

# 基于 HPLC - MS 脂质组学研究棕榈酸 对人正常肝细胞脂质代谢的影响

宋丹<sup>1,2</sup>, 许超<sup>1</sup>, 刘蓉<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 食品科技学院, 南京 210095; 2. 浙江农林大学 动物科技学院、动物医学院, 杭州 311300)

**摘要:**对棕榈酸(PA)处理的人源肝细胞中的脂质进行脂质组学分析,探讨PA对肝细胞脂质代谢的影响。采用基于HPLC-MS的脂质组学技术,识别和量化PA处理人正常肝细胞后改变的内源性脂质代谢产物,并利用流式细胞仪检测细胞周期变化。结果表明,通过脂质组学分析共检测到1 000多种脂质代谢物,又可细分为22种质类别,根据正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)显示有628种脂质代谢物含量存在显著差异。其中PA处理组中溶血磷脂酰胆碱(LPC)、磷脂酰肌醇(PI)、神经酰胺(Cer)、己糖神经酰胺(Hex1Cer)、鞘氨醇(SPH)、甘油二酯(DG)、甘油三酯(TG)、酰基肉碱(AcCa)和N-酰基乙醇胺(AEA)含量显著升高,鞘磷脂(SM)、二己糖神经酰胺(Hex2Cer)和胆固醇酯(ChE)含量显著下降。与对照组相比,PA处理组G0/G1期细胞比例下降,S期和G2/M期细胞比例上升,即细胞周期发生阻滞。综上,PA显著改变了肝细胞的脂质代谢谱,诱导细胞G2/M期阻滞。

**关键词:**棕榈酸;脂质组学;HPLC-MS;细胞周期

中图分类号:TS201.4;R575.5 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)10-0075-07

## Effect of palmitic acid on lipid metabolism of human normal liver cells based on HPLC - MS lipidomics

SONG Dan<sup>1,2</sup>, XU Chao<sup>1</sup>, LIU Rong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technology · College of Veterinary Medicine,

Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

**Abstract:** Lipidomics analysis of lipids in palmitic acid (PA) - treated human - derived hepatocytes was performed to explore the effect of PA on hepatocyte lipid metabolism. HPLC - MS - based lipidomics technique was used to identify and quantify the endogenous lipid metabolites altered after PA administration, and cell cycle analysis was performed by flow cytometer. The results showed that 1 000 lipid metabolites subdivided in to 22 lipid classes were identified by lipidomics analysis and 628 lipid species levels showed significant difference according to the orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS - DA). Among them, lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylinositol (PI), ceramide (Cer), hexose1ceramide (Hex1Cer), sphingosine (SPH), diglyceride (DG), triglyceride (TG), acetylcarnitine (AcCa) and N - acyl ethanolamine (AEA) were significantly higher in the PA - treated group, and sphingomyelin (SM), hexose2ceramide (Hex2Cer) and cholesteryl ester (ChE) significantly decreased. Compared with the control group, the proportion of cells in G0/G1 phase decreased and those in S and G2/M phase increased in the PA - treated group. In conclusion, PA

significantly altered the lipid metabolic profile of hepatocytes and induced cellular G2/M phase arrest.

**Key words:** palmitic acid; lipidomics; HPLC - MS; cell cycle

收稿日期:2020-11-30;修回日期:2021-06-22

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0400200)

作者简介:宋丹(1992),女,博士研究生,研究方向为分子营养与人类健康(E-mail)songdansd521@163.com。

通信作者:刘蓉,博士生导师(E-mail)liurongh010@163.com。

棕榈酸 (PA) 是 16 碳长链饱和脂肪酸, 分子式为  $C_{16}H_{32}O_2$ 。棕榈酸是许多膳食脂肪中常见的饱和脂肪酸, 约占花生油中脂肪酸总量的 13%, 黄油的 65%, 猪油的 42%, 牛油的 53%, 大豆油的 15%, 玉米油的 13%, 橄榄油的 17%<sup>[1]</sup>。PA 也是人体中最常见的饱和脂肪酸, 约占人体饱和脂肪酸的 65%, 占血清总脂肪酸的 28%~32%。人体内的 PA 是由饮食提供, 或由碳水化合物、氨基酸和其他脂肪酸内源性合成的<sup>[2]</sup>。在动物和人类中, 过量摄入 PA 会引起代谢紊乱, 从而导致脂肪毒性和肥胖相关疾病<sup>[3]</sup>。据报道, PA 与慢性肝病的发生风险也密切相关, PA 通过调节脂质代谢, 如诱导肝内甘油三酯的积累, 增加鞘氨醇 1-磷酸的浓度, 进而促进非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 的发生<sup>[4-5]</sup>。此外, PA 通过产生毒性代谢物溶血磷脂-胆碱参与脂性凋亡<sup>[6]</sup>, 还可通过诱导细胞周期的改变, 影响细胞增殖<sup>[7-8]</sup>。目前, 关于 PA 毒性的研究取得了很大进展, 其在分子水平上已作为信号分子调控许多疾病的发展, 但是 PA 激活各种信号分子的机制还没有被完全解释<sup>[1]</sup>。

