

发酵黏液乳杆菌 H3260 通过调节肠道微生物群来缓解高尿酸血症

林文珍¹, 柳小妹², 袁宋健², 钱凯⁴, 李源涛², 林志楷¹, 徐炜^{2,3,4}, 张帮周^{2,3,4*}

1 福建省亚热带植物研究所, 福建省亚热带植物生理生化重点实验室, 福建 厦门

2 厦门承葛生物科技有限公司, 福建 厦门

3 江西承葛生物科技有限公司, 江西 宜春

4 宜春学院 医学院, 江西 宜春

林文珍, 柳小妹, 袁宋健, 钱凯, 李源涛, 林志楷, 徐炜, 张帮周. 发酵黏液乳杆菌 H3260 通过调节肠道微生物群来缓解高尿酸血症[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3702-3720.

LIN Wenzhen, LIU Xiaomei, YUAN Songjian, QIAN Kai, LI Yuantao, LIN Zhikai, XU Wei, ZHANG Bangzhou. *Limosilactobacillus fermentum* H3260 alleviates hyperuricemia by regulating the gut microbiota[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3702-3720.

摘要:【目的】探究从人体粪便中分离得到的一株发酵黏液乳杆菌 H3260 的体外降尿酸性能及其生理生化特性, 并进一步评估该菌株对高尿酸血症小鼠模型血清尿酸水平及肠道菌群的影响, 旨在为开发预防和治疗高尿酸血症的功能性食品提供科学依据。【方法】采用高效液相色谱法和尿酸生成法体外测定乳杆菌对尿酸、嘌呤、核苷的降解能力及其对黄嘌呤氧化酶的抑制能力。通过药敏性试验和体外耐受性试验, 评估菌株的益生菌特性。通过体内实验验证发酵黏液乳杆菌 H3260 的降尿酸作用。【结果】筛选出一株发酵黏液乳杆菌 H3260, 其对尿酸、腺嘌呤和核苷的降解率分别为 $(86.84 \pm 0.03)\%$ 、 $(60.84 \pm 2.21)\%$ 和 $(100.00 \pm 0.00)\%$, 对黄嘌呤氧化酶的抑制率为 22.48%。该菌株对红霉素、头孢曲松、青霉素 G、氯霉素等 7 种常见抗生素敏感, 在 0.3% 的胆盐环境下处理 2.5 h 后, 菌株数量仍然能维持在 1.00×10^6 CFU/mL 以上。动物实验结果表明, 该菌株能显著降低高尿酸血症小鼠的尿酸、肌酐和尿素氮水平, 并通过调节肠道菌群来缓解高尿酸血症。【结论】本研究通过高效液相色谱法及体外黄嘌呤氧化酶测定法筛选出具有高效降解尿酸的发酵黏液乳杆菌 H3260, 该菌株在体外展现出良好的生理生化特性, 并在体内实验中显著改善高尿酸血症相关指标及调节肠道菌群, 展现出作为预防和治疗高尿酸血症优势菌种的潜力。

关键词: 尿酸; 嘌呤核苷; 乳杆菌

资助项目: 福建省高校产学研联合创新项目(2022Y4007); 国家自然科学基金(U22A20376); 厦门市科技计划(3502Z20182011, 3502Z20204503-9)

This work was supported by the Fujian Province University Industry University Research Joint Innovation Project (2022Y4007), the National Natural Science Foundation of China (U22A20376), and the Xiamen Science and Technology Planning (3502Z20182011, 3502Z20204503-9).

*Corresponding author. E-mail: xwkhj@163.com

Received: 2025-02-13; Accepted: 2025-03-21; Published online: 2025-06-05

Limosilactobacillus fermentum H3260 alleviates hyperuricemia by regulating the gut microbiota

LIN Wenzhen¹, LIU Xiaomei², YUAN Songjian², QIAN Kai⁴, LI Yuantao², LIN Zhikai¹, XU Wei^{2,3,4}, ZHANG Bangzhou^{2,3,4*}

¹ Fujian Key Laboratory of Subtropical Plant Physiology and Biochemistry, Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian, China

