

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.052

人参总皂甙应用及改善细胞冻存的研究进展

张晓川 侯利民[△] 刘明辉

(哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:人参作为一种名贵的药材,具有多方面的作用,近年来关于人参的成分之一人参总皂甙的研究也越来越多。大量实验研究表明,人参总皂甙对改善细胞冻存方面也有很大的作用。组织细胞经深低温冷冻技术处理后其活性能获得有效的保存,在液氮(-196℃)温度下,细胞、组织内各种酶的活力及代谢很低,几乎为零,生命处于所谓的“停滞”状态,在该状态下细胞的活性能得到最大限度的保存。目前常用的冷冻剂有海藻糖、丙二醇、丙三醇以及二甲基亚砜等。但这些冷冻剂均属于化学药剂,在一定程度上会对纤维细胞造成损伤,从而影响细胞的活性。人参总皂甙是从人参中提取出来的有效成分,其具有增强人体表面细胞活性,延缓细胞衰老的作用,为此本文将对人参总皂甙用于细胞冻存的效果进行综述,旨在为细胞的冻存技术提供参考依据。

关键词:人参总皂甙;临床应用;冻存细胞

中图分类号:S567.52;R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6993-03

Clinical Application and Cell Cryopreservation Improvement of Ginsenosides

ZHANG Xiao-chuan, HOU Li-min[△], LIU Ming-hui

(First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT: Ginsenoside, as a precious Chinese herb, has a variety of functions, recently more and more researches have been done on it, many of which have showed ginsenoside has a power on cell cryopreservation. Tissue cells after deep cryogenic technology processing activity can get effective preservation, at the temperature of liquid nitrogen (-196℃), the activity in the organization and metabolism of cells and enzyme is very low, almost zero, and it is the so-called "dead" state, and the maximum of the preservation of the activity of cells can be obtained in this state. Currently used refrigerant is trehalose, propylene glycol, glycerin, dimethyl sulfoxide and so on. However, these refrigerants are chemicals, it can do some damages to the cells in a certain extent, which affects the activity of the cells. Ginsenosides are the active ingredients extracted from ginseng which can enhance the body surface cell activity and slow cell senescence. This overview article will provide a reference for the cell cryopreservation technology.

Key words: Ginsenoside; Clinical application; Cell cryopreservation

Chinese Library Classification(CLC): S567.52; R285 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6993-03

前言

人参作为我国一种名贵的药材,而它其中的主要成分人参总皂甙也有很多的药理作用,而人参总皂甙的亚型有很多并且具有复杂的药理作用^[1]。近年来国内外关于人参总皂甙的研究也越来越多,人参的药理作用主要表现在其对中枢神经系统、免疫系统、心血管系统及内分泌系统的影响及调节^[2-5]。然而,迄今为止人参的研究很大程度上是停留在动物阶段,在临床上的应用还有很大的提升空间,目前,关于人参总皂甙的单一研究已经日臻成熟,在其成分和有关剂量上的配伍的研究并没有很充分,需要进一步加强。此外,人参总皂甙在抗氧化作用、抗应激作用及降血糖作用等方面的研究也会慢慢的得到足够的重视。

1 人参总皂甙的作用

作者简介:张晓川(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:低温冻存技术,电话:15945066448, E-mail: zhang_xiaochuan@126.com

△通讯作者:侯利民(1969-),男,教授, E-mail: houlimin1969@163.com

(收稿日期:2014-05-14 接受日期:2014-06-12)

人参总皂甙(ginsenosides)作为人参的主要活性成分,有很多的亚型及活性。不同的活性人参皂甙有不同的药理作用,而到目前为止人参总皂甙具体的药理作用仍没有得到明确的阐释。因为人参总皂甙当中不同的成分会起到不同的作用。而且同一种成分对不同的组织也有不同的作用,从而增加了人参总皂甙药理作用的复杂性,大部分研究主要集中在人参对中枢神经系统、免疫系统、心血管系统及内分泌系统的作用,人参的药理学作用研究又有了突破性进展,下面介绍一下人参总皂甙主要作用。

