

Cx43 调控 NLRP3 炎性小体参与 $\alpha 1$ -AR 激活诱导的心脏急性交感应激

王文博^{1,2,3} 荣毅^{1,2,4} 陈玲^{1,2,3} 李新芝^{1,2,4} 司军强^{1,2,4} 王丽^{1,2,3} 马克涛^{1,2,4}

摘要 目的 观察缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 在苯肾上腺素 (PE) 过度激活心肌细胞 $\alpha 1$ -肾上腺素受体 ($\alpha 1$ -AR) 诱导急性交感应激中的作用。方法 将 H9C2 大鼠心肌细胞随机分为对照组 (control 组)、PE 单独处理组、Gap26 (Cx43 特异性抑制剂) 干预组、Gap26 单独处理组,其中 PE 单独处理组给予 50 $\mu\text{mol/L}$ PE 作用 15 min, Gap26 干预组先给予 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Gap26 预处理 30 min, 再给予 50 $\mu\text{mol/L}$ PE 作用 15 min。Western blot 法及 qRT-PCR 法检测心肌细胞 Cx43、NLRP3 炎性小体、白介素-1 β (IL-1 β)、半胱天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、白介素-18 (IL-18) 蛋白及 mRNA 表达水平,免疫荧光法观察心肌细胞 Cx43 的表达和共定位, ELISA 法检测心肌细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的表达。结果 与 control 组相比, PE 单独处理组 Cx43 及 NLRP3、Caspase-1、IL-18 蛋白及 mRNA 水平均升高; 与 PE 单独处理组比, Gap26 干预后 Cx43 及 NLRP3、Caspase-1、IL-18 的蛋白及 mRNA 水平均降低, 但仍高于 control 组; 同样, 免疫荧光显示 PE 单独处理组心肌细胞 Cx43 蛋白表达增加, 而 Gap26 干预组的 Cx43 表达均较 PE 单独处理组下调; ELISA 结果显示 PE 单独处理组心肌细胞因子 IL-1 β 、IL-18 的表达明显上调, Gap26 干预组则显著下调上述细胞因子的表达。结论 Cx43 可通过调控 NLRP3 炎性小体参与 $\alpha 1$ -AR 激活诱导的心脏急性交感应激。

关键词 缝隙连接蛋白 43; NLRP3 炎性小体; 苯肾上腺素; 心肌细胞; 急性交感应激

中图分类号 R 541.6

2022-01-21 接收

基金项目: 兵团财政科技计划项目 (编号: 2020AB023); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金 (编号: 2020-PT330-003)

作者单位: ¹石河子大学医学院新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 石河子 832000

²国家卫生健康委中亚高发防治重点实验室, 石河子 832000

³石河子大学医学院第一附属医院心血管内科, 石河子 832000

⁴石河子大学医学院生理学教研室, 石河子 832000

作者简介: 王文博, 男, 主治医师, 硕士研究生;

王丽, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mc-mwl@163.com;

马克涛, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: maketao@hotmail.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0534-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.006

心力衰竭的病理进程往往伴随着交感神经系统的过度激活和血浆儿茶酚胺水平的增高。在急性交感应激时, 心脏中的 $\alpha 1$ -肾上腺素受体 ($\alpha 1$ -adrenergic receptor, $\alpha 1$ -AR)、 β -肾上腺素受体 (β -adrenergic receptor, β -AR) 被儿茶酚胺激活, 并通过 NLRP3 炎性小体/半胱天冬氨酸蛋白酶-1/白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 通路 (NLRP3/Caspase-1/IL-18) 介导急性交感应激引起的心脏炎症^[1]。而炎性小体 (NACHT、LRR 和 PYD 结构域蛋白、NLRP) 作为一种大分子蛋白质复合物, 可精细调节 Caspase-1 的激活以及促炎性细胞因子 [如白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18] 的产生和分泌, 其核心作用已被众多研究证实^[2]。

