

OTUD3 敲除对神经干细胞中缝隙连接蛋白 43 表达的影响

徐同迎 焦倩 姜宏

(青岛大学基础医学院,山东省神经相关疾病的机制与重点防治实验室,山东省沿海地区神经退变疾病协同创新中心,山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 探讨 OTUD3 敲除对神经干细胞(NSCs)中缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达的影响。方法 分离提取妊娠第 14 天时野生型(WT)和 OTUD3^{-/-} 胚胎小鼠的脑皮质组织蛋白,同时进行体外培养 WT-NSCs 和 OTUD3^{-/-}-NSCs,并根据细胞状态传代,传代至第 3 代时,应用倒置显微镜观察第 1、3 天时 OTUD3^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs 生长状态。用细胞免疫荧光染色检测 WT-NSCs 和 OTUD3^{-/-}-NSCs 中 Ki67、Nestin 和 β -tubulin III 的表达情况,应用 Western blotting 方法检测 WT-NSCs 和 OTUD3^{-/-}-NSCs 中以及 WT 和 OTUD3^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质组织中 OTUD3 和 Cx43 表达变化情况。结果 培养并传代至第 3 代的 WT-NSCs 和 OTUD3^{-/-}-NSCs 生长状态良好,细胞免疫荧光染色显示 Ki67、Nestin 和 β -tubulin III 染色阳性。与 WT-NSCs 相比,OTUD3^{-/-}-NSCs 中 OTUD3 和 Cx43 表达量显著下调($t=16.82, 3.21, P<0.05$);与 WT 胚胎小鼠相比,OTUD3^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质组织中 OTUD3 和 Cx43 表达量显著下调($t=10.04, 20.41, P<0.05$)。结论 OTUD3 敲除后,NSCs 中 Cx43 表达量显著下调,Cx43 可能在促进 NSCs 的增殖和神经发育过程中发挥调节作用。

[关键词] 神经干细胞;连接蛋白 43;去泛素酶类;小鼠,基因敲除;细胞周期;细胞增殖

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

EFFECT OF OTUD3 KNOCKOUT ON THE EXPRESSION OF CONNEXIN 43 IN NEURAL STEM CELLS XU Tongying, JIAO

Qian, JIANG Hong (School of Basic Medicine, Qingdao University, Shandong Provincial Key Laboratory of Pathogenesis and Prevention of Neurological Disorders and State Key Disciplines, Shandong Provincial Collaborative Innovation Center for Neurodegenerative Disorders, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of OTUD3 knockout on the expression of connexin 43 (Cx43) in neural stem cells (NSCs). **Methods** Brain cortex tissue protein was isolated and extracted from wild-type (WT) and OTUD3^{-/-} embryonic mice on day 14 of gestation, and WT-NSCs and OTUD3^{-/-}-NSCs were cultured *in vitro* and subcultured according to cell status. After subculture to the third generation, an inverted microscope was used to observe the growth state of OTUD3^{-/-}-NSCs and WT-NSCs on days 1 and 3. Immunofluorescent staining was used to measure the expression of Ki67, Nestin, and β -tubulin III in WT-NSCs and OTUD3^{-/-}-NSCs, and Western blotting was used to measure the changes in the expression of OTUD3 and Cx43 in WT-NSCs, OTUD3^{-/-}-NSCs, and the cerebral cortex of WT and OTUD3^{-/-} embryonic mice. **Results** WT-NSCs and OTUD3^{-/-}-NSCs cultured and subcultured to the third generation showed a good growth status, and immunofluorescent staining showed positive staining of Ki67, Nestin, and β -tubulin III. Compared with WT-NSCs, OTUD3^{-/-}-NSCs had significant reductions in the expression levels of OTUD3 and Cx43 ($t=16.82, 3.21, P<0.05$), and compared with WT embryonic mice, OTUD3^{-/-} embryonic mice also had significant reductions in the expression levels of OTUD3 and Cx43 in the cerebral cortex ($t=10.04, 20.41, P<0.05$). **Conclusion** The expression of Cx43 in NSCs is significantly downregulated after OTUD3 knockout, and Cx43 may play a regulatory role in promoting the proliferation of NSCs and neurodevelopment.

