

水溶性富勒烯C₆₀对肝细胞脂肪变性的改善效果研究

苏强¹ 孙娜¹ 程燕¹ 汪淑琴² 俞梅兰² 张勇^{3*} 陈侃^{1,2*}

¹西北民族大学, 生物医学研究中心生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030;

²浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018;

³中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院, 第一派驻门诊部, 兰州 730050)

摘要 该文研究水溶性富勒烯C₆₀在体外对肝细胞脂肪变性的改善效果。首先利用游离脂肪酸诱导Huh6和WRL68细胞, 建立肝细胞脂肪变的体外模型, 再用水溶性富勒烯C₆₀干预脂肪变细胞, 利用尼罗红染色法检测胞内的脂质蓄积程度, 通过检测细胞内甘油三酯(TG)的含量、细胞活性氧(ROS)水平、超氧化物歧化酶(SOD)活力、还原性谷胱甘肽(GSH)和三磷酸腺苷(ATP)含量变化, 比较C₆₀的作用效果。结果显示, 游离脂肪酸诱导使得细胞蓄积脂滴明显增多, 且TG和ROS水平显著升高, 而C₆₀处理使得细胞脂肪蓄积减少, TG和ROS水平均下降, 尤其是对氧化应激反应较为敏感的Huh6细胞, C₆₀的改善效果更佳。总之, C₆₀能有效改善肝细胞脂肪变性的程度, 并缓解氧化应激所造成的细胞损伤。

关键词 NAFLD; 富勒烯C₆₀; 游离脂肪酸; 肝细胞脂肪变性

The Improvement Effect of Water-Soluble Fullerene C₆₀ on Steatotic Hepatocytes

SU Qiang¹, SUN Na¹, CHENG Yan¹, WANG Shuqin², YU Meilan², ZHANG Yong^{3*}, CHEN Kan^{1,2*}

¹The Key Laboratory of Biotechnology & Bioengineering (KLBB) of the State Ethnic Affairs Commission, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; ²College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

³The 940th Hospital of Joint Logistics Support of Chinese People's Liberation Army Stationed in the First, Outpatient Department, Lanzhou 730050, China)

Abstract This study was to investigate the effect of water-soluble fullerene C₆₀ on steatotic hepatocytes *in vitro*. Huh6 and WRL68 cell lines were induced by free fatty acid to establish steatotic hepatocytes models *in vitro*, and C₆₀ was added to intervene the cells. Nile red staining was used to detect lipid accumulation. TG (triglyceride), ROS (reactive oxygen species), SOD (superoxide dismutase), GSH (glutathione) and ATP (adenosine triphosphate) were measured. The results showed that the accumulation of lipid droplets as well as the levels of TG and ROS were significantly increased in the cells induced by free fatty acids, but decreased in the cells treated with C₆₀. In particular, for Huh6 cells which were sensitive to oxidative stress, C₆₀ had better effect. In conclusion, C₆₀ can effectively reverse the degree of steatosis and protect cell from injury induced by oxidative stress.

收稿日期: 2021-04-02 接受日期: 2021-05-25

国家自然科学基金(批准号: 81972281)、教育部动物医学生物工程创新团队(批准号: IRT_17R88)和西北民族大学引进人才科研项目(批准号: Z20055)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15990015632, E-mail: chenkan_xjtu@163.com; Tel: 13919763678, E-mail: 13919763678@163.com

Received: April 2, 2021 Accepted: May 25, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81972281), Animal Medicine Bioengineering Innovation Team of Ministry of Education (Grant No. IRT_17R88) and Talent Introduction Research Project of Northwest Minzu University (Grant No.Z20055)

*Corresponding authors. Tel: +86-15990015632, E-mail: chenkan_xjtu@163.com; Tel: +86-13919763678, E-mail: 13919763678@163.com

Keywords NAFLD; fullerene C₆₀; free fatty acid; steatotic hepatocytes

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指在没有过量摄入酒精的情况下, 肝脏脂肪含量超过5%的一类代谢性疾病^[1]。NAFLD不仅影响肝脏发挥正常功能, 还与肥胖症、糖尿病、代谢紊乱综合征、肝癌等疾病密切相关, 是医学领域普遍关注的问题, 而目前却没有针对NAFLD的有效治疗药物^[2]。

“二次打击”学说是已明确的NAFLD的风险因素, 即胰岛素抵抗促使肝细胞内脂肪聚集, 后者继而引发线粒体功能障碍和氧化应激等连锁反应, 最后导致肝脏炎症和损伤。其中氧化应激(oxidative stress, OS)是引起肝功能不断恶化进展为肝硬化乃至肝癌的关键原因^[3]。氧化应激是指体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增加, 或机体清除ROS的能力降低, 致使过量的氧自由基(包括超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基)在人体内堆积^[4], 继而对蛋白质、DNA以及细胞膜磷脂等分子造成氧化损伤的病理过程。肝脏是能量代谢的调控中心, 肝细胞内富含大量的线粒体, 是ROS产生的重要场所之一, 因而也是ROS攻击的主要对象, 过量的ROS会损伤肝细胞, 影响肝细胞的脂肪代谢, 最后导致脂肪沉积在肝脏中, 进一步加重NAFLD^[5-7]。因而, 我们认为使用外源性抗氧化剂和自由基清除剂可以有效改善NAFLD的状况。

