

## 研究论文

## 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液的抗抑郁样效果

廖铭能<sup>1</sup> 于立坚<sup>1\*</sup> 张永平<sup>1</sup> 马润娣<sup>1\*</sup> 张霄瑜<sup>1,3</sup> 于廷曦<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>广东海洋大学海洋药物重点实验室, 湛江 524025; <sup>2</sup>Cell Biology Group, Department of Surgery, Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine and Baltimore Veterans Affairs Medical Center, MD 21201; <sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, MD 21228)

**摘要** 阿魏酸(ferulic acid, FA)是一种广泛存在的低毒酚酸,阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)则是其钠盐。先前的研究已经证实,阿魏酸钠具有显著的神经保护和神经发生增强作用及抗抑郁效果。该研究的目的在于探讨阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液可能的抗抑郁效果。PC12细胞在含80 μmol/L阿魏酸钠的DMEM培养基中孵育6 d,无菌条件下制备阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞液的无细胞滤液,测定PC12细胞裂解液无细胞滤液中残留的阿魏酸钠量。以慢性不可预期的多种刺激制造大鼠抑郁模型,用行为学、形态学、免疫组织化学和BrdU掺入等方法观察并检测阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激大鼠抑郁模型行为学、海马的组织病理学、海马和大脑皮质的神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达及神经发生的影响。实验证实,阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液能改善抑郁症样模型大鼠的行为学障碍,上调其海马和大脑皮质NGF和BDNF的表达,增加海马神经干细胞/神经前体细胞的增殖。由此可见,阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液有明显的抗抑郁效果,而其抗抑郁效果可能源自它的上调NGF和BDNF,以及其增强神经发生作用。

**关键词** 阿魏酸钠; PC12细胞; 诱导分化; 细胞裂解液; 抗抑郁样效果; 慢性抑郁模型; 大鼠

抑郁症属情感性精神障碍性疾病,而精神病往往是脑特殊部位形态结构改变的结果。过去十多年的研究揭示,抑郁症与导致神经元或神经网络丢失的神经退行性病变的关系十分密切。临床病理检查结果表明,长期抑郁症患者的脑海马区多萎缩,海马萎缩和抑郁症病人的时间过程之间的关系呈正相关<sup>[1,2]</sup>。不断增加的证据显示,成年动物(包括人类)的海马还产生新的神经元<sup>[3]</sup>。实验研究表明,慢性应激可引起海马区神经元的萎缩和丢失,而抗抑郁药可以修复应激所导致的海马的病理损伤<sup>[4]</sup>。海马神经发生的增强或减弱是抑郁症病情好转或加重的关键因素<sup>[5]</sup>。

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)广泛存在于哺乳动物胚胎及成体的中枢神经系统,当神经系统受到各种伤害时,神经干细胞能被诱导分化为某

种神经元来替代损伤的神经细胞,达到重建结构和恢复功能的目的。神经干细胞移植被认为是最有前途的神经组织替代性治疗。脑损伤后,大脑神经元具有一定再生能力,但需要有神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)的参与。神经营养因子在大脑神经元以及胶质细胞中均可合成,具有保护神经元和促进神经细胞分化和再生的功能,对脑损伤后脑功能的恢复有重要意义。海马区的神经发生在抗抑郁药物的治疗中起着重要的作用<sup>[6]</sup>。

PC12细胞(rat pheochromocytoma cells, PC12 cells)来源于大鼠肾上腺皮质的肾上腺嗜铬细胞瘤。

收稿日期: 2010-11-20 接受日期: 2011-03-01

广东海洋大学研究生基金资助项目

\*通讯作者。Tel: 0759-2362424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 0759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com

这一细胞株首先由Green和Tischler<sup>[7]</sup>从移植的大鼠嗜铬细胞瘤细胞中克隆获得,至今已经使用了三十多年。该细胞株性状稳定、均一,具有高度分化潜能,与正常神经母细胞、神经元的特性高度相符,能在NGF的作用下,分化成典型的交感神经元样细胞<sup>[8,9]</sup>。PC12是广泛用于替代原代培养神经细胞的模型细胞,用于体外神经元的存活、分化以及相应的分子机制研究。自从发现NGF有诱导PC12细胞分化成交感神经元的作用以来,人们应用PC12细胞株进行了大量研究。已经证实,在一定环境下保护PC12细胞或在一定条件下促进PC12细胞分化成神经元样细胞的多种物质具有神经保护作用 and/或神经发生增强的作用。

阿魏酸(ferulic acid, FA), 化学名3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-2-丙烯酸(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid), 是植物界普遍存在的一种酚酸。在植物体内主要与细胞壁多糖和木质素交联构成细胞壁的一部分,是阿魏、当归、川芎、升麻、木贼等多种中药的有效成分之一<sup>[10]</sup>。在中药研究中,阿魏酸常作为一种指示性化合物(marker compound); 由于具有确切的药理活性,且毒性很低,又常作为一些药的活性化合物(active compound)。临床和研究中通常用它的钠盐(阿魏酸钠, sodium ferulate, SF)。中国学者对阿魏酸及其钠盐的药学及其应用进行了广泛深入的研究。此前作者已经报告<sup>[11]</sup>,阿魏酸钠具有诱导PC12细胞增殖和分化为神经元样细胞的作用。用急性动物行为绝望模型(悬尾和强迫游泳试验)证实阿魏酸钠具有急性抗抑郁作用<sup>[12]</sup>; 用慢性不可预见性轻度应激大鼠抑郁模型证实阿魏酸钠具有慢性抗抑郁作用<sup>[13]</sup>。阿魏酸钠的抗抑郁样效果可能系其神经保护和神经发生增强作用所致<sup>[11]</sup>。本文则报告阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液的抗抑郁样效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物

盐酸氟西汀胶囊(flouxetine hydrochloride capsules, Flu)由Eli Lilly and Company Limited (USA)生产,礼来苏州制药有限公司分装,规格:20 mg/粒(以氟西汀计);阿魏酸钠粉剂购自丽珠集团利民制药厂,含量为99.3%;阿魏酸钠注射液由海南利能康泰制药有限公司生产。

### 1.2 试剂

超级新生牛血清(newborn calf serum, NCS)购自杭州四季青生物材料有限公司;马血清购自美国HyClone公司;DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)为美国Gibco公司产品;Triton X-100、噻唑蓝(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)和胰酶为美国Sigma公司产品。兔抗鼠抗神经生长因子多克隆抗体[Rabbit anti-rat anti-nerve growth factor (NGF) polyclonal antibody (bs-0067R, 0.1 ml)]和抗脑源性神经营养因子多克隆抗体[Rabbit anti-rat anti-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (bs-0248R, 0.1 ml) polyclonal antibody]购自北京博奥森生物技术有限公司。5-溴-2'-脱氧尿苷(5-Bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)购自罗氏公司;BrdU一抗、鼠单克隆抗BrdU抗体购自艾碧康生物制品有限公司(Abcam(Hong Kong) Ltd)。二抗(生物素酰化的马抗小鼠抗体, biotinylated horse anti-mouse antibody)和亲和素-生物素复合物(avidin-biotin complex)购自北京博奥森生物技术有限公司。二氨基联苯胺(DAB)显色溶液购自Invitrogen公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 细胞和细胞培养

PC12细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。细胞以含10%新生小牛血清、5%马血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM培养液,预先在内壁被覆胶原的培养瓶,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>中培养<sup>[14]</sup>,3~4 d细胞传代一次。

### 1.4 动物

SPF级220~280 g体质量的雄性SD大鼠,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(长沙),室温23 °C±1 °C,12 h照明,12 h黑暗。实验中严格遵守中华人民共和国科学技术部2006年颁发的《实验动物福利和使用原则》<sup>[15]</sup>。

### 1.5 细胞形态学观察

取处于对数生长期的PC12细胞,吸走原有培养基。常规消化后,加入适量DMEM培养基,用吸管轻柔吹打细胞,使其悬浮并成单个细胞。计数细胞,调整其浓度为5×10<sup>4</sup>细胞/ml,以1 ml/瓶的量接种于100 ml培养瓶,放入培养箱培养。待细胞生长至对数生长期时,将细胞置于4 °C约30 min,使细胞生长同步化。然后吸去培养基,加等量DMEM培养基,加

阿魏酸钠,使其终浓度为80  $\mu\text{mol/L}$ ,空白对照组加入等量PBS。放入培养箱继续培养6 d,在倒置显微镜下观察细胞形态变化,并进行拍照。

### 1.6 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液无细胞滤液的制备

无菌条件下收集与80  $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠共同培养6 d的PC12细胞,加预冷PBS,离心,无菌PBS吹洗3次。加入适量无菌PBS,吸管吹打细胞团块,使其悬浮并成单个细胞。计数细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 细胞/ml,冰浴超声破碎(350 W,工作时间2 s,间隔10 s,40次)。针式滤器抽滤除菌, $-80^\circ\text{C}$ 保存备用。

