

肥胖主要起因于能量摄入和消耗的失衡,脂质大量聚集在白色脂肪细胞^[1]。长期过量的白色脂肪沉积不仅改变体型,同时增加慢性疾病包括心血管疾病、糖尿病和高血脂等的发生风险。与白色脂肪细胞相反,棕色脂肪细胞主要负责产热代谢,抑制肥胖的发生,但棕色脂肪细胞主要存在于婴儿时期,随年龄增加而减少。有意义的是,白色脂肪组织中存在的米色脂肪细胞^[2],结构和功能与棕色脂肪细胞类似:脂滴较白色脂肪细胞小,且多呈串状或环状;富含线粒体;高表达产热关键因子解偶联蛋白1(uncoupling protein 1, Ucp1)^[3]。增加米色或棕色脂肪细胞的量,将增加机体能量消耗。因此,积极寻找诱导白色脂肪细胞转变成米色脂肪细胞(棕色化或者褐变)的方法,将成为防治肥胖的新手段。

当机体受到寒冷、运动等刺激时,交感神经末梢释放去甲肾上腺素,作用于脂肪细胞表面的β3肾上腺素能受体(β3 adrenergic receptor, β3-AR),促进脂肪产热的关键调控因子 Ucp1 等的转录表达^[4]。PPARγ 共激活因子-1α (PPARγ coactivator-1α, PGC1α)是β3-AR下游关键的脂肪细胞核内转录因子,参与脂肪细胞线粒体生物合成以及白色脂肪棕色化的过程^[5]。姜黄素(curcumin, C₂₁H₂₀O₆,图1)是一种姜科植物姜黄中提取出的具有生物活性的黄酮类多酚物质,相对分子量368.37,日常用作食用香料及天然的可食用色素,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用^[6]。大量研究表明,姜黄素具有减轻体重、改善胰岛素抵抗和血脂异常等作用^[7-8]。本研究拟通过体外研究,探讨姜黄素促进白色脂肪细胞棕色化的作用及潜在机制。

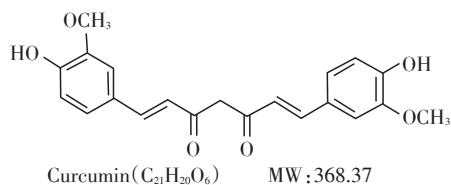


图1 姜黄素的化学结构

Figure 1 Chemical structure of curcumin

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6J 雄性小鼠购于南京大学模式动物中心。本研究经南京医科大学实验动物伦理委员会批准。DMEM/F-12 细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、PBS 缓冲液、青-链霉素、胰酶(Gibco 公司,美国);Ⅱ型胶原酶、牛血清白蛋白(bovine serum

albumin, BSA)、地塞米松(dexamethasone, DEX)、胰岛素、罗格列酮(Rosi)、姜黄素、油红O染料、3-异丁基-1-甲基次黄嘌呤(3 isobutyl-1-methyl xanthine, IBMX)、β3-AR 拮抗剂 SR59230A (Sigma 公司,美国); Mito SOX™ Red、Mito Tracker Green (Invitrogen 公司,美国);三磷酸腺苷(aenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(杭州碧云天公司);TRIzol、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本);SYBR green PCR 混合液(南京诺唯赞公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠皮下前脂肪细胞分离和培养

取 SPF 级 3~4 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,颈椎脱臼法处死后于 75%酒精浸泡约 10 min,在生物安全柜内小心取出小鼠腹股沟皮下白色脂肪组织置于预冷的 PBS 缓冲液中。用眼科剪将取下的脂肪组织尽量剪碎成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的脂肪块,将剪碎的组织转移到无菌 15 mL 离心管中,加入配好的组织消化液(DMEM/F-12+Ⅱ型胶原酶 1.5 g/L+BSA 20 g/L),约为组织总体积的 3~5 倍,然后置于 150 r/min、37 ℃摇床中消化 1 h。待脂肪组织消化完全后,将消化液经 200 目筛网过滤后转移至新的 15 mL 离心管中,2 000 r/min 离心 10 min;去除上清,用 PBS 洗涤沉淀 2 次,2 000 r/min 离心 10 min。去除上清后,用前脂肪细胞完全培养基(DMEM/F-12+10%FBS+1%青-链霉素)重悬沉淀并转移至培养瓶中,摇晃均匀后置 37 ℃、5% CO₂细胞培养箱培养。过夜后使用 PBS 冲洗未贴壁细胞,并更换前脂肪细胞完全培养基,隔天换液,密切观察细胞形态,待细胞长至 80%~90%后冻存细胞,待用。

1.2.2 小鼠皮下前脂肪细胞的诱导分化

分离的小鼠皮下前脂肪细胞均匀接种于 12 孔板中,待 2~3 d 细胞接触抑制后,更换完全培养基为分化诱导液(完全培养基中再加入 0.5 mmol/L IBMX、1 μmol/L DEX、5 μg/mL 胰岛素、1 μmol/L Rosi),培养 4 d,隔天换液。细胞分化第 4 天,用 PBS 清洗细胞 1 次,更换为分化维持液(完全培养基+5 μg/mL 胰岛素)继续培养。至细胞分化第 6~7 天,80%~90%的细胞体积增大,胞内含有大量脂滴,即为成熟白色脂肪细胞。弃去培养基,用 PBS 清洗 1 次,分别加入含不同浓度姜黄素(0、10、20、40 μmol/L)的分化维持液继续培养 48 h,以确定姜黄素的最佳干预剂量。进一步,使用含最佳干预浓度的姜黄素和/或 SR59230A (0.5 μmol/L)的分化维持液干预成熟白色脂肪细胞 48 h(图 2)。

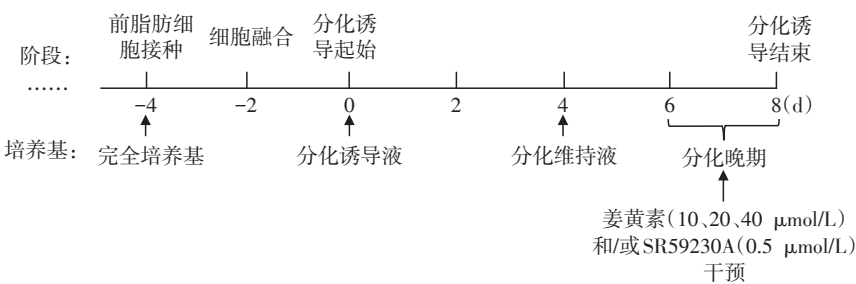


图2 小鼠皮下原代脂肪细胞诱导分化及干预方案
Figure 2 Induction and differentiation of mouse primary preadipocytes and intervention methods

1.2.3 油红O染色

油红O工作液配制:油红O粉剂溶于异丙醇配成0.5%油红O贮备液,以3:2(体积比)的比例将贮备液与双蒸水混匀后过滤2次,至液体澄清为止。吸尽细胞上清,用PBS洗涤2次,4%多聚甲醛室温固定30 min,每孔加500 μL油红O工作液,于37℃染色30 min,洗净背景,在显微镜下观察细胞形态及脂滴形成。

1.2.4 线粒体数量测定

Mito Tracker Green是线粒体特异性染料,能特异地积聚在线粒体中。因此,利用此染料检测细胞内线粒体数量。姜黄素干预细胞后,吸尽细胞上清,PBS洗涤2遍,用含有50 nmol/L Mito Tracker Green的DMEM/F-12在37℃避光孵育30 min,PBS洗涤细胞2遍。使用荧光显微镜观察490 nm处的绿色荧光强度。使用Image J图像分析软件进行Mito Tracker Green荧光强度定量分析。

1.2.5 线粒体ROS定性分析

Mito SOX Red线粒体超氧化物检测试剂盒是一种特异性靶向活细胞线粒体ROS的荧光染料。姜黄素处理终止后,吸尽培养基,PBS洗涤2遍,用含有5 μmol/L Mito SOX Red的DMEM/F-12,37℃避光孵育10 min。用PBS洗涤细胞2遍。使用荧光显微镜观察510 nm处的红色荧光强度。

1.2.6 线粒体ROS定量分析

干预终止后,胰酶消化收集细胞,使用DMEM/F-12轻柔洗涤细胞3遍,用含有5 μmol/L Mito SOX Red的

DMEM/F-12重悬细胞,37℃避光孵育10 min,每隔3 min混匀1次,使细胞和探针充分作用。流式细胞仪检测,使用PE-A通道测定平均荧光强度,激发波长为510 nm,发射波长为580 nm。

