

参赛队员姓名：李家荀

中学：广东实验中学

省份：广东省

国家/地区：中国

指导教师姓名：刘佩、王剑

论文题目：人参皂苷 Rg1 抑制小胶质细胞激活在治疗氯胺酮滥用所致精神障碍中的作用和机制研究

2020 S.-T. Yau High School Science Award

第二页为创新性申明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员： 李茵

指导老师：

李茵

2020年9月8日

# 人参皂苷 Rg1 抑制小胶质细胞激活在治疗氯胺酮滥用所致精神障碍中的作用和机制研究

广东实验中学 李家荀

## 摘要:

近年来，氯胺酮滥用的情况非常突出，以青少年居多。研究显示滥用氯胺酮会导致神经毒性反应致精神障碍，严重损害青少年的生长发育和身心健康，造成严重的社会和公共卫生、公共安全问题。本研究构建大鼠模型，研究氯胺酮滥用对其远期认知功能、学习记忆以及情绪状态的影响。实验结果表明：单次暴露氯胺酮对远期认知功能无影响，长期暴露于可使前额皮质小胶质细胞激活导致神经元树突棘过度修剪，造成远期学习记忆损害及情绪异常。人参皂苷 Rg1 通过抑制  $Ca^{2+}$  通道阻止小胶质细胞激活发挥神经保护作用，从而减少氯胺酮暴露所致的认知和情绪障碍。本项目为氯胺酮滥用的危害提供了有力的依据，同时有望找到氯胺酮滥用后精神障碍的新靶点，为氯胺酮滥用者摆脱毒品依赖，回到正常的家庭生活带来曙光，为和谐社会贡献力量。

## Abstract

In recent years, abuse of ketamine is very common, especially in teenagers. Studies have shown that abuse of ketamine induce neurotoxic reactions leading to mental disorders, seriously impair their physical and mental health, resulting in serious social and public health problems. In this study, we established an adolescent mouse model to investigate the effects of ketamine abuse on long-term cognitive function, learning, memory, and emotional state. The results showed that single exposure to ketamine had no effect on long-term cognitive function, but long-term exposure may activate microglia cells in the prefrontal cortex and cause excessive pruning of dendritic spines of neurons, resulting in long-term learning, memory impairment and emotional abnormalities. Ginsenoside Rg1 plays a neuroprotective role by inhibiting the activation of microglia through Inhibiting  $Ca^{2+}$  channels and reducing cognitive and emotional disorders caused by ketamine exposure. This project provides a strong basis for the harm of ketamine abuse, and is expected to find a new target for mental disorders after ketamine abuse, so as to bring hope for the recovery and return of ketamine abusers to the society and family, and reduce the burden on the family and society.

**关键词：**人参皂苷 Rg1、氯胺酮、滥用、小胶质细胞、精神障碍

# 目录

1. 项目概述.....	5
1.1 研究背景.....	5
1.2 研究意义.....	6
1.3 拟解决的科学问题.....	6
1.4 实验目的.....	6
1.5 研究方案.....	7
2. 材料和方法.....	8
2.1 实验动物.....	8
2.2 实验材料.....	8
2.3 实验设备.....	9
2.4 实验方法.....	9
2.5 统计学分析: .....	11
3. 实验结果.....	11
3.1 建立青少年期单次或长期多次氯胺酮暴露的大鼠模型.....	11
3.2 青少年大鼠单次或长期多次氯胺酮暴露模型的行为学评价.....	12
3.3 青少年大鼠单次或长期多次氯胺酮暴露对前额皮质小胶质细胞激活的影响.....	14
3.4 人参皂苷改善青少年大鼠长期氯胺酮暴露所致的行为学异常.....	14
3.5 人参皂苷 Rg1 抑制前额皮质小胶质细胞的激活.....	16
3.6 人参皂苷 Rg1 抑制 NF- $\kappa$ B/TLR-4 信号途径.....	18
4. 讨论.....	19
5. 参考文献.....	21
6. 附件.....	22

## 1. 项目概述

### 1.1 研究背景

氯胺酮是一种 NMDA 受体拮抗剂，是使用临床广泛的全麻药，常常用于各种手术麻醉、镇痛、镇静、辅助麻醉。氯胺酮在 1962 年由美国药剂师 Stevens 首次合成，主要通过减少丘脑-皮层的传导，选择性的阻断痛觉传递系统，同时激动边缘系统和脑干，产生痛觉和意识相分离，即分离麻醉感，并最终使人产生幻觉、进入梦幻，因此氯胺酮也具有很强的成瘾性<sup>[1]</sup>。近年来在我国滥用逐渐严重，滥用人群呈现低龄化，青少年人群在好奇心的驱使或教唆下成为新的药物滥用者<sup>[2]</sup>。研究显示滥用氯胺酮会导致神经毒性反应致精神障碍，如：抑郁、精神分裂样症状，严重损害青少年的生长发育和身心健康<sup>[3]</sup>。氯胺酮吸毒的剂量低于临床麻醉使用的剂量，属于亚麻醉剂量。成人因手术、麻醉、镇静等需要，单次使用麻醉剂量和亚麻醉剂量的氯胺酮不会导致成瘾和远期的精神障碍。青少年的大脑尚未发育完善，如发育最晚的前额叶皮层等脑区还处于发育的突触修剪期，对药物刺激和环境变化较为敏感，容易造成功能障碍。因此，青少年单次暴露于低于麻醉剂量的氯胺酮是否会导致远期的精神障碍，研究报道较少。

小胶质细胞是一类在中枢神经系统(CNS)内数量多、分布广的免疫细胞，其数量为大脑内神经胶质细胞总数的 5%到 20%左右。小胶质细胞对有害刺激具有防御作用，能阻挡病原的入侵。在中枢炎症反应中发挥着关键的作用，维持着神经系统微环境的动态平衡。研究表明，多种神经精神疾病的发病和小胶质细胞异常有关，如中枢神经系统退行性疾病阿尔海默病、精神分裂症、抑郁、及发育性疾病自闭症等。小胶质细胞数量失衡和激活不当和大脑功能异常相关。青少年滥用氯胺酮所致的神经精神障碍是否会影响皮质小胶质细胞尚无研究。

人参是一种的中药材，生物活性广泛。人参所含有的化学成分复杂且多样，有皂苷类、脂肪、及矿物质等，其有效成分主要是人参皂苷。存在几十种单体，其中主要的 5 种占 80%以上，人参皂苷 Rg1 在其中含量较高。近年来，研究证实，人参皂苷 Rg1 可通过许多方式在中枢神经系统、生殖系统以及泌尿系统等多个系统中发挥着极其重要的作用。同时研究表明，人参皂苷 Rg1 可阻断或抑制钙离子通道，维持细胞内外 Ca<sup>2+</sup>稳态，从而达到保护心肌细胞的作用。在中枢神经系统，人参皂苷 Rg1 可抑制 toll 样受体-3 (TLR-3)、 TLR-4 的表达，降低 TNF- $\alpha$ ，降低神经毒性，减少神经细胞凋亡，改善学习和记忆功能<sup>[4]</sup>。小胶质细胞是重要的免疫细胞，在神经元生长、保持大脑功能稳定和信号转导方面发挥重要作用，这是小胶质细

