

绿茶水提物对蛋氨酸和胆碱缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪肝炎小鼠的保护作用

黄天养¹, 李惠民¹, 封雨², 李铭源², 崔国祯¹

(1. 遵义医科大学珠海校区生物工程系, 广东珠海 519041) (2. 澳门大学中华医药研究院, 澳门 999078)

摘要: 为探究绿茶水提物对蛋氨酸和胆碱缺乏(MCD)饮食诱导的非酒精性脂肪肝炎的药效作用及其作用机制, 将40只C57BL/6小鼠随机分为空白组(MCS组)、MCD组、绿茶水提物低浓度组(0.15 g/kg)和高浓度组(0.30 g/kg)。小鼠饲喂MCD饲料, 建立非酒精性脂肪肝炎模型, 造模同时给予绿茶水提物进行干预。8周后, 测定血清的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的浓度以及肝组织的甘油三酯(TG)和胆固醇(TC)浓度; 油红染色检测肝组织脂肪堆积情况和HE染色对肝组织病理等级评定; Western blot检测葡萄糖调节蛋白78(GRP78)和微管相关蛋白轻链3(LC3)表达水平。结果发现, 与模型组相比, 绿茶水提物显著降低小鼠血清AST、ALT、IL-6和TNF- α 水平, 其最大降幅分别约为38%、45%、46%、74%, 并且可以降低肝脏TG、TC水平以及减少脂肪堆积面积, TG和TC的最大降幅分别约为44%和37%, 同时改善肝组织的脂肪变性、炎症反应和细胞气球样变。Western blot显示, 绿茶水提物降低GRP78蛋白水平, 同时升高LC3-II的表达水平。因此, 绿茶对MCD饮食诱导的非酒精性脂肪肝炎小鼠模型有明显保护作用, 其作用机制可能与GRP78蛋白和LC3蛋白相关。

关键词: 非酒精性脂肪肝炎; 绿茶提取物; 蛋氨酸和胆碱缺乏饮食; 功能性食品; 自噬

文章编号: 1673-9078(2019)04-9-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.002

Effect of Green Tea Extract on the Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by MCD Diet

HUANG Tian-yang¹, LI Hui-min¹, FENG Yu², LEE Ming-yuan², CUI Guo-zhen¹

(1. Department of Bioengineering, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China)

(2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine and Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao 999078, China)

Abstract: To evaluate the effect of green tea extract on the NASH mice induced by MCD diet and its possible mechanism, forty C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: control group (MCS diet), MCD group (MCD diet), MCD diet supplemented with green tea extract (0.15 g/kg/day or 0.30 g/kg/day). After 8-weeks administration, blood and liver were harvested. The levels of serum ALT, AST, IL-6 and TNF- α were measured. The levels of hepatic TG and TC were also measured. The oil red stained was used to evaluate the lipid accumulation area in liver. Additionally, the liver tissues were stained with hematoxylin-eosin to evaluate the hepatic steatosis, inflammation and the ballooning according to the non-alcoholic fatty liver disease activity score. Western blot was used to analyze the protein expression levels of GRP78 and LC3. Results showed that, compared to MCD model, administration of green tea extract could significantly decrease the levels of serum ALT, AST, IL-6 and TNF- α , with the largest decrease rate of 38%, 45%, 46% and 74%, respectively. In addition, result of oil red O staining indicated that the extract also could obviously attenuate the accumulated fat in the liver. The extract could decrease the levels of hepatic TG and TC, with the largest decrease rate of 44% and 37%, when compared to MCD group. Result of H&E staining showed that the score of steatosis, lobular inflammation, hepatic ballooning was significantly reduced by green tea extract in C57/BL6 mice subjected to MCD diet. The expression level of GRP78 was markedly restrained while that of LC3-II was increased by administration of green tea extract. Green tea extract has beneficial effects against NASH-induced by MCD diet. The regulations of GRP78 and LC3-II might be involved in the mechanisms of

收稿日期: 2018-11-29

基金项目: 遵义医学院招标课题(F-787); 珠海市优势学科建设项目(2015年)

作者简介: 黄天养(1994-), 男, 硕士, 研究方向: 药理学

通讯作者: 崔国祯(1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 药理学

action of green tea extract.

Key words: nonalcoholic steatohepatitis; green tea extract; methionine-choline-deficient diet; functional food; autophagy

