

冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 研究中 几个值得关注的问题

梁宗琦* 韩燕峰 梁建东 董旋 杜文

(贵州大学真菌资源研究所 贵州 贵阳 550025)

摘要: 扼要概述和讨论了冬虫夏草与寄主的关系, 种的遗传变异、隐蔽种及伴生菌复合体, 高活性产物的体细胞杂交方法及固体人工培养和产品标准等方面的一些新的研究动态。

关键词: 冬虫夏草, 共生, 体细胞杂交, 遗传变异性, 质量标准, 活性成分

Issues of Concern in the Studies of *Ophiocordyceps sinensis*

LIANG Zong-Qi* HAN Yan-Feng LIANG Jian-Dong DONG Xuan DU Wen

(Institute of Fungus Resources, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Some new progress about *Ophiocordyceps sinensis* were summarized and discussed, including the relationship between *Ophiocordyceps sinensis* and its host; genetic variation, cryptic species and associated species; somatic hybridization of high active compounds; its artificial culture and product standards and so on.

Keywords: *Ophiocordyceps sinensis*, Symbiosis, Somatic hybridization, Genetic variability, Quality standards, Bioactive compounds

在古代, 青藏高原上的牦牛放牧人惊讶地发现, 每年开春后, 牦牛啃吃了冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (图 1) 就会变得兴奋激动。从那时起人们开始了寻求用这种真菌来处理肾、肺、心脏和男女性功能障碍等方面的疾病。经过几个世纪先民的不断应用总结, 冬虫夏草已成为著名的传统中药材之一。但西方人在最近 20 年才真正开始关注冬虫夏草的药用价值, 作为补充药物使用在西方已有明显增加^[1-2]。随着人们对冬虫夏草需求日益扩大, 它在资源利用、生产开发、质量标准及其在医药和功能食

品上的应用受到了更多的关注。本文拟就近年一些研究新动向做一扼要概述。

1 冬虫夏草是寄生物或是共生物?

人们的研究已观察到, 蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link、小蝉草 *Cordyceps sobolifera* Berk. & Broome 和冬虫夏草在寄主体内和人工培养时都有酵母状细胞的生长阶段^[3-4]。这种虫草属的类酵母形态也在其他昆虫中被发现。Suh 等经核糖体 RNA 的大亚基和小亚基基因分析观察到, 3 种叶蝉的内共生真菌都与虫草属的一些种聚在一个进化分支中,



图1 冬虫夏草子实体

Fig. 1 Fruitbody of *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

它们不是真正的酵母菌。叶蝉的酵母状内共生真菌 (YLS) 尚未发现能在自然界自由生活, 它们都存在于寄主的脂肪体内, 通过卵巢而传递给子代。酵母状内共生真菌显然和宿主是一种专性联合体。在这个体系中 YLS 利用甾醇, 并帮助寄主进行氮循环。与寄生真菌子实体的大团囊虫草 *Elaphocordyceps ophioglossoides* (Ehrh.) G.H. Sung, J.M. Sung & Spatafora 和头状虫草 *E. capitata* (Holmsk.) G.H. Sung, J.M. Sung & Spatafora 相比, YLS 应该是进化更晚, 因它们在菌生虫草之后才分歧分化^[3]。

基于以上的一些研究成果, 有研究者提出, 子囊孢子虽是冬虫夏草入侵寄主昆虫的感染单元, 但冬虫夏草与寄主主要是致病性的关系值得怀疑。他们认为, 冬虫夏草和寄主昆虫是一种共生关系, 它们之间是互利的, 而不是致病性的。在昆虫和真菌的这种独特的共生体中, 寄主昆虫借生活在体内的冬虫夏草获得能量^[1]。在自然界, 一些胁迫因子, 如温暖和严寒、火灾和水灾、营养缺乏或饥荒, 能触发冬虫夏草-寄主昆虫共生体中冬虫夏草子实体的形成。

在自然界中, 冬虫夏草子实体形成常与寄主蝙蝠蛾羽化同步; 不同种群冬虫夏草的寄主有明显的遗传差异; 广谱寄生的蛹虫草子实体形成则与寄主化蛹同步。这些现象是巧合或是协同发育? 寄主昆虫在冬虫夏草子实体形成中可能起到的重要作用^[5]。可以假设, 冬虫夏草在子实体形成时会插入一些昆虫的 DNA 片段; 而当孢子形成或分离菌丝体培养时, 插入的序列片段会丢失。人工分离菌种产子实体能力的退化可能与此有关。如果这些推断最终证明是真实的, 现行冬虫夏草人工培养的理念将

