

本文引文格式:李松恒,米华.褪黑素通过 NRF2 对氯胺酮诱导的尿路上皮损伤保护作用研究[J].右江民族医学院学报,2022,44(2):147-154.

【论著与临床报道】

褪黑素通过 NRF2 对氯胺酮诱导的尿路上皮损伤保护作用研究

李松恒,米华

(广西医科大学第一附属医院泌尿外科,广西南宁 530021)

摘要:目的 在细胞水平探究褪黑素通过 NRF2 对氯胺酮相关性膀胱炎(KC)尿路上皮损伤的保护作用。方法 首先利用 Western blot 验证 NRF2 在氯胺酮刺激后的 SV-HUC-1 细胞的表达水平变化;构建沉默 NRF2 的 SV-HUC-1 细胞株,利用流式细胞术检测氯胺酮共培养后的细胞凋亡率;利用 CCK-8 筛选褪黑素的工作浓度,将 SV-HUC-1 细胞分为对照组(CON),氯胺酮组(KET),褪黑素治疗组(KET+褪黑素)和褪黑素组,利用 Western blot 检测 NRF2、HO-1 蛋白表达丰度,利用实时荧光定量 PCR 检测 IL-6 mRNA 表达水平,并测定 SOD 水平变化情况。结果 氯胺酮共培养后的 SV-HUC-1 细胞 NRF2 表达水平显著降低($P < 0.001$);成功构建沉默 NRF2 的稳定转染细胞株,si-NRF2 组的 NRF2 表达水平低于 si-NC 组($P < 0.05$);si-NRF2+氯胺酮组[(14.717±0.601)%]和 si-NC+氯胺酮组[(10.890±0.429)%]的细胞凋亡率显著高于 si-NC 组[(8.560±0.846)%]($P < 0.01$)和 si-NRF2 组[(9.023±0.703)%]($P < 0.01$);且 si-NRF2+氯胺酮组的凋亡率显著高于 si-NC+氯胺酮组($P < 0.001$)。选取 100 μM 为褪黑素的工作浓度。KET 组的 IL-6 mRNA 表达水平(1.415±0.286)显著高于 CON 组(1.024±0.230)($P < 0.01$);KET+褪黑素组(1.026±0.344)的 IL-6 mRNA 表达水平显著低于 KET 组($P < 0.01$);KET+褪黑素组 SV-HUC-1 细胞的 SOD(20.521±1.351)显著高于 CON 组(15.461±2.018)($P < 0.001$)和 KET 组(15.763±2.216)($P < 0.0001$);KET 组 SV-HUC-1 细胞 NRF2 的表达丰度(0.428±0.101)低于 CON 组(1.500±0.081)($P < 0.0001$);KET+褪黑素组的 NRF2 表达丰度(0.804±0.100)高于 KET 组($P < 0.01$)。除此之外,KET+褪黑素的 HO-1 的表达丰度(1.419±0.098)高于 CON 组(0.352±0.168)($P < 0.0001$)和 KET 组(0.199±0.046)($P < 0.0001$)。结论 褪黑素能够通过 NRF2 保护氯胺酮导致的尿路上皮损伤。

关键词:氯胺酮相关性膀胱炎;NRF2;褪黑素

中图分类号:R694.3

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)02-0147-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.002

Protective effect of melatonin on ketamine-induced urothelium injury via NRF2

Li Songheng, Mi Hua

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore at the cellular level the protective effect of melatonin via NRF2 on urothelium injury caused by ketamine cystitis (KC). **Methods** First, Western blot was used to verify the expression changes of NRF2 in SV-HUC-1 cells stimulated by ketamine. The SV-HUC-1 cell line with silenced NRF2 was constructed. Flow cytometry was employed to detect the apoptosis rate after the cells were co-cultured with ketamine. The working concentration of melatonin was screened using CCK-8. SV-HUC-1 cells were divided into a control group (CON), a ketamine (KET) group, a melatonin treatment (KET+melatonin) group and a melatonin group. The abundance of NRF2 and HO-1 protein expressions was detected by Western

基金项目:国家自然科学基金项目(81860142)

第一作者简介:李松恒(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向:氯胺酮相关性膀胱炎,E-mail:lisongheng123@163.com

通讯作者简介:米华(1967-),男,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:泌尿外科疾病,E-mail:mihua2019@163.com

blot; the IL-6 mRNA expression and SOD changes by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** There was a significant decrease in the expression of NRF2 in SV-HUC-1 cells co-cultured with ketamine ($P < 0.001$). The stably transfected cell line with silenced NRF2 was successfully constructed. The expression of NRF2 in the si-NRF2 group was lower than that in the si-NC group ($P < 0.05$). The apoptosis rates in the si-NRF2+ketamine group [(14.717±0.601)%] and si-NC+ketamine group [(10.890±0.429)%] were significantly higher than that in the si-NC group [(8.560±0.846)%] ($P < 0.01$) and that of the si-NRF2 group [(9.023±0.703)%] ($P < 0.01$). The si-NRF2+ketamine group had significantly higher apoptosis rate than the si-NC+ketamine group ($P < 0.001$). 100 μ M was selected as the working concentration of melatonin. The IL-6 mRNA expression of the KET group (1.415±0.286) was significantly higher than that of the CON group (1.024±0.230) ($P < 0.01$), while that of the KET+melatonin group (1.026±0.344) was significantly lower than that of the KET group ($P < 0.01$). The SOD of SV-HUC-1 cells in the KET+melatonin group (20.521±1.351) was significantly higher than that of the CON group (15.461±2.018) ($P < 0.001$) and that of the KET group (15.763±2.216) ($P < 0.0001$). The KET group had lower expression abundance of NRF2 in SV-HUC-1 cells (0.428±0.101) than the CON group (1.500±0.081) ($P < 0.0001$). But the KET+melatonin group had higher abundance of NRF2 (0.804±0.100) than the KET group ($P < 0.01$). In addition, the expression abundance of HO-1 in the KET+melatonin group (1.419±0.098) was higher than that in the CON group (0.352±0.168) ($P < 0.0001$) as well as that in the KET group (0.199±0.046) ($P < 0.0001$).

