

引文格式:

钟嘉峰, 胥亮, 周锐奕, 等. 氯胺酮诱导小鼠脑网络激活研究 [J]. 集成技术, 2025, 14(2): 109-124.

Zhong JF, Xu L, Zhou RY, et al. Research on the activation of brain networks induced by ketamine in mice [J]. Journal of Integration Technology, 2025, 14(2): 109-124.

氯胺酮诱导小鼠脑网络激活研究

钟嘉峰^{1,3} 胥亮^{4,5} 周锐奕⁴ 陈波^{1,3,4} 朱英杰^{1,3,4*} 李蕾^{1,3*} 徐薇^{1,2,3,4*}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(深圳理工大学 深圳 518000)

³(中国科学院大学 北京 100049)

⁴(深圳市药物成瘾重点实验室 深圳 518055)

⁵(四川大学华西公共卫生学院 成都 610041)

摘要 氯胺酮是一种 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体拮抗剂, 临床上用于镇静、麻醉和治疗难治性抑郁症, 但是氯胺酮的成瘾性限制了其临床应用。0.5 mg/kg 是临床常用的氯胺酮抗抑郁剂量, 而 15 mg/kg 是氯胺酮滥用人群的暴露剂量。目前, 不同剂量的氯胺酮对脑网络的激活情况仍不清楚。本文选择 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 两个有代表性的氯胺酮剂量, 腹腔连续注射 7 d, 通过检测脑即刻早期基因蛋白 (cFos) 的表达评估氯胺酮对小鼠脑网络的激活情况。结果表明, 与生理盐水组相比, 0.5 mg/kg 氯胺酮能显著增加内侧前额叶、中间外侧隔核、导水管周围灰质脑区 cFos 阳性细胞数量; 而 15 mg/kg 氯胺酮能显著增加伏隔核、外侧缰核、海马 CA3、杏仁核、腹侧被盖区 cFos 阳性细胞数量。由此表明: 氯胺酮对脑网络的激活呈剂量依赖性, 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮激活的脑区存在差异。该研究为探索不同剂量氯胺酮的神经药理作用奠定了基础, 为寻找氯胺酮抗抑郁和成瘾差异脑区提供了参考。

关键词 氯胺酮; 脑网络; cFos 蛋白

中图分类号 Q189 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20240809002

CSTR: 32239.14.j.issn.2095-3135.20240809002

收稿日期: 2024-08-09 修回日期: 2024-09-11

基金项目: 国家科技创新 2030 重大项目 (2021ZD0202103); 广东省科技厅项目 (2023B1515040009, 2023A1515012122); 深圳市科技创新委员会项目 (KCXFZ20230731100901004, KCXFZ20211020164543007); 深圳市医学科研基金项目 (SMRFA2303034)

作者简介: 钟嘉峰, 硕士研究生, 研究方向为药物成瘾的神经机制; 胥亮, 硕士研究生, 研究方向为药物成瘾的神经机制; 周锐奕, 硕士研究生, 研究方向为药物成瘾的神经机制; 陈波, 博士, 副研究员, 研究方向为药物成瘾的神经机制; 朱英杰 (通讯作者), 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为药物成瘾的神经机制, E-mail: yj.zhu1@siat.ac.cn; 李蕾 (通讯作者), 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为中枢-外周生殖功能调控神经机制, E-mail: saralilei@siat.ac.cn; 徐薇 (通讯作者), 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为药物成瘾的神经机制, E-mail: wei.xu@suat-sz.edu.cn.

Research on the Activation of Brain Networks Induced by Ketamine in Mice

ZHONG Jiafeng^{1,3} XU Liang^{4,5} ZHOU Ruiyi⁴ CHEN Bo^{1,3,4}
ZHU Yingjie^{1,3,4*} LI Lei^{1,3*} XU Wei^{1,2,3,4*}

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(Shenzhen University of Advanced Technology, Shenzhen 518000, China)

³(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

⁴(Shenzhen Key Laboratory of Drug Addiction, Shenzhen 518055, China)

⁵(West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

*Corresponding Authors: yj.zhu1@siat.ac.cn; saralilei@siat.ac.cn; wei.xu@suat-sz.edu.cn

Abstract Ketamine, an *N*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR) antagonist, is clinically utilized for sedation, anesthesia, and the treatment of refractory depression. However, its addictive properties restrict its broader clinical application. A dose of 0.5 mg/kg is commonly used as an antidepressant in clinical settings, while 15 mg/kg represents the dose typically associated with abuse. The effects of varying doses of ketamine on brain network activation remain unclear. In this experiment, two representative doses of ketamine, 0.5 mg/kg and 15 mg/kg, were administered via intraperitoneal injection for 7 consecutive days. Brain network activation was assessed by examining the expression of the immediate early gene protein (cFos). The results indicated that, compared to the saline control group, 0.5 mg/kg ketamine significantly increased the number of cFos-positive cells in the medial prefrontal cortex, intermediate lateral septal nucleus, and periaqueductal gray matter. Conversely, 15 mg/kg ketamine significantly increased cFos expression in the nucleus accumbens, lateral habenula, hippocampal CA3 region, amygdala, and ventral tegmental area. These findings suggest that ketamine's activation of brain networks is dose-dependent, with different doses activating distinct brain regions. This study provides a foundation for investigating the neuropharmacological effects of different ketamine doses and investigating brain regions associated with its antidepressant and addictive properties.

Keywords ketamine; brain network; cFos

Funding This work is supported by Major Project of the Science and Technology Innovation 2030 of China (2021ZD0202103), Department of Science and Technology of Guangdong Province (2023B1515040009, 2023A1515012122), Technology and Innovation Commission of Shenzhen (KCXFZ20230731100901004, KCXFZ20211020164543007), Shenzhen Medical Research Fund (SMRFA2303034)

Ethical Statement The study was approved by the Scientific Research Ethics Committee of the Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (ID number: SIAT-IACUC-231110-NS-XW-A2365)

1 引言

1962 年, 美国药物公司 Parke-Davis 的研究人员首次合成了氯胺酮^[1]。起初, 氯胺酮作为一种全身麻醉药物在医学手术中使用。大多数镇静剂和麻醉剂主要通过 γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, GABA) 受体起作用, 而氯胺酮通过阻断 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartic receptor, NMDAR) 进行麻醉^[2], 并因起效快、作用时间短而在手术中被广泛应用^[3]。20 世纪 90 年代末至 21 世纪初, 临床医生发现氯胺酮对抑郁症具有良好疗效, 特别是难治性抑郁症^[4-5]。随着对氯胺酮抗抑郁效果的认识不断加深, 一些制药公司开始研发氯胺酮的类似物, 以开发更安全可控的抗抑郁药物, 这些药物被称为快速作用抗抑郁药^[6]。在临床治疗中, 0.5 mg/kg 是常用的治疗剂量, 患者单次静脉注射 0.5 mg/kg 氯胺酮就能迅速起到抗抑郁的作用^[7-10]。

目前, 氯胺酮虽然已被临床纳入抗抑郁治疗药物, 但是其抗抑郁的机制一直不明晰。有研究认为, 氯胺酮抗抑郁的机制可能是增加大脑皮质兴奋性, 促进谷氨酸释放和暴发^[11], 即通过抑制 GABA 能神经元的兴奋性增加 GABA 能神经元周围的谷氨酸神经元的兴奋性^[12]。2018 年, Yang 等^[13]发现有抑郁样行为小鼠的外侧缰核 (lateral habenula, LHb) 簇状放电神经元增加, 而使用 NMDA 拮抗剂氯胺酮能减少 LHb 神经元簇状放电, 并能改善小鼠的抑郁样行为。这就是以 NMDA 受体为中心的抗抑郁假说, 但是 NMDA 假说也存在争议, 例如, 大多数 NMDA 受体抑制剂并未展现出与氯胺酮相同的抗抑郁作用^[14]。因此, 氯胺酮抗抑郁机制还有待进一步阐明。

除此之外, 氯胺酮还存在滥用风险。氯胺酮的非法使用源于 20 世纪 70 年代的美国^[15], 并很快在“狂欢”文化的帮助下广泛传播^[16]。人群研究表明, 氯胺酮每周的滥用剂量中位数为 14 g