胞最重要的机制。此外，小胶质细胞内钙离子浓度的改变与其功能相关性很强。

因此，我们提出假设，人参皂苷 Rg1 可以通过抑制小胶质细胞上的钙离子通道，维持细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的稳态，抑制小胶质细胞的激活，改善青少年大鼠长期氯胺酮暴露所致的神经精神障碍。

## 1.2 研究意义

滥用氯胺酮严重损害青少年的生长发育、致抑郁、精神分裂症样神经精神障碍、自伤自残等，造成严重的社会和公共卫生、公共安全问题。青少年处于身心发展的阶段，也处于走出校园，走进社会的时期，容易因为好奇心强，或者被他人唆使、在不知情的情况下吸食氯胺酮。首次吸食氯胺酮后，由于氯胺酮的依赖性和成瘾性，极易发展成为新的药物滥用者，对自己、家庭、社会产生严重影响。只有对毒品的危害有足够的了解，才能够减弱好奇心，抵抗诱惑，悬崖勒马，这也是本项目的研究意义所在。

此外，氯胺酮滥用导致严重的神经精神障碍，这些滥用者失去劳动能力，停止吸毒后康复效果不佳，常常残留精神症状，难以回归社会和家庭，增加医疗费用和医疗体系负担，造成严重的家庭和社会负担。本项目有望找到氯胺酮滥用后，治疗精神障碍的新机制和靶点，并从祖国传统的中医药资源中，找到治疗精神障碍的有效药物，为氯胺酮滥用者康复及回归社会和家庭带来希望，减轻家庭和社会负担。

## 1.3 拟解决的科学问题

综合上述，本项目需要解决的科学问题如下：

- ① 单次暴露氯胺酮对远期认知功能无影响，长期暴露于可致对远期学习记忆损害及情绪异常；
- ② 长期暴露氯胺酮激活前额皮质小胶质细胞致神经元树突棘过度修剪；
- ③ 人参皂苷 Rg1 抑制  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻止小胶质细胞激活发挥神经保护作用，治疗氯胺酮暴露所致的认知和情绪障碍。

## 1.4 实验目的

- ① 明确氯胺酮单次暴露和长期多次暴露对认知功能和情绪状态的影响；
- ② 明确皮质小胶质细胞在氯胺酮单次暴露和长期暴露后的激活状态，以及对皮质神经元超微结构的损害；

③明确人参皂苷Rg1氯胺酮长期多次暴露所致认知障碍和情绪异常的治疗作用；

④探讨人参皂苷Rg1阻滞Ca<sup>2+</sup>通道，通过TLR4/NF-κB信号抑制小胶质细胞激活发挥治疗作用的机制。

## 1.5 研究方案

**第一阶段实验方案：**30只雄性、日龄30天(P30)的SD大鼠，测量基础体重后，随机分为3组(n=10)：对照组(Ctrl组)、单次给药组(KTM-S)、长期给药组(KTM-L)。Ctrl组每天注射PBS 1ml/kg；KTM-S组腹腔内注射盐酸氯胺酮30mg/kg一次；KTM-L组每天腹腔注射盐酸氯胺酮30mg/kg，连续8天。在实验开始后每天记录体重变化情况，在建模结束后进行水迷宫测试，测试结束后取大鼠脑组织制备石蜡切片。



图1：第一阶段实验方案图

**二阶段实验方案：**45只雄性、日龄30天(P30)的SD大鼠，测量基础体重后，随机分为3组(n=15)：对照组(Ctrl组)、长期给药组(KTM-L)、人参皂苷Rg1+长期给药组(KTM-L-Rg1)。Ctrl组每天注射PBS 1ml/kg；KTM-L组每天腹腔注射盐酸氯胺酮30mg/kg，连续8天；KTM-L-Rg1组每天腹腔注射盐酸氯胺酮30mg/kg，连续8天。1天后，随后每天腹腔注射人参皂苷Rg1 30mg/kg，连续注射2周。每天记录体重变化情况，治疗结束后进行水迷宫测试，测试结束后随机选择6只大鼠提取蛋白、6只大鼠灌注取脑组织，3只大鼠行高尔基银染色检测。



图2: 第二阶段实验方案图

## 2. 材料和方法

### 2.1 实验动物

本实验严格《实验动物护理和使用指南》(1996年,美国国立卫生研究院发布)中的相关规定进行操作。实验大鼠来自广东省动物中心。健康雄性、日龄30天(P30)的SD大鼠。饲养环境:室温23-25℃左右,湿度维持在55%-65%,规律光照(上午8:00-下午8:00)。

### 2.2 实验材料

试剂	来源	试剂	来源
氯化钠(Cat. No. 746398)	美国 Sigma	氯化钾(Cat. No 746436)	美国 Sigma
磷酸氢二钠(Cat. No. 71649)	美国 Sigma	Tris-Base(Cat. No. 10708976001)	美国 Sigma
磷酸二氢钾(Cat. No. 60229)	美国 Sigma	Tween 20(P1379)	美国 Sigma
柠檬酸(Cat. No. 791725)	美国 Sigma	多聚甲醛(Cat. No. 16005)	美国 Sigma
柠檬酸钠(Cat. No. 1613859)	美国 Sigma	ECL 化学发光液(WBULS0100)	美国 Millipore
甘氨酸(Cat. No. V900144)	美国 Sigma	高尔基试剂盒	美国 FD NeuroTechnologies
人参皂苷 Rg1	上海融禾公司	小鼠抗兔 TLR4 抗体 ab5076	Abcam, UK
羊抗兔 Iba-1 抗体 ab5076	Abcam, UK	小鼠抗兔 NF-κB p65 抗体 MAB3026	Millipore, USA

## 2.3 实验设备

实验设备	来源	实验设备	来源
纯水仪 (Milli-Q®)	美国 Millipore	PowerPac™ 基础电泳仪电源 (#1645050)	美国 Bio-Rad
电子天平 (TE214S)	德国 Sartorius	Mini-PROTEAN 电泳槽及配件 (#1658000)	美国 Bio-Rad
微量移液器 (Research® plus)	德国 Eppendorf	ChemiDoc™ 成像系统 (#12003153) 离心机 (C1301)	美国 Bio-Rad
倒置显微镜 (DMi8+DFC7000J)	德国 Leica	磁力搅拌器 (WH220 PLUS)	德国 Wiggins
生物显微镜 (DM750)	德国 Leica	超声破碎仪 (VCX-130PB)	美国 Sonics
石蜡切片机 (RM 2235)	德国 Leica	漩涡混合器 (Vortex Genie2)	美国 Scientific Industries
振动切片机 (VT1000S)	德国 Leica	高压灭菌锅 (HVE50)	日本 Hirayama
体视显微镜 (Stemi305)	德国 Leica	多标记微孔板检测仪 (EnSpire)	美国 PerkinElmer
粘附载玻片 (#4951PLUS-001E)	美国 ThermoFisher Scientific	行为学分析软件 (EthoVision XT7.0)	美国 Noldus
三维构建软件 Imaris	瑞士 Bitplane	脱色摇床 (TS-1)	海门其林贝尔仪器有限公司
pH 计 (620PH)	上海英格公司	烘片机 (KD-H)	金华科迪仪器设备有限公司

