

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.002

FXR1 真核表达载体的构建与表达及其对神经节苷脂浓度的影响 *

马云 王昌博 李斌元 秦凌雪 付亮 董晓 何淑雅[△]

(南华大学生物化学与分子生物学研究所 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:构建脆性 X 相关基因 1(FXR1)的真核表达载体并检测其对神经节苷脂(GM1)浓度的影响。**方法:**以 pYESTrp3-FXR1 为模板,利用 PCR 扩增 FXR1 基因,PCR 产物经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后插入真核表达载体 pcDNA3.1(-)中,获得的阳性克隆进一步酶切及测序鉴定;将构建成功的 pcDNA3.1(-)-FXR1 转染 SH-SY5Y 细胞后,采用 Western blot 检测 FXR1 的表达情况,同时采用 ELISA 试剂盒检测细胞内 GM1 的浓度。**结果:**PCR 扩增产物为 1.9 Kb 的片段,与 FXR1 基因大小相符,阳性克隆经双酶切后获得两条分别为 5.4 Kb 和 1.9 Kb 的片段,测序结果与 GeneBank 中序列相同。构建成功的重组质粒 pcDNA3.1(-)-FXR1 转染 SH-SY5Y 细胞后,细胞中 FXR1 的表达增加,同时有效提高了细胞内 GM1 的浓度($P < 0.05$)。**结论:**成功构建了真核表达载体 pcDNA3.1(-)-FXR1,FXR1 的表达增加可以提高 SH-SY5Y 细胞中的 GM1 浓度,这些为后续深入研究 FXR1 基因在神经组织发育中的调控功能及其在脆性 X 综合征(FXS)中的作用机制奠定了基础。

关键词:脆性 X 相关基因 1;真核表达;神经节苷脂

中图分类号:R394 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5407-03

Construction and Expression of Eukaryotic Vector of FXR1 and the Effect of Ganglioside GM1*

MA Yun, WANG Chang-bo, LI Bin-yuan, QIN Ling-xue, FU Liang, DONG Xiao, HE Shu-ya[△]

(Department of Biochemistry & Biology, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To construct a eukaryotic expression vector encoding FXR1 and detect its effect on the concentration of GM1. **Methods:** FXR1 was amplified by PCR using pYESTrp3-FXR1 as template and then inserted into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (-) using restriction site of *EcoRI* and *XhoI*. The positive clones were further identified by enzyme cleaving and sequencing. The pcDNA3.1(-)-FXR1 was transfected into SH-SY5Y cells and the expression level of FXR1 was detected by Western blotting and the concentration of GM1 was detected by ELISA Kit. **Results:** The PCR product was a 1.9 Kb fragment consistent with FXR1 gene size, the positive clones were double enzyme cleaved to 5.4 Kb and 1.9 Kb fragment and the results of sequencing were the same as GeneBanks. The expression level of FXR1 was up-regulated and the concentration of GM1 was increased ($P < 0.05$) considerably in SH-SY5Y cells transfected with pcDNA3.1 (-)-FXR1. **Conclusions:** Eukaryotic expression vector encoding FXR1 was successfully constructed, and over-expression of FXR1 could regulate the GM1 concentration, which laid the foundation for the further studying the regulatory functions of FMR1 gene in neural tissue development and the mechanism in fragile X syndrome.

Key words: Fragile-X-related gene 1; Eukaryotic expression vector; GM1

Chinese Library Classification: R394 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5407-03

前言

脆性 X 综合征(fragile X syndrome, FXS)是一种常见的遗传性智障疾病,其致病基因脆性 X 智力低下基因 1 (fragile X mental retardation 1, FMR1) 5' 端非编码区 CGG 三核苷酸重复序列的不稳定扩增及其异常甲基化可导致其编码产物脆性 X 智力低下蛋白(Fragile X mental retardation protein, FMRP)减少或缺失^[1]。脆性 X 相关基因 1(Fragile X related gene 1, FXR1)是 FXS 中与 FMR1 高度同源的致病相关基因^[2],两者均属于脆性 X 基因家族成员。

