

绿茶、乌龙茶和红茶提取物对 2,4-二氯苯氧乙酸诱导的斑马鱼胚胎形态发育毒害的影响

黄勛宏, 谢芊雨, 刘 尧, 朱佳仪, 王维香*

(西华大学食品与生物工程学院, 成都 610065)

摘 要: 目的 研究绿茶提取物(green tea extract, GTE)、乌龙茶提取物(Oolong tea extract, OTE)和红茶提取物(black tea extract, BTE)对 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)导致的斑马鱼胚胎发育毒害的影响。**方法** 用 50 mg/L 2,4-D 分别联合 6.25、12.50 和 25.00 mg/L GTE, 6.25、12.50 和 25.00 mg/L OTE 以及 50、100 和 150 mg/L BTE 处理斑马鱼胚胎至 96 hpf, 体视显微镜观察斑马鱼胚胎发育并统计孵化率、死亡率、畸形率, 测定斑马鱼心跳次数、体长、卵黄和心包面积。**结果** 各处理组斑马鱼胚胎孵化正常。除 2,4-D+BTE 处理组随 BTE 浓度提高死亡率升高, 其他处理组没有发生显著死亡。GTE 降低 2,4-D 导致的斑马鱼胚胎畸变率, 提高 2,4-D 导致的心跳下降和体长缩短, 缩小 2,4-D 导致的卵黄和心包面积; 相反, BTE 加重 2,4-D 导致的斑马鱼胚胎形态发育毒害; 而 OTE 对 2,4-D 导致的斑马鱼胚胎发育毒害无明显影响。**结论** GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 导致的斑马鱼胚胎发育毒害分别具有拮抗作用、无作用和协同作用。

关键词: 2,4-二氯苯氧乙酸; 绿茶提取物; 乌龙茶提取物; 红茶提取物; 斑马鱼; 发育毒害

Effects of green, Oolong, and black tea extracts on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced embryonic morphological developmental toxicity of zebrafish

HUANG Xu-Hong, XIE Qian-Yu, LIU Yao, ZHU Jia-Yi, WANG Wei-Xiang*

(College of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610065, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of green tea extract (GTE), Oolong tea extract (OTE) and black tea extract (BTE) on the developmental toxicity of zebrafish embryos caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). **Methods** Zebrafish embryos were treated with 50 mg/L 2,4-D in combination with 6.25, 12.50 and 25.00 mg/L GTE, 6.25, 12.50 and 25.00 mg/L OTE and 50, 100 and 150 mg/L BTE up to 96 hpf, and zebrafish embryos were observed for hatching rate, mortality rate, malformation rate the number of heartbeats, body length, yolk and pericardial area of zebrafish were also measured. **Results** Zebrafish embryos hatched normally in all treatment groups. No significant mortality occurred in the treatment groups except for the 2,4-D+BTE treatment group where mortality increased with increasing BTE concentration. GTE reduced the rate of 2,4-D-induced malformation in zebrafish embryos, increased 2,4-D-induced heartbeat reduction and body length shortening, and

基金项目: 四川省国际科技合作(澳新)研究院项目(AXYJ2022-003)

Fund: Supported by the Sichuan International Science and Technology Cooperation (Australia and New Zealand) Research Institute (AXYJ2022-003)

*通信作者: 王维香, 博士, 副教授, 主要研究方向为毒理学, 食品中活性物质的分离纯化、功能和应用研究。E-mail: wang_weixiang@hotmail.com

*Corresponding author: WANG Wei-Xiang, Ph.D, Associate Professor, College of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu 610065, China. E-mail: wang_weixiang@hotmail.com

reduced 2,4-D-induced yolk and pericardial area. Conversely, BTE increased 2,4-D-induced morphological toxicity in zebrafish embryos, whereas OTE had no significant effect on the developmental toxicity of 2,4-D-induced zebrafish embryos. **Conclusion** GTE, OTE and BTE have antagonistic, no effect and synergistic effects on the developmental toxicity of zebrafish embryos caused by 2,4-D, respectively.

KEY WORDS: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; green tea extract; Oolong tea extract; black tea extract; *Danio rerio*; developmental toxicity

0 引言

茶是一种流行的饮料,起源于亚洲,按加工方式一般可分为白茶、绿茶、黄茶、乌龙茶、红茶和黑茶^[1]。茶叶提取物富含多酚类化合物,如表儿茶素、表儿茶素、没食子酸表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、黄酮、酚酸、茶红素和茶黄素^[2-5]。研究表明,茶有许多健康功能,如延缓衰老、抗糖尿病、抑制心血管疾病、抗癌、抗菌、减肥去脂、神经保护和肝脏保护^[6-11]。据报道,绿茶提取物(green tea extract, GTE)中的儿茶素能缓解毒死蜱诱导的斑马鱼仔鱼氧化应激^[12]。乌龙茶提取物(Oolong tea extract, OTE)可通过激活心肌细胞和H9c2细胞中的Nrf2途径来增强抗氧化机制,从而抵抗末端激酶的肥大^[13]。红茶提取物(black tea extract, BTE)可延长氧化应激的果蝇平均寿命和存活时间,降低乳过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)水平以及上调*sod1*和*cat*的表达^[14]。

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一种苯氧乙酸类化合物,是超过1500多种除草剂/杀虫剂的主要成分,广泛运用于农业和林业^[15-17]。2,4-D作为植物生长调节剂还用于无根豆芽生产中,可诱导豆芽细胞增殖,缩短根部,提高外观品质^[18]。此外,2,4-D可以调节植物生长,并像天然生长素一样促进细胞分裂和伸长,在低浓度下用于水果的保鲜^[19-20]。据报道,2,4-D在空气、土壤和水环境中都被广泛检测到,与动物、植物和微生物生活息息相关^[21]。皮肤、眼睛和呼吸接触或摄入2,4-D会造成皮肤刺激、瘙痒、烧灼感,眼睛刺激和发红,呼吸困难、咳嗽和肺部灼热,急性高剂量摄入2,4-D会导致手臂和腿部僵硬、不协调、嗜睡、厌食、昏迷、呕吐、腹泻和头痛^[22]。更重要的是,2,4-D已经被国际癌症研究机构归类为2B类致癌物——“可能对人类致癌”^[23]。此外,以前的研究表明,斑马鱼胚胎暴露于2,4-D会干扰心脏发育,诱导氧化应激,影响心脏相关和氧化应激相关基因的表达水平,导致脂质过氧化和DNA损伤,引起神经和行为改变,改变视网膜结构并产生不同类型的畸形,如心包和卵黄水肿^[15,18,24-27]。

