

四种穿心莲二萜内酯类化合物的生物转化

王杰华¹, 王峥涛^{1,2}, 王莉莉¹, 王浙健¹, 马 昭¹, 胡之璧^{1*}, 黎万奎^{1*}

1. 上海中医药大学中药研究所, 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201210

2. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201210

[摘要] 穿心莲二萜内酯类化合物是穿心莲的特征性成分, 具有抗菌、抗病毒、抗炎、解热和抗癌等广泛的药理作用。本文主要从转化底物及转化涉及的反应类型、转化体系、转化产物的构效关系等三方面综述了4种穿心莲二萜内酯在生物转化方面的研究情况, 并就目前存在的问题及前景展望进行简要陈述, 以期为进一步研究穿心莲二萜内酯类化合物的生物转化提供参考。

[关键词] 穿心莲二萜内酯类; 生物转化; 中药化学

[中图分类号] R 931.6

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)10-1130-07

Biotransformation of 4 ent-labdane diterpenoid lactones of *Andrographis paniculata*: recent progress

WANG Jie-hua¹, WANG Zheng-tao^{1,2}, WANG Li-li¹, WANG Zhe-jian¹, MA Zhao¹, HU Zhi-bi^{1*}, LI Wan-kui^{1*}

1. The SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China

2. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China

[Abstract] Ent-labdane diterpenoid lactones, the principal constituents of *Andrographis paniculata*, have a wide range of pharmacological effects, such as antibacterial, anti-viral, anti-inflammatory, antipyretic, and anti-cancer effect, etc. In this review the biotransformations of four principal ent-labdane diterpenoid lactones of *A. paniculata* are discussed from the following aspects: substrates and types of reaction, transformation systems, and structure activity relationships. Moreover, the currently-existing problems and the prospects are also described to provide reference for further studying the biotransformation of ent-labdane diterpenoid lactones of *A. paniculata*.

[Key words] ent-labdane diterpenoid lactones of *A. paniculata*; biotransformation; pharmaceutical chemistry (TCD)

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10): 1130-1136]

中药穿心莲为爵床科穿心莲属植物穿心莲 [*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees] 的干燥地上部分, 以其对流感、流脑、急性菌痢、肺炎等的显著疗效被誉为“中药抗生素”。二萜内酯类化合物是穿心莲的特征性成分, 具有抗菌、抗病毒、抗炎、解热和抗癌等广泛的药理作用^[1-2], 有较高的药用价值; 尤其是其抗菌、消炎、抗癌作用逐渐得到国内外药学界的重视。为了得到结构新颖、生物活性更好、毒副作用更小的穿心莲内酯衍生物, 发掘穿心莲内酯和其衍生物新的生物活性和新用途, 为穿心莲类新药的

研究提供有价值的先导化合物, 以穿心莲二萜内酯为母核的结构改造研究越来越多^[3]。

目前对穿心莲二萜内酯的结构改造主要以化学合成 (chemical synthesis) 和生物转化 (biotransformation) 为主。其中, 生物转化是指以外源性的天然或合成的有机化合物为底物, 添加至处于生长状态的生物体系或酶体系中, 在适宜的条件下进行培养, 使得底物与生物体系中的酶发生相互作用, 从而产生结构改变的过程^[4-5]。生物转化以其选择性强、催化效率高、反应条件温和、反应种类多、环境污染小和可以用

[收稿日期] 2013-02-22 **[接受日期]** 2013-08-27

[基金项目] “十二五”国家科技支撑计划课题 (2012BAI29B02)。Supported by National Sci-tech Supporting Project of “the 12th Five-Year Plan” (2012BAI29B02)。

[作者简介] 王杰华, 硕士生。E-mail: hnzywjh2007@126.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-51322508, E-mail: huzhibi@126.com; Tel: 021-51323036, E-mail: bio5210@126.com

于催化有机合成中难以完成的化学反应等特点日益受到重视,并已经由此获得了新化合物,有些生物转化反应已经达到了工业化生产规模^[6]。本文就穿心莲二萜内酯类的生物转化进展情况进行概述。

