

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.03.005

氯胺酮单次注射对小鼠海马区单羧酸转运蛋白家族表达的影响^{*}

杜 傲¹ 何柏林^{1,2} 李延柠¹ 温歌华¹ 董志斌¹ 任兴华¹ 吴 旭^{1△}(¹ 中国医科大学法医学院, 沈阳 110122; ² 广东华曦法医物证司法鉴定所, 深圳 518000)

吴旭, 医学博士、美国哈佛大学医学院麻省总医院博士后, 教授, 博士研究生导师, 现任中国医科大学法医学院党总支书记兼副院长。参加编写全国高等医学院校法医学专业规划教材《法医毒理学》第 4 版及第 5 版、《法医学》(第 2 版)、创新教材《法医学》(第 1 版)。参加编写专业著作《实用法医学》(第 1 版)、《法医学辞典》(第 1 版)。在国际及国家级专业学术期刊发表论文 70 余篇, 其中 SCI 文章 10 余篇。承担国家自然科学基金面上项目 2 项, 辽宁省自然科学基金项目 2 项、辽宁省教育厅科学研究一般项目 1 项、市级课题 2 项, 参加国家自然科学基金及省市各类课题多项, 目前主要从事毒麻药品中枢神经系统损害及颅脑损伤分子病理学机制等方面的研究。获辽宁省科技进步三等奖、沈阳市科技进步三等奖各 1 项。除科研、教学及培养研究生等工作外, 还承担和参加省内外司法机关和医疗卫生行政部门委托的法医病理学、法医毒理学鉴定工作, 并多次被邀请参加省内外疑难案件的法医学鉴定。

摘 要 **目的** 探讨氯胺酮单次注射小鼠海马区单羧酸转运蛋白 MCT1、MCT2 和 MCT4 的表达变化。**方法** 3 月龄 C57BL/6 小鼠 40 只随机分为 saline 组及 ket 1 组、ket 2 组、ket 3 组、ket 4 组, 每组 8 只, 分别腹腔注射生理盐水及 10、20、40、80mg/kg 氯胺酮, 采用 Western blot 检测不同剂量氯胺酮单次注射后小鼠海马区 MCT1、MCT2 和 MCT4 的蛋白表达情况。**结果** Western blot 结果显示 MCT1 蛋白在各 ket 组表达水平均下降 ($P < 0.05$), MCT2 蛋白仅在 ket 3 组及 ket 4 组表达水平升高 ($P < 0.01$), MCT4 蛋白在各 ket 组表达水平均下降 ($P < 0.01$)。**结论** 单次注射氯胺酮致小鼠脑海马区 MCT1 和 MCT4 表达减弱、MCT2 表达增强, 提示氯胺酮所致神经毒性作用可能与能量代谢受到影响相关。

关键词 氯胺酮; 单羧酸转运蛋白; 海马; 能量代谢

中图分类号: R89 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)06-172-05

Effects of single administration of ketamine on the expression of monocarboxylate transporter in mouse hippocampus

DU Ao¹, HE Bolin^{1,2}, LI Yanning¹, WEN Gehua¹, DONG Zhibin¹, REN Xinghua¹, WU Xu^{1△}(¹ School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China;² Guangdong Huaxi Forensic Institute of Judicial Expertise, Shenzhen 518000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes in the levels of hippocampal MCT1, MCT2 and MCT4 in the mice after single injection of ketamine. **Methods** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into five groups with 8 mice per group treated with the i. p. injections of saline, 10 mg/kg ketamine, 20 mg/kg ketamine, 40mg/kg and 80 mg/kg ketamine respectively. Then western blot were applied to observe the protein levels of MCT1, MCT2 and MCT4. **Results** Western blot results revealed that the levels of MCT1 and MCT4

* [基金项目] 国家自然科学基金(81171032, 81671867); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2014316); 辽宁省科学技术基金项目(2015020514)

△ [通信作者] 吴旭, E-mail: xwu@cmu.edu.cn

significantly decreased compared to saline group ($P < 0.05$), but levels of MCT2 protein exhibited the obvious increase in ket3 and ket4 group ($P < 0.01$). **Conclusion** Ketamine decreased the hippocampal levels of MCT1 and MCT4 after single administration, whereas the expression of MCT2 were increased. Our results suggest that the disturbance of energy metabolism in brain may be involved in the neurotoxicity of ketamine.

