RRPG94020294 (38 .P)

計畫編號：**DOH94-TD-M-113-043**

行政院衛生署九十四年度科技研究計畫

探討 Ketamine 對巨噬細胞可能造成的免疫調控作用與發生機轉

研 究 報 告

執行機構：台北學大學醫學研究所

計畫主持人：陳瑞明

研究人員：林怡伶、張嘉瑱、張雅婷

執行期間：**94** 年 **1** 月 **26** 日至 **94** 年 **12** 月 **31** 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，依合約之規定：

如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意＊

目　　錄

頁　碼

壹、計畫摘要　（ 3）

貳、成果報告內容

一、前言　（ 5）

二、材料與方法　（ 13）

三、結果　（ 19）

四、討論　（ 21）

五、結論與建議　（ 25）

六、九十四年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議　（ 26）

七、參考文獻　（ 27）

八、圖、表　（ 32）

參、附錄

共（38）頁

壹、計畫摘要：

一、中文摘要

氯胺酮(ketamine)是一種靜脈麻醉劑。在臨床上，以ketamine做為麻醉誘導劑時，常會發生免疫抑制作用。巨噬細胞(macrophages)在宿主的免疫防禦功能上，扮演重要角色。此一研究以巨噬細胞為實驗模式，探討ketamine對巨噬細胞功能可能造成的影響，以及其可能發生的機制(mechanisms)。將巨噬細胞暴露於10及100 μM的ketamine(相當於臨床濃度的0.1及1倍)1、6及24小時，並不會影響細胞的存活率及乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase)的釋放。但，當處理濃度達到1000 μM時，ketamine會增加乳酸脫氫酶的釋放及細胞的死亡。Ketamine於10及100 μM濃度下，不會影響巨噬細胞的趨化活性(chemotactic activity)。但，巨噬細胞處理1000 μM的ketamine會導致細胞移動能力(cell migration)的降低。巨噬細胞處理ketamine會降低吞噬能力(phagocytic activities)；Ketamine亦會抑制巨噬細胞的氧化能力。巨噬細胞處理脂多醣(lipopolysaccharide)會誘導TNF-α、IL-1β及IL-6 mRNA的產生，單獨處理ketamine不會影響TNF-α、IL-1β及IL-6 mRNA的產量。同時處理ketamine及脂多醣會有意義地抑制脂多醣(lipopolysaccharide)所誘導TNF-α、IL-1β及IL-6 mRNA的量。Ketamine處理會導致粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)的下降，但不會影響粒線體複合體 I NADH去氫酶(mitochondrial complex I NADH)的活性。本研究顯示在臨床濃度(100 μM)下，ketamine會抑制巨噬細胞吞噬與氧化能力，並能抑制發炎細胞激素(inflammatory cytokine)的產生。而其可能的作用機轉，是透過抑制粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)，而非直接造成細胞的毒害作用。

中文關鍵詞(至少三個)：氯胺酮、趨化活性、吞噬活性、氧化活性、發炎細胞激素、粒線體膜電位

Abstract

Ketamine is an intravenous anesthetic agent. Clinically, induction of anesthesia with ketamine can cause immunosuppression. Macrophages play important roles in host defense. In this study, we attempted to evaluate the effects of ketamine on macrophage functions and its possible mechanism using macrophages as the experimental model. Exposure of macrophages to 10 and 100 μM ketamine, which correspond to 0.1 and 1 times the clinically relevant concentration, for 1, 6, and 24 h had no effect on cell viability or lactate dehydrogenase release. When the administered concentration reached 1000 μM, ketamine caused a release of lactate dehydrogenase and cell death. Ketamine, at 10 and 100 μM, did not affect the chemotactic activity of macrophages. Administration of 1000 μM ketamine in macrophages resulted in a decrease in cell migration. Treatment of macrophages with ketamine reduced phagocytic activities. The oxidative ability of macrophages was suppressed by ketamine. Treatment with lipopolysaccharide induced TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNA in macrophages. Administration of ketamine alone did not influence TNF-α, IL-1β or IL-6 mRNA production. Meanwhile, cotreatment with ketamine and lipopolysaccharide significantly inhibited lipopolysaccharide-induced TNF-a, IL-1h, and IL-6 mRNA levels. Exposure to ketamine led to a decrease in the mitochondrial membrane potential. However, the activity of mitochondrial complex I NADH dehydrogenase was not affected by ketamine. This study shows that a clinically relevant concentration of ketamine (100μM) can suppress macrophage function of phagocytosis, its oxidative ability, and inflammatory cytokine production possibly via reduction of the mitochondrial membrane potential instead of direct cellular toxicity.

Keyword: Ketamine; Macrophages; Chemotactic activity; Phagocytic activity; Oxidative ability; Inflammatory cytokines; Mitochondrial membrane potential

貳、成果報告內容:

一、前言

1. 政策或法令依據

Ketamine 是臨床常用的靜脈麻醉藥物，在外科手術過程中，廣泛被使用當作麻醉的誘導和持續劑，然其在坊間亦被日益濫用嚴重(White et al., 1982)。近年來由於執法機關積極查緝毒品，使得傳統毒品如海洛因、嗎啡和安非他命相對取得不易。然新興毒品，如 ketamine、MDMA、FM2 和 GHB 趁勢而起。因這些新興毒品常於青少年經常聚集之酒吧、KTV、舞廳及網咖等場所販售，而使其竄升為青少年吸食藥物中的最愛（李志恆、民 91）。

Ketamine 具有成癮性，成癮患者會出現惡心、嘔吐、複視、說話遲緩、失憶、幻覺、身體失衡等症狀，嚴重時會譫妄、健忘、運動功能受損、高血壓；更危險的是，ketamine 急性中毒或快速靜脈注射後，會出現心跳過速、抑制呼吸的後果，並可能導致「猝死」(周碧瑟、民 88）。此外，ketamine 和另兩種毒品ＦM2 和ＨＧＢ因都屬安眠鎮定劑，且具有無色、無味以及易與食物飲料混合的特性，服用後代謝迅速，所以易成為性侵犯的工具。被害者服用後短時間內不易清醒，具有暫時性記憶喪失的功能，常使被害者無法回憶加害人(黃徵男、民 90）。

因 ketamine 具有成癮性，不僅對濫用患者之身心健康危害甚鉅，且易被當作犯罪工具造成治安上的隱憂。所以，衛生署管制藥品管理局已將 ketamine 列為第三級管制藥品和毒品。對於輸入、製造、販賣與購買 ketamine 的機構，需先取得管制藥品登記證，亦需設置簿冊登記，定期向管制藥品管理局申報。而醫療院所使用 ketamine 時，需由領有執照的醫師與獸醫師

開立專用處方箋，且需向主管單位申報使用情形。而非法製造、運輸、販賣 ketamine 者，以及引誘他人使用者，皆將會被處以徒刑和併科罰金。

2. 問題狀況或發展需求

Ketamine 屬於中樞神經抑制劑，為非巴比妥鹽類。ketamine 原是用於人或動物麻醉之一種速效和全身性麻醉劑，然而於 1970 年代在美國西岸開始濫用，早期使用均與 MDMA 混合使用，惟近年來逐漸單獨使用。ketamine 可以口服、鼻吸、煙吸與注射方式施用，施用後會產生幻覺、興奮感、意識混亂、與現實解離或是有所謂靈異旅行的經驗。較常見之副作用為心搏過速、血壓上升、震顫、肌肉緊張而呈強直性、陣攣性運動等，部分病人在恢復期會出現不愉快的夢、意識模糊 、幻覺、無理行為及譫妄等現象。長期使用會產生耐藥性與心裡依賴性，不易戒除。近年來國內警察和法務機關對於 ketamine 的查獲數，始終高居於毒品查獲數的前五名（法務部統計摘要）。根據法務部調查局偵破毒品統計資料顯示，第三級毒品 ketamine 的查獲量，佔所有三級毒品的七成以上（法務部調查局網站）。這些資料在在顯示，ketamine 的濫用日趨嚴重。

