三七叶总皂苷对慢性应激抑郁大鼠行为学及海马体 cAMP、PKA、BDNF 的影响

张华林[1]，周中流[1]，杨红艳[1]，项辉[2]
（1.岭南师范学院化学化工学院，广东湛江 524048）（2.中山大学生命科学学院，广东广州 510006）

摘要：本文研究了三七叶总皂苷的抗抑郁作用及其作用机制。40 只大鼠随机分成空白组、模型组、氟西汀组和三七叶总皂苷中高剂量组，建立慢性应激抑郁大鼠模型评价三七叶总皂苷的抗抑郁活性以及对海马体 cAMP、PKA、BDNF 的影响。建模四周后，模型组大鼠与空白组比较，体重、糖水偏好率及自主活动水平等行为学指标分别降低了 8.56%、22.48%、26.17%，表现出人类抑郁症中体重下降、快感缺失、自主活动下降等核心症状，而大鼠海马体 cAMP、PKA、BDNF 的水平分别降低了 53.60%、53.60%、39.20%。给予三七叶总皂苷治疗后，与模型组相比，三七叶总皂苷高剂量组大鼠上述三个行为学指标分别增加了 7.03%、26.21%、26.21%，上述三个生化指标也分别升高了 41.29%、62.79%、49.05%。表明三七叶总皂苷能逆转抑郁大鼠行为学症状以及调节海马体 cAMP、PKA、BDNF 的水平。三七叶总皂苷具有良好的抗抑郁作用，其作用机制与调控海马体 cAMP、PKA、BDNF 水平有关。

关键词：三七叶；人参皂苷；抑郁；慢性应激；cAMP；PKA；BDNF
文章篇号：1673-9078(2015)3-1-5 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.001

Effects of Total Saponins in *Panax notoginseng* Leaves on Behavior and Levels of cAMP, PKA, and BDNF in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress

ZHANG Hua-lin[1], ZHOU Zhong-liu[1], YANG Hong-yan[1], XIANG Hui[2]
(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China)
(2.School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study evaluated the antidepressant effects and corresponding mechanism of the total saponins in leaves of *Panax notoginseng* (TSLPN). A chronic unpredictable mild stress (CUMS) rat model of depression was established to evaluate the antidepressant effects of TSLPN and the effects of TSLPN on the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus of rats. Forty rats were randomly divided into five groups: control, CUMS, fluoxetine, medium dosage of TSLPN, and high dosage of TSLPN groups. After exposure to CUMS for four weeks, compared with the rats in control group, those in CUMS group showed decreases in three behavioral indices-body weight, sucrose preference, and locomotor activity by 8.56%, 22.48%, and 26.17%, respectively. Animals exhibited depression-like symptoms, such as loss in body weight, anhedonia, and decrease in locomotor activity, and the levels of cAMP, PKA, BDNF in the hippocampus also decreased by 53.60%, 53.60%, and 39.20%, respectively. After TSLPN treatment, compared with CUMS group, the above-mentioned three behavioral indices of the rats in high dosage TSLPN increased by 7.03%, 26.21%, and 26.21%, respectively; the levels of three biochemical indices–cAMP, PKA, and BDNF levels–also increased by 41.29%, 62.79%, and 49.05%, respectively. These results indicated that TSLPN could reverse the depression-like behaviors and regulate the levels of cAMP, PKA, and BDNF in the hippocampus. In conclusion, TSLPN was found to have excellent antidepressant effects, and its functioning mechanism was related to the regulation of cAMP, PKA, and BDNF levels in the hippocampus.

