

核因子 E2 相关因子 2 通路在间质性膀胱炎中的研究进展

倪 斌 沈百欣 卫中庆

摘要 间质性膀胱炎是一种慢性非特异性膀胱炎症疾病,其典型的临床表现为顽固性尿频、尿急和盆腔疼痛,严重影响患者的生活质量,且临床上尚无长期有效的干预治疗措施。该病病因不明,机制不清,近年来大量研究提示,氧化应激反应和炎症介质在该疾病发生、发展过程中的重要性,其中核因子 E2 相关因子 2 通路发挥关键作用。现将该信号通路在间质性膀胱炎中的相关研究进展综述如下。

关键词 核因子 E2 相关因子 2 间质性膀胱炎 氧化应激

中图分类号 R694 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.07.005

间质性膀胱炎(interstitial cystitis, IC)又称为膀胱疼痛综合征(bladder painful syndrome, BPS),是一种慢性炎症性膀胱病变,临床表现为与膀胱充盈相关的疼痛或盆腔不适,伴有下尿路症状如尿频或尿急。全球范围内报道的发生率有明显差异,如欧美地区发生率可达 2.7%~6.5%,亚太地区约为 0.10%~0.26%,女性患者比例高于男性^[1,2]。与其他类型的慢性膀胱炎比较,目前临床上对于 IC 的病因、定义及诊断标准均尚未达成共识。近年来研究显示,该疾病可能与氧化应激相关通路的激活密切相关,氧化应激损伤导致膀胱氧化代谢性活动和抗氧化的生理保护机制之间的平衡受到破坏^[3]。其中,核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)通路,作为氧化应激反应中最为重要的转录因子,参与调节多种抗氧化基因的转录表达,对于研究 IC 的发生、发展具有重大意义。本文就 Nrf2 通路在 IC 中的研究进展进行综述。

一、Nrf2 通路的概述

1. Nrf2 的蛋白结构:Nrf2 是一种包含 605 个氨基酸,由 7 个结构域(Neh1~7)组成的转录因子。Neh1 结构域负责 Nrf2 与抗氧化元件序列的正确结合,N 末端的 Neh2 结构域介导了 Nrf2 负调控因子 Keap1 和赖氨酸残基的相互作用并参与调节 Nrf2 的泛素化

和蛋白降解,C 末端的 Neh3 负责染色质重塑后的反式激活,Neh4 和 Neh5 均为转录激活结构域,负责促进 Nrf2 转录。此外,Neh6 结构域参与负反馈调节 Nrf2 稳定性,Neh7 结构域则参与抑制 Nrf2 的转录活性^[4]。

2. Nrf2 相关机制通路:细胞内 Nrf2 的丰度受到 Keap1 的严格调控,在正常生理情况下,两个 Keap1 分子在 ETGE 和 DLG 基序处与 Nrf2 的 Neh2 域结合,并将 Nrf2 隔离在细胞质中。响应于应激条件,Keap1 失活促进了 Nrf2 从 Keap1 的解离并易位至细胞核中与 sMaf 蛋白结合,Nrf2-sMaf 复合物以序列特异性方式与 Nrf2 靶基因的启动子区域中的抗氧化剂反应元件(5'-TGACXXXGC-3')结合,并启动一系列抗氧化基因表达,如 NAD(P)H:醌氧化还原酶 1(NADPH:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)等。除 Keap1 外,Nrf2 活性还受 p62/SQSTM1 的调节,应激条件下 p62 上调,从而整合 Keap1 使 Nrf2 解离并易位入核^[5]。另外,Nrf2 活性也可以通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶糖原合酶激酶 3(GSK-3)和 E3 连接酶衔接子 β -TrCP 介导的蛋白酶体降解机制控制,GSK-3 在其 Neh6 域中磷酸化 Nrf2,以促进 β -TrCP 识别 Nrf2,从而促进 Nrf2 蛋白降解。

3. Nrf2 参与调控的下游基因:(1)血红素加氧酶-1:由 HMOX1 基因编码的血红素加氧酶-1 是一种可诱导的抗氧化酶,它可以催化血红素分子的分解从而导致游离 Fe^{2+} 的释放,为了防止羟自由基的形成,与 HMOX1 上调的同时,Nrf2 增强了编码铁蛋白

