

• 食品生物技术 •

# 染料木黄酮对大鼠体内 *N*-羟乙酰神经氨酸含量的影响及其与唾液酸转移酶相互作用的探讨

李洪英<sup>1</sup>, 常瑞<sup>1</sup>, 朱秋劲<sup>1,2</sup>, 朱旭玲<sup>1</sup>, 徐阿奇<sup>1</sup>, 周樱子<sup>1</sup>, 晏印雪<sup>1</sup><sup>1</sup> 贵州大学 酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025<sup>2</sup> 贵州省农畜产品贮藏与加工重点实验室, 贵州 贵阳 550025

李洪英, 常瑞, 朱秋劲, 等. 染料木黄酮对大鼠体内 *N*-羟乙酰神经氨酸含量的影响及其与唾液酸转移酶相互作用的探讨. 生物工程学报, 2019, 35(5): 857–870.

Li HY, Chang R, Zhu QJ, et al. Effects of genistein on *N*-glycolylneuraminic acid content in rats and the interaction with sialyl transferase. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 857–870.

**摘 要:** 本研究旨在研究染料木黄酮 (Genistein, Gen) 对大鼠体内 *N*-羟乙酰神经氨酸 (*N*-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc) 生物合成的影响。选取 80 只 4 周龄 SD 雄性大鼠, 随机平均分为对照组和 Gen 组, 分别灌胃 5% 的乙醇溶液和 300 mg/(kg·d) 的 Gen 溶液。利用荧光高效液相色谱 (HPLC-FLD) 检测大鼠后腿肌肉、肾脏、肝脏组织中 Neu5Gc 的含量, 并采用 Gen 与唾液酸转移酶 (Sialyltransferase, ST) 分子对接, 初步探讨了其抑制 Neu5Gc 合成的机理。结果表明: 灌胃 15 d 时, 后腿肌肉和肝脏组织中的 Neu5Gc 的含量分别降低了 13.77% 和 15.45%, 而肾脏组织中 Neu5Gc 的含量变化差异不显著; 30 d 时, 在肌肉组织中未检出 Neu5Gc, 在肝脏组织中的 Neu5Gc 的含量降低了 13.35%, 肾脏组织中 Neu5Gc 的含量没有显著的变化; 45 d 时, 在后腿肌肉、肾脏组织和肝脏组织中的 Neu5Gc 含量分别降低了 32.65%、16.80% 和 32.78%; 60 d 时, 在后腿肌肉、肾脏组织和肝脏组织中 Neu5Gc 含量降低了 12.72%、12.30% 和 11.42%。Gen 与 ST 活性位点残基 His319、Ser151、Gly293、Thr328 形成氢键, 且与残基 His302、His301、Trp300、Ser271、Phe292、Thr328、Ser325、Ile274 形成疏水作用。因此分子间弱相互作用是导致 Gen 抑制 ST 活性的主要原因。该研究结果为后续开展宰前降低红肉中 Neu5Gc 的方法提供了基础实验方法支撑。

**关键词:** 染料木黄酮, *N*-羟乙酰神经氨酸, 分子对接, 唾液酸转移酶, 机理

**Received:** December 6, 2018; **Accepted:** January 29, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31660496), Guizhou High-level Innovative Talent Training Project (Qianke Cooperation Platform Talent No. [2016]5662), Guizhou University Graduate Innovation Project (No. GDTSSPGZZ 201707).

**Corresponding authors:** Qiuqin Zhu. Tel/Fax: +86-851-83624290; E-mail: ls.qjzhu@gzu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31660496), 贵州省高层次创新型人才培养项目 (黔科合平台人才 No. [2016]5662), 贵州大学研究生创新基金 (No. GDTSSPGZZ 201707) 资助。

# Effects of genistein on N-glycolylneuraminic acid content in rats and the interaction with sialyl transferase

Hongying Li<sup>1</sup>, Rui Chang<sup>1</sup>, Qiujiu Zhu<sup>1,2</sup>, Xuling Zhu<sup>1</sup>, Aqi Xu<sup>1</sup>, Yingzi Zhou<sup>1</sup>, and Yinxue Yan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

<sup>2</sup> Guizhou Province Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Storage and Processing, Guiyang 550025, Guizhou, China

**Abstract:** To investigate the effects of genistein (Gen) on the biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) in rats, 80 4-week-old male SD rats were randomly equally into the control and genistein groups. The rats of control and genistein groups were fed 5% ethanol and 300 mg/(kg·d) genistein respectively by gavage. The contents of Neu5Gc in hind leg muscle, kidney and liver tissues of rats were measured by using high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detector (HPLC/FLD), and the mechanism of inhibition of Neu5Gc synthesis was investigated by using the molecular docking of Gen and sialyltransferase. On the 15th day, the content of Neu5Gc in hind leg muscle and liver tissues decreased 13.77% and 15.45%, respectively, and there was no significant change in the content of Neu5Gc in kidney tissues. On the 30th day, the content of Neu5Gc in liver tissues decreased 13.35%, however, there was no significant change in the content of Neu5Gc in kidney tissues and Neu5Gc was not detected in hind leg muscle. The content of Neu5Gc in hind leg muscle, kidney and liver tissues decreased respectively 32.65%, 32.78%, 16.80% and 12.72%, 11.42%, 12.30% while rats fed on the 45th and the 60th days. Genistein has formed the hydrogen bond with sialyltransferase activity site residues His319, Ser151, Gly293, Thr328 and formed a hydrophobic interactions with the residues His302, His301, Trp300, Ser271, Phe292, Thr328, Ser325 and Ile274. The results of molecular docking indicated that the weak intermolecular interaction was the main cause of genistein inhibiting sialyltransferase activity. The research results provided an experimental basis for the subsequent reduction of Neu5Gc in red meat before slaughter.

**Keywords:** genistein, N-glycolylneuraminic acid, molecular docking, sialyltransferase, mechanism

红肉的摄入与癌症、心血管和炎症等疾病密切相关，这是因为红肉中含 Neu5Gc<sup>[1-7]</sup>。Neu5Gc 主要存在于脊椎动物体内，极少部分存在于微生物中，通常与糖蛋白或者糖脂以结合态的形式存在于体内，很少以游离的形式存在<sup>[8-10]</sup>。其中结合态 Neu5Gc 含量是游离态的 Neu5Gc 含量的 30 倍，游离态 Neu5Gc 仅占 2% 左右<sup>[11]</sup>，且结合态的 Neu5Gc 才具有引发炎症反应的生物学功能。

大多数哺乳动物自身能合成 Neu5Gc，但人类由于在进化的过程中丢失了编码胞苷-磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH) 基因，所以正常人体内不能合成 Neu5Gc<sup>[12-14]</sup>，人体内的 Neu5Gc 主要通过红肉的摄入而积累，当红肉中的 Neu5Gc 进入人体后，游离态的 Neu5Gc 迅速随代谢产物

(如尿液) 排出体外，结合态的 Neu5Gc 则能在肠道、肝脏、血液中稳定存在，被机体当作外来物质，产生异种抗体，诱发机体处于低度炎症状态<sup>[15]</sup>。大量的流行病学资料表明，约 20% 的恶性肿瘤由炎症诱发或促进<sup>[16-17]</sup>。此外，红肉易被产志贺毒素型大肠杆菌 (Shiga toxin-type *Escherichia coli*, STEC) 污染；若人体上皮细胞中存在结合态的 Neu5Gc，当它与志贺毒素结合时会引起胃肠道不适，从而引发腹泻等症状；而当肾内皮细胞中存在聚集结合态的 Neu5Gc 时，与 STEC 产生的志贺毒素结合会破坏内皮细胞，进而诱发溶血性尿毒症综合征 (Hemolytic uremic syndrome, HUS)，引起血性腹泻并伴肾衰竭等症状<sup>[1, 18-20]</sup>。可见，大宗畜产品红肉中的 Neu5Gc 严重威胁着人类的健康，因此，设法从动物性食品的源头上降低 Neu5Gc 的含量显

