

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.03.002

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190821.1425.002.html>(2019-08-21)

基于代谢组学方面对氯胺酮肝毒性的机制研究^{*}

吴知桂¹,殷文贤²,罗宏丽¹,万胜利¹,王茂林¹,廖林川^{3△}

(1. 西南医科大学附属医院药学部,四川泸州 646000;2. 西南医科大学附属医院中医医院药学部,四川泸州 646000;
3. 四川大学基础医学与法医学院,成都 610041)

[摘要] **目的** 从代谢组学层面对氯胺酮肝毒性及其机制进行研究。**方法** 选择 48 只 SD 大鼠为实验动物,将其分为氯胺酮组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和对照组(等量生理盐水),每组 24 只,均腹腔注射给药。分别在给药 1、4、12 周后每组取 8 只大鼠,测定其肝脏指数,检测血清 ALT、AST 水平,IL-6 和 TNF- α 炎症指标,观察肝组织病理学变化;同时运用气相色谱-质谱法(GC-MS)分析血清代谢物变化。**结果** 与对照组比较,氯胺酮组在给药 12 周后体质量明显减轻($P<0.05$);肝脏指数在给药 4、12 周后明显增加($P<0.05$);血清 ALT、AST、IL-6、TNF- α 水平在给药 12 周后均明显升高($P<0.01$);肝组织细胞受损,出现明显病理性改变。氯胺酮组和对照组血清代谢物水平发生明显改变,差异代谢通路涉及 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢;丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢;苯丙氨酸代谢;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢。**结论** 氯胺酮肝毒性机制主要涉及氨基酸多条代谢通路,体现在能量代谢、氧化应激、神经递质传递等的异常反应。

[关键词] 氯胺酮;代谢组学;药物性肝损伤;代谢网络和途径;气相色谱-质谱法

[中图法分类号] R992 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)03-0349-07

Study on mechanism of ketamine hepatotoxicity based on metabonomic^{*}

WU Zhigui¹,YIN Wenxian²,LUO Hongli¹,WAN Shengli¹,WANG Maolin¹,LIAO Linchuan^{3△}

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Southwest Medical University,

Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Traditional

Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. College of Basic

Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the hepatotoxicity and mechanism of ketamine from the metabonomic level. **Methods** Forty-eight SD rats served as the experimental animals and divided into the ketamine group ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and control group (same volume of normal saline), 24 cases in each group. The medication was given by intraperitoneal injection. After 1, 4, 12 weeks of drug administration, 8 cases in each group were taken for measuring the liver index, serum ALT and AST levels, IL-6 and TNF- α inflammatory indicators, and the liver histopathological changes were observed. Meanwhile, the changes of serum metabolites were analyzed by using the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Results** Compared with the control group, the body mass after 12 weeks of administration in the ketamine group was significantly decreased ($P<0.05$). The liver index at 4, 12 weeks of medication was increased significantly ($P<0.05$). The levels of serum ALT, AST, IL-6 and TNF- α at 12 weeks after medication was increased significantly ($P<0.01$). The liver tissue cells were damaged and showed obvious pathological changes. Serum metabolite levels in the ketamine group and control group were significantly changed, and the different metabolic pathways involved D-glutamine and D-glutamic acid metabolism; alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism; phenylalanine, tyrosine and tryptophan metabolism; phenylalanine metabolism; valine, leucine and isoleucine metabolism. **Conclusion** The ketamine hepatotoxicity mechanism mainly involves in multiple amino acid metabolic pathways, which are reflected in abnormal reactions of energy metabolism, oxidative stress and neurotransmitter transmission.

[Key words] ketamine; metabonomics; drug-induced liver injury; metabolic networks and pathways; gas chromatography-mass spectrometry

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金面上项目(81373239);西南医科大学附属医院博士启动基金项目(18104);西南医科大学校级项目(00031260)。 **作者简介:**吴知桂(1986—),讲师,博士,主要从事代谢组学药理毒理学研究。 [△] **通信作者,** E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn。

氯胺酮(ketamine)是具有镇静、镇痛和麻醉等多项药效于一体的静脉麻醉药物^[1]。近年来,氯胺酮的抗抑郁^[2-3],脑保护^[4]等其他作用也突显出来;同时,氯胺酮具有致幻作用和成瘾性,也被滥用于各种娱乐场所,非法滥用氯胺酮的人数呈现快速增长趋势^[5]。在氯胺酮应用范围越广泛的同时,其毒副作用也受到人们的高度关注。有实验表明,长期服用氯胺酮对中枢神经系统有不良影响^[6],可导致血压升高、心肌缺血等心血管系统事件^[7],以及膀胱炎^[8]等毒性反应。但是,氯胺酮的肝毒性研究较少。事实上,氯胺酮在肝脏中被微粒体酶广泛代谢为去甲氯胺酮及羟化去甲氯胺酮,这些代谢物和氯胺酮会损害肝细胞导致肝损伤^[9],但其肝毒性机制有待进一步考察。

