doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.21.003

# 一株人肠源性高效尿酸降解菌的分离、鉴定及降尿酸条件优化 *

梁美婷[1,4] 杨珊珊[2] 贺 怡[3,4] 玛依娜·卡哈尔[5] 陈邬锦[6] 李 瑞[7] 孙玉萍[5,8△]

（1 新疆第二医学院基础医学部 病理学教研室 新疆 克拉玛依 834000；2 新疆医科大学第五附属医院 检验科 新疆 乌鲁木齐 830000；
3 新疆第二医学院基础医学部 细胞生物学与遗传学教研室 新疆 克拉玛依 834000；4 新疆医科大学基础医学院 新疆 乌鲁木齐 830000；
5 新疆医科大学基础医学院 微生物教研室 新疆 乌鲁木齐 830000；6 新疆医科大学基础医学院 形态中心 新疆 乌鲁木齐 830000；
7 新疆医科大学基础医学院 人体寄生虫学教研室 新疆 乌鲁木齐 830000；
8 新疆医科大学 新疆地方病分子生物学重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830000）

**摘要 目的：**肠道作为人体的重要消化器官，其内定植的微生物在尿酸合成和代谢过程中发挥着重要作用，本研究利用含尿酸靶向培养基筛选正常人群肠道内具有降尿酸功能的细菌并鉴定。**方法：**依据尿酸的摩尔质量制备含不同浓度尿酸的 BHI 培养基，液体培养基扩增并驯化肠道粪便微生物，固体培养基分离和纯化具有尿酸降解功能的细菌。挑取固体培养基上形态一致的单个菌落进行革兰氏染色和镜检，筛选出已纯化菌株，在需氧和厌氧培养条件下测定尿酸降解率，选取降解率≥50%以上的菌株为高效尿酸降解菌的候选菌株，再测定不同温度和 pH 值条件下的尿酸降解率，进行降尿酸条件优化。利用 16S rDNA 序列测定法对尿酸降解菌进行鉴定，药敏实验测定该菌对抗生素的敏感性。**结果：**正常人群粪便微生物中分离获得一株高效尿酸降解菌 B5C，第 5 天需氧条件下的尿酸降解率均 >50%，与初始尿酸浓度相比具有统计学意义（$P<0.05$）。优化降尿酸条件后，在 37℃、pH7.0 时，降解率可达 88.7%，经鉴定为粪肠球菌，对常见的抗生素如阿莫西林、氨苄西林和青霉素 G 等具有较高的敏感性。**结论：**本研究利用含不同尿酸浓度的靶向培养基驯化、分离和鉴定出一株人肠源性细菌，在需氧条件下也具有较高的尿酸降解率，可为今后临床降尿酸微生物制剂的开发和利用提供新的菌种资源。

**关键词：**肠道微生物；尿酸降解菌；尿酸降解率

**中图分类号：**R-33；R373 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2023)21-4013-07

# Isolation, Identification and Optimization of Uric Acid Degradation Conditions of a Human Enterogenic High Efficiency Uric Acid Degrading Bacterium*

*LIANG Mei-ting[1,4], YANG Shan-shan[2], HE Yi[3,4], MA Yi-na·kahaer[5], CHEN Wu-jin[6], LI Rui[7], SUN Yu-ping[5,8△]*

*(1 Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, XinJiang Second Medical College, Karamay, Xinjiang, 834000, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Xinjiang Medical University Affiliated Fifth People's Hospital, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 3 Department of Cell Biology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Second Medical College, Karamay, Xinjiang, 834000, China; 4 Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 5 Department of Microbiology, School of Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 6 Morphological Center, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 7 Department of Human Parasitology School of Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China; 8 Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology for Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)*

**ABSTRACT Objective:** As an important digestive organ in the human body, the microbiome colonized in the intestine play an important role in the synthesis and metabolism of uric acid. In this study, we used uric acid-containing targeting medium to screen for and identify bacteria with uric acid degrading function in the normal human intestine. **Methods:** Preparation of BHI medium containing different concentrations of uric acid based on the molar mass of uric acid. Liquid medium to amplify and domesticate intestinal bacteria, solid medium to isolate and purify bacteria with uric acid degradation function. Single colonies with consistent morphology on solid medium were picked for Gram staining and microscopic examination. The purified strains were screened and the rate of uric acid degradation was

* 基金项目：国家自然科学基金项目（82260182；81960169）；新疆维吾尔自治区自然科学基金项目（2021D01C275；2022D01C185）；新疆维吾尔自治区名医名方与特色重点实验室开放课题（2020D04024）；新疆维吾尔自治区高校科研计划项目（XJEDU2021Y054）；新疆研究生科研创新项目（XJ2021G228；XJ2022G166）；克拉玛依市创新人才项目（20212022hjcxrc0060）

作者简介：梁美婷（1987-），女，博士研究生，主要研究方向：尿酸代谢与肠道菌群，E-mail: 234573040@qq.com

△ 通讯作者：孙玉萍（1967-），女，教授，博士生导师，主要研究方向：嘌呤代谢紊乱机制的研究，E-mail: 544481723@qq.com

（收稿日期：2023-03-20 接受日期：2023-04-14）

determined under aerobic and anaerobic culture conditions. The strains with degradation rate ≥50% or more were selected as the candidate strains of efficient uric acid-degrading bacteria. Subsequently, the degradation rate of uric acid was measured under different temperature and pH conditions for optimization of uric acid reduction conditions. The 16S rDNA sequence assay was used to identify the uric acid-degrading bacteria, and drug sensitivity test to determine the susceptibility of the bacteria to antibiotics. **Results:** An efficient strain of uric acid-degrading bacteria B5C was isolated from fecal microbiome of normal people, showed >50% degradation of uric acid on day 5 under aerobic conditions, which was statistically significant compared to the initial uric acid concentration ($P$<0.05). After optimizing the conditions for degradation of uric acid, the degradation rate could reach 88.7% at 37℃ and pH 7.0. It was identified as Enterococcus faecalis, which has high sensitivity to common antibiotics such as amoxicillin, ampicillin and penicillin G. **Conclusion:** In this study, a strain of human enteric-derived bacteria was domesticated, isolated and characterized using targeted media containing different uric acid concentrations. It also has a high rate of uric acid degradation under aerobic conditions, providing a new strain resource for the development and utilization of uric acid degrading microbial preparations.