斑马鱼(*Danio rerio*)是一种常见的热带鱼,因其易于饲养、产卵率高、胚胎透明,有着与哺乳动物相似的心血管、神经和免疫系统,且许多化合物溶于水后很容易被斑马鱼胚胎吸收,已成为科学研究中常用的脊椎动

物模型^[18,28-30]。前人研究倾向于评估2,4-D单独暴露对斑马鱼胚胎的毒性影响,但关于2,4-D与其他物质结合的毒性效应尚未见报道。本研究采用3种茶叶提取物与2,4-D同时处理斑马鱼胚胎,探究其与2,4-D联合后对斑马鱼胚胎形态发育的毒害效应,为茶叶提取物的开发应用以及2,4-D引起的不良反应提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生型斑马鱼雌雄成鱼,形态正常,游动灵活,购于南京一树梨花生物科技有限公司。

氯化钠(分析纯,天津福晨化学试剂有限公司); 2,4-D(纯度98%)、碳酸氢钠、无水氯化钙、氯化钾、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(分析纯)(成都市科隆化学有限公司); GTE、OTE(提取比例10:1, 4℃保存,陕西新天域生物科技有限公司); BTE(提取比例10:1, 4℃保存,上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

四层双排斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司); V1.0 明美显微数码测量分析系统(广州市明美光电技术有限公司); BPH-9082 恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); SZX10 体视显微镜(日本奥林巴斯株式会社); BSA224S-CW 万分之一天平(德国赛多利斯公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 处理液配制

50 mg/L 2,4-D 配制: 2,4-D 先用微量 DMSO 溶解,再用超纯水配制成 1 g/L 2,4-D 母液, -20℃ 保存; 然后用胚胎培养液(60.00 mmol/L NaCl、0.67 mmol/L KCl、0.90 mmol/L CaCl₂ 和 0.30 mmol/L NaHCO₃)将 2,4-D 母液稀释成 50 mg/L 2,4-D 处理液, DMSO 最终浓度为 0.05%, 现用现配。

前期研究发现, GTE、OTE 和 BTE 对斑马鱼胚胎 96 hpf 半致死浓度(lethal concentration 50, LC₅₀)分别为 185.87、112.74 和 2241.76 mg/L^[31]。分别选取 3 种茶叶提取物 1/4、1/8 和 1/16 LC₅₀ 进行预实验, 最高浓度分别对应为 50 mg/L GTE、25 mg/L OTE 和 500 mg/L BTE, 但 50 mg/L GTE 影响斑马鱼胚胎发育, 而 500 mg/L 和 250 mg/L BTE 联合 2,4-D 后斑马鱼胚胎全部死亡, 因此最终采用 25 mg/L GTE、25 mg/L OTE 和 150 mg/L

BTE 作为最高处理浓度进行研究。

25 mg/L GTE、25 mg/L OTE 和 150 mg/L BTE 处理液配制: GTE、OTE 和 BTE 用超纯水溶解后分别配制成 0.5、1.0 和 10.0 g/L 母液, 然后用胚胎培养液分别稀释成 25 mg/L GTE、25 mg/L OTE 和 150 mg/L BTE 处理液, 现用现配。

50 mg/L 2,4-D 与 GTE、OTE 和 BTE 的联合处理液: 分别将一定体积 GTE、OTE 和 BTE 母液与 2,4-D 母液混合后用胚胎培养液稀释制成 6.25、12.50 和 25.00 mg/L GTE+50 mg/L 2,4-D, 6.25、12.50 和 25.00 mg/L OTE+50 mg/L 2,4-D 和 50、100 和 150 mg/L BTE+50 mg/L 2,4-D 处理液, DMSO 最终浓度为 0.05%, 现用现配。

1.3.2 胚胎收集与处理

实验前一天晚上, 从养殖盒里捞出斑马鱼成鱼, 分别在每个放有隔离板的交配盒里放一条雌鱼和两条雄鱼, 然后将交配盒在 28.5℃黑暗处理; 次日早上, 将隔板抽离并进行曝光; 0.5 h 后, 收集胚胎, 用胚胎液冲洗, 去除杂质。受精后 4 hpf 随机选择发育正常的胚胎放入六孔板中, 每孔 20 个, 加入 5 mL 不同处理液, 置于恒温培养箱中

28.5℃恒温培养至 96 hpf。采用体视显微镜观察并统计斑马鱼胚胎在 96 hpf 内的孵化率、死亡率、畸形率、卵黄水肿率、卵黄肿大黑率、心包水肿率、脊柱弯曲率和 20 s 心跳次数, 显微数码测量分析系统静态测量 72 hpf 和 96 hpf 体长、卵黄和心包面积。每天观察结束将死亡胚胎挑出, 并更换新鲜处理液。每一处理重复 3 次。

