

## 研究论文

## 阿魏酸钠的神经保护和神经发生增强作用

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

<sup>1</sup> 广东海洋大学海洋药物研究与开发重点实验室, 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, Baltimore, MD 21201; <sup>3</sup> Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21228)

**摘要** 作用靶点新颖而又无副作用的抗抑郁药正处于巨大需求之中。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。我们先前的研究已经表明,阿魏酸具有显著的抗兴奋性中毒和抗抑郁样作用,而我们现在则研究其神经保护和神经发生增强效果,并讨论其神经保护和神经发生增强效果与它的抗抑郁样作用的关系。MTT法检测阿魏酸钠对PC12细胞生长的影响和它的神经保护作用;形态学和免疫细胞化学方法检测其诱导分化作用;免疫组织化学和BrdU-掺入方法检测抑郁症样模型大鼠海马神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平及神经干细胞/神经前体细胞的增殖状况。体外试验表明,阿魏酸钠促进PC12细胞的增殖,部分保护PC12细胞免受过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和地塞米松(dexamethasone, DXM)诱导的损伤,诱导PC12细胞分化为形态特征和分子标记与神经样细胞一致的细胞。体内试验表明,阿魏酸钠上调NGF和BDNF的表达,增强抑郁症样模型大鼠海马神经干细胞/神经前体细胞的增殖。上述研究提供的证据表明,阿魏酸钠具有神经保护和神经发生增强作用,而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。

**关键词** 阿魏酸钠;神经保护作用;神经发生增强作用;PC12细胞;抑郁症大鼠模型

阿魏酸(ferulic acid),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,是阿魏、当归、川芎、升麻、木贼等多种中药的有效成分之一。在植物体内主要与多糖、蛋白质和木质素交联构成细胞壁的骨架<sup>[1,2]</sup>。在中药研究中,阿魏酸常作为一种指示性化合物(marker compound);由于其具有某些确切的药理活性,且毒性很低,又常作为一些药的活性化合物(active compound)<sup>[2]</sup>,临床和研究中通常用它的钠盐(阿魏酸钠, sodium ferulate, SF)。中国学者对阿魏酸的药学、药理学及其临床应用进行了较广泛深入的研究。

大量研究已证实过量的兴奋性氨基酸能对神经系统造成损伤<sup>[3]</sup>。兴奋性中毒对急性神经疾病神经元损伤和死亡负有关键责任。兴奋性中毒可能是不同机制引起的急性神经元损伤的一条最终的共同的通路<sup>[4]</sup>。抗兴奋性毒性一直是近年来神经保护

和修复药物研究最有吸引力的入路之一。此前我们的工作已经证实阿魏酸钠对妊娠晚期母小鼠谷氨酸单钠诱导的仔鼠兴奋性毒性神经损伤有显著的保护和修复作用<sup>[5,6]</sup>,对谷氨酸单钠诱导的成年小鼠兴奋性毒性神经损伤也有保护和修复作用<sup>[7,8]</sup>。

抑郁症是一种严重危害人类健康的疾病,其发病年龄提早和发病率增加的趋势是世界性的,紧随的自杀行为也在持续上升。现在用来治疗抑郁症的有三种基本类型的药物:三环类抗抑郁药,单胺氧化酶抑制剂,选择性5-羟色胺再摄取抑制剂。上述三类现在临床应用的抗抑郁药都有一定疗效,但效果并不理想,而且都有明显的副作用。因此,寻找具有不同的作用机制和作用靶点且副作用低的抗抑郁药实乃

收稿日期: 2010-07-02 接受日期: 2010-10-09

\* 通讯作者。Tel: 0759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 0759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com

当务之急。此前我们的工作已经证实在急性动物行为绝望模型(悬尾和强迫游泳试验)和慢性应激大鼠抑郁模型中阿魏酸钠都显示有意义的抗抑郁样效果,且未发现明显的副作用<sup>[9,10]</sup>。

神经科学家现在知道,在许多病例中,心理紊乱是脑特殊化学介质失调的结果。临床和临床前研究指出,在抑郁症病人中多有高皮质激素血症及海马萎缩<sup>[11]</sup>。氧化性应激在抑郁症的发病中起着重要作用<sup>[12]</sup>。海马萎缩和抑郁症病人的时间过程之间呈正相关<sup>[13,14]</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>[15]</sup>。应激减少海马的神经发生,而抗抑郁治疗则刺激海马神经元增殖。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>[16]</sup>。顺着这一思路,本研究采用体外实验和慢性不可预见性轻度应激大鼠抑郁模型研究阿魏酸钠的神经保护和神经发生增强作用,并讨论阿魏酸钠的神经保护和神经发生增强效果与其抗抑郁样作用的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物

盐酸氟西汀胶囊(Fluoxetine Hydrochloride Capsules), 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);阿魏酸钠注射液由海南利能康泰制药有限公司生产;地塞米松(dexamethasone, DXM)为天津药业集团新郑股份有限公司公司产品。

### 1.2 试剂

超级新生牛血清为杭州四季青公司产品;胰蛋白酶和DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)为美国Gibco公司产品;马血清购自美国HyClone公司;噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、牛血清白蛋白、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Triton X-100、吖啶橙(acridine orange, AO)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)均为美国Sigma公司产品;小鼠抗神经丝蛋白轻链单克隆抗体(mouse anti NF-L monoclonal antibody)购自武汉博士德公司;抗鼠IgG(TRICH-Anti-Mouse IgG)购自北京中杉公司;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[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(Roche Diagnostics Indianapolis, IN, USA)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)、亲和素-生物素复合物(avidin-biotin complex)均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 mg/ml链霉素的DMEM培养液,预先在内壁被覆胶原的培养瓶,在37℃、5%CO<sub>2</sub>中培养<sup>[17]</sup>,取对数生长期细胞用于实验。