### 1.7 滤液中残留的阿魏酸钠浓度的测定

用PBS配制不同浓度的阿魏酸钠标准液,波长310 nm处测定吸光度,制作标准曲线。测定阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液在波长310 nm处的吸光度。计算PC12细胞裂解液的无细胞滤液中残留的阿魏酸钠量。

### 1.8 慢性应激抑郁模型

参照文献<sup>[16,17]</sup>所述方法并稍加改进制造大鼠慢性抑郁模型。动物遭受28 d的随机刺激,包括冰水游泳( $4^\circ\text{C}$ , 5 min)、热应激( $45^\circ\text{C}$ , 5 min)、禁水(48 h)、禁食(24 h)、夹尾(1 min)、电击足底(Y迷宫实验系统,电流强度30 V,持续3 min)、昼夜颠倒24 h、摇晃(HQ 45水平摇床,60次/min,15 min)。每日采用1种刺激,平均每种刺激用3~4次。同种刺激不连续出现,以期动物不能预料刺激的发生。对照组不予任何刺激。

### 1.9 实验程序

购回大鼠适应环境1周,每日人工触摸2 min。1周后行1%糖水摄入筛选实验,筛选合格的大鼠随机分为:对照组(control)、慢性应激(CMS)组、慢性应激+氟西汀(CMS+Flu)组、慢性应激+阿魏酸钠(CMS+6  $\mu\text{g}$  SF)组、慢性应激+PC12细胞( $1 \times 10^6$ 细胞)裂解液的无细胞滤液(CMS+PC12- $10^6$ )组和慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ , 6 d)诱导分化的PC12细胞( $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 细胞)裂解液的无细胞滤液(CMS+SF+PC12- $10^4$ 、CMS+SF+PC12- $10^5$ 、CMS+SF+PC12- $10^6$ )组,每组12只。对照组分两笼饲养,其余大鼠单笼孤养。除对照组外,其他动物均遭受28 d的慢性随机应激。在应激的当天,CMS+Flu组即开始每鼠给予Flu灌胃(2.0 mg/kg),CMS+SF (6  $\mu\text{g}$ )组即开始每鼠腹腔注射阿魏酸钠液1.0 ml(含6  $\mu\text{g}$  SF),

CMS+PC12- $10^6$ 组和CMS+SF+PC12- $10^4$ 、CMS+SF+PC12- $10^5$ 、CMS+SF+PC12- $10^6$ 组即开始分别每鼠腹腔注射PC12细胞( $1 \times 10^6$ 细胞)裂解液的无细胞滤液和阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞( $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 细胞)裂解液的无细胞滤液各1.0 ml,每日1次,持续28 d。对照组不予任何刺激,正常照料。对照组和慢性应激组每日每鼠腹腔注射等量生理盐水1次。应激前和第28 d后分别测定体重、摄食量和液体消耗(即糖水摄入),分别行旷场试验和强迫游泳试验,之后牺牲动物,取脑,进行脑海马病理组织学和免疫化学检查。

1.9.1 体重测定 于应激前和末次应激3 d后分别测量各组动物体重,按下面公式计算体重增加值。

体重增加值=应激后体重平均值-应激前体重平均值。

1.9.2 液体消耗(糖水偏爱)测定 参照文献<sup>[18]</sup>对大鼠进行基础糖水/纯水消耗实验。大鼠单笼饲养。应激前先训练动物适应含糖饮水,每笼同时给予装有1%蔗糖水的2个小瓶,24 h后,同时给予每只大鼠事先量好的2瓶水,1瓶装1%蔗糖水,1瓶装纯水,1 h后,取走2瓶并称重。实验前禁食禁水23 h。实验当日17时同时给予每只大鼠事先量好的2瓶水,1瓶装1%蔗糖水,1瓶装纯水,次日17时取走2瓶并称重液体余量。计算应激前后动物的总液体消耗、糖水消耗、糖水偏爱百分比(糖水偏爱百分比=糖水消耗/总液体消耗 $\times 100\%$ )。

1.9.3 旷场试验 末次应激后1 d进行旷场试验。敞箱为立方体(80 cm $\times$ 80 cm $\times$ 40 cm),周壁为黑色,底面由面积相等的25个方块组成。试验于上午在安静的房间内进行。将大鼠放入中央格,观察3 min内活动情况。主要观察指标为穿越格子数和站立次数。以动物穿越地面方块数为水平运动得分(crossing),动物穿越1格(3爪以上跨入)为1分,如动物沿线行走,以每16 cm为1分;以直立次数为垂直运动得分(rearing),动物双足离开底面为标志,无论动物站立多长时间直至放下双足为1分。每只动物进行1次试验。

1.9.4 强迫游泳试验 于末次应激后翌日参照文献<sup>[19]</sup>进行。将大鼠放入内径20 cm、高50 cm的圆桶中,每桶1只。水深25 cm,水温 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。强迫大鼠游泳,在水中不能以后爪支撑身体,也不能以前爪攀附于缸壁。每桶水只使用1次。试验第1天,每只大鼠预游泳5 min,随后取出于灯下擦干放入笼中。

24 h后再次将大鼠放入水中,连续观察5 min,以跑表测定并累计各组大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态的时间。每只大鼠仅进行1次实验。判断不动的标准:四肢完全不动或仅有足部轻拍划水动作。

**1.9.5 病理组织学检查** 末次应激后3 d,每组任取4只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠50 mg/kg(5 mg/ml)进行麻醉,10%中性福尔马林溶液心脏灌注牺牲动物。取脑,置10%中性福尔马林溶液中固定2~3 d。通过海马区全脑冠状面切片,片厚4  $\mu\text{m}$ ,常规HE染色。光镜下检查海马区组织病理学变化。

**1.9.6 免疫组织化学检查** (1)神经生长因子和脑源性神经营养因子:末次应激后3 d,每组任取4只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠50 mg/kg(5 mg/ml)进行麻醉,4%多聚甲醛(0.1  $\mu\text{mol/L}$  PBS, pH7.4)心脏灌注牺牲动物。取脑,在4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下,置4%多聚甲醛(0.1  $\mu\text{mol/L}$  PBS, pH7.4)中固定2 d。石蜡包埋。通过海马区或内侧前额叶皮质全脑冠状面切片,片厚4  $\mu\text{m}$ 。NGF、BDNF表达水平采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin peroxidase conjugated method, SP),按说明书在切片上进行免疫组化检测<sup>[20,21]</sup>。第一抗体稀释到1:100。第一抗体在室温下孵育过夜后,第二抗体在室温下与切片孵育15 min,之后加DAB。(2)在光学显微镜下鉴定脑区:细胞体出现淡黄至褐黄色细颗粒状着色为NGF或BDNF阳性细胞。两位观察者盲法阅片,每张切片至少观察5个具有代表性的高倍视野,计数不少于100个细胞。(3)BrdU掺入测定<sup>[22,23]</sup>:末次应激后4 d,每组任取4只大鼠腹腔注射BrdU(75 mg/kg,每2 h 1次,共4次;BrdU贮备液的准备:20 mg/ml的BrdU PBS溶液(pH7.2, 0.1 mol/L NaOH调配)。末次BrdU注射后24 h牺牲大鼠,并心脏灌注预冷0.1 mol/L PBS 5 min,预冷4%多聚甲醛17 min。灌注后摘除全脑,在4%多聚甲醛中固定过夜(4  $^{\circ}\text{C}$ ),之后贮存在30%蔗糖液中(4  $^{\circ}\text{C}$ )。通过海马用冰冻切片系列切片(4  $\mu\text{m}$ 厚)。切片保存在PBS/NaN<sub>3</sub>中。(4)自由浮动的切片用于测定BrdU的标记:在65  $^{\circ}\text{C}$ 的50%甲酰胺(formamide)/2 $\times$ SSC(标准柠檬酸溶液)中孵育2 h以使DNA变性,接着以PBS洗几次。之后切片在2 mol/L HCl中孵育30 min,再在硼酸中孵育10 min。PBS洗涤后,切片在30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中孵育30 min以去除内源性过氧化物酶。以3%正常马血清(溶于0.01% Triton X-100)封闭后,加抗小鼠BrdU抗体(1:1 000),于4  $^{\circ}\text{C}$ 孵化过夜。之后切片与第二抗

体生物素酰化的马抗小鼠抗体(biotinylated horse anti-mouse)孵化1 h,接着以亲和素-生物素复合物(avidin-biotin complex)扩增,细胞以DAB处理使之可见。依照鉴定、计数NGF和BDNF阳性细胞同样的方法鉴定、计数BrdU阳性细胞。

## 1.10 统计分析

所有实验经重复证实,动物实验重复1次,体外实验至少重复2次。实验结果以均数 $\pm$ 标准误( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ )表示,采用SPSS 13.0软件进行组间方差分析。 $P<0.05$ 被视为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 滤液中阿魏酸钠的浓度

含阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )的DMEM培养液孵育6 d的PC12细胞裂解液的无细胞滤液的阿魏酸钠浓度为5.49  $\mu\text{g/ml}$ 。

### 2.2 阿魏酸钠诱导的细胞分化

终浓度为80  $\mu\text{mol/L}$ 的阿魏酸钠的DMEM培养液孵育6 d的PC12细胞停止增殖,部分细胞长出突起,呈现明显的分化特征,胞体折光性较低,某些视野中细胞之间的突起相互连接呈网络状(图1)。

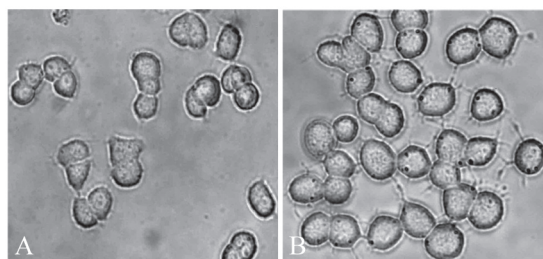


图1 阿魏酸钠诱导的轴突生长

PC12细胞在阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )作用下培养6 d,密切观察细胞轴突的生长情况。PC12细胞在无(A)和有阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )(B)作用下培养6 d的代表图像。

Fig.1 Neurite outgrowth in the presence of SF

PC12-cells were grown in the absence (A) or presence of 80  $\mu\text{mol/L}$  SF (B) for 6 days. Neurite outgrowth was monitored. Representative micrographs of PC12-cell culture are shown.

