

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.010

人参皂苷对 BALB/c 小鼠肠道菌群的影响

刘艳艳 张 凯 关家伟 曹雪姣 吴大畅[△]

(大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044)

摘要 目的:随着人参药用和保健价值的不断发掘,人参皂苷引起人们越来越多的关注,但有关人参皂苷与肠道菌群之间相互作用的研究仍为空白领域,本实验旨在探明人参皂苷对小鼠肠道菌群的影响,以期为人参皂苷的推广应用提供理论基础和实验依据。**方法:**有机溶剂法提取人参皂苷,将正常 BALB/c 小鼠按 2 mg/0.1 kg 人参皂苷进行连续灌胃饲养,分别在灌胃第 10 d 和第 13 d 无菌收集小鼠粪便,提取肠道细菌基因组总 DNA,应用 PCR-DGGE 技术获得肠道菌群分子指纹图谱,进行菌群结构相似性、多样性分析,并将感兴趣的条带进行切胶、测序分析,对获得的序列在 GeneBank 数据库比对。**结果:**灌胃人参皂苷后小鼠肠道菌群结构发生改变,荧光假单胞菌和丁酸梭菌数量明显增加。**结论:**人参皂苷使小鼠肠道的菌群结构和数量发生明显改变,天然的人参皂苷口服很难被直接吸收利用,因此推测人参皂苷可能以肠道菌群作为发挥生物学作用的靶点,进而行使提高健康水平等保健功能。

关键词:人参皂苷;肠道菌群;PCR-DGGE

中图分类号:Q95-3; R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)06-1041-05

The Effects of Ginsenoside on the Intestinal Microbiota of Mice

LIU Yan-yan, ZHANG Kai, GUAN Jia-wei, CAO Xue-jiao, WU Da-chang[△]

(Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning, 116044, China)

ABSTRACT Objective: People pay more attention to ginsenoside with the investigation of medicinal and health value of ginseng, but the interaction between ginsenoside and intestinal microbiota still keep as a blank. This experiment aim to explore the effects of ginsenoside on the intestinal microbiota of mice, so as to provide theoretical and experimental basis for the popularization and application of ginsenosides. **Methods:** The ginsenoside was extracted through the organic solvent extraction process. Then the ginsenoside was given to the normal BALB/c mice at 2 mg/0.1 kg for ten days, fresh feces samples were collected at 10 d, 13 d under aseptic condition, respectively. After extraction of total bacterial genomic DNA from feces, index analyses of diversity, similarity were carried out through DGGE profiling obtained by PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) technique. And the interest bands in DGGE profile were cut off and sequencing analysis, to obtain the sequence alignment in GeneBank database. **Results:** There were great changes in the intestinal microbial community structure after the intervene of ginsenoside. Further DNA sequence analysis indicated that there were a remarkable increase in the number of *Pseudomonas fluorescens* and *Clostridium butyricum*. **Conclusion:** Ginsenoside made the structure and quantities changed in intestinal microbiota of mice, and the natural ginsenosides are difficult directly absorb after oral administration, so ginsenoside may take the intestinal microbiota as the target to act its biological functions, so as to improve the health level and some related health care functions.

Key words: Ginsenoside; Intestinal microbiota; PCR-DGGE

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1041-05

前言

我国最早的药理学著作《神农本草经》中记载:人参具有镇静安定,补气固元,安神益智,延年益寿等诸多功效^[1]。人参也素有“百草之王”的美誉,其生物学活性的发挥多依赖于其主要成份-人参皂苷(Ginsenoside)。黄海英^[2]等报道人参皂苷具有抗肿瘤、抗疲劳、保护心血管和神经系统、免疫系统等多方面功效,且其主要通过调动机体内因,促进激素分泌和改善细胞膜

流动性等机制发挥生物学功效。

在人类肠道中居住着数万亿的细菌,数量是人类细胞数的大约 10 倍。被称之为“微生物群”的这些细菌是机体代谢和健康的关键。有研究表明:人参皂苷口服后很难被肠道直接吸收利用,需要通过肠道菌群来降解^[3]。推测人参皂苷很可能作为一种益生元,通过改善肠道内环境,增加有益菌的数量和比例进而发挥益生作用,促进机体健康。

