

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01018

氯胺酮对大鼠肾脏低温延时保存影响的形态学观察

范颖晖^{1*}, 高 轶², 王新华¹

1. 同济大学附属东方医院疼痛科, 上海 200120

2. 第二军医大学长征医院泌尿外科, 上海 200003

[摘要] **目的:**观察氯胺酮对大鼠肾脏低温保存期间肾皮质形态学的影响。**方法:**雄性SD大鼠分别用0~4℃单纯高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(HC-A)保存液、加入氯胺酮 10^{-5} μmol/L的HC-A保存液50~100 ml原位逆行灌注肾脏,离体低温保存24、48、72 h,取材在光镜和电镜下作形态学观察。**结果:**低温保存72 h内氯胺酮组肾脏光镜和电镜下组织形态学有明显改变,细胞和细胞器变性坏死,肾间质高度水肿;单纯HC-A保存液组上述改变较轻。**结论:**在器官保存液中加入氯胺酮,不利于肾脏低温保存。

[关键词] 氯胺酮;肾;低温保存;肾移植

[中图分类号] R 699.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1018-04

Effect of ketamine dissolved in multi-organ preservation solution on morphology of cold-stored rat kidneys

FAN Ying-hui^{1*}, GAO Yi², WANG Xin-hua¹

1. Department of Pain Management, Eastern Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China

2. Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the morphological changes of cold-stored rat kidneys flushed with multi-organ preservation solution containing ketamine. **Methods:** The kidneys of male SD rats were retrogradely perfused with 0-4℃ HC-A (50-100 ml) only or together with ketamine (10^{-5} μmol/L), and were then isolated, cold stored for 24, 48, and 72 h. The morphological changes of the kidneys in both groups were observed under light microscope and transmission electron microscope. **Results:** Light microscopy and transmission electron microscopy showed that there were evident morphological changes in the ketamine group after 72 h, with necrotic cells and organelles, and severe renal interstitial edema. The above changes in the HC-2 group were slighter. **Conclusion:** Ketamine in the organ preservation solution is harmful for the cold storage of rat kidneys.

[KEY WORDS] ketamine; kidney; cold-preservation; kidney transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):1018-1021]

氯胺酮是苯环己哌啶类静脉麻醉药,可作用于阿片受体、单胺类受体、胆碱能受体及N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体,产生镇痛麻醉效应。近年来研究发现,氯胺酮除了传统的麻醉与镇痛作用外,可能对脑组织或缺血再灌注(I/R)损伤心肌有保护作用^[1-2]。高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(HC-A)作为肾脏保存液经过近年的临床应用,已经得到广泛的肯定,在国内肾脏移植领域发挥了重要作用^[3]。国内外研究表明非免疫学因素——缺血再灌注损伤在慢性移植性肾病的发生、发展过程中起重要作用^[4],防治缺血再灌注损伤是移植肾低温保存的重要环节。本实验采用肾脏原位逆行灌注、离体低温延时保存模型,观察将消旋

氯胺酮加入HC-A液对大鼠肾脏低温延时保存形态学变化的影响,以期肾脏移植研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备 日立H-7000型透射电子显微镜,Leica普通光学显微镜,深低温冰箱(日本三洋公司),HC-A液(第二军医大学长征医院药学部),盐酸氯胺酮注射液(上海第一生化药业有限公司)。

1.2 实验分组 雄性健康SD大鼠30只(购自第二军医大学实验动物中心),体质量200~300 g,20~22℃饲养,12 h昼夜交替,自由摄食饮水。随机分为2组,每组各15只;对照组单纯用HC-A保存液

[收稿日期] 2008-12-08 **[接受日期]** 2009-03-20

[作者简介] 范颖晖,硕士,主治医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-38804518-5282, E-mail: fanyh86@yahoo.com.cn

灌注, 氯胺酮组在 HC-A 保存液中加氯胺酮 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 。两组所用液体 pH 值、渗透压无显著差异。