[KEY WORDS] Neural stem cells; Connexin 43; Deubiquitinating enzymes; Mice, knockout; Cell cycle; Cell proliferation

神经干细胞(NSCs)存在于哺乳动物胚胎的脑组织以及成年人侧脑室室管膜下区和海马齿状回颗粒下层中,具有自我增殖和分化的潜能^[1-3]。中枢神经系统受到损伤以后,静止的 NSCs 被激活并参与到中枢神经系统的损伤修复过程中^[4]。去泛素化酶(DUBs)可以逆转蛋白质泛素化降解过程,进而影响多种生物学过程,包括细胞凋亡和自噬、调节细胞

周期和干细胞的发育等^[5-8]。卵巢肿瘤结构域蛋白(OTUs)是 DUBs 家族成员,具有内源性连锁特异性^[9-10]。OTUD3 是 OTUs 亚家族中的一员,与肿瘤的发生发展和神经退行性疾病关系密切,其底物包括 PTEN、GRP78、p53 和 IRP2 蛋白^[8,11-14]。缝隙连接蛋白(Cx)通道是机体大多数组织中相邻细胞间及细胞与细胞外区域进行物质交换和信号交流主要通道^[15-16]。其中 Cx43 是 Cx 中分布最广泛家族成员^[17],与基因转录、发育、自噬调节、细胞内运输和细胞外小泡介导远程通讯有关^[18-20]。OTUD3 是

[收稿日期] 2022-12-15; **[修订日期]** 2023-01-28

[基金项目] 山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2019-ZD31);山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC072)

[通讯作者] 姜宏,Email:hongjiang@qdu.edu.cn

否调节 Cx43 而参与 NSCs 增殖分化等生物学行为,目前尚未见相关报道。本研究利用 *OTUD3* 敲除 (*OTUD3*^{-/-}) 的胚胎小鼠,于体外分离并且培养 *OTUD3*^{-/-} 和野生型 (WT) 胚胎小鼠 NSCs,检测 *OTUD3* 对 NSCs 中 Cx43 表达影响,同时提取胚胎小鼠脑皮质蛋白,验证 *OTUD3* 对 Cx43 表达影响。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

表皮生长因子 (EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、N-2 supplement、B-27 supplement 购自美国 Gibco 公司;GAPDH 抗体和 Cx43 抗体购自美国 CST 公司;*OTUD3* 抗体购自美国 Abcam 公司;Ki67 抗体、Nestin 抗体、 β -tubulin III 抗体购自美国 Millipore 公司;羊抗兔 IgG-HRP 购自中国爱博泰克生物公司;ECL 发光液购自美国 Millipore 公司。

1.2 实验动物及其饲养

3 月龄 *OTUD3*^{-/-} 小鼠 (中国军事医学科学院提供) 和 3 月龄 WT 小鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司提供) 置于恒温 (21±2) °C、恒湿 (50±10)%、12-12 h 昼夜交替光照下饲养,自由饮水与取食。同种基因型小鼠之间进行交配,待妊娠第 14 天时,异氟烷气体麻醉孕鼠,以体积分数 0.75 的乙醇消毒腹部后,沿腹中线剪开,使用镊子取出串珠样 *OTUD3*^{-/-} 小鼠和 WT 胚胎小鼠各 3 只,置于预冷的 PBS 中,用于后续实验。

1.3 实验方法

1.3.1 胚胎小鼠脑皮质组织的提取 剥离出所有 *OTUD3*^{-/-} 和 WT 胚胎小鼠的全部脑组织,剔除脑膜后分离脑皮质组织。取出每只胚胎小鼠的一部分脑皮质组织置入 1.5 mL EP 管内,加入配置好的蛋白裂解液,组织研磨仪研磨 1 min,冰上裂解 30 min 后,4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min,提取脑皮质组织蛋白用于后续实验。

