

文章编号:1000-5404(2013)19-2037-04

茶多酚对草甘膦致小鼠睾丸支持细胞氧化损伤及凋亡的保护作用

赵文红¹, 俞慧¹, 张建国², 江城梅¹ (233030 安徽蚌埠, 蚌埠医学院:预防医学系营养与食品卫生学教研室¹, 第一附属医院麻醉科²)

[摘要] **目的** 探讨不同剂量的茶多酚(tea polyphenol, TP)对草甘膦(glyphosate, GLY)诱导小鼠睾丸支持细胞(sertoli 细胞)氧化损伤及凋亡的拮抗作用。**方法** 体外原代培养小鼠 sertoli 细胞, 90 mg/L GLY 培养液处理细胞形成 sertoli 细胞损伤模型, 加入不同剂量 TP(浓度分别为 10、20、40、80 mg/L), 形成 4 个拮抗组, 另设由正常培养基形成的对照组; 各组细胞培养 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞生长情况及形态改变; 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞存活率; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)法检测细胞毒性; TUNEL 法检测细胞凋亡情况; 检测细胞中超氧化物歧化酶(super oxidase dimutase, SOD)活性、谷胱甘肽(glutathione, GSH)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。**结果** GLY 处理组细胞出现收缩变小、脱落、甚至破碎, 细胞的存活率明显低于对照组($P < 0.05$), 为对照组的 47.03%; 细胞内 LDH 活性明显高于对照组; 细胞凋亡指数为(37.0 ± 4.0)%, 明显高于对照组($P < 0.05$); 细胞内 SOD 活性、GSH 含量与对照组相比明显降低, 而 MDA 含量明显升高($P < 0.05$)。各拮抗组与 GLY 处理组相比, 细胞形态有不同程度改善, 尤其是拮抗组 4(TP 80 mg/L)细胞生长状况明显好转, 碎片明显减少; 细胞的存活率、SOD 活性及 GSH 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 细胞凋亡指数、LDH 活及 MDA 含量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** GLY 对小鼠 sertoli 细胞具有诱导细胞凋亡及抑制细胞增殖, 降低细胞抗氧化能力的影响, TP 对 GLY 造成的这些损伤有一定的保护作用。

[关键词] 茶多酚; 草甘膦; 小鼠睾丸支持细胞; 氧化损伤; 凋亡

[中图分类号] R151.3; R322.64; R595.4 **[文献标志码]** A

Tea polyphenol protects mouse sertoli cells against oxidative damage and apoptosis induced by glyphosate

Zhao Wenhong¹, Yu Hui¹, Zhang Jianguo², Jiang Chengmei¹ (¹Department of Nutrition and Food Hygiene, Faculty of Preventive Medicine, ²Department of Anesthetics, First Affiliated Hospital, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233030, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of different doses of tea polyphenol (TP) on the mouse sertoli cells against oxidative damage and apoptosis induced by glyphosate (GLY). **Methods** The oxidative damage model of primarily cultured mouse sertoli cells was established through GLY (90 mg/L) incubation for 24 h. Then the cells were treated with different doses of TP (10, 20, 40 and 80 mg/L). Meanwhile, the control cells were incubated with normal medium. After incubation for 24 h, the sertoli cells were observed for the morphological changes by inverted microscopy. Cell viability was evaluated by MTT assay. Cell cytotoxicity was measured by lactate dehydrogenase (LDH) test. Cell apoptosis was tested with TUNEL assay. The activity of super oxidase dismutase (SOD), as well as the levels of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were also detected. **Results** After the sertoli cells were treated with GLY (90 mg/L), the cells became smaller, and more cast-off cells and cell debris were found. The cell viability was significantly lower than that in the normal control ($P < 0.05$), only accounting for 47.03%. The LDH activity and the level of MDA were significantly higher ($P < 0.05$), and the activity of SOD and the level of GSH were obviously lower than those of control group. Furthermore, the rate of cell apoptosis was (36.96 ± 4.0)%, significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). Meanwhile, when sertoli cells were treated with GLY followed by different doses of TP, the states of cells were improved, especially in those treated by 80 mg/L TP, and there were less cell debris found. TP inhibited the decrease of cell proliferation, SOD activity and GSH level ($P <$

[基金项目] 蚌埠医学院科技发展基金重点项目(BYkf12A09); 蚌埠医学院院级课题(BY0835)

[通信作者] 赵文红, E-mail: zwh3104@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130726.1058.016.html> (2013-07-26)

0.05, $P < 0.01$). In addition, TP also inhibited the increase of MDA level and LDH activity ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** GLY induces apoptosis, inhibits cell proliferation, and decreases anti-oxidative ability in mouse sertoli cells. While, TP plays a protective role against these damages.

