

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20221130002

李思颖, 马栋栋, 张金阁, 等. 新精神活性物质氯胺酮对斑马鱼幼鱼的神经毒性[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(1): 246-260

Li S Y, Ma D D, Zhang J G, et al. Neurotoxicity of a new psychoactive substance ketamine on zebrafish larvae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(1): 246-260 (in Chinese)

新精神活性物质氯胺酮对斑马鱼幼鱼的神经毒性

李思颖^{1,2}, 马栋栋^{1,2}, 张金阁^{1,2}, 龙小冰^{1,2}, 卢志杰^{1,2}, 刘昕³, 黄楚舒³, 史文俊^{1,2,3,*}, 刘芳^{4, #}

1. 华南师范大学环境研究院广东省化学污染与环境安全重点实验室, 华南师范大学环境理论化学教育部重点实验室, 广州 510006

2. 华南师范大学环境学院, 广州 510006

3. 广东省毒品实验技术中心(国家毒品实验室广东分中心), 广东省精神活性物质监测与安全重点实验室, 广州 510000

4. 华南师范大学地理科学学院, 广州 510631

收稿日期: 2022-11-30

录用日期: 2023-01-13

摘要: 氯胺酮(ketamine, KET)是一种新精神活性物质, 使用后会产生致幻、视听分离感和欣快感。KET 已经在地表水中广泛检出, 浓度高达 $420 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。已有大量研究表明 KET 对人、鼠类等哺乳动物具有强烈的神经毒性, 但 KET 对鱼类的神经毒性及潜在机制尚不清晰。目前研究多关注 KET 对非竞争性 N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体的影响, 较少考虑多巴胺(dopamine, DA)和 γ -氨基丁酸(GABA)通路的影响。为研究 KET 对斑马鱼幼鱼早期神经毒性及其作用机制, 将 2 hpf (hours post-fertilization) 的斑马鱼胚胎分为对照组和 3 个暴露组(10 、 100 和 $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$), 分析 KET 对斑马鱼胚胎和幼鱼行为、活性氧水平以及神经相关基因转录水平的影响。结果表明, $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 显著降低 7 dpf 斑马鱼心率($P < 0.05$)。行为分析显示, $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 显著增加斑马鱼胚胎自发摆尾运动频率($P < 0.001$)。 $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 显著升高 27 hpf 斑马鱼对触碰反应的敏感程度、而降低 48 hpf 斑马鱼的敏感程度($P < 0.01$)。 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 显著降低斑马鱼在黑暗状态下的趋触性($P < 0.05$)。活性氧水平检测结果表明, $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 显著增加斑马鱼幼鱼腹部 ROS 荧光信号强度($P < 0.05$)。qPCR 分析结果表明, $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 下调多巴胺受体基因 *drd3* 转录水平, $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 上调钾内向整流通道亚家族 J 成员 6 基因 *kcnj6* 转录水平, $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 上调 γ -氨基丁酸转运体基因 *slc6a1b*、钾内向整流通道亚家族 J 成员 5 基因 *kcnj5* 转录水平。上述结果表明, KET 通过影响 DA 和 GABA 通路来显著影响斑马鱼幼鱼行为和神经相关基因转录水平, 产生神经毒性。

关键词: 氯胺酮; 斑马鱼; 神经毒性; 心脏毒性

文章编号: 1673-5897(2023)1-246-15

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Neurotoxicity of A New Psychoactive Substance Ketamine on Zebrafish Larvae

Li Siying^{1,2}, Ma Dongdong^{1,2}, Zhang Jingge^{1,2}, Long Xiaobing^{1,2}, Lu Zhijie^{1,2}, Liu Xin³, Huang Chushu³, Shi Wenjun^{1,2,3,*}, Liu Fang^{4, #}

1. SCNU Environmental Research Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety & MOE Key Laboratory of Environmental Theoretical Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42277268); 广东省精神活性物质监测与安全重点实验室开放基金资助项目

第一作者: 李思颖(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: siying.li@m.scnu.edu.cn

* **通信作者** (Corresponding author), E-mail: wenjun.shi@m.scnu.edu.cn

共同通信作者 (Co-corresponding author), E-mail: liufang77@m.scnu.edu.cn

2. School of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

3. Anti-Drug Technology Center of Guangdong Province and National Anti-Drug Laboratory Guangdong Regional Center, Guangdong Provincial Key Laboratory of Psychoactive Substances Monitoring and Safety, Guangzhou 510000, China

4. School of Geography, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Received 30 November 2022 **accepted** 13 January 2023

Abstract: Ketamine (KET) is a new psychoactive substance that can produce hallucinations, audiovisual separation and euphoria. KET has been widely detected in surface water at concentrations up to $420 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Some studies show that KET has strong neurotoxicity to human, rodents and other mammals, but the neurotoxicity of KET to fish and its potential mechanism are not known. Current studies have focused more on the effect of KET on non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and less on the effects of dopamine (DA) and γ -aminobutyric acid (GABA) pathways. To investigate the neurotoxicity of KET on zebrafish larvae and its mechanism, 2 hpf (hours post-fertilization) zebrafish embryos were divided into control group and three KET groups (10, 100 and $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$). The effects of KET on the behavior, reactive oxygen species level and nerve-related gene transcription of zebrafish embryos and larvae were analyzed. The results showed that $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET apparently reduced the heart rate of 7 dpf zebrafish ($P < 0.05$). Behavioral analysis revealed that $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET significantly enhanced the frequency of spontaneous tail contraction in embryos ($P < 0.001$). $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET significantly elevated the sensitivity of touch response at 27 hpf zebrafish, while decreased the sensitivity at 48 hpf zebrafish ($P < 0.01$). $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET obviously reduced the degree of thigmotaxis of zebrafish in dark ($P < 0.05$). The results of ROS showed that $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET markedly increased the ROS fluorescence signal intensity in the abdomen of zebrafish larvae ($P < 0.05$). The qPCR data showed that $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET reduced the transcription of dopamine receptor gene *drd3*, $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET enhanced the transcription of potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 6 gene *kcnj6*, $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET increased the transcriptions of GABA transporter gene *slc6a1b* and potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 5 gene *kcnj5*. The above results indicated that KET could affect the behavior and the transcriptions of nerve-related genes of zebrafish larvae by affecting the DA and GABA pathways, which resulted in neurotoxicity in fish.

Keywords: ketamine; zebrafish; neurotoxicity; cardiotoxicity

新精神活性物质(new psychoactive substances, NPS)是指“未被联合国《麻醉品单一公约》《精神药物公约》所管制,但具有滥用潜力并可以引起公共健康风险的精神活性物质”。根据《2022 年世界毒品报告》,在 2009—2021 年期间,134 个国家向联合国毒品和犯罪问题办公室(United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC)报告了 1 127 种 NPS^[1]。NPS 作用于人体可产生兴奋、欣快和致幻等精神活性,滥用时极易过量造成中毒和死亡,全球因 NPS 死亡或犯罪的事件屡见不鲜。氯胺酮(ketamine, KET)就是其中一种典型的 NPS。KET 是苯环己哌啶(phencyclidine, PCP)衍生物,是非竞争性 N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体拮抗剂。KET 在 1962 年首次被美国化学家 Calvin Stevens 在实验室合成后,因其具有相当的麻醉效果和一定的止痛作用,广泛用于人类和兽医学的静脉

麻醉剂^[2]。同时,KET 对中枢神经系统具有兴奋和抑制两方面作用,其中,对丘脑-新皮质系统有抑制作用,而对丘脑和边缘系统有兴奋作用^[3-4]。重要的是 KET 还具有致幻作用,可以激动阿片受体,使用后可产生幻觉、视听分离感和欣快感而在全世界被“娱乐性”滥用^[5]。

由于个人滥用和医疗中作为麻醉剂的大量使用,而 KET 尚不能被人体完全代谢,KET 会以母体化合物或代谢物的形式经由下水道进入污水处理厂^[6]。目前大多数污水处理厂对 KET 去除率低于 50%^[7],水体中 KET 较难挥发、吸附、水解和生物降解,在自然水体中的自然衰减率非常低,导致在地表水中广泛检出^[8-9]。KET 在地表水和废水中的检出水平为 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1} \sim \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8,10-12],例如中国台北河流中检出浓度高达 $420 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,台北医院排放废水中浓度甚至达到了 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8]。自然水体中精神活性

物质的污染对水生生物的生态风险引起社会各界的广泛关注。重要的是, KET(951.95×10^4 、 9.5×10^5 和 $9.5 \times 10^6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)暴露青鳉胚胎和幼鱼, 导致胚胎心率降低, 孵化延迟, 心脏畸形率增加, 青鳉鱼幼鱼运动的平均速度产生类似于斑马鱼和哺乳动物的“倒U”剂量反应, 即低剂量引起多动和高剂量诱导较低的运动活力^[13]。因此, 低浓度 KET 对鱼类的影响不容忽视。

