

褪黑素对氯胺酮所致大鼠膀胱氧化应激损伤的保护作用^①

卢勇, 谭伟明, 牛得草, 曾锦江, 米华^②

(广西医科大学第一附属医院泌尿外科, 广西南宁 530021 E-mail: luyong560@163.com)

摘要: **目的** 探讨褪黑素对氯胺酮所致大鼠膀胱氧化应激损伤的保护作用及机制。**方法** 将雄性SD大鼠30只随机分为3组:生理盐水组(NS组,生理盐水1 ml/d)、氯胺酮组(KET组,氯胺酮100 mg/(kg·d⁻¹))、氯胺酮+褪黑素组[MT组,氯胺酮100 mg/(kg·d⁻¹)+褪黑素10 mg/(kg·d⁻¹)],每组10只。连续腹腔注射给药12周后收集大鼠膀胱组织,免疫组化法检测膀胱组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白和环氧化酶-2(COX-2)蛋白的表达,TUNEL法检测膀胱细胞凋亡情况,透射电镜观察膀胱细胞超微结构的改变。**结果** 与NS组、MT组比较,KET组细胞凋亡数、iNOS和COX-2蛋白表达明显增加($P < 0.05$),透射电镜下膀胱上皮细胞线粒体出现明显肿胀以及空泡化。与NS组比较,MT组细胞凋亡数、iNOS和COX-2蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),透射电镜下膀胱上皮细胞线粒体形态未见明显异常,与NS组相似。**结论** 褪黑素对氯胺酮所致的大鼠膀胱氧化应激损伤具有保护作用,其机制可能与抑制iNOS和COX-2活性,减轻线粒体损伤有关。

关键词: 褪黑素;氯胺酮;氧化应激;诱导型一氧化氮合酶;环氧化酶-2

中图分类号: R694.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)01-0013-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.01.004

Protective effects of melatonin on oxidative stress injury induced by ketamine in rat bladder

Lu Yong, Tan Weiming, Niu Decao, Zeng Jinjiang, Mi Hua

(Department of Urology Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China E-mail: luyong560@163.com)

Abstract: **Objective** To explore the protective effects and mechanism of melatonin on oxidative stress injury induced by ketamine in rat bladder. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into 3 groups: normal saline group (NS group), ketamine group (KET group), melatonin + ketamine group (MT group), 10 rats in each group. The rats of the NS group were injected intraperitoneally with normal saline (1 ml/d), rats of the KET group with ketamine [100 mg/(kg·d⁻¹)], and rats of the MT group with melatonin [10 mg/(kg·d⁻¹)] + ketamine [100 mg/(kg·d⁻¹)]. After 12 weeks of administration by continuous intraperitoneal injection, the rats bladders tissues were collected. Immunohistochemical staining was carried out to examine the expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in bladder tissues, TUNEL method was used to detect the apoptosis of bladder cells, the ultrastructure changes of bladder cells were observed by transmission electron microscope. **Results** As compared with NS and MT groups, the number of bladder cell apoptosis and the expressions of iNOS and COX-2 protein in KET group were significantly increased ($P < 0.05$), and under the transmission electron microscope, the mitochondria of the bladder epithelial cells were markedly swollen and vacuolated. Compared with NS group, the number of bladder cell apoptosis and the expressions of iNOS and COX-2 in MT group were not significantly increased or decreased ($P > 0.05$). In MT group, the morphologies of mitochondria of the bladder epithelial cells observed by using transmission electron microscopy were normal and similar to those of NS group. **Conclusion** Melatonin may protect against ketamine-induced oxidative stress injury in rat bladder by inhibiting the expressions of iNOS and COX-2 and alleviating mitochondrial damage.