Conclusion Melatonin can protect ketamine-induced urothelium injury via NRF2.

Key words: ketamine cystitis; NRF2; melatonin

氯胺酮(ketamine, KET)是苯环己哌啶(phencyclidine, PCP)的衍生物,已作为麻醉剂应用于临床和镇痛领域。根据《2020 年中国毒情形势报告》,截至 2020 年底,全国现有吸毒人员 180.1 万名^[1]。根据《2019 年中国毒品形势报告》,全国滥用氯胺酮 4.9 万名,占比为 2.3%^[2]。长期使用氯胺酮会造成膀胱黏膜及肌层的损伤,可出现类间质性膀胱炎的症状,这一临床表现由 Shahani R 等^[3]于 2007 年首次报道,自此,氯胺酮相关性泌尿系统损害(ketamine associated urinary dysfunction, KAUD)才逐渐引起医生及研究人员的重视。氯胺酮引起的 KAUD 在临床上主要表现为严重的下尿路症状(lower urinary tract symptoms, LUTS),这些症状包括如排尿困难、尿频、尿急、急迫性尿失禁、尿痛、血尿等,随着病情加重可能会导致膀胱挛缩,甚至引起肾损伤。氯胺酮滥用导致的 LUTS 会严重影响患者生活质量,我们称之为氯胺酮相关性膀胱炎(ketamine cystitis, KC)。研究表明,氯胺酮及其代谢物可以直接损伤尿路上皮细胞,继而导致膀胱炎^[4]。在临床上,对 KC 的治疗手段主要包括药物治疗和手术干预,虽然手术治疗可以较理想的缓解患者症状,但术后并发症的发生率比较高^[5]。尽管目前已有 KET 滥用导致泌尿系统损害的相关研究,但由于对该病的认识不充分,传统的治疗手段效果不佳,其症状给患者生活质量带来的影响和巨大的经济负担使得此病的诊疗成为临床工作中非常棘手的工作。临床上迫切需要针对此类病人的有效而明确的药物和治疗手

段。因此,深入探讨 KC 发生发展的分子机制,对于寻找 KC 诊治的特异性分子靶点,发展更精准个性化的诊断和治疗方法,具有重要意义。

最近的研究表明,氧化应激损伤可能是 KC 的重要病理学基础,维持细胞内的氧化/抗氧化失衡可能是减轻尿路上皮损伤的有效途径^[6]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, NRF2)含有 6 个高度保守的结构域,是调节细胞氧化应激反应的关键因子。在氧化应激的情况下, NRF2 的功能对细胞存活至关重要。 NRF2 可以促进抗氧化酶如血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达,阻止胞内脂质过氧化物的形成,从而防止细胞损伤^[7-8]。研究发现,在 NRF2 高表达的疾病环境中,细胞可以利用抗氧化系统来防止脂质过氧化物积累以利于生存;而在 NRF2 低表达的疾病中,下游 NRF2 靶点的失活可能显著增强蛋白质的脂质过氧化,从而进一步促进疾病的进展^[9]。除此之外, NRF2 还能够抵消 NF- κ B 驱动的炎症反应^[10-11]。然而, NRF2 是否能够调控 KC 的发展过程还未见有明确报道。

褪黑素由松果体分泌,除了负责调节昼夜节律之外,还参与了许多关键的生理过程^[12-15]。据报道^[16],褪黑素是一种强大的抗氧化剂,它可以减轻氧化应激,清除自由基。然而,褪黑素是否可以通过调节 NRF2 蛋白表达来减轻氯胺酮导致的尿路上皮损伤仍不清楚。因此,本研究旨在通过细胞模型探究 NRF2 在氯胺酮导致的尿路上皮损伤中的保护作用,并探讨褪黑

素通过调节 NRF2 表达作为治疗 KC 潜在药物的可能性。

1 实验材料和方法

1.1 细胞培养和试剂 永生化人膀胱上皮细胞系 SV-HUC-1 购自中国科学院细胞库;褪黑素购自北京索莱宝科技有限公司;细胞恒温培养箱(正航仪器设备有限公司);10%热灭活胎牛血清(Gibco);DMEM/F12K(Gibco)培养基;1%抗生素(Hyclone);盐酸氯胺酮注射液(福建古田制药有限公司,100 mg/2 ml);胰酶(Gibco);RIPA 裂解液(Solarbio);CCK-8 试剂盒(同仁化学,日本);RNA 提取试剂盒(9108)、RNA 逆转录试剂盒(RR047A)、RNA 扩增试剂盒(RR820A)(TaKaRa 公司,日本);光学显微镜(O-LYMPUS 公司,日本);Bioford 蛋白定量试剂盒(Bio-Rad Laboratories,CA,USA);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Millipore Corporation, Bedford, MA);一抗:NRF2 (PTG, # 16396-1-AP)、HO-1 (PTG, # 10701-1-AP)、 β -actin(CST, # 4970);电泳、转膜仪(北京六一公司);流式凋亡检测试剂盒(联科生物);SOD 检测试剂盒(南京建成);慢病毒及病毒转染试剂购自吉凯生物。

