

脂肪肝细胞模型的研究进展

冯秋琪¹ 任国艳^{1*} 乔香君² 柳嘉³ 夏凯³

¹河南科技大学, 食品与生物工程学院, 洛阳 471003; ²郑州航空港经济综合实验区口岸业务服务局, 郑州 451150;

³中国食品发酵工业研究院, 功能主食创制与慢病营养干预北京市重点实验室, 北京 100015)

摘要 脂肪肝是仅次于病毒性肝炎的第二大肝病。脂肪肝的发病率不断升高, 且发病年龄日趋年轻化, 正严重威胁人类的健康。脂肪肝包含一系列病理症状, 随病情进展, 患者可发生脂肪性肝炎、肝硬化和肝细胞性肝癌。一般而言, 脂肪肝属于可逆性疾病, 通过早期诊断和及时治疗往往能恢复正常。细胞模型是研究脂肪肝病理机制的重要途径。该文讨论了脂肪肝的发病机制, 并从细胞模型使用的细胞类型(动物和人的原代肝细胞、永生细胞系、诱导多能干细胞分化而来的类肝细胞和精密肝切片)、培养方式(单独培养、共培养、三维培养)和诱导方式(高脂、高糖和酒精)这三个方面对近年来常用的细胞培养模型进行总结和分析, 以期对脂肪肝的研究和药物筛选提供参考。

关键词 酒精性脂肪肝; 非酒精性脂肪肝; 细胞模型; 细胞系

Advances in Cell Models of Fatty Liver Disease

FENG Qiuqi¹, REN Guoyan^{1*}, QIAO Xiangjun², LIU Jia³, XIA Kai³

¹College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

²Port Bureau Of Zhengzhou Airport Economic Integrated Experimental Zone, Zhengzhou 451150, China;

³Beijing Key Laboratory of Innovative Development of Functional Staple and the Nutritional Intervention for Chronic Disease, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

Abstract Fatty liver disease is currently one of the most common liver diseases in the world, and it has become the second largest liver disease after viral hepatitis. The incidence of fatty liver disease is increasing, and the age of onset is getting younger, which is a serious threat to human health. Fatty liver disease contains a series of pathological symptoms. As the disease progresses, patients may develop steatohepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Generally speaking, fatty liver disease is a reversible disease, and early diagnosis and timely treatment can often lead to a return to normal. Cell model is an important way to study the pathological mechanism of fatty liver disease. In this paper, the pathogenesis of fatty liver disease is discussed, and the commonly used cell culture models in recent years are summarized and analyzed from the three aspects of cell type (primary hepatocytes of animals and humans, immortal cell lines, hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells, and precision-cut liver slices), culture mode (monoculture, coculture, three-dimensional culture) and modeling method (high-fat, high-sugar and alcohol) used in the cell model. This will provide reference for the study of fatty liver disease and drug screening.

Keywords alcoholic fatty liver disease; nonalcoholic fatty liver disease; cell model; cell lines

脂肪肝的主要特征是肝脏中脂肪沉积过度, 患者的临床表现有肝细胞炎症和肝纤维化等。脂肪

肝包括非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)和酒精性脂肪性肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD), 区分NAFLD和AFLD的重要指标是患者的饮酒情况, AFLD是过量饮酒导致的脂肪肝, 而NAFLD是排除过量饮酒和其他特异性肝损伤因素, 与代谢综合征和胰岛素抵抗有关的疾病, 其主

收稿日期: 2020-05-21

接受日期: 2020-09-04

*通讯作者。Tel: 15937969597, E-mail: renguoyan@163.com

Received: May 21, 2020 Accepted: September 4, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-15937969597, E-mail: renguoyan@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5415>

要特征是肝细胞内脂肪过度沉积^[1]。

目前, 脂肪肝在全球的患病率日益增长, 在亚洲NAFLD的发病率高达29.62%^[2], 严重威胁公共健康, 应当引起公众关注。研究脂肪肝使用的手段有动物模型和细胞模型, 动物模型能模拟体内环境, 但实验周期长、个体差异大; 而细胞模型能克服个体差异的影响, 更简便、高效, 适于开展高通量的药物筛选和机制研究。国内外的研究人员根据脂肪肝的特征建立了多种细胞模型, 如采用高糖高脂和酒精诱导细胞, 检测细胞糖脂代谢的情况, 建立脂肪肝细胞模型, 进而筛选出可以改善脂肪肝的食品功能因子。下文将从细胞类型选择、细胞培养方式和干预条件这几方面来进行综述, 以期筛选药物和天然活性成分提供参考。

1 NAFLD的发病机制

1.1 NAFLD的发病机制

近年来的研究发现, 引起NAFLD的因素有超重、胰岛素抵抗、缺少运动、高脂高糖的饮食模式、遗传因素和肠道菌群失调^[3](图1)。NAFLD的主要特征是肝脏内脂质异常积聚, 在没有发生炎症和肝损伤的情况下, 被称为脂肪变性或单纯性脂肪肝。NAFLD包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及非酒精性脂肪性肝炎引起的肝硬化。目前, NAFLD的发病机理尚不清楚, 被提到最多的“二次打击”学说^[4]是

这样解释的: 首先, 机体由于各种原因出现胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱, 导致肝细胞内堆积大量的脂质, 形成NAFLD, 这是肝脏受到的“首次打击”; 随后, 细胞内的脂质氧化产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 引起氧化应激和炎症反应, 肝细胞受到损伤, 形成非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 即“第二次打击”。肝脏是机体糖脂代谢的重要器官。人体摄入食物后, 消化酶将淀粉分解为单糖进入血液, 血糖升高, 促进胰岛素分泌。胰岛素调节血糖的途径有: (1) 促进外周组织对葡萄糖的吸收利用; (2) 促进肝脏利用葡萄糖生成肝糖原; (3) 促进脂肪生成, 抑制脂肪组织的脂解作用。当机体发生胰岛素抵抗时, 机体的糖脂代谢会紊乱, 形成脂肪肝和糖尿病^[5]。

NAFLD患者肝脏脂肪来源主要有两个。(1) 脂肪组织中的甘油三酯分解的游离脂肪酸由血液运送到肝脏。在这一过程中, 胰岛素抵抗是重要的一环, 胰岛素抵抗使脂肪组织中的脂解失调, 过多的脂肪酸被输送到肝脏, 从而导致肝脏脂肪变性的发生^[6]。(2) 脂肪酸的从头合成。机体大量摄入果糖和葡萄糖, 会增加肝脏脂质的从头合成。研究表明, 人类肠道上皮对果糖的吸收能力有限, 所以大部分果糖都在肝脏内被磷酸化形成脂肪酸, 这一磷酸化的过程导致机体肝脏内ATP的耗竭, 从而增加细胞应激反应^[7]。