1 用于生物转化的底物及转化涉及的反应类型

目前,穿心莲二萜内酯类的生物转化研究主要集

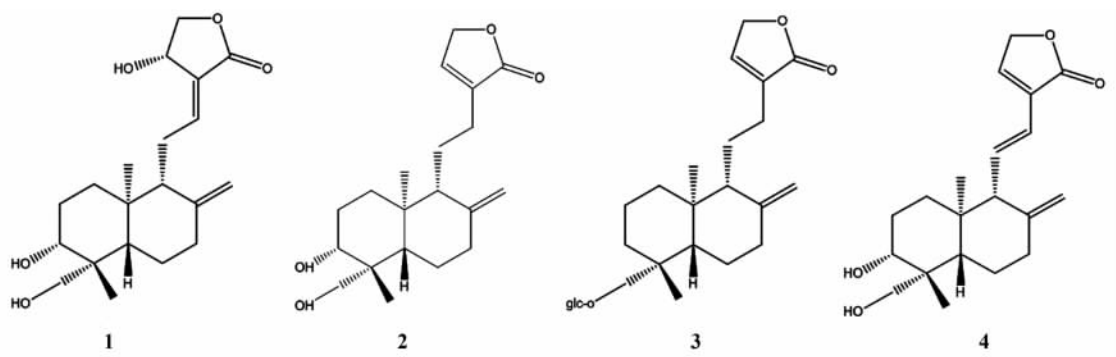


图 1 四种穿心莲二萜内酯的结构式

Fig 1 Structures of four principal ent-labdane diterpenoid lactones of *A. paniculata*

1: Andrographolide; 2: 14-Deoxyandrographolide; 3: Neoandrographolide; 4: 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide

1.1 穿心莲内酯 为穿心莲的主要有效成分,具有祛热解毒、消炎止痛之功效,对细菌性与病毒性上呼吸道感染及痢疾有特殊疗效,被誉为“天然抗生素药物”,在穿心莲叶中高达 1.84%^[7],在我国已规模化生产,极易获得。穿心莲内酯由二萜双环和五元内酯环两部分通过 2 个碳原子连接构成。在二萜内酯基本结构上有羟基和双键官能团,同时 14-OH 又位于不饱和内酯羰基的 β -位,所以较易失去或发生亲核取代的氧化反应被氧化成羰基,双键均为环外双键,其中一个双键是五元内酯环的环外双键,同时也是烯丙醇的一部分,它与内酯环上的酯羰基共轭,构成了环外 α,β' -不饱和- γ -内酯,由于环内张力,这种内酯结构较不稳定,极易发生加成反应^[8-9]。环外双键也易发生重排,进入内酯环内形成更为稳定的 α,β -不饱和- γ -内酯。另外一个双键位于二萜双环上,8,17-C=C-易发生加成反应(加一分子 H_2O)^[9]; 19- CH_2OH 易被氧化成-COOH^[8]。因此,穿心莲内酯通常被作为穿心莲二萜内酯类化合物的合成及生物转化的起始原料。

1.2 新穿心莲内酯 异名穿心莲新苷、穿心莲丙素,研究表明新穿心莲内酯有很多生物活性,例如抗炎^[10]、抗病毒^[11]、抗自由基^[12]、保肝^[13]和抗 HIV 病

中在以下 4 种二萜内酯:穿心莲内酯(andrographolide)、去氧穿心莲内酯(14-deoxyandrographolide,又称穿心莲甲素)、新穿心莲内酯(neoandrographolide,又称穿心莲丙素)和 14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯(14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide,又称脱水穿心莲内酯、穿心莲丁素),其结构式见图 1。

毒^[14]等活性。新穿心莲内酯较穿心莲内酯少了 14-OH,形成了更为稳定的 α,β -不饱和- γ -内酯,内酯环较稳定,19- CH_2OH 则变成了葡萄糖苷。对新穿心莲内酯而言,其转化反应的类型主要有:19 位的糖苷键多脱糖变成 $-CH_2OH$ 或 $-COOH$ 、8,17-C=C-多发生加成反应及二萜环上 2 位、3 位或 7 位被羟化^[15-16]。

