

不同块菌的系统发育分析和对小鼠的免疫调节作用

金鑫¹, 陈诚², 陈祖琴¹, 黄文丽^{1*}

¹四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610061; ²四川省农业科学院植物保护研究所, 成都 610066

摘要: 研究分析夏块菌(*Tuber aestivum*)、印度块菌(*Tuber indicum*)和白块菌(*Tuber panzhihuanense*)对小鼠免疫功能的调节作用。将三种新鲜块菌制成匀浆液,按照高剂量(125 g/kg)、低剂量(2.5 g/kg)的块菌经灌胃不同剂量的块菌匀浆,每天灌胃一次,连续2周,以生理盐水为对照组。分别通过中性红的吞噬实验来检测小鼠巨噬细胞的吞噬能力,MTT法测定ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖指数,SRBC免疫小鼠后检测其半数溶血值(HC₅₀),测定小鼠的体液免疫功能。结果显示夏块菌、印度块菌和白块菌实验组都能显著提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力,其中低剂量组的白块菌效果最显著,三种块菌匀浆都显著增强了小鼠脾淋巴细胞的增殖作用,高剂量组的印度块菌效果最好,同时都大幅提高小鼠血清溶血素的含量,各实验组之间的差异不显著($P < 0.05$)。研究表明这三种新鲜块菌匀浆能够显著增强机体的免疫力,综合分析得出印度块菌的高剂量组效果更显著。

关键词: 夏块菌; 印度块菌; 白块菌; 系统发育分析; 免疫功能

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.10.008

Phylogenetic Analysis on Different Truffles and Immunomodulatory Effects on Mice

JIN Xin¹, CHEN Cheng², CHEN Zu-qin¹, HUANG Wen-li^{1*}

¹Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China; ²Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: The aim of this study was to analyze the effect of *Tuber aestivum*, *Tuber indicum* and *Tuber panzhihuanense* on the immune function of mice. The three kinds of fresh truffles were made into homogenate. Different doses of truffle homogenate (125 and 2.5 g/kg) were administered once daily for two consecutive weeks, with normal saline as control group. The phagocytosis ability of murine macrophages was detected by neutral phagocytosis test. ConA-induced mouse spleen lymphocyte proliferation index was measured by MTT assay. Half-hemolytic value (HC₅₀) was detected after SRBC immunization. The humoral immune function of mice was measured. The results showed that, *T. indicum* and *T. panzhihuanense* test group can significantly improve the phagocytosis of macrophage of mice, the low dose of *T. panzhihuanense* group was most significant, and three kinds of truffles significantly enhanced the proliferation of mouse spleen lymphocytes. The best effect of high dose group was *T. indicum*. At the same time the content of serum hemolysin were all substantially improved in mice. The difference between each experimental group was not significant ($P < 0.05$). The three kinds of fresh truffle homogenates can significantly enhance the immunity of the body, and the comprehensive analysis showed that the high dose group of *T. indicum* was more effective.

Key words: *Tuber aestivum*; *Tuber indicum*; *Tuber panzhihuanense*; phylogenetic analysis; immune function

块菌(*Truffle*)隶属于囊菌亚门(Ascomycotina),块菌目(Tuberales),块菌科(Tuberaceae),块菌属(*Tuber*)^[1],又称松露、无娘果是地下菌类中最为重要的一类,子实体呈椭球状、瘤状或不规则状,成熟子实体具有独特的芳香气味,是一种珍贵的与树木

共生的外生菌根型食药真菌^[2]。块菌在我国主要分布于西南地区的四川、云南和西藏等地,而较多学者对块菌的研究其产地主要集中在云南和四川省会东县^[3-5]。本研究实验材料均采集于四川省会东县块菌主产地。