1.1 对神经中枢的作用

人参总皂甙对神经系统(CNS)的调节表现为刺激和抑制二重作用,调节神经传递。其中人参皂甙 Rb1 和 Rg1 对神经系统起到了主要作用。曾有学者对大鼠腹腔注射人参总皂甙后发现大鼠脑干及皮脂中的谷氨酸含量、天门冬氨酸含量显著下降,而大脑皮质 γ -氨基丁酸(GABA)显著增高^[6]。也有学者曾对家兔注射人参总皂甙,发现家兔脑部中的 Ca^{2+} -ATPase 的活力受到抑制,从而说明人参总皂甙对大脑的作用主要是通过抑制 ATP 酶的生成而起到改善大脑功能的作用的。人参活性成分对中枢神经系统的调节,主要是使大脑处于兴奋和抑制的一种中

间状态,提高脑力和工作效率,并有减轻人体疲劳的作用。

1.2 对心血管疾病的作用

近年来,有关人参皂苷对心血管系统作用的报道较多,而且都有很大的进展,实验表明人参皂苷具有抑制血管细胞凋亡、心肌肥厚和舒张血管等作用。研究表明,给大鼠注射异丙肾上腺素建立心肌梗死模型后再往大鼠胃部灌注人参中不同部位提取出来的皂甙,研究发现各部位的皂甙均能改善大鼠心肌功能,通过心电图可看到大鼠心脏 T 波正常,从而说明人参总皂甙能保护心肌,减少心肌的损害^[7]。通过破坏大鼠脊髓实验中可发现,给脊髓受损的大鼠注射人参总皂甙后能减少交感神经递质释放,从而起到降压的效果^[8]。

1.3 对内分泌系统的作用

相关研究表明,人参茎叶皂能改善胆固醇过高的大鼠中血脂水平,且其将低血浆中胆固醇的过程是选择性的,其不会明显降低高胆固醇血脂大鼠中的 VLVL-C、LDL-D 以及 T-C 的水平,但能有效地降低 T-C/HDL-C、T-C-HDL/HDL-C 和 LDL-C/HDL-C 等水平,因此通过研究可说明,人参茎叶皂苷降血脂的过程是通过提高 HDL-C 而起作用的。同时研究还发现,对于各项指标正常的大鼠,人参茎叶皂苷并不会降低正常血胆固醇的水平,因此其调整胆固醇的过程是安全、有效的^[9]。人参对内分泌系统的作用研究不是很成熟,但有的研究表明人参总皂甙对糖皮质激素有一定的影响。人参总皂甙的代谢产物能够通过乙酰胆碱受体的作用,降低肾上腺嗜铬细胞分泌儿茶酚胺类激素的水平。此外,也有研究表明人参总皂甙能够提高血浆促肾上腺皮质激素水平,进而起到增强体质、延缓衰老和抗疲劳等功效。总之,人参总皂甙对内分泌系统的作用在体内研究较少,需要进一步实验研究进行阐释。

1.4 抗衰老作用

分别对老年大鼠及中年大鼠应用人参茎叶提取出来的皂苷进行治疗,研究可发现不同年龄组的大鼠其血清丙二醛值将随年龄的增高而升高,而在青年及老年的小鼠中存在上述状况。通过对不同年龄组大鼠注射人参茎叶总皂苷后可发现小鼠血清及肝脏中的丙二醛含量显著下降,从而说明人参茎叶皂苷能有效抑制中老年小鼠过氧化反应,从而阻断大鼠自由基生成,有利于延缓机体衰老^[10]。

1.5 抗氧化作用

相关研究表明,对小鼠注射人参根皂苷后能降低小鼠低压缺氧的环境,从而有利于延长小鼠的存活时间,在急性低氧低压的环境下,动脉皮层脑电图将受到影响且其存活率显著下降,通过对小鼠注射人参根皂苷后能发现大鼠皮层脑电图及存活率显著改善,从而说明人参根皂苷能增加机体的耐氧能力,提高机体生存率^[11]。

2 细胞冻存的进展

Polianskai 等曾对毛冠鹿皮肤纤维细胞进行冷冻保存,经冷冻处理后细胞活力显著下降,同时 DNA 的合成及复制也随之减少,冷冻存储 14 天后这些指标恢复正常。其研究指出当细胞长时间在液氮中保存时,细胞染色体容易出现断裂,导致染色体畸变频率增加。Kearner JN 等研究指出,对细胞复温及冷冻时,采用慢速降温法能有效降低复温对细胞组织活性的影

