

工业三七药渣中三七素的提取纯化及其止血药理活性研究

李 双¹, 杨晓涵², 李怀宇³, 陈丽玲⁴, 刘艳红¹, 王华晶¹, 秦华炎¹, 陈 彤^{1*}

¹昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500; ²四川省凉山州中西医结合医院, 凉山 615000; ³大理护理职业学院, 大理 671006; ⁴昆明医科大学临床技能中心, 昆明 650500

摘要:为考察工业三七药渣中是否含有三七素, 探究提取、分离纯化三七素的方法, 并考察三七素的止血药理活性。实验以提取过三七总皂苷的工业三七药渣为原料, 采用水提醇沉法, 过滤沉淀得滤液, 回收滤液中的乙醇得粗提液, 粗提液经 001 × 7 阳离子树脂柱分离, 薄层鉴别法检测洗脱液中是否含有三七素, 收集与三七素对照品显相同斑点的洗脱液, 经丙酮结晶, 冷冻干燥得三七素供试品; 高效液相色谱法测定三七素供试品中三七素的含量; 玻片法测定三七素供试品的凝血时间。建立的高效液相色谱法测定三七素含量, 该方法准确度、精密度、稳定性均良好, 三七素供试品中三七素含量为 59.03%; 小鼠腹腔注射不同剂量的三七素供试品与阳性组比较, 均能显著缩短凝血时间。建立的高效液相色谱法可用于三七素供试品含量的测定; 三七素供试品能显著缩短凝血时间; 三七素供试品中三七素含量反推到工业三七药渣中含量为 0.72%; 采用价格低廉的 001 × 7 阳离子交换树脂柱分离纯化三七素, 此方法简单易行, 成本低廉, 适合大工业生产。综上, 从工业三七药渣中提取纯化三七素具有良好的综合利用前景。

关键词:三七; 三七素; 001 × 7 阳离子树脂; HPLC; 玻片法

中图分类号: R284.2; R965

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)4-0663-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.4.017

Extraction and purification of dencichine from the industrial *Panax notoginseng* dregs and its hemostatic pharmacological activity

LI Shuang¹, YANG Xiao-han², LI Huai-yu³,
CHEN Li-ling⁴, LIU Yan-hong¹, WANG Hua-jing¹, QIN Hua-yan¹, CHEN Tong^{1*}

¹School of Pharmaceutical Science and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

²Liangshan state hospital for the integration of Chinese and western medicine, Liangshan 615000, China;

³Dali Nursing Vocational College, Dali 671006, China; ⁴Clinical skills center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: The purpose of this experiment was to investigate whether or not the industrial medicinal residue of *Panax notoginseng* contains dencichine, how to extract, isolate and purify the dencichine, and to investigate the hemostatic pharmacological activity of the dencichine. The industrial *Panax notoginseng* medicinal residue from which the total saponins of *Panax notoginseng* has been extracted is used as a raw material, using water extraction and alcohol precipitation method, filtering the precipitate to obtain a filtrate, the ethanol solution in the filtrate is recovered to obtain a crude extract, and the crude extract is separated by a 001 × 7 cationic resin column, the thin layer identification method was used to detect whether the eluate contained dencichine, and the eluate with the same spots as the reference substance of the dencichine was collected, crystallized by acetone, and lyophilized to obtain the sample of the dencichine. Determination of the content of dencichine in the samples of dencichine by high performance liquid chromatography and the clotting time of the samples of dencichine by slide method. The HPLC method was established for the determination of notoginseng content. The accuracy, precision and stability of the method were good. The content of dencichine in the samples of dencichine was 59.03%. The intraperitoneal injection of different doses of dencichine in the mice compared with the positive group can significantly shorten the clotting time. The established high performance liquid chromatography method can be used to determine the content of the test sample of dencichine; the test

收稿日期: 2018-09-29 接受日期: 2019-02-22

基金项目: 国家自然科学基金(8176140266); 云南省教育厅科学研究基金(2018JS708); 昆明医科大学 2018 年研究生创新基金(2018S076)

* 通信作者 Tel: 86-013888610422; Email: chentongdoc@163.com

sample of dencichine can significantly shorten the clotting time. The content of dencichine in the sample of dencichine was reversed to 0.72% in the industrial *Panax notoginseng* medicinal residue. The low-cost 001 × 7 cation exchange resin column was used to separate and purify the notoginseng. This method is simple and easy, and the cost is low. Suitable for large industrial production. In summary, the extraction and purification of dencichine from industrial *Panax notoginseng* medical residue has a good comprehensive utilization prospect.