缝隙连接蛋白广泛分布在人体中, 这些跨膜蛋白组装形成称为间隙连接的细胞间通道^[3]。缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 是心脏中连接蛋白最丰富的同工型, 主要存在于心室肌细胞中, 对维持由心肌细胞的协调收缩引起的正常心跳至关重要^[4]。有研究^[5]表明, α 肾上腺素能受体激动剂苯肾上腺素 (phenylephrine, PE) 可增强新生大鼠心肌细胞 Cx43 的表达, 从而导致缝隙连接电导的增强。然而, 在心脏急性交感应激中, Cx43 的作用目前尚未见相关报道。该研究将在心肌细胞水平, 通过急性过度激活 $\alpha 1$ -AR 模拟诱导心脏急性交感应激疾病模型, 探讨 Cx43 在心脏急性交感应激中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 H9C2 大鼠心肌细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。PE 购于 Sigma 公司; Cx43 特异性阻断剂 Gap26 购于 APEX BIO 公司; 兔抗 NLRP3 抗体、兔抗 Cx43 抗体、鼠抗 IL-1 β 抗体购于 Abcam 公司; 兔抗 Caspase-1 抗体、兔抗 IL-18 抗体购于 Proteintech Group 公司; 小鼠抗 GAPDH 抗体、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶

标记的山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 均购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 其余试剂材料均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 H9C2 大鼠心肌细胞培养与实验分组 使用含有 12% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) DMEM 培养基, 将 H9C2 心肌细胞置于含 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中进行培养。当细胞生长至 80% 时进行传代及下一步实验。首先使用 50 μmol/L PE 分别干预 H9C2 心肌细胞 5、15、30、60、120 min, 检测不同时间组心肌细胞 NLRP3 蛋白表达, 确定 PE 干预时间。接下来实验分为 4 组: 对照组 (control 组)、PE 单独处理组、Gap26 干预组、Gap26 单独处理组, 其中 PE 单独处理组中 PE 干预浓度为 50 μmol/L^[6-7], Gap26 干预组给予 0.5 μmol/L 的 Gap26 预处理 30 min 后^[8], 加入 50 μmol/L 的 PE 干预 15 min。

1.2.2 Western blot 法检测 H9C2 大鼠心肌细胞 Cx43、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 的蛋白水平 从心肌细胞中提取蛋白样品, 用 10% 或 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, 室温封闭 2 h (5% 的脱脂奶粉或 BSA)。分别加小鼠抗 GAPDH 抗体 (1 : 1 000)、兔抗 Cx43 抗体 (1 : 1 000)、兔抗 NLRP3 抗体 (1 : 1 000)、兔抗 Caspase-1 抗体 (1 : 1 000)、鼠抗 IL-1β 抗体 (1 : 500)、兔抗 IL-18 抗体 (1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜后孵育二抗 (1 : 5 000、1 : 10 000) 2 h; 洗膜后在暗室内加 ECL 化学发光试剂显影, 压片、曝光。使用 Image J 软件对目的蛋白进行灰度值分析。

1.2.3 免疫荧光法检测 H9C2 大鼠心肌细胞 Cx43 的蛋白表达及定位 将 H9C2 大鼠心肌细胞按分组接种于小皿中, 爬片, 恒温培养。待爬片上心肌细胞形态良好、密度适中时, 分组干预后弃培养基, 预温 PBS 清洗 3 次, 后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗 3 次; 用 0.2% Triton X-100 将各皿细胞透化破膜 3~5 min; PBS 清洗 3 次, 加 5% BSA 置于 37 °C 温箱中封闭 30 min; 弃掉封闭液后, 加入兔抗 Cx43 (1 : 100), 于湿盒中 4 °C 孵育过夜; 次日 37 °C 复温 30 min, PBS 清洗 3 次; 避光加入 FITC 标记的山羊抗兔二抗, 37 °C 恒温孵育 1 h; PBS 清洗 3 次; 避光加入 PI 染核 4 min, PBS 清洗 3 次; 抗荧光淬灭剂封片; 在激光共聚焦显微镜下观察并采集图像, 用 Image J 软件进行分析。

