

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.04.003

LC-MS/MS 法检测猪内脏和肌肉中 N-乙酰神经氨酸、N-羟乙酰神经氨酸和脱氨神经氨酸浓度的研究*

吉素娜 王芳 张盼望 陈越 杨长伟 王冰[△]

(厦门大学医学院基础医学系 神经营养研究室 福建 厦门 361102)

摘要 目的: 建立液相色谱-三重四级杆质谱联用法(LC-MS/MS)测定猪内脏和肌肉组织中唾液酸 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)和脱氨神经氨酸(KDN)浓度的分析方法。方法: 将内脏肉组织匀浆后, 利用三氟乙酸(TFA)将结合态的唾液酸从糖脂或糖蛋白链上解离下来后进样分析。色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18(5 μm, 4.6×250 mm, Waters), 流动相为 0.1% 醋酸铵-100%乙腈(9:1), 柱温 25℃, 流速 800 μL·min⁻¹, 进样量 20 μL。质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为多重反应监测(MRM), 监测离子对: Neu5Ac 307.7→87.0, Neu5Gc 323.3→116.0, KDN 266.7→87.0, 13C3Neu5Ac 内标品 310.9→90.0。结果: Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 分别在 0.1~20.0、0.05~10.00 和 0.005~1.000 μmol·L⁻¹ 的浓度范围内和对照品与内标峰面积比值线性关系良好, 重复性平均 RSD 为 1.2%, 稳定性平均 RSD 为 1.9%, 日间和日内精密密度试验 RSD 均小于 6.7%, 平均回收率为 92.9~106.4%。结论: 本方法简便、快速、灵敏度高, 可广泛运用于组织和体液中唾液酸的测定。
关键词 液相色谱-三重四级杆质谱联用; N-羟乙酰神经氨酸; N-乙酰神经氨酸; 脱氨神经氨酸; 猪内脏组织
中图分类号: R-33; R446; R151.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2017)04-610-05

Determination for the Contents of Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in Organ Meats and Muscle of Pigs by LC-MS/MS*

JI Su-na, WANG Fang, ZHANG Pan-wang, CHEN Yue, YANG Chang-wei, WANG Bing[△]

(Department of neurotrophology, Medicine of Xiamen University Medicine college, Xiamen, Fujian, 361102, China)

ABSTRACT Objective: To establish an LC-MS/MS method for the detection of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononic acid (KDN) in organ meats and muscle of pigs. **Methods:** Tissues were acid hydrolyzed with trifluoroacetic acid (TFA) to get ganglioside-bound and glycoprotein-bound sialic acid, followed by injected and analyzed. The analysis was performed on an ZORBAX Eclipse Plus C18 (5 μm, 4.6×250 mm, Waters) column, and the mobile phase consisted of 0.1% ammonium-100% acetonitrile (9:1), the flow rate was 800 μL/min, the temperature was maintained at 25 °C, injection volume was set up 20 μL. Negative electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) mode was used, MRM: Neu5Ac: 307.7→87.0, Neu5Gc: 323.3→116.0, KDN: 266.7→87.0, 13C3Neu5Ac (IS): 310.9→90.0. **Results:** The ratio of internal with standard sample peak area and content of Neu5Ac, Neu5Gc and KDN showed good linearity in the range of 0.1~20.0, 0.05~10.00, and 0.005~1.000 μmol/L, RSDs of the repeatability and stability were 1.2% and 1.9%, Intra- and inter-day RSDs were all lower than 6.7%, the recoveries of sialic acid were 92.9~106.4%. **Conclusion:** The established method is simple, accurate and rapid, higher sensitivity and can be applied to determination of Neu5Gc, Neu5Ac and KDN in tissues and fluid of animals and human.