1.3.2 NSCs 的分离和传代 将 *OTUD3*^{-/-} 和 WT 胚胎小鼠剩余部分脑皮质组织,剪碎至 1 mm×1 mm×1 mm,使用 1 mL 枪头反复吹打组织直至形成细胞悬液,400 目筛网过滤后置于大离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;加入完全培养液重悬细胞,细胞计数后将其接种于 75 cm² 培养瓶中,接种密度约为 1×10⁸ 个/L,并分别标记为 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs,置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 细胞培养箱中进行培养;隔天添加完全培养基,培养 4~6 d 时,根据细胞状态 (细胞

生长所形成神经球聚集增多时) 传代,传至第 3 代时,于倒置显微镜下观察第 1、3 天时 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs 的生长状态。

1.3.3 NSCs 的培养 将高压灭菌后的玻片置于 24 孔板中,加入多聚赖氨酸溶液室温下孵育 5 min,0.01 mol/L PBS 洗 2 次后,超净台晾干;将传代至第 3 代的神神经球消化为单细胞后,调整细胞密度为 1×10⁹ 个/L,接种细胞悬液至上面制备好的玻片上,置于 37 °C、含体积分数为 0.05 的 CO₂ 细胞培养箱中培养。取 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs 各 3 个玻片,使用完全培养基贴壁培养 3 d 以后,用于检测 Ki67;取 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs 各 6 个玻片,使用分化培养基贴壁培养 7 d 以后,用于检测 Nestin 和 β -tubulin III。

1.3.4 细胞免疫荧光染色 将前面培养 3 d 或 7 d 的 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs 玻片从 24 孔板取出,吸弃培养基,用 4 °C 预冷的 4% PFA 溶液室温固定 30 min,0.01 mol/L 的 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入封闭液,室温下封闭 1 h;向使用完全培养基培养 3 d 的 NSCs 中加入 Ki67 一抗 (1:400),向使用分化培养基培养 7 d 的 NSCs 中加入 Nestin 一抗 (1:100) 和 β -tubulin III 一抗 (1:500),室温孵育 1 h 后,4 °C 摇床孵育过夜,0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入 AF555 或 AF488 标记的荧光二抗 (1:500),室温避光孵育 1 h;将含 DAPI 封片液滴于载玻片上,将生长细胞的玻片面缓慢接触封片液,避光保存,倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.5 Western blotting 方法检测脑皮质和 NSCs 中 *OTUD3* 和 Cx43 表达水平 NSCs 培养至第 3 代时,传代后接种于 6 孔板 (2 mL/孔) 中,每组设置 3 个复孔,调整密度为 1×10⁸ 个细胞/L;继续培养至细胞融合度约 90% 时,加入已配置好的蛋白裂解液,组织研磨仪研磨 1 min,冰上裂解 30 min 后,4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min,提取 NSCs 蛋白用于后续实验。配制聚丙烯酰胺凝胶,向凝胶孔加入 1.3.1 中制备好的脑皮质组织蛋白样品或 NSCs 蛋白样品,电压调至 80 V 进行 SDS 蛋白电泳,待样品进入分离胶后,将电压调为 120 V,PVDF 转膜,使用 100 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h 以后,分别加入 *OTUD3* 一抗 (1:1 000) 和 Cx43 一抗 (1:1 000),4 °C 摇床孵育过夜,次日使用 TBST 洗条带 3 次,每次 10 min;根据一抗种属加入 HRP 偶联的山羊抗兔二抗 (1:10 000),于室温下孵育 1 h 后,TBST 漂洗 3 次,每次洗 10 min,ECL 化学发光液避光孵育

1 min 显影。使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以 GAPDH 条带结果作为内参照,计算目的蛋白的相对表达量。

2 结 果

2.1 WT 和 *OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠 NSCs 的鉴定

倒置显微镜下观察显示,第 3 代 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 和 WT-NSCs 培养 1 d 时均形成由多细胞组成的神经球,培养 3 d 时增殖形成的神经球均增多(图 1)。细胞免疫荧光染色检测结果显示,使用完全培养基培养 3 d 时的 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 当中 Ki67 均染色阳性(图 2A),图中绿色为 Ki67;使用分化培养基培养至第 7 天 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 中 Nestin 和 β -tubulin III 均染色阳性(图 2B),其中绿色为 Nestin,红色为 β -tubulin III。通过以上结果可以鉴定本研究中原代提取培养的细胞为 NSCs,具有增殖和分化能力。