**Key words:** Gut microbiome; Uric acid degrading bacteria; Uric acid degradation rate

**Chinese Library Classification(CLC): R-33; R373 Document code: A**

**Article ID: 1673-6273(2023)21-4013-07**

## 前言

尿酸是人体嘌呤代谢的最终产物，由于缺乏编码尿酸氧化酶（Uox）基因而不能将尿酸进一步降解，因此人类易患高尿酸血症（HUA）[1]。人体尿酸来源分两部分：67%由体内细胞 DNA 和 RNA 氧化分解产生是内源性途径；另外 33%通过摄入富含嘌呤或核蛋白类成分的食物代谢产生是外源性途径[2]。由于遗传基因突变或疾病、药物、饮食等因素，尿酸持续在体内过量积累，可诱发高尿酸血症。随着尿酸盐在血液中持续性堆积，导致尿酸盐结晶析出在关节或者肾脏，引起组织器官的炎症反应甚至痛风和肾脏疾病的发生，并与高脂血症、高血压、糖尿病等多种代谢性疾病的并发症有关[3,4]。

人体肠道内定植了大量的微生物，在调节人体能量与代谢方面具有不可替代的作用[5-7]。Eckburg 等发现[8]，痛风患者肠道内的普拉梭菌（Faecalibacterium prausnitzii）显著减少，该菌所代谢产生的丁酸盐是小肠上皮细胞的能量来源，同时可阻断炎性通路 NF-κB 的活化，发挥抗炎作用。此外，在乳酸菌和假单胞菌中，发现人体所缺乏的酶类物质：尿酸酶、尿囊素酶和尿囊酸酶，可将尿酸降解为 5- 羟基酸、尿囊素排出体外，减少尿酸沉积[9]。

由此可见，人体肠道内可能存在具有特殊功能的微生物影响尿酸代谢。本研究目的是从正常人群肠道粪便中分离、驯化和鉴定具有尿酸降解功能的微生物，为肠道降尿酸机制研究奠定理论基础，并为研发降尿酸生物活性物质提供菌种资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和试剂

尿酸标准品购自上海麦克林生化有限公司，磷酸氢二钾和磷酸二氢钾均购自天津致远化学试剂公司，BHI 脑心浸出液培养基进行分离培养、BHI 肉汤培养基进行粪便微生物的富集培养均购自青岛海博生物技术有限公司。PCR 相关试剂（Premix TaqTM、DNA DL2000 Maker、缓冲液等）购自天根生化科技有限公司。革兰氏染液购自珠海贝索生物技术公司，细菌 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 实验样本采集

利用国际人类微生物组项目 HMP 和 IHMS 推荐的肠道微生物样品采集套装收集 5 名正常人群的清晨空腹粪便，放置冰盒中保存，2 小时内送回实验室，放入 4℃冰箱保存备用。纳入标准：近一个月内无胃肠道以及全身重大疾病且未服用抗生素者，健康体检后血尿酸水平男性 <420 μmol/L、女性 <360 μmol/L 者，对本研究均知情同意。

### 1.3 高效尿酸降解菌的驯化及分离纯化

**1.3.1 不同浓度尿酸培养基制备** 根据尿酸的化学式（$C_5H_4N_4O_3$）及摩尔质量（M=168.1103 g/mol），即：1 mol 尿酸质量为 168.1103 g。称取 1.0759 g 尿酸于 1000 mL 容量瓶制备成 6.400 mmol/l 的尿酸溶液，以先加入甘油后加入蒸馏水的顺序溶解尿酸，并辅以超声震荡仪（深圳福洋科技集团有限公司，F-031SD）促进溶解，甘油浓度保证 9-10%以避免甘油浓度过高影响微生物的生长，最后加入磷酸氢二钾调节 pH 至 7.2-7.5，模拟人体肠道 pH 值。依照此方法，配置 0.2 mmol/L、0.4 mmol/l、0.8 mmol/l、1.6 mmol/l、3.200 mmol/L 剩余 5 个浓度梯度的尿酸稀释溶液，并以上述 6 个梯度的尿酸溶液配比成对应浓度的 BHI 液体和固体培养基。

**1.3.2 菌株的驯化培养** 采用液体培养基驯化、筛选和固体培养基分离菌株形式，用无菌接种环挑取少量粪便于 6 个浓度梯度含有尿酸的 BHI 液体培养基中，37℃厌氧培养 24 h 后，运用涂布平板法将 6 个浓度梯度各做 3 个重复涂布，于 37℃恒温倒置厌氧培养 1-2 d，观察单个菌落数量变化。

**1.3.3 菌株的纯化和观察** 采取高浓度梯度纯尿酸对驯化后的细菌进一步纯化。挑取涂布平板上的单个菌落，运用分区划线法重新接种至含有尿酸浓度为 6.4 mmol/l 的纯尿酸固体培养基中，纯化 2-3 次以后，选取菌落颜色、大小、边缘一致的菌落，进行革兰氏染色和镜检。在载玻片上滴一滴生理盐水，用接种环挑取单个菌落的 1/3 涂片后，置于酒精灯上固定，再依次用龙胆紫初染、碘液媒染、95%酒精脱色及沙黄复染各处理 10 s，随后用缓慢水流冲洗染液或脱色液 1-2 次，自然晾干后镜检。在油镜下（10× 100）观察已纯化菌株的颜色（均为革兰氏阳性或阴性菌）和形态（均为球菌或杆菌）均匀一致，将剩余 2/3 菌落接种至同浓度尿酸的 BHI 液体培养基扩大培养后，放入 4℃冰箱内保藏。