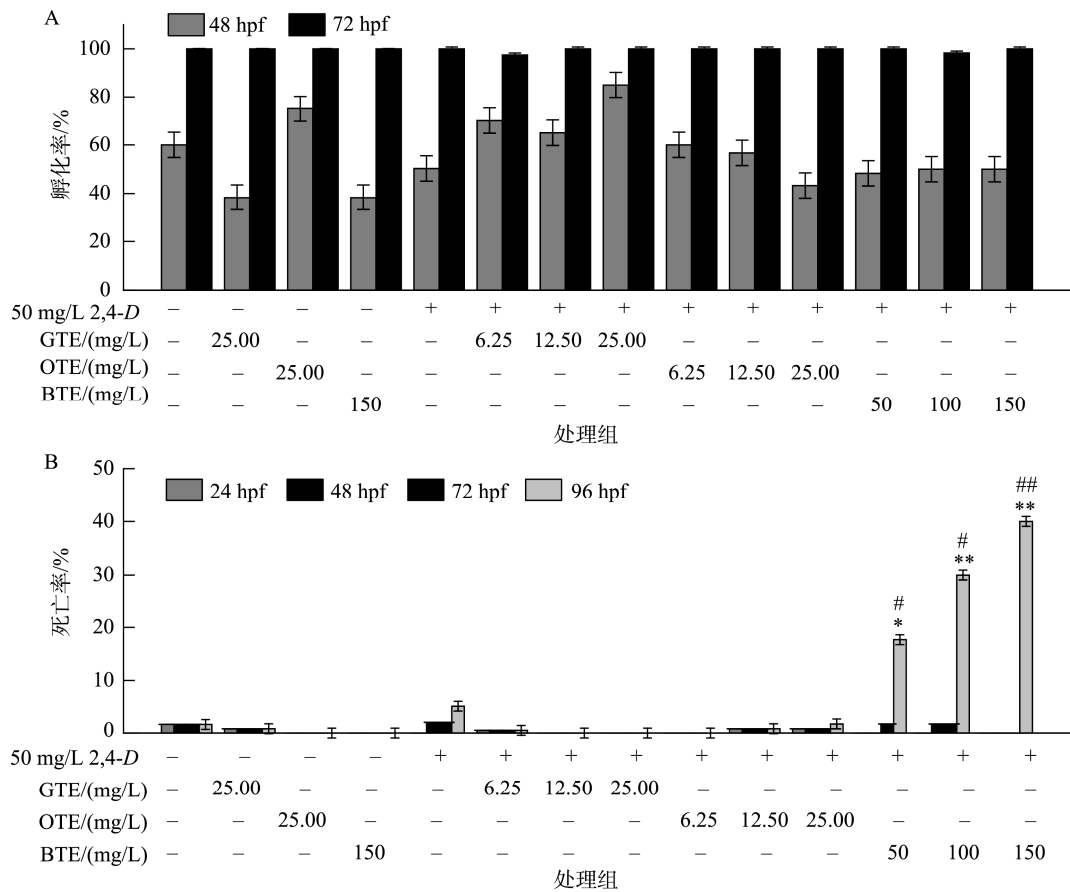
1.4 数据处理

采用 Excel 2020 进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA), Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎发育孵化率和死亡率的影响

GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎孵化率和死亡率的影响见图 1A 和 1B。从图 1A 可见, 72 hpf 时, 各组处理, 包括 2,4-D 处理组, 斑马鱼胚胎的孵化率皆正常, 为 100%。表明各处理组暴露不影响斑马鱼胚胎孵化。



注: *与对照组差异显著($P<0.05$); **与对照组差异非常显著($P<0.01$); #与 2,4-D 组差异显著($P<0.05$); ##与 2,4-D 组差异非常显著($P<0.01$), 图 2~7 同。

图 1 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎孵化率(A)和死亡率(B)的影响

Fig.1 Effects of GTE, OTE and BTE on hatchability (A) and mortality rates (B) of zebrafish embryos treated with 2,4-D

从图 1B 可见, 96 hpf 前各处理组的死亡率均低于 5%; 96 hpf 时, GTE 和 OTE 分别与 2,4-D 联合处理后死亡率没有增加, 均低于 5%, 而 2,4-D 与 BTE 联合处理, 随 BTE 浓度提高死亡率升高, 其中 2,4-D+150 mg/L BTE 联合处理组的死亡率达到 40%, 表明 BTE 加剧胚胎死亡。

2.2 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎形态发育畸变的影响

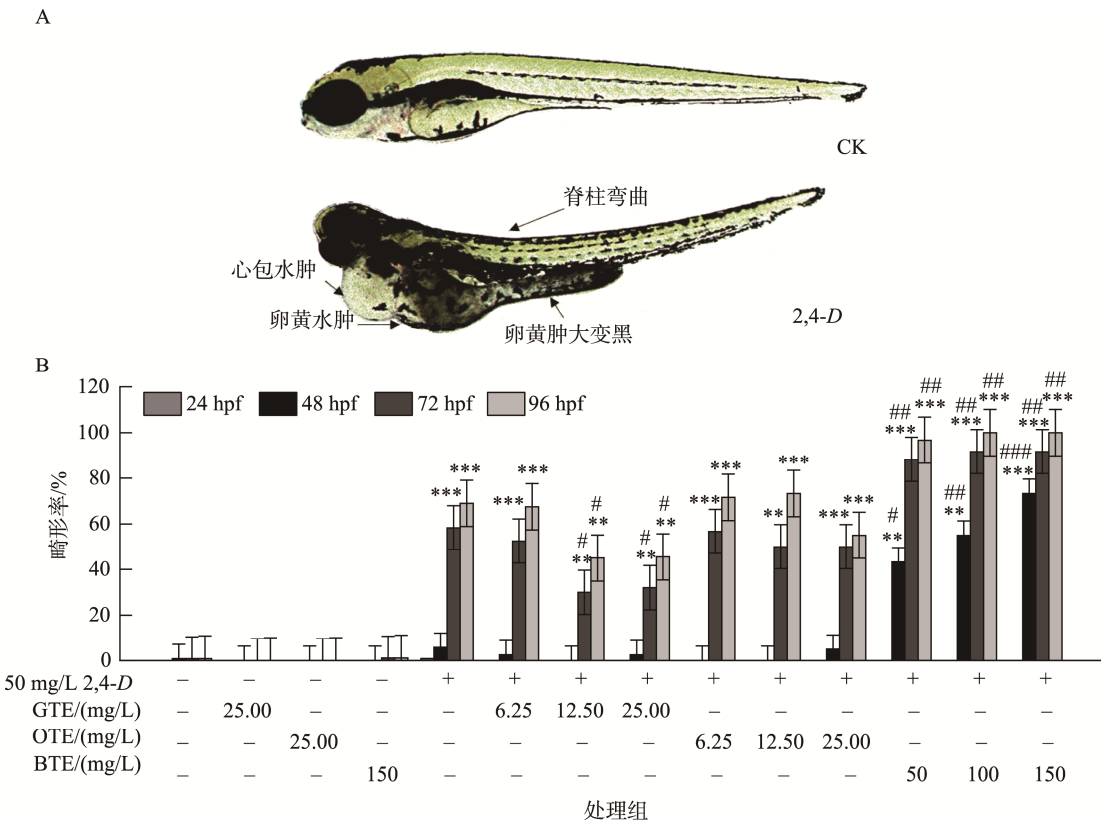
从图 2A 可见, 对照组斑马鱼胚胎发育正常, 而 2,4-D 暴露导致斑马鱼胚胎发育畸变, 以卵黄水肿、卵黄肿大变黑、心包水肿和脊柱弯曲为主, 与 LI 等^[18]研究结果一致。