由於 ketamine 的濫用，已成為戕害青少年身心健康的重要殺手之一。而此類毒品濫用問題，亦常會引發諸多犯罪、治安惡化等社會問題。為治療濫用毒品患者的健康問題，以及提供一科學數據，做為毒品濫用的預防宣導，實有必要對 ketamine 對人體可能造常的健康影響做一深入研究。而由於毒品成癮患者，其身體的免疫功能常會因吸食毒品而降低，並因而造成患者易遭至感染，增加併發多重疾病的風險。先前有關 ketamine 免疫調控作用的研究，尤其對於巨噬細胞的影響，並無太多之著墨。所以，探討 ketamine 對巨噬細胞功能之影響，以及其可能發生的機轉，實屬重要。

3. 國內外相關研究之文獻探討

在臨床使用上，ketamine 常會併發多重心血管異常作用，包括增加 cardiac output、arterial blood pressure、和 heart rate (Traber et al., 1971; Reich and Silvay, 1989)。而在經內毒素 LPS 所活化的 leukocytes 中，ketamine 被證實會降低細胞黏附(adherence)和移動(migration)的能力(Schmidt et al., 1995; Hofbauer et al., 1998)。當以 neutrophils 為研究模式時，ketamine 被證實會降低細胞生成氧化物和移動的能力(Zahler et al., 1999; Weigand et al., 2000)。所以，由先前的研究中發現，ketamine 不僅能影響患者之心血管功能，其亦可能對患者產生免疫調控(immunomodulation)的作用。

巨噬細胞對於身體遭受感染(infection)和組織傷害(tissue injury)時，扮演重要的細胞防禦(cellular host defense)角色(Nathan, 1987; Valledor and Ricote, 2004)。當身體受到病菌入侵時，巨噬細胞將被活化，並引導出一系列的發炎過程(inflammatory process) (Nathan, 1987; Aderem, 2001)。這些發炎過程包括：巨噬細胞移動(chemotaxis)至受感染部位，對病菌進行吞噬作用(phagocytosis)，以及經由產生活氧物質(oxidants)而將吞噬的病菌消滅。同時巨噬細胞亦透過生成和釋放發炎細胞素，以活化更多的免疫細胞，齊力將入侵的病菌消滅。而當巨噬細胞這些功能受到破壞(dysfunction)時，身體的 non-specific cell-mediated immunity 免疫作用，亦會隨之受到影響而降低防禦的功能(Lander, 1997)。

Propofol 和 ketamine 同是種靜脈麻醉藥物，其亦被認為可能具有免疫調控作用。本實驗室先前已針對 propofol 對巨噬細胞功能的影響，做一系列之研究。實驗結果發現，propofol 會抑制細胞 chemotaxis、phagocytosis 和 oxidative ability (Chen et al., 2003)。然先前有關 ketamine 是否影響巨噬細胞功能的研究，主要著重於其對 TNF-α 和一氧化氮(nitric oxide)生合成的作

用(Takenaka et al., 1994; Shimaoka et al., 1996; Sakai et al., 2000)。而對於 ketamine 是否會影響巨噬細胞 chemotaxis、phagocytosis、oxidative ability 和 inflammatory cytokines 的生成，則無相關的研究報告被提出。

粒線體(mitochondria)是細胞重要能量生成的胞器(energy-producing organelles)，其對巨噬細胞活化功能的維持，扮演重要角色(Brown and Borutaite, 1999; Diehl and Hoek, 1999)。先前研究證實，粒線體呼吸鏈反應(respiratory chain reaction)所生成的 ATP，能增加巨噬細胞和嗜中性細胞移動和吞噬作用(Fredholm, 1997; Lammas et al., 1997)。且其作用機轉，可能是透過活化 purinergic P2 receptor 或細胞內鈣的路徑(Oshimi et al., 1999; Di Virgilio et al., 2001)。對於罹患敗血症的老鼠，當其細胞內的 ATP 含量減少時，淋巴球(lymphocytes)和巨噬細胞的功能亦會隨之降低(Ayala and Chaudry, 1996)。所以由這些證據顯示，細胞內的 ATP 含量的正常與否，將會直接影響巨噬細胞的功能。粒線體膜電位的平衡，以及呼吸鏈酵素活性的正常與否，皆會影響粒線體 ATP 的生合成(Pearce et al., 2001; Papucci et al., 2003)。但是，先前並無有關 ketamine 是否會影響粒線體功能的研究。

所以，本研究計劃將以小鼠腹腔巨噬細胞(peritoneal macrophages)為研究模式，探討 ketamine 對於細胞移動(chemotaxis)、吞噬(phagocytosis)以及生成氧化物(oxidants)和發炎細胞素(inflammatory cytokines)等能力的影響，藉此釐清 ketamine 對巨噬細胞可能造成的免疫調控作用。另方面因 adenosine triphosphate (ATP)之生合成(biosynthesis)，與巨噬細胞功能之執行，具有密切的關係。所以本計劃將進一步探討，ketamine 是否會影響巨噬細胞粒線體(mitochondria)功能，包括粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)、呼吸鏈酵素 complex I NADH dehydrogenase 活性和細胞內 ATP 之生成量，藉此釐清粒線體於 ketamine 調控巨噬細胞功能中，可

能扮演的角色。

4. 本計畫與醫療保健之相關性

本計劃旨在探討 ketamine 對巨噬細胞功能可能造成之免疫調控作用，以及其可能發生的機轉研究。經由此一計畫之執行，將可獲得以下成果

(1) 經由此系列研究將可得到可靠之科學數據，對於 ketamine 可能引起的免疫調控作用和機轉，會有更深入的瞭解，並有助於後續對於 ketamine 所進行的更深入研究。

(2) 而經由此計劃的成果發表，對於 ketamine 成癮患者的醫療保健工作將有重要貢獻。其一，乃提供醫療人員一重要的參考數據，有助成癮患者相關疾病的治療。其二，經由此一研究成果，對於醫療和公衛人員於宣導 ketamine 的毒品防治工作上，提供一重要有關 ketamine 對人體可能產生免疫調控作用的數據。

(3) 由於 ketamine 亦為現今臨床常使用的麻醉藥物，本研究成果將提供麻醉醫師於臨床使用 ketamine 時一重要的參考依據上的依據。

(4) 對於後續欲探討其他成癮藥物可能產生的免疫調控作用，經由本計劃的執行，將提供其一可靠的細胞研究模式。

5. 本研究計畫所提出的研究假說(hypothesis)、研究目標(specific aims)以及各項工作項目分別敘述如下：

(一)、研究假說：

Ketamine 會經由影響巨噬細胞移動、吞噬、氧化能力和生成發炎細胞素等作用，進而對巨噬細胞功能產生免疫調控作用。而此一調控機制(mechanism)，則可能是透過改變粒線體膜電位、呼吸鏈酵素活性和細胞內 ATP 生合成的路徑(pathway)。

說明:

此一研究主要在探討 ketamine 對巨噬細胞可能造成的免疫調控作用和

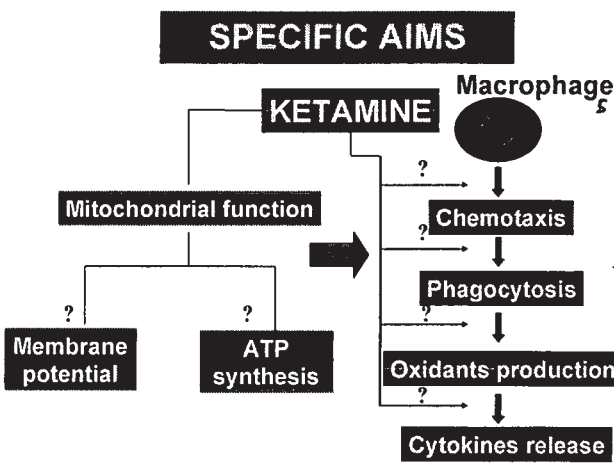
機制。當巨噬細胞被活化後，其會透過細胞移動(chemotaxis)以運動至受感染部位，然後對入侵的病源菌進行吞噬作用(phagocytosis) (Nathan, 1987; Aderem, 2001)。而對於吞噬至細胞內的病原菌，會以生成氧化物(oxidants)方式將其消滅。除此之外，巨噬細胞會利用生成和釋放發炎細胞素如 TNF-α、IL-1β 和 IL-6，去活化更多的免疫細胞，以共同消滅入侵的病原菌。而當巨噬細胞這些功能受到破壞時，細胞會產生 dysfunction，進而造成個體免疫抑制(immunosuppression)現象(Lander, 1997)。所以，本計劃將透過研究 ketamine 對巨噬細胞移動能力、吞噬作用、氧化能力和生成發炎細胞素的影響，以探討 ketamine 對巨噬細胞可能造成的免疫調控作用。