代谢组学通过对机体代谢物的分析,以追踪代谢物与机体生理病理状态的关系或外源性物质毒性作用的生物学机制^[10]。近年来,代谢组学在药物毒性作用中的研究引起了较大关注^[11-12],如用代谢组学技术研究黄药子和黄独素 B 诱导的肝损伤可能与胆汁酸及脂肪酸代谢密切相关^[13-14],表明该方法是探索药物毒性机制的有力工具。本实验采用气相色谱-质谱法(GC-MS)的代谢组学检测氯胺酮致大鼠肝损伤血液的代谢产物,以期找到与氯胺酮肝毒性相关的关键代谢通路,为其机制的研究提供依据和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 48 只[SCXK(川)2015-030],体质量(220±10)g,购自成都达硕实验动物有限公司。饲养环境如下:饲养温度(23±2)℃,湿度(50±10)%,光照/黑暗 12 h 交替,自由饮水进食。所有实验均遵照四川省实验动物管理委员会的规定进行,符合《实验动物管理和使用指导》。

1.1.2 试剂与药品

乙腈、吡啶、正庚烷,甲氧胺盐酸盐(98%)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;N,O-双三甲基硅三氟乙酰胺(BSTFA)+1%三甲基氯硅烷(TMCS,1 g)购自美国 Regis 公司,硬脂酸甲酯(99.5%)购自中国阿拉丁公司;IL-6 和 TNF-α 试剂盒购自江苏南京建成生物工程研究所有限公司;氯胺酮(0.1 g)购自中国福建古田公司。

1.1.3 设备与软件

冷冻离心机购自美国 Thermo Fisher 公司,旋转蒸发集中器购自日本 Eyela 公司,冻干机购自德国 Christ 公司,Agilent 7890C GC-MS 购自美国 Agilent 公司,显微镜(Olympus Bx53)购自日本 Tokyo 公司;AMDIS 6.51 分析软件购自美国 Agilent 公司,SIM-CA-P11.0 分析软件购自美国 Umetrics 公司。

1.2 方法

1.2.1 氯胺酮染毒模型的建立

将 48 只大鼠分为氯胺酮组和对照组,每组 24 只。氯胺酮组腹腔注射氯胺酮,剂量为 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对照组给予等量生理盐水。每组 8 只大鼠分别给药至 1、4、12 周,且每周称体质量 1 次,观察大鼠体质量变化。

1.2.2 样本采集

每日观察大鼠行为表现,每组分别在 1、4、12 周的末次给药 24 h 后,取 8 只大鼠麻醉,心脏采血,取肝脏组织肉眼观察并称质量,计算其脏器指数[脏器指数=脏器质量(g)/体质量(g)×100%],所有样本放置于-80℃冰箱冻存备检。

1.2.3 血清生化及 ELISA 分析

用促凝管采集大鼠心脏血液,静置 30 min,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用于肝功能生化 ALT、AST 指标及炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的检测。ALT、AST 采用全自动生化仪分析;IL-6 和 TNF-α 采用 ELISA 检测,按试剂盒操作说明进行操作。

1.2.4 肝脏组织 HE 染色

取同一部位的肝脏组织固定于 4%多聚甲醛中,石蜡包埋,在不同乙醇浓度下脱水,切片,进行常规 HE 染色。在 200 倍显微镜下观察染色切片。

1.2.5 血清代谢组学分析

1.2.5.1 样本前处理

血清样本解冻后,取 50 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入-20℃乙腈 150 μL 沉淀蛋白,混匀 2 min,4℃12 000 r/min 离心 10 min,分取上清液 100 μL 于杜氏小管中,于 30℃真空旋转蒸发浓缩器中浓缩至近干,将残余液体快速冻成冰,于冻干机中冻干 12 h。在小管中加入 30 μL 甲氧胺盐酸盐的吡啶溶液(15 mg/mL),加盖,涡旋 1 min,超声处理 3 次,每次 10 s,最后再次涡旋 2 min。用铝箔将液相小瓶包好(防止吡啶光解),置于暗处 16℃下脗化 16 h。脗化完成后,迅速加入 30 μL BSTFA+1% TMCS,加盖涡旋 5 min,置于 70℃烘箱中甲基硅烷化 1 h,取出在黑暗中冷却 1 h。冷却后,加入 100 μL 内标溶液(10 μg/mL),涡旋 2 min,1 000×g 离心 15 min,取上清液进行 GC-MS 分析。