IOANNOU等^[8]研究发现, 脂质在枯否氏细胞中

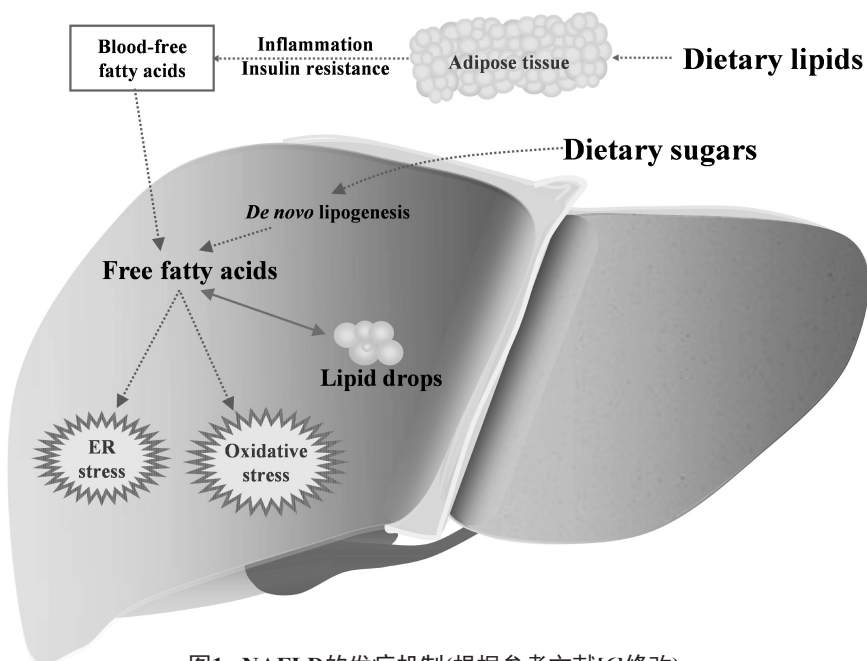


图1 NAFLD的发病机制(根据参考文献[6]修改)

Fig.1 The pathogenesis of NAFLD (modified from reference [6])

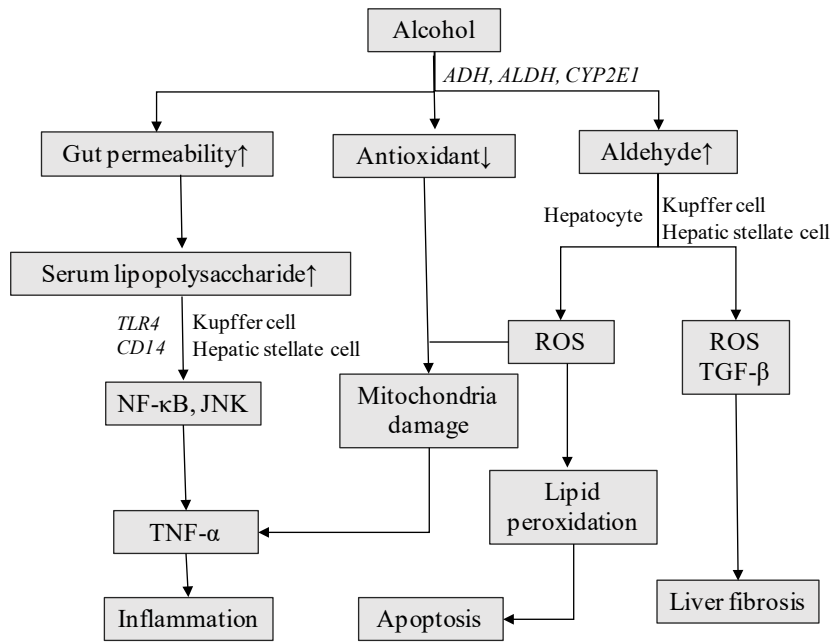


图2 AFLD的发病机制(根据参考文献[17]修改)

Fig.2 The pathogenesis of AFLD (modified from reference [17])

堆积可以促进炎症因子白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)释放,导致肝细胞发生炎症反应。炎症还能干扰胰岛素信号,从而引起胰岛素抵抗^[9]。过多的脂肪酸在细胞内的堆积,可以破坏线粒体膜的流动性,导致内质网应激和线粒体功能障碍,后者会使得活性氧产生过量,最终导致细胞炎症和凋亡的发生,形成NASH^[10]。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP)调控肝脏和其他组织胆固醇、脂肪酸和甘油三酯(triglyceride, TG)的合成,下调SREBP-1c的表达可能对治疗脂肪性肝炎有益。过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators activated receptors, PPARs)负责调控能量平衡和脂质代谢,可以将脂肪酸和碳水化合物从肝脏转移到脂肪组织,增强脂肪细胞的脂肪储存,减少肝脏的负担^[11]。肠道菌群失调会降低胆碱水平,提高甲胺水平,从而增加脂蛋白脂肪酶活性,增加TG积累,促进NASH^[12]。

1.2 AFLD的发病机制

AFLD的主要致病因素包括饮酒、肥胖、性别、和遗传等。参与乙醇代谢的酶活性在不同个体间有基因决定的差异,不同的人代谢酒精的能力有强弱之分,女性的首过代谢和胃内的乙醇脱氢酶活性较低,使患病几率增大^[13]。肥胖则加重了肝脂质氧化,加速了酒精性肝病的纤维化和肝硬化进程^[14](图2)。

酒精的代谢主要是在肝脏内进行的,通过乙醇脱氢酶将乙醇转化为对人体毒性较大的乙醛,再由乙醛脱氢酶转化为相对无毒性的乙酸,进入三羧酸循环代谢为二氧化碳和水^[15]。酒精诱导AFLD可通过以下两个途径:(1)酒精在肝脏中氧化产生ROS,ROS可以促进脂质过氧化,改变磷脂膜通透性导致肝脏氧化应激损伤,引起肝硬化等疾病发生。(2)酒精在肝脏中初步代谢产生乙醛,乙醛的毒性较大,可促进AFLD的发展,乙醛可直接破坏PPAR- α 的功能,使得游离脂肪酸无法被氧化、运输和输出,导致肝脏内的脂肪酸大量积累,破坏脂质稳态^[16]。乙醛还能损伤线粒体,抑制三羧酸循环,并可损伤肝脏微管进而影响脂质代谢,使脂质沉积在肝细胞中,发展为脂肪肝^[17]。另外,最近的研究发现,乙醇可以通过抑制胰岛素分泌而上调饥饿素的水平,从而使肝脏组织中的脂质增加^[18]。

