

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

苯甲酸鈉改善 K 他命誘發之行為異常

Sodium benzoate ameliorates ketamine-induced  
behavioral disturbances

研究生：劉奕賢 撰

指導教授：陳慧誠 博士

詹銘煥 博士

中華民國 107 年 7 月 27 日

DOI:10.6814/THE.NCCU.IN.004.2018.C05

## 摘要

K 他命 (Ketamine) 是一種合成的解離型麻醉劑，具有快速啟動抗憂鬱效果的作用。近年來，它成為了一種常見的濫用藥物。長期使用 K 他命會造成突觸功能損傷與行為異常，如：社交互動缺陷、認知功能障礙以及憂鬱症傾向的情形發生，亦會降低突觸相關蛋白的表現量。越來越多的研究發現，藉由增強 NMDA 受體的功能可以改善 K 他命誘導的行為異常與神經化學變化。苯甲酸鈉 (sodium benzoate) 是一種右旋胺基酸氧化酵素酶抑制劑，透過增加 D-serine 間接增強 NMDA 受體功能，臨床研究顯示對思覺失調症或憂鬱症患者皆有良好的治療效果。本研究的目標在於檢測 sodium benzoate 是否可以保護或改善小鼠急性或重複暴露 K 他命情況下所導致的行為與突觸蛋白異常。結果發現，sodium benzoate 在強迫游泳試驗中具有抗憂鬱效果，然而與 K 他命並不會產生加成的作用。Sodium benzoate 增強了 K 他命在失去翻正反射試驗中的麻醉反應，但減弱了 K 他命誘導在社交互動行為與新物體辨識能力測試中的擬精神病行為。同時重複給予 sodium benzoate 與 K 他命 14 天顯著地減弱 K 他命誘導的持續性行為異常，包括社交退縮、認知障礙、類憂鬱症行為與 5-HT<sub>2A</sub> 受體介導頭部抽蓄反應的敏感性。此外，透過後給予 sodium benzoate 方式也能改善重複暴露 K 他命後的異常行為表現及海馬迴中突觸蛋白表現異常的影響。這些結果推測 sodium benzoate 可能有助於減緩使用 K 他命所造成的負面行為影響。

關鍵字: K 他命、苯甲酸鈉、抗憂鬱效果、擬精神病行為、麻醉反應

# Abstract

Ketamine is a synthetic dissociative anesthetic and has rapid onset antidepressant effect. It has become a common abused substance, recently. Heavy ketamine use often results in synaptic dysfunction and behavioral disturbances including depression, social deficits, cognitive impairments and decrease synapse-associated protein expression. Growing evidence shows that enhancement of NMDA receptor function can ameliorate the effects of ketamine-induced behavioral and neurochemical responses. Sodium benzoate, an inhibitor of D-amino acid oxidase, can indirectly increase the NMDA receptor function through increasing the levels of D-serine and is also beneficial to the patients with depression or schizophrenia in the clinical study. The present study examined whether sodium benzoate could protect or reverse the behavioral dysfunction and synaptic dysfunction in mice exposed to ketamine acutely or repeatedly. Our results showed that sodium benzoate has antidepressant-like responses in the forced swimming test, whereas it did not produce additive effect with ketamine. Sodium benzoate enhanced the anesthetic responses of ketamine in the loss of righting reflex test, but attenuated the ketamine-induced psychotomimetic behaviors in the social interaction test and novel object recognition test. Repeated cotreatment of sodium benzoate and ketamine for 14 days significantly attenuated ketamine-induced persistent behavioral abnormalities including social withdrawal, recognition impairment, depression-like behaviors and hypersensitiveness of 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated head twitch response. Moreover, the behavioral manifestation and lower level of synaptic protein

PSD-95 after repeated ketamine exposure could be ameliorated by post-treatment of sodium benzoate. These findings suggest that sodium benzoate might have potential to reduce negative behavioral consequences of heavy ketamine use.

Key words: Ketamine, sodium benzoate, antidepressant-like responses, psychotomimetic behaviors, anesthetic responses



## 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	IV
圖表目錄.....	V
縮寫對照表.....	VII
壹、 背景介紹.....	1
一、 K 他命 (Ketamine).....	1
二、 K 他命吸收與代謝.....	1
三、 K 他命作用機制.....	2
四、 K 他命的抗憂鬱效果.....	4
五、 急性 K 他命造成類精神病症狀.....	5
六、 K 他命的麻醉效果.....	6
七、 慢性 K 他命造成類精神病症狀.....	6
八、 苯甲酸鈉.....	8
貳、 研究動機與目的.....	10
參、 實驗設計.....	11
肆、 實驗材料與方法.....	12
伍、 實驗數據分析.....	22
陸、 實驗結果.....	23
柒、 討論.....	33
捌、 結論.....	40
玖、 參考文獻.....	41
壹拾、 圖表.....	55

## 圖表目錄

Figure 1. Effects of sodium benzoate and ketamine on the immobility in forced swimming test. ....	55
Figure 2. Effects of sodium benzoate on acute ketamine-induced social deficits in the social interaction test.....	56
Figure 3. Effects of sodium benzoate on acute ketamine-induced recognition memory impairment in the novel object recognition task. ....	57
Figure 4. Effects of sodium benzoate on the onset (A) and duration (B) of ketamine-induced loss of righting reflex.....	58
Figure 5. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on social deficits in the social interaction test. ....	59
Figure 6. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on recognition memory impairment in the novel object recognition task. ....	60
Figure 7. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on impairment of sociability (A) and social novelty (B) in the three-chamber social test.....	61
Figure 8. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on depression-like behavior in the tail suspension test.....	62
Figure 9. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on depression-like behavior in the forced swimming test. ....	63
Figure 10. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on DOI-induced head twitch response.....	64
Figure 11. Effects of subchronic ketamine-induced recognition memory impairment in the novel object recognition task. ....	65
Figure 12. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced social deficits in the social interaction test. .	66
Figure 13. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced recognition memory impairment in the novel object recognition task. ....	67
Figure 14. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced impairment of sociability (A) and social novelty (B) in the three-chamber social test.....	68
Figure 15. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced depression-like behavior in the tail suspension test.....	69
Figure 16. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on	

subchronic ketamine-induced depression-like behavior in the forced swimming test. ....70

Figure 17. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14days on DOI-induced head twitch response in subchronic ketamine-exposed mouse. ....71

Figure 18. Effects of subchronic administration of ketamine followed by sodium benzoate treatment for 14 days on the levels of PSD-95 in the hippocampus.....72

Figure 19. Effects of subchronic administration of ketamine followed by sodium benzoate treatment for 14 days on the levels of SYN1 in the hippocampus.....73



## 縮寫對照表

NMDA	N-methyl-D-aspartate
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BBB	Blood brain barrier
CNS	Central nervous system
5-HT	Serotonin
nACh	Nicotinic acetylcholine
mTOR	Mammalian target of rapamycin
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3
eEF2K	Eukaryotic elongation factor 2 kinase
PKA	Protein kinase A
CREB	cAMP response element binding
iNOS	Inducible NO synthase
ROS	Reactive oxygen species
LTP	Long-term potentiation
LTD	Long-term depression
PSD95	Postsynaptic density 95
SYN1	Synapsin 1
DOI	1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane
BPRS	Brief psychiatric rating scale
PANSS	Positive and negative syndrome scale
CES-D	Center of epidemiological studies depression scale



# 壹、背景介紹

## 一、K 他命 (Ketamine)

K 他命於 1962 年由 Clavin Stevens 合成發現，常溫常壓下的常見型態有白色結晶粉末、無色無味液體或錠劑。K 他命早期被拿來運用在麻醉、鎮靜、止痛的治療上(Sinner and Graf, 2008)，但因後續常有副作用產生，包括妄想、恍惚狀態及短暫記憶喪失(Green et al., 2011)，所以逐漸被其他更安全地藥物取代。近年來，K 他命也被拿來當作一種抗憂鬱劑使用(Berman et al., 2000; Ibrahim et al., 2011)。1970 年中期，K 他命開始普遍遭濫用，許多國家紛紛建立休閒藥物法規來管制。國內近幾年的藥物濫用情形逐年上升，其中 K 他命為最常見的濫用藥物之一，常見俗名有 K 仔、K 粉或褲子，施用途徑包括口服、鼻吸、煙吸及注射等方式，使用後會產生幻覺及欣快感，因此常在夜店、舞廳等場所發現它的存在，使用 K 他命除了會造成短暫記憶喪失及成癮之外，也會造成腦部及膀胱的永久性傷害。現今已被政府列為第三級毒品加以管制。

## 二、K 他命吸收與代謝

K 他命可經由呼吸道、腸胃道或注射方式進入體內，由於 K 他命具有高度脂溶性，所以容易穿透血腦障壁 (Blood-Brain-Barrier, BBB) 進入中樞神經系統 (central nervous system, CNS)。其中靜脈注射 K 他命，約需 30 秒即可產生效用(Green and Johnson, 1990)，注射後可分為兩個階段，第一階段是麻醉效果，半衰期約 10-16 分鐘；第二階段是重新分配由 CNS 到周邊組織，排除半衰期約 2-3 小時(Kohrs and Durieux, 1998)。K 他命在血漿濃度的不同會有不同效應：(1)鎮痛作用濃度範圍約 100 ng/ml；(2)嗜睡及認知扭曲作用濃度範圍約 50-200 ng/ml；(3)麻醉作用濃度範圍約 2000-3000 ng/ml；(4)患者從麻醉至漸漸甦醒的作用濃度範圍約 500-1000 ng/ml(Sinner and Graf, 2008)。

K 他命經由肝微粒系統 (hepatic microsomal system) 中的細胞色素 P450 代謝成 norketamine，其約具有 20-30% 的 K 他命生物活性 (Moore et al., 2001)，再經由羥基化 (hydroxylation) 形成 hydroxynorketamine，上述兩種代謝物再與葡萄糖醛酸共軛結合 (conjugation)，最終經尿液排出體外 (Shahani et al., 2007)。

### 三、K 他命作用機制

K 他命與天使塵 (phencyclidine, PCP) 同樣屬於芳基環己胺類結構，是一種非競爭性的 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受體拮抗劑，NMDA 受體為麩胺酸鹽 (glutamate) 受體，同時被促效劑 (agonist) glutamate 和共促效劑 (co-agonist) glycine or D-Serine 結合時所活化，促使陽離子 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ ) 能進入細胞膜，K 他命主要結合在 NMDA 受體的 PCP binding site，阻斷受體正常運作，使得離子無法進入細胞膜，導致神經傳導功能異常 (Anis et al., 1983; Orser et al., 1997)。K 他命有兩種消旋混合物，分別是 S(+)-Ketamine 和 R(-)-Ketamine，在臨床上，S(+)-Ketamine 的麻醉效力約為 R(-)-Ketamine 的三到四倍 (White et al., 1980)。有研究發現，S(+)-Ketamine ( $\text{K}_i: 0.3 \mu\text{M}$ ) 對於 NMDA 受體的抑制效力為 R(-)-Ketamine ( $\text{K}_i: 1.4 \mu\text{M}$ ) 的三到四倍 (Ebert et al., 1997; Ibrahim et al., 2011; Moaddel et al., 2013)，且已被證明會引起健康人類受試者產生擬精神病症狀的不利影響 (Krystal et al., 1994b)。

不同劑量的 K 他命在中樞神經系統扮演不一樣的效果，高劑量時具有解離性麻醉功效；亞劑量會誘發欣快感，令人產生一種和現實環境分離的感覺，造成使用者出現噁心、視覺模糊、肢體協調性下降和暫時失憶等症狀，並會產生心搏過快、血壓上升及震顫等副作用；低劑量具有治療憂鬱症功效 (Ibrahim et al., 2011)。相同地，啮齒類動物中也有相關的研究指出高劑量 K 他命為 95 mg/kg 以上出現麻醉效果 (Wang et al., 2009; Dholakia et al., 2017)；中劑量 K 他命範圍為 20-50 mg/kg 產生擬精神病作用 (Watanabe et al., 2010; Featherstone et al., 2012; Nikiforuk and Popik, 2012; Rajagopal et al., 2016)；低劑量 K 他命範圍為 2-15 mg/kg 產生抗憂鬱效果 (Maeng et al.; Ghasemi et al.,

2010; Lin et al., 2016a; Clarke et al., 2017)。

K 他命在中樞神經系統也會和其他受體產生相互作用(Kohrs and Durieux, 1998)。K 他命對於不同亞型的類鴉片受體 (opioid receptor)有不同的抑制效果，如  $\mu$ - opioid receptor (Ki:26.8  $\mu$ M)、 $\kappa$ -opioid receptor (Ki:85.2  $\mu$ M)、 $\delta$ -opioid receptor (Ki:66  $\mu$ M)(Hustveit et al., 1995)；同時對於不同亞型蕁毒鹼型受體 (muscarinic receptors)也有不同的抑制效果，如 M1 type (Ki:45  $\mu$ M)、M2 type (Ki:294  $\mu$ M)、M3 type (Ki:246  $\mu$ M)(Hirota et al., 2002)；另外，對於單胺類轉運蛋白也具有不同親和力，如 dopamine transporter (Ki:62.9  $\mu$ M)、serotonin transporter (Ki:161.7  $\mu$ M)、norepinephrine transporter (Ki:66.8  $\mu$ M)(Nishimura et al., 1998)。

研究指出， $\mu$ -opioid receptor antagonist :clocinnamox 及  $\delta$ -opioid receptor antagonist : naltrindole 以劑量依賴性方式拮抗 K 他命在小鼠熱刺激實驗中的鎮痛作用，而  $\kappa$ -opioid receptor antagonist : nor-binaltorphimine 則不產生效果。證明  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors 但非  $\kappa$ -opioid receptor 參與了 K 他命在中樞的抗疼痛效果(Pacheco Dda et al., 2014)；另外，K 他命以劑量依賴性方式提高了大鼠前額葉皮質的血清素 (5-HT)水平，透過給予  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) antagonist : NBQX、NASPM 及 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) antagonist : dihydro- $\beta$ -erythroidine 降低 K 他命誘導前額葉皮質的 5-HT 升高，證明 AMPAR 和 nAChR 參與了 K 他命誘導的前額葉皮質中 5-HT 的釋放(Nishitani et al., 2014)。K 他命也可以當作一種抗癲癇藥物 (anticonvulsant)(Veliskova et al., 1990; Fujikawa, 1995)，可以預防荷包牡丹鹼 (bicuculline)造成大鼠產生癲癇及毒蕁鹼型受體 (muscarinic receptor)的變化(Schneider and Rodriguez de Lores Arnaiz, 2013)。K 他命會增加前額葉皮質 (prefrontal cortex)及紋狀體 (striatum)中 dopamine 的釋放，正子電腦斷層造影實驗也證實人類使用 K 他命會增加紋狀體中 dopamine 釋放(Breier et al., 1998)，施用擬精神病症狀劑量的 K 他命通過 dopamine D1 receptor 介導的 dopaminergic 調節機制來抑制海馬迴 (hippocampus)突觸傳遞(Kamiyama et al., 2011)；

通過 dopamine D1/D5 receptors 誘發海馬迴突觸抑制和空間記憶障礙(Duan et al., 2013)。

#### 四、K 他命的抗憂鬱效果

傳統的抗憂鬱劑，如血清素回收抑制劑 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, SSRIs)通常需要數周至數月才能達到緩解憂鬱症的效果(Trivedi et al., 2006)，且對於 30-40%的憂鬱症患者無治療效果(Thase et al., 2005)，且有復發的可能性(Rush et al., 2006; Ghaemi, 2008)，因此開發更有效及快速的抗憂鬱劑對於治療憂鬱症是相當重要的。

K 他命最早於西元 2000 年被發現單次注射低劑量時可以產生快速的抗憂鬱作用，具有治療難治型憂鬱症及重鬱症的潛力(Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006; Liebrez et al., 2009)。研究發現，患者注射低劑量 K 他命後約 2 小時內即可產生抗憂鬱的效果(Zarate et al., 2006; Phelps et al., 2009)，且單次治療效果可維持數天至數周(Liebrez et al., 2007; Irwin and Iglewicz, 2010)；啮齒類動物研究中也發現，給予低劑量 K 他命後 30 分鐘，即可降低小鼠在強迫游泳試驗中不動的時間(Fukumoto et al., 2016)，具有類抗憂鬱效果，且此效果可維持 8 天以上(Clarke et al., 2017)。

PCP、MK-801、AP-7 等 NMDA 受體拮抗劑也被發現具有抗憂鬱的潛力(Sernagor et al., 1989; Trullas and Skolnick, 1990; Lodge and Mercier, 2015)，其中傳統抗憂鬱劑中的三環抗憂鬱劑 (Tricyclic antidepressants, TCA)與 NMDA 受體具有親和力，進而阻斷 NMDA 受體而達到抗憂鬱效果(Reynolds and Miller, 1988; Watanabe et al., 1993)；過去認為利用 K 他命直接阻斷 NMDA 受體功能產生抗憂鬱的作用。後續研究發現，給予 AMPA 受體抑制劑 NBQX，能夠阻斷 K 他命在小鼠進行尾部懸吊試驗中的抗憂鬱效果(Koike et al., 2011)；給予 AMPA 受體增強劑 LY392098 同樣具有抗憂鬱效果(Li et al., 2001)。近期研究更顯示，K 他命的抗憂鬱作用主要是由其代謝物 (2S,6S;2R,6R)-hydroxynorketamine(HNK)而來，(2S,6S;2R,6R)-HNK 藉由作用在



AMPA 受體上來達到抗憂鬱效果(Zanos et al., 2016)。低劑量 K 他命會增加腦部 glutamate 含量和提升 AMPA 受體移動至突觸活躍區 (active zone)，再藉由 AMPA 受體與 glutamate 相互作用快速活化 mTOR pathway 相關訊號來產生抗憂鬱效果(Duman et al., 2012; Duman and Voleti, 2012)。

研究發現，重鬱症患者的前額葉皮質中 mTOR (mammalian target of rapamycin) 訊號有嚴重的缺陷(Jernigan et al., 2011; Abelaira et al., 2014)，mTOR 是一種絲胺酸/蘇胺酸激酶 (serine/threonine kinase)，是調控蛋白質轉譯的起始酶，可以促進樹突棘蛋白的合成，調控細胞代謝、成長與存活功能(Duman et al., 2012)。低劑量 K 他命透過快速活化 mTOR signaling pathway 產生抗憂鬱作用，其上游分子 ERK (extracellular signal-regulated kinase)和 Akt 被磷酸化而促進 mTOR 活化，使 4E-BP-1 與 p70S6K 活化，進而調節基因表達及蛋白質合成，增加 PSD-95 和 Synapsin 1 等突觸蛋白及神經突觸生長相關因子的表達(Li et al., 2010a; Duman and Aghajanian, 2012)。

另外，K 他命的抗憂鬱機制也和腦源性神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及糖原合成酶激酶 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3)有關。研究指出，誘導型 BDNF knockout 會降低 K 他命在強迫游泳試驗中的抗憂鬱效果，其機制是透過降低真核延伸因子 2 激酶 (eukaryotic elongation factor 2 kinase, eEF2K)的活性，進而減少對 BDNF 的表達的抑制(Autry et al., 2011)，同時增強 mTOR 產生突觸新生作用。；低劑量 K 他命透過磷酸化 GSK-3，降低 GSK-3 對 mTOR 信號傳遞的抑制，達成增加突觸生成來達到抗憂鬱效果(Liu et al., 2013)。