1.3 脱水穿心莲内酯 异名 14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯、穿心莲丁素。《中华人民共和国药典》中含量测定项下,以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯为指标成分^[17]。脱水穿心莲内酯作为抗癌剂及免疫增强剂^[18],也有很强的抗病毒活性^[19]。脱水穿心莲内酯的转化反应多为:3-OH 被氧化成 $C=O$ ^[20]、7 位或 9 位被羟化^[21]及 8,17 位- $C=CH_2$ 发生加成及环氧化反应^[22]。

1.4 去氧穿心莲内酯 异名 14-去氧穿心莲内酯,又称穿心莲甲素,是一种马来西亚常用的抗高血压的民间药物^[23]。去氧穿心莲内酯较穿心莲内酯少了 14-OH,其转化反应多为:3-OH 被氧化成 $C=O$ 、7 位和 9 位引入羟基以及 8,17 位- $C=CH_2$ 发生加成反应或环化反应^[22,24-27]。

4 种二萜内酯的转化主要涉及羟化、氧化和加

成等反应类型。以上4种二萜内酯占穿心莲二萜内酯类成分的70%~80%,是穿心莲二萜内酯类成分的代表性化合物,也是各种穿心莲产品的定性、定量指标性成分。目前关于4种二萜内酯的转化研究中,以穿心莲内酯最多,去氧穿心莲内酯次之,脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯较少,这主要与4种底物在穿心莲中的含量、原料制得的难易程度及底物本身的性质有关。

2 穿心莲二萜内酯的生物转化反应体系

用于生物转化研究的生物体系主要有真菌、细菌、藻类、植物的悬浮细胞、组织或器官及动物的细胞、组织等。在穿心莲二萜内酯类的转化中,目前的研究主要涉及到微生物转化、药物代谢相关的转化和毛状根转化。

2.1 微生物转化体系 微生物转化是利用微生物作用进行某种化学反应,更确切地说是利用微生物代谢过程中产生的酶使底物进行有机反应。微生物转化可用完整的微生物细胞或从微生物细胞中提取的酶作为生物催化剂,其区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低和公害少,且能完成一些化学合成难以进行的反应。

He等^[8]用赫曲霉菌 *Aspergillus ochraceus* 对穿心莲内酯进行生物转化,得到8 β -羟基-8(17)-二氢穿心莲内酯、8 β -羟基-8(17)-二氢-14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯、8 β -羟基-8(17)-二氢-14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯酸、14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯及14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯酸5个转化产物,其中14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯为主产物;利用葡茎根霉菌 *Rhizopus stolonifer* 对穿心莲内酯进行转化,分离得到了12(R),13(R)-12-羟基穿心莲内酯、12(S),13(S)-12-羟基穿心莲内酯、异穿心莲内酯、3-脱氢异穿心莲内酯、14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯、3-脱氢-14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯、3-脱水穿心莲内酯、14-去氧穿心莲内酯、3-去氧-14-去氧穿心莲内酯及3-去氧-14-去氧穿心莲内酯酸10个转化产物^[9]。

Chen等^[15]对新穿心莲内酯进行微生物转化研究,从黑曲霉 *Aspergillus niger* 发酵液中,共分离获得新穿心莲内酯苷元酸、新穿心莲内酯苷元、18-羟基新穿心莲内酯苷元酸、3 α -羟基新穿心莲内

酯苷元酸及8 β -羟基-8(17)-二氢新穿心莲内酯苷元5种转化产物。Wang等^[16]利用刺囊毛霉 *Mucor spinosus* 对新穿心莲内酯进行转化,分离得到了14-去氧穿心莲内酯、3,14-二去氧穿心莲内酯和7 β -羟基-二去氧穿心莲内酯等10个转化产物。

Xin等^[20]利用 *Cunninghamella elegans* 对脱水穿心莲内酯的9位碳具有较好的专一性转化,得到了3-氧代脱水穿心莲内酯、3-氧代-2 β -羟基-脱水穿心莲内酯、3-氧代-8 β ,17 α -环氧脱水穿心莲内酯等4个转化产物;利用 *Cunninghamella echinulata* 得到了9 β -羟基脱水穿心莲内酯、3-氧代-羟基脱水穿心莲内酯、3-氧代-9 β -羟基脱水穿心莲内酯、7 α -羟基脱水穿心莲内酯及8 β ,17 α -环氧脱水穿心莲内酯5个转化产物^[21]。