### 1.4 动物

SPF级220~280g体质量的雄性SD大鼠,购自广东医学院实验动物中心(湛江,中国),室温23±1℃,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年颁发的动物福利和使用原则。

### 1.5 MTT法

按Hansen等<sup>[18]</sup>报告的MTT法检测阿魏酸钠、过氧化氢和糖皮质激素对PC12细胞生长的影响及阿魏酸钠对PC12细胞的保护作用。简言之,取PC12细胞接种于96孔板,每孔90 μl细胞悬液(1.0×10<sup>6</sup>细胞/孔)。待细胞长到约80%融合时,分别加入不同浓度的药液10 μl,对照组加入相同体积DMEM培养液。每一浓度设4个平行孔。充分混匀后,于CO<sub>2</sub>培养箱中分别培养指定的时间。每孔加入MTT 20 μl (5 μg/ml),继续培养5 h。每孔加入三联液(10%SDS, 5%异丁醇, 0.012 mol/L HCl, 蒸馏水溶解)100 μl。37℃放置过夜,用酶标仪在570 nm波长处测量各孔OD值。资料表达为对照组OD值的百分率。

### 1.6 阿魏酸钠对PC12细胞生长的影响及其对过氧化氢和糖皮质激素诱导的PC12细胞损伤的保护作用

PC12细胞在不同浓度的阿魏酸钠作用下培养24 h, MTT法检测阿魏酸钠对PC12细胞生长的影响。PC12细胞在不同浓度的阿魏酸钠作用下培养1 h,之后加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(终浓度为150 μmol/L)或DXM溶液(终浓度为200 μmol/L),继续培养24 h, MTT法检测阿魏酸钠对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或DXM诱导的PC12细胞损伤的

保护作用。

### 1.7 荧光显微镜观察细胞形态

取 PC12 细胞接种于 24 孔板, 每孔 900  $\mu\text{l}$  细胞悬液( $1 \times 10^5$  细胞)。细胞在 40  $\mu\text{mol/L}$  阿魏酸钠作用下培养 1 h, 之后加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液, 使其终浓度为 150  $\mu\text{mol/L}$ , 继续培养 24 h。细胞经 PBS 涮洗后, 加入 200  $\mu\text{l}$  PBS 和 10  $\mu\text{l}$  混合荧光染色液(含 100  $\mu\text{g/ml}$  AO 和 100  $\mu\text{g/ml}$  EB), 混匀染色。荧光显微镜观察、拍照。

### 1.8 PC12 细胞的分化诱导

PC12 细胞在阿魏酸钠作用下培养指定的时间, 研究不同浓度(10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$ )的阿魏酸钠在不同时间点(6 h 和 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 days)对 PC12 细胞轴突长出和分子标志 NF-200 的影响。

每一不同时间点(6 h 和 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 days)培养碟任选 1  $\text{cm}^2$  视野观察细胞轴突长出情况, 以 Leica DM IRB 机拍照<sup>[19]</sup>。

免疫细胞化学法检测神经细胞分化的分子标志神经丝蛋白-200(neurofilament-200, NF-200)<sup>[20-22]</sup>。简言之, 不同浓度阿魏酸钠作用 7 d 后, 吸去培养液, 各孔用 0.01 mol/L PBS 洗涤两次, 加入福尔马林于室温下固定 30 min。去除固定液后, 用 0.01 mol/L PBS 室温下洗涤 3 次, 5 min/次。再用含有 0.5% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 处理 20 min, 加入牛血清白蛋白, 室温下封闭 30 min。0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 5 min/次。滴加一抗(mouse anti NF-L monoclonal antibody, 1:100), 对照组加入 PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$  放置过夜。取出室温放置 1 h 后, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤三次, 5 min/次。滴加二抗(Trick 标记的 anti-mouse IgG, 1:50), 室温、避光放置 1h, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 5 min/次。实验中设不加一抗的空白对照组, 除加入一抗时以 0.01 mol/L PBS 代替 mouse anti NF-L polyclonal antibody 外, 其余步骤同上。在激光共聚焦显微镜下(激发波长: 488 nm, 观察波长: 518 nm), 观察结果, 并进行拍照。

### 1.9 大鼠慢性应激抑郁模型

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、慢性应激(模型)组、慢性应激 + 氟西汀(阳性对照)组和阿魏酸钠(慢性应激 + 不同剂量阿魏酸钠)治疗组, 每组 11 只动物。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 的随机慢性应激。慢性应激参照文献<sup>[10,23]</sup>所述方法进行。动物遭受 28 d 的随机刺激, 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

(48 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, 速率为 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。在应激的当天, 阳性对照组即开始给予盐酸氟西汀灌胃[2.0 mg/(kg·d)], 阿魏酸钠治疗组即开始腹腔注射阿魏酸钠[10、20、40 mg/(kg·d)], 每日一次, 持续 28 天。对照组不予任何刺激, 正常照料。对照组和模型组每日灌胃等量生理盐水一次。应激及氟西汀、阿魏酸钠处理第 28 d 后牺牲动物, 取脑, 进行海马免疫组织化学检查。

### 1.10 免疫组织化学

1.10.1 神经生长因子和脑源性神经营养因子 在接受 28 d 应激和阿魏酸钠或氟西汀治疗后, 每组任取 4 只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg(5 mg/ml)麻醉, 10% 福尔马林溶液(0.1 mmol/L PBS, pH 7.4)心脏灌注牺牲动物。取脑, 在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 置 10% 福尔马林溶液(0.1 mmol/L PBS, pH 7.4)中固定 2 d。石蜡包埋。通过海马区全脑冠状面切片, 片厚 4  $\mu\text{m}$ 。神经生长因子和脑源性神经营养因子的免疫组化检查采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin peroxidase conjugated method, SP 法)按说明书在切片上进行<sup>[24,25]</sup>。第一抗体稀释到 1:100。第一抗体在室温下孵育过夜后, 第二抗体在室温下孵育与切片孵育 15 min, 之后加 DAB。