1.2.5.2 仪器设置和进样分析

采用已经建立好的基于 GC-MS 代谢组学的仪器分析条件进行样本的检测分析,具体参数如下:色谱柱采用 DB-5MS,0.25 mm×30 m×0.25 μm;自动进样,进样体积为 1 μL,进样后自动洗针 6 次;载气为高纯氦气,流速为 1.0 mL/min;进样口温度为 250℃,分流比为 5:1;程序升温起始温度为 60℃,保持 1 min,然后以每分钟 10℃升温至 325℃,最后保持 10 min;质谱接口温度、离子源温度、四极杆温度分别为 280、230、150℃;采用 EI 源,碰撞电压设置为 70 eV 质

谱,全扫描模式(M/Z 50-600),扫描速度为 2 spectra/s。

1.2.5.3 数据处理方法

数据经 AMDIS 6.51 软件(美国 Agilent 公司)去卷积和进行谱峰的确证,将与 NIST 2014(购自美国 Agilent 公司)质谱库匹配大于 80% 的色谱峰作为代谢物定性的标准,导出包括化合物名称,保留时间,峰面积的数据。进行保留时间校准、峰对齐等操作,将数据导入 Metaboanalyst 3.5 分析平台的统计分析,包括:*t* 检验,倍数变化分析(fold change analysis, FC)等;主成分分析(principal component analysis, PCA),偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis,PLS-DA)。差异化合物筛选标准为变量投影重要度(variable importance in the projection,VIP)>1.5 及 *t* 检验 $P<0.05$ 。

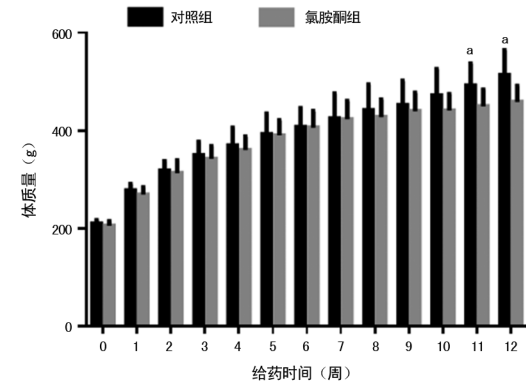
1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组动物行为学观察结果

对照组大鼠毛色光滑、活动自如、摄食、饮水、粪便均正常,生长发育良好;氯胺酮组随着给药时间的延长出现毛发凌乱、没有光泽,活动度下降、扎堆、蜷缩、精神萎靡、摄食减少;体质量增长缓慢等症状。在给药 8 周后,氯胺酮组大鼠体质量增长缓慢,但与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);直到给药 11 周时,两组大鼠体质量比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

