

基于 TLR₄/MyD88/NF-κB 通路探讨茯砖茶改善 ApoE^{-/-} 小鼠非酒精性脂肪肝的作用

张文将¹, 段丽芳¹, 孟 涛³, 李 鑫¹, 杨冬梨¹, 刘圆月^{2*}

(1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 益阳医学高等专科学校, 湖南 益阳 413000; 3. 湖南省白沙溪茶厂股份有限公司, 湖南 安化 413500)

摘要: **目的** 研究茯砖茶对载脂蛋白 E 敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠肝组织 TLR₄/MyD88/NF-κB 通路的影响, 探讨其抑制非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 形成的作用机理。 **方法** 将 50 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为模型组、阿托伐他汀组和茯砖茶高、中、低剂量组 (2.16、1.44、0.72 g/kg), 每组 10 只, 高脂饲料连续喂养 17 周并同时予以相应药物灌胃干预; 另取 8 周龄 C57BL/6J 野生小鼠作为空白组, 普通饲料喂养 17 周并予以生理盐水灌胃干预。给药结束后, 取肝脏行 HE 染色观察组织病理变化, 采用 RT-qPCR 法检测小鼠肝组织 Toll 样受体 4 (TLR₄)、髓样分化因子 88 (MyD88)、核因子 Kappa B (NF-κB)、白细胞介素-1β (IL-1β)、脂肪酸合成酶 (FAS) mRNA 表达。 **结果** 模型组小鼠肉眼可见肝脏体积增大, 边缘变钝, 呈黄色油腻感, 镜下可见大小不等的脂肪空泡形成, 证实模型制备成功; 茯砖茶高、中剂量组小鼠脂肪变性程度轻于模型组, 茯砖茶各剂量组小鼠肝组织 TLR₄、MyD88、NF-κB、IL-1β、FAS mRNA 表达低于模型组 (P<0.05)。 **结论** 茯砖茶可能通过抑制 TLR₄/MyD88/NF-κB 通路来达到预防 NAFLD 形成的作用。

关键词: 茯砖茶; 非酒精性脂肪肝; ApoE^{-/-} 小鼠; TLR₄/MyD88/NF-κB 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3429-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.046

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 为慢性进行性肝脏疾病, 我国 NAFLD 患病率高达 29.2%, 已经逐渐超越病毒性肝炎, 成为我国第一大肝病, 该病可发展为肝硬化甚至肝癌, 同时 NAFLD 的长期存在增加了动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 和 2 型糖尿病罹患风险, 且中晚期很难逆转, 因此早期防治尤为关键^[1-3]。“二次打击”学说无法解释 NAFLD 形成的复杂机制, “多重平行打击”学说认为慢性、持续性、低度非感染性炎症反应为 NAFLD 发展过程中的一个重要病理特征^[4]。有研究证实长期高脂饮食可破坏肠黏膜屏障功能, 大量内毒素随门静脉入血进入肝脏, 激活肝实质细胞和肝库普弗细胞上的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR₄) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) /核因子 Kappa B (nuclear factor-kappa B, NF-κB) 通路, 引起肝脏炎症反应和胰岛素抵抗的发生, 促使脂质在肝脏的沉积, 从而为 NAFLD 的发生创造条件^[5]。

NAFLD 防治尚无特效药物, 抗氧化剂的应用为防治 NAFLD 提供新思路。茯砖茶属于黑茶类, 除了具有抗氧化作用的茶多糖及茶多酚外, 在发酵过程中形成了冠突散囊菌属等优势益生菌, 是医学领域中具有应用潜力的微生物^[6-7]。课题组前期实验证实茯砖茶可通过抑制甘油三酯合