巨噬細胞生合成 ATP 的能力，關係著細胞功能是否可正常維持。而 ATP 的生合成，和粒線體功能是否完整有關(Pearce et al., 2001; Papucci et al., 2003)。所以，本研究將探討粒線體膜電位、呼吸鏈酵素活性以及 ATP 生成能力，以探討粒線體在 ketamine 調控巨噬細胞作用中，可能扮演的角色。

(二)、研究目標(specific aims)和工作項目：

本計劃之研究目標主要為(圖一)：

1. 探討 ketamine 對巨噬細胞功能的調控作用。
2. 研究 ketamine 調控巨噬細胞功能的機制：粒線體可能扮演的角色。



圖一 研究目標

而為達成各項研究目標，所需進行的工目詳述如下(圖一)：

目標一：探討 ketamine 對巨噬細胞功能的調控作用。

工作項目(一)：小鼠腹腔巨噬細胞的製備。

說明：本研究所用的細胞模式為小鼠(mice)的腹腔巨噬細胞，所以首要工作項目即是初代巨噬細胞的製備和培養(primary culture)。本研究室先前已針對麻醉藥物 propofol 對巨噬細胞功能的影響，做過系列的探討。所以將秉持過往的經驗，先將 casein 以腹腔注射方式打入小鼠腹腔，經過 4 天之後，再以抽腹水方式製備和純化腹腔巨噬細胞。先前的經驗顯示，經此方法所得到的巨噬細胞的純度，可大於 90%。

工作項目(二)：細胞毒性分析。

說明：為探討 ketamine 是否會因直接對細胞造成毒性死亡作用，而導致對巨噬細胞造成免疫抑制(immunosuppression)作用。所以本研究目標的第二項工作項目，即在研究 ketamine 是否會對巨噬細胞造成細胞毒性(cytotoxicity)。此計畫將以 trypan blue exclusion 和偵測培養基 lactate dehydrogenase(LDH)的方法，評估巨噬細胞經 ketamine 處理後，trypan blue 染劑是否能進入細胞內，以及 LDH 的釋放量，藉以評估細胞膜(plasma membrane)的完整性，以做為細胞毒性的指標。

工作項目(三)：細胞移動能力的偵測。

說明：巨噬細胞對抗發炎感染(infection)的首要工作，即是運動至受感染部位。本計畫將以 Transwell 方式，測量細胞經 ketamine 處理後，其移動至底層(bottom layer)的細胞數目。據此瞭解 ketamine 對巨噬細胞移動能力，可能造成的影響。

工作項目(四)：細胞吞噬作用的測定。

說明：巨噬細胞對於病菌會以吞噬作用，將其吞噬至細胞內。本計畫將以已 coated 螢光物質的小球(beads)為工具，探討經 ketamine 處理後的巨噬細胞對 beads 的吞噬能力，藉此研究 ketamine 對巨噬細胞吞噬能力的影響。

工作項目(五)：細胞氧化能力的測定。

說明：巨噬細胞會經由生成活氧物質(oxidants)，摧毀吞噬至細胞內的病菌。所以本計畫將以 flow cytometry 方法，測定巨噬細胞經 ketamine 處理後，其細胞內生成氧化物的量，以此評估 ketamine 對巨噬細胞氧化能力的影響。

工作項目(六)：細胞生成發炎細胞素的測量。

說明：巨噬細胞除了以移動、吞噬和生成活氧物的方式，消滅入侵的病菌外，還會經由生成和釋放發炎細胞素，以活化更多的免疫細胞，加快清除入侵的病菌。所以本計畫將以內毒素(endotoxin)脂多醣 lipopolysaccharide (LPS)當做活化巨噬細胞的物質，探討 ketamine 是否會拮抗 LPS 所誘導產生的發炎細胞素 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 的生成量，藉此研究 ketamine 對巨噬細胞生成發炎細胞素的影響。

目標二：研究 ketamine 調控巨噬細胞功能的機制：粒線體可能扮演的角色。

工作項目(一)：粒線體膜電位的測定。

說明：粒線體的主要功能之一即是 ATP 的生合成，而於 ATP 生成過程中，由於 proton 由粒線體內打出至粒線體外，因而形成一膜電位。此一膜電位的平橫(balance)維持，對於呼吸鏈電子傳遞，和 ATP 的生合成，扮演重要角色。所以，本計畫將以 flow cytometry 方法偵測粒線體膜電位，以探討 ketamine 對巨噬細胞粒線體膜電位，可能造成的影響為何。

工作項目(二)：粒線體呼吸鏈酵素活性的測量。

說明：粒線體呼吸鏈(respiratory chain)的電子傳遞，是經由一連串的酵素反應而成。其中位於電子傳遞過程中，complex I NADH dehydrogenase 酵素尤其扮演重要角色。因而，本計畫將研究巨噬細胞

經 ketamine 處理後，complex I NADH dehydrogenase 酵素活性，是否將因此而受到改變。藉此探討 ketamine 對巨噬細胞粒線體呼吸鏈酵素活性，可能造成的影響。

工作項目(三)：細胞內 ATP 量的測定。

說明：除了偵測 ketamine 對粒線體膜電位和呼吸鏈酵素的影響外，本計畫將以冷光方法測量細胞內 ATP 的量，以此釐清 ketamine 對巨噬細胞內 ATP 生合成的影響。

經由此計畫的執行，將可進一步釐清 ketamine 是否能調控巨噬細胞的免疫功能，以及此一調控機制是否和粒線體的 ATP 生合成有關。由於長期濫用成癮藥物的患者，常因感染而罹患或併發不同疾病。所以瞭解 ketamine 的免疫調控作用，以及其可能發生的機轉，將對於 ketamine 濫用患者的治療和預防工作，有著重要的貢獻和幫助。

二、材料與方法

1. 細胞模式之建立和藥物處理

本研究計畫旨在探討成癮藥物 ketamine 對巨噬細胞功能的影響，細胞來源為初代(primary)製備於小鼠(mice)的腹腔巨噬細胞(peritoneal macrophages)。有關細胞製備(preparation)、培養(culture)和藥物處理(drug treatment)方法，分段詳述如下：

Cell culture and drug treatment

Male ICR mice at 8-12 weeks of age are purchased from the Animal Center of National Taiwan University. Peritoneal macrophages and neutrophils are harvested from 10 mice with no treatment as resident macrophages and neutrophils, 10 mice stimulated with casein. For in vivo stimulation, mice are

injected intraperitoneally with 1 ml containing 5 % casein for 96 hours. Peritoneal macrophages are obtained by lavaging of the peritoneal cavity with 5 ml of PBS on ice. Harvested peritoneal cells are centrifuged at 200 g for 10 min at 4 ℃ , resuspended in RPMI 1640 medium (Gib co-BRL, Life Technologies) containing 10 % heat-inactivated fetal calf serum and 4 x 10^6 cells are seeded in each 90-mm tissue culture dish. After incubation for 2 h at 37℃ in a humidified atmosphere of 5 % CO_2 in air, the nonadherent cells are removed by washing with PBS 3 times. The nutrient medium is renewed twice a week.

Ketamine is dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) (0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, and 1.5 mM KH_2PO_4). According to the clinical application, concentrations of ketamine at 10, 100, and 1000 μM, which correspond to 0.1-, 1-, and 10-times the clinical plasma concentration (Domino et al., 1982; Grant et al., 1983), are chosen as the administered dosages in this study. Prior to the addition of ketamine, macrophages are washed with PBS buffer, and non-adherent cells are removed. Control macrophages receive PBS only.