Key words: LC-MS/MS; Neu5Ac; Neu5Gc; KDN; Pigs organ**Chinese Library classification (CLC):** R-33; R446; R151.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2017)04-610-05

前言

唾液酸(sialic acid, Sia)是以九碳糖神经氨酸为基本结构的一类衍生物的总称^[1-3]。通常位于糖蛋白和糖脂等大分子的末端,是动物细胞膜上的糖蛋白和糖脂的重要组成部分^[4]。唾液酸具有多种生物学功能比如:细胞的增值、分化和识别^[5];与病原微生物的相互作用^[6],参与免疫反应,促进神经系统发育^[7],易化

记忆的形成,提高学习能力等。

唾液酸在哺乳动物组织和体液中分布广泛,如大脑、肝脏、唾液腺、乳腺、泪液、血浆和尿液等都含有丰富的唾液酸^[8]。目前,唾液酸家族已经有 50 多个成员,Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 是其最常见的核心单体^[9,10](见图 1)。在人体正常组织中却很难检测到唾液酸的存在,这是因为人类在进化过程丢失了合成 CMP-神经氨酸羟化酶(CMAH)基因,而 CMAH 是合成

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31271038)

作者简介:吉素娜(1991-),硕士研究生,主要从事营养学研究, E-mail: Alinajsn@126.com

△ 通讯作者:王冰,教授,博士生导师,主要从事神经营养生物学研究, E-mail: biwang@csu.edu.au

(收稿日期:2016-04-26 接受日期:2016-05-21)

Neu5Gc的关键酶^[11,12]。然而在人体内癌症组织和胎儿中仍能检测 Neu5Gc 的存在^[13]。日常的饮食,如红肉和牛奶中富含 Neu5Gc 是人体内 Neu5Gc 的主要来源^[13,14]。研究表明,从红肉(主要指牛肉、羊肉和猪肉等)中摄取的 Neu5Gc 和疾病,如癌症、心血管疾病和炎症性疾病等有着密切的关系^[15]。Neu5Gc 小部分经代谢吸收进入人体内^[16],被当作抗原来识别,产生抗 Neu5Gc 的抗体,抗原和抗体发生反应从而引发炎症,促进肿瘤生长^[17,18]。

近年来红肉中 Neu5Gc 的研究也成为热点。猪内脏肉

在中国的传统饮食中较为常见,如猪肝、猪心含有丰富的蛋白质、微量元素铁、锌和维生素^[19]等,能够满足人们营养所需^[20]。然而 Neu5Gc 在猪内脏中的含量目前尚不清楚。因此,测定猪内脏肉 Neu5Gc 的含量,对将使人们关于饮食中肉类的选择以及相关研究具有重要的指导意义。本文在参考文献的基础上建立了快速、简单和灵敏度更高的液相色谱-质谱联用方法(LC-MS/MS)对猪心、猪肝、猪肾、猪肺和猪瘦肉的唾液酸进行测定,比较猪内脏肉和猪瘦肉中 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的浓度差异。

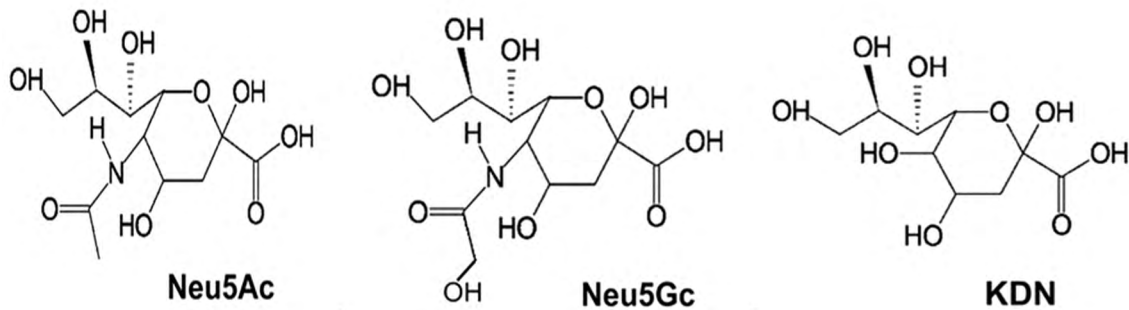


图 1 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Neu5Ac, Neu5Gc and KDN

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成年猪(杜洛克猪×长白猪×大约克夏,约 180~200 d)内脏购于厦门银祥集团有限公司,猪瘦肉购于厦门市翔安区人人乐超市,厦门市新华都超市。Neu5Ac、Neu5Gc、KDN 标准品和 ¹³C₃Neu5Ac 内标品(IS)购自美国 Sigma 公司;甲醇与乙腈均为色谱纯,三氟乙酸和醋酸铵购自国药集团化学试剂有限公司。0.22 μm 有机滤膜购自上海麦约尔生物有限公司。