非酒精性脂肪肝炎 (Non-alcoholic Steatohepatitis, NASH) 被定义为一种无过量饮酒, 由长期的激素代谢紊乱引起的慢性肝损伤, 是脂肪性肝病进一步恶化为肝硬化, 甚至肝癌的一个重要阶段。它是一种代谢型综合征, 研究表明, NASH 与 2 型糖尿病、血脂异常、肥胖及胰岛素抵抗等一系列疾病的发生密切相关^[1~3]。近年来, 随着生活水平的不断改善, 人们饮食的高脂化、药物的滥用以及周围环境的恶化等问题造成它的发病率在不断提高。据统计, 非酒精性脂肪性肝病 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 在全世界范围内的发病率约为 25%, 由于肥胖、糖尿病等因素使得脂肪肝患者发展成为 NASH 的数量每年都在加速增长。推测在未来 5 年 NASH 将会成为肝硬化和肝细胞癌的主要病因, 这将严重威胁人类的生命健康^[4]。因此, 寻找 NASH 的有效的疗法已成为目前研究热点。然而, 关于 NASH 的具体发病机理至今尚未明确, 但有研究表明氧化应激是 NASH 发展过程中的重要因素之一^[5]。目前, 临床上使用的主要药物有熊去氧胆酸, 甘草酸制剂等, 但这些药物长期使用普遍存在毒副作用较大, 经济负担重等问题, 而被证实的有效且无副作用治疗方法仅有适当的渐进性减肥运动这一项^[6]。因此, 研究及开发有效的且能被大众所接受的治疗 NASH 的产品具有现实而重要的意义。

茶作为一种日常饮品, 具有降血脂^[7]、抗氧化应激和抗炎症等多种药理学活性^[8]。有研究指出绿茶能明显抑制 ob/ob 小鼠的脂肪变性^[9]。但是关于日常饮用绿茶是否对 NASH 具有防治作用尚未见文献报道。因此, 实验通过 MCD 饮食诱导建立 NASH 小鼠模型, 给予绿茶水提物 (Green tea extract, GTE) 干预防治, 探索绿茶对 NASH 的保护作用并且阐明其作用机制, 为开发辅助性治疗 NASH 的功能性食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPF 级的 C57BL/6 雄性小鼠共 40 只, 7~8 周龄, 体重为 22~25 g, 购买于广东省医学实验动物中心, 许可证号为[SCXK (粤) 2013-0002]。绿茶由贵州省凤冈县万缘锌硒茶业有限公司提供, 根据前述的研究方法提取 GTE^[10]。蛋氨酸-胆碱缺乏饲料 (methionine-choline-deficient, MCD) 和蛋氨酸-胆碱充足饲料 (methionine-choline-sufficient, MCS) 购于

南通特洛菲饲料科技有限公司。AST (产品编号: C010-2)、ALT (产品编号: C009-2)、TC (产品编号: A111-1)、TG (产品编号: A110-1) 生化试剂盒和 IL-6 酶联免疫试剂盒 (产品编号: H007) 购买于中国南京建成生物研究所; TNF- α 酶联免疫试剂盒 (产品编号: 6165781) 购买于美国 BD bioscience 公司; BCA 法蛋白定量检测试剂盒 (产品编号: P0010) 和 RIPA 蛋白裂解液 (产品编号: P0013B) 购买于中国碧云天生物科技有限公司; 兔抗鼠 GRP78 单克隆抗体 (产品编号: 3177)、兔抗鼠 LC3 单克隆抗体 (产品编号: 4108) 和的羊抗兔的二抗 (产品编号: 7074) 均购买于美国 CST 公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪 SpectraMax M5 (美国 Molecular Devices 公司), TB-718E 型生物组织自动包埋机 (中国泰维科技有限公司); TK-218 型恒温摊片烤片机 (中国泰维科技有限公司); RM2255 生物组织自动切片机 (中国上海徐卡显微系统有限公司); 5415R 台式离心机 (德国 Eppendorf 公司); 双色近红外多功能成像仪 Chemstudio (德国 analytikiena 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计

将 40 只 SPF 级的 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 MCS 组, MCD 组, GTE 低浓度组 (0.15 g/kg), GTE 高浓度组 (0.30 g/kg)。除 MCS 组喂食 MCS 饲料外, 其他实验组均将 MCS 和 MCD 饲料按一定比例适应性喂养一周以后, 每天喂食 MCD 饲料建立 NASH 模型。自造模 (完全喂食 MCD 饲料) 开始, 将绿茶提取物溶于纯净水后, 对 GTE 高、低浓度组每天进行灌胃干预 (0.1 mL/10 g), MCS 组和 MCD 组同步给予纯净水灌胃。每天测定各组小鼠的摄入量并记录; 每周称量小鼠体重, 并且根据各组小鼠体重变化来调整给药的剂量。

1.3.2 血清样本的检测

绿茶干预 8 周后, 禁食过夜, 麻醉动物后摘除眼球采血, 在 4 °C 预冷的离心机 1000 g 离心 10 min 后, 吸取上清液后测定血清中 ALT 和 AST、IL-6 和 TNF- α 的浓度。

1.3.3 肝组织的脂肪堆积检测

取出完整肝脏称重, 然后剪取肝脏相同部位大约

150 mg 放入装有 1.5 mL Buffer 溶液的玻璃匀浆器中,冰上将肝脏组织充分匀浆,在 4 °C 预冷的离心机 3000 g 离心 10 min,吸取上清,测定蛋白浓度,使蛋白浓度均一化后测定肝脏 TG 和 TC 含量。此外,另取一份相同部位的肝脏,冰冻切片后做油红染色,进一步确定肝组织的脂肪堆积情况。