1.2.4 qRT-PCR 法检测 NLRP3、Caspase-1、IL-18、

IL-1β 的 mRNA 表达 分组干预后收集各组细胞, TRIzol 法提取总 RNA; 检测 RNA 的浓度, 使用反转录试剂盒得到 cDNA。PCR 扩增, 运行实时定量 PCR 程序: UDG 酶激活 50 °C 2 min, 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环。根据数据计算每组 Ct 值, 对 NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1β 的 mRNA 表达水平进行分析。实验所有引物见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	大小(bp)
NLRP3	F: CCAGGACGCATCCACCAAGAAG	259
	R: GCTGCCACACGGAAGAAAAGACC	
IL-18	F: GGTGTGCAGATGCCGGTTCAG	179
	R: ACGGTGGTGGAGAACTCTT CAG	
IL-1β	F: TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	118
	R: TGCTCATGTCTCATCTGGAAGG	
Caspase-1	F: GTACAGAGCTGGACTGCGGTATTG	118
	R: AGTCGGCCTCCACTGGTATCTTC	
GAPDH	F: GATGCTGCTGCTGACTATGRCC	200
	R: GTGCTGCAGGATGCATTGCTCTGA	

1.2.5 ELISA 法检测心肌细胞培养液中细胞因子 IL-1β、IL-18 的表达 对照说明书配制标准样品, 按照说明书中具体操作步骤进行实验。所有加样完毕后, 在 15~30 min 内, 使用酶标仪检测各组样品在 450 nm/540 nm 波长处的光密度值 (optical density, OD)。以标准品线性回归曲线为参照, 计算出样品 450 nm/540 nm OD 值对应的浓度。

1.3 统计学处理 应用 IBM SPSS STATISTICS 22.0 统计软件对各组实验数据进行分析。首先检测每组数据的正态分布和方差的均质性。所有数据结果均用平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组之间的数据比较采用单因素方差分析, 分组数据之间的两两比较选用 LSD 法。当 $P < 0.05$ 时, 则认定所得实验数据差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 5.0 软件进一步处理每组数据并绘制统计图。

2 结果

2.1 PE 急性刺激心肌细胞后 NLRP3 表达上调 Western blot 结果显示, 使用 PE 刺激 H9C2 大鼠心肌细胞后, NLRP3 的蛋白水平快速升高, 其表达峰值在药物作用 15 min 时 ($P < 0.01$) 随后蛋白表达开始下降, 见图 1。表明激动心肌细胞 α1-AR 可以引起心肌细胞 NLRP3 炎症小体的激活。

2.2 PE 急性刺激心肌细胞后 Cx43 蛋白表达上调

Western blot 结果显示 给予 PE 刺激后 心肌细胞 Cx43 蛋白表达上调 ($P < 0.01$) ,并且随着 PE 的干预呈现时间依赖性变化 在 PE 刺激 15 min 后表达开始下调 见图 2。表明 Cx43 参与 PE 诱导的心肌细胞急性交感应激过程。

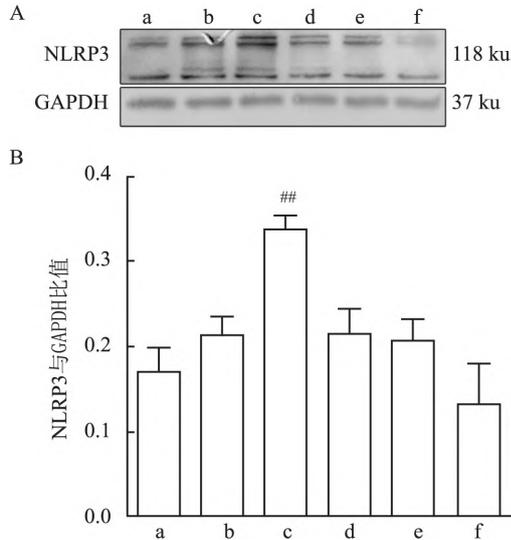


图1 激活心肌细胞 $\alpha 1$ -AR 使 NLRP3 表达上调 ($n = 3$)