## 五、急性 K 他命造成類精神病症狀

使用 K 他命和其他 NMDA 受體拮抗劑會造成使用者產生短暫的精神病狀態，如記憶障礙及認知缺陷(Krystal et al., 1994b; Malhotra et al., 1996; Adler et al., 1998)，且也會加劇思覺失調症患者的現有症狀(Lahti et al., 1995; Malhotra et al., 1997)。健康受試者給予 K 他命後，在簡明精神病量表 (Brief Psychiatric Rating Scale, BPRS)的分數有

明顯增加的狀況(Rowland et al., 2010)，正性與負性症狀量表 (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS)的分數也因此增加(Krystal et al., 1994a; D'Souza et al., 2012)，且會造成工作、情節、和程序記憶的損傷(Newcomer et al., 1999; Morgan et al., 2004)。

實驗發現，透過靜脈注射方式急性給予 K 他命會造成腦部的 glutamate 濃度增加 (Anand et al., 2000; Deakin et al., 2008)，glutamatergic system 異常(Egerton et al., 2012)，造成腦部損傷。

動物研究中發現，K 他命會使啮齒類動物產生類似思覺失調症中許多症狀的行為狀態。急性給予 K 他命會導致運動障礙、損傷前脈衝抑制作用(de Bruin et al., 1999; Razoux et al., 2007)，產生類精神病行為。

## 六、K 他命的麻醉效果

K 他命具有解離性麻醉作用，隨著劑量逐漸增加的情況下，會導致近乎完全的麻痺與鎮靜，與其他麻醉藥物不同的地方在於 K 他命對於被麻醉者呼吸功能的影響甚小且能緩解疼痛，不需要繁瑣的呼吸機器輔助，成為戰爭期間或嚴峻環境下必備的麻醉藥劑。研究發現，K 他命透過濃度依賴性及電壓依賴性阻斷 NMDA 介導的電流(MacDonald et al., 1987; MacDonald et al., 1991)，阻斷 NMDA 受體開放通道，減少通道平均的開啟時間及頻率(Orser et al., 1997)來達到麻醉的效果。此外，研究發現選擇性剷除 HCN1 通道的小鼠實驗中，其誘導失去翻正反射反應所需的 K 他命劑量明顯提高，推測高劑量 K 他命的麻醉機制與 HCN1 通道的抑制具有高度相關性(Zhou et al., 2013)。

## 七、慢性 K 他命造成類精神病症狀

臨床研究發現，濫用 K 他命的受試者在流行病學研究中心憂鬱量表 (Center of Epidemiological Studies Depression Scale, CES-D)的分數有增加的情形，產生憂鬱傾向的後遺症(Li et al., 2017)。

動物研究中發現，以亞慢性方式給予 K 他命則會誘發社交互動缺失、認知障礙及記憶障礙(Becker et al., 2003; Featherstone et al., 2012)。另外，重複暴露 K 他命也會造成啮齒類動物產生憂鬱症的類比行為，增加強迫游泳試驗 (Forced swimming test, FST) 及尾部懸吊實驗 (Tail suspension test, TST) 中的不動時間 (immobility times)(Chatterjee et al., 2011; Suarez-Santiago et al., 2017)；其中，思覺失調症患者與類精神病症狀動物模型的行為及分子機制也有相似的特徵(Kilts, 2001)。

NMDA 受體對於調控突觸可塑性及記憶功能扮演非常重要的角色(Bergman, 1999; Imre et al., 2006)，且會進一步影響長期增益效應 (Long-term potentiation, LTP)和長期抑制效應 (Long-term depression, LTD)的產生，由於 K 他命是 NMDA 受體的非競爭型拮抗劑，透過與之結合阻斷多種離子進入 NMDA 受體，造成 NMDA 受體功能低下 (NMDA receptor hypofunction)而產生類精神病症狀，如認知功能受損(Newcomer et al., 1999; Wiescholleck and Manahan-Vaughan, 2013)。

K 他命對於腦部的影響是複雜的，重複暴露 K 他命則透過增加 GABA 受體的表達來增加 CNS 中 GABA 的抑制性傳遞(Irifune et al., 2000; Tan et al., 2011)，此外，K 他命會造成 GABAergic 中間神經元的失調，支持 NMDA 受體 hypofunction 假說(Homayoun and Moghaddam, 2007)；除了 glutamate 和 GABA system 之外，K 他命也會影響 dopamine system，增加前額葉皮質中 dopamine 的釋放(Lindefors et al., 1997; Moghaddam et al., 1997)，並可直接作用在 dopamine D2 受體上，為 dopamine D2 受體的部分致效劑 ( $K_i: 0.5 \mu\text{M} \pm 0.2 \mu\text{M}$ )(Kapur and Seeman, 2002)，造成 dopaminergic system 紊亂；K 他命同時也會與 5-HT<sub>2A</sub> 受體結合，為 5-HT<sub>2A</sub> 受體的部分致效劑 ( $K_i: 15 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$ )(Kapur and Seeman, 2002)，其 5-HT<sub>2A</sub> 受體被認為是改變感知而造成幻覺情形的必要條件之一(Aghajanian and Marek, 1999; Gonzalez-Maeso et al., 2007)。總而言之，K 他命會影響多種神經化學系統，導致神經傳導化學物質的穩定性混亂，造成神經傳導功能的失衡，產生類精神病症狀(Geyer and Vollenweider, 2008)。

## 八、苯甲酸鈉

苯甲酸鈉 (sodium benzoate)，又稱安息香酸鈉，為苯甲酸 (benzoic acid)的鈉鹽，是一種無色或白色的結晶或顆粒粉末，可溶於水，水溶液呈弱鹼性。Sodium benzoate 是一種常見的防腐劑，廣泛地使用於食品、飲品及化妝品上(Nair, 2001)。Sodium benzoate 在酸性條件下會解離成苯甲酸，由於苯甲酸親油性強，容易穿過細胞膜進入細胞內，干擾細菌和黴菌等微生物細胞膜的通透性，抑制細胞膜對胺基酸的吸收與微生物細胞呼吸酶的活性，使無氧呼吸中磷酸果糖激酶催化的反應速率下降約 95%，達到防腐的作用(Krebs et al., 1983)。少量的 sodium benzoate 對人體並無毒害，食用後會迅速被胃腸道吸收，在肝臟內與甘氨酸結合並以馬尿酸的形式通過日常小便排出體外，不會有積蓄問題(Bridges et al., 1970; Kubota and Ishizaki, 1991)。國際化學品安全署的研究發現，每天攝入 647-835 mg/kg 的 sodium benzoate 不會對健康產生負面的影響(Nair, 2001)。另外，在臨床實驗中，sodium benzoate 為 Ucephan 的其中成份，可以用於治療高血氨症相關的肝臟代謝缺陷，如尿素循環失調的患者(Leonard and Morris, 2002; Scaglia et al., 2004)。在啮齒類動物實驗中發現，急性口服 sodium benzoate 的毒性很低 (LD50 > 1940 mg/kg)；實驗中，給予含 2% sodium benzoate 的飲用水，無任何副作用產生，不會對小鼠的健康造成影響(Toth, 1984)。

Sodium benzoate 本身是一種 D-amino acid oxidase (DAAO)的抑制劑，能減少 NMDA 受體 glycine binding site 致效劑 D-alanine 和 D-serine 的代謝，間接增強 NMDA 受體的功能。在動物及體外試驗中皆發現，給予 sodium benzoate 可以抑制 DAAO 的活性而增加大腦、小腦、血漿及突觸間 D-serine 的濃度(Bartlett, 1948; Van den Berghe-Snorek and Stankovich, 1985; Howley et al., 2017; Ryan et al., 2017)。臨床實驗中發現給予 sodium benzoate，有助於減緩焦慮或憂鬱的症狀(Lai et al., 2012)。

此外，研究發現 sodium benzoate 具有抗發炎作用，可以抑制 lipopolysaccharide (LPS)在小鼠維膠細胞中誘導的 inducible NO synthase (iNOS)、TNF- $\alpha$  和表面標誌物 (CD11b、CD11c、CD68)的表現量(Brahmachari et al., 2009)；給予 sodium benzoate



亦可抑制阿茲海默症 (Alzheimer's Disease, AD)動物模型中 BV-2 維膠細胞 p21rac 的活性，其中 p21rac 為 NADPH 氧化酶複合物的重要成員，而 NADPH 氧化酶為響應不同刺激中重要的超氧化物 (Reactive oxygen species, ROS)，保護其記憶及學習能力 (Modi et al., 2015)，且 sodium benzoate 會活化蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)與 cAMP 反應組件蛋白 (cAMP response element binding, CREB)，進而上調神經滋養因子，如 BDNF 與 NT-3 的表現量，有助於改善各種神經退化性疾病(Jana et al., 2013)。



## 貳、研究動機與目的

K 他命的藥理機制十分複雜，不同劑量的 K 他命對於神經中樞系統有不一樣的影響，文獻指出，高劑量的 K 他命有麻醉效果、中劑量 K 他命會誘導類精神病症狀、低劑量 K 他命可當作抗憂鬱劑。在此，我們使用 10 mg/kg 的 K 他命劑量進行抗憂鬱試驗、20 mg/kg 的 K 他命劑量誘導小鼠出現擬精神病症狀、100 mg/kg 的 K 他命劑量觀察其麻醉效果。

在過去的研究中發現，K 他命引起擬精神病症狀是透過結合在 NMDA 受體的 PCP binding site，導致 NMDA 受體功能低下，使離子無法正常進入細胞膜進而影響神經傳導功能，誘導出記憶缺陷、認知障礙與社交缺陷等擬精神病行為，與其他 NMDA 受體的拮抗劑如 PCP、MK-801 的影響相似；另外，增強調節 NMDA 受體的 glycine binding site 功能，可以改善 NMDA 受體拮抗劑造成的擬精神病行為，目前常見作用在 glycine binding site 的內生性物質，如 glycine 與 D-serine 因為難通過血腦障壁，需要非常大量才能達到治療效果。低劑量 K 他命的抗憂鬱與擬精神病藥理機制不相同，K 他命的抗憂鬱效果是間接透過正向調節 AMPA 受體與 mTOR 信號傳遞，促進突觸蛋白及神經突觸生長相關因子表現量增加。

因此本實驗假設，利用 sodium benzoate，一種 DAAO 抑制劑，減少 D-amino acid 的代謝，可以透過間接調節 NMDA 受體功能而減少 K 他命誘導的類精神病症狀，且同時具有增強 K 他命的抗憂鬱效果與影響 K 他命麻醉效果的作用。

此外，重複暴露 K 他命會影響 NMDA 受體及突觸功能，造成突觸相關蛋白：如 PSD-95 (postsynaptic density 95) 與 SYN1 (synapsin 1) 的表現量異常。因此假設 sodium benzoate 可以藉由影響突觸相關蛋白表現量變化，反映至 K 他命所造成的行為異常。

## 參、實驗設計

本研究旨在探討 sodium benzoate 對於急性 K 他命所造成的抗憂鬱、麻醉效果與擬精神病效果的交互作用。此外，評估 sodium benzoate 對於亞慢性 K 他命暴露所導致行為異常是有預防和治療的效果。

抗憂鬱的實驗中，利用強迫游泳試驗事先評估 K 他命 (10 mg/kg) 及 sodium benzoate (10、20、30 mg/kg) 的抗憂鬱效果，再挑選適合的 K 他命劑量 (10 mg/kg) 與 sodium benzoate 共同給予，觀察 sodium benzoate 是否會加成 K 他命的抗憂鬱效果。

急性 K 他命造成類精神症狀的實驗，利用中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，觀察暴露前給予 sodium benzoate 是否能預防 K 他命所造成的行為異常，利用社交互動行為測試及新物體辨識測試評估其預防效果。

K 他命的麻醉實驗中，利用失去翻正反應試驗，分別觀察其起始作用時間及藥效作用時間，評估高劑量 K 他命 (100 mg/kg) 及先給予 sodium benzoate (300、600 mg/kg) 後對於 K 他命麻醉效果的影響。

亞慢性實驗中，連續給予 K 他命 (20 mg/kg) 14 天，經過同時給予或後給予治療藥物 sodium benzoate 的兩種給藥方式，利用社交互動型為測試、新物體辨識測試、三室社交試驗、尾部懸吊試驗、強迫游泳試驗以及 DOI 誘導頭部抽蓄試驗，觀察 sodium benzoate 是否有治療亞慢性 K 他命暴露所導致行為異常的效果。最後，進行犧牲取腦並利用西方點墨法分析突觸相關蛋白 PSD-95、SYN1 的表現量，觀察突觸相關蛋白的變化。

# 肆、實驗材料與方法

## 一、實驗動物

本研究使用之實驗動物皆為雄性 ICR 小鼠，訂購來源為樂斯科生物科技公司。飼養於國家衛生研究院之實驗動物中心，飼養條件皆維持 12 小時光照、12 小時黑暗的生理狀況。室溫控制在  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度維持在  $60 \pm 10\%$ ，給予充足的飲水與飼料，並定期更換籠具以維持飼育環境之整潔。

## 二、實驗藥品配置

### (1) K 他命 (Imalgene 1000, Merial Laboratoire de Toulouse, France)

Ketamine 原液為 100 mg/ml，直接以 0.9% NaCl 溶液配製成所需濃度，小鼠每 10 g 體重給予 0.1 ml，以腹腔注射方式給予。

- (A) Ketamine 10 mg/kg，即配製成 1 mg/ml
- (B) Ketamine 20 mg/kg，即配製成 2 mg/ml
- (C) Ketamine 100 mg/kg，即配製成 10 mg/ml

### (2) 苯甲酸鈉 (sodium benzoate, 景明化工股份有限公司)

直接以 0.9% NaCl 溶液配製成所需濃度，小鼠每 10 g 體重給予 0.1 ml，以腹腔注射方式給予。

- (A) Sodium benzoate 10 mg/kg，即配製成 1 mg/ml
- (B) Sodium benzoate 20 mg/kg，即配製成 2 mg/ml
- (C) Sodium benzoate 30 mg/kg，即配製成 3 mg/ml
- (D) Sodium benzoate 100 mg/kg，即配製成 10 mg/ml
- (E) Sodium benzoate 300 mg/kg，即配製成 30 mg/ml
- (F) Sodium benzoate 600 mg/kg，即配製成 60 mg/ml

(3) 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI, Sigma Chemical Co.)

直接以 0.9% NaCl 溶液配製成所需濃度，小鼠每 10 g 體重給予 0.1 ml，以腹腔注射方式給予。

DOI 1 mg/kg，即配製成 0.1 mg/ml

(4) 西方點墨法 (Western blot) 溶液配製

(A) Lysis buffer 1X :

4 M NaCl

0.5 M Tris-HCl (pH=7.6)

0.1 M EGTA (pH=8)

0.1 M EDTA (pH=8)

NP-40 (現加)

最終使用濃度配方：100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM EGTA、1 mM EDTA、

1% NP-40

(B) Running buffer 10X :

0.25 M Tris-Base

1.92 M Glycine

1% SDS

以 dd H<sub>2</sub>O 稀釋至 1L

最終使用濃度配方：25 mM Tris-Base、192 mM Glycine、0.1% SDS

(C) Transfer buffer 10X :

0.25 M Tris-Base

1.92 M Glycine

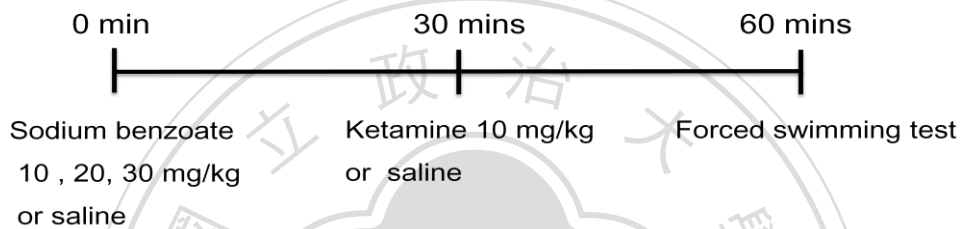
以 dd H<sub>2</sub>O 稀釋至 1L

最終使用濃度配方：25 mM Tri-Base、192 mM Glycine，額外加 Methanol 150 ml，以 dd H<sub>2</sub>O 稀釋至 1L

### 三、實驗流程

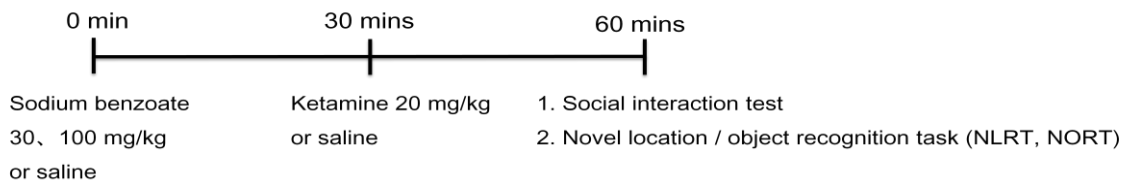
#### (1) 檢測 sodium benzoate 對於急性低劑量 K 他命暴露所引起的抗憂鬱行為

評估前給予 sodium benzoate 對於低劑量 K 他命在小鼠強迫性游泳試驗的影響



本實驗先行評估 sodium benzoate (10, 20, 30 mg/kg, i.p.) 及 K 他命 (10 mg/kg, i.p.) 對於小鼠 forced swimming test 的個別影響；下一步實驗，預先給予 sodium benzoate (10, 20, 30 mg/kg, i.p.) 後 30 分鐘，給予 K 他命 (10 mg/kg, i.p.)，觀察 sodium benzoate 會不會加成 K 他命在 forced swimming test 實驗當中的抗憂鬱程度。

#### (2) 檢測 sodium benzoate 對於急性中劑量 K 他命暴露所引起的社交互動及新物體辨識能力缺失

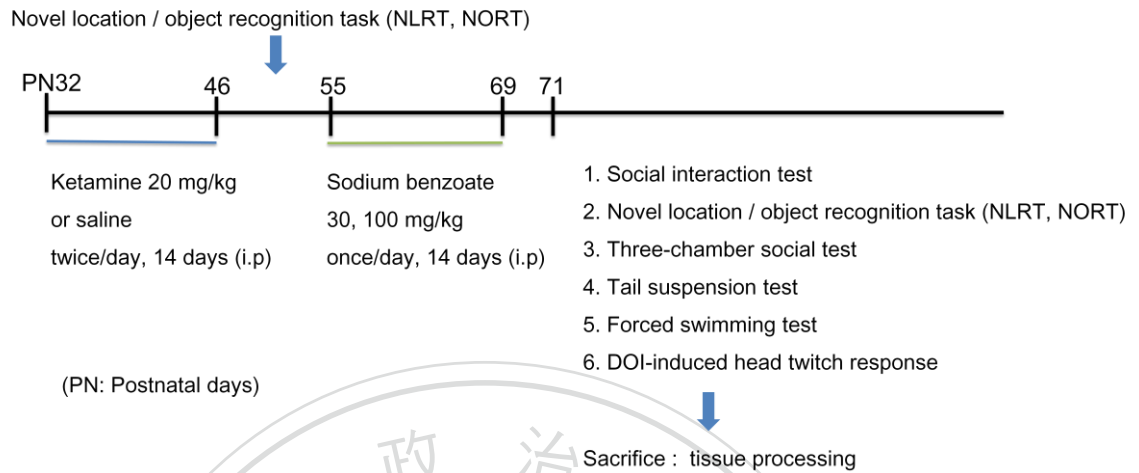


本實驗預先給予 sodium benzoate (30, 100 mg/kg, i.p.) 後 30 分鐘，給予 K 他命 (20 mg/kg, i.p.)，觀察 sodium benzoate 對於 K 他命在社交互動行為測試中所誘發的社交缺失及在新物體辨識能力測試中所導致的認知損傷的影響。