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神经生长因子或脑源性神经营养因子阳性细胞。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。

1.10.2 BrdU 掺入测定<sup>[26,27]</sup> 在接受 28 d 应激和阿魏酸钠或氟西汀治疗后 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(pH 7.2, 0.1 mol/L, 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 $^{\circ}\text{C}$ , 摇床), 之后贮存在 30% 蔗糖液中(4 $^{\circ}\text{C}$ )。通过全海马用冰冻切片系列切片(4  $\mu\text{m}$  厚)。切片保存在 PBS/ $\text{NaN}_3$  中。

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。在 PBS 洗涤后, 切片在 30%  $H_2O_2$  中孵育 30 min 以去除内源性过氧化物酶。在以 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℃ 孵育过夜。之后切片与第二抗体(biotinylated horse anti-mouse, 生物素酰化的马抗小鼠抗体)孵育 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。

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 BrdU 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。

### 1.11 统计分析

实验所得结果数据用均数  $\pm$  标准误( $\bar{x} \pm SE$ )来表示。两样本间均数的比较用成组  $t$  检验。所有数据均用 SPSS11.0 统计软件进行处理。 $P < 0.05$  被视为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 阿魏酸钠促进 PC12 细胞增殖

图 1 显示阿魏酸钠具有促进 PC12 细胞增殖的作用, 且其效果与剂量相关。阿魏酸钠的浓度高于 5  $\mu\text{mol/L}$  时 PC12 细胞的增殖速度缓慢爬升; 80~320  $\mu\text{mol/L}$  浓度的阿魏酸钠显著促进 PC12 细胞增殖 ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ )。

### 2.1 阿魏酸钠对过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用

如图 2 所示, 150  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢明显抑制 PC12 细胞增殖, 而过氧化氢的这一作用浓度依赖性地被阿魏酸钠所缓解。

形态上 AO/EB 荧光染料使正常 PC12 细胞核着绿色(图 3A), 而  $H_2O_2$  处理的细胞显红色或橙色, 核小、皱缩(图 3B)。凋亡和坏死细胞的数量在  $H_2O_2$  和 SF+ $H_2O_2$  处理组之间有着明显的差异(图 3B, 图 3C); 细胞核的形态在  $H_2O_2$  和 SF+ $H_2O_2$  处理组之间有着明显的差异(图 3B, 图 3C)。150  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理 24 h 后观察到的细胞核形态的变化反映染色质浓缩和核皱缩。在 20  $\mu\text{mol/L}$  SF 处理后再用 150  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  处理组, 凋亡和坏死的 PC12 细胞的数量明显减少。结果提示, SF 部分保护过氧化氢对 PC12 细胞的损伤。

### 2.3 阿魏酸钠对地塞米松诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用

如图 4 所示, 200  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松明显抑制 PC12 细胞增殖, 而地塞米松的这一作用浓度依赖性地被阿

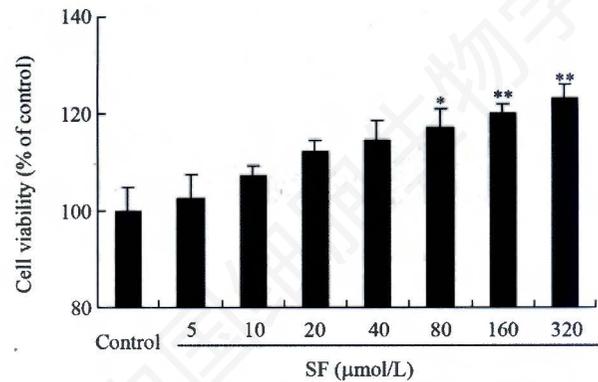


Fig. 1 Effect of SF on the cell viability in PC12 cells

PC12 cells were cultured with different concentrations of SF for 24 h. Cell viability was examined by MTT assay. The data of one representative experiment from three independent experiments were expressed as mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  as compared with control (without SF).

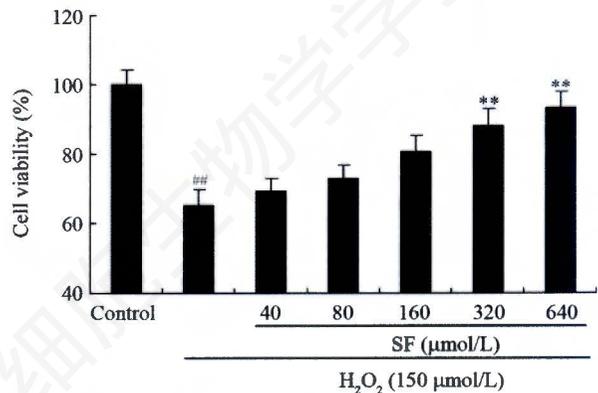


Fig. 2 Protective effect of SF on  $H_2O_2$ -induced cytotoxicity in PC12 cells

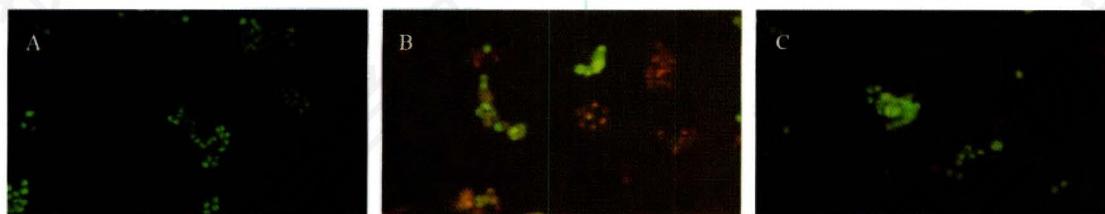
The indicated concentrations of SF was added 1 h prior to  $H_2O_2$  (150  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulation. Following 24 h incubation, the viability of cells treated with or without  $H_2O_2$  or SF+ $H_2O_2$  was examined by MTT assay. The data of one representative experiment from three independent experiments were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=4$ ).  $###P < 0.01$  as compared with control group;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  as compared with  $H_2O_2$  group.