块菌作为一种珍贵的食药真菌,不仅味美营养丰富,而且含有多种生物活性物质,如 α -雄烷醇、神经酰胺和块菌多糖等^[6]。大量研究实验表明块

菌具有壮阳补肾功效^[7]、增强人体免疫力、保肝护肝^[8]、保护人体神经系统、降血压、降血脂、降血糖、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抑菌、调节免疫^[9]等功能。然而较多学者对块菌的药理活性研究主要集中在印度块菌上,对白块菌和夏块菌的药理活性研究较少,本研究对从四川省会东县采集的3种块菌进行系统发育分析和小鼠免疫功能实验,旨在分析它们之间的亲缘关系,研究它们对小鼠免疫功能的影响,以期为我国块菌资源的研究开发提供理论依据,为开发高功效的块菌保健食品提供基础资料和原料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜块菌采集于会东县,RPMI1640 细胞培养液、小牛血清(NCS)来自美国 Hyclon 公司,刀豆蛋白 A(ConA)、噻唑蓝(MTT)、2-巯基乙醇(2-ME)来自美国 Sigma 公司,红细胞裂解液(Red Blood Cell Lysis Buffer)来自杭州开泰生物技术有限公司,绵羊红细胞(SRBC)、豚鼠血清购买自鸿泉生物,其他试剂均购买于阿拉丁。

1.2 实验方法

1.2.1 块菌样品 DNA 提取、扩增及测序

将块菌子实体表面用无菌水清洗干净,取 2 g 子实体用液氮研磨,采用 OMEGA 公司的 D3390-02 E. Z. N. A. TM Fungal DNA Kit 试剂盒提取 DNA,采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对块菌 DNA 进行扩增,扩增条件参考文献^[10],扩增样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.2 块菌样品制备

将收集的3种块菌样品分别洗净、切碎,按1:10比例加蒸馏水,置于高速分散器中匀浆,分别制成不同浓度的块菌匀浆,用于灌胃及后续实验。

1.2.3 动物饲养及分组

SPF 级 8 周龄(20 ± 2 g)的 BALB/C 小鼠 70 只,随机分成 7 组,每组 10 只。分为对照组和实验组,小鼠适应性喂养 5 d 后,分别是:白块菌高、低剂量组,印度块菌高、低剂量组,夏块菌高、低剂量组。实验组分别按照三种块菌高剂量(0.5 g/mL)和低剂量(0.1 g/mL)的匀浆液连续灌胃 2 周,对照组使用生理盐水代替,灌胃结束前四天,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% 绵羊红细胞进行免疫。

1.2.4 小鼠半数溶血值(HC₅₀)的测定

小鼠经末次灌胃后 1 h,眼眶取血,常规分离血清。取血清 10 μL,用 1 mL 1:5 稀释的 SA 缓冲液稀释,每孔加入稀释后的血清 100 μL,以 1:5 稀释的 SA 缓冲液作为对照,再依次加入 10% (v/v) SR-BC 50 μL,补体 100 μL,置 37 °C 水浴 30 min,1500 rpm 离心 10 min。各取上清液 50 μL 加入另一个 96 孔培养板内,加都氏试剂 150 μL。同时设半数溶血孔,加入 10% (v/v) SRBC 12.5 μL,再加都氏试剂至 200 μL。用震荡器充分混匀,放置 10 min 后,于 540 nm 处测定各孔 OD 值。溶血素的量以半数溶血值(HC₅₀)表示,按下列公式计算:样品 HC₅₀ = OD_{样品}/OD_{半数溶血} × 稀释倍数。

1.2.5 小鼠巨噬细胞吞噬实验

腹腔注射加胎牛血清的 PBS 缓冲液 3 mL/只,轻轻按揉小鼠腹部 20 次,以充分洗出腹腔巨噬细胞,然后将腹壁剪开一个小口,吸取腹腔洗液 2 mL;离心取沉淀,用全自动细胞计数仪(Life Technologies Countess)计数,调整巨噬细胞数为 5 × 10⁵/mL,每孔 100 μL,待细胞贴壁后弃上清,加入 0.075% 的中性红溶液 100 μL,吞噬 5 min,吞噬结束后弃中性红溶液,PBS 洗 2 次,加入酸乙醇 200 μL(含 50% 无水乙醇,50% 乙酸)提取中性红,540 nm 测定吸光值。

1.2.6 小鼠脾淋巴细胞转化实验

正常小鼠无菌取脾,置于盛有适量(3 ~ 5 mL)无菌 Hank's 液的平皿中,并在脾上面放置一块纱布,用大号注射器内芯轻轻将脾磨碎,制成单个细胞悬液。经 200 目筛网过滤,用红细胞裂解液去除红细胞,Hank's 液洗 2 次。然后将细胞悬浮于完全培养液中,调整脾细胞浓度为 3-5 × 10⁶ 个/mL,每孔 1 mL,加入 7.5 μg/mL ConA 液,加入不同剂量的块菌匀浆(0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/mL) 100 μL,以 PBS 替代块菌液作为阴性对照,未加细胞的孔作为空白对照,各处理三个平行孔。孵育 72 h 后,MTT 法检测细胞的增殖,以 570 nm 波长测定 OD 值。细胞增殖指数 = (OD_{样品} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白})。