传统毒理学研究表明, 高浓度 KET 暴露水生生物会导致神经毒性^[10,13-14]、发育毒性^[13,15-17]和生殖毒性^[13,18]等。例如, KET 对成年斑马鱼的行为具有抑制和兴奋 2 种效应: $2 \times 10^6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 增强了斑马鱼成鱼脑组织的细胞凋亡, 影响与基底神经节受体结合, 进而抑制运动行为; $2 \times 10^7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 持续暴露斑马鱼成鱼后, *nrla* 基因上调, 机体通过代偿性上调 NMDA 受体表达, 过度激活 NMDA 受体通道导致斑马鱼产生兴奋效应^[14]。在 NMDA 受体表达(约 24 hpf)前, KET(2×10^8 、 4×10^8 和 $8 \times 10^8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)暴露斑马鱼胚胎 20 min 后, 可通过沉默合子基因组导致畸形发育^[15-16]。此外, KET($50 \sim 2.5 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)还可通过提高多巴胺和苯乙醇胺的含量从而增加秀丽隐杆线虫的摄食率和运动速度^[10]。这表明 KET 也可能影响多巴胺以及其他神经通路导致神经毒性。多巴胺(dopamine, DA)和 γ -氨基丁酸(GABA)都是在中枢神经表达的关键神经递质, 参与中枢神经系统的信号转导、神经发育和运动调节等过程。然而目前关于环境浓度水平 KET 对水生生物影响的神经毒性数据非常有限, 神经毒性效应的具体分子机制研究较少。为进一步阐明 KET 的毒性作用机制, 本研究将采用行为学、生化指标以及基因相对表达量分析相结合的方法, 探讨低浓度 KET 对斑马鱼幼鱼的毒性效应。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验试剂和仪器

1.1.1 实验试剂

氯胺酮盐酸盐(分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{ClNO} \cdot \text{HCl}$, CAS 号 1867-66-9, 纯度 $\geq 99.5\%$), 购自上海原思标物科技有限公司。氯胺酮盐酸盐母液溶于无菌超纯水中, 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并保存于 -20°C 冰箱备用。

RNAiso Plus、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)反转录试剂和 ChamQ Univer-

sal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量 PCR 试剂购买于南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 保存于 -20°C 冰箱。基因引物序列购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

根据 ISO 7346/3 标准配制胚胎母液($294.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $123.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $63.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$), 将母液按 1 : 4 稀释得到胚胎培养液, pH 7.8 ± 0.2 , 通气 24 h 以上, 维持水温(27 ± 1) $^\circ\text{C}$ 。

1.1.2 主要仪器

实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, QuantStudio[™] 7 Flex System, 美国), 普通 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, T100[™] Thermal Cycler, 美国), 实验室碎花冰制冰机 (松下, SIM-F140AY65-PC, 日本), 低温离心机 (贝克曼库尔特, Microfuge 20R, 美国), 体视普通生物显微镜 (奥特光学, SZ780, 中国), 光学显微镜 (尼康, Nikon Eclipse 50i, 日本), 斑马鱼行为分析系统 (View-Point Life Sciences, Zebralab, 法国), 超高效液相色谱/三重四级杆串联质谱仪 (Waters, XEVO TQ-S, 美国)。

1.2 实验动物及分组

AB 品系野生型成年斑马鱼 (*Danio rerio*) 来源于南京一树梨花生物科技有限公司。正式实验前, 成年斑马鱼在流动式循环系统中至少培养 2 个月。饲养期间, 每 7 天换一次水, 维持水温(27 ± 1) $^\circ\text{C}$, 水含氧量不低于 80%, pH 维持在 7~8, 饲养光暗周期为 14 h : 10 h (光照 : 黑暗), 每天定时投喂丰年虾。暴露试验用的胚胎收集方法参照本课题组之前的研究^[19]。按照已报道的 KET 相关环境浓度^[8,10-12], 设置暴露浓度 10、100 和 1 000 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将正常发育的胚胎分成 4 组, 包括对照组和 3 个不同浓度 KET 组, 每组含 4 个平行, 每个平行 300 颗胚胎 (即 $n=4$, 共 1 200 颗胚胎), 暴露试验在斑马鱼胚胎受精后 2 hpf (hours post-fertilization) 开始, 在 7 dpf (days post-fertilization) 时结束。

1.3 化学分析

为测定暴露溶液中 KET 的实际平均浓度, 在暴露第 5 天时对每个平行烧杯中的溶液进行化学分析。每 24 h 更换一次暴露液, 在 24 h (换水前) 和 0 h (换水后) 2 个时间点, 从每个平行烧杯中分别收集 500 mL 暴露液, 每个浓度 4 个生物平行, 计算出每个平行中 KET 分别在这 2 个时间点的实际浓度, 求出暴露周期内 KET 在每个烧杯中的平均浓度, 以表示斑马鱼幼鱼的实际暴露浓度。

1.4 一般毒性试验

每组斑马鱼胚胎分别培养于盛有 2 L 新鲜胚胎培养液的烧杯中,在 2 hpf 时开始暴露,分别在 12、24、48、60、72、84、96 hpf 和 7 dpf 记录斑马鱼胚胎白卵数、幼鱼孵化数和死亡数,统计孵化率、24 hpf 成活率和 7 dpf 死亡率。在 7 dpf 时,从每个平行中随机选取 12 条孵出的幼鱼($n=4$,共 48 条幼鱼),用 3% 甲基纤维素固定,侧面向上在体视显微镜下录像 30 s,统计心率(次 $\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.5 行为学分析

行为的连续出现与神经系统的发育紧密相连,为探究 KET 对斑马鱼神经系统发育的影响,从宏观上观察和分析斑马鱼胚胎和幼鱼的行为,主要包括自发摆尾运动、触碰反应、自由游泳运动和趋触性分析,测试时间统一在 9:00—15:00 间进行。

1.5.1 自发摆尾运动分析

在 24 hpf,从每个平行烧杯中随机选取 30 颗胚胎($n=4$,共 120 颗胚胎),放入装有相应浓度暴露液的 24 孔板的单个孔中,在体视显微镜下录像 1 min,根据录像记录 1 min 内胚胎摆尾次数,统计自发摆尾频率(次 $\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.5.2 触碰反应分析

由于在 24 hpf 斑马鱼自发摆尾运动仍在进行,且此时不具备触碰逃逸反应能力,而 27 hpf 自发摆尾运动已结束且开始游泳(表现为触碰逃逸),48 hpf 具备受控的游泳行为能力^[20-24],故选择在 27 hpf 和 48 hpf 进行触碰反应测试。在 27 hpf 和 48 hpf,分别从每个平行烧杯中随机选取 15 颗($n=4$,共 60 颗

胚胎)正常发育的胚胎到 24 孔板的单个孔中,用 0.1 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉菌蛋白酶 E 溶液在室温下摇床轻摇 30 min,以溶解卵膜,溶解后将幼鱼置于新鲜胚胎培养液中。测试时用解剖针尖轻轻触碰斑马鱼头部 10 次,每次触碰间隔 10 s,同时在体视显微镜下录像,根据录像对每次触碰后斑马鱼的行为反应进行评分。根据斑马鱼发育时间及特点的不同,在 27 hpf 和 48 hpf 分别对触碰反应进行评分。在 27 hpf,每次触碰斑马鱼头部时,表现为剧烈的游泳反应记为 1 分,游泳缓慢或异常反应记为 0.5 分,无反应记为 0 分,每条鱼在 10 次触碰结束后得分相加记为触碰得分,最大得分为 10 分^[25]。在 48 hpf,斑马鱼器官原基的形态发生基本完成,此时可表现出受控的游泳行为^[20-21],斑马鱼对触碰反应的评分标准微调后如表 1 所示^[26]。

1.5.3 游泳运动分析

在 6 dpf 晚上 8 点,从每个平行烧杯中随机选取 12 条幼鱼($n=4$,共 48 条幼鱼)到盛有相应浓度溶液的 24 孔板中,每孔一条幼鱼,过夜适应孔板环境,于 7 dpf 早上 9 点开始进行游泳运动行为测试。斑马鱼幼鱼首先在 ZebraLab 系统中适应 5 min 的黑暗环境,之后在 10 min 光照和 10 min 黑暗条件下监测自由游泳运动行为。使用斑马鱼行为分析系统收集并记录每条幼鱼每分钟的运动数据(运动距离和运动持续时间),随后使用 Excel 软件进一步分析斑马鱼幼鱼自由游泳运动行为,包括总平均运动速度、黑暗条件下运动速度和光照条件下运动速度。

表 1 触碰反应评分标准
Table 1 Touch reaction scoring criteria

行为 Behavior	分数 Score
鱼不运动 Fish do not move	1
鱼甩尾巴回应触碰但不游动 Fish flick the tail in response to touch, but do not swim	2
鱼对触碰的反应较慢,游泳距离较短 Fish slowly respond to touch, and swim a shorter distance	3
鱼对触碰的反应迅速,包括长时间游泳和迷失方向 Fish rapidly respond to touch, including prolonged and disoriented swimming	4
鱼迅速游离触碰源,横跨孔板的单孔直径长度到孔的另一端 Fish rapidly swim away from the source of the touch, and move across the length of the well	5

