

## 酸酐酯化法制备人参二醇衍生物

董成梅<sup>1)</sup>, 蒲洪<sup>1)</sup>, 邹澄<sup>1)</sup>, 赵庆<sup>2)</sup>, 胡建林<sup>1)</sup>, 杨淑达<sup>1)</sup>

(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; 2) 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650500)

**[摘要]** 目的 设计合成人参二醇衍生物. 方法 对人参二醇皂苷 3 位 - 羟基基团进行结构改造, 通过一系列的酰化反应制备其衍生物, 并通过核磁对其结构进行鉴定. 结果 制备了 6 个人参二醇衍生物, 其中 5 个化合物为新化合物. 结论 这些化合物简便易得, 因而为得到大量同类衍生物供活性筛选奠定了基础, 为三七的深入研究与开发提供了新途径.

**[关键词]** 人参二醇; 人参二醇衍生物; 酰化反应; 合成

**[中图分类号]** Q946 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 06 - 0004 - 06

## Preparation of Panaxadiol Derivatives with Acid Anhydrides

DONG Cheng - mei<sup>1)</sup>, PU Hong<sup>1)</sup>, ZOU Cheng<sup>1)</sup>, ZHAO Qing<sup>2)</sup>, HU Jian - lin<sup>1)</sup>, YANG Shu - da<sup>1)</sup>

(1) School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) School of Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To design and synthesize panaxadiol derivatives. **Methods** A series of panaxadiol derivatives were synthesized with simple acylation of 3-hydroxy group of panaxadiol. The chemical structures of these derivatives were identified by NMR. **Results** Six derivatives were obtained and five of them were new compounds. **Conclusions** These derivatives can be obtained readily thus a large number of derivatives can be synthesized similarly for bioassay. This provides a new approach for the research and development of Panax notoginseng.

**[Key words]** Panaxadiol; Panaxadiol derivatives; Acylation reaction; Synthesis

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 居云南名药之首, 是传统名贵中药材, 云南省文山州三七总产量占全国总产量 90% 以上<sup>[1]</sup>. 现代药理研究证明三七总皂苷对血液系统具有止血及抗血小板聚集和溶栓作用<sup>[2-3]</sup>, 对心血管系统有抗心律失常、抗动脉粥样硬化和对心肌细胞的保护作用等<sup>[4,5]</sup>, 此外, 对免疫系统, 神经系统, 泌尿生殖系统等均具有广泛的作用, 而且能抗炎、抗肿瘤、抗衰老等, 临床上广泛地应用于心血管疾病、肝炎、外科疾病的治疗.

三七皂苷为达玛烷型三萜皂苷, 由于糖链复杂

多样, 使得已分离鉴定的三七皂苷多达数十种, 三七皂苷的庞杂, 使其分离难度大、成本高, 单体不便产业化, 而苷元则相对单纯得多, 主要为原人参二醇和原人参三醇. 现代药理研究表明三七成分中的二醇型皂苷对心脑血管系统、神经系统和抗肿瘤等方面均有较好的活性<sup>[6,7]</sup>. 人参二醇 (PD) 是具有达玛烷型骨架的原人参二醇型皂苷, 当与环磷酰胺和 5- 氟尿嘧啶联合应用时, 可以增强它们对人类肿瘤细胞株的抗肿瘤作用. 已经有报道提出, 3 个人参二醇的衍生物 (3- $\beta$ -乙酰氧基-人参二醇, 3- $\beta$ -棕榈酸乙酰氧基-人参二醇和 3- $\beta$ -硬

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81160388); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目(2011FB245); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FZ097) .

**[作者简介]** 董成梅 (1988 ~), 女, 云南丽江市人, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究工作.

**[通讯作者]** 邹澄. E-mail:zouchengk@126.com

脂-人参二醇) 与 人参二醇(PD) 相比, 具有更好的抗肿瘤活性<sup>[8]</sup>.

新药研究开发的一条有效途径是通过对丰产易得的天然产物进行结构改造以期发现新的活性成分<sup>[9]</sup>. 但目前对三七皂苷的研究主要是提取分离, 结构改造方面的研究工作较少<sup>[10]</sup>. 为充分开发

利用三七, 笔者以人参二醇为先导化合物, 在 DMAP (4-二甲氨基吡啶)<sup>[11]</sup> 的催化作用下, 将其 3 位 OH 通过与常见的酸酐基团相连, 合成了 6 个人参二醇衍生物, 其结构与合成路线如图 1 所示, 其中有 5 个化合物未见文献报道.