富勒烯由英国科学家CURL等^[8]在惰性气体氦气环境下用激光轰击固态石墨靶而获得。研究揭示, 富勒烯及其衍生物可以与羟基自由基、超氧自由基等发生反应, 因而具有抗氧化、药物载体、神经及心肌保护等多种功能^[9]。其中水溶性富勒烯因其独特的结构和物理性能而具备超强的自由基清除活性, 因此被称为“吸收自由基的海绵”^[10], 已被应用于生物医学的多项研究中。而亲水性富勒烯衍生物C₆₀是富勒烯家族中丰度最高、最容易制备的一种分子构型。

本研究首先诱导了人正常肝细胞WRL68和肝母细胞瘤Huh6发生脂肪变性, 然后用C₆₀分别处理了细胞, 观察并比较了C₆₀对肝细胞脂肪变性程度的影响, 再从氧化应激反应的角度探索了C₆₀的作用机理, 分别比较了ROS水平、超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)活力和还原型谷胱甘肽(glutathione,

GSH)含量, 并检测了肝细胞线粒体中的ATP含量, 以验证C₆₀对肝细胞线粒体的保护作用, 以期针对NAFLD的新药研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人类正常肝脏细胞WRL68细胞及肝母细胞瘤细胞Huh6细胞均购自上海富衡生物科技有限公司, 羟基化富勒烯C₆₀由浙江理工大学俞梅兰副教授合成并惠赠。RPMI-1640及MEM培养基购自美国HyClone公司; 胎牛血清FBS、青霉素-链霉素、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)购自美国Gibco公司; 棕榈酸(palmitic acid, PA)、油酸(oleic acid, OA)和尼罗红(Nile red)染料购自美国Sigma公司; TG、GSH、SOD测定试剂盒以及ATP含量测试盒均购自南京建成生物公司; ROS检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; BCA蛋白浓度检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8试剂盒及牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自大连美仑生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人正常肝细胞WRL68和肝母细胞瘤细胞Huh6分别用含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的RPMI-1640以及MEM培养基培养, 当细胞密度约为80%时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 CCK-8法检测游离脂肪酸及C₆₀对细胞生长的影响 将PA和OA以摩尔比1:2混合, 随后加入摩尔比为4:1的BSA助溶, 配制成为游离脂肪酸诱导剂PAOA。取处于对数生长期的细胞, 以5 000个/孔密度接种于96孔板中培养过夜, 待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度梯度的PAOA(0、200、400、600、800、1 200 μmol/L)和C₆₀(0、25、50、100、200、300 μmol/L), 每个浓度设6个复孔。细胞经PAOA处理24 h后弃上清, 用PBS清洗2次, 每孔加入含10% CCK-8的完全培养基100 μL继续培养30 min, 随后用酶标仪测450 nm处的吸光度(D)值。按照以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率=(加药组D值-空白对照组D值)/(对照组D值-空白对照组D值)×100%。

1.2.3 PAOA诱导肝细胞脂肪变性及C₆₀干预处理

培养细胞至对数生长期,用胰酶消化制备成单细胞悬液,以 3×10^5 个/mL的细胞浓度接种于6孔板过夜,次日待细胞贴壁后将其分为对照组和诱导组。诱导组加入600 $\mu\text{mol/L}$ 的PAOA作用24 h。随后再弃去含PAOA的培养液,PBS清洗1次,再加入含不同浓度 C_{60} (50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)的新鲜培养液,以PAOA诱导但未经 C_{60} 作用的细胞作为对照。

1.2.4 Nile red染色检测 收集以上处理的WRL68和Huh6细胞,用PBS缓冲液重悬,离心弃上清,避光加入1 mL浓度为0.75 $\mu\text{g/mL}$ 的Nile red染色液,细胞染色5 min后,离心弃去染色液,再用PBS清洗1次后收集细胞,最后用PBS重悬细胞上流式细胞仪(Flow-Sight多维全景, Millipore公司)检测,其中激发光波长为525 nm,发射光波长为585 nm。

1.2.5 检测脂肪变肝细胞内的TG含量 收集处理好的细胞,用PBS重悬,随后离心弃上清,加入2%的Triton X-100(35 μL)置于冰上裂解40 min,其间轻轻吹打几次,96孔板中分别设置空白孔、标准孔和样本孔,每组设3个复孔。然后分别向96孔板中加入2.5 μL 蒸馏水、2.5 μL 标准品(2.26 mmol/L)、2.5 μL 细胞裂解液和250 μL 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育细胞10 min,在510 nm波长下测定吸光度(D)值。剩余的细胞裂解液在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 条件下离心10 min,取上清检测蛋白浓度。最后按以下公式计算TG含量: $\text{TG}(\text{mmol/gprot}) = \text{样本}D\text{值} - \text{空白}D\text{值} / \text{标准}D\text{值} - \text{空白}D \times \text{校准品浓度}(\text{mmol/L}) / \text{待测样本蛋白浓度}(\text{gprot/L})$ 。