1.5.4 趋触性分析

在6 dpf晚上8点,从每个平行烧杯中随机选取12条幼鱼($n=4$,共48条幼鱼)到盛有相应浓度溶液的24孔板中,每孔一条鱼,过夜适应孔板环境,于7 dpf早上9点开始进行趋触性行为测试。斑马鱼幼鱼首先在 ZebraLab 系统中适应5 min 的黑暗环境,之后设置观察区域和检测程序,在10 min 光照和10 min 黑暗条件下采集20 min 的幼鱼运动视频。使用斑马鱼行为分析系统收集并记录每条幼鱼每分钟的运动数据,包括总运动距离及运动持续时间、内圈运动距离及运动持续时间,随后使用 Excel 软件进一步分析斑马鱼幼鱼在外圈中的运动数据,包括外圈中运动总时间和距离,以及黑暗/光照条件下外圈中的运动时间和距离,其中以外圈累积时间百分比为指标表征幼鱼的趋触性^[27]。

1.6 大脑细胞凋亡水平

在7 dpf时,使用浓度为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的吖啶橙溶液对斑马鱼幼鱼进行染色,分析幼鱼大脑细胞凋亡情况。从每个平行烧杯中随机选取5条幼鱼($n=4$,共20条幼鱼)放入24孔板中,每孔含有吖啶橙染液的胚胎培养液,幼鱼在孔板中避光孵育40 min 后用新鲜的胚胎培养液清洗5次。随后迅速使用正置荧光显微镜拍摄荧光图像,用 Image J 软件对幼鱼头部荧光强度进行量化分析。

1.7 幼鱼体内活性氧检测(reactive oxygen species, ROS)

在7 dpf时,使用浓度为 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针测量斑马鱼幼鱼体内 ROS 的产生情况。从每个平行烧杯中随机选取5条幼鱼($n=4$,共20条幼鱼)放入含有 DCFH-DA 溶液的24孔板中,幼鱼在孔板中避光孵育40 min 后用新鲜的胚胎培养液清洗5次。随后迅速使用正置荧光显微镜拍摄荧光图像,用 Image J 软件对幼鱼腹部荧光强度进行量化分析。

1.8 荧光定量 PCR 检测分析

在7 dpf,从每个平行烧杯中随机选取40条幼鱼($n=4$,共160条幼鱼)到1.5 mL 离心管中,加入1 mL RNA Later 保存,使用 Trizol 法提取斑马鱼幼鱼总 RNA,随后用微量核酸测定仪 Nano-200 分光光度计测定 RNA 样品的浓度及在260 nm 与280 nm 处的吸光值, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值都在1.8~2.1之间,说明 RNA 质量较好。根据 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)反转录试剂盒说明

书步骤操作进行反转录合成 cDNA,利用 qRT-PCR 方法检测差异表达基因,其反应体系和反应程序参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量 PCR 试剂盒说明书,利用荧光定量 PCR 仪检测目的基因相对表达量,目的基因包括多巴胺通路中酪氨酸羟化酶基因 *th* (tyrosine hydroxylase)、多巴脱羧酶基因 *ddc* (dopa decarboxylase)、多巴胺受体基因 *drd1a* (dopamine receptor D1a)、*drd2a* (dopamine receptor D2a)、*drd2b* (dopamine receptor D2b)、*drd3* (dopamine receptor D3)、*drd4a* (dopamine receptor D4a)); γ -氨基丁酸通路中谷氨酸脱羧酶 1a 基因 *gad1a* (glutamate decarboxylase 1a)、 γ -氨基丁酸转运蛋白 1 基因 *slc6a1b* (solute carrier family 6 member 1b)、 γ -氨基丁酸转运蛋白 2 基因 *slc6a13* (solute carrier family 6 member 13)、去甲肾上腺素转运蛋白基因 *slc6a2* (solute carrier family 6 member 2)、多巴胺转运蛋白基因 *slc6a3* (solute carrier family 6 member 3)、维持未成熟神经元中去极化的 GABA 活性的溶质载体家族 12 成员 2 蛋白基因 *slc12a2* (solute carrier family 12 member 2)、超极化 GABA 能信号传导的溶质载体家族 12 成员 5b 蛋白基因 *slc12a5b* (solute carrier family 12 member 5b)、钾内向整流通道亚家族 J 成员蛋白基因 *kcng5*、*kcng6*、*kcng9*、*kcng19b* (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 5/6/9/19b)。除了参照本课题组已有引物,新基因引物均在生工生物工程(上海)股份有限公司设计和合成。通过 Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)检测引物特异性。 β -actin、*rpl13a* 和 *efl- α* 为本文的内参基因^[19],采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算各组目的基因的相对表达量。qPCR 检测的基因名称、登录号、引物序列、扩增产物长度和扩增效率如表2所示。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 25 统计软件分析实验数据,Origin 2021 软件进行绘图,实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SEM) 表示。Kolmogorov-Smirnov 和 Levene's 检验用于对数据的正态分布和方差齐性的分析。单因素方差分析(One-way ANOVA)中的 LSD 多重比较用于分析暴露组与对照组之间的显著性差异,显著性水平表示为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 。

2 结果 (Results)

2.1 KET 实际浓度测定

KET 暴露第5天在 T_0 和 T_{24} 时间点所检测到

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Sequences of primers used for qPCR

目的基因 Target gene	登录号 Accession No.	引物序列(5' ~ 3') Primer sequences (5' ~ 3')	产物长度/bp Product length/bp	扩增效率/% Amplification efficiency/%
<i>th</i>	NM_131149.1	F: AGCGAGCAGATCGTGTTTGA R: CCTCCAAGCCATCCTTTGGT	178	97.596
<i>ddc</i>	NM_213342.1	F: CTCCAAGCCTACATCCGCAAGC R: AGCAGACGAGACCCATCACCAC	112	106.387
<i>drd1a</i>	XM_021472789.1	F: CGCCAAGATCCGCCATGATAGC R: AAAGGGCAACCAGCAGCACAC	145	90.058
<i>drd2a</i>	XM_009291617.3	F: TGCTCTCTGTGTGATTGCGA R: GCATGTGCGTTTGGTGTGA	151	106.43
<i>drd2b</i>	XM_021476029.1	F: TGTGGGGATGAAAATGGTGG R: TGGACTGATATTCGGCGTGG	134	106.322
<i>drd3</i>	XM_021470111.1	F: CCAAGGCAGTGGCAAAGTTC R: GGATCACCTGCTCCTTGCTT	140	116.003
<i>drd4a</i>	NM_001012616.3	F: CTCTGCGCCATCAGCATAGA R: GTTGGGGACGTTGTGTATGC	162	106.307
<i>slc6a1b</i>	NM_001007362.1	F: TCTTCGACTATTACTCTGCCAGC R: ATATCCGATCATCTCCTCCAGGT	125	91.665
<i>slc6a2</i>	XM_009303350.2	F: TCAATGGCACCGTCTTGGGT R: ACTATGCAGCACTCCACGCT	92	91.429
<i>slc6a3</i>	NM_131755.1	F: AGACATCTGGGAAGGTGGTG R: ACCTGAGCATCATACAGGCG	151	107.017
<i>slc6a13</i>	XM_005166019.4	F: TTGCTGGGCCTTGACAGTGA R: AAGACATACAGGCCGCCCTC	176	110.392
<i>slc12a2</i>	XM_021479152.1	F: CAGGCCACAGTGTCTGGTGA R: GCGCACATGCCCACATAACA	112	98.772
<i>slc12a5b</i>	XM_009304148.3	F: TTGAGGAGGAGATGGACACTAGT R: CACCCCAAGGATGTTTGAAGAC	200	93.153
<i>knj5</i>	XM_695527.8	F: GATGTTCAGGGTGGGCGACTTG R: TGCTGCGAGCGGATGAGTTTG	78	106.917
<i>knj6</i>	XM_005172575.4	F: ACAGACCAAGGAGGGCGAGTTC R: TGAGCGGAGACACCAGGAAGAG	98	102.131
<i>knj9</i>	XM_009298868.3	F: AATGTGCAGCACGGCAACAT R: AGAGCAGCGCCAGTTCAGAT	87	110.266
<i>knj19b</i>	XM_001340292.7	F: CGCTGTTGGGCTCCATCGTG R: CTGCGTCTGGCTGAACATGAG	105	110.874
<i>gad1a</i>	XM_002663304.5	F: TTCCTCAAACACTACGACTGGAGTG R: TGTCCCGGGTTAAAATACTCCTG	161	103.832
<i>β-actin</i> ^[19]	AF057040.1	F: TCTGGCATCACACCTTCTACAAT R: TGTTGGCTTTGGGATTTCAGG	93	97
<i>rpl13α</i> ^[19]	NM_212784.1	F: CCCTTCCCGTGGATCATATC R: TTTGCGTGTGGGTTTCAGAC	208	96
<i>efl-α</i> ^[19]	BC064291.1	F: GAGGAAATCACCAAGGAAGTCA R: AATCTTCCATCCCTTGAACCAG	147	96