Key words: melatonin; ketamine; oxidative stress; inducible nitric oxide synthase; cyclooxygenase-2

① 基金项目:广西高校科学技术研究项目(2013YB059)

② 通信作者,E-mail:mihua570@aliyun.com

氯胺酮(Ketamine)属非竞争性 N-甲基-D-天门冬氨酸受体阻滞剂,具有中枢兴奋、致幻、抗焦虑等作用,是最常用的三大新型毒品之一。长期滥用可导致氯胺酮相关性膀胱损伤。本课题组前期研究发现,氯胺酮会导致大鼠出现氧化应激损伤^[1]。褪黑素(melatonin, Mel)是由松果体分泌的一种激素,是目前已知清除自由基最强的抗氧化剂^[2],可减轻氯胺酮对膀胱的危害^[3],但相关机制尚不清楚。本实验通过观察大鼠膀胱组织中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达变化、细胞凋亡情况以及细胞超微结构的改变,初步探讨褪黑素对氯胺酮所致大鼠膀胱氧化应激损伤的保护机制,为治疗氯胺酮相关性膀胱损伤提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 30 只, SPF 级, 体重 190~210 g, 2 月龄, 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 褪黑素 1 g(美国 sigma 公司); 盐酸氯胺酮注射液 100 mg/2 ml(福建古田制药有限公司); 兔抗大鼠 iNOS、COX-2 抗体、羊抗兔二抗(IgG)、TUNEL 凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。组织切片机(德国 Leica 公司); 显微镜(日本 OLYMPUS 公司); 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 将 30 只大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只; 生理盐水组(NS 组), 给予生理盐水 1 ml/d; 氯胺酮组(KET 组), 予氯胺酮 100 mg/(kg·d⁻¹); 氯胺酮+褪黑素组(MT 组), 予氯胺酮 100 mg/(kg·d⁻¹)+褪黑素 10 mg/(kg·d⁻¹); 药物溶于生理盐水中, 给药总体积均控制在 1 ml, 通过腹腔注射方式给药, 每周大鼠称重两次, 以调整给药剂量。连续给药 12 周后, 以 2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 收集各组大鼠膀胱组织进行实验。

1.2.2 免疫组化检测 大鼠膀胱组织经 10% 甲醛溶液固定, 梯度乙醇脱水后制成石蜡切片。二甲苯脱蜡, 3% H₂O₂ 室温孵育 30 min。切片加入 0.01 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液后, 置入高压锅加热至沸腾, 沸腾持续 8 min, 冷却至室温后加入山羊血清孵育 10 min, 滴加兔抗大鼠 iNOS 抗体, 置于 4℃ 冰箱过夜, 用 PBS 洗 5 min, 共洗 3 次, 再加入二抗(羊抗兔 IgG), 置于室温

30 min 后, 用 PBS 洗 5 min, 共洗 3 次, DAB 显色, PBS 冲洗 5 min, 苏木精复染, 逐级脱水、透明、封片, 200 倍显微镜下观察并拍照。兔抗大鼠 COX-2 抗体同此法操作。

1.2.3 TUNEL 法检测 TUNEL 法检测膀胱凋亡细胞, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.4 图像分析 应用 Image proplus 6.0 软件分析处理免疫组化和 TUNEL 凋亡检测图片。免疫组化图片中含棕色或棕黄色颗粒为阳性细胞, 而凋亡染色图片中以细胞核黄染为凋亡细胞。每张切片在显微镜(200 倍或 100 倍)下随机选取 5 个视野, 测量累积光密度值后, 根据测定的视野面积计算出平均光密度值。

1.2.5 透射电镜检查 取一部分膀胱组织用 2.5% 戊二醛固定, 缓冲液漂洗后, 锇酸固定, 酒精及丙酮脱水, 包埋, 做超薄切片, 染色后在透射电镜下观察细胞的超微结构并拍照保存。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用最小显著差法(LSD 法), 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果 iNOS 蛋白主要表达于膀胱黏膜层和黏膜下层, COX-2 蛋白主要表达于黏膜层, 细胞浆和细胞膜内出现棕色或棕黄色颗粒为阳性细胞。与 NS 组、MT 组比较, KET 组 iNOS、COX-2 蛋白表达均升高($P < 0.05$)。与 NS 组比较, MT 组 iNOS、COX-2 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠膀胱组织中 iNOS、COX-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	iNOS(OD 值)	COX-2(OD 值)
NS 组	10	0.07±0.02	0.10±0.01
KET 组	10	0.17±0.03 ^{ab}	0.21±0.02 ^{ab}
MT 组	10	0.08±0.05	0.11±0.02
F		33.97	58.93
P		<0.001	<0.001