FXR1 对神经系统和肌肉组织^[3]的正常发育具有重要的调

节作用,在 FXR1 正常表达的 FXS 胎儿脑组织中未发现显著的神经病理学异常,提示 FXR1 可能部分弥补 FMR1 的功能^[4]。在本课题组的前期研究中发现 FXR1 基因的编码蛋白脆性 X 相关蛋白 1 (Fragile X related protein 1) 和胞嘧啶单核苷酸 N-乙酰神经氨酸合成酶(CMAS)存在相互作用^[5],但是两者之间的作用机制不明^[6]。CMAS 可催化活性唾液酸的生成,而唾液酸又是神经节苷脂的传递质,故我们推断 FXR1P 与神经节苷脂的生成存在某种联系。因此,本研究通过构建 FXR1 真核细胞表达载体 pcDNA3.1(-)-FXR1,并转染 SH-SY5Y 细胞后验证其在神经细胞中的表达情况,同时检测 FXR1 不同表达水平下细胞内神经节苷脂浓度变化的情况,为阐明 FXR1 在神经系统生

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81200881);湖南省自然科学基金项目(12JJ6073)

作者简介:马云,副教授,硕士研究生导师,研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: luckymayun@163.com

△ 通讯作者:何淑雅,教授,硕士研究生导师,研究方向:生物化学与分子生物学

(收稿日期:2014-05-06 接受日期:2014-05-30)

长发育中的作用提供数据支持,为进一步揭示 FXR1 在 FXS 中的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞、大肠杆菌 DH5 α 均为为本实验室保存;重组质粒 pYESTrp3/FXR1 为本课题组前期构建;pcDNA3.1(-)(Clontech 公司);限制性内切酶 *EcoR*I 和 *Xho*I 及 T4 DNA 连接酶(BBI 公司);Lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen 公司);无内毒素质粒小提试剂盒(QIAGEN 公司);FXR1P 单抗(Millipore 公司);GAPDH 抗体(碧云天生物技术公司);2 $\times$ Taq Master Mix(康为世纪公司);人抗神经节苷脂抗体(GM1)ELISA 试剂盒(北京华英生物技术公司);胎牛血清(四季青生物技术公司);DMEM/F12 培养基(Gibco 公司)。

1.2 主要方法

1.2.1 FXR1 的扩增 根据 GeneBank 中人 FXR1 基因的核苷酸序列设计引物,其中上游引物中插入 *Xho*I 酶切位点,P1:5'-tatctcgagctatggcggagctgacgggtggag-3',下游引物中插入 *EcoR*I 酶切位点,P2:5'-gcggaattctatgaaacaccattcaggac-3'。以 pYESTrp3-FXR1 重组质粒为模板进行扩增。PCR 反应体系:2 $\times$ Taq MasterMix 10 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,模板 3 μ L,H₂O 5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 后,94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后切胶回收。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定 用 *Xho*I 和 *EcoR*I 分别酶切胶回收的 PCR 产物和 pcDNA3.1 (-) 空载体,酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接后,转化提前制备好的大肠杆菌感受态 DH5 α 于 37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养,挑取单克隆并抽提质粒,经双酶酶切验证成功后送上海 Invitrogen 公司测序,测序结果显示正确的重组质粒命名为 pcDNA3.1(-)-FXR1。

1.2.3 重组质粒转染 SH-SY5Y 细胞及 FXR1P 的表达检测 用完全培养基 DMEM/F12 (10%胎牛血清,100 mg/mL 链霉素,100 U/mL 青霉素)于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞。在重组质粒转染细胞前,改用无抗生素无胎牛血清培养液培养 24h,待细胞融合度大于 80%即可转染。按照 Lipofectamine 2000 产品说明书进行细胞转染。转染 6h 后吸去上清,继续加入完全培养基培养 48 h。收集并裂解细胞,利用 Western blot 技术检测 FXR1P 的表达变化,同时以未转染质粒的细胞为空白对照,以转染空质粒 pcDNA3.1(-)的细胞为阴性对照。