### 2.3 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠体重增长的影响

各组动物的平均体重在实验开始时无明显差别。经过4周的实验,动物的平均体重都有所增加,可是,CMS组动物体重的增长显著低于对照组( $P<0.01$ ),而CMS+SF+PC12( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ )组和CMS+Flu组则显著高于CMS组( $P<0.01$ )。在应激28 d后对照组

大鼠体重平均增长 132.2 g, CMS组增长 55.9 g, 而 CMS+SF+PC12 ( $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ )和 CMS+Flu组分别增长 69.9 g、71.1 g、75.2 g 和 68.8 g ( $P<0.01$ )(图2)。CMS+SF(6  $\mu\text{g}$ )组和 CMS+PC12- $10^6$ 组大鼠的体重增长(58.1 g、51.5 g)与 CMS组接近。

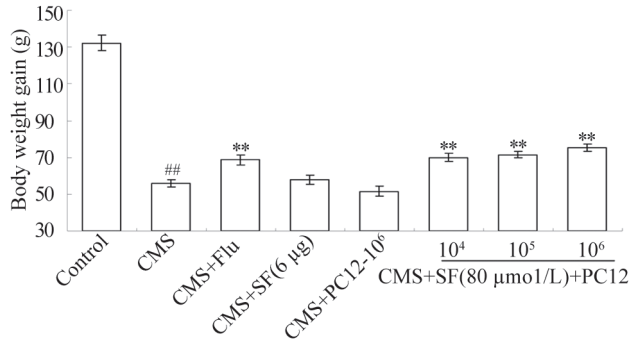


图2 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠体重增长的影响

资料表示为均值 $\pm$ SEM。## $P<0.01$ , 与对照组相比; \*\* $P<0.01$ , 与慢性应激组相比 ( $n=12$ )。

Fig.2 Effect of long-term intraperitoneal injection of cell-free filtrate of sodium ferulate-induced and differentiated PC12 cell lysates on body weight gain in CMS rats

Data are represented as means $\pm$ SEM. ## $P<0.01$  vs control; \*\* $P<0.01$  vs CMS ( $n=12$ ).

## 2.4 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠液体总消耗、糖水消耗及糖水偏爱的影响

应激前各组大鼠的液体总消耗、糖水消耗及糖水偏爱无明显差别。从应激第二周末起, CMS+SF+PC12( $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ )和 CMS+Flu组大鼠的糖水消耗及糖水偏爱即高于CMS组, 到第四周末已接近对照组水平; 而 CMS+SF(6  $\mu\text{g}$ )和 CMS+PC12- $10^6$ 组大鼠的液体总消耗、糖水消耗及糖水偏爱则与CMS组接近(图3)。这些结果提示阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液可部分逆转慢性应激对大鼠液体总消耗、糖水消耗及糖水偏爱的影响, 而微量阿魏酸钠和单纯PC12细胞裂解液的无细胞滤液则无此效果。

## 2.5 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠旷场活动的影响

旷场试验用于评价动物的运动和探究能力。与对照组动物比较, CMS组大鼠的水平运动得分和垂

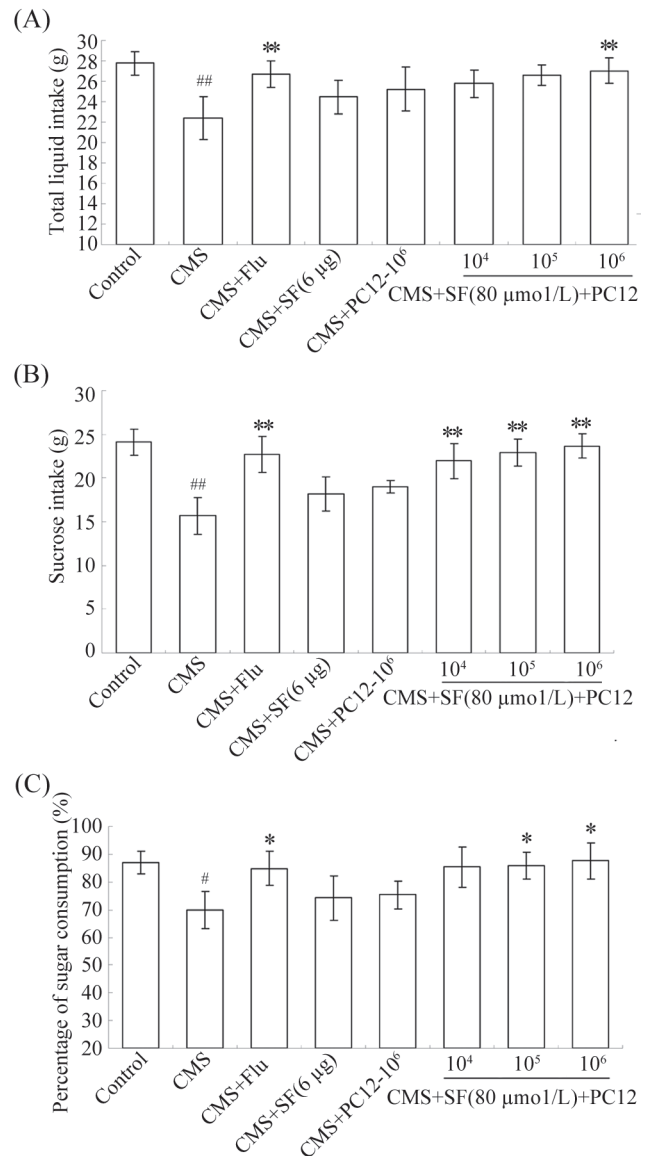


图3 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液对慢性应激抑郁模型大鼠液体总消耗、糖水消耗及糖水偏爱的影响

每次试验前, 大鼠禁水、禁食 23 h, 之后同时给予 1% 蔗糖水和自来水, 1 个瓶装纯水。糖水偏爱=糖水消耗/总液体消耗 $\times$ 100%。资料表示为均值 $\pm$ SEM。A: 总液体消耗; B: 糖水消耗; C: 糖水偏爱, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , 与对照组相比; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与慢性应激组相比 ( $n=12$ )。

Fig.3 Effects of long-term ip injection of sodium ferulate-induced and differentiated PC12 cell lysates (SFIDPC12CL) on total fluid consumption, sucrose solution consumption, and sucrose preference in CMS rats

Prior to each test, rats were food- and water-fasted for 23 h. They were then exposed to both a 1% sucrose solution and tap water. Sucrose preference=amount of sucrose solution consumption/total fluid consumption $\times$ 100%. Data are represented as means $\pm$ SEM. A: total fluid consumption; B: sucrose consumption; C: sucrose preference. # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs control; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs CMS ( $n=12$ ).