[**Key words**] tea polyphenol; glyphosate; mouse sertoli cells; oxidative damage; apoptosis

Supported by Key Program of Science and Technology Development Foundation of Bengbu Medical College (BYkf12A09) and the Project of Bengbu Medical College (BY0835). Corresponding author: Zhao Wenhong, E-mail: zwh3104@sina.com

草甘膦(glyphosate, GLY)即N-膦酸甲基甘氨酸,是目前全球用量最大、应用最广的一种除草剂,其化学性质稳定,在土壤中具有中等的持留性,半衰期为1~174 d^[1]。各国对GLY在食品中的残留量有严格规定,但在各类食品和动物饲料中常有GLY超标的现象^[2]。近年来农药的生殖毒性成为人们关注的热点,有关GLY的生殖毒性也有所报道,研究表明,GLY能通过干扰雄激素合成而影响雄性动物附睾的正常发育^[3];GLY对小鼠精子致畸实验表明,580、1 160 mg/kg浓度时,精子的畸形率明显增加,精子数目减少,直接损害成熟精子的形状,对生殖细胞有潜在的诱变作用^[4]。但关于GLY对动物睾丸支持细胞(sertoli细胞)的毒性作用尚不清楚。茶多酚(tea polyphenol, TP)是一种复合型天然抗氧化剂。有证据表明,TP通过抑制自由基的过氧化,对多种有害物质引起的细胞损伤均有保护作用^[5]。本研究以小鼠sertoli细胞作为研究对象,在体外建立GLY诱导小鼠sertoli细胞氧化应激损伤模型,观察TP对损伤模型的细胞存活率、细胞损伤标志物丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量,抗氧化能力及细胞凋亡的变化,系统研究GLY在体外实验中对sertoli细胞产生的损伤及其机制,探索TP对此损伤是否具有保护作用及作用机制,完善GLY致雄性生殖毒性机制的相关理论,以为GLY生殖毒性损害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 试剂 DMEM/F12培养基(Invitrogen公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),Fas-L抗体(武汉博士德生物工程有限公司),GLY(41%异丙胺盐水剂,孟山都公司);TP(纯度 $\geq 95\%$,浙江派诺生物技术公司),MTT(Sigma公司),一步法TUNEL试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所),LDH、SOD、MDA、GSH试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 仪器 SHELLAB型CO₂培养箱(美国Harris公司),倒置相差显微镜、荧光显微镜(日本OLYMPUS公司),Synergy 2型酶标仪(美国Biotek公司),超低温离心机(德国Eppendorf公司),超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司),凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司),DYY-III型水平电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 实验动物

18~20 d昆明种雄性小鼠,体质量(17±3)g,购自安徽省实验中心,清洁级动物,动物饲养温度(22±2)℃,相对湿度65%,自由饮水进食。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠sertoli细胞的分离与培养 参考文献[6]的方法,将10只小鼠(雄性)脱白处死,收集睾丸,预冷D-Hanks洗涤后,剪切睾丸成约1 mm×1 mm×1 mm块状;分别由0.25%胰蛋白酶、0.1%透明质酸酶及0.1%胶原酶消化后,获得细胞,加入DMEM/F12 10 mL,经200目网筛过滤,取细胞悬液放置于培养瓶培养。选择2~3代细胞用于实验。

1.3.2 小鼠睾丸支持细胞Fas-L染色鉴定 将单细胞悬液接种于内有盖玻片的6孔板中,37℃,5%CO₂饱和湿度条件下培养4 h,小心倾斜6孔板,将培养基及未贴壁的精原细胞去掉,加入培养基继续培养24 h,倾去培养基,加Tris-HCl液低渗处理3 min,D-Hanks液洗涤3次,加培养基继续培养。细胞密度达80%时按试剂盒说明书进行Fas-L染色鉴定。