得尤为必要。

目前降低红肉中 Neu5Gc 含量的研究才刚刚起步,蒋芸等<sup>[21]</sup>分别使用物理和化学酶解法对猪肉和牛肉进行烹饪前的处理,发现它们对红肉中结合态 Neu5Gc 含量的降低有着不同程度的效果。Bardor 等<sup>[22]</sup>利用阿米洛利和 Gen 培养人类的癌细胞及突变细胞,发现它们能降低细胞中 Neu5Gc 的含量,且 Gen 对 Neu5Gc 的抑制效果更好。然而,目前通过添加某种安全试剂降低动物体内 Neu5Gc 生物合成的方法鲜有报道。

本文基于 Neu5Gc 的合成路径,寻找在哺乳动物体内抑制 Neu5Gc 的生物合成的抑制剂。Neu5Gc 在哺乳动物体内的生物合成路径<sup>[14]</sup>如图 1 所示。由图 1 可知,Neu5Gc 的生物合成涉及 CMAH 和 ST,故抑制 ST 的活性是降低对促炎起主要贡献的结合态 Neu5Gc 含量的关键;关于抑制 ST 的研究,王隼等<sup>[23]</sup>通过分子对接和分子动力学模拟的方法探讨了大豆皂苷 I 抑制 ST 的机理,但在活体内还没有相关的实验验证。

Gen 是从大豆中提取的异黄酮类化合物,存在于富含豆肽的多种天然植物中,在大豆中占到 1.5%,明显高于大豆皂苷 (0.6%)<sup>[24]</sup>,无毒副作用,在动物细胞中具有广泛的药理学功效。Gen 还可诱导 T 淋巴瘤细胞、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌细胞的凋亡,具有抗肿瘤作用<sup>[25]</sup>。可见 Gen 对降低动物体内 Neu5Gc 的生物合成必然存在一定的影响,然而,目前这种影响及其作用机制尚不清楚。

本研究首先考察 Gen 对大鼠体内 Neu5Gc 的生物合成的影响;其次,通过分子对接探讨 Gen 降低大鼠体内 Neu5Gc 合成作用机制。本文以期为从饲喂环节降低红肉中 Neu5Gc 的含量提供实验依据;主要对原料肉 (猪、牛、羊) 的养殖具有一定指导意义;为后续探索降低宰前红肉中 Neu5Gc 含量的方法奠定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

采用试剂包括: Gen (纯度>97%)(上海阿拉丁试剂有限公司);色谱纯试剂有: 乙腈、甲醇 (德国 Applichem 公司)、1,2-二氨基 4,5-亚甲基二氧苯盐酸盐 (DMB)、 $\beta$ -巯基乙醇 (Sigma 公司);分析纯试剂有: 氢氧化钠、硫代硫酸钠、无水亚硫酸钠 (天津市致远化学试剂有限公司)、冰乙酸、硫酸铵 (成都金山化学试剂有限公司); Neu5Gc 标准品。

主要仪器设备: Agilent-1260 Infinity 高效液相色谱 (配有荧光检测器和自动进样器); TGL20M 台式高速冷冻离心机 (长沙迈佳森仪器设备有限公司); DY89-II 型电动玻璃匀浆机、SCIENTZ-10N 真空冷冻干燥机、SB25-12DT 超声清洗器 (宁波新芝有限公司); Heal Force 超纯水系统 (力新仪器 (上海) 有限公司); ADVENTURER 电子分析天平 (奥豪斯仪器有限公司)。

开源免费软件 AutoDock vina、贵州大学云计算平台共享软件 SYBYL2.0。

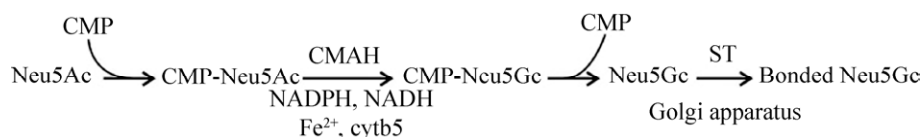


图 1 Neu5Gc 在哺乳动物体内的生物合成

Fig. 1 Biosynthesis of Neu5Gc in mammals.

## 1.2 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 (实验动物生产许可证号: SCXK(湘)2014-0011), 4 周龄, 体重  $(70 \pm 2)$  g, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供。所有大鼠适应性喂养 7 d 后开始实验, 大鼠饲料由长沙市天勤生物技术有限公司提供。

## 1.3 方法

### 1.3.1 实验分组及样品采集

80 只 SD 雄性大鼠, 适应性饲养 7 d 后, 随机分成 2 组, 40 只/组, 即对照组、Gen 组。分组后连续灌胃 60 d, 对照组灌胃 5% 的乙醇 (1 mL/只), Gen 组灌胃 300 mg/(kg·d) (根据 Gen 的安全剂量范围及在动物体内发挥生理作用的特点选定 300 mg/(kg·d) 为实验剂量<sup>[26-30]</sup>) Gen 的溶液 (1 mL/只) (溶液配制方法: Gen 的质量根据  $300 \times$  大鼠体重 (kg)  $\times$  数量 (只) 计算, 1-4 周 Gen 的质量分别为 8.40、10.08、9.82 和 10.08 g, 由于 Gen 不溶于水而溶于乙醇, 故先用 5 mL 的酒精溶解 Gen, 再用蒸馏水稀释定容); 动物房温度控制在  $(23 \pm 2)$  °C, 湿度 60%; 自由进食、自由进水。

灌胃 15 d、30 d、45 d、60 d 后, 在对照组和 Gen 组中分别选 10 只大鼠, 用乙醚迷晕后, 断颈处死, 取大腿肌肉、肝脏组织、肾脏组织于  $-80$  °C 保存待用。

### 1.3.2 肌肉组织及内脏组织前处理

分别称取 1 g 后腿肌肉及左肾组织、肝脏组织于匀浆瓶中, 加入 10 mL 的 30% 的硫酸铵磨成匀浆液,  $-80$  °C 冷冻 12 h 沉淀蛋白质后冷冻干燥成粉末; 将干燥后的粉末加入 10 mL 浓度为 2 mol/L 的醋酸在  $80$  °C 水浴 3 h 进行酸解, 使样品中结合态的 Neu5Gc 解离为游离态的 Neu5Gc<sup>[1,8]</sup>; 之后  $13\ 363 \times g$  离心 15 min, 并用  $0.45 \mu\text{m}$  的有机滤头过滤后于  $-80$  °C 冷冻 12 h, 之后进行真空冷冻干燥成粉末; 将冻干粉溶于 1.0 mL 的蒸馏水和 0.2 mL

NaOH (浓度 0.1 mol/L) 中, 在  $37$  °C 的条件下水浴 30 min 去乙酰化处理; 取去乙酰化的样品 900  $\mu\text{L}$ , 加入 100  $\mu\text{L}$  的衍生剂, 在避光的条件下衍生 150 min 后进行高效液相色谱检测样品中游离态和结合态 Neu5Gc 总的含量。

### 1.3.3 衍生剂的配置及 HPLC 检测条件

衍生剂的配制参考了文献<sup>[1,21]</sup>的配置方法: 0.008 mol/L 的 DMB、0.25 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.5 mol/L  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (冰醋酸) 分析纯、0.25 mol/L 亚硫酸钠 (分析纯)、0.8 mmol/L 的 2-巯基乙醇 (色谱纯)。

衍生条件: 将 100  $\mu\text{L}$  的衍生剂加入到盛有 900  $\mu\text{L}$  样品瓶中,  $50$  °C 避光衍生 2.5 h, 冷却至室温后进样进行 HPLC-FLD 分析。

HPLC 检测条件: 德国默克 Li Chrosorb RP-18 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为乙腈-甲醇-超纯水 (8:7:85, V/V), 流速为 0.9 mL/min, 柱温  $30$  °C, 进样体积 10  $\mu\text{L}$ , 荧光检测器激发波长 373 nm、发射波长 448 nm。

