RRPG92011165 (75 .P)

計畫編號：DOH92-NNB-1011

行政院衛生署管制藥品管理局

九十二年度科技研究發展計畫

Ketamine 及 GHB 引起中樞小神經膠細胞發炎反應的相對活性及毒理機轉研究

研　究　報　告

執行機構：　台北醫學大學

計畫主持人：許準榕

研究人員：　王于豪

執行期間：　92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本局意見＊＊

目錄

中文摘要	3 頁
英文摘要	4 頁
本文	
(1) 前言	5 頁
(2) 材料與方法	7 頁
(3) 結果	10 頁
(4) 討論	12 頁
(5) 結論與建議	12 頁
(6) 參考文獻	13 頁
(7) 圖形	15 頁

中文摘要

關鍵詞：小神經膠細胞, ketamine, GHB, 發炎反應

將小神經膠細胞(5×10^5/ml)分別與二次水、LPS (100 ng/ml)以及各種不同濃度的 ketamine (0.5 和 1.0 mM), GHB (0.25 和 0.5 mM)在不同的時間下(6、12 和 24 小時)分別反應，將離心後的上清液用 EIA kit 分別測定 NO、IL-1β以及 TNF-α的含量；由實驗結果顯示 LPS (100 ng/ml)會明顯的促進 microglia 釋放出 NO、TNF-α 及 IL-1β，且這些反應呈現劑量及時間上的正向關係；另一方面，我們發現不論是 ketamine (0.5 and 1.0 mM)或者是 GHB (0.25 and 0.5 mM)對 microglia 釋放 NO、IL-1β及 TNF-α都不會造成顯著影響，即使將反應時間延長至 24 小時，亦不會促進上述三種物質的釋放反應；另一方面，在 *ex vivo* 的實驗中，先將生理食鹽水、LPS (2 mg/kg)、ketamine (18 mg/kg)及 GHB (5 mg/kg)分別打入老鼠體內，在 4 小時後取出血清，再將血清與 microglia 反應 12 小時，接著如上述測定 NO 的生合成；由本實驗結果顯示，在打入 LPS 的老鼠其血清會明顯促進 microglia 釋放出 NO，然而在打入 ketamine 和 GHB 的老鼠中，其血清並不能明顯促進 microglia 表現 NO。接著我們利用 Western blot 進一步分析 LPS、ketamine 以及 GHB 對 microglia 表現 inducible nitric oxide synthase (iNOS)、IL-1β及 TNF-α的影響；由實驗結果顯示，LPS 會明顯的促進 microglia 表現出 iNOS、 IL-1β及 TNF-α，但 ketamine 及 GHB 對上述三種物質則不會表現。

由本實驗結果顯示，雖然 ketamine 和 GHB 會對人體的中樞神經系統產生強烈的迷幻作用，但它們似乎並不會引起中樞神經的 microglia 產生發炎反應。

英文摘要

keywords: microglia, ketamine, GHB, inflammatory

Recently, ketamine and GHB have been largely abused in Taiwan. They induce a very serious social problem in Taiwan. Ketamine and GHB belong to popular anesthesia in clinic. In this study, we compared and investigated the inflammatory effects of ketamine and GHB in microglia. The activation of microglia in response to neuropathological stimuli is one of the prominent features of human neurodegenerative diseases. Cytokines such as IL-1β and TNF-α and inflammation-related enzymes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) are usually induced during the inflammatory responses of microglia. In this study, we investigated the inflammatory effects of microglia stimulated by LPS (100 ng/ml), ketamine (0.5 and 1.0 mM) and GHB (0.25 and 0.5 mM). We found that LPS (100 ng/ml) time-dependently (12 and 24 hr) induced NO, IL-1β and TNF-α formations in microglia (5× 10^5/ml) as compared with the control groups (distilled water). On the other hand, preincubated microglia with ketamine and GHB for 6, 12 and 24 hr, we found that neither ketamine (0.5 and 1.0 mM) nor GHB (0.25 and 0.5 mM) significantly induced NO, IL-1β and TNF-α formations.

Furthermore, in *ex vivo* experiments, LPS also stimulated markedly NO formation in microglia, however, neither ketamine nor GHB significantly increased NO formation in this reaction. In addition, LPS but not ketamine or GHB significantly induced iNOS, IL-1β and TNF-α expressions in microglia by Western blot experiments.

In conclusion, we found that ketamine and GHB did not significantly induce an inflammatory response of microglia.

本文

(1) 前言

Ketamine 是一種非巴比妥酸鹽之麻醉劑，為一種作用迅速之全身麻醉劑，其所產生之麻醉特徵為深沉的止痛作用。臨床藥理學上證實以 ketamine 麻醉時能增加腦的活動力，因此又被稱為興奮性麻醉藥。此藥對中樞神經系統不但有抑制作用亦有興奮作用，大腦功能呈現'分離"狀態，主要因為 ketamine 在阻斷體感覺路徑之前，能選擇性的先阻斷大腦的聯合路徑。亦即，一方面抑制丘腦-新皮層系統，選擇性地阻斷痛覺傳導。另一方面對腦幹網狀結構、邊緣系統及錐體外系可呈現興奮作用；在過度濫用的情況下，腦幹網狀結構過度興奮將導致網狀結構的功能障礙，失去對大腦皮層的上行激活作用，使病人意識模糊，呈現淺睡狀態，對環境變化沒有反應；邊緣系統興奮使病人出現古怪而不愉快的幻覺及不安；錐體外興奮使病人仍可睜眼，肌張力增加，呈木僵狀態。此種痛覺完全消失而意識模糊、感覺與意識分離的麻醉現象稱為解離性麻醉作用 "(Dissociative anesthesia)"，亦稱為"木僵性麻醉"或"性奮性麻醉" 和一般麻醉劑顯然不同 (Corssen et al., 1974; Davis, 1975; Hess and Ohe, 2001)。再者，此藥鎮痛作用快，毒性小；但維持麻醉時間短，對內臟作用較差，對骨骼肌無鬆弛作用，肌張力增加，對咽喉局部刺激可能引起喉痙攣或呼吸道分泌增加，亦可使心律加快，升壓明顯，腦血流增加，顱內壓升高，甦醒慢。此藥適用於體表手術、燒傷患者更換敷料、骨折脫臼復位及骨科拔鋼絲；與鎮痛藥及全身麻醉藥併用時，麻醉作用增強，作用時間延長，可用於較長時間的手術 (Hess and Ohe, 2001)。