1.3.4 肝组织的脂肪变性,炎症和细胞气球样变的评价

将相同部位的肝脏组织置于 4% 多聚甲醛中固定,脱水,包埋和切片。HE 染色后根据 NAFLD 活动度积分指南^[11],在双盲条件下进行病理学评定。

1.3.5 用 Western blot 方法检测 GRP78 和 LC3 蛋白的表达

取 50 mg 肝组织样品用 300 μ L 裂解缓冲液和含有磷酸酶抑制剂的 3 μ L 蛋白酶抑制剂混合匀浆。然后将匀浆液在 4 °C 以 12000 g 离心 10 min,取上清液,使蛋白浓度均一化,上清液加入电泳样品缓冲液,在 100 °C 沸水中保持 5 min。然后通过 10% SDS-PAGE 分离含有 50 μ g 蛋白质的样品并将蛋白转移至硝酸纤维素膜。封闭后,分别在兔抗鼠 GRP78 的单克隆抗体和兔抗鼠的 LC3 单克隆抗体的稀释液 (1:1000) 4 °C 孵育过夜。然后,使用羊抗兔的二抗室温孵育 1 h 后,用新鲜 TBST 缓冲液重复洗膜 3 次,每次 5 min,加入化学发光试剂后,使用双色近红外多功能成像仪分析采集图片并用 Image-J 图像分析软件分析条带灰度值,计算蛋白的相对表达量。

1.3.6 统计学分析

应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,作图实验计量数据均以 ($\bar{x} \pm SD$) 表示,组间的差异采用单因素方差分析,以 $p < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果和讨论

2.1 绿茶提取物对 NASH 小鼠的体重、摄入量、肝重和肝脏指数的影响

实验期间,小鼠的体重、摄入量变化如图 1 所示,实验的 1~8 周,MCS 组的体重由 26.15 ± 0.12 g 升高至 27.04 ± 1.23 g,摄入量保持在 2.74 ± 0.16 g; MCD 组呈下降趋势,体重和摄入量分别由 26.36 ± 0.61 g 和 2.61 ± 0.23 g 降低至 18.07 ± 0.82 g 和 1.26 ± 0.20 g。GTE 高、低浓度组的体重分别由 26.54 ± 0.54 g 和 26.47 ± 0.41 g 降低至 16.59 ± 0.58 g 和 16.62 ± 0.23 g,摄入量分别由 2.63 ± 0.21 g 和 2.52 ± 0.21 g 降低至 1.82 ± 0.32 g 和 2.42 ± 0.41 g,从第 3 周开始,GTE 高、低浓度组的每

周平均摄入量均高于 MCD 模型组。

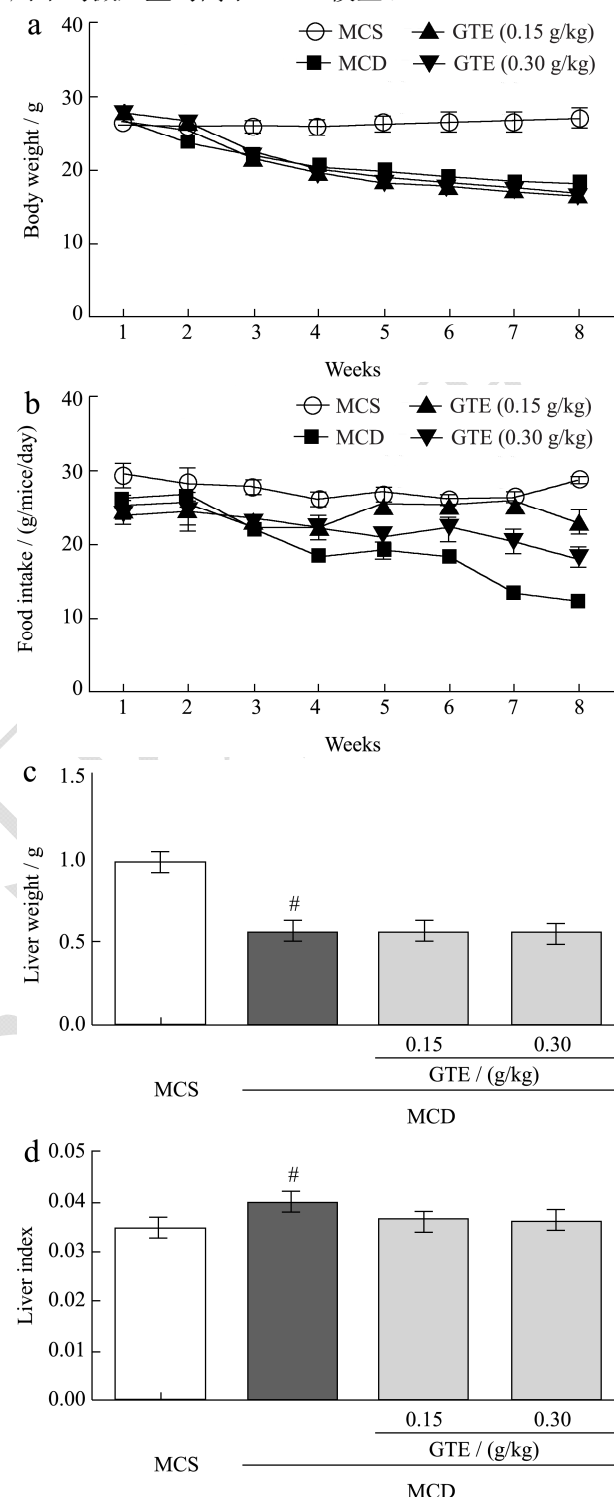


图 1 绿茶提取物对 NASH 小鼠的体重、摄入量、肝湿重和肝脏指数的影响

Fig.1 The effects of green tea extract on body weight, food intake, liver weight and liver index in NASH mice