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81400758);江苏省青年医学重点人才培养基金资助项目

作者单位:210011 南京医科大学第二附属医院泌尿外科

通讯作者:卫中庆,教授,博士生导师,主任医师,电子信箱:Weizq1

@163.com

复合物的组分基因的表达,铁蛋白复合物将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,从而发挥解毒作用^[6]。(2)NAD(P)H:醌氧化还原酶1:NAD(P)H:醌氧化还原酶1是一种普遍存在的胞质Ⅱ期生物转化酶,其主要生理学作用是催化醌的两电子还原并发挥解毒作用,NQO1基因敲除小鼠IC模型表现出膀胱组织活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加,能量代谢和黏附因子改变以及线粒体结构丧失,这些因素共同导致凋亡细胞死亡增加及尿路上皮丢失^[7]。(3)硫氧还蛋白:硫氧还蛋白是一种蛋白质二硫键还原酶,可作为抗氧化剂保护蛋白质免受氧化应激的影响,从而促进蛋白质折叠,通过亚硝基化作用调节细胞凋亡并调节炎症。(4)谷胱甘肽过氧化物酶:谷胱甘肽过氧化物酶是一种广泛存在的过氧化物分解酶,能够催化谷胱甘肽向氧化型谷胱甘肽的转化,将有毒的过氧化物转化为无毒代谢物,从而发挥保护作用。

二、Nrf2 通路在间质性膀胱炎中的研究进展

1. Nrf2 在间质性膀胱炎中的表达:间质性膀胱炎的独特之处在于其不适用于感染性或非感染性膀胱炎的经典区分,全球范围内定义及诊断标准仍存在巨大差异,目前IC的临床诊断主要是通过病史采集及体格检查,膀胱镜下水扩张和膀胱黏膜活组织检查,排除其他疾病如膀胱癌、腺性膀胱炎等。部分IC患者膀胱镜下可见膀胱黏膜出现小球样出血,仅10%左右的患者会出现典型的Hunner溃疡。这种排他性诊断并不准确且容易误诊,治疗方式也十分有限。一项随机对照实验纳入了16例女性IC患者及25例健康女性,分析并比较发现IC组中氧化应激损伤明显上调,相关氧化应激损伤指标单独使用并无特异性,联合使用可以作为IC诊断中的标志物^[8]。在IC的相关研究中,发现氧化应激反应及炎性介质的作用贯穿疾病整个发展过程,Nrf2通路被认为在该疾病发生、发展过程中起着关键作用。

目前最有说服力的理论学说描述了糖胺聚糖层的破坏和功能障碍,导致尿路上皮损伤,继而引起炎性介质浸润及氧化应激损伤,同时激活了Nrf2通路的表达,多种动物研究模型根据该理论学说建立,如环磷酰胺(cyclophosphamide, CYP)腹腔注射,脂多糖膀胱内灌注等。Mbanefo等^[9]对CYP诱导的小鼠IC模型膀胱进行了组织学检测及转录谱分析,研究发现,经CYP处理后小鼠膀胱表现出明显炎性水肿,转录谱分析显示上调了一系列促炎基因表达,如IL-1 β 、TNF- α 和IL-6等,更强调了Nrf2通路下游抗

氧化基因HO-1的转录上调。使用鱼精蛋白/脂多糖小鼠膀胱内灌注后可诱导出类似IC排尿行为的改变、组织学的损伤以及各类氧化应激指标的升高,并检测到Nrf2通路下游抗氧化基因表达明显上升^[10]。由此可见,Nrf2通路是IC的发生、发展过程中重要的调控靶点,基于Nrf2通路的相关研究对于IC的早期诊断、临床治疗及改善预后具有重大意义。