的实际浓度如表 3 所示。结果显示 T_0 和 T_{24} 时刻检测的浓度和设计浓度比较接近,说明 KET 在暴露过程中整体较稳定。本文全篇使用 KET 的名义浓度。

2.2 一般毒性

将 2 hpf 的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的 KET

溶液中,统计各组胚胎在 48、60、72、78、84 和 96 hpf 的孵化率、24 hpf 成活率、7 dpf 死亡率和 7 dpf 心率。结果如图 1 所示,孵化率($F_1=1.000$, $P_1>0.05$; $F_2=1.100$, $P_2>0.05$; $F_3=2.074$, $P_3>0.05$; $F_4=4.746$, $P_4>0.05$; $F_5=2.087$, $P_5>0.05$)、成活率($F=1.699$, $P>0.05$)、

表 3 氯胺酮 (KET) 暴露斑马鱼胚胎/幼鱼实验中名义浓度和实测浓度

Table 3 Nominal and measured concentrations of ketamine (KET) in the zebrafish embryo/larvae exposure

名义浓度/(ng·L ⁻¹) Nominal concentration/(ng·L ⁻¹)	实测浓度/(ng·L ⁻¹) Measured concentration/(ng·L ⁻¹)		
	T_0	T_{24}	均值 Average
10	7.15	8.53	7.84
100	76.73	82.25	79.49
1 000	726.55	787.67	757.11

注: T_0 和 T_{24} 表示暴露时间(0 h 和 24 h),实测浓度取平均值($n=4$)。
Note: T_0 and T_{24} represent exposure time (0 h and 24 h), and measured concentrations are given as mean ($n=4$ replicates).

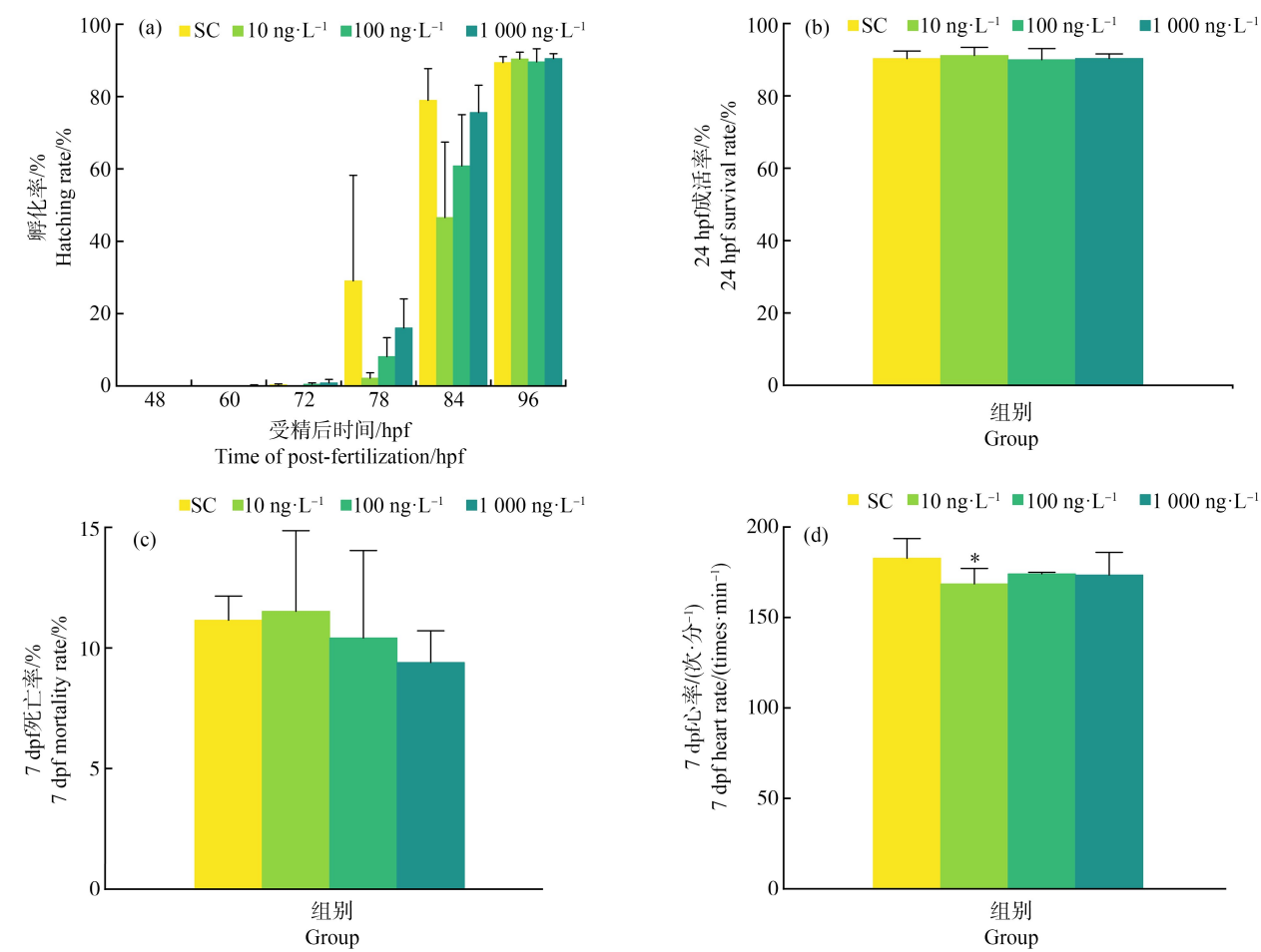


图 1 斑马鱼幼鱼孵化率 (a)、成活率 (b)、死亡率 (c) 和心率 (d)

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

Fig. 1 Hatching rate (a), survival rate (b), mortality rate (c) and heart rate (d) of zebrafish larvae
Note: Compared with control group, * $P<0.05$.

死亡率($F=2.514$, $P>0.05$)无显著的统计学差异。10 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 降低了 7 dpf 心率($F=1.416$, $P=0.034$)。

2.3 KET 对斑马鱼幼鱼行为的影响

2.3.1 KET 暴露对胚胎自发摆尾运动的影响

不同浓度 KET 暴露组胚胎在 24 hpf 后的自发摆尾运动结果如图 2 所示。与对照组相比,100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组胚胎自发摆尾次数显著增加($F=22.301$, $P<0.001$)。这表明较高浓度 KET 暴露促进斑马鱼胚胎自发摆尾运动。

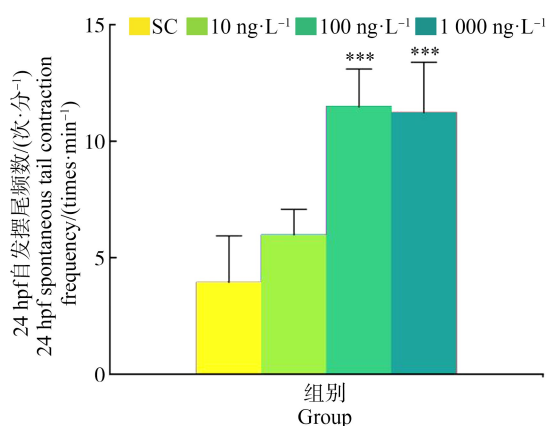


图2 斑马鱼胚胎 24 hpf 自发摆尾运动

注:与对照组比较,*** $P<0.001$ 。

Fig. 2 Spontaneous tail contraction of zebrafish embryos at 24 hpf

Note: Compared with control group, *** $P<0.001$.

2.3.2 KET 暴露对幼鱼触碰反应的影响

不同浓度 KET 暴露组幼鱼分别在 27 hpf 和 48 hpf 进行触碰反应测试,结果如图 3 所示。与对照组相比,在 27 hpf,1 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组的斑马鱼幼鱼在触碰反应中得分增加,对触碰反应更敏感($F=8.990$, $P=0.005$);而在 48 hpf,1 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组的斑马鱼幼鱼在触碰反应中得分降低,对触碰反应敏感程度降低($F=6.035$, $P=0.008$)。随着暴露时间增加,KET 暴露导致不同的触碰反应。

2.3.3 KET 暴露对幼鱼自由游泳运动的影响

不同浓度 KET 暴露组幼鱼在 7 dpf 进行光暗条件刺激下的游泳运动测试和趋触性分析,结果如图 4 所示。与对照组相比,不同浓度暴露组幼鱼游泳速度无显著的统计学差异($P>0.05$)。但是,与对照组相比,在黑暗条件下,10 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组幼鱼在外圈停留时间百分比降低($F=2.436$, $P=0.015$),同时幼鱼在外圈停留距离百分比也有降低的趋势,提示 10 $\text{ng}\cdot$

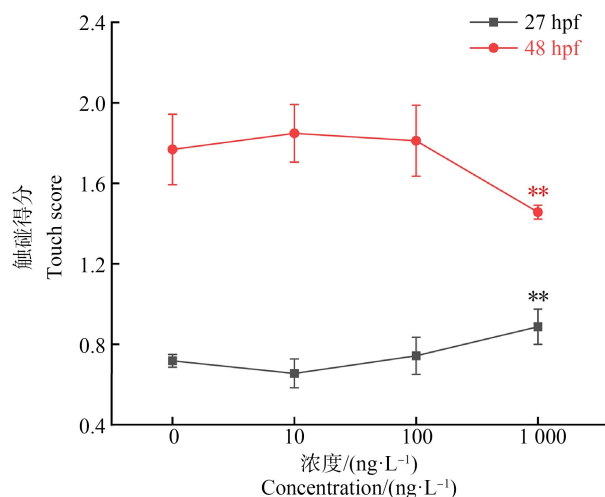


图3 斑马鱼幼鱼 27 hpf 和 48 hpf 触碰反应结果

注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

Fig. 3 Results of contact reaction at 27 hpf and 48 hpf in zebrafish larvae

Note: Compared with control group, ** $P<0.01$.