目前有关人参皂苷对肠道菌群影响的研究没有报道。基于此,本实验从分子微生物学的角度,采用 PCR-DGGE^[4]评价人参皂苷对实验小鼠肠道菌群的影响,填补了其肠道菌群影响方面研究的空白,丰富了人们对人参皂苷生物学功效的认识,为后续人参皂苷作用机制的研究奠定了实验基础,为人参皂苷

作者简介:刘艳艳(1989-),女,本科,主要研究方向:生物技术

[△]通讯作者:吴大畅,电话: 0411-86110351,

E-mail: changdmedu@gmail.com

(收稿日期:2014-06-18 接受日期:2014-07-15)

的推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

东北人参(由吉林省白山市抚松参厂提供);SPF 级、体重(20±2)g 的 BALB/c 雌性小鼠 16 只(大连医科大学实验动物中心提供);DNA 提取所需试剂(蛋白酶 K(Merck, 1245680100)、DNA 提取液、20 %SDS、酚氯仿、异丙醇、70%乙醇等),PCR 引物由大连宝生物公司合成,Ex Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司,去离子甲酰胺、尿素、四甲基乙二胺(TEMED)、溴化乙锭(EB)等购自上海生物化学试剂工程公司,所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

HC-2518R 台式高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司);恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司);隔水式电热恒温培养箱(型号:oskpo,湖北省黄石市医疗器械厂);数显三用恒温水箱(JWFU 杰韦弗);PCR 基因扩增仪(深圳赛泰克生物科技有限公司);Jim-X instrument(大连捷迈科技有限公司);电泳仪器 D-Code™ Universal Mutation Detection System(Bio-Red),离心浓缩仪(Thermo Scientific ISS110),索氏提取器(上海矩源机械设备有限公司)。

1.3 实验方法与步骤

1.3.1 人参皂苷提取 不同溶剂对人参皂苷的提取率存在明显差异,70 %乙醇对人参皂苷的提取率明显高于以水和甲醇为溶剂的提取率^[5]。且乙醇具有提取率高、无毒、易回收等特点,因此,选择乙醇作为提取溶剂。准确称取 30 g 洗净干燥后粉碎的人参,加入六倍体积的 70 %乙醇,索氏回流 2.5 h,合并提取液,离心浓缩,收集人参皂苷粉末,称重,根据郑义等^[6]的研究计算含人参皂苷 22.1 %。

1.3.2 粪便采集 将健康、体重相近的 16 只小鼠随机分成两组,分别为生理盐水(对照组)和人参皂苷(实验)组,按 2 mg/0.1 kg 剂量,每天 12:00 灌服人参皂苷,连续灌服 10 d 后停药,分别在灌胃第 10 d 和 13 d 收取小鼠新鲜无污染的粪便于 Ep 管中,-80℃ 保存、备用。

1.3.3 粪便细菌基因组 DNA 提取 粪便标本的预处理:取 0.3 g 粪便标本加入 1 mL PBS(pH 8.0)混匀 200×g 离心 5 min 收集上清(冰水浴)。沉淀中加入 1 mL PBS 重复上述步骤。混合两次上清,300×g 离心 5 min,弃沉淀。两次上清 10000 rpm 离心 8 min 所得沉淀加入 1 mL PBS 洗涤至上清无色,-20℃ 过夜。按照胡晓红蛋白酶 K 法^[7]提取 DNA 并溶于 15 μL TE,37℃ 孵育 30 min。1 %琼脂糖凝胶电泳检测提取效果。

1.3.4 PCR 扩增 利用通用引物扩增所有细菌 16S rRNA 基因 V3 可变区。参考文献设计引物及 PCR 条件^[8]。PCR 产物以 1 %琼脂糖凝胶检测。

1.3.5 DGGE 检测 按 Mulyzer^[9]等方法,将上述扩增产物进行 DGGE 分析。配制 30 %~50 % 梯度胶,60℃ 电泳 4 h,溴化乙锭染色,于凝胶成像系统检测并拍照,利用 Phoretix 1D (Phoretix, Newcastle upon Tyne, UK)软件分析 PCR-DGGE 胶图谱^[10]。包括条带数目、灰度值以及通过聚类分析显示 DGGE 图谱的相