## 2.4 实验方法

**水迷宫测试:** 将实验所用的铁皮水桶中的水池平均分成4个象限, 做好标记, 将平台 (10cm X 10cm) 放置在其中某一个象限, 距离水面下约1.5cm, 水温持续保持在 $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。室内光线要均匀、密闭且安静无人干扰。每次实验开始的时候, 将大鼠脸朝池壁, 依次以不同象限为起始点, 沿边缘面向池壁置入水中。实时记下其从进入水池内游泳到找到逃避台后, 需要的潜伏时间及速度。在1min以内, 如果大鼠没有到达逃避台, 就让大鼠在该台上停留10s。进行3天的学习训练后, 最后一天进行探索性实验, 我们将平台撤离, 让大鼠在水中游泳1min, 记录下大鼠穿行通过平台所在的象限的时间及频率。

**旷场实验:** 将有机塑料透明敞箱 (旷场实验箱50cm\*40cm \*50cm) 底部平分为25个格子。每天实验上午9: 00-12: 00的在幽静的房间内进行, 将大鼠轻柔的

拿起，放入旷场实验箱正中间的格子内并开始观察，使用(Noldus EthoVision XT 7.1,Wageningen,Netherlands)。用行为学软件实时记录下大鼠的运动轨迹、总距离、穿越格子的次数，我们每次实验时间是15分钟。每只大鼠连续测试3天。

糖水偏好试验：首先检查实验的瓶子是否漏水，瓶子大小、形状一样，做好标记，完成1%蔗糖水制作。实验选择的环境要求：安静、柔和的光线，实验者动作要轻柔。每天早上WMT后，下午大鼠取用1%的糖水1h；连续进行三天实验，记录好数据。具体方法：将大鼠进行禁水23h且独立饲养，接着在鼠笼上放两瓶水（一个自来水，另外一个1%的糖水），水放在相同的地方。30 min后把两瓶水反着放置，实验时间大约为1小时，结束后，把瓶子拿出，及时记录瓶子的差值，然后算出1h糖水取用量和自来水量。

组织取材：行为学实验后，水合氯醛(0.5 mg/kg)麻醉大鼠，随后将其胸骨剪开，剪开右心耳，经左心室心尖部灌入一定的生理盐水，直至肝脏变成苍白为止，然后用多聚甲醛（PFA）溶液持续灌注，直到四肢变僵硬。最后将拿出大鼠大脑放入PFA溶液中24h。

石蜡切片制备：将脑组织浸入多聚甲醛24小时后，将其依次放入酒精和二甲苯中浸泡，最后制作成石蜡块，切成厚度约5 $\mu$ m的切片，最后放入 37 $^{\circ}$ C恒温箱中烘干。

梯度脱蜡：将制作好的切片依次放入不同浓度的二甲苯和酒精内浸泡，之后在DDW中进行充分洗涤约10min，然后在PBS中洗5min。最后，在常温下倒入3%过氧化氢浸泡，再用PBS洗净过氧化氢。倒入适量的抗原修复液，接着封闭液在常温下放置1h。再用PBST清洗三次，加入二抗，37 $^{\circ}$ C烘箱放置1h，然后用PBST清洗三次，再加入AB液室温下放1 h，PBST清洗三次。加入DAB溶液进行显色，随后加入PBS，最后进行封片。

免疫印迹试验即 Western Blot：腹腔内注入水合氯醛对大鼠实施麻醉，随后在冰块上快速的开颅取出海马组织，置入预冷好的离心管内。称重以后，按每 20mg 的样本内加 150-250ul 裂解液，混合均匀后对海马组织进行裂解，组织裂解后置于 4 $^{\circ}$ C离心机进行离心提取上清液，-20 $^{\circ}$ C保存。获得蛋白后，使用 BCA 做蛋白定量。让蛋白样品和缓冲液混合均匀后进行电泳、电转。转膜结束后用 5%的脱脂奶粉或 BSA 常温下封闭 1h。加入含目的蛋白抗体的溶液孵育, 4 $^{\circ}$ C过夜。次日 PBST 溶液清洗三次，随后常温二抗 1h，PBST 溶液清洗三次。ECL 溶液显影，最后曝光。用 Image J 相关软件进行灰度值分析。

神经元 Glogi-Cox 浸染法(高尔基染色)：步骤如下：首先配置液配制：AB 液要

实验前 24h 以上进行制作，避光放置保存，取上层液体。取材：麻醉大鼠后，开颅取出脑组织。将脑组织放入配置好的 AB 溶液中，24h 后更换新的 AB 溶液，室温放置 14 天，注意避光。随后更换 C 溶液，24h 浸泡后更换新的 C 液，室温静置。包埋：将脑组织取出，然后进行包埋。切片：对脑组织进行功能定位，选取距离前囟约 4.2-2.2mm 的位置，使用振动切片机进行切片，厚度约 150  $\mu\text{m}$ ，将切好的组织置于玻片上，加入 C 液。DE 液染色：PBS 清洗几次，讲切片置于 DE 溶液内，置于摇床上轻轻晃动 10min，接着使用双蒸水清洗 3 次。酒精梯度脱水：分布置于不同浓度的酒精中脱水，每次 5min。然后置于不同浓度的二甲苯内浸泡。封片、拍片：采用中性树胶进行封片， $-20^{\circ}\text{C}$  避光保存。倒置显微镜下选择好的视野进行拍摄并统计。

2.5 统计学分析：行为学相关的分析采用方差分析，其他指标采用 One-Way ANOVA 统计分析。

### 3. 实验结果

#### 3.1 建立青少年期单次或长期多次氯胺酮暴露的大鼠模型

三组大鼠实验前的体重无统计学差异。在建模的第4天和第8天体重测试结果显示：和 Ctrl 组相比，KTM-S 组大鼠体重在这两个时间点均无统计学差异 ( $n=5, P>0.05$ )，但是 KTM-L 组大鼠体重显著低于 Ctrl 组 ( $n=5, P<0.01$ ) 和 KTM-S 组大鼠 ( $n=5, P<0.01$ )，见图3。

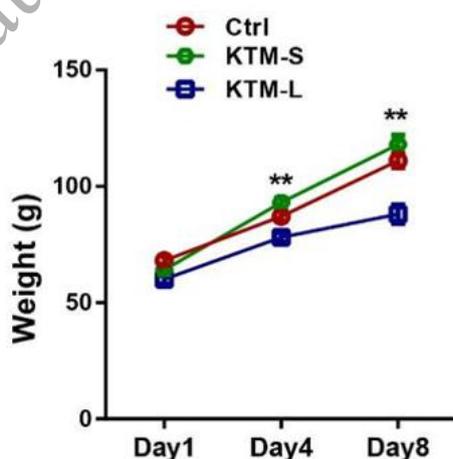


图3：三组大鼠基础体重、建模后第4天、建模后第8天体重值 (g)