成, 减轻机体炎症反应, 抑制肥胖和 AS 形成, 降低肝重及肝指数, 但是深入机制尚不明确^[8]。因此, 本研究通过高脂饮食连续喂养载脂蛋白 E 敲除 (apolipoprotein E, ApoE^{-/-}) 小鼠 4 个月的方法复制 NAFLD 模型, 同时予以茯砖茶灌胃干预, 检测 TLR₄/MyD88/NF-κB 通路上的关键因子的基因表达变化, 以期为 NAFLD 的早期防治提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 8 周龄 SPF 级雄性 ApoE^{-/-} 小鼠, 体质量 (20±5) g, 品系名 ApoE Cas9-KO, 遗传背景 C57BL/6; 10 只 8 周龄 C57BL/6J 雄性野生型小鼠, 购于南京大学生物模式中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2015-0001]。小鼠饲养于 SPF 实验室, 室内 IVC 独立送风隔离笼, 仪器压差 20 Pa, 相对湿度 50%~70%, 温度 (24±0.5)℃, 昼夜光照节律, 每笼 5 只, 各组小鼠定量喂养, 自由饮水 (Ⅲ级水), 每 2 d 更换 1 次垫料, 笼具及水瓶定期消毒。ApoE^{-/-} 小鼠采用高脂辐照饲料 (含 21% 脂肪、0.15% 胆固醇, 货号 H10141, 北京华阜康生物科技股份有限公司) 喂养, 饲料于 -20℃ 下保存, 取需用量于 4℃ 冰箱中短期保存。

1.2 药物 2014 年茯砖茶 (湖南省白沙溪茶厂), 经湖南

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目 (2021JM-478); 陕西中医药大学校级科研项目 (2020GP17)

作者简介: 张文将 (1986—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。E-mail: 1126372680@qq.com

* 通信作者: 刘圆月 (1966—), 女, 教授, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。Tel: (0737) 6359676, E-mail: 505782163@qq.com

中医药大学刘柏炎教授鉴定原料为茶叶一级嫩料压筑而成，色泽黑褐，金花茂盛。阿托伐他汀（辉瑞制药有限公司，批号 110590）。

1.3 试剂 TRIzol 试剂（美国 Invitrogen 公司，批号 50175111）；荧光定量 PCR 试剂盒（日本 TaKaRa 公司，批号 A152172A）；反转录试剂盒（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号 00692424）。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.4 仪器 Z32HK 型高速冷冻离心机（德国 Hermle 公司）；BX-51 型光学显微镜（日本奥林巴斯公司）；核酸蛋白浓度测定仪（英国 Bio-Drop 公司）；PCR 扩增仪（美国 Bio-Rad 公司）；荧光定量 PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）。

2 方法

2.1 药物制备 茯砖茶掰成分散片状后用无菌纱布包裹投入无菌烧杯中，加入实验用Ⅲ级水浸泡 30 min（加水量没过茶叶 2~3 cm），武火煮开后文火煎煮 30 min，药液冷却后过滤，取汁；二次煎煮加水量以淹没药包为准，沸腾后冷却，将 2 次滤液合并，浓缩至所需体积，4 ℃ 冰箱保存备用，依据茶吸收实验推荐成人每日摄入量为 10 g（166.7 mg/kg），参照人与小鼠体表面积换算得小鼠所需剂量为 1.44 g/kg^[9]，设置茯砖茶高、中、低剂量分别为 2.16、1.44、0.72 g/kg。阿托伐他汀使用前将药片放入干净研钵中碾碎，加入生理盐水溶解，搅拌成混悬液，按 10 mg/kg 剂量进行灌胃，现配现用。

2.2 分组、造模与给药 将 50 只 8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠适应性饲养 1 周后随机分为模型组（10 mL/kg 生理盐水）、阿托伐他汀组（10 mg/kg）和茯砖茶高、中、低剂量组（2.16、1.44、0.72 g/kg），每组 10 只，定量予以高脂饲料喂养；另设同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只作为空白组，定量予以普通维持饲料喂养。各组小鼠于每天早上 9 点予以相应的药物连续灌胃干预 17 周^[10-11]。

2.3 标本收集与处理 各组小鼠给药第 17 周末禁食不禁水 12 h，麻醉后摘眼球取血，全血室温静置 2 h，4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min，取血清于-80 ℃ 冰箱中保存待测。颈椎脱臼处死小鼠，取肝脏称重，预冷生理盐水漂洗，取各组小鼠相同部位肝叶（约 1 cm×1 cm×1 cm）于 4% 多聚甲醛中固定，用于 HE 染色；取约 100 mg 肝组织于盛有 1 mL 预冷 TRIzol 的无 RNA 酶冻存管中，液氮速冻后转移至-80 ℃ 冰箱中保存，用于 RT-qPCR 检测。