为探讨 Gen 降低大鼠体内 Neu5Gc 合成的作用机制, 参考本团队前期探索和总结的方法<sup>[31]</sup>, 采用分子对接探讨 Gen 与 ST 可能的作用过程, 具体步骤如下。

### 1.3.4 AutoDock vina 对接

采用分子对接和分子动力学分析探讨 Gen 与 ST 相互作用的可能过程。利用 AutoDock vina 和 SYBYL2.0 中的 Surflex-Geom 对接模块对对接过程中涉及的蛋白活性残基进行分析。对受体准备: 采用北京创腾科技有限公司的 Discovery Studio (DS) 客户端 (2.5 版) 显示 ST (2wnb) 的三维结构信息, 去水加氢后发现其中有两个底物配体, 配体 1 为胞苷单磷酸, 配体 2 由 CG31345、A2G1346、Gal1347 三个残基组成。保留配体 1, 删除配体 2, 记下配体 1 的空间位置参数 ( $x=23.9269$ ,

$y=31.865\ 3$ ,  $z=34.235\ 1$ ), 保存蛋白文件。对配体 2 操作如上, 得到配体 2 位置空腔参数:  $x=34.034\ 286$ ,  $y=23.860\ 486$ ,  $z=40.470\ 714$ 。在 AutodockTool-1.5.6 中打开保存的蛋白文件, 定义原子类型为 AD4 并加 casteiger 电荷, 然后将两文件保存为 pdbqt 格式, 作为对接受体。对接配体准备: Gen 分子结构用 Chemoffice 构建, 用 Openable 转换为 mol2 文件。对 Gen 分子进行加氢和电荷处理时采用的是 Autodock Tools 工具, 并将其原子格式设置为 pdbqt 文件。盒子大小设为  $size\_x=30$ ,  $size\_y=30$ ,  $size\_z=30$ , 选用“拉马克遗传算法”开展对接构象的搜索, 最大对接构象数目控制为 9, 对接完成后, 根据打分函数值的综合得分及其均方根偏差(Root mean square deviation, RMSD)值来评价和确定最佳的对接构象。对接结果采用 Ligplot+软件来统计 Gen 与配体之间发生相互作用的氢键和氨基酸残基数目<sup>[23,31]</sup>。

### 1.3.5 SYBYL-Surflex 对接

采用 Surflex-Dock(SFXC)-Geom 模式进行对接, 采用加氢后删除配体、水分子以及杂原子的方式对受体唾液酸转移酶进行处理。在 Tripos 力场下, 优化唾液酸转移酶的两个配体, 优化的方法每步都采用最陡下降法, 并加 Casteiger-Huckel 电荷处理, 其余参数默认。对接空腔以配体形式产生, 分别提取配体 1 和配体 2 产生对接位点, 在其周围 0.5 nm 范围半径内产生活性空腔。唾液酸转移酶的两配体的均方根偏差 RMSD 值最小值控制在 0.5, 对接构象的数目控制在 20 种。采用 SYBYL 对对接结果进行分析。

### 1.3.6 Gromacs 动力学模拟

在上述优化对接结果的基础上, 选取其中对接较好的复合物进行动力学模拟。具体方法参考本团队探索的方法<sup>[31]</sup>, 首先获得目标配体的限制势文件及拓扑文件, 即在 AMBER99-ILDN 力场存

在的条件下, 以 TIP3P 三点水为模型, 利用 AmberTools 17 中的 GAFF 力场进行处理产生拓扑文件; 而限制势文件是通过 genrestr 工具产生的, 然后再以 DPOSRES 对位置进行限制。盒子大小设为: 边界距离复合物文件大小为 0.8 nm。向体系中加入抗衡离子以平衡电荷, 能量最小优化采用是最陡下降法, 优化 500 步, 模拟步长为 0.01 ps。邻居列表的生成选择“cutoff-scheme=Verlet”, 静电作用选择 coulomb type, 非键相互作用采用 PME 截断方式。使用 LINCS 算法对键进行约束, 每 50 步输出一次能量信息, 控温和控压的时间为 100 ps, 进行限制性动力学模拟, 使体系达到平衡, 热浴设定为 velocity-rescale, 平衡温度控制为 147.86 °C, 时长为 0.2 ps。压浴设定为 Berendsen, 采用各项同性控压, 控压时间设为 0.5 ps, 动力学模拟过程中仅约束氢键, 且每采用最陡下降法优化一次并输入一次能量信息, 而每优化两次的时候输出一次坐标信息。限制性动力学完成后, 对 ST 和 Gen 进行索引的设置并对其进行分组, 进行 200 ns 的常规动力学模拟; 每步为 0.002 ps, 每 1 000 步输出一次能量信息。

模拟达到平衡后, 在 180–200 ns 范围内, 基于分子力学泊松-波尔兹曼表面积 (MM-PBSA) 法对配体和蛋白结合自由能  $\Delta G_{\text{bind}}$  进行计算。受体和配体间的亲和力与  $\Delta G_{\text{bind}}$  值成反比, 即  $\Delta G_{\text{bind}}$  值越低, 受体与配体间的亲和力越好。

MM-PBSA 法计算自由能主要包括以下 4 个过程:

$$\Delta G_{\text{binding}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}}) \quad (1)$$

式中,  $G_{\text{complex}}$  是总的自由能、 $G_{\text{ligand}}$  为配体独立的自由能、 $G_{\text{protein}}$  为溶剂中蛋白独立自由能。其中,  $G_{\text{ligand}}$  和  $G_{\text{protein}}$  由公式 (2) 计算:

$$G_x = EMM - TS + G_{\text{solvation}} \quad (2)$$

式中,  $G_x$  代表复合物;  $EMM$  是分子力学能;  $TS$  是熵变对自由能的贡献值; 由于构象熵对本文变化影响不大, 故  $TS$  一般设置为 0;  $G_{\text{solvation}}$  为

溶剂化能。 $EMM$  由公式 (3) 计算, 而  $G_{\text{solvation}}$  则由公式 (4) 计算:

$$EMM = E_{\text{bond}} + E_{\text{nobonded}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} \quad (3)$$

$$G_{\text{solvation}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{nonpolar}} \quad (4)$$

其中,  $E_{\text{bond}}$  代表成键作用,  $E_{\text{nobonded}}$  为非键作用力。 $G_{\text{polar}}$  由波兹曼方程计算;  $G_{\text{nonpolar}}$  通过 SASA 模型、SAV 和 WCA 模型计算。

### 1.3.7 标准曲线的绘制

称取 Neu5Gc 标准品 0.032 5 g, 并加入 100 mL 超纯水溶解标准品, 将其配置成 1 mol/mL 标准品溶液。分别取 50、100、200、300、400  $\mu\text{L}$  的标准溶液和 850、800、700、600、500  $\mu\text{L}$  的超纯水及加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMB 衍生液中 (表 1), 充分振荡混匀后, 进行避光衍生 2.5 h, 用 HPLC 检测。每个浓度标准品均进样 3 次, 以标准品浓度为纵坐标, 以峰面积的平均值为横坐标, 制作标准曲线, 计算标准曲线方程<sup>[1,21]</sup>。

### 1.3.8 Neu5Gc 含量降低百分比计算

样品中 Neu5Gc 含量降低百分比按式 (5) 进行计算:

$$\text{Neu5Gc 含量降低百分比} = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\% \quad (5)$$

式中,  $C_0$  表示对照组中 Neu5Gc 含量,  $C_1$  表示 Gen 组样品中 Neu5Gc 的含量。

### 1.3.9 数据处理分析方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 IBM SPSS Statistics 进行统计分析, 两样本均采用  $t$  检验, 根据清华大学出版社出版的张永爱主编的医学统计分析教

材,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义, 涉及的图形用 OriginPro 2016 平台完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 对照组中 Neu5Gc 及 Neu5Gc 标品的 HPLC 检测图谱