1.2.6 流式细胞术检测脂肪变性肝细胞内的ROS水平 收集处理好的细胞,PBS清洗后加入经无血清培养基稀释(1:1 000)的DCFH-DA荧光探针1 mL,于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色30 min,染色结束后离心弃上清,再用无血清培养基清洗2次,最后加入200 μL 的PBS溶液重悬细胞,流式细胞仪分析。

1.2.7 检测脂肪变性肝细胞的SOD活力和GSH含量 采用WST-1法检测细胞内SOD酶活力。将收集好的细胞用PBS清洗2次,1 000 r/min离心5 min,弃上清,按照需求分别依次加入蒸馏水、工作液、稀释液以及底物应用液,严格按照SOD试剂盒说明书操作。充分混匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,酶标仪450 nm处进行检测。GSH采用二硫代二硝基苯甲酸(2,2'-dinitro-5,5'-dithiobenzoic acid, DTNB)微板法检测。将处理好的细胞用PBS清洗2次,1 000 r/min离心5 min收集细胞沉淀,然后加入300 μL 的PBS溶液悬浮细胞,超

声破碎细胞后取100 μL 细胞悬液,加入100 μL 细胞沉淀液(南京建成生物研究所)充分混匀,3 500 r/min离心10 min。取上清液依次加入其他相关试剂(按照说明书操作),充分混匀后静置5 min,酶标仪在405 nm波长下检测各孔吸光度(D)值。

1.2.8 细胞内ATP含量检测 用磷钼酸比色法检测细胞内ATP的含量,收集细胞用PBS清洗2次,1 000 r/min离心5 min后弃上清,每孔中加入200 μL 裂解液裂解细胞。随后4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心5 min取上清,然后按照需求分别加入底物液I、底物液II、促进剂、双蒸水、沉淀剂、显色液和终止液(严格按照说明书操作)。最后室温静置5 min后,酶标仪在636 nm处检测其吸光度(D)值。

1.2.9 统计学处理 用Graphpad prism 6.0软件进行数据处理,计量资料采用均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用完全随机设计的One-Way ANOVA及两个独立样本的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 游离脂肪酸PAOA和 C_{60} 的细胞毒作用检测

为了选择合适浓度的游离脂肪酸来诱导肝细胞脂肪变性及后续研究,我们首先采用CCK-8法检测细胞各种化合物对细胞增殖的影响。分别用不同浓度的PAOA和 C_{60} 处理两种细胞24 h,随后进行CCK-8检测,结果显示当使用浓度为600 $\mu\text{mol/L}$ 以下时,PAOA对Huh6细胞和WRL68均无明显的细胞毒作用(图1A和图1B)。同时,CCK-8结果显示,当用200 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度的 C_{60} 处理细胞时,无明显的毒副作用(图1C和图1D)。

2.2 游离脂肪酸可成功诱导肝细胞脂肪蓄积

基于诱导剂的细胞毒性及最佳作用效果分析,我们选用600 $\mu\text{mol/L}$ 的PAOA诱导肝细胞24 h,以建立肝细胞脂肪变性模型,并利用Nile red荧光染色结合流式细胞术分析肝细胞的蓄脂程度。结果如图2所示,与对照组相比,PAOA诱导使得细胞的荧光强度明显增强,即细胞内有大量脂滴堆积,脂质蓄积明显,这表明,600 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的PAOA能成功诱导WRL68和Huh6细胞脂肪变性。

经PAOA诱导后的肝细胞再用不同浓度(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)的 C_{60} 处理24 h,随后再用Nile red染色分析。结果发现,荧光信号随着 C_{60} 浓度的增大