在 96 hpf 内, 对照组和 3 种茶叶提取物组处理的胚胎发育正常, 没有畸形出现; 2,4-D 处理组随处理时间延长畸形率增加, 96 hpf 时, 2,4-D 暴露导致斑马鱼胚胎的总畸形率(图 2B)、卵黄水肿率(图 3A)、卵黄肿大变黑率(图 3B)、心包水肿率(图 3C)和脊柱弯曲率(图 3D)分别为 69.00%、30.00%、60.00%、67.50%和 38.33%; 与 GTE 联合处理后, 随 GTE 浓度提高畸形率显著降低, 其中总畸形率、卵黄水肿率、卵黄肿大变黑率、心包水肿率和脊柱弯曲率最高分别下降到 45.00%、19.67%、35.56%、36.33%和 21.11%, 分别比 2,4-D 处理组的下降了 24.00%、10.33%、24.44%、

36.17%和 17.22%。2,4-D 中加入 OTE 后, 斑马鱼仔鱼的总畸形率以及各种畸形率和 2,4-D 单独处理并无明显差异, 表明 OTE 可能对 2,4-D 的毒害无明显影响。2,4-D 中加入 BTE 后, 斑马鱼总畸形率、卵黄水肿率、卵黄肿大变黑率、心包水肿率和脊柱弯曲率最高分别上升到 100.00%、73.33%、96.67%、96.67%和 96.67%, 分别比 2,4-D 处理组的上升了 31.00%、43.33%、36.67%、29.17%和 58.34%(图 2B 和图 3)。研究结果表明, GTE 对 2,4-D 导致的发育畸变有显著改善效应, 相反, BTE 加重 2,4-D 诱导的发育畸变, 而 OTE 对 2,4-D 导致的胚胎发育畸变没有影响。

2.3 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎心跳次数的影响

从图 4 可见, 72 hpf 时, 与对照组相比, 2,4-D 暴露显著降低斑马鱼心跳次数($P<0.01$), 加入 3 种茶叶提取物后, GTE 显著提高斑马鱼胚胎心跳次数($P<0.05$), 使胚胎心跳恢复正常, 而 OTE 加重 2,4-D 导致的斑马鱼心跳次数提高($P<0.01$), 相反, BTE 显著降低斑马鱼心跳次数, 抑制心跳($P<0.05$), 表明 GTE 对 2,4-D 影响的斑马鱼胚胎心跳有保护作用。



注: ***与对照组差异极显著($P<0.001$); ###与 2,4-D 组差异极显著($P<0.001$), 图 3~7 同。

图 2 2,4-D 暴露诱导斑马鱼胚胎发育畸形(A)和畸形率(B)

Fig.2 2,4-D exposure-induced zebrafish embryonic development malformation (A) and malformation rates (B)