研究发现,AFLD与Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)的关系密切。饮用过量酒精会增加肠道的通透性,并使细菌产生的脂多糖从肠道转移到肝脏,激活枯否氏细胞,通过脂多糖/TLR4通路,上调核因子- κ B表达,促进TNF- α 分泌^[19]。LIN等^[20]发现,敲除TLR4基因可以使天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)的水平显著降低,TG含量显著降低,内源性脂肪生成基因的表达减少,脂肪酸

氧化相关基因的表达增加, 这提示敲除 $TLR4$ 基因可以改善酒精性肝损伤和脂肪肝。

2 用于研究脂肪肝的细胞模型

肝细胞可分为两大类。肝实质细胞即正常肝细胞和胆管细胞, 分别占肝细胞总数的70%和3%~5%, 构成了肝脏的主要基质; 非实质细胞主要包括内皮细胞、枯否细胞和星状细胞, 约占肝细胞总数的25%。现有的模型细胞可以分为: 人原代肝细胞、动物原代肝细胞、永生细胞系、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)源性肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, HLCs)和肝切片(表1); 培养形式可分为单独培养、共培养和三维培养(表2)。

2.1 建立细胞模型所用的细胞系

2.1.1 人原代肝细胞 人原代肝细胞在较大程度上保留了细胞在体内器官里的功能, 各种物质代谢功能和酶活性与体内的肝细胞极其相似, 是最为接近临床的一种标准体外短期培养模型。人原代肝细胞通常从肝或肝组织中获得, 一般在肝切除手术中或者肝移植后排斥的肝组织中获得, 随后即时进行研究或者冻存待用。早在1976年, SEGLEN和

REITH^[21]提出两步胶原酶灌注技术分离人原代肝细胞, 第一步灌注是为了清除肝脏组织中残留的血液, 并加热组织, 促使钙离子和乙二醇双四乙酸的消耗, 松动细胞与细胞之间的连接; 第二步是使用胶原酶灌注, 将组织块消化成单个细胞, 离心细胞可以将肝细胞与非实质细胞分离。WANNINGER等^[22]用油酸(oleic acid, OA)和棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导人原代肝细胞的模型显示, 细胞内的脂质显著增加, 并与OA和PA存在剂量依赖效应, 脂质积累导致TGF- β 上调, 而TGF- β 可能促进肝纤维化。

由于不同捐献者的个体差异和细胞分离过程中的各种因素的影响, 可能出现实验结果不稳定、重复性差的情况。此外, 人原代肝细胞的培养条件比较苛刻, 只能在短期内培养, 不能无限传代, 不利于实验开展。人肝样本的稀缺和伦理道德问题也阻碍了人原代肝细胞的广泛应用。

2.1.2 动物原代肝细胞 鉴于人原代肝细胞存在数量稀缺和伦理道德等问题, 研究人员尝试从动物肝脏中分离原代肝细胞, 用来体外培养并进行研究。使用较多的是啮齿动物, 还有一些哺乳动物和鱼类。

贾哲等^[23]以改进的两步灌注法分离培养的奶

表1 不同细胞系的优势与不足

Table 1 Advantages and disadvantages of different cell lines

模型种类 Model types	细胞系 Cell lines	优势 Advantages	不足 Disadvantages
Primary cell cultures of human	Hepatocytes isolated from NAFLD patients	Mimic <i>in vivo</i> settings	Isolation problems, ethical issues, varying reproducibility in experiments, limited culture time
Primary cell cultures of animals	Hepatocytes isolated from NAFLD animals	Mimic <i>in vivo</i> settings	Varying reproducibility in experiments, limited culture time
Immortalized cell lines	HepG2, L02, HuH7, HepaRG	Continuous growth, easy to culture, stable phenotype	Expression of several enzymes alter according to the immortalization method
Hepatocyte-like cells	Not applicable	Wide source, large number, stable phenotype and high similarity with hepatocytes	Risk of tumorigenesis, and the acquisition process is complicated
Precision-cut liver slices	Not applicable	Contains a variety of liver cells that mimic liver tissue	Short survival time <i>in vitro</i>

表2 不同的细胞培养方式的优势和不足

Table 2 Advantages and disadvantages of different methods of cell culture

培养方式 Culture methods	优势 Advantages	不足 Disadvantages
Monoculture	Short cycle and high efficiency are beneficial to high-throughput drug screening experiment	Single cell type and lack of dimension
Coculture	Mimic <i>in vivo</i> liver architecture, important tools in cellular cross talk studies	Difficult to cultivate
3D culture	Mimic <i>in vivo</i> liver architecture, liver specific differentiation and function, tools for transcriptional regulation studies	Difficult to cultivate, expensive

牛肝细胞为研究对象,使用0~1 mmol/L的油酸钠对其诱导处理12 h,根据细胞活性和脂滴大小最后选择了0.25 mmol/L作为最佳诱导浓度。结果显示:处理过的细胞在电镜下被观察到线粒体空泡化严重,糖原颗粒较少,符合临床脂肪肝病现象;*PPAR- α* 的基因表达水平较对照组显著升高,脂质合成基因*SREBP-1c*和*ChREBP*(carbohydrate-responsive element-binding protein)的表达水平显著降低。ZHENG等^[24]使用两步胶原酶灌注法分离小鼠原代肝细胞,体外培养一定时间后,用浓度为0.2 mmol/L的PA诱导24 h,模型组细胞与对照组相比,细胞内脂质显著增多,细胞摄取葡萄糖的能力显著降低,促炎细胞因子白细胞介素-6、白细胞介素-1 β 和TNF- α 的分泌显著增多,使用益母草三帖酸干预后,通过调控PI3K/Akt/GSK3 β 通路减轻了细胞胰岛素抵抗。