A: Western blot 法检测 50 $\mu\text{mol/L}$ PE 干预 H9C2 大鼠心肌细胞后 NLRP3 的蛋白表达; B: A 图的统计结果; a: control 组; b - f: 50 $\mu\text{mol/L}$ PE 干预 H9C2 心肌细胞 5、15、30、60、120 min; 与 control 组比较: ^{##} $P < 0.01$

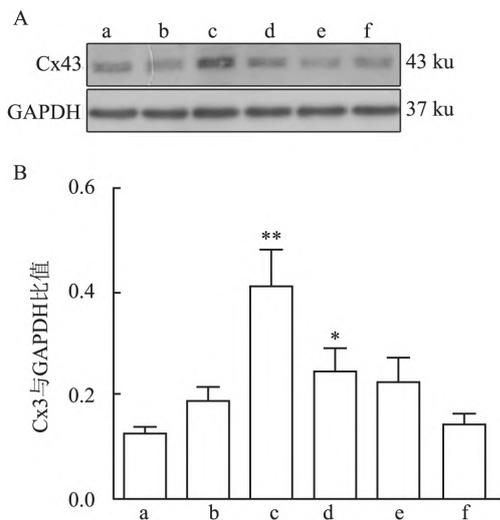


图2 PE 对 H9C2 心肌细胞 Cx43 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

A: PE 干预不同时间对 H9C2 心肌细胞 Cx43 蛋白表达的影响; B: A 图的统计结果; a: control 组; b - f: 50 $\mu\text{mol/L}$ PE 干预 H9C2 心肌细胞 5、15、30、60、120 min; 与 control 组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.3 PE 上调的心肌细胞 Cx43 及 NLRP3/Caspase-1/IL-18 通路蛋白表达可被 Gap26 所逆转 免疫荧光法检测结果显示 Cx43 主要表达在细胞

膜上 与 control 组相比 ,PE 刺激后心肌细胞 Cx43 蛋白表达增加 ($P < 0.01$) (图 3); 而 Gap26 + PE 干预组的 Cx43 表达均较 PE 单独处理组下调 ($P < 0.01$)。用 Western blot 法检测各处理组细胞 NLRP3/Caspase-1/IL-18 通路蛋白及 Cx43、IL-1 β 的蛋白表达 结果如图 4 所示 与 control 组相比 ,PE 单独处理组能上调 NLRP3/Caspase-1/IL-18 通路蛋白及 Cx43、IL-1 β 的蛋白表达 ($P < 0.05$) ; 与 PE 单独处理组相比 ,Gap26 干预组能下调 NLRP3/Caspase-1/IL-18 通路蛋白及 Cx43、IL-1 β 的表达 ($P < 0.05$)。而对于细胞因子 IL-1 β 及 IL-18 ELISA 法测定结果与 Western blot 法检测结果一致(图 5) 差异均有统计学意义。

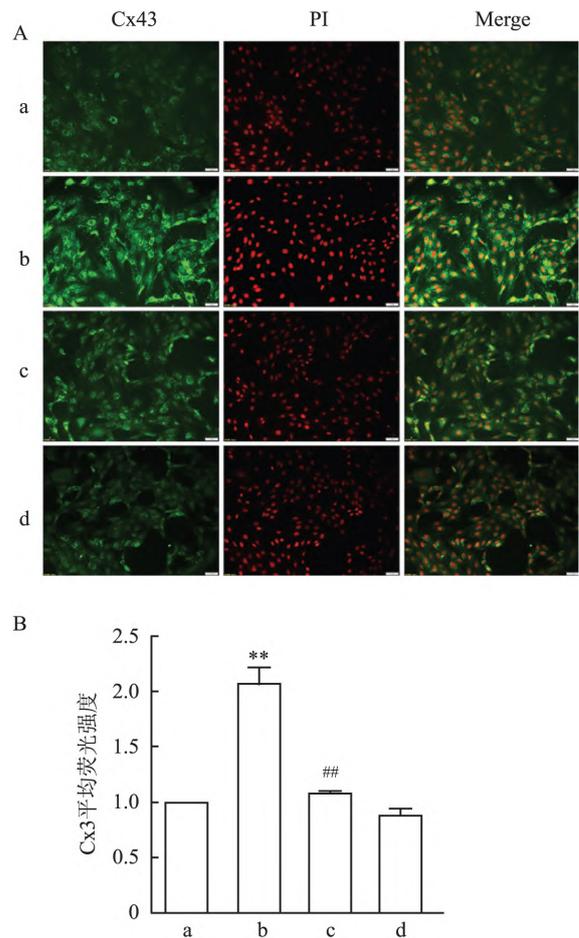


图3 H9C2 心肌细胞上 Cx43 蛋白的表达和定位 ($n = 3$)