1.2 仪器

Agilent 1100 液相色谱仪,Agilent 6430 三重四级杆液质联用系统,均购自美国 Agilent 公司,超速冷冻离心机,购自美国 sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18(5 μm, 4.6×250 mm, Waters),保护柱为 Eclipse Plus C18(4.6×12.5 mm, 5 μm),流动相为 0.1%醋酸铵(A)-100%乙腈(B)梯度洗脱(0~0.5 min 100% A, 0.5~3.0 min 10% B, 3.5~4.0 min 100% A),流速 800 μL·min⁻¹,柱温 25℃,进样量 20 μL。

1.3.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI),源温度 100℃,探针温度 300℃,源电压 3500 V,喷雾氮气压强 60psi,负离子方式检测,扫描方式为多重反应监测(MRM)。监测离子对、碰撞气能量和分段电压见表 1。

1.3.3 组织样品的制备 取内脏和瘦肉组织,用刀片切取 50~100 mg 放入离心管中,用剪刀剪碎,加入磷酸盐缓冲液(PBS)1.1 mL,进行匀浆(冰上操作)。游离唾液酸的测定:取匀浆液 500 μL,然后于 4℃,12000×g 离心 20 min,将上清液用 0.22 μm 的有机滤膜过滤,取滤液加入一定量内标进行

表 1 四种物质的监测离子对、碰撞气能量和分段电压

Table 1 Monitoring ion pairs, collision energy and fragmentation voltage of the four pounds

	Monitoring ion Pairs (m/z)	Collision energy (-v)	Fragmentation voltage (-v)
Neu5Ac	307.7/87.0*	5	90
	307.7/169.8	5	90
Neu5Gc	323.7/185.8	8	90
	323.7/116.0*	8	90
KDN	266.7/87.0*	15	90
	266.7/128.9	15	90
IS	310.9/90.0*	5	90
	310.9/172.9	5	90

*Means quantitative analysis of ion pairs

LC-MS/MS 的分析。结合唾液酸的测定:取匀浆液 500 μL ,加入等体积的三氟乙酸(TFA), 80°C 孵育 2 h,其余步骤均与游离唾液酸处理方式相同,测得值减去游离态唾液酸含量即为结合态唾液酸含量。总唾液酸含量即是游离态和结合态 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的总和。

1.3.4 标准曲线的绘制 取对照品储备液稀释到 100 μL 和 1 μL 配制所需浓度的标准系列溶液,具体操作见表 2,所得混合对照品系列中各分析物的浓度分别为 Neu5Ac 0.1、0.2、0.4、

1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Neu5Gc 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, KDN 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100、0.200、0.500、1.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其中内标浓度均为 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,制备标准曲线。待 LC-MS/MS 基线平稳后按浓度梯度由低向高进样,以对照品浓度 $X(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 为横坐标,对照品与内标峰面积比值 Y 为纵坐标,作标准曲线,且每天建立一条标准曲线。

表 2 唾液酸标准曲线数据

Table 2 Data for preparing standard curve of sialic acid

Neu5Ac, μL	Neu5Gc, μL	KDN, μL	Purity water, μL	IS, μL	Neu5Ac, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Neu5G, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	KDN, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
10.0(1.0)	5.0(1.0)	0.5(1.0)	82.5	2.0	0.1	0.05	0.005
20.0(1.0)	10.0(1.0)	1.0(1.0)	67.0	2.0	0.2	0.10	0.010
40.0(1.0)	20.0(1.0)	2.0(1.0)	36.0	2.0	0.4	0.20	0.020
1.0(100.0)	0.5(100.0)	5.0(1.0)	91.5	2.0	1.0	0.50	0.050
2.0(100.0)	1.0(100.0)	10.0(1.0)	85.0	2.0	2.0	1.00	0.100
4.0(100.0)	2.0(100.0)	20.0(1.0)	72.0	2.0	4.0	2.00	0.200
10.0(100.0)	5.0(100.0)	0.5(100.0)	82.5	2.0	10.0	5.00	0.500
20.0(100.0)	10.0(100.0)	1.0(100.0)	67.0	2.0	20.0	10.00	1.000