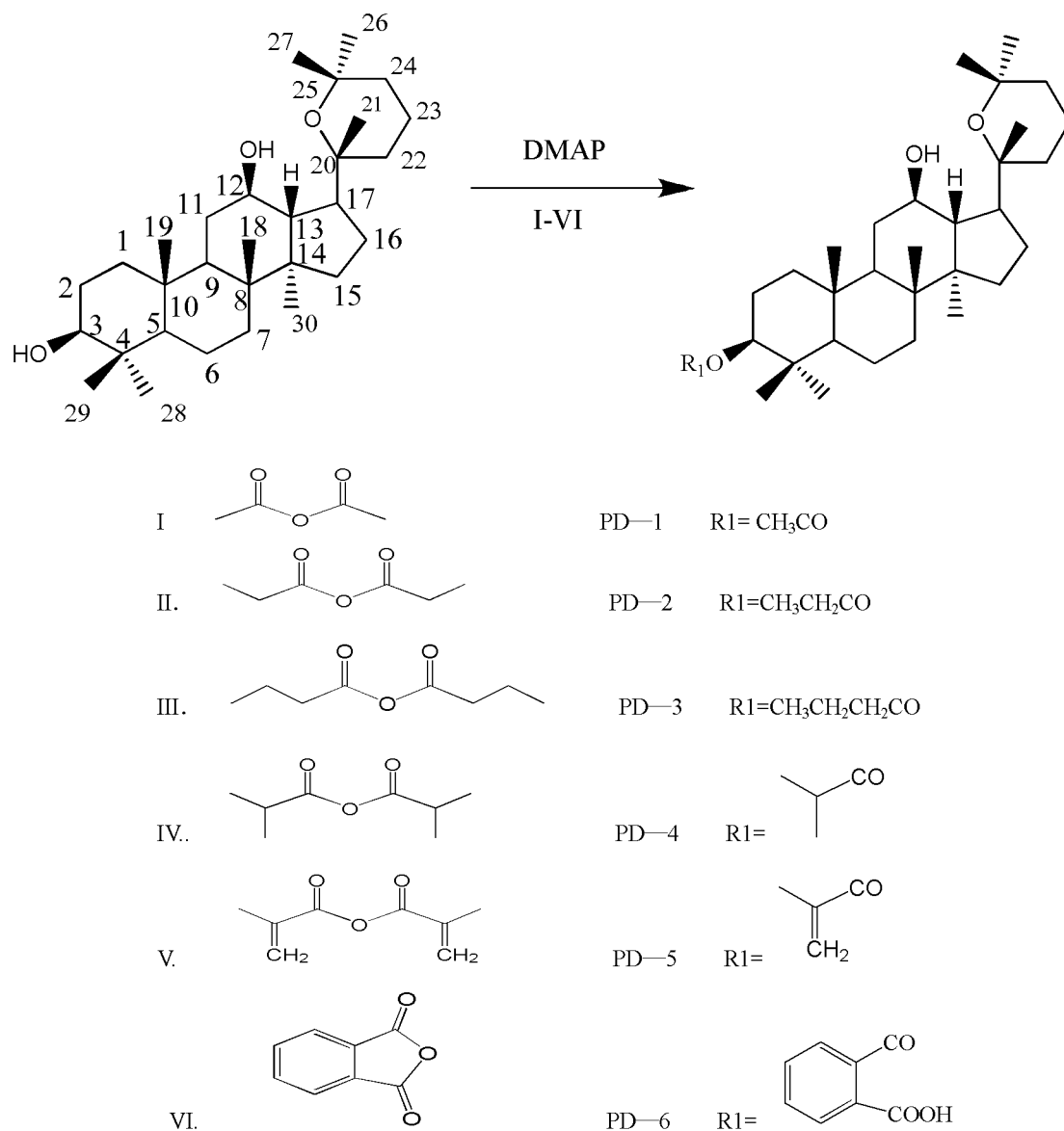


图 1 人参二酵母核及 3-OH 衍生物结构与合成路线

Fig. 1 Chemical structure and synthetic scheme of panaxadiol derivatives

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

BUCHI R-200 旋转蒸发仪, FA2004 电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限公