1.3 动物模型 采用腹主动脉原位逆行灌注法, 离体低温延时保存模型。术前晚大鼠禁食, 自由饮水。麻醉采用 2.5% 戊巴比妥 (25 mg/kg) 腹腔内注射, 麻醉后将大鼠固定于手术台上, 从尾静脉注入含肝素 500 U 的生理盐水 1 ml。腹部消毒后取剑突至耻骨联合上正中切口进腹。用拉钩牵开腹壁, 将肠管推向右侧, 放入塑料小袋内并用盐水纱布覆盖减少体液丧失。分离左肾静脉下部的腹主动脉和下腔静脉各 1 cm 左右, 分别结扎切断两者的分支, 注意不损伤血管壁, 并将两者小心游离开, 经腹主动脉下方引两根 1 号丝线。游离结扎肠系膜上动脉, 在左肾上 1.5 cm 处游离腹主动脉。无创性血管夹阻断肾上腹主动脉, 在预留的肾下腹主动脉两根丝线之间沿血管横断面剪开一小口, 向头侧置入预充好 0°C 灌注液的 PE 管, 管口低于左右肾动脉水平, 结扎固定, 剪断左肾静脉上方、右肾静脉下方腔静脉。以 60 cm 水柱的压力经 PE 管远端进行低压、匀速、原位灌注, 同时肾脏表面和周围置以少量冰屑。当两侧肾脏呈均匀灰白色, 肾上下腔静脉流出的灌洗液清亮, 灌洗完毕, 灌注量内 50~100 ml。迅速离断两肾上下方的血管和输尿管, 切除完整的两侧肾脏、放入盛有 0°C 灌注液的无菌盆内, 置于 4°C 冰箱内冷藏。约 5 min 内完成。分别于保存 24、48、72 h 后取样, 进行形态学观察。

1.4 光镜标本制作 分别将保存 24、48、72 h 的大鼠肾脏于肾皮质相同部位切取若干块。迅速放入中性甲醛液中固定, 石蜡包埋切片, H-E 染色观察。

H-E 病理切片单盲观察由第二军医大学长海医院病理科肾脏病理学专家完成。从胞质空泡化、肾小管坏死、基底膜裸露、肾小管水肿、细胞解离分开、细胞内水肿、间质水肿、刷状缘完整性等方面评估氯胺酮组 and 对照组大鼠肾脏保存期间肾小球、肾小管细胞形态结构的改变。

1.5 电镜标本制作 将标本切成约 1 mm^3 大小 6~8 块, 按常规方法制成电镜观察标本, 用日立 H-7000 型透射电镜观察。电镜单盲观察由第二军医大学电镜室肾脏病理学专家完成。主要从线粒体的肿胀、嵴的改变、细胞及间质水肿程度、细胞核的改变等超微结构变化评价低温保存期间肾皮质细胞组织改变。

2 结果

2.1 光镜观察 0~24 h 肾组织的结构基本相似, 肾组织球管结构基本完整, 可见少量肿胀变性的肾小管上皮细胞, 间质轻度水肿、刷状缘脱落 (图 1A、1B)。但从 24~48 h 后, 氯胺酮组肾组织开始出现较明显的改变, 其中肾小管上皮细胞的改变比肾小球更为明显, 小管上皮广泛中重度空泡样改变, 可见多处小灶状小管坏死, 肾小球毛细血管轮廓欠清晰, 鲍曼囊腔变小, 间质明显水肿, 细胞解离分开, 刷状缘损害明显, 基底膜裸露变宽, 着色变淡 (图 1C); 而对照组相对氯胺酮组的变化较小 (图 1D)。48~72 h 后大部分肾小管上皮细胞的胞质出现小空泡, 间质高度水肿, 尤其是氯胺酮组, 肾小管上皮呈广泛点状、大片状坏死, 肾小球毛细血管轮廓模糊, 甚至成为一片红染区, 曲管结构不清 (图 1E); 而对照组肾组织病变相对较轻 (图 1F)。