此外，ketamine 屬於麩氨酸 NMDA 受體阻斷劑之一的分散性麻醉劑，經動物實驗證實，在亞麻醉劑量下可引起行為、知覺和認知上的異常。而 ketamine 處理也在健康的成人中被証實可引起類似精神分裂症

的病徵及認知方面上的障礙。再者，ketamine 亦可以加速惡化精神分裂症病人的精神症狀 (Aghajanian and Marek, 2000)。另外，GHB (Gamma-hydroxybutyric acid) 是哺乳類動物腦中的一種組成，主要來自於GABA的代謝 (Matire, 1997). GHB表現出 GABA-like 的神經藥理學特性，主要被用來誘導產生鎮靜、安眠及麻醉的作用 (Mamelak et al., 1997)。由外投予的 GHB 的作用還包括引起 absence seizures，抑制神經傳遞物質的釋放，抑制腸胃道運動及刺激腦部 dopamine 合成及受體的表現 (Snead, 1991; Carai et al., 2002)。

GHB 主要的作用能夠被 $GABA_B$ 受體的拮抗劑所阻斷，因此認為 GHB 的作用是經由 $GABA_B$ 受體媒介。然而，有一些 GHB 的作用，例如 GHB 誘導 glutamate 釋放，抑制大鼠 hippocampus 切片中 NMDA 受體及 AMPA/Kainate 受體引發的興奮性突觸後電位 (Bemasconi et al., 1999)，增加 hippocampus 的 cyclic GMP 含量及 phosphoinositol turnover 等都能被 GHB 受體的拮抗劑所阻斷 (Berton et al., 1999)；因此這些作用認為可能是經由 GHB 受體。一般在人體誘導麻醉的劑量下 (100-200 mg/kg)，能將 GHB 的血中濃度由 μM 上升到 mM 的範圍 (Matire et al., 1990)，此一濃度能使神經細胞產生明顯的電生理學上的變化(Lingenhoehl et al., 1999)。

近年來由於台灣社會型態轉型迅速，自由貿易往來頻繁亦將外國文化的惡習帶入台灣。近年來發現數種毒品流竄於台灣都會區之各大舞廳及青少年出入場所，由於正值叛逆期之青少年最容易因好奇心或同儕的鼓動而接觸毒品，此外更有不少社會不法份子利用麻醉藥品來逞兇。在眾多毒品中 ketamine 和 GHB 算是最氾濫的藥品，已經構成相當的社會問題。

Ketamine 在如前所述在醫療上用於人類和動物手術中的全身麻醉劑 (general anesthetic)，且常用於小兒科手術。犯罪者常以液體劑型與大麻煙草產品合用或以白色粉末用鼻吸或煙吸，也可以放入飲料中或以肌肉注射方式使用；本身屬於中樞神經抑制劑，因無色無嗅無味，極易被人偷偷放入飲料中而不易察覺，被有心人用做約會強暴藥，去迷姦被害人。

另外，GHB 30 年前在法國問世後，就成為歐洲地區廣泛應用的普通麻醉劑，但在服用過量後，就會出現失去平衡感、快速沉睡等副作用。此外，GHB 易溶於水，且無色無味，此特性與已被列為三級毒品的 FM2 具有相同效果，因此 GHB 已成為部分歹徒的新寵。 GHB 除以粉末狀型態販售，部分藥商亦有以水溶劑型販賣，只要服用超過 1 mg 就可達到自然睡眠的效果；服用五分鐘後就開始作用，可持續長達四小時，目前已在市面上逐漸流行，成為新一代的迷姦藥劑。

由近年來眾多社會事件觀之，此兩種麻醉藥品已對台灣社會造成極大傷害。為避免此傷害繼續擴大，除消極立法嚴懲歹徒惡行及將藥品嚴格列管外，更重要的是積極去研究 ketamine 和 GHB 對身體所可能造成的傷害，並加以宣導。有鑑於此，本研究計畫將以探討是否 ketamine 和 GHB 此兩種麻醉藥品會對中樞神經之小神經膠細胞 (microglia) 造成發炎反應做深入探討。

(2) 材料與方法

Ketamine 購於南光製藥；GHB, LPS 等購於 Sigma; anti-iNOS monoclonal antibody 購於 BD Biosciences; anti-IL-1β 及 anti-TNF-α monoclonal antibody 購於 R&D Systems; IL-1β 及 TNF-αEIA kits 購於 Cayman; 細胞培養液等購至於 Gibco.

一、初代腦細胞培養 (primary brain culture)

選用 5 天大的老鼠 (S.D. rat)，經乙醚麻醉後，用 0.1M PBS (pH7.4) 經心臟灌流 3 分鐘；接著把全腦 (whole brain) 取出放入 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin) 中，並且將全腦剪成小組織塊，再加入 0.2 % trypsin 和 10 μg/ml deoxyribonuclease 於 37℃下作用 20~30 分鐘。將此混合物於 1,200 rpm 下離心 10 分鐘後，將沉澱物重新懸浮於 DMEM 溶液中。重複上述的離心步驟；最後將此沉澱物懸浮於 DMEM 溶液中(10% FCS, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, 2.5 μg/ml fungizone, 4 ml L-glutamine, 100 μM nonessential amino acid, 5 μg/ml insulin), 以含 10^7 cells/ml 的細胞密度培養於含 95 % air, 5 % CO_2, 37℃的培養箱中。

二、富含小神經膠細胞培養 (enriched microglial culture)

一星期後，初代全腦細胞用 100 rpm 速度搖晃 15~16 小時，收集上層懸浮液，離心 10 分鐘，再讓這些細胞重新附著於培養皿；在 1~2 小時後，用手輕搖培養皿約 2~5 分鐘後，取掉培養液，此時附著在培養皿上的就是富含小神經膠細胞(microglia)。而判斷此細胞的方法參考 Goodwin 等人(1997)螢光免疫分析法; Microglia 可被 Mac-1 單源抗體標定，但是無法被 anti-galactocerebroside (標定 oligodendrocytes) 或 anti-glial fibrillary acidic protein (標定 astrocytes)的單源抗體標定，而培養好的 microglia 其純度要超過 95 % 以上始可被採用。

三、In vitro ketamine 及 GHB 對 microglia 釋放 IL-1β, TNF-α 及 NO 的影響

(a) 取上述之 microglia 懸浮液 (5×10^5 cells/ml), 分別加入不同濃度的

LPS (100 ng/ml), ketamine (0.5-1.0 mM) 或 GHB (0.25-0.5 mM) 在室溫下分別反應 6, 12, 24 小時；反應終了將此混合物在 1,000 rpm 下離心 10 分鐘；取上清液利用不同的 EIA kits 分別定量 IL-1β, TNF-α。