受到冲击, 人工成功培养冬虫夏草子实体的新途径亦可能出现! 寄主昆虫和一些虫草的协同发育不仅表现在形态发生和子实体的建成方面。其他研究还观察到, 冬虫夏草的生物活性物质在子座和内菌核部分是不同的; 如子座有绝育功能, 内菌核则无; 蝉花子座麦角甾醇含量明显高于内菌核; 在降血糖作用上子座和内菌核也有差异^[2]。

经微循环产孢观察和 nrDNA 序列分析提供的证据已表明, 冬虫夏草的无性型是中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* X.J. Liu, Y.L. Guo, Y.X. Yu & W. Zeng^[6-10]。但在实际工作中, 人们也常从冬虫夏草子实体中分离到其他真菌。迄今, 分离自冬虫夏草和与其无性型相关的真菌已涉及十几个属的数十种真菌^[11-13]。其中, 一些真菌的药理作用和某些化学组分与冬虫夏草相近; 并在 nrDNA 分子特征上也具有相似性^[13-15]。因此有人认为, 在天然冬虫夏草中除了中国被毛孢之外, 还存在着内寄生菌、伴生菌或共生菌^[15-16]。Zhu 等用 MassArray 遗传分析系统单核苷酸多态性基因型分析确证, 在野生冬虫夏草子座中存在 GC-和 AT-碱基基因型的转换突变。在未成熟的野生冬虫夏草中, AT-碱基基因型在寄主昆虫中不表达, 但在子座中却高度显性; 相反, 在未成熟的野生冬虫夏草中 GC-碱基基因型表达。蝙蝠蛾拟青霉 *Paecilomyces hepiali* Q.T. Chen & R.Q. Dai ex R.Q. Dai, X.M. Li, A.J. Shao 等的 rDNA 也会伴随子座的成熟而增加。基于这些观察结果他们提出, 野生冬虫夏草随高原环境、温度的变化而成熟时, 不同发育阶段的虫体和子座内的不同真菌(包括蝙蝠蛾拟青霉)的 GC-和 AT-碱基基因型, 会出现种内突变的动态变化, 这些变化可能在野生冬虫夏草子座

发生和成熟中起重要的作用,并导致了野生冬虫夏草多种治疗效果^[15]。这种将野生冬虫夏草作为一个统一的微生态系统,基于基因水平上的动态变化,探索研究冬虫夏草及其相关真菌在子实体形成中的相互作用和治疗效果多养性的关系^[13-15],是一个有趣的研究思路。

2 冬虫夏草的遗传变异性及杂交育种

2.1 种内遗传变异性与隐蔽种

青藏高原幅员广阔,人们采集到的标本都有不同程度的差异。它们是不同的种或是种内的遗传变异性?或是隐蔽种?早在上世纪90年代末,陈永久等人对来自青藏高原3个区域5个具代表性地方的冬虫夏草标本进行了DNA随机扩增多态(RAPD)分析^[17]。他们的实验结果表明,来自同一地方样本间的遗传差异甚微,而同一区域不同地方样本间的遗传差异较大,不同区域样本间遗传差异最大。地理群体间的遗传差异度与地理距离呈正相关。Kinjo & Zang 和 Chen 等用从我国西南不同地点采集到的冬虫夏草标本,结合从GenBank获得的序列一起进行系统发育分析,获得了与前述工作者不完全一致的结论^[18-19]。不同地理来源的冬虫夏草其ITS序列具有高度的同源性,其序列间的距离值差异小于0.03。由于nrDNA-ITS序列具有高的物种专一性,用它来揭示冬虫夏草种群间的遗传变异性有其局限性。近年,一些研究者就采用了其他分子标记,如ISSR、MAT1-2-1、MAT1-2-1与nrDNA-ITS组合和NPS来更好地揭示冬虫夏草的遗传变异性^[15,20-22]。