### 1.4 高效尿酸降解菌的筛选

将已纯化的菌株接种于含有不同浓度尿酸的 BHI 液体培养基，以不接种菌株作为空白对照组，菌体组和空白组的每个浓度各设置 3 个平行样，并于 37℃隔夜进行厌氧和需氧培养，运用尿酸酶法测定液体培养基中尿酸浓度，连续测定 5 天，计算尿酸降解率 =（原始尿酸浓度 - 降解后浓度）/ 原始尿酸浓度（%），挑选降解率≥50%以上的菌株为高效尿酸降解菌的候选菌株。

### 1.5 降尿酸条件的优化

**1.5.1 培养温度** 将已筛选的高效尿酸降解菌接种于尿酸浓度为 0.2 mmol/L 的 BHI 液体培养基中，分别在 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃、40℃、43℃厌氧和需氧条件下培养，每个温度设立三个平行样本和空白对照组，于第 5 天计算尿酸降解率，挑选最佳尿酸降解温度。

**1.5.2 pH 值** 在含尿酸浓度为 0.2 mmol/L 的 BHI 液体培养基中加入磷酸二氢钾和磷酸氢二钾，调节 pH 值至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0，不同 PH 值设立三个平行样本和空白对照组，在 37℃厌氧和需氧培养 5 天后，测定培养基尿酸浓度，根据尿酸降解率选择最佳 PH。

### 1.6 高效尿酸降解菌基因组提取及 16S rDNA 片段 PCR 扩增

运用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化菌的基因组总 DNA，将其为模板，采用细菌通用引物序列 27F（5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCGA-3'）和 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）对细菌的 16S rDNA 序列扩增[10]。配置 25 μL PCR 反应体系：2× Taq PCR Mix 12.5 μL，上、下游引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL，$ddH_2O$ 补至 25 μL。PCR 扩增条件为 94 ℃预变性 5 min，接下来 30 次循环：94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min；最后 72 ℃延伸 10 min。取 5 μL PCR 扩增产物和 DL 2000 DNA Marker，通过凝胶电泳成像分析系统检测 PCR 扩增结果。

### 1.7 序列同源性比对

将扩增后的 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司测序，测序结果在 NCBI GenBank 数据库进行 BLAST 同源序列比较，鉴定已纯化菌株，并用邻接法构建高效尿酸降解菌 16S rDNA 序列的系统发育树。

### 1.8 生化反应鉴定和抗生素敏感性实验

用无菌接种环挑取菌株 B5C 纯培养物置于 0.45%无菌生理盐水中，采用麦氏比浊法调至菌悬液浊度为 0.55，取出革兰氏阳性球菌鉴定卡片插入已制备的菌体悬液，在 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪上进行生化反应鉴定。

采用上述方法制备麦氏浓度在 0.55 的菌悬液，吸取 280 μL 置于 3 mL 0.45%无菌生理盐水中，插入革兰氏阳性球菌药敏卡，在法国生物梅里埃股份有限公司的 VITEK 2 Compact 上进行药物敏感性实验，以能够抑制细菌生长、繁殖的最低药物浓度即最小抑菌浓度 MIC（Minimum Inhibitory Concentration）作为药物敏感性判定标准，进行药敏分析。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析，所测实际尿酸浓度表示为均值± 标准差（$\bar{x}\pm s$），组间显著性差异比较采用配对样本 t 检验，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效尿酸降解菌的筛选结果

共分离纯化得到 4 株具有尿酸降解功能的菌株，挑选出降解效率达到 50%以上的高效尿酸降解菌株共 1 株，命名为 B5C，作为后续研究菌株。B5C 经革兰氏染色后镜检为阳性球菌，分散排列（图 1）。菌落形态在 BHI 培养基上呈小椭圆形、乳白色、边缘整齐、表面光滑（图 2）。

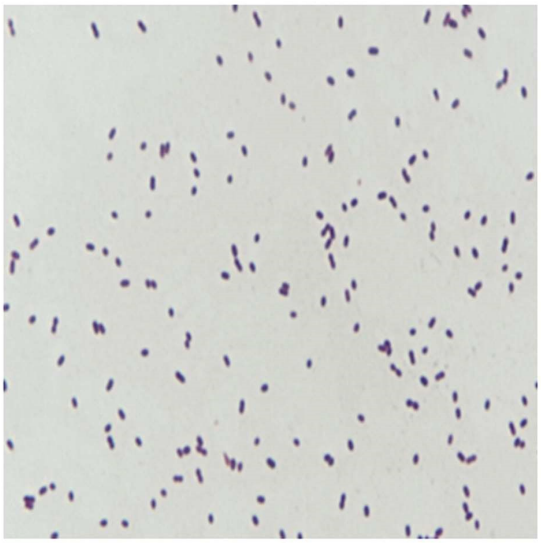

图 1 B5C 革兰染色显微镜下形态（10× 100）

Fig.1 Microscopic morphology of B5C after Gram staining (10× 100)