1.3.3 实验剂量选择 将支持细胞用DMEM(15%小牛血清,100 U/mL青、链霉素)37℃常规培养,细胞长成70%~80%融合度时,加入GLY母液染毒,使GLY在培养基中的浓度分别为60、90、120、150、180 mg/L。MTT法检测24 h不同剂量组细胞存活率,结果显示90 mg/L剂量组细胞的存活率为47%,所以选择90 mg/L为GLY处理组,在此基础上添加不同浓度茶多酚作为4个拮抗组即拮抗组1、2、3、4,其TP最终浓度分别为10、20、40、80 mg/L,并设正常培养基培养细胞作为对照组。

1.3.4 sertoli细胞形态观察 相差显微镜下观察不同组sertoli细胞生长情况及形态改变。

1.3.5 MTT法检测细胞存活率 将细胞悬液稀释成5×10⁴/mL,种植于96孔培养板,每孔200 μL,培养24 h,更换培养基,其中添加GLY及TP,分为6组,分别为对照组、GLY处理组(90 mg/L)及TP拮抗4个剂量组,其剂量符合1.3.3。每组设3个复孔,相同条件下继续培养24 h。取出培养板,每孔中加入四甲基偶氮唑盐(终浓度为0.5 mg/mL),继续培养4 h,移去培养基,每孔加入100 μL二甲基亚砷(DMSO),摇床上摇动20 min至蓝紫色的结晶完全溶解,用酶标仪570 nm测定各孔光密度值。按以下公式计算细胞存活率:细胞存活率=(各组光密度值/对照组光密度值)×100%。

1.3.6 TUNEL法检测支持细胞凋亡情况 按试剂盒要求,将培养于盖玻片上的细胞用PBS洗涤1次,4%多聚甲醛固定60 min,洗涤后,加0.1% Triton X-100,冰浴状态孵育2 min,洗涤后加50 μL TUNEL检测液,37℃避光孵育60 min,洗涤后,加抗荧光淬灭封片液封片;选择激发波长450~500 nm,发射波

长515~565 nm,置荧光显微镜下观察,每张片随机选10个视野计数凋亡细胞。凋亡指数(AI)=(视野内凋亡细胞个数/视野内所有细胞个数)×100%。

1.3.7 sertoli 细胞 MDA、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量及超氧化物歧化酶 (super oxidase dimutase, SOD)、LDH 活性的检测

取生长良好的 sertoli 细胞,以 $10^4 \sim 10^5$ /mL 细胞数接种于培养板内培养,待细胞贴壁生长密度至板底的 80%,按 1.3.3 方法加入 GLY 或 TP 获得各实验组细胞,24 h 后,超声细胞破碎仪破碎细胞,置显微镜下观察确定有细胞存在,按试剂盒要求,将细胞破碎液用于各指标测定。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,经正态性检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析及 *q* 检验。

2 结果

2.1 sertoli 细胞 Fas-L 染色鉴定

培养 sertoli 细胞经 Fas-L 免疫组化染色,光镜下观察可见 sertoli 细胞质和细胞膜呈棕黄色,Fas-L 表达呈阳性,其纯度在 90% 以上。见图 1。

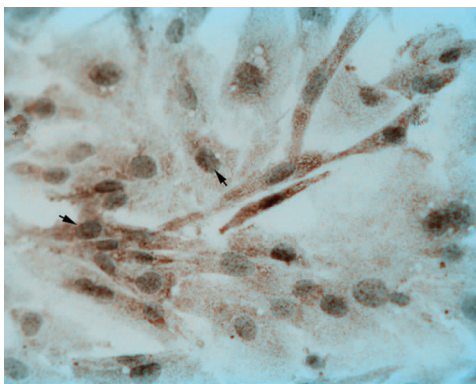
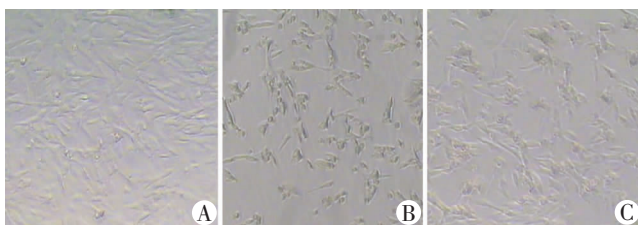