司), KQ-100 型超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), SHZ-D 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司), 瑞士 AV-500 核磁共振波谱仪 (美国 Bruker 公司)。

### 1.2 试剂

人参二醇购买于上海思达医药化工科技有限公

司,所有化学合成试剂主要为分析纯,购买于上海晶纯实业有限公司(阿拉丁)和上海泰坦科技股份有限公司(阿达玛斯),柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 300~400 目硅胶,薄层层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的硅胶板 GF254 和默克公司生产的高效薄层层析板。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 3-O-乙酰基-人参二醇的制备(PD-1)

称取人参二醇 46 mg, DMAP 25 mg, 无水吡啶 5 mL 依次加入 25 mL 两口反应瓶中,溶解后滴加无水乙酸酐 1 mL,室温下搅拌反应, TLC 确定反应终点. 反应完全后将冷却的反应液倾入 80 mL 冷水中,不断搅拌,滴加 5% HCl 溶液至 pH $\approx$ 5.0~5.5,使大量白色沉淀逐渐析出,放置过夜,减压抽滤,用蒸馏水洗沉淀物为中性. 待沉淀物干后上 300~400 目硅胶柱于石油醚:乙酸乙酯(12:1)洗脱,得到化合物 PD-1(图 1),产率为 72%,其  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱数据见表 1.

#### 1.3.2 3-O-丙酰基-人参二醇的制备(PD-2)

称取人参二醇 46 mg, DMAP 25 mg, 无水吡啶 5 mL 依次加入 25 mL 两口反应瓶中,溶解后滴加无水丙酸酐 1 mL,室温下搅拌反应, TLC 确定反应终点. 后处理方法同 PD-1. 将酯层浓缩后上 300~400 目硅胶柱分离,洗脱体系用石油醚:丙酮(10:1)洗脱,得到化合物 PD-2(图 1),产率为 76%,其  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱数据见表 1.

#### 1.3.3 3-O-丁酰基-人参二醇的制备(PD-3)

称取人参二醇 46 mg, DMAP 25 mg, 无水吡啶 5 mL 依次加入 25 mL 两口反应瓶中,溶解后滴加无水丁酸酐 1 mL,室温下搅拌反应, TLC 确定反应终点. 后处理方法同 PD-1. 将浓缩后的酯层经 300~400 目硅胶柱分离,洗脱体系用石油醚:丙酮(6:1)洗脱,得到化合物 PD-3(图 1),产率为 85%,其  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱数据见表 1.

#### 1.3.4 3-O-异丁酰基-人参二醇的制备(PD-4)

称取人参二醇 46 mg, DMAP 25 mg, 无水吡啶 5 mL 依次加入 25 mL 两口反应瓶中,溶解后滴加无水异丁酸酐 15 滴,室温下搅拌反应, TLC 确定反应终点. 反应完全后将反应液倾入 100 mL 接近饱和的 NaCl 溶液中,稍搅拌,静置待沉淀析出,沉淀析出较完全后,用棉花柱过滤滤液,蒸馏水和饱和食盐水冲洗 3 次,乙酸乙酯溶解,弃去水层. 酯层用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,浓缩回收酯层,经 300~400 目硅胶柱于石油醚:乙酸乙酯(15:1)洗脱,得到化合物 PD-4(图 1),产率为 85%,其  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱数据见表 1.

#### 1.3.5 3-O-甲基丙烯酰基-人参二醇的制备(PD-5)

称取人参二醇 46 mg, DMAP 25 mg, 无水吡啶 5 mL 依次加入 25 mL 两口反应瓶中,溶解后滴加无水甲基丙烯酸酐 20 滴,升温至 60 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应, TLC 确定反应终点. 后处理方法同 PD-4. 将酯层浓缩后经 300~400 目硅胶柱分离,洗脱体系用石油醚:乙酸乙酯(15:1)洗脱,得到化合物 PD-5(图 1),产率为 80%. 其  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱数据见表 1.