A: Cx43 在 H9C2 心肌细胞中的表达和定位 $\times 200$; B: Cx43 的半定量统计分析结果; a: control 组; b: PE 单独处理组; c: Gap26 干预组; d: Gap26 单独处理组; 与 control 组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 PE 单独处理组比较: ^{##} $P < 0.01$; Cx43: 绿色; PI(碘化丙啶): 红色(细胞核); Merge: 合并图

2.4 Gap26 预处理抑制 PE 诱导的心肌细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-1 mRNA 表达上调 qRT-PCR

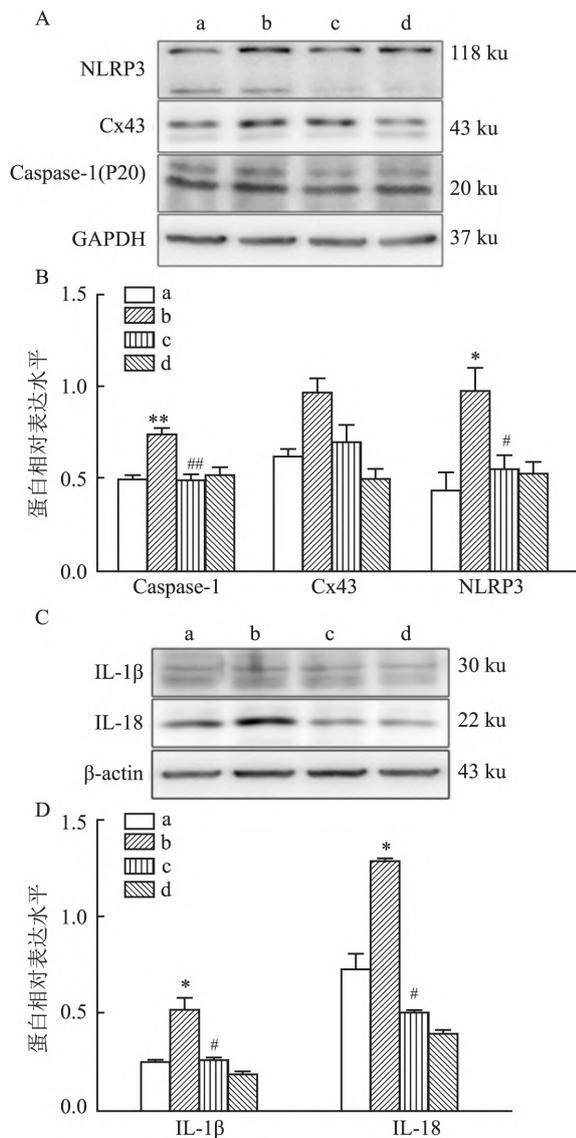


图4 PE及Gap26对H9C2心肌细胞NLRP3/Caspase-1/IL-18通路蛋白及Cx43表达的影响(n=3)

A: PE上调的Cx43、NLRP3、Caspase-1蛋白表达可被Gap26不同程度逆转; B: Caspase-1、Cx43、NLRP3蛋白表达的统计学分析; C: PE上调的心肌细胞因子IL-18、IL-1β表达可被Gap26逆转; D: IL-18、IL-1β蛋白表达的统计学分析; a: control组; b: PE单独处理组; c: Gap26干预组; d: Gap26单独处理组; 与control组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与PE单独处理组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

检测结果显示,与control组相比,PE单独处理组NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1β mRNA水平升高(P < 0.05),而给予Gap26预处理后NLRP3、Caspase-1、IL-18 mRNA水平相对于PE单独处理组降低(P < 0.01); IL-1β mRNA表达水平有所下降,但差异无统计学意义。见图6。