1.2.4 检测 FXR1 过表达对细胞神经节苷脂浓度的影响 培养 SH-SY5Y 细胞,将细胞分为正常组、空质粒组和过表达组。正常组为未转染质粒的细胞,空质粒组为转染 pcDNA3.1(-)的细胞,过表达组为转染重组质粒 pcDNA3.1(-)-FXR1 的细胞。裂解三组细胞,离心后提取细胞上清液,按照人抗神经节苷脂抗体(GM1)ELISA 试剂盒测定细胞的神经节苷脂浓度,最后采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。

2 实验结果

2.1 FXR1 基因扩增

根据 Genebank 所提供的 FXR1 基因的序列设计引物,以 pYESTrp3-FXR1 为模板进行扩增,目的片段长度约为 1.9 Kb。琼脂糖凝胶电泳结果显示所得条带与目的片段长度大小相符(图 1)。

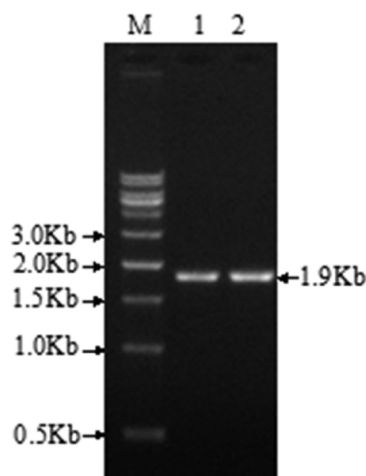


图 1 FXR1 体外 PCR 扩增的结果

M: 1kb ladder Marker; Lane 1 and 2: FXR1

Fig. 1 The PCR amplification products of FXR1

M: 1kb ladder; Lane 1 and 2: FXR1

2.2 重组表达质粒 pcDNA3.1(-)-FXR1 酶切鉴定

pcDNA3.1 (-)-FXR1 重组质粒经 *Xho*I 和 *EcoR*I 双酶切,凝胶电泳结果可见约 5.4 Kb 和 1.9 Kb 的两个片段,与 pcDNA3.1(-)空质粒和 FXR1 基因片段大小相符,证明 FXR1 基因已成功克隆到表达质粒上(图 2)。

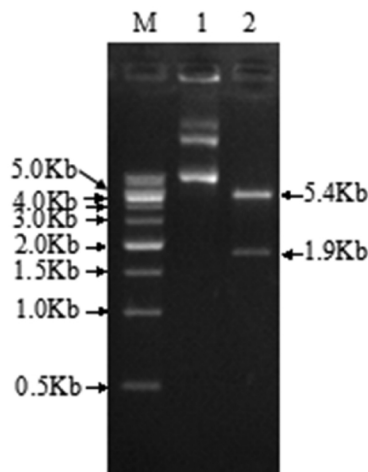


图 2 重组表达质粒 pcDNA3.1(-)-FXR1 的酶切结果

M: 1kb ladder Marker; Lane 1: pcDNA3.1(-)-FXR1 质粒

Lane 2: *Xho*I + *EcoR*I 双酶切 pcDNA3.1(-)-FXR1 质粒

Fig. 2 The results of pcDNA3.1(-)-FXR1 digested with endonuclease

M: 1kb ladder Marker; Lane 1: pcDNA3.1(-)-FXR1

Lane 2: pcDNA3.1(-)-FXR1 digestion by *Xho*I and *EcoR*I

2.3 重组表达质粒 pcDNA3.1(-)-FXR1 的测序鉴定

将酶切鉴定的阳性克隆过夜摇培后,菌液送往上海 Invitrogen 公司进行测序,结果分析显示 DNA 序列和读码框完全正确(图 3)。

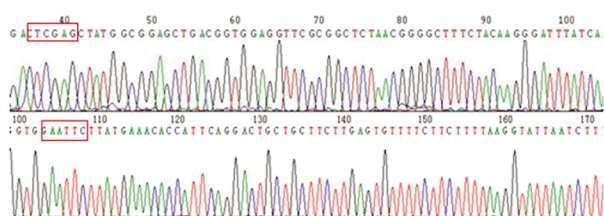


图3 pcDNA3.1(-)-FXR1 测序结果(部分)