直运动得分显著降低( $P<0.01$ ); 与CMS组动物比较, CMS+SF+PC12- $10^6$ )和CMS+Flu组大鼠的水平运动得分和垂直运动得分明显提高( $P<0.01$ )。CMS+SF(6  $\mu\text{g}$ )组、CMS+PC12- $10^6$ 和CMS+SF+PC12( $10^4$ 、 $10^5$ )组大鼠的水平运动得分和垂直运动得分与CMS组接近(图4)。

## 2.6 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠强迫游泳不动时间的影响

与对照组(62.7 $\pm$ 7.8)s相比, CMS组大鼠不动时间(145.5 $\pm$ 8.2)s显著延长( $P<0.01$ ); 与CMS组相比, CMS+SF+PC12( $10^5$ 、 $10^6$ )和CMS+Flu组各组的不动时间(102.9 s、83.0 s和86.7 s)均显著缩短

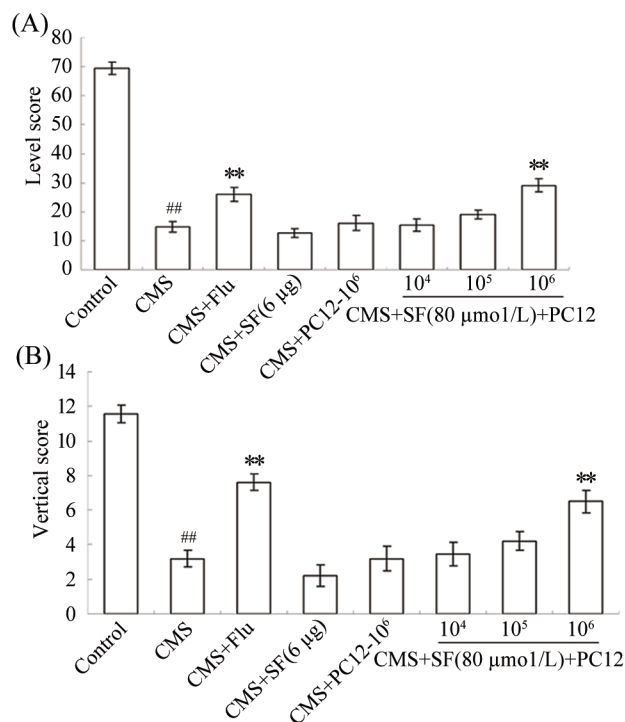


图4 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液对慢性应激抑郁模型大鼠旷场活动的影响

将大鼠放入旷场中央格, 观察3 min内的活动情况。资料表示为均值 $\pm$ SEM。A: 穿越格子数; B: 站立次数。<sup>##</sup> $P<0.01$ , 与对照组相比; <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , 与慢性应激组相比( $n=12$ )。

### Fig.4 Effect of long-term ip injection of SFIDPC12CL on the locomotion and exploratory behavior in CMS rats

Rats were placed in the central square of the open field and observed for 3 min. Data are represented as the means $\pm$ SEM. A: number of squares crossed (times); B: number of rearing (times). <sup>##</sup> $P<0.01$  vs control; <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs CMS ( $n=12$ ).

( $P<0.01$ ); 而CMS+SF(6  $\mu\text{g}$ )和CMS+PC12- $10^6$ 组大鼠的强迫游泳不动时间(144.9 s、135.0 s)与CMS组接近(图5)。这些结果提示阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液可部分逆转慢性应激对大鼠强迫游泳不动时间的影响, 而微量阿魏酸钠和单纯PC12细胞裂解液的无细胞滤液则无此效果。

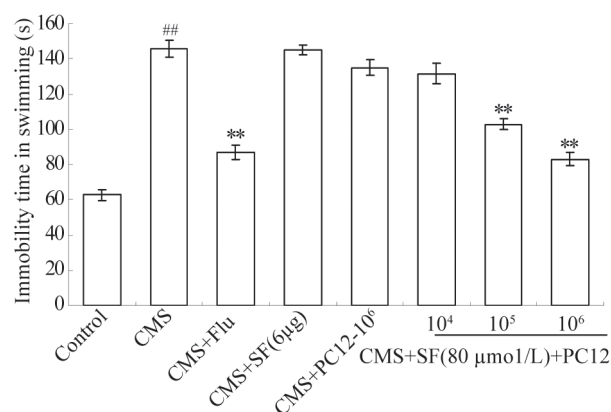


图5 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液对慢性应激抑郁模型大鼠强迫游泳不动时间的影响

末次应激后翌日进行大鼠强迫游泳试验。游泳不动时间表示为均值 $\pm$ SEM。采用SPSS 13.0软件进行组间方差分析。<sup>##</sup> $P<0.01$ , 与对照组相比; <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , 与慢性应激组相比( $n=12$ )。

### Fig.5 Effect of long-term ip injection of SFIDPC12CL on the immobility time during the forced-swim test in CMS rats

The rats exposed to CMS and received administration of cell-free filtrate of sodium ferulate-induced and differentiated PC12 cell lysates (ip, once-daily) for 28 days were subjected forced-swimming test, and the measurement of immobility time was carried out by observing the motoric activity of the rats as described in "Materials and Methods". Values are expressed as the means $\pm$ SEM of 12 animals per group. Data were analyzed with SPSS 13.0 software. <sup>##</sup> $P<0.01$  vs control, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs CMS ( $n=12$ ).

## 2.7 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠海马DG区病理学改变的影响

结果显示, 慢性应激造成大鼠海马损伤, 引起神经元变性坏死(图6A和图6B)。CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12( $10^5$ 、 $10^6$ )和CMS+Flu各组大鼠海马区未发现明显的神经元损伤(图6C、图6G、图6H), CMS+SF(6  $\mu\text{g}$ )和CMS+PC12- $10^6$ 组大鼠海马区的病理改变与CMS组接近(图6B、图6D、图6E), 提示阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液可缓解慢性应激对大鼠海马DG区神经组织病理学的不良影响, 而

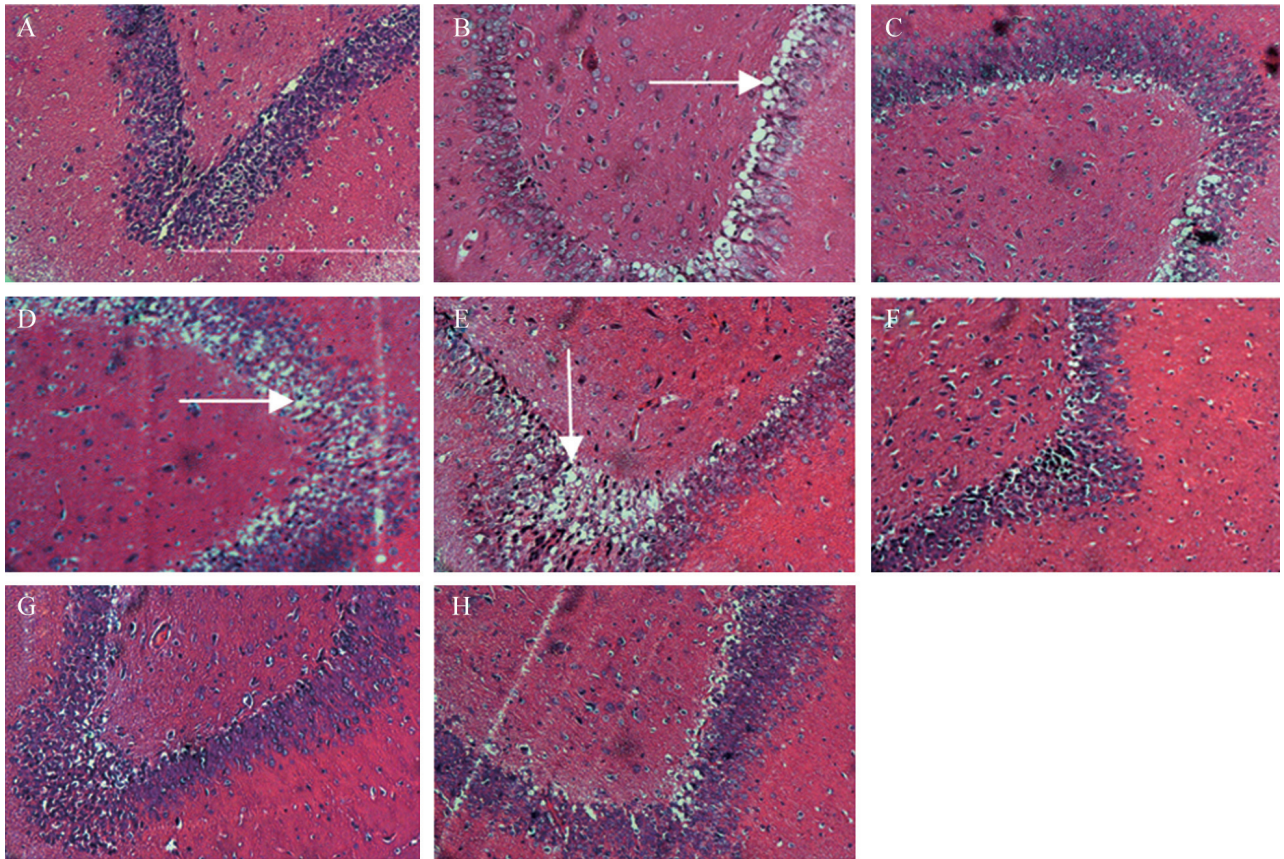


图6 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液对慢性应激抑郁模型大鼠脑海马DG区病理学改变的影响

A: 对照组; B: 慢性应激组; C: 慢性应激+氟西汀组; D: 慢性应激+阿魏酸钠(6 µg)组; E: 慢性应激+PC12细胞( $1 \times 10^6$ 细胞)裂解液组; F: 慢性应激+阿魏酸钠(80 µmol/L)+PC12- $10^4$ 组; G: 慢性应激+阿魏酸钠(80 µmol/L)+PC12- $10^5$ 组; H: 慢性应激+阿魏酸钠(80 µmol/L)+PC12- $10^6$ 组; 箭头: 轻度的神经元水肿和变性。

Fig.6 Sections through hippocampal regions of CMS rats showing morphological effects of SFIDPC12CL ( $\times 50$ )

A: control; B: CMS; C: CMS+Flu; D: CMS+SF(6 µg); E: CMS+PC12- $10^6$ ; F: CMS+SF(80 µmol/L)+PC12- $10^4$ ; G: CMS+SF(80 µmol/L)+PC12- $10^5$ ; H: CMS+SF(80 µmol/L)+PC12- $10^6$ ; Arrow: slight intracellular edema and degeneration.