2.4 HE 染色观察肝组织病理形态 肝组织于 4 ℃、4% 多聚甲醛中固定 48 h，经常规脱水、包埋、4 μm 切片、烤片、染色后封片，于显微镜下观察。按照《NASH 临床研究网病理工作指南》对 NAFLD 活动度积分（NAFLD activity score, NAS）进行半定量分析^[12]，具体评判标准为①肝细胞脂肪变，0 分（<5%），1 分（5%~33%），2 分（34%~66%），3 分（>66%）；②小叶内炎症（20 倍镜计数坏死灶），0 分（无），1 分（>2 个），2 分（2~4 个），3 分（>4 个）；③肝细胞气球样变，0 分（无），1 分（少

见），2 分（多见）。

2.5 RT-qPCR 法检测肝组织 *TLR₄*、*MyD88*、*NF-κB*、*IL-1β*、*FAS* mRNA 表达 TRIzol 法提取肝组织总 RNA，采用核酸蛋白浓度测定仪测定 RNA 浓度和质量，按试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA，反应程序为 42 ℃，60 min；70 ℃，5 min；4 ℃ 维持。随后进行 PCR 扩增反应，反应程序为 95 ℃ 预变性 2 min，95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火 1 min，循环 40 次。以 *β-actin* 为内参，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达，引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
基因	引物序列(5'→3')
<i>β-actin</i>	正向 CGTTGACATCCGTAAAGAC
	反向 TGGGAAGGTGGACAGTGAG
<i>TLR₄</i>	正向 ATGGCATGGCTTACACCACC
	反向 GAGGCCAATTTTGTCTCCACA
<i>MyD88</i>	正向 TACAGGTGCCCAGACTGGAA
	反向 GCAGTAGCAGATAAAGGCATCGAA
<i>NF-κB</i>	正向 TCCGGGAGCCTCTAGTGAGAA
	反向 TCCATTGTGACCAACTGAACGA
<i>IL-1β</i>	正向 CCTCTCCAGCCAAGCTTCCT
	反向 TTTGGAAGCAGCCCTTCATC
<i>FAS</i>	正向 GGAGGTCCAATGTTTCATGT
	反向 TCCTGCACTGCCTCTAAGG

2.6 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处理，实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 茯砖茶对小鼠肝组织病理形态的影响

3.1.1 肉眼观察 如图 1 所示，空白组小鼠肝脏大小适中，暗红色，边缘锐利；模型组小鼠肝脏体积增大，黄色油腻感，边缘较钝；茯砖茶高剂量组小鼠肝脏稍大，暗红为主，色稍黄，边缘稍钝；茯砖茶中剂量组小鼠肝脏体积适中，颜色暗红，边缘锐利；茯砖茶低剂量组小鼠肝脏体积增大，颜色黄色油腻感，边缘变钝；阿托伐他汀组小鼠肝脏体积变大，黄色油腻感，边缘钝。

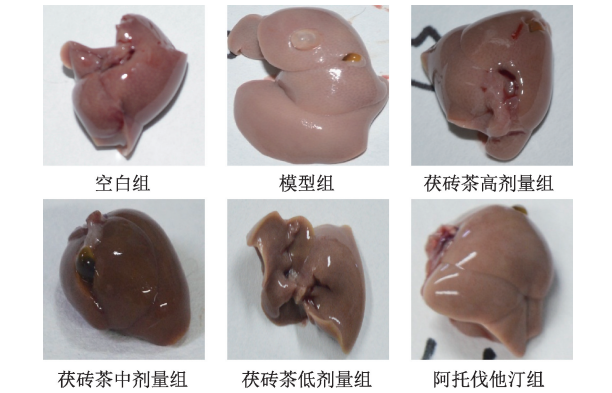


图 1 各组小鼠肝脏肉眼观察

3.1.2 HE 染色镜观察 如图 2 所示，空白组低倍镜下肝小叶轮廓清晰，中央静脉居中，肝索放射状分布，肝血窦

清晰；高倍镜下肝细胞大小均匀，细胞核居中，胞质均质红染。模型组低倍镜下肝小叶轮廓模糊，肝索非放射状排列，肝血窦不清；高倍镜下肝细胞体积变大，大小不一，界限不清，胞浆疏松化，有大量的空泡形成。茯砖茶高剂量组低倍镜下肝小叶结构完整，中央静脉居中，部分细胞核偏位，胞浆淡染疏松化；高倍镜下肝细胞大小较均匀，细胞核居中，胞浆淡染，部分胞浆有少量空泡形成。茯砖