图1 sertoli 细胞 Fas-L 染色观察 (箭头示 ×200)

2.2 TP 对 GLY 损伤睾丸支持细胞形态的影响

将各组细胞置于倒置显微镜下观察可发现,对照组 sertoli 细胞呈单层生长,细胞呈梭状或不规则样镶嵌,细胞核居中呈椭圆形,核仁明显。GLY 处理组细胞出现收缩变小、细胞表面出现黑色颗粒,部分细胞变圆脱落、甚至破碎。拮抗组细胞有不同程度改善,尤其是拮抗组 4 (TP 80 mg/L) 组细胞形态明显好转,细胞突起清晰,碎片明显减少,但与对照组相比仍有区别 (图 2)。



A: 对照组; B: GLY 处理组; C: 拮抗组 4 (TP 80 mg/L)

图2 相差显微镜下观察 GLY 和 TP 对小鼠 sertoli 细胞形态的变化 (×200)

2.3 TP 对 GLY 损伤睾丸支持细胞存活率的影响

由表 1 可知,90 mg/L GLY 作用于小鼠睾丸支持细胞 24 h 后,可明显抑制细胞的生长,低于对照组 ($P < 0.05$)。当细胞加入 GLY 的同时,加入不同浓度的 TP 进行培养,TP 浓度 > 20 mg/L,细胞的存活率高于 GLY 处理组 ($P < 0.05$),但与对照组相比,拮抗组存活率较低 ($P < 0.05$),说明 GLY 对细胞的影响是不可逆的;各拮抗组中,除了拮抗组 1 与拮抗组 2 之间,拮抗组 3 与拮抗组 4 之间无明显差异外 ($P > 0.05$),随 TP 浓度增加,细胞的存活率明有升高的趋势,即其拮抗作用有加强趋势。

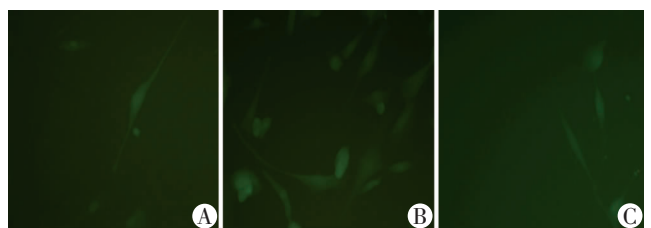
表1 TP 对 GLY 损伤 sertoli 细胞存活、凋亡的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h 光密度值	细胞存活率 (%)	细胞凋亡指数 (%)
对照组	0.793 ± 0.030	100.00	12.9 ± 2.7
GLY 处理组	0.373 ± 0.035 ^a	47.03	37.0 ± 4.0 ^a
拮抗组 1	0.463 ± 0.057 ^{ab}	58.38	35.1 ± 3.7 ^{ab}
拮抗组 2	0.500 ± 0.051 ^{ab}	63.05	26.4 ± 2.6 ^{abc}
拮抗组 3	0.587 ± 0.030 ^{abcd}	74.02	21.2 ± 1.1 ^{abcd}
拮抗组 4	0.602 ± 0.045 ^{abcd}	75.91	20.7 ± 1.9 ^{abcd}

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 GLY 处理组比较; c: $P < 0.05$, 与拮抗组 1 比较; d: $P < 0.05$, 与拮抗组 2 比较

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡情况

荧光显微镜下观察,凋亡细胞呈绿色荧光,与非凋亡细胞相区别 (图 3); sertoli 细胞凋亡情况见表 1,对照组凋亡细胞较少,90 mg/L GLY 处理细胞后,有明显诱导细胞凋亡的作用,细胞凋亡指数明显高于对照组 ($P < 0.05$);各拮抗组中,当 TP ≥ 20 mg/L 时,细胞凋亡指数均明显低于 GLY 处理组 ($P < 0.05$),说明 TP 对 GLY 诱导小鼠 sertoli 细胞引起的凋亡有不同程度的保护作用。拮抗组与对照组相比,细胞的凋亡指数仍然有升高的现象 ($P < 0.05$),说明 GLY 对细胞凋亡的影响是不可逆的。