L^{-1} KET 降低幼鱼在由强光刺激状态进入黑暗状态时的焦虑程度。

2.4 KET 对斑马鱼幼鱼大脑细胞凋亡的影响

白色虚线框内为各个组别中斑马鱼大脑细胞凋亡统计范围。斑马鱼幼鱼暴露于不同浓度的 KET 后,在 7 dpf 统计大脑细胞凋亡的荧光信号强度,结果如图 5 所示。与对照组相比,KET 暴露均增加了大脑细胞凋亡水平,但是却无显著的统计学差异($P>0.05$)。

2.5 KET 对斑马鱼幼鱼体内 ROS 产生的影响

斑马鱼幼鱼暴露于不同浓度的 KET 后,在 7 dpf 统计腹部 ROS 荧光信号强度,ROS 荧光图片和 ROS 荧光信号强度统计结果如图 6 所示。与对照组相比,1 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组斑马鱼幼鱼腹部 ROS 荧光信号强度增加($F=4.039$, $P=0.045$)。该实验结果提示,KET 能够导致斑马鱼体内 ROS 水平出现异常。

2.6 斑马鱼幼鱼神经相关基因转录变化

荧光定量 PCR 结果如图 7 所示,不同浓度的 KET 暴露斑马鱼幼鱼 7 d 后,各组间多巴胺合成及其受体、 γ -氨基丁酸转运和离子通道蛋白等神经相关基因 *ddc*、*drd3*、*slc6a1b*、*kcnj5* 和 *kcnj6* 的转录水平差异具有统计学意义。与对照组相比,*ddc* 在 100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组上调($F=2.251$, $P=0.010$),*drd3* 在 10 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组下调($F=12.610$, $P_1<0.001$, $P_2=0.032$),*slc6a1b* 在 1 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组上

调($F=8.328$, $P=0.013$), *kcnj5* 在 $1\ 000\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组上调($F=1.281$, $P=0.039$), *kcnj6* 在 $100\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ KET 组上调($F=5.445$, $P=0.041$)。该实验结果提示,

KET 能够影响斑马鱼多巴胺合成及其受体、 γ -氨基丁酸转运蛋白及离子通道蛋白等神经相关基因从而导致神经毒性。

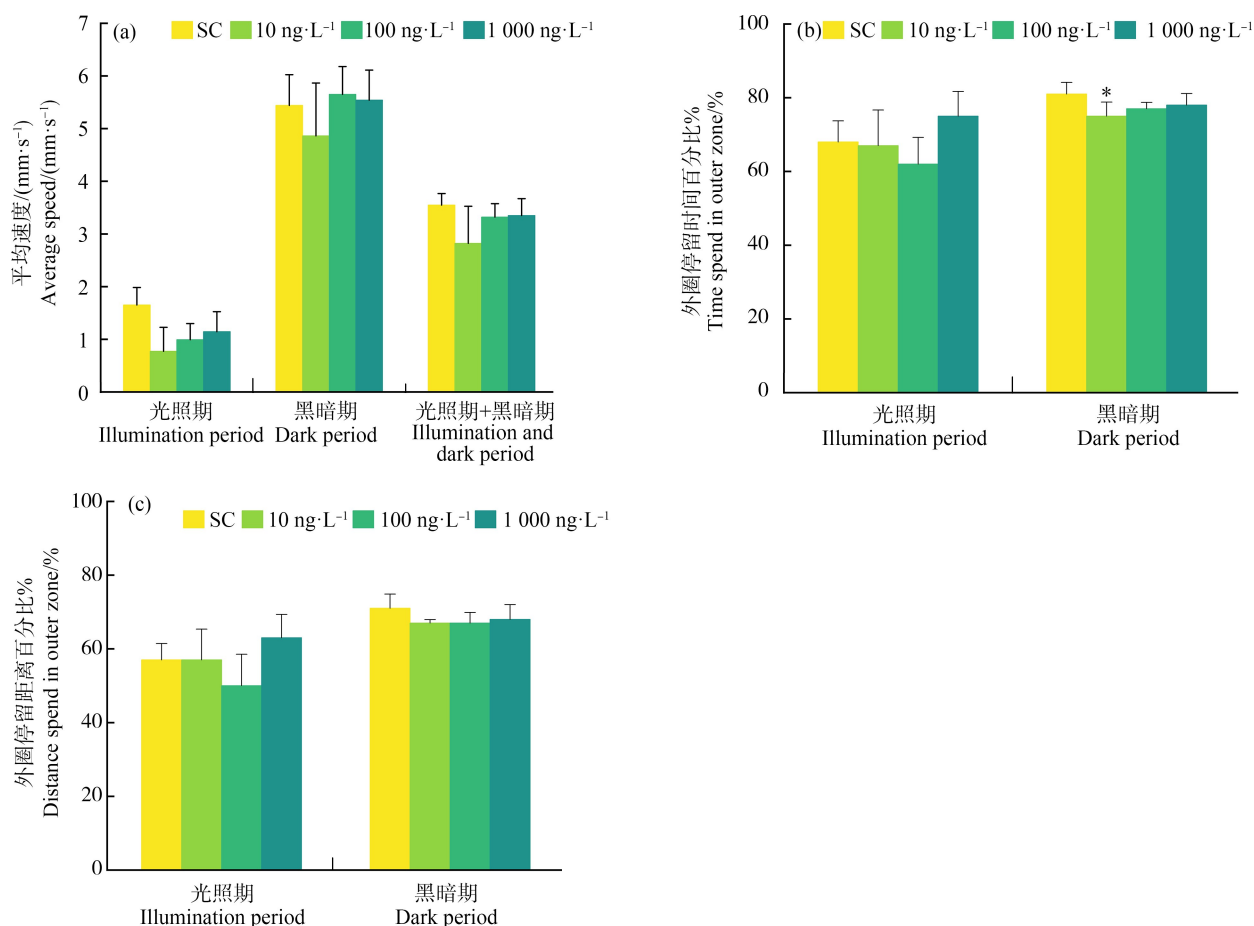


图 4 光暗条件刺激下斑马鱼幼鱼游泳速度变化 (a) 和趋触性分析 (b) 和 (c)

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

Fig. 4 Changes of swimming speed (a) and thigmotactic analysis (b), (c) of zebrafish larvae under light and dark conditions

Note: Compared with control group, * $P<0.05$.

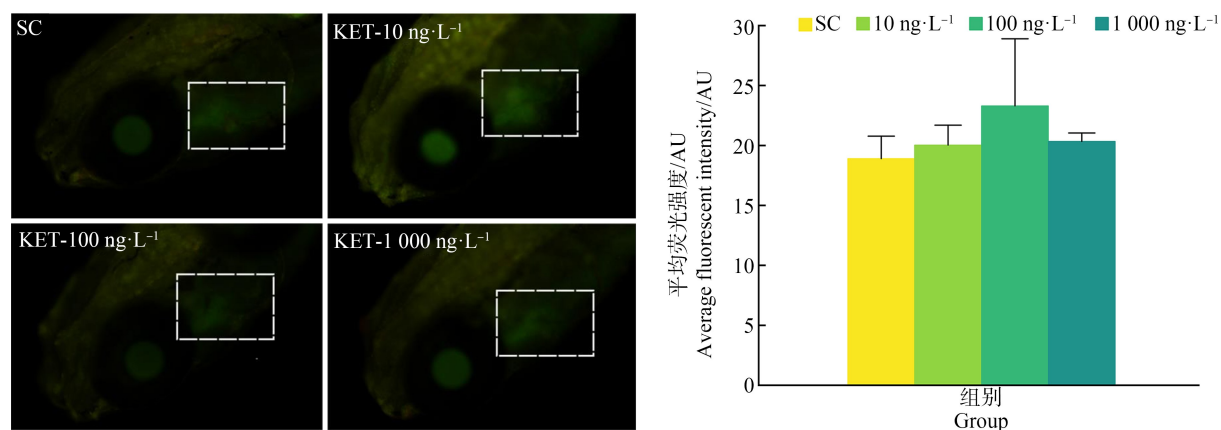


图 5 KET 对斑马鱼幼鱼大脑细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of KET on apoptosis of brain cells in zebrafish larvae