茶中剂量组低倍镜下肝小叶结构完整，中央静脉居中，肝索呈放射状，肝血窦较为清晰；高倍镜下细胞核居中、胞浆淡染疏松化，有部分体积较小空泡形成。茯砖茶低剂量组低倍镜下肝小叶轮廓及肝血窦欠清晰；高倍镜下可见大量的空泡变性。阿托伐他汀组低倍镜下肝小叶轮廓及肝血窦纹理欠清晰；高倍镜下可见胞浆淡染疏松化、细胞核偏位，存在大小不等的空泡形成。

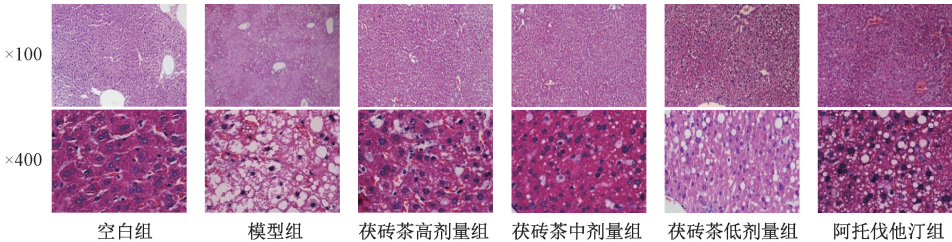


图 2 各组小鼠肝组织 HE 染色

3.1.3 NAS 评分 与空白组比较，模型组小鼠肝脏 NAS 评分升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，阿托伐他汀组和茯砖茶各剂量组小鼠肝脏 NAS 评分降低 ($P<0.05$)；与阿托伐他汀组比较，茯砖茶各剂量组小鼠肝脏 NAS 评分降低 ($P<0.05$)，见表 2。

表 2 各组小鼠肝脏 NAS 评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	NAS 评分/分
空白组	0.00±0.00
模型组	6.72±0.49*
阿托伐他汀组	4.43±0.52 [#]
茯砖茶高剂量组	3.24±0.42 ^{#△}
茯砖茶中剂量组	2.92±0.57 ^{#△}
茯砖茶低剂量组	3.82±0.42 ^{#△}

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与阿托伐他汀组比较，[△] $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠肝组织 TLR_4 、 $MyD88$ 、 $NF-\kappa B$ 、 $IL-1\beta$ 、 FAS mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	TLR_4	$MyD88$	$NF-\kappa B$	$IL-1\beta$	FAS
空白组	1.00±0.07	1.09±0.07	1.12±0.18	1.06±0.12	1.01±0.13
模型组	5.64±0.80*	2.05±0.16*	2.00±0.27*	3.04±0.84*	3.74±0.49*
阿托伐他汀组	3.55±0.45 [#]	1.58±0.26 [#]	1.60±0.20 [#]	1.37±0.38 [#]	2.32±0.44 [#]
茯砖茶高剂量组	1.96±0.54 ^{#△}	1.35±0.12 ^{#△}	1.34±0.28 ^{#△}	1.14±0.17 ^{#△}	1.42±0.20 ^{#△}
茯砖茶中剂量组	1.82±0.41 ^{#△}	1.32±0.10 ^{#△}	1.27±0.30 ^{#△}	1.44±0.27 [#]	1.21±0.19 ^{#△}
茯砖茶低剂量组	2.96±0.36 ^{#△}	1.70±0.08 [#]	1.58±0.34 [#]	1.73±0.28 ^{#△}	2.26±0.65 [#]