动物原代细胞解决了人原代肝细胞伦理问题和数量有限的问题,缺点是受到动物来源和批次不同的影响,重复性差,并且较为敏感,培养条件苛刻。

2.1.3 永生细胞系 永生细胞系能够无限传代,通常使用的永生化手段是在人原代肝细胞中过表达病毒致癌基因和(或)人端粒酶逆转录蛋白基因。永生细胞系与原代肝细胞相比,具有以下优点:生长稳定、无限寿命、表型稳定,并且培养条件比原代肝细胞简单,易于在不同实验室间标准化。常用的永生细胞系有人肝癌细胞系HepG2、人正常肝细胞L02、人肝癌细胞系HuH7、人肝癌细胞系HepaRG和人肝星状细胞系LX2等。

YIN等^[25]使用脂肪酸诱导HepG2细胞24 h后,通过油红O染色观察细胞内脂质积累显著增多,TG、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量显著增多,提示细胞出现损伤和脂质过氧化;超氧化物歧化酶和谷胱甘肽显著减少,提示抗氧化性减弱。赵爽等^[26]使用3%的乙醇诱导L02细胞48 h,AST、ALT(alanine aminotransferase)显著上升、TG含量和ROS水平显著上升,证明细胞获得了脂肪肝和氧化应激的特性。喻青青等^[27]使用0.5 mmol/L的OA诱导HepG2细胞24 h后,TG和ROS显著增多,细胞摄取葡萄糖的能力显著下降,表明细胞出现脂变性、氧化应激和胰岛素抵抗的症状。KHAMPHAYA等^[28]使用PA诱导HuH7细胞24 h,细胞出现脂肪变性。MICHAUT等^[29]使用OA诱导HepaRG细胞1周后出现脂肪变性。BARBERO-

BECERRA等^[30]将HuH7和LX2共培养,使用PA和OA诱导24 h后,肝细胞和肝星状细胞都出现脂肪变性,并且肝星状细胞被激活。

病毒致癌基因介导的永生细胞系存在致癌和病毒感染的风险;过表达人端粒酶逆转录蛋白基因这种方法只适用于人类胎肝细胞和新生肝细胞,无法诱导成人肝细胞永生化。另外,永生化可能使细胞的染色体损伤,从而导致细胞失去相应的功能^[31]。

2.1.4 诱导多能干细胞源性肝细胞样细胞 诱导多能干细胞可以分化成各种体细胞,不会产生免疫排斥和伦理问题。人iPSCs分化而来的HLCs,其形态与功能特性可以与原代肝细胞相媲美,并且有来源广、培养数量大、表型稳定等优点,弥补了原代肝细胞的不足^[32]。

GRAFFMANN等^[33]诱导人iPSC分化为HLCs,在细胞分化至第12天时,细胞各项指标均符合肝细胞的特征。加入50 mmol/L的OA诱导48 h后,细胞内脂质积累增多,PLIN2表达量增加,表明细胞获得NAFLD。PARAFATI等^[34]将多能干细胞分化成HLCs后,使用浓度为25 μ mol/L的OA,协同浓度为50 μ mol/L、100 μ mol/L和200 μ mol/L的PA分别诱导18 h,用硼-二吡咯甲基染色,观察到脂滴的数量随着PA浓度升高而增多。已知TG可以诱导细胞内质网应激,随后用TG联合脂肪酸诱导细胞来验证内质网应激是否能增加外源性脂肪酸在细胞内的积累,结果显示,内质网应激可以显著增加细胞内的脂质积累。

然而,诱导多能肝细胞技术尚存在问题,如诱导细胞转化的效率低,在诱导过程中可能发生基因变异,具有致癌风险,这些缺点限制了其广泛应用。

2.1.5 精密肝切片 精密肝切片是介于器官与细胞水平之间的体外培养技术,相比细胞模型,肝切片更接近复杂的人体肝脏结构和组成。肝切片中包含肝细胞、枯否氏细胞和肝星状细胞等,创造了多细胞的环境,各类肝细胞互相作用能更好地模拟肝脏组织环境,但它的缺点是存活时间较短,不能长期培养。精密肝切片的制作方法是在低温无菌环境下,先切下直径为9 mm左右的圆柱形的实验动物的肝脏组织,然后将肝脏组织放入缓冲液,用组织切片机切成200~500 μ m的薄片,切片太厚会影响组织通透性,不利于氧气和营养物质的扩散;切片太薄则损伤细胞比例过大,影响实验结果。切片前用低温的缓冲液对肝组织清洗,也可以将切片置于缓冲液中,低

温保存1 h后再培养, 这样的细胞活力较高。切片的培养系统主要有两种: 动态组织培养系统和持续浸润组织培养系统。前者在闪烁瓶中间歇通入O₂和CO₂, 在37 °C下振荡水浴; 后者是在多孔板中持续通入O₂和CO₂, 在37 °C下振荡水浴。两种培养系统在短时间内无明显差别, 多孔板由于价格低廉而被更多地使用^[35]。

SCHAFFERT等^[36]建立了一种AFLD肝切片模型, 在培养基中加入25 mmol/L的乙醇培养24 h后, 模型细胞内的谷胱甘肽消耗量显著增加, 脂质过氧化作用增强, 白细胞介素-6显著增加。培养48 h后, 平滑肌肌动蛋白和胶原蛋白1 α 显著增多, 提示肝纤维化加剧, 因此, 该模型可用来研究AFLD和酒精性肝损伤。PRINS等^[37]建立了一种大鼠的精密肝切片模型模拟代谢综合征, 厚度为250~300 μ m, 在培养基中分别加入浓度为25 mmol/L葡萄糖、5 mmol/L果糖、1 nmol/L胰岛素和240 μ mol/L的PA, 孵育24 h后, 油红O染色和试剂盒检测显示: 无论有没有PA存在, 葡萄糖、果糖和胰岛素共同孵育后脂滴都明显增多, 乙酰辅酶a羧化酶1、乙酰辅酶a羧化酶2以及SREBP-1c的上调提示肝细胞中脂肪从头生成增加。此外, 肉碱棕榈酰转移酶1表达降低, 提示脂肪酸转运受损, 线粒体 β 氧化紊乱。这一新的体外NAFLD模型成功地诱导了脂肪变性。

2.2 细胞培养的方式

2.2.1 单独培养模型 单独培养是指一种类型的细胞贴壁培养, 这是最基础的一种培养方式, 无论是原代细胞、永生系细胞都可以进行单独培养。单独培养技术的优点是周期短、效率高, 有利于高通量药物筛选实验, 所以普遍应用于脂肪肝的研究。