脂质组学是研究生物样品中脂质功能和代谢的<sup>[9]</sup>, 应用脂质组学技术能够追踪脂质代谢产物和脂类之间的相互转化, 是了解脂质相关疾病发生机制的有力工具<sup>[10]</sup>。目前, 大量的研究都是基于靶向和非靶向的脂质组学<sup>[9,11]</sup>。尽管很多报告提出 PA 具有潜在的不健康影响, 但其代谢机制较为复杂, 还没有研究探讨 PA 处理的人肝细胞脂质代谢谱的变化。因此, 本研究基于 HPLC-MS 脂质组学分析 PA 处理后脂质代谢谱的变化, 识别 PA 改变的关键差异代谢物, 以期深入理解 PA 诱导的肝细胞代谢差异提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

棕榈酸, 购自 Cayman 公司 (美国), 溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 终浓度为 280 mmol/L; 甲醇和氯仿 (色谱级), Sigma 公司 (美国); 氢氧化钾溶液, 凌峰化学试剂有限公司; BCA 蛋白试剂, 上海碧云天公司 (中国); Annexin V/FITC-PI (荧光素异硫氰酸-碘化丙啶) 细胞周期检测试剂盒, 南京诺唯赞生物公司 (中国)。

#### 1.1.2 仪器与设备

CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (Thermo, 美国); 生物安全柜 (Thermo, 美国); 中速离心机 (Thermo, 美国); Q Exactive Orbitrap 质谱仪偶联 HPLC 设备 (Thermo,

美国); 流式细胞仪 (BD, 美国); 精密电子天平 (Sartorius, 德国)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养和处理

将人正常肝细胞 HL-7702 培养于含 10% 胎牛血清 (Cegrogen, 南非) 和 1% 青霉素-链霉素溶液 (Hyclone, 美国) 的 RPMI 1640 培养基中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。在细胞对数生长期使用终浓度为 70 μmol/L 的 PA 处理 12 h, 设为 PA 处理组, 而将添加同等体积 DMSO 的组设为对照组。

### 1.2.2 细胞脂质代谢物的提取

细胞脂质代谢物的提取要求细胞量至少达到  $5 \times 10^6$  个/mL 以上。将按 1.2.1 方法得到的 PA 处理组和对照组的培养基吸除, 使用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 分别收集对照组和 PA 处理组的细胞各 7 份, 转移到玻璃管中, 添加 4 倍体积的氯仿-甲醇混合液 (体积比 2:1), 混合数次, 于 3 000 r/min 下离心 15 min, 此时玻璃管内的混合物被分为 3 层, 即上层的水相、下层的有机相、水相和有机相连接处的蛋白质层。用玻璃注射器将下层的有机相转移到新的玻璃管中, 用氮吹仪吹干, 得到干燥的脂代谢提取物, 尽快用于检测分析。中间的蛋白质层用 1 mL 0.1 mol/L KOH 溶液于 4℃ 过夜完全溶解, 采用 BCA 法<sup>[12]</sup> 测定蛋白质浓度, 以用于脂质定量分析。

### 1.2.3 脂质组学的 HPLC-MS 分析

HPLC 条件: Cortecs C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, Waters); 流动相 A 是将 0.77 g 乙酸铵溶解到 400 mL HPLC 级水中, 然后加入 600 mL HPLC 级乙腈制得, 流动相 B 是由 100 mL 乙腈和 900 mL 异丙醇混合而成; 梯度洗脱程序为 0 min 37% B, 1.5 min 37% B, 4 min 45% B, 5 min 52% B, 8 min 58% B, 11 min 66% B, 14 min 70% B, 18 min 75% B, 20 min 98% B, 22 min 98% B, 22.1 min 37% B, 25 min 37% B; 流速 220 mL/min。MS 条件<sup>[13]</sup>: 正电离模式设置为 3.2 kV, 负电离模式设置为 2.8 kV; 正、负离子模式的毛细管温度均为 320℃; 护套气体流量 (arb) 为 35; 辅助气体流量 (arb) 为 10; 正离子模式下的质谱范围为  $m/z$  240~2 000, 负离子模式下的质谱范围为  $m/z$  200~2 000; 全扫描时的分辨率为 70 000; MS/MS 的分辨率为 17 500; 每次扫描采集 10 个图谱; 正态曲线值 15/30/45; 工作周期 1.2 s。