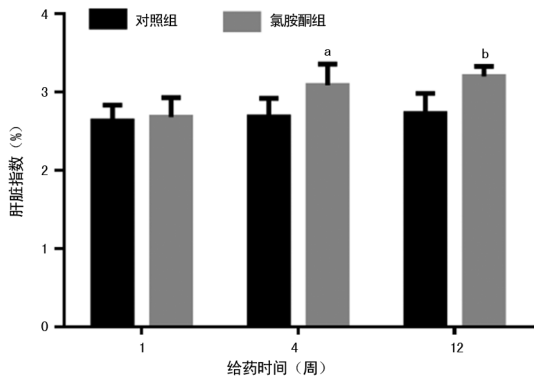


^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 1 两组大鼠各时间点体质量比较

2.2 两组大鼠肝脏指数比较

与对照组比较,氯胺酮组在给药 1 周时肝脏指数基本一致,给药 4、12 周时,肝脏指数明显增加($P<0.05$),见图 2。

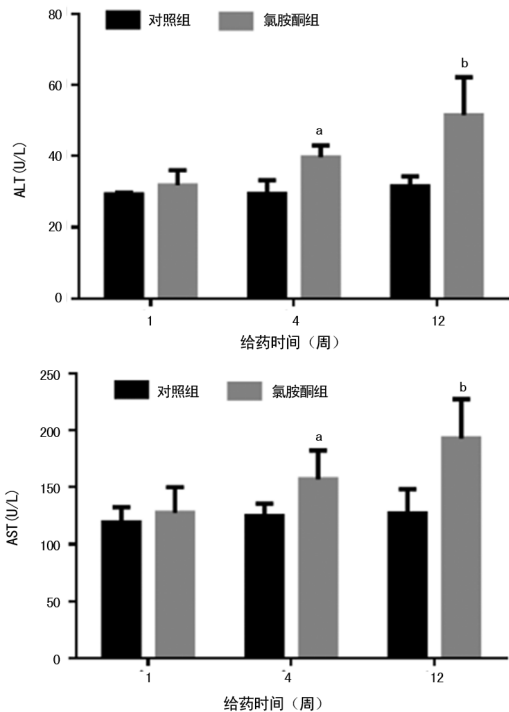


^a: $P<0.05$,^b: $P<0.01$,与对照组比较。

图 2 两组大鼠不同给药时间肝脏指数比较

2.3 两组大鼠肝功能指标比较

与对照组比较,氯胺酮组在给药 1 周时,ALT、AST 水平差异无统计学意义($P>0.05$);给药 4、12 周时,氯胺酮组 ALT、AST 水平明显升高($P<0.05$),见图 3。



^a: $P<0.05$;^b: $P<0.01$,与对照组比较。

图 3 不同给药时间大鼠血清生化指标结果

2.4 两组大鼠 TNF-α 及 IL-6 水平比较

与对照组比较,氯胺酮组在给药 1 周时,TNF-α 和血清 IL-6 水平差异无统计学意义($P>0.05$);在给药 4 周后 IL-6 明显升高($P<0.05$),TNF-α 水平差异无统计学意义($P>0.05$);在给药 12 周后,氯胺酮组 TNF-α 和 IL-6 水平均明显升高($P<0.01$),见表 1。

2.5 两组大鼠肝组织 HE 染色比较

对照组大鼠肝组织细胞边界清晰、排列整齐、形态正常,未见组织病理学异常;氯胺酮组给药 1 周时肝组织病理学未见明显异常,给药 4 周时肝组织细胞出现细胞核萎缩,炎细胞浸润,随着给药时间延长至

表 1 两组大鼠不同给药时间 TNF-α 及 IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s, n=8, \text{ng/L}$)

组别	给药 1 周		给药 4 周		给药 12 周	
	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
对照组	41.04±9.31	6.35±4.23	45.21±12.06	5.79±3.02	46.25±14.86	6.84±2.24
氯胺酮组	53.17±11.34	8.94±5.55	60.00±18.68	10.72±3.92 ^a	99.21±36.37 ^b	15.96±5.69 ^b

^a: $P<0.05$,^b: $P<0.01$,与对照组比较

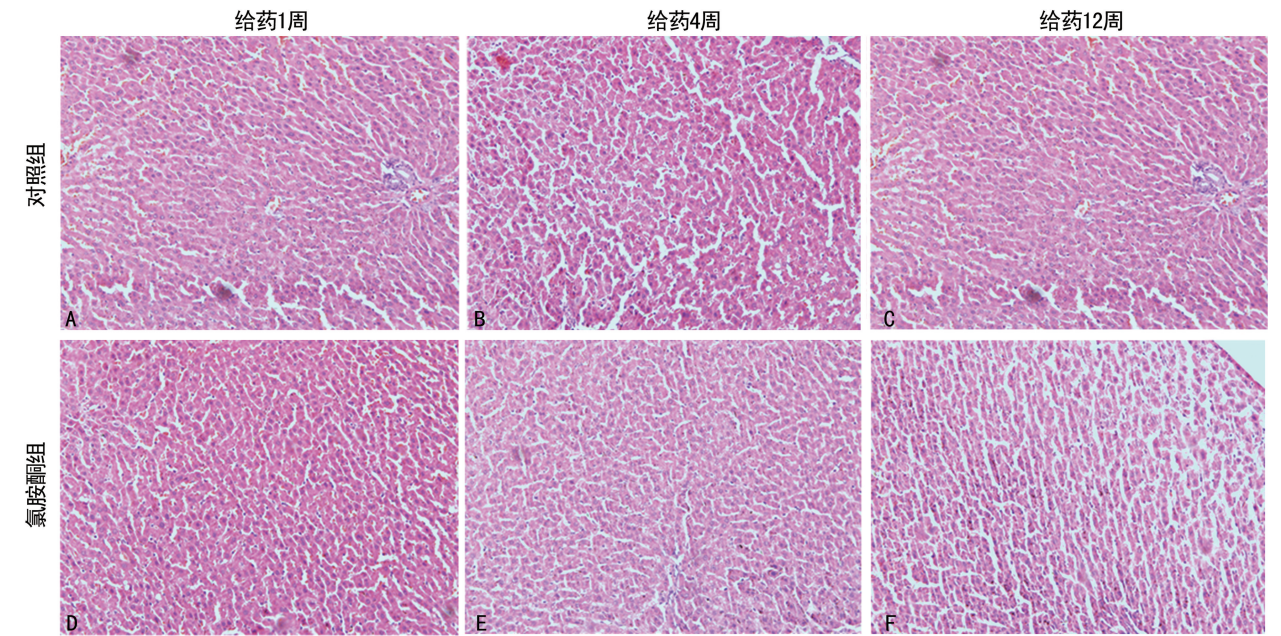


图 4 两组大鼠不同给药时间肝组织病理学显微镜观察(HE 染色,×200)