(范围为 0.2~140 g), 以正常人 70 kg 体重为标准进行换算, 每日氯胺酮的使用剂量中位数为 28.6 mg/kg (范围为 0.4~286 mg/kg)^[17]。啮齿类动物实验表明, 在条件位置偏好 (CPP) 范式中, 2.5 mg/kg 和 5 mg/kg 氯胺酮未能引起雄性大鼠的条件位置偏好, 但是 10 mg/kg 和 15 mg/kg 氯胺酮可以引起雄性大鼠的条件位置偏好^[18-20]。在自身给药的范式中, 啮齿类动物也表现出稳定的自身给药^[21-22]。这些行为实验都证明了氯胺酮的药物奖赏效果和药物强化特性, 表明氯胺酮具有成瘾风险。

目前, 关于氯胺酮抗抑郁作用的研究主要集中在内侧前额叶 (medial prefrontal cortex, mPFC) 和海马 (hippocampus) 等脑区。这些脑区与抗抑郁和成瘾的机制密切相关。例如, mPFC 的形态学变化和神经活动与抑郁症密切相关。在经历压力暴露的小鼠中, mPFC 神经元的基底树突和顶树突的分支数量减少^[23-24]。同时, 通过功能性磁共振成像观察到抑郁症患者的 mPFC 活动发生变化, 特别是侧面区域的功能连接出现异常^[25]。在经历慢性社会挫败压力的小鼠中, mPFC 中的即时早期基因 *zif268* 的表达减少, 表明 mPFC 功能活动显著下降^[26]。此外, 通过光遗传学刺激激活慢性社交挫败应激小鼠的 mPFC, 可改善其社交互动和蔗糖溶液偏好评分^[27]。另外, mPFC 在成瘾行为中发挥着重要作用。mPFC 的部分神经元可以形成神经元集群, 这些集群能够编码药物奖赏效应与使用情境之间的联系。在戒断期间, 这些集群可以被药物相关情境线索重新激活。值得注意的是, 通过光遗传学刺激激活慢性社交挫败应激小鼠的 mPFC, 可以改善其社交互动和蔗糖溶液偏好评分^[28]。mPFC 的功能低下与药物滥用或药物复吸相关。长期的可卡因自给药会降低 mPFC 神经元的兴奋性, 而通过光遗传学激活这些神经元可以减少大鼠的可卡因摄入^[29]。海马脑区在抗抑郁和成瘾方面的作用涉及多种复杂的机

制。有研究表明,海马脑区的神经发生、突触可塑性和脑源性神经营养因子表达水平与抑郁症密切相关。抑郁症患者的海马脑区常常出现神经元减少、树突萎缩、神经可塑性下降和脑源性神经营养因子表达水平降低等症^[30-31]。然而,长期抗抑郁药治疗可逆转这些变化^[32-33]。成瘾方面的某些研究表明,海马 CA1-伏隔核环路在可卡因条件性位置偏好的形成和维持中发挥了关键作用^[34]。

为更好地理解氯胺酮抗抑郁及成瘾的脑区差异机制,本研究将探讨氯胺酮临床常用抗抑郁剂量 0.5 mg/kg 和氯胺酮药物滥用剂量 15 mg/kg 对小鼠的脑网络激活情况,寻找差异激活脑区,为后续研发高抗抑郁、低成瘾性药物提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验动物

实验所用动物为 C57BL/6J 野生型小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有小鼠都饲养在无特定病原体、12 h 光暗周期的屏障区域。所有小鼠可以不受限制地获得食物和水。行为实验都在同一昼夜节律期间(8:00—20:00)进行。本文动物实验方案经中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审查通过(受理号为 SIAT-IACUC-231110-NS-XW-A2365)。

2.2 实验药品

盐酸氯胺酮(药品规格:50 mg/mL,厂商:江苏中牧倍康药业有限公司)、戊巴比妥钠。

2.3 小鼠给药范式

实验选取 9 只 8 周龄 C57BL/6J 野生型小鼠,随机均分为 3 组,每组 3 只,分别为生理盐水组、0.5 mg/kg 氯胺酮组和 15 mg/kg 氯胺酮组。分别对 3 组小鼠腹腔注射生理盐水、0.5 mg/kg 氯胺酮、15 mg/kg 氯胺酮处理,注射盐酸氯胺酮的体积按照体重的 1% 进行(每 100 g 体重注射 1 mL 盐酸氯胺酮),连续注射 7 d。为分析小鼠在慢性

重复给药后全脑即刻早期基因蛋白 cFos 的表达情况,在小鼠最后一次腹腔注射 90 min 后立即进行心脏灌流取脑。

2.4 小鼠心脏灌流及组织处理

在小鼠最后一次腹腔给药 90 min 后,立即进行腹腔注射戊巴比妥钠。5 min 后,小鼠进入深度麻醉,这时将小鼠的四肢依次固定在泡沫板上,使用解剖剪先将小鼠的腹部剪开,将小鼠的腹腔完全暴露,并使用镊子夹住剑突将小鼠胸腔提起,利用剪刀剪开膈膜,以暴露心脏。此时将灌流泵的针尖插入左心室,并立即剪断肝脏,启动灌流泵,以 3 mL/min 的速度将 1×磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)泵入小鼠血管。将小鼠血液排干净后,立刻泵入 25 mL 的 4% 多聚甲醛固定液,以固定脑组织。小鼠灌流完毕后,将小鼠大脑从颅骨内剥离,并放入 4% 多聚甲醛固定液中,4 °C 低温过夜。然后将小鼠大脑放入 30% 蔗糖溶液,4 °C 低温脱水 48 h。

小鼠大脑完成沉糖后,使用徕卡冷冻组织切片机(型号:LEICA CM1950)将小鼠大脑切为 40 μm 厚的脑组织切片,然后放入防冻液(PBS、乙二醇和甘油按 5:3:2 的比例配制),储存在 -20 °C 的低温环境,以备后续进行免疫组化实验。

2.5 免疫组化实验

(1) 将小鼠脑组织从防冻液中捞出,先用 1×PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。

(2) 放入封闭液(由 0.3% TritonX-100 和 10% 山羊血清配制),在室温下封闭 2 h。

(3) 将切片放入一抗混合液(由 0.3% TritonX-100、5% 山羊血清(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号 C0265)和 cFos 抗体配制),在 4 °C 下孵育过夜。

(4) 在室温下用 PBST(由 PBS 加入 0.3% TritonX-100 制成溶液)洗涤 3 次,每次 10 min。

(5) 将切片放入二抗混合液(由 0.3% TritonX-

100、5% 山羊血清和 IgG 488 配制), 在室温下孵育 2 h。

(6) 用 PBST 洗涤脑组织切片 3 次, 每次 10 min。

(7) 将切片与 DAPI(Sigma, 货号 D9542) 放入 PBS 中, 在室温下孵育 10 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。

(8) 将脑片贴在载玻片上, 晾干, 然后使用封片剂 (SouthernBiotech, 货号 0100-01) 进行封片。

实验所使用的一抗和二抗货号如下: 兔抗 cFos(1 : 2 000, Synaptic Systems Cat# 226008, RRID: AB_2891278); 山羊抗兔 IgG 488(1 : 1 000, Thermo Fisher Scientific Cat# A-21245, RRID: AB_2535813)。

2.6 荧光成像及 cFos 蛋白的计数

使用奥林巴斯玻片扫描仪 (型号: VS120-S6-W) 在 10×物镜下拍摄。在灌注或组织处理过程中, 受损的脑组织被排除在组织学分析之外; 使用 Image J (1.54g/Java 1.8.0_345 64-bit) 软件进行 cFos 阳性细胞计数。

2.7 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析和绘图。在不同剂量氯胺酮作用下, 各脑区 cFos 阳性细胞差异分析使用单因素方差分析及 Tukey's

test 事后分析; cFos 阳性细胞在外侧缰核表达的空间差异分析使用双因素方差分析及 Tukey's test 事后分析。采用 Origin 8.0 的 Correlation Plot 模块对各脑区 cFos 阳性细胞的数量进行相关性分析 (Spearman correlation 分析)。数据展现形式为均值 ± 标准误差。

3 结 果

本实验设计流程如图 1 所示。为分析氯胺酮剂量 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 分别对不同脑区的激活情况, 本文选取重复给药策略, 分别给 3 组小鼠腹腔注射生理盐水、0.5 mg/kg 氯胺酮和 15 mg/kg 氯胺酮, 连续注射 7 d。通常根据 cFos 蛋白表达量判断神经细胞活动高低^[35], 通过分析不同脑区的 cFos 表达量, 可以判断不同剂量氯胺酮处理引起的全脑激活状况。