Note: Figures in brackets mean the concentration of the control sample

1.3.5 最低检测限的测定 取 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 对照品溶液适量,加超纯水倍比稀释,进样测定,直至其峰高约为噪音的 3 倍,即以 3 倍信噪比($S/N=3$)的最低浓度作为分析物标准溶液的最低检测限(LOD)。

1.3.6 进样重复性试验 取同一份混合对照品溶液,连续进样 5 次,计算其稳定性。

1.3.7 稳定性试验 取同一份对照品混合溶液,分别于 1、2、4、6、8 h 时测定 Neu5Gc、Neu5Ac 和 KDN 的峰面积,观察其稳定性。

1.3.8 精密度试验 配制 Neu5Ac、Neu5Gc、KDN 和混合对照品的低、中、高三个浓度 (Neu5Ac 0.1, 1.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Neu5Gc 0.05, 0.50, 10.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; KDN 0.005, 0.050, 1.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的质量控制样本,每个浓度 5 个样本,并与标准曲线同批测定,以当日标准曲线计算质量控制样品的测得浓度,与配制的浓度对照,以 1 d 内测得的各物质浓度计算日内 RSD,连续测定 3 d,计算日间 RSD,计算本方法的精密度。

1.3.9 加标回收率试验 配制 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 混合对照品的低、中、高三个浓度 (Neu5Ac 0.1, 1.0, 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Neu5Gc 0.05, 0.50, 10.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; KDN 0.005, 0.050, 1.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 将其分别加入已知唾液酸浓度的样品中,进样分析,每个浓度测定三个重复,计算该方法的回收率。

2 结果

2.1 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的色谱总离子流图

在负离子模式下采用 MRM 扫描模式,得出总离子流图,见图 2。Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 保留时间均为 2.9 min,且响

应值差异较大,能够清楚地将这四种物质辨别出来,无杂峰产生,不受组织液中其它物质的干扰。

2.2 标准曲线

Neu5Ac 的标准曲线为 $y=0.319x+0.0506$ $r=0.9988$; Neu5Gc 的标准曲线为 $y=0.251x+0.0841$ $r=0.9998$; KDN 的标准曲线为 $y=0.253x+0.00169$ $r=0.9996$,表明 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 分别在 0.1~20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.05~10.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.005~1.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内呈线性,且线性关系较好。三种物质的最低检测限均为 0.001 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 重复性和稳定性

连续进样 5 次,Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 峰面积的 RSD 分别为 2.4%、0.6% 和 0.8%,说明该方法重复性良好;同一份对照品混合溶液,分别于 1、2、4、6、8 h 时测定 Neu5Gc、Neu5Ac 和 KDN 的峰面积, RSD 值分别为 1.6%、3.0% 和 1.1%,说明溶液中 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 在 8 h 内稳定。

2.4 精密度和回收率

日内、日间精密度和回收率结果见表 3。日内日间 RSD 均小于 7%,表明该方法精密度良好。样品的低加标量标准品的平均回收率在 92.9% 以上,中加标量标准品的平均回收率均在 96.3% 以上,高加标量标准品的平均回收率均在 106.4% 以上,说明该方法 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 损失较少,准确性较好。

2.5 猪内脏和猪瘦肉实例测定

猪肺、猪肾、猪心、猪肝和猪瘦肉中 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 浓度见表 4,所有浓度均在线性范围内。从结果中可以看出猪内脏中总唾液酸和 Neu5Gc 浓度明显比猪瘦肉中高的多,膳食摄入瘦肉比内脏肉更安全。

