



实验动物麻醉剂使用的福利伦理问题研究进展

李丹, 郭玉莹, 邓昊, 高珊, 徐士欣*

(天津中医药大学第一附属医院医学实验中心, 天津 300381)

【摘要】 在进行动物实验时需要选择合适的麻醉剂来保证实验操作的顺利进行, 获得可靠的实验数据, 同时又将实验动物所遭受的痛苦降至最低, 保证实验动物的福利。近年来, 关于实验动物的福利伦理问题已越来越引起人们的关注。本文主要对动物实验常用的麻醉剂(包括吸入性麻醉剂: 乙醚、七氟烷、异氟烷, 非吸入性麻醉剂: 戊巴比妥钠、水合氯醛、氯胺酮、乌拉坦)的选择及使用过程中可能存在的福利伦理问题做一综述。

【关键词】 实验动物; 麻醉药物; 动物伦理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 09-0087-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.09.017

Research progress on ethical issues of anesthetics application in laboratory animals

LI Dan, GUO Yu-ying, DENG Hao, GAO Shan, XU Shi-xin*

(Medical Experiment Center, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

【Abstract】 Animal experiments are important methods for scientific research. During animal experiments, it is crucial to select the appropriate anesthetics, not only to ensure the smoothly performed operational procedure and obtaining reliable experimental data, but also to avoid the suffering of laboratory animals and ensure their welfare as more as possible. In recent years, the ethical issues related to laboratory animal welfare have drawn more and more attention. In this review, we briefly discuss the selection of commonly used anesthetics during animal experiments, such as inhaled anesthetics, including diethyl ether, sevoflurane and isoflurane, as well as non-inhaled anesthetics, including pentobarbital sodium, chloral hydrate, ketamine and urethane, and the possibly involved ethical issues related to the application of those anesthetics.

【Key words】 Laboratory animals; Anesthetics; Animal ethics

在进行科学研究的过程中, 动物实验是一种重要的研究手段。在动物实验中, 有效的麻醉不仅是保证实验顺利进行方法学上的关键环节, 也是保证实验动物福利的一项基本要求。如何根据科研目的采用合适的实验动物并选择恰当的麻醉药物是顺利进行动物实验的重要前提。例如在广泛应用的脑缺血再灌注损伤动物模型: 大脑中动脉栓塞

(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型中, 麻醉剂的选择就是模型制备中的一个重要因素, 麻醉剂使用不当不但会影响模型制备是否成功, 而且可能给实验动物带来不必要的痛苦, 甚至造成实验动物死亡。理想的麻醉应该既要保证实验操作顺利进行, 保证获得的实验数据准确可靠, 又要将实验动物遭受的痛苦降至最低, 保证动物福利要求。本

【基金项目】 国家自然科学基金(81373850)。

【作者简介】 李丹(1986-), 女, 研究实习员, 研究方向: 中西医结合。E-mail: plum2006420@163.com

【通讯作者】 徐士欣(1973-), 女, 副主任技师, 研究方向: 中西医结合。E-mail: xushixintj@163.com

文将对国内外实验动物麻醉剂使用过程中的福利伦理问题现状做一综述, 以期为相关科研工作者更好地进行动物实验提供帮助。

1 国外动物福利伦理研究进展

1959 年, 英国的动物学家 William Russell 和生物学家 Rex Burch 在《人道主义实验技术原理》(*The Principles of Humane Experimental Technique*) 一书中首次提出了著名的“3R”原则(the 3R principles): 替代(replacement)、减少(reduction)、优化(refinement)^[1]。替代: 是指尽可能采用其他方法而不使用动物进行实验, 或者优先使用低等动物而非高等动物进行实验。减少: 是指在不影响科研目的实现的情况下, 尽可能地减少实验动物的使用数量。优化: 是指通过改进实验条件, 优化实验技术路线, 避免或减轻对实验动物造成的痛苦。1965 年, Brambell 提出动物福利的五大自由: 享受不受饥渴的自由; 享有生活舒适的自由; 享有不受痛苦、伤害和疾病的自由; 享有生活无恐惧和无悲伤的自由; 享有表达天性的自由。3R 原则和动物福利的五大自由构成了现在国际上比较公认的动物伦理审查的基本要求^[2]。