Xin等^[24]利用 *Fusarium graminearum* 对去氧穿心莲内酯进行生物转化得到了3-氧代-8 α ,17 β -环氧-14-去氧穿心莲内酯、3-氧代-14-去氧穿心莲内酯及7 β -羟基-14-去氧穿心莲内酯5个转化产物。Deng等^[25]利用 *Cunninghamella blakesleana* 对去氧穿心莲内酯进行生物转化,得到3-氧代-1 β -羟基-14-去氧穿心莲内酯及3-氧代-2 β -羟基-14-去氧穿心莲内酯等一系列结构类似物。Li等^[26]利用20种来自9个属的丝状真菌对去氧穿心莲内酯进行转化,发现 *Cunninghamella echinulata* 能将去氧穿心莲内酯转化为3-氧代-7 α -羟基-14-去氧穿心莲内酯、3-氧代-8 β ,17 α -环氧-14-去氧穿心莲内酯、8 α -甲酰基-14-去氧穿心莲内酯及8 β -甲氧基-17 α -羟基-14-去氧穿心莲内酯等11个转化产物。Xin等^[27]利用 *Alternaria alternata* 对去氧穿心莲内酯进行转化,得到脱水穿心莲内酯、9 β -羟基脱水穿心莲内酯和3-氧代-9 β -羟基-去氧穿心莲内酯5个转化产物。

Chen等^[22]利用短刺小克银汉霉 *Cunninghamella blakesleana* 对脱水穿心莲内酯和去氧穿心莲内酯进行转化,得到3-氧代-8 α ,17 β -环氧-14-去氧穿心莲内酯及9 β -羟基-14-去氧穿心莲内酯等16种转化产物。

穿心莲二萜内酯类的微生物转化所需菌株也可以从土壤中获得:李合平等^[28]从土壤中分离到一株能将穿心莲内酯转化为脱水穿心莲内酯的菌株,收率为70.1%,经鉴定为变形斑沙雷菌(*Serratia proteamaculans*)。

目前已发现的能成功转化穿心莲二萜内酯类的真菌主要集中在半知菌纲的黑曲霉(*Aspergillus niger*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)及接合菌纲的刺孢小克银汉霉(*Cunninghamella echinulata*)、短刺小克银汉霉(*Cunninghamella blakesleana*)和匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)。目前已经报道的能对二萜类化合物进行转化的微生物有担子菌纲的黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)^[29]、子囊菌纲的维氏核盘菌(*Whetzelinia sclerotiorum*)^[30]及放线菌纲的链霉菌(*Streptomyces* NRRL 5690)^[31]等,这些真菌也可以尝试作为穿心莲二萜内酯类的转化筛选模型^[32]。

2.2 药物代谢相关的转化体系 药物进入机体后受机体作用而发生结构变化即代谢转化。其药理活性及其毒副作用均与药物的代谢转化密切相关。因此开展药物代谢转化的研究在新药研究中占有重要的地位。

肠内菌生物转化是以人肠内菌群为对象的研究体系,适合模拟药物在人肠内的代谢及其吸收机制的阐释,在此层面上,研究药物的肠内菌生物转化,将更具价值和意义。因此本文将肠内菌转化与一般的微生物转化进行分别叙述。杨秀伟^[33]研究了人肠内菌对穿心莲内酯和新穿心莲内酯的生物转化,发现短乳杆菌和人肠内混合菌均可以把穿心莲内酯转化为包括脱水穿心莲内酯在内的 3 种产物,新穿心莲内酯可被肠内菌转化为 3,14-二去氧穿心莲内酯及 3,14-二去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯。这些研究结果对了解穿心莲二萜内酯类在体内的变化规律及其代谢途径提供了实验依据。此外,肠内菌转化还可以作为阐释穿心莲二萜内酯类在动物体内作用机制的辅助工具。

中药血清药物化学是以药物化学的研究手段和方法为基础,综合运用多种现代技术,鉴定分析中药内服后血清中的转运成分,研究其药效相关性,确定中药药效物质基础并研究其体内过程的应用学科。传统中药多为内服给药,内服给药后药物成分或经过消化道直接吸收入血或以其他方式转化入血,因而给药后的血清才是真正起作用的“制剂”,血清中含有的成分才是中药的体内直接作用物^[34]。因此,血清药物化学研究成为一种有效的中药及其复方的体内代谢及转化的研究方法。刘开永等^[35]以鸡为