Keywords: Ketamine; Monocarboxylate transporter; Hippocampus; Energy metabolism

氯胺酮是目前临床常用的全身麻醉药,因其强烈的致幻觉及致欣快作用,自 20 世纪 90 年代起氯胺酮作为一种新型毒品在我国迅速引起广泛性滥用。过去研究表明,氯胺酮滥用者可出现一系列神经毒性反应及行为学改变。健康受试者在静脉注射氯胺酮 1min 后便开始出现学习记忆能力下降及难以集中注意力等变化,这一影响通常持续 30 ~ 60min,但受试者出现的轻微幻觉可长达 24h^[1]。

单羧酸转运蛋白(monocarboxylate transporter, MCTs)是一种存在于细胞膜表面的介导乳酸跨膜转运的蛋白,脑内主要包含 MCT1、MCT2、MCT4 三种亚型,其中 MCT1、MCT4 特异性表达于星形胶质细胞,MCT2 特异性表达于神经元。乳酸是脑内主要的能源物质,尤其在执行神经活动、神经细胞损伤等特殊情况下,乳酸在神经胶质细胞和神经元间的传递对于神经元活性维持、受损神经元修复及大脑功能行使必不可少。研究发现,MCT1、MCT2、MCT4 在细胞膜上表达水平的变化可以影响乳酸转运过程,改变脑内的能量代谢情况,进而引起神经功能改变^[2]。

本文拟进行氯胺酮单次注射,采取 Western blot 方法检测小鼠海马区 MCT1、MCT2 和 MCT4 蛋白表达变化,探讨氯胺酮的神经毒性作用与乳酸转运障碍之间的可能关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3 月龄健康雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,体质量 25 ~ 30g,由中国医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药品、试剂及仪器 兔抗小鼠 MCT1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-50325)、小鼠抗小鼠 MCT2 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-166925)、兔抗小鼠 MCT4 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-50329)、小鼠抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体(中山金桥生物技术公司,TA-08)、细胞膜蛋

白与浆蛋白提取试剂盒(碧云天)等。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及分组 将小鼠随机分为 saline 组和 ket 1、ket 2、ket 3、ket 4 组,每组 8 只,分别腹腔注射生理盐水及 10、20、40、80mg/kg 氯胺酮,给药后 6h 取材。

1.2.2 Western blot 检测 分离小鼠海马,提取海马胞膜蛋白,对 MCT1、MCT2 和 MCT4 进行蛋白定量检测。15μg 蛋白等量上样,SDS-PAGE 凝胶电泳后,湿膜法转印至 PVDF 膜,经 8% 脱脂奶粉室温封闭 2.5h 后加入兔抗小鼠多克隆抗体 MCT1 (1:300 稀释)、小鼠抗小鼠单克隆抗体 MCT2 (1:300 稀释)和兔抗小鼠多克隆抗体 MCT4 (1:300 稀释) 4℃孵育过夜。TBST 洗膜,加入相应的二抗室温 1h, TBST 洗膜后 ECL 发光。利用 Scion Image 软件分别检测 MCT1、MCT2、MCT4 和 GAPDH 蛋白表达的平均光密度值,分别用 MCT1、MCT2、MCT4 与 GAPDH 相比,得到对应指标蛋白表达相对量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 for Windows 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,总体差异采用方差分析,并运用 LSD-t 法进行事后两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠海马组织 MCT1 表达结果

MCT1 片段大小为 43kDa,各 ket 组 MCT1 蛋白表达相对量较 saline 组蛋白表达相对量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),不同剂量组间无统计学差异。见图 1。

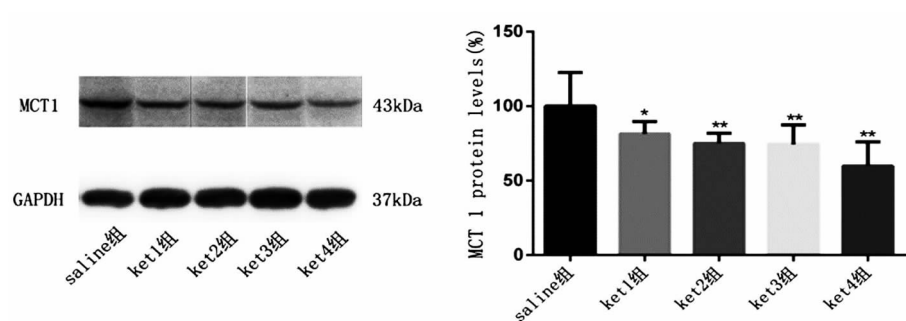
2.2 各组小鼠海马组织 MCT2 表达结果

MCT2 片段大小为 45kDa, ket 3 组、ket 4 组 MCT2 蛋白表达相对量较 saline 组蛋白表达相对量升高,氯胺酮 ket 1 组及 ket 2 组较 saline 组无明显变化($P < 0.01$),组间无统计学差异。见图 2。