1.2 细胞与药物共培养 将细胞分为空白对照组(CON)、氯胺酮组(KET)、KET+褪黑素组(KET+褪黑素)、褪黑素组。将细胞接种于 T25 培养瓶内,细胞在补充有 10%热灭活胎牛血清(Gibco™, Thermo Fisher)和 1% 抗生素(Hyclone)的 DMEM/F12K(Gibco™)培养基中培养。待细胞铺满培养瓶底部大约 80%时,更换培养液。使 KET 组和 KET+褪黑素组中氯胺酮浓度为 2 mmol/L, KET+褪黑素组和褪黑素组的褪黑素浓度为 100 μ mol/L, CON 组培养基中加入等量 PBS 作为空白对照,将细胞置于培养箱中孵育 24 h,用于刺激细胞。

1.3 细胞活力测定 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)比色法评价氯胺酮及褪黑素对 SV-HUC-1 细胞的细胞毒作用。将细胞接种于 96 孔板,待细胞铺满底部大约 80%时,向每个孔中分别滴加氯胺酮 2 mM 及褪黑素(0 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、500 μ mol/L),置于培养箱中孵育 24 h 后,根据 CCK-8 试剂说明书,向每个孔中加入 CCK-8 溶液(10 μ l),在 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 的厌氧条件下培养 1.5 h 后。在 450 nm 处测定吸光度。

1.4 Western blot 分析 将培养后的细胞样品在含有蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解,然后用 BCA 法测定蛋白质浓度。等量的蛋白质(25 μ g)在 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上装载和分离,然后转移到 PVDF 膜上。膜与一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过

夜,然后用 TBST 洗涤,与 HRP 二抗在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。洗涤 3 次后用 ECL 发光试剂盒在暗室内曝光,检测免疫印迹条带的信号强度。使用 Image J 软件分析条带灰度值,将目的蛋白和同一内参灰度值相比后得出相对表达量。主要抗体为:NRF2(1:1000)、HO-1(1:1000),以 β -actin(1:5000)作为内参对照。

1.5 实时荧光定量 PCR 与数据分析 将培养 24 h 后的细胞样品按 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA,按逆转录试剂盒的说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,按扩增试剂盒的说明书对目的基因进行扩增。PCR 反应条件:预处理 95 $^{\circ}$ C 30 s;PCR 循环(40 循环):95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 15 s。获得目的基因的扩增曲线和熔解曲线。以 β -actin 为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列
IL-6	F:ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG R:CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
β -actin	F:GTCATTCCAAATATGAGATGCGT R:GCTATCACCTCCCCTGTGTG

1.6 慢病毒转染 将细胞以 5×10^4 个/毫升接种在 6 孔板中,待细胞贴壁后,将细胞分为沉默 NRF2 组(si-NRF2 组)和空载病毒组(si-NC 组)。根据细胞的 MOI 及病毒滴度,加入适宜体积的病毒悬液和相应的增强液,让细胞在完全培养基下孵育。12~16 h 后,将各组的细胞培养液更换为无特殊处理的完全培养基。观察转染效率,待细胞融合度达到 80%时,对细胞进行传代,并加入嘌呤霉素筛选,得到转染后的稳定细胞株,用于后续实验。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 将处于对数生长期的 si-NRF2 组细胞及 NC 组细胞按照 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板内,待细胞贴壁后,根据预先设置好的分组对细胞的培养基进行更换,具体为:si-NC 组和 si-NRF2 组中加入无特殊处理的 F-12K 完全培养基,si-NC+氯胺酮组和 si-NRF2+氯胺酮组中加入含有浓度为 2 mM 氯胺酮的 F-12K 完全培养基。将处理好的细胞在培养箱中孵育 24 h 后,根据流式凋亡试剂盒说明书进行凋亡检测操作。

1.8 SOD 检测 利用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白,接着根据试剂盒说明书对细胞进行超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测,检测后的 SOD 值与总蛋白浓度的比值就是该组细胞的 SOD 浓度。

