

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.14.002

中性神经酰胺酶在胰岛 β 细胞脂毒性中的变化及作用*

罗粉^{1,4} 韦晓² 马慧敏¹ 唐珊¹ 刘超³ 祝群^{1Δ}

(1 南京医科大学第二附属医院内分泌科 江苏 南京 210011; 2 江苏省中西医结合内分泌实验室 江苏 南京 210028;

3 江苏省中西医结合内分泌科 江苏 南京 210028; 4 亳州市人民医院重症医学科 安徽 亳州 236800)

摘要 目的:探讨中性神经酰胺酶(NCDase)在胰岛 β 细胞脂毒性中的变化及作用。**方法:**采用 0.5 mM 棕榈酸作用 INS-1 细胞不同时间,用 MTT 法检测细胞活力;细胞内分别建立 NCDase 基因过表达和干扰后,用 MTT 法检测细胞的增殖活力;棕榈酸刺激细胞 24 h, HPLC 法和 Western Blot 法检测 NCDase 活性和蛋白表达;重组质粒 pEGFP-C3-NCDase 过表达 NCDase 基因和 NCDase siRNA 干扰 NCDase 基因分别建立后,棕榈酸刺激 24 h,用流式细胞术检测细胞凋亡。**结果:**与对照组相比,棕榈酸刺激 24 h 时细胞抑制率显著降低($52 \pm 3.2\%$)($P < 0.01$);与 BSA 对照相比,棕榈酸刺激 24 h NCDase 活性显著被抑制($P < 0.01$),NCDase 蛋白水平也被显著下调($P < 0.001$);与 BSA 对照组相比,过表达 NCDase 显著促进细胞的增殖,然而 NCDase 干扰显著抑制细胞的增殖($P < 0.05$);与 pEGFP-C3+ 棕榈酸组相比,pEGFP-C3-NCDase 显著缓解棕榈酸诱导的细胞凋亡($P < 0.01$);与 con. siRNA+ 棕榈酸组相比,NCDase siRNA 显著促进了棕榈酸诱导的细胞凋亡($P < 0.01$)。**结论:**棕榈酸刺激后抑制 β 细胞 NCDase 活性和蛋白表达,NCDase 过表达促进 β 细胞增殖并且在 β 细胞脂毒性中起着保护作用。

关键词:中性神经酰胺酶;棕榈酸;脂毒性;胰岛 β 细胞

中图分类号:R-33; R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)14-2606-05

The Change and Effect of Neutral Ceramidase in Pancreatic β Cell Lipotoxicity*

LUO Fen^{1,4}, WEI Xiao², MA Hui-min¹, TANG Shan¹, LIU Chao³, ZHU Qun^{1Δ}

(1 Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210011, China;

2 Endocrine and Diabetes Center, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210028,

China; 3 Department of Endocrinology, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing, Jiangsu,

210028, China; 4 Department of Intensive Care Unit, Bozhou municipal People's Hospital, Bozhou, Anhui, 236800, China)

ABSTRACT Objective: To explore the change and effect of NCDase in pancreatic β cell lipotoxicity. **Methods:** Cell viability was detected by MTT assay after being incubated with 0.5 mM palmitate for different time periods and cell proliferation was measured by MTT assay after transfected with pEGFP-C3-NCDase or NCDase siRNA. NCDase activity and protein expression were investigated by HPLC and Western Blot assay, respectively, after INS-1 cells were treated with 0.5 mM palmitate for 24 h. Stable clones of INS-1 cell line transfected with recombinant plasmids pEGFP-C3-NCDase and pEGFP-C3 vector were established and NCDase siRNA was transiently transfected into INS-1 cells. Then they were incubated with palmitate for 24 h. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. **Results:** Compared with the controls, cell viability was decreased by ($52 \pm 3.2\%$) ($P < 0.01$), treated with 0.5 mM palmitate for 24 h. Compared with BSA group, NCDase activity and protein expression were markedly inhibited ($P < 0.01$). NCDase overexpression markedly enhanced -cell proliferation, while NCDase siRNA significantly inhibited -cell proliferation, compared with BSA group (both $P < 0.05$). Compared with pEGFP-C3 plus palmitate group, NCDase overexpression alleviated palmitate-induced apoptosis in INS-1 cells ($P < 0.01$). In contrast, NCDase siRNA significantly enhanced palmitate-induced apoptosis ($P < 0.01$), compared with con. siRNA plus palmitate group. **Conclusion:** NCDase activity and protein expression were inhibited by palmitate. In addition, NCDase overexpression promoted cell proliferation and protected against palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic β -cell.