使用 Lipidsearch 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 软件进行数据分析和脂质鉴定。

### 1.2.4 细胞周期分析

采用流式细胞仪分析细胞周期变化,按照 Annexin V/FITC - PI(荧光素异硫氰酸 - 碘化丙啶)细胞周期检测试剂盒说明书操作。

### 1.2.5 数据分析

关于脂质组学数据的分析,对获得的原始数据经过峰提取、校准、整合和归一化后,使用 SIMCA - P 软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS - DA),以评估 PA 处理组与对照组之间的差异,并对 OPLS - DA 模型进行 200 次置换检测,以验证此模型的可靠性。采用 Metabo Analyst3.0 在线分析系统构建热图和火山图,使检测到的代谢物的变化更加可视化。采用变量投影重要性(VIP)值总结各代谢物离子对分类判别的影响强度和解释力, VIP  $\geq 1$  被认为是具有显著的影响强度和解释力。根据 VIP > 1 和错误发现率(FDR) < 0.05 ( $p < 0.05$ ) 筛选具有显著差异的脂质代谢物, PA 处理组和对照组均有 7 个生物学重复。其他数据使用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析,

采用  $T$  - test 进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多元统计分析结果

为了比较 PA 处理组和对照组之间的脂质代谢变化,对经预处理后的脂质代谢物数据进行 PCA 和 OPLS - DA,结果如图 1A、图 1B 所示。由图 1A 和图 1B 可见, PA 处理组和对照组之间有明显的分离,没有重叠,并且 PA 处理组和对照组均具有较好的组内重复性,这表明 PA 处理后,肝细胞内的脂质代谢物发生显著变化。随后对 OPLS - DA 模型进行 200 次置换检测,结果见图 1C。图 1C 中  $R^2$  是相关系数,表示模型的拟合效果,是一个定量的测量(范围 0 ~ 1),表示所建立的模型能在多大程度上代表真实的数据。图 1C 中  $Q^2$  表示 OPLS - DA 模型的预测能力,一般  $Q^2 > 0.5$  表示预测能力较好。由图 1C 可见,  $R^2$  和  $Q^2$  分别为 0.956 和 0.627,  $y$  轴的截距为 -0.409,所有  $Q^2$  均低于  $R^2$ ,这些参数表明 OPLS - DA 模型没有过拟合,且具有良好的分离性能和可预测性,数据可靠。

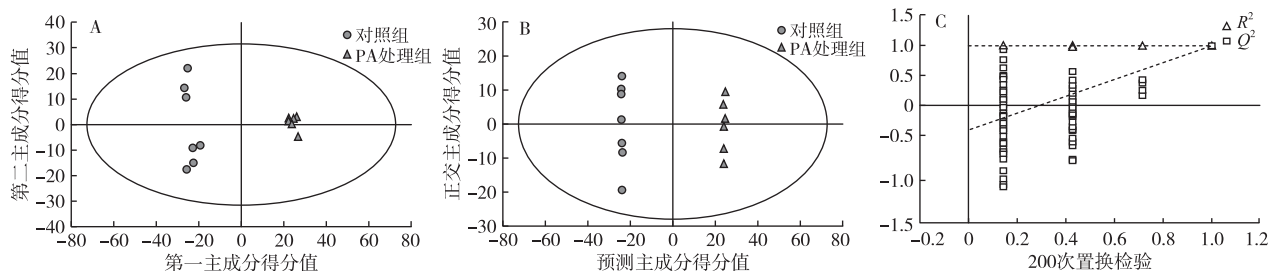


图 1 对照组和 PA 处理组的 PCA (A) 和 OPLS - DA (B) 得分图和验证图 (C)

## 2.2 差异脂质代谢物鉴定

### 2.2.1 脂质代谢物的火山图和聚类热图分析

为了更好地可视化 PA 处理组和对照组之间的差异,根据已鉴定的脂质代谢物建立火山图和聚类热图,结果分别见图 2 和图 3。

由图 2 可以看出,即使在阈值为 2.0 的情况下, PA 处理组和对照组之间仍存在大量显著差异的脂质代谢物。由图 3 可以看出, PA 处理组和对照组之间有明显的层次聚类。