而显著减弱, 这说明C₆₀能改善脂肪变肝细胞的蓄脂程度, 并具有浓度依赖性。

2.3 C₆₀降低脂肪变性肝细胞内TG的含量

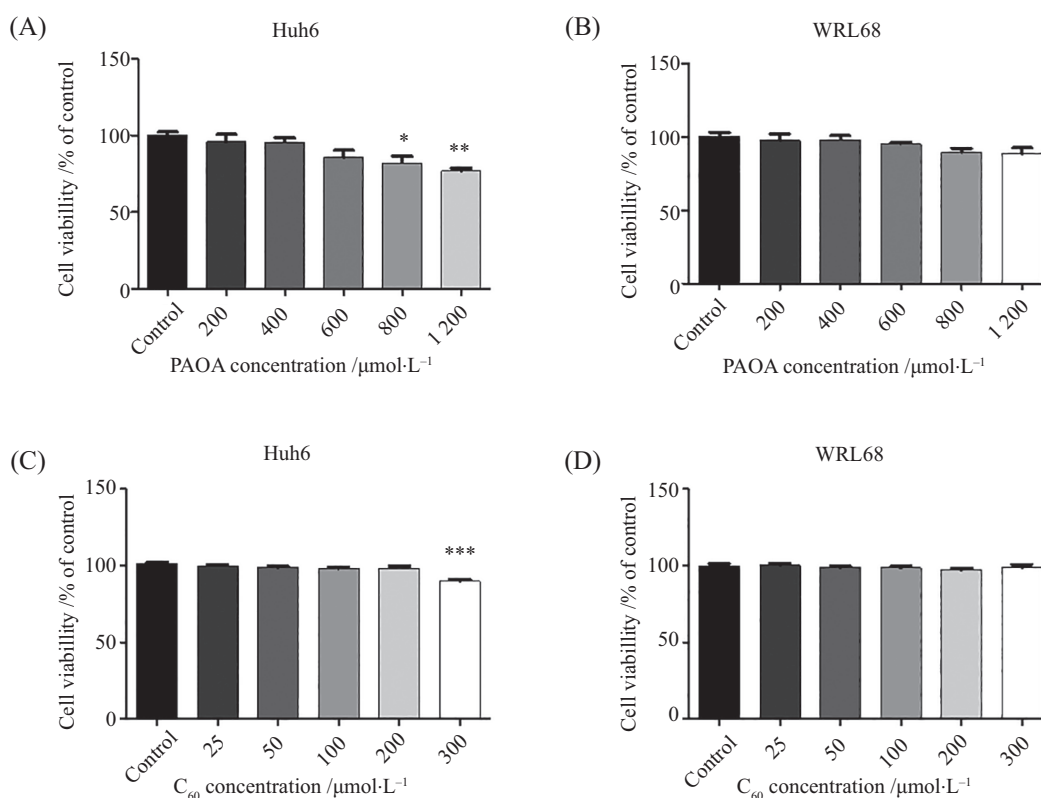
无论是从组织学结构还是从代谢水平分析, NAFLD的典型特征都是TG在肝细胞内的沉积。因此, 我们分别对PAOA诱导及C₆₀处理的WRL68及Huh6细胞进行了TG含量检测。图3显示, C₆₀能显著降低PAOA所诱导的脂肪变性肝细胞中TG的含量。

2.4 C₆₀降低了脂肪变性肝细胞内ROS的水平

为了比较游离脂肪酸诱导以及C₆₀处理细胞的氧化应激反应水平, 我们用流式细胞术检测了细胞内的ROS水平。结果如图4所示, 与对照组细胞相比, PAOA诱导细胞荧光强度明显增强, 说明PAOA诱导促进了细胞内活性氧的产生, 而C₆₀处理能显著降低细胞活性氧水平, 并且在浓度达到200 μmol/L时, C₆₀作用效果最佳。

2.5 C₆₀处理显著升高脂肪变性肝细胞内抗氧化应激酶的水平

基于C₆₀能有效改善脂肪变性肝细胞的脂肪蓄积状况, 且能有效降低脂肪变肝细胞的ROS水平, 我们随后检测了氧化应激相关酶类。结果如图5A和图5B所示, 经游离脂肪酸诱导后, 两种肝细胞内的SOD酶活力和GSH含量都有不同程度的降低, 其中Huh6细胞的SOD酶活力和GSH含量减少尤其明显, 这表明经PAOA诱导后, Huh6细胞发生了氧化应激反应, 而给予C₆₀处理后, 发生脂肪变性的Huh6细胞内SOD酶活力和GSH含量均显著升高, 说明C₆₀可有效降低细胞内的氧化应激反应(图5C)。对于正常人肝细胞WRL68, 虽然PAOA诱导也能降低细胞内的SOD酶活力, 但对GSH含量却无明显影响, 这可能是因为PAOA刺激WRL68细胞脂肪变的过程中, 氧化应激反应所发挥的作用较弱, 因而对于发生脂肪变性的WRL68细胞, 其SOD酶和GSH对C₆₀处理也并