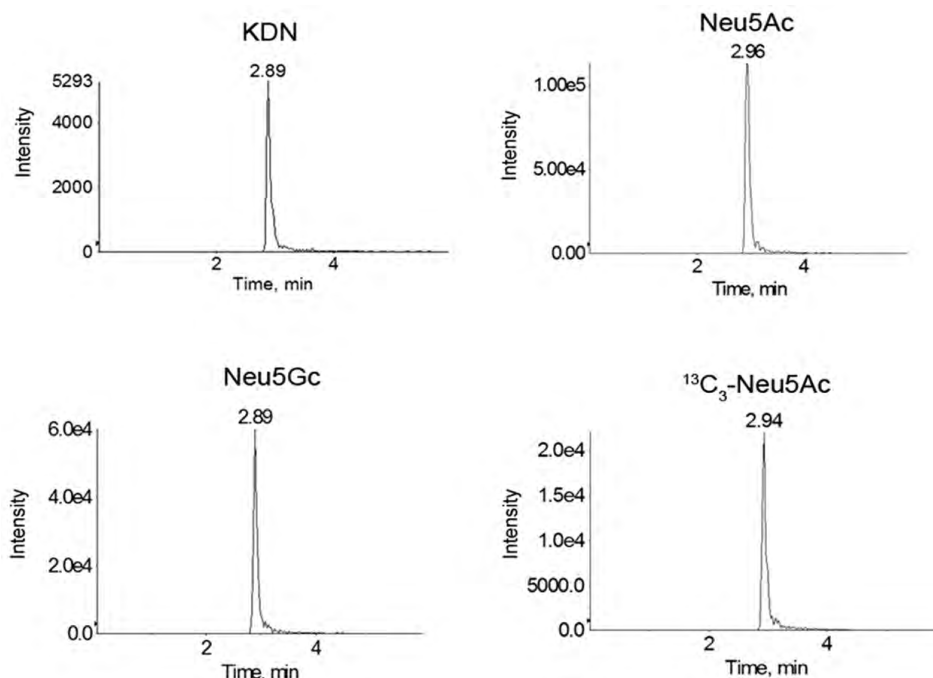


图 2 KDN、Neu5Ac、Neu5Gc 和 ¹³C₃ Neu5Ac 的色谱总离子流图

Fig. 2 The chromatograms of KDN, Neu5Ac, Neu5Gc 和 ¹³C₃ Neu5Ac

表 3 Neu5Gc、Neu5Ac 和 KDN 在低、中、高三个浓度的精密度和回收率

Table 3 Precision and recovery of Neu5Ac, Neu5Gc and KDN

Item	Concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Intra-day (RSD, %)	Inter-day (RSD, %)	Recovery (%)	RSD (%)
Neu5Ac	0.1	3.6	2.2	92.9	7.8
	0.10	6.7	6.3	96.8	3.2
	20.00	4.2	4.4	101.3	5.7
Neu5Gc	0.05	3.7	6.2	94.3	4.3
	0.50	2.9	1.3	98.4	3.8
	10.00	2.8	1.1	106.4	4.2
KDN	0.005	5.9	4.1	94.7	6.5
	0.050	2.7	6.7	96.3	3.9
	1.000	3.1	6.8	102.4	3.4

表 4 猪内脏和肌肉中 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的浓度

Table 4 Concentration of Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in organ meats and muscle of pigs

	Neu5Ac ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Neu5Gc ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	KDN ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Lung	4.1	6.5	0.2
Kidney	1.9	6.7	0.1
Heart	2.8	1.2	0.1
Liver	5.2	2.7	0.3
Muscle	1.1	0.3	0.1

3 讨论

唾液酸水解的关键在于如何将组织中的唾液酸从糖蛋白和糖脂链上释放出来。本试验采用 TFA 水解法^[21] 利用酸水解

断开唾液酸连接,唾液酸释放较为彻底,并且适应性好,无特异性。不同的组织和物种释放唾液酸的酸度和时间有差异,为了更准确测定唾液酸浓度,水解的酸度和浓度需要优化,否则会破坏分子结构。试验比较了心脏组织在 TFA 浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 孵育时间为 60 min、90 min、120 min、150 min 条件下释放出的唾液酸浓度。结果表明 TFA 浓度为 0.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 80 °C 水解 120 min 后测得样品中唾液酸浓度最高,即为最佳浓度和最佳水解时间。

