

体外筛选中药胆碱酯酶抑制剂

郑燕¹, 缪雨静^{1,2}, 江媛^{1,3}, 冯展^{1,4}, 曾铁鑫¹, 张敏¹, 刘德旺⁵, 黄林芳^{1,2*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193; 2. 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193; 3. 大理大学, 云南大理 671000; 4. 江西中医药大学, 江西南昌 330000; 5. 内蒙古医科大学, 内蒙古呼和浩特 010107)

摘要 [目的] 从中药中发现新颖的胆碱酯酶抑制剂 (ChEI)。[方法] 采用 4 种溶剂从 14 种中药中提取了 56 种粗提物, 并对 14 种中药的 56 种中药提取物进行乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 抑制活性筛选。[结果] 虎杖乙酸乙酯提取物和云木香石油醚提取物表现出 AChE 和 BuChE 双重抑制作用, 这 2 种提取物为阿尔兹海默氏症的治疗提供了巨大的潜力。大多数中药乙酸乙酯提取物均显示出较强的 BuChE 抑制活性。提取物抑制 AChE 和 BuChE 的 IC_{50} 分别为 16.00~42.03 和 11.29~41.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。[结论] 中药可以作为胆碱酯酶抑制剂的潜在来源。

关键词 胆碱酯酶抑制; 阿尔兹海默氏症; 中药; 体外筛选

中图分类号 R96 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)06-0149-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.06.035



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

Screening of Traditional Chinese Medicine Cholinesterase Inhibitors *in vitro*

ZHENG Yan¹, MIAO Yu-jing^{1,2}, JIANG Yuan^{1,3} et al (1. Key Laboratory of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Beijing 100193; 3. Dali University, Dali, Yunnan 671000)

Abstract [Objective] To discover a novel cholinesterase inhibitor (ChEI) from traditional Chinese medicine. [Method] 56 kinds of crude extracts were extracted from 14 kinds of traditional Chinese medicines using 4 kinds of solvents, and 56 kinds of traditional Chinese medicine extracts from 14 kinds of traditional Chinese medicines were screened for acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activities. [Result] The ethyl acetate extract of *Polygonum cuspidatum* and the petroleum ether extract of *Carmelia serrata* exhibited dual inhibitory effects on AChE and BuChE, and these two extracts provided great potential for the treatment of Alzheimer's disease. Most of the traditional Chinese medicine ethyl acetate extracts showed strong BuChE inhibitory activity. The IC_{50} of the extracts against AChE and BuChE were 16.00~42.03 and 11.29~41.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. [Conclusion] Traditional Chinese medicine can be a potential source of cholinesterase inhibitors.

Key words Cholinesterase inhibition; Alzheimer's disease; Traditional Chinese medicine; *In vitro* screening

阿尔兹海默氏症 (Alzheimer's disease) 是一种起病隐匿, 以进行性认知功能障碍及行为改变为特征的神经系统退行性疾病, 现已成为全球性的健康问题^[1-4]。研究表明, 阿尔兹海默氏症初期的主要病理变化是中枢胆碱系统功能的显著降低^[5-8]。胆碱酯酶抑制剂 (ChEI) 是第一批已被批准用于治疗轻度至中度阿尔兹海默氏症的药物, 是通过增强突触中乙酰胆碱浓度来改善认知并调节阿尔兹海默氏症的神经病理学标志物^[6,9-11]。

一些基于天然产物的药物, 例如利凡斯的明和加兰他敏等, 被用于治疗由阿尔兹海默氏症引起的记忆力减退和认知功能障碍。然而, 由于它们的不良副作用, 例如生物利用度问题和胃肠道紊乱等, 这些批准的药物在利用上受到了限制^[5,12-13]。人参、五味子、远志和麦冬等中药材也被用于阿尔兹海默氏症病人的认知改善^[14-19]。近年来, 科学家从植物中分离出许多可以显著提高细胞外乙酰胆碱水平的 ChEI 化合物, 例如延胡索中的普罗托品, 吴茱萸中的脱氢吴茱萸碱和石杉中的石杉碱甲乙等^[6,7,19]。因此, 从中药中提取的 ChEI 被认为是阿尔兹海默氏症治疗的有潜力的候选药物。此外,

