

运用双向发酵技术建立中药微生物药代模型的设想

潘 扬, 彭 薇, 刘春美

(南京中医药大学 药用菌与中药生物技术研究所, 江苏 南京 210029)

摘要:简述传统中药药物代谢研究方法的现状与不足,指出利用微生物药代模型进行中药药代研究的技术优势,认为它为中药药物代谢研究提供了新的思路与方法。通过对独特的“双向发酵”技术实用意义及应用前景的深入分析,提出运用其建立中药微生物药代代谢模型的设想。

关键词: 双向发酵; 中药; 药物代谢; 微生物模型

中图分类号: R 285; TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)03—0225—07

Assumptions of Establishing the Microbial Models of Drug Metabolism of Traditional Chinese Herbs by Applying Bi-Directional Solid Fermentation Technology

PAN Yang, PENG Wei, LIU Chun-mei

(Department of Bio-Pharmacy and Laboratory of Medical Fungi and Phyto-Biotech, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: In this manuscript, the progress and deficiency of drug metabolism of traditional Chinese herbs were introduced. The technical advantages were pointed out that drug metabolism research was performed by using the microbial models which provide a novel ways for Chinese herbs drug metabolism. Based on the analysis of practical meaning and prospect of the special ‘bi-directional fermentation’ technology, the assumption of establishing the microbial models of drug metabolism of Chinese herbs was suggested by applying this technology.

Keywords: bi-directional fermentation, traditional Chinese herbs, drug metabolism, microbial models

众所周知, 中药是伴随着中华民族几千年的文明史发展传承下来的宝贵财富。目前, 中医药在国内虽然有着稳定的市场和生命力, 但始终无法得到现代世界医药主流的认可。其原因主要是由于传统

中药缺乏可靠的药效学、药物代谢动力学和安全性等一系列基础研究数据^[1], 尤其是中药的药物代谢(简称中药药代)。药物代谢是指药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程。药物作为外来分子进入

收稿日期: 2013-01-17

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(yssk-2010); 南京中医药大学中药学优势学科开放课题(2011ZYX5-001)。

作者简介: 潘 扬(1964—), 男, 江苏扬州人, 理学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药化学与生物技术研究。

E-mail: y.pan2006@163.com

人体后,一些药物以原形从人体排泄;而大多数药物需要进行氧化、水解、还原、结合等生物化学反应,然后从人体排泄。这些生物化学转化反应统称为“药物代谢”。所谓中药药代即中药成分在体内发生的生物转化。中药发挥防治疾病的作用与其在人体内的代谢密切相关^[2]。中药药代的深入研究对揭示中药的内在作用机制,优化中药给药方案和剂型,促进中药新药开发,并最终推动中医药走向世界,实现中药现代化都具有重要意义^[3]。

微生物药代模型是指利用微生物和哺乳动物在对外源性化合物代谢过程中的相似性,用微生物转化模拟哺乳动物体内药物代谢反应^[4]。哺乳动物的微生物模型从提出至今已被广泛应用于各种成分明确而单一西药的代谢研究,成为研究药物体内代谢的一种重要的辅助工具,但尚未见其在成分复杂的中药药代研究中的应用报道。20世纪80年代末,庄毅等在继承传统中药发酵方法的基础上,创立了“药用真菌新型双向固体发酵”方法^[5],简称“双向发酵”技术,它根据固体发酵的特点,直接将优选的菌种加入到中药材中进行生物转化。“双向发酵”对推动中药微生物药代模型的研究具有很大的启发,本文中则通过深入分析中药“双向发酵”技术的实用意义及应用前景,对运用其建立中药微生物代谢模型作一设想。

1 药物代谢传统研究及其在中药应用中的不足

我国的药物代谢研究始于20世纪50年代,传统的药物代谢研究往往是收集用药后动物的体液(血浆、尿、胆汁和粪便),检测样品中药物及其代谢物;或采用器官灌流^[6]、组织切片^[7]、细胞培养^[8]、组织匀浆及微粒体法^[9]等代谢研究方法来完成。随着分子生物学技术的发展,可利用基因重组表达的细胞色素P450(Cytochrome P450, CYP450)酶系中某个纯酶进行药物代谢研究^[10]。

自1963年起国内开始出现有关中药药代的研究^[11],起初主要集中在药物动力学方面,自20世纪80年代以来,中药药物代谢动力学研究已得到迅速的发展,但直到近年,有关中药药物代谢的研究才逐渐受到人们的重视^[12]。