基于形态特征和ISSR标记用来自青海和国内冬虫夏草主要产区的18个种群的180样品,梁洪卉等人分析了Shannon多样性指数、Nei遗传距离、总基因变异、种群内基因变异、基因分化系数(GST)和基因流(Nm)等遗传变异性指标后认为,冬虫夏草的遗传变异性不高,大多数ISSR变异是存在于很少基因交换的种群中。基于遗传距离,18个种群可分成5个组,它们与地理分布的高度梯度有相关性。在GST和Nm值上存在的明显差异显示出,冬虫夏草种群间的遗传分化是不同地理来源和寄主昆虫共同影响的结果。他们实验表明,来自青海省38°01'N-32°55'N不同纬度范围的冬虫夏草种群,具有较高的遗传多样性,建议可作为原地资源保护中心^[21]。继后,Zhang等用nrDNA ITS和MAT1-2-1

两个基因序列,评估了来自青藏高原不同地域的11个种群的56个冬虫夏草标本及其分离体后则认为,冬虫夏草存在着明显的遗传分化。以林芝地区为中心,北部地区的分离株聚集为一个进化分支,来自南部地区的分离体则分配到了4个进化分支。南部分离体的遗传变异性远比北部的大。基于nrDNA ITS序列展现的多态性,提出了林芝地区是冬虫夏草起源的中心。有可能冬虫夏草先在南部地区扩散,而后借助印度洋季风通过雅鲁藏布江大峡谷再向北扩散。他们同样提出,独特的地理环境和广谱的寄主是导致冬虫夏草种内遗传多样性的主要因素^[22]。

在冬虫夏草的种群内是否存在隐蔽种?目前尚有不同看法。Stensrud等用来自GenBank/EMBL的71条冬虫夏草的ITS序列进行分析,结果以高的支持率将全部系列分成了3个进化分支。其中,有的5.8S序列显示了快速的替换率和高高的AT碱基偏好性。他们认为,其原因可能是由于生活史或生态学特性的改变引起^[23]。这是否也意味着一些常用冬虫夏草冠名的虫草标本,有可能是虫草属中的隐蔽种。但Xiao等用分别来自中国川和青海两省单株冬虫夏草子实体为材料,基于rDNA-ITS序列分析研究后提出,研究材料中一些差异大的标本很可能是属于其他属的真菌,而非冬虫夏草的隐蔽种^[24]。

上述不同结果出现的原因有多种。除研究标本数量、标本是否经正确鉴定以及冬虫夏草自身的遗传变异性外,在DNA分析中的其他多种影响因素也不容忽视,如使用了鉴定有误或受污染的样品、有问题的试剂、以及被测真菌样品中所含的某些次生代谢产物都会对结果产生影响,甚至导致错误的结论^[25-26]。

2.2 冬虫夏草的杂交育种

有关冬虫夏草杂交育种的报道尚不多见。Holliday等为获得高生物活性物质的菌株,用纯菱形斑响尾蛇*Crotalus satrox*毒液作诱变剂,对冬虫夏草进行了体细胞融合杂交^[27]。

2.2.1 培养基: Aloha公司的R7琼脂(麦芽浸出物50g,腐殖质10g,活性炭5g, MgSO₄ 1g, 1% KOH溶液10mL,琼脂34g,响尾蛇毒液10-30mg/300mL)。

2.2.2 体细胞融合杂交方法: 在含蛇毒的培养基上相对接种2株欲杂交的虫草菌株。生长接触后形成抗衡带。在含有蛇毒的培养基中,抑制作用是短暂

的, 仅2-3 h后每菌株都会向抗衡带长出菌丝, 并通过蛇毒影响的细胞壁交换核物质。

2.2.3 假定杂种的确证: 仔细将假定杂种从亲本菌株刚融合的抗衡带移出。将假定杂种菌株和两亲本菌株分别移于不含蛇毒的同一平板上, 若杂交成功并获得了真正的杂种, 3个菌落间都将出现明显抗衡带。

除杂交育种外, 有人改变培养方法也可获得一些有趣的化合物。如基质或培养容器中的空气含硫高, 则形成含硫的多糖。此物质可开发作为抗真菌和抗病毒的制剂。将冬虫夏草培养在含有巧克力牛奶和一个单独的鲑鱼粉培养基上, 结果也可产生了一些十分独特的化合物^[27]。