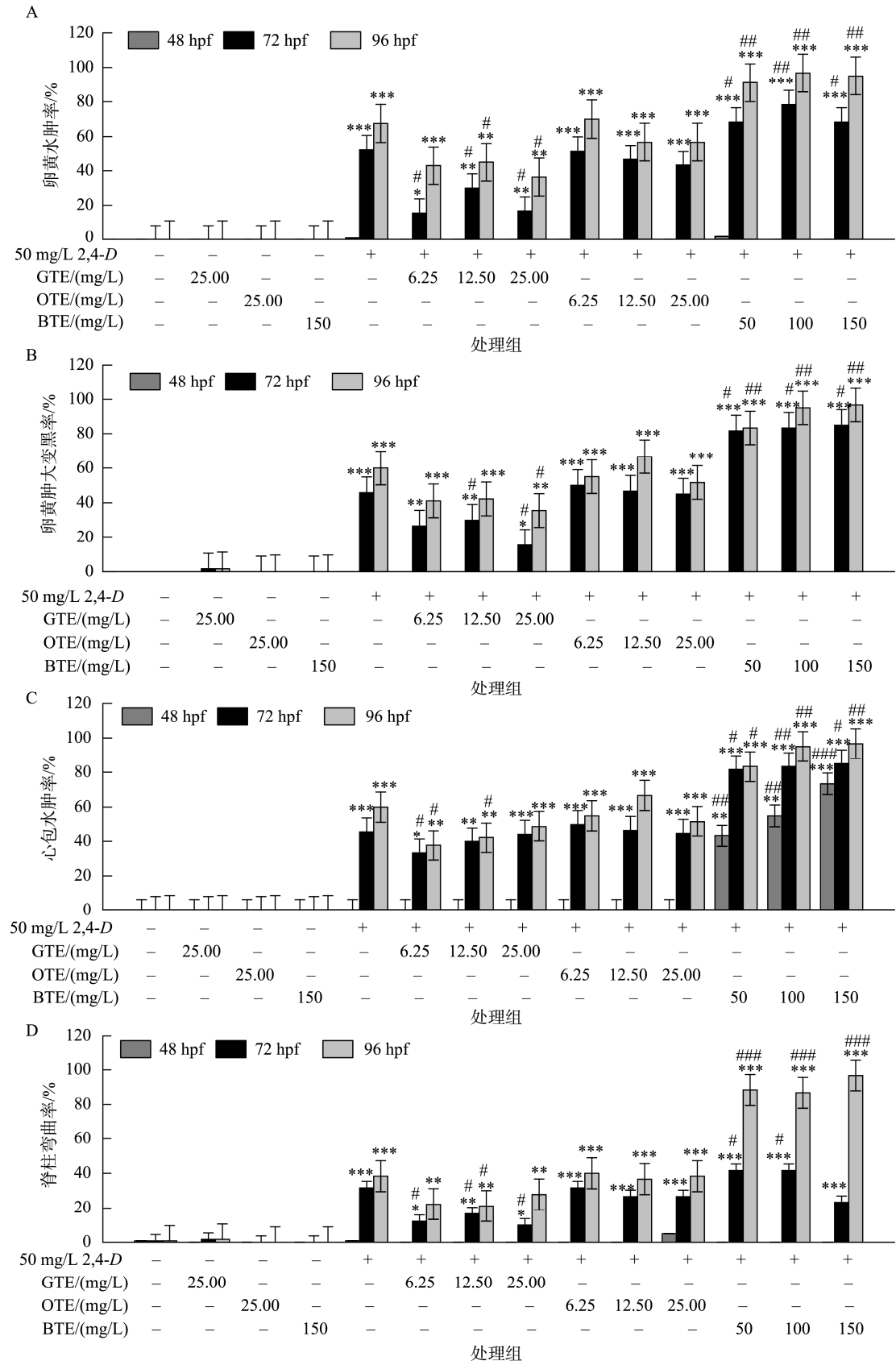


图 3 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎卵黄水肿率(A)、卵黄肿大变黑率(B)、心包水肿率(C)和脊柱弯曲率(D)的影响
Fig.3 Effects of GTE, OTE and BTE on yolk edema rates (A), yolk enlargement and blackening rates (B), pericardial edema rates (C) and spinal curvature rates (D) of zebrafish embryo treated with 2,4-D

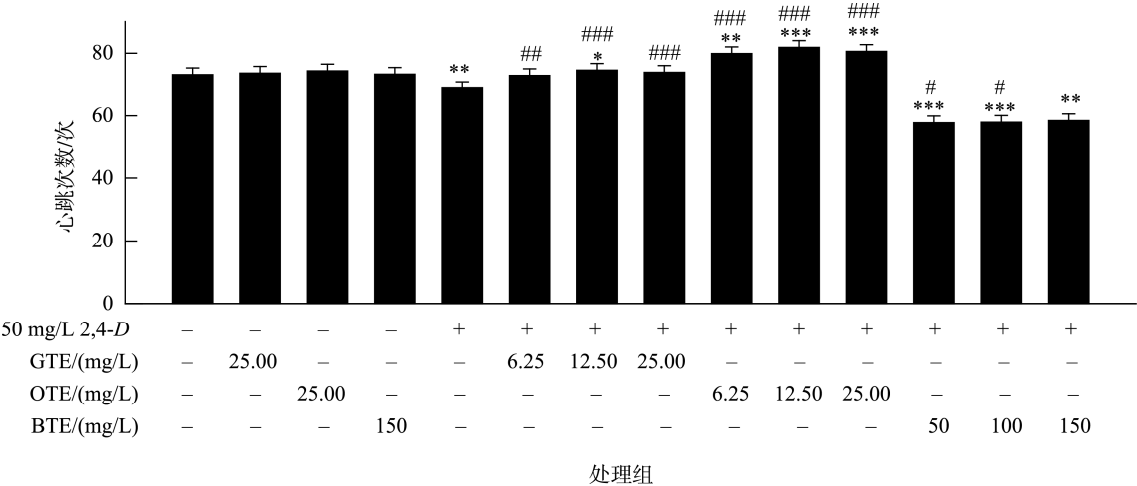


图 4 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎 72 hpf 时 20 s 心跳次数的影响
Fig.4 Effects of GTE, OTE and BTE on the number of 20 s heartbeats in zebrafish embryos treated with 2,4-D at 72 hpf

2.4 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎体长的影响

从图 5 可见, 与对照相比, 2,4-D 处理显著抑制斑马鱼胚胎生长发育, 降低仔鱼体长($P<0.001$); 加入 GTE 后, 随 GTE 浓度增加到 25.00 mg/L, 2,4-D 抑制胚胎生长发育得到显著改善, 孵化仔鱼体长提高; 相反地, 高浓度 BTE 加重 2,4-D 对胚胎发育的抑制作用, 显著降低斑马鱼仔鱼体长($P<0.01$); 而 OTE 对 2,4-D 抑制斑马鱼胚胎体长没有影响, 表明 GTE 对 2,4-D 抑制的胚胎生长发育有保护作用。

2.5 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼仔鱼卵黄面积的影响

从图 6 可见, 与对照组相比, 2,4-D 处理显著增加斑

马鱼仔鱼卵黄面积($P<0.001$), 而 GTE 能显著降低 2,4-D 导致的斑马鱼仔鱼卵黄面积增加($P<0.001$), 相反地, BTE 显著加重 2,4-D 导致的斑马鱼仔鱼卵黄面积增加($P<0.01$), 而 OTE 对 2,4-D 导致的斑马鱼仔鱼卵黄面积增加没有影响。

2.6 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼胚胎发育心包面积的影响

从图 7 可见, 与对照组相比, 2,4-D 处理显著增加斑马鱼仔鱼心包面积($P<0.001$), 25.00 mg/L GTE 显著降低 2,4-D 导致的斑马鱼仔鱼心包面积增大($P<0.05$), 而 OTE 和 BTE 对 2,4-D 导致的斑马鱼仔鱼心包面积增大没有保护作用。

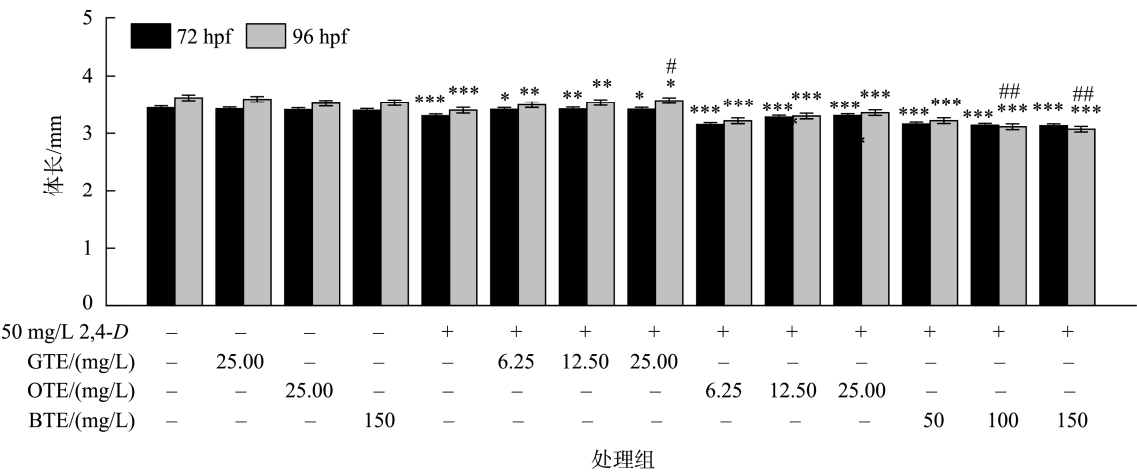


图 5 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼仔鱼体长的影响
Fig.5 Effects of GTE, OTE and BTE on body length of 2,4-D treated zebrafish larvae