乙酰胆碱酯酶/丁酰胆碱酯酶 (AChE/BuChE) 双重抑制剂具有良好的开发和市场前景。该研究对 14 种中药的 56 种中药提取物进行了 AChE 和 BuChE 抑制活性筛选, 以期为其进一步跟踪分离获得活性先导化合物奠定基础, 也为临床治疗阿尔兹海默氏症提供新的用药依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器。 PURELAB Classic-UVF 纯水机 (英国 ELGA 公司); POLARstargalaxy 微板光学测定仪 (德国 BMG 公司); Personal Pipettor PP-550MS 移液器 (美国 Apricot Designs 公司); MassL-ynxV 4.1 工作站。

1.1.2 试剂。 碘化硫代乙酰胆碱 (ATCI)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、丁酰胆碱酯酶 (BuChE)、氯化丁酰胆碱 (BuCh)、氯化丁酰硫基胆碱 (BuSCh)、多奈哌齐 (Donepezil)、四异丙基甲基焦磷酸胺 (*iso*-oMPA)、5,5'-二硫双硝基苯甲酸 (DTNB)、密苏里州圣路易斯; 甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 超纯水。缓冲液和其他试剂均为市售国产分析纯。

1.1.3 试材。 14 种中药材均由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授从四川省和云南省收集所得, 再由林余霖教授鉴定。凭证标本存放在中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所标本馆。

基金项目 北京市自然科学基金项目 (7202135)。**作者简介** 郑燕 (1997—), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源。* 通信作者, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源与鉴定研究。**收稿日期** 2021-06-17; **修回日期** 2021-07-17

1.2 试验方法

1.2.1 待测样品的制备。将 14 种中药材粉碎成粗粉,取粗粉 500 g,先用石油醚浸泡 24 h 后渗滤提取至提取液颜色浅(或 5 倍药材量),回收石油醚,得石油醚提取物;残渣挥去石油醚,用 80% 乙醇湿润后再用 3 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,用等体积乙酸乙酯(EtOAc)萃取 2 次,合并 EtOAc 萃取液(上层),浓缩至干,得 EtOAc 萃取物;母液浓缩至干(下层),得乙醇提取物;残渣挥去乙醇,用 3 倍量水煮提 2 次,合并水提液,浓缩至干,得水提取物,提取流程见图 1。

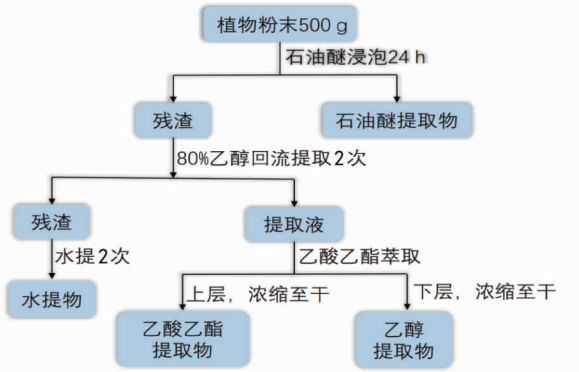


图 1 14 种中药提取流程

Fig.1 Extraction process of 14 traditional Chinese medicines

1.2.2 抗乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶活性的生物测定。

1.2.2.1 酶反应液、底物浓度及 DTNB 试液浓度的确定。人血浆可直接作为酶源。该试验以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释人血浆 80 倍的稀释液作为酶反应液;筛选体系中选用 3 mmol/L 作为底物的终浓度,以保证较快的反应速度,进而实现高通量。确定 DTNB 试液的浓度为 0.625 mmol/L,终浓度为 0.250 mmol/L。

1.2.2.2 AChE 和 BuChE 活性测定方法。

(1) 试剂配制。使用 Ellman 等^[20]的方法评估了 AChE 和 BuChE 的抑制作用。AChE 水解乙酰胆碱生成胆碱和乙酸,BuChE 水解丁酰胆碱生成胆碱和丁酸。胆碱可以与巯基显色剂 DTNB 反应生成 TNB 黄色化合物,根据颜色深浅进行比色定量,水解产物胆碱的数量可以反映胆碱酯酶的活力^[21-22]。

ATCl、BuSCh 和 DTNB 均以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液临用现配。在 384 孔板中进行化合物的大规模筛选,用移液枪转移液体,使每孔中含有天然提取物(终浓度 50 μg/mL) 5 μL、酶反应液 20 μL、BuSCh 20 μL、DTNB 20 μL,反应总体积为 55 μL。标准孔以 0.05 mol/μL 磷酸盐缓冲液来代替样品;以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液代替样品及底物作为空白对照;以 BuChE 的特异性抑制剂 iso-OMPA、AChE 的特异性抑制剂 Donepezil 作为阳性对照,以检验方法的可靠性。