(b) 利用 nitric oxide 分析儀測定 NO 的變化

取上述的上清液 100 μl 加入無水酒精 (1:2) 均勻混合，再於 4℃下冷藏 30 分鐘，最後以 14,000 r.p.m. 離心 8 分鐘，取上層清液。以上為待測物除去蛋白質之前處理。將預處理之待測物取 10 μl 打入反應槽中，以 VCl_3 為還原劑，將待測物中的 nitrate (NO_3^-) 和 nitrite (NO_2^-) 皆還原成 nitric oxide (NO), 再利用氮氣將 NO 帶入一氧化氮分析儀 (Sirvers Research Redox Chemiluminescence Detector, Model NOA 280, Sievers CO. Ltd.) 中與臭氧反應，並偵測反應後釋出 600 nm 以上的螢光，最後以已知濃度的 sodium nitrate 標準曲線來計算血小板 NO 的濃度。

四、Ex vivo ketamine 或 GHB 對 microglia 釋放 NO 的影響

將不同劑量的 LPS (2 mg/kg), ketamine (18 mg/kg) 或 GHB (5 mg/kg) 分別由尾靜脈打入大白鼠體內；在 4 小時的反應時間後，分別將老鼠犧牲。用 pentobarbitone (40 mg/kg)將老鼠麻醉，由胸主動脈取出約 8 ml 的全血；將此全血在 37℃下靜置 2 小時，在 15,000 rpm 離心速率下離心 30 分鐘；取出上輕液(即血清)；分別取 500 μl 之上清液與上述之 microglia 懸浮液 (5×10^5 cells/ml) 分別反應 12 小時；接著如上述將此混合物離心，取上清液利用 NO 分析儀，分別定量 NO 的含量。

五、利用西方墨點法 (western blotting analysis) 分析 LPS, ketamine 或 GHB 對 microglia 表現 iNOS, IL-1β 及 TNF-α 等的活性

如上述之實驗，在投與 LPS, ketamine, GHB 或 ketamine 加上 GHB

後，將 microglia 離心，接著以 lysis buffer [1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl,以及 protease inhibitors (包括 1 mM EGTA, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 和 10 μg/ml pepstatin)]將 microglia (5×10^5 cells/ml) 分解；接著在 4℃下以 14,000 g 離心 10 分鐘，收集其上清液，並定量上清液中的蛋白質含量。取 20 μg protein/sample 以凝膠層析法，用 12% SDS-polyacrylamide gel 分離，之後再轉漬至 0.2 μM nitrocellulose 的 Trans-Blot filter 上。

將 filter 浸泡至 3 %不含脂質的牛奶中，加入不同的初級抗體如加入 anti-rat iNOS monoclonal antibody 來標示 iNOS; anti-rat IL-1β monoclonal antibody 來標示 IL-1β 或加入 anti-rat TNF-α monoclonal antibody 來標示 TNF-α; 最後，洗去游離的初級抗體，再加入二次抗體 (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody), 並利用 Amersham 之 ECL (enhanced chemiluminescence) Western blot kit 將 nitrocellulose 上的 protein 呈色出來，再利用影像分析系統(Scan Maker IIsp) 加以定量每一個 band 的相對強度。

六、實驗數據統計分析：

實驗數據以實驗結果之平均值 (Mean)± 標準誤差 (S.E.M.) 來表示，進行變異數分析 (ANOVA)，並以 Duncan's test 來測試不同投藥組間的差異效果；若 $P<0.05$ 則表示兩組間有統計上的差異。

(3) 結果

一、Ketamine、GHB 對 microglia 釋放 NO、IL-1β 及 TNF-α的影響

圖一為顯微鏡下所觀察到的 microglia 細胞；由圖二的結果顯示 LPS (100 ng/ml)在和 microglia 分別反應 12 和 24 小時後，會明顯的增加

microglia釋放NO (5.1 ± 0.3和12.3 ± 1.2 μM)；反之，分別投與ketamine (0.5和1.0 mM)後，分別與microglia反應6、12及24小時，由圖二的結果顯示，ketamine即使在較高濃度下(1.0 mM)反應24小時，亦不會造成microglia 的 NO釋放；同樣的情形亦可在GHB的反應中得知(圖三)，即使投與較高濃度的GHB (0.5 mM)，反應時間延長至24小時，亦不會造成microglia明顯釋放NO；另外，經LPS分別處理12及24小時後，microglia 所釋放的 IL-1β含量明顯的比控制組(二次水)來得高(12小時, 3.2 ± 0.6 ng/10^6 cells；24小時, 4.6 ± 0.4 ng/10^6 cells)來得高；但經ketamine (0.5和1.0 mM)或GHB (0.25和0.5 mM)分別處理6、12及24小時後，結果顯示ketamine和GHB並不會造成microglia明顯地釋放IL-1β，即使將ketamine (1.0 mM)和GHB (0.5 mM)一起和microglia反應12小時亦然(圖四、五)。在測量TNF-α方面，其結果和IL-1β非常相似，LPS (100 ng/ml)和microglia分別反應12和24小時，LPS會明顯促進microglia釋放TNF-α (12小時, 18.6 ± 2.3 ng/10^6 cells；24小時, 25.6 ± 3.5 ng/10^6 cells)；ketamine (0.5和1.0 mM), GHB (0.25和0.5 mM)或者ketamine (1.0 mM)加上GHB (0.5 mM)分別和microglia反應6、12、24小時，由圖六、七結果顯示ketamine、GHB或者ketamine加上GHB都不會有意義的促進microglia表現TNF-α。

二、*Ex vivo* ketamine和GHB促進microglia表現NO的作用

將LPS (2 mg/kg)、ketamine (18 mg/kg)或者GHB (5 mg/kg)分別打入老鼠體內，再利用其血清去刺激microglia產生NO，由圖八實驗中顯示，在打入LPS的老鼠體中，其血清會明顯的促進NO的形成(5.0 ± 0.4 μM)；但分別打入ketamine和GHB的老鼠血清，並不會造成microglia釋放NO。