2.3 各组小鼠海马组织 MCT4 表达结果

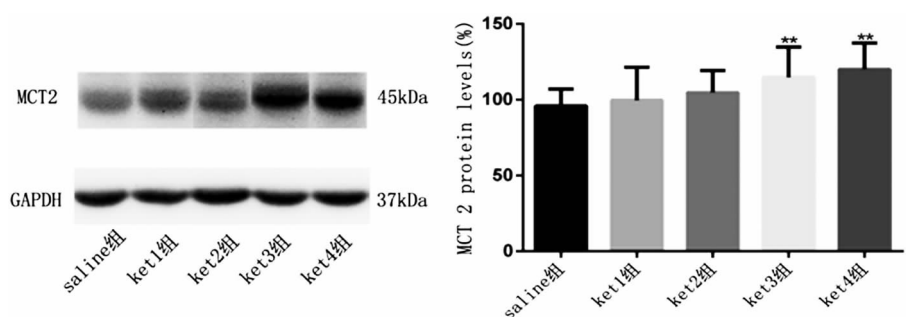
MCT4 片段大小为 43kDa,各 ket 组 MCT4 蛋

白表达相对量较 saline 组蛋白表达相对量降低 ($P < 0.01$), 不同剂量组间无统计学差异。见图 3。



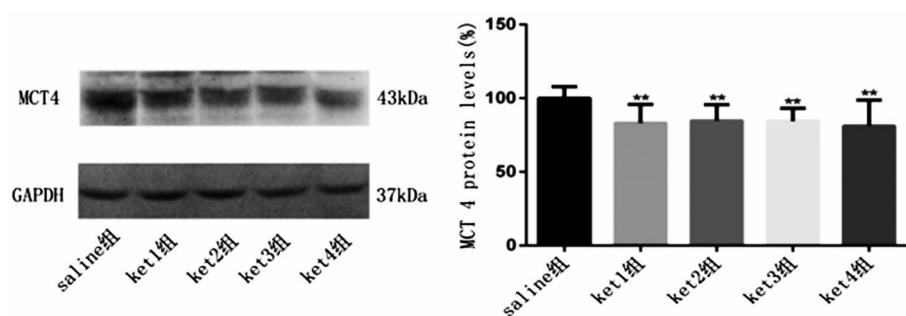
注: 5 组间比较, $F = 8.737, P < 0.0001$; 与 saline 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 各组海马组织中 MCT1 的表达



注: 5 组间比较, $F = 3.763, P = 0.0093$; 与 saline 组比较, ** $P < 0.01$

图 2 各组海马组织中 MCT2 的表达



注: 5 组间比较, $F = 4.565, P = 0.0050$; 与 saline 组比较, ** $P < 0.01$

图 3 各组海马组织中 MCT4 的表达

3 讨论

氯胺酮为非竞争性 N-甲基-D-天门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体拮抗剂, 广泛应用于临床麻醉, 同时也是我国近年来最常见的滥用物质之一。研究发现, 氯胺酮短期注射会导致前额叶及海马区神经细胞变性、凋亡, 且损伤有一定的剂量-效应关系^[3,4]。Duan 等^[5]以 30mg/kg 氯胺酮注射 SD 大鼠 1h 后, 进行行为学实验, 发现其在水迷宫中表现出明显的空间参考记忆的损伤, 同

时电生理结果显示大鼠海马区出现了可逆性突触功能减弱。但也有文献报道, 分别以 25、70 及 150mg/kg 单次注射氯胺酮并未引起小鼠神经细胞凋亡增加; 注射后 1、2、3d 分别进行行为学实验, 均无异常表现^[6]。本课题组前期行为学实验显示, C57BL/6 小鼠随机分组, 分别接受腹腔单次注射 10、20、40、80mg/kg 氯胺酮后 3h 时开始行为学实验, 与生理盐水组相比, 氯胺酮处理组小鼠在旷场实验及 Y 迷宫中的表现并未出现明显改变。提示不同剂量氯胺酮单次注射 3h 后, 对小鼠的行为及