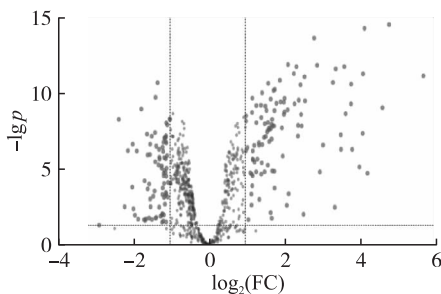


图 2 正负离子模式下的火山图

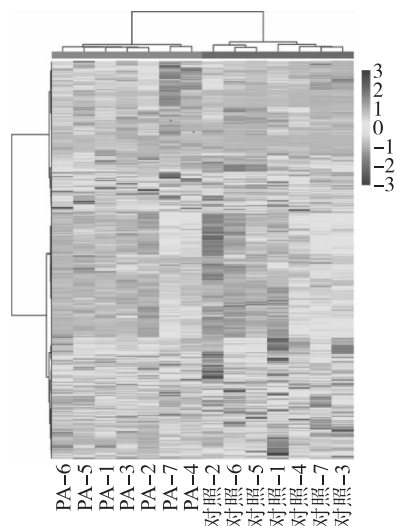


图 3 对照组和 PA 处理组内源性脂质代谢物的聚类热图

基于 HPLC - MS 的脂质组学分析,总共检测到了 1 000 多种脂质代谢物。所检测出的脂质代谢物属于 4 大类,即磷脂类、鞘脂类、中性脂类、脂肪酰基和其他脂类,又可细分为 22 种脂质类别。其中:磷

脂类包括溶血磷脂酰胆碱(LPC)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)和心磷脂(CL);鞘脂类包括鞘氨醇(SPH)、神经酰胺(Cer)、己糖神经酰胺(Hex1Cer)、二己糖神经酰胺(Hex2Cer)、三己糖神经酰胺(Hex3Cer)、神经节苷脂(GM3)、鞘磷脂(SM);中性脂类包括胆固醇酯(ChE)、甘油二酯(DG)、甘油三酯(TG);脂肪酰基和其他脂类包括N-酰基乙醇胺(AEA)、酰基肉碱(AcCa)、辅酶(Co)和脂肪酰基

(FA)。基于OPLS-DA模型,根据VIP > 1、FDR < 0.05,筛选出了628种具有显著差异的脂质代谢物。

### 2.2.2 差异脂质代谢物的直方图统计分析

对22种脂类的加合信号进行统计分析,对PA处理组和对照组之间同一种脂质的差异性进行T-test分析,结果见图4。由图4可见,PA处理组与对照组间有12种脂类的含量有显著差异。与对照组相比,PA处理组中LPC、PI、SPH、Hex1Cer、Cer、DG、TG、AEA和AcCa含量显著升高,而Hex2Cer、SM、ChE含量显著降低。

