

赶黄草总黄酮对小鼠肝损伤的保护作用

舒 刚,张 露,赵 谨,郑艺蕾,古小云,汪开毓*
(四川农业大学 动物医学院,四川 成都 611130)

摘要: 为研究赶黄草总黄酮对脂多糖(LPS)诱发的肝损伤的保护作用,将 50 只昆明种小鼠随机分为空白组、模型组、联苯双酯阳性对照组及赶黄草总黄酮高、低剂量组,每组 10 只。赶黄草总黄酮高、低剂量组分别按照 10 mg/kg、2 mg/kg 的剂量灌服;联苯双酯阳性对照组按照 5 mg/kg 的剂量灌服;空白组和模型组分别灌胃等容积的生理盐水。连续给药 14 d,观察小鼠生长状况,末次给药之后 2 h,空白组尾静脉注射生理盐水 2 mL/kg,其余各组尾静脉注射 5 mg/kg LPS,12 h 后眼球取血处死小鼠,测定小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性以及肝匀浆中的超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。同时将肝脏进行 HE 染色,观察小鼠肝脏组织病理学变化。结果显示,赶黄草总黄酮对小鼠生长有抑制作用。与模型组比较,赶黄草总黄酮高、低剂量组血清中 ALT 活性分别降低 26.53% ($P<0.01$)、16.74% ($P<0.05$),AST 活性分别降低 12.50% ($P<0.05$)、9.88% ($P<0.05$),SOD 活性分别升高 26.46% ($P<0.05$)、21.77% ($P<0.05$),MDA 含量分别降低 48.73% ($P<0.05$)、59.80% ($P<0.01$);小鼠肝脏指数分别降低 10.36% ($P<0.05$)、3.80% ($P>0.05$);赶黄草总黄酮各剂量组肝组织病变程度明显减轻。以上结果表明,赶黄草总黄酮对 LPS 诱导的小鼠肝损伤有保护作用。

关键词: 赶黄草总黄酮;脂多糖;肝损伤;保肝作用

中图分类号: S859.3;R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)06-0142-05

Protective Effect of Total Flavonoid of *Penthorum chinense* Pursh
on Experimental Liver Injuries in Mice

SHU Gang,ZHANG Lu,ZHAO Jin,ZHEN Yilei,GU Xiaoyun,WANG Kaiyu*
(College of Veterinary Medicine,Sichuan Agricultural University,Chengdu 611130,China)

Abstract: To investigate the role of total flavone in *Penthorum chinese* Pursh in protection of LPS-induced liver injury in mice.Fifty Kunming mice were randomly divided into five groups,including a control group, and a model group that were both administrated with equal volume of physiological saline,a high-dose treating group and a low-dose treating group(administrated with 10 mg/kg and 2 mg/kg doses of total flavone in *Penthorum chinese* Pursh), and a positive control group(administrated with 5 mg/kg bifendate). 14 days later,two hours after the last administration,the control group was injected with 2 mL/kg physiological saline via tail vein while other groups were injected with 5 mg/kg LPS. 12 hours later,we measured ALT & AST activities of serum,SOD & MDA activities and levels of liver homogenate in mice. Neither high-dose nor low-dose treating group administrated with total flavone in *Penthorum chinese* Pursh had a positive effect in mice. Compared to the model group, it reduced the ALT activity by 26.53% ($P<0.01$),16.74% ($P<0.05$),the AST activity by 12.50% ($P<0.05$),9.98% ($P<0.05$),the MDA concentration by 48.73% ($P<0.05$),59.80% ($P<0.01$),the liver index 10.36% ($P<0.05$),3.80% ($P>0.05$),and increased the SOD activity by 26.46% ($P<0.05$),21.77% ($P<0.05$). Those groups

收稿日期:2014-12-30
基金项目:四川农业大学教改项目(X2014006);四川省富民强县项目(20130720)
作者简介:舒 刚(1978-),男,重庆人,副教授,硕士,主要从事中药药理学研究。E-mail: cndyx2005@163.com
* 通讯作者:汪开毓(1955-),男,四川荣经人,教授,博士,主要从事药理与毒理学研究。E-mail: ky-wang@sicau.edu.cn

that were administrated with total flavone in *Penthorum chinense* Pursh had been shown to alleviate liver injury and inflammatory cells infiltration through H. E staining. Total flavone in *Penthorum chinense* Pursh had a protective effect on LPS-induced liver injury in mice.