3 冬虫夏草的人工培养及质量标准

3.1 冬虫夏草的培养基培养

冬虫夏草人工接种培养实验已进行多年^[21]; 用冬虫夏草无性型菌株低温发酵培养则已工业生产。而在固体培养基上培养则报道不多。在美国和日本常用大米于塑料袋和玻璃瓶中培养虫草。经检测大米培养基能产生阻碍生长的代谢产物, 在这种培养基上腺苷和虫草菌素含量都很低。生长期大约22-24 d, 其菌丝的生物转化率最多40%^[27]。在中国蚕蛹粉是一种常用的廉价基质, 也可获得高质量的产品。

燕麦比大米更有利于形成高质量的活性物质, 若添加植物油效果更佳。其缺点是, 燕麦可带给产品其他气味, 而把虫草特有的味道掩盖。小米是一种理想的基质, 它没有强烈的气味、不阻碍菌的生长并有利于活性物质的形成。缺点是小米含有较高的粘性物质, 这类物质在灭菌后使培养基变得很粘, 易导致厌氧菌的污染。白高粱(White milo grain)也叫白卡菲玉米(White kaffir corn), 是一种很好的基质。它不阻碍菌的生长和活性组分的形成, 且不影响虫草的风味。但单独使用白高粱不能完全满足虫草的生长, 若在4份白高粱中加入1份小米, 可提高生长速度6倍。在此培养基上, 虫草生长时间较长, 菌丝的生物转化率能达到96%以上, 基质的残留物仅3%-4%, 且能较好地形成生物活性物质。有趣的是, 若混入少量红高粱于其中, 就会明显降低生长并全面影响产品质量^[27]。

3.2 冬虫夏草的质量标准

目前对虫草质量的评估, 有的分析甘露醇、有的分析腺苷、有的分析多糖, 有的分析其他化合物, 致使质量标准混乱, 质量监控十分困难。当前, 如何选取一种(或某几种)特征性的生物活性物质作为质量控制标准并建立一种有效的分析方法及程序就显得十分重要。已知, 脱氧腺苷在其他真菌中目前很少发现。Holliday等研究提出, 脱氧核苷是虫草中具特色的功能性组分; N⁶-二羟乙基腺苷是另一个具活性的物质。连同腺苷和脱氧核苷一起, 此3种化合物可用作虫草不同菌株和生产方法的定性和定量质控标准。上述具重要生物活性意义的化合物, 统称为羟乙基腺嘌呤核苷类物质(Hydroxyethyl adenosine analogs, HEAA)^[27]。

用高效液相色谱(HPLC)/气相色谱(GC)分析HEAA的含量是一个比测定多糖更好的定性指标。在国内有研究者提出除腺苷类物质外, 甾醇也应是冬虫夏草重要的活性成分^[28-29]。

4 冬虫夏草新发现的活性成分及其药理作用

关于虫草的药理和药化研究的国内外进展已有较多的报道^[30-31]。最新研究再次表明, 分离自野生冬虫夏草微生态系的一些真菌具有抗菌、抗肿瘤和抗HIV活性的新化合物^[13]。其他, 有关冬虫夏草(包括野生冬虫夏草产品、从这个产品上分离的中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉等)在提高免疫力、抗菌、抗癌和补肾等功能性物质的一些研究报道, 对方兴未艾的冬虫夏草微生态学和真菌药物开发尚有重要参考意义。

4.1 多糖

用冬虫夏草深层发酵制备的多糖对人外周血液免疫调节活性的实验结果显示, 0.025-0.1 g/L的胞外多糖诱导了肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL)-6和IL-10的形成^[32]。Yoon等从冬虫夏草深层培养液中提取的胞外多糖, 通过静脉注射(100 μ g/鼠)观察了自然杀伤细胞对癌细胞Yac-1的作用^[33]。此外, 从人工培养菌丝中提取的多糖有降血糖和明显降血脂的作用。野生冬虫夏草子实体饲喂实验动物的胸腺重量明显增加; 而饲喂僵虫部分则肾脏重量有明显增加。子实体部分也能控制实验

动物因糖尿病引起的体重下降、口渴和高血糖症^[34]。

4.2 腺苷

已知,冬虫夏草人工培养菌丝体的浸出物对豚鼠离体右心房有负收缩效应,而对回肠的收缩及人血小板的凝集有抑制作用^[29]。近年的研究发现,冬虫夏草还产生一些其他的有趣的核苷,如 2',3'-脱氧腺苷,在美国已作为处理艾滋病的药物(名为 Didanosine)。此外,还有几个脱氧尿嘧啶核苷的衍生物也受到关注^[27]。