响。近年国外相关研究表明^[12-14],对人体皮肤纤维细胞的纵多的保存方式中,通过对冷冻细胞进行台盼蓝拒染实验,可发现细胞集落形成率、生长率、组织酶学以及组织病理学等指标均有所改变。同时可检测到当细胞处在 -4℃ 时,组织细胞活性将无可避免地下降,同时角质化细胞、纤维细胞的活性也随之下降。我国近年研究表明,细胞经 6%的丙二醇加 20%二甲基亚砷浸泡 30 min 后迅速将其放入到液氮中冻存,能保存 70%左右的活性。在电子显微镜下可发现细胞表皮层、真皮血管、毛囊上皮细胞以及汗腺等均正常,同时细胞生物膜完整、清晰,细胞结构正常。当细胞在 -196℃ 下保存 48h 后经检查细胞结构仍能保持良好,并且细胞中 Dsg2、LN、FN 的含量没有发生较大的变化,而当细胞在 4℃、-20℃、-80℃ 等条件下保持时可发现皮肤纤维组织细胞出现较大的改变,当温度越高时,细胞的损伤程度越明显,同时细胞中 Dsg2、LN、FN 的含量也显著下降^[15,16]。

冷冻技术在低温保存显示了重要的应用前景和临床需求,组织和活体器官的低温保存成为当今生物医学工程研究的最前沿课题之一。其研究成果必将促进器官移植和临床医学的发展。红细胞、角膜、胚胎、珍稀动物精子和植物优良品种的低温保存研究成果已在人体细胞和组织的保存、移植、珍稀动物精子和植物良种库建设等方面取得了良好的效果。影响冷冻过程细胞活性的主要因素是细胞冷冻和解冻过程中细胞内形成冰和细胞脱水即所谓冷冻过程细胞损伤的“两因素假说”另外。上述两因素也对细胞恢复有很大的影响。溶质损伤效应是由于水的冻结使细胞间隙内的液体逐渐浓缩,从而显著增加电解质的浓度,某一温度其损失最明显。这一温度范围在水的冰点和该溶液的完全固化温度之间,若能以较高的冷却速率越过这一温度范围,就能大大减弱溶质损伤效应所产生的不良后果。

3 人参总皂甙改善玻璃化液冻存细胞的机制。

细胞凋亡的过程是一个复杂的过程,细胞因子、激素及细胞间质是调控细胞凋亡的关键。凋亡有两条通路,其一是 TNF- α 诱导细胞凋亡,为 Caspase 的非依赖线粒体途径,可以通过 Fas/FasL 介导的信号通路而诱导细胞凋亡,其二是过氧化氢释放的氧自由基可直接损害线粒体,能引起线粒体细胞色素 C 释放,作为凋亡诱导因子,是线粒体介导细胞凋亡的信号途径。

3.1 人参总皂甙对细胞凋亡基因 bcl-2 和 bax 表达的影响

Bcl-2 是一种内源性抑制物,它的功能是防止细胞凋亡而 bax 基因相反可以促进细胞凋亡^[17]线粒体中 Bcl-2 表达最多而 bax 与 Bcl-2 有一定的同源性其过量表达可以抑制 Bcl-2 从而减弱其抑制凋亡的作用。如果细胞因物理或者化学原因线粒体受到损害,导致其线粒体膜的结构遭到破坏,从而其内的钙离子级某些凋亡代表酶激活因子外逸可以使细胞死亡^[18],而人参总皂甙的作用是产生能量,稳定膜电位防止线粒体肿胀,从而使膜通道开放减少,组织细胞内物质外流,减少细胞凋亡,人参总皂甙还可以提高细胞对缺氧的耐受力并清除自由基的作用,减少凋亡基因的激活,使 Bcl-2 高表达^[19],而 Bcl-2 的高表达是则形成 Bcl-2 / bax 异二聚体,抑制细胞凋亡,从而说明人参总皂甙通过细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 的高表达相对抑制促进基因 bax 的表达,从而减少细胞凋亡,保护细胞功能。

3.2 人参总皂甙对氧自由基的影响

研究表明:一定浓度的氧自由基可以诱导细胞凋亡。而经有关实验表明人参总皂甙可以直接清除损害细胞的氧自由基并且在一定程度上作为一种抗氧化剂,起到抑制凋亡的作用^[20]。另外人参总皂甙还可以提高氧化酶在细胞中的活性,启动细胞本身的抗自由基系统从而消除自由基。有研究表明人参总皂甙既有钙通道的阻滞作用又有抗自由基的作用,是细胞钙通道的开放时间缩短,延长关闭时间,减少开放概率,抑制细胞凋亡^[21]。