A: 对照组; B: GLY 处理组; C: 拮抗组 (TP 80 mg/L)

图3 TUNEL 法检测不同浓度 TP 对 GLY 诱导 sertoli 细胞凋亡的抑制作用 (荧光显微镜 ×200)

2.5 细胞内 SOD、LDH 及 MDA、GSH 含量活性变化

由表 2 可知,小鼠 sertoli 细胞经 90 mg/L GLY 处理后,与对照组相比,SOD 活性、GSH 含量明显降低,而 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$),说明小鼠睾丸支持细胞经 GLY 处理后,其抗氧化能力降低。LDH 活性明显高于对照组 ($P < 0.01$),说明 GLY 对小鼠 Sertoli 细胞有一定毒性。

不同剂量 TP 拮抗组细胞与 GLY 处理组 (90 mg/L) 相比,SOD 活性及 GSH 含量明显升高,而 MDA 含量及 LDH 活性明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),说明 TP 对 GLY 引起的细胞损伤有拮抗作用。

表 2 TP 对 GLY 损伤 sertoli 细胞 SOD、GSH、MDA 及 LDH 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg)	GSH(mg/g)	MDA(nmol/mg)	LDH(U/L)
对照组	74.6 ± 2.1	49.5 ± 0.5	4.9 ± 0.4	545.8 ± 14.9
GLY 处理组	38.8 ± 2.8 ^a	22.8 ± 0.8 ^a	8.1 ± 0.6 ^a	983.8 ± 17.9 ^a
拮抗组 1	43.8 ± 1.6 ^b	24.5 ± 1.2 ^b	7.8 ± 0.5 ^b	964.5 ± 20.2 ^b
拮抗组 2	47.5 ± 3.5 ^c	28.7 ± 0.7 ^c	6.4 ± 0.3 ^c	827.4 ± 19.9 ^c
拮抗组 3	55.3 ± 2.3 ^c	32.3 ± 0.8 ^c	5.3 ± 0.6 ^c	685.6 ± 19.8 ^c
拮抗组 4	55.9 ± 1.9 ^c	33.7 ± 1.0 ^c	5.2 ± 0.6 ^c	686.5 ± 15.6 ^c

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与 GLY 处理组比较

3 讨论

本研究对原代培养睾丸 sertoli 细胞采用 Fas-L 免疫细胞化学染色方法鉴定, Fas-L 及 Fas 属于肿瘤坏死因子及受体家族, 构成睾丸的主要细胞中, 只有 sertoli 细胞稳定、高表达 Fas-L, 所以 Fas-L 表达阳性可认为是 sertoli 细胞^[7]。sertoli 细胞是睾丸曲细精管内唯一存在的体细胞, 在生精过程中起营养、支持和保护等重要作用。任何影响 sertoli 细胞功能的因素都可对雄性生殖过程产生影响。本实验结果表明, 小鼠 sertoli 细胞经 90 mg/L GLY 作用 24 h 后, 可出现明显的氧化应激损伤, 表现为 SOD 活性及 GSH 含量明显低于对照组, 而 MDA 含量及 LDH 活性明显升高, 这与国内有关 GLY 引起小鼠各脏器抗氧化能力明显降低的研究相一致^[8]; 同时 GLY 能抑制 sertoli 细胞生长、促进细胞凋亡, 其存活率为对照组的 47.03%, 细胞凋亡指数明显高于对照组 ($P < 0.05$), 说明 GLY 在此剂量范围内对动物有一定的生殖毒性。

自由基学说近来成为毒理学领域的研究热点, 研究认为有机污染物导致雄性生殖毒性机制中, 自由基氧化发挥了重要作用。氧化应激是引起生殖细胞凋亡的主要机制之一^[9]。本实验结果表明, GLY 可导致 sertoli 细胞中 MDA 含量、LDH 活性升高及 SOD 活性及 GSH 含量降低, 说明其抗氧化能力降低, 可能是导致细胞增殖能力降低及诱导细胞凋亡的原因之一。