研究对象对穿心莲的血清药物化学进行初步研究,内服给药后在 60 min 时有 9 个组分在血中出现;其中有 4 个主要成分(穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯)来源于原药并在给药后 0~480 min 内维持较高浓度,其余的组分可能是代谢产物。

肝微粒体法以其操作简便、代谢条件易于控制及在-40℃可长期贮存等特点广泛应用于药物的体外代谢研究。Zhao 等^[36]在体外比较研究了穿心莲内酯在来自人、犬和大鼠 3 种不同种属肝脏肝微粒体的主要代谢转化途径及稳定性,共得到了 8 个 I 相和 5 个 II 相的脱水、脱氧、加氢和葡萄糖醛酸化产物。其中,脱水反应在 3 个体系中均有发生,而脱氧穿心莲内酯及相关的葡萄糖醛酸化产物只在人的肝微粒体转化中发现。此外,代谢产物在 3 种肝微粒体中的稳定性研究表明:大鼠的肝固有清除率高于人和狗。

2.3 毛状根转化体系 此外,还有关于利用毛状根系统对穿心莲内酯的转化筛选研究:邱立鹏^[37]利用发根农杆菌 LBA9402 对何首乌毛状根进行诱导、筛选、累积并建立了悬浮培养优良体系,并利用该毛状根系统进行了穿心莲内酯生物转化的初步实验,通过薄层色谱和高效液相色谱检测方法证实,毛状根可以对穿心莲内酯进行转化。用毛状根作为催化系统进行的生物转化反应,具有生长快速、加倍时间短、遗传和生化稳定的特点。这一发现启示我们:可以利用毛状根系统对另外几种穿心莲二萜内酯进行转化筛选,有望得到活性较好的新衍生物。

同一底物可以被不同的转化体系所转化,所得转化产物的种类与含量也有所不同,微生物转化所得的转化产物结构较多样化,转化所涉及的反应类型较多;肠道菌转化可以在一定程度上模拟药物在人肠内的代谢及其吸收,对研究药物体内作用机制的阐释有一定的指导意义;同一个微生物反应体系可以转化不同的底物:*Cunninghamella blakesleana* AS 3.970 既能转化去氧穿心莲内酯又能转化脱水穿心莲内酯。转化反应能否进行,一方面可能与底物本身的结构特点有关;另一方面可能与菌株在培养过程中产生的能催化底物转化的酶系统有关。关于 4 种穿心莲二萜内酯生物转化的反应体系及反应类型总结见表 1。

表 1 四种穿心莲二萜内酯生物转化的反应体系及反应类型总结
Tab 1 Biotransformation reaction systems and reaction types of four principal ent-labdane diterpenoid lactones of *A. paniculata*

Substrate	Systems of reaction	Types and locations of reaction
Andrographolide	Microorganisms <i>Aspergillus ochraceus</i> ^[8-9] <i>Rhizopus stolonifer</i> ^[9] <i>Serratia proteamaculans</i> ^[28] Metabolism relevant Lactobacillus brevis, human intestinal bacteria ^[33] Chicken serum ^[35] Liver microsomes from humans, dogs and rats ^[36] Others Hairy roots of <i>Polygonum multiflorum</i> ^[34]	Addition reaction (12,13-C=C-, 8,17-C=C-) Climation reaction(13,14) Oxidation reaction (3,14-OH→=O,19-CH ₂ OH→-COOH) Reduction reaction(16=O→-OH)
Neo-andrographolide	Microorganisms <i>Aspergillus niger</i> AS 3.739 ^[15] <i>Mucor spinosus</i> AS 3.2450 ^[16] Metabolism relevant Human intestinal bacteria ^[33]	Hydrolysis reaction (glycosidic bond) Hydroxylation(2,3,7) Epoxidation(8,17-C=C-) Addition reaction(8,17-C=C-) Oxidation reaction(19-CH ₂ OH→-COOH)
Dehydro-andrographolide	Microorganisms <i>Cunninghamella elegans</i> ^[20] <i>Cunninghamella echinulata</i> ^[21] <i>Cunninghamella blakesleana</i> ^[22]	Hydroxylation(2,7,9) Epoxidation(8,17-C=C-) Addition reaction(11,12-C=C-) Oxidation reaction(3-OH→=O)
Deoxy-andrographolide	Microorganisms <i>Fusarium graminearum</i> ^[24] <i>Cunninghamella blakesleana</i> ^[25] <i>Cunninghamella echinulata</i> ^[26] <i>Cunninghamella blakesleana</i> ^[22] <i>Alternaria alternata</i> ^[27]	Hydroxylation(1,2,7,9) Epoxidation(8,17-C=C-) Addition reaction(8,17-C=C-,13,14-C=C-) Oxidation reaction(3-OH→=O)