#### 1.3.6 3-O-邻苯二甲酰基-人参二醇的制备(PD-6)

称取人参二醇 46 mg, 邻苯二甲酸酐 150 mg, DMAP 50 mg, 无水吡啶 10 mL 依次加入 25 mL 两口反应瓶中,充分溶解后,升温至 100 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应, TLC 监测反应进程,待原料消耗无变化后反应停止,到达反应终点. 后处理方法同 PD-4. 回收酯层后经 300~400 目硅胶柱分离,用氯仿:乙酸乙酯(7:5)系统洗脱,得到化合物 PD-6(图 1),产率为 67%. 其  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱数据见表 1.

### 1.4 光谱数据

通过瑞士 AV-500 型核磁共振波谱仪得到化合物 PD-1, PD-2, PD-3, PD-4, PD-5 和 PD-6 的  $^{13}\text{C}$  NMR(400 MHz)波谱数据(全部化合物的波谱数据均由中国科学院昆明植物研究所仪器测定中心测定),见表 1.

### 1.5 结构鉴定

化合物 PD-1:白色晶体(石油醚-丙酮),体积分数 5% 的硫酸乙醇溶液显紫红色.  $^{13}\text{C}$  NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )给出 32 个碳信号,包括 1 个羰基碳:  $\delta$  171.00(C1', s), 9 个甲基峰(原料人参二醇 8 个甲基,乙酰基上 1 个甲基), 10 个亚甲基, 4 个连氧碳:  $\delta$  76.67(C20, s),  $\delta$  73.20(C25, s),  $\delta$  70.00(C12, d), 碳信号  $\delta$  80.82(C3, d)可证明 PD 的 3 位发生衍生化,其余与文献<sup>[12]</sup>中原料 PD 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据比较,二者母核数据基本一致. 因此可判定化合物 PD-1 为 3-O-乙酰基-人参二醇.

化合物 PD-2:白色晶体(石油醚-丙酮),体积分数 5% 的硫酸乙醇溶液显紫红色.  $^{13}\text{C}$  NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )给出 33 个碳信号,包括 1 个羰基碳:  $\delta$  174.28(C1', s), 9 个甲基峰(原料人参二醇 8 个甲基,丙酰基上 1 个甲基), 11 个亚甲基峰(原料 10 个亚甲基,丙酰基上 1 个亚甲基), 4 个连氧碳:  $\delta$  76.67(C20, s),  $\delta$  73.33(C25, s),  $\delta$  70.16(C12, d), 碳信号  $\delta$  80.47(C3, d)可证明 PD 的 3 位发生衍生化,其余对照原料均一致.

表 1 目标化合物的  $^{13}\text{C}$  NMR 数据 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )Tab. 1  $^{13}\text{C}$  NMR data of target compounds (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