认知功能未造成影响^[7]。分析本实验组与之前研究结果不同的原因可能与实验动物及行为学测试时间等方面不同。

近年来,大量研究发现乳酸是大脑所需能量的主要来源^[8]。乳酸在星形胶质细胞内产生后,经其胞膜上的 MCT1、MCT4 转出至细胞间隙,随后由特异性表达于神经细胞膜上的 MCT2 摄取、转至胞内为进一步神经活动提供能量,这一经 MCTs 介导的乳酸转运是维持神经细胞活性及行使大脑功能的必备环节^[9-10]。Schurr 等^[11]通过对短暂性大鼠缺血大鼠模型的研究发现,腹腔注射 4-CIN 抑制 MCT2 表达后,大鼠脑损伤区域范围明显增加、损伤程度加重,提示 MCT 对于大脑活性的维持及损伤后修复的重要意义。此外,有研究发现海马内注射 4-CIN 后,SD 大鼠记忆功能受到严重影响,且这种影响可以被乳酸缓解,提示记忆功能与 MCT 介导乳酸转运息息相关^[12]。Lu 等^[13]发现,与对照组相比,AD 模型大鼠在水迷宫实验中明显表现出记忆功能受损,同时发现实验组脑皮质及海马区乳酸水平均显著降低,MCT 2 的表达也显著减少,这一结果也提示 MCT 在记忆功能中的重要作用。

本实验通过氯胺酮单次注射,Western bolt 检测小鼠海马胞膜蛋白发现,表达于星形胶质细胞膜的 MCT1、MCT4 蛋白在氯胺酮组的蛋白表达相对量均较生理盐水组蛋白表达相对量低,且差异有统计学意义,但各实验组间差异无统计学意义;而表达于神经元胞膜的 MCT2 蛋白表达量仅在 ket 3 组和 ket 4 组有统计学变化,呈升高趋势。以上实验结果说明,氯胺酮单次注射在 10 ~ 80mg/kg 剂量中均可致海马区星形胶质细胞膜上 MCT1 和 MCT4 表达下降。与 MCT1 和 MCT4 相比,MCT2 对氯胺酮的反应存在剂量效应,从 40mg/kg 才开始引起蛋白表达改变,且趋势与 MCT1、MCT4 相反,由此我们推测 MCT2 表达变化可能是由于氯胺酮作用引起 MCT1、MCT4 在星形胶质细胞膜上表达下降,引起乳酸的星形胶质细胞-神经元转运障碍,进而机体反应性上调神经元胞膜上 MCT2 的表达,增加进入神经元的乳酸量,维持神经元的能量代谢及正常的生理活动。

脑是机体主要的耗能器官,能量代谢对于维持神经细胞的活性及功能必不可少。对 AD 患者的研究发现,其脑内能量的摄取及利用障碍较其

组织学及行为学改变更早出现^[14]。我们发现氯胺酮单次注射虽不引起明显的行为学异常,但氯胺酮组小鼠海马区 MCT1、MCT4 表达下降,MCT2 表达升高,提示即使单次使用氯胺酮也可影响海马区乳酸转运,引起能量代谢异常,这一变化为进一步探讨氯胺酮的神经毒性作用与乳酸转运、能量代谢之间的可能关系,阐明氯胺酮滥用所致认知功能障碍的机制提供有益的数据。

参考文献:

- [1] Pfenninger EG, Durieux ME, Himmelseher S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers[J]. *Anesthesiology*, 2002, 96(2): 357-366.
- [2] Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 810-823. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.018.
- [3] Zuo D, Lin L, Liu Y, et al. Baicalin attenuates ketamine-induced neurotoxicity in the developing rats: involvement of PI3K/Akt and CREB/BDNF/Bcl-2 pathways[J]. *Neurotox Res*, 2016, 30(2): 159-172. DOI:10.1007/s12640-016-9611-y.
- [4] Liu F, Paule MG, Ali S, et al. Ketamine-induced neurotoxicity and changes in gene expression in the developing rat brain[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2011, 9(1): 256-261. DOI:10.2174/157015911795017155.
- [5] Duan TT, Tan JW, Yuan Q, et al. Acute ketamine induces hippocampal synaptic depression and spatial memory impairment through dopamine D1/D5 receptors[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 228(3): 451-461. DOI:10.1007/s00213-013-3048-2.
- [6] Ribeiro PO, Rodrigues PC, Valentim AM, et al. A single intraperitoneal injection of ketamine does not affect spatial working, reference memory or neurodegeneration in adult mice: An animal study[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2013, 30(10): 618-626. DOI:10.1097/EJA.0b013e3283610321.
- [7] Li Y, Shen R, Wen G, et al. Effects of Ketamine on levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the hippocampus of mice following acute or chronic administration[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8. DOI:10.3389/fphar.2017.00139.