三、以 Western blot 分析 microglia 細胞內分別表現 iNOS、IL-1β 及 TNF-α的情形

將上述實驗中分別與 LPS (100 ng/ml)、ketamine (1.0 mM)、GHB (0.5 mM)或者 ketamine (1.0 mM)加上 GHB (0.5 mM)反應 12 小時的 microglia 吸出接著用細胞分解液分解數分鐘，經離心後將上清液用 Western blot 分析其細胞內分別表現 iNOS、IL-1β及 TNF-α的情形；由圖九、十、十一中顯示在經過 LPS (100 ng/ml)處理 12 小時的 microglia 會明顯的表現 iNOS (圖九)，IL-1β (圖十) 及 TNF-α (圖十一)；但經 ketamine 或 GHB 甚至 ketamine 加上 GHB 處理過的 microglia 則不會表現 iNOS、IL-1β 及 TNF-α。

(4) 討論

由本實驗結果顯示 ketamine 和 GHB 即使在較高的濃度下和 microglia 反應長達 24 小時，亦不會明顯引起 microglia 的發炎反應發生；再由 *ex vivo* 的實驗中發現即使將 ketamine 或 GHB 打入周邊血管亦不會造成周邊組織細胞產生發炎反應，因此即使 ketamine 和 GHB 兩者會導致強烈的中樞神經迷幻作用亦不會引起 microglia 的發炎反應發生。

(5) 結論與建議

本實驗結果顯示雖然 ketamine 和 GHB 會導致強烈的中樞迷幻作用，但經由本研究結果顯示兩者對 microglia 而言，並不會引起發炎反應的發生；但此結果並不表示服用 ketamine 和 GHB 對中樞神經系統的其它細胞如 astrocyto 甚至是腦部其它區域的神經細胞是安全的，至於兩者對其它中樞細胞的反應如何，仍需進一步實驗才可得知。

(6) 參考文獻

Aghajanian GK, Marek GJ: Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. Brain Res Rev 2000; 31: 302-12.

Bemasconi R, Mathivet P, Bischoff S, Marescaux C: Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous nuromodulator with abuse potential? Trends Pharmacol Sci 1999; 20: 135-41.

Berton F, Brancucci A, Beghé F, Cammalleri M, Demuro A, Francesconi W, Gessa GL: γ-Hydroxybutyrate inhibits excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices. Eur J Pharmcol 1999; 380: 109-16.

Carai MA, Agabio R, Lobina C, Reali R, Vacca G, Colombo G, Gessa GL: GABA(B)-receptor mediation of the inhibitory effect of gamma-hydroxybutyric acid on intestinal motility in mice. Life Sci 2002; 70: 3059-67.

Corssen G, Reves JG, Carter JR: Neuroleptanesthesia, dissociative anesthesia, and hemorrhage. Int Anesthesiol Clin 1974; 12: 145-61.

Davis B: Noninhalational anaesthetics. Adv Drug Res 1975; 10: 1-51.

Goodwin JL, Kehrli Jr ME, Uemura E: Integrin Mac-1 and β-amyloid in microglial release of nitric oxide. Brain Res 1997; 768: 279-86.

Hess WC, Ohe A.: Does ketamine/propofol anesthesia possess antiarrhythmogenic quality? A perioperative study in aortocoronary bypass patients. Eur J Med Res 2001; 17: 543-50.

Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, Beck P, Froestl W, Kaupmann K, Bettler B, Mosbacher J: Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. Neuropharmacol 1999; 38: 1667-73.

Mamelak M, Escriu JM, Stokan O: The effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep. Biological Psychiatry 1997; 12: 273-88.

Matire M, Hechler V, Vayer P, Gobaille S, Cash CD, Schmitt M,

Bourguignon JJ: A specific γ-hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. J Pharmacol Exp Ther 1990; 255: 657-63.

Matire M: The γ-hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and functional implications. Prog Neurobiol 1997; 51: 337-61.

Snead OC: The gamma-hydroxybutyrate model of absence seizures: correlation of regional brain levels of gamma-hydroxybutyric acid and gamma-butyrolactone with spike wave discharges. Neuropharmacol 1991; 30: 161-7.

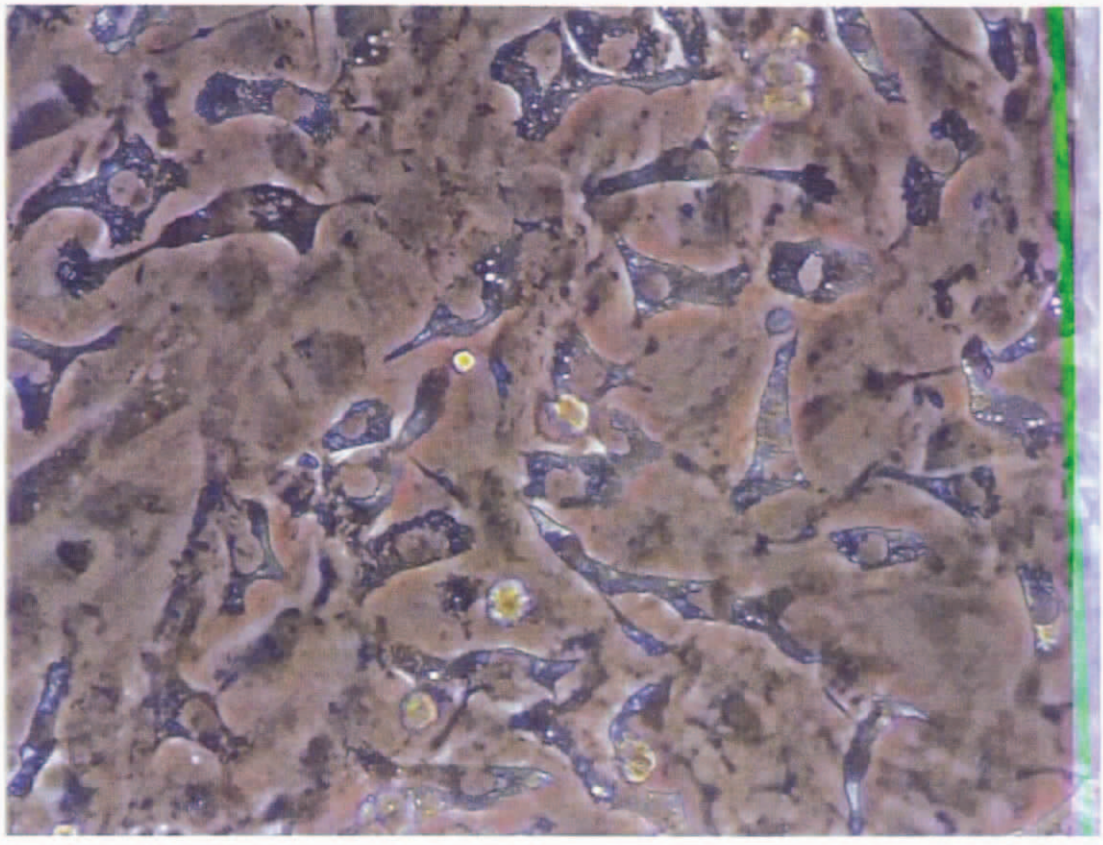

Figure 1. 顯微鏡下所觀察到的小神經膠細胞(microglia) (20 x)