由于不同组织中 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 含量差异较大,稀释比例较小时 Neu5Ac 超出标准曲线范围,稀释比例较大时无法检测到 KDN 的存在,所以进行 LC-MS/MS 分析时须进行预实验,找到合适的稀释比后,再进行批量分析。

与以往相关研究主要采用荧光 HPLC 相比,样品过滤后无需加入衍生剂^[22,23],大大节约了样品的处理时间;且荧光 HPLC 灵敏度较 LC-MS/MS 较低,不适用于微量物质 KDN 的检测。每个样品在液相色谱-质谱联用仪分析的时间为 3.2 min,提高了检测效率。本研究建立的方法用量少,分析时间短,操作便捷,精确度和灵敏度高,满足了本实验低含量样品的测定条件,可广泛运用于组织和体液中唾液酸浓度分析。

猪内脏和猪瘦肉中均能检测到微量的 KDN、Neu5Ac 和 Neu5Gc,不同的是 KDN 主要以游离态存在。目前关于 KDN 的生物学功能目前报道的较少,研究发现 KDN 在特定癌症组织中高表达,可以作为癌症临床前期诊断的一个生物指标^[24,25]。

本研究建立了简单快捷、准确、可靠的液相色谱-质谱联用分析方法,能够精确测定猪心脏、肝脏、脾脏、肾脏以及猪肌肉中 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 含量。为人们更好的理解摄取红肉中的 Neu5Gc 和癌症之间的关系,以及对饮食中猪肉的选择提供了参考。此外,也为唾液酸的临床研究提供了一些理论基础。虽然关于 Neu5Gc 的研究起步较晚,但由于它的生物学功能多样性以及其与疾病的密切关系,近年来受到了国内外学者的广泛关注。目前关于 Neu5Gc 在人体内聚集引发癌症作用机制的相关研究并不深入,Neu5Gc 在人体的特定肿瘤和癌症组织中的高表达有待进一步研究。

参考文献(References)

[1] Schauer R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids[J]. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1982, 40: 131-234

[2] Varki A, Schauer R. Sialic acids [M]//Varki A, Cummings R D, ESKO J D, et al. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY). 2009

[3] Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2009, 29(4): 177-222

[4] Schauer R, Kamerling J P. Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids[J]. *New comprehensive biochemistry*, 1995, 29: 243-402

[5] 魏冬旭,江连洲,王辰,等. 唾液酸生物活性及其应用的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(7): 64-68
Wei Dong-xu, Jiang Lian-zhou, Wang Chen, et al. Research progress on biological activity and its application of sialic acid [J]. *Food and Nutrition in China*, 2011, 17(7): 64-68

[6] Ten Bruggencate S J, Bovee-Oudenhoven I M, FEITSMA A L, et al. Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk oligosaccharides[J]. *Nutrition reviews*, 2014, 72(6): 377-389

[7] Wang B, Miller J B, Mcneil Y, et al. Sialic acid concentration of brain

gangliosides: Variation among eight mammalian species [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*, 1998, 119(1): 435-439

[8] Sillanauke P, Ponnio M, Jaaskelainen I. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders [J]. *European journal of clinical investigation*, 1999, 29(5): 413-425

[9] Bruggencate S J T, Bovee-Oudenhoven I M, Feitsma A L, et al. Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk oligosaccharides[J]. *Nutrition reviews*, 2014, 72(6): 377-389

[10] Chen X, Varki A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids[J]. *Acs Chem Biol*, 2010, 5(2): 163-176

[11] Varki A. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution [J]. *Am J Phys Anthropol*, 2001, Suppl 33: 54-69

[12] Davies L R, Varki A. Why Is N-Glycolylneuraminic acid rare in the vertebrate brain?[J]. *Top Curr Chem*, 2015, 366: 31-54

[13] Malykh Y N, Schauer R, Shaw L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours[J]. *Biochimie*, 2001, 83(7): 623-634

[14] Li H, Fan X. Quantitative analysis of sialic acids in Chinese conventional foods by HPLC-FLD [J]. *Open Journal of Preventive Medicine*, 2014, 04(2): 57-63

[15] Samraj A N, Pearce O M, Laubli H, et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(2): 542-527