Key words: total flavonoid of *Penthorum chinense* Pursh; LPS; liver injuries; liver protection

现代养殖业以集约化、规模化、高密度、周期短为特点,由于疫病的压力巨大,养殖企业往往在动物日粮和疾病防治中大量使用抗生素等化学药品^[1]。但化学药品的过度使用往往对肝脏造成过度伤害,影响肝脏的正常机能,进而影响畜禽的生长性能^[2]。赶黄草(*Penthorum chinense* Pursh)能活血化瘀,抑制肝纤维化、肝硬化,其中的没食子酸和槲皮素等成分均被证明具有抗肝炎病毒和保护肝组织的作用^[3]。前人研究^[4]表明,赶黄草的水提取物有一定的利胆退黄作用。但目前关于赶黄草在畜牧业生产中的应用研究较少。为此,研究赶黄草总黄酮对细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱发的小鼠肝损伤的影响,旨在为赶黄草的开发及其在畜牧业生产中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 健康成年昆明种小鼠(由成都中医药大学实验动物中心提供)50只,雌雄各半,体质量18~22 g。在25~28℃正常环境中适应性喂养3 d后,随机分为5个组,每组各10只。

1.1.2 药物 赶黄草购于四川省古蔺县赶黄草合作社,提取总黄酮,具体步骤如下:称取赶黄草200 g,粉碎,加入70%乙醇4 000 mL,浸泡4 h,然后回流提取90 min,过滤得提取液。滤渣再次加入同样体积乙醇,重复操作2次。以上滤液经80℃水浴旋转蒸发回收乙醇后,减压浓缩干燥得赶黄草总黄酮,4℃备用。应用时加数滴吐温-80,用生理盐水配至所需质量浓度:药液每毫升含粗提取物干物质分别为0.10、0.05 g。

联苯双酯(批号H11020979)购自北京协和药厂。

1.1.3 试剂 脂多糖(批号20130625)购于Sigma公司;谷丙转氨酶(ALT)测定试剂盒(批号C009-1)、谷草转氨酶(AST)测定试剂盒(批号20130421)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法,批号20130325)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(批号20130512)、蛋白质测定试剂盒(考马斯亮蓝法,批号20130725)均购自南京建成生物工程研究所。多聚甲醛、乙醇均为分析纯。

1.1.4 仪器与设备 台式低速离心机、电热恒温水浴锅、索式提取器、紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 将供试动物随机分为5组,分别为空白组、模型组、联苯双酯阳性对照组及赶黄草总黄酮高剂量组(0.10 g/mL)、低剂量组(0.05 g/mL),每组10只。赶黄草总黄酮高、低剂量组分别按照10 mg/kg、2 mg/kg灌服;联苯双酯阳性对照组按照5 mg/kg灌服;空白组和模型组分别灌胃等容积的生理盐水。参照文献[5-6]的方法并做适当修改,药物组采用灌胃受试药法14 d,末次给药后2 h,空白组按2 mL/kg的剂量尾静脉注射生理盐水,其余各组按5 mg/kg的剂量尾静脉注射LPS进行造模。尾静脉注射后禁食,自由饮水12 h后测体质量并摘除眼球取血,分离血清,处死小鼠,摘取肝脏等进行有关指标的测定。

1.2.2 测定项目

1.2.2.1 小鼠日常观察 试验过程中观察小鼠状态、食欲、皮毛、精神等情况,并于1 d、7 d、14 d时称体质量,记录体质量变化情况。

1.2.2.2 血清酶活性 取分离后的血清0.2 mL,按试剂盒所述方法测定血清中的ALT、AST活性。

1.2.2.3 组织中的SOD活性与MDA含量 取约0.5 g的肝脏组织,用冰冷生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干,称质量,在冰浴盒上剪碎,用生理盐水配成10%肝组织液,使用匀浆器制备肝组织匀浆,低温离心取上清液,按试剂盒说明书所述方法用紫外可见分光光度计测定肝匀浆中SOD活性及MDA含量。

1.2.2.4 脏器指数 剖取各组小鼠的肝脏、脾脏、胸腺、心脏、肺脏及肾脏,称质量,计算脏器指数,公式如下:小鼠脏器指数=内脏质量量(mg)/体质量(g)。

1.2.2.5 肝组织病理学观察 选取每组小鼠肝右叶组织进行石蜡切片。采用HE染色法染色,光镜下观察各组肝脏病理组织学的变化情况。

1.3 数据处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析,差异显著时进行LSD多重比较,以 $P < 0.01$ (差异极显著)和 $P < 0.05$ (差异显著)作为差异显著性判断标准,数