2.2 WT 和 *OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠 NSCs 和脑皮质组织中 *OTUD3*、Cx43 的表达情况

Western blotting 法检测结果显示,WT-NSCs 当中 *OTUD3*、Cx43 条带灰度值分别为 1.023 ± 0.062 、 1.035 ± 0.093 ; *OTUD3*^{-/-}-NSCs 中无 *OTUD3* 蛋白表达,Cx43 条带的灰度值为 0.592 ± 0.102 。WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 的上述两种蛋白比较,差异均有显著意义($t = 16.82, 3.21, P < 0.05$),见图 3A。WT 胚胎小鼠脑皮质组织中 *OTUD3*、Cx43 条带的灰度值分别为 $0.929 \pm 0.060, 0.905 \pm 0.0149$; *OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质组织中无 *OTUD3* 蛋白表达,Cx43 条带灰度值为 0.522 ± 0.012 ,WT 胚胎小鼠和 *OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质组织上述两种蛋白比较,差异均具有显著意义($t = 10.04, 20.41, P < 0.05$),见图 3B。

3 讨 论

NSCs 是一类具有自我增殖和分化潜能的细胞,在神经系统发育和修复受损神经组织中发挥重要作用,具有修复和代替受损脑组织的功能,并可以重建部分神经功能环路^[3,21-22]。近年研究发现神经系统疾病的发生发展与缝隙连接密切相关,缝隙连接在细胞间信息传递、物质交换和维持内环境稳态方面都发挥重要作用^[23]。Cx43 在神经元与星形胶质细胞、星形胶质细胞与少突胶质细胞间可以传递死亡信号以及钙超载等危险信号^[24]。也有研究表明 Cx43 可以通过氧化应激和内质网应激调控肾小

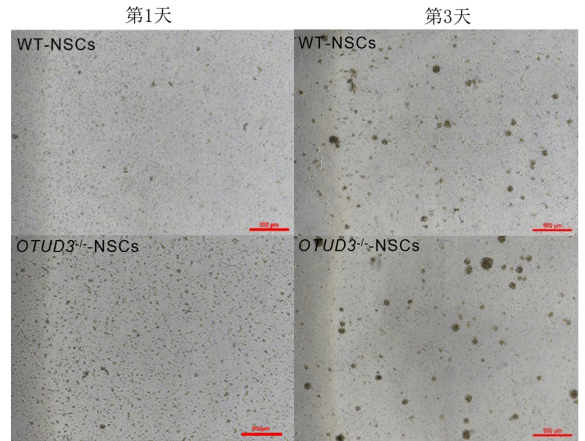
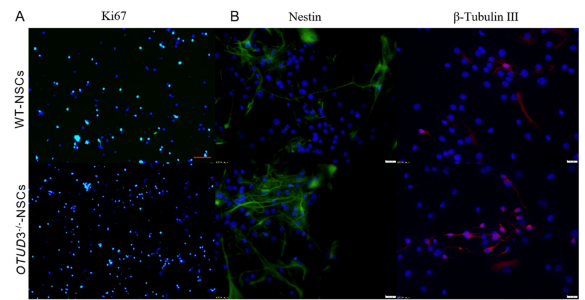
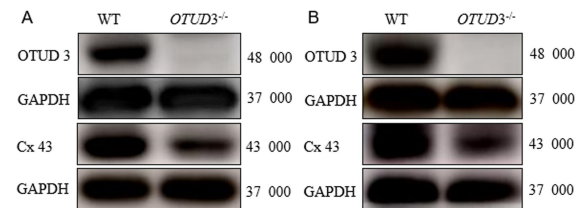


图 1 第 3 代 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 培养第 1、3 天时神经球生长状况(4 倍)