RAFIEI等^[38]用NAFLD细胞模型评价了几种多酚类物质和生物碱小檗碱对NAFLD的作用。在模型中使用浓度为1.5 mmol/L的OA诱导HepG2细胞24 h, 引起脂肪变性和细胞形态变化, 随后用多酚类物质干预NAFLD细胞, 检测了脂代谢相关的基因表达情况, 结果表明, 多酚类物质可以显著改善NAFLD。MONTESANO等^[39]在研究左旋肉碱对脂肪肝的作用时, 利用5 mmol/L的果糖诱导HepG2细胞48 h建立NAFLD模型, 结果表明, 左旋肉碱可以明显减少细胞内脂质, 改善氧化应激。

单独培养模型由于相对简单, 在研究中应用较多, 但它们缺乏维度, 没有介质流, 只有一种类型的

细胞, 缺少其他类型的细胞, 如枯否氏细胞、星状细胞和巨噬细胞等, 缺乏细胞之间的相互作用。

2.2.2 共培养模型 共培养模型可以弥补单独培养模型的缺陷, 在模型中引入第二种细胞, 增加了细胞之间的相互作用, 可以更好地模拟肝脏的生理机能。

人原代肝细胞与内皮细胞共培养可支持肝细胞维持其表型形态, 改善其特定功能, 并可形成毛细血管样结构, 更有利于模拟体内环境, 研究脂肪肝病的病理机制^[40]。枯否氏细胞是位于肝血窦的一种巨噬细胞, 可以分泌炎症细胞因子。人原代肝细胞和枯否氏细胞的共培养可以评估促炎环境下的肝细胞反应^[41]。GIRAUDI等^[42]将人肝细胞HuH7和肝星状细胞LX2共同培养, 用脂肪酸诱导24 h后, 细胞内脂质的积累增多, α 平滑肌肌动蛋白表达增多, 提示肝星状细胞被活化, 细胞出现脂肪变性与纤维化的表征。在另一个研究中, 将人原代肝细胞、肝星状细胞和枯否氏细胞三者共同培养, 用脂肪酸、葡萄糖、胰岛素和炎症细胞因子刺激细胞, 模拟非酒精性脂肪肝炎, 该模型细胞内的脂肪从头合成作用增强, 细胞出现氧化应激、炎症、纤维化症状以及肝星状细胞的激活^[43]。CHEN等^[44]建立了一种HepG2细胞与THP-1巨噬细胞共培养的模式, 先将巨噬细胞贴壁于无菌载玻片, 随后将载玻片放入接种了HepG2细胞的6孔板中, 加入浓度为1 mmol/L的混合脂肪酸(PA和OA的比例为1:2), 诱导24 h后建立了NAFLD模型。

共培养模型的优点是弥补了单独培养模型的不足, 培养条件简单, 还能进行高通量实验。但是现有的共培养模型种类不多, 未来还有很大的发展潜力。

2.2.3 三维培养模型 环境对细胞的生存至关重要, 在活体肝组织内, 肝细胞与细胞外基质之间有物质传输和信号传递, 细胞外基质还起到支撑三维结构的作用^[45]。在传统的二维系统中培养较长时间的人原代肝细胞由于上皮-间质转化发生了形态学改变, 从而导致肝细胞极性和相关肝功能的丧失^[46]。

三维培养常用的方法有支架培养和悬浮培养这两种。常用的支架材料有水凝胶、胶原蛋白和层黏连蛋白等, 支架可以支撑肝细胞, 形成类似细胞间接触和细胞间基质的相互作用。悬浮培养是指细胞在悬浮条件下自发聚集形成球体, 这种方法操作简单、费用低、应用广泛^[47]。三维培养还分为三维单

细胞培养和三维共培养,下文是对两者的说明。

(1) 三维单独培养模型。在GEVAERT等^[48]的实验中,水凝胶支架包裹的人原代肝细胞聚集物培养21天后仍保持稳定的肝细胞表型。在另一个实验中,生物打印机根据特定的类似肝脏结构的设计模板,将细胞聚集物与支撑结构(通常是水凝胶)同时聚积^[49]。KOSTRZWSKI等^[50]建立了一种三维的人原代肝细胞模型,模型组含有0.6 mmol/L的脂肪酸,对照组和模型组都添加了适宜浓度的胰岛素和葡萄糖。培养7天后,模型组脂质积累明显增多,14天后进一步增加,模型组消耗的脂肪酸是对照组的4倍多。造模后细胞的AST、ALT泄漏量无显著变化,表明细胞活性正常,不受造模液影响。细胞内谷胱甘肽水平、LDH释放、尿素生成和线粒体活动也不受造模液的影响,证明此三维模型的细胞功能齐全。基因*CYP2E1*、*IGFBI*、*PDK4*和*CYP7A1*的表达量都显著升高,表明模型具有脂肪变性特征。此模型检测二甲双胍等抗脂肪肝药的效果显著。

三维模型能更好地模拟体内环境,培养时间更长,有利于进行反复诱导实验。球体三维模型可用于高通量筛选实验,效率较高。缺点是建立三维模型非常耗时并且昂贵,由于其仍处于早期使用阶段,有些功能还有待验证。

(2) 三维共培养模型。三维共培养模型可用于研究更复杂的脂肪肝表型,如炎症和肝纤维化。在三维共培养模型中,人肝细胞与非实质细胞一起培养,可以在三维空间模拟肝内各种类型细胞之间的相互作用。三维共培养模型的优点是能长期维持重要的代谢功能,并在相关条件下诱导脂肪肝病理表型。

SUMANTA等^[51]使用瑞士InSphero品牌的三维人肝微组织系统,将原代人肝细胞与肝星状细胞、枯否氏细胞和内皮细胞共培养,使用PA诱导细胞,成功建立了脂肪肝模型。模型显示,PA显著增加了炎症因子以及促纤维化基因的表达(包括胶原基因、 α -平滑肌肌动蛋白、金属蛋白酶组织抑制因子1、血小板衍生生长因子受体- β 以及白细胞介素-8),造成肝微组织的损伤。还检测到转化生长因子 β 通路被激活,使用GS-4997(一种凋亡信号调节激酶ASK-1的抑制剂)进一步验证该模型,结果显示,GS-4997显著降低了PA诱导的炎症和纤维化反应,同时降低了细胞凋亡和肝星状细胞的活化。

三维共培养模型的缺点是操作复杂和价格昂贵,还需要继续提升技术和完善功能,从而在科研中得到更广泛的利用。

脂肪肝细胞模型所用的细胞类型多种多样,培养的方法也各不相同。每种细胞模型都有自身的优缺点,研究者可根据实验环境、研究目的等因素选择适当的细胞模型对脂肪肝进行研究。