3 转化产物的的构效关系研究

穿心莲内酯的转化产物 **1a**、**1b**^[8-9]、脱水穿心莲内酯的转化产物 **4a**、**4b**、**4c**^[21] 及去氧穿心莲内酯的转化产物 **2a**、**2b**、**2c**^[26] 较底物具有较高的抑制肿瘤

细胞生长的活性;新穿心莲内酯的转化产物 **3a**^[16]、去氧穿心莲内酯的转化产物 **2d**、**2e**、**2f**、**2g**^[22,24-25] 及脱水穿心莲内酯的转化产物 **4d**、**4e**、**4f**^[22] 具有较高的抗炎活性。这些化合物的结构式见图 2。

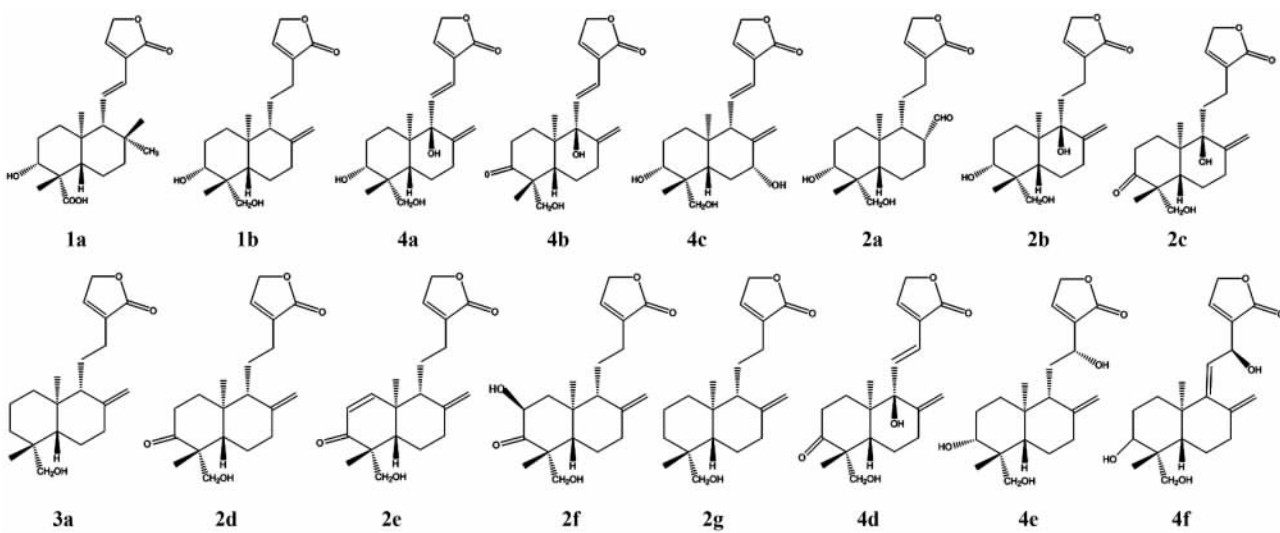


图 2 四种穿心莲二萜内酯转化产物的结构式

Fig 2 Structures of biotransformed products of four principal-ent-labdane diterpenoid lactones of *A. paniculata*