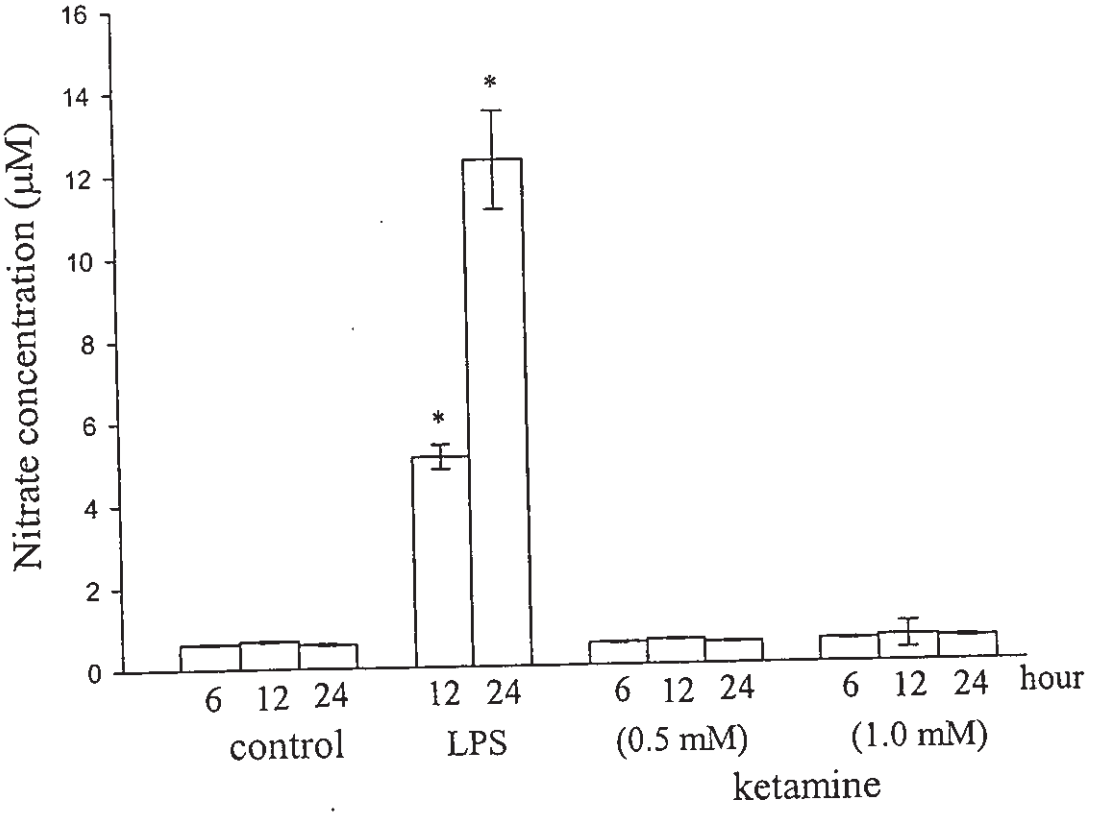

Figure 2. 將 LPS (100 ng/ml), ketamine (0.5 and 1.0 mM) 與 microglia (5×10^5/ml)分別反應 6, 12 及 24 小時；收集上清液利用 NO analyzer 定量 NO 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

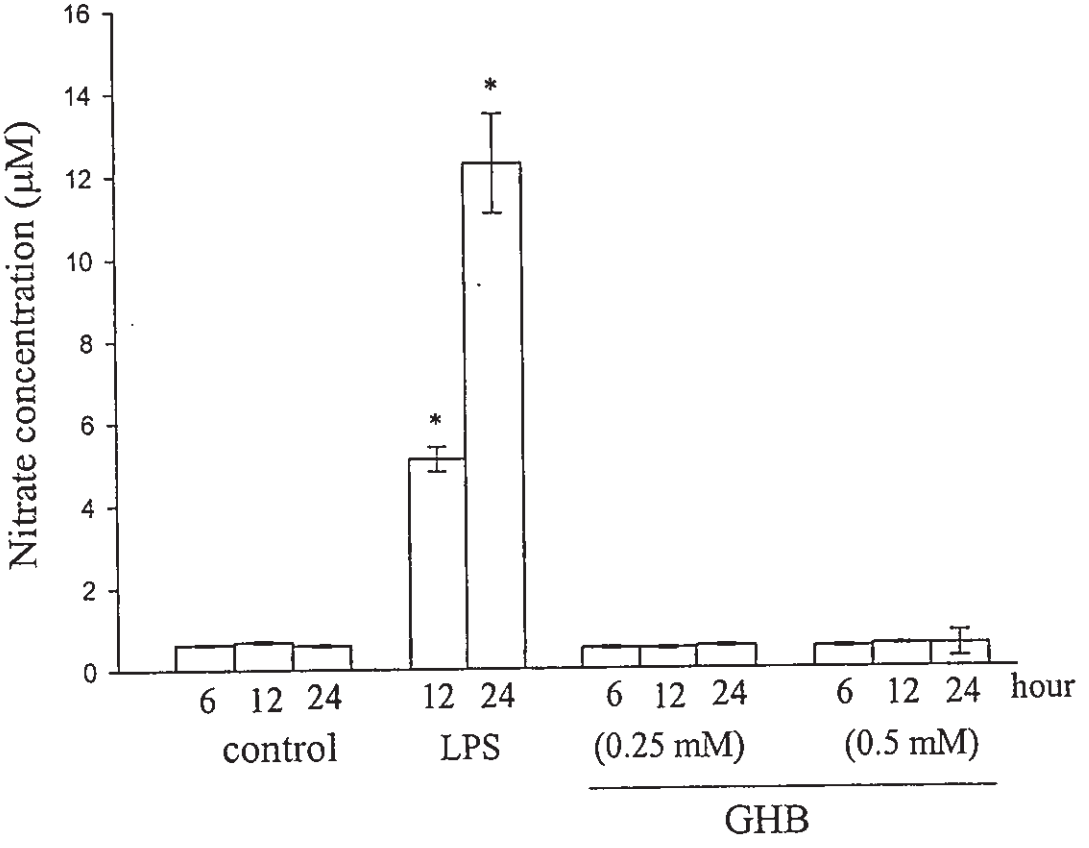

Figure 3. 將 LPS (100 ng/ml), GHB (0.25 and 0.5 mM) 與 microglia (5× 10^5/ml)分別反應 6, 12 及 24 小時；收集上清液利用 NO analyzer 定量 NO 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