Key words: *Panax notoginseng*; dencichine; 001 × 7 cation exchange resin; HPLC; slide method

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属植物, 是我国珍贵的中药材^[1]。道地产地是云南文山。三七的有效成分包括皂苷、三七素、黄酮、聚炔醇、多糖、脂肪酸以及环肽类等^[2]。但目前对三七有效成分的研究利用主要集中在皂苷成分^[3,4]。每年用于提取三七总皂苷的三七约为 1400 吨, 三七总皂苷的工业提取工艺: 取三七碎成粗粉, 用 70% 的乙醇提取, 滤过^[1]。三七总皂苷提取后, 目前大多药企把提取过三七总皂苷的三七药渣请环保单位当成废渣处理, 少数企业将三七药渣压成板用作生物燃料, 这对名贵中药三七是一种浪费。

日本学者小菅卓夫等^[5]首次从三七根中分离并鉴定了三七的主要止血活性成分是一种特殊的水溶性非蛋白质氨基酸即三七素, 化学名为 β -草氨酸-L- α , β -二氨基丙酸 (β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid, 简称 β -ODAP), 分子式为 $C_5H_8N_2O_5$, 相对分子质量为 176.13。参照有关文献报道, 目前对于分离三七素主要采用柱色谱的方法, 鲁岐等^[6]采用 Sephadex LH-20 凝胶柱和 CM Sephadex C-25 凝胶离子交换柱, 谢国祥^[7]等用 001 × 7 阳离子交换树脂柱, 贾伟^[8]等用 D001 型离子交换树脂柱, 谭朝阳^[9]等用 732 强酸型阳离子交换树脂和 CM Sephadex C-25 凝胶离子交换柱, 但上述三七素均是从三七中提取纯化得到。

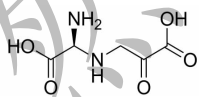


图 1 三七素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of dencichine

本课题以提取过三七总皂苷的工业三七药渣为原料, 考察工业三七药渣中是否含有三七素并进行分离纯化, 测定三七素供试品的含量, 考察三七素供试品的止血药理活性。本课题有利于三七资源的综合利用。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030 型 HPLC 色谱仪 (日本岛津), DK-98-

II 型电热恒温水浴锅 (天津泰斯特仪器有限公司), RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), Labconco^R 4.5L 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司), BSA224S 型万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司), TDZ4 台式低速离心机 (湖南郝西仪器装备有限公司), 5210HP 型超声波清洗机 (上海科导仪器有限公司)。

1.2 试剂

工业三七药渣 (云南云科药业有限公司提供), 001 × 7 阳离子交换树脂 (艾美科健生物医药有限公司), 硅胶板 (青岛海洋化工厂), 三七素标准品 (上海纯优生物科技, 纯度 > 98%), 茛三酮、氯化钠、无水乙醇、冰醋酸 (天津市大茂化学试剂厂), 氨水 (成都市科龙化工试剂厂), 正丁醇 (西陇化工有限公司), 丙酮 (重庆川东化工有限公司), 甲醇, 乙腈均为色谱纯, 0.9% 生理盐水, 酚磺乙胺注射液 (天津金耀集团湖北天药药业股份有限公司, 2 mL:0.5 g)。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠 (购于昆明医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (滇) K2015-0002), 雌性, 6 周龄, 体重 20 ± 2 g, 25 只。

2 方法与结果

2.1 三七素的提取

取工业三七药渣 1 kg, 加 6 倍量重量的蒸馏水在 50 °C 的恒温水浴锅中浸提 8 h, 收集滤液, 滤渣加 3 倍量重量的蒸馏水提取 8 h, 收集滤液, 合并两次滤液。以 4 500 rpm, 离心 5 min, 倾倒入上清液, 抽滤, 得滤液, 将滤液置于旋转蒸发仪, 50 °C 旋转浓缩至原体积的 1/9, 加入 3 倍量乙醇, 边加边搅拌, 4 °C 下静置 24 h, 抽滤; 将滤液置于旋转蒸发仪, 50 °C 回收乙醇, 得粗提液约 100 mL。

2.2 三七素的分离与纯化

2.2.1 001 × 7 阳离子交换树脂纯化三七素

取粗提液 30 mL, 经 001 × 7 阳离子交换树脂柱纯化 (3 cm × 30 cm), 流速为 0.2 mL/min, 先用水洗脱, 以除去色素等杂质, 至洗脱液为无色; 再用