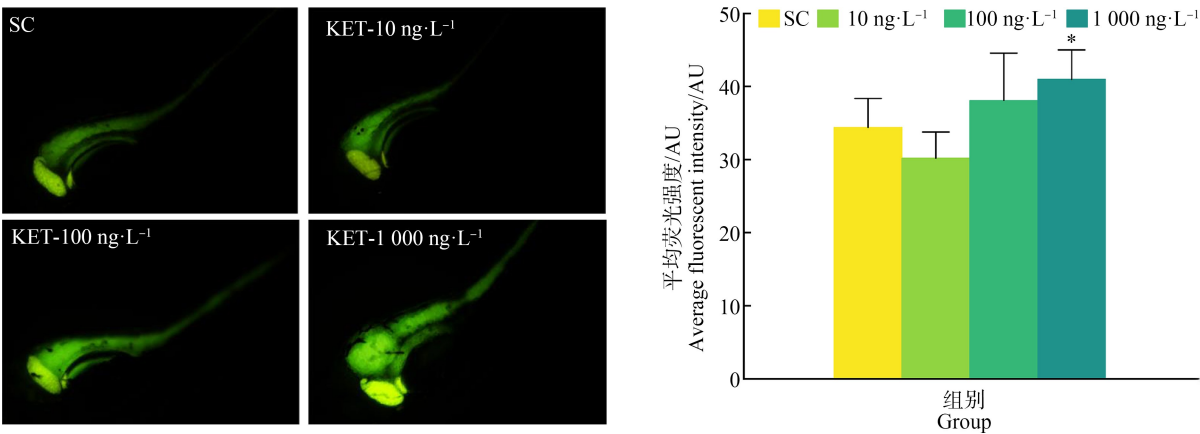


图 6 KET 对斑马鱼幼鱼腹部 ROS 的影响

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

Fig. 6 Effect of KET on ROS in zebrafish larvae abdomen

Note: Compared with control group, * $P<0.05$.

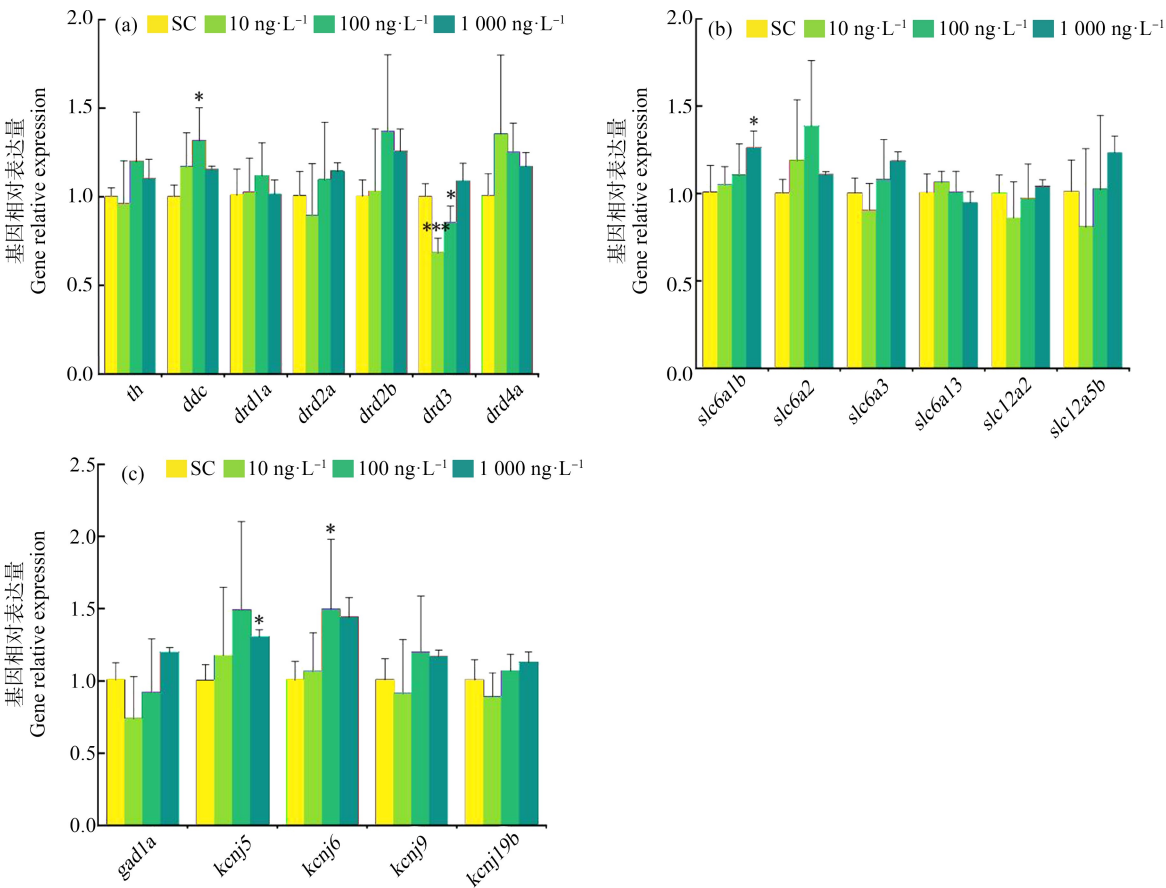


图 7 斑马鱼幼鱼体内神经相关基因表达情况

注:与对照组比较, * $P<0.05$ 、*** $P<0.001$ 。

Fig. 7 Expression of nerve related genes in zebrafish larvae

Note: Compared with control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

3 讨论 (Discussion)

本研究利用行为学、生化指标以及基因相对表

达量分析相结合的方法,在 KET 暴露斑马鱼 7 d 的试验中,检测了斑马鱼胚胎和幼鱼一般毒性终点(孵

化率、成活率、死亡率和心率)、胚胎和幼鱼行为、活性氧水平、神经递质合成、受体、转运和离子通道等神经相关基因转录水平的差异,结果发现 KET 可显著影响斑马鱼幼鱼行为和神经相关基因的转录水平,具有潜在的神经毒性。

心脏是斑马鱼胚胎发育过程中最先发育和发挥功能的重要器官^[28],心率作为一项常用的鱼类胚胎毒性测试的亚致死指标,用来评估鱼体的生长发育情况。斑马鱼的心脏跳动起始于 22 hpf,在受精 72 h 后,幼鱼心脏可以完成一系列复杂的代谢过程,心率反映了心脏的功能^[29],发育中的心脏是发育毒性的敏感靶点^[30]。本研究中,在 7 dpf 时测得 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 组的斑马鱼幼鱼心率降低提示低浓度 KET 可能引起早期发育期间斑马鱼幼鱼的心率降低。在其他研究中也观察到类似的现象。例如, Liao 等^[31]的研究表明 KET(951 、 9.5×10^4 、 9.5×10^5 和 $9.5 \times 10^6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)暴露青鳉鱼胚胎 7 d 后均显著降低胚胎心率。Kanungo 等^[31]的研究表明,用 $1.1875 \times 10^9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 暴露 26 hpf 斑马鱼胚胎 2 h 后显著降低其心率,在 52 hpf 斑马鱼胚胎中, $2.375 \times 10^8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 暴露 2 h、 $1.1785 \times 10^8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 暴露 20 h 后显著降低胚胎心率。在对包括人类的哺乳动物的研究中,也有关于 KET 降低心率的报道^[32-33]。

行为学分析作为一种可视化、可操作性强的方法,能从早期宏观层面上判断外源化学物质造成的神经功能性障碍。本研究基于斑马鱼胚胎发育过程中,不同发育节点对外界刺激的行为反应,如自发摆尾运动、触碰逃逸反应、游泳行为和趋触性。这有利于充分评估 KET 对斑马鱼不同生长发育阶段的行为影响。自发摆尾运动(spontaneous tail contraction, STC)是常用的监测指标之一。STC 的发生伴随着斑马鱼胚胎最初的简单神经网络的发育,在 17 hpf 胚胎出现第一次自发摆尾运动,该运动受到脊髓运动神经元的支配^[34-35],在 27 hpf 时已结束^[22]。大多数情况下,STC 以 24 hpf 为终点进行测试分析^[36]。本研究发现 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 均显著增加斑马鱼胚胎 STC 的频率,可能是通过影响斑马鱼幼鱼脊髓运动神经元的发育,从而导致 STC 的改变,后续将进一步研究。

Saint-Amant 和 Drapeau^[22]研究发现从 21 hpf 开始,触碰胚胎/幼鱼的头部或尾部会产生强有力的尾部向头部线圈式全卷曲的运动,在 48 hpf 之前达到最大收缩速度。在 27 hpf,胚胎开始对外界刺激做