魏酸钠所缓解。

### 2.4 阿魏酸钠诱导 PC12 细胞分化

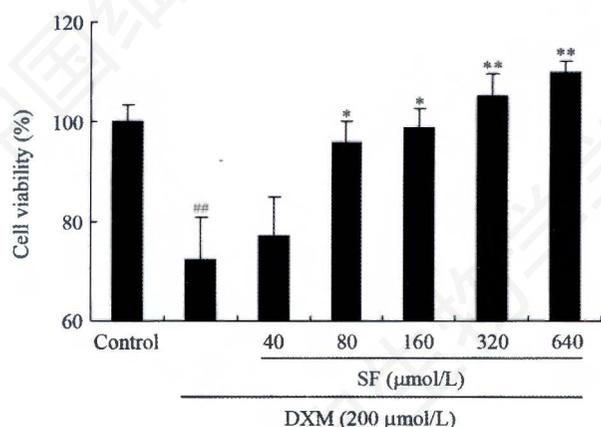
PC12 细胞在不同浓度的阿魏酸钠(10~160  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用下培养, 密切观察细胞的形态变化。培养的第 4 d, 在 80  $\mu\text{mol/L}$ 、160  $\mu\text{mol/L}$  阿魏酸钠处理组观察到细胞轴突长度有意义地增加; 培养的第 7 d, 在 80  $\mu\text{mol/L}$ 、160  $\mu\text{mol/L}$  阿魏酸钠处理组, 获得成熟的神经元表型的细胞以其连接细胞的长轴索结构形成复杂的神经网络(图 5)。

为了确定与阿魏酸钠一起培养的 PC12 细胞的突



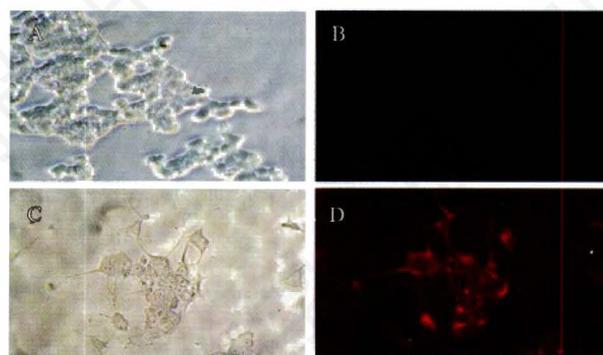
**Fig. 3 Protective effect of SF on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells by double staining with AO/EB(200×)**

A: control; B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μmol/L); C: SF (20 μmol/L) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μmol/L). PC12 cells were incubated in the presence of SF (40 μmol/L) for 1 h, and 150 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for additional incubation of 24 h. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell apoptosis was analyzed by AO/EB double fluorescent staining as described in "Materials and Methods". Cells in which nuclei were red or orange (yellow-red) indicate apoptotic cells.



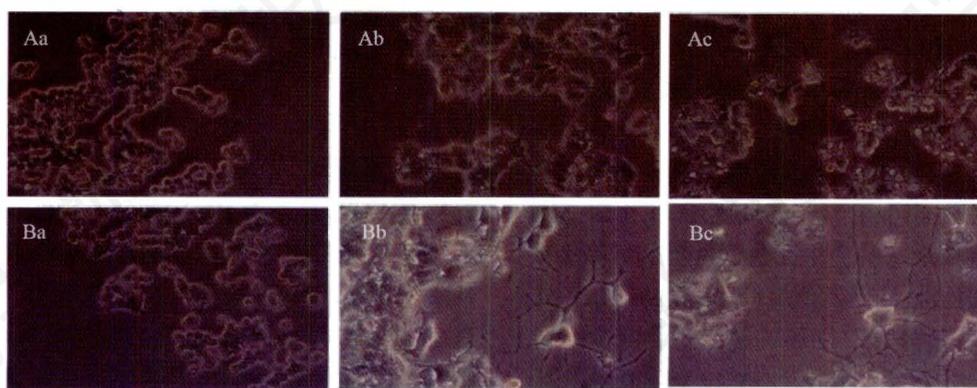
**Fig. 4 Protective effect of SF against DXM-induced cytotoxicity in PC12 cells**

The indicated concentrations of SF was added 1 h prior to DXM (200 μmol/L). Following 24 h incubation, the viability of cells treated with or without DXM or SF+DXM was evaluated by assessing the reduction of MTT. The data of one representative experiment from three independent experiments were expressed as mean±SE (n=4). <sup>##</sup>P<0.01 as compared with control group; <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01 as compared with DXM group.



**Fig. 6 Neuronal-like differentiated and matured cells (200×)**

A: control; B: control, using PBS instead of primary antibody (NF-200 monoclonal body); C: PC12 cells treated with 160 μmol/L SF for 7 days. The cells acquired advanced neuronal-like phenotypes with long axons structures connecting cells to each other forming potential complex neural networks; D: PC12 cells treated with 160 μmol/L SF for 7 days were submitted to the immunocytochemistry of the NF-200. The cells with neuronal-like morphology after differentiation and maturation highly expressed NF-200 (red). PC12-cells were grown in the absence (control) or presence of SF (80, 160 μmol/L) for 9 days. For molecular marker NF-200, the cells were submitted to the immunocytochemistry of the NF-200 on the 7th day as described in "Materials and Methods".