3.1 不同剂量氯胺酮对皮层脑区的激活情况

本文分析了两种剂量氯胺酮处理后, 大脑皮层各脑区的激活情况。如图 2 所示: 与生理盐水组相比, 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮均能显著增加 mPFC 脑区的 cFos 表达, 且 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮升高的 cFos 无明显差异; 在前扣带回皮层 (anterior cingulate cortex, ACC) 脑区中, 只有 15 mg/kg 的氯胺酮能显著增加 cFos

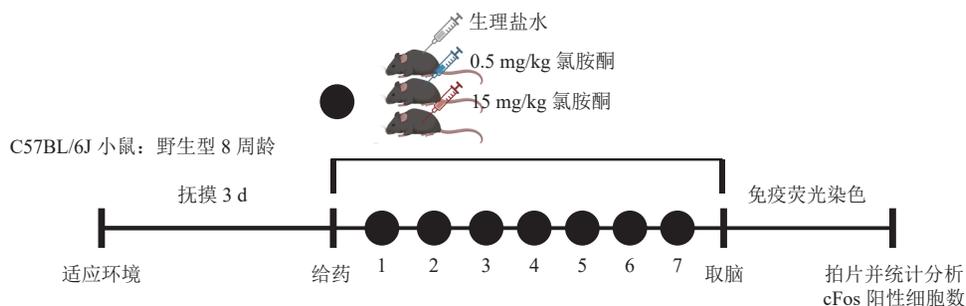
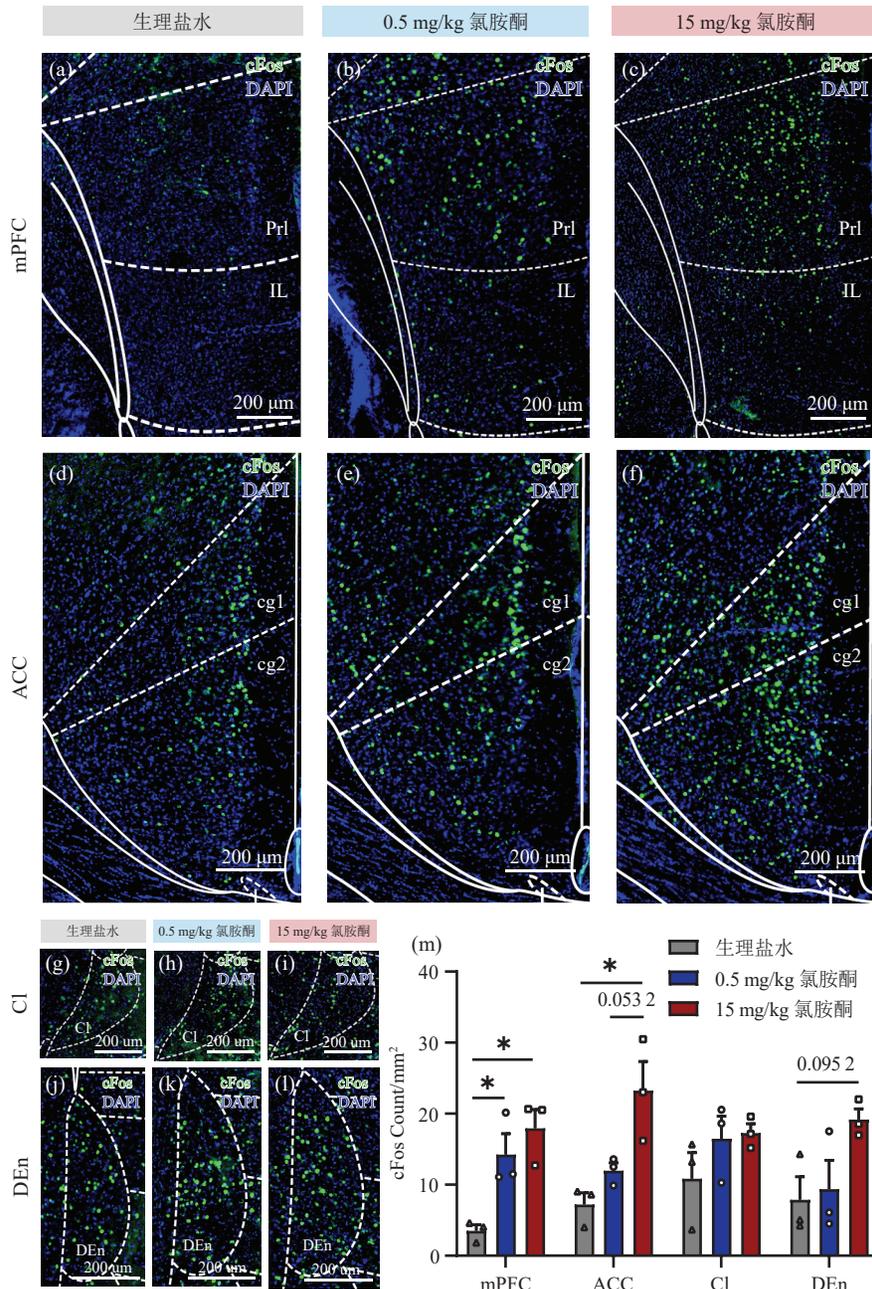


图 1 不同剂量氯胺酮诱导小鼠脑网络激活实验流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental process for inducing brain network activation in mice with different doses of ketamine



(a-c) 在氯胺酮不同剂量作用下, 内侧前额叶脑区 (mPFC)(包含两个亚区, 分别是前边缘皮层 (PrI) 和下边缘皮层 (IL)) 的 cFos 表达明显增多; (d-f) 前扣带回 (ACC) 的 cFos 表达增多; (g-i) 屏状核 (Cl) cFos 表达没有明显差异; (j-l) 梨状核背侧部 (DEn) 的 cFos 表达增加; (m) 经过统计分析后, 各个脑区 cFos 在氯胺酮不同剂量作用下的表达差异分析。单因素方差分析及 Tukey's test 事后分析, mPFC 脑区 ($F(2,6)=10.34, P=0.0114$); ACC 脑区 ($F(2,6)=9.737, P=0.0131$); Cl 脑区 ($F(2,6)=1.481, P=0.3000$); DEn 脑区 ($F(2,6)=3.850, P=0.0840$); * $P<0.05$, 每组 3 只小鼠

图 2 不同剂量氯胺酮对皮层脑区的激活结果

Fig. 2 Activation results of cortical brain regions at different doses of ketamine

表达量, 而 0.5 mg/kg 氯胺酮未显著增加 cFos 的表达; 在屏状核 (claustrum, Cl)、梨状核背侧

部 (dorsal endopiriform nucleus, DEn) 脑区中, 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 氯胺酮均未显著增加

cFos 的表达。

3.2 不同剂量氯胺酮对基底前脑的激活情况

本文比较了两种剂量氯胺酮对基底前脑各个核团的神经元激活情况, 包括伏隔核的两个亚核团 (伏隔核壳区 (nucleus accumbens shell, AcbSh) 和伏隔核核区 (nucleus accumbens core, AcbCo))、背内侧纹状体 (dorsomedial striatum, DMS)、腹侧苍白球 (ventral pallidum, VP) 和外侧隔核的亚核团 (lateral septum, LS (dLS, LSi, vLS))。如图 3 所示: 与生理盐水组相比, 在伏隔核壳区、伏隔核核区、DMS 脑区中, 只有 15 mg/kg 的氯胺酮能显著增加 cFos 的表达量, 而 0.5 mg/kg 氯胺酮未显著增加 cFos 的表达量; 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮均能显著增加 LSi 脑区的 cFos 表达量, 且 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮激活升高的 cFos 表达量无明显差异; 在腹侧苍白球、背外侧隔核区 (dorsal lateral septum, dLS)、腹外侧隔核区 (ventro lateral septum, vLS) 中, 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮均未显著增加 cFos 的表达量。