将对照组样品按照“1.3.2 和 1.3.3”方法处理, 按照“1.3.4”色谱条件进行 3 次分析, 测得 50  $\mu\text{mol/L}$  Neu5Gc 标品的保留时间为 10.080 min (图 2A), 对照组中后腿肌肉组织中 Neu5Gc 保留时间为 10.077 min (图 2B), 肝脏组织中 Neu5Gc 保留时间为 10.187 min (图 2C), 肾脏组织中 Neu5Gc 保留时间为 10.158 min (图 2D)。

### 2.2 标准曲线方程

所得标准曲线方程为  $y = 0.299\ 51x + 33.812\ 2$ ,  $R^2 = 0.993\ 7$ , 表明标准品在 50–400  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内, 峰面积与浓度具有较好的线性关系。

### 2.3 Gen 对大鼠后腿肌肉中 Neu5Gc 的影响

实验结果显示灌胃 15、45、60 d Gen 组 Neu5Gc 含量均低于对照组, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 3), 各组不同灌胃时间 Neu5Gc 的含量如表 2 所示。灌胃 15 d 时, Gen 组 Neu5Gc 的含量比对照组显著降低, 对照组中 Neu5Gc 的含量与 Gen 组中 Neu5Gc 的含量之间的差异有高度统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但 Neu5Gc 的含量仅降低了 2.50  $\mu\text{g/g}$ , 而这一降低值在生物学上实际意义不明显。灌胃 30 d 时, 用 HPLC-FLD 法检测时系统未对其进行积分, 说明在此灌胃时间段内, 大鼠后腿肌肉中 Neu5Gc 的含量很低, 以至于未检出, 由此可以推测 Gen 在灌胃 30 d 抑制 Neu5Gc 的合成效果最好。灌胃 45 d 时, Gen 组中 Neu5Gc 的含量降低了 32.65%, 对照组中 Neu5Gc 的含量与 Gen 组中 Neu5Gc 的含量之间差异具有高度统计学意义 ( $P < 0.01$ ), Neu5Gc 的含量降低了 8.18  $\mu\text{g/g}$ , 在生物学上实际意义明显。灌胃 60 d 时, Gen 组中

表 1 不同浓度 Neu5Gc 标准溶液配制<sup>[1]</sup>

Table 1 Preparation of Neu5Gc standard solutions of different concentrations<sup>[1]</sup>

Neu5Gc ( $\mu\text{L}$ )	Ultrapur water ( $\mu\text{L}$ )	DMB ( $\mu\text{L}$ )
50	850	100
100	800	100
200	700	100
300	600	100
400	500	100

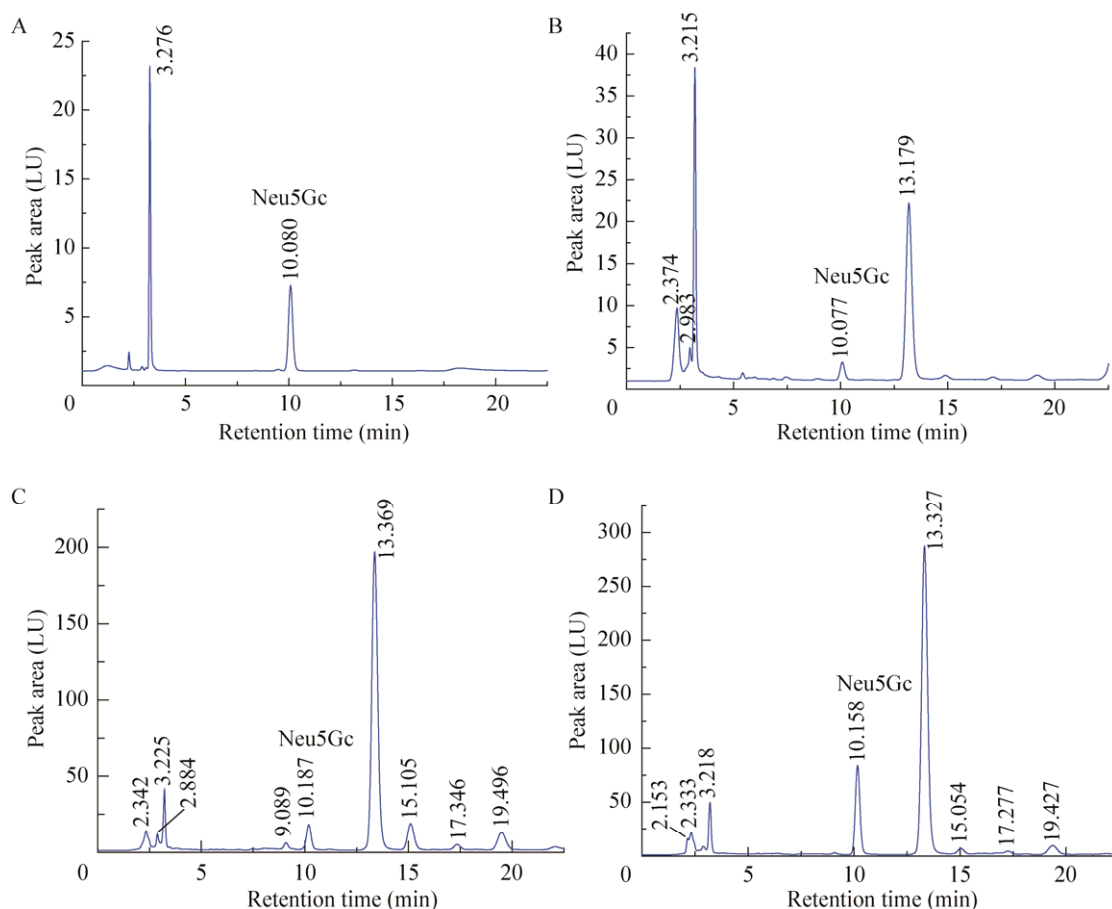


图2 50  $\mu\text{mol/L}$  的 Neu5Gc 标品 (A)、对照组后腿肌肉组织中 Neu5Gc (B)、肝脏组织中 Neu5Gc (C)和肾脏组织中 Neu5Gc (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 The HPLC chromatograms of the 50  $\mu\text{mol/L}$  Neu5Gc standard (A), the hind leg muscle tissue (B), the liver tissue (C) and the kidney tissue (D) of the control group.

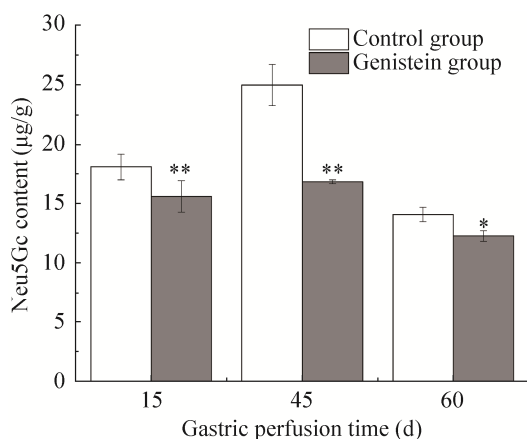


图3 Gen 对大鼠后腿肌肉组织中 Neu5Gc 含量的影响

Fig. 3 Effect of genistein on the content of Neu5Gc in rats hind legs muscle tissues. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Neu5Gc 的含量降低了 12.72%，对照组中 Neu5Gc 的含量与 Gen 组中 Neu5Gc 的含量之间差异具有高度的统计学意义 ( $P < 0.01$ )，Neu5Gc 的含量降低 1.8  $\mu\text{g/g}$ ，而这一降低值在生物学上实际意义不明显。实验结果表明，在对照组中，在灌胃 15–45 d 时间段内，Neu5Gc 的含量在逐渐增大，而在 45–60 d 时间段内，Neu5Gc 含量在降低。造成这种结果的原因可能是：1) 大鼠本身的差异，在饲养过程中，这一组大鼠个体大小差异较大；2) 随着饲养时间的延长，大鼠个体增大，而排泄物的量也随着增加，另有文献报道<sup>[15]</sup>游离态的 Neu5Gc 在体内快速随着体液排出，所以随着排泄物的增