(B) 評估以 post-treatment 方式，檢測 sodium benzoate 是否可以減輕小鼠在青少年時期重複暴露中劑量 K 他命所導致的行為異常



本實驗選取 4 週齡小鼠，於出生後第 32 天以腹腔注射方式給予生理食鹽水或 K 他命 (20 mg/kg) 持續 2 週。期間進行新物體辨識能力測試，檢測亞慢性中劑量 K 他命是否造成小鼠認知能力損傷。於出生後第 55 天以腹腔注射方式給予生理食鹽水或 sodium benzoate (30, 100 mg/kg) 連續 2 週。完成上述給藥程序後，於小鼠出生後第 71 天，依序進行社交互動行為測試、新物體辨識能力測試、三室社交試驗、尾部懸吊試驗、強迫性游泳試驗及 DOI 誘導之頭部抽搐反應試驗。行為實驗結束後，將小鼠犧牲取腦並進行組織處理。



## 四、實驗方法

### 1. 社交互動行為測試 (Social interaction test)

將兩隻給予相同藥物處理，但飼養於不同籠之小鼠，同時放入一個陌生新環境的開放式觀察箱 (長 35×寬 35×高 30 cm)，觀察並記錄 10 分鐘內，兩隻小鼠進行社交互動的總時間 (Contact time)與行為次數。

嗅聞行為 (Sniffing)：嗅聞對方身體任何部位。

跟隨行為 (Following)：任一小鼠跟隨另一隻小鼠繞行活動空間的行為。

攀爬行為 (Climbing)：爬至對方身上或前肢跨過對方背部的動作。

### 2. 新位置辨識能力測試 (Novel location recognition task, NLRT)

#### 新物體辨識能力測試 (Novel object recognition task, NORT)

實驗前 2 天進行適應，每天將小鼠放置於欲進行實驗的開放式觀察箱 (長 35×寬 35×高 30 cm) 適應 20 分鐘。實驗當天需再讓小鼠適應 5 分鐘後，再開始進行實驗。實驗共分為 3 個階段：(a) Sample phase：放入兩個相同物體 (A,A)，讓小鼠自由探索 5 分鐘，並記錄小鼠分別碰觸兩物體的時間，再將小鼠放回飼育籠；經過 30 分鐘後，進行 (b) NLRT：將原先 sample phase 實驗中兩個相同物體的其中一物體改變位置 (A,A')，讓小鼠自由探索 5 分鐘，並記錄小鼠分別碰觸兩物體的時間；經過 24 小時後，進行 (c) NORT：將原先 NLRT 實驗中改變位置的物體，更換成全新的物體 (A,B)，讓小鼠自由探索 5 分鐘，並記錄小鼠分別碰觸兩物體的時間。計算認知係數 (Recognition index, RI) 作為認知能力的判斷。其認知係數計算公式如下：

$$\text{Recognition index (\%)} = \frac{\text{碰觸新位置或物體的時間 (A' or B)}}{\text{碰觸兩物體的總時間 A + (A' or B)}} \times 100\%$$

### 3. 三室社交試驗 (Three-chamber social test)

本試驗分為測試社交能力 (Sociability)與社交新穎性 (Social novelty)兩個階段。實驗使用透明矩形壓克力觀察箱 (長 60×寬 40×高 35 cm)含有三個隔間且隔間中有通道 (寬 13×高 35 cm)讓小鼠可以自由通過，實驗前需預先將來自不同飼育籠的陌生鼠 (stranger 1 and stranger 2)放入柵欄式籠子於實驗觀察箱適應 20 分鐘。實驗當天，測試鼠放置於觀察箱中適應 5 分鐘後，開始測試其社交能力，此時在左邊或右邊的隔間放入一個空的柵欄式籠子，而另一邊的隔間放入含有一隻陌生鼠 (stranger 1)的柵欄式籠子，並記錄小鼠在 5 分鐘內各別嗅聞、碰觸兩籠子的時間。讓小鼠再額外自由探索 5 分鐘後，進行社交新穎性測試，將另一隻陌生鼠 (stranger 2)放入空的柵欄式籠子，再次記錄小鼠 5 分鐘內各別嗅聞、碰觸兩籠子的時間。

### 4. 失去翻正反射試驗 (Loss of righting reflex test, LORR)

本實驗利用 K 他命在高劑量 (100 mg/kg, i.p.)下，可快速誘發麻醉效果。受試鼠先給予 sodium benzoate 或 saline 後 30 分鐘，給予 K 他命，在小鼠倒下後，給予三次翻正機會，以最後一次無法翻正的時間記錄為起始作用時間 (onset)，同樣在麻醉藥效減退甦醒前，給予三次翻正機會，以最後一次確定翻正的時間紀錄為持續麻醉時間 (duration)。

### 5. 尾部懸吊試驗 (Tail suspension)

尾部懸吊試驗由 Steru 等人於 1985 年提出 (Steru et al., 1985)，用來評估小鼠是否有憂鬱症傾向之行為試驗。實驗當天，利用一小塊膠帶黏附距離小鼠尾部 2 公分位置於尾部懸吊試驗觀察箱 (高 60cm)上，試驗時間為 6 分鐘，前 1 分鐘為適應時間，紀錄後 5 分鐘，小鼠靜止不動的時間 (immobility time)。不動的時間定義為放棄掙扎扭動，靜止懸掛的狀態。

## 6. 強迫游泳試驗 (Forced swimming test)

強迫游泳試驗由 Porsolt 等人於 1977 年提出(Porsolt et al., 1978)，是一種常見的啮齒類動物憂鬱測試試驗。實驗使用透明壓克力圓柱筒 (直徑 20×高 33.5 cm)，內裝高約 17-20 公分的水，且溫度控制在 23-25°C 進行試驗。實驗前 24 小時，需先將受試鼠置於設置好的圓柱桶中 15 分鐘。實驗當天，試驗時間為 6 分鐘，前 2 分鐘為適應時間，紀錄後 4 分鐘，小鼠靜止不動的時間 (immobility time)。不動的時間定義為在水面靜止不動、漂浮或只為讓頭持續露出水面隻些微動作。

## 7. DOI 誘導之頭部反應 (DOI-induced head twitch response)

濫用 K 他命會導致類精神病行為且有迷幻的症狀產生，而 5-HT<sub>2A</sub> 受體被認為是改變感知而造成幻覺的重要受體，透過給予 5-HT<sub>2A</sub> 受體致效劑 DOI 引起小鼠頭部抽搐反應，藉此觀察小鼠的迷幻行為。實驗當天，以腹腔注射方式給予小鼠 DOI 1 mg/kg 後，直接將小鼠放入透明壓克力圓柱筒 (直徑 20×高 40 cm)，觀察並記錄 30 分鐘內，小鼠甩頭的次數。

## 8. 西方點墨法 (Western blot)

### 8.1 蛋白質萃取

將小鼠斷頭取腦後，取出海馬迴 (hippocampus)，將適當份量組織加入裂解緩衝液 (lysis buffer) (100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM EGTA、1 mM EDTA、1% NP-40) 並放置在碎冰上，取 100 µl 裂解緩衝液加至含有海馬迴組織之 1.5 ml 離心管，利用超音波震盪器將組織打碎後，將以打碎的組織放置碎冰上 10 分鐘，再以超高速離心的方式 (4°C, 12000 rpm, 10 mins) 分離出上清液與沉澱物，取上清液至新的微量離心管內，待定量分析。

## 8.2 蛋白質濃度定量

蛋白質濃度以 bicinchoninic acid (BCA) protein assay 測定，使用前預先將 reagent A 和 reagent B 的 BCA 以 1:50 的比例配成 BCA buffer，並以胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作為蛋白質標準品，配製濃度為 (0.0625、0.125、0.25、0.5、1、1.5、2 mg/ml)。將蛋白質標準品溶液與蛋白質萃取液各 20  $\mu$ l 依序放入 96-well ELISA plate 中，之後再加入配製好的 BCA buffer 200  $\mu$ l，在 ELISA reader 中以波長 562 nm 測定其吸光值。結果使用 Microsoft Excel 分析繪出定量標準曲線與線性公式，且  $R^2$  值需達 0.99 以上，將吸光值代入標準曲線計算出蛋白質濃度。

## 8.3 蛋白質樣本配製

蛋白質濃度測定完成後，計算出固定蛋白質樣本所需之體積，再加入 sample buffer、reducing buffer 及適當 lysis buffer，混合均勻後以 70°C 的溫度加熱 10 分鐘使蛋白質變性，加熱完成後馬上將蛋白質樣本插置碎冰上，冷卻後儲存於 -80°C 冰箱。

## 8.4 製作聚丙烯醯膠體及電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

剛開始以酒精及 dd H<sub>2</sub>O 擦拭鑄膠玻璃板並架好器具，依實驗需求分別配置 7.5% 或 10% 的 running gel，灌膠時需注意不能產生氣泡，再加入適量 dd H<sub>2</sub>O 於膠體上使其平整，待膠體凝結後將上層 dd H<sub>2</sub>O 倒掉並以濾紙吸乾，再加入事先配製好的 stacking gel，並隨即將齒梳 (comb) 插入未凝固的 stacking gel 中，避免氣泡產生，待凝結後即完成 SDS-PAGE 配製。將製備好的膠體置於電泳槽中，將 running buffer 加入電泳槽中，接著把齒梳拔起，並利用微量吸管去除膠體中的雜質及氣泡，再將待測的蛋白質樣本注入齒梳孔中，以 70V 電壓進行電泳，當進入膠體分離區時，再以 100V 電壓進行電泳，待結束後即可進行轉漬步驟。

## 8.5 轉漬 (Transfer)

電泳完成後，將膠體自電泳槽取出並浸泡於轉漬緩衝液 (transfer buffer) 中，另外，轉漬膜 (PVDF membrane) 在使用前需先浸泡在 100% 甲醇 (Methanol) 中約 30 秒；濾紙也需先浸泡在 transfer buffer 中。實驗開始前將膠體、PVDF membrane 及濾紙組裝並放入裝有 transfer buffer 的轉漬槽中，設定電壓 100V，轉漬時間 100 分鐘。

## 8.6 免疫轉印 (Immunoblotting)

轉漬完成後，將 PVDF membrane 取出並裁剪成欲觀察區塊，再將其浸泡在 5% skim milk 中 2 小時進行 Blocking，結束後即可加入一級抗體：mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1:10000, Novus)、rabbit anti-PSD95 antibody (1:1000, Abcam)、rabbit anti-Synapsin 1 antibody (1:8000, Arigo)，並於 4°C 環境下反應 12-18 小時。一級抗體反應結束後以 PBST 清洗四次，每次 10 分鐘，完成後加入以 PBST 配製好的二級抗體 (Goat-anti-mouse IgG-HRP antibody (1:8000, Jackson immunoResearch)、Goat-anti-rabbit IgG-HRP antibody (1:5000, Cell Signaling)) 中，於室溫下，放置在平板搖盪器反應至少 1 小時。二級抗體反應結束後以 PBST 清洗四次，每次 10 分鐘，清洗完成後加入酵素冷光試劑 (enhanced chemiluminescence, ECL)，接著利用化學冷光影像擷取系統 (biostep<sup>®</sup> CELVIN<sup>®</sup>S chemiluminescence imaging) 進行訊號擷取，實驗結束以 Image J 軟體進行定量分析。

## 伍、實驗數據分析

實驗結果數據以平均值±標準誤差 (means±S.E.M.)來表示取得資料平均。使用的統計分析軟體為 Sigma-Stat statistical software，使用 t-test、單因子變異數分析 (One-way analysis of variance)、雙因子變異數分析 (Two-way analysis of variance)或雙因子重複變異數分析 (Two-way repeated measures analysis of variance)來建立，以 Students-Newman-Keuls test 進行後測分析，並以  $p < 0.05$  視為有統計上的顯著差異。

社交互動行為測試及 DOI 誘導之頭部抽蓄反應試驗結果中的行為次數，則是以 Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks 建立，並使用 Dunn's test 進行後測分析，以  $p < 0.05$  視為有統計上的顯著差異。





## 陸、實驗結果

### 一、 Sodium benzoate 對於 K 他命減少類憂鬱行為的影響

本實驗將試驗分為 (1) 給予單一藥物組: K 他命 (10 mg/kg) 及 sodium benzoate (10、20、30 mg/kg)。(2) 前給予 sodium benzoate (10、20、30 mg/kg) 後給予 K 他命 (10mg/kg) 之不同組別。實驗結束以 one-way ANOVA 分析小鼠不動的時間 ( $F_{7,55}=8.348$ ,  $p < 0.001$ )。如 Fig.1 顯示, 單一藥物組之 K 他命 (10 mg/kg) 處理組的不動時間相較於控制組明顯下降。單一藥物組之 sodium benzoate (10、20 mg/kg) 處理的不動時間與控制組相比下降不顯著, 而 sodium benzoate (30 mg/kg) 處理的動物不動時間與控制組相比有明顯下降情形。前給予 sodium benzoate (10、20、30 mg/kg) 後給予 K 他命 (10 mg/kg) 組相較於單一藥物組之 sodium benzoate 無明顯差異, 另外, 合併藥物組相對於 K 他命組的不動時間卻有明顯上升情形。

### 二、 Sodium benzoate 對於急性 K 他命在社交互動行為測試中所誘發之社交能力缺失的影響

本實驗在給予 K 他命 (20 mg/kg) 前 30 分鐘預先以腹腔注射給予 sodium benzoate (30 or 100 mg/kg), 觀察 sodium benzoate 對於 K 他命誘發之社交能力缺失的影響, 再過 30 分鐘即進行社交互動行為測試。實驗結束以 one-way ANOVA 分析總互動時間 ( $F_{4,39}=6.118$ ,  $p < 0.001$ )。如 Fig.2A 顯示, K 他命組與控制組相比, 總互動時間有明顯降低。預先給予 sodium benzoate 處理的組別中, sodium benzoate (30 mg/kg) 處理的總互動時間有些為提升, 但在統計上並無差異。sodium benzoate (100 mg/kg) 處理的總互動時間有明顯上升, 並且與 K 他命組有明顯差異。以 Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks 分析各別行為次數: 嗅聞 ( $F_{4,38}=7.372$ ,  $p < 0.001$ )、跟隨 ( $H=5.733$ ,  $p=0.22$ )、攀爬 ( $H=9.886$ ,  $p=0.042$ )。如 Fig.2B 顯示, K 他命組與控制組相比嗅聞 (sniffing) 次數

明顯降低，預先給予 sodium benzoate (30 mg/kg)處理的嗅聞次數有些微上升，但在統計上並無意義；預先給予 sodium benzoate (100 mg/kg)處理的嗅聞次數有明顯回復，並與 K 他命組有明顯差異。跟隨 (following)行為的次數在不同處理組別的相互比較沒有明顯差異。攀爬 (climbing)行為的次數在不同處理組別的相互比較沒有明顯差異。因此預先給予 sodium benzoate (100 mg/kg)具有改善急性 K 他命誘發之社交缺失的效果。

### 三、 Sodium benzoate 對於急性 K 他命在新物體辨識能力測試所誘發之認知損傷的影響

本實驗在給予 K 他命 (20 mg/kg)前 30 分鐘預先以腹腔注射給予 sodium benzoate (30 or 100 mg/kg)，觀察 sodium benzoate 對於 K 他命誘發之認知損傷的影響，經過 30 分鐘進行 sample phase test，再過 30 分鐘即進行新位置辨識能力測試 (NLRT)，接著在 24 小時後進行新物體辨識能力測試 (NORT)，並以認知係數 (recognition index) 來判斷小鼠認知能力的改變。實驗結束以 one-way ANOVA 分別分析其認知係數：sample phase test ( $F_{4,41}=0.485$ ,  $p=0.747$ )、NLRT ( $F_{4,41}=11.275$ ,  $p<0.001$ )、NORT ( $F_{4,41}=11.346$ ,  $p<0.001$ )。如 Fig.3 顯示，sample phase test 實驗中五個組別碰觸兩個相同物體的時間比例相近，對於兩個相同物體的認知偏好沒有明顯差異。在 NLRT 實驗中，組間有明顯差異，K 他命組的認知係數控制組相比顯著降低，預先給予 sodium benzoate 處理與 K 他命組並無明顯差異。在 NORT 實驗中，K 他命組的認知係數與控制組相比有明顯差異，預先給予 sodium benzoate (30 mg/kg)處理與 K 他命組無明顯差異，預先給予 sodium benzoate (10 mg/kg)處理能明顯改善 K 他命所誘發的認知損傷。

### 四、 Sodium benzoate 對於 K 他命麻醉效果的影响

本實驗採用 K 他命 100 mg/kg 作為麻醉劑量，評估預先 30 分鐘給予 sodium benzoate (300、600 mg/kg)是否會影響 K 他命的麻醉作用。實驗結束以 one-way



ANOVA 分析小鼠注射 K 他命後藥物起始作用時間 (onset) ( $F_{2,19}=2.922, p<0.078$ )與持續麻醉時間 (duration) ( $F_{2,19}=8.121, p=0.003$ )。如 Fig.4 顯示，前給予 sodium benzoate (300、600 mg/kg)並不會影響 K 他命造成小鼠失去翻正反射的藥物起使作用時間。前給予 sodium benzoate (300、600 mg/kg)相對於 K 他命組的持續麻醉時間有明顯延長情形。

## 伍、同時重複給予 sodium benzoate 與 K 他命減緩小鼠持久性的行為異常

### 1. 同時重複給予 sodium benzoate 與 K 他命對社交互動行為的影響

在經過同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)與中劑量 K 他命 (20 mg/kg)後，進行社交互動行為能力測試，觀察同時給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之社交能力缺失的影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分析總互動時間 ( $F_{4,35}=31.595, p<0.001$ )。如 Fig.5A 顯示，K 他命組與控制組相比，總互動時間有明顯降低。同時給予 sodium benzoate 處理的組別中，sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的總互動時間與 K 他命組有明顯上升。以 Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks 分析各別行為次數：嗅聞 ( $F_{4,35}=16.514, p<0.001$ )、跟隨 ( $H=5.148, p=0.272$ )、攀爬 ( $F_{4,35}=5.685, p=0.001$ )。如 Fig.5B 顯示，K 他命組與控制組相比嗅聞 (sniffing)次數明顯降低，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)處理的嗅聞次數有明顯回復，並與 K 他命組有明顯差異。跟隨 (following)行為的次數在不同處理組別的相互比較沒有明顯差異。K 他命組與控制組相比攀爬 (climbing)行為的次數明顯降低，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)處理的攀爬次數沒有明顯回復。因此同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)具有改善 K 他命誘發之社交缺失的效果。

## 2. 同時重複給予 sodium benzoate 對於 K 他命在新物體辨識能力測試所誘發之認知損傷的影響

在經過同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)與中劑量 K 他命 (20 mg/kg) 後，進行新物體辨識能力測試，觀察同時給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之認知損傷的影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分別分析其認知係: sample phase test ( $F_{4,35}=0.334, p=0.853$ )、NLRT ( $F_{4,35}=2.208, p=0.112$ )、NORT ( $F_{4,35}=7.381, p<0.001$ )。如 Fig.6 顯示，sample phase test 實驗中五個組別碰觸兩個相同物體的時間比例相近，對於兩個相同物體的認知偏好沒有明顯差異。在 NLRT 實驗中五個組別碰觸兩個相同物體的時間比例相近，對於兩個相同物體的認知偏好沒有明顯差異。在 NORT 實驗中，K 他命組的認知係數與控制組相比有明顯差異，但同時給予 sodium benzoate (30 mg/kg) 與 K 他命組無明顯差異，而同時給予 sodium benzoate (100 mg/kg)則有減緩認知損傷的效果。