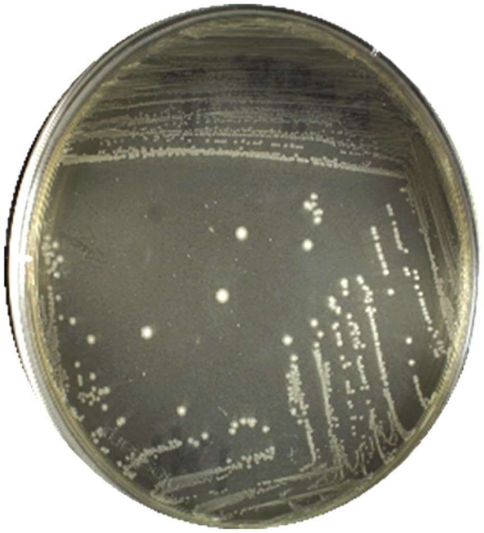

图 2 B5C 菌落形态

Fig.2 Colonial morphology of strain B5C

### 2.2 高效尿酸降解菌 B5C 尿酸降解率测定

尿酸降解菌 B5C 在不同浓度的 BHI 尿酸培养基中的尿酸降解率因培养条件和天数的改变而发生变化：在厌氧和需氧培养条件下，随着培养基尿酸浓度的升高，B5C 的尿酸降解率逐渐下降，但在需氧条件下可能更利于 B5C 对尿酸的利用，因此尿酸降解率较厌氧条件下升高（图 3）；第 1 天尿酸降解率最低，第 4-5 天尿酸降解率逐渐升高并趋于平稳，第 5 天在需氧

条件下的尿酸降解率分别为 87.5%、87.0%、69.8%、64.5%、61.3%、52.6%，且与初始尿酸浓度相比具有统计学意义（表 1）。

表 1 菌株 B5C 在含尿酸的 BHI 培养基中的尿酸降解率（需氧）

Table 1 Uric acid degradation rate of strain B5C in BHI medium containing uric acid (aerobic)

| Initial measured concentration of uric acid (mmol/L) | Uric acid concentration after degradation (mmol /L) | Uric acid degradation rate (%) | t value | *P* value |
|---|---|---|---|---|
| 0.187± 0.008 | 0.023± 0.001 | 87.5 | 39.392 | 0.001 |
| 0.374± 0.046 | 0.045± 0.006 | 87.0 | 12.885 | 0.006 |
| 0.712± 0.069 | 0.215± 0.021 | 69.8 | 18.024 | 0.003 |
| 1.463± 0.073 | 0.520± 0.026 | 64.5 | 34.455 | 0.001 |
| 2.920± 0.137 | 1.130± 0.053 | 61.3 | 36.712 | 0.001 |
| 5.903± 0.287 | 2.796± 0.139 | 52.6 | 36.251 | 0.001 |

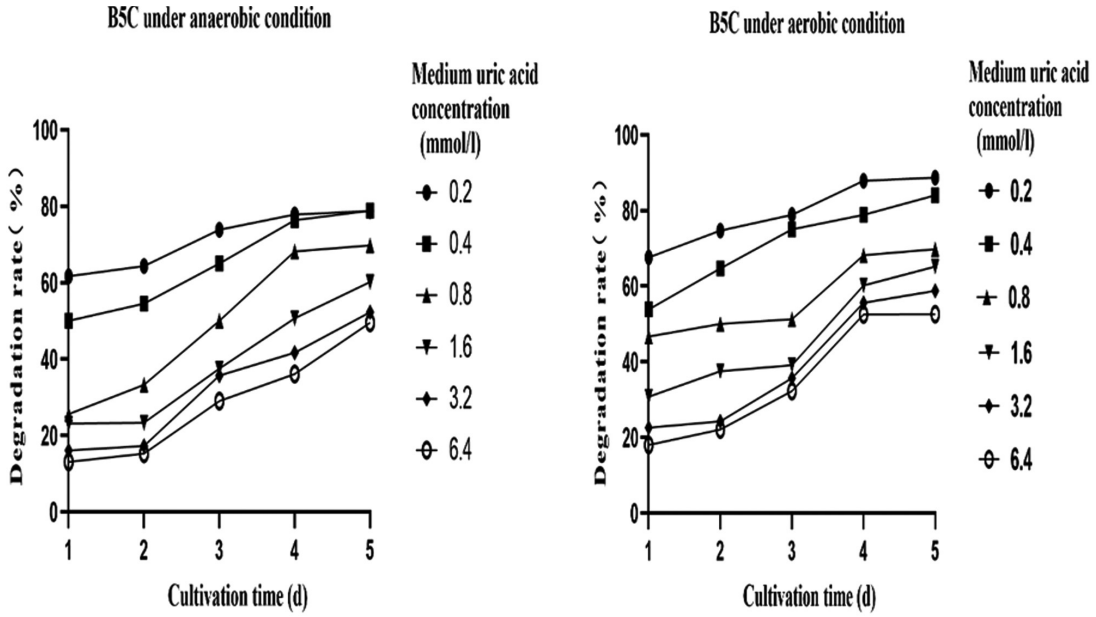


图 3 厌氧和需氧条件下 B5C 尿酸降解率

Fig.3 Uric acid degradation rate of strain B5C under the anaerobic and aerobic conditions

### 2.3 降尿酸条件优化

**2.3.1 培养温度对尿酸降解率的影响** 接种第 5 天测定不同温度下 B5C 的尿酸降解率，由图 4 可以看出培养温度在 25-37℃的尿酸降解率呈现上升趋势，培养温度在 25℃的尿酸降解率最低，厌氧和需氧条件下分别为 35.9%和 44.2%，37℃的尿酸降解率最高，达到 88.4%（需氧），37℃-43℃的尿酸降解率逐渐下降。总体而言，温度对尿酸降解率的影响较大，出现高峰值的温度在 37℃，可能 37℃更利于菌体的生长，增加了对外界尿酸的摄取。