4.3 甾醇

上世纪后期的研究已发现,冬虫夏草产生的几种甾醇及其葡萄糖甙衍生物对 K562 (红白血病), Jurkat (T-成淋巴细胞)、HL-60 (骨髓细胞白血病)、WM1341 (恶性黑素瘤)和 RPMI8226 (多发性骨髓瘤)等多种恶性肿瘤细胞有明显抑制作用^[35]。从冬虫夏草甲醇粗提物分离提纯的甾体 H1-A,在抑制肾小球膜细胞增殖、缓解拜杰氏肾病(Berger's disease)及防治出现尿毒症和蛋白尿上也有作用^[36]。近年的研究进一步发现,麦角固醇酯在僵虫部分的浓度明显高于子实体。虫草降血糖的作用子实体也明显高于下部的僵虫。在蝉花中,虫体和子座的甲醇萃取物对人单核细胞增生的作用也不完全一样^[2]。

4.4 活性蛋白

Hsu 等研究发现,冬虫夏草提取物中含有一种水溶性蛋白 F2、水溶性小的多糖和蛋白 F3。它们都能显著地刺激小鼠体外培养的睾丸间质细胞产生睾酮^[37]。这意味着冬虫夏草可能有望作为男性睾酮水平低引发产生的生殖问题的替代治疗药物。继后,有研究者又从冬虫夏草的培养菌丝体中,分离到另一种有抗菌活性的蛋白 CSAP,此蛋白是单链,通过 SDS-PAGE 测定分子量为 35000 D,具有一个有趣的疏水的 N-末端序列。抗菌试验表明,此蛋白能明显抑制革兰氏阳性和阴性细菌的生长,但对丝状真菌和酵母菌无作用,这是首次报道来自冬虫夏草的真菌中含有抗菌蛋白^[38]。

虽然,冬虫夏草活性组分及药理作用研究多有报道,但对一些重要基因的分子克隆研究,目前仅见于 Zhang 等的工作^[39]。他们首次从冬虫夏草中克隆了 2 个降解昆虫体壁的丝氨酸蛋白酶基因(csp1 和 csp2),并在酵母 *Pichia pastoris* (Guillierm.) Phaff 中得到了成功的表达。

参 考 文 献

- [1] Holliday J, Cleaver M. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2008, **10**(3): 219-234.
- [2] Paterson RRM. *Cordyceps* — a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, 2008(69): 1469-1495.
- [3] Suh SO, Noda H, Blackwell M. Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. *Mol Biol Evol*, 2001, **18**(6): 995-1000.
- [4] 曾伟,尹定华,李泉森,等.冬虫夏草菌侵染及寄生阶段的生长发育研究.菌物学报,2006, **25**(4): 646-650.
- [5] 程舟,耿杨,梁洪卉,等.用线粒体 Cytb 基因序列探讨冬虫夏草寄主蝠蛾的系统进化关系.自然科学进展,2007, **17**(8): 1045-1052.
- [6] Liu ZY, Yao YJ, Liang ZQ, et al. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycol Res*, 2001, **105**(7): 827-832.
- [7] 莫明和,迟胜起,张克勤.冬虫夏草的微循环孢及其无性型的分离.菌物系统,2001, **20**(4): 482-485.
- [8] 许瑞祥,陈志昇,凌启鸿.冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)无性世代菌种之确认.生物产业,2002, **13**(3): 14-20.
- [9] 陈志昇,许瑞祥.利用 18S rRNA 基因序列鉴别冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.之研究.台湾农业化学与食品科学,2002, **40**(4): 219-225.
- [10] 魏鑫丽,印象初,郭英兰,等.冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析.菌物学报,2006(25): 192-202.
- [11] 梁宗琦.一个分离自冬虫夏草的金孢霉新种.真菌学报,1991, **10**(1): 50-56.
- [12] 李兆兰.中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究.真菌学报,1988, **7**(2): 93-98.
- [13] 张永杰,孙炳达,张姝,等.分离自冬虫夏草可培养真菌的多样性研究.微生物学报,2010, **29**(4): 518-527.
- [14] 杨金玲,肖薇,何惠霞,等.蝙蝠蛾拟青霉与冬虫夏草关系的分子系统学研究.药学学报,2008, **43**(4): 421-426.
- [15] Zhu JS, Gao L, Li XH, et al. Maturation alteration of oppositely orientated rDNA and differential proliferation of GC- and AT-biased genotypes of *Ophiocordyceps sinensis* and *Paecilomyces hepiali* in natural *Cordyceps sinensis* 1. *Am J Biomed Sc*, 2010, **2**(3): 217-238.
- [16] 许瑞祥,陈志昇,凌启鸿.冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)无性世代菌种之确认.生物产业,2002, **13**(3):