据以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 LPS 诱发的肝损伤小鼠日常观察

空白组小鼠,各项生命表征活动正常,体质量稳步增长;模型组小鼠造模前与空白组表现一致,造模后精神食欲不振,活动也明显减少;赶黄草总黄酮高、低剂量组小鼠造模前活动情况接近空白组,但饮食较少,体质量增长缓慢,造模后精神、采食下降;阳性对照组造模前与空白组保持一致,饮食及活动情

况均正常,精神状态良好,但体质量增长稍缓慢,造模后也出现精神萎靡、活动减少。

从表 1 可以看出,在 1—7 d 阶段,空白组体质量增加显著高于赶黄草总黄酮高剂量组;在 7—14 d 阶段,低剂量、高剂量组体质量增加均极显著低于其他组;全程增质量比较,赶黄草总黄酮低、高剂量组体质量增加均显著低于空白组、模型组、阳性对照组。表明赶黄草总黄酮对小鼠生长有一定抑制作用。

表 1 各处理组小鼠体质量变化的情况

g

组别	初质量	1—7 d 增质量	7—14 d 增质量	全程增质量
空白组	19.23 ± 1.58 ^a	2.59 ± 2.42 ^{Aa}	2.83 ± 1.15 ^{Aa}	5.43 ± 3.19 ^{ABa}
模型组	19.97 ± 1.00 ^a	2.20 ± 0.82 ^{Aab}	3.92 ± 1.94 ^{Aa}	6.12 ± 1.38 ^{Aa}
高剂量组	19.88 ± 1.21 ^a	0.45 ± 2.63 ^{Ab}	0.52 ± 0.17 ^{Bb}	0.97 ± 0.25 ^{Cbc}
低剂量组	19.55 ± 1.44 ^a	1.55 ± 1.38 ^{Aab}	0.82 ± 0.27 ^{Bb}	2.37 ± 1.59 ^{BCc}
阳性对照组	20.10 ± 1.21 ^a	1.38 ± 1.72 ^{Aab}	2.92 ± 0.31 ^{Aa}	4.30 ± 2.69 ^{ABa}

注:同列肩标不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下表同。

2.2 赶黄草总黄酮对 LPS 诱发的肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性的影响

由表 2 可知,与空白组相比,模型组小鼠的 ALT、AST 活性分别升高 91.25% ($P < 0.01$)、35.60% ($P < 0.05$),表明 LPS 对小鼠肝细胞造成了严重的损伤,造模成功。与模型组相比,赶黄草总黄酮高、低剂量组的 ALT 活性分别降低 26.53% ($P < 0.01$)、16.74% ($P < 0.05$)。赶黄草总黄酮高、低剂量组 AST 活性与空白组差异不显著 ($P > 0.05$),分别低于模型组 12.50% ($P < 0.05$)、9.88% ($P < 0.05$)。与阳性对照组相比,赶黄草总黄酮高、低剂量组的 AST 活性分别升高 59.22% ($P < 0.01$)、63.99% ($P < 0.01$)。

表 2 赶黄草总黄酮对 LPS 肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性的影响

U/L

组别	ALT 活性	AST 活性
空白组	15.65 ± 2.26 ^{Bb}	42.19 ± 7.76 ^{ABb}
模型组	29.93 ± 5.07 ^{Aa}	57.21 ± 3.90 ^{Aa}
高剂量组	21.99 ± 4.60 ^{Bb}	50.06 ± 1.87 ^{ABb}
低剂量组	24.92 ± 2.82 ^{Ab}	51.56 ± 2.93 ^{ABb}
阳性对照组	16.91 ± 3.17 ^{Bb}	31.44 ± 8.45 ^{Cc}

2.3 赶黄草总黄酮对 LPS 诱发的肝损伤小鼠肝脏组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响

由表 3 可知,与模型组比较,空白组、阳性对照组及赶黄草总黄酮高、低剂量组小鼠肝匀浆 SOD 活性分别升高 24.66% ($P < 0.05$)、36.14% ($P < 0.01$)、26.46% ($P < 0.05$)、21.77% ($P < 0.05$),小