3.3 不同剂量氯胺酮对间脑的激活情况

本文比较了两种剂量氯胺酮对间脑各个核团的神经元激活情况, 其中包括缰核的两个亚核团 (内侧缰核 (medial habenula, MHb) 和外侧缰核 (lateral habenula, LHb))、丘脑室旁核 (paraventricular thalamus, PVT)、外侧下丘脑 (lateral hypothalamus, LH)、背内侧下丘脑 (dorsomedial hypothalamic nucleus, DMH) 和腹内侧下丘脑 (ventromedial hypothalamus nucleus, VMH)。如图 4 所示: 与生理盐水组相比, 在 LHb 脑区中, 只有 15 mg/kg 的氯胺酮能显著增加 cFos 的表达量, 而 0.5 mg/kg 的氯胺酮未显著增加 cFos 的表达量; 在丘脑室旁核、外侧下丘脑区、背内侧下丘脑区、腹内侧下丘脑区, 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮均未显著增加 cFos 的表达量。

3.4 不同剂量氯胺酮对海马、杏仁核及中脑的激活情况

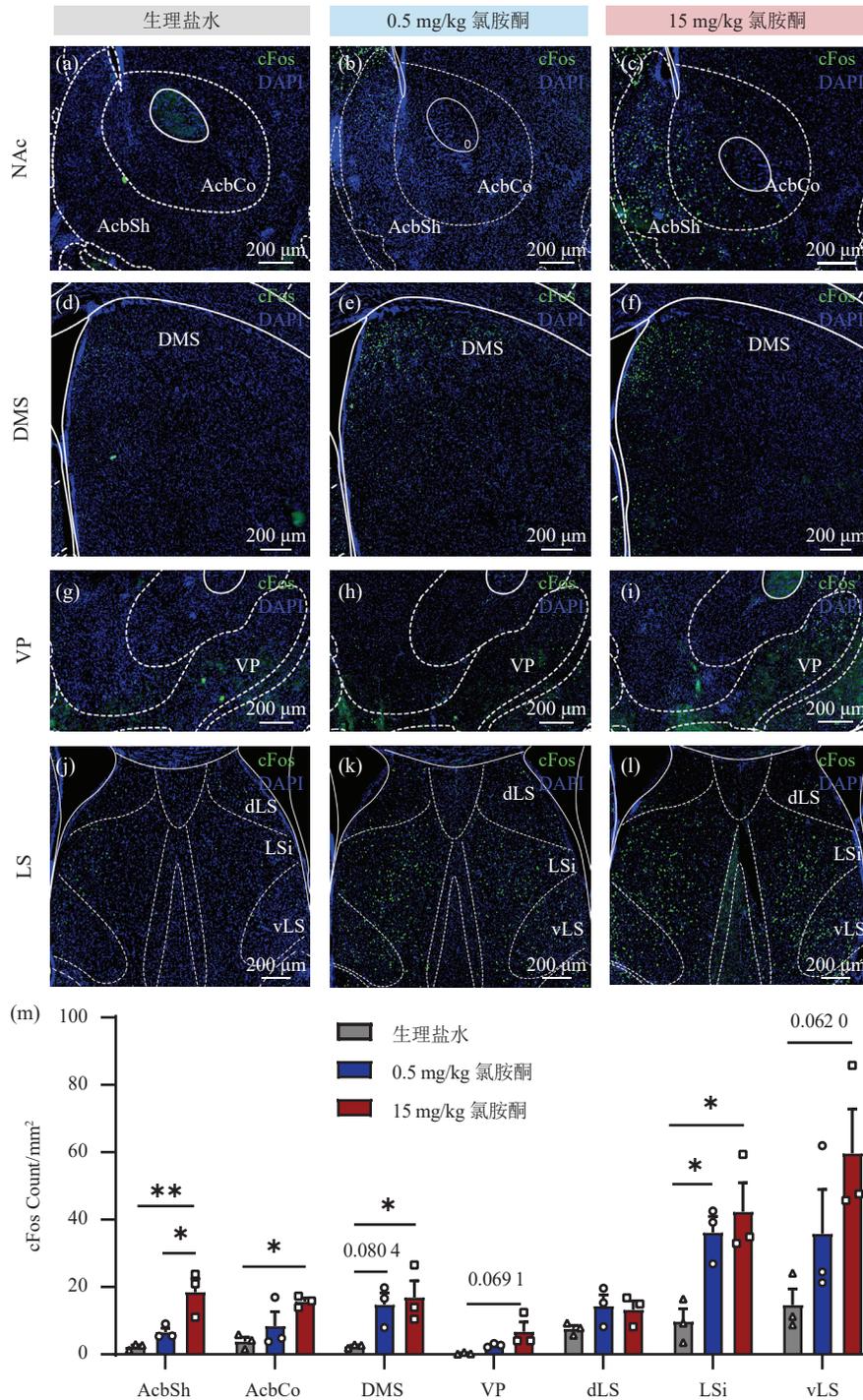
本文比较了两种剂量的氯胺酮对海马 (hippocampus, Hipp)、外侧基底杏仁核 (basolateral amygdaloid nucleus, BLA)、中央杏仁核 (central amygdaloid nucleus, CeA) 和中脑的激活情况, 其中包括海马的亚核脑区 (dentate gyrus, DG; CA3; CA1)、腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 和导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG)。如图 5 所示: 与生理盐水组相比, 在 CA3、BLA、VTA 脑区中, 只有 15 mg/kg 的氯胺酮能显著增加 cFos 的表达量, 而 0.5 mg/kg 的氯胺酮未显著增加 cFos 的表达量; 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮均能显著增加 PAG 脑区的 cFos 的表达量, 且 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮升高的 cFos 表达量无明显差异; 在齿状回 (dentate gyrus, DG)、海马 CA1 区中, 0.5 mg/kg 和 15 mg/kg 的氯胺酮均未显著增加 cFos 的表达量。

3.5 cFos 蛋白在外侧缰核表达的空间差异

除此之外, 本文在分析两种剂量氯胺酮对外侧缰核激活情况时发现, cFos 在外侧缰核的表达具有空间差异。如图 6 所示: 与距离 Bregma 点 1.58 mm 外侧缰核中间区域相比, 0.5 mg/kg 的氯胺酮仅可显著增加 Bregma-1.94 mm 外侧缰核靠后区域的 cFos 表达量, 而 Bregma-1.22 mm 外侧缰核靠前区域的 cFos 表达量未显著增加; 15 mg/kg 的氯胺酮能显著增加外侧缰核靠前、靠后区域的 cFos 表达量, 且这两个区域增加的 cFos 表达量无明显差异。

3.6 cFos 蛋白在不同脑区的相关性分析

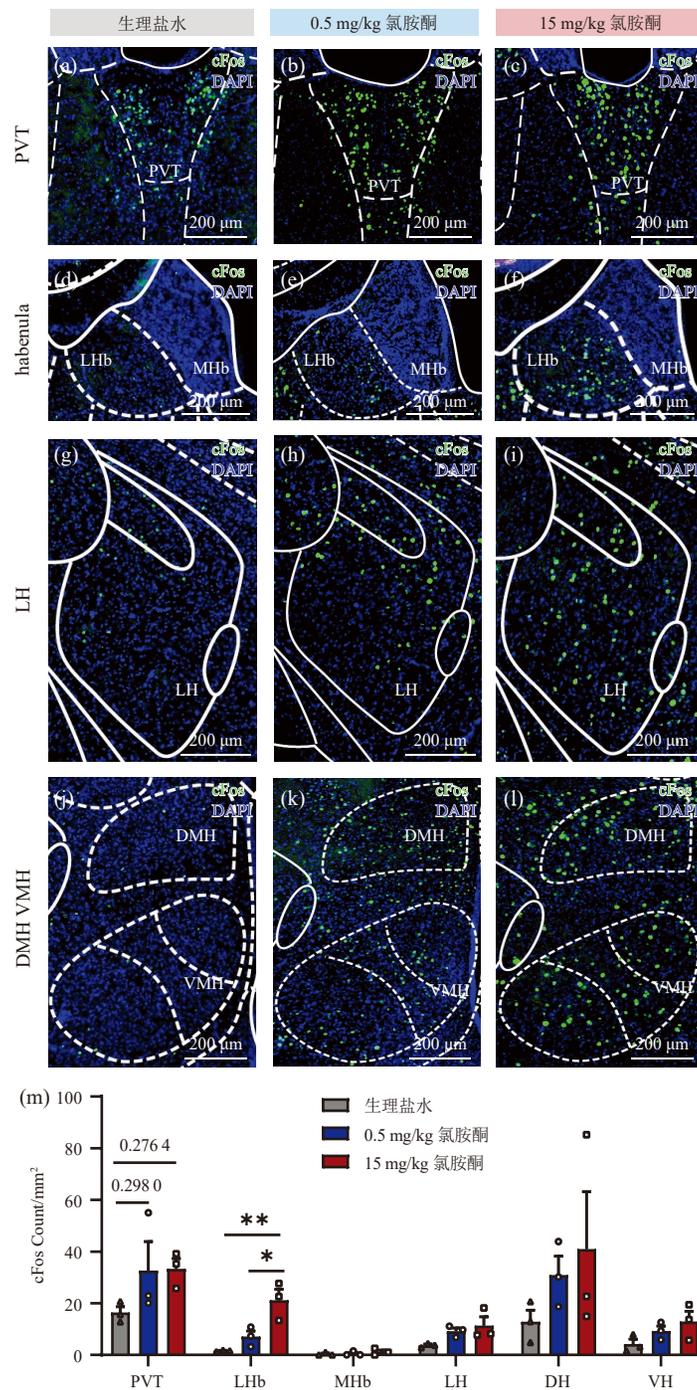
上述内容研究了同一脑区两种剂量氯胺酮作用下的 cFos 激活情况。接下来, 本文通过分析观察氯胺酮对脑网络连接的影响。0.5 mg/kg 氯胺酮可显著激活 mPFC、LSi 和 PAG, 增强 NAc 与 mPFC、ACC、DMS 和 VTA 的连接, 增