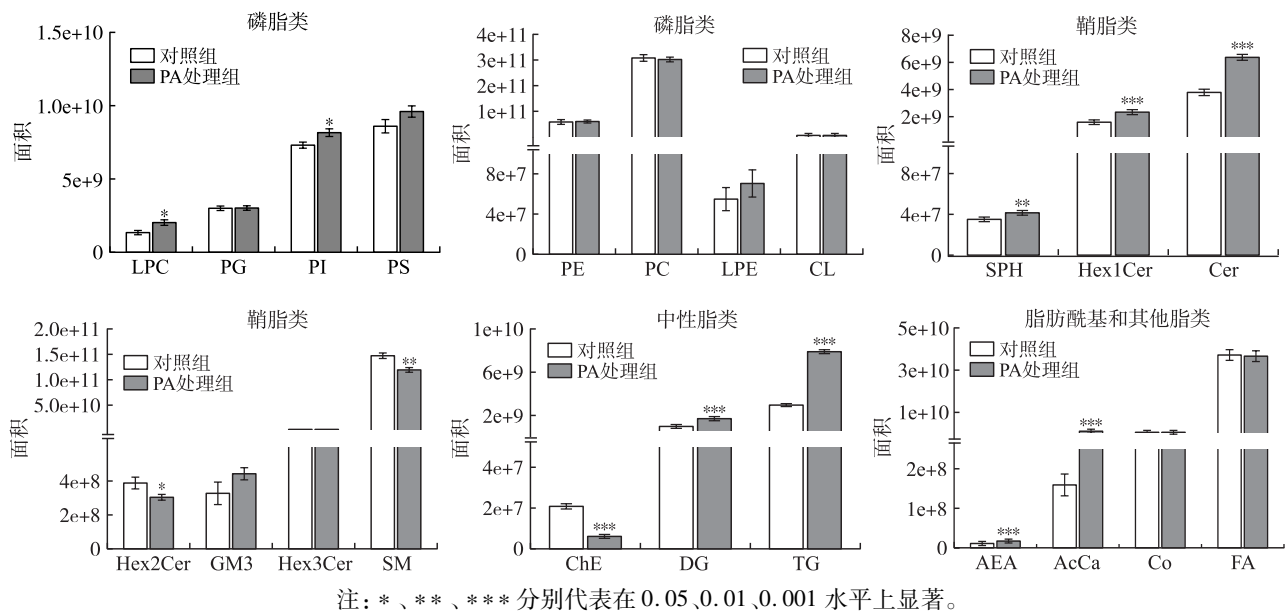


图4 22种脂类加合信号的直方统计图

### 2.2.3 具有显著性变化的代表性脂质代谢物箱形图分析

利用箱形图进一步揭示不同脂质类别中差异脂

质的表达情况。图5为磷脂类脂质代谢物中具有显著性变化的代表性LPC和PI的箱形图。

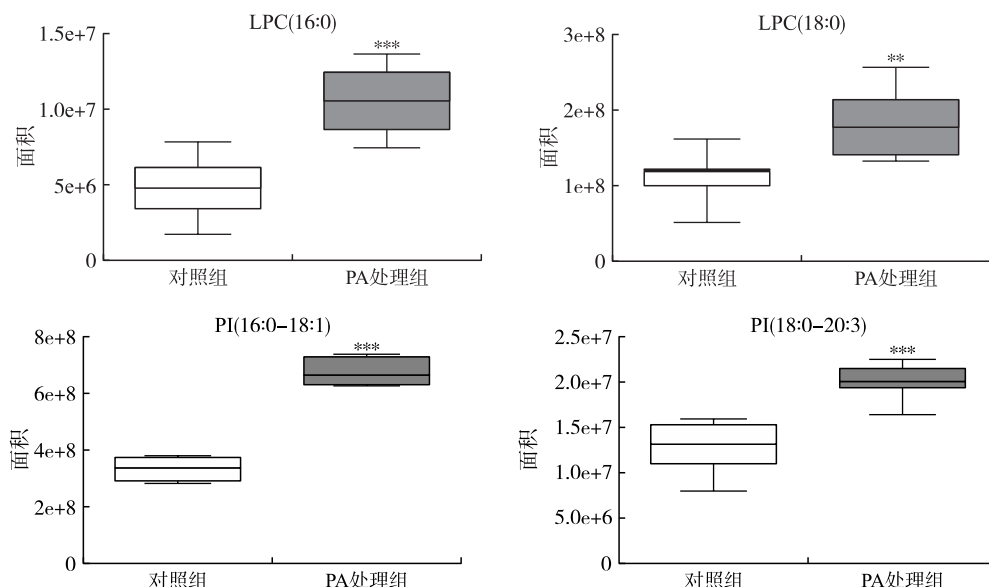


图5 代表性LPC和PI的箱形图

LPC 是 PA 诱导肝细胞脂肪凋亡的主要毒性代谢物和凋亡效应因子之一<sup>[13-14]</sup>。Lee 等<sup>[9]</sup>发现非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 患者肝脏中 LPC 的含量高。Deng 等<sup>[15]</sup>指出 NAFLD 患者肝脏中 LPC (16:0) 和 LPC (18:0) 的含量较高。这与本文的研究结果一致,即 PA 处理组中 LPC 的含量明显增加,尤其是 LPC (16:0) 和 LPC (18:0) (图 5)。PI 是一种膜磷脂,在细胞生理

和信号转导中起关键作用。有报道称,与健康人群相比,NASH 患者的 PI 含量明显上调,其中以 PI (16:0-18:1) 和 PI (18:0-20:3) 为代表的 PI 在肝癌中显著升高<sup>[16-17]</sup>。本文的研究结果显示 PA 处理组 PI (16:0-18:1) 和 PI (18:0-20:3) 含量显著上调(图 5)。