鼠肝匀浆 MDA 含量分别降低 42.51% ($P < 0.01$)、54.03% ($P < 0.01$)、48.73% ($P < 0.01$)、59.80% ($P < 0.01$),且除模型组外,其余各组间 SOD 活性和 MDA 含量差异均不显著。表明,赶黄草总黄酮能提高肝脏抗氧化的能力。

表 3 赶黄草总黄酮对 LPS 肝损伤小鼠肝脏组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响

组别	SOD 活性/ (U/mg)	MDA 含量/ (nmol/mg)
空白组	115.36 ± 6.29 ^{ABa}	12.47 ± 1.42 ^{Bb}
模型组	92.54 ± 5.64 ^{Bb}	21.69 ± 4.42 ^{Aa}
高剂量组	117.03 ± 10.16 ^{ABa}	11.12 ± 2.52 ^{Bb}
低剂量组	112.69 ± 2.99 ^{ABa}	8.72 ± 4.02 ^{Bb}
阳性对照组	125.98 ± 16.61 ^{Aa}	9.97 ± 4.38 ^{Bb}

2.4 赶黄草总黄酮对 LPS 诱发的肝损伤小鼠脏器指数的影响

病理剖检发现,模型组肝脏肿大、瘀血,肺脏充血、瘀血严重;而空白组各器官正常;阳性对照组、赶黄草总黄酮高剂量组外观基本正常;赶黄草总黄酮低剂量组肝脏轻微肿大,肺部有瘀血。从表 4 可以看出,与模型组相比,空白组、阳性对照组及赶黄草总黄酮高、低剂量组小鼠的肝脏指数分别降低 12.69% ($P < 0.05$)、20.69% ($P < 0.05$)、10.36% ($P < 0.05$)、3.80% ($P > 0.05$);与模型组相比,阳性对照组及赶黄草总黄酮高、低剂量组小鼠的脾脏指数分别升高 10.92% ($P < 0.05$)、9.66% ($P < 0.05$)、9.45% ($P > 0.05$),肺脏指数分别降低 21.98% ($P > 0.05$)、19.63% ($P > 0.05$)、8.89%

($P>0.05$) 胸腺指数、心脏指数及肾脏指数各组间 差异均不显著。

表 4 赶黄草总黄酮对 LPS 肝损伤小鼠脏器指数的影响						mg/g
组别	肝脏指数	脾脏指数	胸腺指数	心脏指数	肺脏指数	肾脏指数
空白组	49.13 ± 3.70 ^{Ab}	4.22 ± 1.24 ^{Ab}	1.42 ± 0.82 ^a	5.79 ± 1.11 ^a	4.34 ± 0.113 ^{Ab}	7.38 ± 1.15 ^a
模型组	56.27 ± 4.57 ^{Aa}	4.76 ± 1.20 ^{Ab}	1.45 ± 0.17 ^a	5.96 ± 2.13 ^a	5.96 ± 0.19 ^{Aa}	7.31 ± 2.22 ^a
高剂量组	50.44 ± 2.75 ^{Ab}	5.22 ± 2.28 ^{Aa}	1.42 ± 0.14 ^a	6.49 ± 1.13 ^a	4.79 ± 0.21 ^{Ab}	7.74 ± 1.70 ^a
低剂量组	54.13 ± 4.85 ^{Aab}	5.21 ± 3.47 ^{Aab}	1.47 ± 0.01 ^a	5.83 ± 2.13 ^a	5.43 ± 0.31 ^{Aa}	7.55 ± 2.21 ^a
阳性对照组	44.63 ± 3.32 ^{Ab}	5.28 ± 2.31 ^{Aa}	1.43 ± 0.16 ^a	6.30 ± 1.11 ^a	4.65 ± 0.23 ^{Ab}	7.21 ± 2.26 ^a