A:第 3 代 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 培养第 3 天时 Ki67 染色呈阳性(细胞免疫荧光染色,10 倍);B:第 3 代 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 培养第 7 天时 Nestin 和 β -Tubulin III 染色阳性(细胞免疫荧光染色,40 倍)

图 2 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 中 Ki67、Nestin 和 β -Tubulin III 表达情况



A:WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 中 *OTUD3*、Cx43 表达;B:WT 和 *OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质中 *OTUD3*、Cx43 表达

图 3 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 以及 WT 和 *OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质中 *OTUD3*、Cx43 的表达情况

管上皮细胞损伤,抑制 Cx43 后可以促进细胞生长并提升细胞对于应激情况的抵抗能力^[25],但目前具体机制尚不清楚。NSCs 存在于哺乳动物胚胎期的大脑,胚胎小鼠大脑皮质中有大量的 NSCs,Cx43 在胚胎发育期的脑组织中广泛表达,本研究选择胚胎期第 14 天小鼠的脑皮质区,体外培养 NSCs,探讨 Cx43 调控 NSCs 生物行为学的具体机制。

泛素化信号通路在神经发育和神经元生理功能中发挥重要的调控作用,而 DUBs 作为调节蛋白泛素化的中心分子,其对神经系统的调控受到越来越多的关注。*OTUD3* 属于 DUBs 家族,是 *OTUs* 亚

家族中的一员^[11],其功能具有组织特异性和时间特异性,可通过调控不同靶蛋白的稳定性,调控细胞周期和细胞增殖^[26]。OTUD3 可以稳定 PTEN 蛋白表达水平,PTEN 的缺乏可以调控细胞周期相关基因 *cyclin B2* 和 *cyclin D1*,进而缩短细胞周期,影响 NSCs 增殖分化^[11]。本研究中使用异氟烷气体麻醉孕鼠以后取出串珠样胚胎小鼠,分离提取胚胎 WT 和 *OTUD3*^{-/-} 小鼠 NSCs,分别标记为 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs,在完全培养基中进行培养,倒置显微镜下观察其生长状态良好。Ki67 是一种表达于细胞周期 G₁、S、G₂ 和 M 期的核抗原,其表达水平能够客观地反映细胞的增殖状态。本研究应用细胞免疫荧光染色对第 3 代培养了 3 d 的 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 进行 Ki67 检测,结果为阳性;应用细胞免疫荧光染色对第 3 代培养了 7 d 的 WT-NSCs 和 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 进行 Nestin 和 β -tubulin III 检测,结果为阳性,提示本研究中原代提取培养的细胞为 NSCs,并有增殖和分化能力。

接下来,本研究应用 Western blotting 技术检测敲除 *OTUD3* 后胚胎小鼠 NSCs 和脑皮质组织中 *OTUD3* 蛋白的表达情况,结果显示,与 WT-NSCs 相比,*OTUD3*^{-/-}-NSCs 无 *OTUD3* 蛋白的表达;与 WT 胚胎小鼠脑皮质组织相比,*OTUD3*^{-/-} 胚胎小鼠脑皮质组织也无 *OTUD3* 蛋白的表达,提示胚胎小鼠 NSCs 中和脑皮质组织中 *OTUD3* 敲除成功。

Cx43 参与细胞增殖过程,通过控制 *cyclin D1*-*CDK4-p27* 复合体的核转位,进而阻断细胞周期进程^[27]。NSCs 发育的同时,Cx 亚型的表达模式也会发生变化,Cx43 在胚胎发育期的脑组织中广泛表达^[28]。随着 NSCs 在体内分化为神经元,Cx43 表达水平下降,但是 Cx43 在 NSCs 表达调控仍需进一步研究。为明确 Cx43 在 *OTUD3* 调控 NSCs 生物学功能中的作用,本研究采用 Western blotting 技术检测敲除 *OTUD3* 后胚胎小鼠脑皮质和 NSCs 中 Cx43 的表达情况,结果显示 *OTUD3*^{-/-}-NSCs 中 Cx43 表达水平明显降低,同时在动物水平进一步验证,显示 *OTUD3*^{-/-} 后 Cx43 表达明显降低,由于 Cx43 是 NSCs 增殖的抑制蛋白,通过改变细胞周期进展参与调控 NSCs 的增殖行为。而 *OTUD3* 可以通过调控下游靶蛋白,调控细胞增殖和分化。由此推测 *OTUD3* 可能通过调控 Cx43 影响 NSCs 的增殖和分化等生物学行为,进而影响神经发生。