注: 蛋白表达以平均光密度值(OD 值)表示。与 NS 组比较, a: $P < 0.05$; 与 MT 组比较, b: $P < 0.05$ 。iNOS 蛋白: KET 组与 NS 组比较, $t = -6.57$, $P < 0.001$; KET 组与 MT 组比较, $t = -7.06$, $P = 0.0000001$; MT 组与 NS 组比较, $t = 0.14$, $P = 0.89$ 。COX-2 蛋白: KET 组与 NS 组比较, $t = -9.38$, $P < 0.001$; KET 组与 MT 组比较, $t = -9.27$, $P < 0.001$; MT 组与 NS 组比较, $t = 1.06$, $P = 0.30$

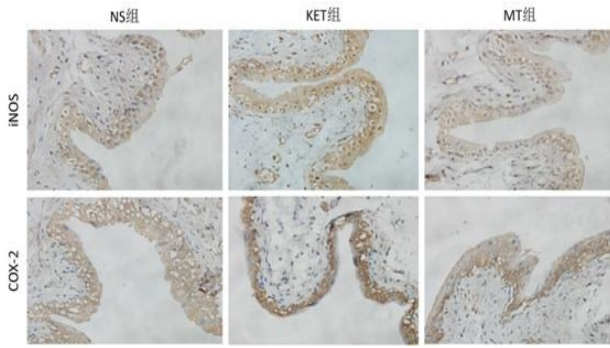


图1 免疫组化检测各组大鼠膀胱组织 iNOS、COX-2 蛋白表达情况($\times 200$)

2.2 TUNEL 法检测结果 NS 组膀胱组织黏膜、黏膜下层以及肌层均未见明显阳性核黄染细胞,说明细胞凋亡不明显。KET 组膀胱组织黏膜及黏膜下层阳性染色细胞明显增多,即出现明显细胞凋亡状态。MT 组膀胱组织黏膜、黏膜下层以及肌层极少出现细胞凋亡,未见明显阳性染色。与 NS 组、MT 组比较, KET 组细胞凋亡水平明显升高($P < 0.05$); MT 组与 NS 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 各组大鼠膀胱组织中细胞凋亡水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡水平(OD 值)
NS 组	10	0.08 \pm 0.02
KET 组	10	0.20 \pm 0.04 ^{ab}
MT 组	10	0.10 \pm 0.03
F		17.48
P		<0.001

注:细胞凋亡水平以平均光密度值(OD 值)表示。与 NS 组比较,a: $P < 0.05$;与 MT 组比较,b: $P < 0.05$ 。KET 组与 NS 组比较, $t = -5.26$, $P < 0.001$;KET 组与 MT 组比较, $t = -4.95$, $P < 0.001$;MT 组与 NS 组比较, $t = -0.68$, $P = 0.50$

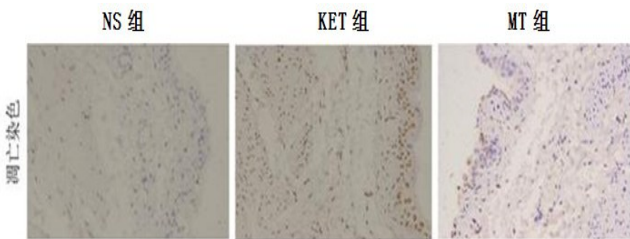


图 2 TUNEL 法检测各组大鼠细胞凋亡情况($\times 100$)

2.3 透射电镜结果 KET 组膀胱上皮细胞核出现染色质边集的现象,线粒体出现肿胀,形态不规则,数量减少,以及空泡化。而 NS 组膀胱上皮细胞无明显异常,线粒体大小及数量正常,未见线粒体肿胀等病理改变。MT 组基本情况与 NS 组相似。见图 3。