2.5 小鼠肝脏病理学观察结果

图 1A、图 1B 为显微镜下观察正常小鼠的肝组织,可见结构清晰,肝索排列整齐,肝小叶无肿胀和坏死,无炎性细胞浸润和纤维结缔组织增生。图 2A、图 2B 为显微镜下观察 LPS 模型组小鼠肝组织,可见肝细胞索离断,肝小叶结构紊乱,其间大片肝细胞坏死消失伴大量淋巴细胞浸润,并出现明显肿胀,这说明造模成功。图 3A、图 3B 为显微镜下观察高剂量组小鼠肝组织,可见肝细胞坏死、变形程度有所改善,炎性浸润也减少,破坏程度较模型组减轻,肝索排列紊乱。图 4A、图 4B 为显微镜下低剂量组小鼠肝组织,主要表现为不同程度细胞变形和炎性浸润,部分组织可见坏死细胞及正常细胞交错现象,肝细胞排列紊乱。图 5A、图 5B 为显微镜下阳性对照组小鼠肝组织,可见再生现象,再生结节较模型组明显增多,炎性浸润减少,可见肝索结构,肝细胞损伤明显减轻。

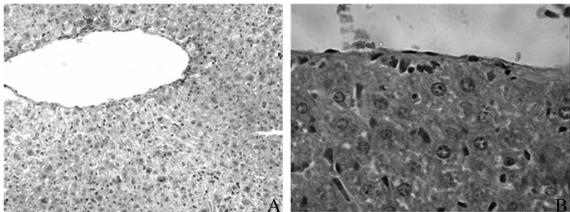


图 4 赶黄草低剂量组肝脏结构

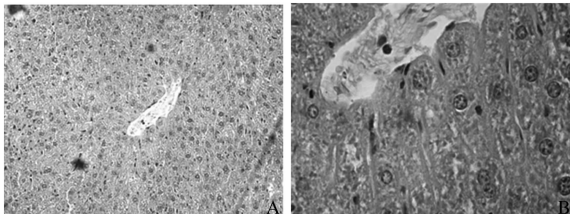


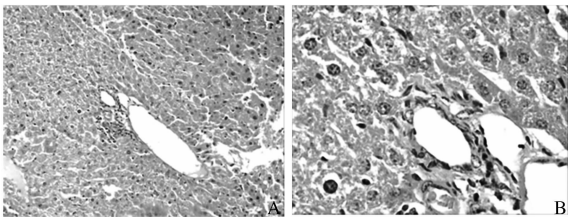
图 5 阳性对照组肝脏结构

根据以上组织病理观察的结果,赶黄草总黄酮各剂量组均有一定疗效,低、高剂量组疗效比较,高剂量组肝细胞修复现象较为明显,残存的肝组织内坏死区域明显减少。

3 结论与讨论

朱晓梅等^[7]研究表明,大豆黄酮在动物体内如果含量高时会抑制睾酮和生长激素的生成和释放,从而使动物的生长受到抑制。张勇等^[8]研究发现,高浓度红三叶草异黄酮提取物对小鼠生长同样具有抑制作用。本试验表明,赶黄草总黄酮对小鼠生长性能有抑制作用且作用大小与剂量有关,对小鼠的体质量增加效果随药物剂量升高而降低,剂量增大有抑制作用。

植物中黄酮类有效成分在消除自由基、抑菌等方面有显著效果^[9]。机体在严重应激状态下,外源性细菌侵入或肠源性细菌及 LPS 移位入血导致炎症反应细胞活化,形成内毒血症,并时常伴有肝功能严重受损^[10-11]。而血清中转氨酶、SOD 活性及 MDA 含量是反映肝细胞损害程度及细胞氧化损伤的重要检测指标。本试验中小鼠尾注射 LPS 12 h 后,模型组血清内 AST 活性和 ALT 活性均显著增高,与栗福星等^[12]报道的一致。本试验证实,小鼠肝脏受损会