0.1 mol/L 氨水洗脱,收集洗脱液,每管 10 mL,茛三酮显色,至洗脱液不显紫色,结束洗脱。

2.2.2 三七素的薄层鉴别(确证三七药渣中是否含有三七素)

将显色的各管洗脱液与三七素对照品各 10 μ L 在硅胶板上点样,展开剂为正丁醇:冰醋酸:乙醇:水(4:1:1:2),茛三酮溶液为显色剂(110 $^{\circ}$ C 显色 5 min),观察是否有与三七素对照品相同 R_f 值及颜色的斑点。

2.2.3 丙酮结晶

合并与三七素对照品斑点有相同 R_f 值及颜色且只有这一个斑点的洗脱液。合并液于 50 $^{\circ}$ C 的旋转蒸发仪浓缩蒸干,加适量水使其全部溶解,倒至烧

杯中,加入 30 倍量的丙酮,边加边搅拌,析出大量沉淀,过 0.2 μ m 滤膜,沉淀用少量水溶解;所得水溶液继续用同样的方法再次结晶;将重结晶溶于水,进行薄层检测验证,结果仅有一个斑点且与三七素对照品有相同 R_f 值和颜色,将重结晶水溶液冷冻干燥,得三七素供试品,备用。

2.3 三七素供试品的含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:溶剂 A:溶剂 B(95:5, v:v),溶剂 A 为 0.001% 的醋酸溶液,溶剂 B 为乙腈:甲醇:水(45:10:45, v:v:v)的混合溶液;流速 1.0 mL/min,检测波长:214 nm,柱温为 30 $^{\circ}$ C,进样量为 20 μ L。

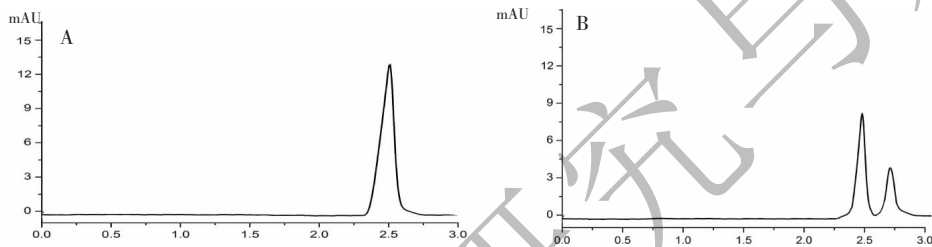


图 2 三七素色谱图

Fig. 2 Chromatogram of dencichin

注:A:三七素标准品;B:三七素供试品。

Note:A:Standard of dencichine;B:Test product dencichine.

因三七素水溶性好,反相高效液相出峰时间短,三七素粗提物、树脂纯化和结晶各阶段高效液相色谱图见图 3:各阶段高效液相色谱证实了工业三七

药渣中含有三七素,并证实三七素在分离纯化的各个步骤中存在。

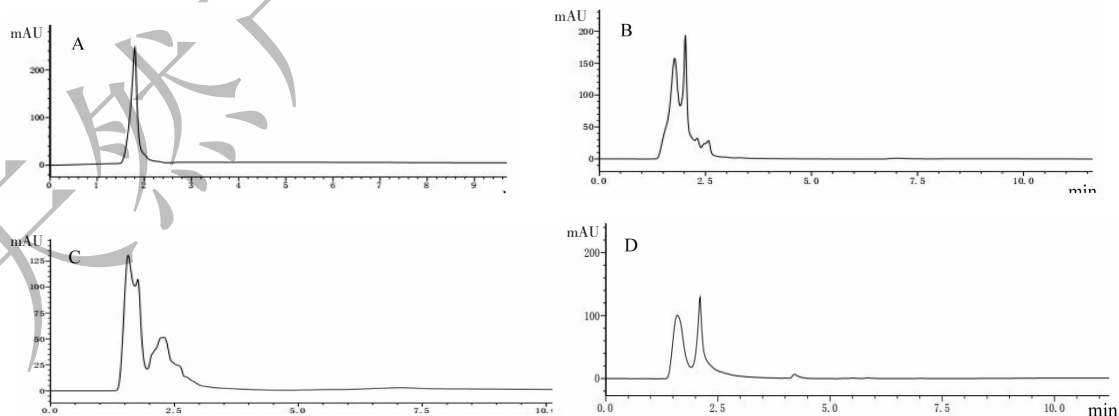


图 3 三七素色谱图

Fig. 3 Chromatogram of dencichin

注:A:三七素标准品;B:三七素粗提液;C:树脂柱层析后溶液;D:三七素供试品。

Note:A:Standard of dencichine;B:Crude dencichine extract;C:Dencichine solution obtained by chromatography separation with cation exchange resin;D:Test product dencichine.