(2) 样品筛选。将 10 μL AChE/BuChE 与 5 μL 中药提取液(50 μg/mL)混合,然后添加 20 μL 酶反应溶液。在存在 5 μL Donepezil 或 iso-PMPA 溶液的阳性对照组,重复上述操作,可以评估待测物质在测定中的干扰。通过添加

0.625 mmol/L DTNB(20 μL) 和 ATCl/BuSCh(20 μL) 开始反应,将该溶液置于 37 °C 下静置 60 min。反应完成后,送入微板光学测定仪,在 412 nm 处测量吸光度,并计算抑制率:抑制率=($A_{标准}-A_{样品}$)/($A_{标准}-A_{空白}$)×100%,试验重复 3 次。

使用贝克曼库尔特检测平台进行数据分析,样品筛选试验至少重复 2 次。对具有显著抑制作用的中药提取物进行剂量依赖性抑制分析。

2 结果与分析

评估了 14 种中药的 4 种溶媒(石油醚、乙酸乙酯、乙醇和水)提取物对 BuChE 和 AChE 的抑制活性,具体结果见图 2 和表 1。从表 1 可以看出,除竹节参(*Panax japonicus*)和宿柱栲(*Fraxinus stylosa*)的乙酸乙酯提取物,其余中药提取物均显示出不同程度的 BuChE 和 AChE 抑制活性。粗茎鳞毛蕨(*Dryopteris crassirhizoma*)、云木香(*Saussurea costus*)、鸡屎藤(*Paederia scandens*)、虎杖(*Reynoutria japonica*)和越南槐(*Sophora tonkinensis*)这 5 种中药的提取物对 BuChE 和 AChE 的抑制作用非常好,表明这 5 种中药是有前途的治愈阿尔茨海默氏症的自然资源。

从表 1 可以看出,8 种提取物的 BuChE 抑制率均大于 50%,其中越南槐乙醇提取物表现出最佳抑制效果,抑制率为 86.84%,其次为虎杖乙酸乙酯提取物(84.69%)、越南槐乙酸乙酯提取物(79.16%)、云木香石油醚提取物(68.49%)、鸡屎藤乙酸乙酯提取物(66.92%)、越南槐石油醚提取物(66.89%)、粗茎鳞毛蕨水提取物(63.12%)、云木香乙酸乙酯提取物(54.09%)。这表明越南槐因其较优的 BuChE 抑制率,可能是治疗阿尔茨海默氏症的最佳药物。然而,只有云木香石油醚提取物和虎杖乙酸乙酯提取物对 AChE 的抑制率超过 50%,分别为 66.50% 和 64.32%。

进一步研究了云木香、粗茎鳞毛蕨、鸡屎藤、虎杖、越南槐的提取物对 AChE 和 BuChE 抑制活性的剂量依赖性,IC₅₀ 抑制值见表 2。56 种提取物抑制 AChE 和 BuChE 的 IC₅₀ 分别为 16.00~42.03 和 11.29~41.92 μg/mL。虎杖乙酸乙酯提取物对 BuChE 表现出最强的抑制作用(IC₅₀ = 11.29 μg/mL),云木香乙醇提取物对 AChE 表现出最强的抑制作用(IC₅₀ = 16.00 μg/mL)。虎杖具有降血压、血糖、血脂以及散瘀止痛、止咳化痰的功能^[23]。现代药理学证明,虎杖具有保护心血管系统、抗氧化和提高人体免疫力的功能。云木香是多年生菊科植物,根具有促进气虚、止痛、健脾、消食的功能^[24]。虎杖和云木香都是我国的传统中药,已经使用了数千年,但是它们尚未被完全开发,该研究表明,二者在开发抗阿尔茨海默氏症药物方面具有较好的前景。

3 结论与讨论

该研究使用比色法从 14 种中药的 56 种粗提取物中筛选新型 ChEI。虎杖乙酸乙酯提取物和云木香石油醚提取物表现出 AChE 和 BuChE 双重抑制作用,结果表明,这 2 种提取物为阿尔兹海默氏症的治疗提供了巨大的潜力。此外,大多数中药乙酸乙酯提取物均显示出较强的 BuChE 抑制活性。该研究是首次对中药提取物进行 AChE 和 BuChE 抑制能力