Key words: leaves of *Panax notoginseng*; ginsenosides; depression; chronic unpredictable mild stress; cyclic adenosine monophosphate; protein kinase A; brain-derived neurotrophic factor

收稿日期：2014-10-07
基金项目：国家自然科学基金（81202435）；广东省自然科学基金（2014A030307025 ）；广东高校优秀青年创新人才培养计划项目（LYM11088）；岭南师范学院自然科学基金（YL1401）；作者简介：张华林（1979-），男，博士，副教授，研究方向：天然产物有效成分研究；通讯作者：项辉教授

五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen 具有散瘀止血、消肿定痛的显著疗效，是名贵药材和高级食品、补品。三七叶总皂苷是三七茎叶的提取物，收载于《中国药典》一部，为传统中成药七叶神安片的主要原料，具有益气安神、活血止痛的功效[1]。抑郁症（depression）系一组以显著而持久的心境低落为主要特征的综合症，为常见精神疾病之一。世界卫生组织的统计表明，世界上前 10 种致人残疾或丧失劳动能力的疾病中，抑郁症居第 5 位，并且具有逐步上升的趋势，估计到 2020 年，抑郁症有可能成为影响人类健康和生存质量的第二大重要疾病[2]。

课题组早期采用行为绝望模型（强迫游泳实验）、5-HTP 诱导的甩头实验，L-Dopa 诱导的奔跑实验，可乐定诱导的打斗实验等多种抑郁症研究常用的动物学行为模型评价三七叶总皂苷的抗抑郁活性，发现其具有显著的抗抑郁作用[3]。进一步的实验表明三七叶总皂苷代表性成分之一的人参皂苷 Rb_3 具有显著的抗抑郁活性，是重要的活性成分，而作用机制方面的研究表明人参皂苷 Rb_3 能够调节脑内神经营养因子 BDNF 而发挥抗抑郁作用[4]。BDNF 属于神经营养因子家族，在成年哺乳动物和人体的中枢及周围神经系统的多种神经元均有分布，尤其在海马组织的含量最高。多项研究表明，BDNF 表达的下降与抑郁症的发生和发展有关，促进 BDNF 水平的上调作用在抗抑郁药治疗中具有关键作用[5]。本文模拟人类抑郁症中体重下降、快感缺失，自主活动下降等核心症状，建立慢性温和性不可预知应激抑郁大鼠模型（CUMS）进一步评价三七叶总皂苷的抗抑郁活性，并分析其对神经营养因子 BDNF 及其上游 AC/cAMP/PKA 神经信号转导通道可能的调节作用，探讨三七叶总皂苷抗抑郁作用的分子机制。为基于三七叶总皂苷为原料的抗抑郁药品、保健食品的开发提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 原料

三七叶总皂苷由广东环球制药有限公司提供，符合《中国药典》2010 年版一部三七叶总皂苷质量标准项下要求，经 HPLC 检测，三七叶总皂苷含有人参皂苷 Rb_3 15.62%、Rc 7.62%、Rb_1 2.98%、Rb_2 3.83%、F_1 0.75%、F_2 10.52%，三七皂苷 Fa 3.27%、Fc 6.83%[3]；阳性对照药盐酸氟西汀（Fluoxetine，商品名“百优解”，礼来苏州制药有限公司分装）；环磷酸腺苷（cAMP）、蛋白激酶 A（PKA）、脑源性神经营养因子（BDNF）检测试剂盒，美国 BD 公司进口分装；ZH-ZFT 型自发活动实验装置及视频分析系统，淮北正华生物仪器设备有限公司；ELX800 型酶标仪，美国 Biotek 公司；J2-21 低温离心机，美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

SD 大鼠，180~220 g，SPF 级，雄性，购自中山大学实验动物中心，许可证号：SCXK(粤)2011-0029。大鼠检疫 4 d，饲养条件为：温度 20~26 ℃，湿度 40~70%，采用 10 h：14 h 昼夜间断照明，自由进食饮水。检疫合格后，测定糖水消耗基线（方法同糖水消耗检测），根据糖水消耗基础值，筛选 40 只大鼠，将大鼠随机分为空白组、模型组、三七叶总皂苷组（中剂量 70 mg/kg，高剂量 100 mg/kg）、氟西汀组（10 mg/kg），共 5 组。空白组集中于一个笼子里，单独置于安静的环境饲养，其余各组大鼠单笼饲养。在 4 周的造模期里，空白组和模型组大鼠给予蒸馏水（10 mL/kg），给药组灌胃给药，每天 1 次。