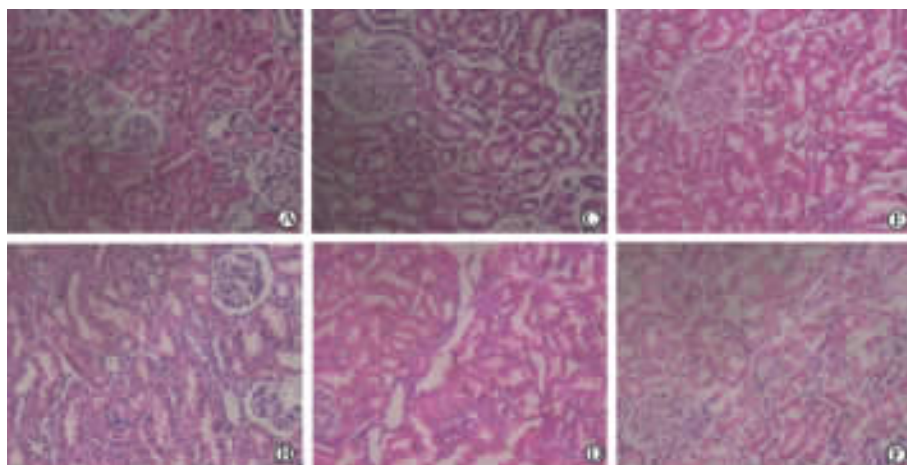


图 1 大鼠离体肾脏低温保存 24、48、72 h 后的显微结构变化

Fig 1 Microstructure changes of isolated rat kidneys cold-stored for 24, 48, and 72 hours (H-E staining)

A: Control group at 24 h; B: Ketamine group at 24 h; C: Control group at 48 h; D: Ketamine group at 48 h; E: Control group at 72 h; F: Ketamine group at 72 h. Original magnification, $\times 200$

2.2 电镜观察 0~24 h的电镜图像基本一致,细胞核形大致正常,核质无边聚、分布欠均匀,线粒体不同程度肿胀,线粒体缩短。嵴数量减少,但排列欠规律,内质网轻度水肿,近曲小管微绒毛少量水肿、脱落。毛细血管内皮细胞、足突细胞尚可分辨。48 h后对照组的超微结构改变较轻微,基底膜基本正常(图 2A),仅有轻微的核固缩(图 2B)和线粒体肿胀等。而氯胺酮组出现较明显的超微结构改变,主要表现为肾小管及肾小球的基底膜不均一增厚(图 2C);核严重变形、核固缩(图 2D),核膜不规则,线粒体显著肿胀为球形,嵴断裂、溶解明显,微绒毛分布散乱,大片脱落。细胞内褶明显减少且紊乱。肾小管个别上皮细胞核出现核固缩,核缘呈锯齿状。线粒体基质的电子密度明显减低,嵴数量减少,排列紊

乱,其中尤以近曲小管上皮更为显著。多数线粒体肿胀变性,嵴几乎消失,内质网轻度扩张。

48~72 h后病理改变更为明显,其上皮细胞变性更严重,各种细胞器,连同其基膜及间质呈现一片模糊,有的结构甚至全部崩解。细胞核固缩特别显著。肾小球的改变程度比肾小管稍轻,但也很严重,其上皮细胞内的线粒体呈空泡变性;肾小球基底膜增生,部分足突融合(图 3A),线粒体嵴部分消失及髓样体形成线(图 3B);氯胺酮组小管细胞严重肿胀变性,细胞核、线粒体严重破坏,结构模糊不清近于崩解,线粒体嵴几乎完全溶解,肾小球基底膜肿胀,足突部分消失(图 3C),线粒体肿胀及部分结构消失,细胞基质有大量胶原纤维形成(图 3D)。