**Fig. 5 Neurite outgrowth in the presence of SF(200×)**

PC12-cells were grown in the absence (control) or presence of SF (80、160 μmol/L). A: 4th day: Aa: control; Ab: 80 μmol/L; Ac: 160 μmol/L; B: 7th day: Ba: control; Bb: 80 μmol/L; Bc: 160 μmol/L. Neurite outgrowth was monitored for 9 days, starting 6 h post-supplementation of SF. Representative micrographs of PC12-cell culture are shown.

触是否整合和成熟,我们检测了神经细胞分化的分子标志 NF-200 的表达。经过 3~4 d 孵化的细胞丧失了完整的圆形,小突起开始从这些细胞长出。分化过程伴随着一些细胞的凋亡。经过一周的分化,细胞呈极性形态,可以清楚地看到轴突和树突结构,发现相当复杂的神经网络(图 5Bb, 图 5Bc, 图 6C, 图 6D)。分化的细胞高表达 NF-200(红色),而 NF-200 则沿神经细胞的轴突结构高度集中(图 6D)。结果提示,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记与神经样细胞一致的更加成熟的细胞。

### 2.5 阿魏酸钠上调慢性应激抑郁模型大鼠海马 DG 区神经生长因子和脑源性神经营养因子的表达

慢性应激抑郁模型大鼠海马 DG 区神经生长因子和脑源性神经营养因子的水平明显下降(图 7Aa, 图 7Ab, 图 7Ba, 图 7Bb)。与此相反,阿魏酸钠以剂量依赖的方式逆转慢性应激对大鼠海马 DG 区神经生长因子和脑源性神经营养因子的影响(图 7Ab, 图 7Ad~图 7Af, 图 7Bb, 图 7Bd~图 7Bf),而且阿魏酸钠的效果堪与氟西汀相比(图 7Ab, 图 7Ac, 图 7Af, 图 7Bb, 图 7Bc, 图 7Bf),提示阿魏酸钠可缓解慢性应激对大鼠海马 DG 区神经生长因子和脑源性神经营养因子表达的不良影响。

### 2.6 阿魏酸钠增强慢性应激抑郁模型大鼠海马 CA3 区神经发生

BrdU 标记细胞的数量分析表明,与慢性应激组相比,阿魏酸钠(10, 20, 40 mg/kg)分别增加 BrdU 标记的细胞 8.6%, 27.8%, 47.7%(氟西汀对照组为 23.2%) (图 8)。可见,阿魏酸钠明显增加海马 CA3 区 BrdU 阳性细胞数,提示阿魏酸钠有增强慢性应激抑郁模型大鼠海马 CA3 区神经发生的作用。

## 3 讨论

大小鼠强迫游泳和小鼠悬尾试验中出现的不动状态反映动物的绝望行为。我们以前和现在的研究表明,阿魏酸钠显著缩短大小鼠强迫游泳和小鼠悬尾试验的不动时间,提示阿魏酸钠有明显的急性抗抑郁样作用。但是,阿魏酸钠不抵抗利血平引起的体温降低、眼睑下垂及运动不能,不抑制 5-羟色胺的重摄取,不增强去甲肾上腺素的毒性。这些结果提示,阿魏酸钠的抗抑郁作用机制与三环类抗抑郁剂、5-羟色胺重摄取抑制剂及单胺氧化酶 A 抑制剂不同<sup>[9]</sup>。