1.2.7 细胞内ATP含量测定

吸尽培养基,用PBS洗涤细胞2次,加入裂解液充分裂解细胞。离心后,取部分上清液,根据试剂盒说明书,使用化学发光仪检测细胞内ATP含量。剩余部分上清液用BCA法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。最后以每克蛋白浓度校正ATP含量。

1.2.8 检测棕色化标志性基因的mRNA表达水平

细胞干预终止后每孔加入TRIzol 0.5 mL,提取细胞总RNA,进一步逆转录成cDNA,建立PCR反应体系,上机扩增,相关引物序列见表1。

1.3 统计学方法

应用SPSS22.0进行统计学分析,结果以均数±标准误($\bar{x} \pm S_x$)表示,采用单因素方差分析比较组间差异,两两比较采用LSD-*t*检验。使用Graph Pad Prism 6.0软件进行制图。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素作用后白色脂肪细胞脂滴形态的变化

分化第6天,视野中90%以上的小鼠皮下原代脂肪细胞分化为含有单个大脂滴的成熟白色脂肪细胞。此时,在维持分化液中加入10、20、40 μmol/L姜黄素孵化48 h后,细胞中大脂滴数量较对照组明

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 Primers of RT-PCR

产物名称	正义链(3'→5')	反义链(5'→3')
GAPDH	GTCTTCACTACCATGGAAGG	TCATGGATGACCTTGCCAG
β3-AR	TCTCTGGCTTTGTGCTCGGA	GTTGGTTATGCTCTGTAGTCTCG
Ucp1	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
PGC1α	AGACGGATTGCCCTCATTGA	GGTCTTAACAATGGCAGGGTTT

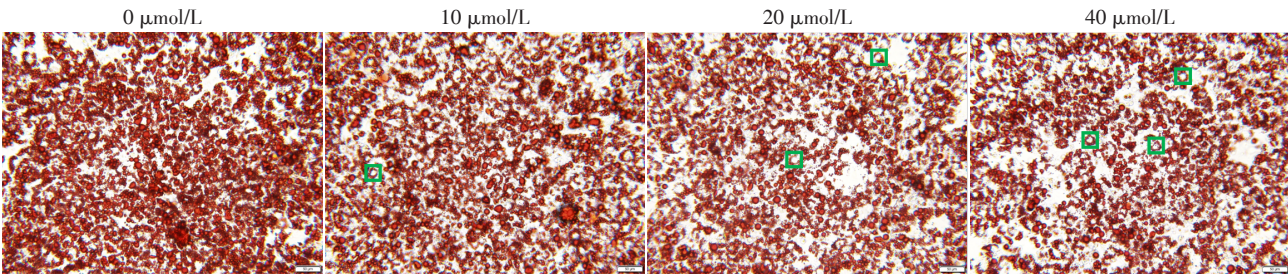
显减少,脂滴多呈小串珠样、花环样(图3)。

2.2 姜黄素作用对白色脂肪细胞线粒体数量的影响

姜黄素 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 干预白色脂肪细胞 48 h 后,荧光显微镜观察,发现细胞内代表线粒体数量的绿色荧光强度较对照组增强(图 4A)。使用 Image J 图像分析软件进行荧光强度定量分析,结果显示 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素干预后,细胞内绿色荧光强度显著增强(图 4B)。

2.3 姜黄素干预对白色脂肪细胞线粒体功能的影响
进一步检测线粒体氧化损伤产物 ROS 水平和

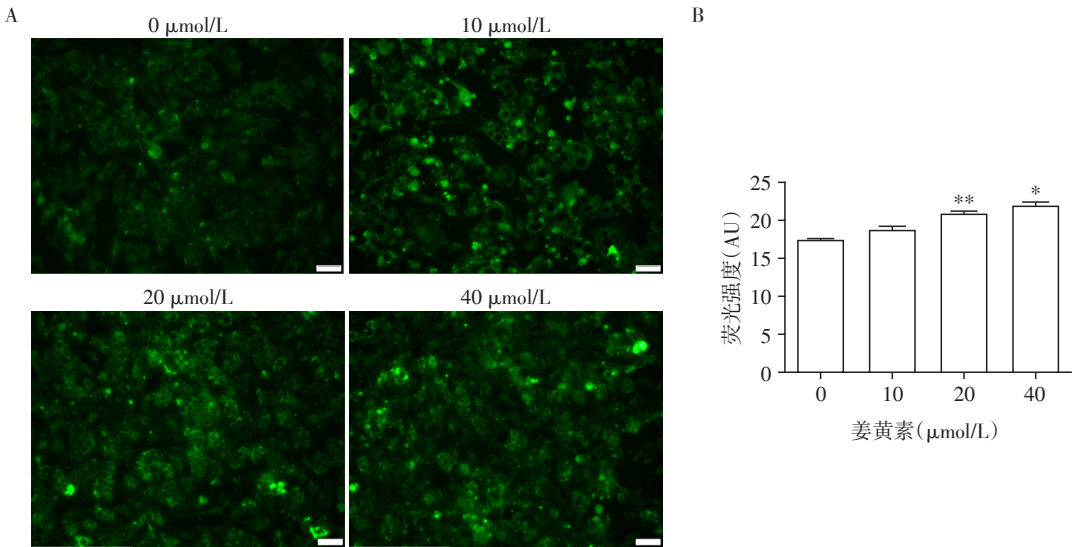
细胞内 ATP 含量,明确姜黄素对白色脂肪细胞线粒体功能的作用。结果显示,与对照组相比,姜黄素 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 干预组红色荧光明显减弱,当姜黄素浓度增加到 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,红色荧光增强(图 5A)。流式细胞术定量分析 Mito SOX Red 染色结果显示:低浓度(10、20 $\mu\text{mol/L}$)姜黄素干预后,脂肪细胞线粒体 ROS 水平较对照组降低,而高浓度(40 $\mu\text{mol/L}$)姜黄素则提高线粒体 ROS 水平(图 5B、C)。此外,10、20 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素能够增加脂肪细胞内 ATP 含量(图 5D)。



绿色方框所示为典型花环状脂滴(油红 O 染色,×200)。

图3 不同浓度姜黄素干预下小鼠白色脂肪细胞形态变化

Figure 3 Morphological changes of mouse white adipocytes treated with curcumin of different concentrations



绿色荧光代表细胞内线粒体着色(×200),与对照组相比,* $P < 0.001$,** $P < 0.0001$, $n = 4$ 。

图4 不同浓度姜黄素干预后细胞线粒体数量

Figure 4 Mitochondrial numbers of cells treated with curcumin of different concentrations

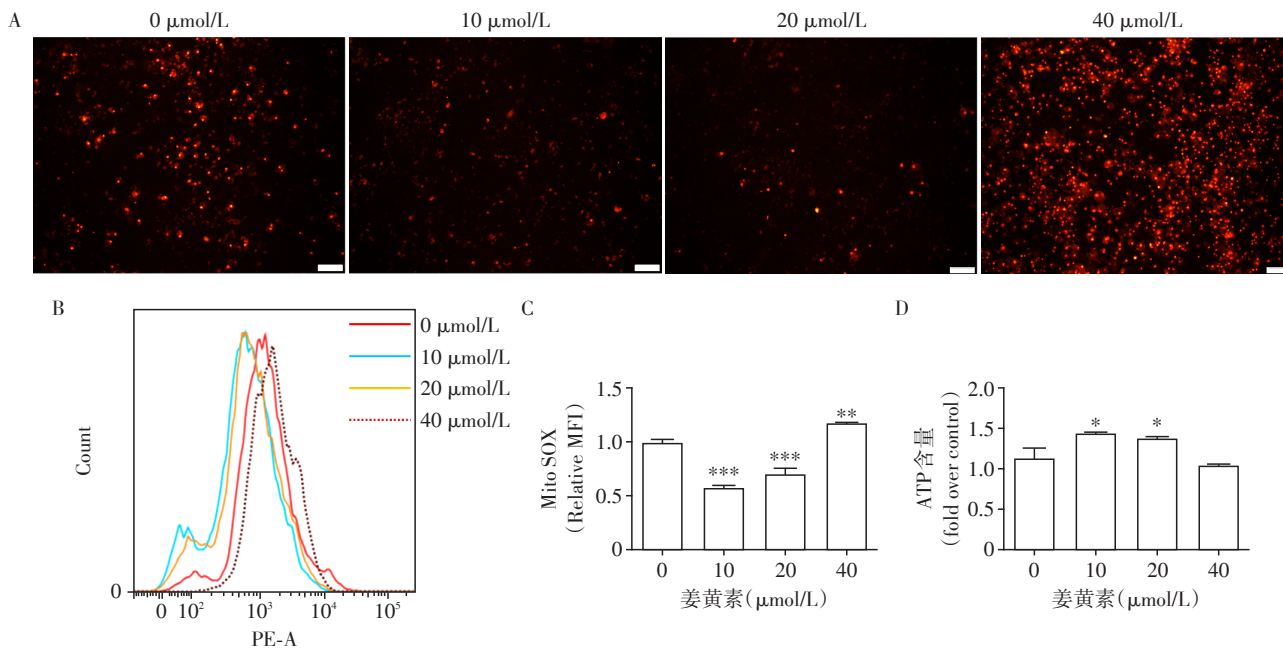
2.4 姜黄素干预对白色脂肪细胞棕色化标志性基因 mRNA 表达的影响

白色脂肪细胞分化晚期加入 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素干预 48 h 后,随姜黄素浓度上升,脂肪细胞 $\beta 3\text{-AR}$ 、 $\text{PGC}1\alpha$ mRNA 表达水平明显增加,但姜黄素达到 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,脂肪细胞 $\beta 3\text{-AR}$ 、 $\text{PGC}1\alpha$