图 6 和图 7 分别为鞘脂类脂质代谢物中具有显著性变化的代表性 Cer 和 Hex1Cer 的箱形图。

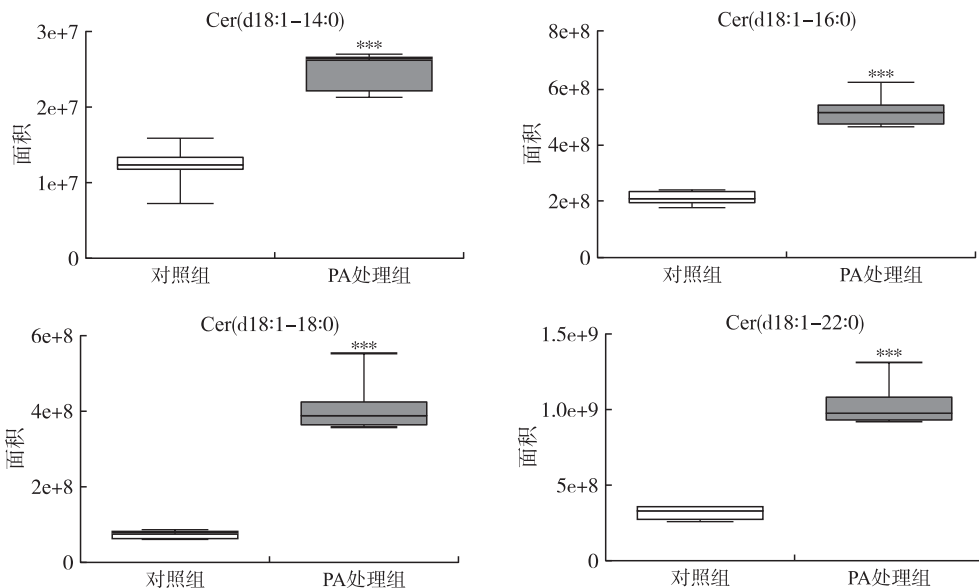


图 6 代表性 Cer 的箱形图

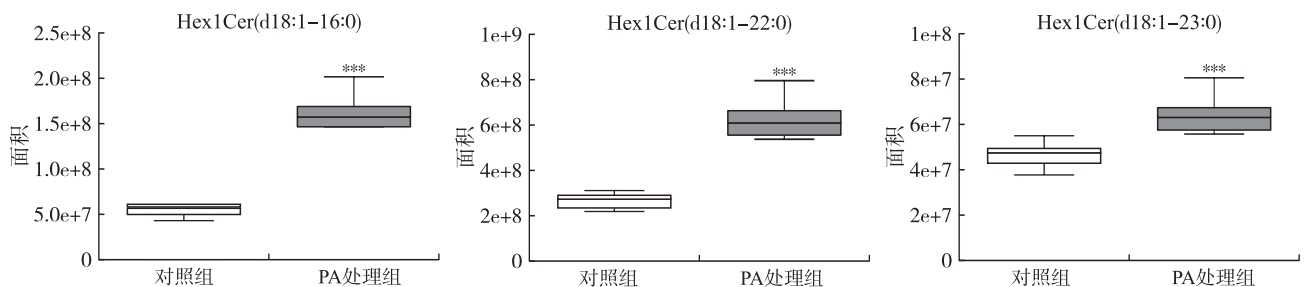


图 7 代表性 Hex1Cer 的箱形图

鞘脂是一类具有生物活性的分子,在细胞增殖、凋亡和分化等多种细胞过程中发挥着重要作用,其与 NAFLD 和 NAFLD 源性肝癌等肝脏疾病的发生有关<sup>[18-19]</sup>。Cers 是鞘脂代谢的中心分子<sup>[20]</sup>。以往的研究结果表明,NAFLD 患者血清中总 Cer 浓度较高,其中 Cer (d18:1-14:0)、Cer (d18:1-16:0)、Cer (d18:1-18:0)、Cer (d18:1-22:0) 含量显著升高<sup>[21]</sup>,并且降低 Cer 浓度可改善 NAFLD 的症状<sup>[22]</sup>。另外,神经酰胺酶可以将 Cer 分解为 SPH,已有研究指出,NAFLD 患者和慢性肝炎患者的 SPH 水平均高于健康个体<sup>[23]</sup>。在本文的研究结果中,PA 处理后 SPH 和 Cer 含量显著上调(图 4),Cer (d18:1-14:0)、Cer (d18:1-16:0)、Cer (d18:1-18:0)、

Cer (d18:1-22:0) 含量也明显升高(图 6)。

此外,Hex1Cer 的积累与肝脏疾病的风险增加有关。研究表明,Hex1Cer (d18:1-16:0)、Hex1Cer (d18:1-22:0)、Hex1Cer (d18:1-23:0) 和 Hex1Cer (d18:1-24:1) 的含量在慢性丙肝和 NASH 患者体内较高<sup>[24-25]</sup>。在本文的研究结果中,Hex1Cer (d18:1-16:0)、Hex1Cer (d18:1-22:0) 和 Hex1Cer (d18:1-23:0) 这 3 种己糖神经酰胺含量显著上调(图 7)。