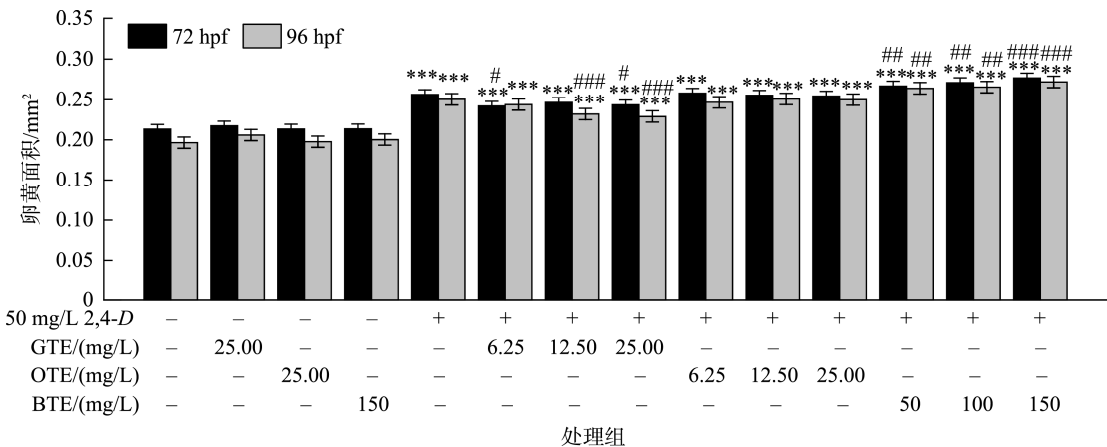


图 6 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼仔鱼卵黄面积的影响
Fig.6 Effects of GTE, OTE and BTE on the yolk area of 2,4-D treated zebrafish larvae

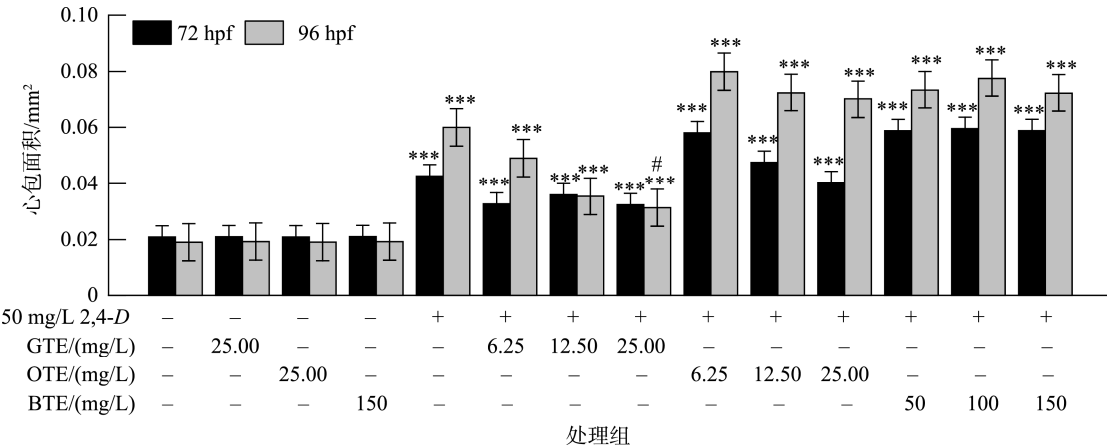


图 7 GTE、OTE 和 BTE 对 2,4-D 处理的斑马鱼仔鱼心包面积的影响
Fig.7 Effects of GTE, OTE and BTE on the pericardial area of 2,4-D treated zebrafish larvae

3 讨论与结论

本研究通过 2,4-D 与 3 种茶叶提取物 GTE、OTE 和 BTE 共同处理斑马鱼胚胎, 探究了 3 种茶叶提取物对 2,4-D 导致的斑马鱼胚胎发育毒害的影响。研究结果发现, 2,4-D 暴露对斑马鱼胚胎死亡率和孵化率无明显影响, 但导致畸形率上升, 诱导卵黄水肿、卵黄肿大变黑、心包水肿和脊柱弯曲, 其中以心包水肿为主, 与 LI 等^[18]的研究结果相似。在 2,4-D 处理中加入 GTE 后, 斑马鱼胚胎发育的总畸形率、卵黄水肿率、卵黄肿大变黑率、心包水肿率和脊柱弯曲率都显著下降, 表明 GTE 对 2,4-D 的发育毒害有保护作用; 相反 BTE 会加重 2,4-D 对斑马鱼的死亡和畸变; 而 OTE 对 2,4-D 的毒害无明显影响。

本研究结果表明, 2,4-D 暴露会导致斑马鱼心跳次数显著下降, 而 LI 等^[18]发现, 2,4-D 暴露显著提高斑马鱼心跳。存在差异可能的原因是, 刚开始接触 2,4-D 会刺激斑马鱼, 导致心跳加快, 随着暴露时间增加, 斑马鱼仔鱼心

力衰竭, 最终导致斑马鱼心跳变缓。此外, 2,4-D 暴露会导致斑马鱼仔鱼体长缩短、卵黄和心包面积增大, 与 LI 等^[18]的研究一致。GTE 对 2,4-D 导致的心率下降、体长降低、卵黄面积增大有缓解作用。OTE 能提高 2,4-D 导致的心率下降, 但对体长、卵黄和心包面积无显著影响。因此, OTE 可能对 2,4-D 诱导的斑马鱼毒害无明显影响。2,4-D 中加入 BTE 后, 加重斑马鱼仔鱼低心跳的情况, 降低斑马鱼仔鱼体长, 进一步增加斑马鱼卵黄面积, 但对心包面积无显著影响。其可能原因是 2,4-D 与 BTE 联合后, 斑马鱼发育被严重抑制, 吸收卵黄中营养物质的功能被破坏, 而心包肿大程度达到上限, 与 2,4-D 处理组也无显著差异。因此, BTE 中某些成分可能会加重 2,4-D 对斑马鱼胚胎的毒害。本课题组前期以斑马鱼胚胎为模型, 研究了 3 种茶叶提取物安全性。结果表明, GTE、OTE 和 BTE 对斑马鱼胚胎 96 hpf-LC₅₀ 分别为 185.87、112.74 和 2241.76 mg/L^[31]。根据 GBT 31270—2014 鱼类急性毒性的分级标准, 3 种茶叶提取物的 LC₅₀ 都大于 10 mg/L, 是低毒化学品, 安全性较高, 尤其红茶是安全