1.2.7 数据分析

实验测定的数据结果全部用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS17.0 软件对结果进行 *t* 检验统计学处理,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 样品采集及系统发育分析

三种块菌采集地情况见表 1,均采集于会东县,

海拔在 2500 ~ 2600 m 之间,植被均为华山松,落叶 较多,土质疏松,土壤 pH 均在 6.5 左右。

表 1 块菌样本的基本情况

Table 1 The basic situation of truffles sample

样品编号 Sample No.	采样地 Sampling places	海拔 Altitude(m)	地理位置 Position	植物类型 Plant type	pH
夏块菌(XKJ)	会东县雪山乡 HDXS	2603	N 26°26'04" E 102°41'42"	华山松 Pinusarmandi	6.42
印度块菌(YDKJ)	会东县淌塘镇 HDTTZ	2624	N 26°22'28" E 102°46'43"	华山松 Pinusarmandi	6.57
白块菌(BKJ)	会东县新田乡 HDXT	2506	N 26°22'42" E 102°57'37"	华山松 Pinusarmandi	6.49

将块菌样品其测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,同时在 GenBank 中寻找同源性最大的序列,每个样品各找 3 条与之对应相似的同源序列(相似 >97%),构建系统发育树,同时以赤芝(*Ganoderma lucidum*)为外参。从图 1 可见 BKJ、XKJ、YD-KJ 分别处于不同的分支上,BKJ 与白块菌(*Tuber panzhihuanense*)相似性 > 99%,YDKJ 与印度块菌(*Tuber indicum*)相似性 > 99%,XKJ 与(*Tuber aestivum*)相似性 > 99%,可见所采集的样品 BKJ 与白块菌最相近,YDKJ 与印度块菌最相近,XKJ 与夏块菌最相近。

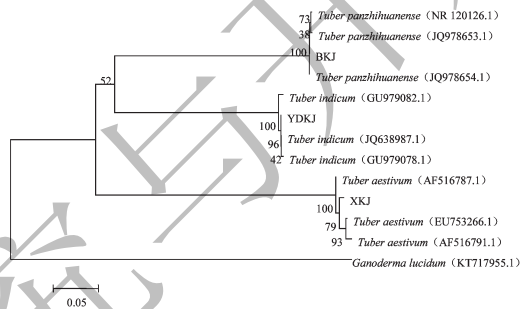


图 1 块菌 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by Truffles based on ITS sequences



图 2 3 种野生块菌子实体及生境图

Fig. 2 Three species of wild truffles and habitat

注:A:夏块菌,B:印度块菌,C:白块菌,D:块菌生境

Note:A: *Tuber aestivum*, B: *Tuber indicum*, C: *Tuber panzhihuanense*, D: Truffle habitat

2.2 不同块菌对小鼠半数溶血值 (HC₅₀) 的影响

各新鲜块菌匀浆对小鼠半数溶血值 (HC₅₀) 的影响结果如图 3 所示,各新鲜块菌匀浆实验组的 HC₅₀ 均显著高于对照组 ($P < 0.05$),实验结果均为阳性,夏块菌和白块菌低浓度匀浆的效果均比高浓度的效果明显 ($P < 0.05$),并与印度块菌高低剂量组相当,无明显差异。而印度块菌高剂量组的 HC₅₀ 值比低剂量组略高,但并无显著差异,这说明块菌匀浆对 HC₅₀ 的效果并无剂量依赖性。SRBC 属于胸腺依赖型免疫原^[11],结果中实验组血清溶血素含量的大幅升高证明,新鲜块菌匀浆增强了机体对抗原的特异性反应,说明新鲜块菌匀浆能够显著增强机体的免疫力。综合来看,印度块菌对半数溶血值的影响最大,效果更明显。