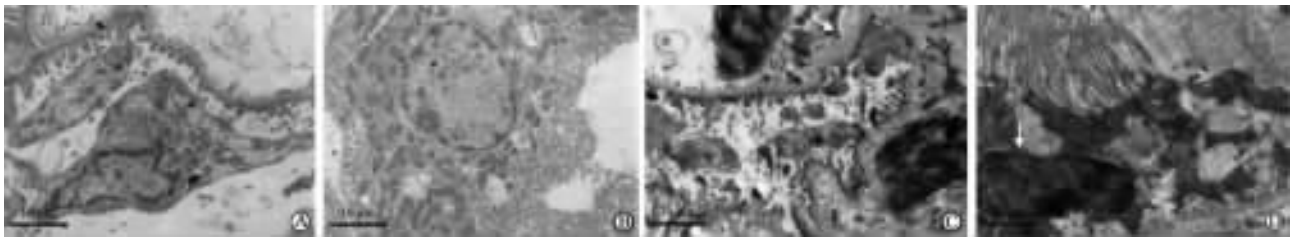


图 2 大鼠离体肾脏低温保存 48 h 的超微结构变化

Fig 2 Ultrastructural changes of isolated rat kidneys cold-stored for 48 h

A,B:Control group; C,D:Ketamine group. The arrow in C indicates the thickened basement membrane; the arrow in D indicates nuclear karyopyknosis

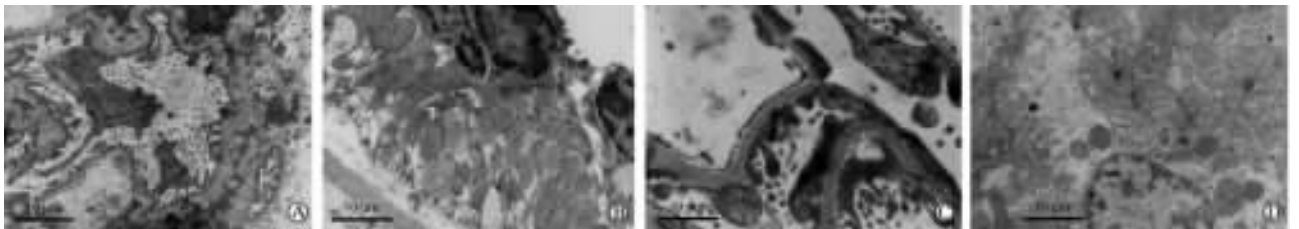


图 3 大鼠离体肾脏低温保存 72 h 的超微结构变化

Fig 3 Ultrastructural changes of isolated rat kidneys cold-stored for 72 h

A,B:Control group; C,D: Ketamine group

3 讨论

氯胺酮自 1965 年用于临床以来,在麻醉中一直享有独特的地位,至今仍广泛用于哮喘活动期、失血性休克的麻醉诱导、儿童等不合作患者的镇静、局麻不完善时辅助及烧伤换药等短小操作的镇痛。近年来发现氯胺酮还具有抗炎及保护缺血再灌注(I/R)损伤的作用,其可能的作用机制是:(1)氯胺酮抑制促炎性细胞因子的释放^[5-6],从而降低 PMN 活性和毒性物质释放,减轻器官组织再灌注损伤的作用^[7];

(2)氯胺酮抑制中性粒细胞激活、黏附、呼吸爆发等^[8],从而抑制了 PMN 介导的氧自由基的生成;(3)氯胺酮抑制 I/R 过程中细胞内钙超载,Nishina 等^[9]发现,随氯胺酮剂量的增高,PMN 内游离钙浓度相应下降,提示氯胺酮对 PMN 功能的抑制可能与其抑制细胞内钙离子升高有关。

1988 年,Belzer 等学者指出:一种成功的器官保存液的组成应满足下列 5 个要求:(1)减少由于低温保存导致的细胞水肿;(2)防止细胞的酸化作用;(3)防止灌注保存过程中细胞间隙的肿胀;(4)防止氧自

由基的损伤,尤其是在再灌注过程中;(5)提供再生高能磷酸化合物的底物。因此,本研究根据氯胺酮可能的抗炎及保护 I/R 作用,将氯胺酮加入国产经典器官保存液 HC-A 中,通过光镜和电镜观察氯胺酮对大鼠肾脏灌注、低温保存的影响,以探讨氯胺酮可否改善 HC-A 的器官保存效果。