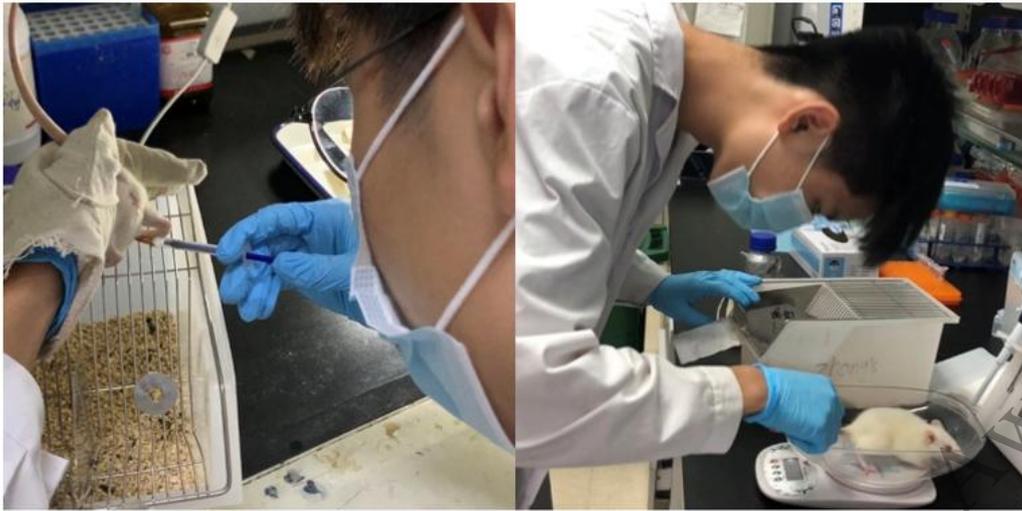


图4：大鼠称重及注射氯胺酮

### 3.2 青少年大鼠单次或长期多次氯胺酮暴露模型的行为学评价

#### 3.2.1 旷场实验

在该实验中，和 Ctrl 组比较，KTM-S 组大鼠运动总距离和中央区停留时间的差异无统计学意义 ( $n=5, P>0.05$ )，KTM-L 组大鼠运动总距离和中央区停留时间显著少于对照组 ( $n=5, P<0.05$ )，这表明 KTM-L 组大鼠探索活动减少，表现出抑郁的状态。见图 5。

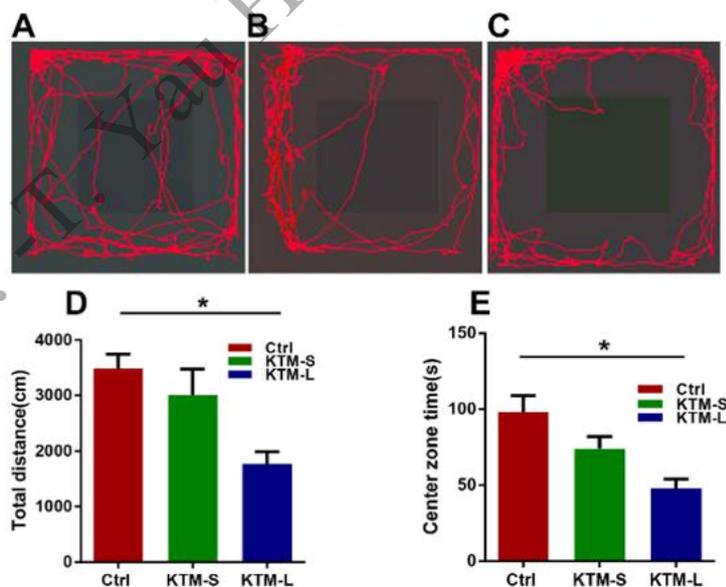


图5：三组大鼠在旷场实验中的运动总距离和中心区探索时间。A-C分别为Ctrl组、KTM-S组、KTM-L组大鼠在旷场实验中的运动轨迹。D为三组大鼠运动总距离的统计图。E为三组大鼠中心区探索时间的统计图。

#### 3.2.2 水迷宫的探索实验

在水迷宫的探索实验中，和Ctrl组相比，KTM-S组大鼠在平台象限停留的的差异无统计学意义 ( $n=5, P>0.05$ )，KTM-L组大鼠在平台象限停留的时间显著少于对照组 ( $n=5, P<0.05$ )。见图6。

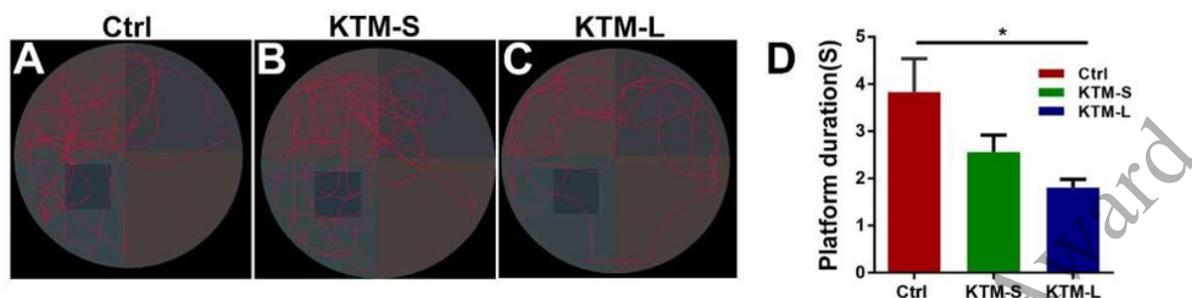


图6：三组大鼠在水迷宫探索实验中平台期停留时间。A为Ctrl组大鼠运动轨迹，B为KTM-S组鼠运动轨迹，C为KTM-L组鼠运动轨迹，D为三组平台期停留时间的统计图。

### 3.2.3 糖水偏好实验

在糖水偏好实验 (SPT) 中，和 Ctrl 组相比，KTM-S 组大鼠糖水饮用率的差异无统计学意义 ( $n=5, P>0.05$ )，KTM-L 组大鼠糖水饮用率显著少于对照组 ( $n=5, P<0.05$ )，这表明 KTM-L 组大鼠快感缺失，表现出抑郁的状态。见图 7。