**2.3.2 pH 值对尿酸降解率的影响** 在最佳培养温度 37℃、第 5 天测定不同 pH 值影响下的尿酸降解率。由图 5 可以看出，pH 为 5.0-7.0 的尿酸降解率呈上升趋势，pH 值在 5.0 的尿酸降解率最低，厌氧和需氧条件下分别为 47.3%和 53.2%，在 pH 7.0 的尿酸降解率最高，厌氧和需氧条件下分别为 76.9%和 88.7%，pH 值在 7.0-10.0 的尿酸降解率缓慢下降。由此可见，尿酸降解率虽然受 pH 值的影响，但在 9.0-10.0 时比较平稳。pH 7.0 与人体肠道 pH 值更接近，菌株 B5C 的尿酸降解率最高。

### 2.4 高效尿酸降解菌 B5C 16S rDNA 序列测定及系统进化树构建

将 B5C 基因组在 NCBI-BLAST 中进行比对，共挑选出与 B5C 有近缘关系的细菌共 24 株，通过 MEGA-X 10 进行系统进化树分析，显示 B5C 与粪肠球菌 4369（Enterococcus faecalis strain 4369）存在 98%的近缘关系（图 4），登录号为 ON318408。由此可鉴定 B5C 为粪肠球菌。

### 2.5 生化反应鉴定结果

采用梅里埃 VITEK 2 Compact 生化反应系统对 B5C 进行微生物鉴定，具体检测结果见表 2。经鉴定，B5C 为粪肠球菌，同 16S rDNA 序列测定结果一致。

### 2.6 高效尿酸降解菌 B5C 药敏试验

药敏结果显示（表 3），B5C 对利奈唑胺、替加环素、万古霉素、阿莫西林、氨苄西林和青霉素 G 等抗生素表现出较高的敏感性。表明该菌株不含有青霉素、万古霉素、利奈唑胺等抗生素的耐药基因。

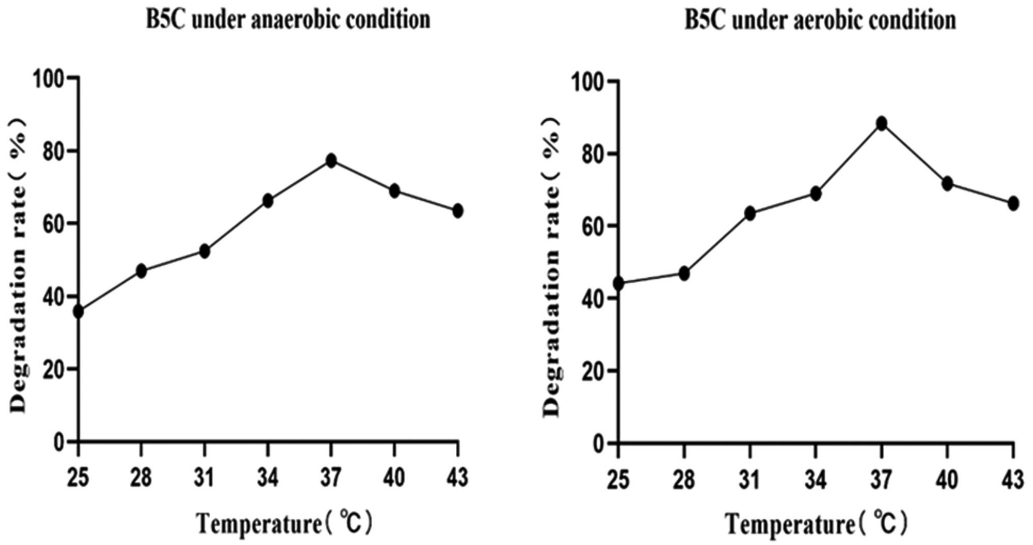


图 4 不同培养温度下 B5C 尿酸降解率

Fig.4 Uric acid degradation rate of strain B5C under different cultivation temperature