2. Nrf2 通路相关治疗手段在 IC 中的研究进展

(1)激活Nrf2通路的天然抗氧化化合物:目前针对Nrf2通路的治疗药物富马酸二甲酯已被FDA批准用于治疗多发性硬化症,同样有大量研究在探索是否有相关药物可应用于IC。Core等^[11]研究发现,紫花苜蓿中的活性成分百里香醌(thymoquinone)剂量依赖性地保护了小鼠膀胱组织学改变,抑制炎性细胞因子的释放,并在小鼠膀胱组织内检测到Nrf2通路相关抗氧化基因的表达上调及氧化应激指标的降低。其他类似化合物在日常生活中也不难获取,如叔丁基对羟基茴香醚、莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、苹果汁、姜黄素等,这些天然化合物能够通过诱导激活Nrf2及其下游靶基因的表达,抑制氧化应激及炎性介质,对于IC的预防治疗极具研究意义及研发前景。

(2)褪黑素:在CYP诱导的膀胱炎模型中用苏木精和曙红染色对膀胱的组织学镜下观察可以发现广泛的膀胱炎,黏膜下层有明显的白细胞浸润。相反,在褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺)治疗的膀胱中,尿道上皮保存良好且炎症改变得到缓解^[12]。褪黑素是一种主要由哺乳动物的松果体分泌的神经激素,广泛分布于人体器官中。褪黑素的生物学功能被广泛研究,作为一个强大有效的抗氧化剂,可以清除不同类型的氧自由基并激活抗氧化剂防御功能,其中涉及多个通路,如NF- κ B、Nrf2、MAPK通路等^[13]。Tripathi等^[14]研究发现,褪黑素治疗IC小鼠可增加膀胱组织中Nrf2及下游抗氧化基因的表达,抑制氧化应激反应及炎性介质分泌,从而减少膀胱损伤和细胞凋亡。进一步研究发现,褪黑素还可以改善膀胱过度活动等LUTS症状,并通过褪黑素受体激动剂对照实验发现褪黑素改善膀胱功能主要是由于其抗氧化及抗炎特性^[15]。因此,褪黑素由于其卓越的抗氧化能力且安全可靠,对于IC的预防及治疗具有指导意义,但目前尚缺乏相关循证医学证据。

(3)单克隆抗体:血管内皮生长因子(vascular

endothelial growth factor, VEGF) 是一种促进血管生成的多效细胞因子。研究表明, VEGF 在 IC 患者尿液中高表达且与膀胱疼痛严重程度相关, 可作为临床诊断 IC 的尿液生物学标志物^[16]。同时在 IC 模型小鼠的膀胱中也检测到 VEGF 的表达上调, 其机制可能与炎性介质的激活、趋化因子活化以及巨噬细胞募集增加相关。研究发现, 抗 VEGF 中和抗体应用于 IC 小鼠模型可改善疼痛导致的骨盆超敏, 但对排尿行为无明显作用, 而阻断 VEGF/VEGF 受体 2 信号转导可改善 IC 相关膀胱功能障碍^[17,18]。其中相关具体机制尚不明确, 有研究发现, VEGF 可通过 ERK1/2 信号通路激活 Nrf2 通路, 进而上调其自身表达, 同时 Nrf2 也可以通过 Nrf2/HO-1/HIF-1 α 途径上调 VEGF 的表达, 促进异常血管生成, 这可能部分解释了以上研究结果。目前单克隆抗体在 IC 治疗中的应用研究甚少, 相关具体机制仍需进一步探索, 但其为 IC 治疗提供了新的思路。