加而游离态的 Neu5Gc 排出量增加, 导致结合态的 Neu5Gc 合成减少, 所以导致大鼠肌肉组织中 Neu5Gc 的含量减少。Gen 组, Neu5Gc 的含量与对照组有相似的变化趋势, 除了上述对照组存在的原因外, 还有一种可能是 Gen 在动物体内发生生理活性时具有剂量依赖性<sup>[27,32]</sup>, 随着饲养时间的延长, 大鼠体内蓄积 Gen 的量增多, 增强了对 Neu5Gc 合成的影响。

## 2.4 Gen 对大鼠肝脏中 Neu5Gc 的影响

由图 4 可知, 各时间段实验组肝脏组织中 Neu5Gc 的含量均低于对照组, 各组在不同灌胃时间内 Neu5Gc 的含量如表 3 所示。

灌胃 15 d 时, Gen 组中 Neu5Gc 的含量与对照组相比显著降低, Gen 组中 Neu5Gc 含量降低了 15.45%, 经统计学分析, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), Gen 组中 Neu5Gc 的含量降低了 4.57  $\mu\text{g/g}$ , 而这一降低值在生物学上实际意义不明显。灌胃 30 d 时, Gen 组中 Neu5Gc 的含量与对照组相比显著降低, Gen 组中 Neu5Gc 含量降低了 13.35%, Gen 组中 Neu5Gc 含量降低了 4.07  $\mu\text{g/g}$ , 而这一降低值在生物学上的实际意义不明显。灌胃 45 d 时, Gen 组 Neu5Gc 的含量与对照组相比显著降低, Gen 组中 Neu5Gc 的含量降低了 16.80%, 经统计学分析差异具有高度的统计学意义 ( $P<0.01$ ), Neu5Gc 的含量降低了 4.41  $\mu\text{g/g}$ , 而这一降低值在生物学上差异性实际意义不明显。灌胃 60 d 时, Gen 组中 Neu5Gc 含量降低了 12.30%, 对照组中 Neu5Gc 的含量与 Gen 组中 Neu5Gc 的含

量之间差异有高度统计学意义 ( $P<0.01$ ), Neu5Gc 的含量降低了 4.06  $\mu\text{g/g}$ , 而这一降低值在生物学上的实际意义不明显。整个饲养阶段, 在 45 d 时, 对照组和 Gen 组中 Neu5Gc 的含量最低, Neu5Gc 的含量降低值最高。然而, 随着灌胃时间继续延长, Neu5Gc 的含量开始升高, 60 d 时, 对照组和 Gen 组中 Neu5Gc 的含量达到最高。

## 2.5 Gen 对大鼠肾脏中 Neu5Gc 的影响

由图 5 可知, 各时间段 Gen 组肾脏组织中 Neu5Gc 的含量均略低于对照组, 但是 15 d 和 30 d 时经统计分析, 差异不显著 ( $P>0.05$ ), 而灌胃 45 d 时, Gen 组 Neu5Gc 的含量与对照组相比显著降低, Gen 组中 Neu5Gc 的含量降低了 32.78%, 经统计学分析差异具有高度的统计学意义 ( $P<0.01$ ), Gen 组 Neu5Gc 的含量降低了 49.00  $\mu\text{g/g}$ , 在生物学和统计学上具有高度的统计学意义。灌胃 60 d 时, Gen 组 Neu5Gc 的含量与对照组相比显著降低, Gen 组中 Neu5Gc 的含量降低了 11.42%, 经统计学分析差异具有高度的统计学意义 ( $P<0.01$ ), Gen 组 Neu5Gc 的含量降低了 17.53  $\mu\text{g/g}$ , 在生物学和统计学都具有实际意义。这一结果与

表 2 不同灌胃时间内肌肉组织中 Neu5Gc 含量  
Table 2 Neu5Gc content in muscle tissue during gastric perfusion time

Group	15 d	45 d	60 d
Control group ( $\mu\text{g/g}$ )	18.15 $\pm$ 1.12	25.05 $\pm$ 1.72	14.14 $\pm$ 0.60
Gen group ( $\mu\text{g/g}$ )	16.87 $\pm$ 0.15	15.65 $\pm$ 1.32	12.34 $\pm$ 0.45
Neu5Gc content reduction ( $\mu\text{g/g}$ )	2.50	8.18	1.80

表 3 不同饲养时间肝脏组织中 Neu5Gc 含量

Table 3 Neu5Gc content in livers tissues during gastric perfusion time

Group	15 d	30 d	45 d	60 d
Control group ( $\mu\text{g/g}$ )	29.60 $\pm$ 3.11	29.71 $\pm$ 1.20	26.27 $\pm$ 1.48	32.99 $\pm$ 3.52
Gen group ( $\mu\text{g/g}$ )	25.02 $\pm$ 2.31	25.74 $\pm$ 4.04	21.86 $\pm$ 1.48	28.93 $\pm$ 2.21
Neu5Gc content reduction ( $\mu\text{g/g}$ )	4.57	4.07	4.41	4.06



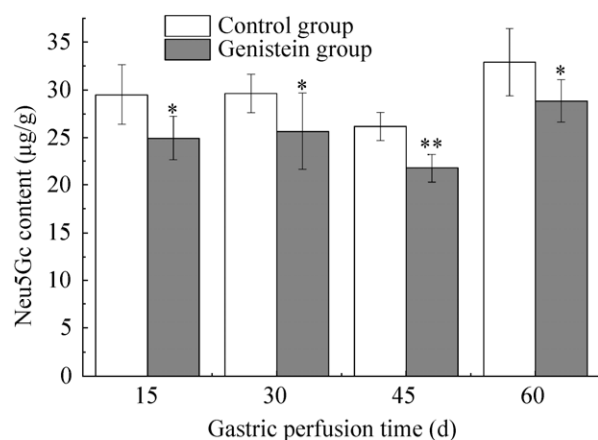


图4 Gen 对大鼠肝脏组织中 Neu5Gc 含量的影响  
Fig. 4 Effect of genistein on the content of Neu5Gc in rat livers tissues. \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ .

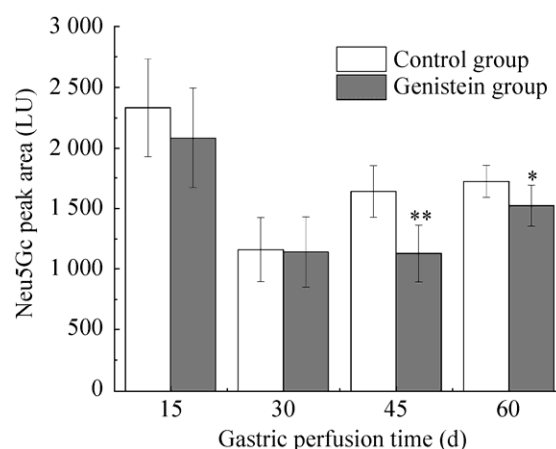


图5 Gen 对大鼠肾脏组织中 Neu5Gc 含量的影响  
Fig. 5 Effect of genistein on the content of Neu5Gc in rat kidneys tissues. \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ .

表4 不同饲养时间肾脏组织中 Neu5Gc 含量

Table 4 Neu5Gc content in kidneys tissues tissuese during gastric perfusion time

Group	15 d	30 d	45 d	60 d
Control group (μg/g)	212.50±20.03	113.56±11.24	149.47±13.83	153.53±12.25
Gen group (μg/g)	164.13±39.39	95.69±19.12	100.47±17.72	136.00±12.30
Neu5Gc content reduction (μg/g)			49.00	17.53

肌肉和肝脏组织存在一定的差异。在本实验中 Gen 对肌肉和肝脏组织中 Neu5Gc 的含量影响较肝脏明显,这可能与 Gen 在肾脏组织中存在的代谢机制与其在肌肉和肝脏组织中不同有关<sup>[29]</sup>。

## 2.6 ST 与 Gen 分子对接和分子动力学结果分析

已知对接受体 ST 晶体结构解析得到的活性位点残基为:Gln108、Asn150、Met172、Asn173、Tyr194、Clu196、Phe212、Tyr233、Arg269、Thr272、Gly273、Gly293、Trp300、His302、Val318、His319<sup>[33-34]</sup>。

ST 和 Gen 在配体 1 和配体 2 位置进行 AutoDock vina 对接后,打分最高的对接构象其结合能均为 -35.564 kJ/mol, 仅从结合能无法判定最佳结合位置,故继续进行相互作用残基分析和 SYBYL-Surflex 对接分析。

图 6A 为 Gen 与 ST 在配体 1 位置完成 Auto Dock vina 对接后的二维相互作用模式图。由图可知,ST 和 Gen 产生氢键的残基是 Asn150、Ser151、

Gly291、Glu324,共产生了 4 个氢键。产生疏水相互作用的残基为: His302、His301、Trp300、Ile274、Phe292、Ser271、Thr328、Ser325。图 6B 为 Gen 与 ST 在配体 1 位置 SYBYL-Surflex 对接后相互作用示意图,可发现 Gen 和 ST 残基 Asn173、Asn150、Gly293、Glu324、Ser271 产生氢键,数目为 5 个。对比 ST 在配体 1 处的活性残基,Gen 与其中的残基 Asn150、Asn173、Gly273、Gly293 产生了氢键作用,并且和残基 Trp300、His302 产生了疏水相互作用。综合以上分析,Gen 在 ST 配体 1 处占据了 ST 中 7 个活性残基的 6 个,且和配体 2 处的活性残基没有相互作用,表明 Gen 在配体 1 处结合作用较强。

图 7A 为 Gen 与 ST 在配体 2 位置与 Auto Dock vina 对接后的二维相互作用模式图。在配体 2 处,ST 和 Gen 产生氢键的残基是 Asn150、Ser151、Glu324、Gly291,共产生了 4 个氢键。产生疏水

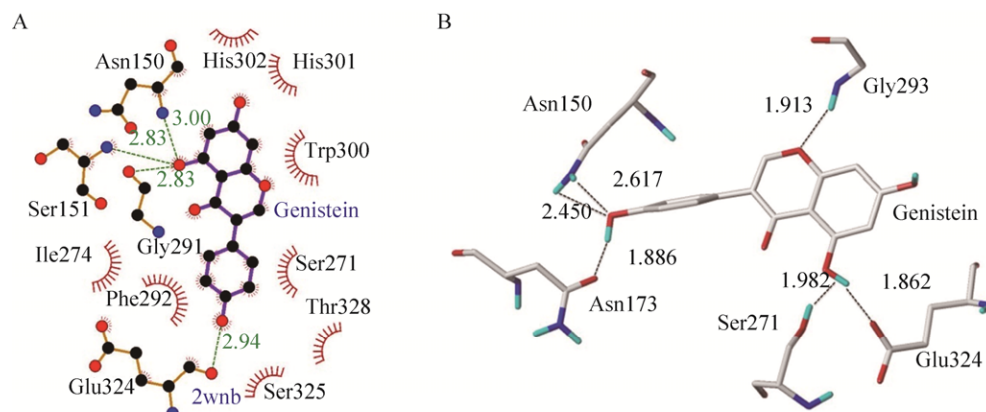


图 6 ST 配体 1 与 Gen 对接模式图

Fig. 6 Binding mode of sialyltransferase ligand 1 with genistein by docking. (A) A two-dimensional analysis of genistein and ST after docking Auto Dock vina at the position of ligand 1. (B) A schematic diagram of the interaction between genistein and SYBYL-Surfex at the position of ligand 1.

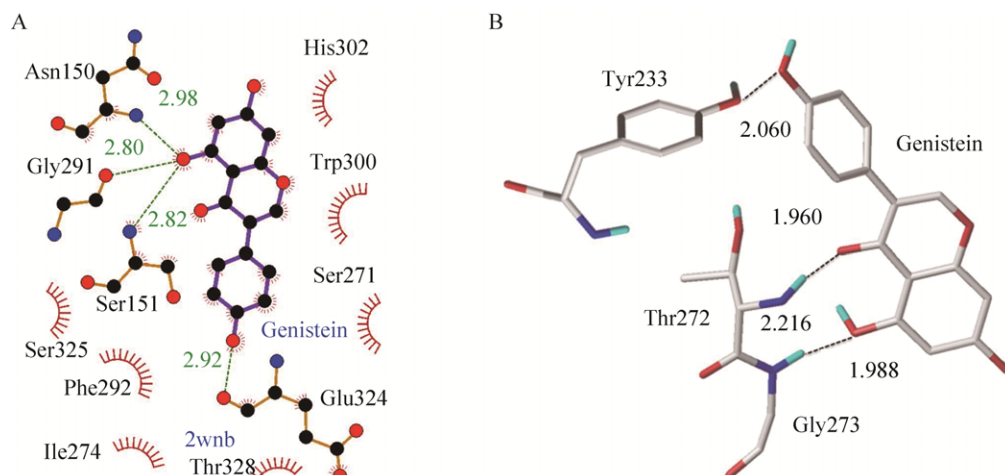


图 7 ST 配体 2 与 Gen 对接模式图

Fig. 7 Binding mode of sialyltransferase ligand 2 with genistein by docking. (A) A two-dimensional interaction analysis diagram of genistein and ST after docking with Auto Dock vina at the position of ligand 2. (B) A schematic diagram of the interaction between genistein and SYBYL-Surfex at the position of ligand 2.

相互作用的残基是 His302、Trp300、Ser325、Phe292、Ile274、Thr328、Ser271 共 7 个残基。图 7B 为 Gen 与 ST 在配体 2 位置 SYBYL-Surfex 对接后相互作用示意图,由图可知仅和残基 Tyr233、Thr272、Gly273 产生氢键。综合以上分析,可知 Gen 在 ST 配体 2 处和 ST 活性残基 Thr272、Tyr233 产生氢键,而在配体 1 处不仅与 ST 活性残基 Asn150、Gly273 产生氢键,还和活性残基 Trp300、His302 产生疏水相互作用,因此 Gen 更易与 ST 配体 1 位点产生相互作用。

对 Gen 与 ST 在配体 1 处 AutoDock vina 对接后最佳复合物进行水环境下 200 ns 的分子动力学模拟,分子动力学模拟过程一般以均方根偏差 RMSD 来衡量体系的稳定性<sup>[34]</sup>;从模拟结果可知,ST 和 ST-Genistein 复合物的 RMSD 值在 70 000–130 000 ns 时趋于平衡并收敛于 0.25 nm 附近,表明体系模拟过程中较为稳定。

图 8 为动力学模拟平衡时 ST 和 Gen 结合模式图。氢键是维持底物和配体稳定结合的重要分子间作用力<sup>[34]</sup>。从图 8 可以看出,动力学平衡后

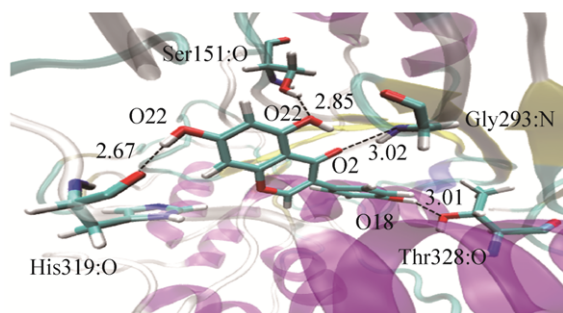


图 8 ST-Genistein 动力学平衡后结合模式图

Fig. 8 ST-Genistein binding mode diagram at MD equilibrium position.