2.3.2 对照品溶液的配制

精密称取三七素对照品 2.5 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。临用前用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。

2.3.3 供试品溶液的配制

精密称取供试品 2.5 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。临用前用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。

2.3.4 标准曲线的制备

精密吸取对照品储备液适量, 用流动相配制成浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/mL 的对照品溶液, 摇匀, 依次进样, 按上述色谱条件测定, 以三七素对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归。得回归方程 $A = 1\ 867.6C - 24\ 814$, $r^2 = 0.999\ 26$, 结果表明三七素对照品浓度在 20 ~ 100 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 仪器精密度试验

精密吸取浓度为 0.1 mg/mL 的对照品溶液, 按照 2.3.1 中色谱条件进样, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 峰面积依次为 167 461、170 647、168 729、170

984、166 467、169 710, RSD 为 1.06%, 结果表明, 用于本品的检测仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验

精密称取同一批号供试品 6 份, 按照 2.3.3 中“供试品溶液的制备”方法操作, 制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 记录峰面积, 峰面积依次为 96 412、97 984、95 118、97 555、96 098、96 275, RSD 为 1.08%, 结果表明, 此方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样测定, 记录峰面积, 峰面积依次为 96 424、95 984、96 118、97 357、96 288、96 325。RSD 为 0.51%, 结果表明, 本供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验

精密量取待测样品 6 份, 按照 2.3.3 中“供试品溶液的制备”方法操作, 分别加入三七素对照品(对照品浓度为 0.1 mg/mL) 0.4 mL, 即加入 0.04 mg 三七素, 进样, 测定峰面积, 计算回收率。结果表明, 本方法加样回收率良好。

表 1 三七素供试品加样回收率试验结果

Table 1 Recovery test results

组别 Group	样品含量 Sample content (μg)	加入量 Addition amount (μg)	测得量 Measured amount (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
1	41.3	40	39.23	98.08	98.59	0.47
2	41.26	40	39.68	99.2		
3	41.23	40	39.26	98.15		
4	41.31	40	39.35	98.37		
5	41.24	40	39.47	98.68		
6	41.19	40	39.61	99.03		

2.3.9 含量测定

称取供试品 2.5 mg, 按照 3.3.3 中供试品溶液的制备供试液 3 份, 进样 20 μL, 计算三七素的含量。

表 2 三七素供试品中三七素的含量测定结果 (n = 3)

Table 2 The determination of dencichine in the test substance (n = 3)

组别 Group	三七素含量 Dencichine content (%)	平均含量 Average content (%)	RSD (%)
1	58.48	59.03	0.84
2	59.44		
3	59.18		

2.4 三七素供试品的凝血实验

2.4.1 玻片法测定凝血时间

取昆明种小鼠 25 只, 随机分为 5 组, 每组 5 只, 分别用苦味酸标记。组别分别为生理盐水组(阴性对照组)、酚磺乙胺注射液组(阳性对照组, 25 mg/mL)、三七素粗提液注射液组(27 mg/mL)、三七氨基酸注射液组(9.4 mg/mL)、三七素粗品低浓度组(1.6 mg/mL)、三七素粗品中浓度组(3.2 mg/mL)、三七素粗品高浓度组(6.4 mg/mL)。腹腔注射给药, 剂量为 10 mL/kg。30 min 后用眼科弯镊迅速摘去小鼠一侧眼球, 即有血液流出。将血滴至干净的载玻片上, 血滴直径约为 5 mm, 滴血同时用秒表计时, 每隔 10 s 用清

洁针头自血滴边缘向里轻轻挑动1次,观察有无血丝挑起,记录凝血时间。从采血开始到挑起血丝止,所历时间为凝血时间。采用SPSS统计学软件中的单因素方差分析法对各组凝血时间进行比较。

2.4.2 结果

三七素供试品对小鼠凝血时间的影响,如下表

表3 三七素供试品对小鼠凝血时间的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Effects of dencichine on mouse coagulation time($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	凝血时间 Clotting time (s)
生理盐水 Saline	0	163.4 ± 36.74
酚磺乙胺注射液 Phenol sulfonamide injection	250	85.20 ± 21.44 **
三七素供试品低剂量 Dencichine-L	16	28.20 ± 11.05 ** [△]
三七素供试品中剂量 Dencichine-M	32	24.60 ± 8.32 ** [△]
三七素供试品高剂量 Dencichine-H	64	38.40 ± 12.00 ** [△]