Key words: Neutral Ceramidase; Palmitate; Lipotoxicity; Pancreatic β -cell

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)14-2606-05

前言

长期血脂异常所产生的脂毒性在 2 型糖尿病的起病中扮演着重要的角色。所谓脂毒性是指过量的脂质主要为过高的游

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81270898);江苏省自然科学基金项目(BK20151577)

作者简介:罗粉(1987-),硕士研究生,主要从事胰岛 β 细胞脂毒性的基础研究,电话:15298365179, E-mail: luofen_2016@163.com

Δ 通讯作者:祝群,博士,副教授,主要从事糖尿病的诊治及发病机制的研究, E-mail: zhuqun@njmu.edu.cn

(收稿日期:2016-10-09 接受日期:2016-10-28)

离脂肪酸(free fatty acid, FFA)在多个非脂肪组织(如胰岛 β 细胞)异位沉积并导致其功能障碍^[1]。研究表明诱导细胞内神经鞘脂信号分子神经酰胺(ceramide, Cer)增高是 β 细胞“脂毒性”损伤的主要机制之一^[2]。Cer是神经鞘磷脂信号通路的中心分子,能进一步被神经酰胺酶(ceramidase, CDase)水解形成神经鞘氨醇(sphingosine, Sph)。CDase根据最适PH值分为酸性、中性和碱性^[3]。我们的前期研究发现NCDase在 β 细胞表达并具有酶活性,炎症应激下NCDase活化与 β 细胞自我保护有关^[4]。但NCDase在胰岛 β 细胞脂毒性中的变化及作用目前尚未见报道。本研究通过探讨棕榈酸刺激胰岛 β 细胞后NCDase的活性和蛋白表达的变化以及NCDase在棕榈酸诱导 β 细胞脂毒性中的作用,以期临床治疗2型糖尿病胰岛 β 细胞脂毒性提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠胰岛瘤 INS-1 细胞株(南京医科大学韩晓教授惠赠)。RPMI-1640 培养基(美国 Gibco), MTT 和棕榈酸(美国 Sigma), 牛血清白蛋白 BSA (无游离脂肪酸)(美国 Roche), BCA 蛋白定量试剂盒(南京凯基), Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD), ECL 显色试剂盒(德国 Millipore), 小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz)、兔抗大鼠 NCDase 抗体(美国 Abcam 公司)。C12-ceramide 和 C17-D-erythro-SPH(美国 Avanti Polar Lipids), C12-D-erythro-SPH(瑞典 Larodan)。

1.2 实验方法

1.2.1 INS-1 细胞培养 参照我们先前的方法^[5]用 RPMI-1640 完全培养基培养 INS-1 细胞,细胞放置于 37℃、5%CO₂ 的饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 棕榈酸的配置 参照国外的文献报道^[6],取适量的棕榈酸在 70℃ 的水浴中溶于 0.1 M NaOH 约 30 min, 配成 100 mM 的棕榈酸储存液。然后取适量 BSA 溶于 55℃ 去离子水浴中配成 5% (w/v) 的溶液, 然后以合适的比例混合棕榈酸/5% BSA 配置成 5 mM 的混合液, 然后放于零下 20℃ 冰箱储存。

1.2.3 MTT 法检测细胞活性及增殖率 配置 5 g/L 的 MTT 溶液。INS-1 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板上, 0.5 mM 棕榈酸分别培养细胞不同的时间(0, 24, 48 和 72 h), 每组 6 个复孔, 测定前向每孔中加入 10% (v/v) 的上述 MTT 溶液继续培养 4 h, 弃去培养液终止培养并向每孔中加入 150 μ L DMSO, 充分震荡 15 min 后测定 490 nm 处吸光度(A)值。