减轻 sertoli 细胞的氧化损伤及细胞凋亡程度则是保护生物生殖功能的主要措施。SOD 活力及 GSH 含量的高低可间接反映机体清除自由基的能力, MDA 是氧自由基引发脂质过氧化作用而形成的产物, 其高低可反应细胞受自由基攻击的严重程度; LDH 是机体糖酵解途径中一种重要的酶类, 一般组织、器官受到损伤时, 其活性会增强, 对判断细胞损伤程度有重要意义^[10]。因此睾丸组织中这些指标的高低可反映氧自由基对雄性生殖系统损伤的程度。本研究结果显示, TP 是一种很好的自由基清除剂, 能显著抑制 GLY 诱导的睾丸 sertoli 细胞氧化应激及细胞凋亡的发生。TP 是从天然茶叶中分离提纯的复合物, 包括 30 多种酚类

化合物。主要成分为黄烷醇类即儿茶素, 占 TP 总量的 60% ~ 80%。TP 的抗氧化作用主要表现在儿茶素结构中的酚性羟基, 是优良的氢或中子的供体, 及时终止脂肪酸自动氧化过程^[11], 儿茶素类对超氧阴离子、过氧化氢自由基的清除率可达 98% 以上, 且在一定范围内, 其剂量与清除效果呈正相关性, 清除氧自由基的能力显著高于维生素 C 和维生素 E^[12]。本实验中 TP 能够有效地抑制 SOD 活性、GSH 含量的降低, 抑制 MDA 含量及 LDH 活性的升高, 说明 TP 作为一种非酶抗氧化剂, 能够有效地抑制自由基的过氧化链式反应从而减轻 GLY 对睾丸组织损伤程度并因此而促进细胞的增殖、抑制细胞的凋亡。

综上所述, 本研究结果显示, TP 能明显抑制 GLY 诱导的 sertoli 细胞氧化应激, 进一步研究揭示, TP 可通过保护细胞结构和功能来抑制细胞凋亡的发生。为阐明 TP 的拮抗 GLY 生殖毒性的作用提供了实验依据, 并为探索使用天然植物化学物质防治农药残留的策略奠定了基础, 但有关最适剂量和防护机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Jiraunkoorskul W, Upatham E S, Kruatrachue M, et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Environ Toxicol*, 2003, 18(4): 260 - 267.
- [2] 俞慧, 江城梅, 赵文红. 草甘膦毒性作用研究进展 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(6): 743 - 745, 封 3.
- [3] Oliveira A G, Telles L F, Hess R A, et al. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos* [J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 23(2): 182 - 191.
- [4] 康菊芳, 曾明, 关岚, 等. 草甘膦对小鼠的致突变作用研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2008, 20(3): 227 - 230.
- [5] 郑燕, 杨明建, 申海玉, 等. 茶多酚对 UVB 照射雄性小鼠生殖系统的保护作用 [J]. *河北工业大学学报*, 2012, 41(3): 19 - 23.
- [6] 周德荣, 郑俊鸿, 杨庆涛, 等. 小鼠睾丸支持细胞的体外分离、培养与鉴定 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2011, 24(3): 169 - 171, 封 4.
- [7] Tanaka M, Suda T, Yatomi T, et al. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes* [J]. *J Immunol*, 1997, 158(5): 2303 - 2309.
- [8] 赵伟, 曹曦予, 吴艳萍. 草甘膦致小鼠机体氧化损伤作用的研究 [J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(5): 364 - 366.
- [9] Ma A, Yang X, Wang Z, et al. Adult exposure to diethylstilbestrol induces spermatogenic cell apoptosis *in vivo* through increased oxidative stress in male hamster [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25(3): 367 - 373.
- [10] Kim J W, Dang C V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(3): 142 - 150.
- [11] 黎伟, 边连全, 王昊, 等. 茶多酚的抗氧化机理及其在畜牧业中应用的前景 [J]. *饲料工业*, 2007, 28(1): 57 - 59.
- [12] 于春霞, 王宇, 王爱青. 茶多酚的应用研究进展 [J]. *辽宁化工*, 2012, 41(8): 809 - 812.

(收稿: 2013-03-25; 修回: 2013-04-24)

(编辑 吴培红)