3.3 人参总皂甙对炎症因子在细胞中表达的影响

炎症因子在正常的组织细胞中表达叫少,但是一旦细胞遭到创伤,缺血缺氧等条件时,就会产生大量的炎症细胞因子,导致细胞水肿。实验表明,人参总皂甙可以有效的降低促炎细胞因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的表达^[22]。而使细胞因子 IL-10 表达升高, IL-10 能够使 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的表达下降^[23]。人参总皂甙可以有效地使炎症反应减轻,减少细胞水肿,保护细胞,抑制凋亡。

三七能调控多种细胞凋亡,并且对正常组织细胞的毒性较低。其调控细胞凋亡的机制是多环节、多途径的如上,如上调 Bcl-2 表达下调 Bax 表达,组织 caspase 连锁活化,调控 Fas/FasL 的表达等而且是多环节多途径相互作用,但其最根本的机制是什么,尚有待进一步研究。

4 小结和展望

人参总皂甙作为一种重要中药已经证明其在临床以及改善细胞冻存方面的巨大作用,而其也越来越受到重视,人参可以对人体多种系统进行影响及调节。然而,目前关于人参的研究还停留在比较初级的阶段,还有很多未知的药理作用需要得到阐释,目前,对于人参总皂甙的单一亚型的研究比较多,但是作为中药其亚型之多并且亚型之间的可能会相互影响,这方面的研究还比较少,需要进一步加强。

参 考 文 献(References)

- [1] Isachenko V, Montag M, Isachenko E, et al. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as acryoprotectant[J]. Fertil Steril, 2006, 85: 741-747
- [2] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C [J]. Science, 1972, 178: 411-414
- [3] Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing [J]. Life Sciences, 1972, 11: 1071-1079
- [4] Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, et al. Deep freezing of sheep embryos [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1976, 46: 151-154
- [5] Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA. The viability of deep-frozen cow embryos [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1978, 52: 391-393
- [6] Grossman KJ, Goss CW, Stein DG. Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat [J]. Brain Res, 2004, 1008(1): 29-31
- [7] Post M J, Simons M. The rational phase of therapeutic angiogenesis[J]. Minerva Cardioangiol, 2003, 51(5): 421-432
- [8] Yu P, Passam F H, Yu D M, et al. Beta2-glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(7): 1215-1223
- [9] Yu P, Passam F H, Yu D M, et al. Beta2-glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induced angiogenesis through its amino terminal domain [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(7): 1215-1228
- [10] Paczkowska E, Kawa M, Klos P, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH)-a promising new candidate for use in preclinical and clinical selection of pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELSCs) of high long-term repopulating hematopoietic potential [J]. Ann Transplant, 2011, 16(3): 59-71
- [11] Folkersma H, Breve JJ, Tilders FJ, et al. Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1 β and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats [J]. Acta Neurochir, 2008, 150(12): 1277-1279
- [12] Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells [J]. Experimental Cell Research, 1972, 71: 345-355
- [13] Quinn PJ. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes [J]. Cryobiology, 1985, 22: 128-146
- [14] Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, et al. Do physical forces contribute to cryodamage [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 104: 719-728
- [15] Zieger MA, Tredget EE, McGann LE. Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection in split-thickness skin [J]. Cryobiology, 1996, 33(3): 376-389
- [16] Leunig M, Yuan F, Bek DA, et al. Heating or freezing bone: Effect on angiogenesis induction and growth potential in mice [J]. Acta Orthop Scand, 1996, 67(4): 383-388
- [17] Reed JC, Miyashita T, Takayama S, et al. bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy [J]. Cell Biochem, 1996, 60: 23-32
- [18] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis [J]. Immunology Today, 1997, 18: 45-51
- [19] Fang Yun-xiang, Shen Nai, Chen Xiu. Beneficial changes in PFI2 and TXA2 by ginsenoside in experimental myocardial infarction. [J]. China Journal of Pharmacology, 1986, 7: 226-227
- [20] Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1464): 2255-2258
- [21] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [22] Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury [J]. Exp Neurol, 1998, 153(1): 143-145
- [23] Folkersma H, Breve JJ, Tilders FJ, et al. Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1 β and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats [J]. Acta Neurochir, 2008, 150(12): 1277-1279