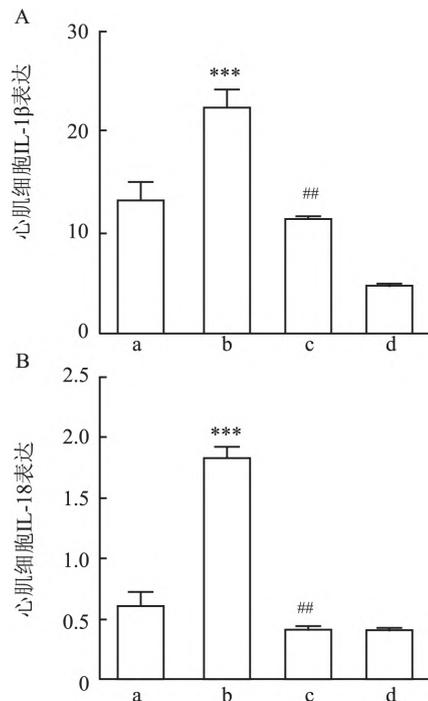


图5 PE及Gap26对H9C2心肌细胞中细胞因子IL-1β、IL-18表达的影响(n=6)

A: ELISA法检测H9C2心肌细胞IL-1β的表达; B: ELISA法检测H9C2心肌细胞IL-18的表达; a: control组; b: PE单独处理组; c: Gap26干预组; d: Gap26单独处理组; 与control组比较: *** P < 0.001; 与PE单独处理组比较: ## P < 0.01

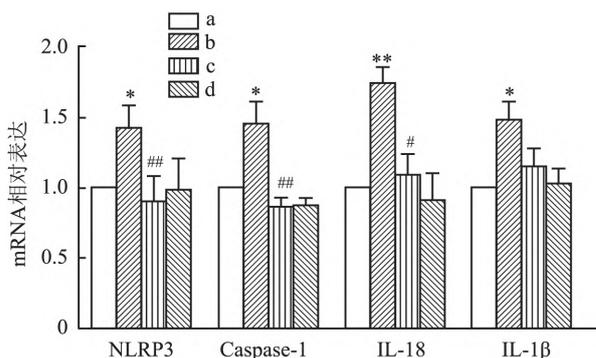


图6 PE及Gap26对H9C2心肌细胞NLRP3、caspase-1、IL-18及IL-1β mRNA水平的影响(n=6)

a: control组; b: PE单独处理组; c: Gap26干预组; d: Gap26单独处理组; 与control组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与PE单独处理组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

3 讨论

心力衰竭是各种心血管疾病的终末期,其发生发展过程主要与神经内分泌失调引起的心肌重塑密

切相关。交感神经系统(SNS)过度激活在心血管病的进程中发挥重要作用,应激刺激引起循环儿茶酚胺浓度升高,进而过量的儿茶酚胺与心脏肾上腺素能受体结合,激活并进一步导致一系列心血管系统病理生理改变。尽管在交感应激早期,机体会表现生理性代偿,但若不加以干预,随着时间延长呈现交感持续刺激时,心脏就会出现失代偿损害:心肌纤维化、肥大等病理性重塑,而炎症因子在此过程中发挥了关键性作用。此外,促炎性刺激可诱导 NLRP3 和其他炎性小体成分在心肌细胞、白细胞和其他非心肌细胞驻留细胞(如成纤维细胞和内皮细胞)中表达^[9-10]。本研究使用 50 $\mu\text{mol/L}$ PE 作用于 H9C2 心肌细胞,通过 Western blot 检测不同 PE 干预时间下 NLRP3 的蛋白表达,结果显示 PE 可上调 NLRP3 表达,并且在 15 min 时达到最高峰,之后逐渐下降,由此证实急性过度激活心脏 $\alpha 1\text{-AR}$ 诱导的急性交感应激中, NLRP3 炎性小体被激活并进一步介导心脏炎症反应。