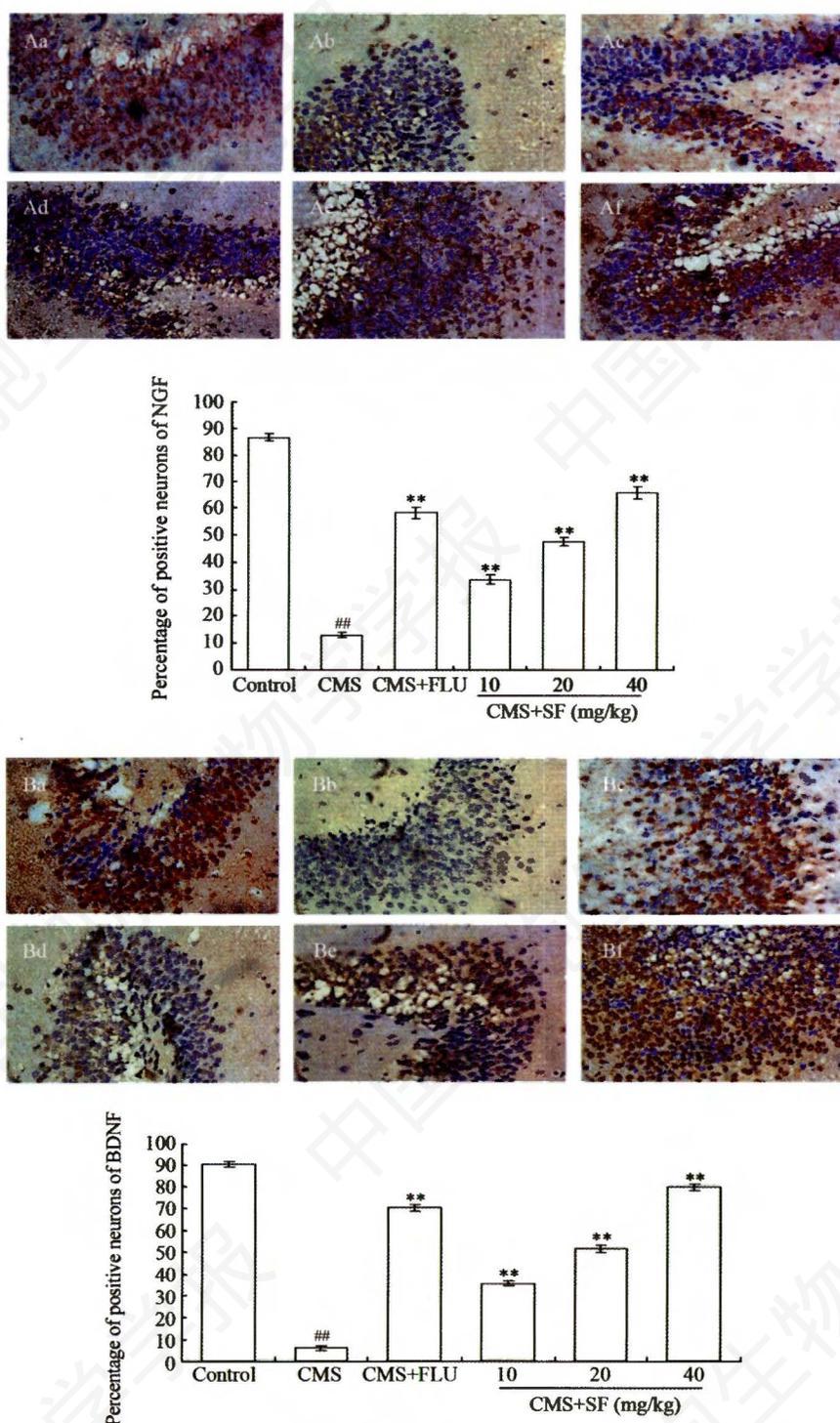
Katz 等<sup>[28]</sup>报道,若使大鼠连续 3 周处于应激状态(包括电击、剥夺食水、冷水浸泡和反转昼夜节律等),大鼠会出现探究行为明显减弱,血浆中皮质激素升高,而给予三环类、单胺氧化酶抑制剂等抗抑郁药,则可阻止这些异常改变的发生<sup>[29]</sup>。Richardson<sup>[30]</sup>报道,幼年动物隔离喂养,数月后动物表现为绝望状态,平卧、探究活动减少,以及孤独状。这是目前广泛应用的大鼠慢性应激抑郁模型。我们最近的研究结果表明,慢性给药的阿魏酸钠部分逆转应激引起的大鼠体重和摄食量的下降,以及行为学和海马组织病理学的变化。这些结果提示,阿魏酸钠有显著的慢性抗抑郁样作用<sup>[10]</sup>。

本文报告的结果表明,在体外阿魏酸钠对过氧化氢和地塞米松诱导的 PC12 细胞损伤有明显的保护作用,能促进 PC12 细胞增殖、诱导其分化为与神经样细胞形态特征与分子标记一致的更加成熟的细胞;在体内阿魏酸钠上调慢性应激抑郁模型大鼠海马 DG 区神经生长因子和脑源性神经营养因子的表达,增强慢性应激抑郁模型大鼠海马 CA3 区神经发生。

兴奋性氨基酸(主要是谷氨酸)外源性引入或内源性释放而产生的兴奋性中毒是谷氨酸或其他兴奋性氨基酸引起中枢神经系统神经细胞死亡的过程<sup>[3]</sup>。多种神经性疾病,如局部或全脑缺血缺氧,急、慢性神经退行性疾病,可能也包括抑郁症等,其产生的原因可能有多种,但可能享有谷氨酸受体过度受刺激导致神经元损伤这一共同通路<sup>[4]</sup>。一系列实验证实阿魏酸钠对兴奋性神经中毒有显著的保护作用<sup>[5~8]</sup>。

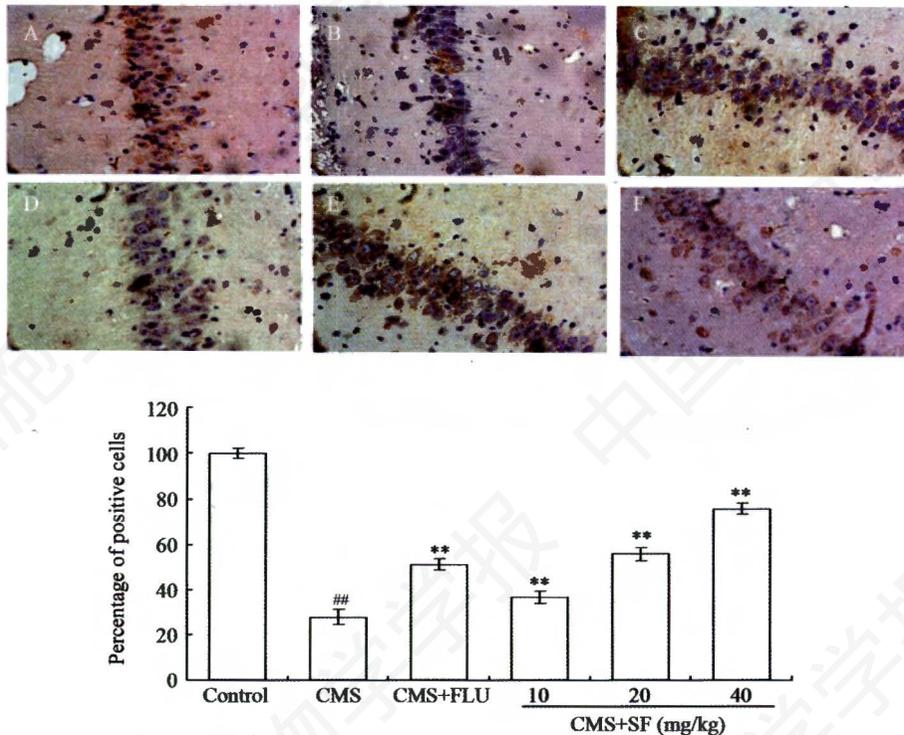
氧化应激参与抑郁症的发病机制。正常细胞在代谢过程中,自由基的产生和清除处于动态平衡;当细胞出现病理情况时,自由基产生过多或产生的自由基得不到及时清除,促氧化-抗氧化系统平衡向促氧化方向变化,称为氧化应激。过氧化氢是与氧化应激反应密切相关的活性氧之一,其产物具有很强的氧化性并可自由进入细胞,进而导致细胞内酶、蛋白质、DNA 等生物大分子的结构和功能的改变,造成细胞酶活力变化、代谢紊乱和细胞凋亡。本文报告的体外实验结果表明,阿魏酸钠对氧化应激反应及其产生的活性氧造成的细胞损伤有明显的保护作用。