关于动物麻醉伦理方面, 美国兽医学会(American Veterinary Medical Association, AVMA) 制定了“动物安乐死指南”(AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition), 提供了可以参考的安乐死方法。2014 年 7 月 8 日, 美国通过了《美国兽医流动法案》, 这项法案中规定, 为了保护动物福利, 兽医可在紧急情况下对动物进行麻醉、疼痛管理甚至安乐死。

2 国内动物福利伦理研究进展

国内在动物伦理方面的工作起步相对较晚。1988 年国家科学技术委员会发布了《实验动物管理条例》, 要求相关工作人员必须爱护实验动物; 2006 年科技部颁布了《关于善待实验动物的指导性意见》, 从饲养管理、应用、运输等各个过程提出了善待实验动物的指导性意见及相关措施。2016 年, 我国发布了实验动物福利相关的国家标准《实验动物福利伦理审查指南(征求意见稿)》。《实验动物福利伦理审查指南(征求意见稿)》规定了实验动物生产、使用过程中福利伦理审查的各项要求, 如疼痛管理、安乐死等, 将有助于规范实验动物福利伦理审查, 并指导科研人员采用更有利于实验动物福利

的实验方法和技术。

3 常用动物麻醉剂使用的福利伦理问题

在动物实验过程中, 麻醉是动物手术顺利进行的先决条件。基于伦理及动物福利的考虑, 应给予实验动物适当的镇静、麻醉剂以减轻对实验动物造成的痛苦。动物实验的麻醉分为不同的类型: 按照麻醉途径可分为吸入麻醉、口服麻醉、皮下或肌肉注射麻醉、腹腔麻醉以及静脉注射麻醉; 按照麻醉部位可分为全身麻醉和局部麻醉; 按照用药的种类可分为单一麻醉和复合麻醉。不同的麻醉剂及麻醉方式会对实验动物生理功能产生不同的影响, 根据研究目的科学地选择合适的麻醉剂是对科研工作者的基本要求。

3.1 吸入性麻醉剂

3.1.1 乙醚(diethyl ether)

乙醚曾是广泛使用的麻醉剂和动物安乐死药物, 被吸收后会广泛抑制中枢神经系统, 为高度易挥发性液体, 对呼吸系统有刺激性, 可增加呼吸道分泌物。乙醚麻醉过深, 可抑制呼吸中枢导致动物死亡。由于其对实验动物的造成有害作用及可能造成的人员操作危险等原因, 目前已不推荐使用^[3]。

3.1.2 七氟烷(sevoflurane)

七氟烷为无色透明、芳香无刺激的液体, 对呼吸系统刺激小, 不易燃易爆, 也不与金属发生反应。七氟烷血气分配系数低, 诱导期短, 麻醉维持期平稳, 苏醒快, 是一种较为理想的吸入麻醉剂。七氟烷对心血管影响小, 且未见明显的肝损伤, 有良好的肌松作用, 随着麻醉的加深会加重呼吸抑制。

研究表明, 幼年时期接触七氟烷会导致成年后空间记忆受损, 并且接触间隔越短, 记忆受损越严重^[4]。七氟烷可以通过激活 GABA_A 受体, 抑制中枢神经系统; 引起 Bax 和 caspase-3 表达增加以及 Bcl-2 表达降低, 造成神经干细胞凋亡, 最终导致神经干细胞退化^[5]。另有研究表明, 2.5% 七氟烷持续麻醉 1~3 h 可以改善小鼠空间认知能力。该认知能力的改善可能与海马中 NR2B 水平和 p-ERK1/2: 总 ERK1/2 比值增高有关。然而, 暴露于七氟烷 4 h 会引起 caspase-3 激活和凋亡, 导致神经毒性^[6]。

3.1.3 异氟烷(isoflurane)