mRNA 表达与正常对照组无明显差异(图 6A、B)。同样,姜黄素能够上调脂肪细胞 Ucp1 mRNA 表达水平,其中,20 $\mu\text{mol/L}$ 效果最显著(图 6C)。

2.5 $\beta 3\text{-AR}$ 阻断对姜黄素调控白色脂肪棕色化标志性基因的影响

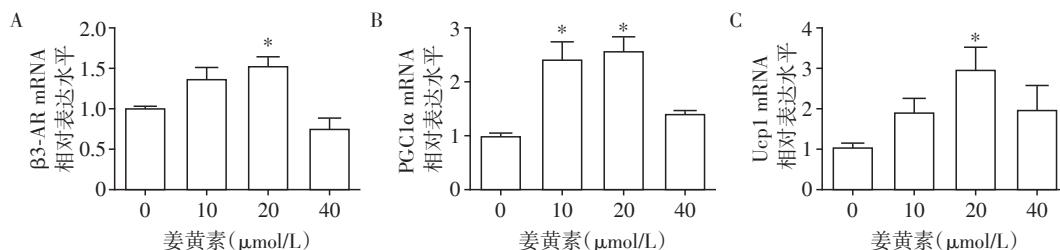
为明确 $\beta 3\text{-AR}$ 在姜黄素调控 Ucp1 表达中的作



A~C:线粒体ROS水平;A:荧光显微镜观察,红色荧光代表线粒体ROS着色($\times 200$)。B:流式细胞术检测 Mito SOX Red 染色结果;C:定量分析流式细胞术检测结果;D:细胞内ATP含量。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$, $n = 4$ 。

图5 不同浓度姜黄素干预对脂肪细胞线粒体功能的影响

Figure 5 Effect of curcumin with different concentrations on mitochondrial function



A:各组 $\beta 3$ -AR mRNA的表达水平;B:各组PGC1 α mRNA的表达水平;C:各组Ucp1 mRNA的表达水平。与对照组比较,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图6 姜黄素对白色脂肪细胞 $\beta 3$ -AR、PGC1 α 、Ucp1 mRNA 表达水平的影响

Figure 6 The mRNA expression of $\beta 3$ -AR, PGC1 α and Ucp1 after curcumin treatment in white adipocytes

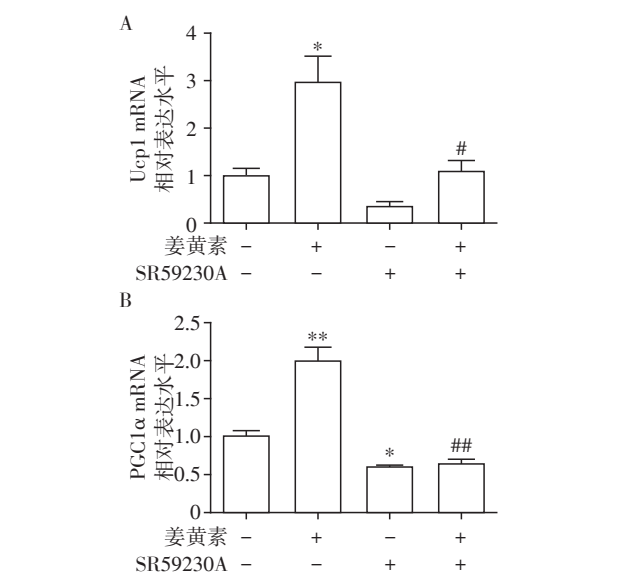
用,用姜黄素(20 $\mu\text{mol/L}$)单独或联合 $\beta 3$ -AR抑制剂(SR59230A)(0.5 $\mu\text{mol/L}$)作用于分化晚期的白色脂肪细胞48 h。结果显示:与对照组相比较,姜黄素显著增加Ucp1和PGC1 α mRNA表达水平,而SR59230A则抑制Ucp1和PGC1 α mRNA表达水平(图7A,B),SR59230A与姜黄素联合培养可显著抑制姜黄素对Ucp1和PGC1 α mRNA水平的上调作用(图7A,B)。

3 讨论

肥胖已经成为一个日益严重的全球健康问题,根本原因是机体能量摄入大于消耗。因此,诱导白色脂肪细胞棕色化,作为一种增加能量消耗的策略,将有助于对抗肥胖和相关代谢性疾病^[9]。研究表明多种激素、细胞因子、饮食组分和药物可作为

褐变剂,增加Ucp1的活性,从而增加产热,促进白色脂肪棕色化,最终达到减轻体重的目的^[10]。姜黄素是一种从姜黄中提取的膳食多酚,由于其广泛的药理活性而成为人们研究的热点^[11]。本研究通过分化成熟的小鼠原代白色脂肪细胞,进行不同浓度(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)的姜黄素干预^[12]。结果显示,姜黄素能够显著减小脂肪细胞体积,促进脂肪细胞线粒体生物合成并改善其功能,上调棕色化相关标志基因的表达水平,表明姜黄素具有促进白色脂肪细胞棕色化的作用。这种促棕色化的作用,可被 $\beta 3$ -AR抑制剂所拮抗, $\beta 3$ -AR通路可能是姜黄素诱导白色脂肪细胞棕色化的重要途径。

姜黄素促进白色脂肪细胞棕色化作用存在一定的剂量效应,当浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最显著,而当浓度高达40 $\mu\text{mol/L}$ 时,会增加细胞的氧化应激



A: 各组 Ucp1 mRNA 表达水平; B: 各组 PGC1α mRNA 表达水平。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与单独姜黄素干预组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$, $n = 3$ 。

图7 姜黄素单独或联合SR59230A干预对白色脂肪细胞Ucp1和PGC1α mRNA表达水平的影响

Figure 7 Effects of curcumin with or without SR59230A on the mRNA transcription levels of Ucp1 and PGC1α in white adipocytes

水平,因此高浓度的姜黄素可能对细胞有损伤。临床研究显示姜黄素可改善存在心血管系统疾病风险患者的血脂水平^[13-14],但在1项姜黄素脂质体静脉注射安全性的临床研究中发现,过高浓度的姜黄素会短暂地改变健康受试者红细胞的形态^[15]。目前,姜黄素的安全剂量仍不确定,因此在临床中使用姜黄素还为时过早,需要大量动物实验以及大规模的临床实验以确定姜黄素的安全性和耐受剂量,从而支持姜黄素的临床应用。

白色脂肪棕色化的明显表现是脂滴形态的改变,白色脂肪细胞通常拥有单个大脂滴,而棕色脂肪细胞多为多腔、串珠样小脂滴^[16]。已有研究表明,姜黄素是一种抗脂肪生成的膳食生物活性成分,能够在脂肪细胞分化早期阶段抑制脂肪细胞分化^[12]。本研究发现,在白色脂肪细胞分化晚期(成熟阶段),姜黄素亦能够显著改变脂滴形态,呈棕色样脂滴。

线粒体是重要的细胞器,以ATP的形式为细胞代谢提供能量,被认为是细胞的“动力工厂”。研究表明线粒体数量是区别白色和棕色脂肪细胞的关键,白色脂肪细胞缺乏线粒体,而棕色脂肪细胞富含线粒体。因此,线粒体数量的增加是白色脂肪细胞棕色化的一个特征^[16]。本研究通过对细胞内线粒体进行染色,发现姜黄素能够明显增加脂肪细胞