西药绝大多数是单体化合物、结构明确,用药时不存在化学成分之间的相互作用,因而药物代谢

研究比较简单,其结果也能很好地反映药物的体内过程。与此相反,传统的药物代谢方法用于中药药代研究则存在明显不足:第一,中药成分类型复杂,种类繁多,且多数成分结构不明。如此繁杂的成分进入人体后,其中肯定存在化合物之间的相互作用,且这种相互作用可能比较复杂,进一步增加了研究的难度。第二,中药材中多数成分含量很低,化学对照品不易获得,由于药物在生物体内的广泛分布,其代谢转化的脏器和酶系统的多样化,药物及其代谢产物在体内的浓度低,尤其是一些毒副作用较大的中药如马钱子、乌头等,服用剂量十分有限,服用后肠道代谢物的浓度本身很低,进入血浆中的浓度就更低,因此直接从血浆、胆汁等生物体液中提取分离有一定困难^[13],更谈不上弄清它们的化学结构。第三,传统药物代谢的技术要求较高,成本昂贵,操作复杂,要消耗大量的实验动物,违背了目前医药学动物实验中提倡的“3R”原则。

2 微生物药代模型理论基础及其优势

倡导使用微生物模型探索哺乳动物的药物代谢已有相当长的历史。1974年,Smith和Rosazza在研究芳香化合物的微生物羟基化时,发现微生物特别是真菌的代谢物和哺乳动物具有相似性,并因此首次提出了“哺乳动物药物代谢的微生物模型”的概念^[14]。利用微生物转化系统来模拟哺乳动物药物代谢情况,使得微生物转化方法及其研究思路应用到药理学和毒理学研究领域,推动了药物代谢的研究。微生物代谢模型的核心理论是:真菌和哺乳动物都是真核细胞生物,两者主要的生理功能中含有类似的酶作用机制,对外源性化合物的代谢有相似的系统 and 过程。因此,真菌(微生物)转化模拟哺乳动物药物代谢途径就有一定的预见性^[15]。

随着对微生物转化研究的深入,大量科学事实证实,在很多情况下,微生物转化与哺乳类动物代谢途径相平行,真菌等多种微生物特别是丝状真菌具有与哺乳动物药物代谢功能非常相似的药物代谢酶,如细胞色素P450同工酶和葡萄糖苷酶等^[16],可进行某些与哺乳动物相同的相和相代谢反应。细胞色素P450酶系(CYP450)在人体内主要存在于肝脏中,是肝微粒体混合功能酶系的末端氧化酶,由NADPH、NADPH-P450还原酶脂质和多种P450同工酶组成。P450酶是体内药物发生代谢转

化的关键酶,药物半衰期、肝脏首过效应、药物相互作用等药动学特征均与药物代谢的 CYP450 有关^[17]。微生物转化的实质就是微生物利用自身的酶系对外源性化合物(底物)进行转化,从而产生相应的产物。所有的有机化学反应类型几乎都可以通过微生物转化实现。真菌等多种微生物具有与哺乳动物药物代谢酶功能非常相似的细胞色素 P450 酶系和葡萄糖苷酶等,真菌的细胞色素 P450 酶与哺乳动物类似也是结合在内质网膜上,因而可进行与哺乳动物相同的相和相药物代谢反应。如含有细胞色素 P450 酶系的小克银汉霉属真菌,已广泛应用于多种药物的微生物代谢模型研究^[18]。Wang Rong-fu 等^[19]利用真菌微粒体的单克隆抗体筛选雅致小克银汉霉(*C. elegans* ATCC 3612)的 cDNA 文库,得到一个含有全部 *C. elegans* P450 基因的 cDNA,并利用质粒 *E. coli* 系统(pQE30)实现了过量表达。免疫印迹实验显示,哺乳动物 P450 酶系的 3 个抗体(CYP1A1、CYP2E1 和 CYP3A1)与 E 表达呈阳性反应,证实了雅致小克银汉霉含有与哺乳动物相似的细胞色素 P450 酶。微生物(真菌)中含有与哺乳动物类似的 P450 酶系,为建立药物(包括中药)微生物代谢模型提供了理论依据。

真菌(微生物)转化可模拟哺乳动物的药物代谢已得到公认,与其它代谢方法相比具有以下优点^[20]:

1)从技术上:①微生物来源广泛、种类繁多,可提供大量的模型供筛选;②建立微生物转化体系的操作简单、易于控制,可规模化制备;③通过调节优化条件,可显著提高代谢产物的收率,再经分离纯化获得代谢产物单体进行结构鉴定、药理和毒理研究;④与细胞或组织模型相比,可以使用较高的底物浓度,代谢物的产率高,易于检测以及样品的分离纯化。

2)从效益上:建立微生物转化体系的成本较低,绿色环保,可规模化制备。

3)从社会伦理上:可减少实验动物的使用,符合目前医药学动物实验中提倡的“3R”原则。

通过筛选得到能产生与动物(或人)体内相同代谢物的微生物菌株,经过转化条件的优化,可方便快捷地获得目标代谢物并进行结构鉴定,且较容易地与动物(或人)体内的代谢物进行比对,以复制药物在生物体内的代谢过程。哺乳动物代谢的微生物模型理论已被广泛地应用,成为研究体内代谢的

一种重要的辅助工具^[21-22]。目前已见到应用微生物模型研究中药单体成分药物代谢的少量报道,而直接对成分复杂的药材进行此方面研究则尚未见报道。由此可见,建立适合于中药药代规律的微生物药代模型急需理论上的突破与实践上的创新。

3 微生物药代模型的应用现状

目前,随着国外有关微生物代谢模型的各种研究数据的日积月累^[20,23],关于微生物转化的思路得到了普遍认同。国内对这一领域的研究主要是针对成分单一的化学药,如普罗帕酮^[24]、苯丙呱林^[25]、SFZ-47^[26]、维拉帕米^[27]、间尼索地平^[28]、昂丹司琼^[29]、安非他酮^[30]和哈尔明碱^[31]等,研究方法和手段也是日渐成熟,为将微生物代谢模型应用于中医药提供了充足的技术支持。

在中药研究方面,虽然活性单体化合物如马兜酸 A 和 B^[32-33]、芍药苷和芍药内酯苷^[34]的研究已采用了微生物代谢模型,但迄今为止还未将微生物代谢模型直接应用于中药材或中药复方的代谢研究,只是将微生物应用于中药活性成分及中药复方转化的研究取得了一定的进展^[35]。据报道,应用微生物转化的中药化学成分包括生物碱、苷类、萜类、黄酮类、甾类、醌类等^[36]等几乎所有中药成分的结构类型。这些微生物转化研究为建立中药微生物代谢模型奠定了一定的技术基础,也充分证明了建立中药微生物代谢模型的可行性。

4 应用双向发酵技术建立中药微生物代谢模型的设想

传统的中药固体发酵已经有着较为悠久的历史,主要是通过微生物和酶的催化分解作用对天然药物进行生物转化。由于微生物有强大的分解转化物质的能力,故通过发酵可使药材产生特殊的化学成分变化^[37]。20 世纪 80 年代末,庄毅等在继承传统发酵方法的基础上,创立了“药用真菌新型双向固体发酵”方法^[5]简称“双向发酵”,它根据固体发酵的特点,可直接将优选的菌种加入药材中进行微生物转化。

双向固体发酵技术的理论基础是优选合适的药用真菌对具有活性成分的中药材(即药性基质)进行固态发酵,药性基质不仅能提供真菌所需的营养,同时又因真菌酶的作用,分解(合成)转化药性

基质的组织成分使原有的成分转化,形成新的药用菌质。发酵过程具有“双向性”,因此也被称为“双向发酵”^[38]。双向发酵的特点是采用了中药材作为基质,所产生的发酵产物(药性菌质)既含有中药残渣及其活性成分,又含有菌体及其代谢物的全组分。目前,该技术已广泛应用于多种中药材的生物转化,达到降毒存效、改变药性及增加适应症等目的。

一般来说,中药通过真菌双向发酵产生的发酵品,其化学成分与原药材成分相比都发生了明显变化。研究显示,中药巴豆^[39-40]、川乌^[41]、马钱子^[42]、雷公藤^[43-44]、三七^[45]等采用不同菌种进行双向固体发酵后,所得的药性菌质与药材生品相比,其活性成分(有毒或有效成分)的含量均有不同程度的变化,并且有新成分产生。由于这个过程与中药在体内的代谢过程极为相似,因此可以通过筛选合适的菌种对中药材进行双向发酵来模拟哺乳动物的药物代谢。同时,固体发酵弥补了液体发酵不能直接用于中药材的缺陷,为模拟中药复杂体系药物代谢提供了可能性;且它几乎是对中药全成分进行转化,更能体现中药成分作用于机体的整体观。