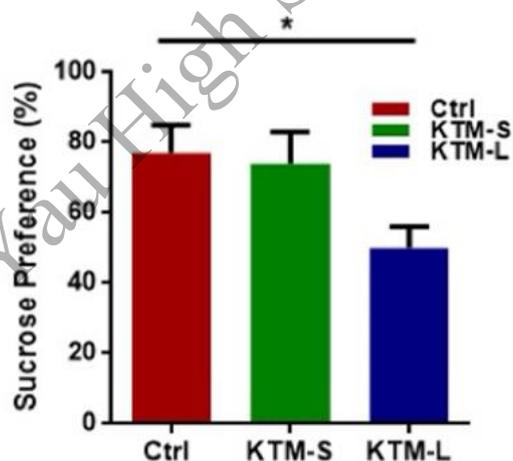


图7：三组大鼠糖水偏好实验的统计图

旷场实验、水迷宫实验以及糖水偏好实验主要用于评估分析大鼠的一般运动能力，智力和焦虑相关的情绪行为，测试大鼠对立体位置感和记忆力以及抑郁样行为。我们发现单次给予氯胺酮后，大鼠在实验中的行为和对照组相比无明显差异。而持续给予氯胺酮小组的大鼠，运动总距离和中央区停留时间、平台象限停留以及糖水饮用率显著减少。以上结果表明单次暴露氯胺酮对远期认知功能无影响，长期暴露可导致远期学习记忆损害及情绪异常。

### 3.3 青少年大鼠单次或长期多次氯胺酮暴露对前额皮质小胶质细胞激活的影响

前额皮质小胶质细胞免疫组化显示：和Ctrl组相比，KTM-S组大鼠前额皮质小胶质细胞密度无统计学差异（ $n=5$ ,  $P>0.05$ ），KTM-L组大鼠前额皮质小胶质细胞密度显著多于对照组（ $n=5$ ,  $P<0.01$ ）和KTM-S组（ $n=5$ ,  $P<0.01$ ）。见图8。

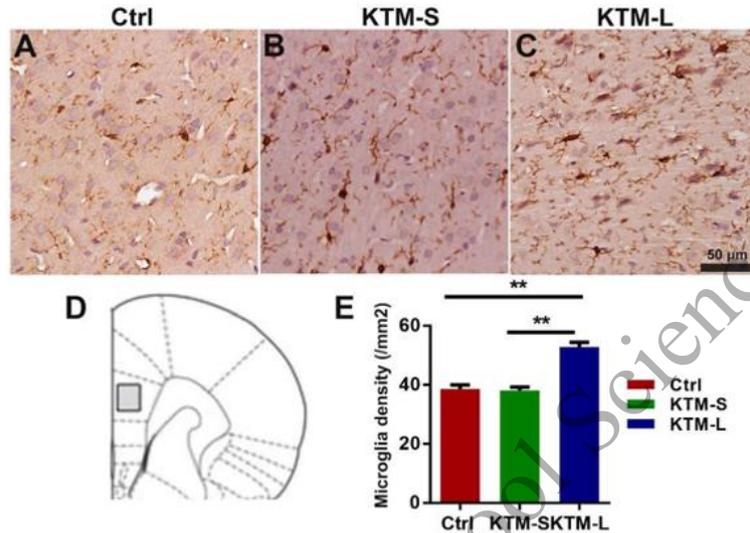


图8：前额皮质小胶质细胞的密度。A为Ctrl组大鼠前额皮质小胶质细胞，B为KTM-S组大鼠前额皮质小胶质细胞，C为KTM-L组大鼠前额皮质小胶质细胞，D为前额皮质示意图，E为三组前额皮质小胶质细胞密度的统计图。

前额皮质是大脑发育最晚的脑区，是认知功能和情绪调控方面的高级中枢，前额皮质发育障碍及病理改变和很多神经精神疾病的发生有关。小胶质细胞作为免疫细胞，其激活后释放的炎症因子，从而介导炎性途径，过多的活化小胶质细胞造成结构和功能损伤。我们发现单次给予氯胺酮后，大鼠前额皮质小胶质细胞和对照组相比无明显差异。而持续给予氯胺酮的大鼠，小胶质细胞密度明显增加。结果表明长期暴露氯胺酮可激活前额皮质小胶质细胞致神经元树突棘过度修剪。

### 3.4 人参皂苷改善青少年大鼠长期氯胺酮暴露所致的行为学异常

#### 3.4.1 旷场实验

在旷场实验（OFT）中，和Ctrl组相比，KTM-L组大鼠运动总距离和中央区逗留时间显著减少（ $n=15$ ,  $P>0.05$ ）；KTM-L+Rg1组大鼠运动总距离和中央区停留时间明显高于KTM-L组（ $n=15$ ,  $P<0.05$ ）；Ctrl组和KTM-L+Rg1组相比，总距离和中央区逗留时间的差异无意义（ $n=15$ ,  $P>0.05$ ）。这表明Rg1可逆转KTM暴露所致的探索活动减少。见图9。

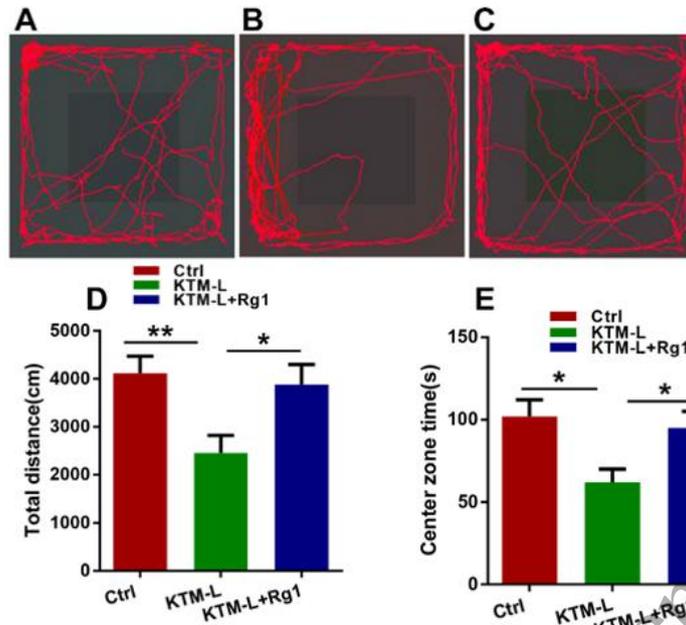


图9: 三组大鼠在旷场实验中的运动总距离和中心区探索时间。A-C分别为Ctrl组、KTM-L组、KTM-L+Rg1组大鼠在旷场实验中的运动轨迹。D为三组大鼠运动总距离的统计图。E为三组大鼠中心区探索时间的统计图。

### 3.4.2 水迷宫的探索实验

在水迷宫的探索实验中,和Ctrl组相比,KTM-L组大鼠在平台象限逗留的时间显著减少 ( $n=15, P<0.05$ ); KTM-L+Rg1组大鼠在平台象限逗留的时间显著高于KTM-L组 ( $n=15, P<0.05$ ); Ctrl组和KTM-L+Rg1组相比,平台象限逗留时间的差异无意义 ( $n=15, P>0.05$ )。这表明Rg1可减轻KTM暴露所致的记忆损伤。见图10A-D。