异氟烷是目前广泛使用的吸入麻醉药, 是无色透明的液体, 不易燃烧, 化学性质稳定, 诱导、恢复和麻醉快速, 吸入后 80% 以上以原形随呼气排出, 体内代谢少, 因此, 对药物代谢和毒理学实验的干

扰小。麻醉时有一定的肌松作用,不影响心肌收缩力,对肝、肾、脑也无不良影响。深麻醉时,能引起呼吸抑制。

研究表明,异氟烷麻醉维持动物的心率、血氧分压、血液 pH 等生理功能处于稳定状态^[7],适合情况复杂且持续时间较长的动物实验^[8]。异氟烷在多种动物模型中具有抗炎和抗氧化作用。七氟烷和异氟烷预处理可以抑制大鼠 MCAO 模型凋亡相关基因的表达,减轻炎症反应,从而发挥神经保护作用^[9]。异氟烷在糖尿病大鼠模型中也可发挥抗氧化作用^[10]。异氟烷还可以通过抑制活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)介导的 NLRP3 炎性小体激活而减轻内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤^[11]。异氟烷麻醉后作用可能导致小鼠注意力缺陷。C57 小鼠暴露于 1.8% 异氟烷 2 h,在麻醉 7 d 后仍显示潜伏抑制受损,虽然此时脑中剩余的异氟烷少到几乎可以忽略^[12]。

3.2 非吸入性麻醉剂

3.2.1 戊巴比妥钠(pentobarbital sodium)

戊巴比妥钠属于中效巴比妥类镇静催眠药,随用量的增加逐渐产生镇静、催眠和抗惊厥作用,大剂量使用时可产生麻醉作用。戊巴比妥钠通过作为 GABA 受体激动剂而发挥麻醉作用^[13],对呼吸中枢有较强的抑制作用,安全范围较小,麻醉过量易导致动物死亡。

以 50 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉小鼠时,戊巴比妥钠具有足够的镇静作用,但是镇痛作用差^[14]。如果增加麻醉剂量,例如以 70 mg/kg 剂量麻醉小鼠,戊巴比妥钠可以提供足够的镇痛作用,但是与之相关的死亡率风险和血流动力学不稳定性增加了^[15]。因此,有学者认为巴比妥类药物只适合终末阶段高剂量使用并且不准用于疼痛控制,除非和阿片类或非甾体类抗炎药共同使用^[3]。

3.2.2 水合氯醛(chloral hydrate)

水合氯醛是一种催眠药、抗惊厥药,为白色或无色透明的结晶,有刺激性气味。具有镇静、催眠和抗惊厥作用。较大剂量有抗惊厥作用,大剂量可引起昏迷和麻醉。麻醉过量会导致延髓呼吸中枢抑制,引起死亡。水合氯醛对心血管系统影响大,可引起严重的心律失常^[16]。

目前认为水合氯醛适合于催眠而非麻醉,动物手术所需麻醉剂量的水合氯醛不能提供足够的镇痛作用^[3, 17],并且还会导致显著的呼吸抑制。20%的水合氯醛具有很强的刺激性,可能会造成大鼠肠梗阻,腹膜炎以及胃溃疡等,因此不推荐存活动物

实验使用水合氯醛腹腔麻醉^[17]。水合氯醛对实验动物还具有致突变和致癌作用^[18]。此外,水合氯醛曾和硫酸镁、戊巴比妥钠联合使用作为一种经济的大动物麻醉和安乐死试剂,但是现在在兽医领域已很少用这种方法。根据美国兽医学会“动物安乐死指南”(AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition),鉴于水合氯醛严重的副反应,水合氯醛也不是合适的安乐死药物。麻醉学杂志(*Anesthesiology*)在 2009 年就明确表示将竭力关注动物保护问题,并且不再发表使用水合氯醛进行麻醉或安乐死的文章。