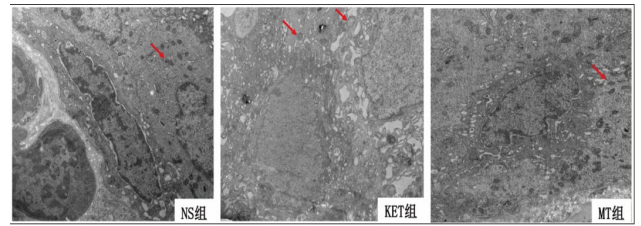


图 3 各组大鼠膀胱组织电镜结果($\times 15000$)
注:图内红色箭头为线粒体

3 讨论

长期滥用氯胺酮可导致氯胺酮相关性膀胱损伤,主要表现为尿频、尿急、尿痛等下尿路症状,急性发作时,可合并骨盆区剧烈疼痛及持续性血尿^[3]。目前发现可能的发病机制包括^[4]:直接毒性损伤、免疫反应、微循环障碍、神经源性炎症反应等。结合前期研究结果^[1],本实验从氧化应激角度去研究和探讨褪黑素对氯胺酮相关性膀胱损伤的保护机制。

为探讨氯胺酮诱导膀胱氧化应激损伤的分子机制,我们观察了大鼠长期腹腔注射氯胺酮后,膀胱组织中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达情况。一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)是调节生成 NO 的关键酶。NOS 可分为 3 种亚型,包括内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、神经型一氧化氮合成酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)。生理需要量的 NO 主要由 nNOS 和 eNOS 生产,对维持机体生理功能有重要作用。但 iNOS 主要在机体受到损伤或发生肿瘤等病理情况时才会被激活, iNOS 表达增多后,催化 L-精氨酸产生大量 NO, NO 进一步诱导大量氮自由基等损伤因子产生,增强氧化应激损伤。本研究发现,与 NS 组比较, KET 组 iNOS 表达明显增加,说明氯胺酮可上调 iNOS 表达,增强膀胱氧化应激损伤。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是生成前列腺素(prostaglandins, PGs)的限速酶,目前发现有 COX-1(结构型)和 COX-2(诱导型)两种亚型。COX-2 合成的 PGs 产物对维持机体的病理生理过程有重要作用^[5],如参与细胞有丝分裂、炎症反应等。由于 iNOS 和 COX-2 之间存在“cross-talk”效应,二者可互相促进表达^[6],且 NO 可通过 NO/cGMP 路径增加 COX-2 的表达^[5],故 COX-2 可能随 iNOS 表达上调而升高。本研究结果与上述理论相符合,即 KET 组的 iNOS 和 COX-2 均较 NS 组表达显著升高。Lin HC 等^[7]发现长期滥用氯胺酮的病人膀胱组织中 COX-2 和 iNOS 高表达。本研究 and Chuang SM^[8]在动物实验中也得到相一致的结果,说明氯胺酮所致膀胱氧化应激损伤与 iNOS

和 COX-2 表达上调有关。

为探讨氯胺酮相关性膀胱损伤是否与细胞凋亡相关,我们采用 TUNEL 法检测凋亡细胞和透射电镜观察,结果显示 KET 组出现明显的细胞凋亡,大鼠膀胱上皮细胞线粒体出现明显损伤且数量减少,而 NS 组未见明显异常。以上结果说明氯胺酮能诱导细胞凋亡和损伤膀胱上皮细胞线粒体。体外实验发现氯胺酮可刺激正常膀胱上皮细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,诱导线粒体膜通透性转换孔开放,释放细胞色素 C,激活 caspase 介导的细胞凋亡^[9]。通过对比分析本研究的动物实验结果和上述体外实验结果,作者认为细胞凋亡确实与线粒体损伤有一定关系。另外,有研究报道氯胺酮可通过线粒体途径提高体内 NO 的含量,主要与氯胺酮损伤线粒体复合物 I,诱导线粒体 NO 合酶活性增加相关^[10]。由此,推测氯胺酮通过诱导 iNOS 和 COX-2 高表达,或经线粒体途径,增加 NO 的产生,进而促使细胞内生成大量自由基,自由基过多又可以反过来破坏线粒体,使得线粒体释放的自由基增加,形成恶性循环,诱导膀胱细胞凋亡。