1.2.2 建模方法

按照文献方法建立慢性温和性不可预知应激模型（CUMS）[6]。每天随机给予大鼠如下任意一种刺激：行为限制 30 min，4 ℃冰水游泳 2 min，断水 24 h，断粮 24 h，夹尾 5 min，通宵照明，白噪音 30 min 及 45° 斜笼等，使大鼠不能预料刺激的发生。在建模前及建模每周进行行为学指标测定，以判断 CUMS 建模是否成功。

1.2.3 体重的检测

体重变化是建模是否成功的一个重要测定指标，故此分别在建模前 1 d（weak 0）及建模给药期（weak 1~4）测定大鼠体重，分析大鼠体重变化情况。

1.2.4 糖水消耗的检测

CUMS 模型大鼠会出现快感缺失现象，通常以糖水偏好率行为学指标来测定大鼠快感缺失的程度，同时可反映各给药组的抗抑郁药效。采用双瓶法测定糖水的消耗：在实验前先断水 23 h，分别给予两个已称重的喂水瓶，其中一瓶为 1%的蔗糖水，一瓶为自来水。1 h 后各水瓶分别称重，计算糖水偏好率：

糖水偏好率/%=蔗糖饮用水量/(蔗糖饮用水量+自来水引用量)×100%

1.2.5 自主活动的检测

将大鼠放入 ZH-ZFT 型自发活动实验装置中，先适应 2 min，录像记录大鼠在随后 10 min 内的活动总路程。使用附带的分析系统对录得结果进行分析，统计大鼠活动的总路程。

1.2.6 生化指标的检测

最后一次行为学指标检测完成后，大鼠立即断头处死，在冰上剥离大脑，脑组织用冰生理盐水冲洗，去除脑膜，在冰皿上分离两侧海马组织，置于液氮中冷冻后储存于-70 ℃冰箱备用。采用酶联免疫吸附方法（ELISA），严格按照检测试剂盒的说明操作，分别检测大鼠脑内海马体 BDNF、cAMP、PKA 的含量。

1.2.7 数据分析与统计

实验数据采用 Ms Office Excel 2007 分析，结果用 Mean±S.E.M.表示，统计数据进行 Student-T 及 one-way ANOVA 检验，P<0.05，P<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 慢性应激建模及药物对大鼠体重的影响

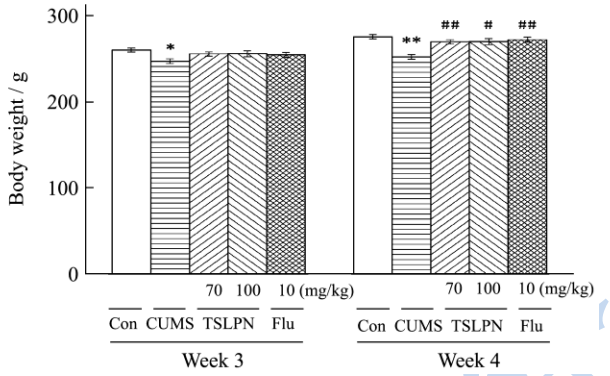


图 1 三七叶总皂苷和氟西汀对慢性应激模型大鼠体重的影响

Fig.1 Effects of TSLPN and Flu on body weight in CUMS rat model

注：Con 为空白组，CUMS 为模型组，TSLPN 为三七叶总皂苷组，Flu 为氟西汀组。*表示与空白对照组相比，*P<0.05，差异显著；**P<0.01，差异极其显著；#表示与模型组相比，#P<0.05，差异显著，##P<0.01，差异极其显著。