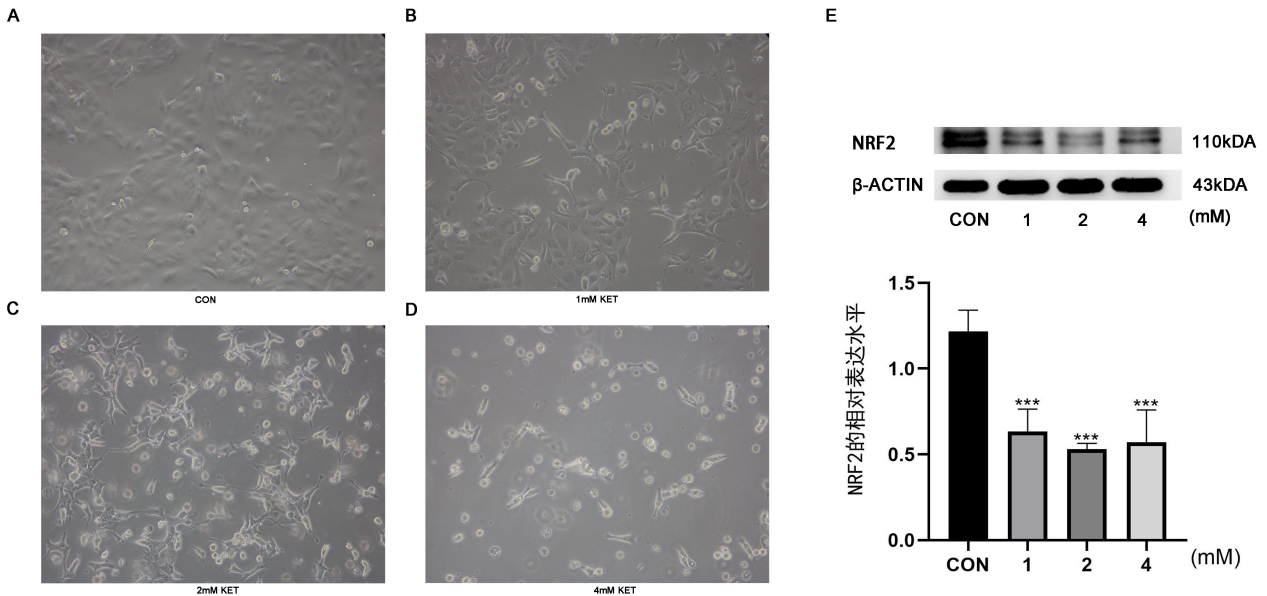
1.9 统计学方法 本研究采用 SPSS 23.0 软件进行

统计分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析和 LSD 事后检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯胺酮可降低 SV-HUC-1 细胞中 NRF2 的表达水平 在光学显微镜下观察了 0 mM、1 mM、2 mM、4 mM 的氯胺酮对 SV-HUC-1 细胞的影响,观察到随着氯胺酮浓度的增高,细胞大量死亡,细胞体肿胀,解体

(见图 1A~图 1D)。选取 2 mM 为氯胺酮工作浓度。为了探究 NRF2 是否参与了 KC 的形成过程,利用 Western blot 检测了 0 mM、1 mM、2 mM、4 mM 氯胺酮共培养后的 SV-HUC-1 中 NRF2 的表达丰度,结果如图 1E 所示。结果显示氯胺酮共培养的各组 SV-HUC-1 细胞中的 NRF2 表达丰度较 CON 组显著降低 ($P < 0.001$)。



注:A~D:不同氯胺酮浓度(0 mM、1 mM、2 mM、4 mM)共培养后的细胞形态;E:不同浓度(0 mM、1 mM、2 mM、4 mM)氯胺酮共培养后的 SV-HUC-1 中 NRF2 的表达丰度;与 CON 组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 1 细胞形态和 NRF2 表达情况

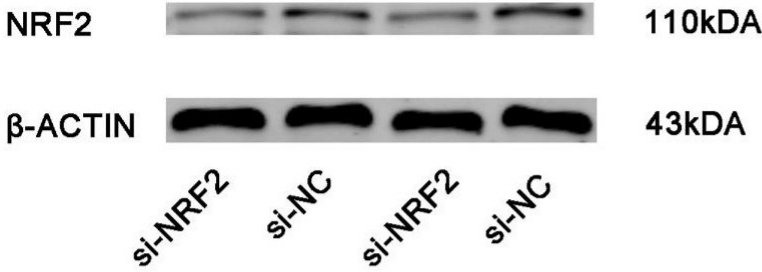
2.2 构建稳定转染的沉默 NRF2 基因 SV-HUC-1 细胞 利用慢病毒载体对细胞进行转染,通过反复的药物筛选,成功构建了沉默 NRF2 的细胞株,为了对慢病毒转染的效果进行评估,首先对 si-NRF2 和 si-NC 组的细胞进行了荧光显微镜下成像的观察,发现经过慢病毒转染后的细胞均产生大量绿色荧光(见图 2C)。随后,对 si-NRF2 和 si-NC 组细胞的 NRF2 蛋白表达丰度进行了检测,结果显示,si-NRF2 组(0.654 ± 0.086)的 SV-HUC-1 细胞的 NRF2 的表达丰度显著低于 si-NC 组(0.868 ± 0.096), $P < 0.05$ (见图 2A、图 2B)。

2.3 NRF2 表达降低可增加氯胺酮刺激后的细胞凋亡率 通过沉默 NRF2,以进一步探究其对 SV-HUC-1 细胞所受氯胺酮损伤的保护作用。对慢病毒转染后的各组细胞按照分组进行相关处理后,利用流式细胞术对各组细胞的凋亡率进行了分析。发现 si-NRF2+氯胺酮组(14.717 ± 0.601)%和 si-NC+氯胺酮组