注:与生理盐水组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与环磷酰胺组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: Compared with saline group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Etamsylate group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 结论

工业三七药渣要经过用70%的乙醇,高温数次提取,有些还要调节pH值,药渣最后用蒸汽吹干,后晒干。而三七素极易溶于水且遇热遇酸碱不稳定,工业三七药渣是否含有三七素是本课题能否进行的关键。

在HPLC检测过程中,参照已有文献^[13-16],考察了不同的流动相,甲醇:水(70:30)、乙腈:0.05%磷酸溶液(5:95)、乙腈:水(80:20)等,根据色谱图分离效果,确定流动相为溶剂A:溶剂B(95:5, v:v),溶剂A为0.001%的醋酸溶液,溶剂B为乙腈:甲醇:水(45:10:45, v:v)的混合溶液。所建立的高效液相色谱法测定三七素含量,方法简单,结果准确。因三七素水溶性好,反相高效液相出峰时间短,三七素粗提物、树脂纯化和结晶各阶段高效液相色谱图见图3:各阶段高效液相色谱证实了工业三七药渣中含有三七素,并证实三七素在分离纯化的各个步骤中存在。

目前文献报道的三七素的分离纯化方法^[11]用到凝胶色谱柱Sephadex LH-20和CM SephadexC-25,但Sephadex LH-20和CM SephadexC-25价格昂贵,成本较高,不适合大工业生产所用。而本实验参照文献^[12]采用价格低廉的001×7阳离子交换树脂柱分离纯化三七素,此方法简单易行,成本低廉,适合大工业生产,但文献^[12]中以三七为原料,先用乙醇沉淀、正丁醇萃取除去皂苷成分再进行分离纯化,而本实验以提取过三七总皂苷后的工业药渣为原料,在工业药渣中加入纯化水提取,提取液浓缩后加

所示:

三七素供试品高、中、低剂量组与生理盐水组比较,能显著缩短凝血时间($P < 0.01$)。三七素供试品高、中、低剂量组与酚磺乙胺注射液组比较,能显著缩短凝血时间($P < 0.01$)。

乙醇沉淀多糖等物质,皂苷已提取,不需要正丁醇萃取除去皂苷,将上清液过001×7阳离子交换树脂柱分离纯化,成本低廉,适合于大工业生产。

本实验最初将所得三七素供试品水溶液于50℃下烘干并进行了薄层鉴别,薄层鉴别未发现与对照品有相同斑点,推测三七素受热不稳定。后将三七素供试品水溶液采用真空冷冻干燥技术进行干燥,冻干产品薄层鉴别结果证实与对照品有相同斑点。考虑三七素是一个受热不稳定的物质,所以干燥过程要采用真空冷冻干燥技术。

据报道^[10]三七中三七素的含量为0.5%~0.9%,故直接从三七中提取三七素成本较高。三七道地产地云南文山常年种植面积达到了12万亩左右,产量9000吨。本实验采用水提醇沉法从提取过三七总皂苷的工业三七药渣中提取三七素,经001×7阳离子树脂柱纯化、丙酮结晶、冷冻干燥得三七素供试品,高效液相色谱法测定三七素含量为59.03%,反推到三七药渣中,三七素含量为0.72%,每年用于提取三七皂苷的三七约为1400吨,皂苷提取后,每年从工业三七药渣中弃去的三七素近3吨。药理实验证实:三七素供试品能明显缩短凝血时间,具有良好的应用前景,可用于止血药物、医疗器械及日化产品的研发。本课题的研究有利于三七资源的综合利用。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of Peoples Republic of China, Vol I (中华人民共和国:第一部)