MCAO 模型是研究脑缺血再灌注损伤的动物模型,该动物实验要求安全有效的麻醉来保证足够时间完成脑部手术并能够快速觉醒,并且基于伦理原因,理想的麻醉剂应该具有术后镇痛作用。过去,常用麻醉方法便是采用水合氯醛进行腹腔注射麻醉,水合氯醛腹腔麻醉具有容易实现,对心血管功能影响小,并且没有协同的神经保护作用等优点。现在,越来越多研究者可能已经认识到水合氯醛麻醉可能产生的动物伦理问题,而选择使用其他麻醉剂如异氟烷进行麻醉^[19-25],异氟烷麻醉操作比较简单,能够快速诱导麻醉和苏醒,可以达到足够的可重复的麻醉深度,对心血管影响小,并且具有镇痛作用,满足动物实验的伦理标准^[18]。但是同时仍有许多采用水合氯醛麻醉^[26-31],其中有的研究对为何选择水合氯醛麻醉进行了特别说明^[30]。一些研究采用了水合氯醛与非甾体类抗炎药联合使用^[32]。此外,还有一些研究使用了其他麻醉剂,如氯胺酮和甲苯噻嗪^[33],戊巴比妥钠^[34],或未明确说明麻醉剂名称及给药方法^[35]。

3.2.3 氯胺酮(ketamine)

氯胺酮是一种作用于大脑皮质和脊髓神经元的非竞争性 NMDA 受体拮抗剂^[36]。NMDA 受体对学习和记忆功能有重要作用。氯胺酮广泛应用于所有动物物种的麻醉,还具有镇痛作用。氯胺酮的多种副作用,包括妄想、幻觉、谵妄和混乱等致使临床上氯胺酮不再作为主流麻醉剂使用^[37]。

氯胺酮不适合单独作为手术麻醉药物,常与其它麻醉剂联合使用^[38]。与 α -2-肾上腺素能激动剂(甲苯噻嗪)联合使用,可增加镇静和镇痛作用。与苯二氮平类药物(地西洋)联用可缓解肌肉僵硬症状。使用阿托品可以预防使用氯胺酮导致的唾液分泌物增加和心律失常。

研究表明,氯胺酮具有神经毒性,会导致大鼠发育的大脑神经元细胞凋亡^[39],引起脑超氧化物增

加^[40], 损伤线粒体功能并促进大脑超氧化物歧化酶活性^[41], 氯胺酮还会抑制神经干细胞的增殖^[42] 并干扰其分化^[43]。

3.2.4 乌拉坦(urethane, ethyl carbamate)

乌拉坦又称氨基甲酸乙酯, 是一种易逆性胆碱酯酶抑制剂。乌拉坦通过抑制乙酰胆碱酶的活性, 造成乙酰胆碱累积干扰正常神经传导而发挥麻醉作用。此外, 乌拉坦可能对其他多个通道具有调控作用, 包括 GABA_A 受体、NMDA 受体等^[44]。乌拉坦作用持久, 麻醉平稳, 对实验动物生理变化影响较小, 副作用包括具有致癌、骨髓抑制作用等^[45]。实验人员操作时需注意: 处理乌拉坦的结晶或粉末时, 需戴口罩、防护眼镜和手套, 防止吸入和接触皮肤, 并且应戴手套处理乌拉坦麻醉动物的血液或血清。

4 讨论

近年来, 实验动物麻醉剂使用的伦理问题已越来越引起人们的关注。在 2009 年 *Anesthesiology* 杂志明确表明将不再发表使用水合氯醛进行麻醉或安乐死的文章, 竭力关注动物保护问题。从 2010 年 11 月起, 《心血管研究》(*Cardiovascular Research*) 杂志采取了更为积极的行动, 提出了更加严格的动物伦理标准, 来保证其所发表的论文符合国际规范^[3]。新的要求涉及认识到动物遭受的疼痛、缓和措施、可能的联合用药, 以及可接受的安乐死方法。造成动物疼痛的实验必须在全麻或局部麻醉的情况下进行, 并且应该使用镇痛来保证动物遭受的痛苦降至最低。

在动物实验开始前对各种麻醉剂作用机制及毒副作用进行了解, 充分考虑麻醉剂对实验结果及实验动物可能造成的影响, 根据研究目的科学地选择麻醉剂, 不仅可以避免麻醉剂对实验结果的干扰, 增加实验数据的准确性, 同时又能保证动物实验的伦理学要求。因此, 我们建议: 建立更加科学、完善的实验动物福利伦理审查制度; 加强研究人员及技术人员关于动物福利伦理方面知识的培训, 比如在研究生教育阶段就增加动物福利伦理方面的课程; 加强科研人员与兽医学和实验动物领域专家的交流, 适时寻求专业指导。

参考文献:

[1] Zurlo J, Rudacille D, Goldberg AM. The three Rs: the way forward [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(8): 878-880.
[2] 李楠, 孙荣泽, 王天奇, 等. “我们”的福音——实验动物福

利伦理法规与标准 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(3): 89-90.