上图:正向 下图:反向

Fig.3 Sequence result of pcDNA3.1(-)-FXR1(part)

above:sense below:antisense

2.4 重组表达质粒 pcDNA3.1(-)-FXR1 转染 SH-SY5Y 细胞 48h 后 FXR1P 的表达变化

Western blot 检测结果显示:过表达组中的 FXR1P 的表达水平较空白对照组和阴性对照组明显升高(图4)。

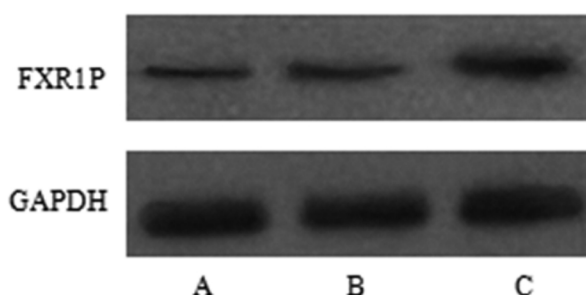


图4 SH-SY5Y 细胞中 FXR1 的表达水平检测

A: SH-SY5Y; B: pcDNA3.1(-) 转染的 SH-SY5Y;

C: pcDNA3.1(-)-FXR1 转染的 SH-SY5Y

Fig.4 The expression of FXR1 in SH-SY5Y cells

A: SH-SY5Y; B: SH-SY5Y transfected with pcDNA3.1(-);

C: SH-SY5Y transfected with pcDNA3.1(-)-FXR1

2.5 FXR1 过表达对 SH-SY5Y 细胞中 GM1 浓度的影响

利用酶标仪分别检测 450 nm 波长时正常组、空质粒组和 FXR1 过表达组的 OD 值,结果(图5)显示:FXR1 过表达组 SH-SY5Y 细胞的 GM1 浓度与正常组相比升高 78.25% ($P < 0.05, n=3$),而正常组与空载体组之间的结果没有显著差异。

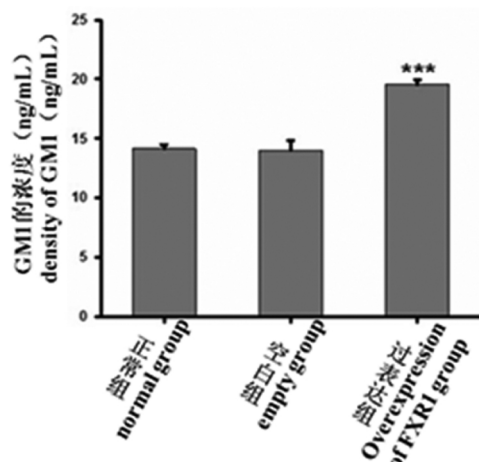


图5 FXR1 对 SH-SY5Y 细胞中 GM1 含量的影响

* 与正常组相比 $P < 0.05, n=3$

Fig.5 Effect of overexpression of FXR1 to the concentration of GM1 in SH-SY5Y

* contrast to Normal cell group $P < 0.05, n=3$

3 讨论

脆性 X 综合征(FXS)是一种常见的遗传性智障,临床上主要表现为中度到重度的智力低下,并常伴有特殊面容、巨睾、多动症、癫痫发作及认知功能障碍等。在我国约有 20 万左右的患者,故其致病机制的研究仍是热点问题。FMR1 和 FXR1 是 FXS 主要致病相关的基因,两者编码的蛋白 FMRP 与 FXR1P 是 RNA 结合蛋白,在氨基酸序列上具有极高的同源性,均含有两个 KH 结构域(K 同源结构域)、RGG 盒(富含精氨酸甘氨酸的区域)、NLS(核定位信号)和 NES(核输出信号),其中的 KH 结构域和 RGG 盒可以与富含 U 元件的 RNA^[7,8]以及 RNA 中的 G-四叠体相结合^[9],同时可以与 Motor 蛋白共同作用决定 mRNA 的亚细胞定位进而介导翻译调控^[10]。目前,国内外学者针对 FMRP 的结构与功能研究较多,而对 FXR1P 的研究则为少见。