## 3. 同時重複給予 sodium benzoate 對於 K 他命在三室社交試驗所誘發之社交能力與社交新穎性缺失的影響

在經過同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)與中劑量 K 他命 (20 mg/kg) 後，進行三室社交試驗，觀察同時給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之社交能力與社交新穎性的影響。實驗結束以 two-way repeated measures ANOVA 分析社交能力 [treatment : ( $F_{4,35}=2.787, p=0.041$ ), cage : ( $F_{1,35}=98.343, p<0.001$ ), interaction : ( $F_{4,35}=6.621, p<0.001$ )]及社交新穎性 [treatment : ( $F_{4,35}=2.207, p=0.088$ ), cage : ( $F_{1,35}=105.712, p<0.001$ ), interaction : ( $F_{4,35}=12.965, p<0.001$ )]的互動時間。如 Fig.7A 的社交能力結果顯示，K 他命組嗅聞空籠子與陌生鼠的時間無明顯差異，而同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)處理的組別嗅聞陌生鼠的時間有明顯增加，且與嗅聞空籠子的時間有明顯差異。如 Fig.7B 的社交新穎性的結果顯示，K 他命組嗅聞空籠子與陌生鼠的時間無明顯差異，同時給予 sodium benzoate (30 mg/kg)處理的組別

嗅聞陌生鼠的時間有些微增加，但在統計上並無意義；同時給予 sodium benzoate (100 mg/kg)處理的組別嗅聞陌生鼠的時間有明顯增加，且與嗅聞空籠子的時間有明顯差異。因此，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)具有改善 K 他命誘發之社交能力缺失的效果，但只有同時給予 sodium benzoate (100 mg/kg)具有改善 K 他命誘發之社交新穎性缺失的效果。

#### 4. 同時給予重複 sodium benzoate 對於 K 他命在尾部懸吊試驗所誘發之類憂鬱行為的影響

在經過同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)與中劑量 K 他命 (20 mg/kg)後，進行尾部懸吊試驗，觀察同時給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之類憂鬱行為的影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分析小鼠不動的時間 ( $F_{4,35}=78.269$ ,  $p < 0.001$ )。如 Fig.8 顯示，K 他命組相較於控制組的不動時間有明顯上升，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)處理的組別相較於 K 他命組的不動時間有明顯下降的情形。因此，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)皆具有改善 K 他命誘發之類憂鬱行為的效果。

#### 5. 同時重複給予 sodium benzoate 與 K 他命在強迫游泳試驗所誘發之類憂鬱症的影響

在經過同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)與中劑量 K 他命 (20 mg/kg)後，進行強迫游泳試驗，觀察同時給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之類憂鬱症的影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分析小鼠不動的時間 ( $F_{4,35}=5.071$ ,  $p=0.002$ )。如 Fig.9 顯示，K 他命組相較於控制組的不動時間有明顯上升，同時給予 sodium benzoate (30 mg/kg)處理的組別相較於 K 他命組的不動時間有些微下降，但在統計上並無意義；同時給予 sodium benzoate (100 mg/kg)處理的組別相較於 K 他命組的不動時間有明顯下降情形。因此，同時給予 sodium benzoate (100 mg/kg)具有改善 K 他命誘發之類憂鬱行為的效果。

## 6. 同時重複給予 sodium benzoate 對於 K 他命在 DOI 誘導之甩頭反應之高敏感性的影響

在經過同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)與中劑量 K 他命 (20 mg/kg) 後，給予一劑 DOI (1 mg/kg)，進行 DOI 誘導之頭部反應實驗，觀察同時給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發甩頭反應高敏感性的影響，並記錄甩頭次數 (head twitch response)。實驗結束以 Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks 分析小鼠總甩頭次數 ( $F_{4,35}=14.381$ ,  $p<0.001$ )。如 Fig.10 顯示，K 他命組相較於控制組的總甩頭次數有明顯增加，同時給予 sodium benzoate (30 mg/kg)處理的組別相較於 K 他命組的總甩頭次數有下降情形，但無法完全恢復；同時給予 sodium benzoate (100 mg/kg)處理的組別相較於 K 他命組的總甩頭次數有明顯下降情形。因此，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg)皆可降低 K 他命誘導甩頭的敏感性。

## 六、 Sodium benzoate 改善重複暴露中劑量 K 他命後所造成的行為缺失

### 1. 重複暴露 K 他命在新物體辨識能力測試中所誘發之認知損傷的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)14 天後，進行新物體辨識能力測試，觀察 K 他命誘發之認知損傷的影響。實驗結束以 t-test 分別分析其認知係數 (a) sample phase test ( $p=0.628$ )、(b) NLRT ( $p<0.001$ )及 (c) NORT ( $p<0.001$ )。如 Fig.11 顯示，sample phase test 實驗中控制組與 K 他命組碰觸兩個相同物體的時間比例相近，對於兩個相同物體的認知偏好沒有明顯差異。在 NLRT 實驗中 K 他命組的認知係數與控制組相比有明顯差異。在 NORT 實驗中，K 他命組的認知係數與控制組相比有明顯差異。因此，重複暴露中劑量 K 他命確實會造成小鼠認知能力的損傷，後續將會利用此動物模型進行其他實驗。

### 2. Sodium benzoate 對於 K 他命在社交互動行為測試中所誘發之社交能力缺失的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate



(30、100 mg/kg) 後，進行社交互動行為能力測試，觀察後給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之社交能力缺失的影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分析總互動時間 ( $F_{4,35}=31.246, p<0.001$ )。如 Fig.12A 顯示，K 他命組與控制組相比，總互動時間有明顯降低。後給予 sodium benzoate 處理的組別中，sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的總互動時間有明顯上升，並且與 K 他命組有明顯差異。以 Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks 分析各別行為次數：嗅聞 ( $F_{4,35}=32.487, p<0.001$ )、跟隨 ( $H=8.556, p=0.073$ )、攀爬 ( $F_{4,35}=12.608, p<0.001$ )。如 Fig.12B 顯示，K 他命組與控制組相比嗅聞 (sniffing) 次數明顯降低，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的嗅聞次數有明顯回復，並與 K 他命組有明顯差異。跟隨 (following) 行為的次數在不同處理組別的相互比較沒有明顯差異。K 他命組與控制組相比攀爬 (climbing) 行為的次數沒有明顯差異，其中單獨 sodium benzoate (100mg/kg) 組別相較於 K 他命組的攀爬次數有明顯上升情形。

### 3. Sodium benzoate 對於 K 他命在新物體辨識能力測試中所誘發之認知損傷的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，進行新物體辨識能力測試，觀察後給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之認知損傷的影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分別分析其認知係數：sample phase test ( $F_{4,33}=1.057, p=0.393$ )、NLRT ( $F_{4,33}=1.031, p=0.406$ )、NORT ( $F_{4,33}=18.635, p<0.001$ )。如 Fig.13 顯示，sample phase test 實驗中五個組別碰觸兩個相同物體的時間比例相近，對於兩個相同物體的認知偏好沒有明顯差異。在 NLRT 實驗中五個組別碰觸兩個相同物體的時間比例相近，對於兩個相同物體的認知偏好沒有明顯差異。在 NORT 實驗中，K 他命組的認知係數與控制組相比有明顯差異，而後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 則有減緩認知損傷的效果。

#### 4. Sodium benzoate 對於 K 他命在三室社交試驗中所誘發之社交能力與社交新穎性缺失的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，進行三室社交試驗，觀察後給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之社交能力與社交新穎性缺失的影響。實驗結束以 two-way repeated measures ANOVA 分析社交能力 [treatment : ( $F_{4,34}=5.649$ ,  $p=0.001$ ), cage : ( $F_{1,34}=92.353$ ,  $p < 0.001$ ), interaction : ( $F_{4,34}=8.087$ ,  $p < 0.001$ )] 與社交新穎性 [treatment : ( $F_{4,34}=1.468$ ,  $p=0.233$ ), cage : ( $F_{1,34}=77.426$ ,  $p < 0.001$ ), interaction : ( $F_{4,34}=5.531$ ,  $p=0.002$ )] 的互動時時間。如 Fig.14A 的社交能力結果顯示，K 他命組嗅聞空籠子與陌生鼠的時間無明顯差異，後給予 sodium benzoate (30 mg/kg) 處理的組別嗅聞陌生鼠的時間有些微增加，但在統計上並無意義；給予 sodium benzoate (100 mg/kg) 處理的組別嗅聞陌生鼠的時間有明顯增加，且與嗅聞空籠子的時間有明顯差異。如 Fig.14B 的社交新穎性結果顯示，K 他命組嗅聞空籠子與陌生鼠的時間無明顯差異，而後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的組別嗅聞陌生鼠的時間有明顯增加，且與嗅聞空籠子的時間有明顯差異。因此，只有後給予 sodium benzoate (100 mg/kg) 具有改善 K 他命誘發之社交能力缺失的效果，但後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 皆具有改善 K 他命誘發之社交新穎性缺失的效果。

#### 5. Sodium benzoate 對於重複給予 K 他命在尾部懸吊試驗中所誘發之類憂鬱症的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，進行尾部懸吊試驗，觀察後給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之類憂鬱症影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分析小鼠不動的時間 ( $F_{4,34}=21.03$ ,  $p < 0.001$ )。如 Fig.15 顯示，K 他命組相較於控制組的不動時間有明顯上升，後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的組別相較於 K 他命組的不動時間有明顯下降的情形。因此，後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 皆具有改善重複

給予 K 他命誘發之類憂鬱症的效果。

## 6. Sodium benzoate 對於重複給予 K 他命在強迫游泳試驗中所誘發之類憂鬱的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，進行強迫游泳試驗，觀察後給予 sodium benzoate 對於中劑量 K 他命誘發之類憂鬱症影響。實驗結束以 one-way ANOVA 分析小鼠不動的時間 ( $F_{4,34}=2.859, p=0.038$ )。如 Fig16 顯示，K 他命組相較於控制組的不動時間有明顯上升，後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的組別相較於 K 他命組的不動時間有明顯下降情形。因此，同時給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 皆具有改善重複給予 K 他命誘發之類憂鬱行為的效果。

## 7. Sodium benzoate 對於重複給予 K 他命在 DOI 誘導之甩頭反應之高敏感性的影響

經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，給予一劑 DOI (1 mg/kg)，進行 DOI 誘導之甩頭反應實驗，觀察後給予 sodium benzoate 對於 K 他命誘發甩頭反應高敏感性的影響，並記錄甩頭次數 (head twitch response)。實驗結束以 Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks 分析小鼠總甩頭次數 ( $F_{4,33}=33.045, p<0.001$ )。如 Fig.17 顯示，K 他命組相較於控制組的總甩頭次數有明顯增加，後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的組別相較於 K 他命組的總甩頭次數有明顯下降情形。因此，後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 皆可降低 K 他命誘導甩頭的敏感性。

## 七、 檢測重複暴露 K 他命後給予 sodium benzoate 對小鼠腦中突觸相關蛋白表達的影響

### 1. Sodium benzoate 對於 K 他命在後突觸蛋白 PSD-95 的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，進一步檢測其 PSD-95 的表現量。實驗結束以 one-way ANOVA 分析 ( $F_{4,15}=8.779$ ,  $p<0.001$ )。如 Fig.18 顯示組間差異，K 他命組相較於控制組的 PSD-95 表現量有明顯下降的狀況，且統計上具有差異，後給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 處理的組別相較於 K 他命組的 PSD-95 表現量有明顯上升情形，且具有統計差異。

## 2. Sodium benzoate 對於 K 他命在前突觸蛋白 SYN1 的影響

在經過連續暴露中劑量 K 他命 (20 mg/kg)，再連續給予治療藥物 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 後，進一步檢測其 SYN1 的表現量。實驗結束以 one-way ANOVA 分析 ( $F_{4,19}=0.438$ ,  $p=0.779$ )。如 Fig.19 顯示，五個組別的 SYN1 表現量相近，無統計差異。





## 柒、討論

K 他命在不同劑量時具有不同的神經藥理作用，也會導致不一樣的行為狀態，從最早的解離型麻醉劑、產生欣快感的毒品，一直到近期被發現可當作一種抗憂鬱劑。事實上，K 他命在高劑量產生麻醉作用、中劑量會導致類精神病症狀，而低劑量的 K 他命則有是快速有效的抗憂鬱效果。

我們的結果顯示小鼠給予低劑量 K 他命 (10 mg/kg) 在強迫游泳試驗有抗憂鬱的效果，這吻合先前文獻(Owolabi et al., 2014)提到給予低劑量 K 他命可以降低小鼠在強迫游泳試驗中的不動時間(Chen et al., 2017)。給予高劑量 K 他命 (100 mg/kg) 在失去翻正反射試驗中具有麻醉效果，跟先前研究結果相同(Dholakia et al., 2017)。另外，我們的結果發現以急性與亞慢性方式給予中劑量 K 他命 (20 mg/kg) 皆會造成小鼠社交行為缺失、認知記憶損傷，而亞慢性方式給予中劑量 K 他命則會使小鼠產生類憂鬱症行為，先前研究也發現亞慢性給予中劑量 K 他命會造成社交缺失、認知記憶障礙等行為異常(Becker and Grecksch, 2004; Razoux et al., 2007)。

先前研究指出，低劑量 K 他命透過抑制 GABA interneuron 上的 NMDA 受體增加腦部 glutamate 釋放及調控 AMPA 受體活化(Fee et al., 2017)，再藉由 AMPA 受體與 glutamate 相互作用活化 mTOR pathway 相關訊號，活化突觸新生的相關蛋白表達，活化突觸新生與增加突觸密度，進而加強神經元之間的連結來達到抗憂鬱的效果(Li et al., 2010a; Autry et al., 2011; Browne and Lucki, 2013)；高劑量 K 他命 (100 mg/kg) 除了阻斷 NMDA 受體開放通道之外，也會抑制 HCN1-containing channel，其中 HCN 亞基是過極化活化節律點電流的基礎，涉及神經節律的產生，透過抑制 HCN1 通道達到麻醉的效果(Chen et al., 2009)。另外，高劑量 K 他命也會阻斷乙醯膽鹼受體 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChR)，減少通道開放的頻率及時間(Scheller et al., 1996)。總而言之，高劑量 K 他命會作用在多個路徑及通道來達到麻醉的效果；中劑量 K 他命透過結合在 NMDA 受體的 PCP 結合位點進而阻斷多種離子無法正常進入 NMDA 受體，

造成 NMDA 受體功能低下，也會降低 GABAergic 中間神經元的活性而釋放過量的 glutamate，造成一連串神經化學反應紊亂，造成類精神病行為與認知異常的產生 (Homayoun and Moghaddam, 2007)。有相關研究指出，急性給予中劑量 K 他命會增加腦前額葉邊緣迴路中 glutamate 與 dopamine 的含量，與思覺失調症的症狀有相關性 (Rujescu et al., 2006)，這些研究與其他 NMDA 受體拮抗劑有相似的結果 (Stefani and Moghaddam, 2005)。此外，在 NMDA 受體剔除的實驗中也發現，小鼠的神經化學反應及行為皆顯示出類精神病症狀的情形 (Gainetdinov et al., 2001; Belforte et al., 2010)。其中，參與工作記憶與執行功能的前額葉 dopaminergic system 易受到慢性 K 他命的影響 (Narendran et al., 2005)，在影像結果研究中，發現慢性 K 他命使用導致額葉及顳頂葉皮質中的白質發生變化，類似於精神分裂症的腦部變化 (Li et al., 2010b; Liao et al., 2010)。

### 一、Sodium benzoate 對於 K 他命抗憂鬱效果的影響

在臨床與動物研究中皆發現，低劑量 K 他命具有快速且持續的抗憂鬱效果 (Engin et al., 2009; Mathew et al., 2010; Mathew et al., 2012)，但因 K 他命本身還是會造成短暫認知障礙等副作用產生，對於臨床用藥的安全性有疑慮，難以直接使用 K 他命來當作抗憂鬱劑進行治療，所以近期有更多研究在尋找具快速且低副作用的抗憂鬱劑。研究指出，glycine 衍生物 sarcosine 具有抗憂鬱效果，可以降低小鼠在尾部懸吊試驗與強迫游泳試驗中的不動時間 (Huang et al., 2013; Chen et al., 2017)；另外，本實驗室先前的研究發現，NMDA 受體的部分致效劑 (partial agonist) betaine 與 DMG 具有抗憂鬱的效果，可以降低小鼠在強迫游泳試驗中的不動時間，且可加強低劑量 K 他命的抗憂鬱作用 (Lin et al., 2016b; Lin et al., 2016a)

綜合以上研究發現，直接或間接調控 NMDA 受體 glycine 結合位點皆具有抗憂鬱功效。本實驗使用的 sodium benzoate 是一種 DAAO 抑制劑，可以透過增加 D-amino acid 的含量，來間接增強 NMDA 受體的功能。

在我們的實驗中發現，單獨給予 DAAO 抑制劑 sodium benzoate (30 mg/kg, i.p.) 可以降低小鼠在強迫游泳試驗中的不動時間；然而預先給予 sodium benzoate 會使 K 他命原先的抗憂鬱效果減弱。Sodium benzoate 透過調節 NMDA 受體的 glycine 結合位點而達到抗憂鬱的效果，單獨給予具有治療憂鬱相關疾病的潛力。強迫游泳試驗中，然而合併藥物組無論 sodium benzoate 劑量高低，相較於 K 他命組的不動時間皆有上升的情形，對於 K 他命與 sodium benzoate 是否有互相拮抗之作用，需要進一步的做探討並釐清。

## 二、Sodium benzoate 對於急性暴露 K 他命所誘發之社交互動及新物體辨識能力缺失

許多文獻指出，急性給予 NMDA 受體的拮抗劑會產生運動障礙、刻板行為與社交互動缺陷 (Irifune et al., 1995; Sams-Dodd, 1996; Razoux et al., 2007)。在我們的實驗中發現，急性給予 K 他命 (20 mg/kg, i.p.) 可以引起明顯的社交互動缺失。預先給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg, i.p.) 可以減輕急性 K 他命所造成的社交互動缺失，其中 sodium benzoate (30 mg/kg) 雖有改善社交缺失的趨勢，但若給予 sodium benzoate (100 mg/kg) 可以達到更好的效果。在單獨給予 sodium benzoate (100 mg/kg, i.p.) 的情況下，並不會影響社交互動時間及次數。因此推測，急性 K 他命所造成的社交行為缺失可以藉由 sodium benzoate 調節 NMDA 受體來達到改善的效果。

相關研究指出，暴露 K 他命會造成認知功能受損 (Nagy et al., 2015; Ding et al., 2016)。我們的結果顯示，急性給予 K 他命 (20 mg/kg, i.p.) 可以引起明顯認知功能障礙。使用較高劑量 sodium benzoate (100 mg/kg, i.p.) 可以明顯減輕急性 K 他命所引起的認知缺失。因此推測，急性 K 他命所造成的認知障礙可以藉由 sodium benzoate 調節 NMDA 受體來達到改善的效果。