(a-c) 在氯胺酮不同剂量作用下, 伏隔核 (NAc) 的 cFos 表达明显增多; (d-f) 背内侧纹状体 (DMS) 的 cFos 表达增多; (g-i) 腹侧苍白球 (VP) cFos 表达没有明显差异; (j-l) 外侧隔核 (LS) 的 cFos 表达明显增加; (m) 经过统计分析后, 各个脑区 cFos 在氯胺酮不同剂量作用下的表达差异分析。单因素方差分析及 Tukey's test 事后分析, NAc 壳区脑区 ($F(2,6)=12.75, P=0.0069$); NAc 核区脑区 ($F(2,6)=5.244, P=0.0482$); DMS 脑区 ($F(2,6)=5.689, P=0.0412$); VP 脑区 ($F(2,6)=4.044, P=0.0773$); dLS 脑区 ($F(2,6)=2.101, P=0.2035$); LSi 脑区 ($F(2,6)=8.239, P=0.0190$); vLS 脑区 ($F(2,6)=4.173, P=0.0732$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 每组 3 只小鼠

图 3 不同剂量氯胺酮对基底前脑的激活结果

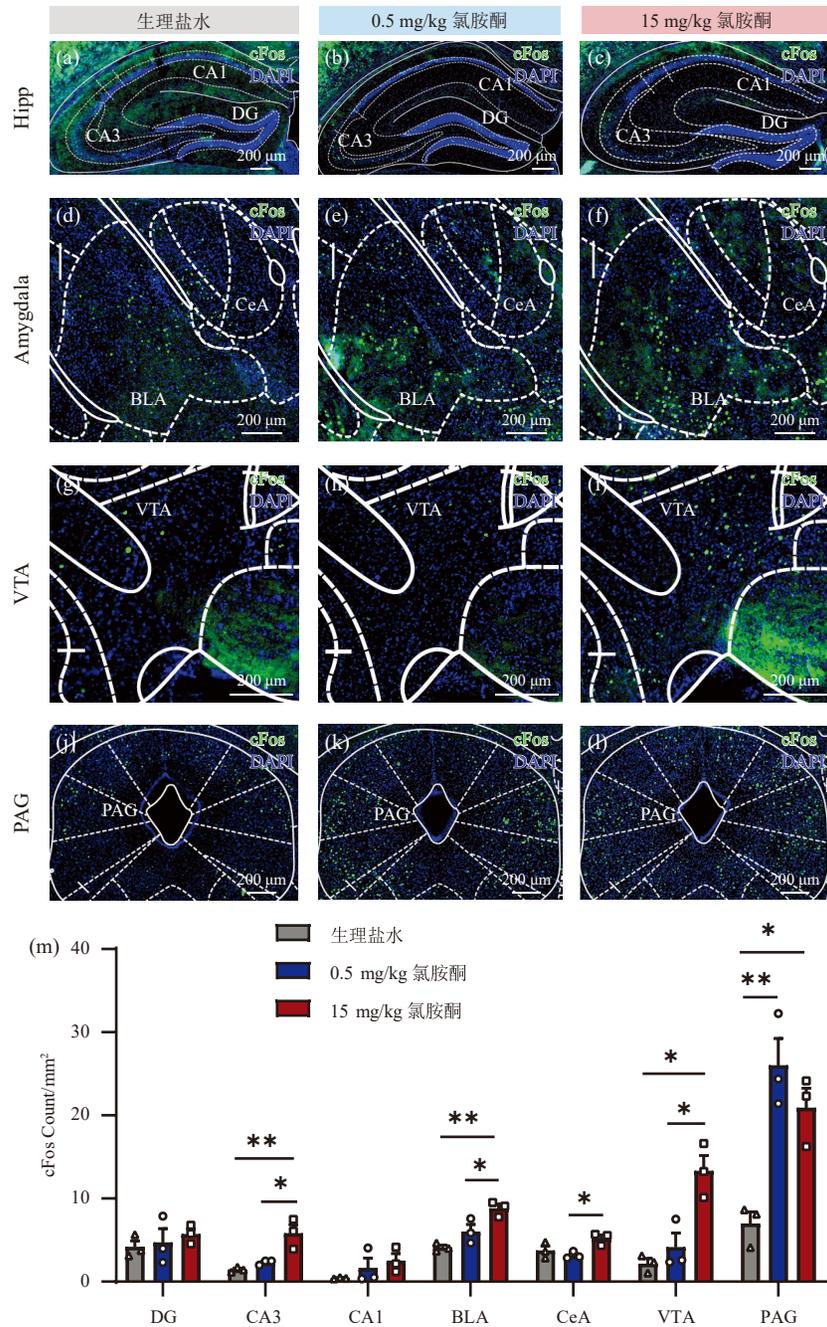
Fig. 3 Activation results of the basal forebrain at different doses of ketamine



(a-c) 在氯胺酮不同剂量作用下, 丘脑室旁核 (PVT) 的 cFos 表达没有差异; (d-f) 内侧缰核 (MHb) 的 cFos 表达几乎没有, 但外侧缰核 (LHb) 的 cFos 表达显著增加; (g-i) 外侧下丘脑 (LH) 的 cFos 表达没有显著增加; (j-l) 背内侧下丘脑 (DMH)、腹内侧下丘脑 (VMH) 的 cFos 表达没有显著增加; (m) 经过统计分析后, 各个脑区在氯胺酮不同剂量作用下 cFos 的表达差异分析。单因素方差分析及 Tukey's test 事后分析, PVT 脑区 ($F(2,6)=1.889, P=0.2310$); LHb 脑区 ($F(2,6)=13.67, P=0.0058$); MHb 脑区 ($F(2,6)=0.6563, P=0.5524$); LH 脑区 ($F(2,6)=3.436, P=0.1013$); DMH 脑区 ($F(2,6)=1.070, P=0.4005$); VMH 脑区 ($F(2,6)=2.467, P=0.1652$), * $P<0.01$ 、** $P<0.01$, 每组 3 只小鼠