1.2.4 NCDase 活性的检测 0.5 mM 棕榈酸处理 INS-1 细胞 24 h。按我们已报道过的 HPLC 方法测定 NCDase 活性^[4], 主要步骤如下: ① 样品制备: 以预冷 PBS 液洗涤 2 次后, 收集细胞, 加入 150 μ L 蛋白裂解液含 1 mM 蛋白酶抑制剂, 4℃、12000 $\times$ g 离心 20 min, 收集上清液 BCA 法蛋白定量。② 酶促反应: 在 100 μ g 蛋白样品中加入终浓度为 100 μ M 的反应底物 C12-Ceramide, 酶促反应 37℃ 水浴 2 h 完成。加入 HPLC 级甲醇和氯仿, 振荡 30 s, 中止和溶解反应产物。③ 有机萃取: 在反应产物中加入 50 pmol C17-D-erythro-SPH, 37℃ 振荡水浴 120 min, 冷却后, 加入氯仿、5% 甘油进行有机萃取, 将萃取物转移至 Ep-

pendorf 管并用 N₂ 吹干后可见管壁有薄膜状物, 加入 MeOH 溶解, -20℃ 保存或进行 HPLC 检测。④ 反应产物的 HPLC 检测: 在样品管中加入新鲜配制的 o-phthaldehyde, 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。HPLC 流动相为甲醇: 磷酸钾 = 90:10 (v/v), 流速为 0.8 mL/min。荧光探测器激发波长为 345 nm, 发射波长为 455 nm。

1.2.5 Western Blot 实验检测 用 0.5 mM 棕榈酸刺激 INS-1 细胞 24 h, 收集细胞, 用 RIPA 裂解液(P0013E-1, 上海碧云天)进行裂解, 并加入终浓度为 1 mM 的 PMSF (蛋白酶抑制剂), 4℃、14000 $\times$ g 离心 30 min 收集上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。40 μ g 总蛋白在 10% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳分离, 电转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭, 孵育 β -actin 和 NCDase 一抗于 4℃ 冰箱过夜, 室温下孵育标记辣根过氧化物酶(HRP)的二抗, TBST 洗膜后用 E-CL 发光试剂盒对免疫印记进行检测与观察。用 Quantity One 软件计算光密度比值(NCDase/ β -actin)作为 NCDase 蛋白的相对表达量。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将贴壁的 INS-1 细胞消化后收集细胞, 用预冷 PBS 液洗涤细胞 3 遍后, 用 $1 \times$ buffer 缓冲液制成细胞悬液, 充分吹打, 按试剂盒操作说明行 Annexin V-FITC 和 PI 染色, 待室温条件下避光 15 min 后, 流式细胞术检测 INS-1 细胞凋亡率。

1.2.7 pEGFP-C3-NCDase 重组质粒转染及筛选 pEGFP-C3 空载质粒购自 Clontech; pEGFP-C3-NCDase 重组质粒由 Prof. Hannun (Medical University of South Carolina, USA) 馈赠。按 Invitrogen 公司操作说明, 应用脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导 pEGFP-C3 空质粒和 pEGFP-C3-NCDase 重组质粒转染 INS-1 细胞, 转染 24 h 后, 用加有 G418(终浓度为 400 g/mL)的 1640 全培养基筛选, 每 3-4 天更换一次含有 G418 的培养液, 筛选两周后, 更换 G418 浓度为 200 g/mL, 继续维持筛选, 约两周后显微镜下可见转染组均有分裂相细胞并形成集落, 根据质粒带 GFP 的特点, 挑取 GFP 阳性单克隆株转入培养瓶中继续培养, 获得稳定表达的细胞系。

1.2.8 NCDase 小 RNA 干扰 按照我们已报道过的方法^[4]进行大鼠 NCDase 基因小 RNA 干扰。主要步骤如下: INS-1 细胞接种于 60 mm 细胞培养皿, 待细胞融合度达 70-80% 后, 按转染试剂盒说明分别转染大鼠干扰对照(Con. siRNA)及 NCDase 基因 siRNA(NCDase siRNA)(美国 Thermo Fisher Scientific), 转染 siRNA 终浓度为 20 nmol/L。转染 36 h 后, Western blot 检测 β -actin 及 NCDase 蛋白表达。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 进行统计学分析, 计量资料的数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 每组数据至少通过 3 次独立的重复实验获得。组间均值比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Student-Newman-Keuls(SNK)检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 棕榈酸对 INS-1 细胞活力的影响