的研究。值得注意的是,该研究中使用的 5 种中药(云木香、粗茎鳞毛蕨、鸡屎藤、虎杖、越南槐)传统上并未用于阿尔兹

海默氏症治疗,在 5 种中药提取物中,越南槐乙酸乙酯提取物在 BuChE 抑制试验中抑制能力最强。

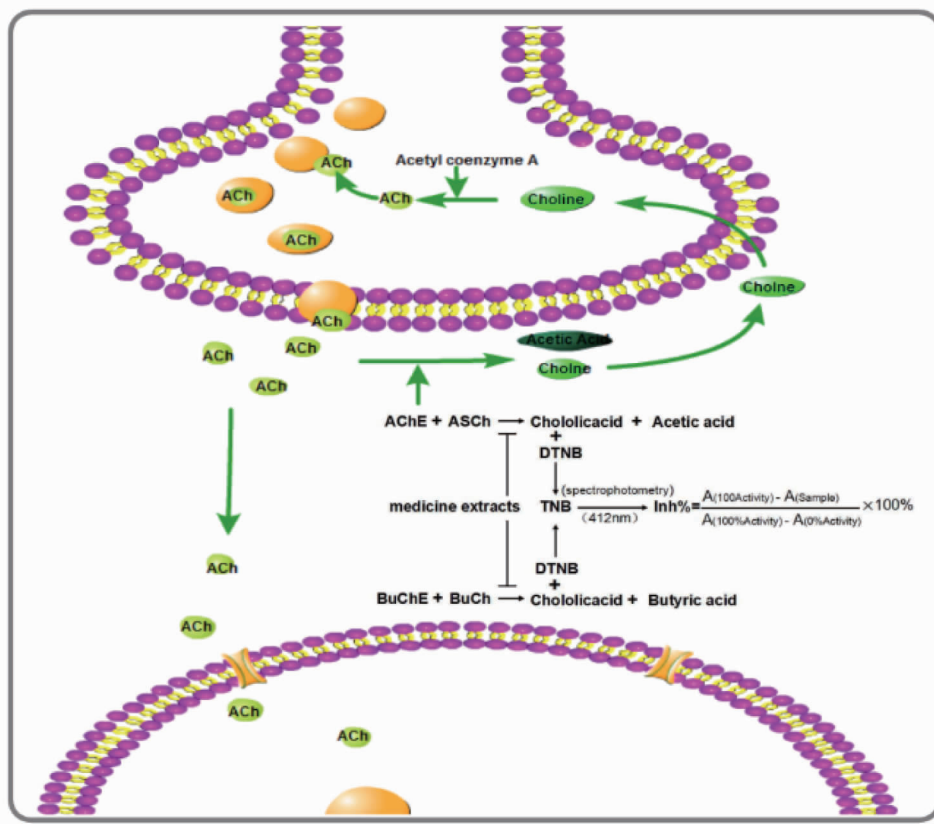


图 2 中药提取液对胆碱酯酶的抑制作用示意图

Fig.2 Schematic diagram of the inhibitory effect of traditional Chinese medicine extract on cholinesterase

表 1 14 种中药的 4 种溶剂提取液对 50 μg/mL 的 BuChE 和 AChE 活性的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of 4 solvent extracts of 14 traditional Chinese medicines on the activities of BuChE and AChE at 50 μg/mL

序号 No.	中药 Traditional Chinese medicine	药用部位 Medicinal parts	抑制率 Inhibition rate//%							
			BuChE				AChE			
			P	E	EA	W	P	E	EA	W
1	桔梗 <i>Platycodon grandiflorus</i>	根	13.93	12.59	10.54	0.55	15.66	8.21	12.23	8.32
2	粗茎鳞毛蕨* <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	根茎	47.27	38.65	44.12	63.12	11.05	25.77	21.72	32.94
3	牛蒡 <i>Arctium lappa</i>	果实	9.67	8.38	24.36	22.99	10.26	15.88	18.12	22.30
4	云木香* <i>Saussurea costus</i>	根	68.49	22.08	54.09	12.27	66.50	24.89	27.93	15.99
5	苍术 <i>Atractylodes lancea</i>	根茎	37.79	13.35	37.83	5.80	6.25	16.77	10.42	15.27
6	鸡屎藤* <i>Paederia scandens</i>	整株和根	15.40	40.04	66.92	11.45	8.27	43.84	11.98	17.45
7	卫矛 <i>Euonymus alatus</i>	枝	41.25	18.68	47.02	11.89	2.42	17.64	26.30	13.01
8	虎杖* <i>Reynoutria japonica</i>	根和根茎	40.01	16.00	84.69	32.37	22.87	26.71	64.32	33.38
9	竹节参 <i>Panax japonicus</i>	根茎	42.11	16.41	—	18.11	17.98	9.43	—	9.76
10	肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i>	皮	42.67	33.87	40.42	24.62	11.79	20.22	22.39	27.68
11	宿柱柃 <i>Fraxinus stylosa</i>	皮	21.73	35.29	—	8.46	23.12	17.46	—	12.53
12	越南槐* <i>Sophora tonkinensis</i>	根和根茎	66.89	86.84	79.16	32.05	7.79	31.15	16.48	26.15
13	细辛 <i>Asarum heterotropoides</i>	根和根茎	32.97	26.90	32.04	5.59	12.91	24.01	13.78	24.30
14	夏枯草 <i>Prunella vulgaris</i>	全草	37.03	26.87	27.47	3.14	31.19	15.12	15.08	8.94
阳性对照 Positive control			94.43 (iso-OMPA)				76.66 (Donepezil)			