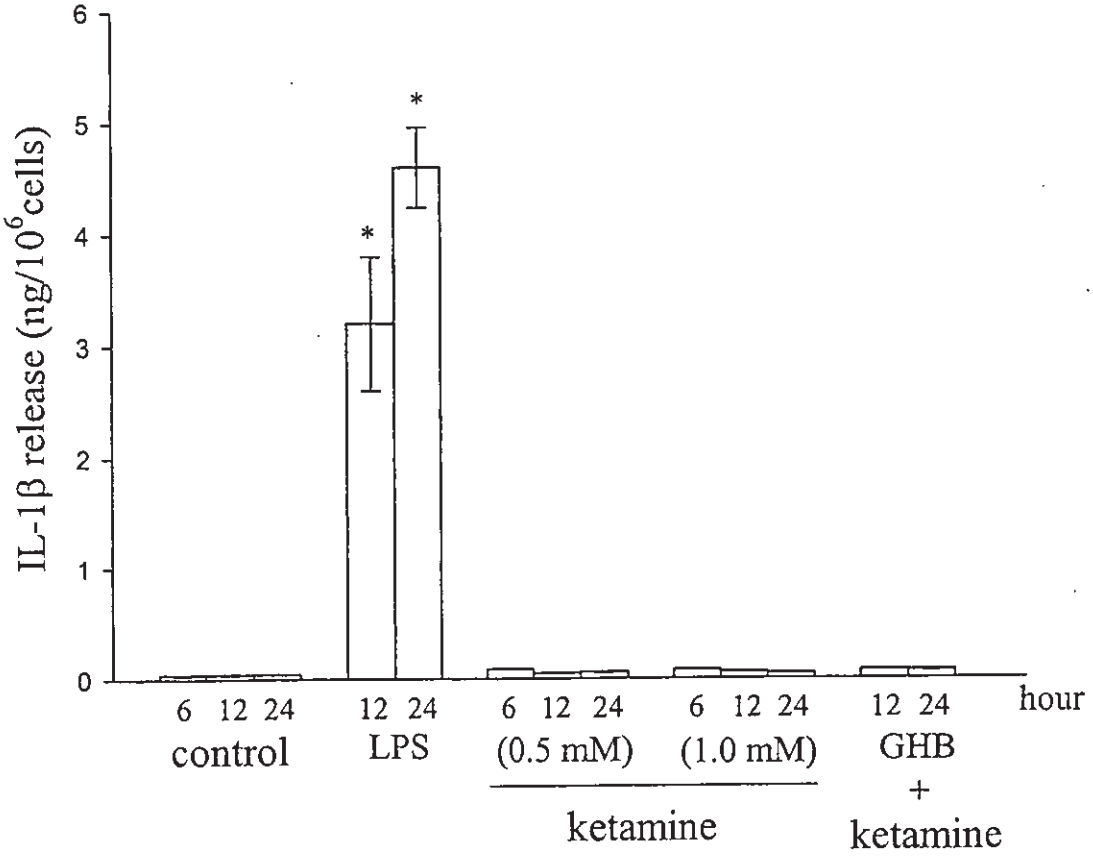

Figure 4. 將 LPS (100 ng/ml), ketamine (0.5 and 1.0 mM) 或者 ketamine (1.0 mM) 加上 GHB (0.5 mM) 與 microglia (5× 10^5/ml)分別反應 6, 12 及 24 小時；收集上清液利用 EIA kit 定量 IL-1β 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

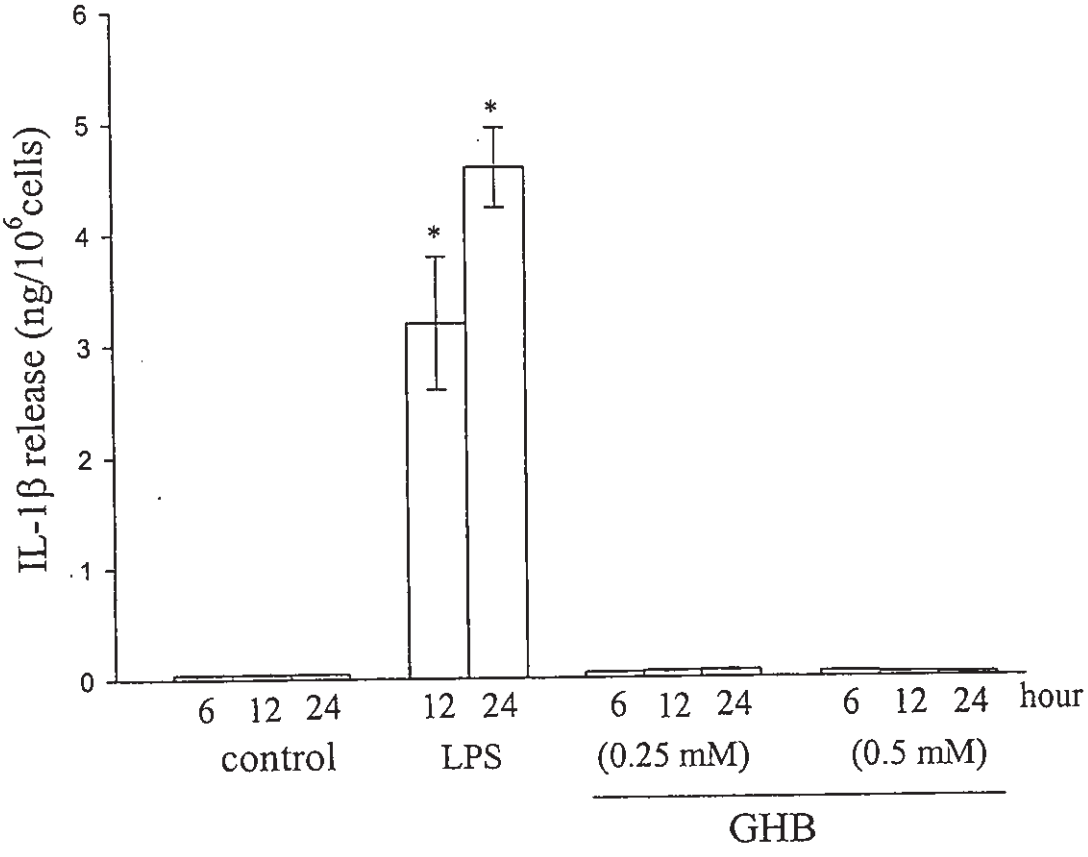

Figure 5. 將 LPS (100 ng/ml), GHB (0.25 and 0.5 mM) 與 microglia (5×10^5/ml)分別反應 6, 12 及 24 小時；收集上清液利用 EIA kit 定量 IL-1β 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