注: a 表示体重; b 表示摄入量; c 表示肝湿重; d 表示肝脏指数,与 MCS 组比较, $^{\#}p < 0.05$; 与 MCD 组比较, $^{*}p < 0.05$ 。

实验末,小鼠的体重、肝重和肝脏指数见图 1, MCS 组的体重和肝湿重分别为 27.04 ± 1.23 g 和

0.98±0.07 g; MCD 组的各项指标分别降低至 18.07±0.82 g 和 0.55±0.09 g, 与 MCS 组相比, MCD 组的体重和肝湿重均显著降低 ($p<0.05$); 以上数据说明 MCD 饮食诱导的 NASH 小鼠模型会出现体重下降, 食欲不振及肝湿重下降的特征。GTE 高、低浓度组的体重和肝湿重与 MCD 组相比无显著差异 ($p>0.05$), 说明 GTE 对小鼠不会产生毒性或者其他不良影响, 同时研究发现 GTE 可能具有改善 MCD 饮食引起的小鼠食欲不振的功能。肝脏指数方面, 与 MCS 组相比, MCD 组显著升高 ($p<0.05$); 与 MCD 组相比, GTE 高、低浓度组降低但是结果无显著性差异 ($p>0.05$), 提示 GTE 可能具有使 NASH 小鼠的肝脏指数恢复正常的作用。

2.2 绿茶提取物对 NASH 小鼠血清 AST、ALT、IL-6、TNF- α 水平的影响

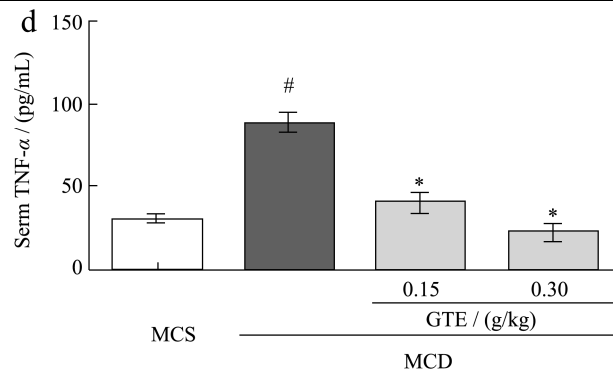
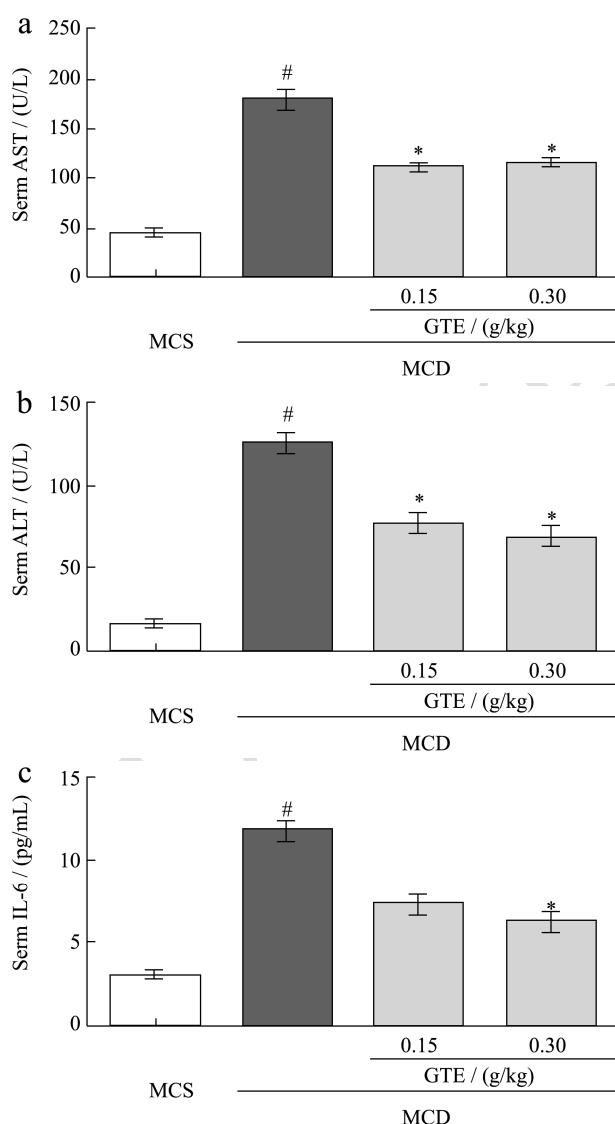