内线粒体的数量。同时,姜黄素能够上调线粒体生物合成相关调节因子PGC1α的mRNA表达水平。以上均提示姜黄素具有诱导白色脂肪细胞棕色化的作用。另一方面,肥胖导致脂肪组织线粒体功能紊乱,不仅影响ATP的有效产生,同时将更多的能量转化为过氧化物或ROS,进而造成线粒体氧化应激。而线粒体氧化应激又可以直接损害线粒体DNA及线粒体功能,从而导致氧化应激和线粒体功能损害的恶性循环^[17-19]。在阿尔兹海默病的研究中发现,姜黄素能够抑制β-淀粉样蛋白诱导的神经元ROS生成,从而保护神经细胞线粒体功能^[20]。与之一致,本研究发现低浓度姜黄素(10、20 μmol/L)能够明显减少线粒体ROS水平,并提高细胞内ATP含量,高浓度姜黄素(40 μmol/L)则增加线粒体ROS水平。提示低剂量姜黄素能够改善脂肪细胞线粒体功能,但过高浓度的姜黄素可能损害脂肪细胞线粒体功能。

米色脂肪细胞产热激活主要依赖于脂肪组织和肾上腺髓质交感神经末梢释放的去甲肾上腺素^[21]。去甲肾上腺素通过β-肾上腺素能受体(主要为β3型)和cAMP依赖的通路,刺激PGC1α和Ucp1的表达,进而介导米色脂肪发生自适应生热效应^[22]。多种因素能够激活白色脂肪组织中的β-肾上腺素能信号通路,进而诱导棕色化过程^[10],如冷暴露、β-肾上腺素能药物^[23]。近年来,有研究发现姜黄素能够增加高脂喂养小鼠血清去甲肾上腺素水平和皮下白色脂肪组织β3-AR的表达^[7]。本研究亦发现姜黄素能够增加脂肪细胞β3-AR、PGC1α和Ucp1的mRNA表达水平。为了进一步验证β3-AR在姜黄素诱导白色脂肪细胞棕色化过程中的作用,本研究采用β3-AR抑制剂SR59230A联合姜黄素刺激脂肪细胞。结果发现β3-AR阻断后,姜黄素诱导的Ucp1和PGC1α mRNA的上调明显抑制。提示姜黄素可通过β3-AR依赖的信号通路诱导白色脂肪细胞棕色化。

姜黄素对于体重、脂质代谢、β细胞功能的有益作用,引起了人们对姜黄素作为肥胖和糖尿病等疾病潜在治疗手段的浓厚兴趣。本研究观察到姜黄素能够改变白色脂肪细胞脂滴形态;增加脂肪细胞线粒体生物合成并改善线粒体功能;提高脂肪细胞棕色化标志性基因的表达,并初步验证了姜黄素是通过β3-AR途径发挥促棕色化作用。这些发现证实了姜黄素在诱导白色脂肪棕色化中的重要作用,但仍需要进一步的动物和临床研究为姜黄素应用于肥胖患者的治疗提供更有力的依据。

[参考文献]

- [1] HILL J O, WYATT H R, PETERS J C. Energy balance and obesity[J]. *Circulation*, 2012, 126(1): 126-132
- [2] 刘碧莲, 刘 峰. 白色脂肪米色化及其在代谢平衡中的调控作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(1): 8-11, 25
- [3] CHONDRONIKOLA M, SIDOSSIS L S. Brown and beige fat: from molecules to physiology [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(1): 91-103
- [4] 吴绮楠, 陈 兵. 产热脂肪与体育锻炼[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(1): 12-18
- [5] SEALE P. Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2010, 34(Suppl 1): S17-S22
- [6] SHEHZAD A, QURESHI M, ANWAR M N, et al. Multifunctional curcumin mediate multitherapeutic effects [J]. *J Food Sci*, 2017, 82(9): 2006-2015
- [7] WANG S, WANG X, YE Z, et al. Curcumin promotes browning of white adipose tissue in a norepinephrine-dependent way [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(2): 247-253
- [8] MOHAMMADI A, SAHEBKAR A, IRANSHAHI M, et al. Effects of supplementation with curcuminoids on dyslipidemia in obese patients: a randomized crossover trial [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(3): 374-379
- [9] THYAGARAJAN B, FOSTER M T. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans [J/OL]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2017, 31(2). DOI: 10/515/hmbci-2017-0016
- [10] MONTANARI T, POŠČIĆ N, COLITTI M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review [J]. *Obes Rev*, 2017, 18(5): 495-513
- [11] GUPTA S C, PATCHVA S, KOH W, et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 283-299
- [12] KIM C Y, LE T T, CHEN C, et al. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(10): 910-920
- [13] PANAHI Y, KIANPOUR P, MOHTASHAMI R, et al. Efficacy and safety of phytosomal curcumin in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial [J]. *Drug Res*, 2017, 67(4): 244-251
- [14] QIN S, HUANG L, GONG J, et al. Efficacy and safety of turmeric and curcumin in lowering blood lipid levels in patients with cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Nutr J*, 2017, 16(1): 68
- [15] STORKA A, VCELAR B, KLIČKOVIC U, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of liposomal curcumin in healthy humans [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2015, 53(1): 54-65
- [16] SEPA-KISHI D M, CEDDIA R B. White and beige adipocytes: are they metabolically distinct? [J/OL]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2018, 33(2). DOI: 10.1515/hmbci-2018-0003
- [17] YIN X, LANZA I R, SWAIN J M, et al. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(2): E209-E216
- [18] HEIDARI R, GHANBARINEJAD V, MOHAMMADI H, et al. Mitochondria protection as a mechanism underlying the hepatoprotective effects of glycine in cholestatic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1086-1095
- [19] KEUPER M. On the role of macrophages in the control of adipocyte energy metabolism [J]. *Endocr Connect*, 2019, 8(6): R105-R121
- [20] SUN Q, JIA N, WANG W, et al. Activation of SIRT1 by curcumin blocks the neurotoxicity of amyloid- β 25-35 in rat cortical neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(1): 89-94
- [21] BARTELT A, HEEREN J. Adipose tissue browning and metabolic health [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(1): 24-36
- [22] NEDERGAARD J, CANNON B. The browning of white adipose tissue: some burning issues [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(3): 396-407
- [23] CAO Q, JING J, CUI X, et al. Sympathetic nerve innervation is required for beiging in white fat [J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(6): e14031

[收稿日期] 2019-08-22

· 基础研究 ·

轻度增高的游离脂肪酸与脂多糖协同抑制中性神经酰胺酶诱导INS-1细胞凋亡及胰岛素分泌异常的机制

王 铮¹,张少坤¹,温洪华¹,韦 晓²,刘 超³,缪 珩¹,祝 群^{1*}

¹南京医科大学第二附属医院内分泌科,江苏 南京 210011;²江苏省中西医结合医院内分泌代谢病研究中心,³内分泌科,江苏 南京 210028

[摘 要] 目的:探讨轻度增高的游离脂肪酸与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)协同对大鼠胰岛β细胞株INS-1凋亡及胰岛素分泌的影响及机制。方法:采用0.125 mmol/L棕榈酸和不同浓度的LPS(1、10、50 ng/mL)单独、联合作用INS-1细胞24 h,流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blot检测Cleaved caspase-3表达;棕榈酸和LPS(50 ng/mL)单独或联合刺激INS-1细胞24 h后,HPLC法检测中性神经酰胺酶(neutral ceramidase, NCDase)活性,ELISA法检测胰岛素分泌功能;并观察转染pEGFP-C3-NCDase重组质粒后,棕榈酸和LPS刺激的INS-1细胞凋亡率及胰岛素分泌功能的改变。结果:与对照组相比,棕榈酸或LPS(50 ng/mL)单独处理,对INS-1细胞凋亡及胰岛素分泌无明显影响,但两者联合可明显增加凋亡率及Cleaved caspase-3表达($P < 0.05$)。棕榈酸联合LPS作用24 h后明显抑制基础胰岛素分泌($P < 0.01$),对细胞内胰岛素含量及葡萄糖刺激的胰岛素分泌无影响。此外,棕榈酸或LPS单独刺激不影响INS-1细胞NCDase,两者联合则显著抑制其活性($P < 0.01$);而高表达NCDase能明显缓解棕榈酸联合LPS诱导的凋亡和基础胰岛素分泌减少($P < 0.05$)。结论:轻度增高的游离脂肪酸联合LPS可通过抑制鞘脂信号分子代谢的关键酶——NCDase活性,促进胰岛β细胞凋亡并抑制基础胰岛素分泌。