### 3.4.3 糖水偏好实验

在糖水偏好实验中,和Ctrl组相比,KTM-L组大鼠的糖水饮用率显著降低 ( $n=15, P<0.05$ ); KTM-L+Rg1组糖水饮用率显著高于KTM-L组 ( $n=15, P<0.05$ ); Ctrl组和KTM-L+Rg1组相比,糖水饮用率的差异无意义 ( $n=15, P>0.05$ )。这表明Rg1可减轻KTM暴露所致的快感缺失。见图10E。

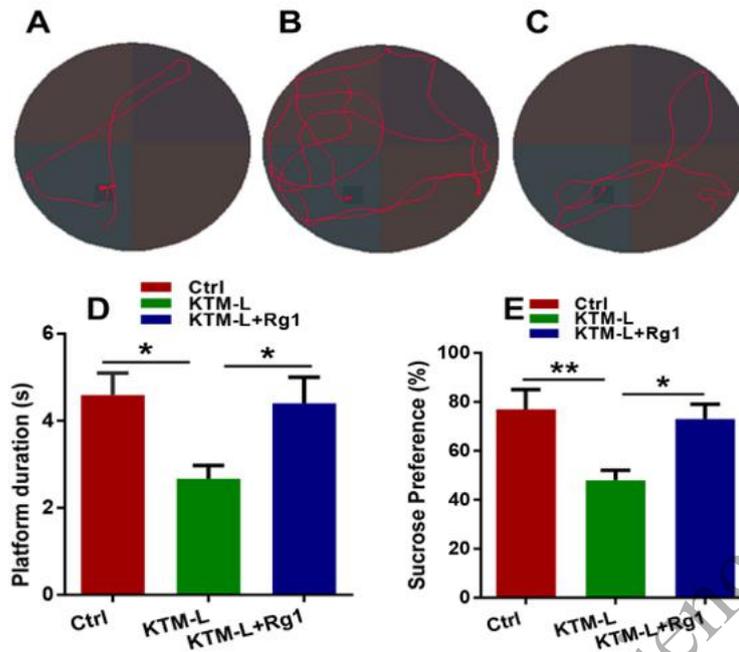


图10: 三组大鼠在水迷宫探索实验中平台期停留时间。A为Ctrl组大鼠运动轨迹, B为KTM-L组大鼠运动轨迹, C为KTM-L+Rg1组大鼠运动轨迹, D为三组平台期停留时间的统计图。E图为糖水偏好实验的统计图。

我们发现和对照组相比, 持续给予氯胺酮小组的大鼠, 运动总距离和中央区停留时间、平台象限停留以及糖水饮用率显著减少, 表明长期暴露氯胺酮可致对远期学习记忆损害及情绪异常。而持续给予氯胺酮刺激, 然后加入人参皂苷干预, 其结果和对照组无明显差异。以上结果表明人参皂苷能逆转氯胺酮长期多次暴露所致认知障碍和情绪异常。

### 3.5 人参皂苷抑制前额皮质小胶质细胞的激活

石蜡切片免疫组化显示, 和Ctrl组相比, KTM-L组大鼠前额皮质小胶质细胞的密度显著升高 ( $n=5, P<0.05$ ); KTM-L+Rg1组前额皮质小胶质细胞的密度低于KTM-L组 ( $n=5, P<0.05$ ); Ctrl组和KTM-L+Rg1组相比, 前额皮质小胶质细胞密度的差异无统计学差异 ( $n=5, P>0.05$ )。这表明Rg1可减轻KTM暴露所致的小胶质细胞激活。见图11。

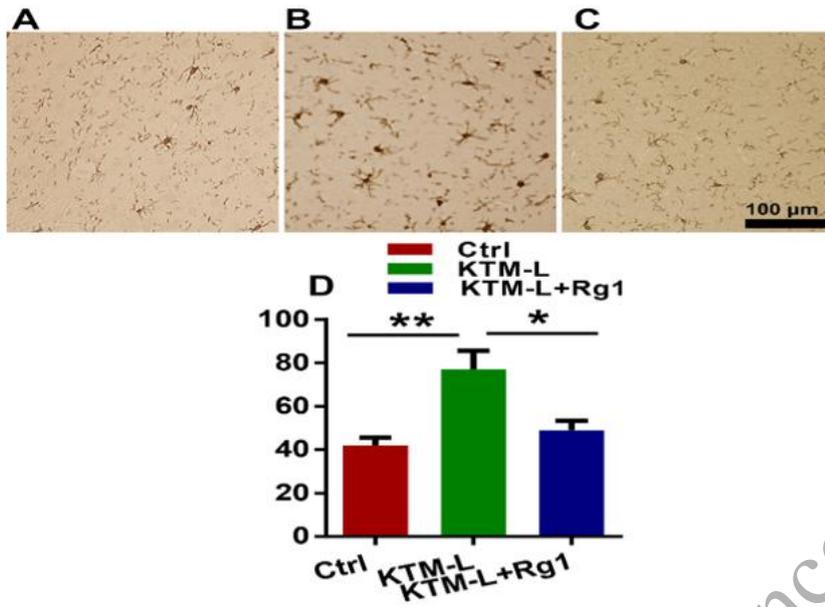


图11: 三组大鼠前额皮质小胶质细胞免疫组化结果。A为Ctrl组大鼠前额皮质小胶质细胞的免疫组化示意图, B为KTM-L组大鼠前额皮质小胶质细胞的免疫组化示意图, C为KTM-L+Rg1组大鼠前额皮质小胶质细胞的免疫组化示意图, D为三组大鼠前额皮质小胶质细胞密度的统计图。