建模前 1 周（week 0）为大鼠的适应期，各组间大鼠体重没有显著性差异（P>0.05）；建模给药的第 1 周（week 1），各组大鼠体重均有所增加，各组间没有显著性差异（P>0.05）；第 2 周（week 2）开始，慢性刺激发挥作用，模型组及给药组的大鼠体重减少或者体重增加减慢，模型组尤其明显，但各组间仍没有显著性差异（P>0.05）（week 0~week 2 数据省略）。建模给药的第 3 周（week 3），模型组大鼠体重持续减少，与空白组相比，体重降低了 5.03%，呈现出显著性差异（P<0.05），慢性应激导致大鼠体重明显减少，表明建模成功。而三七叶总皂苷中高剂量组及氟西汀组的大鼠体重依然是缓慢增加，与空白组相比体重是减少的，与模型组相比体重是增加的，但都没有显著性差异（P<0.05），表明药物治疗开始发挥作用。第 4 周（week 4）时，模型组大鼠与空白组比较，体重降低了 8.56%，呈现极其显著性差异（P<0.01），表明随着刺激时间延长，模型组大鼠体重持续降低。三七叶总皂苷中高剂量组及氟西汀组与模型组相比，大鼠体重分别增加了 7.02%、7.03%、8.02%，均呈现出显著差异（P<0.05），但与空白组相比，仍低于空白组，大鼠体重分别降低了 2.15%、2.13%、1.23%，没有显著性差异（P>0.05），表明各给药组 4 周治疗后，可极其显著的恢复大鼠的体重，但不能恢复到正常水平，表现出明显的抗抑郁作用。此外，三个给药组组间比较，没有显著性差异（P>0.05），表明三七叶总皂苷中高剂量组的疗效与氟西汀组没差异。week 3 和 week 4 的结果见图 1。Ye Liang 等也观察到长期慢性应激可导致动物食欲减退，体重下降，服用抗抑郁药物氟西汀可以显著缓解体重的减少[7]。上述结果表明三七叶总皂苷具有与氟西汀相似的抗抑郁作用。

2.2 慢性应激建模及药物对大鼠糖水消耗的影响

建模前（week 0）对大鼠的糖水偏好率进行测定，结果各组间没有显著性差异（P>0.05），可以进行糖水消耗实验。建模给药第 1 周（week 1）和第 2 周（week 2），各建模组大鼠的糖水偏好率有一定的下降，模型组尤其明显，但与空白对照组相比各建模组均没有显著性差异（P>0.05）。第 3 周（week 3）时，各建模组大鼠的糖水偏好进一步下降，与空白组相比，模型组、三七叶总皂苷中高剂量组、氟西汀组分别降低了 19.72%、9.06%、3.85%、2.36%，其中模型组呈现极其显著性差异（P<0.01），表明建模成功。与模型组比较，三七叶总皂苷高剂量组、氟西汀组大鼠糖水偏好率分别明显提高了 19.75%和 21.60%（P<0.05），开始表现出抗抑郁作用。第 4 周（week 4），与空白组比较，模型组大鼠的糖水偏好率明显降低了 22.48%（P<0.05），糖水偏好率持续降低。与模型组比较，三七叶总皂苷中高剂量组、氟西汀组大鼠糖水偏好率分别提高了 17.51%（P>0.05）、26.21%（P<0.05）、28.09%（P<0.05），明显逆转 CUMS 大鼠的快感缺失现象，表现出良好的抗抑郁作用。此外三个给药组比较，没有显著性差异（P>0.05）。week 0~week 2 数据省略，week 3 和 week 4 的结果见图 2。糖水偏好率是反映抑郁模型动物兴趣爱好的重要指标，Li Lufan 等观察到长期慢性应激导致大鼠的糖水消耗量明显减少，而服用抗抑郁药物氟西汀可以有效的反转抑郁动物的快感缺失[8]。上述结果表明高剂量的三七叶总皂苷具有具