图 4 不同剂量氯胺酮对间脑的激活结果

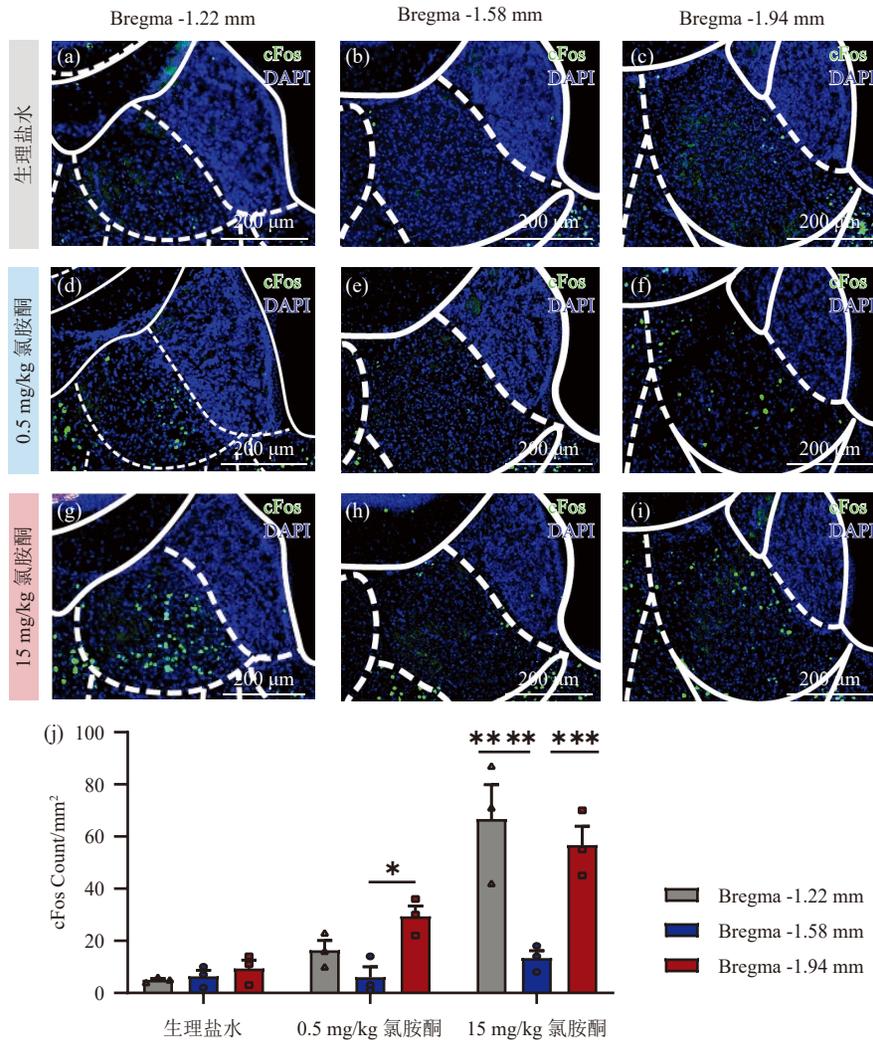
Fig. 4 Activation results of the diencephalon at different doses of ketamine



(a-c) 在氯胺酮不同剂量作用下, 海马 (Hipp) 亚区 CA3 的 cFos 表达显著增多; (d-f) 杏仁核 (Amygdala) 的 cFos 表达显著增多; (g-i) 腹侧被盖区 (VTA) cFos 表达显著增加; (j-l) 中脑导水管周围灰质 (PAG) cFos 表达显著增加; (m) 经过统计分析后, 各个脑区 cFos 在氯胺酮不同剂量作用下的表达差异分析。单因素方差分析及 Tukey's test 事后分析, DG 脑区 ($F(2,6)=0.4926$, $P=0.6338$); CA3 脑区 ($F(2,6)=14.14$, $P=0.0054$); CA1 脑区 ($F(2,6)=1.468$, $P=0.3027$); BLA 脑区 ($F(2,6)=15.56$, $P=0.0042$); CeA 脑区 ($F(2,6)=5.959$, $P=0.0375$); VTA 脑区 ($F(2,6)=15.80$, $P=0.0041$); PAG 脑区 ($F(2,6)=16.06$, $P=0.0039$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 每组 3 只小鼠

图 5 不同剂量氯胺酮对海马、杏仁核、腹侧被盖区和中脑导水管周围灰质的激活结果

Fig. 5 Activation results of the hippocampus, amygdala, ventral tegmental area, and periaqueductal gray at different doses of ketamine



(a-c) 在生理盐水作用下, 外侧缰核 (LHb) 不同区域 cFos 表达没有差异; (d-f) 在 0.5 mg/kg 氯胺酮作用下, 外侧缰核靠后区域的 cFos 表达显著增多; (g-i) 在 15 mg/kg 氯胺酮作用下, 外侧缰核前、后区域的 cFos 表达显著增加; (j) 经过统计分析后, 外侧缰核的前、中、后区域 cFos 在氯胺酮不同剂量作用下的表达差异分析。双因素方差分析及 Tukey's test 事后分析, ($F_{交互效应(4,18)}=6.896, P=0.0015$)、($F_{剂量效应(2,18)}=36.30, P<0.0001$)、($F_{位置效应(2,18)}=14.75, P=0.0002$)。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 每组 3 只小鼠

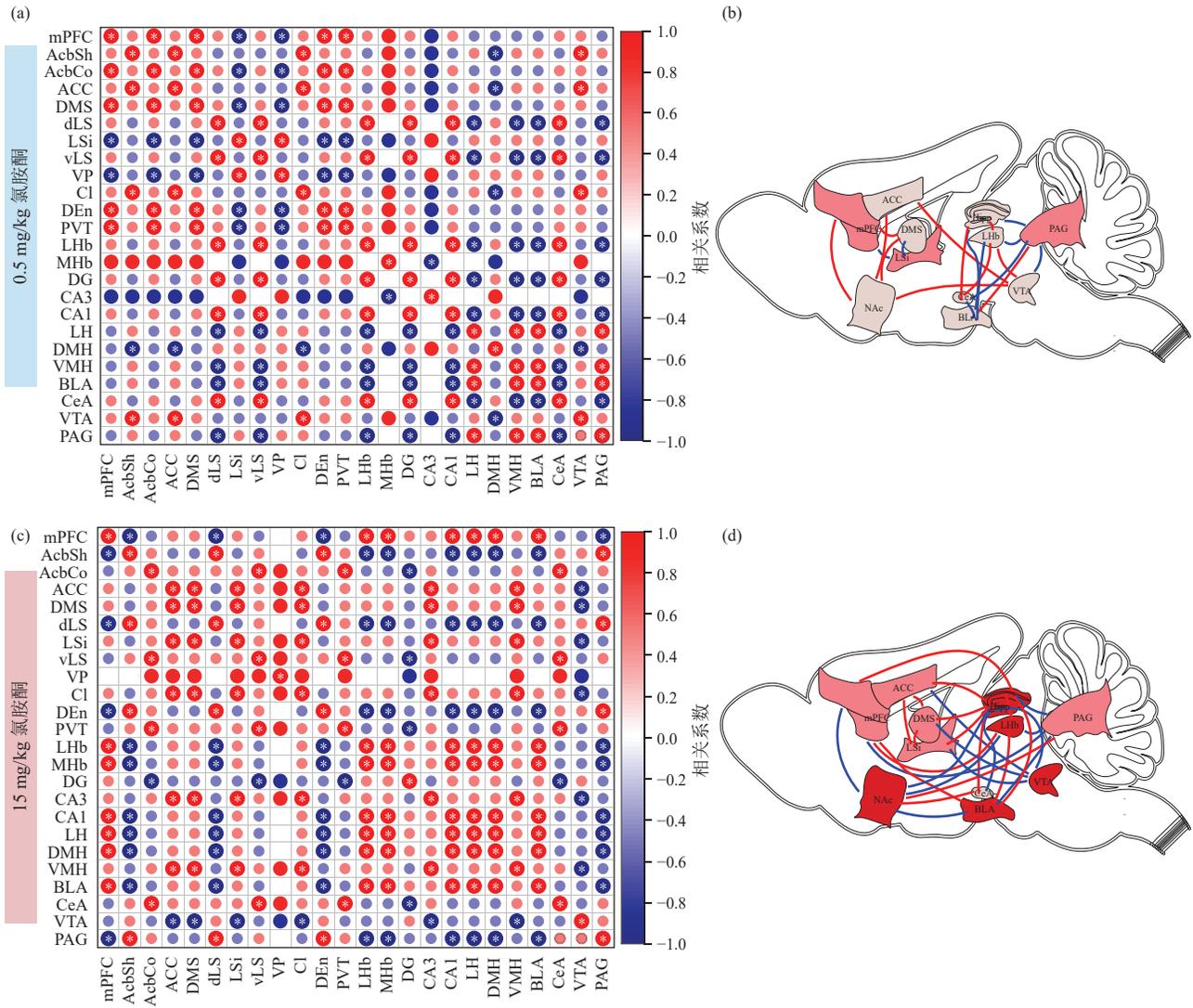
图 6 不同剂量氯胺酮对外侧缰核亚区的激活结果

Fig. 6 Activation results of the subregions of the lateral habenula at different doses of ketamine