C	PD-1	PD-2	PD-3	PD-4	PD-5	PD-6
1	38.52(t)	38.50(t)	38.50(t)	38.45(t)	38.46(t)	38.62(t)
2	25.11(t)	25.10(t)	25.10(t)	25.10(t)	25.09(t)	25.16(t)
3	80.82(d)	80.47(d)	80.44(d)	80.19(d)	81.07(d)	82.45(d)
4	37.81(s)	37.89(s)	37.84(s)	37.94(s)	38.06(s)	38.18(s)
5	55.89(d)	55.88(d)	55.88(d)	55.87(d)	55.87(d)	56.14(d)
6	18.14(t)	18.13(t)	18.14(t)	18.12(t)	18.13(t)	18.13(t)
7	34.74(t)	34.73(t)	34.73(t)	34.74(t)	34.73(t)	34.74(t)
8	39.75(s)	39.75(s)	39.74(s)	39.74(s)	39.74(s)	39.76(s)
9	49.79(d)	49.78(d)	49.78(d)	49.76(d)	49.76(d)	49.88(d)
10	36.40(s)	36.38(s)	36.38(s)	36.38(s)	36.37(s)	36.44(s)
11	30.42(t)	30.33(t)	30.33(t)	30.48(t)	30.42(t)	29.68(t)
12	70.00(d)	70.16(d)	70.18(d)	69.85(d)	69.97(d)	70.66(d)
13	49.02(d)	48.95(d)	48.94(d)	49.07(d)	49.01(d)	48.59(d)
14	51.17(s)	51.19(s)	51.19(s)	51.16(s)	51.17(s)	51.28(s)
15	31.09(t)	31.09(t)	31.09(t)	31.07(t)	31.08(t)	31.14(t)
16	23.68(t)	23.70(t)	23.73(t)	23.64(t)	23.58(t)	23.11(t)
17	54.65(d)	54.62(d)	54.62(d)	54.65(d)	54.63(d)	54.65(d)
18	16.22(q)	16.20(q)	16.20(q)	16.23(q)	16.21(q)	16.26(q)
19	16.17(q)	16.15(q)	16.15(q)	16.13(q)	16.13(q)	16.18(q)
20	76.67(s)	76.67(s)	76.67(s)	76.60(s)	76.68(s)	76.68(s)
21	19.37(q)	19.35(q)	19.35(q)	19.36(q)	19.35(q)	19.28(q)
22	35.68(t)	35.67(t)	35.67(t)	35.68(t)	35.67(t)	35.71(t)
23	16.44(t)	16.48(t)	16.50(t)	16.50(t)	16.56(t)	16.63(t)
24	36.99(t)	37.00(t)	36.99(t)	36.99(t)	36.99(t)	37.04(t)
25	73.20(s)	73.33(s)	73.35(s)	73.06(s)	73.17(s)	73.58(s)
26	27.94(q)	27.95(q)	27.95(q)	27.92(q)	28.03(q)	28.09(q)
27	33.00(q)	32.96(q)	32.97(q)	32.98(q)	32.96(q)	32.88(q)
28	15.58(q)	15.58(q)	15.57(q)	15.57(q)	15.57(q)	15.58(q)
29	27.08(q)	27.06(q)	27.06(q)	27.07(q)	27.06(q)	27.01(q)
30	16.97(q)	16.97(q)	16.96(q)	16.99(q)	16.98(q)	16.93(q)
1'	171.00(s)	174.28(s)	173.50(s)	176.79(s)	167.13(s)	167.85(s)
2'	21.32(q)	28.04(t)	36.72(t)	34.41(d)	136.91(s)	133.24(s)
3'		9.33(q)	18.61(t)	19.17(q)	124.88(t)	131.91 (s)
4'			13.70(q)	18.90(q)	18.36(q)	129.51(d)
5'						130.51(d)
6'						130.97(d)
7'						128.46(d)
3'-COOH						169.49(s)

因此可判定化合物 PD-2 为 3-O-丙酰基-人参二醇。

化合物 PD-3: 白色晶体 (石油醚-丙酮), 体积分数 5% 的硫酸乙醇溶液显紫红色。 $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出 34 个碳信号, 包括 1 个羰基碳:  $\delta$  173.50 ( $\text{C}1'$ , s), 9 个甲基峰 (原料人参二醇 8 个甲基, 丁酰基上 1 个甲基), 12 个亚甲基峰 (原料 10 个亚甲基, 丁酰基上 2 个亚甲基), 4 个连氧碳:  $\delta$  76.67 ( $\text{C}20$ , s),  $\delta$  73.35 ( $\text{C}25$ , s),  $\delta$  70.18 ( $\text{C}12$ , d), 碳信号  $\delta$  80.44 ( $\text{C}3$ , d) 可证明 PD 的 3 位发生衍生化, 其余对照原料均一致。因此可判定化合物 PD-3 为 3-O-丁酰基-人参二醇。

化合物 PD-4: 白色晶体 (石油醚-丙酮), 体积分数 5% 的硫酸乙醇溶液显紫红色。 $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出 34 个碳信号, 包括 1 个羰基碳:  $\delta$  176.79 ( $\text{C}1'$ , s), 10 个甲基峰 (原料人参二醇 8 个甲基, 异丁酰基上 2 个甲基), 10 个亚甲基峰, 相比 PD 多出一个叔碳:  $\delta$  34.41 ( $\text{C}2'$ , d), 4 个连氧碳:  $\delta$  76.60 ( $\text{C}20$ , s),  $\delta$  73.06 ( $\text{C}25$ , s),  $\delta$  69.85 ( $\text{C}12$ , d), 碳信号  $\delta$  80.19 ( $\text{C}3$ , d) 可证明 PD 的 3 位发生衍生化, 其余对照原料均一致。因此可判定化合物 PD-4 为 3-O-异丁酰基-人参二醇。