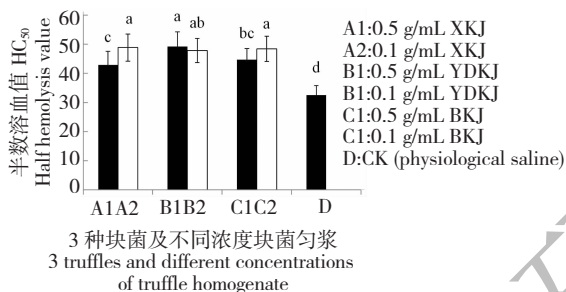


图 3 块菌对小鼠半数溶血值 (HC₅₀) 的影响

Fig. 3 Effect of truffles on half hemolytic value (HC₅₀) in mice

注:图中不同字母表示 3 种块菌及不同浓度块菌匀浆对小鼠 HC₅₀ 具有显著性差异 ($P < 0.05$),下同

Note: Different letters indicated significant difference between each group ($P < 0.05$), same as below

2.3 不同剂量块菌对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

从图 4 中看出,与对照组相比,3 种块菌新鲜匀浆都能不同程度的提高巨噬细胞的吞噬能力,并且与生理盐水组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。低剂量的白块菌匀浆吞噬作用最强,其次为高剂量组的印度块菌匀浆,其余实验组之间不存在显著差异 ($P > 0.05$);高低剂量组的夏块菌匀浆吞噬相当,印度块菌的高剂量组吞噬能力却强于低剂量组,而白块菌的低剂量组吞噬能力远远强于其高剂量组。由此可见,药效与块菌匀浆剂量之间不存在相关性,但可反映出白块菌的药效活性强于印度块菌,印度块菌强于夏块菌。

2.4 不同块菌对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

新鲜块菌匀浆对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

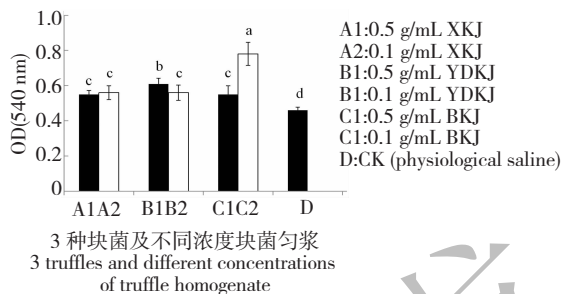


图 4 块菌匀浆对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

Fig. 4 The effects of truffles homogenates on macrophage phagocytosis in mice

结果见图 5 和表 2,在 ConA 刺激下,3 种块菌匀浆对脾淋巴细胞的增殖能力较对照组有显著的提高,促进脾淋巴细胞转化的作用非常明显 ($P < 0.05$)。印度块菌的高剂量组对脾细胞的增殖作用最明显,其增殖指数达到 2.30,与其他实验组差异显著 ($P < 0.05$),其次为低剂量组的印度块菌 (1.96 ± 0.09) 和夏块菌 (1.87 ± 0.06),从实验结果看出它们之间不存在量效关系,整体上印度块菌的药效活性最强,夏块菌次之,白块菌最弱。

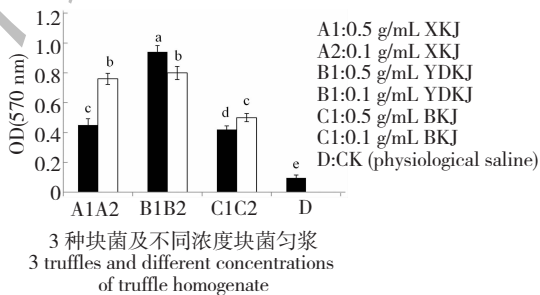


图 5 块菌匀浆对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

Fig. 5 Effect of truffles homogenate on splenic lymphocyte transformation in mice

表 2 块菌匀浆对脾淋巴细胞增殖指数的影响

Table 2 Effects of truffles homogenates on the proliferation index of splenic lymphocytes

组别 Group	样品及浓度 Sample and concentration	增殖指数 Proliferation index
A1	XKJ (0.5 g/mL)	1.11 ± 0.05c
A2	XKJ (0.1 g/mL)	1.87 ± 0.06b
B1	YDKJ (0.5 g/mL)	2.30 ± 0.11a
B2	YDKJ (0.1 g/mL)	1.96 ± 0.09b
C1	BKJ (0.5 g/mL)	1.03 ± 0.11d
C2	BKJ (0.1 g/mL)	1.23 ± 0.11c