2. 細胞毒性分析

將分別以 trypan blue exclusion 和 LDH 偵測方法，探討 ketamine 對巨噬細胞可能造成的細胞毒性。有關此兩種方法的實際操作步驟，分述如下：

Cytotoxic assay. Analyses of cell viability and lactate dehydrogenase release are carried out to determine the toxicity of ketamine to macrophages. Cell viability is analyzed using a trypan blue exclusion method. Briefly, macrophages (2 x 10^5 cells) are cultured in 24-well tissue culture plates (Corning-Costar, Cambridge, MA, USA) for overnight. After administration of 10, 100, and 1000 μM

ketamine for 1, 6, and 24 h, cells are trypsinized by 0.1% trypsin-EDTA (Gibco-BRL). Following centrifugation and washing, macrophages are suspended in PBS, and stained with an equal volume of trypan blue dye (Sigma, St. Louis, MO, USA). Fractions of dead cells with a blue signal are determined using a reverse-phase microscope. The amounts of lactate dehydrogenase in the culture medium are quantified using a model 7450 automatic autoanalyzer system from Hitachi (Tokyo, Japan).

3. Ketamine 對巨噬細胞功能的影響分析

將分別測定巨噬細胞的 chemotaxis、phagocytosis、oxidative ability 和 inflammatory cytokine mRNA production，以做為探討 ketamine 對巨噬細胞功能可能產生的調控作用。有關各實驗方法的實際操作步驟，分述如下：

Chemotactic activity. The migrating capacity of macrophages is determined by using Costar Transwell cell culture chamber inserts, with a pore size of 8 μm, according to the application guide provided by Corning-Costar. The bottom layers of the Transwell membranes have been commercially coated with collagen. The RPMI-1640-rich medium (1.5 ml) is first added to 12-well tissue cluster plates, and the Transwell is inserted in the plates. Macrophages (1×10^5 cells) suspended with 10, 100, and 1000 μM ketamine in 0.5 ml rich medium is added to the inside of the Transwell and cultured at 37 °C for 1, 6, and 24 h in an atmosphere of 5% CO_2. Macrophages that migrate to the bottom surface of the polycarbonate filters are counted in each field and averaged for 3 fields with the aid of a crosshair micrometer (Nikon, Tokyo, Japan). The data are normalized to the numbers of living cells.

Phagocytic activity. The macrophage function of phagocytosis is assayed by

detecting the number of cells that ingested at least 1 fluorescent particle according to the method of Kotani et al. (1998). Macropahges (1 x 10^6 cells) are cultured in 12-well tissue culture plates for overnight. After exposure to 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h, macrophages are trypsinized and suspended in PBS. Red fluorescent FluoSphere carboxylate-modified microspheres (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), with a diameter of 0.5 μm, are added to the cell suspensions and incubated at 37 °C on a shaking platform for 20 min. The ratio of particles-to-cells is 15:1. The reaction is stopped by immersion in an ice-cold saline solution. Proportions of macrophages that ingest at least 1 particle are counted with the aid of a crosshair micrometer (Nikon). The data are normalized to the numbers of living cells.

Oxidative ability. Amounts of intracellular reactive oxygen species are quantified to determine the oxidative ability of macrophages according to a previously described method (Simizu et al., 1997). Briefly, 1 x 10^5 macrophages are cultured in 12-well tissue culture clusters overnight, and then co-treated with 10, 100, and 1000 μM ketamine and 2,7-dichlorofluorescin diacetate, a reactive oxygen species-sensitive dye for 1, 6, and 24 h. After drug treatment, macrophages are harvested and suspended in PBS. The fluorescence intensities in cells are quantified using a flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Only living cells are analyzed in this assay.

Reverse-transcription polymerase chain reaction assay. Messenger RNA from macrophages exposed to 100 μM ketamine, 1 ng/ml LPS, and a combination of ketamine and LPS for 1 h is prepared for reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses of TNF-α, IL-1β, IL-6, and β-actin following

instructions of the ExpressDirect™ mRNA Capture and RT system for the RT-PCR kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Oligonucleotides for PCR analyses of TNF-α, IL-1β, IL-6, and β-actin are designed and synthesized by Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA). The oligonucleotide sequences of these primers are

5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGC-3',

and 3'-CTCAGGCCCGTCCAGATGAAACC-5' for TNF-α;

5'-ATGGCAACTGTTCCTGAACTCAACT-3',

and 3'-TTTCCTTTCTTAGATATGGACAGGAC-5' for IL-1β;

5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT-3',

and 3'-CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC-5' for IL-6;

5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3',

and 3'-CTTTAGCACGCACTGTAGTTTCTC-5' for β-actin.

The PCR reaction is carried out using 35 cycles including 94 °C for 45 s, 55-65 °C for 45 s, and 72 °C for 2 min. The PCR products are loaded onto a 1.8% agarose gel containing 0.1 μg/ml ethidium bromide and electrophoretically separated. DNA bands are visualized and photographed under UV-light exposure. The intensities of the DNA bands in the agarose gel are quantified with the aid of the UVIDOCMW version 99.03 digital imaging system (UVtec, Cambridge, England, UK).

4. Ketamine 對粒線體功能影響之分析

細胞 ATP 含量對於巨噬細胞功能的維持，扮演重要角色。而粒線體膜電位和呼吸鏈酵素活性的正常與否，則與粒線體能否正常合成 ATP 有關。所以，本計劃將分別偵測巨噬細胞粒線體膜電位和呼吸鏈酵素活性，以闡

明粒線體於 ketamine 調控巨噬細胞功能中，可能扮演的角色。有關粒線體膜電位、呼吸鏈 NADH dehydrogenase activity 和細胞內 ATP 含量的偵測法，分別敘述如下：

Quantification of the mitochondrial membrane potential. The membrane potential of macrophage mitochondria is determined according to the method of Chen (1988). Briefly, 1 x 10^5 macrophages are seeded in 12-well tissue culture clusters overnight, and then treated with 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h. Macrophages are harvested and incubated with 3,3'-dihexyloxacarbocyanine ($DiOC_6(3)$), a positively charged dye, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 for 30 min. After a process of washing and centrifuging, cell pellets are resuspended with PBS, and the fluorescent intensities are analyzed by flow cytometry (FACS Calibur). Only living cells are analyzed in this assay.

Mitochondrial complex I NADH dehydrogenase activity. NADH dehydrogenase activity is determined by a colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay following the method of Wu et al. (2003). Briefly, macrophages (5 x 10^5 cells) are seeded in 96-well tissue culture clusters overnight. After treatment with 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h, cells are cultured with new medium containing 0.5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide for another 3 h. The blue formazan products in cells are dissolved in dimethyl sulfoxide and spectrophotometrically measured at a wavelength of 570 nm. The data are normalized to the numbers of living cells.

Detection of Cellular Adenosine Triphosphate Levels. The levels of cellular ATP

in macrophages were determined by a bioluminescence assay, which is based on luciferase's requirement for ATP in producing emission light, according to the protocol of Molecular Probes' ATP Determination kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). The luminent light (560 nm) emitted by the luciferase-mediated reaction of ATP and lucifenin is detected by a WALLAC VICTOR^2$_{TM}$ 1420 multilabel counter (Welch Allyn Inc., Turku, Finland).

5. 統計分析 *Statistical analysis.* The statistical significance of differences between the control and ketamine-treated groups is evaluated using Student's *t*-test, and differences are considered statistically significant at *p* values of less than 0.05. Differences between ketamine- and LPS-treated groups are considered significant when the *p* value of Duncan's multiple-range test is less than 0.05. Statistical analysis between groups over time is carried out using two-way ANOVA.