图2 绿茶提取物对 NASH 小鼠血清 AST、ALT、IL-6、TNF- α 水平的影响

Fig.2 The effects of green tea extract on levels of serum AST, ALT, IL-6 and TNF- α in NASH mice

注: a 表示 AST; b 表示 ALT; c 表示 IL-6; d 表示 TNF- α , 与 MCS 组比较, # $p<0.05$; 与 MCD 组比较, * $p<0.05$ 。

MCD 饮食由于缺乏蛋氨酸会引起氧化应激而发生肝损伤^[12]。在流行病学研究中, AST 和 ALT 酶活力的水平通常作为临床上衡量肝脏功能的重要临床指标, ALT 的显著升高说明机体出现了严重的肝脏损伤^[13], AST 则与肝细胞中的线粒体受损相关。氧化应激的发生会激活炎症反应包括 TNF- α 等炎症因子的表达^[14]。如图 2 显示, MCS 组血清 AST、ALT、IL-6 和 TNF- α 水平分别为 45.01±5.33 U/L、16.23±0.23 U/L、3.06±1.02 pg/mL 和 31.35±4.23 pg/mL; MCD 组的各项血清指标分别升高至 178.66±21.32 U/L、126.08±7.86 U/L、11.90±1.32 pg/mL 和 89.30±18.56 pg/mL, 与 MCS 组相比, MCD 组血清 AST、ALT、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($p<0.05$), 说明 MCD 饮食引起了小鼠严重的肝损伤和炎症反应, 提示 NASH 造模成功。与 MCD 组相比, GTE 高、低浓度处理组, 血清 AST、ALT、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($p<0.05$), 且低浓度组的各项血清指标分别降低至 110.38±5.32 U/L、77.75±10.55 U/L、7.41±3.52 pg/mL 和 40.57±4.65 pg/mL, 高浓度组分别降低至 114.61±11.15 U/L、69.21±6.58 U/L、6.41±2.12 pg/mL 和 22.64±2.69 pg/mL, 绿茶水提取物使 NASH 小鼠血清 AST、ALT、IL-6 和 TNF- α 水平的最大降幅分别约为 38%、45%、46%、74%, 说明 GTE 具有改善肝损伤和抑制炎症反应的作用。

2.3 绿茶提取物对 NASH 小鼠肝脂质含量的影响

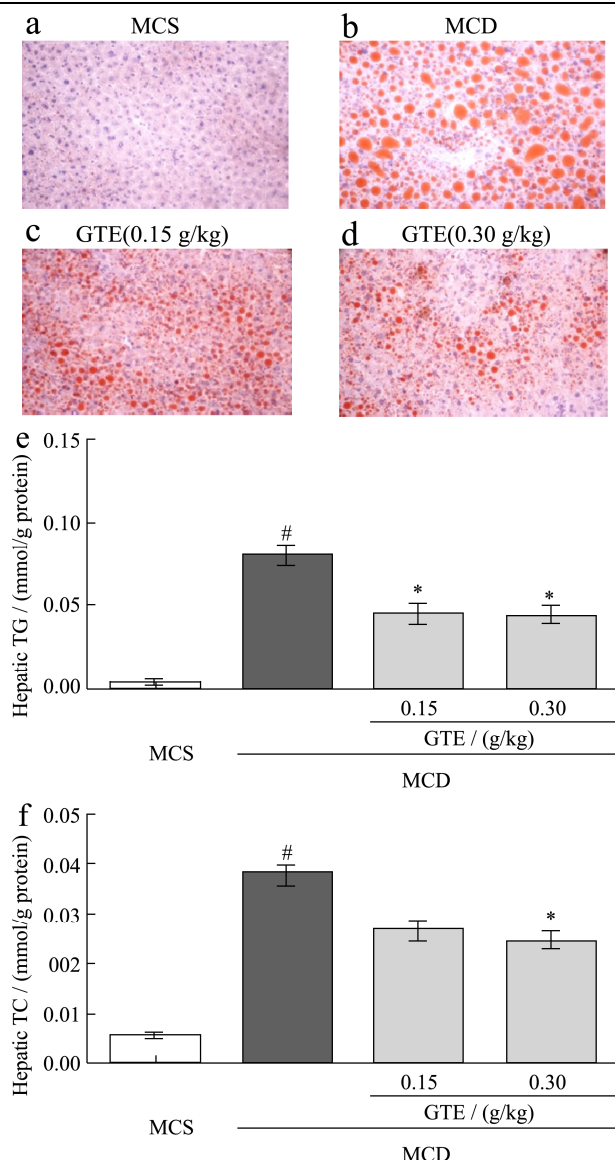


图3 绿茶提取物对NASH小鼠肝脂质含量的影响(400×)

