

不同剂量氯胺酮对大鼠离体缺血再灌注损伤心肌 8-异前列腺素水平的影响

于冬梅 周锦 张铁铮 张倩 姚婧 金强

【摘要】 目的 比较不同剂量氯胺酮对大鼠离体缺血再灌注损伤心肌 8-异前列腺素的影响。**方法** 成年 Wistar 大鼠 24 只,随机均分为心肌缺血再灌注(IR)组、5 $\mu\text{mol/L}$ 氯胺酮(KL)组、10 $\mu\text{mol/L}$ 氯胺酮(KM)组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 氯胺酮(KH)组。四组首先采用 Langendorff 逆灌装置建立离体心脏缺血再灌注模型,以 K-H 液平衡灌注 10 min 后,再分别应用不含氯胺酮、含 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 氯胺酮的 K-H 液灌注 10 min,之后全心停灌 25 min,复灌 30 min。测定冠状动脉流出液中总乳酸脱氢酶(LDH)、心尖部心肌组织 8-异前列腺素和超氧化物歧化酶(SOD)含量,并取左心室心肌组织观察超微结构变化。**结果** 与 IR 组比较,KL 和 KM 组 8-异前列腺素、SOD 及 LDH 含量均无统计学差异($P > 0.05$),超微结构变化也未见损伤减轻;KH 组 8-异前列腺素和 LDH 含量明显升高($P < 0.05$),超微结构损伤加重。**结论** 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 氯胺酮对大鼠离体心肌缺血再灌注损伤和 8-异前列腺素含量无明显影响,而 50 $\mu\text{mol/L}$ 氯胺酮则增加 8-异前列腺素含量、加重心肌损伤。

【关键词】 心肌再灌注损伤; 氯胺酮; 异前列腺素; 脂质过氧化作用

Effects of different doses of ketamine on 8-isoprostane in isolated rat hearts after myocardial ischemia-reperfusion YU Dong-mei, ZHOU Jin, ZHANG Tie-zheng, ZHANG Qian, YAO Jing, JIN Qiang. Department of Anesthesiology, General Hospital of Shenyang Command, Shenyang 110016, China
Corresponding author: JIN Qiang, Email: jinqiang1972@126.com

【Abstract】 Objective To compare the effects of three different doses of ketamine on 8-isoprostane in isolated rat hearts after myocardial ischemia-reperfusion. **Methods** Twenty-four adult Wistar rats weighing 240-300 g were randomly divided into 4 groups ($n = 6$ each): ischemia-reperfusion group (I/R group), 5 $\mu\text{mol/L}$ ketamine group (KL), 10 $\mu\text{mol/L}$ ketamine group (KM), 50 $\mu\text{mol/L}$ ketamine group (KH). The isolated myocardial ischemia-reperfusion models were prepared with Langendorff perfusion system. The rat hearts were initially perfused with Krebs-Henseleit (K-H) solution for 10 min, and then respectively perfused with K-H solution contained no ketamine, 5 $\mu\text{mol/L}$ ketamine, 10 $\mu\text{mol/L}$ ketamine, 50 $\mu\text{mol/L}$ ketamine for 10 min followed by 25 min global ischemia and 30 min reperfusion. The total lactate dehydrogenase (LDH) in the reperfusion K-H solution, levels of 8-isoprostane and SOD activity of tissue samples from apex of hearts were evaluated. The tissues from left ventricular were used for observing myocardial ultrastructure. **Results** Levels of 8-isoprostane, LDH and SOD activity in group KL and KM did not significantly differ from I/R group ($P > 0.05$). The microscopic examination also showed that two doses ketamine cannot alleviate the myocardial I/R injury. While compared with I/R group, levels of 8-isoprostane and LDH were increased significantly ($P < 0.05$), the myocardial ultrastructure was injured more severely. **Conclusions** Ketamine (5, 10 $\mu\text{mol/L}$) cannot decrease the levels of 8-isoprostane or suppress myocardial ischemia-reperfusion injury. Ketamine (50 $\mu\text{mol/L}$) aggravate lipid peroxidation and myocardial ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Myocardial reperfusion injury; Ketamine; Isoprostanes; Lipid peroxidation