## 三、Sodium benzoate 對於 K 他命麻醉效果的影響

先前文獻指出，K 他命會透過阻斷 NMDA 受體開放通道，減少通道平均的開啟時

間及頻率(Orser et al., 1997)來達到麻醉的效果。在我們的實驗中發現，預先給予高劑量 sodium benzoate (300、600 mg/kg, i.p.)無法影響 K 他命的麻醉起始時間，但是會延長 K 他命的持續麻醉時間，推測 K 他命抑制 NMDA 受體導致麻醉效果不是唯一的原因。研究指出，選擇性剷除 HCN1 通道的小鼠實驗中發現，其誘導失去翻正反射反應所需的 K 他命劑量明顯提高，推測高劑量 K 他命的麻醉機制與 HCN1 通道的抑制具有高度相關性(Zhou et al., 2013)。我們推測 sodium benzoate 或許會與 HCN1 通道產生相互作用，間接或直接影響 K 他命的持續麻醉時間。因此，未來應該進一步研究並釐清 sodium benzoate 影響 K 他命麻醉機制的相關機轉。

#### 四、Sodium benzoate 對於重複暴露 K 他命所誘發之行為異常

許多文獻指出，重複暴露 K 他命會造成社交能力缺失、認知障礙與類憂鬱症行為(Becker and Grecksch, 2004; Nikiforuk and Popik, 2012; Suarez-Santiago et al., 2017)。我們的結果顯示，以亞慢性方式連續給予中劑量 K 他命 (20 mg/kg, i.p.)14 天會造成認知障礙，建立出類精神病症狀的小鼠動物模型。後續進行其他實驗也發現，亞慢性 K 他命會影響正常小鼠的多種行為，造成長久性的傷害。給予 DOI 會增強小鼠的頭部抽蓄反應，其反應與迷幻作用有相關性，DOI 是 5-HT<sub>2A</sub> 受體的作用劑，5-HT<sub>2A</sub> 受體被認為是改變感知而造成幻覺情形的必要條件之一，而 K 他命與 5-HT<sub>2A</sub> 受體具有親和力，為其部分致效劑 (Ki:15  $\mu$ M  $\pm$  5  $\mu$ M)(Kapur and Seeman, 2002)，促使 5-HT<sub>2A</sub> 受體功能增強(Lin et al., 2018)。與亞慢性暴露另一個 NMDA 受體拮抗劑 PCP 相同(Kim et al., 2000; Santini et al., 2013)，K 他命會增強頭部抽蓄反應。此外亞慢性暴露 PCP 增加 DOI 所誘發之前額葉皮質中的早期立即基因 (immediate-early genes, IEGs)表達，但不影響 5-HT<sub>2A</sub> 受體的表現量(Santini et al., 2013)，因此推測亞慢性暴露 K 他命應該也會有類似增加 5-HT<sub>2A</sub> 受體的作用，然而仍有待更進一步證實。

我們認為 sodium benzoate 預先活化 NMDA 受體的情況下，可以減輕亞慢性 K 他命所引起的行為異常，因此，接下來實驗則使用亞慢性 K 他命合併給予 sodium benzoate



(30、100 mg/kg, i.p.)觀察其改善效果。結果顯示，sodium benzoate (30、100 mg/kg)可以減緩亞慢性K他命造成的社交行為缺失，而單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響社交互動時間及次數。在新物體辨識能力試驗中，低劑量sodium benzoate (30 mg/kg)不具有改善的效果，而高劑量sodium benzoate (100 mg/kg)則能明顯回復亞慢性K他命造成的認知障礙，單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響認知係數的改變。在三室社交試驗中的社交能力方面，sodium benzoate (30、100 mg/kg)皆能增加嗅聞、碰觸陌生鼠的時間，具有明顯改善社交能力的效果，但是在社交新穎性方面，sodium benzoate (30 mg/kg)雖具有改善趨勢，但給予sodium benzoate (100 mg/kg)可以達到更顯著的改善效果，而單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響社交能力與社交新穎性。在尾部懸吊試驗中，sodium benzoate (30、100 mg/kg)皆能降低小鼠不動的時間，明顯改善亞慢性K他命造成的類憂鬱症行為；在強迫游泳試驗中，sodium benzoate (30 mg/kg)雖具有改善趨勢，但給予sodium benzoate (100 mg/kg)可以達到更顯著的改善效果，而單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響小鼠不動時間的變化。在DOI誘導頭部抽蓄試驗中，sodium benzoate (30、100 mg/kg)皆有減緩小鼠的頭部抽蓄反應的作用。

我們認為亞慢性暴露K他命後連續給予治療藥物sodium benzoate (30、100 mg/kg, i.p.)來調節NMDA受體亦可得到同樣的效果，實驗發現sodium benzoate可以減輕小鼠社交能力缺失的狀況，而單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響社交互動時間及次數。在新物體辨識能力試驗中，sodium benzoate (30、100 mg/kg, i.p.)皆能提升認知係數，而單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響認知係數的變化。在三室社交試驗中的社交能力方面，低劑量sodium benzoate (30 mg/kg)不具有改善的效果，而高劑量sodium benzoate (100 mg/kg)則能明顯回復亞慢性K他命造成的社交能力缺失；sodium benzoate (30、100 mg/kg)在社交新穎性方面，皆可改善亞慢性K他命造成的損傷，而單獨給予sodium benzoate (100 mg/kg)不會影響社交能力與社交新穎性。在尾部懸吊試驗及強迫游泳試驗中，sodium benzoate (30、100 mg/kg)皆能降低小鼠

不動的時間，明顯改善亞慢性 K 他命造成的類憂鬱症行為，而單獨給予 sodium benzoate (100 mg/kg) 不會影響小鼠不動時間的變化。

在 DOI 誘導頭部抽蓄試驗中，給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 皆有減緩小鼠的頭部抽蓄反應的作用，sodium benzoate 或許是透過改變下游哪些的基因表達來達到改善的效果，未來需進一步做研究並釐清之間相關性。

## 五、 Sodium benzoate 對於重複暴露 K 他命後所誘發的突觸相關蛋白變化

暴露亞慢性 K 他命所造成的行為異常具有持續性，在 K 他命代謝後仍無法恢復正常，推測是因為長期連續暴露 K 他命，持續性的阻斷 NMDA 受體，造成 NMDA 受體功能低下與損傷大量神經元及突觸功能，導致神經傳遞路徑受到嚴重破壞(Ikonomidou et al., 1999; Yan et al., 2014; Ruddy et al., 2015)。據報導，懷孕母鼠暴露 K 他命或新生兒給予 K 他命會造成長期的行為障礙及腦部病變，其中也會改變突觸相關蛋白與神經滋養因子的表現量(Zhao et al., 2014; Zhao et al., 2016; Kokane et al., 2017)。因此假設亞慢性暴露 K 他命亦會影響海馬迴中突觸相關蛋白 PSD-95 與 SYN1 的表現量。我們的結果顯示，亞慢性暴露 K 他命會造成 PSD-95 的表現量明顯下降，給予 sodium benzoate (30、100 mg/kg) 皆有明顯恢復其表現量，而單獨給予 sodium benzoate (100 mg/kg) 不會影響 PSD-95 表現量的變化；SYN1 的表現量在各組之間皆無差異。

Sodium benzoate 除了可以間接活化 NMDA 受體，亦有抗發炎與抗氧化的作用，可以抑制 LPS 誘導增加 iNOS 與 TNF- $\alpha$  的表現量(Brahmachari et al., 2009; Ciardi et al., 2012)。Sodium benzoate 可以上調神經保護蛋白 (neuroprotective protein) Parkin 與 DJ-1，保護帕金森氏症造成的 dopaminergic 神經破壞(Khasnavis and Pahan, 2014)。另外，sodium benzoate 會活化蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 與 cAMP 反應組件蛋白 (cAMP response element binding, CREB)，進而上調神經滋養因子，如 BDNF 與



NT-3 的表現量，有助於改善各種神經退化性疾病(Jana et al., 2013)。我們的研究發現，sodium benzoate 可以減緩急性與亞慢性中劑量 K 他命造成的持續性行為異常，並影響 K 他命低劑量的抗憂鬱與高劑量的麻醉效果。未來，應該更進一步探討並釐清 sodium benzoate 影響這些結果的相關機制。



## 捌、結論

本研究實驗結果發現，sodium benzoate 可以改善急性中劑量 K 他命造成的社交缺失及認知障礙。另外，亞慢性暴露中劑量 K 他命導致社交缺失、認知障礙、類憂鬱症行為與 5-HT<sub>2A</sub> 受體功能改變，能透過合併給予 sodium benzoate 與 K 他命方式與暴露 K 他命後連續給予 sodium benzoate 治療的方式來達到減緩擬精神病行為的效果。以上作用可能與 NMDA 受體的活化有關。此外，sodium benzoate 在 K 他命抗憂鬱與麻醉效果中的影響，可能是透過哪種路徑，需要更進一步的研究確認。



## 玖、參考文獻

### 中文部分

林仁政 (2016)。二甲基甘胺酸與三甲基甘胺酸對於 K 他命誘發抗憂鬱與擬精神病行為之效用 (未出版之博士論文)。國防醫學院，臺北市。

### 英文部分

- Abelaira HM, Reus GZ, Neotti MV, Quevedo J (2014) The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life sciences* 101:10-14.
- Adler CM, Goldberg TE, Malhotra AK, Pickar D, Breier A (1998) Effects of ketamine on thought disorder, working memory, and semantic memory in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 43:811-816.
- Aghajanian GK, Marek GJ (1999) Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21:16s-23s.
- Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM, Hu XS, Cappiello A, Krystal JH (2000) Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Archives of general psychiatry* 57:270-276.
- Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D (1983) The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *British journal of pharmacology* 79:565-575.
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475:91-95.
- Bartlett GR (1948) The inhibition of d-amino acid oxidase by benzoic acid and various monosubstituted benzoic acid derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 70:1010.
- Becker A, Grecksch G (2004) Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 28:1267-1277.
- Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G (2003) Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*

27:687-700.

- Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, Nakazawa K (2010) Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature neuroscience* 13:76-83.
- Bergman SA (1999) Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. *Anesthesia progress* 46:10-20.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:351-354.
- Brahmachari S, Jana A, Pahan K (2009) Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Reduces Microglial and Astroglial Inflammatory Responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 183:5917-5927.
- Breier A, Adler CM, Weisenfeld N, Su TP, Elman I, Picken L, Malhotra AK, Pickar D (1998) Effects of NMDA antagonism on striatal dopamine release in healthy subjects: application of a novel PET approach. *Synapse (New York, NY)* 29:142-147.
- Bridges JW, French MR, Smith RL, Williams RT (1970) The fate of benzoic acid in various species. *The Biochemical journal* 118:47-51.
- Browne CA, Lucki I (2013) Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. *Frontiers in pharmacology* 4:161.
- Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G (2011) Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behavioural brain research* 216:247-254.
- Chen KT, Wu CH, Tsai MH, Wu YC, Jou MJ, Huang CC, Wei IH (2017) Antidepressant-like effects of long-term sarcosine treatment in rats with or without chronic unpredictable stress. *Behavioural brain research* 316:1-10.
- Chen X, Shu S, Bayliss DA (2009) HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:600-609.
- Ciardi C, Jenny M, Tschoner A, Ueberall F, Patsch J, Pedrini M, Ebenbichler C, Fuchs D (2012) Food additives such as sodium sulphite, sodium benzoate and curcumin inhibit leptin release in lipopolysaccharide-treated murine adipocytes in vitro. *The British journal of nutrition* 107:826-833.
- Clarke M, Razmjou S, Prowse N, Dwyer Z, Litteljohn D, Pentz R, Anisman H, Hayley S (2017) Ketamine modulates hippocampal neurogenesis and pro-inflammatory cytokines but not stressor induced neurochemical changes. *Neuropharmacology* 112:210-220.

- D'Souza DC, Ahn K, Bhakta S, Elander J, Singh N, Nadim H, Jatlow P, Suckow RF, Pittman B, Ranganathan M (2012) Nicotine fails to attenuate ketamine-induced cognitive deficits and negative and positive symptoms in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 72:785-794.
- de Bruin NM, Ellenbroek BA, Cools AR, Coenen AM, van Luijtelaar EL (1999) Differential effects of ketamine on gating of auditory evoked potentials and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology* 142:9-17.
- Deakin JF, Lees J, McKie S, Hallak JE, Williams SR, Dursun SM (2008) Glutamate and the neural basis of the subjective effects of ketamine: a pharmaco-magnetic resonance imaging study. *Archives of general psychiatry* 65:154-164.
- Dholakia U, Clark-Price SC, Keating SCJ, Stern AW (2017) Anesthetic effects and body weight changes associated with ketamine-xylazine-lidocaine administered to CD-1 mice. *PLoS one* 12:e0184911.
- Ding R, Li Y, Du A, Yu H, He B, Shen R, Zhou J, Li L, Cui W, Zhang G, Lu Y, Wu X (2016) Changes in hippocampal AMPA receptors and cognitive impairments in chronic ketamine addiction models: another understanding of ketamine CNS toxicity. *Scientific reports* 6:38771.
- Duan TT, Tan JW, Yuan Q, Cao J, Zhou QX, Xu L (2013) Acute ketamine induces hippocampal synaptic depression and spatial memory impairment through dopamine D1/D5 receptors. *Psychopharmacology* 228:451-461.
- Duman RS, Aghajanian GK (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science (New York, NY)* 338:68-72.
- Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in neurosciences* 35:47-56.
- Duman RS, Li N, Liu RJ, Duric V, Aghajanian G (2012) Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62:35-41.
- Ebert B, Mikkelsen S, Thorkildsen C, Borgbjerg FM (1997) Norketamine, the main metabolite of ketamine, is a non-competitive NMDA receptor antagonist in the rat cortex and spinal cord. *European journal of pharmacology* 333:99-104.
- Egerton A, Brugger S, Raffin M, Barker GJ, Lythgoe DJ, McGuire PK, Stone JM (2012) Anterior cingulate glutamate levels related to clinical status following treatment in first-episode schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37:2515-2521.
- Engin E, Treit D, Dickson CT (2009) Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. *Neuroscience* 161:359-369.

- Featherstone RE, Liang Y, Saunders JA, Tatard-Leitman VM, Ehrlichman RS, Siegel SJ (2012) Subchronic ketamine treatment leads to permanent changes in EEG, cognition and the astrocytic glutamate transporter EAAT2 in mice. *Neurobiology of disease* 47:338-346.
- Fee C, Banasr M, Sibille E (2017) Somatostatin-Positive Gamma-Aminobutyric Acid Interneuron Deficits in Depression: Cortical Microcircuit and Therapeutic Perspectives. *Biol Psychiatry* 82:549-559.
- Femenia T, Gomez-Galan M, Lindskog M, Magara S (2012) Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders. *Brain research* 1476:58-70.
- Fujikawa DG (1995) Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 36:186-195.
- Fukumoto K, Iijima M, Chaki S (2016) The Antidepressant Effects of an mGlu2/3 Receptor Antagonist and Ketamine Require AMPA Receptor Stimulation in the mPFC and Subsequent Activation of the 5-HT Neurons in the DRN. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41:1046-1056.
- Gainetdinov RR, Mohn AR, Bohn LM, Caron MG (2001) Glutamatergic modulation of hyperactivity in mice lacking the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11047-11054.
- Geyer MA, Vollenweider FX (2008) Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends in pharmacological sciences* 29:445-453.
- Ghaemi SN (2008) Why antidepressants are not antidepressants: STEP-BD, STAR\*D, and the return of neurotic depression. *Bipolar disorders* 10:957-968.
- Ghasemi M, Raza M, Dehpour AR (2010) NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 24:585-594.
- Gonzalez-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q, Sealfon SC, Gingrich JA (2007) Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* 53:439-452.
- Green SM, Johnson NE (1990) Ketamine sedation for pediatric procedures: Part 2, Review and implications. *Annals of emergency medicine* 19:1033-1046.
- Green SM, Roback MG, Kennedy RM, Krauss B (2011) Clinical practice guideline for emergency department ketamine dissociative sedation: 2011 update. *Annals of emergency medicine* 57:449-461.
- Hirota K, Hashimoto Y, Lambert DG (2002) Interaction of intravenous anesthetics with



- recombinant human M1-M3 muscarinic receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *Anesthesia and analgesia* 95:1607-1610, table of contents.
- Homayoun H, Moghaddam B (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:11496-11500.
- Howley E et al. (2017) Assessment of the Target Engagement and D-Serine Biomarker Profiles of the D-Amino Acid Oxidase Inhibitors Sodium Benzoate and PGM030756. *Neurochemical research* 42:3279-3288.
- Huang CC, Wei IH, Huang CL, Chen KT, Tsai MH, Tsai P, Tun R, Huang KH, Chang YC, Lane HY, Tsai GE (2013) Inhibition of glycine transporter-I as a novel mechanism for the treatment of depression. *Biol Psychiatry* 74:734-741.
- Hustveit O, Maurset A, Oye I (1995) Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. *Pharmacology & toxicology* 77:355-359.
- Ibrahim L, Diazgranados N, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Baumann J, Mallinger AG, Zarate CA, Jr. (2011) Rapid decrease in depressive symptoms with an N-methyl-d-aspartate antagonist in ECT-resistant major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35:1155-1159.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science (New York, NY)* 283:70-74.
- Imre G, Fokkema DS, Den Boer JA, Ter Horst GJ (2006) Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain research bulletin* 69:338-345.
- Irifune M, Shimizu T, Nomoto M, Fukuda T (1995) Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 51:291-296.
- Irifune M, Sato T, Kamata Y, Nishikawa T, Dohi T, Kawahara M (2000) Evidence for GABA(A) receptor agonistic properties of ketamine: convulsive and anesthetic behavioral models in mice. *Anesthesia and analgesia* 91:230-236.
- Irwin SA, Iglewicz A (2010) Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. *Journal of palliative medicine* 13:903-908.
- Jana A, Modi KK, Roy A, Anderson JA, van Breemen RB, Pahan K (2013)

- Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:739-755.
- Jernigan CS, Goswami DB, Austin MC, Iyo AH, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B (2011) The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35:1774-1779.
- Kamiyama H, Matsumoto M, Otani S, Kimura SI, Shimamura KI, Ishikawa S, Yanagawa Y, Togashi H (2011) Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience* 177:159-169.
- Kapur S, Seeman P (2002) NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia. *Molecular psychiatry* 7:837-844.
- Khasnavis S, Pahan K (2014) Cinnamon treatment upregulates neuroprotective proteins Parkin and DJ-1 and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 9:569-581.
- Kilts CD (2001) The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50:845-855.
- Kim HS, Park IS, Lim HK, Choi HS, Oh S, Park WK, Jang CG, Kim SH, Chang MJ (2000) N-Methyl-D-aspartate receptor antagonists enhance the head-twitch response, a 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor-mediated behaviour, in reserpine-treated mice. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 52:717-722.
- Kohrs R, Durieux ME (1998) Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesthesia and analgesia* 87:1186-1193.
- Koike H, Iijima M, Chaki S (2011) Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behavioural brain research* 224:107-111.
- Kokane SS, Gong K, Jin J, Lin Q (2017) Prolonged ketamine exposure induces increased activity of the GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptor in the anterior cingulate cortex of neonatal rats. *Neurotoxicology and teratology* 63:1-8.
- Krebs HA, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, Bedoya F (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *The Biochemical journal* 214:657-663.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, et al. (1994a) Subanesthetic effects of the noncompetitive nmda antagonist, ketamine, in humans: Psychotomimetic,

- perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994b) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of general psychiatry* 51:199-214.
- Kubota K, Ishizaki T (1991) Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. *European journal of clinical pharmacology* 41:363-368.
- Lahti AC, Holcomb HH, Medoff DR, Tamminga CA (1995) Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport* 6:869-872.
- Lai CH, Lane HY, Tsai GE (2012) Clinical and cerebral volumetric effects of sodium benzoate, a D-amino acid oxidase inhibitor, in a drug-naive patient with major depression. *Biol Psychiatry* 71:e9-e10.
- Leonard JV, Morris AA (2002) Urea cycle disorders. *Seminars in neonatology* : SN 7:27-35.
- Li CR, Zhang S, Hung CC, Chen CM, Duann JR, Lin CP, Lee TS (2017) Depression in chronic ketamine users: Sex differences and neural bases. *Psychiatry research Neuroimaging* 269:1-8.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010a) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science (New York, NY)* 329:959-964.
- Li Q, Cheung C, Wei R, Cheung V, Hui ES, You Y, Wong P, Chua SE, McAlonan GM, Wu EX (2010b) Voxel-based analysis of postnatal white matter microstructure in mice exposed to immune challenge in early or late pregnancy. *NeuroImage* 52:1-8.
- Li X, Tizzano JP, Griffey K, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P (2001) Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). *Neuropharmacology* 40:1028-1033.
- Liao Y, Tang J, Ma M, Wu Z, Yang M, Wang X, Liu T, Chen X, Fletcher PC, Hao W (2010) Frontal white matter abnormalities following chronic ketamine use: a diffusion tensor imaging study. *Brain : a journal of neurology* 133:2115-2122.
- Liebrenz M, Stohler R, Borgeat A (2009) Repeated intravenous ketamine therapy in a patient with treatment-resistant major depression. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of*

- Biological Psychiatry 10:640-643.
- Liebrenz M, Borgeat A, Leisinger R, Stohler R (2007) Intravenous ketamine therapy in a patient with a treatment-resistant major depression. *Swiss medical weekly* 137:234-236.
- Lin H, Kim JG, Park SW, Noh HJ, Kim JM, Yoon CY, Woo NS, Kim B, Il Cho S, Choi BH, Sung DJ, Bae YM (2018) Enhancement of 5-HT<sub>2A</sub> receptor function and blockade of Kv1.5 by MK801 and ketamine: implications for PCP derivative-induced disease models. *Experimental & molecular medicine* 50:47.
- Lin JC, Lee MY, Chan MH, Chen YC, Chen HH (2016a) Betaine enhances antidepressant-like, but blocks psychotomimetic effects of ketamine in mice. *Psychopharmacology* 233:3223-3235.
- Lin JC, Chan MH, Lee MY, Chen YC, Chen HH (2016b) N,N-dimethylglycine differentially modulates psychotomimetic and antidepressant-like effects of ketamine in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 71:7-13.
- Lindfors N, Barati S, O'Connor WT (1997) Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain research* 759:205-212.
- Liu RJ, Fuchikami M, Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS, Aghajanian GK (2013) GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38:2268-2277.
- Lodge D, Mercier MS (2015) Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. *British journal of pharmacology* 172:4254-4276.
- MacDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P (1987) Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *Journal of neurophysiology* 58:251-266.
- MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, Schneiderman JH, Pennefather PS (1991) Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *The Journal of physiology* 432:483-508.
- Maeng S, Zarate CA, Jr., Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. *Biological Psychiatry* 63:349-352.
- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A (1996) NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in

- healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 14:301-307.
- Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A (1997) Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 17:141-150.
- Mathew SJ, Murrough JW, van den Heuvel PA, Collins KA, Reich DL, Charney DS (2010) Riluzole for relapse prevention following intravenous ketamine in treatment-resistant depression: a pilot randomized, placebo-controlled continuation trial. *The international journal of neuropsychopharmacology* 13:71-82.
- Mathew SJ, Shah A, Lapidus K, Clark C, Jarun N, Ostermeyer B, Murrough JW (2012) Ketamine for treatment-resistant unipolar depression: current evidence. *CNS drugs* 26:189-204.
- Moaddel R, Abdrakhmanova G, Kozak J, Jozwiak K, Toll L, Jimenez L, Rosenberg A, Tran T, Xiao Y, Zarate CA, Wainer IW (2013) Sub-anesthetic concentrations of (R,S)-ketamine metabolites inhibit acetylcholine-evoked currents in  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *European journal of pharmacology* 698:228-234.
- Modi KK, Roy A, Brahmachari S, Rangasamy SB, Pahan K (2015) Cinnamon and Its Metabolite Sodium Benzoate Attenuate the Activation of p21<sup>rac</sup> and Protect Memory and Learning in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *PloS one* 10:e0130398.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 17:2921-2927.
- Moore KA, Sklerov J, Levine B, Jacobs AJ (2001) Urine concentrations of ketamine and norketamine following illegal consumption. *Journal of analytical toxicology* 25:583-588.
- Morgan CJ, Mofeez A, Brandner B, Bromley L, Curran HV (2004) Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 29:208-218.
- Nagy LR, Featherstone RE, Hahn CG, Siegel SJ (2015) Delayed emergence of behavioral and electrophysiological effects following juvenile ketamine



- exposure in mice. *Translational psychiatry* 5:e635.
- Nair B (2001) Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *International journal of toxicology* 20 Suppl 3:23-50.
- Narendran R, Frankle WG, Keefe R, Gil R, Martinez D, Slifstein M, Kegeles LS, Talbot PS, Huang Y, Hwang DR, Khenissi L, Cooper TB, Laruelle M, Abi-Dargham A (2005) Altered prefrontal dopaminergic function in chronic recreational ketamine users. *The American journal of psychiatry* 162:2352-2359.
- Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW (1999) Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 20:106-118.
- Nikiforuk A, Popik P (2012) Effects of quetiapine and sertindole on subchronic ketamine-induced deficits in attentional set-shifting in rats. *Psychopharmacology* 220:65-74.
- Nishimura M, Sato K, Okada T, Yoshiya I, Schloss P, Shimada S, Tohyama M (1998) Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Anesthesiology* 88:768-774.
- Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, Yamashiro M, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S (2014) Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex. *The international journal of neuropsychopharmacology* 17:1321-1326.
- Orser BA, Pennefather PS, MacDonald JF (1997) Multiple mechanisms of ketamine blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Anesthesiology* 86:903-917.
- Owolabi RA, Akanmu MA, Adeyemi OI (2014) Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on fluoxetine-induced antidepressant-related behavior using the forced swimming test. *Neuroscience letters* 566:172-176.
- Pacheco Dda F, Romero TR, Duarte ID (2014) Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and mu- and delta-opioid receptors. *Brain research* 1562:69-75.
- Phelps LE, Brutsche N, Moral JR, Luckenbaugh DA, Manji HK, Zarate CA, Jr. (2009) Family history of alcohol dependence and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Biol Psychiatry* 65:181-184.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology* 47:379-391.
- Rajagopal L, Burgdorf JS, Moskal JR, Meltzer HY (2016) GLYX-13 (rapastinel) ameliorates subchronic phencyclidine- and ketamine-induced declarative



- memory deficits in mice. *Behavioural brain research* 299:105-110.
- Razoux F, Garcia R, Lena I (2007) Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32:719-727.
- Reynolds IJ, Miller RJ (1988) Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. *British journal of pharmacology* 95:95-102.
- Rowland LM, Beason-Held L, Tamminga CA, Holcomb HH (2010) The interactive effects of ketamine and nicotine on human cerebral blood flow. *Psychopharmacology* 208:575-584.
- Ruddy RM, Chen Y, Milenkovic M, Ramsey AJ (2015) Differential effects of NMDA receptor antagonism on spine density. *Synapse (New York, NY)* 69:52-56.
- Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohl F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Moller HJ, Grunze H (2006) A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry* 59:721-729.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M (2006) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*D report. *The American journal of psychiatry* 163:1905-1917.
- Ryan A, Baker A, Dark F, Foley S, Gordon A, Hatherill S, Stathis S, Saha S, Bruxner G, Beckman M, Richardson D, Berk M, Dean O, McGrath J, Group CW, Scott J (2017) The efficacy of sodium benzoate as an adjunctive treatment in early psychosis - CADENCE-BZ: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 18:165.
- Sams-Dodd F (1996) Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats: a possible animal model of schizophrenia. *Behavioural pharmacology* 7:3-23.
- Santini MA, Ratner C, Aznar S, Klein AB, Knudsen GM, Mikkelsen JD (2013) Enhanced prefrontal serotonin 2A receptor signaling in the subchronic phencyclidine mouse model of schizophrenia. *J Neurosci Res* 91:634-641.
- Scaglia F, Carter S, O'Brien WE, Lee B (2004) Effect of alternative pathway therapy on branched chain amino acid metabolism in urea cycle disorder patients. *Molecular genetics and metabolism* 81 Suppl 1:S79-85.
- Scheller M, Bufler J, Hertle I, Schneck HJ, Franke C, Kochs E (1996) Ketamine blocks

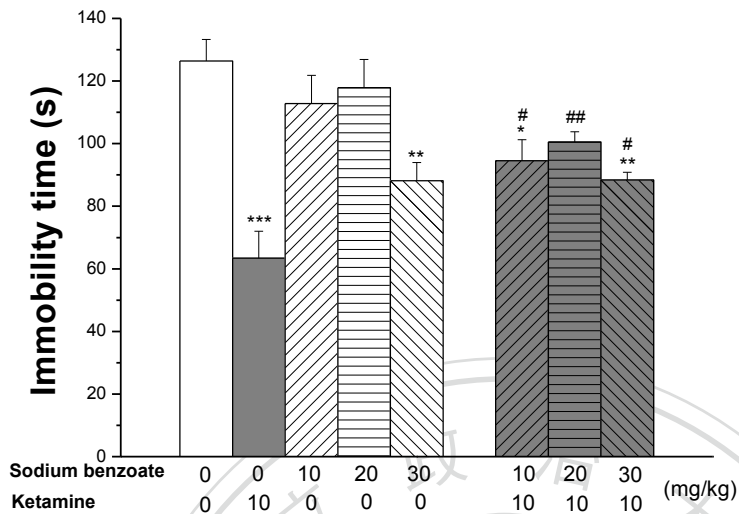
- currents through mammalian nicotinic acetylcholine receptor channels by interaction with both the open and the closed state. *Anesthesia and analgesia* 83:830-836.
- Schneider PG, Rodriguez de Lores Arnaiz G (2013) Ketamine prevents seizures and reverses changes in muscarinic receptor induced by bicuculline in rats. *Neurochemistry international* 62:258-264.
- Sernagor E, Kuhn D, Vyklicky L, Jr., Mayer ML (1989) Open channel block of NMDA receptor responses evoked by tricyclic antidepressants. *Neuron* 2:1221-1227.
- Shahani R, Streutker C, Dickson B, Stewart RJ (2007) Ketamine-associated ulcerative cystitis: a new clinical entity. *Urology* 69:810-812.
- Shapiro M (2001) Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Archives of neurology* 58:874-881.
- Sinner B, Graf BM (2008) Ketamine. *Handbook of experimental pharmacology*:313-333.
- Stefani MR, Moghaddam B (2005) Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57:433-436.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85:367-370.
- Suarez-Santiago JE, Briones-Aranda A, Espinosa-Raya J, Picazo O (2017) Agonist E-6837 and antagonist SB-271046 of 5-HT6 receptors both reverse the depressive-like effect induced in mice by subchronic ketamine administration. *Behavioural pharmacology* 28:582-585.
- Tan S, Rudd JA, Yew DT (2011) Gene expression changes in GABA(A) receptors and cognition following chronic ketamine administration in mice. *PloS one* 6:e21328.
- Thase ME, Haight BR, Richard N, Rockett CB, Mitton M, Modell JG, VanMeter S, Harriett AE, Wang Y (2005) Remission rates following antidepressant therapy with bupropion or selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis of original data from 7 randomized controlled trials. *The Journal of clinical psychiatry* 66:974-981.
- Toth B (1984) Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 4:494-496.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical

- practice. *The American journal of psychiatry* 163:28-40.
- Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European journal of pharmacology* 185:1-10.
- Van den Berghe-Snorek S, Stankovich MT (1985) Thermodynamic control of D-amino acid oxidase by benzoate binding. *The Journal of biological chemistry* 260:3373-3379.
- Veliskova J, Velisek L, Mares P, Rokyta R (1990) Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 37:667-674.
- Wang D, Zhang X, Ye JN, Jia XB, Yang TD (2009) [Effect of orexin-A on recovery from ketamine anesthesia in aged rats]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 29:936-938.
- Watanabe M, Yoshikawa M, Takeyama K, Hashimoto A, Kobayashi H, Suzuki T (2010) Subchronic administration of ketamine decreases the mRNA expression of serine racemase in rat brain. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* 35:137-143.
- Watanabe Y, Saito H, Abe K (1993) Tricyclic antidepressants block NMDA receptor-mediated synaptic responses and induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 32:479-486.
- White PF, Ham J, Way WL, Trevor AJ (1980) Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology* 52:231-239.
- Wiescholleck V, Manahan-Vaughan D (2013) Persistent deficits in hippocampal synaptic plasticity accompany losses of hippocampus-dependent memory in a rodent model of psychosis. *Frontiers in integrative neuroscience* 7:12.
- Yan J, Huang Y, Lu Y, Chen J, Jiang H (2014) Repeated administration of ketamine can induce hippocampal neurodegeneration and long-term cognitive impairment via the ROS/HIF-1 $\alpha$  pathway in developing rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 33:1715-1732.
- Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA, Jr., Gould TD (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* 533:481-486.
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of general psychiatry* 63:856-864.

- Zhao T, Li Y, Wei W, Savage S, Zhou L, Ma D (2014) Ketamine administered to pregnant rats in the second trimester causes long-lasting behavioral disorders in offspring. *Neurobiology of disease* 68:145-155.
- Zhao T, Li C, Wei W, Zhang H, Ma D, Song X, Zhou L (2016) Prenatal ketamine exposure causes abnormal development of prefrontal cortex in rat. *Scientific reports* 6:26865.
- Zhou C, Douglas JE, Kumar NN, Shu S, Bayliss DA, Chen X (2013) Forebrain HCN1 channels contribute to hypnotic actions of ketamine. *Anesthesiology* 118:785-795.



## 壹拾、圖表

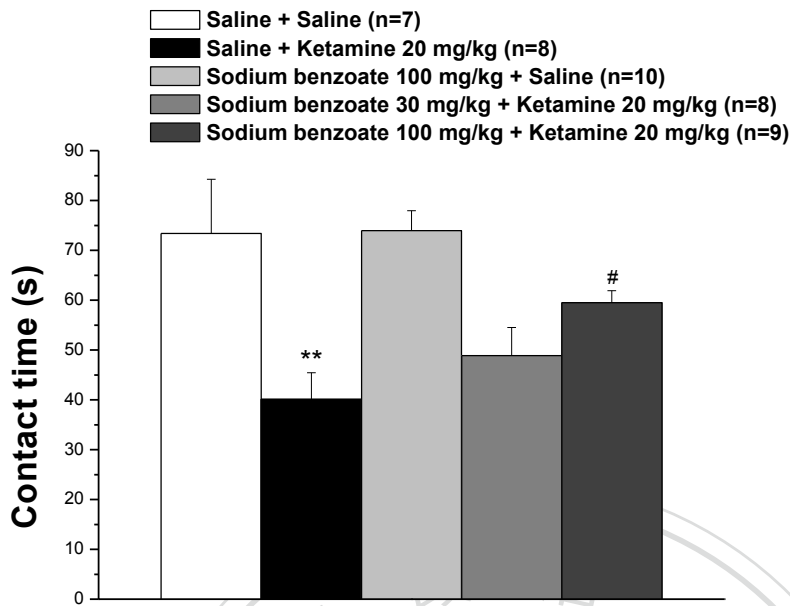


**Figure 1. Effects of sodium benzoate and ketamine on the immobility in forced swimming test.**

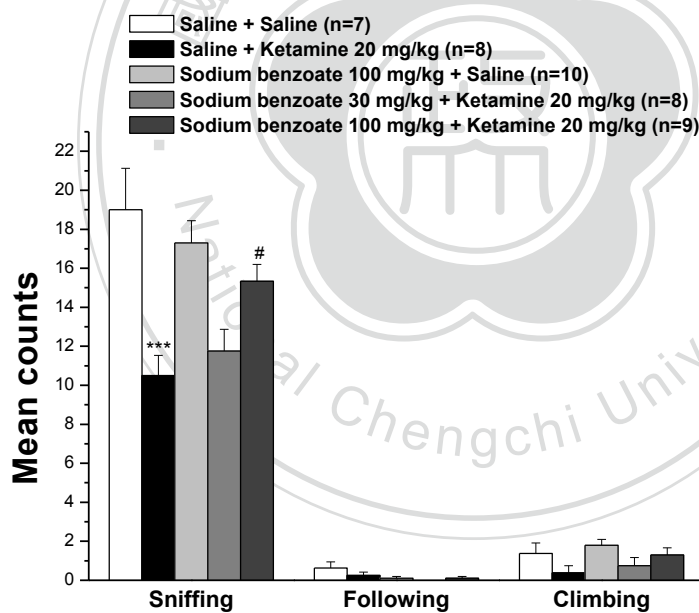
Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  as compared with control group. ##  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$  as compared with ketamine treatment.



(A)



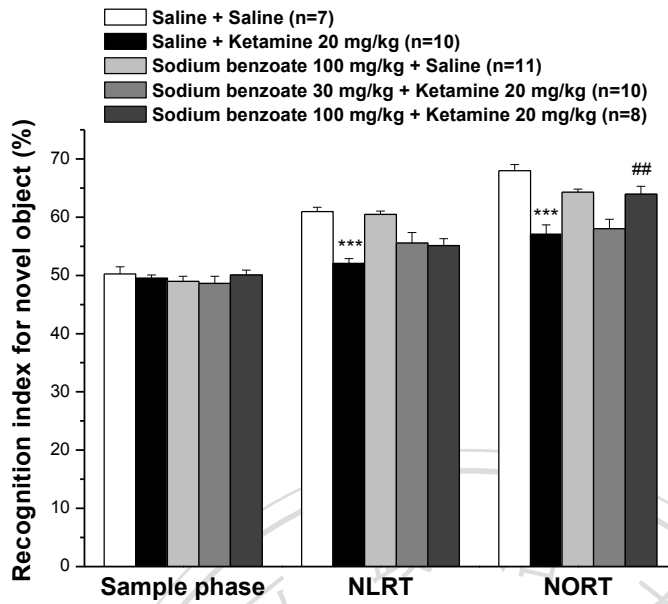
(B)



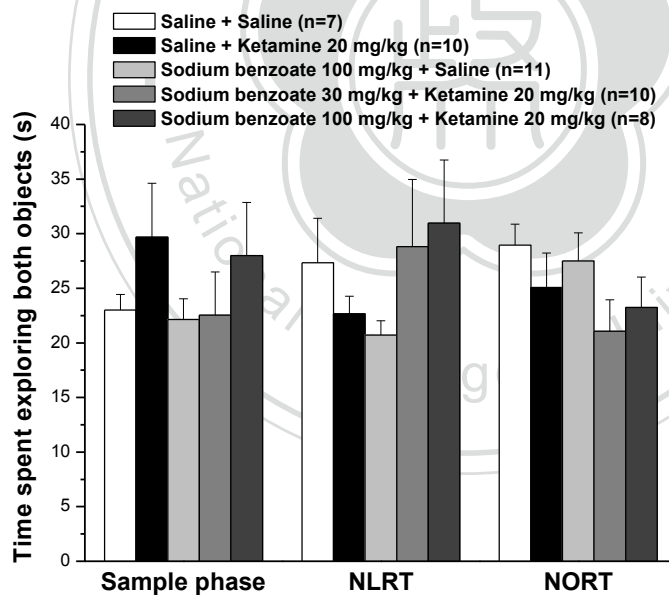
**Figure 2. Effects of sodium benzoate on acute ketamine-induced social deficits in the social interaction test.**

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks follow by Student-Newman-Keuls and Dunn's post hoc test. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  as compared with control group. # $P < 0.05$  as compared with ketamine treatment.