三、結果

如表一所示，利用細胞活性和乳酸去　酶的釋放來評估偵測 ketamine 對巨噬細胞產生的毒性。統計結果中不含 ketamine 的控制組和 ketamine 處理的對照組，在 *P* 小於 0.05 時有顯著差異。當巨噬細胞在 ketamine 劑量 10 和 100 μM 暴露 1、6 以及 24 小時下並不影響細胞的活性，偵測細胞培養基中乳酸去　酶的釋放，也沒有影響。然而，在 ketamine 劑量 1000 μM 暴露 6 及 24 小時下，分別對細胞產生 13%以及 31%的細胞死亡，乳酸去　酶的釋放也分別明顯的有 89%以及 164%的增加。

如表二所示，利用細胞趨化性試驗評估偵測 ketamine 對巨噬細胞移動能力的影響。統計結果中不含 ketamine 的控制組和 ketamine 處理的對照組，

在 P 小於 0.05 時有顯著差異。在分別給予劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 1、6 以及 24 小時下，對細胞趨性並沒有顯著影響。

如圖一所示，利用巨噬細胞攝入含螢光粒子的比例來偵測評估巨噬細胞的吞噬能力。統計結果中不含 ketamine 的控制組和 ketamine 處理的對照組，在 P 小於 0.05 時有顯著差異。在圖一最上方所示，細胞在 ketamine 劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 1 小時下，對細胞的吞噬能力沒有影響。圖一中間部份所示，細胞在 ketamine 劑量 10 μM 暴露 6 小時下，對細胞的吞噬能力仍然沒有影響，然而當劑量增加到 100 以及 1000 μM 時，細胞吞噬能力明顯減少 23%以及 27%。在圖一最下方所示，細胞在 ketamine 劑量 10 μM 暴露 24 小時下，對細胞的吞噬能力沒有影響，然而當劑量增加到 100 以及 1000 μM 時，細胞吞噬能力明顯減少 29%以及 31%。

如圖二所示，利用定量細胞內的 ROS 來偵測評估 ketamine 對巨噬細胞氧化能力的影響。統計結果中不含 ketamine 的控制組和 ketamine 處理的對照組，在 P 小於 0.05 時有顯著差異。在圖二最上方所示，細胞在 ketamine 劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 1 小時下，對細胞的氧化能力沒有影響。圖二中間部份所示，細胞在 ketamine 劑量 10 μM 暴露 6 小時下，對細胞的氧化能力仍然沒有影響，然而當劑量增加到 100 以及 1000 μM 時，細胞氧化能力明顯減少 18%以及 25%。在圖二最下方所示，細胞在 ketamine 劑量 10 μM 暴露 24 小時下，對細胞氧化能力沒有影響，然而當劑量增加到 100 以及 1000 μM 時，細胞氧化能力明顯減少 32%以及 37%。

如圖三所示，利用 RT-PCR 分析 ketamine 對 LPS 所活化 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表現的影響。在圖三第二欄所示，沒有給予 ketamine 和 LPS 的控制組，偵測到低量的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表現。在圖三第三欄所示，給予臨床意義劑量 100 μM 的 ketamine，並不影響 TNF-α、IL-1β

和 IL-6 mRNA 的表現。在圖三第四欄所示，給予 LPS 明顯的誘導 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 的表現。在圖三第五欄所示同時給予 ketamine 和 LPS，顯著的抑制了 LPS 活化的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表現。利用數位影像系統將 cDNA 量化，結果顯示於表三，細胞在給予 ketamine 治療劑量下，並不會影響 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表現。給予 LPS，對巨噬細胞誘導 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表現量分別明顯增加 2、3 以及 4 倍。Ketamine 顯著抑制 76%、63%以及 65%的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 表現量。

如圖四所示，利用粒腺體膜電位的偵測來確認粒線體在 ketamine 抑制巨噬細胞功能中所扮演的角色。統計結果中不含 ketamine 的控制組和 ketamine 處理的對照組，在 *P* 小於 0.05 時有顯著差異。在圖四最上方所示，細胞在 ketamine 劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 1 小時下，對巨噬細胞粒線體膜電位並沒有影響。圖四中間部份所示，細胞在 ketamine 劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 6 小時下，粒腺體膜電位分別有顯著的減少 15%、22%和 25%。在圖四最下方所示，細胞在 ketamine 劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 24 小時下，粒腺體膜電位分別有顯著的減少 20%、35%和 40%。

如表四所示，利用粒線體複合體 I 中 NADH 去　酶的分析，來評估 ketamine 是否會調控此酵素活性。統計結果中不含 ketamine 的控制組和 ketamine 處理的對照組，在 *P* 小於 0.05 時有顯著差異。在分別給予劑量 10、100 和 1000 μM 暴露 1、6 以及 24 小時

四、討論

本研究結果顯示，以臨床治療濃度內(100 μM)的 ketamine 處理巨噬細胞，會抑制巨噬細胞的正常功能。依據 Domino 等人(1982 年)以及 Grant 等

人(1983 年)所做的研究中可得知，本研究所使用之 100 μM ketamine，確實落在臨床相對使用濃度範圍內。而 100 μM 的 ketamine 雖然不會對巨噬細胞造成細胞毒性，卻很明顯地會抑制巨噬細胞本身吞噬顆粒及製造氧化產物的能力。本研究選用脂多醣(LPS)做為引發巨噬細胞表現大量發炎相關細胞激素 mRNA 之誘導物。以 100 μM 的 ketamine 處理巨噬細胞，會抑制巨噬細胞受脂多醣刺激後所引發的 TNF-α，IL-1β 以及 IL-6 等發炎相關細胞激素 mRNA 合成增加情形。依據 Aderm(2001 年)及 Nathan(1987 年)所做的研究中可得知，在發炎期間，體內的巨噬細胞會透過趨化性(chemotaxis)、吞噬作用(phagocytosis)、氧化產物的製造及釋出發炎相關細胞激素等一連串的反應，來對抗入侵人體的微生物或生長異常的癌細胞。依據 Lander(1997 年)所做的研究中亦可得知，若這些功能受損，將會影響宿主體內經由巨噬細胞所媒介的免疫反應。因此本實驗將以體內實驗模式來證明，在臨床濃度下，100 μM 的 ketamine 對巨噬細胞之趨化性、吞噬作用、氧化能力，以及 TNF-α，IL-1β 以及 IL-6 等發炎相關細胞激素 mRNA 合成，皆具有抑制的作用。

除了造成巨噬細胞功能喪失外，本研究亦顯示臨床治療濃度內的 ketamine 會去干擾巨噬細胞粒線體膜電位。粒線體膜的去極化會導致粒線體功能喪失，甚至會對細胞造成傷害。本研究首次證實 ketamine 對粒線體膜電位具有抑制的影響。暴露於臨床濃度的 ketamine 並不會影響巨噬細胞的存活率，因此可得知，ketamine 所引起的抑制巨噬細胞功能之原因，並非源自於此靜脈麻醉藥物之細胞毒性作用。巨噬細胞功能之健全主要是需仰賴粒線體膜電位的維持。ketamine 引起的粒線體膜電位被還原的效應，可能為造成此麻醉藥物抑制巨噬細胞功能的作用機轉之一。

ketamine 會使巨噬細胞吞噬能力下降。先前研究中顯示巨噬細胞的吞

噬能力需由細胞 ATP 提供足夠的能量來源。調控粒線體膜電位將擾亂 ATP 之合成。本研究顯示臨床治療濃度(100 μM)的 ketamine 會造成粒線體膜電位降低。因此，此麻醉藥物可能會透過改變粒線體膜電位，進而引起細胞內 ATP 合成下降，最後導致其對巨噬細胞吞噬能力的抑制作用。依據 Weinshank 等人(1988 年)的研究顯示，包括 TNF-α 和 IFN-γ 等發炎反應相關細胞激素之刺激，將會造成 Raw 264.7 細胞內的 FcγRα 受體表現量增加及促進吞噬作用活性增加。之前研究亦顯示臨床濃度的 ketamine 處理細胞後，會抑制其 TNF-α mRNA 生合成。因此，此麻醉藥物對發炎相關細胞激素生成之抑制作用，亦有可能為其造成巨噬細胞吞噬能力抑制的原因之一。在其他研究中曾指出，ketamine 處理會造成多型核白血球細胞吞噬能力下降。於本研究中更進一步證明了，臨床治療濃度的 ketamine 會使巨噬細胞吞噬能力下降。

ketamine 可以讓巨噬細胞製造氧化產物的能力下降。對巨噬細胞施以不同處理濃度及處理時間的 ketamine 後，可發現其對細胞內活氧物生成之減低作用具有濃度及時間效應。活化的巨噬細胞會產生並分泌大量的過氧化物、超氧物及一氧化氮等氧化性產物，以殺死造成感染的病原體。本研究中利用 DCFH-DA 染劑對細胞內之活氧物進行染色及量化分析。DCFH-DA 染劑已被指出其可用於偵測過氧化物、超氧物及一氧化氮。因此其所測得之細胞內活氧物降低，可代表過氧化物、超氧物及一氧化氮等氧化性產物生成減少。透過此染劑之使用可得知，ketamine 可以讓巨噬細胞氧化產物的產生減少。有研究指出，ketamine 會抑制人類噬中性球內活氧物釋出。於本研究中更進一步指出，臨床濃度的 ketamine 會抑制巨噬細胞內具有的氧化能力。

ketamine 顯著地抑制巨噬細胞受脂多醣刺激後所引發的 TNF-α，IL-1β

以及 IL-6 等發炎相關細胞激素 mRNA 合成。當巨噬細胞受到脂多醣刺激活化後，TNF-α，IL-1β 以及 IL-6 會被大量表現，此為體內免疫反應與宿主防衛機轉中重要的一環。發炎相關細胞激素合成之抑制會造成宿主免疫能力的降低。之前研究中曾發現 ketamine 會降低脂多醣活化後的巨噬細胞及小鼠體內 TNF-α 生成。除 TNF-α 外，本研究更進一步證實 ketamine 亦可對脂多醣所引發的 IL-1β 及 IL-6 mRNA 合成造成抑制。脂多醣一種活化巨噬細胞的常用處理藥物。本研究主要以脂多醣刺激之巨噬細胞部分為主，探討了 ketamine 對此活化細胞內發炎相關細胞激素表現之影響。然而關於其他常用刺激物，如 IFN-γ，以其所活化的巨噬細胞內，ketamine 可能對發炎相關細胞激素表現所造成之影響就不在此次探討範圍內。