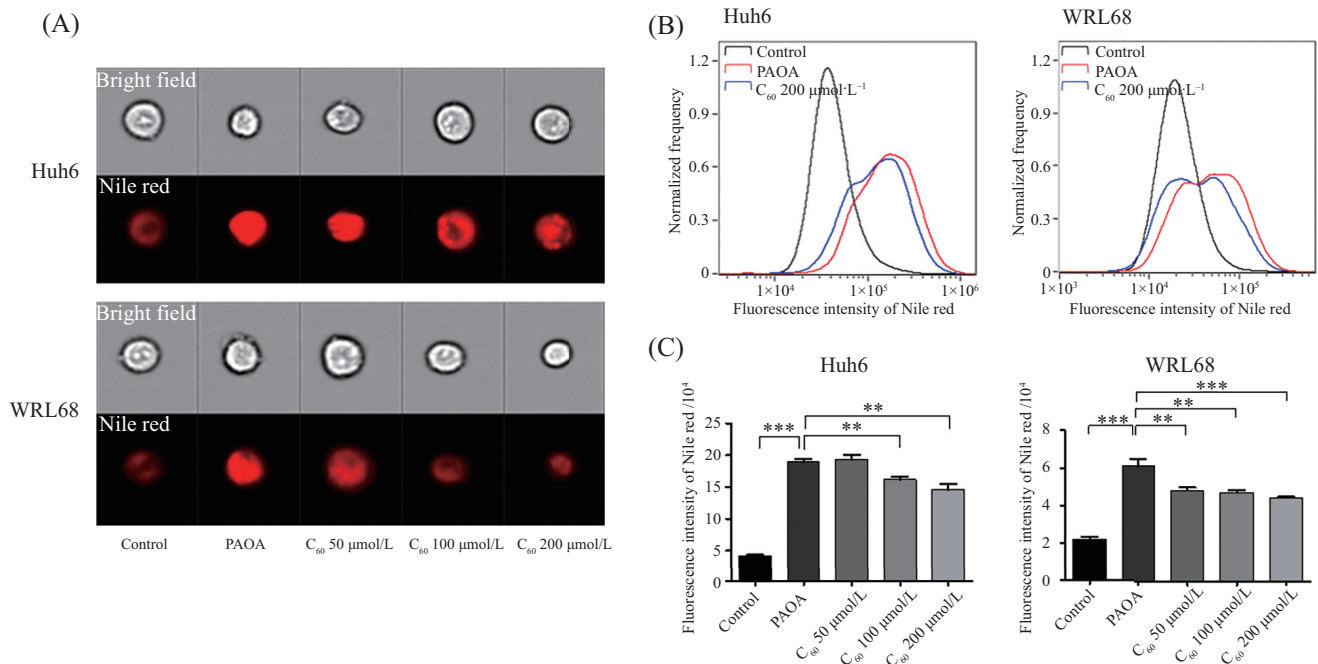


A、B: 不同浓度的PAOA诱导Huh6细胞或WRL68细胞24 h, CCK-8实验检测细胞活力; C、D不同浓度的C₆₀处理Huh6细胞或WRL68细胞24 h, CCK-8实验检测细胞活力。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与对照组比较。

A,B: Huh6 cells or WRL68 cells were treated with different concentrations of PAOA for 24 h, and cell viability was detected by CCK-8 assay; C,D: Huh6 cells or WRL68 cells were treated with different concentrations of C₆₀ for 24 h, and cell viability was detected by CCK-8 assay. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with control group.

图1 游离脂肪酸PAOA及C₆₀对细胞活力的影响

Fig.1 Effects of free fatty acids PAOA and C₆₀ on cell viability

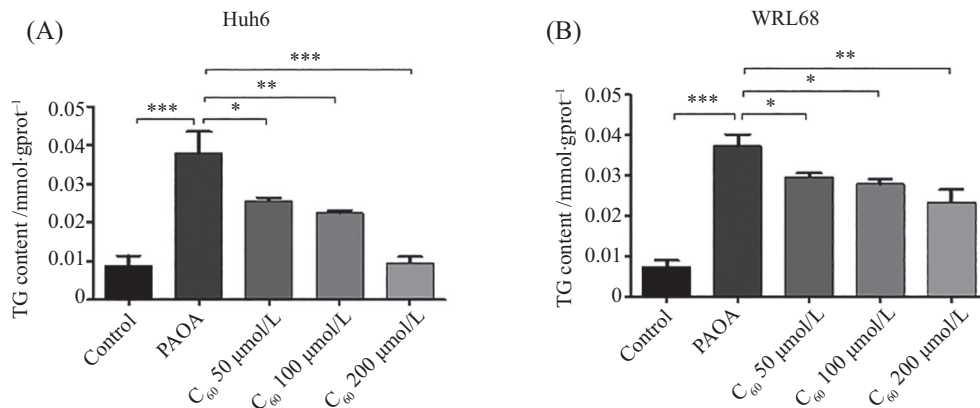


A: 多维全景流式细胞仪拍摄的细胞Nile red荧光成像; B: 多维全景流式仪检测细胞荧光强度的曲线图; C: 流式细胞术检测荧光数值的统计分析。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

A: Nile red fluorescence imaged by multi-dimensional panoramic flow cytometry; B: fluorescence intensity detected by multi-dimensional panoramic flow cytometry; C: statistical analysis of fluorescence detected by flow cytometry. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图2 C₆₀显著改善脂肪变性肝细胞的脂肪蓄积程度

Fig.2 C₆₀ significantly improved the degree of fat accumulation in steatotic hepatocytes



A: Huh6细胞TG含量检测; B: WRL68细胞TG含量检测。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

A: determination of TG content in Huh6 cells; B: determination of TG content in WRL68 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图3 C₆₀降低脂肪变性的肝细胞内TG含量