- [3] Ruiz-Meana M, Martinson EA, Garcia-Dorado D, et al. Animal ethics in cardiovascular research [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(1): 1-3.
[4] Shen X, Liu Y, Xu S, et al. Early life exposure to sevoflurane impairs adulthood spatial memory in the rat [J]. *Neurotoxicology*, 2013, 39: 45-56.
[5] Qiu J, Shi P, Mao W, et al. Effect of apoptosis in neural stem cells treated with sevoflurane [J]. *BMC Anesthesiol*, 2015, 15: 25.
[6] Liu J, Zhang X, Zhang W, et al. Effects of sevoflurane on young male adult C57BL/6 mice spatial cognition [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134217.
[7] Low LA, Bauer LC, Klauenberg BA. Comparing the effects of isoflurane and alpha chloralose upon mouse physiology [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154936.
[8] 王洋, 陈克研, 张贺, 等. 丙泊酚静脉麻醉与异氟醚吸入麻醉在巴马小型猪实验中的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(7): 25-28.
[9] Bedirli N, Bagriacik EU, Emmez H, et al. Sevoflurane and isoflurane preconditioning provides neuroprotection by inhibition of apoptosis-related mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2012, 24(4): 336-344.
[10] Shen X, Bhatt N, Xu J, et al. Effect of isoflurane on myocardial energetic and oxidative stress in cardiac muscle from Zucker diabetic fatty rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349(1): 21-28.
[11] Yin N, Peng Z, Li B, et al. Isoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5): 2033-2046.
[12] Yonezaki K, Uchimoto K, Miyazaki T, et al. Postanesthetic effects of isoflurane on behavioral phenotypes of adult male C57BL/6J mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122118.
[13] Zeller A, Arras M, Jurd R, et al. Identification of a molecular target mediating the general anesthetic actions of pentobarbital [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(3): 852-859.
[14] Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, et al. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate) [J]. *Res Exp Med (Berl)*, 1984, 184(3): 159-169.
[15] Matsuda Y, Ohsaka K, Yamamoto H, et al. Comparison of newly developed inhalation anesthesia system and intraperitoneal anesthesia on the hemodynamic state in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(9): 1716-1720.
[16] 孙安会, 谷捷, 吴涛, 等. 四种常用实验麻醉药物对大鼠心血管系统的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2): 120-126.
[17] Baxter MG, Murphy KL, Taylor PM, et al. Chloral hydrate is not acceptable for anesthesia or euthanasia of small animals [J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(1): 209-210.