抑郁症的发病机制涉及下丘脑-垂体-肾上腺轴失调。糖皮质激素的过量释放与海马萎缩密切相关。抑郁症病人常观察到高糖皮质激素血症及与之联系的海马萎缩,抗抑郁药物具有改善高可的索血症及相关的海马萎缩的效果就是重要的佐证<sup>[11]</sup>。本文



**Fig. 7 SF enhances the expressions of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampal DG of chronic mild stress-induced depression-like model rats(200 $\times$ )**

A: control; B: CMS; C: CMS+Flu; D: CMS+SF (10 mg/kg/d); E: CMS+SF (20 mg/kg/d); F: CMS+SF (40 mg/kg/d). The whole brains of unselected rat ( $n=4$ ) were immediately fixed in 10% formalin, and processed by paraffin embedding methods. Sections 4  $\mu\text{mol/L}$  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  $\pm$  SE, and statistical significance was evaluated by Dunnet's multiple comparison test for nonparametric analysis.



**Fig. 8 SF induces the proliferation of neural stem cell/neural progenitor cells in the hippocampal CA3 of chronic mild stress-induced depression-like model rats(200×)**

A: control; B: CMS; C: CMS+Flu; D: CMS+SF (10 mg/kg/d); E: CMS+SF (20 mg/kg/d); F: CMS+SF (40 mg/kg/d). For *in vivo* BrdU-incorporation assay, rats were administered BrdU ( $4 \times 75$  mg/kg every 2 h) 4d after the last antidepressant treatment. Twenty-four 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  $\pm$  SE and statistical significance was evaluated by Dunnett's multiple comparison test for nonparametric analysis.

报告的体外实验结果表明,阿魏酸钠对肾上腺皮质激素造成的细胞损伤有明显的保护作用。

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株。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。该细胞株性状稳定、均一,具有高度的分化潜能,与正常神经母细胞、神经元的特性高度相符,被广泛用于体外神经元的分化、存活以及相应的分子机制研究。

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。神经丝蛋白NF-200是神经元细胞骨架的主要成分,对维持神经元独特的形态特征以及维持神经系统正常活动必需的轴浆运输现象有着至关重要的作用,是神经元所特有的标记<sup>[20]</sup>。本文报告的结果提示,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。

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>[31,32]</sup>。本文报告的结果表明,阿魏酸钠可缓解慢性应激对大鼠海马DG区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<sup>[33]</sup>。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>[34]</sup>。本文报告的结果表明, 阿魏酸钠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。

阿魏酸钠是我国自行研发的一类新的非肽类内皮素受体拮抗剂。基础和临床研究表明, 其酚羟基结构清除自由基, 苯烯结构拮抗内皮素, 具有双重细胞保护作用<sup>[35]</sup>。阿魏酸对  $\beta$ -淀粉样蛋白引起的神经系统损伤也有显著的保护作用<sup>[36]</sup>。阿魏酸增强脑血循环, 在逃避抑制实验(inhibitory avoidance performance)中的效果比吡拉西坦(piracetam)强, 但作用机制与吡拉西坦和他克林(tacrine)稍有不同<sup>[37]</sup>。阿魏酸钠不仅是一种有显著效果的神经系统保护剂, 而且有增强神经发生的作用。因此, 我们推测阿魏酸钠的抗抑郁效果可能是通过神经保护和神经修复途径发挥作用的。

最后, 令我们感兴趣的是, 在我们证实阿魏酸具有神经保护<sup>[5,7]</sup>、脑修复<sup>[6,8]</sup>和抗抑郁作用<sup>[9,10]</sup>之后, Yabe 等<sup>[38]</sup>也报告阿魏酸具有缓解压力引起的抑郁样行为, 在体内外促进神经干/祖细胞增殖的效果。这些结果与我们先前及现在的研究结果一致。