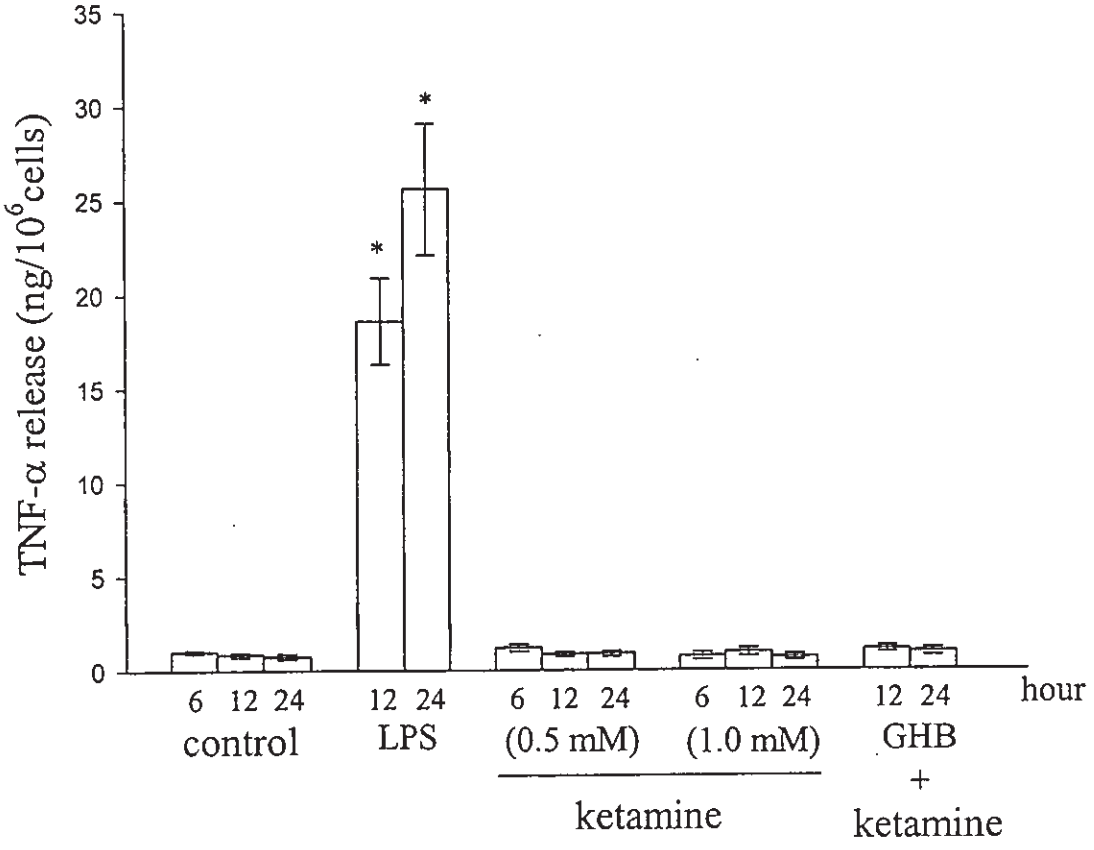

Figure 6. 將 LPS (100 ng/ml), ketamine (0.5 and 1.0 mM) 或者 ketamine (1.0 mM) 加上 GHB (0.5 mM) 與 microglia (5× 10^5/ml)分別反應 6, 12 及 24 小時；收集上清液利用 EIA kit 定量 TNF-α 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