低温保存期间肾小球、肾小管细胞形态学改变能够比较直观地反映器官组织结构损伤情况,而电镜结果则更细致地反映出组织在低温缺氧环境下的超微形态改变。本研究观察到保存 0~24 h 两组肾脏组织结构均基本完整;保存超过 48 h 后,氯胺酮组出现较明显的形态学改变,线粒体肿胀、空泡变,嵴模糊,断裂明显,基质电子密度增高或出现透明区;保存至 72 h,氯胺酮组肾脏组织严重破坏,线粒体结构崩解,组织细胞发生不可逆改变,而对照组对肾皮质线粒体的保护作用优于氯胺酮组。线粒体肿胀可能由线粒体通透性改变引起的。当细胞缺血、缺氧或再灌注而损伤线粒体后,高能磷酸化合物合成中断,线粒体通透性增加,线粒体肿胀、嵴断裂,细胞色素 C 释放,细胞凋亡相关的酶被激活,细胞发生凋亡或坏死。

氯胺酮抗缺血再灌注损伤作用在本研究中没有体现,反而表现出一定的损伤作用。正常生理状态下肾脏髓质的氧合作用处于供需平衡,打破平衡会发生低氧损伤,导致急性肾小管坏死,尤其髓襻升支粗段对低氧更为敏感,易发生坏死。循环血流中任何因素导致的儿茶酚胺增加均会引起肾脏血管收缩,因此尽管肾血流正常,髓内仍有可能发生缺血。由此推论,用加入氯胺酮的 HC-A 保存液灌注和保存肾脏,可能使循环或组织内 ANP、FFA 和儿茶酚胺浓度增加,这可能引起脂代谢异常,肾脏皮质和髓质的血管收缩,血流再分布,肾小管缺氧坏死,线粒体 ATP 耗竭。

本研究发现临床麻醉浓度的消旋氯胺酮不利于大鼠肾脏灌注和离体低温延时保存,提示在移植物供体或受体应用氯胺酮有可能影响移植物的形态与

功能。氯胺酮的左旋和右旋异构体对细胞代谢和细胞凋亡等方面的影响尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Xue Q S, Yu B W, Wang Z J, Chen H Z. Effects of ketamine, midazolam, thiopental, and propofol on brain ischemia injury in rat cerebral cortical slices[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 115-120.
- [2] Ozden S, Isenmann S. Neuroprotective properties of different anesthetics on axotomized rat retinal ganglion cells *in vivo* [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21: 73-82.
- [3] 张 昊,何长民. HC-A 液用于离体肾脏保存 2000 例总结[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2003, 1: 1-4.
- [4] Böhmová R, Viklický O. Renal ischemia-reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2001, 46: 267-276.
- [5] Beilin B, Rusabrov Y, Shapira Y, Roytblat L, Greemberg L, Yardeni I Z, et al. Low-dose ketamine affects immune responses in humans during the early postoperative period[J]. *Br J Anaesth*, 2007, 99: 522-527.
- [6] Yu M, Shao D, Liu J, Zhu J, Zhang Z, Xu J. Effects of ketamine on levels of cytokines, NF-kappa B and TLRs in rat intestine during CLP-induced sepsis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 1076-1082.
- [7] Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Nandate K, Shigematsu A. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood[J]. *Can J Anaesth*, 2001, 48: 819-823.
- [8] Weigand M A, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer H J. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils *in vitro* [J]. *Anesth Analg*, 2000, 90: 206-212.
- [9] Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, et al. The inhibitory effects of thiopental, midazolam and ketamine on human neutrophil functions [J]. *Anesth Analg*, 1998, 86: 159-165.
- [10] Cavallari G, Catena F, Santoni B, Montalti R, Turi P, Beltempo P, et al. Kidney preservation in pigs with Wisconsin and Celsior Solution[J]. *Minerva Chir*, 2002, 57: 295-300.

[本文编辑] 孙 岩