有与氟西汀相似的抗抑郁作用。

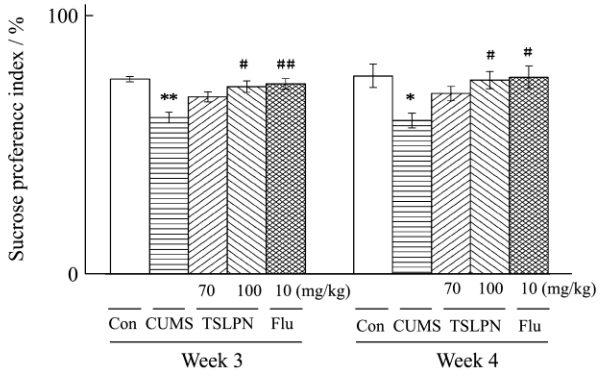


图 2 三七叶总皂苷和氟西汀对慢性应激模型大鼠糖水偏好率的影响

Fig.2 Effects of TSLPN and Flu on sucrose preference index in CUMS rat model

注：Con 为空白组，CUMS 为模型组，TSLPN 为三七叶总皂苷组，Flu 为氟西汀组。*表示与空白对照组相比，*P<0.05，差异显著；**P<0.01，差异极其显著；#表示与模型组相比，#P<0.05，差异显著，##P<0.01，差异极其显著。

2.3 慢性应激建模及药物对大鼠自主活动的影响

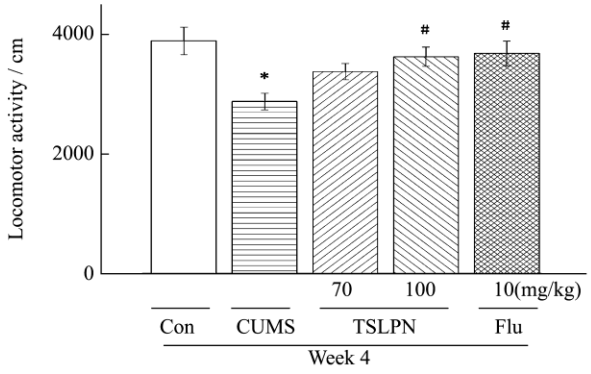


图 3 三七叶总皂苷和氟西汀对慢性应激模型大鼠开场实验活动总路程的影响

Fig.3 Effects of TSLPN and Flu on locomotor activity in CUMS rat model

注：Con 为空白组，CUMS 为模型组，TSLPN 为三七叶总皂苷组，Flu 为氟西汀组。*表示与空白对照组相比，*P*<0.05，差异显著；#表示与模型组相比，#*P*<0.05，差异显著。

在建模给药前（week 0）及建模给药的第 1~3 周（week 1~3），各给药组、模型组与空白组比较，大鼠的自主活动总路程呈现下降趋势，其中以模型组尤为明显，而各给药组与模型组比较，大鼠的自主活动总路程呈现增加趋势，但各给药组、模型组和空白组间均没有显著性差异（P>0.05）。第 4 周（week 4）时，模型组、三七叶总皂苷中高剂量组、氟西汀组大鼠的自主活动水平进一步下降，与空白组比较，分别降低了 26.17%、13.25%、6.83%、5.44%，其中模型组呈现显著性差异（P<0.05），表明建模成功。与模型组比较，三七叶总皂苷中高剂量组、氟西汀组大鼠的自主活动水平持续增加，分别提高了 17.51%、26.21%、28.09%，其中三七叶总皂苷高剂量组及氟西汀组呈现著性差异（P<0.05），表明给药后能明显改善抑郁模型大鼠的自主活动水平。此外三个给药组比较，没有显著性差异（P>0.05）。week 0~week 3 数据省略，week 4 的结果见图 3。长期慢性应激，动物丧失了生活的兴趣，表现为活动减少，活动能力减弱，服用抗抑郁药物氟西汀可以明显的增强抑郁动物的活动能力[8]。上述结果表明高剂量的三七叶总皂苷具有与氟西汀相似的抗抑郁作用。