强 CeA 与 Hipp 和 LHb 的连接, 如图 7(a)~(b) 所示。15 mg/kg 氯胺酮可非常显著地激活 NAc、BLA、VTA、LHb 和 Hipp, 显著激活 mPFC、ACC、LSi、DMS 和 PAG, 增强 NAc 与 mPFC、Hipp、LHb、PAG 和 BLA 的连接, 增加 BLA 与 LHb、mPFC、Hipp、NAc 和 PAG 的连接, 增加 VTA 与 DMS、ACC、LSi 和 Hipp 的连接 (负相关), 如图 7(c)~(d) 所示。

4 讨论

在目前的临床研究中, 氯胺酮治疗抑郁症除了采用静脉注射给药外, 还开发出了肌肉给药、鼻内给药、口服给药、直肠给药、皮下给药和舌下给药^[36]。在化学结构上, 氯胺酮存在 *S*-氯胺酮和 *R*-氯胺酮两种异构体^[37]。2019 年, *S*-氯胺酮鼻喷雾剂在美国和欧洲被批准用于难治性抑郁症,



(a, c) 不同剂量氯胺酮作用下, cFos 在不同脑区相关性矩阵图 ($^*P < 0.05$; 每组 3 只小鼠); (b, d) 不同剂量氯胺酮作用下, cFos 在不同脑区相关性示意图。粉色脑区代表与生理盐水组相比, cFos 显著增加脑区, 红色脑区代表与 0.5 mg/kg 氯胺酮组相比, cFos 显著增加的脑区; 红线代表脑区之间呈正相关, 蓝线代表脑区之间呈负相关

图 7 氯胺酮诱导的激活脑区相关性分析图

Fig. 7 Ketamine-induced activation brain region correlation analysis map

其虽然能快速缓解难治性抑郁患者的症状, 但存在不良反应^[38]。例如, 使用 S-氯胺酮存在长期有效性问题、成瘾的可能性, 以及引起少数患者自杀的风险^[39]。氯胺酮是我国第三大毒品“K 粉”的主要成分, 滥用人数高达 3 万人^[40], 长期使用氯胺酮鼻喷剂存在很大的滥用风险。因此, 解析氯胺酮抗抑郁和滥用的机制对开发低成瘾性抗抑郁药意义重大。本研究通过比较抗抑郁(低)剂量

和成瘾(高)剂量氯胺酮激活的脑区, 发现不同剂量的氯胺酮激活的脑区存在显著差异。

高剂量 (15 mg/kg) 氯胺酮激活的全脑 cFos 数量远远高于低剂量 (0.5 mg/kg) 氯胺酮。但少数几个重要的脑区, 如 mPFC、LSi、PAG 脑区, 0.5 mg/kg 氯胺酮和 15 mg/kg 氯胺酮增加的 cFos 数量无显著差异。而 mPFC、LSi 和 PAG 脑区与抑郁症密切相关。研究表明: 氯胺酮可能通过作

用于 mPFC GABA 能神经元, 降低对兴奋性锥体神经元的抑制, 增加谷氨酸的释放和爆发^[41]; LS 脑区是调控情绪的重要脑区^[42], 通过化学遗传抑制外侧隔核 GABA 能神经元能改善小鼠抑郁样行为^[43]; PAG 脑区也参与抑郁症发病^[44]。由此表明: 0.5 mg/kg 氯胺酮极有可能通过这几个脑区发挥抗抑郁作用。

15 mg/kg 氯胺酮可以显著激活伏隔核、外侧缰核、海马 CA3、杏仁核、腹侧被盖区, 增加 cFos 表达量。以往研究表明, 伏隔核、外侧缰核、海马 CA3、杏仁核、腹侧被盖区均为成瘾关键脑区。例如: CA3-LS-VTA 环路参与情景线索诱导可卡因觅药行为的恢复; 在单次注射可卡因时, VTA 中的兴奋性输入会快速但短暂地增强, 只有多次注射可卡因, 才能诱导 NAc 神经元可塑性的发生; 人体影像学研究和动物模型表明, 与药物相关的线索会激活 BLA, 且 BLA 的失活会破坏吸毒和寻求药物的行为^[45-48]。

在国内外研究中, 同样有人利用全脑的 cFos 表达量研究氯胺酮对各脑区的激活情况。例如: Davoudian 等^[49]分别给小鼠单次腹腔注射 1 mg/kg 裸盖菇素、10 mg/kg 氯胺酮, 研究氯胺酮和裸盖菇素靶向 cFos 蛋白表达的相同和不同的大脑区域, 结果表明, 10 mg/kg 氯胺酮能增加 mPFC 和 LHb 等脑区的 cFos 表达量, 与本实验结果相同; Hu 等^[50]为研究氯胺酮与异氟烷麻醉剂之间是否存在不同的脑区和通路来诱导麻醉, 比较分析了氯胺酮 (麻醉剂量: 100 mg/kg) 和异氟烷 (连续吸入 1.5% 的异氟烷) 对小鼠大脑中 cFos 表达的影响。与上述实验相比, 本实验侧重研究不同剂量的氯胺酮对全脑 cFos 表达的影响。

本文除了分析不同剂量的氯胺酮对同一脑区 cFos 表达的影响外, 还研究了氯胺酮影响不同脑区 cFos 表达的相关性。该相关性分析能侧面说明不同脑区之间的连接、激活情况。例如: 当氯胺酮的剂量为 0.5 mg/kg 时, VTA 的 cFos 与

NAc 的 cFos 呈正相关, 表明 VTA 神经元激活能使 NAc 脑区活动增加; 而当氯胺酮的剂量为 15 mg/kg 时, 与 0.5 mg/kg 氯胺酮组相比, 小鼠的各个脑区之间激活 cFos 的相关性也发生许多变化, 如 ACC 激活 cFos 与 DMS 激活 cFos 呈正相关, 表明 ACC 与 DMS 之间可能存在神经投射。Li 等^[51]的研究表明: DMS 为 ACC 主要的下游脑区之一; VTA 激活表达的 cFos 数量与 NAc、LS、Hipp 等均呈负相关, 但根据本文统计, 这些脑区的 cFos 表达量都是增加的, 原因可能是 VTA 的 cFos 增加的数量远远少于其他脑区的数量, 因此呈负相关。

除此之外, 本研究还发现, 在氯胺酮的作用下, 外侧缰核脑区的不同部分, cFos 的表达情况不同, 外侧缰核的前、后神经元活动要显著高于外侧缰核中间部分。LHb 具有高度异质的功能区 and 神经元亚型。各种单胺受体、神经肽和钙结合蛋白在 LHb 中都表现出异质分布^[52]。例如, 转录 D2 mRNA 神经元主要分布在外侧缰核内侧中央部分, 而转录 5-羟色胺 2c 型受体 (Htr2c) mRNA 神经元主要分布在外侧缰核外侧下部分^[53]。因此, 氯胺酮作用下, cFos 在外侧缰核的空间分布存在差异, 可能原因是外侧缰核前后空间分布的神经元类型不同, 又或者是不同的空间分布的神经元表面表达的 NMDAR 不一样, 即外侧僵核中间部分的神经元表达的 NMDAR 少, 而前后表达的多, 这值得进一步探讨。

5 结 论

氯胺酮是 NMDA 受体拮抗剂, 低剂量具有抗抑郁作用, 但高剂量容易使患者成瘾。本研究通过分析小鼠的 cFos 脑网络激活情况发现, 与生理盐水组相比, 0.5 mg/kg 氯胺酮能显著激活内侧前额叶、中间外侧隔核和导水管周围灰质脑区; 与 0.5 mg/kg 氯胺酮组相比, 15 mg/kg 氯胺

酮能显著激活伏隔核、外侧缰核、海马 CA3、杏仁核、腹侧被盖区。本研究揭示了不同剂量氯胺酮的脑网络激活情况,为进一步研究氯胺酮的剂量药理学效应奠定了基础,可为探讨氯胺酮抗抑郁和成瘾性差异作用脑区提供参考。