- 14–20.
- [17] 陈永久, 王文, 杨跃雄, 等. 冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 的随机扩增多态 DNA 及其遗传分化. 遗传学报, 1997, **24**(5): 410–416.
- [18] Kinjo N, Zang M. Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China. *Mycoscience*, 2001(42): 567–574.
- [19] Chen YQ, Hu B, Xu F, *et al.* Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China. *FEMS Microbiology Letters*, 2004(230): 153–158.
- [20] 梁洪卉, 程舟, 杨晓, 等. 青海省冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性状和 ISSR 分析. 中草药, 2005, **36**(12): 1859–1864.
- [21] Liang HH, Cheng Z, Yang XL, *et al.* Genetic diversity and structure of *Cordyceps sinensis* populations from extensive geographical regions in China as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *The Journal of Microbiology*, 2008, **46**(5): 549–556.
- [22] Zhang YJ, Xu LL, Zhang S, *et al.* Genetic diversity of *Ophiocordyceps sinensis*, a medicinal fungus endemic to the Tibetan Plateau: implications for its evolution and conservation. *BMC Evolutionary Biology*, 2009(9): 290.
- [23] Stensrud Ø, Schumacher T, Shalchian-Tabrizi K, *et al.* Accelerated nrDNA evolution and profound AT bias in the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *Mycological research*, 2007(111): 409–415.
- [24] Xiao W, Yang JL, Zhu P, *et al.* Non-support of species complex hypothesis of *Cordyceps sinensis* by targeted rDNA-ITS sequence analysis. *Mycosystema*, 2009, **28**(5): 724–730.
- [25] Paterson RRM. Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins and scourge of PCR. *Current Enzyme Inhibition*, 2008, **4**(1): 46–59.
- [26] Paterson RRM, Lima N. Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA / RNA of producing fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 2009(106): 1070–1080.
- [27] Holliday JC, Cleaver P, Loomis-Powers M, *et al.* Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2004(6): 151–164.
- [28] Li SP, Zhao KJ, Ji ZN, *et al.* A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Life Sciences*, 2003(73): 2503–2513.
- [29] Huang LF, Liang YZ, Guo FQ, *et al.* Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003(33): 1155–1162.
- [30] 王征, 刘建利. 冬虫夏草化学成分研究进展. 中草药, 2009, **40**(7): 1187–1160.
- [31] Zhong JJ, Xiao JH. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2009(113): 79–150.
- [32] Kuo MC, Chang CY, Cheng TL, *et al.* Immunomodulatory effect of exo-polysaccharides from submerged cultured *Cordyceps sinensis*: enhancement of cytokine synthesis, CD11b expression, and phagocytosis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007(75): 769–775.
- [33] Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, *et al.* Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008(80): 1087–1093.
- [34] Lo HC, Tu ST, Lin KC, *et al.* The anti-hyperglycemic activity of the fruiting body of *Cordyceps* in diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin. *Life Sciences*, 2004(74): 2897–2908.
- [35] Bok JW, Lermer L, Chilton J, *et al.* Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 1999(51): 891–898.
- [36] Lin CY, Ku FM, Kuo YC, *et al.* Inhibition of activated human mesangial cell proliferation by the natural product of *Cordyceps sinensis* (H1-A): an implication for treatment of IgA mesangial nephropathy. *J Lab Clin Med*, 1999(133): 55–63.
- [37] Hsu CC, Huan YL, Tsai SJ, *et al.* *In vivo* and *in vitro* stimulatory effects of *Cordyceps sinensis* on testosterone production in mouse Leydig cells. *Life Sciences*, 2003(73): 2127–2136.
- [38] Hu Z, Xia MQ, Tu LQ, *et al.* Purification and characterization of an antibacterial protein from the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2006, **11**(3): 709–714.
- [39] Zhang YJ, Liu XZ, Wang M. Cloning, expression, and characterization of two novel cuticle-degrading serine proteases from the entomopathogenic fungus *Cordyceps sinensis*. *Research in Microbiology*, 2008, **159**(6): 462–469.