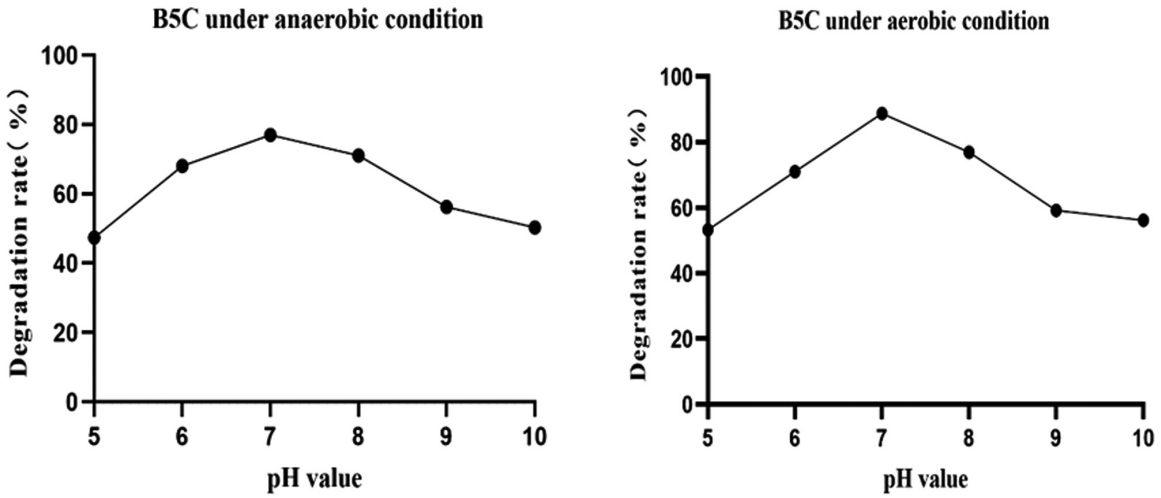


图 5 不同 pH 值下 B5C 尿酸降解率

Fig.5 Uric acid degradation rate of strain B5C under different pH value

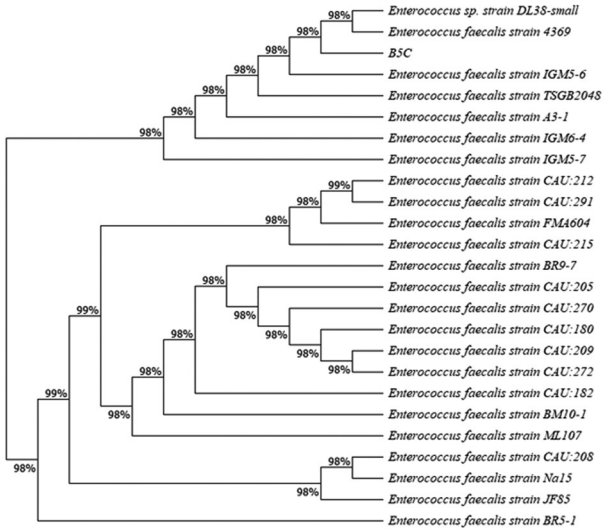


图 6 B5C 系统进化发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of strain B5C

## 3 讨论

人体通过两种途径排出尿酸，70%通过肾脏排出，主要经肾小管分泌，尿道排出；其余 30%由肠道上皮细胞转运至肠腔直接排出或肠道微生物分解排出[11]。由于肠腔内环境受疾病、饮食和遗传等多种因素干扰，增加了肠道菌群相关研究的难度。目前关于肠道菌群与尿酸代谢紊乱疾病的研究多基于 16S rDNA 二代测序或宏基因组测序技术，分析疾病人群与正常人群的肠道菌群差异，但较难分离获得影响尿酸代谢的特定菌株[12-14]。本研究基于靶向培养基[15]，利用特定的培养基筛选目标菌株，即在 BHI 培养基中加入不同浓度的尿酸进行驯化和初筛，再在高浓度纯尿酸培养基中纯化得到具有高效尿酸降解能力的细菌 B5C。该菌株是从正常人群肠道筛选获得，其在厌氧条件和需氧条件下均具有较高的尿酸降解率，并随着液体培养基中尿酸浓度增加而下降，于第 5 天的尿酸降解率处于平稳，说明在需氧条件下并未抑制该菌对尿酸的利用，在尿酸浓度为 0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.6 mmol/L、3.2 mmol/L、6.4 mmol/L 的 BHI 液体培养基的尿酸降解率分别是 87.5%、87.0%、69.8%、64.5%、61.3%、52.6%均高于 50%。优化培养条件后，在培养温度为 37℃、pH 值 7 时，尿酸降解率最高为 88.7%。

表 2 菌株 B5C 生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results of strain B5C

| Biochemical reaction | Abbreviation | Result | Biochemical reaction | Abbreviation | Result |
|---|---|---|---|---|---|
| D-AMYGDALIN | AMY | + | POLYMIXIN B RESISTANCE | POLYB | + |
| PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C | PIPLC | - | D-GALACTOSE | dGAL | + |
| D-XYLOSE | dXYL | + | N-ACETYL-D-GLU-COSAMINE | NAG | + |
| ARGININE DIHYDROLASE1 | ADH1 | + | D-MALTOSE | dMAL | + |
| BETA-GALACTOSIDASE | BGAL | - | BACITRACIN RESISTANCE | BACI | + |
| ALPHA-GLUCOSIDASE | AGLU | + | NOVOBIOCIN RESISTANCE | NOVO | + |
| Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE | APPA | - | GROWTH IN 6.5% NaCl | NC6.5 | + |
| CYCLODEXTRIN | CDEX | + | D-MANNITOL | dMAN | + |
| L-Aspartate ARYLAMIDASE | AspA | + | D-MANNOSE | dMNE | + |
| BETA GALACTOPYRANOSIDASE | BGAR | - | METHYL-B-D-GLU-COPYRANOSIDE | MBdG | + |
| ALPHA-MANNOSIDASE | AMAN | - | PULLULAN | PUL | - |
| PHOSPHATASE | PHOS | - | D-RAFFINOSE | dRAF | + |
| Leucine ARYLAMIDASE | LeuA | + | O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.) | O129R | + |
| L-Proline ARYLAMIDASE | ProA | - | SALICIN | SAL | + |
| BETA GLUCURONIDASE | BGURr | - | SACCHAROSE/SUCROSE | SAC | + |
| ALPHA-GALACTOSIDASE | AGAL | - | D-TREHALOSE | dTRE | + |
| L-Pyrrolidonyl-ARYLAMI-DASE | PyrA | + | ARGININE DIHYDROLASE 2 | ADH2s | + |
| BETA-GLUCURONIDASE | BGUR | - | OPTOCHIN RESISTANCE | OPTO | + |
| Alanine ARYLAMIDASE | AlaA | + | D-RIBOSE | dRIB | + |
| Tyrosine ARYLAMIDASE | TyrA | + | L-LACTATE alkalinization | ILATk | - |
| D-SORBITOL | dSOR | + | LACTOSE | LAC | + |
| UREASE | URE | - | | | |

表 3 B5C 药敏试验结果

Table 3 Drug sensitivity test results of B5C

| Drug | Minimum inhibitory concentration udgment criteria( μg/mL ) | | | Minimum inhibitory concentration | Drug sensitivity test results |
|---|---|---|---|---|---|
| | S | I | R | | |
| Linazolamide | 2≤ | - | ≥8 | 2 | S |
| Tegacyclin | 0.25≤ | - | >0.25 | 0.12≤ | S |
| Vancomycin | 4≤ | - | ≥32 | 1 | S |
| Amoxicillin | 8≤ | - | ≥16 | 2 | S |
| Erythromycin | 0.5≤ | - | ≥8 | 2 | I |
| Ampicillin | 8≤ | - | ≥16 | 2≤ | S |
| Penicillin G | 8≤ | - | ≥16 | 2 | S |

Note: S means sensitive, I means moderately sensitive, R means resistance.