[关键词] 游离脂肪酸;脂多糖;中性神经酰胺酶;β细胞

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)06-803-07

doi:10.7655/NYDXBNS20200606

Study on the mechanism of mild elevation of free fatty acid and lipopolysaccharide synergistically inhibiting neutral ceramidase to induce apoptosis and abnormal insulin secretion in INS-1 cells

WANG Zheng¹,ZHANG Shaokun¹,WEN Honghua¹,WEI Xiao²,LIU Chao³,MIAO Heng¹,ZHU Qun^{1*}

¹Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011;

²Research Center of Endocrine and Metabolic Diseases, ³Department of Endocrinology, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the synergistic effects of mild elevation of free fatty acid and lipopolysaccharide (LPS) on apoptosis and insulin secretion in rat pancreatic β-cell line INS-1 and its mechanism. **Methods:** The INS-1 cells were cultured with palmitate (0.125 mmol/L) and different concentrations of LPS (1, 10, 50 ng/mL) for 24 h alone or together. Apoptosis rate was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of Cleaved caspase-3. Neutral ceramidase (NCDase) activity was investigated by HPLC after INS-1 cells were treated with palmitate and LPS (50 ng/mL) alone or together. Insulin secretion was detected by ELISA. After transfected with recombinant plasmids pEGFP-C3-NCDase, the changes of apoptosis rate and insulin secretion of INS-1 cells stimulated by palmitate and LPS were observed. **Results:** Compared with the control, palmitate alone or LPS (50 ng/mL) alone had no significant effect on apoptosis or insulin secretion. However, the combination of palmitate and LPS significantly increased the apoptosis rate and up-regulated the expression of Cleaved caspase-3 ($P < 0.05$). Intracellular insulin content or glucose-stimulated insulin secretion was not altered while basal insulin secretion was significantly inhibited by palmitate and LPS for 24 h ($P < 0.01$). In addition, NCDase activity was not affected by stimulation with palmitate or LPS alone while its activity was

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(BK20151577)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qun_zhu@163.com

markedly inhibited by combination of palmitate and LPS ($P < 0.01$). NCDase overexpression markedly ameliorated the apoptosis induced by palmitate and LPS in INS-1 cells and increased basal insulin secretion ($P < 0.05$). **Conclusion:** Mild elevation of free fatty acid and LPS could synergistically promote β -cell apoptosis and decrease basal insulin secretion through inhibition of the activity of NCDase, a key enzyme of the sphingolipid metabolism.

[Key words] free fatty acid; lipopolysaccharide; neutral ceramidase; β -cells

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(06): 803-809]

2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)和肥胖人群体内游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)及革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)水平虽然明显高于普通人群,但通常呈轻度增高^[1-2]。研究发现,高浓度的FFA或LPS可导致胰岛 β 细胞凋亡及功能障碍^[3-4],而轻度增高的FFA或LPS对胰岛 β 细胞并无明显影响^[5-6]。棕榈酸约占FFA的1/4,是FFA中与代谢疾病相关的重要组分^[7]。近来研究发现,轻度增高的棕榈酸(palmitate, PA)与LPS协同可通过影响鞘脂分子代谢从而促进免疫细胞炎症因子表达及神经细胞凋亡^[8-9]。本课题组的前期研究显示,鞘脂分子代谢亦在调控T2DM β 细胞功能中起着重要作用^[10];并且轻度增高的PA与LPS协同影响胰岛 β 细胞的增殖^[6]。本研究进一步探讨轻度增高的PA与LPS协同对 β 细胞凋亡和胰岛素分泌的影响以及鞘脂分子在其中扮演的角色,为阐明细菌、FFA增高产生的脂毒性等致T2DM的机制提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠胰岛 β 细胞株INS-1(南京中医药大学刘超教授惠赠);RPMI-1640培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(ScienCell公司,美国),PA和LPS(O55:B5, L6529)(Sigma公司,美国),Annexin-V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(BD公司,美国),BCA蛋白定量试剂盒(杭州碧云天公司);兔抗大鼠中性神经酰胺酶(neutral ceramidase, NCDase)抗体、兔抗Cleaved caspase-3抗体、兔抗Caspase-3抗体(Abcam公司,美国),鼠抗 β -actin单克隆抗体、HRP标记的抗鼠IgG及抗兔IgG(Cell Signaling Technology公司,美国);C12-ceramide和C17-D-erythro-SPH(Avanti Polar Lipids公司,美国);C12-D-erythro-SPH(Larodan公司,瑞典);大鼠胰岛素ELISA试剂盒(ALPCO公司,美国);pEGFP-C3空载质粒和pEGFP-C3-NCDase重组质粒由Hannun教授(Medical University of South Car-

olina, 美国)馈赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

参照本课题组先前用的方法^[6]用RPMI-1640完全培养基培养INS-1细胞,在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。隔天换液,2~3 d传代。

1.2.2 棕榈酸配制

按照本课题组先前报道的方法^[6]配制5.0 mmol/L的PA/BSA复合液混合液,-20℃保存。将PA/BSA的混合液与完全培养基按适当比例混合后配制成本研究所需浓度0.125 mmol/L。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的INS-1细胞接种于6孔板中,每组设3个复孔。待细胞贴壁后按实验分组用药物干预24 h。实验1:①对照组;②不同浓度的LPS组(1、10、50 ng/mL)。实验2:①对照组;②PA组;③PA联合不同浓度的LPS(1、10、50 ng/mL)组。实验3:①pEGFP-C3空载质粒组;②pEGFP-C3-NCDase重组质粒组;③pEGFP-C3+PA+LPS(50 ng/mL)组;④pEGFP-C3-NCDase+PA+LPS(50 ng/mL)组。用胰酶消化后收集细胞,用预冷PBS液洗涤细胞,用1×缓冲液重悬细胞,分别加入Annexin V-FITC和PI,混匀后避光室温孵育15 min后,流式细胞仪检测INS-1细胞凋亡率,实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达水平

检测凋亡相关蛋白实验分组:①对照组;②PA组;③PA联合不同浓度的LPS(1、10、50 ng/mL)组。检测NCDase蛋白分组:①对照组;②pEGFP-C3空载质粒组;③pEGFP-C3-NCDase组。将INS-1细胞接种于6孔板上,按照上述分组,每组设置3个复孔。用相应药物作用24 h后收集细胞提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度及定量,蛋白变性后待用。根据蛋白浓度取适量蛋白上样于12%的聚丙烯酰胺凝胶中,并转印至PVDF膜上,室温下5%脱脂奶粉溶液封闭2 h,加入相应一抗(Cleaved caspase-3、caspase-3、NCDase)于4℃孵育过夜,二抗于室温下

孵育2 h,再用PBST洗膜后,ECL试剂处理曝光,显影、定影后扫描胶片,定量分析使用Image J软件,实验重复3次。

1.2.5 NCDase 活性检测

检测NCDase活性实验分组:实验1:①对照组;②PA组;③LPS(50 ng/mL);④PA联合LPS(50 ng/mL)。实验2:①pEGFP-C3空载质粒组;②pEGFP-C3-NCDase组。INS-1细胞接种于60 mm培养皿中,每组设置3个复孔。用相应药物干预24 h后,收集细胞提取总蛋白并测定蛋白含量。定量后,蛋白样品中加入终浓度为100 μmol/L的反应底物C12-Ceramide,并在37 ℃水浴中完成酶促反应。在反应产物中加入50 pmol C17-D-erythro-SPH进行有机萃取,将萃取物用N₂吹干后可见管壁有薄膜状物,加入MeOH溶解,-20 ℃保存待用。按照已报道过的HPLC方法测定INS-1细胞NCDase活性^[10],以C12-D-erythro-SPH作为内标准品,C17-D-erythro-SPH作为外标准品,通过HPLC分离及荧光探测器定量检测o-phthaldehyde-SPH衍化物,实验重复3次。

1.2.6 胰岛素含量检测

取对数生长期的INS-1细胞接种于24孔板中,分组同上,每组设置3个复孔。用药物干预24 h后,按照大鼠胰岛素ELISA试剂盒说明检测细胞内胰岛素含量、葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose-stimulated insulin secretion,GSIS)和24 h基础胰岛素分泌,BCA法检测细胞的总蛋白含量用作校正。GSIS的检测:弃培养基,PBS洗涤细胞后,加入无糖的KRB缓冲液

500 μL/孔孵育1 h;弃上清后加入含有2.8 mmol/L或16.7 mmol/L葡萄糖的KRB缓冲液孵育1 h后收集上清,-80 ℃保存待测。参照相关文献报道^[11],检测胰岛素基础分泌和细胞内胰岛素含量:检测前24 h,弃除培养基,PBS洗涤后加入新鲜RPMI-1640完全培养基孵育24 h,收集上清。收集裂解液并提取蛋白用于细胞内胰岛素含量的检测。实验重复3次。