微量阿魏酸钠和单纯PC12细胞裂解液的无细胞滤液则无此效果。

## 2.8 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠脑海马DG区NGF和BDNF表达的影响

慢性应激造成大鼠海马DG区NGF和BDNF表达水平明显下降(图7Aa、图7Ab、图7Ba、图7Bb)。与此相反,阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液以剂量依赖的方式逆转慢性应激对大鼠海马DG区NGF和BDNF表达的影响(图7Aa、图7Ab、图7Af~图7Ah、图7Ba、图7Bb、图7Bf~图7Bh),且这一效果堪与氟西汀相比(图7Ab、图7Ac、图7Ah、图

7Bb、图7Bc、图7Bh),而微量阿魏酸钠和单纯PC12细胞裂解液的无细胞滤液则无此效果(图7Aa、图7Ab、图7Ad、图7Ae、图7Ba、图7Bb、图7Bd、图7Be)。

## 2.9 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠内侧前额叶皮质NGF和BDNF表达的影响

慢性应激造成大鼠大脑皮质NGF和BDNF的表达水平明显下降(图8Aa、图8Ab、图8Ba、图8Bb)。阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液以剂量依赖的方式逆转慢性应激对大鼠大脑皮质NGF和BDNF表达的影响(图8Aa、图8Ab、图8Af~图8Ah、图8Ba、图8Bb、图8Bf~图8Bh),且这一效果

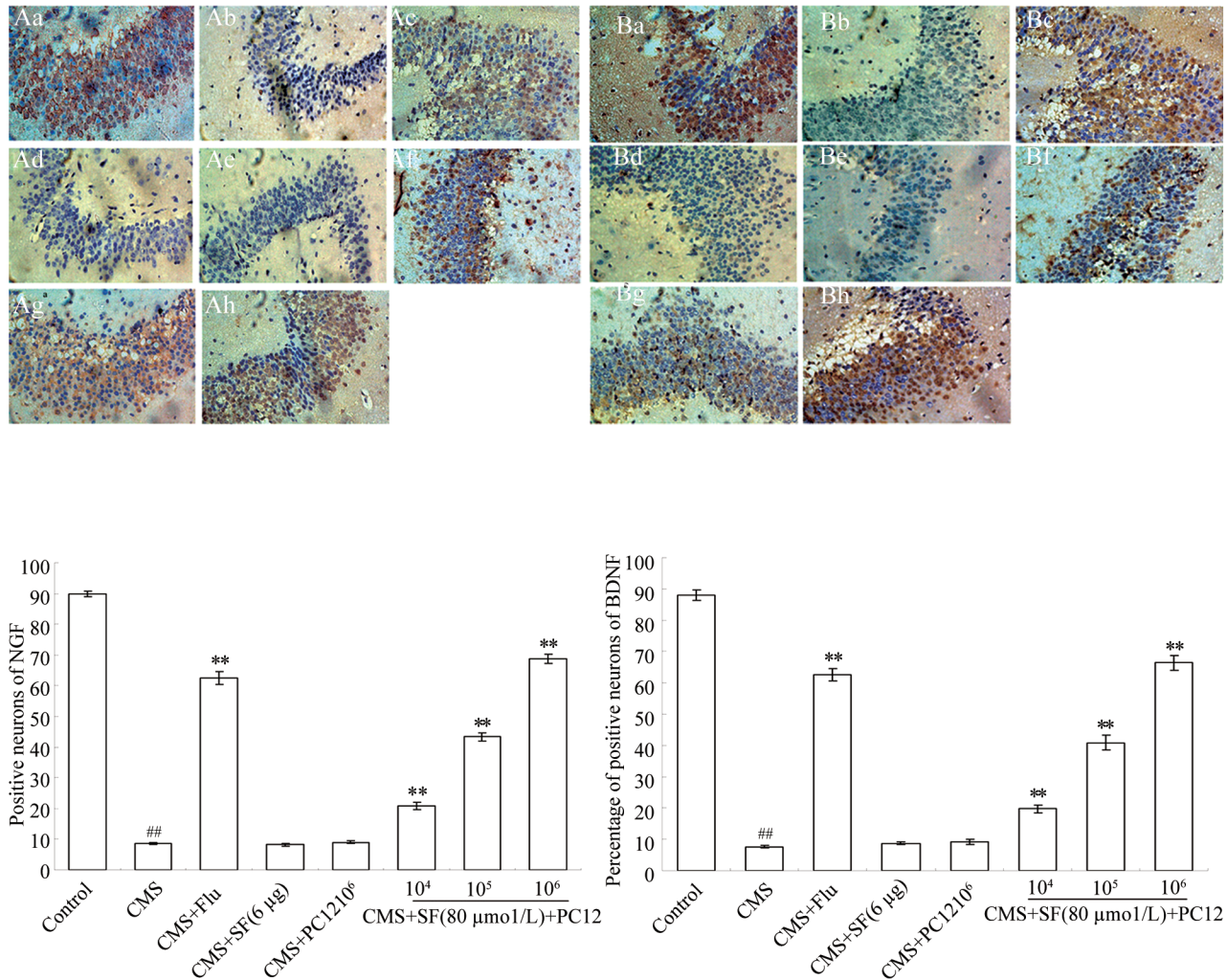


图7 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液增强慢性应激抑郁模型大鼠脑海马DG区NGF和BDNF的表达

取脑( $n=4$ ), 4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋。通过海马区, 片厚4  $\mu\text{m}$ 。NGF、BDNF表达水平采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin peroxidase conjugated method, SP), 按说明书在切片上进行免疫组化检测。细胞体出现淡黄至褐黄色细颗粒状着色为NGF或BDNF阳性细胞。两位观察者盲法阅片, 每张切片至少观察5个具有代表性的高倍视野, 计数不少于100个细胞。资料表示为均值 $\pm$ SEM。A: NGF: Aa: 对照组; Ab: 慢性应激组; Ac: 慢性应激+氟西汀组; Ad: 慢性应激+阿魏酸钠(6  $\mu\text{g}$ )组; Ae: 慢性应激+PC12细胞( $1 \times 10^6$ 细胞)组; Af: 慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^4$ 组; Ag: 慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^5$ 组; Ah: 慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^6$ 组; B: BDNF: Ba: 对照组; Bb: 慢性应激组; Bc: 慢性应激+氟西汀组; Bd: 慢性应激+阿魏酸钠(6  $\mu\text{g}$ )组; Be: 慢性应激+PC12细胞( $1 \times 10^6$ 细胞)组; Bf: 慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^4$ 组; Bg: 慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^5$ 组; Bh: 慢性应激+阿魏酸钠(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^6$ 组。