基于 16S rDNA 序列测定并构建系统进化树结果显示，该菌与粪肠球菌 4369（*Enterococcus faecalis* strain 4369）的同源关系为 98%，因此鉴定为粪肠球菌。

随着对微生物研究的深入探索，越来越多的微生物被发现具有降解尿酸的功能，如枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌，均可通过有氧依赖途径将尿酸分解代谢为尿囊素，再将尿囊素分解为氨，排出体外[16,17]。另有研究发现，大肠杆菌在 14C 标记的腺嘌呤培养基中产生了 $^{14}CO_2$，这表明大肠杆菌可将嘌呤代谢的终产物尿酸降解为尿囊素和 $CO_2$[18]。此外，在大肠杆菌中还鉴定出高亲和力尿酸转运蛋白 UacT，它对尿酸表现出高亲和力，而对嘌呤没有亲和力，进一步证明大肠杆菌利用尿酸的可能性[19]。不同于克雷伯菌和大肠杆菌，枯草芽孢杆菌所具有的 puc 基因簇和尿酸酶基因可调节尿酸降解途径，已有研究将枯草芽孢杆菌来源的尿酸酶基因克隆并实现了异源表达，如苛求芽孢杆菌（Bacillus fastidiosus）和克劳氏芽孢杆菌（Bacillus clausii）所表达的高效能、高碱性的尿酸酶基因[20,21]。

本研究分离获得的降尿酸菌株 B5C 为粪肠球菌，属于肠球菌属，是哺乳动物肠道内定植的重要菌种，具有较强的抗氧化应激和抵御外界不良环境的能力[22]。虽然不是公认的安全菌种，但部分粪肠球菌因缺乏毒力因子和具有抑制有害细菌生长的细菌素等特性，被广泛开发应用在发酵食品和益生菌制剂[23-25]。Fang 等[24]对粪肠球菌、长双歧杆菌和嗜酸乳杆菌三联活粉末 / 胶囊的临床应用进行了安全性评估，证实该联合益生菌制剂可调节肠道微生态平衡，用于各种消化系统疾病的治疗和预防，总体安全性良好。一项前瞻性、比较性、随机研究表明[25]，由长双歧杆菌 BB-46 和粪肠球菌 ENCfa-68 制备而成的益生菌制剂可改善幽门螺旋杆菌阳性患者肠道菌群失衡，显着降低药物引起的不良反应并增加胃肠道黏膜的保护因子水平，提高患者的依从性。田等[26]分离的尿酸降解菌为大肠杆菌，厌氧条件下的尿酸降解率为 50.2%，与本研究分离的菌株和尿酸降解率均有所不同，且尚无将大肠杆菌作为益生菌的报道，其安全性有待进一步评价。本研究分离获得的菌株在需氧和厌氧条件下均具有较高的尿酸降解率，可能与高浓度尿酸体外驯化后激活菌株内相关的降尿酸功能基因有关，但其具体降尿酸机制及益生特性还有待深入研究。

目前针对治疗高尿酸血症的药物已被广泛开发和利用，但存在的副作用不容忽视。因此探索具有无毒、安全性高、副作用小具有尿酸降解功能的微生物活性制剂将是未来研究的热点。本研究分离得到的人肠源性高效尿酸降解菌 B5C，为今后应用该菌于临床医疗实践提供科学依据和菌种资源，具有极大地社会价值和深远意义。

## 参 考 文 献（References）


[1] Alvarez-Lario B, Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution [J]. Rheumatology, 2010, 49(11): 2010-2015

[2] Pascart Tristan, Lioté Frédéric. Gout: state of the art after a decade of developmen ts [J]. Rheumatology (Oxford, England), 2019, 58(1): 1-18

[3] Li C, Hsieh MC, Chang SJ. Metabolic syndrome, diabetes, and hyperuricemia[J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25(2): 210-216

[4] Bonakdaran S, Kharaqani B. Association of serum uric acid and metabolic syndrome in type 2 diabetes [J]. Curr Diabetes Rev, 2014, 10(2): 113-117

[5] Pengqing Nie, Zhiqiang Li, Yimeng Wang, et al. Gut microbiome interventions in human health and diseases [J]. Medicinal Research Reviews, 2019, 39(6): 2286-2313

[6] Michael A. Fischbach. Microbiome: Focus on Causation and Mechanism[J]. Cell, 2018, 174(4): 785-790

[7] Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, et al. Current understanding of the human microbiome[J]. Nat Med, 2018, 24(4): 392-400

[8] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5728): 1635-1638

[9] Ichida K, Matsuo H, Takada T, et al. Decreased extra-renal u rate excretion is a common cause of hyperuricemia [J]. Nat Commun, 2012, 3: 764

[10] 曹敬荣, 陈静, 高世超, 等. 应用通用引物 PCR 检测诊断细菌和真菌性中枢神经系统感染的价值 [J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15 (03): 145-149

[11] Mandal AK, Mount DB. The molecular physiology of uric acid homeostasis[J]. Annual review of physiology, 2015, 77: 323-345

[12] Guo Z, Zhang J, Wang Z, et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20602

[13] 任科雨, 勇春明, 金延春, 等. 青岛地区高尿酸血症患者的肠道菌群分析[J]. 中国医师杂志, 2014, 16(12) : 1649-1651

[14] Shao T, Shao L, Li H, et al. Combined signature of the fecal microbiome and metabolome in patients with gout [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 268