### 参考文献(References)

- 1 方文贤, 宋崇顺, 周立孝. 医用中药药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1998, 468-70.
- 2 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展. 中成药 2006; 28(2): 253-5.
- 3 Yu TX, Zhao Y, Shi WC, Ma RD, Yu LJ. Effects of maternal oral administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Brain Res* 1997; 747(2): 195-206.
- 4 Lipton SA, Rosenberg PA. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330(9): 613-22.
- 5 Yu LJ, Zhang YP, Ma RD, Bao L, Fang JZ, Yu TX. Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16(3): 170-7.
- 6 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.
- 7 Zhang YP, Yu LJ, Ma RD, Bao L, Zeng R, Fang JZ, et al. Potent protective effects of ferulic acid on glutamate-induced neurotoxicity in adult mice. *Chin Neural Med* 2008; 7(6): 596-9.
- 8 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.
- 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研究. *中华行为医学科学* 2007; 16(7): 595-6.
- 10 张永平, 于立坚, 廖铭能, 马润娣, 张霄瑜, 于廷曦. 阿魏酸钠对慢性应激抑郁模型大鼠抗抑郁作用的实验研究. *中华行为医学科学与脑科学杂志* 2009; 18(8): 685-8.
- 11 Mao QQ, Ip SP, Ko KM, Tsai SH, Zhao M, Che CT. Peony glycosides protect against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29(5): 643-7.
- 12 Wei YC, Zhou FL, He DL, Bai JR, Hui LY, Wang XY, et al. The level of oxidative stress and the expression of genes involved in DNA-damage signaling pathways in depressive patients with colorectal carcinoma. *J Psychosom Res* 2009; 66(3): 259-66.
- 13 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.
- 14 Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(10): 925-35.
- 15 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.
- 16 Jacobs BL. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain Behav Immun* 2002; 16(5): 602-9.
- 17 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.
- 18 Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119(2): 203-10.
- 19 Dagai L, Peri-Naor R, Birk RZ. Docosahexaenoic acid significantly stimulates immediate early response genes and neurite outgrowth. *Neurochem Res* 2009; 34(5): 867-75.
- 20 Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 61: 1-23.
- 21 Ali H, Jurga M, Kurgonaite K, Forraz N, McGuckin C. Defined serum-free culturing conditions for neural tissue engineering of human cord blood stem cells. *Acta Neurobiol Exp* 2009; 69(1): 11-23.
- 22 Guzen FP, de Almeida Leme RJ, de Andrade MS, de Luca BA, Chadi G. Glial cell line-derived neurotrophic factor added to a sciatic nerve fragment grafted in a spinal cord gap ameliorates motor impairments in rats and increases local axonal growth. *Restor Neurol Neurosci* 2009; 27(1): 1-16.
- 23 夏军, 叶慧, 周义成, 张景峰, 夏黎明, 王承缘. 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及其有效性的探讨. *华中科技大学学报(医学版)* 2005; 34(4): 493-5.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 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.
- 27 Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20(24): 9104-10.
- 28 Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. 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.
- 29 Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 1987; 93(3): 358-64.
- 30 Richardson JS. Animal models of depression reflect changing views on the essence and etiology of depressive disorders in humans. *Prog Biol Psychiatry* 1991; 15(2): 199-204.
- 31 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.
- 32 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.
- 33 von Bohlen H. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 2007; 329(3): 409-20.
- 34 张志军, 万琪, 江文, 王卫东, 王洪典. 成年大鼠脑缺血再灌注后海马齿状回神经发生的实验研究。中华老年心脑血管病杂志 2002; 4(5): 345-8.
- 35 王峰, 刘敏, 杨连春, 王京媛, 蔡庆, 吕敏, 等. 咖啡酸、阿魏酸: 新的非肽类内皮素拮抗剂。中国临床药理学与治疗学杂志 1999; 4(2): 85-92.
- 36 Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, *et al.* Protection against  $\beta$ -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 2001; 133(1): 89-96.
- 37 Hsieh MT, Tsai FH, Lin YC, Wang WH, Wu CR. Effects of ferulic acid on the impairment of inhibitory avoidance performance in rats. *Planta Med* 2002; 68(8): 754-6.
- 38 Yabe T, Hirahara H, Harada N, Ito N, Nagai T, Sanagi T, *et al.* Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 2010; 165(2): 515-24.

## Neuroprotective and Neurogenesis-enhancing Effects of Sodium Ferulate

Ming-Neng Liao<sup>1</sup>, Yan-Ping Wang<sup>1</sup>, Yong-Ping Zhang<sup>1</sup>, Run-Di Ma<sup>1\*</sup>,

Xiao-Yu Zhang<sup>1,3</sup>, Li-Jian Yu<sup>1\*</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** Antidepressants with novel targets and without side effects are in great demand. Ferulic acid (FA) is a ubiquitous phenolic acid of low toxicity, and sodium ferulate (SF) is its sodium salt. Our previous studies have revealed that FA (or SF) show significant protective effect on excitotoxicity and antidepressant-like effect, and we now test the neuroprotective and neurogenesis-enhancing actions of SF and discuss their relationship with its antidepressant-like effect of SF. MTT assay was performed to measure the effect of SF on the growth of PC12 cells and its neuroprotective effects; morphological and immunocytochemical methods were used for assessing its differentiation-inducing action. The expressions of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the proliferation of neural stem cell/neural progenitor cells were assessed in the hippocampi of chronic mild stress (CMS)-induced depression-like model rats by immunohistochemistry and BrdU-incorporation assays. *In vitro* tests showed that SF promoted the proliferation of PC12 cells in the concentration range of 5~320 mmol/L, and partially protected PC12 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative and dexamethasone (DXM)-induced neurotoxicity damage, and induced PC12 cells to differentiate to more mature cells with the morphological characteristics and molecular marker of neuronal-like cells. *In vivo* tests showed that SF up-regulated the expressions of NGF and BDNF, and induced the proliferation of neural stem cell/neural progenitor cells in the hippocampi of CMS-induced depression-like model rats. This study provides evidences that SF shows the neuroprotective and neurogenesis-enhancing actions, and the antidepressant-like effects of SF may result from its neuroprotective and neurogenesis-enhancing actions.

**Key words** sodium ferulate; neuroprotective effect; neurogenesis-enhancing action; rat pheochromocytoma (PC12) cells; rat models of depression

Received: July 2, 2010 Accepted: October 9, 2010

\*Corresponding author. Tel: 86-759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 86-759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com