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与阿托伐他汀组比较，[△] $P<0.05$ 。

高^[14]。肠道内毒素通过门脉系统到达肝脏，被肝脏实质细胞中的 TLR_4 或者 Kupffer 细胞所识别^[15-16]。LPS 激活 $TLR_4/MyD88/NF-\kappa B$ 信号通路后促使大量炎症因子的释放，造成肝细胞的损伤^[17]。通过阻断 TLR_4 通路来抑制炎症反应，已经成为了干预肝脏疾病的有效途径之一^[18]。

课题组前期实验证实，茯砖茶预防性灌胃给药可减轻 NAFLD 小鼠肝脏氧化损伤^[19]，降低血清 $IL-1\beta$ 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , $TNF-\alpha$) 等炎症因子表达^[8]，由此证实 NAFLD 模型小鼠确实存在慢性非感染性炎症现象，而茯砖茶灌胃给药可以起到抑制炎症反应的效果，但其抗炎机制尚不明确。本研究结果显示，茯砖茶各剂量

3.2 茯砖茶对 $TLR_4/MyD88/NF-\kappa B$ 通路相关因子 mRNA 表达的影响 与空白组比较，模型组小鼠肝组织 TLR_4 、 $MyD88$ 、 $NF-\kappa B$ 、 $IL-1\beta$ 、 FAS mRNA 表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，阿托伐他汀组和茯砖茶各剂量组小鼠肝组织 TLR_4 、 $MyD88$ 、 $NF-\kappa B$ 、 $IL-1\beta$ 、 FAS mRNA 表达降低 ($P<0.05$)；与阿托伐他汀组比较，茯砖茶高、中剂量组小鼠肝组织 TLR_4 、 $MyD88$ 、 $NF-\kappa B$ 、 FAS mRNA 表达降低 ($P<0.05$)，茯砖茶高剂量组小鼠肝组织 $IL-1\beta$ mRNA 表达降低 ($P<0.05$)，见表 3。

4 讨论

近年来提出的“肠-肝轴”理论认为，肠道菌群失调在 NAFLD 的形成中发挥着重要作用^[13]。研究显示，NAFLD 患者比正常人群更容易出现小肠细菌过度生长，导致富含脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 成分的细菌含量升高。肠道内毒素通过门脉系统到达肝脏，被肝脏实质细胞中的 TLR_4 或者 Kupffer 细胞所识别^[15-16]。LPS 激活 $TLR_4/MyD88/NF-\kappa B$ 信号通路后促使大量炎症因子的释放，造成肝细胞的损伤^[17]。通过阻断 TLR_4 通路来抑制炎症反应，已经成为了干预肝脏疾病的有效途径之一^[18]。

课题组前期实验证实，茯砖茶预防性灌胃给药可减轻 NAFLD 小鼠肝脏氧化损伤^[19]，降低血清 $IL-1\beta$ 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , $TNF-\alpha$) 等炎症因子表达^[8]，由此证实 NAFLD 模型小鼠确实存在慢性非感染性炎症现象，而茯砖茶灌胃给药可以起到抑制炎症反应的效果，但其抗炎机制尚不明确。本研究结果显示，茯砖茶各剂量

组和阿托伐他汀组预防性灌胃给药均可抑制小鼠肝组织 TLR_4 、 $MyD88$ 、 $NF-\kappa B$ 、 $IL-1\beta$ 、 FAS mRNA 表达，其中茯砖茶高、中剂量组抑制效果优于低剂量组和阿托伐他汀组，由此可见适当浓度茯砖茶预防性灌胃给药发挥着较好预防 NAFLD 形成效果。阿托伐他汀为临床抑制胆固醇合成常用降脂药物，在本实验中虽可抑制 NAFLD 形成，但其效果不如茯砖茶高、中剂量组，考虑可能是研究过程中阿托伐他汀所用剂量并非治疗最佳剂量所致。 FAS 为催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成脂肪酸的关键限速酶，其表达量的增加会导致甘油三酯在体内的蓄积，由此可见 FAS 系统在 NAFLD 的发生与发展中起到关键作用^[20]。本实验结