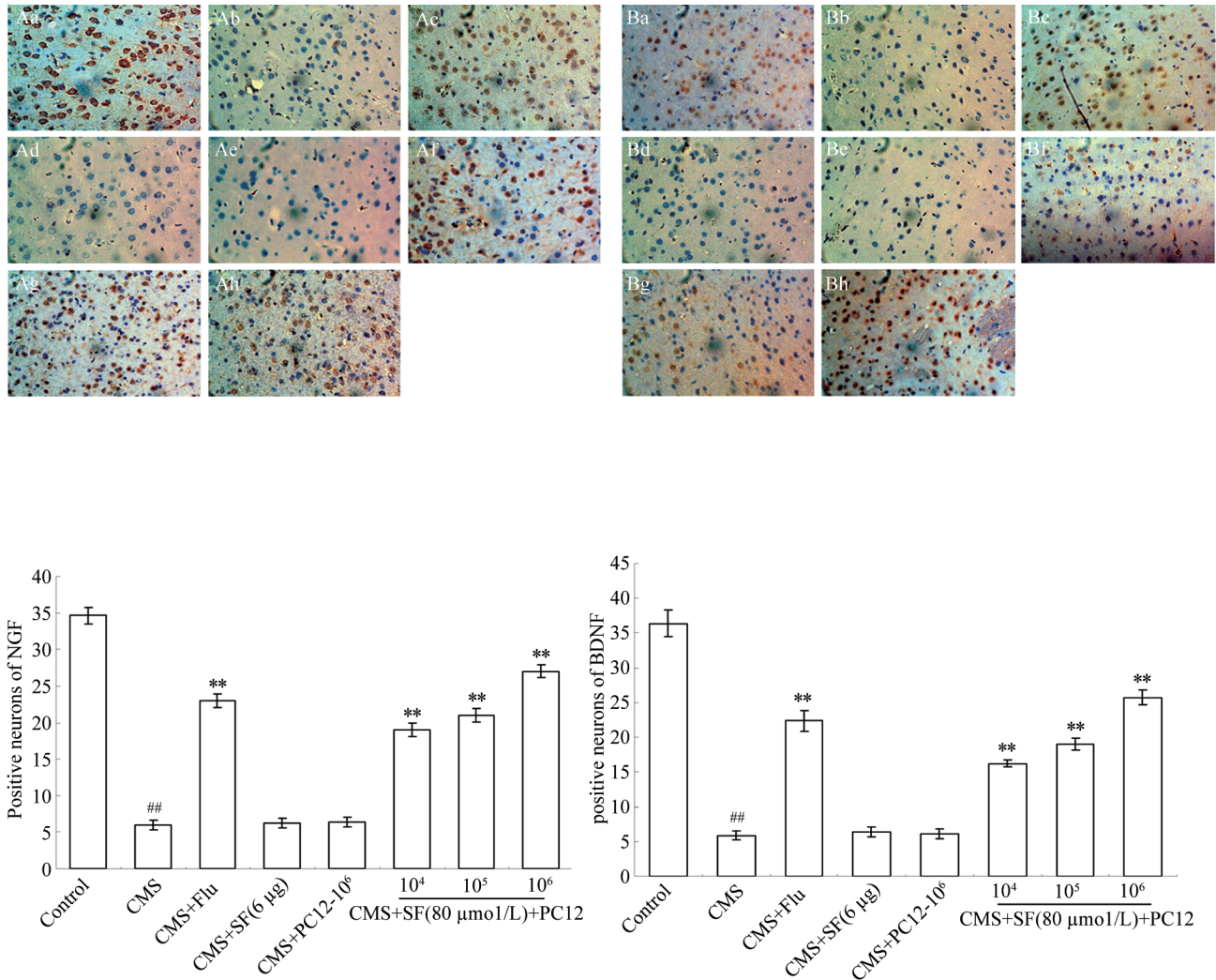
Fig.7 SFIDPC12CL enhances the expressions of NGF and BDNF in the hippocampal DG of CMS-induced depression-like model rats( $\times 200$ )

The whole brains of unselected rat ( $n=4$ ) were immediately fixed in 4% paraformaldehyde, and processed by paraffin embedding methods. Sections 4  $\mu\text{m}$  thick were cut and processed for immunohistochemistry. The immunohistochemistry of NGF and BDNF on sections was performed using a streptavidin-peroxidase conjugate (SP) method according to the manufacturer's instructions. Rabbit anti-rat polyclonal antibodies (anti-NGF and anti-BDNF) labels were identified by the characteristic yellowish brown stain seen in NGF and BDNF positive cell bodies. Changes in the number of immunopositive cells of the hippocampal DG sector in stained sections were counted under a light microscope at a magnification of a  $\times 200$ , and the average of five different areas was determined. All values were expressed as the means $\pm$ SEM, and statistical significance was evaluated by Dunnet's multiple comparison test for nonparametric analysis. A: NGF: Aa: control; Ab: CMS; Ac: CMS+Flu; Ad: CMS+ SF(6  $\mu\text{g}$ ); Ae: CMS+PC12- $10^6$ ; Af: CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^4$ ; Ag: CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^5$ ; Ah: CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^6$ ; B: BDNF: Ba: control; Bb: CMS; Bc: CMS+Flu; Bd: CMS+SF(6  $\mu\text{g}$ ); Be: CMS+PC12- $10^6$ ; Bf: CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^4$ ; Bg: CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^5$ ; Bh: CMS+SF(80  $\mu\text{mol/L}$ )+PC12- $10^6$ .



堪与氟西汀相比(图8Ab、图8Ac、图8Ah、图8Bb、图8Bc、图8Bh), 而微量阿魏酸钠和单纯PC12细胞裂

解液的无细胞滤液则无此效果(图8Aa、图8Ab、图8Ad、图8Ae、图8Ba、图8Bb、图8Bd、图8Be)。



**图8 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液增强慢性应激抑郁模型大鼠内侧前额叶皮质NGF和BDNF表达**

材料与方同图7说明。A: NGF: Aa: 对照组; Ab: 慢性应激组; Ac: 慢性应激+氟西汀组; Ad: 慢性应激+阿魏酸钠(6 μg)组; Ae: 慢性应激+PC12细胞(1×10<sup>6</sup>细胞)组; Af: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12-10<sup>4</sup>组; Ag: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12-10<sup>5</sup>组; Ah: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12-10<sup>6</sup>组; B: BDNF: Ba: 对照组; Bb: 慢性应激组; Bc: 慢性应激+氟西汀组; Bd: 慢性应激+阿魏酸钠(6 μg)组; Be: 慢性应激+PC12细胞(1×10<sup>6</sup>细胞)组; Bf: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12-10<sup>4</sup>组; Bg: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12-10<sup>5</sup>组; Bh: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12-10<sup>6</sup>组。

**Fig.8 SFIDPC12CL enhances the expressions of NGF and BDNF in the medial prefrontal cortex of CMS-induced depression-like model rats**

“Materials and Methods” described as Figure 7 was used in this test. Changes in the number of immunopositive cells of the cerebral cortex sector in stained sections were counted under a light microscope at a magnification of a ×200, and the average of five different areas was determined. All values were expressed as the means±SEM, and statistical significance was evaluated by Dunnet’s multiple comparison test for nonparametric analysis. A: NGF: Aa: control; Ab: CMS; Ac: CMS+Flu; Ad: CMS+ SF(6 μg); Ae: CMS+PC12-10<sup>6</sup>; Af: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12-10<sup>4</sup>; Ag: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12-10<sup>5</sup>; Ah: CMS+SF(80 μmol/L)+ PC12-10<sup>6</sup>; B: BDNF: Ba: control; Bb: CMS; Bc: CMS+FLU; Bd: CMS+SF(6 μg); Be: CMS+PC12-10<sup>6</sup>; Bf: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12-10<sup>4</sup>; Bg: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12-10<sup>5</sup>; Bh: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12-10<sup>6</sup>.

### 2.10 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液对慢性应激抑郁模型大鼠海马CA3区神经发生的影响

BrdU标记细胞的数量分析表明, 与对照组相比, 慢性应激抑郁模型大鼠海马CA3区BrdU标记的细胞明显减少( $P < 0.01$ ); 与慢性应激组相比, 阿魏酸钠诱

导分化的PC12细胞( $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ )裂解液的无细胞滤液分别增加11.4%、22.1%、57.0%BrdU标记的细胞(氟西汀对照组为23.2%)(图9); 而微量阿魏酸钠和单纯PC12细胞裂解液的无细胞滤液则无此效果, 提示阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液有增强慢性应激抑郁模型大鼠海马神经发生的作用。

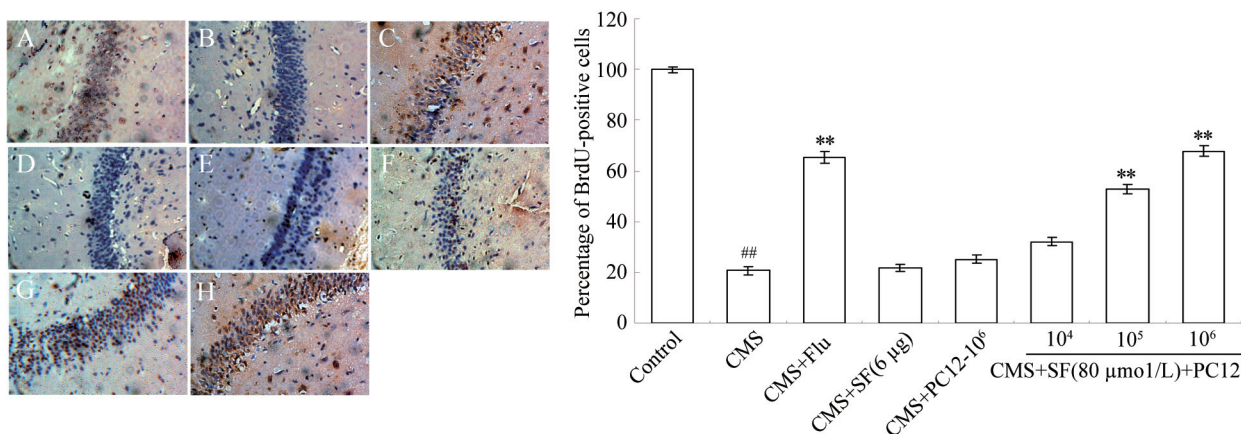


图9 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液增强慢性应激抑郁模型大鼠海马CA3区神经发生

末次应激后4 d, 每组任取4只大鼠腹腔注射BrdU(75 mg/kg, 每2 h 1次, 共4次)。末次BrdU注射后24 h牺牲大鼠, 并心脏灌注预冷0.1 mol/L PBS 5 min, 预冷4%多聚甲醛17 min。灌注后摘除全脑, 在4%多聚甲醛中固定过夜(4 °C, 摇), 之后贮存在30%蔗糖液中(4 °C)。免疫组织化学检查方法如“材料与与方法”所述。依照鉴定、计数NGF和BDNF阳性细胞同样的方法鉴定、计数BrdU阳性细胞。A: 对照组; B: 慢性应激组; C: 慢性应激+氟西汀组; D: 慢性应激+阿魏酸钠(6 μg)组; E: 慢性应激+PC12细胞( $1 \times 10^6$ 细胞)组; F: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12- $10^4$ 组; G: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12- $10^5$ 组; H: 慢性应激+阿魏酸钠(80 μmol/L)+PC12- $10^6$ 组。