似性,各条带的聚类分析应用 UPGMA 算法进行分析^[11]。利用香农指数(Shannon-Weaver index, H,)计算条带的多样性^[12]。并采用均匀度 Evenness(E)分析菌群分布的统一性,由于数据不服从正态分布,故利用非参数统计分析 U 检验。H 和 E 通过以下公式获得:

多样性按公式(1)计算

$$H' = -\sum P_i \ln P_i \quad (1)$$

H' 多样性;

P_i 第 i 条条带占该泳道所有条带光密度的比值。

均匀度按公式(2)计算

$$E = H' / \ln S \quad (2)$$

E 均匀度;

H' 多样性;

S 丰富度(条带数)。

1.3.6 DGGE 优势性条带分析 割取 DGGE 图谱上优势条带,加入 50 μL TE,捣碎,-20℃ 保存过夜。90℃ 水浴 10 min,10000×g,5 min 离心。以上清为模板,利用无 GC 引物,再次进行 PCR 反应,条件同上。PCR 产物由 Invitrogen(北京)公司测序。序列拼接后在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 Blast 比对分析。

2 结果

2.1 粪便细菌 DNA 提取结果

1 %琼脂糖电泳后可在紫外灯下看到清晰的条带(图 1),片段大小为 20 kb,亮度较强。上样孔偶有少许亮带,疑为少量蛋白质,影响不大,可进行后续的 PCR 扩增。

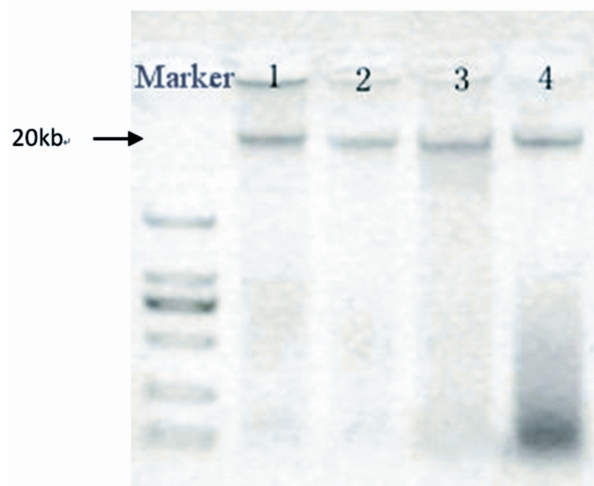


图 1 粪便细菌基因组提取结果

Fig.1 Total DNA extraction of fecal microorganism

Lane1:生理盐水(对照组)灌胃第 10 d;Lane2:人参皂苷(实验组)灌胃第 10 d

Lane3:人参皂苷(实验组)灌胃第 13 d;Lane4:生理盐水(对照组)灌胃第 13 d

Lane1:Negative control group of 10 days;Lane2:Positive experimental group of 10 days

Lane3:Positive experimental group of 13 days;Lane4:Negative control group of 13 days

2.2 PCR 扩增结果

所扩增的特异性片段长度约 200 bp。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下见到相应位置清晰明亮的条带,即为目的条带(图 2)。

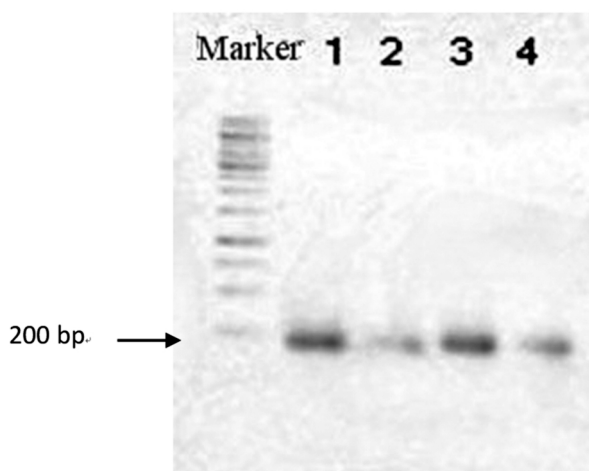


图 2 细菌 V3 区 16S rRNA 基因扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of V3 region of 16S rRNA gene