与对照相比,0.5 mM 棕榈酸作用 24 h 时细胞的活力被抑制($52 \pm 3.2\%$)($P < 0.01$)(图 1),48 和 72 h 时细胞活力分别被抑制($68.7 \pm 5.01\%$)($P < 0.001$)和($78 \pm 2.6\%$)($P < 0.001$)。

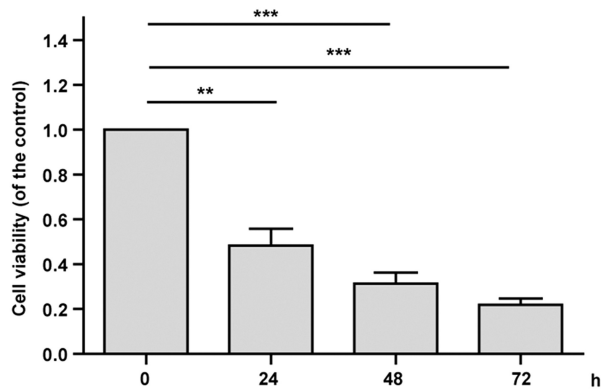


图 1 棕榈酸对 INS-1 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of palmitate on the cell viability of INS-1 cell

注:** 与对照组相比 $P < 0.01$, *** 与对照组相比 $P < 0.001$ 。

Note: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with the control.

2.2 棕榈酸对 INS-1 细胞内 NCDase 活性的影响

0.5 mM 棕榈酸处理 INS-1 细胞 24 h 后,用 HPLC 法检测细胞内 NCDase 的活性,对照组细胞内的 NCDase 的活性为(19.76 ± 1.6)pmol SPH·min⁻¹·mg⁻¹。与 BSA 对照组相比,棕榈酸显著抑制了细胞 NCDase 的活性($P < 0.01$)(图 2)。

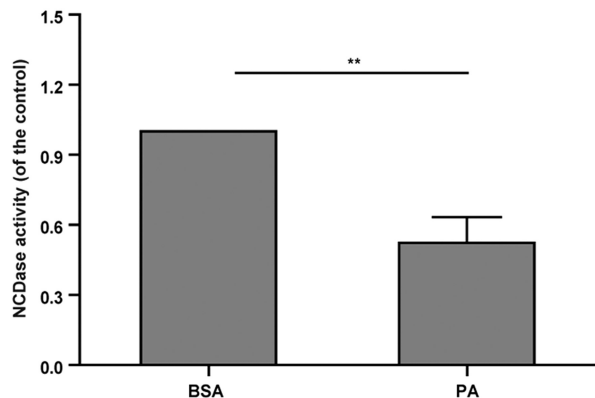


图 2 棕榈酸对 INS-1 细胞内 NCDase 活性的影响

Fig. 2 Effect of palmitate on the NCDase activity in INS-1 cells

注:** 与 BSA 组相比 $P < 0.01$; PA: 棕榈酸。

Note: ** $P < 0.01$, compared with BSA group; PA: palmitate.

2.3 棕榈酸对 INS-1 细胞内 NCDase 蛋白表达的影响

用 Western Blot 法检测细胞内 NCDase 蛋白表达水平,与对照组相比,棕榈酸显著抑制 NCDase 蛋白表达(图 3A),进行灰度值分析:棕榈酸组 NCDase 蛋白含量下降了($73.0 \pm 5.1\%$)($P < 0.001$)(图 3B)。

2.4 过表达 NCDase 对 INS-1 细胞增殖和棕榈酸诱导细胞凋亡的影响

重组质粒 pEGFP-C3-NCDase 能够在 INS-1 细胞内稳定过表达(图 4A)。与 BSA 对照组相比,NCDase 过表达显著增加 INS-1 细胞的增殖活性 ($P < 0.05$)(图 4B),0.5 mM 棕榈酸分别刺