综上所述,敲除 *OTUD3* 后体外培养的 NSCs 中 Cx43 表达下降,可能通过影响细胞间的连接,进

而促进 NSCs 的增殖,在神经发育过程发挥着重要作用。但 *OTUD3* 是否通过影响其泛素化水平影响 Cx43 表达,具体调节机制仍需进一步探讨。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学医学部伦理委员会的审核批准(文件号 QDU-AEC-20233-47)。所有实验过程均遵照《伦理委员会标准/守则》的条例进行。

作者声明:所有作者均参与了研究的设计、论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] HUANG L, ZHANG L B. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury[J]. Prog Neurobiol, 2019,173:1-17.
- [2] ANDREOTTI J P, SILVA W N, COSTA A C, et al. Neural stem cell niche heterogeneity[J]. Semin Cell Dev Biol, 2019, 95:42-53.
- [3] URBÁN N, BLOMFIELD I M, GUILLEMOT F. Quiescence of adult mammalian neural stem cells: A highly regulated rest [J]. Neuron, 2019,104(5):834-848.
- [4] PICCIN D, YU F G, MORSHEAD C M. Notch signaling imparts and preserves neural stem characteristics in the adult brain[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(10):1541-1550.
- [5] MEVISSSEN T E T, KOMANDER D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation[J]. Annu Rev Biochem, 2017,86:159-192.
- [6] JOLLY L A, KUMAR R, PENZES P, et al. The DUB club: Deubiquitinating enzymes and neurodevelopmental disorders [J]. Biol Psychiatry, 2022,92(8):614-625.
- [7] LANGE S M, ARMSTRONG L A, KULATHU Y. Deubiquitinases: From mechanisms to their inhibition by small molecules[J]. Mol Cell, 2022,82(1):15-29.
- [8] ZHAO Q Q, LI Y X, DU X X, et al. Effects of deubiquitylases on the biological behaviors of neural stem cells[J]. Dev Neurobiol, 2021,81(6):847-858.
- [9] MEVISSSEN T E, HOSPENTHAL M K, GEURINK P P, et al. OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis[J]. Cell, 2013,154(1):169-184.
- [10] DU J S, FU L, SUI Y L, et al. The function and regulation of OTU deubiquitinases[J]. Front Med, 2020,14(5):542-563.
- [11] YUAN L, LV Y R, LI H C, et al. Deubiquitylase OTUD3 regulates PTEN stability and suppresses tumorigenesis [J]. Nat Cell Biol, 2015,17(9):1169-1181.
- [12] JIA F J, LI H C, JIAO Q, et al. Deubiquitylase OTUD3 prevents Parkinson's disease through stabilizing iron regulatory protein 2[J]. Cell Death Dis, 2022,13(4):418.
- [13] DU T D, LI H C, FAN Y S, et al. The deubiquitylase OTUD3 stabilizes GRP78 and promotes lung tumorigenesis [J]. Nat Commun, 2019,10(1):2914.
- [14] PU Q, LV Y R, DONG K, et al. Tumor suppressor OTUD3