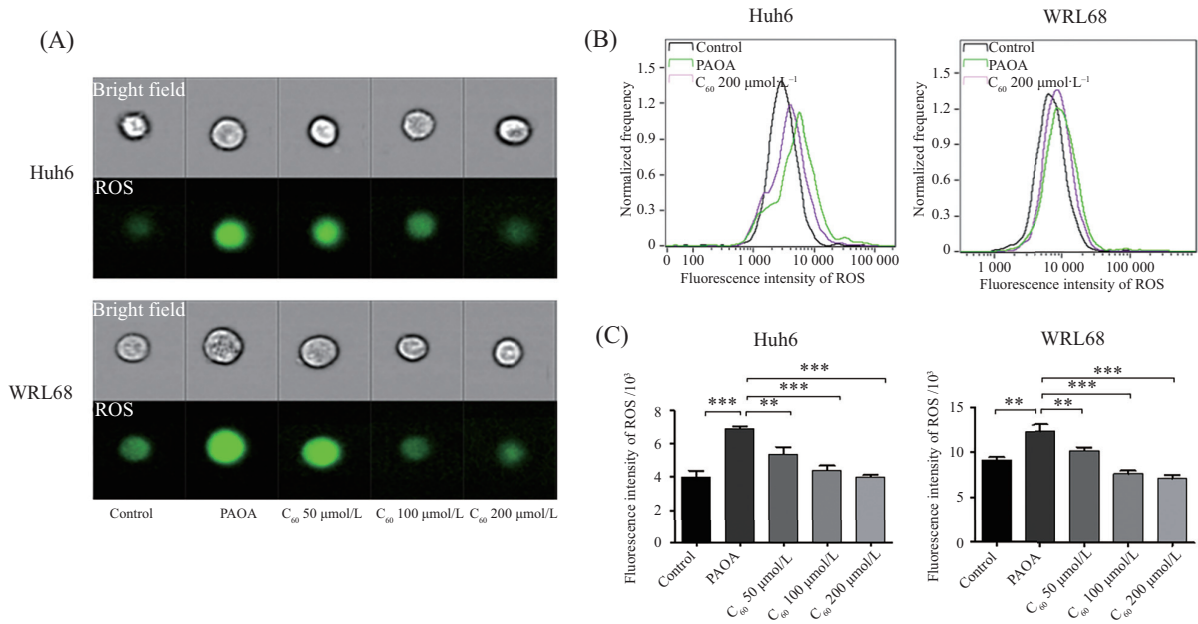
Fig.3 C₆₀ reduced the TG content in steatotic hepatocytes

不敏感(图5D)。

2.6 C₆₀改善脂肪变性肝细胞的能量代谢水平

过度的氧化应激反应可引起线粒体能量代谢障碍,进而导致线粒体损伤及其ATP含量降低,这是NAFLD疾病进展的重要因素^[11-12]。本研究发现,游离脂肪酸PAOA作用使得Huh6细胞内ATP含量降低,而用高浓度(200 μmol/L)的C₆₀干预可使ATP含量显

著回升(图6A)。同时我们也观察到,PAOA诱导并不能显著降低WRL68细胞内ATP的含量,这可能是因为在PAOA诱导过程中,氧化应激反应并不强烈导致,这正好与前述SOD酶活力和GSH含量检测结果相互印证。WRL68细胞对高浓度(≥ 100 μmol/L) C₆₀处理表现为ATP含量显著升高(图6B)。这表明, C₆₀对不同程度的线粒体损伤都具有一定保护作用,能

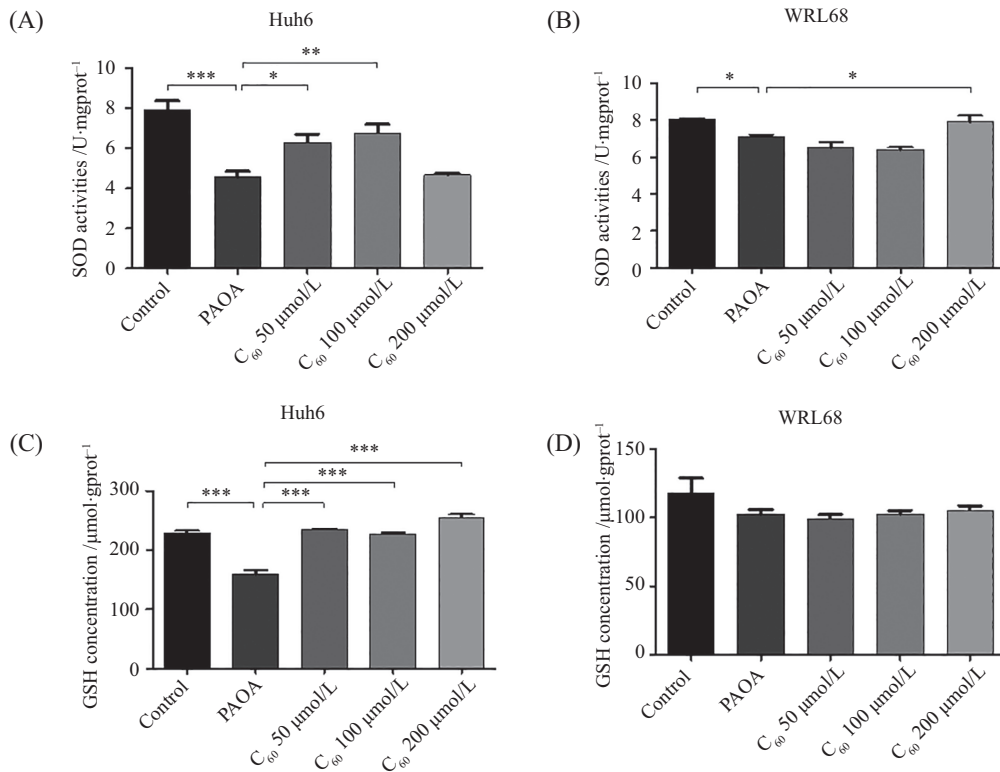


A: 多维全景流式细胞仪拍摄的细胞内ROS荧光成像; B: 多维全景流式细胞仪检测细胞ROS荧光强度的曲线图; C: 流式细胞术检测荧光数值的统计分析。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