(A)



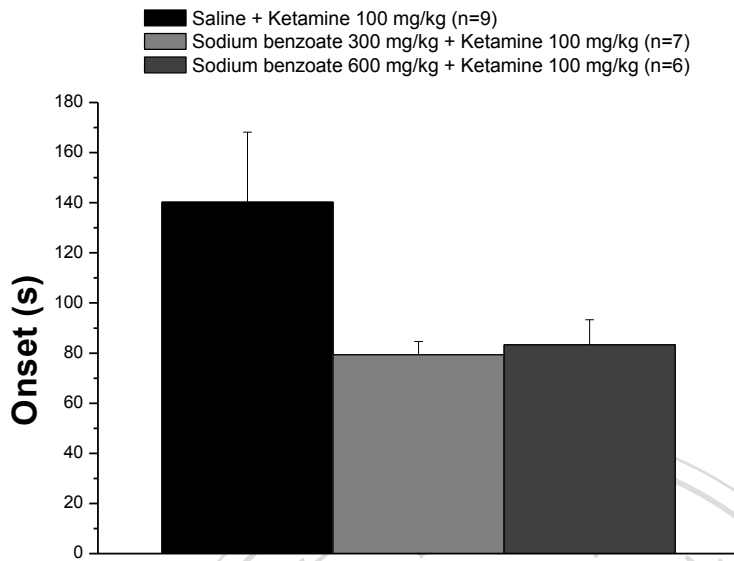
(B)



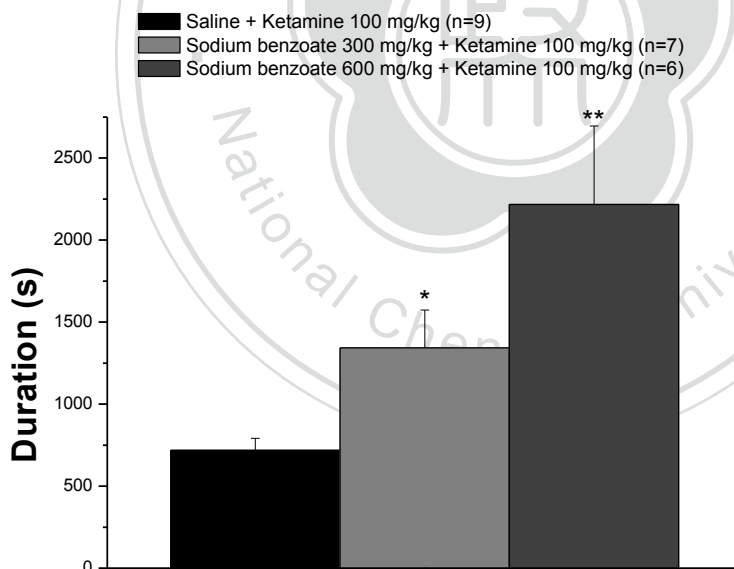
**Figure 3. Effects of sodium benzoate on acute ketamine-induced recognition memory impairment in the novel object recognition task.**

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\*\* $P < 0.001$  as compared with control group. ## $P < 0.01$  as compared with ketamine treatment.

(A)



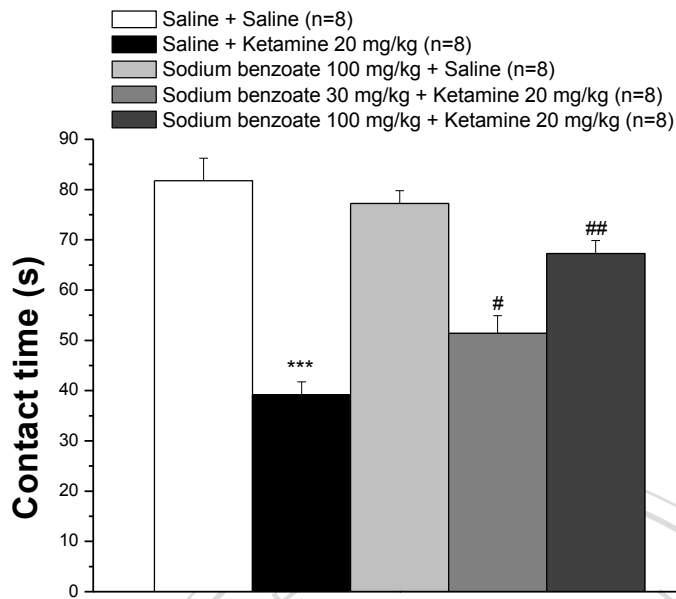
(B)



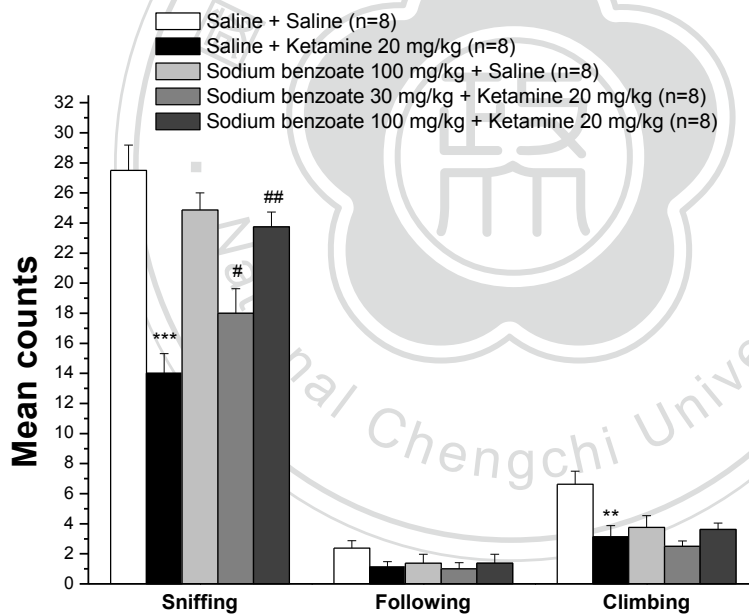
**Figure 4. Effects of sodium benzoate on the onset (A) and duration (B) of ketamine-induced loss of righting reflex.**

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  as compared with ketamine group.

(A)



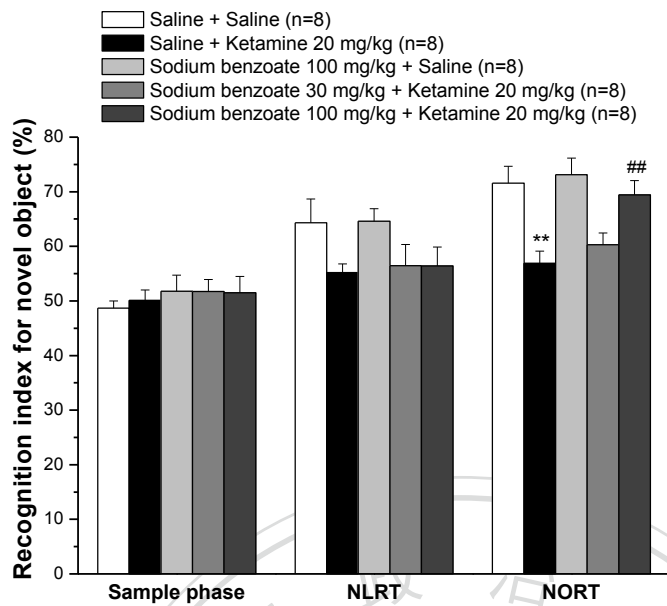
(B)



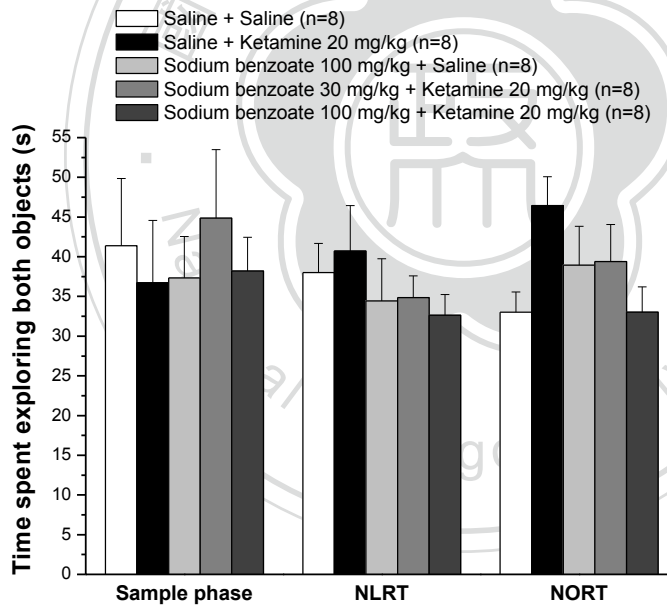
**Figure 5. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on social deficits in the social interaction test.**

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks follow by Student-Newman-Keuls and Dunn's post hoc test. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$  as compared with control group. ##  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$  as compared with ketamine treatment.

(A)



(B)

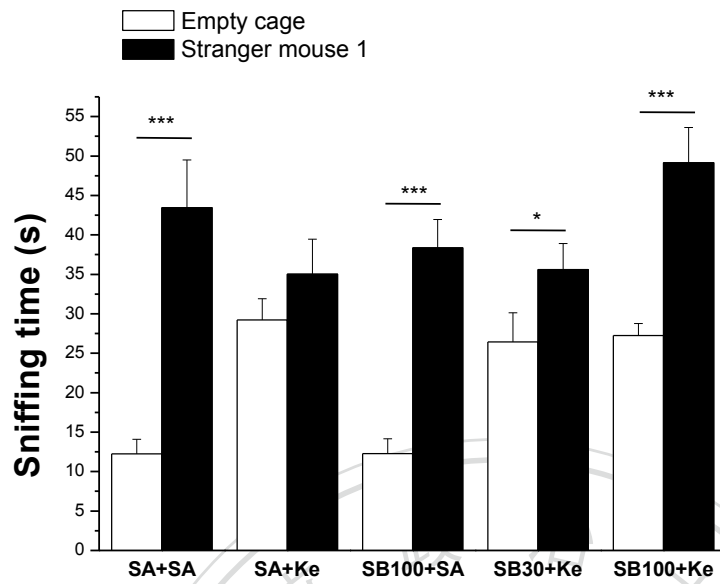


**Figure 6. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on recognition memory impairment in the novel object recognition task.**

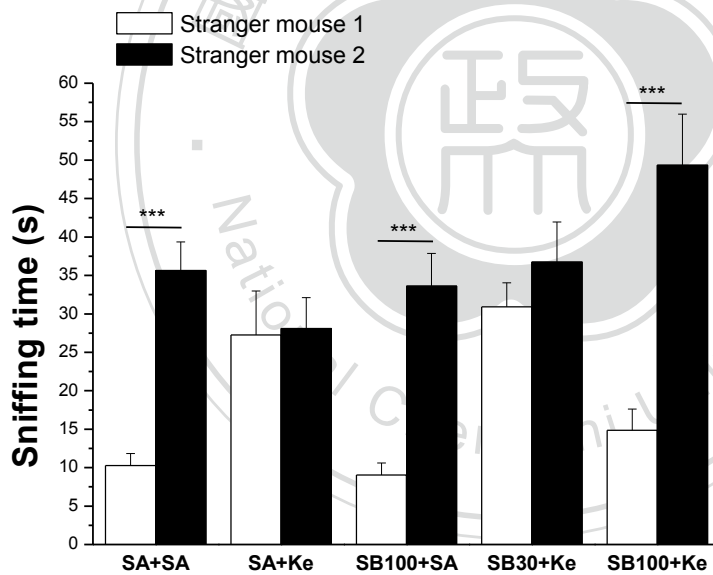
Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\*P<0.01 as compared with control group. ##P<0.01 as compared with ketamine treatment.



(A)

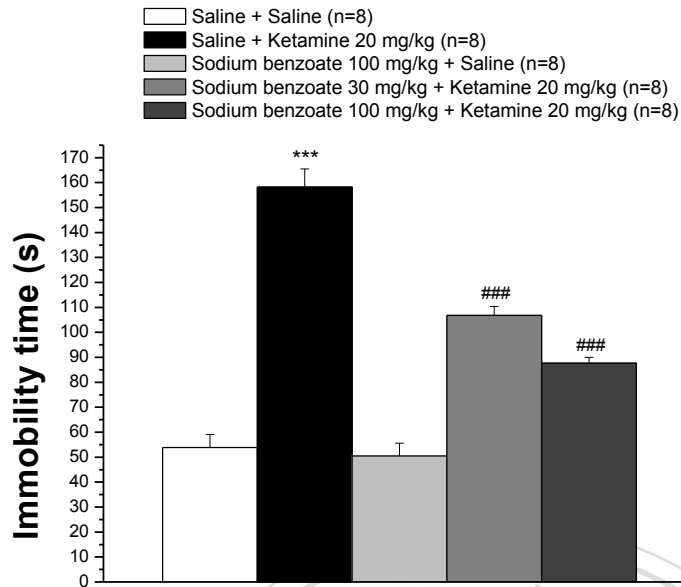


(B)



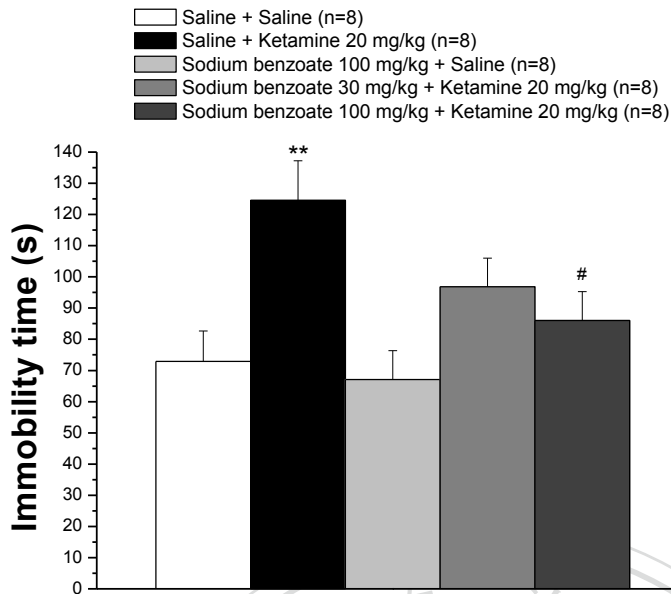
**Figure 7. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on impairment of sociability (A) and social novelty (B) in the three-chamber social test.**

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by two-way repeated measures ANOVA and post-hoc Fisher LSD test. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$  sniffing time with stranger mouse 1, compare to empty cage(A) or stranger mouse 2(B).



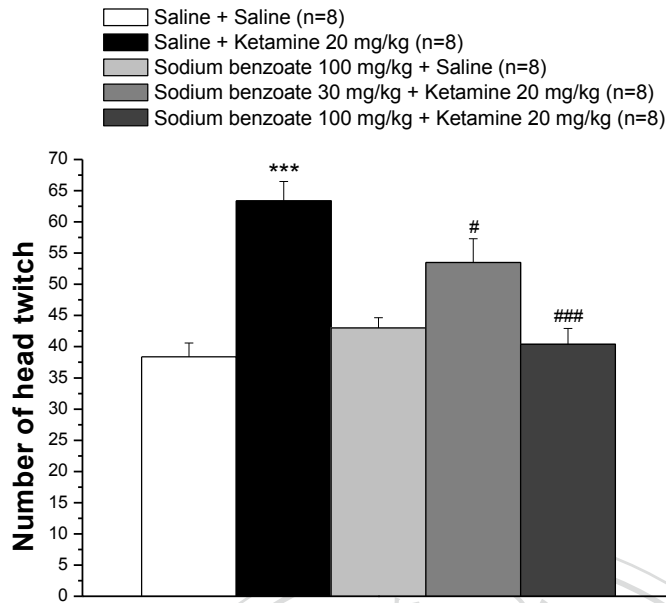
**Figure 8. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on depression-like behavior in the tail suspension test.**

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with control group. ###  $P < 0.001$  compared with ketamine treatment.



**Figure 9. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on depression-like behavior in the forced swimming test.**

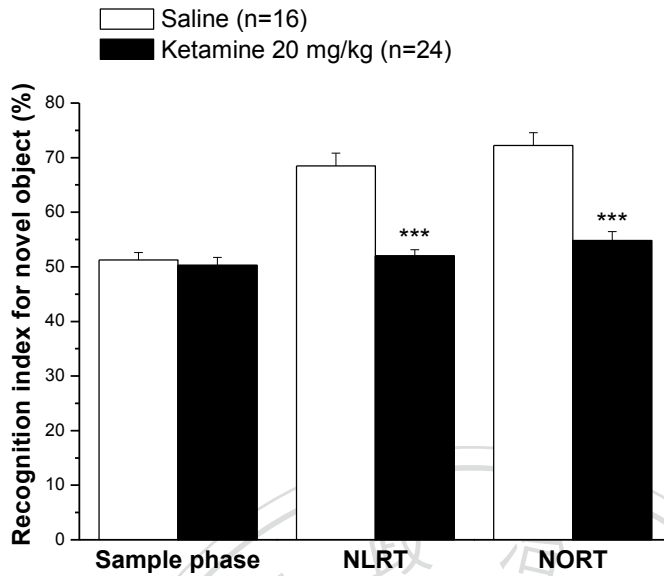
Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\* $P < 0.01$  as compared with control group. # $P < 0.05$  compared with ketamine treatment.



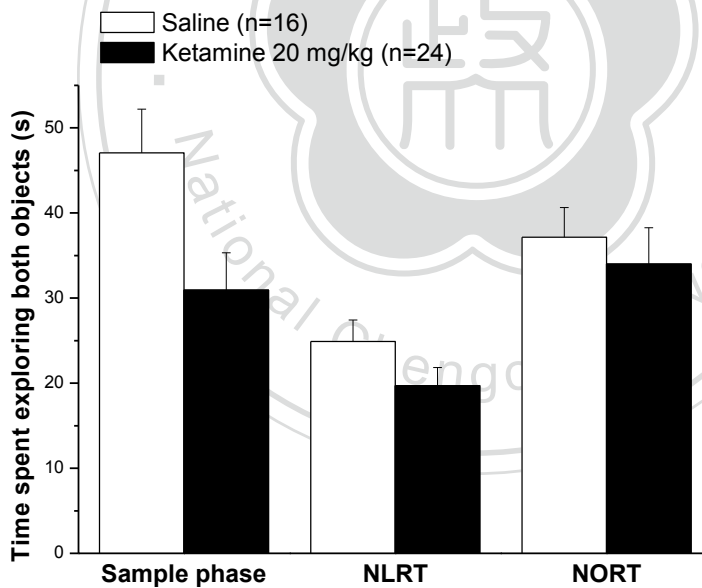
**Figure 10. Effects of repeated co-treatment of sodium benzoate with ketamine on DOI-induced head twitch response.**

After withdrawal from drug treatment for at least 20 days, head twitch response was measured for 30 min immediately after administration of DOI (1 mg/kg, i.p.). Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks and post-hoc Dunn's test. \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with control group. ###  $P < 0.001$ , #  $P < 0.05$  compared with ketamine treatment.