Gen 主要和 ST 残基 His319、Thr328、Gly293、Ser151 产生 4 个氢键。对比 Gen 在配体 1 处与 STAutoDock vina 和 SYBYL-Surflex 对接揭示的可能相互作用残基结果,发现残基 Ser151 和 Gly293 与对接分析结果一致。这表明 Ser151 和 Gly293 在复合物体系稳定性中可能有重要贡献。

通过 g\_mmpbsa 工具对动力学平衡后 Gen 与 ST 的结合能进行计算分解,结果显示:总结合能为 $-82.691$  kJ/mol;对结合过程起促进作用的是范德华力 ( $-155.167$  kJ/mol)、静电作用力 ( $-62.223$  kJ/mol) 和溶剂可积表面作用力 ( $-14.502$  kJ/mol);对结合过程起抑制作用的是极性溶剂化能 ( $149.201$  kJ/mol)。

图 9 为 ST-Genistein 在动力学模拟相互结合

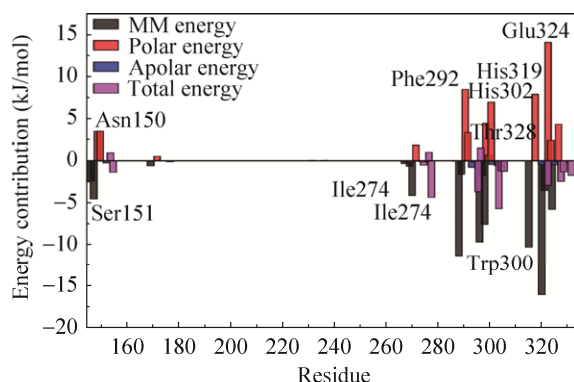


图 9 ST-Genistein 结合位点残基能量分解图

Fig. 9 ST-Genistein binding residue energy decomposition map.

过程中重要氨基酸残基的能量贡献。从图 9 可知,ST 中与 Gen 产生氢键作用的残基 Asn150、Ser151 和 Glu324 主要贡献了静电相互能,与 Gen 产生疏水作用的残基 Phe292、His302、Thr328、His319、Trp300 和 Ile274 主要贡献了极性作用力,这和对接分析的结果是一致的,表明分子间弱相互作用主导了 Gen 对 ST 活性抑制的机制。

### 3 讨论

#### 3.1 Gen 对大鼠不同部位 Neu5Gc 的合成具有不同抑制效果

Neu5Gc 在哺乳动物体内主要是以  $\alpha 2 \rightarrow 8$  与寡糖连接和以  $\alpha 2 \rightarrow 5$  与寡糖连接,形成结合态的 Neu5Gc,极小部分以游离的形式存在<sup>[14]</sup>。而 HPLC-FLD 法能直接检测游离态的 Neu5Gc,但是不能直接检测与糖蛋白和糖脂连接的结合态的 Neu5Gc,因此,检测组织中总的 Neu5Gc 含量时,需将 Neu5Gc 从糖复合物上释放出来。结合先前的研究<sup>[1,8]</sup>,本研究选择 2 mol/L 的醋酸在 80 °C 水浴 3 h 进行酸解,使各组织中结合态的 Neu5Gc 解离为游离态的 Neu5Gc,然后用 HPLC-FLD 检测组织中游离态和结合态 Neu5Gc 总的含量。

实验结果表明,Gen 对大鼠不同组织中 Neu5Gc 的含量具有不同的影响效果,并且不同灌胃时长的影响效果不一样;在肌肉组织中,灌胃时间段内,Gen 组 Neu5Gc 含量与对照组相比降低极显著 ( $P < 0.05$ ),且灌胃 30 d 时,后腿肌肉组织中未检测到 Neu5Gc,可能的原因是后腿肌肉中 Neu5Gc 量很少,达不到 HPLC 最低检测限,或是根本不存在 Neu5Gc,但是进一步的依据还需后续大量的实验证实;而在肝脏组织中,整个灌胃时间内,Gen 组 Neu5Gc 的含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),且在灌胃 45 d 时,Gen 对肝脏组织的中 Neu5Gc 的含量影响最明显,Neu5Gc 的含量降低了 16.80%,体内 Neu5Gc 的含量也最低,若灌胃时间继续延长,Neu5Gc 的含量开始升高,60 d

时,对照组和 Gen 组中 Neu5Gc 的含量达到最高;在肾脏组织中,直到灌胃 45 d 时,Gen 组中 Neu5Gc 的含量才显著低于对照组 ( $P<0.01$ ),Gen 组中 Neu5Gc 的含量降低了 32.78%。Gen 对不同部位 Neu5Gc 的含量影响效果不一样,这主要是因为:1) 由于 Gen 具有雌激素活性和抗雌激素活性,当它与雌二醇受体结合时,动物的生理状态、给药途径、局部浓度以及内源性雌激素水平等均影响生物学功能<sup>[29,35]</sup>;2) Gen 在哺乳动物中存在着不同的代谢机制;3) 哺乳动物不同身体部位对 Gen 的吸收和代谢速率也不同<sup>[32,35]</sup>。

### 3.2 Gen 对 Neu5Gc 含量降低的机制探讨

Neu5Gc 的生物合成涉及 CMAH 和 ST,其中 ST 是结合态 Neu5Gc 合成的关键酶<sup>[34]</sup>,故抑制 ST 的活性是降低对促炎起主要贡献的结合态 Neu5Gc 含量的关键。

分子对接研究结果表明:Gen 在大鼠体内占据 ST 活性位点 His319、Ser151、Gly293、Thr328,并与其形成稳定的氢键,与残基 His302、His301、Trp300、Ser271、Phe292、Thr328、Ser325、Ile274 形成疏水相互作用,从而竞争性地降低了 ST 的活性,表明 Gen 在动物体内降低 Neu5Gc 的生物合成可以通过抑制 ST 的活性来实现。有研究报道<sup>[36-37]</sup>Gen 可作为酪氨酸蛋白激酶抑制剂,通过去极化内皮超氧化物产生刺激物,抑制磷酸化的 G 蛋白 Rac 膜移位,达到抑制胞内还原型辅酶 II (NADPH)氧化酶的活性的目的,而 Neu5Gc 的合成需要还原型辅酶 II (NADPH)或 NADH 及  $\text{Fe}^{2+}$ ,所以使 Neu5Gc 的生物合成受到限制,从而达到降低大鼠体内肌肉和内脏组织中 Neu5Gc 含量的目的。

## 4 结论

本文实验结果揭示了 Gen 具有降低大鼠后腿肌肉、肾脏组织、肝脏组织中 Neu5Gc 的含量的

效果。在不同的灌胃时间和不同的组织器官中,Gen 对 Neu5Gc 含量的影响存在差异。在肌肉组织中,灌胃 30 d 时抑制效果最好,未能检出 Neu5Gc;在肾脏和肝脏组织中灌胃至 45 d 时抑制效果最好,其 Neu5Gc 的含量分别降低了 31.04% 和 21.66%;且内脏组织中 Neu5Gc 的含量都高于肌肉组织中的含量。

分子对接结果反映 Gen 在生物体内抑制 Neu5Gc 生物合成的机制如下:4 个氨基酸残基 (His319、Ser151、Gly293、Thr328) 与 Gen 形成稳定的氢键作用,8 个氨基酸残基 (His302、His301、Trp300、Ser271、Phe292、Thr328、Ser325、Ile274) 与 Gen 形成疏水相互作用,占据了结合态 Neu5Gc 生成关键酶 ST 与底物结合的活性位点,所以 Gen 是 ST 的竞争性抑制剂,通过与 ST 底物作用间接地抑制了 ST 的活性,从而限制了游离态 Neu5Gc 向结合态 Neu5Gc 的转化,最终达到降低 Neu5Gc 生物合成的目的。本实验方法和所获数据对采用饲养方式降低红肉类动物中 Neu5Gc 的含量具有指导意义。

## REFERENCES

- [1] Liang ML, Zhu QJ, Liu CL, et al. Dissociation effect of different treatments on *N*-Glycolylneuraminic acid in beef. *Food Sci*, 2018, 39(10): 28–34 (in Chinese). 梁美莲, 朱秋劲, 刘春丽, 等. 不同加工处理方式对牛肉中 Neu5Gc 解离的影响. *食品科学*, 2018, 39(10): 28–34.
- [2] Malykh YN, Schauer R, Shaw L. *N*-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*, 2001, 83(7): 623–634.
- [3] Fan XD, Li HW. Progress in studies on relationship between red meat intake, *N*-Glycolylneuraminic acid and cancer risk. *Food Sci*, 2014, 35(15): 326–329 (in Chinese). 范杏丹, 李红卫. 红肉、*N*-羟乙酰神经氨酸与癌症关系的研究进展. *食品科学*, 2014, 35(15): 326–329.