(4) 干细胞疗法: 尿路上皮功能障碍是 IC 相关致病性的关键因素之一, 而干细胞具有自我更新、增殖和分化为各种细胞类型的能力, 包括尿路上皮和平滑肌细胞, 因此干细胞疗法被视为治疗 IC 的最新策略。同样的, 在正常干细胞中, Nrf2 诱导抗氧化剂基因使细胞内 ROS 保持在较低水平, 以抑制干细胞的过度增殖。人脐带血干细胞可以显著改善 IC 大鼠的排尿频率, 组织学分析显示, 可治愈 IC 的大多数病理特征, 包括尿路上皮剥夺和肥大细胞浸润, 神经网络和受损膀胱黏膜中的血管生成。同样的, 人间充质干细胞在大鼠 IC 模型中已获得成功进展, Chen 等^[19]研究证明, 联合使用脂肪来源的间充质干细胞和褪黑素可明显改善 IC 症状。实验发现, 联合疗法显著下调了膀胱组织中炎性标志物以及 ROS 相关蛋白的表达水平, 同时激活了 Nrf2 通路上调了抗氧化蛋白 HO-1 及 NQO1 的表达。此外, 尿源性干细胞(USC) 更容易获得, 抗炎作用明显优于其他干细胞, 且具有完整的干细胞特性, 更有改善膀胱功能障碍的潜力, 因此被视为治疗 IC 的最佳干细胞来源^[20]。Li 等^[10]将 USC 应用于 IC 大鼠模型中发现, 膀胱组织中 Nrf2 通路下游抗氧化蛋白 HO-1 及 NQO1 明显上调, 并下调了凋亡、氧化应激、自噬相关标志物, 从而改善膀胱内环境, 发挥保护 IC 逼尿肌细胞的作用。总之, 干细胞疗法既依赖于 Nrf2 诱导的低 ROS 环境, 又能在 IC 中通过激活上调 Nrf2 通路及其下游抗氧化基因表达, 为 IC 的再生治疗提供新的方案。

三、展 望

综上所述, Nrf2 通路在 IC 中可通过上调下游抗氧化基因表达, 从而抑制氧化应激损伤, 改善膀胱功能。尽管近年来人们对 IC 的认识已经取得较大进步, 但仍缺乏早期诊断、有效治疗和改善预后的相关手段, 因此 Nrf2 通路对于 IC 的病理生理及治疗手段的研究具有重要意义, 但因缺乏客观的功能评价体系, 尚无法对 IC 动物模型的功能性活动进行量化评价, 相关具体机制及治疗作用仍需进一步探索。本文回顾并讨论了 Nrf2 通路的概念和功能, 并综述了其在间质性膀胱炎中的研究进展, 希望有助于以 Nrf2 通路为方向的临床应用研究。

参考文献

- 1 Cox A, Golda N, Nadeau G, *et al.* CUA guideline: diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Can Urol Assoc J*, 2016, 10(5-6): E136-E155
- 2 Hanno PM, Erickson D, Moldwin R, *et al.* Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: AUA guideline amendment [J]. *J Urol*, 2015, 193(5): 1545-1553
- 3 Stefanson AL, Bakovic M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals [J]. *Nutrients*, 2014, 6(9): 3777-3801
- 4 Wang H, Liu K, Geng M, *et al.* RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2 [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(10): 3097-3108
- 5 Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, *et al.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733
- 6 Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947
- 7 Patrick BA, Das A, Jaiswal AK. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 protects bladder epithelium against painful bladder syndrome in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(10): 1886-1893
- 8 Ener K, Keske M, Aldemir M, *et al.* Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with painful bladder syndrome/interstitial cystitis: preliminary results of a randomised study [J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47(8): 1297-1302
- 9 Mbanefo EC, Le L, Zee R, *et al.* IPSE, a urogenital parasite-derived immunomodulatory protein, ameliorates ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis through downregulation of proinflammatory pathways [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1586
- 10 Li J, Luo H, Dong X, *et al.* Therapeutic effect of urine-derived stem cells for protamine/lipopolysaccharide-induced interstitial cystitis in a rat model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 107
- 11 Gore PR, Prajapati CP, Mahajan UB, *et al.* Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis through inhibiting DNA damage and upregulation of Nrf2 expression [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(8): 944-953 (下转第 25 页)