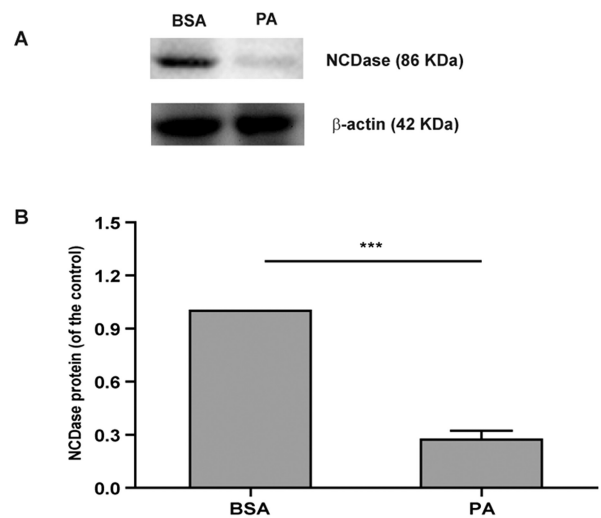


图 3 棕榈酸对 INS-1 细胞内 NCDase 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of palmitate on the NCDase protein expression in INS-1 cells

注:*** 与 BSA 组相比 $P < 0.001$ 。

Note: *** $P < 0.001$, compared with BSA group.

激稳定转染 pEGFP-C3-NCDase 重组质粒和 pEGFP-C3 空质粒的 INS-1 细胞 24 h,用流式细胞仪术对细胞的凋亡进行检测:与 pEGFP-C3+BSA 组相比,pEGFP-C3+PA 组凋亡率显著增加($P < 0.01$),与 pEGFP-C3+PA 组比较,pEGFP-C3-NCDase+PA 组细胞凋亡比例显著下降($P < 0.01$)(图 4C)。

2.5 siRNA 干扰 NCDase 表达对 INS-1 细胞增殖和棕榈酸诱导细胞凋亡的影响

NCDase siRNA 能够干扰 INS-1 细胞内 NCDase 蛋白表达(图 5A)。与 BSA 对照组相比,NCDase siRNA 显著抑制 INS-1 细胞的增殖活性 ($P < 0.05$)(图 5B),NCDase 基因干扰后 0.5 mM 棕榈酸作用 INS-1 细胞 24 h,流式细胞术检测细胞凋亡:con. siRNA+PA 组细胞凋亡率较对照 con. siRNA+BSA 组显著增加($P < 0.01$);与 con. siRNA+PA 组相比,NCDase siRNA+PA 组细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$)(图 5C)。

3 讨论

棕榈酸是常见的诱导 β 细胞脂毒性的饱和游离脂肪酸^[7],刺激能促进细胞内 Cer 合成,而增高的 Cer 通过启动内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)、氧化应激或者直接活化 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun NH₂-terminal kinase,JNK)、Caspase-3 等导致 β 细胞损伤^[8-10],而抑制神经酰胺合成可以显著缓解棕榈酸诱导的 β 细胞毒性作用^[11]。由此,神经酰胺合成在棕榈酸诱导 β 细胞脂毒性的过程中发挥着重要作用。Cer 在细胞内有两条生成途径:(1) 利用丝氨酸和软脂酰-CoA 从头合成;(2) 由神经鞘磷脂经神经鞘磷脂酶水解生成。棕榈酸是软脂酰-CoA 的前体物质,外源性的棕榈酸能够促进神经酰胺的含量增加^[12]。

NCDase 是 Cer 分解代谢的关键酶,先前的动物实验表明游离脂肪酸能通过抑制大鼠肌肉组织 NCDase 活性从而诱导神经酰胺的含量增加^[13]。本研究则首次发现棕榈酸刺激胰岛 β 细胞下调 NCDase 蛋白表达并引起 NCDase 活性降低,提示除