参 考 文 献

- [1] Denomme N. The Domino effect: Ed Domino's early studies of psychoactive drugs [J]. *Journal of Psychoactive Drugs*, 2018, 50(4): 298-305.
- [2] Sinner B, Graf BM. Ketamine. *Handbook of Experimental Pharmacology* [M]. Berlin: Springer, 2008: 313-333.
- [3] Andrade C. Ketamine for depression, 4: in what dose, at what rate, by what route, for how long, and at what frequency? [J]. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2017, 78(7): e852-e857.
- [4] Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity [J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(3): 454-464.
- [5] Voineskos D, Daskalakis ZJ, Blumberger DM. Management of treatment-resistant depression: challenges and strategies [J]. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2020, 16: 221-234.
- [6] Hillhouse TM, Porter JH. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate [J]. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2015, 23(1): 1-21.
- [7] Phillips JL, Norris S, Talbot J, et al. Single, repeated, and maintenance ketamine infusions for treatment-resistant depression: a randomized controlled trial [J]. *American Journal of Psychiatry*, 2019, 176(5): 401-409.
- [8] Singh JB, Fedgchin M, Daly EJ, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-frequency study of intravenous ketamine in patients with treatment-resistant depression [J]. *American Journal of Psychiatry*, 2016, 173(8): 816-826.
- [9] Fava M, Freeman MP, Flynn M, et al. Double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of intravenous ketamine as adjunctive therapy in treatment-resistant depression (TRD) [J]. *Molecular Psychiatry*, 2020, 25(7): 1604.
- [10] Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients [J]. *Biological Psychiatry*, 2000, 47(4): 351-354.
- [11] Zanos P, Thompson SM, Duman RS, et al. Convergent mechanisms underlying rapid antidepressant action [J]. *CNS Drugs*, 2018, 32(3): 197-227.
- [12] Miller OH, Moran JT, Hall BJ. Two cellular hypotheses explaining the initiation of ketamine's antidepressant actions: direct inhibition and disinhibition [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 100: 17-26.
- [13] Yang Y, Cui YH, Sang KN, et al. Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression [J]. *Nature*, 2018, 554(7692): 317-322.
- [14] Jiang Y, Dong Y, Hu H. The *N*-methyl-*D*-aspartate receptor hypothesis of ketamine's antidepressant action: evidence and controversies [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2024, 379(1906): 20230225.
- [15] Siegel RK. Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users [J]. *NIDA Research Monograph*, 1978(21): 119-147.
- [16] Jansen KL. A review of the nonmedical use of ketamine: use, users and consequences [J]. *Journal of Psychoactive Drugs*, 2000, 32(4): 419-433.
- [17] Liu SYW, Ng SKK, Tam YH, et al. Clinical pattern and prevalence of upper gastrointestinal toxicity in patients abusing ketamine [J]. *Journal of Digestive Diseases*, 2017, 18(9): 504-510.
- [18] Schoepfer KJ, Strong CE, Saland SK, et al. Sex- and dose-dependent abuse liability of repeated subanesthetic ketamine in rats [J]. *Physiology & Behavior*, 2019, 203: 60-69.
- [19] Li FQ, Fang Q, Liu Y, et al. Cannabinoid CB(1) receptor antagonist rimonabant attenuates reinstatement of ketamine conditioned place preference in rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 589(1-3): 122-126.
- [20] 卢英豪,王季石,方琴,等. 氯胺酮诱导大鼠条件

- 性位置偏爱的消退特点 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2007, 16(2): 99-101.
- Lu YH, Wang JS, Fang Q, et al. Extinction character of ketamine-induced conditioned place preference in rats [J]. Chinese Journal of Drug Dependence, 2007, 16(2): 99-101.
- [21] Botanas CJ, de la Peña JB, Dela Peña IJ, et al. Methoxetamine, a ketamine derivative, produced conditioned place preference and was self-administered by rats: evidence of its abuse potential [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2015, 133: 31-36.
- [22] Xu W, Li HC, Wang L, et al. Endocannabinoid signaling regulates the reinforcing and psychostimulant effects of ketamine in mice [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5962.
- [23] Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, et al. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex [J]. Journal of Comparative Neurology, 2008, 507(1): 1141-1150.
- [24] Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, et al. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making [J]. Science, 2009, 325(5940): 621-625.
- [25] Xu P, Chen A, Li YP, et al. The medial prefrontal cortex in neurological diseases [J]. Physiological Genomics, 2019, 51(9): 432-442.
- [26] Covington HE, Kikusui T, Goodhue J, et al. Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and *zif268* mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(2): 310-321.
- [27] Covington HE, Lobo MK, Maze I, et al. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex [J]. Journal of Neuroscience, 2010, 30(48): 16082-16090.
- [28] Bossert JM, Stern AL, Theberge FR, et al. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin [J]. Nature Neuroscience, 2011, 14(4): 420-422.
- [29] Chen BT, Yau HJ, Hatch C, et al. Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking [J]. Nature, 2013, 496(7445): 359-362.
- [30] Kim IB, Park SC. The entorhinal cortex and adult neurogenesis in major depression [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11725.
- [31] Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(17): 12619-12628.
- [32] Duman RS, Nakagawa S, Malberg J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment [J]. Neuropsychopharmacology, 2001, 25(6): 836-844.
- [33] Chen B, Dowlathshahi D, MacQueen GM, et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication [J]. Biological Psychiatry, 2001, 50(4): 260-265.
- [34] Zhou YM, Zhu HW, Liu ZY, et al. A ventral CA1 to nucleus accumbens core engram circuit mediates conditioned place preference for cocaine [J]. Nature Neuroscience, 2019, 22(12): 1986-1999.
- [35] Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation [J]. Nature, 1987, 328(6131): 632-634.
- [36] Hashimoto K. Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: a historical overview and future perspective [J]. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2019, 73(10): 613-627.
- [37] Li L, Vlisides PE. Ketamine: 50 years of modulating the mind [J]. Frontiers in Human Neuroscience, 2016, 10: 612.
- [38] Reif A, Bitter I, Buyze J, et al. Esketamine nasal spray versus quetiapine for treatment-resistant depression [J]. New England Journal of Medicine, 2023, 389(14): 1298-1309.
- [39] Jiang Y, Du Z, Shen Y, et al. The correlation of Esketamine with specific adverse events: a deep dive into the FAERS database [J]. European

- Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 2023: 1-9.
- [40] 中国国家禁毒委员会办公室. 2023 年中国毒情形势报告 [N]. 中国禁毒报, 2024-06-28(3).
China National Narcotic Control Committee. China's drug situation report in 2023 [N]. China Narcotics Control News, 2024-06-28(3).
- [41] Ali F, Gerhard DM, Sweasy K, et al. Ketamine disinhibits dendrites and enhances calcium signals in prefrontal dendritic spines [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 72.
- [42] Yadin E, Thomas E, Grishkat HL, et al. The role of the lateral septum in anxiolysis [J]. *Physiology & Behavior*, 1993, 53(6): 1077-1083.
- [43] Wang D, Wang WT, Jiang SJ, et al. Regulation of depression-related behaviors by GABAergic neurons in the lateral septum through periaqueductal gray neuronal projections [J]. *Journal of Psychiatric Research*, 2021, 137: 202-214.
- [44] Yin WW, Mei LS, Sun TT, et al. A central amygdala-ventrolateral periaqueductal gray matter pathway for pain in a mouse model of depression-like behavior [J]. *Anesthesiology*, 2020, 132(5): 1175-1196.
- [45] Bagot RC, Parise EM, Peña CJ, et al. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7062.
- [46] Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, et al. Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area [J]. *Science*, 2011, 333(6040): 353-357.
- [47] Sharp BM. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction [J]. *Translational Psychiatry*, 2017, 7(8): e1194.
- [48] Mameli M, Halbout B, Creton C, et al. Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc [J]. *Nature Neuroscience*, 2009, 12(8): 1036-1341.
- [49] Davoudian PA, Shao LX, Kwan AC. Shared and distinct brain regions targeted for immediate early gene expression by ketamine and psilocybin [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2023, 14(3): 468-480.
- [50] Hu Y, Du WJ, Qi JT, et al. Comparative brain-wide mapping of ketamine- and isoflurane-activated nuclei and functional networks in the mouse brain [J]. *eLife*, 2024, 12: RP88420.
- [51] Li YD, Luo YJ, Su WK, et al. Anterior cingulate cortex projections to the dorsal medial striatum underlie insomnia associated with chronic pain [J]. *Neuron*, 2024, 112(8): 1328-1341.
- [52] Hu HL, Cui YH, Yang Y. Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2020, 21(5): 277-295.
- [53] Aizawa H, Kobayashi M, Tanaka S, et al. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula [J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2012, 520(18): 4051-4066.