无毒的。这与其他茶叶及制品的急性毒性、安全性检测结果一致^[32-34]。但与 0.6%乙醇共同处理胚胎后, 3 种茶叶提取物对斑马鱼胚胎 96 hp_f-LC₅₀ 分别为 58.80 mg/L、33.34 mg/L 和 40.98 mg/L(结果未公布), 急性毒害加重, 其中尤以 BTE 作用最为严重^[31], 与本研究中的 2,4-*D* 互作的现象相似, 可能的作用机制暂未探究清楚。

前人研究表明, 3 种茶叶提取物能显著抑制苯并[a]芘诱导的人肝细胞 DNA 损伤^[35]。此外, GTE 和 BTE 能缓解大鼠佐剂性关节炎/关节外氧化损伤和贫血, 但 GTE 缓解程度高于 BTE, 其可能原因是 GTE 未氧化儿茶素含量高于 BTE, 具有更强的自由基清除活性^[36]。茶叶中含有丰富的活性成分, 其中, 绿茶是发酵程度低的茶, 含有较多的茶多酚, 如表儿茶素和没食子酸表儿茶素等, 具有较强的抗氧化性; 乌龙茶是经过部分发酵后制成的, 主要营养成分为茶多酚和茶碱; 红茶是全发酵的茶, 茶黄素和茶红素含量较高^[37-38]。本课题组通过高效液相色谱法测定分析了 3 种茶叶提取物中的 9 种茶多酚类化合物, 包括儿茶素、可可碱、咖啡因、表儿茶素、没食子酸、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯等, 发现 GTE 和 OTE 的茶多酚组成相似, 是茶叶提取物的主要成分, 但 BTE 几乎不含茶多酚^[31]。另外, 还测定了 3 中茶叶提取物的多糖含量, 发现 BTE 以多糖为主^[31]。本研究中 GTE 降低 2,4-*D* 导致的毒害, 说明其主要成分儿茶素可能对 2,4-*D* 有保护作用; 而 OTE 对 2,4-*D* 毒害无明显影响, 说明可能同时含有增加/降低 2,4-*D* 毒害的成分; BTE 加重 2,4-*D* 毒害, 说明其主要成分茶黄素和茶红素可能和 2,4-*D* 协同作用, 可以加重 2,4-*D* 毒害, 其可能的作用机制还需要进一步研究。

斑马鱼胚胎暴露于 2,4-*D* 导致斑马鱼发育形态畸变, 诱导卵黄水肿、卵黄肿大变黑、心包水肿和脊柱弯曲的畸形; 降低心跳和体长, 增大卵黄和心包面积。GTE 对 2,4-*D* 导致的斑马鱼胚胎发育毒害具有保护作用, OTE 对 2,4-*D* 导致的斑马鱼胚胎发育毒害无明显影响, BTE 加重 2,4-*D* 对斑马鱼胚胎发育毒害。

参考文献

- [1] LIN FJ, WEI XL, LIU HY, *et al.* State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits [J]. Trends Food Sci Technol, 2021, 109: 126–138.
- [2] JIANG H, ENGELHARDT UH, THRÄNE C, *et al.* Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UPLC compared to HPLC [J]. Food Chem, 2015, 183: 30–35.
- [3] BAI HX, JIANG W, YAN RN, *et al.* Comparing the effects of three processing methods on the efficacy of mulberry leaf tea: Analysis of bioactive compounds, bioavailability and bioactivity [J]. Food Chem, 2023, 405: 134900.
- [4] NHU-TRANG TT, NGUYEN QD, CONG-HAU N *et al.* Characteristics and relationships between total polyphenol and flavonoid contents, antioxidant capacities, and the content of caffeine, gallic acid, and major catechins in wild/ancient and cultivated teas in vietnam [J]. Molecules, 2023, 28(8): 2–17.
- [5] GUO YJ, SUN LQ, YU BY, *et al.* An integrated antioxidant activity fingerprint for commercial teas based on their capacities to scavenge reactive oxygen species [J]. Food Chem, 2017, 237: 645–653.
- [6] KIM YH, WON YS, YANG X, *et al.* Green tea catechin metabolites exert immunoregulatory effects on CD4⁺ T cell and natural killer cell activities [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 3591–3597.
- [7] LEUNG FP, YUNG LM, NGAI CY, *et al.* Chronic black tea extract consumption improves endothelial function in ovariectomized rats [J]. Eur J Nutr, 2016, 55: 1963–1972.
- [8] LIU K, ZHOU R, WANG B, *et al.* Effect of green tea on glucose control and insulin sensitivity: A meta-analysis of 17 randomized controlled trials [J]. Am J Clin Nutr, 2013, 98: 340–348.
- [9] NAM M, CHOI MS, CHOI JY, *et al.* Effect of green tea on hepatic lipid metabolism in mice fed a high-fat diet [J]. J Nutr Biochem, 2018, 51: 1–7.
- [10] TRUONG VL, JEONG WS. Antioxidant and anti-inflammatory roles of tea polyphenols in inflammatory bowel diseases [J]. Food Sci Hum Well, 2022, 11(3): 502–511.
- [11] TORELLO CO, SHIRAIISHI RN, DELLA VF, *et al.* Reactive oxygen species production triggers green tea-induced anti-leukaemic effects on acute promyelocytic leukaemia model [J]. Cancer Lett, 2018, 414: 116–126.
- [12] ZHAO Y, FANG CL, JIN CY, *et al.* Catechin from green tea had the potential to decrease the chlorpyrifos-induced oxidative stress in larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Pestic Biochem Phys, 2022, 182: 105028.
- [13] SHIBU MA, KUO CH, CHEN BC, *et al.* Oolong tea prevents cardiomyocyte loss against hypoxia by attenuating p-JNK mediated hypertrophy and enhancing P-IGF1R, p-akt, and p-Badser136 activity and by for tifying NRF2 antioxidation system [J]. Environ Toxicol, 2018, 33(2): 220–233.
- [14] CHENG P, CHAN HY, LI YM, *et al.* Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies [J]. Exp Gerontol, 2009, 44(12): 773–783.
- [15] GAAIED S, OLIVEIRA M, BIHANIC F, *et al.* Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide [J]. Chemosphere, 2019, 224: 289–297.
- [16] PHONG TH, HIEU T, TUNG HT, *et al.* Somatic embryogenesis as potential method for commercial propagation in *Passiflora edulis Sims f. edulis*—An important horticultural crop [J]. Sci Hortic-Amsterdam, 2023, 316: 112020.
- [17] FREISTHLER MS, ROBBINS CR, BENBROOK CM, *et al.* Association between increasing agricultural use of 2,4-*D* and population biomarkers of exposure: Findings from the national health and nutrition examination survey, 2001–2014 [J]. Environ Health-Glob, 2022, 21(1): 1–23.
- [18] LI K, WU JQ, JIANG LL, *et al.* Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos [J]. Chemosphere,