Lane1: 生理盐水(对照组)灌胃第 10 d; Lane2: 人参皂苷(实验组)灌胃第 10 d

Lane3: 人参皂苷(实验组)灌胃第 13 d; Lane4: 生理盐水(对照组)灌胃第 13 d

Lane1: Negative control group of 10 days; Lane2: Positive experimental group of 10 days

Lane3: Positive experimental group of 13 days; Lane4: Negative control group of 13 days

2.3 DGGE 结果

由 DGGE 图谱可以观察到四条泳道均有亮度不同、数量不等的条带(图 3),进一步的丰富度、多样性和均匀度分析(表 1)结果提示人参皂苷灌胃后改变了肠道菌群结构。

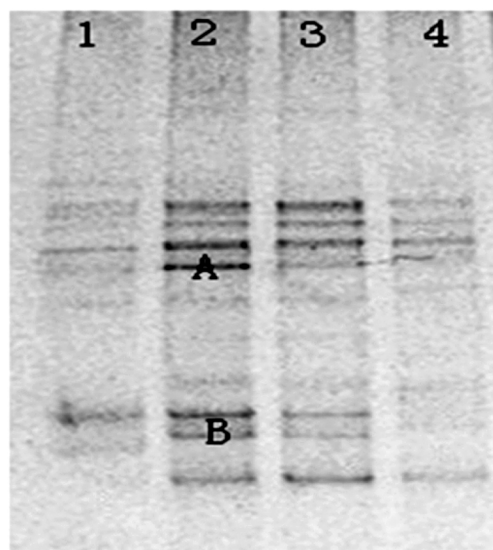


图 3 各实验组 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profiling of different experiment group

Lane1: 生理盐水(对照组)灌胃第 10 d; Lane2: 人参皂苷(实验组)灌胃第 10 d

Lane3: 人参皂苷(实验组)灌胃第 13 d; Lane4: 生理盐水(对照组)灌胃第 13 d

Lane1: Negative control group of 10 days; Lane2: Positive experimental group of 10 days

Lane3: Positive experimental group of 13 days; Lane4: Negative control group of 13 days

表 1 肠道菌群 DGGE 图谱分析结果

Table 1 Microbiota diversity index analysis of each group

组别 Groups	丰富度(S) Number of bands	多样性(H') Shannon-Weaver index (H')	均匀性(E) Evenness(E)
Lane1	8.17± 0.32	1.93± 0.12	0.92± 0.08
Lane2	13.98± 0.26*	2.50± 0.13*	0.94± 0.10
Lane3	10.82± 0.19*	2.20± 0.09*	0.92± 0.07
Lane4	8.15± 0.15	1.98± 0.15	0.94± 0.09

注:* 与对照组比较 $P<0.05$ 。

Note: *Compared with the control group $P<0.05$.

Lane1: 生理盐水(对照组)灌胃第 10 d; Lane2: 人参皂苷(实验组)灌胃第 10 d

Lane3: 人参皂苷(实验组)灌胃第 13 d; Lane4: 生理盐水(对照组)灌胃第 13 d

Lane1: Negative control group of 10 days; Lane2: Positive experimental group of 10 days

Lane3: Positive experimental group of 13 days; Lane4: Negative control group of 13 days

聚类分析结果(图 4)主要分为两簇。Lane1 和 Lane4 细菌 DGGE 图谱相似性达 76%, 并聚成一簇, 说明同为对照组灌胃时间的延长对小鼠肠道内的菌群影响不大。Lane2 与 Lane3 的相似性为 91%, 说明实验组进行人参皂苷灌胃, 改变了肠道菌群结构, 二者呈现高度一致性, 且人参皂苷的调节作用有一定