12 周,肝细胞损伤明显加重。肝组织病理学显微镜图,见图 4。

2.6 代谢组学

2.6.1 各组模式识别分析结果

PLS-DA 得分图可以看到对照组与氯胺酮组之间分离较好,无重叠,见图 5。热图中每行表示一种物质在不同样本中的相对浓度,每列表示某样本中所有差异物质的浓度情况。各实验组之间涉及的物质浓度变化趋势见图 6,其颜色越接近棕色,相对浓度越大;颜色越接近蓝色,相对浓度越小。

2.6.2 差异物质的通路分析

差异物质分析以 PLS-DA 模型的 VIP>1.5 和 t 检验的 $P<0.05$ 为筛选标准,将筛选出的差异小分子物质导入 Metaboanalyst 3.5 的通路分析模块,匹配的代谢途径见图 7,通路图中有色圆点代表不同的代谢通路;纵坐标为通路富集分析 P 值的负对数($-\log p$), P 值越小, $-\log p$ 越大,圆点颜色越深(红色);横坐标为拓扑分析的影响值,影响值越大,圆点直径越大。满足 $P<0.05$ 和影响值大于 0.1 筛选条件的代谢通路信息,见表 2。

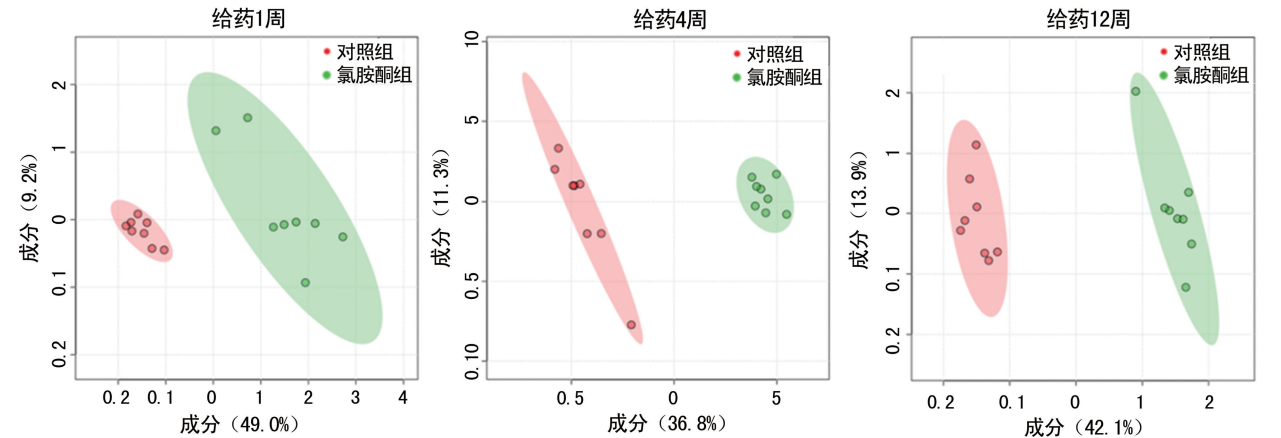


图 5 两组大鼠不同给药时间的 PLS-DA 得分图

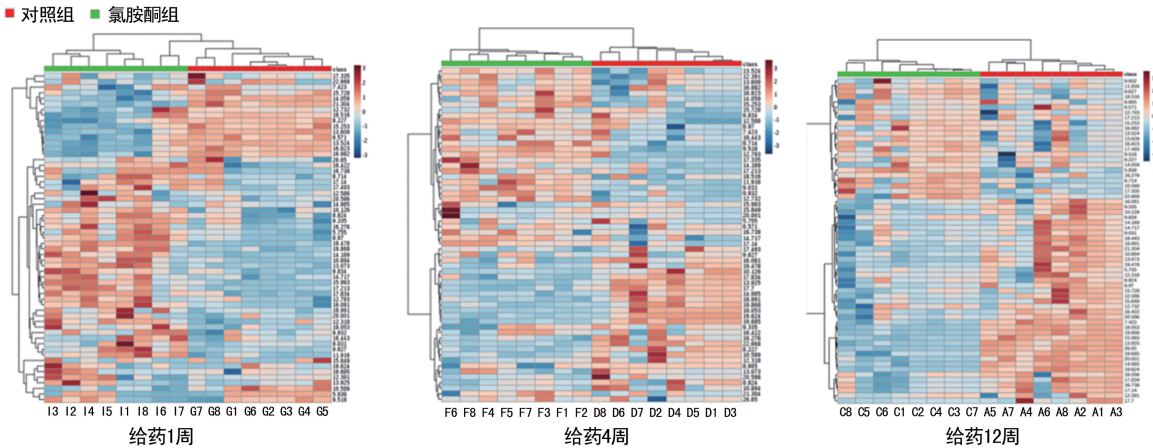
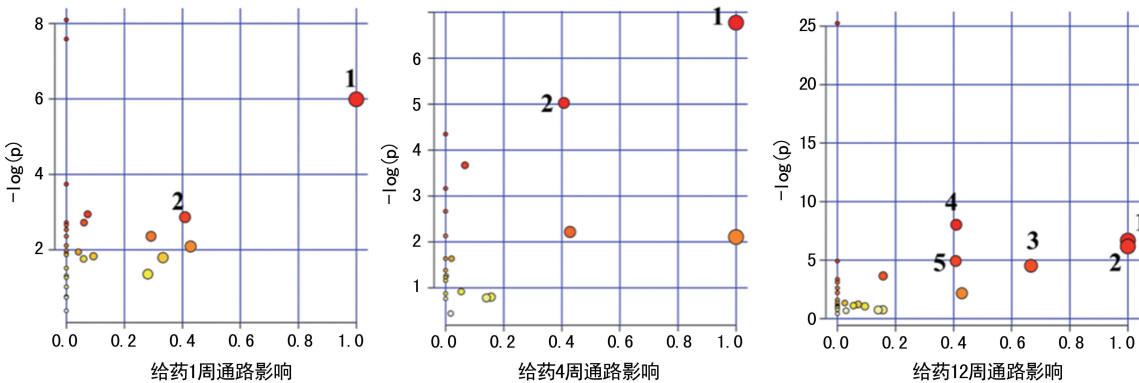


图 6 两组大鼠不同给药时间的热图



A:1 为 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,2 为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;B:1 为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢,2 为苯丙氨酸代谢;C:1 为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢,2 为 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,3 为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,4 为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,5 为苯丙氨酸代谢。

图 7 两组大鼠不同差异物质匹配的代谢通路图

表 2 对照组与氯胺酮组代谢通路信息表			
代谢通路	P	-log p	影响值
给药 1 周			