(A)



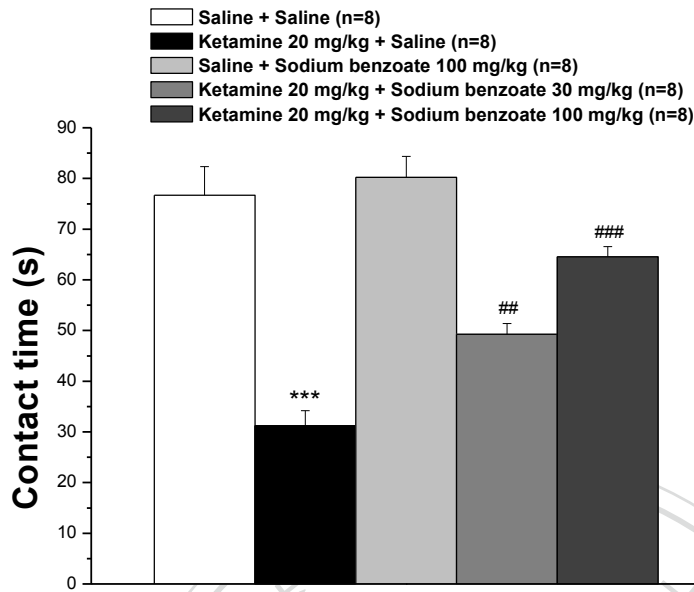
(B)



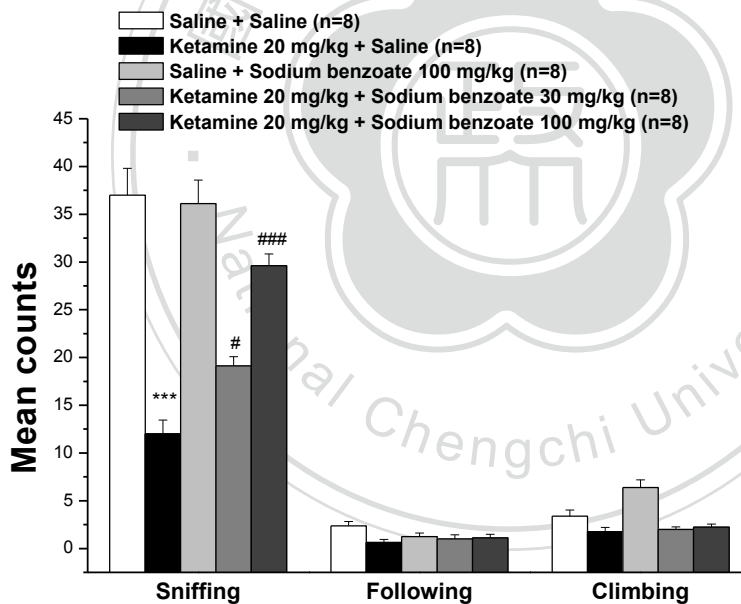
**Figure 11. Effects of subchronic ketamine-induced recognition memory impairment in the novel object recognition task.**

Novel object recognition task was tested after toluene treatment for 14 days. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by t-test. \*\*\* $P < 0.001$  as compared with control group.

(A)



(B)

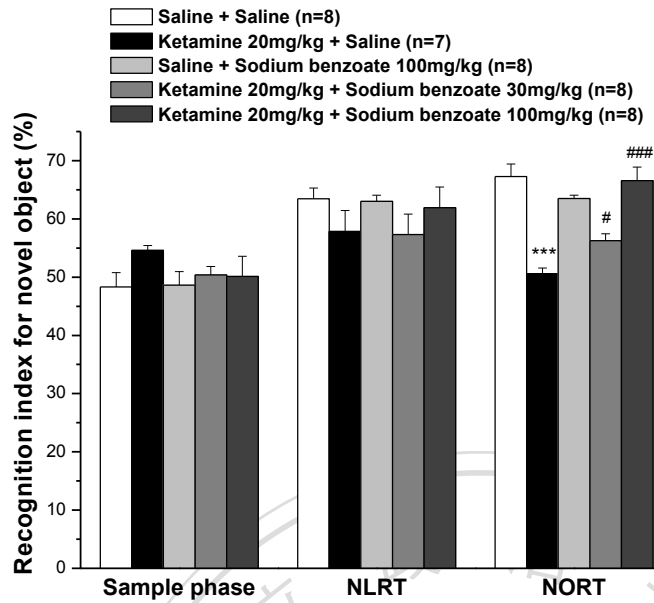


**Figure 12. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced social deficits in the social interaction test.**

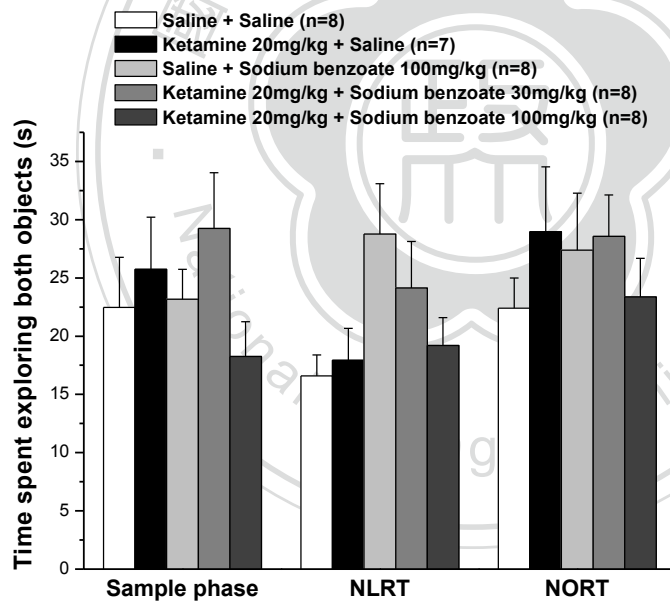
Sodium benzoate (one injection/day) was administered to mice 14 days after final administration of saline or ketamine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks follow by Student-Newman-Keuls and Dunn's post hoc test. \*\*\* $P < 0.001$  as compared with control group. ### $P < 0.001$ , ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$  as compared with ketamine treatment.



(A)



(B)

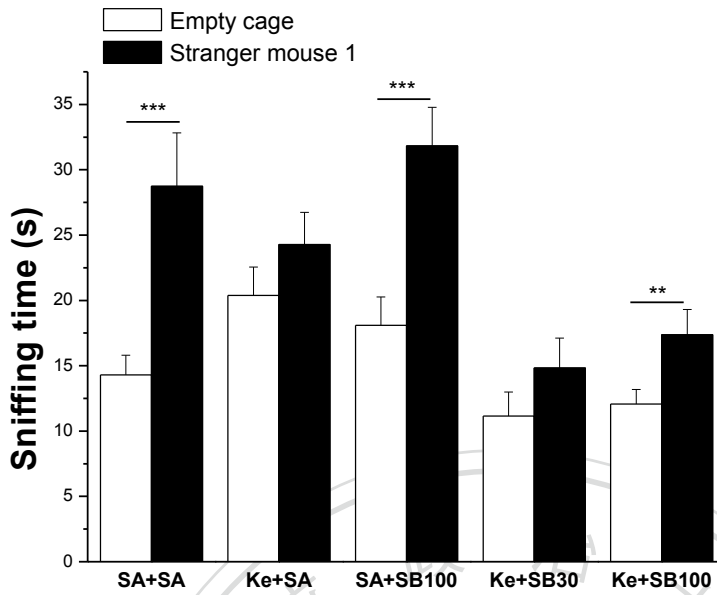


**Figure 13. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced recognition memory impairment in the novel object recognition task.**

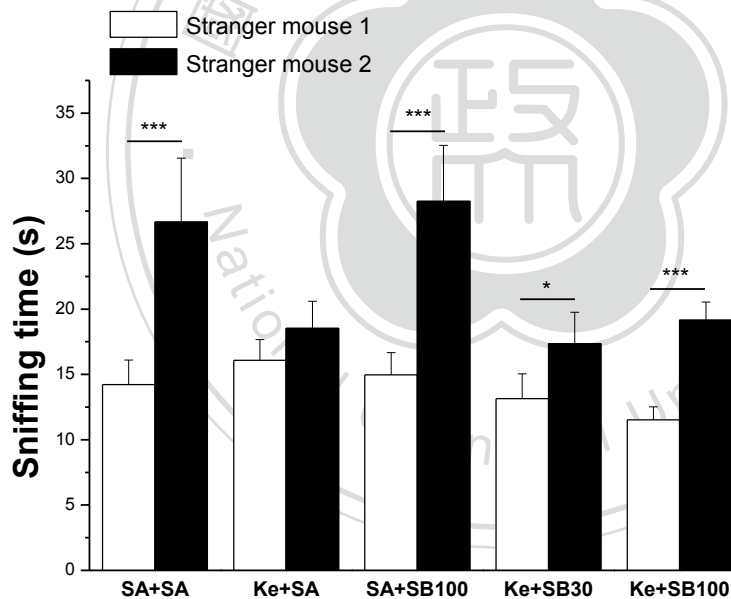
Sodium benzoate (one injection/day) was administered to mice 14 days after final administration of saline or ketamine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test.

\*\*\* $P < 0.001$  as compared with control group. #### $P < 0.001$ , ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$  as compared with ketamine treatment.

(A)

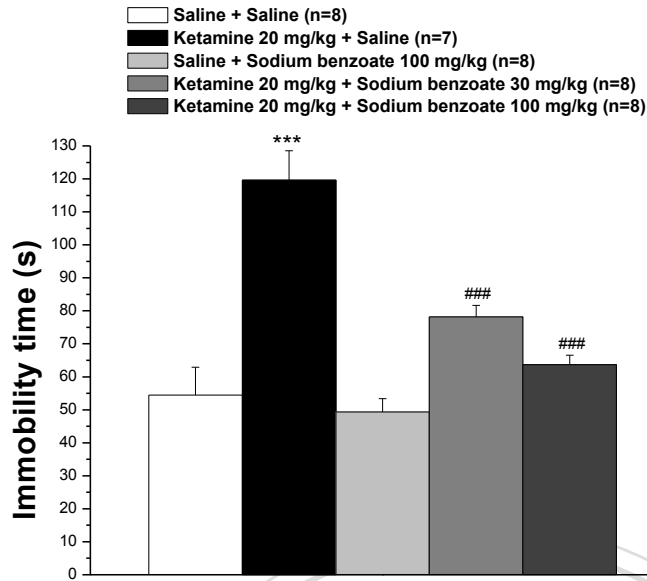


(B)



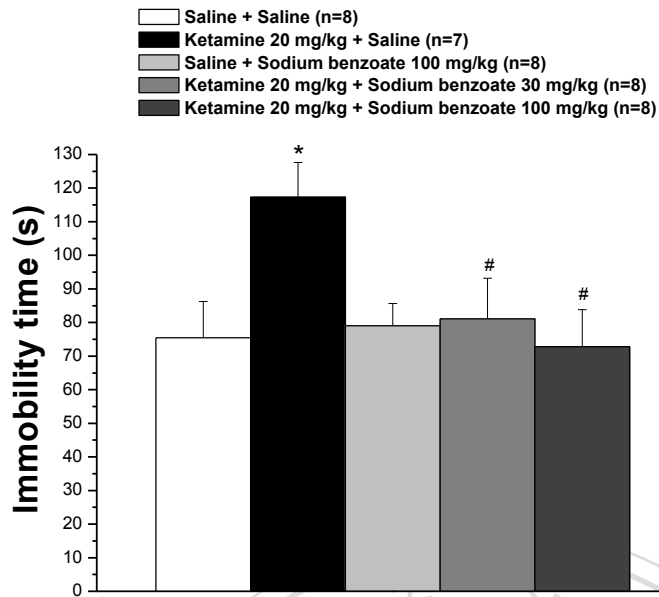
**Figure 14. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced impairment of sociability (A) and social novelty (B) in the three-chamber social test.**

Sodium benzoate (one injection/day) was administered to mice 14 days after final administration of saline or ketamine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by two-way repeated measures ANOVA and post-hoc Fisher LSD test. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  sniffing time with stranger mouse 1, compare to empty cage(A) or stranger mouse 2(B).



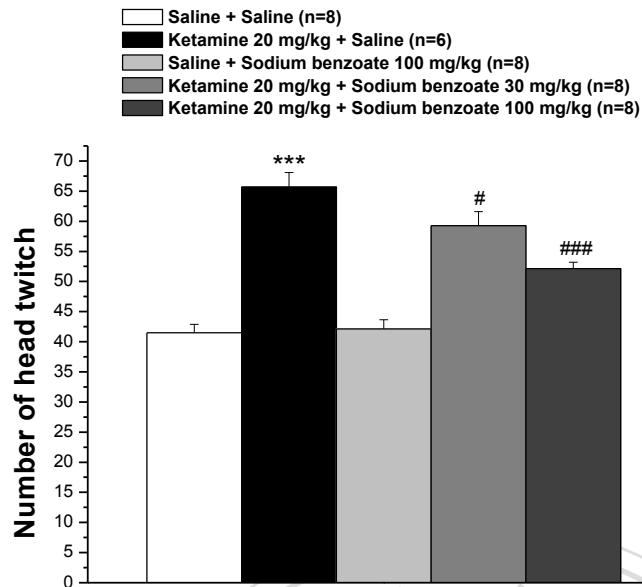
**Figure 15. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced depression-like behavior in the tail suspension test.**

Sodium benzoate (one injection/day) was administered to mice 14 days after final administration of saline or ketamine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\*\* $P < 0.001$  as compared with control group. ### $P < 0.001$  compared with ketamine treatment.



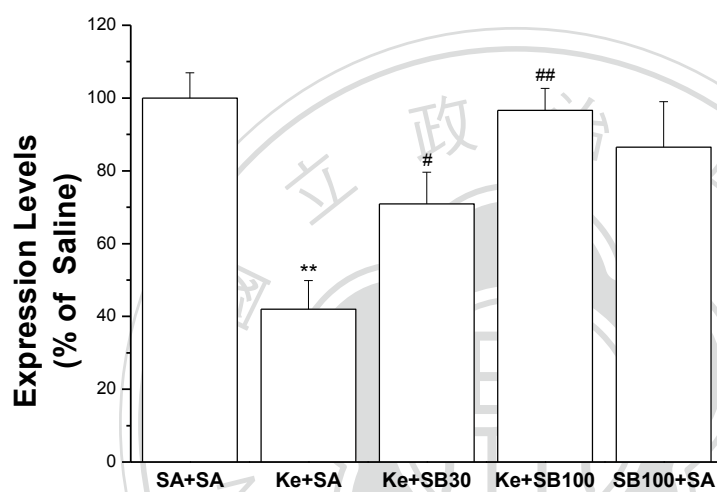
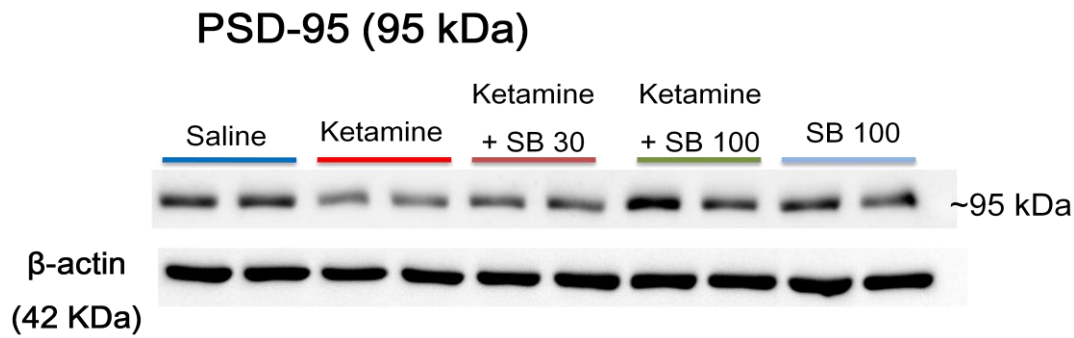
**Figure 16. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14 days on subchronic ketamine-induced depression-like behavior in the forced swimming test.**

Sodium benzoate (one injection/day) was administered to mice 14 days after final administration of saline or ketamine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \* $P < 0.05$  as compared with control group. # $P < 0.05$  compared with ketamine treatment.



**Figure 17. Effects of post-treatment of sodium benzoate for 14days on DOI-induced head twitch response in subchronic ketamine-exposed mouse.**

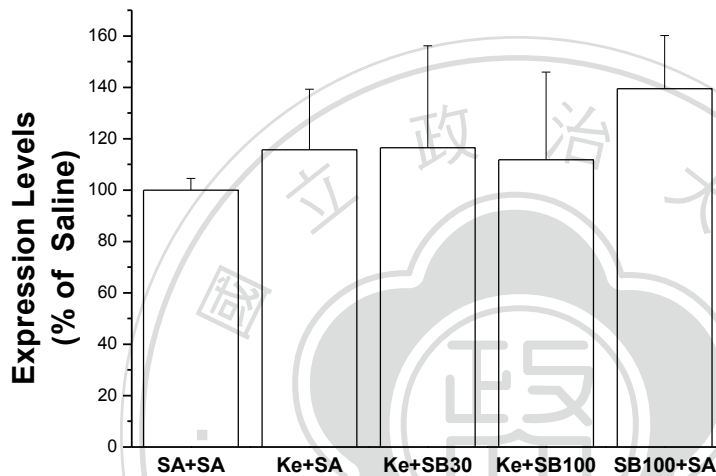
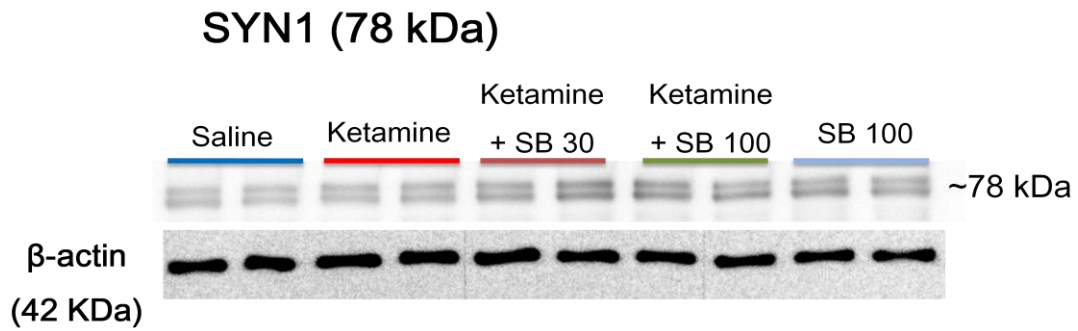
After withdrawal from drug treatment for at least 20 days, head twitch response was measured for 30 min immediately after administration of DOI (1 mg/kg, i.p.). Values are the mean  $\pm$  S.E.M. Data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks and post-hoc Dunn's test. \*\*\* $P < 0.001$  as compared with control group. ### $P < 0.001$ , # $P < 0.05$  compared with ketamine treatment.



**Figure 18. Effects of subchronic administration of ketamine followed by sodium benzoate treatment for 14 days on the levels of PSD-95 in the hippocampus.**

Sodium benzoate was administered 14 days after ketamine treatment for 14 days. (A) Representative of western blot of PSD-95 from hippocampus. (B) Quantification of immunoblots of PSD-95. Values are the mean  $\pm$  S.E.M (n=4). Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test. \*\*P<0.01 as compared with control group. ##P<0.01, #P<0.05 compared with ketamine treatment.





**Figure 19. Effects of subchronic administration of ketamine followed by sodium benzoate treatment for 14 days on the levels of SYN1 in the hippocampus.**

Sodium benzoate was administered 14 days after ketamine treatment for 14 days. (A) Representative of western blot of SYN1 from hippocampus. (B) Quantification of immunoblots of SYN1. Values are the mean  $\pm$  S.E.M (n=4). Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test.