- [18] Maud P, Thavarak O, Cédric L, et al. Evidence for the use of isoflurane as a replacement for chloral hydrate anesthesia in experimental stroke: an ethical issue [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 802539.
- [19] Yuan H, Denton K, Liu L, et al. Nuclear translocation of histone deacetylase 4 induces neuronal death in stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 91: 182–193.
- [20] Jung YS, Lee SW, Park JH, et al. Electroacupuncture preconditioning reduces ROS generation with NOX4 down-regulation and ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic stroke [J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 32.
- [21] Nakano T, Irie K, Hayakawa K, et al. Delayed treatment with ADAMTS13 ameliorates cerebral ischemic injury without hemorrhagic complication [J]. *Brain Res*, 2015, 1624: 330–335.
- [22] Wang Z, Leng Y, Wang J, et al. Tubastatin A, an HDAC6 inhibitor, alleviates stroke-induced brain infarction and functional deficits; potential roles of α -tubulin acetylation and FGF-21 up-regulation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19626.
- [23] Caltagirone C, Cisari C, Schievano C, et al. Co-ultramicrosized palmitoylethanolamide/luteolin in the treatment of cerebral ischemia: from rodent to man [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(1): 54–69.
- [24] Andresen L, Theodorou K, Grünwald S, et al. Evaluation of the therapeutic potential of anti-TLR4-antibody MTS510 in experimental stroke and significance of different routes of application [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148428.
- [25] Nagai N, Yoshioka C, Ito Y, et al. Intravenous administration of cilostazol nanoparticles ameliorates acute ischemic stroke in a cerebral ischemia/reperfusion-induced injury model [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29329–29344.
- [26] Yang S, Ning F, Li J, et al. Therapeutic effect analysis of sinomenine on rat cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(5): 1263–1269.
- [27] Chen X, Liu Y, Zhu J, et al. GSK-3 β downregulates Nrf2 in cultured cortical neurons and in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20196.
- [28] Li YH, Fu HL, Tian ML, et al. Neuron-derived FGF10 ameliorates cerebral ischemia injury via inhibiting NF- κ B-dependent neuroinflammation and activating PI3K/Akt survival signaling pathway in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19869.
- [29] Zong Y, Jiang L, Zhang M, et al. Limb remote ischemic post-conditioning protects cerebral ischemia from injury associated with expression of HIF-1 α in rats [J]. *BMC Neurosci*, 2015, 16: 97.
- [30] Li L, Tian J, Long MK, et al. Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0144219.
- [31] Qi J, Liu Y, Yang P, et al. Heat shock protein 90 inhibition by 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin protects blood-brain barrier integrity in cerebral ischemic stroke [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(10): 1826–1837.
- [32] Lin CH, Wang CH, Hsu SL, et al. Molecular mechanisms responsible for neuron-derived conditioned medium (NCM)-mediated protection of ischemic brain [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146692.
- [33] Fanaei H, Karimian SM, Sadeghipour HR, et al. Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats [J]. *Brain Res*, 2014, 1558: 74–83.
- [34] Zhang H, Liu Y, Guan S, et al. An orally active allosteric GLP-1 receptor agonist is neuroprotective in cellular and rodent models of stroke [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148827.
- [35] Liu C, Du Q, Zhang X, et al. Clemastin serves as a neuroprotective agent against ischemic stroke: the synergistic action of ERK1/2 and cPKC pathways [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 9: 517.
- [36] Martin D, Lodge D. Ketamine acts as a non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist on frog spinal cord *in vitro* [J]. *Neuropharmacology*, 1985, 24(10): 999–1003.
- [37] Morgan CJ, Curran HV. Independent Scientific Committee on Drugs. Ketamine use: a review [J]. *Addiction*, 2012, 107(1): 27–38.
- [38] Green CJ, Knight J, Precious S, et al. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience [J]. *Lab Anim*, 1981, 15(2): 163–170.
- [39] Zou X, Patterson TA, Sadovova N, et al. Potential neurotoxicity of ketamine in the developing rat brain [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 108(1): 149–158.
- [40] Behrens MM, Ali SS, Dao DN, et al. Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase [J]. *Science*, 2007, 318(5856): 1645–1647.
- [41] Venâncio C, Félix L, Almeida V, et al. Acute ketamine impairs mitochondrial function and promotes superoxide dismutase activity in the rat brain [J]. *Anesth Analg*, 2015, 120(2): 320–328.
- [42] Wu YQ, Liang T, Huang H, et al. Ketamine inhibits proliferation of neural stem cell from neonatal rat hippocampus *in vitro* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(5): 1792–1801.
- [43] Huang H, Liu L, Li B, et al. Ketamine interferes with the proliferation and differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of neonatal rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 315–325.
- [44] Hara K, Harris RA. The anesthetic mechanism of urethane; the effects on neurotransmitter-gated ion channels [J]. *Anesth Analg*, 2002, 94(2): 313–318.
- [45] Field KJ, Lang CM. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature [J]. *Lab Anim*, 1988, 22(3): 255–262.