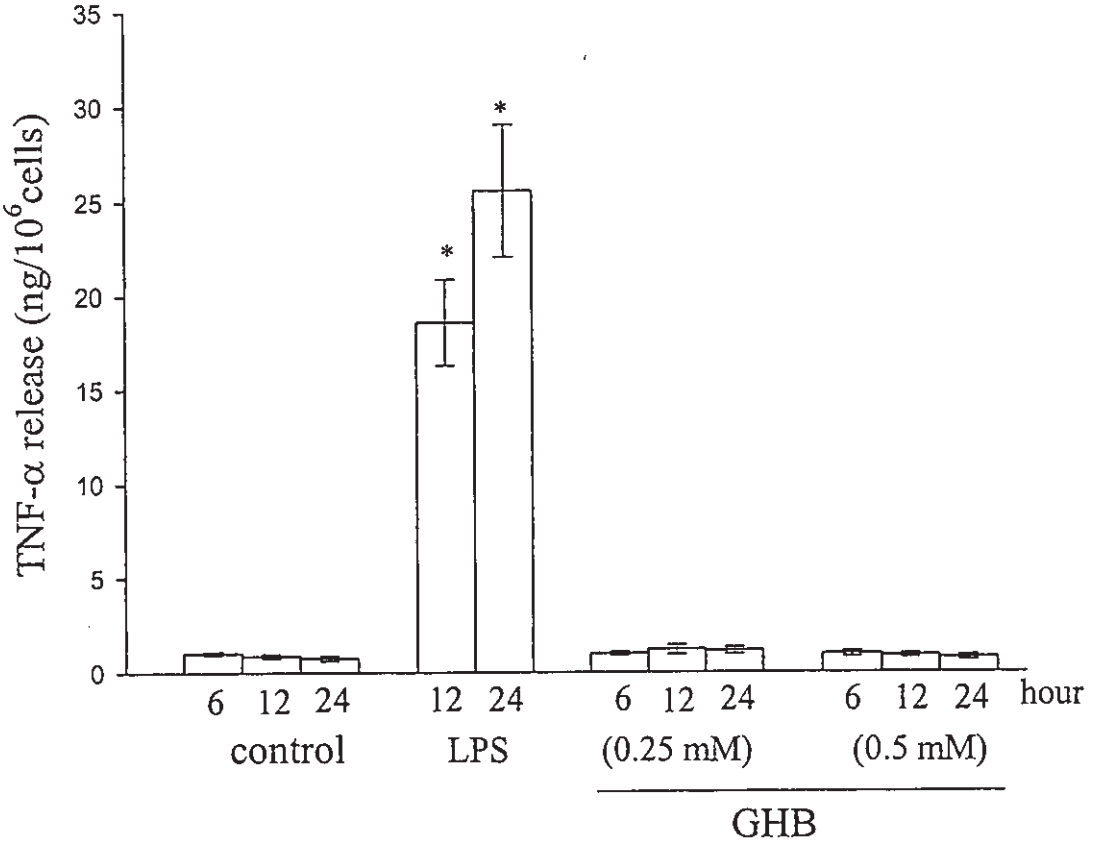

Figure 7. 將 LPS (100 ng/ml), GHB (0.25 and 0.5 mM) 與 microglia (5× 10^5/ml)分別反應 6, 12 及 24 小時；收集上清液利用 EIA kit 定量 TNF-α 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

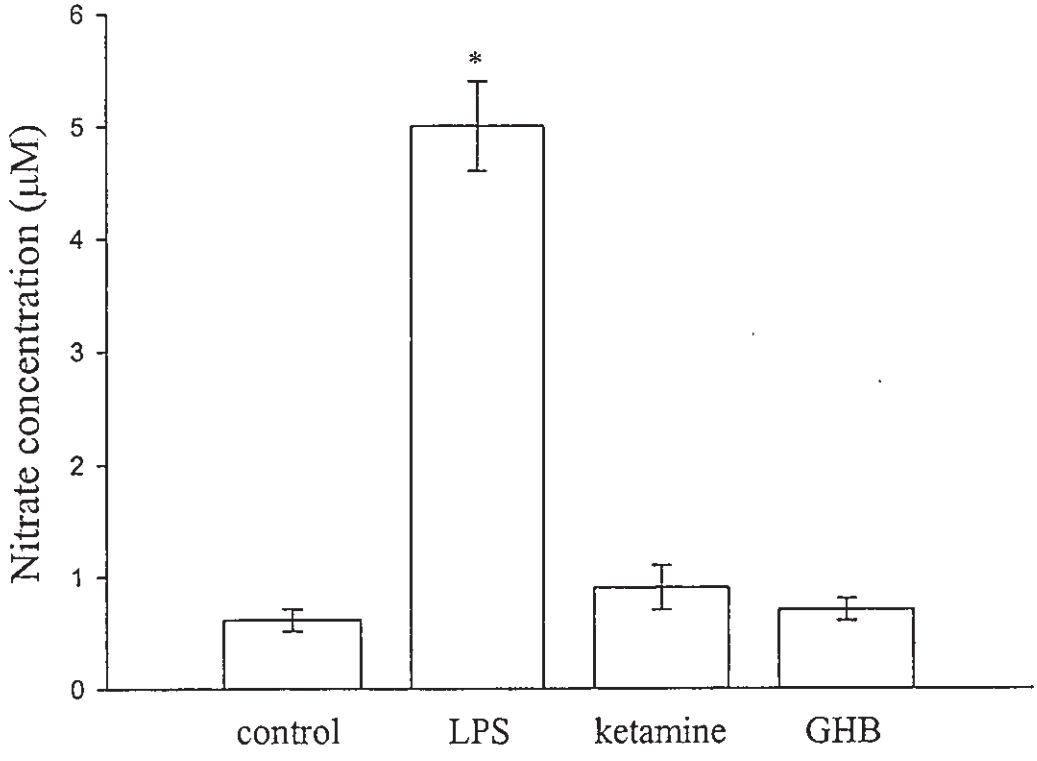

Figure 8. 先將 LPS (2 mg/kg), ketamine (18 mg/kg) 及 GHB (5 mg/kg)分別打入老鼠體內，再將其血清 與 microglia (5x 10^5/ml)反應 12 小時；收集上清液利用 NO analyzer 定量 NO 的含量；實驗數據以平均值 ± 標準誤差表示(n=3)；$^*P < 0.001$ 當和控制組 (normal saline) 比較。

Figure 9. 將 LPS (100 ng/ml), ketamine (1.0 mM), GHB (0.5 mM) 及 ketamine (1.0 mM) 加上 GHB (0.5 mM) 分別與 microglia (5× 10^5/ml)反應 12 小時；收集細胞溶解液跑 Western blot, 用以標定 microglia 細胞內 iNOS 表現的情形； Lane 1 代表投與 LPS 組，lane 2 代表投與 ketamine 組，lane 3 代表投與 GHB 組，lane 4 代表投與 ketamine 加上 GHB 組；本圖代表三次相似的實驗之一。

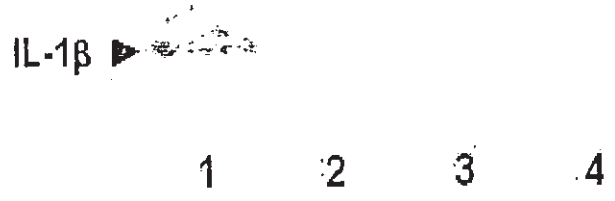

Figure 10. 將 LPS (100 ng/ml), ketamine (1.0 mM), GHB (0.5 mM) 及 ketamine (1.0 mM) 加上 GHB (0.5 mM) 分別與 microglia (5× 10^5/ml)反應 12 小時；收集細胞溶解液跑 Western blot, 用以標定 microglia 細胞內 IL-1β 表現的情形； Lane 1 代表投與 LPS 組，lane 2 代表投與 ketamine 組，lane 3 代表投與 GHB 組，lane 4 代表投與 ketamine 加上 GHB 組；本圖代表三次相似的實驗之一。

Figure 11. 將 LPS (100 ng/ml), ketamine (1.0 mM), GHB (0.5 mM) 及 ketamine (1.0 mM) 加上 GHB (0.5 mM) 分別與 microglia (5× 10^5/ml)反應 12 小時；收集細胞溶解液跑 Western blot, 用以標定 microglia 細胞內 TNF-α 表現的情形； Lane 1 代表投與 LPS 組，lane 2 代表投與 ketamine 組，lane 3 代表投與 GHB 組，lane 4 代表投與 ketamine 加上 GHB 組；本圖代表三次相似的實驗之一。