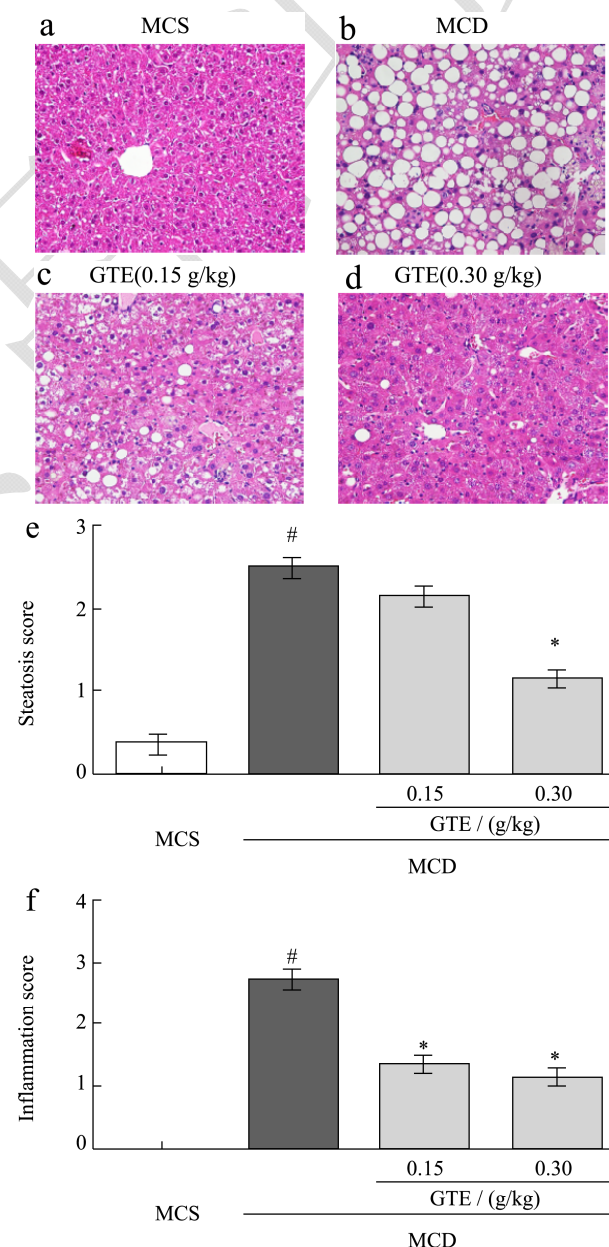
Fig.3 The effects of green tea extract on the level of liver lipids in NASH mice

注: a-d表示油红染色; e表示甘油三脂; f表示胆固醇, 与MCS组比较, [#] $p<0.05$; 与MCD组比较, ^{*} $p<0.05$ 。

脂肪堆积和变性是NASH模型基本的病理特征。MCD饮食由于缺乏蛋氨酸无法合成低密度脂蛋白胆固醇, 三酰甘油转移受阻而导致小鼠脂肪变性。如图3显示, MCS组的肝组织无明显脂滴, TG和TC水平分别为 0.0042 ± 0.0001 mmol/g和 0.0059 ± 0.0011 mmol/g。与MCS组相比, MCD组的肝组织的脂质堆积的面积显著增多, 脂滴明显变大; 同时, 肝组织TG和TC水平均显著升高($p<0.05$), 分别升高至 0.0815 ± 0.0212 mmol/g和 0.0381 ± 0.0102 mmol/g, 提示MCD饮食诱导的NASH小鼠肝组织出现严重脂肪堆积和脂肪变性, 与临床上NASH的病理特性相符。与

MCD组相比, GTE高、低浓度组的肝组织的脂质堆积面积显著减少、脂滴明显变小; 肝匀浆的TG和TC水平都显著降低($p<0.05$), GTE低浓度组的TG和TC水平分别降低至 0.0463 ± 0.0137 mmol/g和 0.0271 ± 0.0102 mmol/g, GTE高浓度组分别降低至 0.0441 ± 0.0062 mmol/g和 0.0242 ± 0.0056 mmol/g, 绿茶水提取物使NASH小鼠肝组织TG和TC水平的最大降幅分别约为44%和37%, 说明GTE能显著降低NASH小鼠的肝组织脂肪堆积, 改善脂肪变性, 并且呈现明显药效浓度依赖性。

2.4 绿茶提取物对NASH小鼠肝组织的脂肪变性、炎症反应、细胞气球样变的影响



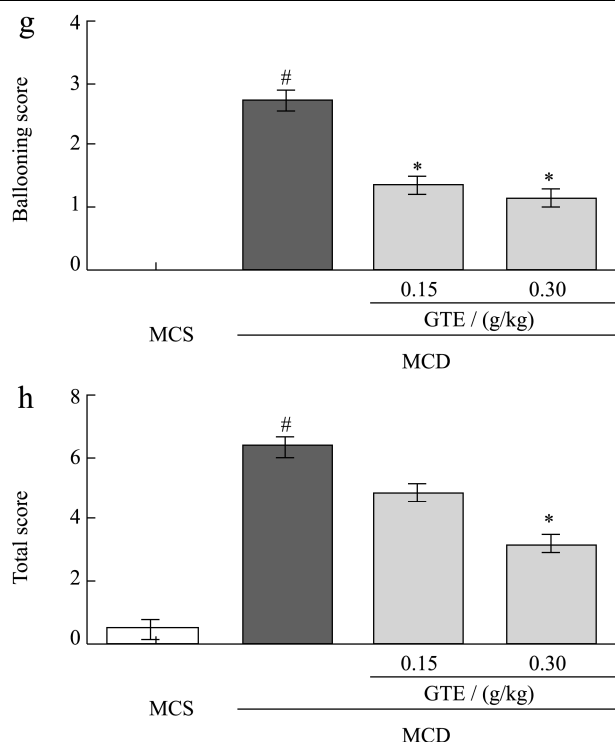


图4 小鼠的肝组织的HE染色以及组织结构和形态学变化等级评定(400×)