氯胺酮对血流动力学抑制轻微,可用于高危、低血容量和冠状动脉搭桥术患者的麻醉^[1-2],而此类患者是围术期发生心肌缺血的高危人群。长时间心肌缺血和

随后的再灌注可引发脂质过氧化,进而导致心肌缺血再灌注损伤。有研究表明,氯胺酮能减轻脑和下肢缺血再灌注引起的脂质过氧化^[3-4],而 8-异前列腺素是可靠的脂质过氧化标志物^[5-6]。因此,本研究拟通过观察不同剂量氯胺酮对大鼠离体缺血再灌注损伤心肌 8-异前列腺素的影响,评价氯胺酮对心肌缺血再灌注损伤的作用。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.21.033

作者单位:110016 沈阳军区总医院麻醉科(于冬梅、周锦、张铁铮、姚婧、金强);中国医科大学口腔医学院麻醉科(张倩)

通讯作者:金强,Email:jinqiang1972@126.com

材料与方法

1. 实验动物及分组:健康成年 Wistar 大鼠 24 只(雌雄不拘,体重 240 ~ 300 g,购自沈阳军区总医院动物实验中心,饲养条件:室温 18 ~ 25 °C,相对湿度 40% ~ 60%,正常光照,空气流通,自由摄食、饮水),随机数字表法均分为心肌缺血再灌注(IR)组、5 μmol/L 氯胺酮(KL)组、10 μmol/L 氯胺酮(KM)组和 50 μmol/L 氯胺酮(KH)组,每组 6 只。

2. 大鼠离体缺血再灌注损伤心肌模型的制备:大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)麻醉和肝素 1000 U/kg 抗凝后,迅速开胸,在无菌条件下摘取心脏,于 0 ~ 4 °C Kerbs-H(K-H)液(NaCl 118 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、葡萄糖 11 mmol/L)内迅速行主动脉插管并与 Langendorff 逆灌装置连接。以 95% O₂ 和 5% CO₂ 预充饱和的 K-H 液行恒温[(37 ± 0.2) °C]恒压(90 cm H₂O, 1 cm H₂O = 0.098 kPa)灌注 10 min,四组再分别应用不含氯胺酮、含 5 μmol/L 氯胺酮、10 μmol/L 氯胺酮和 50 μmol/L 氯胺酮的 K-H 液灌注 10 min,之后以夹闭主动脉的方法全心停灌 25 min,复灌 30 min。

3. 标本采集:留取冠状动脉流出液检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH);灌注末取心尖部心肌组织,放入 -70 °C 冰箱待行 8-异前列腺素和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定;取左心室心肌组织置于 2.5% 的戊二醛固定,电镜下观察超微形态学变化。

4. 指标检测:ELISA 法检测心肌组织 8-异前列腺素含量(美国 Cayman 公司检测试剂盒),采用芬兰产 THERMO 全自动酶标仪测定;黄嘌呤氧化酶法测定心肌组织 SOD 含量(南京建成公司检测试剂盒);日立全自动生化分析仪测定冠状动脉流出液 LDH 活性。所有操作步骤均按产品说明书进行。

5. 心肌超微形态学检查:取左心室心肌组织,置于 2.5% 戊二醛固定,经生理盐水冲洗,硝酸镧固定,磷酸盐缓冲液漂染,锇酸固定,逐级脱水、浸透、包埋、切片,并经枸橼酸铅、醋酸铀双染,透射电镜下观察心肌组织超微形态学改变。

6. 统计学分析:应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠冠状动脉流出液 LDH、心肌组织 8-异前列