1.2.7 pEGFP-C3-NCDase 重组质粒转染及筛选

按照本课题组先前的方法^[10],INS-1细胞生长至80%进行转染,按照Lipofectamine™ 2000说明书,分别转染pEGFP-C3空载质粒和pEGFP-C3-NCDase重组质粒以获得稳定表达的细胞系,用Western blot检测转染后NCDase表达情况,其方法参照1.2.4的步骤。

1.3 统计学方法

数据采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析LSD检验,制图使用Graphpad Prism 6.0软件,P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS对INS-1细胞凋亡的影响

用不同浓度的LPS(1、10、50 ng/mL)刺激INS-1细胞24 h后,流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,浓度轻度增高的LPS对INS-1细胞凋亡的影响差异无统计学意义(图1)。

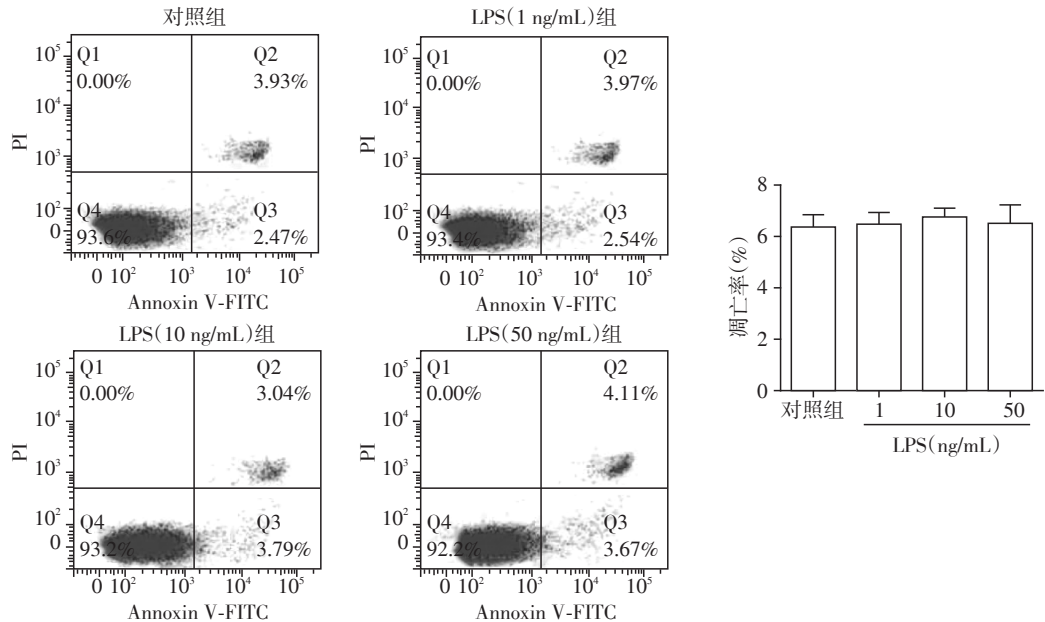


图1 不同浓度LPS对INS-1细胞凋亡的影响

Figure 1 Effects of LPS with different concentrations on apoptosis of INS-1 cells

2.2 PA 与 LPS 联合对 INS-1 细胞凋亡的影响

流式细胞术和 Western blot 结果显示,采用 PA (0.125 mmol/L) 单独、联合不同浓度的 LPS (1、10、50 ng/mL) 共同刺激 INS-1 细胞 24 h 后,与对照组相比,PA 组对 INS-1 细胞凋亡影响的差异无统计学意义,但 PA 联合 LPS (50 ng/mL) 时可明显诱导 INS-1 细胞凋亡 (图 2A、B),显著上调 Cleaved caspase-3 蛋白表达 (P 均 < 0.05 , 图 2C~E)。因此,本研究采取 PA (0.125 mmol/L) 联合 LPS (50 ng/mL) 进行后续实验。

2.3 PA 与 LPS 协同抑制 NCDase 性

HPLC 法测定 NCDase 活性。结果显示与对照组相比,PA 或 LPS 单独刺激 INS-1 细胞 24 h 后,NCDase 活性无明显影响,但两者联合可明显抑制 NCDase 活性 ($P < 0.01$, 图 3)。

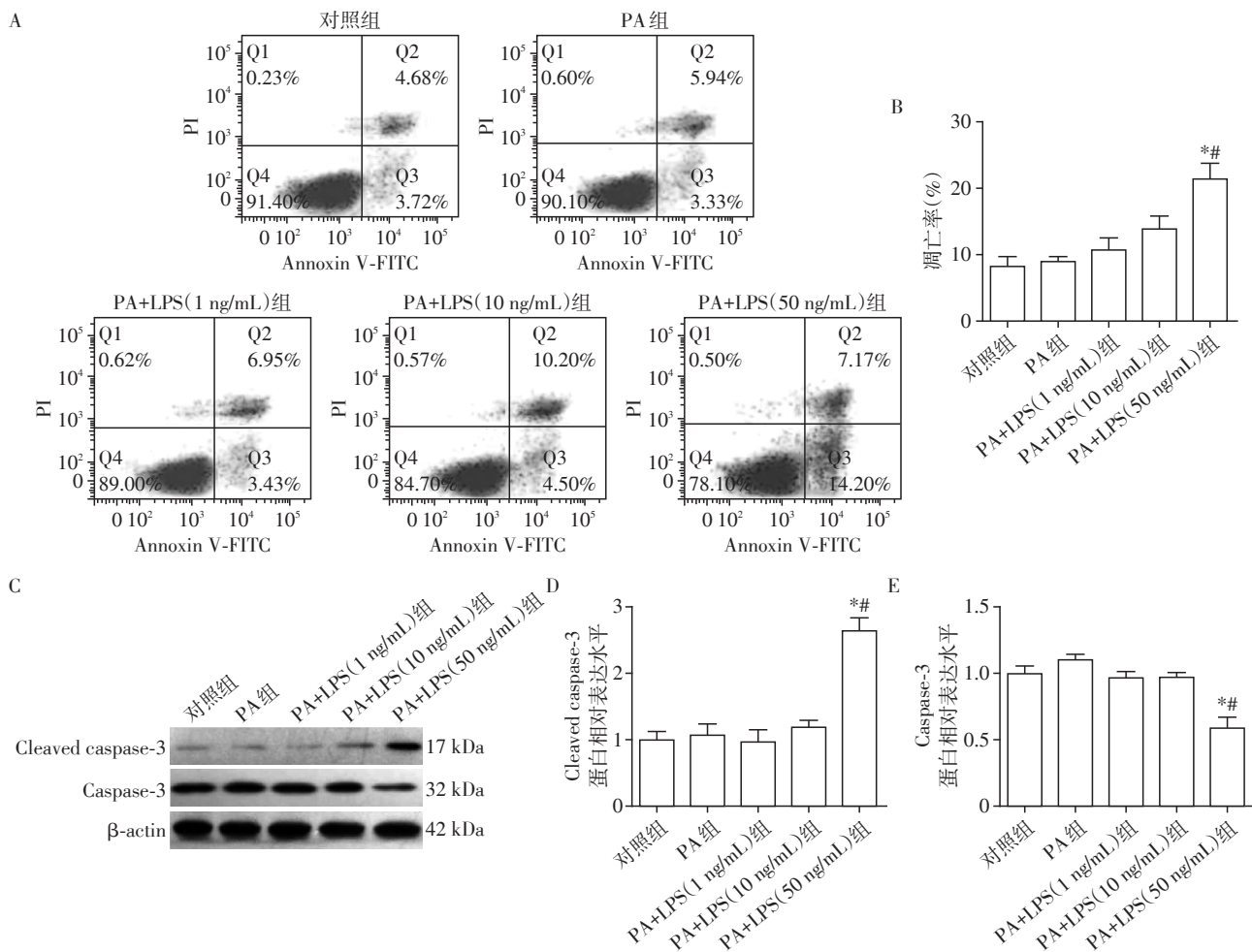
2.4 PA 与 LPS 协同对胰岛素分泌的影响

大鼠胰岛素 ELISA 测定结果显示,PA、LPS 单独

或者联合刺激 INS-1 细胞 24 h 后,GSIS (图 4A) 和细胞内胰岛素含量 (图 4B) 各组间差异无统计学意义;与对照组相比,PA 或 LPS 单独刺激 INS-1 细胞 24 h 后,基础胰岛素分泌无明显变化,但两者联合可显著降低 INS-1 细胞的基础胰岛素分泌 ($P < 0.01$, 图 4C)。