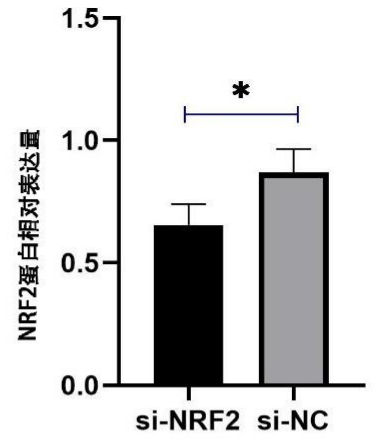
(10.890 ± 0.429)%的细胞凋亡率显著高于 si-NC 组 [8.560 ± 0.846]%, $P < 0.01$]和 si-NRF2 组 [9.023 ± 0.703]%, $P < 0.01$];且 si-NRF2+氯胺酮组的凋亡率显著高于 si-NC 组+氯胺酮组 ($P < 0.001$),见图 3。这项结果表明沉默 NRF2 后可能会让 SV-HUC-1 细胞更易受到氯胺酮的直接损伤,进一步证明了 NRF2 可能是 KC 的重要保护性靶点。

2.4 褪黑素可增加 NRF2 的表达水平并提高氯胺酮刺激后的细胞活力 褪黑素作为一种常见的抗氧化剂,且可通过上调 NRF2 通路保护细胞免受多种损伤。为了探究褪黑素是否可通过上调 NRF2 而减少氯胺酮导致的尿路上皮细胞损伤,首先利用 CCK-8 检测了 2 mM 氯胺酮与不同浓度褪黑素共培养后的 SV-HUC-1 细胞活力的差异。当褪黑素浓度为 50~100 μM 时,褪黑素能上调氯胺酮引起的 SV-HUC-1 细胞活力的降低 ($P < 0.0001$)(见图 4A)。除此之外,KET+褪黑素组 SV-HUC-1 细胞的抗氧化蛋白 SOD

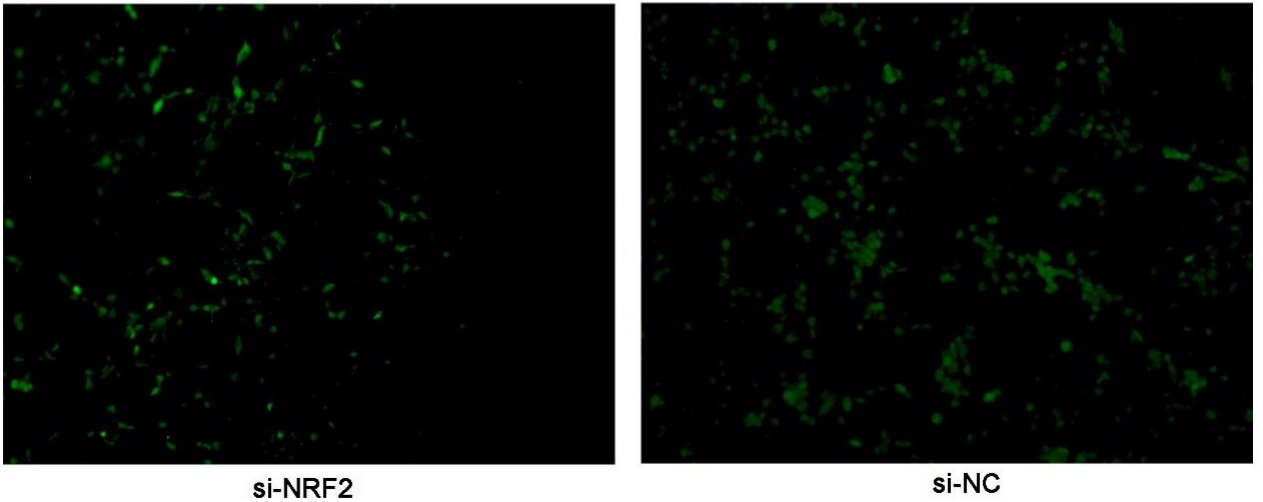
A



B



C

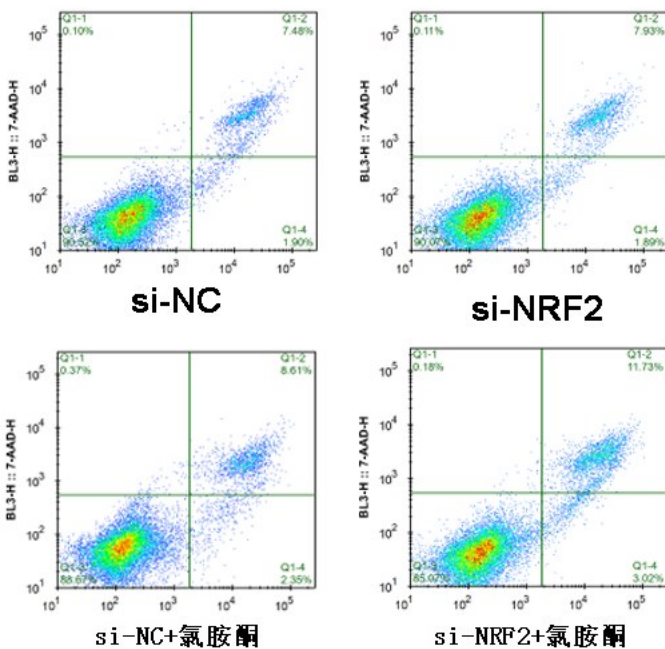


注:A为利用 Western blot 展示的慢病毒转染后的各组细胞 NRF2 表达丰度;B为灰度分析;