注: P-石油醚提取物, E-乙醇提取物, EA-乙酸乙酯提取物, W-水提取物; * 表示选择用于剂量依赖性抑制研究的草药

Note: P-petroleum ether extract, E-ethanol extract, EA-ethyl acetate extract, W-water extract; * indicates herbs selected for dose-dependent inhibition studies

表2 5种中药石油醚、乙醇、乙酸乙酯提取物对BuChE和AChE抑制的IC₅₀值Table 2 The IC₅₀ values of five traditional Chinese medicine extracts of petroleum ether, ethanol and ethyl acetate on BuChE and AChE inhibition

中药 Traditional Chinese medicine	BuChE			AChE		
	石油醚提取物 Petroleum ether extract	乙醇提取物 Ethanol extract	乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract	石油醚提取物 Petroleum ether extract	乙醇提取物 Ethanol extract	乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract
云木香 <i>Saussurea costus</i>	29.27±1.32	—	41.92±0.91	—	16.00±1.46	—
粗茎鳞毛蕨 <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	—	—	—	42.03±1.21	—	—
鸡屎藤 <i>Paederia scandens</i>	—	—	12.41±0.98	—	—	—
虎杖 <i>Reynoutria japonica</i>	—	—	11.29±1.54	—	—	27.04±1.18
越南槐 <i>Sophora tonkinensis</i>	15.52±1.56	25.17±1.51	17.99±1.24	—	—	—
阳性对照 Positive control	0.89 (iso-OMPA)			0.03 (Donepezil)		

该研究表明,传统中药在阿尔兹海默氏症的治疗中具有较大的潜力,但治疗机制仍未得到充分探索。该研究结果为将传统中药提取物用于治疗阿尔兹海默氏症提供了理论依据,但这些提取物的化学成分和药理活性需进一步研究。

参考文献

- [1] BANIK A, PRABHAKAR S, KALRA J, et al. Effect of human umbilical cord blood derived lineage negative stem cells transplanted in amyloid- β induced cognitive impaired mice[J]. Behavioural brain research, 2015, 291: 46-59.
- [2] SIOTTO M, SQUITTI R. Copper imbalance in Alzheimer's disease: Overview of the exchangeable copper component in plasma and the intriguing role albumin plays[J]. Coordination chemistry reviews, 2018, 371: 86-95.
- [3] ZHOU J, MENG L C, YE W R, et al. A sensitive detection assay based on signal amplification technology for Alzheimer's disease's early biomarker in exosome[J]. Analytica chimica acta, 2018, 1022: 124-130.
- [4] 吴福林, 周柏松, 董庆海, 等. 中药蜈蚣的研究进展[J]. 特产研究, 2018, 40(1): 69-76.
- [5] SMALL G, BULLOCK R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers & dementia, 2011, 7(2): 177-184.
- [6] BONO G F, SIMÃO-SILVA D P, BATISTELA M S, et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population[J]. Neurochemistry international, 2015, 81: 57-62.
- [7] LEBOS E P, THORN C, EDGERTON J R, et al. Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease[J]. Neuropharmacology, 2018, 136: 362-373.
- [8] KAMAGATA K, ANDICA C, HATANO T, et al. Advanced diffusion magnetic resonance imaging in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Neural regeneration research, 2020, 15(9): 1590-1600.
- [9] LIN H Q, HO M T, LAU L S, et al. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease[J]. Chemico-biological interactions, 2008, 175(1/2/3): 352-354.
- [10] SATHEESHKUMAR N, MUKHERJEE P K, BHADRA S, et al. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents[J]. Phytomedicine, 2010, 17(3/4): 292-295.
- [11] BOROWIEC K, SZWAJGIER D, TARGO ŃSKI Z, et al. Cholinesterase in-