为探讨褪黑素对氯胺酮相关性膀胱损伤的保护机制,我们观察了褪黑素和氯胺酮联合干预后,大鼠膀胱组织中 iNOS 和 COX-2 的表达和细胞凋亡情况,以及电镜结果,结果显示:MT 组 iNOS 和 COX-2 表达明显低于 KET 组,且通过凋亡染色未见明显凋亡细胞,电镜下膀胱上皮细胞线粒体无明显肿胀和减少,提示褪黑素能有效抑制氯胺酮诱导的 iNOS 和 COX-2 表达上调,减缓线粒体损伤,保护膀胱。有研究报道,褪黑素可减轻砷暴露造成的膀胱损伤,主要是抑制 MAPK 途径的活化,下调 COX-2 的表达,降低活性氧(ROS)的产生^[11]。亦有研究显示褪黑素不仅能直接清除氮自由基,还能下调 iNOS 的表达^[12]。褪黑素还能有效地调节糖尿病大鼠膀胱组织的氧化应激反应,保护平滑肌细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞线粒体^[13]。从上述三个研究看出,褪黑素不但能下调 iNOS 和 COX-2 的表达,还保护细胞线粒体。但具体机制有待进一步研究。

综上所述,褪黑素作为一种新型高效抗氧化剂和自由基清除剂,能减轻氯胺酮诱导的氧化应激反应对大鼠膀胱组织的损伤。其机制可能与褪黑素抑制 iNOS 和 COX-2 的活性,减少 NO 产生,同时降低线粒体破坏,有效减轻氧化应激损伤,减少细胞凋亡有关。但是,在本研究中缺失相关氧化应激信号通路的研究,这将是本课题下一步的研究方向。

参考文献:

- [1] 谭伟明,米华.褪黑素对氯胺酮相关性大鼠膀胱损伤的保护作用[J].中国现代医药杂志,2016,18(3):13-16.
- [2] Lochner A, Genade S, Davids A, et al. Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery[J]. J Pineal Res, 2006, 40(1):56-63.
- [3] Colebunders B, Van Erps P. Cystitis due to the use of ketamine as a recreational drug: a case report[J]. J Med Case Rep, 2008, 2(1): 219.
- [4] 谭伟明,米华.氯胺酮相关性膀胱炎发生机制的研究进展[J].广东医学,2016,37(8):1243-1245.
- [5] Yang BC, Jin LL, Yang YF, et al. Inhibitory effect of rape pollen supercritical CO₂ fluid extract against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(1):31-37.
- [6] Paduch R, Kandefers-Szerszeń M. Nitric Oxide (NO) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) Cross-Talk in Co-Cultures of Tumor Spheroids with Normal Cells[J]. Cancer Microenviron, 2011 4(2):187-198.
- [7] Lin HC, Lee HS, Chiueh TS, et al. Histopathological assessment of inflammation and expression of inflammatory markers in patients with ketamine-induced cystitis[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4):2421-2428.
- [8] Chuang SM, Liu KM, Li YL, et al. Dual involvements of cyclooxygenase and nitric oxide synthase expressions in ketamine-induced ulcerative cystitis in rat bladder[J]. Neurourol Urodyn, 2013, 32(8):1137-1143.
- [9] Baker SC, Shabir S, Georgopoulos NT, et al. Ketamine-Induced Apoptosis in Normal Human Urothelial Cells: A Direct, N-Methyl-d-Aspartate Receptor-Independent Pathway Characterized by Mitochondrial Stress[J]. Am J Pathol, 2016, 186(5):1267-1277.
- [10] Venancio C, Felix L, Almeida V, et al. Acute ketamine impairs mitochondrial function and promotes superoxide dismutase activity in the rat brain[J]. Anesth Analg, 2015, 120(2):320-328.
- [11] Wang H, Xi S, Xu Y, et al. Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction[J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(3): 1043-1048.
- [12] Tan DX, Manchester LC, Terron MP, et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? [J]. J Pineal Res, 2007, 42(1):28-42.
- [13] 李世健,王明,张龙,等.比较褪黑素与维生素 E 在对抗早期糖尿病大鼠膀胱氧化性损伤的作用[J].重庆医科大学学报,2013,38(2):143-147.

收稿日期:2017-12-14