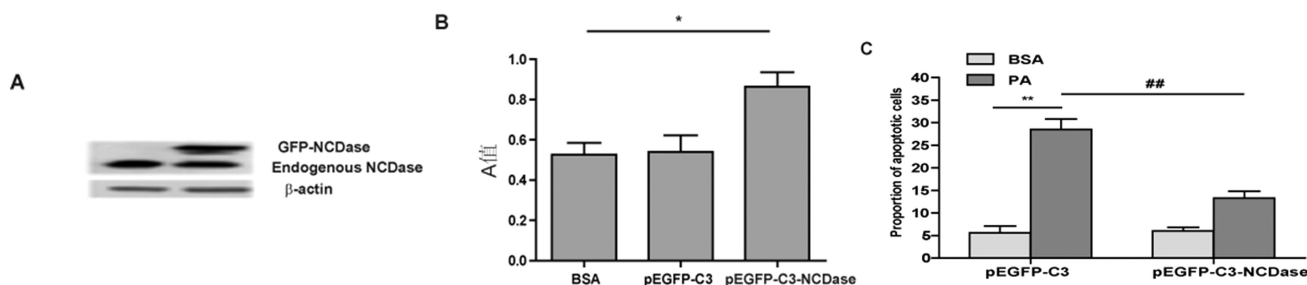


图4 NCDase 过表达对 INS-1 细胞增殖和棕榈酸诱导细胞凋亡的影响

Fig. 4 The effect of NCDase overexpression on INS-1 cells proliferation and palmitate-induced apoptosis in INS-1 cells

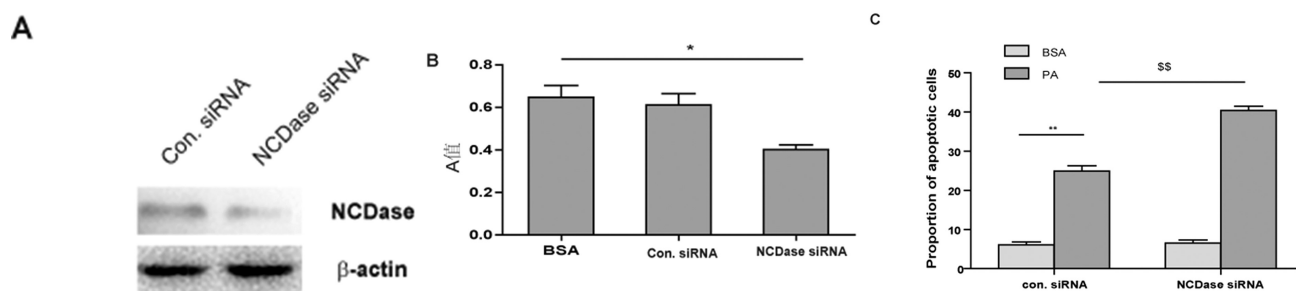
注: * 与对照组相比 $P < 0.05$; ** 与 pEGFP-C3+BSA 组相比 $P < 0.01$; ## 与 pEGFP-C3+PA 组相比 $P < 0.01$ 。Note: * $P < 0.05$, compared with the control; ** $P < 0.01$, compared with the pEGFP-C3+BSA group; ## $P < 0.01$, compared with the pEGFP-C3+PA group.

图5 siRN 干扰 NCDase 表达对 INS-1 细胞增殖和棕榈酸诱导细胞凋亡的影响

Fig. 5 the effect of NCDase siRNA on INS-1 cells proliferation and palmitate-induced apoptosis in INS-1 cells

注: * 与对照组相比 $P < 0.05$; ** 与 con. siRNA+BSA 组相比 $P < 0.01$; ## 与 con. siRNA+PA 组相比 $P < 0.01$ 。Note: * $P < 0.05$, compared with the control; ** $P < 0.01$, compared with the con. siRNA+BSA group, ## $P < 0.01$, compared with the con. siRNA+PA group.

了促进从头合成途径外, 棕榈酸抑制 NCDase 活性从而减少 Cer 的降解可能是其诱导 β 细胞 Cer 增多的另外一个重要机制。棕榈酸抑制 NCDase 活性的具体机制目前并不明确。已有的研究显示在胰岛 β 细胞脂毒性发生的过程中, 棕榈酸刺激 β 细胞产生一些脂质信号分子 (比如磷脂酰丝氨酸)^[14]。而 Chathoth 等^[15]的研究表明磷脂酰丝氨酸等脂质信号分子在低浓度时就能显著抑制脑组织的 NCDase 的活性。而 2 棕榈酸引起胰岛 β 细胞 NCDase 活性的降低是否与上述信号分子的产生有关尚需要进一步的研究证实。