出反应,可以进行较小规模的起搏式游泳行为(表现为逃脱反应),这种逃脱反应利于幼鱼逃避天敌^[24]。本研究发现 $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 组斑马鱼的触碰反应得分在 27 hpf 增加,却在 48 hpf 减少,说明 KET 分别在 27 hpf 时升高、在 48 hpf 时降低斑马鱼对触碰的敏感程度,而幼鱼对触碰敏感程度的降低不利于斑马鱼躲避天敌。同一浓度下在 27 hpf 和 48 hpf 测得斑马鱼对触碰反应的敏感程度不同,可能是由于 KET 对斑马鱼暴露时间长短不同而造成对神经发育的影响不同导致的。例如,本研究中 24 hpf 斑马鱼自发摆尾运动频率显著增加,这与 27 hpf 斑马鱼触碰反应得分提高吻合,而 48 hpf 后呈麻醉效应,减缓了对外界刺激的反应。

120 hpf 后斑马鱼仔鱼逐渐形成较为完善的常规游泳行为等行为,之后几天斑马鱼仔鱼会整合各种感觉系统(如视觉、触觉和味觉等)进行复杂行为(如焦虑行为、运动行为等)^[37]。在 7 dpf 检测幼鱼在明暗条件下的游泳行为,发现幼鱼在明暗转换条件下的运动活性发生改变,具体表现为在光照条件下运动减少(游泳速度减小)、黑暗条件下运动活跃(运动速度增大),这与其他精神活性物质(如地西洋)对斑马鱼胚胎行为的影响效果一致^[38-39]。通常情况下,斑马鱼仔鱼具有趋光性,表现为更喜欢光照环境^[40]。斑马鱼仔鱼运动呈现出贴壁效应,这是趋触性行为表现,有利于斑马鱼在自然环境中躲避天敌^[41-42],同时也能反映斑马鱼焦虑情绪。斑马鱼在孔板中心区域停留时间越长表明其越不焦虑,在孔板边缘区域停留时间越长表明越焦虑。本试验统计斑马鱼幼鱼光照和黑暗期间在外圈运动时间占运动总时间的百分比,结果表明,在黑暗期间, $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 组幼鱼在外圈停留时间百分比降低,其他浓度 KET 组($100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1000 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)幼鱼在外圈停留时间百分比也有降低的趋势,整体在外圈停留时间百分比均低于对照组水平,而光照期间无显著性差异。提示 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ KET 可能降低幼鱼在由强光刺激状态进入黑暗状态时的焦虑程度。

通过以上研究表明, KET 可以显著影响斑马鱼胚胎重要发育节点的行为。行为变化往往与神经系统变化有密切的联系。为了探究其潜在的分子机制,本研究进一步分析了 KET 对大脑凋亡水平和基因表达的影响。ROS 主要是通过分子氧的不完全还原产生于各种器官和组织的细胞线粒体中,在外界刺激和损伤的情况下,ROS 水平会急剧增加^[43],

当体内 ROS 的产生和清除这一动态平衡状态被破坏时,就会导致氧化应激^[44]。研究表明,KET 在暴露青鳉鱼胚胎 7 d 和 14 d 后,呈剂量依赖性特征增加其体内 ROS 水平。KET 还有其他麻醉剂如异氟醚通过 ROS 介导的线粒体途径诱导神经元凋亡,引发神经毒性^[45-47]。就本试验研究结果来看,与对照组相比,1 000 ng·L⁻¹ KET 组斑马鱼幼鱼腹部 ROS 荧光信号强度增加,表明 KET 增加了斑马鱼幼鱼腹部 ROS 的产生,可能引发神经毒性。

行为的连续出现与神经系统的发育紧密联系,神经元的树突棘除了是树突接收信号的重要部位外,还有多种受体和离子通道。突触传递作为中枢神经系统内神经元间的信息传递方式,通过突触前膜释放神经递质作用于突触后膜,神经递质的合成、贮存、释放、与受体结合和失活等过程中任一环节受到外源有毒物质的影响,都有可能导致神经系统功能异常,产生神经毒性^[48]。

DA 是一种单胺类神经递质,是以酪氨酸为起始原料,先由酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)催化生成左旋多巴(即 L-3,4-二羟基苯丙氨酸, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA),再通过多巴脱羧酶(dopa decarboxylase, DDC)催化而成。DA 是一种关键的神经递质,在运动控制、认知、动力、多巴胺神经元和多巴胺能回路的发育上起着重要作用^[49]。DRD3 受体具有大脑边缘区特异性分布的特点,与情绪密切相关^[50-51],同时在运动和社会行为中起作用^[52]。Steiner 等^[53]的研究表明 DRD3 受体缺乏减少了小鼠焦虑样行为。在某些药物干预等条件下,DRD3 受体可能参与了与情绪相关的行为变化,抗抑郁药物在 DRD3 受体敲除型小鼠中诱导了更好的行为表现^[54]。提示 KET 可能通过下调 *drd3* 来降低斑马鱼幼鱼在由强光刺激状态进入黑暗状态时的焦虑程度。

GABA 是一种存在于中枢神经系统的抑制性神经递质,GABA 在突触后作用于离子型 GABA_A/GABA_C 和代谢型 GABA_B 受体,以诱导神经元抑制,其突触传递的终止是通过位于突触前末端质膜和神经胶质细胞上的 GABA 转运蛋白(GAT)的再摄取来实现的^[55-57]。*slc6a1b* 基因编码 GABA 转运蛋白 GAT1。研究表明,转基因 GAT1 过表达小鼠模型(TG1 小鼠)中,GAT1 过度表达,TG1 小鼠大脑中的 GABA 摄取增加^[58],同时过表达 GAT1 导致小鼠疼痛敏感性升高^[59]。本研究中 KET 暴露使 GABA 转

运体基因 *slc6a1b* 上调,可能使 GABA 转运蛋白 GAT1 表达增加,从而增加 GABA 再摄取,使得斑马鱼对触碰反应更加敏感。

此外,*kcnj5* 和 *kcnj6* 基因是钾内向整流通道亚家族 J 成员 5 和 6,编码形成由 G 蛋白调节的向内整流型钾通道的整合膜蛋白亚基,其中,由 *kcnj5* 和 *kcnj6* 编码的蛋白亚基在心脏表达^[60]。心房特异性 K⁺ 电流对于心房动作电位的形成至关重要,当由 *kcnj5* 编码的蛋白亚基组成的 KACH 型通道被激活时会导致心房收缩和心室传导减少^[61]。本研究发现斑马鱼幼鱼心率降低,*kcnj5*、*kcnj6* 基因上调,可能是由于 KET 上调钾内向整流通道蛋白的表达,激活了钾内向整流通道,从而降低斑马鱼幼鱼心率。

综上所述,氯胺酮对早期发育期间的斑马鱼具有潜在的神经毒性。氯胺酮可能通过上调钾内向整流通道蛋白基因而上调钾内向整流通道蛋白的表达,激活钾内向整流通道,从而降低斑马鱼幼鱼心率。另一方面,氯胺酮可能通过影响斑马鱼幼鱼的脊髓运动神经元的发育来提高自发摆尾运动频率,通过下调 *drd3* 来降低斑马鱼幼鱼在由强光刺激状态进入黑暗状态时的焦虑程度,通过上调 *slc6a1b* 来增加 GAT1 的表达使得斑马鱼对触碰反应更加敏感,导致神经毒性。

通信作者简介:史文俊(1987—),男,博士,副教授,主要研究方向为生态毒理学。

共同通信作者简介:刘芳(1981—),女,硕士,主要研究方向为生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2022 [R]. New York: United Nations Publications, 2022
- [2] Jansen K L R. A review of the nonmedical use of ketamine: Use, users and consequences [J]. Journal of Psychoactive Drugs, 2000, 32(4): 419-433
- [3] Curran H V, Morgan C. Cognitive, dissociative and psychotogenic effects of ketamine in recreational users on the night of drug use and 3 days later [J]. Addiction, 2000, 95(4): 575-590
- [4] 郑涵予,王雪. 氯胺酮神经精神毒性的研究进展[J]. 中国药物依赖性杂志, 2010, 19(6): 450-453
- [5] Bobo W V, Miller S C. Ketamine as a preferred substance of abuse [J]. American Journal on Addictions, 2002, 11