2.4 药物对慢性应激抑郁大鼠海马体 cAMP、PKA、BDNF 的影响

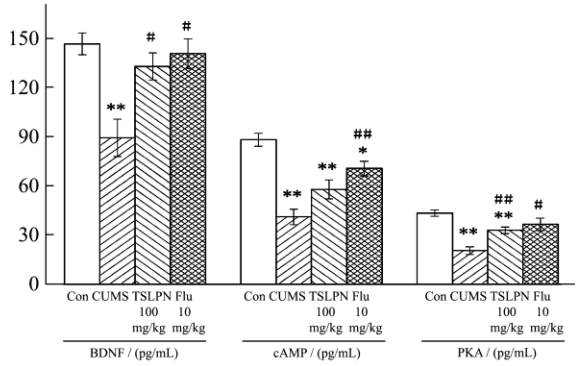


图 4 三七叶总皂苷和氟西汀对慢性应激模型大鼠海马体 BDNF、cAMP、PKA 的影响

Fig.4 Effects of TSLPN and Flu on BDNF, cAMP, and PKA levels in the hippocampus of CUMS rat model

注：Con 为空白组，CUMS 为模型组，TSLPN 为三七叶总皂苷组，Flu 为氟西汀组。*表示与空白对照组相比，P<0.05，差异显著；#表示与模型组相比，#P<0.05，差异显著。

连续四周的刺激建模和给药，对大鼠海马体 cAMP、PKA、BDNF 的影响见图 4。模型组、三七叶总皂苷高剂量组及氟西汀组与空白组比较，大鼠海马体内 BDNF 的水平有所下降，分别降低了 39.20%、9.37%、3.99%，其中模型组呈现出极其显著性差异（P<0.01）。三七叶总皂苷高剂量组、氟西汀组与模型组比较，大鼠海马体内 BDNF 的水平分别明显升高了 49.05%、57.90%（P<0.05）。模型组、三七叶总皂苷高剂量组及氟西汀组与空白组比较，大鼠海马体内 cAMP 的水平明显下降，分别降低了 53.60%（P<0.01）、34.45%（P<0.01）、19.99%（P<0.05）。三七叶总皂苷

高剂量组、氟西汀组与模型组比较，大鼠海马体内cAMP的水平分别升高了41.29%、72.44%，其中氟西汀组呈现出极其显著性差异（P<0.01）。模型组、三七叶总皂苷高剂量组及氟西汀组与空白组比较，大鼠海马体内PKA的水平有所下降，分别降低了53.60%，24.48%、15.92%，其中模型组及三七叶总皂苷高剂量组呈现出极其显著性差异（P<0.01）。三七叶总皂苷高剂量组、氟西汀组与模型组比较，大鼠海马体内PKA的水平分别明显升高了62.79%（P<0.01）、81.22%（P<0.05）。此外，三七叶总皂苷高剂量组大鼠脑内海马体cAMP、PKA、BDNF水平均比氟西汀组偏低，但没有显著性差异。