近年研究发现 FXR1P 不仅调控其靶 mRNA 翻译^[11-13],而且还参与了 miRNA 的调控途径^[14-16]。本课题组的前期研究首次发现 CMAS 是 FXR1P 的相互作用蛋白^[3],CMAS 可以催化 CMP-N-乙酰神经氨酸即活性唾液酸的生成。唾液酸是广泛存在于生物系统中的一类天然糖类化合物,广泛存在于生物体内细胞膜糖蛋白和脂蛋白中,在生命活动中发挥着重要作用^[17],其主要是以多聚唾液酸的形式存在于细胞表面,参与细胞粘附、迁移、神经突生长、神经元分化、神经元导向、突触形成等功能^[18-20]。研究发现高唾液酸可以增加血清中神经节苷脂的含量,并能促进认知能力的发展^[21]。生物体内神经节苷脂的生成主要包括两个过程,首先是唾液酸的活化,这一步由 CMAS 催化;然后是活化的唾液酸被转移至寡糖类等其它基团形成唾液酸糖结合物,这一步由唾液酸转移酶催化。单唾液酸四己糖神经节苷脂(monosialote- trahexosyl ganglioside, GM1)是一类含唾液酸的鞘糖脂,神经系统中含量尤其丰富,是神经细胞膜的组成成分,同时它也在神经突触的形成和神经传导过程中起着关键的作用。

综合上述,本课题组推测 FXR1P 可能与 CMAS 相互作用共同调控神经细胞内 GM1 的生成。因此,本研究通过构建 FXR1 真核细胞表达载体 pcDNA3.1 (-)-FXR1,并转染 SH-SY5Y 细胞,验证其在神经细胞中的表达情况,同时检测了 GM1 的浓度。研究结果表明,转染重组质粒 pcDNA3.1 (-)-FXR1 后,FXR1P 的表达水平增加,并且 SH-SY5Y 细胞内的 GM1 浓度随着 FXR1P 表达的增加而升高。因此,我们认为 FXR1P 可通过与 CMAS 之间的相互作用,使得细胞内唾液酸的活化加强,从而调节细胞内 GM1 的含量增加,最终实现对神经系统生长发育的调控作用,这些研究结果为揭示 FXR1 基因在 FXS 中的功能提供重要的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, et al. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n[J]. Science, 1991, 252(5013): 1711-1714
- [2] Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, et al. FXR1, and autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene [J]. EMBO J, 1995, 14(11): 2401-2408
- [3] Whitman SA, Cover C, Yu L, et al. Desmoplakin and talin2 are novel mRNA targets of fragile X-related protein-1 in cardiac muscle[J]. Circ Res, 2011, 109(3): 262-271

(下转第 5435 页)

- [7] Barad O, Meiri E, Avniel A, et al. MicroRNA expression detected by oligo nucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues [J]. *Genome Res*, 2004, 14(12): 2486-2494
- [8] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [9] Pieter Mestdagh, Tom Feys, Nathalie Bernard, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(21): e143
- [10] Shi R, Chiang V I. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519-525
- [11] Luo Xin, Zhang Jin, Wang Hui-jun, et al. Poly A RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(4): 627-633
- [12] Emi Arikawa, Yanyang Sun, Jie Wang, et al. Cross-platform comparison of SYBR[®] Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(7): 328-340
- [13] 时宿妹, 张越, 张传宇, 等. 2 种微小 RNA 实时定量 PCR 检测方法的比较[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(3): 377-384
- Shi Su-mei, Zhang Yue, Zhang Chuan-yu, et al. Comparison of Two Method for Detection of MicroRNA by Real-Time Quantitative PCR [J]. *Letters in Biotechnology*, 2010, 21(3): 377-384
- [14] Kenneth JL, Thomas D.S. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *METHODS*, 2001, 25(4): 402-408
- [15] 陈烨, 李凯, 周宇荀, 等. 小鼠基因转录表达分析中内参基因的优选[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 197-201
- Chen Ye, Li Kai, Zhou Yu-xun, et al. Selection of reference genes for transcription expression analysis in the mouse [J]. *ACTA LABORATORII ANIMALIS SCIENTIA SINICA*, 2011, 19(3): 197-201
- [16] Zhang YW, Davis EG, Bai J. Determination of internal control for gene expression studies in equine tissues and cell culture using quantitative RT-PCR [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 130(1-2): 114-119
- [17] Thomas D Schmittgen, Jinmai Jiang, Qian Liu, et al. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(4): 43-43
- [18] Kou Shu-Jun, Wu Xiao-Meng, et al. Selection and validation of suitable reference genes for miRNA expression normalization by quantitative RT-PCR in citrus somatic embryogenic and adult tissues [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(12): 2151-2163
- [19] Heidi J. Peltier, Gary J. Latham. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues [J]. *RNA*, 2008, 14(5): 844-852
- [20] Eun Joo Lee, Myungwon Baek, Yuriy Gusev, et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors [J]. *RNA*, 2008, 14(1): 35-42
- [21] Thomas D. Schmittgen, Eun Joo Lee, Jinmai Jiang, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA [J]. *Methods*, 2008, 44(1): 31-38