D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	0.002	5.992	1.000
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.047	2.863	0.409
给药 4 周			
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢	0.001	6.776	1.000
苯丙氨酸代谢	0.006	5.027	0.407
给药 12 周			
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢	0.001	6.677	1.000
D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	0.002	6.175	1.000
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸	0.010	4.525	0.667
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.000	8.028	0.409
苯丙氨酸代谢	0.007	4.930	0.407

3 讨 论

氯胺酮首次在 1965 年应用于人体,在其药理作用逐渐被探索的过程中,其毒性作用也不容忽视。本研究采用大鼠模型探讨氯胺酮的肝毒性,通过对照组

与氯胺酮组大鼠的体质量、肝脏指数及肝功能生化指标 AST、ALT 水平,血清 TNF- α 和 IL-6 水平,以及 HE 染色等实验结果比较,提示氯胺酮确实能够导致肝损伤,再通过代谢组学技术探讨氯胺酮诱导的肝损伤的可能机制。

在本研究中,两组大鼠在给药 10 周前体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$),第 11、12 周时,氯胺酮组大鼠体质量明显轻于对照组($P<0.05$),造成这一现象的原因之一可能是长期使用氯胺酮会导致恐惧、抑郁、焦虑、长时间的压力等情绪异常,进而影响身体的消化吸收功能,导致体质量增长缓慢^[15]。通过大鼠血清肝功能生化指标显示,在给药 4 周后氯胺酮组大鼠 ALT、AST 水平均明显上升,表明氯胺酮导致肝功能受损。氯胺酮组中血清 IL-6、TNF- α 水平在给药 12 周后明显高于对照组($P<0.01$),提示炎症参与了氯胺酮引起的肝毒性;在 HE 染色中,观察到第 12 周时,氯胺酮组有明显的炎症反应,与炎症指标相互印证。这一病理变化与临床报道一致,临床报道主要针对氯胺酮滥用者,有不同程度的肝纤维化及炎性细胞增加^[16-17]。