- hibitors isolated from bilberry fruit[J]. Journal of functional foods, 2014, 11: 313-321.
- [12] DARVESH S, HOPKINS D A, GEULA C. Neurobiology of butyrylcholinesterase[J]. Nature reviews neuroscience, 2003, 4(2): 131-138.
- [13] GROSSBERG G T, TONG G, BURKE A D, et al. Present algorithms and future treatments for Alzheimer's disease[J]. Journal of alzheimers disease, 2019, 67(4): 1157-1171.
- [14] LHO S K, KIM T H, KWAK K P, et al. Effects of lifetime cumulative ginseng intake on cognitive function in late life[J]. Alzheimer's research & therapy, 2018, 10: 1-9.
- [15] WANG M S, BI W C, FAN K Y, et al. Ameliorating effect of *Alpinia oxyphylla-Schisandra chinensis* herb pair on cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2018, 97: 128-135.
- [16] KUBOYAMA T, HIROTSU K, ARAI T, et al. Polygalae Radix extract prevents axonal degeneration and memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Frontiers in pharmacology, 2017, 8: 1-11.
- [17] ZHANG W M, ZHI D J, REN H, et al. Shengmai formula ameliorates pathological characteristics in AD *C. elegans*[J]. Cellular and molecular neurobiology, 2016, 36(8): 1291-1302.
- [18] YANG Y P, LIANG X H, JIN P, et al. Screening and determination for potential acetylcholinesterase inhibitory constituents from ginseng stem-leaf saponins using ultrafiltration (UF)-LC-ESI-MS²[J]. Phytochemical analysis, 2019, 30(1): 26-33.
- [19] CURRAIS A, CHIRUTA C, GOUJON-SVRZIC M, et al. Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé Príncipe[J]. Journal of ethnopharmacology, 2014, 155(1): 830-840.
- [20] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V JR, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochemical pharmacology, 1961, 7: 88-95.
- [21] 王冬梅, 刘艾琳, 黄林芳, 等. 鸡屎藤抑制丁酰胆碱酯酶活性及活性部位的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(1): 44-48.
- [22] 王增绘, 王冬梅, 刘艾琳, 等. 山豆根抑制丁酰胆碱酯酶活性及活性部位的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. 中国现代中药, 2015, 17(9): 912-916.
- [23] 王欣, 覃瑶, 孙建彬, 等. 虎杖叶的化学成分、药理活性、临床应用及质量控制研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(10): 196-200.
- [24] 杨娟, 全健, 余中蓬, 等. 云木香研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 181-184.

(上接第134页)

- [18] 杨洋, 王亚娟, 阴法庭, 等. 盐碱胁迫对油菜苗期生理及光合特性的影响[J]. 北方园艺, 2020(15): 1-8.
- [19] 刘浩. 盐分含量对油菜碳氮积累、运转及利用效率的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [20] 刘婧台, 左青松, 王龙, 等. 不同盐分条件下油菜氮、磷、钾积累与分配差异[J]. 中国农学通报, 2021, 37(12): 24-30.
- [21] 刘萍, 夏江宝. 滨海盐碱地根际溶磷细菌磷素转化特征[J]. 生态学报, 2021, 41(11): 4531-4540.
- [22] 徐茂, 曹翠玉, 史瑞和. 不同作物对磷的吸收与根系的生理形态特征

- 关系[J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 65-70.
- [23] ELANCHEZHIAN R, KRISHNAPRIYA V, PANDEY R, et al. Physiological and molecular approaches for improving phosphorus uptake efficiency of crops[J]. Current science, 2015, 108(7): 37-45.
- [24] 张海伟, 徐芳森. 不同磷水平下甘蓝型油菜光合特性的基因型差异研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(5): 1196-1202.
- [25] 余利平, 田立荣, 张春雷, 等. 低磷胁迫对油菜不同生育期叶片光合作用的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 232-236.
- [26] 左青松, 蒯捷, 刘浩, 等. 土壤盐分对油菜氮素积累、运转及利用效率的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(3): 827-833.