Sakai 等人於 2000 年的研究中指出，ketamine 會抑制內毒素所引起的 NF-κB 表現。NF-κB 為細胞內轉錄因子的一種，可能參與了巨噬細胞內 TNF-α，IL-1β 以及 IL-6 等基因表現之調控。我們先前研究指出降低細胞內一氧化氮之合成，將可顯著地抑制巨噬細胞受脂多醣刺激後所引發的 TNF-α，IL-1β 以及 IL-6 被表現。本研究結果顯示，臨床治療濃度(100 μM)的 ketamine 降低細胞內活氧物之形成，包括一氧化氮。Shimaoka 等人於 1996 年亦指出，ketamine 會降低活化的巨噬細胞一氧化氮的合成。因此，ketamine 亦有可能經由降低細胞內活氧物的作用機轉，進而造成對 TNF-α，IL-1β 及 IL-6 生成之抑制。

我們之前結果顯示，ketamine 會造成巨噬細胞粒線體膜電位顯著的降低。粒線體為細胞內最主要負責合成 ATP 的胞器。ketamine 引起粒線體膜電位降低會直接影響 ATP 合成，進而抑制了巨噬細胞的功能。臨床濃度的 ketamine 並不影響粒線體的 complex I NADH dehydroxygenase 的酵素活性。NADH dehydroxygenase 為細胞內負責粒線體呼吸鏈及 ATP 生成的關鍵

酵素。然而，臨床濃度的 ketamine 選擇性的造成粒線體膜電位降低，卻不會對 NADH dehydroxygenase 酵素活性造成影響。因此，ketamine 對巨噬細胞功能的抑制，可能主要是經由 ketamine 所引起粒線體膜電位的抑制作用，進而引發粒線體功能喪失後所得到的結果。

以 10 μM 及 100 μM 的 ketamine 處理巨噬細胞，並不影響巨噬細胞的遷移能力。然而，以 1000 μM 的 ketamine 處理細胞，則可能造成巨噬細胞的遷移能力降低。以細胞存活率分析結果發現，1000 μM 的 ketamine 對巨噬細胞所造成的存活率降低現象，具有時間效應。因此，高濃度 ketamine 抑制巨噬細胞趨化性的結果，可能源自於此靜脈麻醉藥物對細胞所造成的細胞毒性。Kress 和 Segmuller 在 1987 年指出，ketamine 及 etomidate 這兩種麻醉藥物皆不會影響多型核白血球的遷移能力。然而，ketamine 造成脂多醣刺激活化的白血球內細胞黏著及遷移能力的減弱。對於噬中性球，氯胺酮亦會抑制其氧化產物的製造及趨化活性。本研究中，我們更進一步證明臨床治療濃度(＜100 μM)的 ketamine 並不影響巨噬細胞的遷移能力。

五、結論與建議

本研究結果顯示臨床治療濃度(100 μM)的 ketamine，對巨噬細胞之趨化性、吞噬作用、氧化能力，以及 TNF-α，IL-1β 以及 IL-6 等發炎相關細胞激素 mRNA 合成，皆具有抑制的作用。臨床治療濃度(100 μM)的 ketamine 會透過降低粒線體膜電位，而非影響粒線體 complex I NADH dehydroxygenase 的酵素活性的方式，進而導致粒線體功能喪失。臨床治療濃度的 ketamine 不會對巨噬細胞造成細胞毒性。因此，根據本研究結果可以得知，ketamine 主要是經由降低粒線體膜電位，卻不會減少細胞存活率

的機轉，抑制了巨噬細胞功能。然而在本研究中雖採用功能特性接近正常巨噬細胞之 Raw264.7 細胞株為細胞來源，但該細胞株仍為小鼠腫瘤組織所衍生出來的。因此在本研究室中，亦已建立由小鼠腹腔培養出正常巨噬細胞的實驗模式，將可應用於探討 ketamine 對於正常巨噬細胞功能之影響。除此之外，因為本研究為 *in vitro*（體外）之研究，並不足以評估 ketamine 對於其他體液及組織因子的影響，因此我們的研究並不足以完全代表及說明 ketamine 在臨床使用時對巨噬細胞功能的實際上所造成影響為何。

由此一研究可知，ketamine 的施用會造成巨噬細胞功能的降低，亦就是會產生免疫抑制作用。所以對於長期使用此一成癮藥物的患者而言，他們可能會因為其免疫系統的損傷，進而易罹患各種不同的疾病，尤其是跟感染有關的傳染性疾病。

六、九十四年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議

1.本計畫之新發現或新發明

1). Ketamine 會經由抑制巨噬細胞活性，而導致患者的免疫抑制作用。

2). Ketamine 對巨噬細胞活性的抑制作用，主要是在吞噬作用、氧化能力和發炎細胞素的生成能力。

3). Ketamine 對巨噬細胞活性的抑制機轉，是透過造成粒線體功能的降低作用。

2.本計畫對民眾具教育宣導之成果

1). 常其施用成癮藥物 ketamine，會造成免疫功能的傷害。

2). 由於免疫功能受到抑制，施用 ketamine 而成癮患者易罹患其他疾病，

尤其是和感染有關的傳染性疾病。

3. 本計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於 ketamine 具有成癮性，而由本研究證實此一成癮藥物具有免疫抑制作用。成癮患者容易因免系統的傷害，而併發其他重要疾病。所以衛生單位應多宣導施用 ketamine 對於身體的危害作用，以讓社會大眾避免因長期施用此一藥物，除了會造成自我身體的戕害之外，亦會造成社會醫療成本無謂的浪費。

七、參考文獻

李志恆（民 91），藥物濫用之防制、危害、戒治，台北市：行政院衛生署管制藥品管理局。

周碧瑟（民 88），台灣地區在校青少年藥物使用流行病學調查研究，行政院衛生署委託研究計畫研究報告。

黃徵男（民 90），毒品犯之現況分析、矯治模式與處遇對策，文刊矯正月刊第 108 期。

Aderem A: Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. *Crit Care Med* 2001; 29: S16-S18.

Ayala A, Chaudry IH: Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock* 1996; 6: S27-S38.

Brown GC, Borutaite,V: Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 1999; 66: 17-25.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.

Chen LB: Mitochondria membrane potential in living cells. Ann Rev Cell Biol 1988; 4: 155-181.

Chen RM, Wu CH, Chang HC, Wu GJ, Lin YL, Sheu JR, Chen TL: Propofol suppresses macrophage functions and modulates mitochondrial membrane potential and cellular adenosine triphosphate levels. *Anesthesiology* 2003; 98: 1178-1185.

Chen RM, Wu GJ, Tai YT, Lin YL, Jean WC, Chen TL: Propofol downregulates nitric oxide biosynthesis through inhibiting inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Toxicol* 2003; 77: 418-423.

Clements JA, Nimmo WS: Pharmacokinetics and analgesic effect of ketamine in man. *Br J Anaesth* 1981; 53: 27-30.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR: Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587-600.

Diehl AM, Hoek JB: Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "the benefits of losing control". *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 493-506.