图 8 为中性脂类脂质代谢物中具有显著性变化的代表性 DG 的箱形图。

一些研究报道指出,NAFLD 患者中 DG 和 TG 总浓度升高<sup>[26]</sup>,并且 TG 的积累被认为是 NAFLD 的

一个关键特征<sup>[26-27]</sup>。在本文的研究结果中,PA处理后TG和DG含量显著增加(图4),特别是某些特

定的DG种类,如DG(16:0-16:0)、DG(18:0-16:0)、DG(16:0-18:1)和DG(18:0-18:1)(图8)。

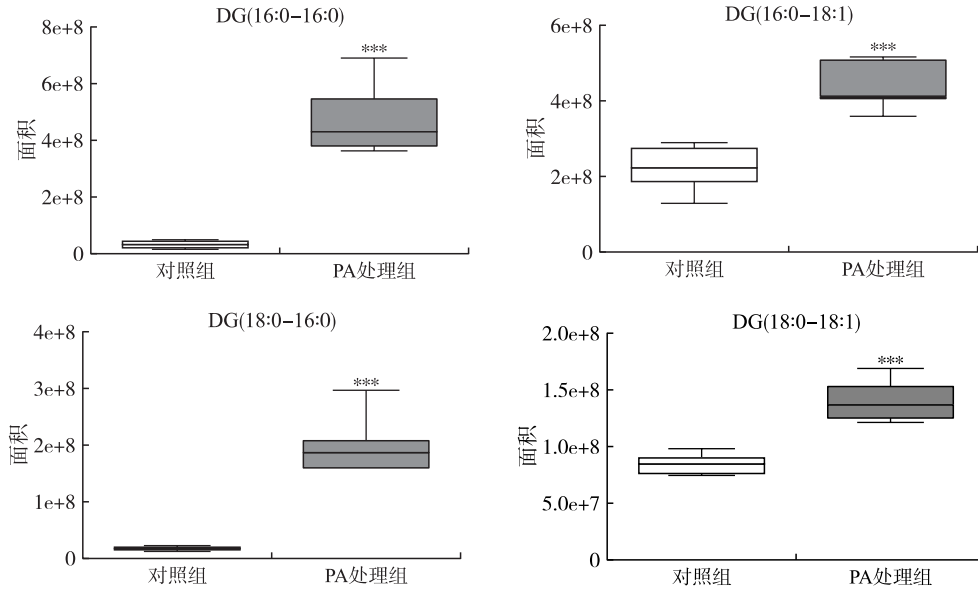


图8 代表性DG的箱形图

### 2.3 细胞周期的变化

PA除了调节脂质代谢外,还会干扰细胞周期。采用流式细胞仪对PA处理12h和48h的HL-7702细胞和对照组进行细胞周期分析,结果见图9。由图9可见,与对照组比较,PA处理12h和48h后

G0/G1期细胞比例显著降低,而S期和G2/M期细胞比例显著增加,且在处理48h时细胞周期各个阶段细胞比例差异更明显,说明细胞周期阻滞发生在G2/M期。这与之前的研究<sup>[7-8]</sup>一致,即PA可以诱导细胞周期阻滞在G2/M期,从而调节细胞增殖。

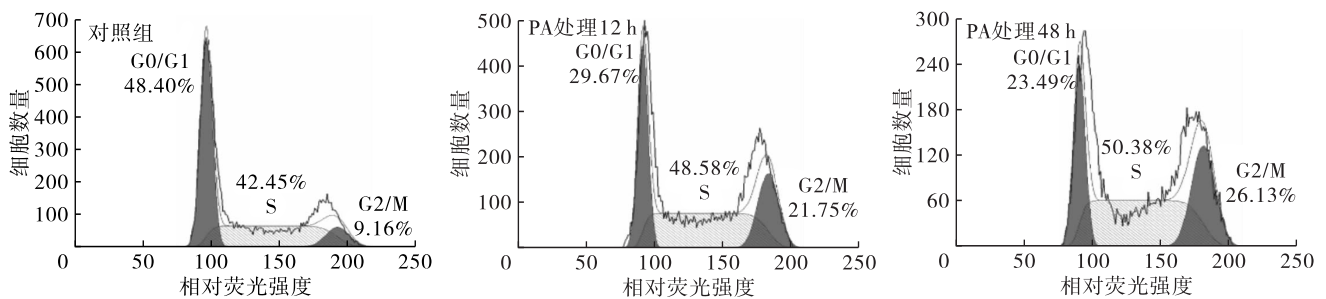


图9 细胞周期变化

### 3 结论

基于HPLC-MS的脂质组学分析了PA的代谢组学特征。结果表明,PA引起脂质代谢谱的明显变化,干扰细胞内代谢物的平衡。总共鉴定了628种具有显著差异的脂质代谢物,特别是LPC(16:0)、LPC(18:0)、PI(16:0-18:1)、PI(18:0-20:3)、Cer(d18:1-14:0)、Cer(d18:1-16:0)、Cer(d18:1-18:0)、Cer(d18:1-22:0)、Hex1Cer(d18:1-16:0)、Hex1Cer(d18:1-22:0)、Hex1Cer(d18:1-23:0)、DG(16:0-16:0)、DG(18:0-16:0)、DG(16:0-18:1)和DG(18:0-18:1)含量显著改变。PA处理还降低了G0/G1期细胞比例,增加了S期和G2/M期细胞比例,说明PA诱导细胞周期阻滞发生在G2/M期。本文的研究有助于探索PA对肝脏细胞代谢的影