此外,还利用代谢组学研究了不同给药时间大鼠血清内源性代谢物的变化。对照组与给药组在第 1、

4、12 周分别鉴定出 24、25、22 种差异代谢物。根据差异代谢物富集代谢通路,在给药 1 周,存在明显差异的代谢通路有 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;在给药 4 周,主要参与的代谢通路有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢,苯丙氨酸代谢;在给药 12 周,有关的代谢通路不仅包含了给药 1、4 周差异代谢物参与的代谢路径,还包括了缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢。与其他两个时间点不同的是,在第 12 周,氯胺酮组大鼠表现出明显的炎症反应,其差异代谢物参与的代谢路径也明显增多,表明机体代谢物紊乱也更加明显,这与肝功损害、炎症因子及病理结果相符。谷氨酰胺和谷氨酸通过三羧酸循环(TCA)参与细胞能量代谢^[18];另外,谷氨酸对维持氧化还原反应平衡,并通过产生谷胱甘肽(GSH)来避免细胞出现氧化应激非常关键^[19];机体的丙氨酸代谢主要涉及丙氨酸-葡萄糖循环^[20],这一代谢途径提示能量代谢在氯胺酮给药后期受到干扰。柠檬酸参与乙醛酸和二羧酸盐的代谢,是能量产生的关键调节因子,表明在对照组和氯胺酮组间存在能量代谢差异及氧化应激异常;苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸为芳香族氨基酸,在肝功能异常时,体内产生大量芳香胺类不能经肝脏降解处理,通过血液进入脑组织,发挥神经递质的作用,可能会导致神经系统功能紊乱,出现意识障碍和昏迷及其他异常行为^[21-23]。

综上所述,氯胺酮肝毒性代谢通路相对集中,多为氨基酸代谢通路,表明氯胺酮肝毒性机制主要涉及能量代谢、氧化应激、神经递质传递等方面。

参考文献

[1] LINDER L M,ROSS C A,WEANT K A. Ketamine for the acute management of excited delirium and agitation in the prehospital setting[J]. *Pharmacotherapy*,2018,38(1):139-151.

[2] 朱贤林,王在平,叶刚,等. 小剂量氯胺酮对抑郁大鼠海马 Rac1 蛋白表达及树突棘密度的影响[J]. *重庆医学*,2019,48(18):3061-3066.

[3] WEN G,YAO H,LI Y,et al. Regulation of tau protein on the antidepressant effects of ketamine in the chronic unpredictable mild stress model[J]. *Front Psychiatry*,2019,10(287):1-10.

[4] FUJIKAWA D G. Starting ketamine for neuroprotection earlier than its current use as an anesthetic/antiepileptic drug late in refractory status epilepticus[J]. *Epilepsia*,2019,60(3):373-380.

[5] LI C C,WU S T,CHA T L,et al. A survey for ketamine abuse and its relation to the lower u-

inary tract symptoms in Taiwan[J]. *Sci Rep*,2019,9(1):7240.

[6] WANG C,LIU F,PATTERSON T A,et al. Relationship between ketamine-induced developmental neurotoxicity and NMDA receptor-mediated calcium influx in neural stem cell-derived neurons[J]. *Neurotoxicology*,2017,60:254-259.

[7] ZHU W,DING Z,ZHANG Y,et al. Risks associated with misuse of ketamine as a rapid-acting antidepressant[J]. *Neurosci Bull*,2016,32(6):557-564.

[8] WANG J,CHEN Y,GU D,et al. Ketamine-induced bladder fibrosis involves epithelial-to-mesenchymal transition mediated by transforming growth factor-beta1[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2017,313(4):961-972.

[9] HEWITT N A,COX P. Recurrent subanesthetic ketamine infusions for complex regional pain syndrome leading to biliary dilation, jaundice, and cholangitis: a case report[J]. *A A Pract*,2018,10(7):168-170.

[10] ZAITSU K,HAYASHI Y,KUSANO M,et al. Application of metabolomics to toxicology of drugs of abuse: a mini review of metabolomics approach to acute and chronic toxicity studies[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*,2016,31(1):21-26.

[11] GULERIA A,KUMAR A,KUMAR U,et al. NMR Based Metabolomics: an exquisite and facile method for evaluating therapeutic efficacy and screening drug toxicity[J]. *Curr Top Med Chem*,2018,18(20):1827-1849.

[12] BEYOGLU D,ZHOU Y,CHEN C,et al. Mass isotopomer-guided decluttering of metabolomic data to visualize endogenous biomarkers of drug toxicity[J]. *Biochem Pharmacol*,2018,156:491-500.