果显示肝脏 *FAS* 基因表达和肝脏脂肪变性程度呈正相关，由此可见茯砖茶预防性灌胃给药可抑制肝脏脂类物质的合成，从而达到了延缓肝脂变的效果。

茯砖茶作为一种后发酵茶，有报道显示茯砖茶水提取物明显恢复高脂饮食小鼠引起的厚壁菌门/拟杆菌门比值的升高，提高双歧杆菌科细菌的相对丰度^[21]。茯砖茶中的冠突散囊菌增加了小鼠肠道中产生乙酸和丁酸的细菌，可以部分逆转高脂饮食小鼠肠道菌群失调^[22]。由此可见对肠道菌群失衡的调节可能是茯砖茶发挥作用的重要因素，但茯砖茶是否通过调节肠道菌群而抑制肝脏 TLR₄/MyD88/NF-κB 通路激活尚不明确，后续将完善通路关键因子蛋白表达实验，并配合细胞实验对该通路进一步验证。

参考文献：

[1] Zhou F, Zhou J H, Wang W X, *et al.* Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018; A systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2019, 70 (4): 1119-1133.

[2] Li J, Zou B, Yeo Y H, *et al.* Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, 1999-2019: A systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(5): 389-398.

[3] 孙 超, 范建高. 中外非酒精性脂肪性肝病诊疗指南解读 [J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(3): 235-238.

[4] Abenavoli L. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: A close relationship [J]. *J Gastrointestin Liver Dis*, 2021, 30(2): 183-184.

[5] Jiang J W, Chen X H, Ren Z G, *et al.* Gut microbial dysbiosis associates hepatocellular carcinoma *via* the gut-liver axis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2019, 18(1): 19-27.

[6] 刘 勤, 牛春燕. 由“二次打击”到“多重打击”: 发病机制的演变带给非酒精性脂肪性肝病的治疗启示[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(19): 1171-1178.

[7] 覃金球, 罗美玲, 张 旋, 等. 冠突散囊菌医药价值研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 336-339.

[8] 张文将, 易 健, 刘圆月, 等. 安化黑茶预防性给药对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(19): 2420-2427.

[9] 吴香兰, 刘仲华, 曹 丹, 等. 茯砖茶对小鼠肠道免疫功能调节作用的研究[J]. 茶叶科学, 2013, 33(2): 125-130.

[10] 韦 磊, 王 绚, 陈 雄, 等. 汉黄芩素缓解高脂饮食喂养

ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化和 NF-κB 介导的动脉炎症反应[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(5): 750-757.

[11] 张涛涛, 黄 娜, 余 锋, 等. 温阳活血解毒方稳定 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块机制研究[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(8): 1679-1685.

[12] Kleiner D E, Brunt E M, Van Natta M, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.

[13] Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3): 558-577.

[14] Mouries J, Brescia P, Silvestri A, *et al.* Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(6): 1216-1228.

[15] 夏 凡, 周本杰. 肠-肝轴功能紊乱在非酒精性脂肪肝病发病机制中的作用及相关治疗策略[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(24): 1439-1447.

[16] Carpino G, Del Ben M, Pastori D, *et al.* Increased liver localization of lipopolysaccharides in human and experimental non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 470-485.

[17] Liu D, Zhang Y Y, Liu Y H, *et al.* Berberine modulates gut microbiota and reduces insulin resistance *via* the TLR₄ signaling pathway[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018, 126(8): 513-520.

[18] 农汝楠, 王竞静, 吴燕春, 等. 基于 TLR₄ 信号通路的中药抗肝脏疾病作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 201-212.

[19] 张文将, 刘圆月, 易 健, 等. 安化黑茶减轻高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠非酒精性脂肪肝 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1274-1280.

[20] 魏苏宁, 苏雪莹, 徐国恒. 肝细胞甘油三酯代谢途径异常与脂肪肝[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(2): 123-132.

[21] Liu D M, Huang J N, Luo Y, *et al.* Fuzhuan brick tea attenuates high-fat diet-induced obesity and associated metabolic disorders by shaping gut microbiota [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(49): 13589-13604.

[22] Kang D D, Su M, Duan Y W, *et al.* *Eurotium cristatum*, a potential probiotic fungus from Fuzhuan brick tea, alleviated obesity in mice by modulating gut microbiota [J]. *Food Funct*, 2019, 10(8): 5032-5045.