Fig.4 Histopathological evaluation of liver tissue in NASH mice by HE staining method

注: a~d 表示 HE 染色; e 表示脂肪变性; f 表示炎症程度; g 表示气球样变程度; h 表示肝组织综合得分, 与 MCS 组比较, [#] $p<0.05$; 与 MCD 组比较, ^{*} $p<0.05$ 。

HE 染色结果显示, MCS 组小鼠的肝细胞结构清晰、完整并且以中央静脉为中心呈索性排列。MCD 组小鼠肝细胞基本结构被破坏, 呈现明显肿胀状态, 出现严重的脂肪变性, 胞质挤满空泡, 以浸润为主的坏死性炎症, 胞核呈现固缩, 深染, 聚集的状态, 表明 NASH 小鼠造模成功。与 MCD 组相比, GTE 高、低浓度组的肝细胞结构和形态都有明显的改善作用, 细胞呈现以中央静脉为中心有序排列状态, 脂肪变性的空泡和坏死性炎症明显减少, 并且呈现明显药效浓度依赖性。同时, 针对肝组织的脂肪变性、炎症反应、细胞气球样变的病理学评定得分和综合得分的结果显示, MCS 组得分分别是 0.40 ± 0.21 、 0.00 、 0.00 和 0.40 ± 0.21 ; MCD 组得分分别是 2.50 ± 0.19 、 2.75 ± 0.15 、 2.75 ± 0.15 和 6.38 ± 0.30 , 相比 MCS 组, MCD 组的肝组织的脂肪变性、炎症以及细胞气球样变以及最终的评定得分都显著升高 ($p<0.05$)。GTE 低浓度组得分分别为 2.16 ± 0.25 、 1.33 ± 0.15 、 1.33 ± 0.15 和 4.83 ± 0.88 , GTE 高浓度组得分分别为 1.17 ± 0.25 、 1.17 ± 0.17 、 1.17 ± 0.15 和 3.17 ± 0.51 , 相比 MCD 组, GTE 高、低浓度组的肝组织的脂肪变性、炎症以及细胞气球样变

以及最终的评定得分都显著降低 ($p<0.05$), 进一步说明了绿茶具有显著抑制脂肪变性和炎症反应, 改善细胞气球样变的作用, 提示饮用绿茶对 NASH 有明显保护作用。

2.5 绿茶水提物对 NASH 小鼠肝脏 GRP78 和 LC3 蛋白水平表达的影响

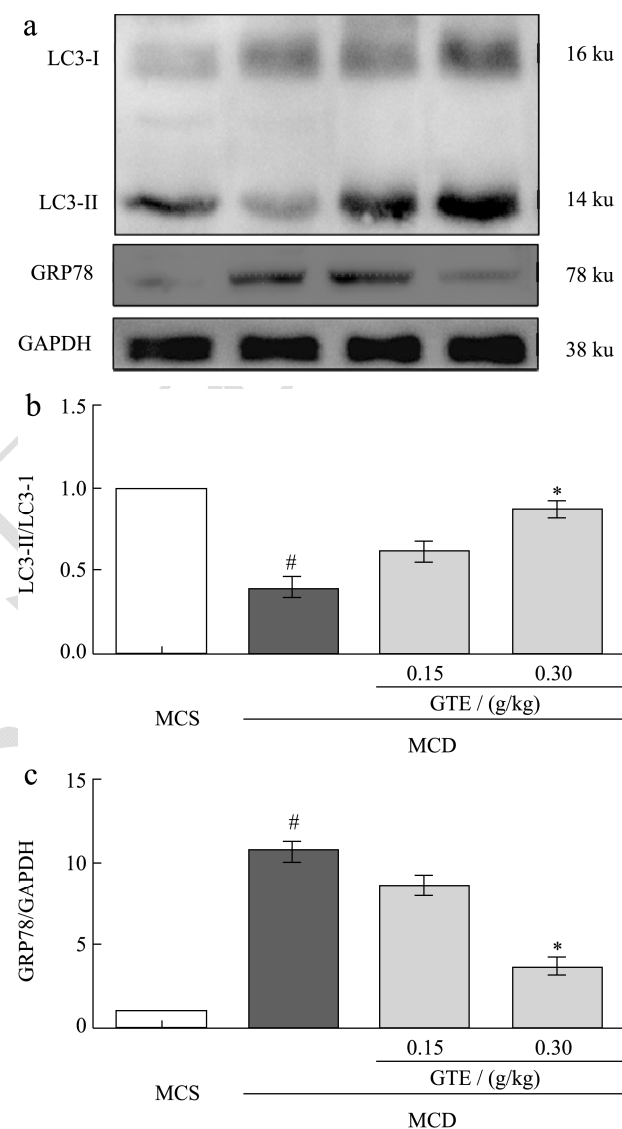


图5 绿茶水提物对 NASH 小鼠 GRP78 和 LC3 蛋白表达的影响

Fig.5 The effects of green tea extract on protein expression levels of GRP78 and LC3 in NASH mice