众所周知, Cx43 在心房和心室肌细胞中表达最丰富,广泛参与疾病的发展。Cx43 在调节细胞生长、凋亡、微管稳定性、细胞周期、分化、增殖和细胞信号传导中起重要作用^[11-12]。在实验动物水平及细胞水平模拟心肌肥大反应的相关研究中, Cx43 的分布和表达变化一直是研究的主要焦点,这些变化背后的分子机制和信号通路的研究还不够深入^[13-15]。在关于激活 $\alpha 1\text{-AR}$ 表达心脏 Cx43 信号通路研究中,显示 PE 对乳鼠心肌细胞 24 h 的刺激导致 Cx43 蛋白和 mRNA 浓度依赖性升高,表明 $\alpha 1\text{-AR}$ 刺激对 Cx43 蛋白和 mRNA 水平均有调节。Cx43 的增加可以被 PKC 抑制剂 BIM I 或 MAPK 信号通路的抑制剂阻断,表明 p38 和 p42/44 参与了这一过程^[16]。本研究中,给予 PE 干预 H9C2 心肌细胞, Cx43 的蛋白表达上调,其峰值出现在 15 min 时;免疫荧光显示 Cx43 的表达主要分布在细胞质和细胞膜中,说明 Cx43 参与了 $\alpha 1\text{-AR}$ 急性过度激活诱导的心脏炎症过程。而在此急性炎症过程中, Cx43 及 NLRP3 蛋白表达均有上调,且随时间的变化趋势基本一致,故推测在心脏急性交感应激时, Cx43 与 NLRP3 之间可能存在相关性(图 1~3)。故在接下来的研究中,增加了 Cx43 特异性抑制剂 Gap26 来进一步探讨 Cx43 与 NLRP3 炎性小体之间的作用关系。

在脂多糖诱导急性肾损伤的研究及另一项慢性眼病研究模型中, Cx43 表达的增加与 NLRP3 表达

直接相关,增加 Cx43 水平有助于炎症小体激活^[17-18]。在受损的心肌细胞中 NLRP3 炎性小体的形成是保护性机制还是进一步损伤机制尚不清楚。本研究的主要目的是希望在急性交感应激过程与 NLRP3/caspase-1/IL-18 通路中寻找一个新的治疗靶点。Western blot、qRT-PCR 检测发现, Cx43 特异性抑制剂 Gap26 预处理组与单独 PE 干预组相比, IL-1 β 与 NLRP3、Caspase-1 及 IL-18 的蛋白及 mRNA 表达水平均下调(图 4~6)。使用 PE 急性过度刺激 H9C2 心肌细胞上的 $\alpha 1\text{-AR}$,可以引起 NLRP3、Caspase-1、IL-18 及 IL-1 β 的蛋白与 mRNA 表达水平增加;ELISA 法检测同样提示 PE 干预 H9C2 心肌细胞,可以使细胞因子 IL-1 β 及 IL-18 表达上调,而使用特异性抑制剂 Gap26 可以下调其表达。

综上, Cx43 可通过调控 NLRP3 炎性小体激活参与 $\alpha 1\text{-AR}$ 激活诱导的心脏急性交感应激。

参考文献

- [1] Xin J Z, Wu J M, Hu G M, et al. $\alpha 1\text{-AR}$ overactivation induces cardiac inflammation through NLRP3 inflammasome activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(3): 311-8.
- [2] Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(4): 203-14.
- [3] Zhang Q W, Bai X, Liu Y, et al. Current concepts and perspectives on connexin43: A mini review[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(11): 1049-57.
- [4] Vuyst E D, Boengler K, Antoons G, et al. Pharmacological modulation of connexin-formed channels in cardiac pathophysiology[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163(3): 469-83.
- [5] Rojas Gomez D M, Schulte J S, Mohr F W, et al. Alpha-1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, 377(1): 77-85.
- [6] Zheng J L, Tian J, Wang S N, et al. Stachydrine hydrochloride suppresses phenylephrine-induced pathological cardiac hypertrophy by inhibiting the calcineurin/nuclear factor of activated T-cell signalling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173386.
- [7] Conejeros C, Parra V, Sanchez G, et al. Miro1 as a novel regulator of hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 141: 65-9.
- [8] Hawat G, Benderdour M, Rousseau G, et al. Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury[J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(3): 583-92.
- [9] Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(49): 19725-30.
- [10] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activa-