[15] Browne Hilary P, Forster Samuel C, Anonye Blessing O, et al. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation[J]. Nature, 2016, 533(7604): 543-546

[16] Schultz A C, Nygaard P, Saxild H H. Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in Bacillus subtilis and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator[J]. Journal of bacteriology, 2001, 183 (11): 3293-3302

[17] Hicks Katherine A, Ealick Steven E. Biochemical and structural characterization of Klebsiella pneumoniae oxamate amidohydrolase in the uric acid degradation pathway [J]. Acta Crystallogr D Struct Biol, 2016, 72(Pt 6): 808-816

[18] Xi H, Schneider B L, Reitzer L. Purine catabolism in Escherichia coli and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage [J]. J Bacteriol, 2000, 182(19): 5332-5341

[19] Papakostas Konstantinos, Frillingos Stathis. Substrate selectivity of YgfU, a uric acid transporter from *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2012, 287(19): 15684-15695

[20] Zhang C, Yang X, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly (ethylene glycol) on a recombinant uricase from Bacillus fastidiosus [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74 (6): 1298-1301

[21] 王一恬, 沈微, 陈献忠, 等. 一种来源于克劳氏芽孢杆菌的高碱性尿酸氧化酶的异源表达及重组酶性质分析 [J]. 生物学杂志, 2013, 30(02): 1-4

[22] Baureder M, Reimann R, Hederstedt L. Contribution of Catalase to Hydrogen Peroxide Resistance in Enterococcus Faecalis [J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 331(2): 160-164


（下转第 4006 页）

2017, 34(2): 26

[12] Jones R P, Sutton P A, Evans J P, et al. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 116 (7): 923-929

[13] Serebriiskii I G, Connelly C, Frampton G, et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3722

[14] Lane D P. Cancer. p53, guardian of the genome[J]. Nature, 1992, 358 (6381): 15-16

[15] Toledo F, Wahl G M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(12): 909-923

[16] Contractor T, Harris C R. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2[J]. Cancer Res, 2012, 72(2): 560-567

[17] R M, P H A, Mahadevan V. HDAC inhibitors show differential epigenetic regulation and cell survival strategies on p53 mutant colon cancer cells[J]. J Biomol Struct Dyn, 2018, 36(4): 938-955

[18] Pino M S, Chung D C. The chromosomal instability pathway in colon cancer[J]. Gastroenterology, 2010, 138(6): 2059-2072

[19] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823

[20] Hosseini S A, Salehifard Jouneghani A, Ghatrehsamani M, et al. CRISPR/Cas9 as precision and high-throughput genetic engineering tools in gastrointestinal cancer research and therapy [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 223(Pt A): 732-754

[21] Matano M, Date S, Shimokawa M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human in testinal organoids[J]. Nat Med, 2015, 21(3): 256-262

[22] Roper J, Tammela T, Cetinbas N M, et al. In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(6): 569-576

[23] Li Y, Li X, Qu J, et al. Cas9 Mediated Correction of beta-catenin Mutation and Restoring the Expression of Protein Phosphorylation in Colon Cancer HCT-116 Cells Decrease Cell Proliferation in vitro and Hamper Tumor Growth in Mice in vivo[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 17-29

[24] Ikediobi O N, Davies H, Bignell G, et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(11): 2606-2612

[25] Meyer B, Are C. Current Status and Future Directions in Colorectal Cancer[J]. Indian J Surg Oncol, 2018, 9(4): 440-441

[26] Schirripa M, Cohen S A, Battaglin F, et al. Biomarker-driven and molecular targeted therapies for colorectal cancers [J]. Semin Oncol, 2018, 45(3): 124-132

[27] 谢俊祥, 张琳. 精准医疗发展现状及趋势 [J]. 中国医疗器械信息. 2016, 22(11): 5-10

[28] Jiang C, Meng L, Yang B, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment [J]. Clin Genet, 2020, 97(1): 73-88

[29] Chen M J, Chung-Faye G A, Searle P F, et al. Gene therapy for colorectal cancer: therapeutic potential [J]. BioDrugs, 2001, 15 (6): 357-367

[30] Ma S C, Zhang J Q, Yan T H, et al. Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer [J]. Cancer Med, 2023 [Epub ahead of print]

[31] Tria S M, Burge M E, Whitehall V L J. The Therapeutic Landscape for KRAS-Mutated Colorectal Cancers[J]. Cancers (Basel), 2023, 15 (8): 2375

[32] Doudna J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. Nature, 2020, 578(7794): 229-236

[33] Kreitz J, Friedrich M J, Guru A, et al. Programmable protein delivery with a bacterial contractile injection system [J]. Nature, 2023, 616 (7956): 357-364

(上接第 4019 页)

[23] Yuehua Jiao, Lanwei Zhang, Fei Liu, et al. Complete genome sequence of Enterococcus faecalis LD33, a bacteriocin-producing strain[J]. J Biotechnol, 2016, 227: 79-80

[24] Fang Jingyuan,Yang Yunsheng, Xie Weifen. Chinese expert consensus on the application of live combined Bifidobacterium, Lactobacillus, and Enterococcus powder/capsule in digestive system diseases (2021)[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2023: 1-10

[25] Yakovenko E P, Strokova T V, Iakovenko A V, et al. A prospective randomized comparative study of the effificacy and safety of a two-week bismuth-based quadrotherapy of Helicobacter pylori infection with the inclusion of the probiotic containing Bifidobacterium longum BB-46 and Enterococcus faecium ENCfa-68 [J]. Ter Arkh, 2021, 93: 916-922

[26] 田婷婷, 陈邬锦, 梁美婷, 等. 低尿酸人群肠道尿酸降解功能菌的筛选、驯化及鉴定[J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39(04): 792-797