初步设想分3个步骤建立中药微生物代谢模型。

4.1 中药有效单体和部位成分微生物代谢模型的研究(液体发酵)

见图1。



图1 液体发酵技术路线

Fig. 1 Technical route for liquid fermentation

4.2 中药材微生物代谢模型研究(双向固体发酵)

见图2。

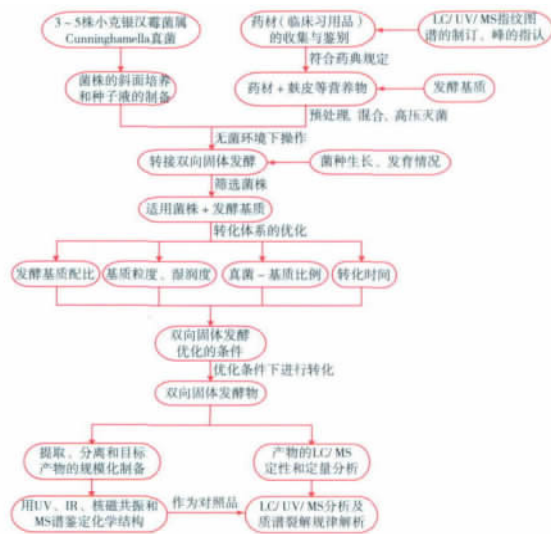


图2 双向固体发酵技术路线

Fig. 2 Technical route for bi-directional solid fermentation

4.3 液体发酵与双向固体发酵模型的比较研究

见图3。

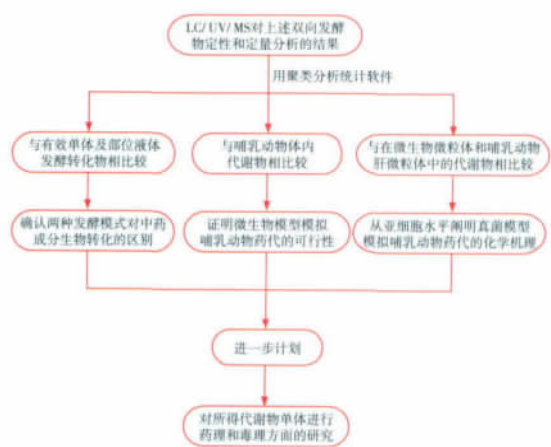


图3 比较研究框图

Fig. 3 Comparison between liquid fermentation models and bi-directional solid fermentation models

5 结语

药物代谢不仅影响药物作用的发挥,也与药物毒性的产生息息相关。中药代谢研究要以中医基础理论为指导,对中医讲究的整体观进行阐述,才能更好地发现其代谢规律,探明中药作用的物质基础。目前,已有的体外代谢模型直接用于中药代谢研究的尚不多见。本文中首次提出利用双向发酵技术应建立中药微生物代谢模型的设想,即采用体外

微生物模型模拟中药体内代谢,预测其在人体中的代谢过程,更有利于探索中药整体成分的代谢规律,进而阐明中药效应的物质基础。这对于代谢率低、毒性大及缺少灵敏检测手段的中药代谢研究,无疑是开拓了一条广阔的新路,且这种以整体成分作为研究对象的研究方法,也可以为一直以来难以突破的中药复方代谢研究提供有效的手段。因此,基于双向发酵技术建立中药微生物代谢模型,采用

微生物模型作为研究中药体内代谢的方法,有望给中药及其复方的代谢研究工作带来新的生机;同时,采用微生物模型作为研究中药体内代谢的一个重要工具,需要将微生物转化与药理学、生物化学和现代分析方法等多重学科、多领域有机结合,这给中药药物代谢研究工作带来的既是一种机遇,更是一种挑战。

参考文献:

- [1] 刘昌孝. 中药药代动力学研究的难点和热点[J]. 药学学报, 2005, 40(5): 395-401.
LIU Chang-xiao. Difficulties and hot-points on pharmacokinetics studies of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2005, 40(5): 395-401. (in Chinese)
- [2] 郭立玮. 中药药物动力学方法与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [3] 刘昌孝. 中药的药代动力学研究在中药现代化中面临的任务[J]. 天津中医药, 2003, 20(6): 1-5.
LIU Chang-xiao. The task of the pharmacokinetics of traditional Chinese medicine in the modernization of traditional Chinese medicine[J]. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2003, 20(6): 1-5. (in Chinese)
- [4] Smith R V, Rosazza J P. Microbial models of mammalian metabolism: aromatic hydroxylation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1974, 161: 551-558.
- [5] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 3-6.
ZHUANG Yi. New type (two-way Pattern) solid fermentation engineering in medicinal mushrooms[J]. *Journal of China Edible Fungi*, 2002, 21(4): 3-6. (in Chinese)
- [6] Wrighton S A, Ring B J, van Braden M. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies[J]. *Toxicol Pathol*, 1995, 23: 199-208.
- [7] Parrish A R, Gemdolfi A J, Brendel K. Precision-cut tissue slices: application in pharmacology and toxicology [J]. *Life Sci*, 1995, 57: 1887-1901.
- [8] Sanjeev T, MaryLynn C Z, Chung H O. Tissue slices revisited: evaluation and development of a short-term incubation for integrated drug metabolism[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29: 1337-1342.
- [9] Jurima-Romet M, Crawford K, Cyr T, et al. Terfenadine metabolism in human liver: in vitro inhibition by macrolide antibiotics and azole antifungals[J]. *Drug Metab Dispos*, 1994, 22: 849-857.
- [10] Guengerich F P, Asti P. Expression of drug-metabolism enzymes[J]. *Curr Opin Biotech*, 1997, 8: 623-628.
- [11] 陈琼华, 高士美, 杜学芳, 等. 中药大黄的综合研究: 大黄蒽醌衍生物在体内的吸收、排泄和分布[J]. 药学学报, 1963, 10(9): 525-528.
CHEN Qiong-hua, Gao Shi-mei, Du Xue-fang, et al. Study on Chinese rhubarb: Absorption, excretion and distribution of Rheum anthraquinone derivatives in vivo[J]. *Acta Pharm Sin*, 1963, 10(9): 525-528. (in Chinese)
- [12] 屈铭. 中药药物代谢研究概述[J]. 九江医学, 2007, 22(2): 48-52.
QU Ming. The overview of drug metabolism for traditional Chinese herbs[J]. *Jiujiang Medical Journal*, 2007, 22(2): 48-52. (in Chinese)
- [13] 张文江, 周同惠. 药物代谢转化研究及其进展[J]. 分析测试学报, 1997, 16(6): 82-86.
ZHANG Wen-jiang, ZHOU Tong-hui. Progress in drug metabolic biotransformation [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 1997, 16(6): 82-86. (in Chinese)
- [14] Smith R V, Rosazza J P. Microbial models of mammalian metabolism: aromatic hydroxylation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1974, 161: 551-558.
- [15] Smith R V, Rosazza J P. Microbial models of mammalian metabolism[J]. *J Nat Prod*, 1983, 46: 79-87.
- [16] 张宾, 张临通. 近年中药对 CYP450 酶系影响的研究进展[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(6): 92-93.