腺素和 SOD 含量的变化(表 1):与 IR 组比较,KL 和 KM 组 8-异前列腺素、LDH 和 SOD 含量均无统计学差异($P > 0.05$);KH 组 8-异前列腺素及 LDH 含量明显升高($P < 0.05$),SOD 含量无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠 8-异前列腺素、SOD 及 LDH 含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	8-异前列腺素 (pg/ml)	SOD (U/mg prot)	LDH (U/g)
IR 组	6	191.7 ± 51.2 ^a	26.1 ± 3.9	18.2 ± 3.8 ^a
KL 组	6	231.1 ± 64.7 ^a	24.4 ± 5.9	18.0 ± 4.3 ^a
KM 组	6	166.8 ± 36.0 ^a	27.8 ± 6.0	15.7 ± 4.6 ^a
KH 组	6	364.6 ± 62.0	24.8 ± 7.1	27.2 ± 4.8

注:与 KH 组比较,^a $P < 0.05$

2. 心肌超微形态学检查(透射电镜):IR、KL 和 KM 组心肌纤维排列较紊乱,细胞水肿,部分肌丝溶解,线粒体嵴减少,外膜破损;KH 组心肌纤维排列紊乱,细胞核形不规则,肌丝溶解,线粒体嵴减少,外膜破损及空泡样变(图 1)。

讨 论

氯胺酮既具有中枢交感神经兴奋作用,亦有心肌抑制作用,故既往并不常规用于心脏手术。近年研究显示,冠状动脉搭桥术(CABG)麻醉诱导时复合氯胺酮,可显著提高患者的血流动力学稳定性直至锯胸骨阶段^[2]。同时,S(+)氯胺酮维持麻醉可显著降低 CABG 患者心肌肌钙蛋白 T 水平^[7],其较舒芬太尼更能减少血浆促炎细胞因子 IL-6 和 IL-8 的释放,且可增加抗炎细胞因子 IL-10 的水平,有利于减轻体外循环诱导的炎症反应^[8]。然而,由于氯胺酮具有显著交感神经兴奋作用^[9],在体研究无法排除神经体液因素的影响。基于此选用了大鼠 Langendorff 离体心脏灌注模型进行研究,用以反映氯胺酮本身对心脏缺血再灌注损伤的直接作用。由于临床上应用氯胺酮的有效浓度为(9.3 ± 0.8) μmol/L,清醒浓度为(2.7 ± 0.9) μmol/L,本研究选择了 5 μmol/L、10 μmol/L 和 50 μmol/L 浓度,用以模拟亚临床浓度、临床浓度和超临床浓度。

缺血再灌注后,心肌细胞膜通透性增高、LDH 释放增加。心肌细胞产生的大量氧自由基可引发各种生物膜的脂质过氧化反应。脂质过氧化是一种链式反应,能氧化不饱和脂肪酸,损害生物膜结构,并产生有毒的代谢产物,例如 MDA、8-异前列腺素。8-异前列腺素生成于细胞膜磷脂,是非环氧化酶依赖的自由基催化花生四烯酸的脂质过氧化产物,化学性质稳定。有研究表明 8-异前列腺素可作为标志物,早期准确评估众多疾病的氧化应激状态^[10]。还可诱导单核细胞黏附于血