Domino EF, Zsigmond EK, Domino LE, Domino KE, Kothary SP, Domino SE: Plasma levels of ketamine and two of its metabolites in surgical patients using a gas chromatographic mass fragmentographic assay. *Anesth Analg* 1982; 61: 87-92.

Eriksson O: Effects of the general anaesthetic propofol on the Ca^{2+}-induced permeabilization of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1991; 279: 45-48.

Fredholm BB: Purines and neutrophil leukocytes. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 345-350.

Grant IS, Nimmo WS, McNicol LR, Clements JA: Ketamine disposition in children and adults. *Br J Anaesth* 1983; 55: 1107-1110.

Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T: Treponemal phospholipids inhibit innate

immune responses induced by pathogen-associated molecular patterns. *J Biol Chem* 2003; 278: 44205-44213.

Hofbauer R, Moser D, Hammerschmidt V, Kapiotis S, Frass M: Ketamine significantly reduces the migration of leukocytes through endothelial cell monolayers. Crit Care Med 1998; 26: 1545-1549.

Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Kikuchi A, Suzuki A, Takahashi S, Muraoka M, Matsuki A: Intraoperative modulation of alveolar macrophage function during isoflurane and propofol anesthesia. *Anesthesiology* 1998; 89: 1125-1132.

Kress HG, Segmuller R: Intravenous anesthetics and human neutrophil granulocyte motility in vitro. *Anaesthesist* 1987; 36: 356-361.

Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G: Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro. Br J Anaesth 1995; 75: 66-70.

Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS: ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* 1997; 7: 433-444.

Lander HM: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11, 118-124.

Nathan CF: Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987; 80: 1550-1560.

Oshimi Y, Miyazaki S, Oda S: ATP-induced Ca2+ response mediated by P2U and P2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages. *Immunology* 1999; 98: 220-227.

Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R, Capaccioli S: Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial

depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem* 2003; 278: 28220-28228.

Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR, Peterson J: Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide* 2001; 5: 128-136.

Rao KM, Padmanabhan J, Kilby DL, Cohen HJ, Currie MS, Weinberg JB: Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *J Leukoc Biol* 1992; 51: 496-500.

Reich DL, Silvay G: Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anesth* 1989; 36: 186-197.

Sakai T, Ichiyama T, Whitten CW, Giesecke AH, Lipton JM:. Ketamine suppresses endotoxin-induced NF-κB expression. *Can J Anesth* 2000; 47: 1019-1024.

Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Bach A, Bohrer H, Gebhard MM, Martin E: Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules. *Crit Care Med* 1995; 23: 2008-2014.

Shimaoka M, Iida T, Ohara A, Taenaka N, Mashimo T, Honda T, Yoshiya I: Ketamine inhibits nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cells. *Br J Anaesth* 1996; 77: 238-242.

Simizu S, Imoto M, Masuda N, Takada M, Umezawa K: Involvement of hydrogen peroxide production in erbstain-induced apoptosis in human small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1997; 56: 4978-4982.

Takenaka I, Ogata M, Koga K, Matsumoto T, Shigematsu A: Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology* 1994; 80: 402-408.

Traber DL, Wilson RD, Priano LL: The effect of alphaadrenergic blockade on the cardiopulmonary response to ketamine. *Anesth Analg* 1971; 50: 737-742.

Tripathi S, Maiti TK: Stimulation of murine macrophages by native and heat-denatured lectin from *Abrus precatorius*. *Intl Immunopharmacol* 2003; 3: 375-381.

Valledor AF, Ricote M: Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 201-212.

Weigand MA, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ: Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. Anesth Analg 2000; 90: 206-212.

Weinshank RL, Luster AD, Ravetch JV: Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, FcγRα. J Exp Med 1988; 167: 1909-1925.

White PF, Way WL, Trevor AJ: Ketamine: its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 1982; 56: 119-136.

Wu CH, Chen TL, Chen TG, Ho WP, Chiu WT, Chen RM: Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages. *J Trauma* 2003; 55: 540-545.

Yoon YS, Byun HO, Cho H, Kim BK, Yoon G: Complex II defect via down-regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence-associated growth arrest. J Biol Chem 2003; 278: 51577-51586.

Zahler S, Heindl B, Becker BF: Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils. *Acta Anaesth Scand* 1999; 43: 1011-1016.

八、圖、表

Table 1 Effects of ketamine on macrophage viability

Treatment	Cell viability (cell number x 10^2)	LDH (U/L)
1 h		
KTM, 0 μM	332 ± 35	71 ± 19
KTM, 10 μM	309 ± 41	68 ± 23
KTM, 100 μM	329 ± 34	78 ± 21
KTM, 1000 μM	344 ± 27	83 ± 23
6 h		
KTM, 0 μM	349 ± 22	64 ± 26
KTM, 10 μM	313 ± 30	78 ± 17
KTM, 100 μM	322 ± 46	74 ± 22
KTM, 1000 μM	288 ± 28*	121 ± 18*
24 h		
KTM, 0 μM	489 ± 56	77 ± 22
KTM, 10 μM	503 ± 47	79 ± 20
KTM, 100 μM	487 ± 34	83 ± 25
KTM, 1000 μM	336 ± 40*	203 ± 30*

Macrophages were exposed to 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h. Cell viability was assayed using a trypan blue exclusion method. Levels of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium were determined by an automatic analyzer. Each value represents the mean ± SEM for n = 12. * Values significantly differ from the respective control, $p < 0.05$.

Table 2 Effects of ketamine on chemotactic activities of macrophages

	Chemotactic activity, cell number x 10^2		
Time, h	10 μM	100 μM	1000 μM
0	161 ± 28	158 ± 38	169 ± 25
1	152 ± 29	145 ± 33	157 ± 29
6	149 ± 29	134 ± 28	134 ± 22
24	148 ± 34	129 ± 33	130 ± 28

Macrophages were exposed to 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h. Chemotactic activity was assayed using Transwell cell culture chamber inserts as described in "Materials and Methods". Each value represents the mean ± SEM for n = 6. *Values significantly differ from the respective control, $p < 0.05$.

Table 3 Effects of ketamine on TNF-α, IL-1β, and IL-6 mRNA levels

Treatment	TNF-α mRNA (arbitrary units)	IL-1β mRNA (arbitrary units)	IL-6 mRNA (arbitrary units)
Control	2578 ± 626	862 ± 150	247 ± 53
Ketamine	1826 ± 488	936 ± 174	268 ± 74
LPS	5271 ± 934*	2785 ± 445*	991 ± 269*
Ketamine + LPS	1261 ± 355†	1026 ± 258†	344 ± 102†

Macrophages were exposed to 100 μM ketamine, 1 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) and a combination of ketamine and LPS for 1, 6, and 24 h. Levels of TNF-α, IL-1β, and IL-6 mRNA were determined using RT-PCR analyses. Amounts of β-actin mRNA were detected as an internal standard. Intensities of RNA bands were quantified using a digital imaging system. Each value represents the mean ± SEM for n = 3. * Values significantly differ from the respective control, $p < 0.05$. † Values significantly differ from the LPS-treated groups, $p < 0.05$.

Table 4

Effects of ketamine on mitochondrial complex I NADH dehydrogenase activity

	NADH dehydrogenase activity (O.D. values at 570 nm)		
Time, h	10 μM	100 μM	1000 μM
0	1.05 ± 0.24	1.03 ± 0.24	1.24 ± 0.18
1	1.01 ± 0.26	0.97 ± 0.22	1.15 ± 0.22
6	0.99 ± 0.21	1.09 ± 0.24	0.99 ± 0.21
24	0.98 ± 0.25	0.97 ± 0.20	0.93 ± 0.17

Macrophages were exposed to 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h. The activity of mitochondrial complex I NADH dehydrogenase was assayed using a colorimetric method. Each value represents the mean ± SEM for $n = 12$.

Figure legends

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of ketamine on phagocytic activities of macrophages. Macrophages were exposed to 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h. Phagocytotic activities were determined by counting the proportions of macrophages that had digested at least 1 fluorescent particle as described in "Materials and Methods". Each value represents the mean ± SEM for $n = 12$. *Values significantly differ from the respective control, $p < 0.05$.