化合物 PD-5: 白色晶体 (石油醚-丙酮), 体积分数 5% 的硫酸乙醇溶液显紫红色。 $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出 34 个碳信号, 包括一个羰基碳:  $\delta$  167.13 ( $\text{C}1'$ , s), 9 个甲基峰 (原料人参二醇 8 个甲基, 甲基丙烯酰基上 1 个甲基), 相比原料多出 1 对烯碳:  $\delta$  136.91 ( $\text{C}2'$ , s),  $\delta$  124.88 ( $\text{C}3'$ , t), 4 个连氧碳:  $\delta$  76.68 ( $\text{C}20$ , s),  $\delta$  73.17 ( $\text{C}25$ , s),  $\delta$  69.97 ( $\text{C}12$ , d), 碳信号  $\delta$  81.07 ( $\text{C}3$ , d) 可证明 PD 的 3 位发生衍生化, 其余对照原料均一致。因此可判定化合物 PD-5 为 3-O-甲基丙烯酰基-人参二醇。

化合物 PD-6: 白色晶体 (石油醚-丙酮), 体积分数 5% 的硫酸乙醇溶液显紫红色。 $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出 38 个碳信号, 包括 2 个羰基碳: 1 个酯羰基碳  $\delta$  167.85 ( $\text{C}1'$ , s), 1 个羧酸羰基碳  $\delta$  169.49 ( $-\text{COOH}$ , s), 相比原料多出 1 组苯环信号:  $\delta$  130.97 ( $\text{C}6'$ ),  $\delta$  130.51 ( $\text{C}5'$ ),  $\delta$  128.46 ( $\text{C}7'$ ),  $\delta$  133.24 ( $\text{C}2'$ ),  $\delta$  131.91 ( $\text{C}3'$ ),  $\delta$  129.51 ( $\text{C}4'$ ), 4 个连氧碳:  $\delta$  76.68 ( $\text{C}20$ , s),  $\delta$  73.58 ( $\text{C}25$ , s),  $\delta$  70.66 ( $\text{C}12$ , d), 碳信号  $\delta$  82.45 ( $\text{C}3$ , d) 可证明 PD 的 3 位发生衍生化, 其余对照原料均一致。因此可判定化合

物 PD-6 为 3-O-邻苯二甲酰基-人参二醇。

## 2 结果

实验结果表明, 在制备得到的 6 个化合物中, 其中 5 个化合物的产率均大于 70% 以上, 化合物 PD-3 (3-O-丁酰基-人参二醇) 和 PD-4 (3-O-异丁酰基-人参二醇) 产率最高, 都达到了 85%, 而化合物 PD-6 (3-O-邻苯二甲酰基-人参二醇) 的产率略低于 70%, 分析原因可能为试验中反应不完全所致。但总体来看, 用酸酐酯化法制备人参二醇酰化产物时, 以 DMAP 作为反应催化剂, 具有反应条件温和、反应时间较短, 产率高等优点。

## 3 讨论

有关人参二醇 3-位羟基酰化的反应要受到反应条件 (溶剂、温度、湿度、时间) 及催化剂的影响。由于 3-位羟基部分的立体位阻使反应速度慢而且不完全, 因此选用合适的催化剂也显得尤为重要。本文选用酯化反应常用的碱性催化剂 DMAP 为反应催化剂, 并以吡啶作为反应溶剂, 不仅增加了反应速度, 而且还提高了目标化合物的产率。

### [参考文献]

- [1] 云南省药物研究所, 云南重要天然药物[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006:9.
- [2] 王平. 三七对血液系统作用的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19 (1):10.
- [3] 许军, 王阶, 温林军. 三七总皂苷干预血栓形成研究概况[J]. 云南中医中药杂志, 2003, 24 (5):46-47.
- [4] 钱越洲, 刘宇, 顾仁樾. 三七有效成分 R<sub>x</sub> 对离体心脏缺血再灌注损伤的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2005, 19 (1):50-52.
- [5] 顾国熔, 黄培志, 童朝阳, 等. 血塞通预处理对心肌缺血再灌注损伤的早期保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 25 (4):264-265.
- [6] 张春红, 李向高, 张连学, 等. 人参二醇衍生物抗肿瘤活性比较的初步结果 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 369-371.
- [7] YE Z G, XUE B Y, DAI B Q, et al. Comparative study on pharmacological action of ginseng saponins and notoginseng saponins [J]. China J Chinese Medicine Information, 1996, 3(5):11-14.
- [8] LIU XUE-KUN, YE BAI-JUN, WU YAN, et al. Synthesis and anti-tumor evaluation of panaxadiol derivatives[J].