(下转第 180 页)

别、亲权鉴定及遗传学研究提供依据和有效补充。

参考文献:

- [1] 周保成,许天龙,毛华芬,等. 19 个 STR 基因座分型在 741 例亲子鉴定中的应用[J]. 中国法医学杂志, 2015,30(4):396-398. DOI: 10. 13618/ j. issn. 1001-5728. 2015. 04. 014.
- [2] 赵方,伍新尧,蔡贵庆. Modified-Powerstates 软件在法医生物统计中应用[J]. 中国法医学杂志,2003,18(5):297-299.
- [3] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. Journal of Heredity, 1995, 86(3):248-249. DOI:10. 1093/ oxfordjournals. jhered. a111573.
- [4] 张国安,宋如莹,李璐,等. 山东济宁地区汉族人群 15 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 中国法医学杂志, 2016,31(6):619-620. DOI: 10. 13618/ j. issn. 1001-5728. 2016. 06. 026.
- [5] Gill P, Urquhart T A, Millican E, et al. A new method of STR interpretation using inferential logic--development of a criminal intelligence database[J]. Int J Legal Med, 1996,109(1):14-22. DOI:10. 1007/bf01369596.
- [6] Chen L, Lu H, Qiu P, et al. Polymorphism analysis of 15 STR loci in a large sample of Guangdong (Southern China) Han population[J]. Leg Med (Tokyo), 2015, 17(6):489-492. DOI: 10. 1016/j. legalmed. 2015. 10. 001.
- [7] 董迎春,李诗柳,周如华,等. 大规模汉族个体 15 个 STR 基因座遗传多态性调查[J]. 中国法医学杂志, 2016,31(6):630-632. DOI: 10. 13618 / j. issn. 1001-5728. 2016. 06. 031.
- [8] 靳婵婵,贺静,王蕾,等. 云南汉族 15 个短串联重复序列基因座遗传多态性特征及分析[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(10):1428-1436. DOI:10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2016. 10. 005.
- [9] Wang X, Chen W, Zhao L, et al. Genetic polymorphism analysis of 3 short tandem repeat loci on chromosome 21 in Chinese Han population in Shaanxi Province [J]. Journal of Southern Medical University, 2008, 28(10):1906-1908.
- [10] 魏丽,张涛,孙数毅,等. 中国 4 个少数民族人群 18 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 中国法医学杂志,2015, 30(3):301-304. DOI: 10. 13618/j. issn. 1001-5728. 2015. 03. 023.
- [11] Hossain T, Hasan M, Mazumder AK, et al. Genetic polymorphism studies on 22 autosomal STR loci of the PowerPlex Fusion System in Bangladeshi population[J]. Leg Med (Tokyo), 2016, 23:44-46. DOI:10. 1016 / j. legalmed. 2016. 09. 005.

(收稿日期 2017-05-05)

(本文编辑:甘慧敏)

(上接第 175 页)

- [8] Boumezbeur F, Petersen KF, Cline GW, et al. The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. J Neurosci, 2010, 30(42):13983-13991. DOI:10. 1523/JNEUROSCI. 2040-10. 2010.
- [9] Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation[J]. Cell Metab, 2011, 14(6):724-738. DOI:10. 1016/j. cmet. 2011. 08. 016.
- [10] Gibbs ME, Lloyd HG, Santa T, et al. Glycogen is a preferred glutamate precursor during learning in 1-day-old chick: biochemical and behavioral evidence[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(15):3326-3333. DOI: 10. 1002/ jnr. 21307.
- [11] Schurr A, Payne RS, Miller JJ, et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2001, 895(1-2):268-272. DOI:10. 1016/s0006-8993(01)02082-0.
- [12] Newman LA, Korol DL, Gold PE. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing [J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28427. DOI:10. 1371/ journal. pone. 0028427.
- [13] Lu W, Huang J, Sun S, et al. Changes in lactate content and monocarboxylate transporter 2 expression in A β -treated rat model of Alzheimer's disease [J]. Neurol Sci, 2015, 36(6):871-876. DOI: 10. 1007/s10072-015-2087-3.
- [14] Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function[J]. J Neurochem, 2005, 94(1):1-14. DOI: 10. 1111/j. 1471-4159. 2005. 03168. x.

(收稿日期 2017-04-09)

(本文编辑:石俊强)