[16] Wang B. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3 (3): 465-472

[17] Lofling J C, Paton A W, Varki N M, et al. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome [J]. *Kidney international*, 2009, 76(2): 140-144

[18] Hedlund M, Varki A. Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(48): 18936-18941

[19] Scheid H E, Schweigert B S. Vitamin B12 content of organ meats[J]. *J Nutr*, 1954, 53(3): 419-427

[20] 郭振东. 如何择食猪肉内脏[J]. *中国保健营养*, 1996, 2: 51-51
Guo Zhen-dong. How to chose organ meats of pigs [J]. *Chiese health and nutrition*, 1996, 2: 51-51

[21] Chen Y, Pan L L, Liu N, et al. LC-MS/MS quantification of N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid and ketodeoxyonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3- to 5-year-old children [J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 111 (2): 332-341

[22] 陈海娇,王萍,陈越,等. 高效液相色谱法测定母乳中唾液酸含量 [J]. *食品科学*, 2011, 32(16): 308-311
Chen Hai-jiao, Wang Ping, Chen Yue, et al. Determination of Total Sialic Acid Content in Human Milk by HPLC-FLD [J]. *Food Science*, 2011, 32(16): 308-311

[23] 姜水红,查圣华,谢丽芬,等. 燕窝中唾液酸含量测定方法的研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2009, 30(5): 315-317 (下转第 623 页)

- technique to measure pulmonary artery pressure by right heart catheterization in rats [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2014, 30(4): 757-762
- [10] 张利鹏, 杨敬平, 孙德俊, 等. 雾化吸入亚硝酸钠对低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉压力及 NO、H₂S 水平的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(1): 122-126
Zhang Li-peng, Yang Jing-ping, Sun De-jun, et al. Expression of NO and H₂S in hypoxic pulmonary hypertension and intervention of sodium nitrite in rats [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2010, 26(1): 122-126
- [11] Zhang HL, Luo Q, Liu ZH, et al. Abnormal expression of vesicular transport proteins in pulmonary arterial hypertension in monocrotaline-treated rats [J]. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2015, 47(3): 156-163
- [12] Polonio IB, Acencio MMP, Pazetti R, et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension[J]. Jornal Brasileiro De Pneumologia, 2012, 38(4): 452-460
- [13] Gomez-Arroyo J, Saleem SJ, Mizuno S, et al. A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects [J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2012, 302(10): L977-L991
- [14] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure [J]. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2009, 297(6): L1013-1032
- [15] Pristera N, Musarra R, Schilz R, et al. The Role of Echocardiography in the Evaluation of Pulmonary Arterial Hypertension [J]. Echocardiography, 2016, 33(1): 105-116
- [16] Rawat DK, Alzoubi A, Gupte R, et al. Increased reactive oxygen species, metabolic maladaptation, and autophagy contribute to pulmonary arterial hypertension-induced ventricular hypertrophy and diastolic heart failure[J]. Hypertension, 2014, 64(6): 1266-1274
- [17] Zaiman AL, Damico R, Thoms-Chesley A, et al. A Critical Role for the Protein Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension [J]. Circulation, 2011, 124(23): 2533-2542
- [18] Hennes AR, Zaiman A, Champion HC. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation [J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2008, 294(1): L24-L33
- [19] Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, et al. beta2-Adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats[J]. PloS one, 2014, 9(10): e110693
- [20] Zhang H, Luo Q, Liu Z, et al. Abnormal expression of vesicular transport proteins in pulmonary arterial hypertension in monocrotaline-treated rats[J]. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2015, 47(3): 156-163

(上接第 614 页)

- Jiang Shui-hong, Zha Sheng-hua, Xie Li-fen, et al. Study on the determination of sialic acid in edible bird's nest[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2009, 30(5): 315-317
- [24] 王芳, 王冰. 脱氨神经氨酸及其在肿瘤中表达的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(24): 5152-5155
- Wang Fang, Wang Bing. Progress on KDN (2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) and its Expression in tumor [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(24): 5152-5155
- [25] Wang F, Xie B, Wang B, et al. LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers[J]. Glycobiology, 2015, 25(12): 1362-1374