3 讨论与结论

到目前为止,我国已知块菌种类达 25 种以上^[12],然而目前市场上食用价值较高的块菌主要为印度块菌、夏块菌和白块菌,通过本调查研究发现这三种块菌主要分布于海拔 2000 ~ 2900 m,季节分明、昼夜温差较大的地区,其主要植被为松树林、栎树林以及它们的混交林,地面落叶较多,土壤较疏松,有机质含量高。印度块菌、夏块菌和白块菌成熟时其香味浓郁,在市场上具有广阔的前景,由于块菌人工栽培产量极低,加之野生资源较少,在市场上一直供不应求^[13]。

在法国,块菌、鱼子酱与鹅肝酱被称为三大珍品,中国所产块菌与欧洲块菌在品质上完全可以媲美,营养价值极高,陶恺^[14]等人对中国块菌营养成分进行了测定,结果显示蛋白质含量约占 27.9% 左右,还原糖含量约占 1.6% 左右,Beuchat^[15]等人对德州块菌子实体进行了营养成分测定,蛋白质含量约为 16.1%、脂质含量约为 2.8%。目前较多学者对块菌进行了研究,但大部分都是通过提取其活性成分块菌多糖来研究其抗氧化作用和保健功能^[16-20],由于块菌市场价格较高,块菌较多的还是直接食用,而对块菌活性成分的提取进行药用还非常少,因而本研究直接以新鲜块菌为材料,探究其直接食用对机体的免疫功效。研究结果显示新鲜的夏块菌、印度块菌和白块菌都能显著提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力、都显著增强小鼠脾淋巴细胞增殖作用、都能大幅提高小鼠血清溶血素的含量,增强机体对抗原的特异性反应,说明这三种新鲜块菌匀浆能够显著增强机体的免疫力。但是这三种块菌在增强小鼠免疫功能上存在一定的差异,综合本研究的实验结果发现印度块菌的药效最好,这对块菌产品的精深加工提供了一定的借鉴,选择药效功能强的块菌种类为保健产品的原料,充分提高了块菌资源利用的价值。在今后的研究中,将进一步对块菌的活性成分进行功效研究,与本研究的实验结果进行比较分析,为块菌产品的加工研究提高一定的帮助,以开发出高功效的块菌保健食品或药品。

参考文献

1 Chen J (陈娟), Deng XJ (邓晓娟), Liu PG (刘培贵). Research status and significant progress on the Genus *Tuber*. *Microbiology* (微生物学通报), 2009, 36: 1013-1018.

2 Hu HD (胡弘道), Su KM (苏开美), Chai HM (柴红梅), et al. Study on the morphological changes of the *Ectomycorrhizae* formed by *Tuber aestivum* on *Cyclobalanopsis glaucocedlings*. *Acta Botan Yunnanica* (云南植物研究), 2010, 32: 489-494.

3 Cai JZ (蔡佳仲), Huang ZZ (黄珍珍), Zhou J (周娟), et al. GC-MS analysis of the ethyl ether extract from Chinese *Tuber indicum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1242-1245.

4 Zhang SQ (张世奇). Purification and molecular weight determination of HUI DONG truffles polysaccharide. *Food Fermentation Technol* (食品与发酵科技), 2010, 46(6): 97-100.

5 Wu SH (吴少华), Chen YW (陈有为), Yang LY (杨丽源), et al. Study on chemical constituents of *Tuber indicum*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 8: 1211-1214.

6 Guo M (过敏), Yan JP (严金平), Tang LW (唐丽薇), et al. Main physiological activities of truffles and research progress of active substances production. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33: 403-407.

7 Dong Y (董洋), Wang HY (王海英), Zhao ZT (赵遵田), et al. Primary study on the health value of *Tuber indicum*. *J Hebei Acade Sci* (河北省科学院学报), 2012, 29(1): 68-73.

8 Wang FQ (王福强), Zhang SQ (张世奇). Study on the truffles at home and abroad and their effective application of the active ingredient. *Agric Prod Proc, Innov* (农产品加工, 创新版), 2011, 1: 63-67.

9 Zhao L (赵玲). Preparation and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Tuber sinense*. Yaan: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), PhD. 2013.

10 Xiong C (熊川), Chen C (陈诚), Huang WL (黄文丽), et al. Protective effects of aqueous extracts of *Ganoderma leucocostatum* on H₂O₂ induced apoptosis in PC12 cells. *J Food Safety Quality* (食品安全质量检测学报), 2016, 2: 662-668.