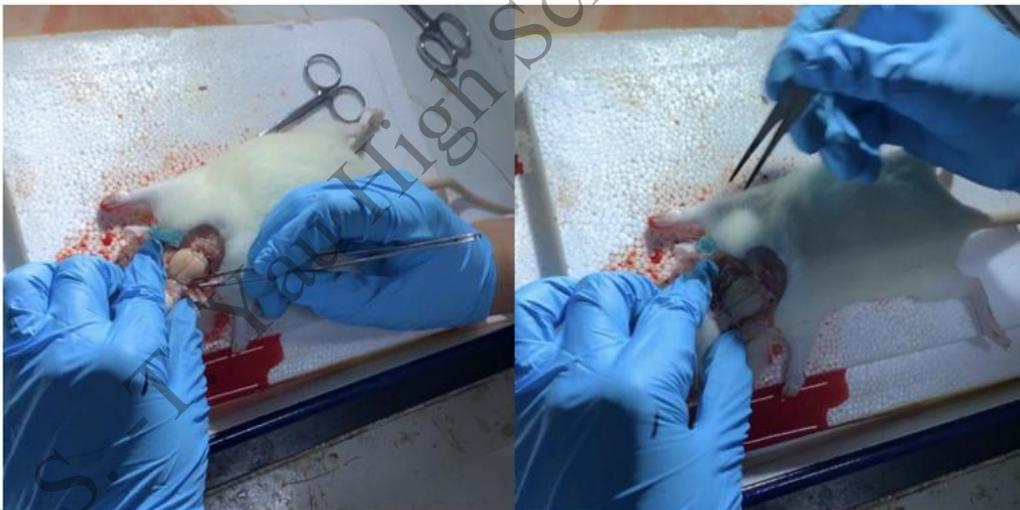


图12: 剪开大鼠颅骨并取脑

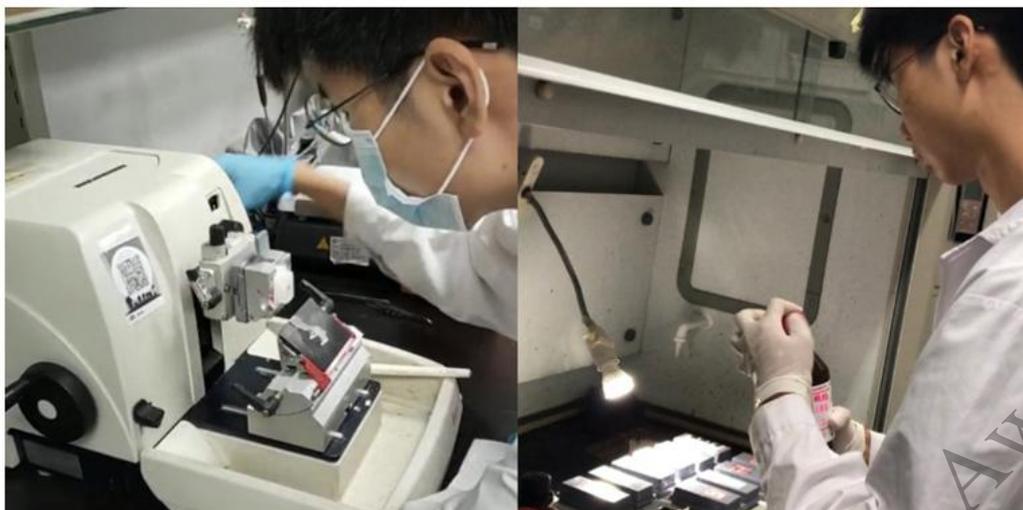


图13: 脑组织切片及梯度脱蜡

### 3.6 人参皂苷Rg1抑制NF- $\kappa$ B/TLR-4信号通路

Western blot结果显示, 和Ctrl组相比, KTM-L组大鼠前额皮质NF- $\kappa$ B、TLR-4的表达均显著升高 ( $n=5, P<0.05$ ); KTM-L+Rg1组大鼠前额皮质NF- $\kappa$ B、TLR-4的表达均低于KTM-L组 ( $n=5, P<0.05$ ); Ctrl组和KTM-L+Rg1组相比, 前额皮质大鼠前额皮质NF- $\kappa$ B、TLR-4表达的差异均无明显差异 ( $n=5, P>0.05$ )。这表明Rg1可能通过TLR4/NF- $\kappa$ B信号途径发挥作用。见图14。

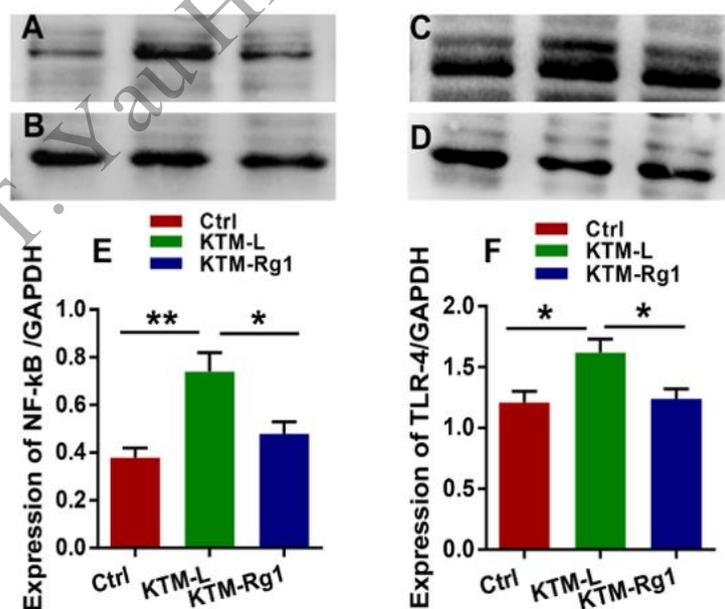


图14: 三组大鼠前额皮质蛋白表达的结果。A、B分别为三组大鼠前额皮质目标蛋白NF- $\kappa$ B和内参蛋白GAPDH的Western blot条带; C、D分别为三组大鼠前额皮质目标蛋白TLR-4和内参蛋白GAPDH的Western blot条带, E为三组大鼠前额皮质目标蛋白NF- $\kappa$ B和内参蛋白GAPDH表达比值的统计图; F为三组大鼠前额皮质目标蛋白TLR-4和内参蛋白GAPDH表达比值的统计图。



图15：免疫组织化学染色



图16：免疫印迹实验

与行为学结果一致，和对照组相比，我们发现持续给予氯胺酮的大鼠，小胶质细胞密度明显增加。其结果表明长期暴露氯胺酮可激活前额皮质小胶质细胞致神经元树突棘过度修剪。而持续给予氯胺酮刺激，然后加入人参皂苷干预，其结果和对照组无明显差异。同时我们观察到持续给予氯胺酮后，TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的表达明显增加，而加入人参皂苷后，其表达显著降低了。表明人参皂苷可能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径抑制小胶质细胞激活发挥治疗作用的机制。

#### 4、讨论

近年来，全球药物滥用的人数急剧增加，其中氯胺酮流行性滥用的情况非常突出。据联合国毒品与犯罪问题办公室报道，东南亚地区是氯胺酮滥用的主要地区，尤其是我国香港等地。增加的氯胺酮滥用者以青少年居多，因此本研究中采用P30大鼠，相当于人类的青少年时期，给予娱乐剂量的氯胺酮腹腔注射，用以模拟青少年滥用氯胺酮的模型<sup>[5]</sup>。其中，单次氯胺酮腹腔注射用于模拟青少年首次吸食氯胺酮后由于自我意识提高等

原因未再次吸食。多次氯胺酮腹腔注射用于模拟青少年多次吸食氯胺酮的现象。本研究结果表明，青少年大鼠单次氯胺酮腹腔注射未损害记忆功能和体重增加，前额皮质的小胶质细胞数量无显著增加。大鼠多次氯胺酮腹腔注射损害记忆功能，体重显著下降，且前额皮质的小胶质细胞显著增加。这表明青少年大鼠单次注射娱乐剂量氯胺酮并不会损害生长发育、记忆功能，也不会对大脑的炎症细胞产生影响。而多次注射会损害生长发育、记忆，并造成大脑皮质炎症细胞小胶质细胞的激活和增多。