3 脂肪肝细胞模型的干预条件

3.1 高脂诱导脂肪肝

医用脂肪乳剂毒性低、溶解性好、操作简便、经济实惠。刘晓等^[52]使用HepG2细胞建立了一种NAFLD模型,脂肪乳剂的质量浓度为0.2%~4.0%,孵育72 h后,用MTT法检测细胞活性,油红O染色细胞内脂质,试剂盒法检测细胞内TG。结果显示,1%及以下浓度的脂肪乳剂对细胞活力无影响,0.4%及以上浓度的脂肪乳剂可以逐渐增加细胞内脂滴,1%为诱导的最佳质量浓度,此时胞内TG最多,且细胞存活率最高。PCR结果显示,1%脂肪乳剂孵育24 h后,模型组细胞肉碱棕榈酰转移酶1和TNF- α 表达量显著增多,SREBP-1c表达量显著降低,提示NAFLD和炎症反应的发生。

PA和OA是人体中最丰富的膳食长链脂肪酸,是目前NAFLD造模中最常用的脂肪酸,但是脂肪酸存在溶解性差的问题。为了使其更好地溶解于培养基,YASUYUKI等^[53]使脂肪酸与BSA以5:1的比例结合,溶解后再用培养基稀释至所需浓度。CHEN等^[54]利用500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的OA诱导WRL68细胞24、48 h,建立了脂肪肝模型。GOMEZ等^[55]的实验表明,PA与OA浓度比为1:2时对肝细胞毒性最小,所以很多研究采用此比例。CHIENWICHAI等^[56]利用0.2 mmol/L的OA和0.1 mmol/L的PA共同诱导HepG2细胞72 h,成功建立了脂肪肝模型。肖晴等^[57]使用1 mmol/L的游离脂肪酸(OA:PA=2:1)诱导HepG2和L02细胞24 h均获得了脂肪肝细胞模型。

3.2 高糖诱导脂肪肝

有研究证明,高果糖摄入与NAFLD和肝纤维化相关^[58]。贺雯茜等^[59]建立了果糖诱导的L02细胞脂肪肝模型,并检测到果糖浓度在32 mmol/L以下时对细胞活性无影响,果糖浓度不低于4 mmol/L时能显著增加细胞内脂质,并上调乙酰辅酶A羧化酶1、SREBP-1和碳水化合物反应元件结合蛋白的表达。

ZHAO等^[60]为了研究果糖和脂肪酸的造模效果,使用5~25 mmol/L葡萄糖和/或5~25 mmol/L果糖在1 mmol/L混合脂肪酸(PA和OA浓度比为1:2)存在的条件下诱导HepG2细胞24 h,监测脂质和尿酸生成、葡萄糖代谢、氧化状态以及相关基因和蛋白的变化。结果表明,PA可以诱导胰岛素抵抗、氧化应激和脂质积累,OA促进细胞内脂质积累,而果糖可以促进尿酸和胆固醇的产生,果糖、葡萄糖和脂肪酸协同提高细胞内外TG和细胞外的MDA。

3.3 酒精诱导脂肪肝

肝脏是储存铁的主要部位,机体出现AFLD时,肝铁含量增多,铁会促进肝细胞的脂质氧化,从而损害肝细胞^[61]。袁叶飞等^[62]使用含有0.5%乙醇和0.01%硫酸亚铁的培养液诱导L02细胞,培养3天后再换不含乙醇和硫酸亚铁的培养液培养3天,重复3次,获得了AFLD细胞模型,乙醇和硫酸亚铁诱导后胞内TG含量显著上升,脂质积累增多,但是AST、ALT没有显著性变化,说明低浓度的酒精对细胞活性没有显著影响。

班笃敬等^[63]在研究木香烃内酯对AFLD的影响时,利用浓度为100 mmol/L的酒精诱导L02细胞48 h后,检测到细胞内的TG、TC含量显著增多,形成脂肪肝。魏颖等^[64]为了探究玉米肽和姜黄素对AFLD的作用时,在HepG2细胞培养基中加入浓度为1 mmol/L的OA、玉米肽和姜黄素共同培养20 h后,加入0.6%的无水乙醇继续培养4 h,建立了AFLD的细胞模型,检测到模型组细胞的ALT、AST和LDH泄漏量显著增多,提示发生细胞损伤;胞内TG、MDA和乙醇脱氢酶含量显著增多,提示细胞内脂质和脂质过氧化产物增多。

综上所述,高脂、高糖和酒精都可以诱导细胞脂肪变性,一般来说,浓度越高,作用时间越长,诱导脂肪肝的效果越好,但是酒精浓度过高会影响细胞存活率。不同的细胞系对糖类、脂类、酒精的敏感性也有所不同,研究者需要预先筛选出适当的造模液浓度。NAFLD的检测指标有TG、TC、糖原、ROS水平、炎症因子。AFLD的检测指标有TG、TC、ROS、AST、ALT、MDA、乙醇脱氢酶等。

4 结语与展望

如本文所述,细胞模型可以反映NAFLD的发病机制,并作为一种工具来测试新的治疗手段和预防

策略。目前的脂肪肝细胞模型种类很多,其中二维培养的原代细胞和永生细胞系被广泛应用,随着科技发展,细胞模型也变得越来越复杂和精密,如三维培养和共培养模型,肝切片技术也随着技术发展得到了提高。高脂、高糖、酒精均能诱导细胞形成脂肪肝。细胞模型具有数量大、周期短、易于重复的优点,是研究脂肪肝发病机制的有力工具,可以与动物模型互相补充。未来的目标应该是发展和完善标准化的细胞模型,探究NAFLD发展的分子机制,为治疗脂肪肝提供更好的理论基础。

参考文献 (References)