- [4] Alisson-Silva F, Kawanishi K, Varki A. Human risk of diseases associated with red meat intake: analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid. *Mol Aspects Med*, 2016, 51: 16–30.
- [5] Zarogoulidis K, Eleftheriou P, Domvri K, et al. Determination of antibodies against the red meat derived antigen Neu5Gc in patients with lung cancer. Probable association with disease development and progress. *Eur Respir J*, 2015, 46(S59): PA533.
- [6] Samraj AN, Läubli H, Varki N, et al. Involvement of a non-human sialic acid in human cancer. *Front Oncol*, 2014, 4: 1–13.
- [7] Endo T, Seeberger PH, Hart GW, et al. *Glycoscience: Biology and Medicine*. Tokyo: Springer, 2015: 1–8.
- [8] Wang MM. Establishment and optimization of method for sialic acid detection from animal-originated foods and the high-throughput method for sialylated conjunction extraction[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).  
王毛毛. 动物性食品中唾液酸测定及唾液酸复合物高通量提取方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [9] Ji S, Wang F, Chen Y, et al. Developmental changes in the level of free and conjugated sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in different organs of pig: a LC-MS/MS quantitative analyses. *Glycoconj J*, 2017, 34(1): 21–30.
- [10] Iwasaki M, Inoue S, Kitajima K, et al. Novel oligosaccharide chains on polysialoglycoproteins isolated from rainbow trout eggs. A unique carbohydrate sequence with a sialidase-resistant sialyl group, DGalNAc.betal leads to 4(NeuGc2 leads to 3)DGalNAc. *Biochemistry*, 1984, 23(2): 305–310.
- [11] Muralikrishna G, Reuter G, Peter-Katalinić J, et al. Identification of a new ganglioside from the starfish *Asterias rubens*. *Carbohydr Res*, 1992, 236: 321–326.
- [12] Chou HH, Takematsu H, Diaz S, et al. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the *Homo-pan* divergence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(20): 11751–11756.
- [13] Hayakawa T, Aki I, Varki A, et al. Fixation of the human-specific CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase pseudogene and implications of haplotype diversity for human evolution. *Genetics*, 2006, 172(2): 1139–1146.
- [14] Chen HJ, Ding C. Progress on Neu5Gc. *Prog Veterin Med*, 2009, 30(4): 64–68 (in Chinese).  
陈鸿军, 丁铲. N-羟乙酰神经氨酸研究进展. *动物医学进展*, 2009, 30(4): 64–68.
- [15] Banda K, Gregg CJ, Chow R, et al. Metabolism of vertebrate amino sugars with *N*-glycolyl groups: mechanisms underlying gastrointestinal incorporation of the non-human sialic acid xeno-autoantigen *N*-glycolylneuraminic acid. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28852–28864.
- [16] Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 635–645.
- [17] Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6(6): 399–409.
- [18] Löfling JC, Paton AW, Varki NM, et al. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome. *Kidney Int*, 2009, 76(2): 140–144.
- [19] Serna IV A, Boedeker EC. Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(1): 38–47.
- [20] Melton-Celsa A, Mohawk K, Teel L, et al. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012, 357: 67–103.
- [21] Jiang Y, Fu H, Feng CY, et al. Effects of different treatments on *N*-glycolylneuraminic acid dissociation in red meat. *Meat Res*, 2015, 29(12): 52–57 (in Chinese).  
蒋芸, 付浩, 冯昌雨, 等. 不同处理方式对红肉中 *N*-羟乙酰神经氨酸解离的影响. *肉类研究*, 2015, 29(12): 52–57.

- [22] Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, et al. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(6): 4228–4237.
- [23] Wang F, Zhang HL, Guang CE, et al. Mechanism of interaction between sialyltransferase and its inhibitory soyasaponin I. *J Food Sci Biotechnol*, 2015, 34(4): 355–360 (in Chinese).  
王隼, 张海玲, 光翠娥, 等. 大豆皂苷 I 抑制唾液酸转移酶的分子机理研究. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(4): 355–360.
- [24] Sun MM, Wang P, Li ZY, et al. Research progress of soybean active ingredients. *Soyb Sci*, 2018, 37(6): 975–983 (in Chinese).  
孙明明, 王萍, 李智媛, 等. 大豆活性成分研究进展. *大豆科学*, 2018, 37(6): 975–983.
- [25] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 1987, 262(12): 5592–5595.
- [26] McClain RM, Wolz E, Davidovich A, et al. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(1): 56–80.
- [27] Sun JX, Zhang YZ, Gao F. The research progress on physiological function of genistein. *Food Res Dev*, 2005, 26(3): 92–95 (in Chinese).  
孙洁心, 张永忠, 高峰. 染料木黄酮生理功能的研究进展. *食品研究与开发*, 2005, 26(3): 92–95.
- [28] Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, et al. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3315–3320.
- [29] Nielsen ILF, Williamson G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutr Cancer*, 2007, 57(1): 1–10.
- [30] Penza M, Montani C, Romani A, et al. Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology*, 2006, 147(12): 5740–5751.
- [31] Zhou YZ, Zhu QJ, Chang R, et al. Effects of Kaempferol and Quercetin on the Synthesis of Neu5Gc in Rats and its Molecular Mechanism. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2019, 35(1): 101–111.  
周樱子, 朱秋劲, 常瑞, 等. 山奈酚和槲皮素对大鼠体内 Neu5Gc 合成的影响及分子机制探究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(1): 101–111.
- [32] Xiu JC. Research progress of soy isoflavones in breed of pig, cow and sheep. *Sci Technol Innovat*, 2018, (11): 140–142 (in Chinese).  
修建成. 大豆异黄酮在猪牛羊养殖中的应用进展. *科学技术创新*, 2018, (11): 140–142.
- [33] Rao FV, Rich JR, Rakić B, et al. Structural insight into mammalian sialyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(11): 1186–1188.
- [34] Duan YB, Yin Y, Meng FL, et al. Design, synthesis and biological evaluation of benzothiazoles as highly potent rock inhibitors through molecular docking and free energy calculations. *Chem J Chin Univ*, 2017, 38(9): 1568–1577 (in Chinese).  
段永斌, 殷燕, 孟凡丽, 等. 基于分子对接和自由能计算的高活性苯并噻唑类 ROCK 抑制剂的设计、合成和生物学评价. *高等学校化学学报*, 2017, 38(9): 1568–1577.
- [35] Chen P, Li LK, Chen XL, et al. Effects of soy isoflavone on hepatic fatty acid metabolism of rats. *J Sichuan Agric Univ*, 2018, 36(2): 267–272 (in Chinese).  
陈苹, 李立科, 陈晓林, 等. 大豆异黄酮对大鼠肝脏脂肪酸代谢的影响. *四川农业大学学报*, 2018, 36(2): 267–272.
- [36] Sohn HY, Keller M, Gloe T, et al. The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(25): 18745–18750.
- [37] Zhu GC. Experimental study on genistein prevention and treatment of transplant arteriosclerosis in aortic transplants of rat. *Huazhong Univ Sci and Technol*, 2006 (in Chinese).  
朱国超. 防治大鼠移植动脉硬化的实验研究. 华中科技大学, 2006.

(本文责编 陈宏宇)