- (4): 332-334
- [6] Wang K C, Shih T S, Cheng S G. Use of SPE and LC/TIS/MS/MS for rapid detection and quantitation of ketamine and its metabolite, norketamine, in urine [J]. Forensic Science International, 2005, 147(1): 81-88
- [7] Du P, Li K Y, Li J, et al. Methamphetamine and ketamine use in major Chinese cities, a nationwide reconnaissance through sewage-based epidemiology [J]. Water Research, 2015, 84: 76-84
- [8] Lin A Y C, Lee W N, Wang X H. Ketamine and the metabolite norketamine: Persistence and phototransformation toxicity in hospital wastewater and surface water [J]. Water Research, 2014, 53: 351-360
- [9] Wang Z L, Han S, Cai M, et al. Environmental behavior of methamphetamine and ketamine in aquatic ecosystem: Degradation, bioaccumulation, distribution, and associated shift in toxicity and bacterial community [J]. Water Research, 2020, 174: 115585
- [10] Wang Z L, Xu Z Q, Li X Q. Impacts of methamphetamine and ketamine on *C. elegans*'s physiological functions at environmentally relevant concentrations and eco-risk assessment in surface waters [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 363: 268-276
- [11] Baker D R, Kasprzyk-Hordern B. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218 (12): 1620-1631
- [12] Vazquez-Roig P, Andreu V, Blasco C, et al. Spatial distribution of illicit drugs in surface waters of the natural park of Pego-Oliva Marsh (Valencia, Spain) [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2012, 19(4): 971-982
- [13] Liao P H, Hwang C C, Chen T H, et al. Developmental exposures to waterborne abused drugs alter physiological function and larval locomotion in early life stages of medaka fish [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 165: 84-92
- [14] Riehl R, Kyzar E, Allain A, et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2011, 33(6): 658-667
- [15] Félix L M, Antunes L M, Coimbra A M. Ketamine NMDA receptor-independent toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2014, 41: 27-34
- [16] Schier A F. The maternal-zygotic transition: Death and birth of RNAs [J]. Science, 2007, 316(5823): 406-407
- [17] Guo R, Liu G J, Du M, et al. Early ketamine exposure results in cardiac enlargement and heart dysfunction in *Xenopus* embryos [J]. BMC Anesthesiology, 2015, 16(1): 23
- [18] Li S W, Wang Y H, Lin A Y C. Ecotoxicological effect of ketamine: Evidence of acute, chronic and photolysis toxicity to *Daphnia magna* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 143: 173-179
- [19] Shi W J, Ying G G, Huang G Y, et al. Transcriptional and biochemical alterations in zebrafish eleuthero-embryos (*Danio rerio*) after exposure to synthetic progestogen dydrogesterone [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 99(1): 39-45
- [20] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. Developmental Dynamics, 1995, 203(3): 253-310
- [21] Sztal T E, Ruparel A A, Williams C, et al. Using touch-evoked response and locomotion assays to assess muscle performance and function in zebrafish [J]. Journal of Visualized Experiments, 2016, 116: 54431
- [22] Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo [J]. Journal of Neurobiology, 1998, 37(4): 622-632
- [23] Grunwald D J, Kimmel C B, Westerfield M, et al. A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish [J]. Developmental Biology, 1988, 126(1): 115-128
- [24] 邹苏琪, 殷梧, 杨昱鹏, 等. 斑马鱼行为学实验在神经科学中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(1): 5-12
- Zou S Q, Yin W, Yang Y P, et al. The ethology application of zebrafish in neuroscience [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(1): 5-12 (in Chinese)
- [25] Carmean V, Yonkers M A, Tellez M B, et al. Pigk mutation underlies macho behavior and affects Rohon-Beard cell excitability [J]. Journal of Neurophysiology, 2015, 114(2): 1146-1157
- [26] Stanley K A, Curtis L R, Simonich S L, et al. Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development [J]. Aquatic Toxicology, 2009, 95(4): 355-361
- [27] Schnörr S J, Steenbergen P J, Richardson M K, et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish [J]. Behavioural Brain Research, 2012, 228(2): 367-374
- [28] Hill A J, Teraoka H, Heideman W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(1): 6-19
- [29] Li J J, Zhang Y, Liu K C, et al. Xiaoaiping induces developmental toxicity in zebrafish embryos through activation

- of ER stress, apoptosis and the Wnt pathway [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1250
- [30] Kopf P G, Walker M K. Overview of developmental heart defects by dioxins, PCBs, and pesticides [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2009, 27(4): 276-285
- [31] Kanungo J, Cuevas E, Ali S F, et al. L-Carnitine rescues ketamine-induced attenuated heart rate and MAPK (ERK) activity in zebrafish embryos [J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 33(2): 205-212
- [32] Hotchkiss C E, Wang C, Slikker W Jr. Effect of prolonged ketamine exposure on cardiovascular physiology in pregnant and infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2007, 46(6): 21-28
- [33] 李岳振, 王文军, 王航, 等. 小剂量氯胺酮麻醉对感染性休克患者 C-反应蛋白的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(11): 2519-2521
Li Y Z, Wang W J, Wang H, et al. Impact of low dose of ketamine anesthesia on C-reactive protein of septic shock patients [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2016, 26(11): 2519-2521 (in Chinese)
- [34] Drapeau P, Saint-Amant L, Buss R R, et al. Development of the locomotor network in zebrafish [J]. *Progress in Neurobiology*, 2002, 68(2): 85-111
- [35] Saint-Amant L. Development of motor networks in zebrafish embryos [J]. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 173-190
- [36] Richendrfer H, Creton R, Colwill R M. *Zebrafish* [M]. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2014: 245-264
- [37] Borla M A, Palecek B, Budick S, et al. Prey capture by larval zebrafish: Evidence for fine axial motor control [J]. *Brain, Behavior and Evolution*, 2002, 60(4): 207-229
- [38] Leuthold D, Klüver N, Altenburger R, et al. Can environmentally relevant neuroactive chemicals specifically be detected with the locomotor response test in zebrafish embryos? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(1): 482-493
- [39] 吴敏. 地西洋药物污染对斑马鱼神经行为毒性及机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021: 19-20
Wu M. Neurobehavioral toxicity and related mechanisms of diazepam to zebrafish (*Danio rerio*) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021: 19-20 (in Chinese)
- [40] Lau B Y, Mathur P, Gould G G, et al. Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(6): 2581-2586
- [41] Sackerman J, Donegan J J, Cunningham C S, et al. Zebrafish behavior in novel environments: Effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line [J]. *International Journal of Comparative Psychology*, 2010, 23(1): 43-61
- [42] Miller N, Gerlai R. From schooling to shoaling: Patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48865
- [43] Childs E W, Udobi K F, Wood J G, et al. *In vivo* visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock [J]. *Shock*, 2002, 18(5): 423-427
- [44] Wang L, Ryu B, Kim W S, et al. Protective effect of gallic acid derivatives from the freshwater green alga *Spirogyra* sp. against ultraviolet B-induced apoptosis through reactive oxygen species clearance in human keratinocytes and zebrafish [J]. *Algae*, 2017, 32: 379-388
- [45] Bai X W, Yan Y S, Canfield S, et al. Ketamine enhances human neural stem cell proliferation and induces neuronal apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway [J]. *Anesthesia and Analgesia*, 2013, 116(4): 869-880
- [46] Zhang Y Y, Dong Y L, Wu X, et al. The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(6): 4025-4037
- [47] Wang C, Zhang X, Liu F, et al. Anesthetic-induced oxidative stress and potential protection [J]. *The Scientific World Journal*, 2010, 10: 1473-1482
- [48] Jones D C, Miller G W. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2008, 76(5): 569-581
- [49] Iversen S D, Iversen L L. Dopamine: 50 years in perspective [J]. *Trends in Neurosciences*, 2007, 30(5): 188-193
- [50] Beaulieu J M, Gainetdinov R R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors [J]. *Pharmacological Reviews*, 2011, 63(1): 182-217
- [51] Xu M, Koeltzow T E, Santiago G T, et al. Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors [J]. *Neuron*, 1997, 19(4): 837-848
- [52] Liang X F, Zhao Y Q, Liu W, et al. Butylated hydroxytoluene induces hyperactivity and alters dopamine-related gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 257: 113624
- [53] Steiner H, Fuchs S, Accili D. D3 dopamine receptor-deficient mouse: Evidence for reduced anxiety [J]. *Physiology & Behavior*, 1997, 63(1): 137-141

- [54] Leggio G M, Micale V, Drago F. Increased sensitivity to antidepressants of D3 dopamine receptor-deficient mice in the forced swim test (FST) [J]. *European Neuropsychopharmacology*, 2008, 18(4): 271-277
- [55] Borden L A. GABA transporter heterogeneity: Pharmacology and cellular localization [J]. *Neurochemistry International*, 1996, 29(4): 335-356
- [56] Morara S, Brecha N C, Marcotti W, et al. Neuronal and glial localization of the GABA transporter GAT-1 in the cerebellar cortex [J]. *Neuroreport*, 1996, 7(18): 2993-2996
- [57] Gadea A, López-Colomé A M. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I . Glutamate transporters [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2001, 63(6): 453-460
- [58] Ma Y H, Zhou X G, Duan S H, et al. Overexpression of gamma-aminobutyric acid transporter subtype I leads to cognitive deterioration in transgenic mice [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2001, 22(4): 340-348
- [59] Hu J H, Yang N, Ma Y H, et al. Hyperalgesic effects of gamma-aminobutyric acid transporter I in mice [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2003, 73(4): 565-572
- [60] Isomoto S, Kondo C, Takahashi N, et al. A novel ubiquitously distributed isoform of GIRK2 (GIRK2B) enhances GIRK1 expression of the G-protein-gated K⁺ current in *Xenopus* oocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 218(1): 286-291
- [61] Dhein S, van Koppen C J, Brodde O E. Muscarinic receptors in the mammalian heart [J]. *Pharmacological Research*, 2001, 44(3): 161-182 ◆