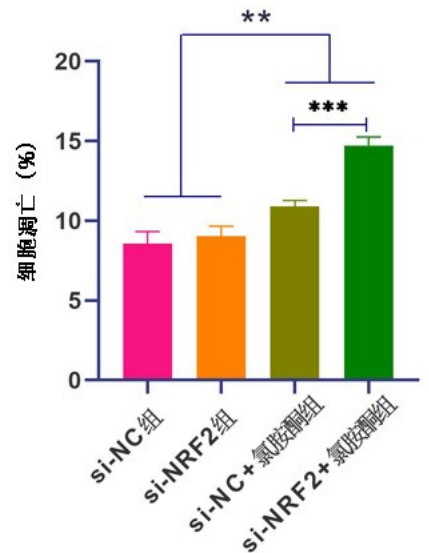
C为慢病毒转染后各组细胞的荧光表现。* $P < 0.05$ 。

图2 慢病毒转染后细胞 NRF2 表达水平及荧光表现

A



B

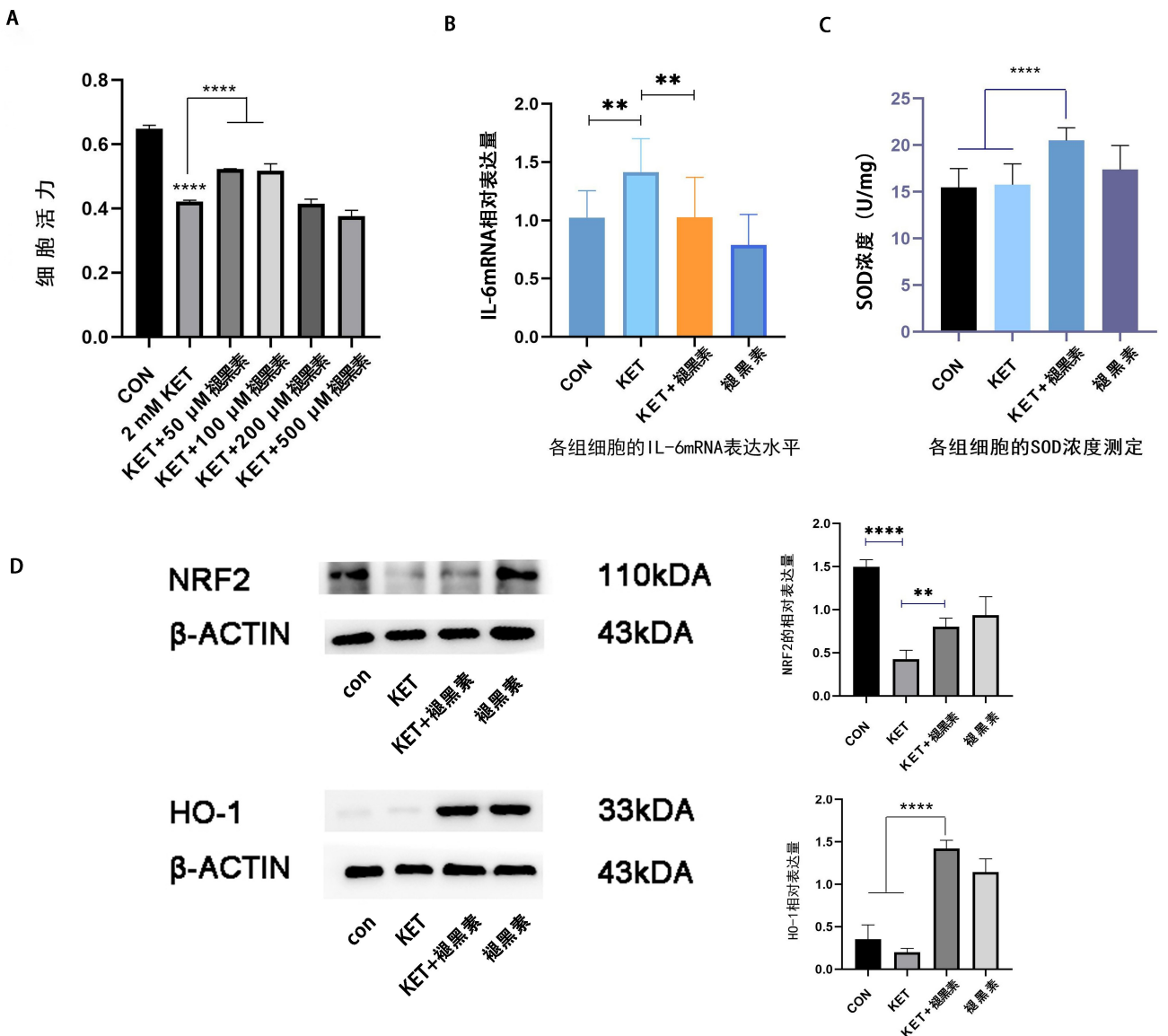


注:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图3 沉默 NRF2 细胞和空载病毒细胞与氯胺酮共培养后的细胞凋亡水平差异