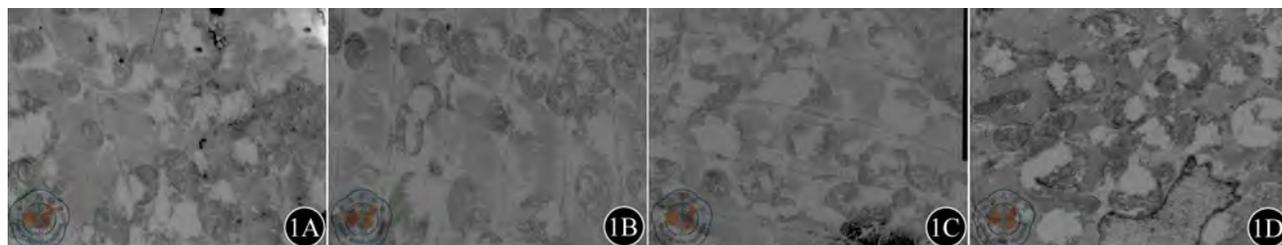


图1 各组大鼠心肌超微形态学检测结果(透射电镜×4000)。1A: IR组; 1B: KL组; 1C: KM组; 1D: KH组

管内皮,促进血小板聚集,加速自由基生成,引起细胞结构和功能的改变以及血管收缩,加重心肌缺血性损伤。SOD可歧化氧自由基,阻断羟自由基的生成,使细胞免受损伤。因此,本研究选用8-异前列腺素代表大鼠离体缺血再灌注损伤心肌的脂质过氧化程度,测定冠状动脉流出液LDH浓度和心肌SOD含量,用以反映心肌损伤程度和自由基的清除能力。结果显示,IR、KL和KM组8-异前列腺素、LDH和SOD含量均无统计学差异,心肌超微形态学改变相似。表明5 μmol/L和10 μmol/L氯胺酮并不能增加自由基清除,减轻大鼠心肌缺血再灌注脂质过氧化和心肌损伤。这与在体研究结果不同^[3-4],原因可能是在体时氯胺酮主要通过抑制缺血再灌注后中性粒细胞黏附冠状动脉血管和生成超氧阴离子,发挥心肌保护作用^[11-13],而离体灌注模型丧失了中性粒细胞的趋化、聚集和黏附,使保护作用未能体现出来。本研究中KH组8-异前列腺素、LDH明显高于IR组,心肌超微形态学损伤加重,表明50 μmol/L氯胺酮加重了缺血再灌注心肌的脂质过氧化和心肌损伤。可能与高浓度氯胺酮增强心肌抑制作用,加剧心肌缺氧有关,其具体机制尚待进一步研究。

综上所述,5 μmol/L和10 μmol/L氯胺酮对大鼠离体心肌缺血再灌注损伤和8-异前列腺素含量无明显影响,而50 μmol/L氯胺酮则增加8-异前列腺素含量、加重心肌损伤。

参 考 文 献

- [1] Raeder JC, Stenseth LB. Ketamine: a new look at an old drug. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2000, 13: 463-468.
- [2] Basagan-Mogol E, Goren S, Korfali G, et al. Induction of anesthesia in coronary artery bypass graft surgery: the hemodynamic and analgesic effects of ketamine. *Clinics*, 2010, 65: 133-138.

- [3] Lips J, deHaan P, Bodewits P, et al. Neuroprotective effects of riluzole and ketamine during transient spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*, 2000, 93: 1303-1311.
- [4] Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, et al. Ketamine sedation during spinal anesthesia for arthroscopic knee surgery reduced the ischemia-reperfusion injury markers. *Anesth Analg*, 2005, 101: 904-909.
- [5] Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 1998, 28: 659-671.
- [6] Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 279-286.
- [7] Neuhäuser C, Preiss V, Feurer MK, et al. Comparison of S-(+)-ketamine-with sufentanil-based anaesthesia for elective coronary artery bypass graft surgery: effect on troponin T levels. *Br J Anaesth*, 2008, 100: 765-771.
- [8] Welters ID, Feurer MK, Preiss V, et al. Continuous S-(+)-ketamine administration during elective coronary artery bypass graft surgery attenuates pro-inflammatory cytokine response during and after cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth*, 2011, 106: 172-179.
- [9] Craven R. Ketamine. *Anaesthesia*, 2007 (62 Suppl 1): 48-53.
- [10] Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ, et al. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*, 2004, 18: 1791-1800.
- [11] Szekely A, Heindl B, Zahler S, et al. S-(+)-ketamine, but not R(-)-ketamine, reduces postischemic adherence of neutrophils in the coronary system of isolated guinea pig hearts. *Anesth Analg*, 1999, 88: 1017-1024.
- [12] Shen H, Jin L, Zhuang X, et al. A single small dose of ketamine prevents lung injury following hepatic ischemia-reperfusion in rabbits. *J Chin Med Assoc*, 2011, 74: 350-356.
- [13] Lu HW, He GN, Ma H, et al. Ketamine reduces inducible superoxide generation in human neutrophils *in vitro* by modulating the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-mediated pathway. *Clin Exp Immunol*, 2010, 160: 450-456.

(收稿日期:2012-06-19)

(本文编辑:吴莹)