2.5 高表达 NCDase 缓解 PA 联合 LPS 诱导的 INS-1 细胞损伤

INS-1 细胞通过转染 pEGFP-C3-NCDase 重组质粒,瞬时高表达 NCDase (图 5A),在此基础上建立转有 NCDase 重组质粒的 INS-1 稳定细胞系,稳定高表达 NCDase (图 5B) 且 NCDase 活性增高 (图 5C)。稳定转染 pEGFP-C3 空载质粒和 pEGFP-C3-NCDase 重组质粒的 INS-1 细胞经 PA 联合 LPS 作用 24 h 后,流式细胞术检测细胞凋亡和 ELISA 检测胰岛素含量结果显示,与 pEGFP-C3 空载质粒组比较,转染 pEGFP-



A: 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况; B: 各组细胞凋亡率定量分析结果; C: Western blot 检测各组细胞 Cleaved caspase-3 和 Caspase-3 表达情况; D: Cleaved caspase-3 蛋白定量分析结果; E: Caspase-3 蛋白定量分析结果。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PA 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 PA 联合不同浓度的 LPS 对 INS-1 细胞凋亡的影响

Figure 2 Effects of PA and LPS at different concentrations on apoptosis of INS-1 cells

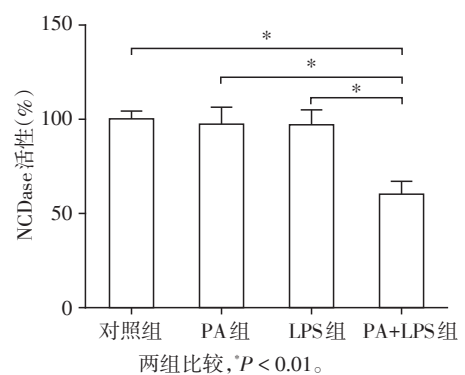


图3 PA联合LPS对INS-1细胞内NCDase活性的影响
Figure 3 Effects of PA and LPS on the NCDase activity in INS-1 cells

C3-NCDase 重组质粒的INS-1细胞凋亡明显下降(图5D、E),基础胰岛素分泌明显增加(图5F, P 均 <0.05)。

3 讨论

正常人血中能检测到微量的LPS(通常 <1.0 ng/mL)。与急性炎症状态时增加数百倍不同,T2DM患者由于肠道黏膜细胞通透性增加和高脂饮食等使LPS呈低水平增高,称之为代谢性内毒素血症^[2,12]。研究发现,虽然高浓度的LPS($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)通过促进氧化应激等诱导 β 细胞损害^[4,13],然而代谢性内毒素血症浓度的LPS却并不损伤 β 细胞^[6]。与LPS相似,T2DM

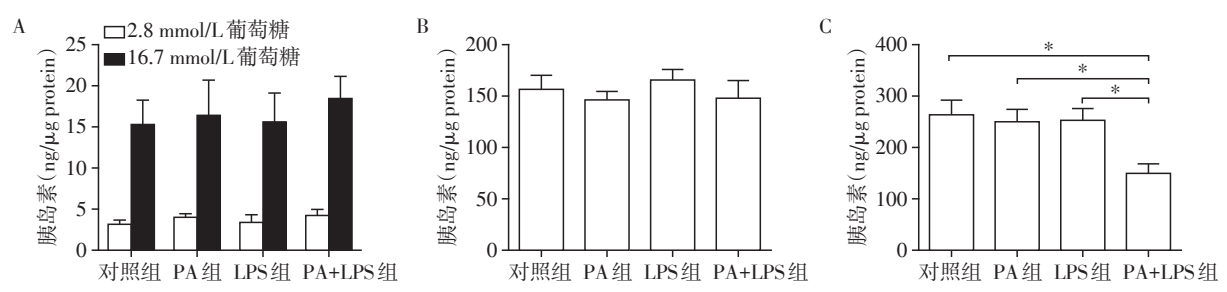
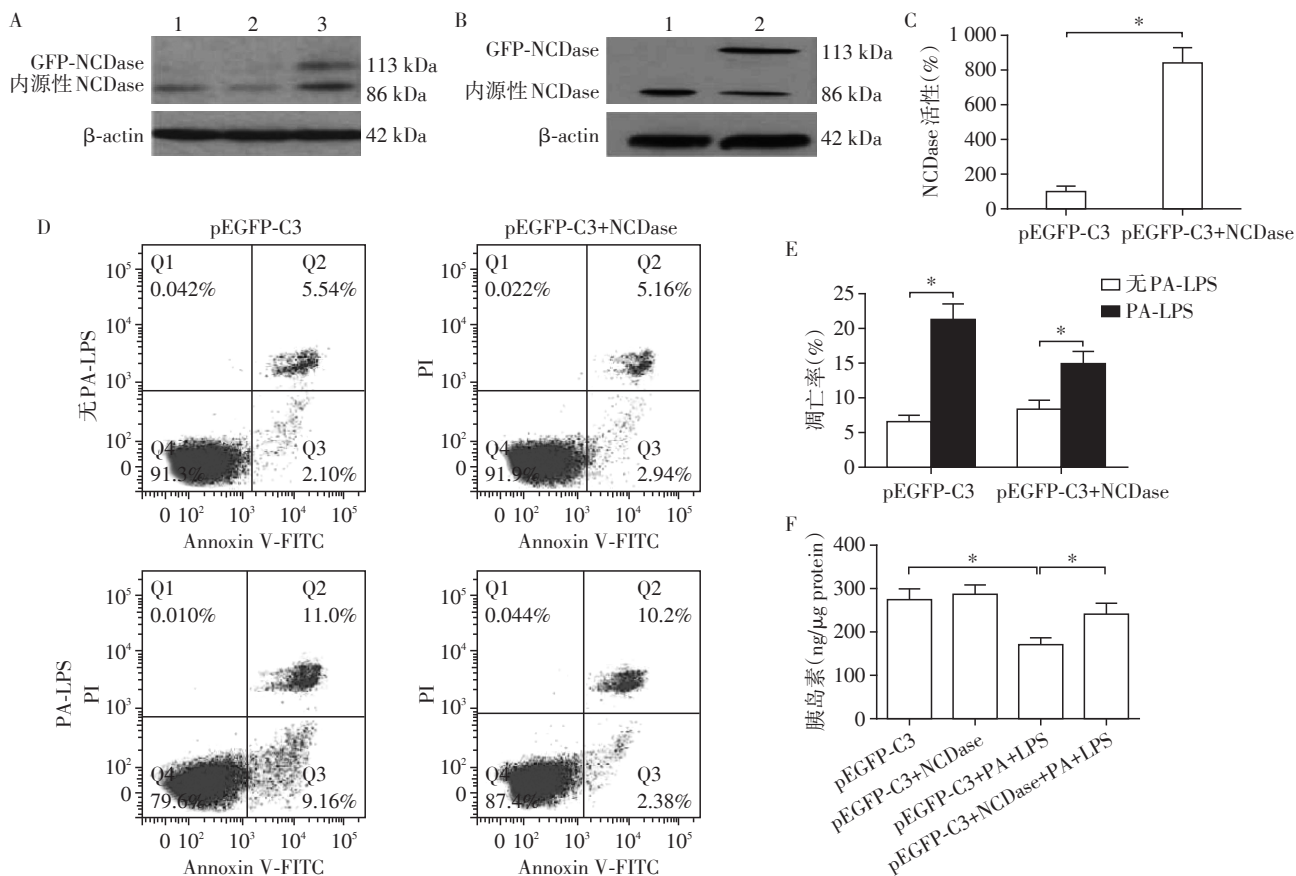


图4 PA联合LPS对INS-1细胞胰岛素分泌的影响
Figure 4 Effects of PA and LPS on insulin secretion of INS-1 cells

患者血浆中FFA水平虽明显高于普通人群,但亦呈轻度增高,为 $0.40\sim0.66$ mmol/L^[1,14],其中以PA含量(约占1/4)最为丰富。较高浓度的PA($0.3\sim0.5$ mmol/L)产生“脂毒性”致 β 细胞损伤和功能障碍^[15-16],而代谢性内毒素血症浓度的PA($0.1\sim0.2$ mmol/L)却并不影响 β 细胞^[6]。本课题组首次报道,轻度增高浓度的PA或LPS单独对大鼠 β 细胞系INS-1无影响,而两者协同可显著抑制其增殖^[6]。本研究进一步发现,浓度轻度增高的PA(0.125 mmol/L)或LPS(50 ng/mL)单独作用 24 h对INS-1细胞凋亡无明显影响,而两者联合却能显著促进细胞凋亡并且活化凋亡相关蛋白Caspase-3。此外,本研究还发现,轻度增高的PA与LPS联合作用于INS-1细胞,虽然对GSIS以及细胞内胰岛素含量无明显影响,但却显著抑制基础胰岛素分泌,提示轻度增高的PA与LPS产生协同作用导致 β 细胞凋亡以及胰岛素分泌异常。