[13] ZHAO D S,JIANG L L,FAN Y X,et al. Investigation of dioscorea bulbifera rhizome-induced hepatotoxicity in rats by a multisample integrated metabolomics approach[J]. *Chem Res Toxicol*,2017,30(10):1865-1873.

[14] ZHAO D S,WU Z T,LI Z Q,et al. Liver-specific metabolomics characterizes the hepatotoxicity of Dioscorea bulbifera rhizome in rats by integration of GC-MS and ¹H-NMR[J]. *J Ethnopharmacol*,2018,226:111-119.

[15] ONAOLAPO A Y,AYENI O J,OGUNDEJI

- M O, et al. Subchronic ketamine alters behaviour, metabolic indices and brain morphology in adolescent rats: Involvement of oxidative stress, glutamate toxicity and caspase-3-mediated apoptosis[J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 96: 22-33.
 - [16] KALKAN Y, TOMAK Y, ALTUNER D, et al. Hepatic effects of ketamine administration for 2 weeks in rats[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(1): 32-40.
 - [17] CHEUNG H M, CHOW T, YEW D. How ketamine affects livers of pregnant mice and developing mice? [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1098-1110.
 - [18] ALDANA B I, ZHANG Y, LIHME M F, et al. Characterization of energy and neurotransmitter metabolism in cortical glutamatergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells: a novel approach to study metabolism in human neurons[J]. *Neurochem Int*, 2017, 106: 48-61.
 - [19] VISHNOI S, RAISUDDIN S, PARVEZ S. Glutamate excitotoxicity and oxidative stress in epilepsy: modulatory role of melatonin[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2016, 35(4): 365-374.
 - [20] FERRARIO M, BRUNELLI L, SU F, et al. The systemic alterations of lipids, alanine-glucose cycle and inter-organ amino acid metabolism in swine model confirms the role of liver in early phase of septic shock[J]. *Front Physiol*, 2019, 10(11): 1-27.
 - [21] HARDING C O, WINN S R, GIBSON K M, et al. Pharmacologic inhibition of L-tyrosine degradation ameliorates cerebral dopamine deficiency in murine phenylketonuria (PKU)[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2014, 37(5): 735-743.
 - [22] HUFNER K, FUCHS D, BLAUTH M, et al. How acute and chronic physical disease may influence mental health-An Analysis of neurotransmitter precursor amino acid levels[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 106: 95-101.
 - [23] O'KELL A L, GARRETT T J, WASSERFALL C, et al. Untargeted metabolomic analysis in non-fasted diabetic dogs by UHPLC-HRMS[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(2): 15.
- (收稿日期: 2019-06-13 修回日期: 2019-09-04)
-
- (上接第 348 页)
- meta-analysis of studies comparing primary duct closure and T-tube drainage after laparoscopic common bile duct exploration for choledocholithiasis[J]. *Surg Endosc*, 2016, 30(3): 845-861.
- [10] PAN L, CHEN M, JI L, et al. The Safety and efficacy of laparoscopic common bile duct exploration combined with cholecystectomy for the management of cholecysto-choledocholithiasis: an up-to-date meta-analysis[J]. *Ann Surg*, 2018, 268(2): 247-253.
- [11] WANG P, CHEN X, SUN B, et al. Application of combined rigid choledochoscope and accurate positioning method in the adjuvant treatment of bile duct stones[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 16550-16556.
- [12] GUPTA N. Role of laparoscopic common bile duct exploration in the management of choledocholithiasis[J]. *World J Gastrointest Surg*, 2016, 8(5): 376-381.
- [13] 汪晓峰, 郑杨, 陈嘉希, 等. “三步法”在十二指肠乳头括约肌切开后行腹腔镜胆囊切除术治疗胆囊结石合并胆总管结石手术时机选择的应用[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(8): 976-982.
- [14] LOPES L, CANENA J. ERCP in Portugal: A wide survey on the prevention of post-ercp pancreatitis and papillary cannulation techniques[J]. *GE Port J Gastroenterol*, 2018, 26(1): 14-23.
- [15] 许志峰, 李建军. 复杂胆道结石的微创治疗进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(8): 1049-1056.
- [16] 张智勇, 杜立学, 郑伟, 等. 腹腔镜胆总管探查术与内镜下十二指肠乳头括约肌切开术治疗胆总管结石的临床对照研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(8): 1088-1092.
- [17] 黄理, 姚朝光, 陈丽芬, 等. 肝外胆管结石微创治疗的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(4): 791-794.
- (收稿日期: 2019-04-18 修回日期: 2019-09-30)