Fig.9 SFIDPC12CL induces the proliferation of neural stem cell/neural progenitor cells in the hippocampal CA3 of CMS-induced depression-like model rats

For *in vivo* BrdU-incorporation assay, rats were administered BrdU( $4 \times 75$  mg/kg every 2 h) 4d after the last antidepressant treatment. 24 hours after the last BrdU injection, rats were killed and transcardially perfused. After perfusion, all brains were post-fixed overnight in paraformaldehyde (with shaking) at 4 °C and stored at 4 °C in 30% sucrose. Immunohistochemistry assay was performed as “Materials and Methods”. Anti-BrdU labels were identified by the characteristic yellowish brown stain seen in BrdU-positive cell bodies. Changes in the number of immunopositive cells of the hippocampal CA3 sector in stained sections were counted under a light microscope at a magnification of a  $\times 200$  without the examiner knowing the experimental protocols, and the average of five different areas was determined. All values were expressed as the means $\pm$ SEM, and statistical significance was evaluated by Dunnet’s multiple comparison test for nonparametric analysis. A: control; B: CMS; C: CMS+Flu; D: CMS+SF(6 μg); E: CMS+PC12- $10^6$ ; F: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12- $10^4$ ; G: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12- $10^5$ ; H: CMS+SF(80 μmol/L)+PC12- $10^6$ .

### 3 讨论

本文报告的结果表明, 终浓度为80 μmol/L的阿魏酸钠培养液孵育6 d的PC12细胞停止增殖, 部分细胞长出突起, 突起相互连接呈网络状, 其细胞裂解液滤液的阿魏酸钠浓度为5.49 μg/ml。体内试验证实, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液无细胞滤液改善抑郁症样模型大鼠的行为学障碍, 上调其海马和大脑皮质NGF和BDNF的表达, 增加其神经干细胞/神经前体细

胞的增殖。因此, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液无细胞滤液有明显的抗抑郁效果, 而其抗抑郁效果可能源自它的上调NGF和BDNF的表达和神经发生增强作用。

此前作者已经报告, 在体内阿魏酸钠不仅是一种有显著效果的神经系统保护剂<sup>[24,25]</sup>, 而且在一定程度上有促进损伤的神经系统修复的作用<sup>[26,27]</sup>; 在体外一定浓度范围的阿魏酸钠不仅对PC12细胞有

明显的促增殖作用, 而且有诱导PC12细胞分化成神经元样细胞的功能<sup>[11]</sup>。虽然阿魏酸钠本身具有抗抑郁作用, 但终浓度为80  $\mu\text{mol/L}$ 的阿魏酸钠培养液孵育6 d的PC12细胞裂解液滤液中的阿魏酸钠浓度仅为5.49  $\mu\text{g/ml}$ , 而用阿魏酸钠(6  $\mu\text{g}$ )进行的长期体内实验表明, 这一微量的阿魏酸钠并无抗抑郁效果, 可见, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液所显示的抗抑郁样效果并非这一微量阿魏酸钠的作用; 虽然PC12细胞具有高度分化为神经母细胞、神经元样细胞的潜能, 但实验表明, 单纯PC12细胞裂解液并无抗抑郁效果。因此, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液所显示的抗抑郁样效果应该与阿魏酸钠诱导PC12细胞分化成的神经元样细胞的裂解产物有关。

PC12细胞是一株来源于大鼠肾上腺皮质的嗜铬细胞瘤的细胞<sup>[28]</sup>。在糖皮质激素的作用下, PC12细胞分化成典型的肾上腺嗜铬细胞; 在神经生长因子的作用下, 分化成典型的交感神经元样细胞<sup>[7-9]</sup>。PC12细胞停止增殖, 胞体变大, 长出轴突样结构, 是其向神经元分化的形态特征。在阿魏酸钠作用下, PC12细胞可以被诱导分化为形态特征和分子标志与神经样细胞一致的细胞, 这与我们以前的研究结果是一致的<sup>[11]</sup>。

NGF和BDNF是神经系统重要的营养因子, 是多功能性生长因子, 其表达主要在神经系统, 不仅可促进神经细胞的生长、分化, 而且对免疫、炎症细胞有确切的趋化、增殖活性。目前已经明确 NGF和BDNF能够促进神经元存活、分化并在神经损伤后再修复过程中发挥作用<sup>[29,30]</sup>。本文报告的结果表明, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液无细胞滤液可缓解慢性应激对大鼠海马DG区 and 大脑皮质NGF和BDNF表达的不良影响。

5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, 它在细胞增殖周期的S期即DNA合成期被整合入细胞核DNA中, 故BrdU是反映细胞增殖状态的理想标志物。免疫荧光双染法显示, 大多数BrdU免疫阳性细胞可同时拥有神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)和维生素D依赖性钙结合蛋白(calbindin-D28k, CaBP), 该共存现象提示BrdU免疫阳性细胞大多数分化为成熟神经元。因此, BrdU免疫阳性细胞的数目基本上可代表脑内神经前体细胞的发生水平<sup>[31]</sup>。本文报告的结果表明, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液无细胞滤液明显增强慢

性应激所造成的抑郁模型大鼠海马CA3区神经前体细胞的发生。

中枢神经再生一直是困扰神经科学的一大难题。与外周神经组织或某些胚胎期神经元不同, 成年哺乳类中枢神经轴突在损伤后多难以再生; 但研究提示损伤的中枢神经元轴突再生困难并不是由于内在再生能力的缺乏, 如创造适当的生长环境, 受损中枢神经元轴突的生长修复也是可能的。近十年来的研究显示可能是几类因素共同构成了中枢神经再生困难的神经微环境, 包括再生后神经营养因子的逐步减少, 损伤后胶质瘢痕的形成, 髓鞘相关轴突生长抑制因子以及排斥性导向分子的存在等<sup>[32]</sup>。

神经营养因子是选择性调节周围神经和中枢神经系统神经生长和存活的一类蛋白质。BDNF是Brade等<sup>[33]</sup>于1982年从猪脑中分离纯化的一种碱性蛋白, 分子量为12.3 kDa。作为脑组织中含最丰富的神经营养因子, BDNF在中枢神经系统内合成并广泛存在于脑组织包括大脑皮层、海马、基底前脑、纹状体、下丘脑和小脑, 其中以海马和皮层中含量最高。BDNF促进神经元的发育、损伤后的修复和再生及维持其存活<sup>[34]</sup>, 防止胆碱能神经元的减少和神经功能的缺失<sup>[30]</sup>。BDNF通过其特异性受体酪氨酸激酶 TrkB 参与细胞的分化、粘着、增殖与成熟等重要的生物学过程。

自Levi-Montalcini等<sup>[35]</sup>发现NGF以来, 科学家们对其进行了大量的研究。NGF的生物活性蛋白, 它广泛存在于中枢神经系统, 对神经元的存活、发育和分化起重要作用<sup>[30]</sup>。NGF在保护神经元、抑制神经元死亡方面也有重要作用。内源性的NGF缺乏能引起脑缺血损伤区的迟发性神经元死亡, 侧脑室注入NGF则可以延迟并预防胆碱能神经末梢损伤及预防迟发性神经元死亡<sup>[36-38]</sup>。NGF能保护海马及皮质神经元免受低氧、低糖和谷氨酸毒性损害<sup>[39,40]</sup>。

我们推测, 阿魏酸钠诱导的向神经元样细胞分化的PC12细胞, 特别是分化早、中期的PC12细胞, 具有旺盛的合成神经营养因子的功能。本研究仅检测了BDNF和NGF的表达, 实际上, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液所显示的抗抑郁样作用应该是向神经元样细胞分化的PC12细胞合成的神经营养因子(已知的和未知的)和其他细胞因子(已知的和未知的)综合作用的结果。

利用诱导多能干细胞(induced pluripotent stem

cells, iPS)技术可以诱导人皮肤纤维母细胞成为几乎与胚胎干细胞完全一样的多能干细胞。iPS技术的关键是引入OCT4、SOX2、c-MYC和KLF4等转录因子<sup>[41]</sup>。上述转录因子在阿魏酸钠诱导PC12细胞向神经元样细胞分化的过程中是否发挥以及怎样发挥作用值得探讨。