近年有关巨噬细胞的研究发现,鞘脂分子-神经酰胺(ceramide, Cer)水平增高在轻度增高的PA与LPS的协同作用中扮演关键角色^[17]。近年发现,鞘脂分子不仅是细胞的膜性结构成分,也是一个关键的

信号转导分子,并在调控T2DM中起着重要作用^[18]。Cer是鞘脂信号通路的中心分子。研究显示,炎症因子及高浓度PA能够促进Cer合成,并通过诱导内质网应激、氧化应激水平增高等促进 β 细胞凋亡^[19-20]。NCDase是Cer降解的关键酶,能将Cer进一步水解形成神经鞘氨醇(sphingosine, SPH)。本课题组前期系列报道, β 细胞存在NCDase表达及活性,抑制NCDase活性进一步导致细胞内Cer含量增加;而NCDase活化通过加速Cer降解从而减轻应激下的 β 细胞损伤^[5,10]。本课题组前期报道,轻度增高的PA与LPS协同能抑制NCDase表达^[6]。本研究采用已报道过的HPLC法测定NCDase活性^[10],进一步发现虽然浓度轻度增高的PA或LPS单独并不影响 β 细胞NCDase,而两者协同却显著抑制其活性;并且高表达NCDase能明显缓解轻度增高的PA与LPS协同诱导的 β 细胞凋亡与胰岛素分泌异常。上述结果提示,与高浓度PA促进Cer合成不同,轻度增高的PA与LPS协同通过抑制NCDase活性,导致Cer降解减少从而损伤 β 细胞。未来的研究将采用Cer合成酶抑制剂抑制Cer合成,进一步探讨轻度增高的PA与



A: 转染重组质粒 pEGFP-C3-NCDase 在 INS-1 细胞中实现 NCDase 高表达。1: 空白对照; 2: 转染 pEGFP-C3; 3: 转染 pEGFP-C3-NCDase。B: 重组质粒 pEGFP-C3-NCDase 在 INS-1 细胞中稳定表达。1: 转染 pEGFP-C3; 2: 转染 pEGFP-C3-NCDase。C: HPLC 检测 NCDase 活性。D: 流式细胞术检测细胞凋亡率。E: 各组细胞凋亡率的定量分析。F: ELISA 检测 24 h 基础胰岛素分泌。两组比较, * $P < 0.05$ 。

图5 NCDase 高表达对 PA 联合 LPS 诱导 INS-1 细胞凋亡及功能的影响

Figure 5 Effects of NCDase overexpression on the apoptosis and function of INS-1 cells after incubated with PA and LPS

LPS 是否对 Cer 合成有影响。有研究报道, 轻度增高的 FFA 或 LPS 刺激能诱导细胞磷脂酸水平增加^[21-22], 而一定水平增高的磷脂酸等小分子脂质分子能显著抑制 NCDase 活性^[23]。因此, 轻度增高的 FFA 与 LPS 协同抑制 β 细胞 NCDase 活性是否与磷脂酸增高有关、Cer 水平的具体变化, 以及轻度增高的 FFA 与 LPS 协同致 β 细胞胰岛素分泌异常的相关机制, 尚需进一步的研究证实。

综上所述, 轻度增高的 PA 或 LPS 在糖代谢紊乱人群中广泛并存, 虽然两者单独对于 β 细胞凋亡及胰岛素分泌功能无明显影响, 但协同却通过抑制 NCDase 活性调控鞘脂代谢进而导致 β 细胞损伤及胰岛素分泌异常。本研究将为 T2DM 的防治提供新的理论依据和靶点。

[参考文献]

[1] BLACHE D, BOURDON E, SALLOIGNON P, et al. Glycated albumin with loss of fatty acid binding capacity con-

tributes to enhanced arachidonate oxygenation and platelet hyperactivity: relevance in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2015, 64(3): 960-972

[2] GOMES J M G, COSTA J A, ALFENAS R C G. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: a systematic review [J]. Metabolism, 2017, 68: 133-144

[3] OH Y S, BAE G D, BAEK D J, et al. Fatty acid-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells during development of type 2 diabetes [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 384

[4] MO X, WANG X, GE Q, et al. The effects of SIRT1/FoxO1 on LPS induced INS-1 cells dysfunction[J]. Stress, 2019, 22(1): 70-82

[5] LUO F, FENG Y, MA H, et al. Neutral ceramidase activity inhibition is involved in palmitate-induced apoptosis in INS-1 cells[J]. Endocr J, 2017, 64(8): 767-776

[6] 马惠敏, 韦 晓, 温洪华, 等. 轻度增高的棕榈酸与脂多糖协同对胰岛 β 细胞活力的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(9): 1634-1637

- [7] WEIGERT C, BRODBECK K, STAIGER H, et al. Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(23):23942-23952
- [8] JIN J, LU Z, LI Y, et al. Docosahexaenoic acid antagonizes the boosting effect of palmitic acid on LPS inflammatory signaling by inhibiting gene transcription and ceramide synthesis[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(2):e0193343
- [9] REICHARDT F, CHASSAING B, NEZAMI B G, et al. Western-diet induces colonic nitroergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling[J]. *J Physiol*, 2017, 595(5):1831-1846
- [10] TANG S, LUO F, FENG Y, et al. Neutral ceramidase secreted via exosome protects against palmitate-induced apoptosis in INS-1 cells[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2017, 125(2):130-135
- [11] 梁绮君,李 焱,刘珊英,等.低剂量脂多糖对NIT-1 β 细胞凋亡、增殖和分泌功能的影响[J].*中华内分泌代谢杂志*, 2011, 27(9):761-765
- [12] BOUTAGY N E, MCMILLAN R P, FRISARD M I, et al. Metabolic endotoxemia with obesity: is it real and is it relevant?[J]. *Biochimie*, 2016, 124:11-20
- [13] CHEN X, YAN Y, WENG Z, et al. TAX-875 mitigates β -cell lipotoxicity-induced metaflammation damage through inhibiting the TLR4-NF- κ B pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019:549796
- [14] 宣丽萍,郑芬萍,林细华,等.2型糖尿病患者血清游离脂肪酸与肾小球滤过率的关系[J].*中华医学杂志*, 2016, 96(17):1320-1324
- [15] 钟继娟,祝 群,缪 珩.牛磺熊脱氧胆酸对棕榈酸诱导的INS-1细胞凋亡的保护作用[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(3):354-358
- [16] LY L D, XU S, CHOI S K, et al. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(2):e291
- [17] JIN J, LU Z, LI Y, et al. LPS and palmitate synergistically stimulate sphingosine kinase 1 and increase sphingosine 1 phosphate in RAW264.7 macrophages[J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 104(4):843-853
- [18] BANDET C L, TAN-CHEN S, BOURRON O, et al. Sphingolipid metabolism: new insight into ceramide-induced lipotoxicity in muscle cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3):pii:E479
- [19] HE X, SCHUCHMAN E H. Ceramide and ischemia/reperfusion injury[J]. *J Lipids*, 2018, 2018:3646725
- [20] YARIBEYGI H, BO S, RUSCICA M, et al. Ceramides and diabetes mellitus: an update on the potential molecular relationships[J]. *Diabet Med*, 2019, 37(1):11-19
- [21] TARDY F M, TUCCI M, BAKER R, et al. The evaluation of macrophages following bacterial or cytokine challenge[J]. *Biomedical Sci Instrum*, 2008, 44:428-433
- [22] MACCHIONI L, PETRICCIUOLO M, DAVIDESCU M, et al. Palmitate lipotoxicity in enteric glial cells: lipid remodeling and mitochondrial ROS are responsible for cyt C release outside mitochondria[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(3):895-908
- [23] CHATHOTH S, THAYYULLATHIL F, GALADARI A, et al. Purification and biochemical characterization of membrane-bound neutral ceramidase from camel brain (*Camelus dromedarius*) [J]. *Int J Biochem Mol Biol*, 2013, 4(1):54-66

[收稿日期] 2019-09-16