A: ROS fluorescence imaged by multi-dimensional panoramic flow cytometry; B: fluorescence intensity of ROS was detected by multi-dimensional panoramic flow cytometry; C: statistical analysis of fluorescence detected by flow cytometry. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图4 C₆₀显著降低脂肪变性肝细胞内的ROS水平

Fig.4 C₆₀ Significantly reduced the level of ROS in steatotic hepatocytes

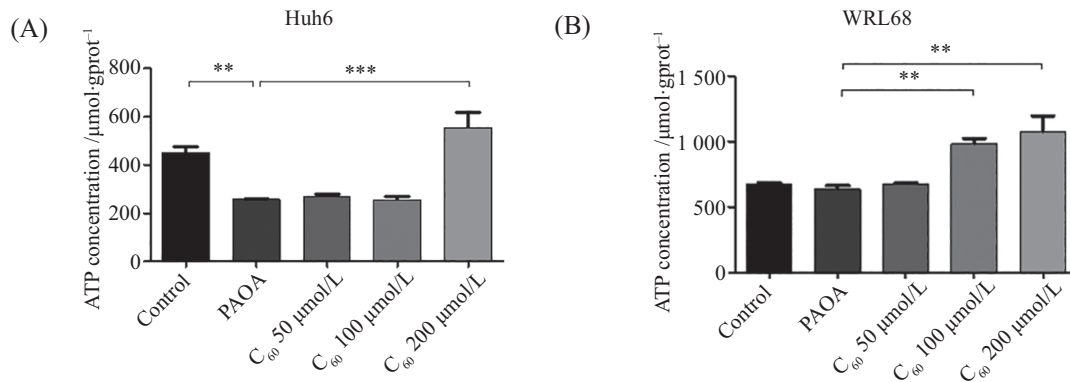


A、B: C₆₀对Huh6细胞和WRL68细胞SOD活力影响的测定; C、D: C₆₀对Huh6细胞和WRL68细胞GSH含量影响的测定。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

A,B: determination of the effect of C₆₀ on SOD activity in Huh6 and WRL68 cells; C,D: determination of the effect of C₆₀ on GSH content in Huh6 and WRL68 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图5 氧化应激反应相关酶类含量的测定

Fig.5 Determination of the enzymes related to oxidative stress



A: C_{60} 对Huh6细胞内ATP含量影响的测定; B: C_{60} 对WRL68细胞内ATP含量影响的测定。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

A: determination of the effect of C_{60} on ATP content in Huh6 cells; B: determination of the effect of C_{60} on ATP content in WRL68 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

图6 C_{60} 增加脂肪变性肝细胞的ATP含量
Fig.6 C_{60} increased ATP content in steatotic hepatocytes

有效改善细胞的能量代谢水平。

3 讨论

NAFLD包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化4个病理过程。据流行病学统计,NAFLD在全球范围的发病率高达25%^[13],该疾病在我国城市人口中的发病率也逐年上升^[14]。NAFLD不仅干扰肝脏的正常功能,还与肥胖、高脂血症、2型糖尿病、胰岛素抵抗、肝癌等密切相关,因而成为近年来多学科共同关注的医学问题。

肝脏是哺乳动物乃至人类能量代谢的调控中心,当肝脏脂质代谢紊乱时,肝细胞中聚集大量的脂肪酸会促进线粒体 β 氧化,继而导致过量的ROS积累,引发线粒体功能障碍和氧化应激等一系列反应,后者影响肝细胞的脂肪代谢,导致肝脏炎症及肝损伤,进一步加重NAFLD的症状^[15],促进其从单纯性脂肪肝向NASH乃至肝纤维化进展。研究表明,纳米材料如 Fe_3O_4 、纳米银、富勒烯^[16-19]等可以有效清除自由基。王雅等^[20]发现,将 Pt^{2+} 、 Pd^{2+} 和 Cu^{2+} 还原获得的三金属纳米合金TNAs(Pt Pd Cu TNAs)在生物保护方面具有潜力。富勒烯及其衍生物可以与羟基自由基、超氧自由基等反应,因此具有抗氧化、神经及心肌保护等多种功能^[21],这表明,富勒烯抵抗氧化应激具有广阔的应用前景。