- ZHANG Bin, ZHANG Lin-tong. Advance of the influence of traditional Chinese medicine to CYP450 enzyme system in recent years[J]. **Pharmacol Clin Chin Materia Medica**, 2005, 21(6):92-93. (in Chinese)
- [17] 张小梅, 冯毅凡, 陈耕夫, 等. 细胞色素 P450 与中草药代谢关系的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3):327-331.
- ZHANG Xiao-mei, FENG Yi-fan, CHEN Geng-fu, et al. Review on interactions between cytochrome P450 and metabolism of medicinal herbs[J]. **Journal of Guangdong Pharmaceutical University**, 2011, 27(3):327-331. (in Chinese)
- [18] 钦松, 周长林. 小克银汉霉属的向生物转化在体外药物代谢模型研究中的应用[J]. 海峡药学, 2004, 16(1):4-8.
- QIN Song, ZHOU Chang-lin. Application of microbial transformation in medicine metabolization model in vitro by *Cunninghamella matrucht*[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2004, 16(1):4-8. (in Chinese)
- [19] Wang R F, Cao W W, Khan A A, et al. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a cytochrome P450 gene from *Cunninghamella elegans*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2000, 188:55-61.
- [20] Das S, Rosazza J P N. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids[J]. **J Nat Prod**, 2006, 69:499-508.
- [21] Clark A M, Hufford C D. Use of microorganisms for the study of drug metabolism[J]. **Med Res Rev**, 1991, 11:473-486.
- [22] Abourashed A E, Clark M A, Hufford C D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review[J]. **Curr Med Chem**, 1999(6):359-374.
- [23] Das S, Lamm A S, Rosazza J P N. Biotransformation of (+)-catechin to novel B-ring fission lactones[J]. **Org Process Res Dev**, 2011, 15:231-235.
- [24] Huang H H, Chen X Y, Zhong D F. Selective biotransformation of propafenone by *Cunninghamella blakesleana*[J]. **Asian J Drug Metab Pharmacokin**, 2001, 1:37-43.
- [25] 黄海华, 崔洪霞, 钟大放, 等. 利用微生物转化模型研究苯丙呱林的代谢产物[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4):297-301.
- HUANG Hai-hua, CUI Hong-xia, ZHONG Da-fang, et al. Study on metabolites of benproperine using microbial model of transformation[J]. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, 2001, 15(4):297-301. (in Chinese)
- [26] 黄海华, 钟大放, 王英. 小克银汉霉对 SFZ-47 的代谢转化[J]. 药物生物技术, 1997, 4(3):158-163.
- HUANG Hai-hua, ZHONG Da-fang, WANG Ying. Microbial transformation of SFZ-47 by *Cunninghamella* [J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 1997, 4(3):158-163. (in Chinese)
- [27] 刘磊, 黄海华, 孙璐, 等. 短刺小克银汉霉菌对维拉帕米转化的能力[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(4):292-298.
- LIU Lei, HUANG Hai-hua, SUN Lu, et al. Capability of *Cunninghamella blakesleana* to transform verapamil[J]. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, 2002, 16(4):292-298. (in Chinese)
- [28] 孔德志, 韩学静, 景秀娟, 等. 微生物转化研究间尼索地平的代谢产物[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2):204-207.
- KONG De-zhi, HAN Xue-jing, JING Xiu-juan, et al. Study on metabolites of m-nisoldipine by microbial transformation[J]. **Chin J Pharm Anal**, 2010, 30(2):204-207. (in Chinese)
- [29] 李欣南, 齐秀兰, 段明郁, 等. 短刺小克银汉霉与卷枝毛霉对昂丹司琼的转化[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3):54-60.
- LI Xin-nan, QI Xiu-lan, DUAN Ming-yu, et al. Transformation of ondansetron by *Cunninghamella blakesleana* and *Mucor circinelloides*[J]. **Journal of Microbiology**, 2007, 27(3):54-60. (in Chinese)
- [30] 吴艳平, 何艳艳, 齐秀兰, 等. 短刺小克银汉霉 AS 3.153 菌株对安非他酮的代谢转化[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(4):291-297.
- WU Yan-ping, HE Yan-yan, QI Xiu-lan, et al. Microbial transformation of amfepramone by *Cunninghamella blakesleana* AS 3.153[J]. **Chin J Pharmacol Toxicol**, 2010, 24(4):291-297. (in Chinese)
- [31] 邱彬, 罗文鸿. 短刺小克银汉霉菌对哈尔明碱的代谢转化[J]. 汕头大学医学院学报, 2010, 23(2):81-83, 88.
- QIU Bin, LUO Wen-hong. Microbial transformation of harmine by *Cunninghamella blakesleana* [J]. **Journal of Shantou University Medical College**, 2010, 23(2):81-83, 88. (in Chinese)
- [32] 郭永超, 林哲绚, 罗文鸿. 短刺小克银汉霉菌对马兜铃酸 A 的代谢转化 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(6):451-455.
- GUO Yong-chao, LIN Zhe-xuan, LUO Wen-hong. Microbial Transformation of aristolochic acid by *Cunninghamella blakesleana*[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2006, 13(6):451-455. (in Chinese)
- [33] 郭永超, 罗文鸿. 马兜铃酸化合物的微生物转化及其对 HK-2 细胞毒性的研究[D]. 汕头: 汕头大学医学院, 2006.
- [34] 刘鑫鑫, 王巧. 芍药苷和芍药内酯苷的代谢研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.