Fig. 2. Concentration- and time-dependent effects of ketamine on the oxidative ability of macrophages. Macrophages were exposed to 10, 100, and 1000 μM ketamine for 1, 6, and 24 h. Levels of intracellular reactive oxygen species were determined by a flow cytometric method. Each value represents the mean ± SEM for $n = 12$. *Values significantly differ from

the respective control, $p < 0.05$.

Fig. 3. Effects of ketamine (KTM) on TNF-α, IL-1β, and IL-6 mRNA production in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. Messenger RNA from macrophages exposed to 100 μM KTM, 1 ng/ml LPS, and a combination of KTM and LPS were prepared for RT-PCR analysis of TNF-α, IL-1β, and IL-6 mRNA. Amounts of β-actin mRNA were determined as an internal standard (*bottom panel*). M, DNA 100-bp marker; C, control.

Fig. 1

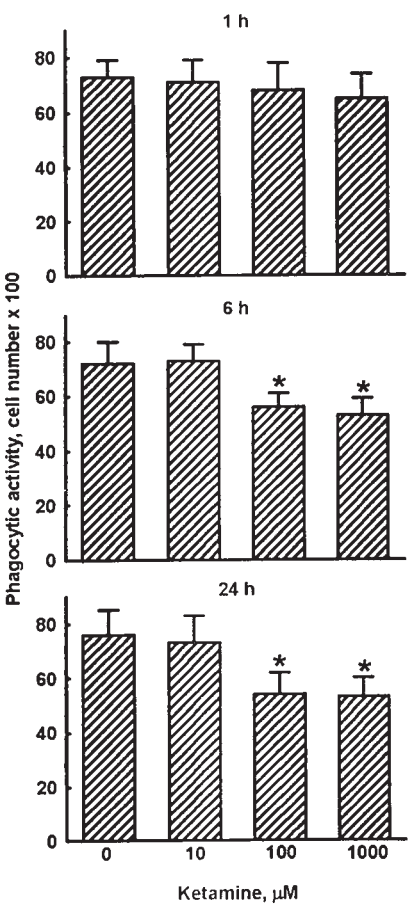


Fig. 2

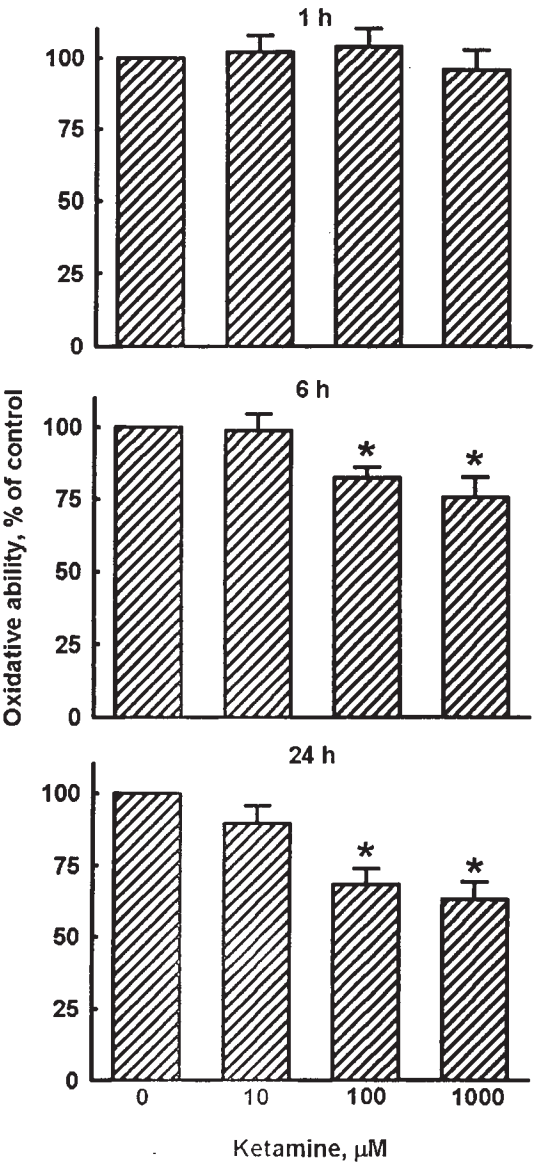

1 h
6 h
24 h
100
75
50
25
0
*
Oxidative ability, % of control
0
10
100
1000
Ketamine, μM

Fig. 3

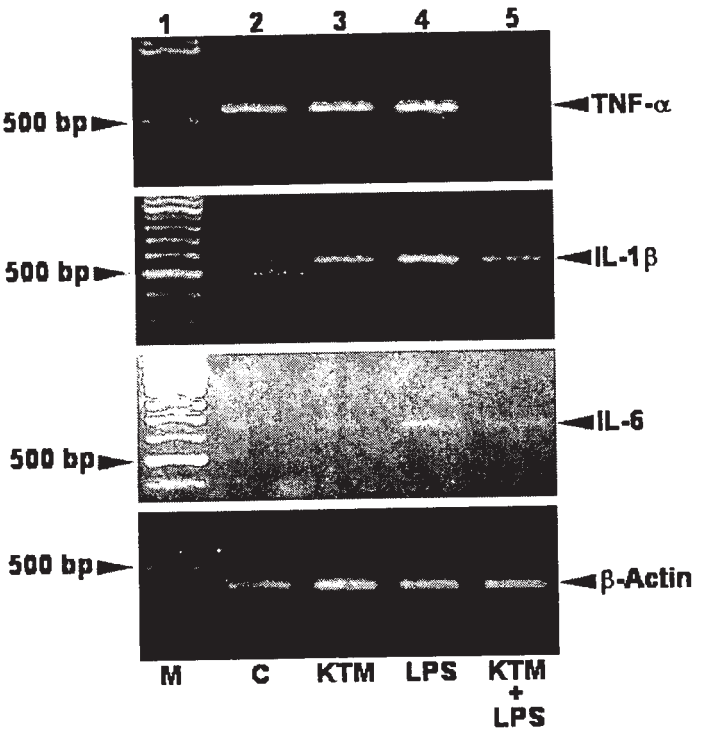
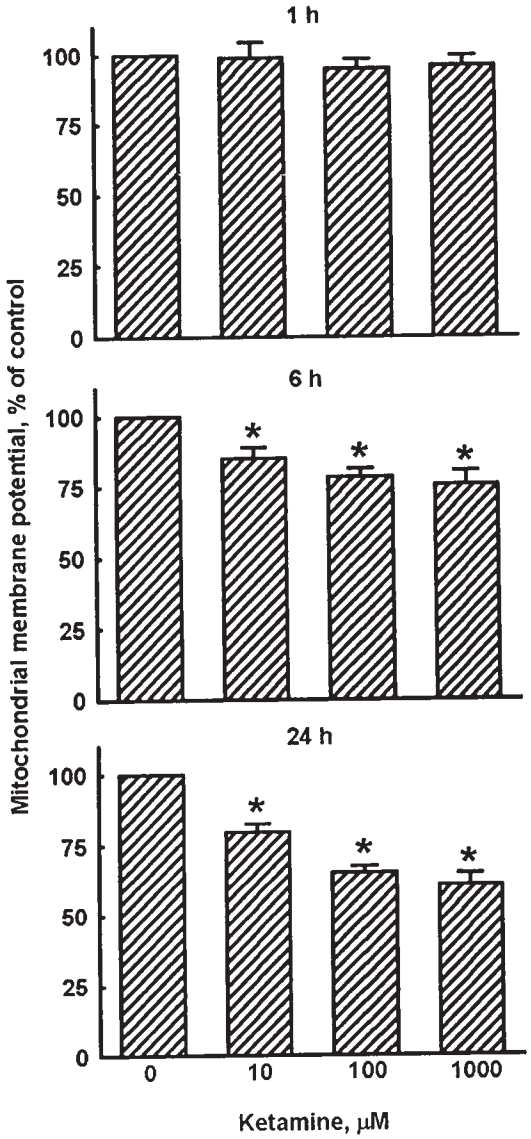

1
2
3
4
5
500 bp
TNF-α
500 bp
IL-1β
500 bp
IL-6
500 bp
β-Actin
M
C
KTM
LPS
KTM + LPS

Fig. 4


1 h
6 h
24 h
Mitochondrial membrane potential, % of control
100
75
50
25
0
*
0
10
100
1000
Ketamine, μM