(上接第 5409 页)

- [4] Agulhon C, Blanchet P, Kobetz A, et al. Expression of FMR1, FXR1 and FXR2 genes in human prenatal tissues [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(8): 867-880
- [5] 杨阳. 智力低下相关蛋白 FXR1P 与 FTH1 及 CMAS 相互作用的研究[D]. 湖南: 南华大学, 2010
- Yang Yang. The study on verification FTH1 and CMAS interacting with FXR1P[D]. Hunan: South China University, 2010
- [6] Kean EL. Sialic acid activation[J]. *Glycobiology*, 1991, 1(5): 441-447
- [7] Brown V, Small K, Lakkis L, et al. Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(25): 15521-15527
- [8] Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, et al. Fragile X mental retardation protein nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(5): 1539-1547
- [9] Darnell JC, Jensen KB, Jin P, et al. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function [J]. *Cell*, 2001, 107(4): 489-499
- [10] Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, et al. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(6): 926-939
- [11] Davidovic L, Durand N, Khalfallah O, et al. A novel role for the RNA-binding protein FXR1P in myoblasts cell-cycle progression by modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA stability [J]. *PloS Gene*, 2013, 9(3): 1003367-1003371
- [12] Yun Ma, Lingxue Qin, Xiao Dong, et al. Biological Effect of the Interaction Between Mental Retardation Related Protein (FXR1P) and CMAS [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(11): 1124-1130
- [13] 王三虎. 脆性 X 相关蛋白 1 的靶标鉴定及其对 IQCE 翻译的影响[D]. 湖南: 南华大学, 2013
- Wang San-hu. Fragile X Related Protein 1 Target Identification and Effect the Translation of IQCE [D]. Hunan: South China University, 2013
- [14] Xu XL, Zong R, Li Z, et al. FXR1P but not FMRP regulates the levels of mammalian brain-specific microRNA-9 and microRNA-124 [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(39): 13705-13709
- [15] Gessert S, Bugner V, Tecza A, et al. FMR1/FXR1 and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development [J]. *Dev Biol*, 2010, 341(1): 222-235
- [16] Cheever A, Blackwell E, Ceman S. Fragile X protein family member FXR1P is regulated by microRNAs[J]. *RNA*, 2010, 16(8): 1530-1539
- [17] Sanchez-Felipe L, Villar E, Munoz-Barroso I, et al. α 2-3- and α 2-6- N-linked sialic acids allow efficient interaction of Newcastle Disease Virus with target cells[J]. *Glycoconj J*, 2012, 29(7): 539-549
- [18] Zhang JN, Wang SJ. The biology of Sialic acid and health and disease[J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2011, 23(7): 678-684
- [19] Brusés JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development [J]. *Biochimie*, 2001, 83(7): 635-643
- [20] Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 26-35
- [21] Gurnida DA, Rowan AM, Idjradinata P, et al. Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants[J]. *Early Hum Dev*, 2012, 88(8): 595-601