(下转第 28 页)

义,说明当成骨细胞纯化至第 4 代时,2 种原代培养方法获得的同一类型细胞增殖活性相当。

对 2 种培养细胞进行细胞计数及 MTT 生长曲线绘制发现,改良 I 型胶原酶消化培养的成骨细胞数量较改良贴壁组织块法多,且细胞更快进入快速生长期及达到生长高峰。组织块贴壁法需要组织粘附后才能逐渐游离细胞,并且组织块一旦脱落则细胞爬出量变少,相互连结作用减弱,细胞生长相对缓慢;而用 I 型胶原酶处理组织块后即可见大量细胞游离出来,密度大的细胞量一方面贴壁多,另一方面细胞相互连结作用强,使其生长迅速。另外,骨组织中成骨细胞外富含 I 型胶原的基质,I 型胶原酶可通过整合素对成骨细胞发挥促分化和促细胞间的粘附作用<sup>[9]</sup>,调节细胞的代谢生长,加速骨组织中成骨细胞的游离生长,因此改良 I 型胶原酶消化在短期内获得更多的成骨细胞。

本研究的实验结果表明,改良贴壁组织块法及改良 I 型胶原酶消化均适用于颞下颌关节软骨下骨成骨细胞的培养,2 种方法获得的成骨细胞在稳定状态下可以表现出相似的增殖效果,但改良 I 型胶原酶消化具有方法快速简便、特异性高、细胞产出量高、细胞生长速度快等优点,在短期内可以更有效地提供更多的实验研究细胞。

#### [参考文献]

- [1] 王卫华. 成骨细胞体外培养方法研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册,1996,23(9):287-291.
- [2] ORRISS I R,TAYLOR S E,AMETT T R. Rat osteoblast cultures[J]. *Methods Mol Biol*,2012,816(1):31-41.
- [3] ASTRID D ,BAKKER JENNEKE KLEIN-NULEND. Bone research protocols [J]. Amsterdam:Methods Mol Biol,2012,816:19-29.
- [4] 王双利,查振刚,刘宁,等. 改进酶消化法培养SD大鼠成骨细胞及其鉴定[J]. 实用医学杂志,2008,24(6):915-918.
- [5] RI弗雷谢尼.动物细胞培养—基本技术指南[M]. 第5版. 北京:科学出版社,2008:241-243.
- [6] ISABEL R,ORRISS GILLIAN E,KNIGHT SAM RANASINGHE,et al. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation [J]. *Bone*,2006,39(2):300-309.
- [7] R.I.弗雷谢尼.动物细胞培养—基本技术指南[M]. 第5版. 北京:科学出版社,2008:255-257.
- [8] KUMAR A,WEBSTER T J,BISWAS K,et al. Flow cytometry analysis of human fetal osteoblast fate processes on spark plasma sintered hydroxyapatite-titanium biocomposites[J]. *J Biomed Mater Res A*,2013,101(10):2925-2938.
- [9] HASEGAWA Y,SHIMADA K,SUZUKI N,et al. The in vitro osteogenic characteristics of primary osteoblastic cells from a rabbit alveolus [J]. *J Oral Sci*,2008,50(4):427-434.

(2014-03-14 收稿)

(上接第 8 页)

- European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46: 1997-2002.
- [9] 邹澄,赵庆,郝小江,等. 丰产易得天然产物结构改造值得重视 [J]. 中国民族民间医药杂志,2004,68(3):135-137.
  - [10] 魏均娴,陈业高,张红彬,等. 达玛烷型皂苷人参低元醇衍生物及制备方法[P].中国:ZL93.1.08189.0,1995.1.
  - [11] 张春桃,卢茂芳,刘恒言. DCC/DMAP催化制备乙酰阿魏酸苯丙醇酯[J]. 中国实用医药,2010,5(23):37-38.
  - [12] 魏均娴,杜元冲. 三七—现代科学研究及应用[M]. 昆明:云南科技出版社,1996:58.

(2014-03-05 收稿)