- 2017, 171: 40–48.
- [19] SONG Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide [J]. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56: 106–113.
- [20] ISLAM F, FAROOQ MA, GILL RA, *et al*. 2,4-D attenuates salinity-induced toxicity by mediating anatomical changes, antioxidant capacity and cation transporters in the roots of rice cultivars [J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7: 10443.
- [21] ENSMINGER MP, BUDD R, KELLEY KC, *et al*. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008–2011 [J]. *Environ Monit Assess*, 2013, 185: 3697–3710.
- [22] GANGULI A, CHOUDHURY D, CHAKRABARTI G. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced toxicity in lung cells by disruption of the tubulin-microtubule network [J]. *Toxicol*, 2014, 3: 118–130.
- [23] IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. DDT, Lindane, and 2,4-D. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer [Z]. 2018
- [24] GAAIED S, OLIVEIRA M, BARRETO A. *et al*. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) affects DNA integrity and retina structure in zebrafish larvae [J]. *Environ Sci Pollut*, 2022, 29: 85402–85412.
- [25] GAAIED S, OLIVEIRA M, DOMINGUES I, *et al*. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: Development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints [J]. *Environ Sci Pollut*, 2020, 27: 3686–3696.
- [26] DEHNERT GK, KARASOV WH, WOLMAN MA. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid containing herbicide impairs essential visually guided behaviors of larval fish [J]. *Aquat Toxicol*, 2019, 209: 1–12.
- [27] RAFAEL XM, LEONARDO V, JULIANA ACRS, *et al*. Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2021, 248: 109110.
- [28] TAO YX, DU CY, DUAN BC, *et al*. Eugenol exposure inhibits embryonic development and swim bladder formation in zebrafish [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2023, 268: 109602.
- [29] HE YD, ZHU RW, CAI YJ, *et al*. Transcriptomics and protein biomarkers reveal the detoxifying mechanisms of UV radiation for nebulivol toward zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae [J]. *Aquat Toxicol*, 2022, 249: 106241.
- [30] QIN Z, WANG WT, WENG Y, *et al*. Bromuconazole exposure induces cardiotoxicity and lipid transport disorder in larval zebrafish [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2022, 262: 109451.
- [31] 王维香, 李金秋, 朱鹏, 等. 基于斑马鱼模型的乌龙茶、绿茶和红茶提取物的胚胎发育毒害研究[C]. 中国毒理学会第九次全国毒理学大会论文集, 2019.
- WANG WX, LI JQ, ZHU P, *et al*. Embryonic developmental toxicity study of oolong, green and black tea extracts based on zebrafish model [C]. *Proceedings of the 9th National Conference on Toxicology of the Chinese Society of Toxicology*, 2019.
- [32] 孙凯, 黎顺庚, 王光光, 等. 白叶茶鲜叶制益生茶的急性、慢性毒性试验研究[J]. *中国茶叶加工*, 2017, (2): 11–15.
- SUN K, LI SG, WANG GG, *et al*. Acute and chronic toxicity studies on the production of probiotic tea from fresh leaves of white leaf tea [J]. *China Tea Process*, 2017, (2): 11–15.
- [33] 吴文亮, 林勇, 刘仲华, 等. 六堡茶急性和亚急性毒性安全性评价研究[J]. *茶叶科学*, 2017, 37(2): 173–181.
- WU WL, LIN Y, LIU ZH, *et al*. Safety evaluation study on the acute and subacute toxicity of Liubao tea [J]. *J Tea Sci*, 2017, 37(2): 173–181.
- [34] 宿迷菊, 王岳飞, 骆耀平, 等. 绿茶口含片安全性毒理学研究[J]. *茶叶科学*, 2006, 26(2): 122–127.
- SU MJ, WANG YF, LUO YP, *et al*. Toxicological study on the safety of green tea oral tablets [J]. *J Tea Sci*, 2006, 26(2): 122–127.
- [35] ZHANG H, QIB R, MINEB Y. The impact of oolong and black tea polyphenols on human health [J]. *Food Biosci*, 2019, 29: 55–61.
- [36] 刘智钧. 茶与茶渣的高值化综合利用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(1): 8–12.
- LIU ZJ. High-value comprehensive utilization of tea and tea pomace [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(1): 8–12.
- [37] YEN GC, JU JW, WU CH, *et al*. Modulation of tea and tea polyphenols on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in chang liver cells [J]. *Free Radical Res*, 2004, 38(2): 193–200.
- [38] EL-BEIH NM, RAMADAN G, TALAAT RM, *et al*. Alleviative effects of green and black tea aqueous extracts on cellular oxidative stress and anemia in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *Indian J Tradit Know*, 2015, 14(3): 335–343.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介

黄勳宏, 主要研究方向为活性成分功能研究, 基于斑马鱼模型的毒理学研究。
E-mail: huang_xuhong@stu.xhu.edu.cn

王维香, 博士, 副教授, 主要研究方向为毒理学, 食品中活性物质的分离纯化、功能和应用研究。
E-mail: wang_weixiang@hotmail.com