PC12细胞裂解液的主要成分应该是多肽蛋白质类物质,而起到抗抑郁样作用的应该主要是阿魏酸钠诱导的向神经元样细胞分化的PC12细胞所含的特殊的多肽蛋白质类物质。通常情况下,大分子蛋白质不能通过血脑屏障,但Schäbitz等<sup>[42]</sup>报告,静脉注射BDNF可促进卒中后感觉运动恢复,以及刺激神经发生。总之,本文旨在报告阿魏酸钠诱导的向神经元样细胞分化的PC12细胞裂解液具有抗抑郁样作用这一实验结果,至于这种作用的有效成分及其作用机制我们确实尚不清楚,进一步的深入研究正在进行中。

### 参考文献(References)

- Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress caused apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 1996; 16(10): 3534-40.
- Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(10):925-35.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4(11): 1313-7.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20(24): 9104-10.
- Jacobs BL. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain Behav Immun* 2002; 16(5): 602-9.
- Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: A novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des* 2005; 11(2): 145-55.
- Green LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(7): 2424-8.
- Green LA. The importance of both early and delayed responses in the biological actions of nerve growth factor. *Trends Neurosci* 1984; 7(3): 91-4.
- Förander P, Hoffer B, Strömberg I. Nerve fiber formation and catecholamine content in adult rat adrenal medullary transplants after treatment with NGF, NT-3, NT-4/5, bFGF, CNTF and GDNF. *Cell Tissue Res* 1998; 292(3): 503-12.
- 方文贤, 宋崇顺, 周立孝. 医用中药药理学, 第1版. 北京: 人民卫生出版社 1998, 468-70.
- 廖铭能, 王艳平, 张永平, 马润娣, 张霄瑜, 于立坚, 等. 阿魏酸钠的神经保护和神经发生增强作用及其抗抑郁样效果. *中国细胞生物学报* 2010; 32(6): 840-9.
- 张霞, 廖铭能, 张永平, 于立坚, 马润娣, 张霄瑜, 等. 阿魏酸钠的抗抑郁作用的研究. *中华行为医学科学杂志* 2007; 16(7): 595-6.
- 张永平, 于立坚, 廖铭能, 马润娣, 张霄瑜, 于廷曦. 慢性应激大鼠抑郁模型检测阿魏酸钠的抗抑郁效果. *中华行为医学科学与脑科学杂志* 2009; 18(8): 685-8.
- Yoshizumi M, Kogame T, Suzaki Y, Fujita Y, Kyaw M, Kirima K, *et al.* Ebselen attenuates oxidative stress-induced apoptosis via the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1 signalling pathway in PC12 cells. *Br J Pharmacol* 2002; 136(7): 1023-32.
- 中华人民共和国科学技术部. 实验动物福利和使用原则. 2006.
- Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1981; 5(2): 247-51.
- 许晶, 李晓秋. 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及其评价. *中国行为医学科学* 2003; 12(1): 14-7.
- Benelli A, Filaferrero M, Bertolini A, Genedani S. Influence of S-adenosyl-L-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats. *Br J Pharmacol* 1999; 127(3): 645-54.
- Porsolt RD, Antonia G, Blaveta N, Jalfrea M. Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978; 47(4): 379-91.
- Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, *et al.* Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004; 10(6): 776-82.
- Shi ZR, Itzkowitz SH, Kim YS. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem* 1988; 36(3): 317-22.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 2002; 115(1): 97-105.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20(24): 9104-10.
- Yu LJ, Zhang YP, Ma RD, Bao L, Fang JZ, Yu TX. Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intra-gastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16(3): 170-7.
- Zhang YP, Yu LJ, Ma RD, Bao L, Zeng R, Fang JZ, *et al.* Potent protective effect of ferulic acid on glutamate-induced neurotoxicity in adult mice. *Chin J Neuromed* 2008; 7(6): 596-9.
- 杨培培, 于立坚, 马润娣, 张永平, 张霄瑜, 于廷曦. 阿魏酸钠脑室内注射对谷氨酸单钠诱导的成年小鼠神经损伤的修复作

- 用。中国行为医学科学 2008; 17(1): 13-5.
- 27 张永平, 于立坚, 马润娣, 张霄瑜, 于廷曦。阿魏酸钠对妊娠晚期母小鼠谷氨酸单钠灌胃诱导的仔鼠兴奋性毒性神经损伤的修复作用。中国行为医学科学 2008; 17 (11): 968-71.
- 28 Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P, Bedri S, Alroy J, Shahsavari M, *et al.* Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. *Cell Tissue Res* 2000; 302(3): 309-20.
- 29 王 晶, 路 毅, 邢秀荣, 秦 俭, 王 蓉, 盛树力。APP17肽对心肺复苏大鼠海马神经元NGF、BDNF表达的影响。中国药理学通报 2007; 23(5): 582-5.
- 30 张 卓, 王廷华, 朱榆红, 冯忠堂, 孙 冰, 胡艳丽。NGF、BDNF和NT3在AD大鼠海马中的分布及表达变化。四川大学学报医学版 2005; 36(6): 789-91.
- 31 张志军, 万 琪, 江 文, 王卫东, 王洪典。成年大鼠脑缺血在灌注后海马齿状回神经发生的试验研究。中华老年心脑血管病杂志 2002; 4(5): 345-8.
- 32 蔡文琴。发育神经生物学。北京: 科学出版社, 2007, 322-4.
- 33 Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1(5): 549-53.
- 34 王堰婷, 陆佩华。神经营养素与免疫细胞的关系。细胞与分子免疫学杂志 2001; 17(1): 95-7.
- 35 Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237(4819): 1154-62.
- 36 Shigeno T, Mima T, Takakura K, Graham DI, Kato G, Hashimoto Y, *et al.* Amelioration of delayed neuronal death in hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 1991; 11(9): 2914-9.
- 37 Garofalo L, Ribeiro-da-silva A, Cuello AC. Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2639-43.
- 38 Ishimaru H, Takahashi A, Ikarashi Y, Maruyama Y. NGF delays rather than prevents the cholinergic terminal damage and delayed neuronal death in the hippocampus after ischemia. *Brain Res* 1998; 789(2): 194-200.
- 39 Cheng B, Mattson MP. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* 1991; 7(6): 1031-41.
- 40 Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Iwata H, *et al.* Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 1993; 632(1-2): 296-302.
- 41 Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. Induced pluripotent stem cells: Advances to applications. *Stem Cells Cloning* 2010; 3(1): 29-37.
- 42 Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, *et al.* Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 2007; 38(7): 2165-72.

## Antidepressant-like Effect of Cell-free Filtrate of Sodium Ferulate-induced and Differentiated PC12 Cell Lysates

Ming-Neng Liao<sup>1</sup>, Li-Jian Yu<sup>1\*</sup>, Yong-Ping Zhang<sup>1</sup>, Run-Di Ma<sup>1\*</sup>, Xiao-Yu Zhang<sup>1,3</sup>, Ting-Xi Yu<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; <sup>2</sup>Cell Biology Group, Department of Surgery, Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine and Baltimore Veterans Affairs Medical Center, Baltimore, MD 21201, USA; <sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21228, USA)

**Abstract** Ferulic acid (FA), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid, is one of the most common phenolic acids with low toxicity, and sodium ferulate (SF) is its sodium salt. Our previous work demonstrates that SF has significant neuroprotective and neurogenesis-enhancing actions and antidepressant-like effects. The aim of this study was to investigate a potential antidepressant-like effect of cell-free filtrate of sodium ferulate-induced and differentiated PC12 cell lysates (SFIDPC12CL) in the chronic mild stress (CMS)-induced depression-like model rats. PC12 cells were cultured in DMEM containing 80  $\mu\text{mol/L}$  SF for 6 days, and then cell-free SFIDPC12CL was prepared. Residual SF concentration in cell-free SFIDPC12CL was assayed by HPLC. Depression-like rat models were reproduced by CMS stimuli. Antidepressant effects of SFIDPC12CL were assessed by behavioural tests. The effects of SFIDPC12CL on hippocampal and cerebral cortex expressions of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were assayed by immunohistochemistry, and the effect of SFIDPC12CL on hippocampal neurogenesis assayed using the thymidine analog bromodeoxyuridine (BrdU) as a marker for dividing cells in CMS-induced depression-like model rats. Our studies demonstrate that administration of SFIDPC12CL significantly attenuated the CMS-induced depression-like behavioural disorders, up-regulated the hippocampal and cerebral cortex expressions of NGF and BDNF, and increased the hippocampal number of BrdU-labeled cells. These findings indicate that SFIDPC12CL shows marked antidepressant-like effects in the CMS-induced depression-like model rats, and raise the possibility that SFIDPC12CL up-regulates expressions of NGF and BDNF, and increases neuronal number.

**Key words** sodium ferulate; PC12 cells; induction of differentiation; cell lysates; antidepressant-like effect; chronic mild stress; rats

Received: November 20, 2010 Accepted: March 1, 2011

This work was supported by the Graduate Funded Project of Guangdong Ocean University

\*Corresponding author. Tel: 86-759-2362424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 86-759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com