响,并为进一步的研究提供基础。

### 参考文献:

- [1] FATIM S, HU X J, GONG R H, et al. Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(13): 2547-2557.
- [2] INNIS S M. Palmitic acid in early human development[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 56:1952-1959.
- [3] KHODABANDEHLOO H, GORGANI - FIRUZJAEI S, PANABI G, et al. Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and *beta* - cell dysfunction[J]. *Transl Res*, 2016, 167(1): 228-256.
- [4] MARUYAMA H, KIYONO S, KONDO T, et al. Palmitate - induced regulation of PPARgamma via PGC1alpha: a mechanism for lipid accumulation in the liver in



- nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Med Sci*, 2016, 13(3): 169–178.
- [5] ALFADEL F, FAYYAZ S, JAPTOK L, et al. Involvement of sphingosine 1 – phosphate in palmitate – induced non – alcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1637–1645.
- [6] KAKISAKA K, CAZANA VE S C, FINGAS C D, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine – induced hepatocyte lipopapoptosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(1): 77–84.
- [7] WANG X, LIU J Z, HU J X, et al. ROS – activated p38 MAPK/ERK – Akt cascade plays a central role in palmitic acid – stimulated hepatocyte proliferation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(2): 539–551.
- [8] PARK E J, LEE A Y, PARK S, et al. Multiple pathways are involved in palmitic acid – induced toxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 67: 26–34.
- [9] LEE H C, YOKOMIZO T. Applications of mass spectrometry – based targeted and non – targeted lipidomics [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(3): 576–581.
- [10] WOLF C, QUINN P J. Lipidomics: practical aspects and applications [J]. *Prog Lipid Res*, 2008, 47(1): 15–36.
- [11] HAN X, YANG K, GROSS R W. Multi – dimensional mass spectrometry – based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2012, 31(1): 134–178.
- [12] REICHEL T W N, WALDSCHITZ D, HERWIG C, et al. Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(9): 1271–1280.
- [13] GRIFFITHS W J, WANG Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics [J]. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(7): 1882–1896.
- [14] MATTEONI C A, YOUNOSSI Z M, GRAMLICH T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity [J]. *Gastroenterology*, 1999, 116(6): 1413–1419.
- [15] DENG Y, PAN M, NIE H, et al. Lipidomic analysis of the protective effects of shenling Baizhu San on non – alcoholic fatty liver disease in rats [J/OL]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3943 [2020 – 11 – 30]. <https://doi.org/10.3390/molecules24213943>.
- [16] LI Z, GUAN M, LIN Y, et al. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by liver lipidomics [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2550 [2020 – 11 – 30]. <https://doi.org/10.3390/ijms18122550>.
- [17] MA D W, ARENDT B M, HILLYER L M, et al. Plasma phospholipids and fatty acid composition differ between liver biopsy – proven nonalcoholic fatty liver disease and healthy subjects [J/OL]. *Nutr Diabetes*, 2016, 6(7): e220 [2020 – 11 – 30]. <https://doi.org/10.1038/nutd.2016.27>.
- [18] HANNUN Y A, OBEID L M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2): 139–150.
- [19] SIMON J, OURO A, ALA – IBANIBO L, et al. Sphingolipids in non – alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: ceramide turnover [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 40 [2020 – 11 – 30]. <https://doi.org/10.3390/ijms21010040>.
- [20] MULLEN T D, OBEID L M. Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death [J]. *Anti – Cancer Agent Me*, 2012, 12(4): 340–363.
- [21] WASILEWSKA N, BOBRUS – CHOCIEJ A, HARASIM – SYMBOR E, et al. Increased serum concentration of ceramides in obese children with nonalcoholic fatty liver disease [J/OL]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 216 [2020 – 11 – 30]. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0855-9>.
- [22] KUREK K, PIOTROWSKA D M, WIESIOLEK – KUREK P, et al. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2014, 34(7): 1074–1083.
- [23] GRAMMATIKOS G, MUHLE C, FERREIROS N, et al. Serum acid sphingomyelinase is upregulated in chronic hepatitis C infection and non alcoholic fatty liver disease [J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2014, 1841(7): 1012–1020.
- [24] SILSIRIVANIT A, PHOOMAK C, TEERAVIROTE K, et al. Overexpression of HexCer and LacCer containing 2 – hydroxylated fatty acids in cholangiocarcinoma and the association of the increase of LacCer (d18:1 – h23:0) with shorter survival of the patients [J]. *Glycoconj J*, 2019, 36(2): 103–111.
- [25] ZHANG J Y, QU F, LI J F, et al. Up – regulation of plasma hexosylceramide (d18:1/18:1) contributes to genotype 2 virus replication in chronic hepatitis C: a 20 – year cohort study [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(23): e3773 [2020 – 11 – 30]. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003773>.
- [26] PURI P, BAILLIE R A, WIEST M M, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2007, 46(4): 1081–1090.
- [27] GOLDBERG I J, GINSBERG H N. Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(4): 1343–1346.