- induces growth inhibition and apoptosis by directly deubiquitinating and stabilizing p53 in invasive breast carcinoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):583.
- [15] WHITE T W, BRUZZONE R, PAUL D L. The connexin family of intercellular channel forming proteins [J]. *Kidney Int*, 1995, 48(4):1148-1157.
- [16] BONACQUISTI E E, NGUYEN J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions[J]. *Cancer Lett*, 2019, 442:439-444.
- [17] AASEN T, MESNIL M, NAUS C C, et al. Gap junctions and cancer: Communicating for 50 years [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(1):74.
- [18] OLK S, TURCHINOVICH A, GRZENDOWSKI M, et al. Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration[J]. *Glia*, 2010, 58(4):494-505.
- [19] CRESPIN S, FROMONT G, WAGER M, et al. Expression of a gap junction protein, connexin43, in a large panel of human gliomas: New insights[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(8):1742-1752.
- [20] DANG X T, DOBLE B W, KARDAMI E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 242(1-2):35-38.
- [21] BRAND A, LIVESEY F. Neural stem cell biology in vertebrates and invertebrates: More alike than different? [J]. *Neuron*, 2011, 70(4):719-729.
- [22] STENUDD M, SABELSTRÖM H, FRISÉN J. Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair[J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72(2):235-237.
- [23] JOURDEUIL K, TANEYHILL L A. The gap junction protein connexin 43 controls multiple aspects of cranial neural crest cell development[J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(4):jcs235440.
- [24] HACKLEY C, MULHOLLAND E, KIM G J, et al. A transiently expressed connexin is essential for anterior neural plate development in *Ciona intestinalis*[J]. *Development*, 2013, 140(1):147-155.
- [25] BI M X, NACZKI C, KORITZINSKY M, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth[J]. *EMBO J*, 2005, 24(19):3470-3481.
- [26] DHARA A, SINAI A P. A cell cycle-regulated toxoplasma deubiquitinase, TgOTUD3A, targets polyubiquitins with specific lysine linkages[J]. *mSphere*, 2016, 1(3):e00085-e00016.
- [27] HINO H, DAI P, YOSHIDA T, et al. Interaction of Cx43 with Hsc70 regulates G1/S transition through CDK inhibitor p27[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15365.
- [28] NGEZAHAYO A, RUHE F A. Connexins in the development and physiology of stem cells[J]. *Tissue Barriers*, 2021, 9(4):1949242.
- (本文编辑 耿波 厉建强)
-
- (上接第99页)
- [10] PAWADE T A, NEWBY D E, DWECK M R. Calcification in aortic stenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(5):561-577.
- [11] AIKAWA E, LIBBY P. A rock and a hard place: Chiseling away at the multiple mechanisms of aortic stenosis[J]. *Circulation*, 2017, 135(20):1951-1955.
- [12] PASIPOULARIDES A. Calcific aortic valve disease: Part 1—Molecular pathogenetic aspects, hemodynamics, and adaptive feedbacks[J]. *J of Cardiovasc Trans Res*, 2016, 9(2):102-118.
- [13] YU J H, LI S, QI J, et al. Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3):193.
- [14] DING B Z, MA G P, WANG Z N, et al. Mechanisms of kidney cell pyroptosis in chronic kidney disease and the effects of traditional Chinese medicine[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:1173324.
- [15] 朱晔, 朱伟平, 李巍, 等. 表氧化二十碳三烯酸对小鼠肾缺血再灌注损伤 NLRP3 炎症小体表达及细胞焦亡的影响[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(10):779-784.
- [16] XU Y J, ZHENG L, HU Y W, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis[J]. *Clin Chimica Acta*, 2018, 476:28-37.
- [17] ZHOU J M, QIU J J, SONG Y W, et al. Pyroptosis and degenerative diseases of the elderly[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2):94.
- [18] LINDMAN B R, CLAVEL M A, MATHIEU P, et al. Calcific aortic stenosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2:16006.
- [19] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: Mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):128.
- [20] ZENG C, WANG R Q, TAN H M. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7):1345-1357.
- [21] SHI J J, GAO W Q, SHAO F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4):245-254.
- [22] NEW S E P, AIKAWA E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification[J]. *Circ Res*, 2011, 108(11):1381-1391.
- [23] ÉVA SIKURA K, COMBI Z, POTOR L, et al. Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization[J]. *J Adv Res*, 2021, 27:165-176.
- [24] ABBATE A, TOLDO S, MARCHETTI C, et al. Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2020, 126(9):1260-1280.
- [25] LIU M, LI F, HUANG Y M, et al. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates calcification by inhibiting activation of the AKT/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway in human aortic valve interstitial cells[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:826.
- (本文编辑 范睿心 厉建强)