由此可以看出,就抗肿瘤活性而言,3-OH的氧化、二萜环上7-OH或9-OH的引入、14-OH的存在或被氧化及8,17-C=C的氧化可增强抗肿瘤活性;对穿心莲二萜内酯类衍生物的抗炎活性的研究发现:3-OH被氧化或消除可增强抗炎活性,二萜环上-OH的位置与个数均可影响其抗炎活性;二萜环上羟基或羰基的引入均可以使其抗炎活性及抗肿瘤活性增强。这与Nanduri等^[3]的发现一致。因此,选择具有催化二萜环上特定位置羟化或氧化反应的酶的生物转化体系,并通过对转化方法及条件的优化,最大程度地得到活性更好的穿心莲二萜内酯类衍生物,进而实现工业化生产,将具有非常可观的经济和社会效益。

生物转化催化的多样性可大大丰富穿心莲二萜内酯类的化学结构,但目前大部分穿心莲二萜内酯类的生物转化研究仍停留在实验室的新反应发现和筛选研究的初级阶段,将来的研究要在寻找新的转化模型筛选的同时,重视对重要的反应进行深入研究,比如加深对反应机制、酶的底物选择性及立体选择性等性质的规律性研究,建设完备的转化酶与底物的数据库,进而运用酶的定向进化技术获得高效的生物催化剂,并综合运用酶的基因克隆、菌种改良、并结合发酵工程、固定化技术、基因重组技术,不断提高微生物转化效果,缩短这些转化体系与真正的工业化生产应用之间的距离。随着转化体系研究的累积和深入,生物转化工业也必然迎来新的突破。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Handa S, Sharma A. Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbontetrachloride[J]. Indian J Med Res, 1990, 92: 276.
- [2] Puri A, Saxena R, Saxena R P, Saxena K C, Vandita S, Tandon J S. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*[J]. J Nat Prod, 1993, 56: 995-999.
- [3] Nanduri S, Nyavanandi V K, Thunuguntla S S R, Kasu S, Pallerla M K, Ram P S, et al. Synthesis and structure-activity relationships of andrographolide analogues as novel cytotoxic agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14: 4711-4717.
- [4] Loughlin W A. Biotransformations in organic synthesis[J]. Bioresource Technol, 2000, 74: 49-62.
- [5] Rozzell J D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities[J]. Bioorgan Med Chem, 1999, 7: 2253-2261.
- [6] Sebek O K. Notes on the historical development of microbial transformations[J]. Comb Chem High T Scr, 1982, 1: 1.
- [7] Srivastava A, Misra H, Verma R K, Gupta M M. Chemical fingerprinting of *Andrographis paniculata* using HPLC, HPTLC and densitometry[J]. Phytochem Analysis, 2004, 15: 280-285.
- [8] He X, Wang Y, Hu H, Wu Y, Zeng X. Novel bioconversion products of andrographolide by *Aspergillus ochraceus* and their cytotoxic activities against human tumor cell lines[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2011, 68: 89-93.
- [9] He X, Zeng X, Hu H, Wu Y. Cytotoxic biotransformed products from andrographolide by *Rhizopus stolonifer* ATCC 12939[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2010, 62(3-4): 242-247.
- [10] Batkhuu J, Hattori K, Takano F, Fushiya S, Oshiman K, Fujimiya Y. Suppression of NO production in activated macrophages *in vitro* and *ex vivo* by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25: 1169-1174.
- [11] Wiart C, Kumar K, Yusof M Y, Hamimah H, Fauzi Z M, Sulaiman M. Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1[J]. Phytother Res, 2005, 19: 1069-1070.
- [12] Kamdem R E, Sang S, Ho C T. Mechanism of the superoxide scavenging activity of neoandrographolide - a natural product from *Andrographis paniculata* nees[J]. J Agr Food Chem, 2002, 50: 4662-4665.
- [13] Kapil A, Koul I B, Banerjee S K, Gupta B D. Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*[J]. Biochem Pharmacol, 1993, 46: 182-185.
- [14] Basak A, Cooper S, Roberge A G, Banik U K, Chretien M, Seidah N G. Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpenes of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters[J]. Biochem J, 1999, 338(Pt 1): 107.
- [15] Chen L X, Qiu F, Qu G X, Yao X S. Microbial transformation of neoandrographolide by *Aspergillus niger*