的延续性, 在停药后仍能发挥一定作用, 但随着时间的推移药效减弱。

2.4 DGGE 优势性条带分析结果

从 DGGE 图谱中可以看出: 灌胃 10 d 的 Lane2 条带与对照组的 Lane1 相比 A、B 两处的条带存在明显的差异性, 将 A、

B 进行切胶测序后结果如下(表 2)。

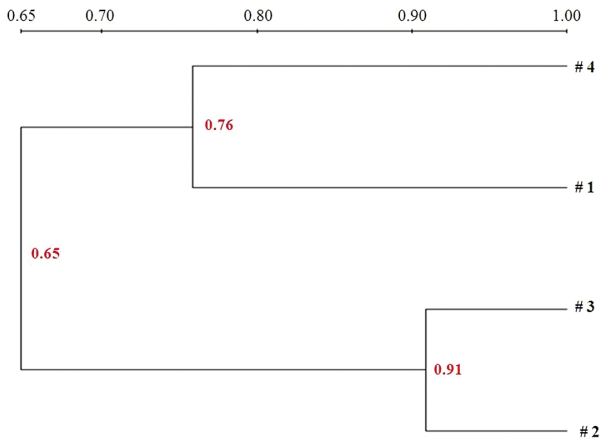


图 4 各组小鼠肠道菌群 UPGMA 相似性聚类分析

Fig. 4 Dendrogram of DGGE profiles analyzed by UPGMA method

#1:生理盐水(对照组)灌胃第 10 d;#2:人参皂苷(实验组)灌胃第 10 d
#3:人参皂苷(实验组)灌胃第 13 d;#4:生理盐水(对照组)灌胃第 13 d
#1:Negative control group of 10 days;#2:Positive experimental group of 10 days
#3:Positive experimental group of 13 days;#4:Negative control group of 13 days

表 2 DGGE 优势条带对应的细菌 16S rDNA V3 区测序结果

Table 2 Identification by sequence of V3 fragments excised from DGGE dominant bands of total microbial community

Selected band	比对结果 Blast result	门 Bacteria Phylum	属 Bacteria Genus	相似性 Similarity
A	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 荧光假单胞菌	Proteobacteria	Pseudomonas	95%
B	<i>Clostridium butyricum</i> 丁酸梭菌	Firmicutes	Clostridium	97%

图谱中条带相似性和差异性分析发现荧光假单胞菌和丁酸梭菌数量明显增加。

荧光假单胞菌是一种生物防治菌,大量研究发现,它可以通过产生抗生素等生物活性物质来抑制病原菌的生长^[16]。丁酸梭菌又名酪酸菌,是厌氧革兰氏阳性芽孢杆菌,具有整肠作用,可与肠道中的致病菌发生拮抗作用^[17,18]。朱晓慧等^[19]研究发现丁酸梭菌可以产生淀粉酶促进肠道中益生菌如乳酸杆菌和双歧杆菌的生长。由此推测:人参皂苷可通过上调肠道荧光假单胞菌和丁酸梭菌的数量,进而促进优势菌的增殖,抑制肠道病原菌的定植生长,从而提高小鼠的健康水平。

本实验以小鼠肠道作为研究对象,用人参皂苷对小鼠进行灌胃饲养,通过 PCR-DGGE、DNA 测序技术分析小鼠肠道内的菌群结构变化以此评价人参皂苷的作用及靶向菌属。为人参皂苷的进一步开发应用提供了实验基础和理论依据。

参考文献(References)

[1] 陈德兴,张玉萍,徐丽莉,等.神农本草经[M].福建:福建科学技术出版社,2012,6:13
Chen De-xing, Zhang Yu-ping, Xu Li-li, et al. Shen nong Ben Cao Jing[M]. Fu Jian: Fujian Science and Technology Press, 2012, 6: 13
[2] 黄海英.人参皂苷 Rgl 药理作用研究进展 [J]. 实用中医药杂志,