A、B 分别为 HE 200 ×、HE 400 × 下观察的结果,下同
图 1 空白组肝脏结构

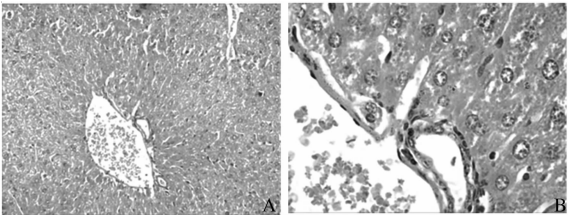


图 2 模型组肝脏结构

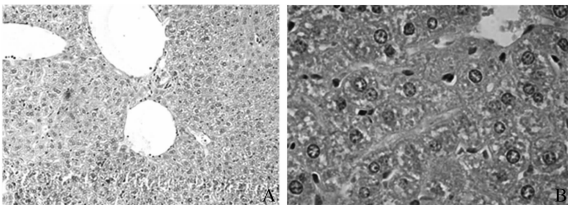


图 3 赶黄草高剂量组肝脏结构

导致转氨酶释放到血液中,使血清中的 AST 和 ALT 活性升高;而赶黄草总黄酮高、低剂量组 ALT、AST 活性均比模型组低,说明赶黄草总黄酮能保护肝细胞,减少肝细胞损伤后酶的逸出,在一定程度上起到了保护肝脏的作用。肝、肺脏器指数的变化也说明了 LPS 可以引起全身多个器官的炎症以及形态变化;同时自由基与脂质过氧化作用在肝损伤与肝病发生发展中也起着重要作用。大量动物试验也证实,自由基清除系统损伤是引起肝细胞损伤的重要环节,机体血清或血浆中脂质过氧化终产物 MDA 含量升高的同时,自由基清除剂如 SOD 严重减少或缺乏,说明 LPS 诱导的肝损伤存在严重的自由基代谢紊乱^[13-14]。本试验结果显示,模型组小鼠肝组织 MDA 含量明显升高,而发挥清除自由基作用的 SOD 活性水平明显降低,同时给予赶黄草总黄酮的小鼠肝组织匀浆 MDA 含量较模型组明显降低,SOD 活性水平明显升高,说明赶黄草总黄酮对 LPS 诱导的小鼠肝损伤的防治机制可能与其提高机体抗脂质过氧化能力有关。

通过对实质器官的病理学观察和器官指数测定表明,LPS 主要损害肝脏和肺脏,这与郭凡溪等^[15]的报道一致。同时,病理观察结果显示,模型组肝细胞肿胀、坏死、炎细胞浸润,表明 LPS 诱导小鼠急性肝损伤模型成功;而赶黄草总黄酮各剂量组较模型组肝细胞坏死、变形程度有所改善,炎性浸润也减少,破坏程度减轻,对小鼠的肝脏和肺脏有一定的保护作用。

本试验结果表明,赶黄草总黄酮能降低 LPS 导致的小鼠急性肝损伤酶活性,提高抗氧化能力,改善肝组织病变,发挥护肝作用。

参考文献:

- [1] 施杏芬,陆国林,周文海,等. 抗生素饲料添加剂的危害及防止对策[J]. 中国动物检疫,2005(1):28-29.
- [2] 梁斌,王冬梅,代珍青,等. 中药对肉鸡的肝脏损伤与

- 保护效果研究[J]. 广西畜牧兽医,2011,27(4):198-199.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2000:480.
- [4] 张中贤,黄剑臻. 赶黄草水提取物利胆退黄作用的研究[J]. 热带医学杂志 2008,8(2):125-127.
- [5] 刘韦成,罗学来. 脂多糖诱导小鼠肝损伤模型及致死模型的建立[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(2):330-332.
- [6] 陈玺华,王锋,韩德五,等. 甘氨酸抗内毒素性休克和肝损伤的作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志,2003(20):415-417.
- [7] 朱晓梅,刘兆斌,缪爱琴,等. 大豆黄酮对大鼠肌肉生长、内分泌水平的影响[J]. 体育与科学,2004,25(6):62-64.
- [8] 张勇,朱宇旌,任慧玲,等. 红三叶草异黄酮提取物对小鼠生长性能和免疫功能的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2008,39(1):104-107.
- [9] 朱海扬,曾慧兰. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 山东医药,2009,49(17):114-115.
- [10] Martin G S, Mannino D, Eaton S, *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 [J]. N Engl J Med,2003,348(16):1546-1554.
- [11] Fukazawa A, Yokoi Y, Kurachi K, *et al.* Implication of B lymphocytes in endotoxin-induced hepatic injury after partial hepatectomy in rats[J]. Surg Res,2007,137(1):21-29.
- [12] 栗福星,董如玉,陈坤,等. 牛膝水煎液对小鼠免疫性肝损伤的影响[J]. 畜牧与兽医,2012,44(7):73-76.
- [13] 张丛. 梅绞股蓝多糖对四氯化碳所致大鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):244-247.
- [14] 王志旺,王瑞琼,郭玫,等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):206-209.
- [15] 郭凡溪,刘腾飞,耿智霞,等. 复方甘草酸单胺可溶性粉对恩诺沙星联合 LPS 致鸡肝损伤的免疫调节[J]. 中国农业科学,2013,46(12):2576-2583.