上述三个生化指标有两个共同特征：一是各建模组与空白组比较，海马体cAMP、PKA、BDNF水平有所降低；二是各给药组与模型组比较，海马体cAMP、PKA、BDNF水平有所升高。表明长期的连续刺激，可以影响大鼠海马体上述指标的水平，导致其降低，表现出抑郁的状态，而药物治疗可以逆转刺激导致的海马体cAMP、PKA、BDNF水平降低的情况，提示三七叶总皂苷及氟西汀可通过调控脑内海马体cAMP、PKA、BDNF水平发挥抗抑郁作用。目前的研究表明抑郁症患者脑区内BDNF表达会有明显的下降，通过药物治疗升高脑内BDNF水平可以有效的缓解抑郁的症状[4]。而BDNF的表达与多个上游神经信号转导通道有密切关联，例如环磷酸腺苷通道（AC/cAMP/PKA）、丝裂原活化蛋白激酶通道（TrKB/MAPK/PSK）、钙调蛋白激酶通道（Ca^{2+}/CaM/CaMK）等[9]。氟西汀作为目前主流的一线抗抑郁药物，它的作用机制的研究比较清晰，其中一条作用机制就是通过调控AC-cAMP-PKA信号转导通道，从而调节脑内BDNF水平，发挥抗抑郁疗效[10]。通过本文的研究发现三七叶总皂苷对脑内cAMP、PKA、BDNF水平也具有类似的调节作用，提示三七叶总皂苷通过cAMP-PKA-BDNF途径发挥抗抑郁作用是其可能的分子作用机制。

3 结论

大鼠持续四周的温和性不可预知刺激后，呈现出体重下降、快感缺失、行动迟缓等抑郁症相似的行为表现，而经过三七叶总皂苷给药治疗能够恢复大鼠的体重，提升大鼠的糖水偏好率，缓解大鼠快感缺失情况，恢复大鼠自主活动水平，表明三七叶总皂苷具有良好的抗抑郁作用。同时通过考察脑内海马体cAMP、PKA、BDNF表达的变化，发现三七叶总皂苷抗抑郁作用可能涉及cAMP-PKA-BDNF分子机制途径。抑郁症是个慢性疾病，需要长期用药，必须要考虑抗抑郁药的长期耐受性和与其他药物相互作用的安全性等问题。主流的抗抑郁西药例如氟西汀、帕罗西汀、西酞普兰等虽然起效快，但是由于其化学结构特征以及作用机制特点，不可避免的产生5-HT综合征、胃肠道反应、性功能障碍、抗利尿激素异常分泌综合征、戒断反应等中枢神经系统药物共有的一些不良反应。三七叶总皂苷作为安神补脑药应用于精神科疾病多年，安全可靠，毒副作用少，至今没有发现不良反应的报道。因此以三七叶总皂苷为原料，开发出疗效显著，低毒，安全的人参皂苷类抗抑郁新药或者保健食品，具有重要的理论研究意义和应用价值。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2010
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China [M]. Beijing: China medical science press, 2010

[2] The WHO World Mental Health Survey Consortium, Prevalence, severity and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys [R]. JAMA, 2004, 291(21): 2581-2590

[3] Xiang Hui, Liu Ying-xue, Zhang Bai-bing, et al. The antidepressant effects and mechanism of action of total saponins from the caudexes and leaves of Panax notoginseng in animal models of depression [J]. Phytomedicine, 2011, 18(8-9): 731-738

[4] Cui Ji-hong, Jiang Ling-xi, Xiang Hui. Ginsenoside Rb3 exerts antidepressant-like effects in several animal models [J]. Journal of Psychopharmacology, 2012, 26(5): 697-713

[5] Hashimoto Kenji. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions [J]. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2010, 64(4): 341-357

[6] Zhou Yu-zhi, Lu Lin-lin, Li Zhong-feng, et al. Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137(1): 236

[7] Ye Liang, Hu Zheng-ping, Du Guang-ying, et al. Antidepressant-like effects of the extract from *Cimicifuga foetida* L. [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 144(3): 683-691

[8] Li Lu-fan, Lu Jie, Li Xiu-min, et al. Antidepressant-like effects of the saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-

muli-tang in a rat unpredictable chronic mild stress model [J]. Fitoterapia, 2012, 83(1): 93-103

[9] Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB [J]. Trends in Neurosciences, 2005, 28(8): 436-445

[10] Mato Susana, Vidal Rebeca, Castro Elena, et al. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-Hydroxytryptamine (1A) receptor-dependent mechanisms [J]. Molecular Pharmacology, 2010, 77(3): 424-434

现代食品科技