注: b 表示 LC3; c 表示 GRP78, 与 MCS 组比较, [#] $p<0.05$; 与 MCD 组比较, ^{*} $p<0.05$ 。

肝细胞在损伤的状态下会激活自噬机制来避免细胞的过度死亡。LC3 是自噬通路中的关键标志物^[15]。在自噬体的形成过程中, LC3-I 在自噬基因的作用下与磷脂酰乙醇胺偶联, 将无活性的 LC3-I 转化为脂活化形式 LC3-II, 活化后的 LC3-II 具有促进损伤细

胞自噬的功能。研究发现绿茶提取物组小鼠肝脏的 LC3-II 与 LC3-I 蛋白含量比例与 MCD 组比较显著升高 ($p<0.05$), 说明绿茶可能通过激活细胞自噬机制来改善肝损伤及脂肪变性。有研究者提出通过药物激活自噬通路来减轻脂肪肝损伤和脂肪变性的观点^[16]。也有研究表明在高脂饮食诱导的脂肪肝模型中也证实绿茶的主要成分 EGCG 具有刺激自噬通路来改善脂肪变性的作用^[17]。

越来越多的研究发现内质网应激在 NASH 的发病过程中发挥着重要的作用^[18,19]。其中, GRP78 是内质网应激中最重要的靶标蛋白之一, 其通过与错误折叠的蛋白质组合起作用以阻止它们形成聚集体并有助于适当的重折叠。当内质网处于应激状态时, 其膜上的 GRP78 蛋白高度表达, 协助细胞恢复稳态, 维持机体的正常运行。研究发现 MCD 组小鼠的 GRP78 水平显著高于正常组 ($p<0.05$), 提示 MCD 饮食会触发内质网应激, 这与学者 Michael W. Greene 等之前的研究结果一致^[20]。更值得关注的是与 MCD 组相比, GTE 处理组的 GRP78 蛋白表达水平显著降低 ($p<0.05$), 提示绿茶具有改善内质网应激作用。相关研究表明, 内质网应激最终会诱导肝细胞发生脂肪变性^[21]。因此, 基于 GRP78 蛋白结果, 绿茶减少 NASH 小鼠的脂肪堆积, 抑制脂肪变性和炎症反应的作用机制可能与改善内质网应激有关。

3 结论

研究发现饮用绿茶对 MCD 饮食诱导的 NASH 小鼠呈现明显保护作用, 其作用机制可能与 GRP78 蛋白和 LC3 蛋白的调控有关, 其具体的作用机制还需进一步研究。本研究将为绿茶作为一种有效低毒可用于 NASH 防治的功能性食品提供有效科学依据。

参考文献

- [1] Patel Y A, Gifford E J, Glass L M, et al. Risk factors for biopsy-proven advanced non-alcoholic fatty liver disease in the veterans health administration [J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 47(2): 268-278
- [2] Lallukka S, Yki-J Rvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2016, 30(3): 385-395
- [3] Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease [J]. *Nutrients*, 2013, 5(5): 1544-1560
- [4] Ara Jo A R, Rosso N, Bedogni G, et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future [J]. *Liver International*, 2018, 38(S1): 47-51
- [5] Schohraya S, Edgard D, Jean-Michel B, et al. Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017, 26(10): 519-541
- [6] Ibrahim S H, Hirsova P, Malhi H, et al. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, delete, and inflame [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2016, 61(5): 1325-1336
- [7] Onakpoya I, Spencer E, Heneghan C, et al. The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2014, 24(8): 823-836
- [8] Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, et al. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients [J]. *Nutrition Research*, 2012, 32(6): 421-427
- [9] Park H J, Dinatale D A, Chung M-Y, et al. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22(4): 393-400
- [10] 张莹,李惠琼,邹佳,等.凤冈富锌硒茶对 ERp57 蛋白酶的抑制作用及其有效成分的虚拟筛选[J].*中国现代医学杂志*,2018,28(11): 22-26
ZHANG Ying, LI Hui-qiong, ZOU Jia, et al. Inhibitory effect of Se-enriched and zinc-enriched green tea of Fenggang on ERp57 protease and virtual screening of its effective constituents [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2018, 28(11): 22-26
- [11] 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 (Baltimore, Md)*, 2005, 41(6): 1313-1321
- [12] 崔国祯,余汉濠,黄天养,等.胆碱和蛋氨酸缺乏饲料诱导大、小鼠非酒精脂肪性肝炎动物模型的比较研究[J].*遵义医学院学报*,2017,40(3):229-233
CUI Guo-zhen, YU Han-hao, HUANG Tian-yang, et al. Comparison of NASH models-induced by methionine and choline deficient diets between rat and mouse [J]. *Journal of Zunyi Medical University*, 2017, 40(3): 229-233

(下转第 292 页)

现代食品科技