3 讨论

肠道正常菌群可增强机体免疫功能,排斥、阻止外来致病菌,提供维生素等,对维持健康发挥重要作用。正常情况下,菌群内部微生物间相互制约,实现菌群平衡^[13]。如果肠道菌群失衡就会扰乱正常生理功能,从而导致疾病的发生。益生元是一类很难被肠道直接消化吸收而被肠道菌群分解吸收的物质,它可以作为肠道菌群的"食物",促进益生菌的生长繁殖。益生菌一方面通过拮抗作用抑制致病菌,另一方面对失衡的菌群进行纠正^[14]。人参皂苷能够刺激机体免疫系统增强免疫力^[15],具有益生元的潜在特性。本实验研究结果表明,人参皂苷能够显著改变小鼠肠道菌群的结构和数量,推测人参皂苷可能以肠道菌群作为发挥生物学作用的靶点,以此发挥提高免疫力等生物学功效。

本实验根据 DGGE 能分离长度相同而序列不同的 DNA 的原理,每一个条带与小鼠肠道菌群中的优势菌群大致相对应,条带越多说明菌群多样性越丰富,染色后条带的强度强则说明该细菌的数量多,从而反映小鼠肠道菌群的种类和数量的变化,针对进行人参皂苷灌胃饲养后小鼠肠道菌群条带的相似性和差异性,研究其对 BALB/c 小鼠肠道菌群的影响。DGGE

2012, 28(7): 608-609

Hang Hai-ying. Research Progress on Pharmacological Effects of Ginsenoside Rgl [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Medicine, 2012, 28(7): 608-609

[3] 杜彩贺,周东蕊,肖飞,等.肠道菌群结构多样性初筛研究 [J]. 南京晓庄学院学报, 2010, 26(3): 67-70

Du Cai-he, Zhou Dong-rui, Xiao Fei, et al. Screening of Intestinal Microflora Diversity [J]. Journal of Nanjing Xiaozhuang University, 2010, 26(3): 67-70

[4] 况炜,唐欢,袁静,等. PCR-DGGE 技术评价抗生素诱导的肠道菌群失调[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(5): 425-427

Kuang Wei, Tang Huan, Yuan Jing, et al. Assessment of antibiotic induced intestinal flora imbalance by PCR-DGGE[J]. Chinese Journal of Microecology, 2008, 20(5): 425-427

[5] 刘继菊. 人参总皂苷提取工艺条件优化研究[J]. 中国医药现代远程教育, 2010, 8(14): 200-201

Liu Ji-ju. Optimization of the Extraction Process of Saponins from Panax ginseng [J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2010, 8(14): 200-201