一般情况下,ROS水平越高,细胞抗氧化能力越弱,细胞受氧自由基损伤越严重。在本实验中,我们利用DCFH-DA荧光探针检测细胞内ROS水

平。结果发现与对照细胞相比,游离脂肪酸诱导细胞的ROS水平显著增高,说明脂肪变性肝细胞内的抗氧化物质被消耗,而水溶性富勒烯 C_{60} 处理能改善游离脂肪酸所诱导的肝细胞脂肪变性,并有效降低PAOA诱导细胞的ROS水平,提高抗氧化酶SOD/GSH的活力/含量,为细胞提供代谢所需的ATP,从而缓解肝细胞脂肪变,起到保护肝脏的作用。在本研究中,肝母瘤细胞Huh6较正常肝细胞WRL68的氧化应激反应更为灵敏,这可能是由代谢旺盛的癌细胞与线粒体活动之间的联系更为密切导致的,所以线粒体对此类细胞内蓄积脂肪的刺激反应更为敏感。也可能是因为癌变细胞内部的某些信号发生改变,进而影响其自身对外来刺激的反应。综上所述,水溶性富勒烯 C_{60} 对体外游离脂肪酸所诱导的肝细胞脂肪变具有一定的改善作用,而这种作用可能与细胞氧化应激有密切的关联。这为NAFLD的新药研发提供了新的参考,尤其是NAFLD型肝癌患者,联合应用水溶性富勒烯 C_{60} 进行治疗,会更有前景。然而由于时间有限,我们未能在动物模型上验证这一结果。

NAFLD的发病机制复杂且病程长,虽然近年来关于NAFLD的研究取得了重大进展,但目前依然没有可行的方法来逆转NAFLD的疾病进程,况且每个患者都可能携带不同的诱发因素,例如饮食、遗传、生活习惯、代谢表型等,因而治疗方法也不尽相同。我们期望未来的NAFLD治疗是针对不同人群(伴有超重、肥胖、糖尿病或其他代谢病),结合代谢组学、蛋白组学、表型组学等系统分析的个性

化治疗。而针对NAFLD的治疗药物也可以采用多样性的联合治疗, 希望在不久的将来, 水溶性富勒烯C₆₀或其衍生物能成为一种有效的NAFLD伴随治疗药物。

参考文献 (References)

- [1] LI M, XU T C, ZHENG W H, et al. Triacylglycerols compositions, soluble and bound phenolics of red sorghums, and their radical scavenging and anti-inflammatory activities [J]. Food Chem, 2021, 340: 128123.
- [2] KISTLER K D, BRUNT E M, CLARK J M, et al. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(3): 460-8.
- [3] BARBIER-TORRES L, FORTNER K A, IRUZUBIETA P, et al. Silencing hepatic MCJ attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by increasing mitochondrial fatty acid oxidation [J]. Nat Commun, 2020, 11: 3360.
- [4] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 373-99.
- [5] QU J, CHEN W X, HU R, et al. The injury and therapy of reactive oxygen species in intracerebral hemorrhage looking at mitochondria [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 2592935.
- [6] HU C X, ZHAO L F, PENG C G, et al. Regulation of the mitochondrial reactive oxygen species: strategies to control mesenchymal stem cell fates *ex vivo* and *in vivo* [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22: 5196-207.
- [7] FARIAS J G, HERRERA E A, CARRASCO-POZO C, et al. Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress [J]. Pharmacol Ther, 2016, 158: 1-23.
- [8] KROTO H W, HEATH J R, O'BRIEN S C, et al. C60-the third Man [J]. Nature, 1985, 318: 162-3.
- [9] 邵磊厚, 刘珊珊, 黄雯雯, 等. 富勒烯在纳米生物医学领域中的应用[J]. 分析仪器(SHAO L H, LIU S S, HUANG W W, et al. Application of fullerene in nanobiomedicine [J]. Analytical Instrumentation), 2020, (3): 1-8.
- [10] TRPKOVIC A, TODOROVIC-MARKOVIC B, TRAJKOVIC V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress [J]. Arch Toxicol, 2012, 86: 1809-27.
- [11] PETTA S, MURATORE C, CRAXI A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future [J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(9): 615-25.
- [12] CARAZO A, LEON J, CASADO J, et al. Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase [J]. Obes Surg, 2011, 21(4): 492-500.
- [13] YOUNOSSI Z, TACKE F, ARRESE M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology, 2019, 69: 2672-82.
- [14] FAN J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, doi: 10.1111/jgh.12036.
- [15] GREBOWSKI J, KAZMIERSKA P, KROKOSZ A. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 751913.
- [16] BARBIER-TORRES L, FORTNER K A, IRUZUBIETA P, et al. Silencing hepatic MCJ attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by increasing mitochondrial fatty acid oxidation [J]. Nat Commun, 2020, 11: 3360.
- [17] GAYA D R, MCLAY A L C, OIEN K A et al. A tale of two sisters [J]. J Clin Pathol, 2004, 57: 439-41.
- [18] 中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十一届年会论文摘要集. 中国食品科学技术学会: 中国食品科学技术学会, 2014: 387-8.
- [19] 魏思敏, 王英辉, 唐志书, 等. 大枣水提液还原制备纳米银材料及抗氧化和抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发(WEI S M, WANG Y H, TANG Z S, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using jujube aqueous extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial effects [J]. Natural Product Research and Development), 2020, 32(2): 182-9,99.
- [20] 王雅, 毛远洋, 何伟伟. PtPdCu三金属纳米酶的制备及在抗氧化行为评价中的应用[C]. 河南省化学会2020年学术年会论文摘要集, 2020: 41.
- [21] ZHOU Y, ZHEN M M, GUAN M R, et al. Amino acid modified fullerene derivatives with high radical scavenging activity as promising bodyguards for chemotherapy protection [J]. Sci Rep, 2018, 8: 16573.