(20.521 ± 1.351) 显著高于 CON 组 (15.461 ± 2.018 , $P < 0.0001$) 和 KET 组 (15.763 ± 2.216 , $P < 0.0001$) (见图 4C), 我们进一步推测褪黑素对 SV-HUC-1 细胞的保护作用可能是通过提高其在受到病理刺激后的抗氧化能力而实现的。同时, 我们利用实时荧光定量 PCR 检测了各组细胞炎症指标 IL-6 mRNA 水平的变化, 结果显示 KET 组的 IL-6 mRNA 表达水平 (1.415 ± 0.286) 显著高于 CON 组 (1.024 ± 0.230 , $P < 0.01$); KET+褪黑素组 (1.026 ± 0.344) 的 IL-6 mRNA 表达水平显著低于 KET 组 ($P < 0.01$) (见图 4B)。我们接下来利用 Western blot 分析了各组细胞的蛋白表达丰度差异 (见图 4D)。结果显示, KET 组

SV-HUC-1 细胞 NRF2 的表达丰度 (0.428 ± 0.101) 低于 CON 组 (1.500 ± 0.081 , $P < 0.0001$); KET+褪黑素组的 NRF2 表达丰度 (0.804 ± 0.100) 高于 KET 组 ($P < 0.01$)。除此之外, KET+褪黑素的 HO-1 的表达丰度 (1.419 ± 0.098) 高于 CON 组 (0.352 ± 0.168 , $P < 0.0001$) 和 KET 组 (0.199 ± 0.046 , $P < 0.0001$)。我们推测, 褪黑素能够引起 SV-HUC-1 细胞中 NRF2 蛋白表达水平升高, 并减少细胞所受的氯胺酮导致的直接损伤。结果证明了褪黑素作为治疗 KC 药物的可能性, 而 NRF2 可能是治疗药物的重要靶点, 进一步证明了 NRF2 对于改善尿路上皮损伤的重要性。



注: A 为 2 mM 氯胺酮与不同浓度褪黑素共培养后的细胞活力比较; B 为氯胺酮与褪黑素共培养后的各组细胞的 IL-6 mRNA 表达差异; C 为胞内 SOD 浓度变化; D 为氯胺酮与褪黑素共培养后的各组细胞的 NRF2 和 HO-1 表达丰度。* $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 4 褪黑素对 SV-HUC-1 细胞活力、IL-6 mRNA、SOD、NRF2、HO-1 影响情况

3 讨论

KC 作为一种化学药物引发的尿路上皮损伤,由于其发病机制不明,治疗方式单一,自发现以来就一直泌尿系统中的一种非常棘手的疾病。本研究通过慢病毒转染的方式沉默 NRF2,探讨了 NRF2 在 KC 中的保护作用;我们还在细胞层面验证了褪黑素作为保护药物的可能性。

自从 2007 年首次报道 KC 以来,已经有很多学者对 KC 的发生发展进行了研究。尿液中的高浓度的氯胺酮和去甲氯胺酮的长期刺激可能会直接损伤膀胱黏膜,引起 KC 患者膀胱黏膜减少和间质纤维化,从而引起膀胱炎^[17]。多项研究也通过建造大鼠 KC 模型证明了氯胺酮增加了大鼠膀胱组织的活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量,并促进了膀胱黏膜的损伤和纤维化,这与我们的设想是一致的^[18]。ROS 包括过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(-OH)、超氧阴离子(O²⁻)和一氧化氮(NO),这些物质不稳定且具有高反应性。ROS 通常在细胞中水平较低,正常范围内的 ROS 对于维持细胞稳态和功能至关重要^[19]。机体由于各种病理情况导致体内氧化/抗氧化失衡会导致 ROS 的过量积累,这种生理机制的不平衡会引起炎症细胞因子和趋化因子的表达增加,从而导致细胞内多种大分子结构和功能的改变。在 ROS 产生增加的情况下,细胞会激活针对 ROS 的抗氧化防御机制,这种防御机制会帮助去除细胞内的 ROS 分子^[20-21]。在这个过程中,SOD 可将 O²⁻ 转化为 H₂O₂ 来防止氧化应激,而 H₂O₂ 会被过氧化氢酶进一步消除。NRF2/HO-1 信号轴是生物体进化过程中形成对外界刺激防御的一种抗损伤机制,也是氧化应激的主要细胞传感器^[22]。当 NRF2 激活时,它可进入细胞核并结合到特定的位点来激活抗氧化酶 HO-1。HO-1 有助于维持细胞内氧化还原平衡,从而保护细胞免受氧化应激损伤。我们的结果表明,NRF2 的表达降低可增加细胞受到损伤后的凋亡率,而褪黑素可能是一种通过上调 NRF2 以治疗 KC 的潜在药物。褪黑素能逆转多种因素导致的损伤,并可以通过增加谷胱甘肽含量来诱导抗氧化能力^[23]。NRF2 及其相关途径的进一步研究对炎症相关疾病的临床治疗仍具有重要意义^[24]。据报道,褪黑素可以激活 NRF2 并抑制 MC3T3-E1 的铁死亡,还可减轻氧化应激和炎症从而保护脑组织^[25-26]。我们的结果表明,褪黑素可以提高细胞内 NRF2 蛋白的表达水平,能够上调氯胺酮诱导的 SV-HUC-1 细胞活力的降低,提高了受损细胞的 SOD 表达量,并减少 SV-HUC-1 细胞所受的炎性损伤。这些研究都揭示了褪黑素在维持 SV-HUC-1 细胞氧化/抗氧化平衡中的作用。然而有研究发现 NRF2 的持续过度表达可能是有害的,最

近的研究提出了还原性应激的概念,NRF2 也可能参与了这一过程,还原性应激是由细胞内产生过量的还原型辅酶 II,以及抗氧化系统的巨大激活和氧化活性的抑制而引起的,这也解释了为何我们加入过量的褪黑素会降低细胞活力^[27-28]。