- 6 曹维嘉, 邵子玮, 段孟洮, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)及其在相关炎症性疾病的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(5): 635-638
- 7 Kenny EF, Herzig A, Kruger R, *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways[J]. *Elife*, 2017, 69(2): 24-37
- 8 Fuhrmann J, Clancy KW, Thompson PR, *et al.* Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation[J]. *Chem Rev*, 2015, 115(11): 5413-5461
- 9 Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK, *et al.* PI₃K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 109(4): 314-341
- 10 Zhu L, Li JY, Zhang YM, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Shengjiang decoction in rats with acute pancreatitis for protecting against multiple organ injury[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(46): 8169-8181
- 11 Szatmary P, Liu T, Abrams ST, *et al.* Systemic histone release disrupts plasmalemma and contributes to necrosis in acute pancreatitis[J]. *Pancreatology*, 2017, 17(6): 884-892
- 12 Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, *et al.* Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets[J]. *Leukoc Biol*, 2016, 99(1): 153-162
- 13 Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, *et al.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *J Cell Biol*, 2019, 191(3): 677-691
- 14 Saluja A, Dudeja V, Dawra R, *et al.* Early intra-acinar events in pathogenesis of pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1979-1993
- 15 Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps[J]. *Front Immunol*, 2016, 7(6): 27-32
- 16 Targeting peptidylarginine deiminase reduces neutrophil extracellular trap formation and tissue injury in severe acute pancreatitis[J]. *Cell Physiol*, 2018, 28(5): 24-30
- 17 Wang T, Zou W, Niu C, *et al.* Brg1 inhibits E-cadherin expression in lung epithelial cells and disrupts epithelial integrity[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(10): 1117-1126
- 18 Habtezion A, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Acute pancreatitis: a multifaceted set of organelle and cellular interactions[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1941-1950
- 19 Qingqing Ruan, Hong Lu, Hengyue Zhu, *et al.* A network-regulative pattern in the pathogenesis of kidney injury following severe acute pancreatitis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125(5): 12-18
- 20 Shi Q, Liao KS, Zhao KL, *et al.* Hydrogen-rich saline attenuates acute renal injury in sodium Taurocholate-induced severe acute pancreatitis by inhibiting ROS and NF- κ B pathway[J]. *Mediat Inflamm*, 2015, 68(5): 43-50
- 21 卫明, 宋妍婷, 于宝琪, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在心血管疾病中的作用[J]. *生理科学进展*, 2020, 51(5): 347-352
- 22 Sanghvi S, Waqar F, Effat M. Coronary thrombosis in acute pancreatitis[J]. *J Thromb Thrombol*, 2019, 47(1): 157-161
- 23 Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, *et al.* Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis[J]. *Science*, 2015, 349(6245): 316-320
- 24 Yu J, Ni L, Zhang X. Surfactant protein D dampens lung injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling in acute pancreatitis[J]. *Shock*, 2019, 51(5): 557-568
- 25 Yang J, Zhou Y, Shi J. Cordycepin protects against acute pancreatitis by modulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation via AMPK[J]. *Life Sci*, 2020, 251(11): 76-84

(收稿日期: 2021-01-28)

(修回日期: 2021-02-10)

(上接第21页)

- 12 Fathollahi A, Daneshgari F, Hanna-Mitchell AT. Melatonin and its role in lower urinary tract function: an article review[J]. *Curr Urol*, 2015, 8(3): 113-118
- 13 Aparicio-Soto M, Alarcon-De-La-Lastra C, Cardeno A, *et al.* Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(1): 134-144
- 14 Tripathi DN, Jena GB. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF- κ B during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat[J]. *J Pineal Res*, 2010, 48(4): 324-331
- 15 Dobrek L, Baranowska A, Thor PJ. Indirect autonomic nervous system activity assessment with heart rate variability in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis treated with melatonin or agomelatine[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(5): 368-373
- 16 Dagher A, Curatolo A, Sachdev M, *et al.* Identification of novel non-invasive biomarkers of urinary chronic pelvic pain syndrome: findings from the Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network[J]. *BJU Int*, 2017, 120(1): 130-142
- 17 Lai HH, Shen B, Vijairania P, *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor treatment decreases bladder pain in cyclophosphamide cystitis: a Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network animal model study[J]. *BJU Int*, 2017, 120(4): 576-583
- 18 Tooke K, Girard B, Vizzard MA. Functional effects of blocking VEGF/VEGFR2 signaling in the rat urinary bladder in acute and chronic CYP-induced cystitis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(7): F43-F51
- 19 Chen YT, Chiang HJ, Chen CH, *et al.* Melatonin treatment further improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute interstitial cystitis in rat[J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(3): 248-261
- 20 Chung JW, Chun SY, Lee EH, *et al.* Verification of mesenchymal stem cell injection therapy for interstitial cystitis in a rat model[J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0226390

(收稿日期: 2021-01-22)

(修回日期: 2021-02-19)