- (AS 3, 739) [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9: 463-469.
- [16] Wang Y, Chen L, Zhao F, Liu Z, Li J, Qiu F. Microbial transformation of neoandrographolide by *Mucor spinosus* (AS 3, 2450) [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2011, 68: 83-88.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1.
- [18] Ajaya Kumar R, Sridevi K, Vijaya Kumar N, Nanduri S, Rajagopal S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 92: 291-295.
- [19] Panossian A, Hovhannisyan A, Mamikonyan G, Abrahamian H, Hambardzumyan E, Gabrielian E, et al. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7: 351-364.
- [20] Xin X L, Ma X C, Zhang B J, Su D H, Wu Z M, Wang X J, et al. Microbial transformation of dehydroandrographolide by *Cunninghamella elegans* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11: 187-191.
- [21] Xin X, Su D, Wang X, Yuan Q. Microbial transformation of dehydroandrographolide by *Cunninghamella echinulata* [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, 59 (1-3): 201-205.
- [22] Chen L X, Zhuang Y L, Shen L, Ma E L, Zhu H J, Zhao F, et al. Microbial transformation of 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide and 14-deoxyandrographolide and inhibitory effects on nitric oxide production of the transformation products [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2011, 72(3-4): 248-255.
- [23] Zhang C, Tan B. Effects of 14-deoxyandrographolide and 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide on nitric oxide production in cultured human endothelial cells [J]. *Phytother Res*, 1999, 13: 157-159.
- [24] Xin X L, Cui X, Wang C, Zhang B, Ma X, Huang S, et al. Microbial transformation of deoxyandrographolide by *Fusarium graminearum* AS 3, 4598 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13: 350-355.
- [25] Deng S, Zhang B J, Wang C Y, Tian Y, Yao J H, An L, et al. Microbial transformation of deoxyandrographolide and their inhibitory activity on LPS-induced NO production in RAW 264. 7 macrophages [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 1615-1618.
- [26] Li F Y, Cang P R, Huang S S, Zhang J B, Xin X L, Yao J H, et al. Microbial transformation of deoxyandrographolide by *Cunninghamella echinulata* [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2011, 68: 187-191.
- [27] Xin X, Deng S, Zhang B, Huang S, Tian Y, Ma X, et al. Microbial transformation of deoxyandrographolide by *Alternaria alternata* AS 3, 4578 [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6: 781-784.
- [28] 李合平, 许东升, 徐海伟, 刘宏民. 微生物转化法制备脱水穿心莲内酯 [J]. *中国药科大学学报*, 2008, 39: 479-480.
- [29] Simeo Y, Sinisterra J. Biotransformation of terpenoids: a green alternative for producing molecules with pharmacological activity [J]. *Mini-Rev Org Chem*, 2009, 6: 128-134.
- [30] Chen A R M, Ruddock P L D, Lamm A S, Reynolds W F, Reese P B. Stemodane and stemarane diterpenoid hydroxylation by *Mucor plumbeus* and *Whetzelinia sclerotiorum* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1898-1902.
- [31] Peng J, Kasanah N, Stanley C E, Chadwick J, Fronczek F R, Hamann M T. Microbial metabolism studies of cyanthiwigin B and synergetic antibiotic effects [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 727-730.
- [32] 张翔, 胡昌华. 二萜类化合物微生物转化研究进展 [J]. *化学工程与装备*, 2010(5): 115-118.
- [33] 杨秀伟. 穿心莲内酯类化合物的肠吸收研究 [A] // 第八届全国中药和天然药物学术研讨会与第五届全国药用植物和植物药学术研讨会论文集 [C]. 2005.
- [34] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究 [J]. *世界科学技术: 中药现代化*, 2002, 4: 1-4.
- [35] 刘开永, 高海, 黄显会, 贺利民, 陈建新, 陈杖榴, 等. 穿心莲在鸡中血清药物化学初步研究 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42: 3320-3327.
- [36] Zhao H, Hu H, Wang Y. Comparative metabolism and stability of andrographolide in liver microsomes from humans, dogs and rats using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *Rapid Commu Mass Sp*, 2013, 27: 1385-1392.
- [37] 邱立鹏. 转基因何首乌毛状根诱导和培养及其代谢产物的初步研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.