已有研究报道晚期糖基化产物(AGE)在低浓度时通过活化 NCDase 促进肾小球系膜细胞的增殖^[16], 提示 NCDase 在细胞增殖过程中起着重要作用。本研究中, 过表达 NCDase 显著促进 INS-1 细胞增殖, 而 NCDase 基因干扰显著抑制细胞的增殖活性, 表明 NCDase 对胰岛 β 细胞的增殖有着重要作用。NCDase 催化 Cer 水解生成 SPH, 后者被鞘氨醇激酶磷酸化生成鞘氨醇-1-磷酸(S1P)^[17]。Cer 和 S1P 对细胞有着相反的作用, S1P 促进增殖、抗凋亡^[18], 而 Cer 抑制增殖、诱导凋亡^[19], Cer/S1P 比值的平衡决定着细胞的命运^[20]。NCDase 是调控神经酰胺/S1P 比值平衡的关键酶, 参与了细胞的促增殖和抗凋亡过程^[16,21]。我们先前报道胰岛细胞 NCDase 的活化能够对抗炎症因子的细胞毒性作用^[4,5]。本研究结果显示 INS-1 细胞过表达 NCDase 可以显著缓解棕榈酸诱导的细胞凋亡, 而 NCDase 基因干扰后促进棕榈酸诱导的细胞凋亡。上述结果表明 NCDase

在棕榈酸诱导的 β 细胞脂毒性中起着保护作用, 这可能与 NCDase 促进 Cer 的降解, 改变 Cer/S1P 的比值有关。

综上所述, 棕榈酸刺激后抑制了胰岛 β 细胞 NCDase 活性和蛋白表达, 而增强 NCDase 活性则能缓解棕榈酸的胰岛 β 细胞脂毒性损害。因此, 对 NCDase 的研究有望为胰岛 β 细胞脂毒性的治疗提供新的思路。

参考文献 (References)

- [1] Giacca A, Xiao C, Oprescu A I, et al. Lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction: focus on in vivo studies [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 300(2): E255-E262
- [2] Chaurasia B, Summers S A. Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders [J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26 (10): 538-550
- [3] Ito M, Okino N, Tani M. New insight into the structure, reaction mechanism, and biological functions of neutral ceramidase [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(5): 682-691
- [4] Zhu Q, Jin J F, Shan X H, et al. Chronic activation of neutral ceramidase protects beta-cells against cytokine-induced apoptosis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(5): 593-599
- [5] Zhu Q, Kang J, Miao H, et al. Low-dose cytokine-induced neutral ceramidase secretion from INS-1 cells via exosomes and its anti-apoptotic effect [J]. FEBS J, 2014, 281(12): 2861-2870
- [6] Cousin S P, Hugl S R, Wrede C E, et al. Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced

- deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1 [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 229-240
- [7] Hao F, Kang J, Cao Y, et al. Curcumin attenuates palmitate-induced apoptosis in MIN6 pancreatic beta-cells through PI3K/Akt/FoxO1 and mitochondrial survival pathways[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(11): 1420-1432
- [8] Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, et al. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 98
- [9] El-Assaad W, Joly E, Barbeau A, et al. Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(7): 3061-3073
- [10] Lang F, Ullrich S, Gulbins E. Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(9): 1061-1071
- [11] Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated [J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1437-1442
- [12] Hage H R, Pacheco D S A, Mahfouz R, et al. Sustained Action of Ceramide on the Insulin Signaling Pathway in Muscle Cells: Implication of The Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(6): 3019-3029
- [13] Blachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zabielski P, et al. Effect of high fat diet enriched with unsaturated and diet rich in saturated fatty acids on sphingolipid metabolism in rat skeletal muscle [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 225(3): 786-791
- [14] Alcazar O, Qiu-Yue Z, Gine E, et al. Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid[J]. *Diabetes*, 1997, 46(7): 1153-1158
- [15] 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
- [16] Geoffroy K, Wiernsperger N, Lagarde M, et al. Bimodal effect of advanced glycation end products on mesangial cell proliferation is mediated by neutral ceramidase regulation and endogenous sphingolipids[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33): 34343-34352
- [17] Mao C, Obeid L M. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1781(9): 424-434
- [18] Nojima H, Freeman C M, Schuster R M, et al. Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1): 60-68
- [19] Kuzmenko D I, Klimentyeva T K. Role of Ceramide in Apoptosis and Development of Insulin Resistance[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81(9): 913-927
- [20] Ueda N. Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 5076-5124
- [21] Choi M S, Anderson M A, Zhang Z, et al. Neutral ceramidase gene: role in regulating ceramide-induced apoptosis [J]. *Gene*, 2003, 315: 113-122