前额皮质是大脑发育最晚的脑区，是认知功能和情绪调控的高级中枢，前额皮质发育障碍及病理改变和很多神经精神疾病的发生有关<sup>[6]</sup>。前额皮质对药物滥用会非常敏感，可改变前额皮质神经元的超微结构，造成神经环路异常，从而出现神经精神样的异常症状如记忆损害、抑郁、躁狂等<sup>[7]</sup>。我们的研究显示青少年大鼠长期氯胺酮滥用致前额皮质小胶质细胞显著增加。作为中枢神经系统的免疫细胞的主要组成部分小胶质细胞，其能被激活，并能释放的炎症因子介导中枢炎症反应，但过多活化后可能对神经细胞造成结构和功能损伤，产生神经毒性反应<sup>[8]</sup>。本项目中氯胺酮长期滥用导致前额皮质小胶质细胞增加以及增加的小胶质细胞如何产生神经毒性的机制需要进一步的研究。

中医药是我国重要文化遗产，对医疗健康有很重要的作用。中医很受我们人民欢迎，近年来流传到国外，颇受关注和欢迎，中草药副作用小，疗效好，价格相对便宜。我们青年一代应该传承好中医药，继续发挥中医药在医疗健康上面的关键作用。本人经过本次的项目研究，惊喜的发现人参皂苷Rg1（腔注射，连续两周）可显著改善青少年大鼠长期氯胺酮暴露所致的神经精神障碍，抑制前额皮质小胶质细胞的激活。同时我们观察到持续给予氯胺酮刺激，TLR4和NF- $\kappa$ B的表达明显增加，而加入人参皂苷后，其表达显著降低了。有研究表明参皂苷Rg1可抑制toll样受体-3（TLR-3）、TLR-4的表达，降低TNF- $\alpha$ ，降低神经毒性，减少神经细胞的凋亡，改善学习和记忆功能。由此我们推测人参皂苷可能通过TLR4/NF- $\kappa$ B信号抑制小胶质细胞激活发挥治疗作用的机制。

滥用氯胺酮不仅可严重损害青少年的生长发育、致抑郁、精神分裂症样神经精神障碍，自伤自残<sup>[9]</sup>。而且因为情绪亢奋和幻觉而故意致人死伤，造成严重的社会和问题。青少年处于生长发育和学习知识技能的关键时期，同时也处于走向社会、接触社会的阶段，容易因为好奇心强，或者被他人唆使、在不知情的情况下盲目吸食氯胺酮<sup>[10]</sup>。首次吸食氯胺酮后，由于氯胺酮的依赖性和成瘾性，及易发展成为新的药物滥用者，对自己、家庭、社会产生严重影响。因此，对毒品的毒性和毒害有更加好的了解，就可以控制好奇心，抵抗诱惑，悬崖勒马。对于多次暴露氯胺酮，已经导致严重神经精神障碍的青少年患者，由于

青少年患者神经的可塑性好，治愈的希望较大，我们寄希望祖国的中草药人参科植物的提取物人参皂苷能发挥神经保护作用，逆转多次暴露氯胺酮所致的神经精神障碍，尽早回归社会，重新拥有健康和幸福的人生。

## 5. 参考文献

- [1] L. Li, P.E. Vlisides, Ketamine: 50 Years of Modulating the Mind, *Front Hum Neurosci*, 10 (2016) 612.
- [2] H.Q. Sun, Y.P. Bao, S.J. Zhou, S.Q. Meng, L. Lu, The new pattern of drug abuse in China, *Curr Opin Psychiatry*, 27 (2014) 251-255.
- [3] J.H. Li, B. Vicknasingam, Y.W. Cheung, W. Zhou, A.W. Nurhidayat, D.C. Jarlais, R. Schottenfeld, To use or not to use: an update on licit and illicit ketamine use, *Subst Abuse Rehabil*, 2 (2011) 11-20.
- [4] C.V. Vorhees, M.T. Williams, Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nat Protoc*, 1 (2006) 848-858.
- [5] V.B. de Graaf-Peters, M. Hadders-Algra, Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when?, *Early Hum Dev*, 82 (2006) 257-266.
- [6] E.C. Pittaras, A. Faure, X. Leray, E. Moraitopoulou, A. Cressant, A.A. Rabat, C. Meunier, P. Fossier, S. Granon, Neuronal Nicotinic Receptors Are Crucial for Tuning of E/I Balance in Prelimbic Cortex and for Decision-Making Processes, *Front Psychiatry*, 7 (2016) 171.
- [7] B.T. Chen, H.J. Yau, C. Hatch, I. Kusumoto-Yoshida, S.L. Cho, F.W. Hopf, A. Bonci, Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking, *Nature*, 496 (2013) 359-362.
- [8] M.L. Block, L. Zecca, J.S. Hong, Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms, *Nat Rev Neurosci*, 8 (2007) 57-69.
- [9] L. Velisek, CNS aspects of prenatal drug exposure: drugs of abuse, toxins, and corticosteroids, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 1074 (2006) 577-589.
- [10] C. Yiu-Cheung, Acute and chronic toxicity pattern in ketamine abusers in Hong Kong, *J Med Toxicol*, 8 (2012) 267-270

---

## 6. 附件

### 6.1 项目分工及致谢

本课题是在南方医科大学第三附属医院刘佩老师和学校科技创新教练组的王剑老师的悉心指导下开展的。从实验的设计、开展及数据整理，刘老师都给予了我非常专业的知识辅导及耐心的技术指导。也借此机会感谢粤港澳中枢神经再生研究院的周立兵教授、秦静文技术员以及帮助过我的其他老师和实验师，感谢他们对我的很多帮助和鼓励。感谢我的父母和家人，他们给了我极大的鼓励和帮助。内容不足之处，恳请各位老师批评指正。

### 6.2 参赛选手简历

李家苟，男，2003年5月14日出生于，初中就读于广州市第一一三中学，现为广东实验中学学生。他德智体美劳全面发展，生物特长突出。于2020年2月获得AMC-12全球前2.5%。积极参与生物实践社的各项活动，与2020年五月获得学期学习进步奖及奖学金。热心参与义工活动，定期去医院探望儿童骨科患儿。

### 6.3 辅导教师简历

刘佩，硕士，医师，主要研究方向为自噬与神经损伤，探讨信号分子转导途径等问题。先后参与多项国家自然科学基金项目和广东省自然科学基金项目。在Theranostics、Molecular and Cellular Endocrinology、Journal of Molecular neuroscience等期刊上发表论文。

王剑，广东实验中学科技教育办公室主任、综合实践活动教研组长、广州市STEM教育研究中心常务副主任、。曾担任第32届美国匹兹堡国际发明展青少年项目评委、第67届德国纽伦堡国家发明展青少年项目评委；荣获过2018年基础教育国家级教学成果二等奖、第八届广东省普通教育教学成果奖荣获二等奖、全国中学生水科技发明比赛优秀指导教师、全国创新型名师等荣誉称号。先后指导学生获得国际奖54项，国家级奖项200多项，500余项省级以上奖项。发表过11篇论文，撰写过一篇专著。

---

*2020 S.-T. Yau High School Science Award*