- [1] 于文雪, 孙禹欣, 金莉莉, 等. NAFLD的发病机制与新型治疗药物研发[J]. 中国细胞生物学学报(YU W X, SUN Y X, JIN L L, et al. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease and development of new therapeutic drugs [J]. Chin J Cell Biol, 2020, 42(3): 499-506.
- [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, doi: 10.1016/S2468-1253(19)30039-1.
- [3] BIBBO S, LANIRO G, DORE M P, et al. Gut microbiota as a driver of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Mediators Inflammation, 2018, 2018: 1-7.
- [4] DAY C P, JAMES O F W. Steatohepatitis: a tale of two “Hits” [J]? Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-5.
- [5] ARAB J P, ARRESE M, TRAUNER M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13(1): 321-50.
- [6] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-22.
- [7] ABDELMAIEK M F, LAZO M, HORSKA A, et al. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes [J]. Hepatology, 2012, 56(3): 952-60.
- [8] IOANNOU G N. The role of cholesterol in the pathogenesis of NASH [J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 27(2): 84-95.
- [9] DU PLESSIS J, KORF H, VAN PELT J, et al. Pro-inflammatory cytokines but not endotoxin-related parameters associate with disease severity in patients with NAFLD [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0166048.
- [10] OGAWA Y, SUGANAMI T, TANAKA M, et al. Parenchymal-stromal cell interaction in metabolic diseases [J]. Inflamm Regen, 2015, 35(4): 167-71.
- [11] SILVA A K S, PEIXOTO C A. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in non-alcoholic fatty liver disease inflammation [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(16): 2951-61.
- [12] SPENCER M D, HAMP T J, REID R W, et al. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency [J]. Gastroenterology, 2011, 140(3): 976-86.
- [13] HORIE Y, YAMAGISHI Y, HIROTOSHI E, et al. Obesity, type 2

- diabetes, age, and female gender: significant risk factors in the development of alcoholic liver cirrhosis [J]. *Hepatol Int*, 2013, 7(1): 280-5.
- [14] LU F B, HU E D, XU L M, et al. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 12(5): 491-502.
- [15] Boyle M, Masson S, Anstee Q M. The bidirectional impacts of alcohol consumption and the metabolic syndrome: cofactors for progressive fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2): 251-67.
- [16] LEBRUN V, MOLENDI-COSTE O, LANTHIER N, et al. Impact of PPAR- α induction on glucose homeostasis in alcohol-fed mice [J]. *Clin Sci*, 2013, 125(11): 501-11.
- [17] ALTAMIRANO J, BATALLER R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(9): 491-501.
- [18] RASINENI K, THOMES P G, KUBIK J L, et al. Chronic alcohol exposure alters circulating insulin and ghrelin levels: role of ghrelin in hepatic steatosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, doi: 10.1152/ajpgi.00334.2018.
- [19] LIU J. Ethanol and liver: recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40): 14672-85.
- [20] JIA L, CHANG X L, QIAN S W, et al. Hepatocyte toll-like receptor 4 deficiency protects against alcohol-induced fatty liver disease [J]. *Mol Metab*, 2018, 14: 121-9.
- [21] SEGLEN P O, REITH A. Ammonia inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes: quantitative ultrastructural alterations in the lysosomal system [J]. *Exp Cell Res*, 1976, 100(2): 276-80.
- [22] WANNINGER J, NEUMEIER M, HELLERBRAND C, et al. Lipid accumulation impairs adiponectin-mediated induction of activin A by increasing TGFbeta in primary human hepatocytes [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2011, 1811(10): 626-33.
- [23] 贾哲, 张才, 吴庭才, 等. 奶牛脂肪肝细胞模型的建立[J]. *中国兽医学报*(JIA Z, ZHANG C, WU T C, et al. Establishment of a model of hepatocyte steatosis in dairy cows [J]. *Chin J Vet Sci*), 2018, 38(5): 1023-8.
- [24] ZHENG X, ZHAO M G, JIANG C H, et al. Triterpenic acids-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* attenuates insulin resistance and hepatic steatosis via PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Phytomedicine*, 2020, 66: 153130.
- [25] YIN J, LUO Y, DENG H, et al. Hugin Qingzhi medication ameliorates hepatic steatosis by activating AMPK and PPAR α pathways in L02 cells and HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1): 229-39.
- [26] 赵爽, 荣成博, 张淑曼, 等. 毛木耳多糖对乙醇性肝损伤的保护作用[J]. *江苏农业科学*(ZHAO S, RONG C B, ZHANG S M, et al. Protective effects of polysaccharides from *Auricularia auricula* on ethanol-induced liver injury [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*), 2017, 45(12): 142-4.
- [27] 喻青青, 孟沫然, 刘亚云, 等. 二氢姜黄素对油酸诱导的非酒精性脂肪肝体外模型的预防作用与机制研究[J]. *中草药*(YU Q Q, MENG M R, LIU Y Y, et al. Preventive effect and underlying mechanism of dihydrocurcumin on NAFLD in oleic acid-treated HepG2 cells [J]. *Chin Herb Med*), 2018, 49(5): 1092-9.
- [28] KHAMPHAYA T, CHUKIJRUNGROAT N, SAENGSRISUWAN V, et al. Non-alcoholic fatty liver disease impairs expression of the type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [J]. *Hepatology*, 2017, 67(2): 560-74.
- [29] MICHAUT A, LE-GUILLOU D, MOREAU C, et al. A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: application to acetaminophen [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 292: 40-55.
- [30] BARBERO-BECERRA V J, GIRAUDI P J, CHAVEZ-TAPIA N C, et al. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an *in vitro* model of NASH [J]. *Toxicol In vitro*, 2015, 29(7): 1753-8.
- [31] TSURUGA Y, KIYONO T, MATSUSHITA M, et al. Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as cell sources for liver cell-based therapy [J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(9): 1083-94.
- [32] MANN D A. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes for toxicology testing [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 11(1): 1-5.
- [33] GRAFFMANN N, RING S, KAWALA M A, et al. Modeling non-alcoholic fatty liver disease with human pluripotent stem cell-derived immature hepatocyte-like cells reveals activation of PLIN2 and confirms regulatory functions of peroxisome proliferator-activated receptor alpha[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(15): 1119-33.
- [34] PARAFATI M, KIRBY R J, KHORASANIZADEH S, et al. A nonalcoholic fatty liver disease model in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, created by endoplasmic reticulum stress-induced steatosis [J]. *Dis Model Mech*, 2018, doi: 10.1242/dmm.033530.
- [35] 杨哲琼, 彭仁. 精细肝切片技术在药物代谢研究中的应用[J]. *生物技术*(YANG Z Q, PENG R. Technology and applications in research of drug metabolism of precision-cut liver slice [J]. *Biotechnology*), 2002, 12(2): 47-8.
- [36] SCHAFFERT C S, DURYEE M J, BENNETT R G, et al. Exposure of precision-cut rat liver slices to ethanol accelerates fibrogenesis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(3): 661-8.
- [37] PRINS G, LUANGMONKONG T, OOSTERHUIS D, et al. A pathophysiological model of non-alcoholic fatty liver disease using precision-cut liver slices [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 507-19.
- [38] RAFIEI H, OMIDIAN K, BANDY B. Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an *in vitro* model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function [J]. *Nutrients*, 2019, doi:10.3390/nu11030541.
- [39] MONTESANO A, SENESI P, VACANTE F, et al. L-Carnitine counteracts *in vitro* fructose-induced hepatic steatosis through targeting oxidative stress markers [J]. *J Endocrinol Invest*, 2020, doi: 10.1007/s40618-019-01134-2.
- [40] SALERNO S, CAMPANA C, MORELLI S, et al. Human hepatocytes and endothelial cells in organotypic membrane systems [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(34): 8848-59.
- [41] NGUYEN T V, UKAIRO O, KHETANI S R, et al. Establishment of a hepatocyte-kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(5): 774-83.
- [42] GIRAUDI P J, BARBERO-BECERRA V J, MARIN V, et al. The

- importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(1): 85-92.
- [43] FEAVER R E, COLE B K, LAWSON M J, et al. Development of an *in vitro* human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Jci Insight*, 2016, doi: 10.1172/jci.insight.90954.
- [44] CHEN Y, MA K. NLR4 inflammasome activation regulated by TNF- α promotes inflammatory responses in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(3): 524-30.
- [45] EBRAHINKHANI M R, NEIMAN J A S, RAREDON M S B, et al. Bioreactor technologies to support liver function *in vitro* [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 69: 132-57.
- [46] KAMEI K I, YOSHIOKA M, TERADA S, et al. Three-dimensional cultured liver-on-a-Chip with mature hepatocyte-like cells derived from human pluripotent stem cells [J]. *Biomed Microdevices*, 2019, 21(3): 731-9.
- [47] 程华, 刘素生, 韩玮. 三维细胞培养的研究进展[J]. *重庆医学* (CHENG H, LIU S S, HAN Y. *Advances in three-dimensional cell culture* [J]. *Chongqing Medicine*), 2019, 48(19): 3363-6.
- [48] GEVAERT E, DOLLE L, BILLIET T, et al. High throughput micro-well generation of hepatocyte micro-aggregates for tissue engineering [J]. *PLoS one*, 2014, 9(8): e105171.
- [49] BHISE N S, MANOHARAN V, MASSA S, et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids [J]. *Biofabrication*, 2016, 8(1): 14101.
- [50] KOSTRZEWSKI T, CORNFORTH T, SNOW S A, et al. Three-dimensional perfused human *in vitro* model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2017(2): 28-39.
- [51] SUMANTA M, ZHEININ L, SANFIZ A, et al. Development and validation of an *in vitro* 3D model of NASH with severe fibrotic phenotype [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3): 1531-40.
- [52] 刘晓, 朱月永, 任杰, 等. 医用脂肪乳诱导的肝脂肪变性细胞模型的建立[J]. *肝脏* (LIU X, ZHU Y Y, REN J, et al. *Establishment of liver steatosis cell model induced by medical fatty milk* [J]. *Chinese Hepatology*), 2010, 15(6): 446-8.
- [53] FUJIMOTO Y, ONODUKA J, HOMMA K J, et al. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(11): 2174-80.
- [54] CHEN K Y, LIN J A, YAO H Y, et al. Arctigenin protects against steatosis in WRL68 hepatocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B and AMP-activated protein kinase pathways [J]. *Nutr Res*, 2018, 52: 87-97.
- [55] GOMEZ-LECHON M J, DONATO M T, MARTINEZ-ROMERO A, et al. A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 165(2): 106-16.
- [56] CHIENWICHAI P, REAMTONG O, BOONYUEN U, et al. Hepatic protein Carbonylation profiles induced by lipid accumulation and oxidative stress for investigating cellular response to non-alcoholic fatty liver disease *in vitro* [J]. *Proteome Sci*, 2019, doi: 10.1186/s12953-019-0149-9.
- [57] 肖晴, 章述军, 阳成, 等. 人参皂苷Rg1对游离脂肪酸诱导非酒精性脂肪肝细胞炎症的改善作用及机制研究[J]. *中国细胞生物学学报* (XIAO Q, ZHANG S J, YANG C, et al. *Effects and mechanisms of ginsenoside Rg1 on free fatty acid mediated inflammation in NASH cell model* [J]. *Chin J Cell Biol*), 2020, 42(1): 102-9.
- [58] ABDELMALEK M F, SUZUKI A, GUY C, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2010, 51(6): 1961-71.
- [59] 贺雯茜, 杨金玉, 徐艳娇, 等. 果糖诱导肝脂肪变性细胞模型建立及评价[J]. *肝脏* (HE W Q, YANG J Y, XU Y J, et al. *Establishment and evaluation of a fructose-induced hepatic steatosis cell model* [J]. *Chinese Hepatology*), 2019, 24(6): 638-42.
- [60] ZHAO L, GUO X X, WANG O, et al. Fructose and glucose combined with free fatty acids induce metabolic disorders in HepG2 cell: a new model to study the impacts of high-fructose/sucrose and high-fat diets *in vitro* [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(4): 909-21.
- [61] DJURIC Z, POTTER D W, TAFFE B G, et al. Comparison of iron-catalyzed DNA and lipid oxidation [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2001, 15(2): 114-9.
- [62] 袁叶飞, 胡祥宇, 欧贤红. 赶黄草对体外诱导的酒精性脂肪肝细胞的影响[J]. *泸州医学院学报* (YUAN Y F, HU X Y, OU X H. *Effect of Chinese Pursh Penthorum on cells of alcoholic fatty liver induced by ethanol in vitro* [J]. *Journal of Luzhou Medical College*), 2013, 36(1): 35-8.
- [63] 班笃敬, 魏炜, 申超, 等. 木香烯内酯抑制乙醇诱导的肝细胞损伤与脂肪变性[J]. *天然产物研究与开发* (BAN D J, WEI W, SHEN C, et al. *Costunolide inhibits ethanol-induced hepatocyte injury and steatosis* [J]. *Natural Product Research and Development*), 2019, 31(4): 608-14.
- [64] 魏颖, 尹曼, 陈亮, 等. 玉米肽和姜黄素对酒精性脂肪肝的作用[J]. *中国食品学报* (WEI Y, YIN M, CHEN L, et al. *The effect of corn peptide and curcumin on alcoholic fatty liver* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*), 2019, 19(3): 121-6.