[6] 郑义,陆辉. 人参总皂苷提取工艺的优化研究 [J]. 金陵科技学院学报, 2008, 24(2): 89-91

- Zheng Yi, Lu hui. Optimization of the Extraction Process of Saponins from *Panax ginseng* [J]. Journal of Jinling Institute of Technology, 2008, 24(2): 89-91
- [7] 胡晓红, 彭惠民, 刘昕, 等. PCR 及 Real-time PCR 评价细菌 DNA 提取方法[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2): 155-158
- Hu Xiao-hong, Peng hui-ming, Liu Xin, et al. Methods Of DNA extraction from bacteria for PCR and Real-time PCR [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2008, 33(2): 155-158
- [8] Wu XK, Ma CF, Han L, et al. Molecule Characterization of the faecal microbiota in patients with type II diabetes [J]. Curr Microbiol, 2010, 61(1): 69-78
- [9] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700
- [10] Gavin PG, Victoria SL, Graham JR, et al. Statistical Analyses of Complex Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 3971-3978
- [11] Fromin N, Hamelin J, Tarnawski, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns [J]. Environ Microbiol, 2002, 4(11): 634-643
- [12] Silva EP, Russo CAM. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics [J]. Hydrobiologia, 2000, 420 (1): 119-135
- [13] 周德庆. 微生物学教程(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011: 248-249
- Zhou De-qing. Essential Microbiology (Third edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2011: 248-249
- [14] 张峻, 罗燕, 朱尤庆. 应用 16S rRNA 实验性结肠 PCR 技术评价益生菌 VSL#3 对肠炎大鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 武汉大学学报, 2010, 31(6): 754-770
- Zhang Jun, Luo Yan, Zhu You-qing. Application of 16S rRNA-Based Polymerase Chain Reaction in the Evaluation of the Probiotics Treatment (VSL#3) on TNBS-Induced Colitis Through Modulation of Gut Flora in Rats [J]. Medical Journal of Wuhan University, 2010, 31 (6): 754-770
- [15] 李丽艳, 路新国. 人参皂甙的最新研究进展[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2004, 23(4): 293-295
- Li Li-yan, Lu Xin-guo. Latest research progress of ginseng saponins [J]. Journal of Sichuan Continuing Education College of MS, 2004, 23(4): 293-295
- [16] 雷阳, 曾延松, 汪琳. 荧光假单胞菌的生物防治机理 [J]. 贵州农业科学, 2002, 30(5): 46-47
- Lei Yang, Zeng Yan-song, Wang Lin. Biological Control Mechanism of *Pseudomonas fluorescent* [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2002, 30(5): 46-47
- [17] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 酪酸菌对动物肠道致病菌体外拮抗作用的研究[J]. 生物技术, 2005, 15(1): 37-39
- Tang Bao-ying, Zhu Xiao-hui, Liu Jia. Studies on the Antagonism of *Clostridium butyricum* RH2 Strain against Three Animal Enteropathogens in Vitro [J]. Biotechnology, 2005, 15(1): 37-39
- [18] Takahashi M., Taguchi H., Yamaguchi H., et al. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2004, 41 (3): 219-226
- [19] 朱晓慧, 唐宝英, 刘佳. 酪酸菌对肠道有益菌的增殖作用和共生关系研究[J]. 中国微生态杂志, 2004, 16(4): 193-196
- Zhu Xiao-hui, Tang Bao-ying, Liu Jia. Study on proliferation effect of *Clostridium butyrium* on intestinal available bacteria and symbiotic relation between them [J]. Chinese Journal of Microecology, 2004, 16 (4): 193-196

(上接第 1197 页)

- [14] Krzystanek M, Pałasz A, Krzystanek E, et al. S-adenosyl L-methionine in CNS diseases [J]. Psychiatr Pol, 2011, 45(6): 923-931
- [15] Mischoulon D, Alpert JE, Arning E, et al. Bioavailability of S-adenosyl methionine and impact on response in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in major depressive disorder [J]. J Clin Psychiatry, 2012, 73(6): 843-848
- [16] Yechiel Levkovitz, Jonathan E Alpert, Carrie E. Brintz Yechiel Levkovitz, et al. Brintz Effects of S-adenosylmethionine augmentation of serotonin-reuptake inhibitor antidepressants on cognitive symptoms of major depressive disorder [J]. Journal of Affective Disorders, 2012, 136(3): 1174-1178
- [17] Nahas R, Sheikh O. Complementary and alternative medicine for the treatment of major depressive disorder [J]. Can Fam Physician, 2011, 57(6): 659-663
- [18] Caruso I, Pietrogrande V. Italian double-blind multicenter study comparing S-adenosylmethionine, naproxen, and placebo in the treatment of degenerative joint disease [J]. Am J Med, 1987, 83(5A): 66-71
- [19] Delle Chiaie R, Pancheri P, Scapicchio P. Efficacy and tolerability of oral and intramuscular S-adenosyl-L-methionine 1,4-butanedisulfonate (S-AMe) in the treatment of major depression: comparison with imipramine in 2 multicenter studies [J]. Am J Clin Nutr, 2002, 76(5): 1172S-1176S
- [20] Papakostas GI. Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder [J]. J Clin Psychiatry, 2009, 70(Suppl 5): 18-22
- [21] Chitiva H, Audivert F, Alvarez C. Suicide attempt by self-burning associated with ingestion of S-adenosylmethionine: a review of the literature and case report [J]. J Nerv Ment Dis, 2012, 200(1): 99-101
- [22] 刘平, 顾牛范, 翁史旻, 等. S-腺苷蛋氨酸治疗抑郁症 [J]. 中国心理卫生杂志, 1998, 12 (2): 94
- Liu Ping, Gu Niu-fan, Weng Shi-yan, et al. Ademetionine in the Treatment of Depressive Disorders [J]. Chinese Mental Health Journal, 1998, 12(2): 94