11 Koenen ME, Kramer J, Van Der Hulst R, et al. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer-and meat-type chickens. *British Poultry Sci*, 2004, 45: 355-366.

12 Chen YJ (陈毅坚), Zhong WW (钟文武), Yu ZY (余正云), et al. Study on morphological character and antioxidant activity of edible truffle. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 2: 139-141.

13 Tang YJ (汤亚杰), Kong GP (孔国平), Zhu LL (朱伶俐), et al. Advances in studies on active constituents from truffle and its artificial cultivation. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 629-632.

14 Tao K (陶恺), Liu B (刘波). The ecological and nutritional

- value of Chinese truffle. *J Shanxi Univ* (山西大学学报), 1990, 13: 319-321.
- 15 Baldauf SL, Palmer JD. Animals and fungi are each other's closest relatives; congruent evidence from multiple proteins. *Proceed Nat Acade Sci*, 1993, 90: 11558-11562.
 - 16 Guo T (郭坦), Hou CL (侯成林), Wei L (魏磊), et al. Antioxidant activities of extracts and sub-fractions from *Tuber indicum*. *Mycosystema* (菌物学报), 2010, 4: 569-575.
 - 17 Luo Q (罗强), Yan L (颜亮), Wu LS (吴俐莎), et al. Monosaccharide compositions and antioxidant activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Tuber indicum*. *Food Sci* (食品科学), 2010, 23: 52-56.
 - 18 Cao JZ (曹晋忠), Wei L (魏磊), Su H (苏红), et al. Study on extraction and anti-oxidant activity of crude polysaccharides from *Tuber indicum*. *J Shanxi Univ, Nat Sci* (山西大学学报, 自科版), 2011, 34: 137-142.
 - 19 Kong QL (孔庆龙), Fan J (樊建), Zhao TR (赵天瑞), et al. Optimization of extraction technique of polysaccharides from truffles by response surface methodology and determination of crude polysaccharide antioxidant activity. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2012, 38: 175-179.
 - 20 Dong Y (董洋). Primary study on the health value of *Tuber indicum*. Jinan: Shandong Normal University (山东师范大学), MSc. 2012.
-
- (上接第 1653 页)
- 8 Ru QM (茹巧美), Pei ZM (裴真明), Zheng HL (郑海雷). *In vitro* studies on antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides from *Lycoris aurea*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2008, 31: 1536-1540.
 - 9 Wu YL (吴扬兰), Wang YL (王远亮), Xu SR (徐世荣), et al. Determination of molecular weight and distribution of hydroxyethyl starch (HES) by means of GPC-RI-MALLS technique. *J Chongqing Univ, Nat Sci* (重庆大学学报, 自科版), 2007, 30: 121-123.
 - 10 Cui YY (崔莹莹), Zhang JY (张剑韵), Zhang RF (张容鹄), et al. Study on structure analysis and anticoagulant function *in vitro* of garlic polysaccharides. *Food Fer Ind* (食品与发酵工业), 2009, 35(4): 24-27.
 - 11 Wu YL (吴扬兰), Wang YL (王远亮), Yang L (杨力). Application of SEC-RI-MALLS technique on the study of lentinan molecular weight and distribution analysis of molecular weight. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2011, 31: 2256-2259.
 - 12 Guo X (国欣), Hu XL (胡小龙), Wang YR (王月荣), et al. System isolation and purification of Isatidis Radix polysaccharides and determination of their compositions. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 1508-1514.
 - 13 Yan J (颜军), Yi Y (易勇), Wu XY (邬晓勇), et al. The isolation, molecular size and monosaccharides compositions of polysaccharides from Astragalus. *Food Sci Tech* (食品科技), 2012, 37: 278-283.
 - 14 Liu XP (刘小攀), Tian CL (田春莲), Yao SF (姚姝凤), et al. Optimization of extraction of polysaccharide from *Lycoris aurea* by response surface methodology and comparison of polysaccharide content in genus *Lycoris*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 36: 1576-1581.
 - 15 Wu Y (吴彦), Zhou SB (周守标), Wan A (万安). Isolation and purification of polysaccharide in *Lycoris Herb*. *J Biol* (生物学杂志), 2005, 22(3): 44-46.
 - 16 Wu Y (吴彦), Zhou SB (周守标), Wan A (万安). Analysis and comparison of polysaccharide content in *Lycoris*. *Guihaia* (广西植物), 2005, 25: 264-268.