这项研究还存在一些局限性,褪黑素的保护作用可能存在时效性,我们只对单个时间点的相关指标进行检测,没有设立多时间点检测相关指标的变化;其次,我们没有设置褪黑素的预处理组,预处理后的细胞可能具有更强的保护作用;除此之外,氯胺酮对细胞的损伤机制是及其复杂的,除了氧化应激损伤之外,可能还会因 ROS 的过量产生导致脂质过氧化,进而引发铁死亡。以上缺陷将在接下来的研究中进一步解决。

综上所述,我们利用细胞模型探究了 NRF2 对尿路上皮所受氯胺酮损伤的保护作用。我们的结果表明,氯胺酮可引起 NRF2 表达水平降低,且 NRF2 表达减少后的细胞对氯胺酮的刺激更为敏感;而褪黑素可能会通过上调细胞的 NRF2 表达水平减少细胞所受损伤,我们猜测 NRF2 可能是治疗和预防 KC 的关键靶点。

参考文献:

- [1] 2020 年中国毒情形势报告[N]. 中国禁毒报,2021-07-23.
- [2] 2019 年中国毒品形势报告[N]. 人民公安报,2020-06-25.
- [3] Shahani R,Streutker C,Dickson B, et al. Ketamine-associated ulcerative cystitis:a new clinical entity[J]. Urology, 2007,69(5):810-812.
- [4] Liu KM,Chuang SM,Long CY, et al. Ketamine-induced ulcerative cystitis and bladder apoptosis involve oxidative stress mediated by mitochondria and the endoplasmic reticulum[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015,309(4): F318-F331.
- [5] Sihra N,Ockrim J,Wood D. The effects of recreational ketamine cystitis on urinary tract reconstruction-a surgical challenge[J]. BJU Int, 2018,121(3):458-465.
- [6] Xi XJ,Zeng JJ,Lu Y, et al. Extracellular vesicles enhance oxidative stress through P38/NF-kB pathway in ketamine-induced ulcerative cystitis[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(13):7609-7624.
- [7] Cardozo LF,Pedruzzi LM,Stenvinkel P, et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2[J]. Biochimie, 2013,95(8):1525-1533.
- [8] Luo D,Guo YM,Cheng YY, et al. Natural product celastrol suppressed macrophage M1 polarization against inflammation in diet-induced obese mice via regulating Nrf2/HO-1,MAP kinase and NF-kappaB pathways[J]. Aging (Albany NY), 2017,9(10):2069-2082.

- [9] Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update[J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(5): 924-963.
- [10] 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.
- [11] Ren J, Su D, Li LX, et al. Anti-inflammatory effects of Aureusidin in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages via suppressing NF- κ B and activating ROS- and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 387: 114846.
- [12] Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands[J]. *J Biol Chem*, 1960, 235: 1992-1997.
- [13] Guan Q, Wang Z, Cao J, et al. Mechanisms of Melatonin in Obesity: A Review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 218.
- [14] Gonzalez A, del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, et al. Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology [J]. *J Pineal Res*, 2011, 50(3): 250-260.
- [15] Lin C, Chao HL, Li Z, et al. Melatonin attenuates traumatic brain injury-induced inflammation: a possible role for mitophagy[J]. *J Pineal Res*, 2016, 61(2): 177-186.
- [16] Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, et al. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13(3): 373-384.
- [17] Wai MSM, Luan P, Jiang Y, et al. Long term ketamine and ketamine plus alcohol toxicity-what can we learn from animal models? [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13(2): 273-279.
- [18] Yu YM, Wu DX, Li YW, et al. Ketamine enhances autophagy and endoplasmic reticulum stress in rats and SV-HUC-1 cells via activating IRE1-TRAF2-ASK1-JNK pathway[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(18): 1907-1922.
- [19] Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, et al. Redox regulation of cell survival[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(8): 1343-1374.
- [20] Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(4): 576-591.
- [21] Luo J, Mills K, le Cessie SL, et al. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 57: 100982.
- [22] Li A, Liu Y, Zhu X, et al. Methylallyl sulfone attenuates inflammation, oxidative stress and lung injury induced by cigarette smoke extract in mice and RAW264. 7 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 369-374.
- [23] Mukherjee D, Roy SG, Bandyopadhyay A, et al. Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms [J]. *J Pineal Res*, 2010, 48(3): 251-262.
- [24] Xu JQ, Li HB, Chen L, et al. BML-111 accelerates the resolution of inflammation by modulating the Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in rats with ventilator-induced lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 289-298.
- [25] Ma HD, Wang XD, Zhang WL, et al. Melatonin Suppresses Ferroptosis Induced by High Glucose via Activation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Type 2 Diabetic Osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9067610.
- [26] Arioz BI, Tastan B, Tarakcioglu E, et al. Melatonin Attenuates LPS-Induced Acute Depressive-Like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Through the SIRT1/Nrf2 Pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1511.
- [27] Narasimhan M, Rajasekaran NS. Reductive potential-A savior turns stressor in protein aggregation cardiomyopathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(1): 53-60.
- [28] Zucker SN, Fink EE, Bagati A, et al. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9 [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(6): 916-928.

收稿日期: 2022-03-22; 修回日期: 2022-03-31