- [35] 张艳华,张大海,张洪娟. 浅谈生物转化在中药活性成分研究中的应用[J]. 黑龙江医药,2010,23(2):222-224.
ZHANG Yan-hua,ZHANG Da-hai,ZHANG Hong-juan. Application of active components of Chinese herbs by biotransformation [J]. **Heilongjiang Medical Journal**,2010,23(2):222-224. (in Chinese)
- [36] 刘学湘,陈建伟. 中药有效成分生物转化的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(2):14-18.
LIU Xue-xiang,CHEN Jian-wei. Research progress of Chinese medicine effective component biotransformation [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2008,27(2):14-18. (in Chinese)
- [37] 王兴红,李棋德,曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J]. 中草药,2001,32(3):267-268.
WANG Xing-hong,LI Qi-de,CAO Qiu-e. New field for study of TCM through fermentation by microbe[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2001,32(3):267-268. (in Chinese)
- [38] 庄毅,潘扬,谢小梅,等. 药用真菌“双向发酵”起源发展、优势与潜力[J]. 中国食用菌,2007,26(2):3-6.
ZHUANG Yi,PAN Yang,XIE Xiao-mei,et al. The origin,development and its advantage and potential of ‘the bi-directional solid fermentation’ for medicinal fungi[J]. **Edible Fungi of China**,2007,26(2):3-6. (in Chinese)
- [39] 刘春美,吴晓峰,潘扬. 巴豆发酵品与生巴豆、巴豆霜中毒性成分的含量比较[J]. 中国药房,2011,22(43):4071-4074.
LIU Chun-mei,WU Xiao-feng,PAN Yang. Comparison of toxic ingredient contents of fermented *Croton tiglium*, crude *C. tiglium* and defatted *C. tiglium* seed powder[J]. **China Pharmacy**,2011,22(43):4071-4074. (in Chinese)
- [40] 潘扬,吴晓峰,涂霞,等. 中药巴豆经炮制与发酵后毒性效应的比较[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(5):788-792.
PAN Yang,WU Xiao-Feng,TU Xia,et al. Toxicological comparison between defatted croton seed powder and two fermentation products of *Fructus crotonis*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(5):788-792. (in Chinese)
- [41] 王身艳,潘扬,蒋亚平,等. 双向发酵对川乌指纹图谱及乌头碱类成分含量的影响[J]. 中国药房,2010,21(39):3712-3714.
WANG Shen-yan,PAN Yang,JIANG Ya-ping,et al. Effects of two-way fermentation on the fingerprints of *Aconitum carmichaeli* and the content of aconitine[J]. **China Pharmacy**,2010,21(39):3712-3714. (in Chinese)
- [42] 潘扬,张弦,蒋亚平,等. 双向发酵前后马钱子生物碱含量及其 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 南京中医药大学学报:自然科学版,2006,22(6):362-365.
PAN Yang,ZHANG Xian,JIANG Ya-ping,et al. The comparison of contents of alkaloids and the HPLC fingerprints of *Strychnos nux-vomica* between after and before bi-directional solid fermentation [J]. **J Nanjing TCM Univ:Nat Sci Ed.**,2006,22(6):362-365. (in Chinese)
- [43] 庄毅,谢小梅. 药用真菌新型(双向性)固体发酵工程对雷公藤解毒持效的初步研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(16):2083-2087.
ZHUANG Yi,XIE Xiao-mei. Primary studies of toxicity-reducing and efficacy-maintaining action of fungal fermentative products in *Tripterygium wilfordii* by a novel bi-directional solidstate fungal fermentation[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**,2009,34(16):2083-2087. (in Chinese)
- [44] 张普照,杨丽娟,侯志帆,等. 雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):59-62.
ZHANG Pu-zhao,YANG Li-juan,HOU Zhi-fan,et al. Study on changes of chemical constituents in *Tripterygium wilfordii* during process of fermenting[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**,2010,16(10):59-62. (in Chinese)
- [45] 马伟光,黄之镨,范培红. 整体固态生物转化后三七化学成分变化的初步研究 [J]. 中华中医药杂志,2010,25 (10):1683-1686.
MA Wei-guang,HUANG Zhi-pu,FAN Pei-hong. Primary studies on saponins from solid fermented roots of *Panax notoginseng* [J]. **China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy**,2010,25(10):1683-1686. (in Chinese)