- [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 2 Zhen GZ, Yang CR. Biology and application of *Panax notoginseng* (三七生物学及其应用) [M]. Beijing: Science Press, 1994; 9-36.
 - 3 Wang MX, Zhao JY, Sun DM, et al. Protective effects and underlying mechanisms of *Panax notoginseng* saponins against SH-SY5Y cell apoptosis induced by 6-hydroxydopamine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 898-906.
 - 4 Liu XY, Ma J, Li CJ, et al. New triterpenoid saponins from the leaves of *Panax notoginseng* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1432-1436.
 - 5 Kosuge T, Yokota M, Ochiai A. Studies on antihemorrhagic principles in the crude drugs for hemostatics. On antihemorrhagic principle in Sanchi ginseng Radix [J]. Yakugku Zasshi, 1981, 101: 629-632.
 - 6 Lu Q, Li XG. Separation, identification and content determination of *Panax notoginseng* hemostatic components [J]. Chin Tradit Patent Med (中成药), 1988, 9: 34-35.
 - 7 Xie GX, Qiu YP, Qiu MF. Analysis of dencichine in *Panax notoginseng* by gas chromatography-mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 920-925.
 - 8 Jia W, Qiu MF, Xie GX, et al. Extraction of dencichine from *Panax notoginseng* (从三七中提取三七素的方法) CN1865232A [P]. 2006-11-22.
 - 9 Tang ZY, Yuan HJ, You ZL, et al. Study on the separation of effective components in *Panax notoginseng* [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm (中医药导报), 2010, 16(1): 63-65.
 - 10 Liu G, Liu YJ, Hu WY, et al. Determination of the content of dencichine in *Panax notoginseng* saponins extraction waste liquid by HPLC [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Medica (云南中医中药杂志), 2010, 31(2): 61-62.
 - 11 Lan GH, Fang S, Chen P, et al. The synthetic method of high effective hemostatic drug dencichine (高效止血药三七素的合成制备方法) CN1292377A [P]. 2001-4-25.
 - 12 Xie GX, Qiu MF, Zhao AH, et al. Separation purification and structural analysis of dencichine from *Panax notoginseng* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2007, 19: 1059-1061.
 - 13 Ju ZC, He CY, Liu Q, et al. Determination of dencichine in *Panax notoginseng* tablet by HPLC [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 2594-2597.
 - 14 Zhang YP, Yu Q, et al. Extraction abstraction and assaying of dencichine in *Radix notoginseng* [J]. Shanxi J Tradit Chin Med (山西中医药杂志), 2009, 25(10): 55-56.
 - 15 Yang LJ, Gao EQ, Jiao CJ, et al. Determination of dencichine in *Panax notoginseng* by pre-column derivatization HPLC [J]. Res Dev & Market (资源开发与市场), 2015, 31(1): 1-3.
 - 16 Li L, Wang CX, Qu Y, et al. Content determination of dencichine in *Panax notoginseng* by a reversed phase ion-pair chromatography [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Medica (云南中医中药杂志), 2015, 40: 4026-4030.

(上接第 703 页)

- 12 Jiang T, Deng M, James R, et al. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering [J]. Acta Biomaterialia, 2014, 10: 1632-1645.
- 13 Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications [J]. Adv Mater, 2011, 23(12): 41-56.
- 14 Choi KY, Saravanakumar G, Park JH, et al. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 99(11): 82-94.
- 15 Langmaier F, Mladek M, Mokrej P. Hydrogels of collagen hydrolysate cross-linked with dialdehyde starch [J]. J Therm Anal Calorim, 2009, 98: 807.
- 16 Florczyk S J, Wang K, Jana S, et al. Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM [J]. Biomaterials, 2013, 34: 10143-10150.
- 17 Zhang G, Brion A, Willemin AS, et al. Nacre, a natural, multi-use and timely biomaterial for bone graft substitution. [J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105: 662-671.
- 18 Alakpa EV, Burgess KEV, Chung P, et al. Nacre Topography Produces Higher Crystallinity in Bone than Chemically Induced Osteogenesis [J]. ACS Nano, 2017, 11: 6717-6727.
- 19 Brion A, Zhang G, Dossot M, et al. Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts [J]. J Struct Biol, 2015, 192: 500-509.
- 20 Gulseren G, Yasa IC, Ustahuseyin O, et al. Alkaline phosphatase-mimicking peptide nanofibers for osteogenic differentiation. [J]. Biomacromolecules, 2015, 16: 2198-2208.
- 21 Suh H, Han DW, Park JC, et al. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. [J]. Artif Organs, 2015, 25: 459-466.
- 22 Bellosta S, Ferri N, Bernini F, et al. Non-lipid-related effects of statins [J]. Ann Med, 2000, 32: 164-176.
- 23 Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10: 111-120.
- 24 Lee J, Lee YJ, Cho H, et al. The incorporation of bFGF mediated by heparin into PCL/gelatin composite fiber meshes for guided bone regeneration [J]. Drug Deliv Transl Re, 2015, 5: 146-159.