- tion of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2011, 123(6): 594 – 604.
- [11] Schulz R, Gorge P M, Gorge A, et al. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 153: 90 – 106.
- [12] Gago-Fuentes R, Bechberger J F, Varela-Eirin M, et al. The C-terminal domain of connexin43 modulates cartilage structure *via* chondrocyte phenotypic changes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 73055 – 67.
- [13] Teunissen B E J, Jongma H J, Bierhuizen M F A. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodelling [J]. *Eur Heart J*, 2004, 25(22): 1979 – 89.
- [14] Shl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 228 – 32.
- [15] Boot M J, Gittenberger-de G A C, Poelmann R E, et al. Connexin43 levels are increased in mouse neural crest cells exposed to homocysteine [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2006, 76(2): 133 – 7.
- [16] Salameh A, Krautblatter S, Baessler S, et al. Signal transduction and transcriptional control of cardiac connexin43 up-regulation after α 1-adrenoceptor stimulation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 326(1): 315 – 22.
- [17] Huang Y R, Mao Z M, Zhang Z, et al. Connexin43 contributes to inflammasome activation and LPS-initiated acute renal injury *via* modulation of intracellular oxidative status [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(16): 1194 – 212.
- [18] Mugisho O O, Rupenthal I D, Paquet-Durand F, et al. Targeting connexin hemichannels to control the inflammasome: the correlation between connexin43 and NLRP3 expression in chronic eye disease [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(10): 855 – 63.

Cx43 regulates NLRP3 inflammasome and participates in α 1-AR activation induced cardiac acute sympathetic stress

Wang Wenbo^{1,2,3}, Rong Yi^{1,2,4}, Chen Ling^{1,2,3}, Li Xinzhi^{1,2,4}, Si Junqiang^{1,2,4}, Wang Li^{1,2,3}, Ma Ketao^{1,2,4}

[¹Ministry of Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000; ²NHC Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases, Shihezi 832000; ³Dept of Cardiology, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000; ⁴Dept of Physiology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000]

Abstract Objective To investigate the role of connexin 43 (Cx43) in acute sympathetic stress induced by phenylephrine (PE) overactivation of α 1-adrenergic receptor (α 1-AR) in cardiomyocytes. **Methods** Cardiomyocytes of H9C2 rats were randomly divided into control group, PE alone treatment group, Gap26 (Cx43 specific inhibitor) intervention group and Gap26 alone treatment group. PE alone treatment group was treated with 50 μ mol/L PE for 15 min. The Gap26 intervention group was pretreated with 0.5 μ mol/L Gap26 for 30 min, and then treated with 50 μ mol/L PE for 15 min. The protein and mRNA expression levels of Cx43, NLRP3 inflammasome, interleukin-1 β (IL-1 β), Caspase-1, interleukin-18 (IL-18) were detected by Western blot and qRT-PCR. The expression and co-location of Cx43 in cardiomyocytes were observed by immunofluorescence assay, and the expression of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 in cardiomyocytes was detected by ELISA. **Results** Compared with control group, the protein and mRNA levels of Cx43, NLRP3, Caspase-1 and IL-18 in PE group increased. Compared with PE alone treatment group, the protein and mRNA levels of Cx43, NLRP3, Caspase-1 and IL-18 decreased after Gap26 intervention, but they were still higher than those of control group. Similarly, immunofluorescence showed that Cx43 protein expression increased in PE alone group, while Cx43 expression was down-regulated in Gap26 intervention group compared with PE alone group. ELISA results showed that the expression of IL-1 β and IL-18 was significantly up-regulated in PE alone group, but down-regulated in Gap26 intervention group. **Conclusion** Cx43 is involved in α 1-AR activation induced cardiac acute sympathetic stress by regulating NLRP3 inflammasome.

Key words connexin 43; NLRP3 inflammasome; phenylephrine; myocardial cells; acute sympathetic stress