² Xiamen Treatgut Biotechnology Co., Ltd., Xiamen, Fujian, China

³ Jiangxi Treatgut Biotechnology Co., Ltd., Yichun, Jiangxi, China

⁴ School of Clinical Medicine, Yichun University, Yichun, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] To investigate the *in vitro* uric acid degradation performance and physiological and biochemical characteristics of *Limosilactobacillus fermentum* H3260 isolated from human feces and examine the effects of this strain on the serum uric acid level and gut microbiota in the mouse model of hyperuricemia, providing scientific evidence for the development of functional food for the prevention and treatment of hyperuricemia. [Methods] HPLC and the uric acid production assay were employed to determine the abilities of the target strain to degrade uric acid, adenosine, and nucleosides and to inhibit xanthine oxidase. The probiotic characteristics of the strain were evaluated by antimicrobial sensitivity tests and *in vitro* tolerance tests. The uric acid-lowering effect of *L. fermentum* H3260 was verified by *in vivo* experiments. [Results] *L. fermentum* H3260 was screened out. The strain exhibited degradation rates of (86.84±0.03)% for uric acid, (60.84±2.21)% for adenine, and (100.00±0.00)% for nucleosides, along with an inhibition rate of 22.48% for xanthine oxidase. The strain was sensitive to seven common antibiotics, including erythromycin, ceftriaxone, penicillin G, and chloramphenicol. After treatment in 0.3% bile salt for 2.5 h, the bacterial count remained above 1.00×10⁶ CFU/mL. Animal experiments showed that the strain significantly reduced uric acid, creatinine, and blood urea nitrogen in hyperuricemic mice and regulate the gut microbiota to alleviate hyperuricemia. [Conclusion] We successfully screened out a strain *L. fermentum* H3260 capable of efficiently degrading uric acid, adenosine, and nucleosides. The strain exhibited good physiological and biochemical characteristics *in vitro* and significantly improved hyperuricemia-related indicators and regulated the gut microbiota *in vivo*, showing potential as an elite strain for the prevention and treatment of hyperuricemia.

Keywords: uric acid; purine nucleoside; *Lactobacillus*

尿酸(uric acid, UA)作为人体内嘌呤类物质代谢的终产物,其溶解度较低,主要以尿酸盐形式存在^[1]。当人体内嘌呤代谢发生紊乱,导致UA生成增加或排泄受阻时,UA会在组织和关节

内大量蓄积,从而形成高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)^[2]。根据诊断标准,无论性别,若非同日两次空腹血尿酸水平高于420 μmol/L时,即可诊断为HUA^[3]。HUA与痛风密切相关,UA水

平过高会导致尿酸盐析出结晶, 这些晶体沉积于关节中, 进而引发痛风^[4]。此外, HUA 还被认为是动脉粥样硬化的危险因素, 与代谢综合征、高血压、慢性糖尿病及肾脏疾病的发生密切相关^[5]。随着生活水平的提高, 全球 HUA 及痛风的患病率逐年上升。数据显示, 截至 2020 年, 全球 HUA 及痛风患病人数已达 9.3 亿人, 其中中国 HUA 的患病人数约为 1.7 亿人, 痛风患病人数约为 1 466 万人。考虑到中国未来的人口增长趋势和患病率的持续上升, 预计到 2030 年, 中国 HUA 及痛风患病人数将增至 2.4 亿人, 且发病群体呈现年轻化趋势^[6-7]。因此, HUA 已成为严重威胁人类健康的重大公共卫生疾病之一。

目前, 临床上治疗 HUA 的常用药物包括别嘌呤醇、非布索坦、苯溴马隆和丙磺舒等, 这些药物虽起效迅速且治疗周期较短, 但均存在明显的副作用, 如易引发过敏反应并对患者的机体造成较大损害^[8]。因此, 开发一种对人体副作用较小或无副作用的降尿酸药物具有重要的临床意义。

根据联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)/世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 的定义, 益生菌是指“当摄入足够量时, 能够为宿主带来健康益处的活微生物”^[9]。益生菌在促进人体健康方面发挥着巨大作用^[10]。乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 作为人体肠道中常见的益生菌, 具有促进肠道健康、调节免疫、产生抗菌物质以及释放功能性蛋白质等作用^[11]。乳杆菌 (*Lactobacillus*) 是乳酸菌中的重要类群, 属于兼性厌氧的杆状细菌, 广泛分布于发酵食品和人体肠道、生殖道等黏膜环境中。因其独特的代谢能力, 乳杆菌已成为调控尿酸稳态的研究热点^[12-13]。例如, Zhao 等^[14]利用鼠李糖乳酪杆菌 Fmb14 治疗 HUA 小鼠, 显著降低了小鼠血清 UA 水平。Shi 等^[15]通过植物乳植杆菌对 HUA 小鼠进行干预后, 发现其肝脏和肾脏的病理损伤有所减轻, 炎症反应也得到缓解, 血液

中 UA 水平降低, UA 代谢平衡得以恢复。Lee 等^[16]从发酵食品中筛选出 2 株能降解肌苷、鸟苷、腺苷的副干酪乳杆菌 MJM60396 和加氏乳杆菌 MJM60662, 发现副干酪乳杆菌 MJM60396 可有效地降低 HUA 小鼠的尿酸水平, 减轻炎症损伤并平衡肠道菌群。因此, 能够有效降解尿酸、嘌呤核苷的乳杆菌是预防 HUA 的潜在方法^[17]。

本研究从健康人体粪便中筛选出乳酸菌, 采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法和尿酸生成法筛选出具有潜在降尿酸功能的乳杆菌。通过一系列生理生化实验对菌株的益生菌特性进行系统分析。通过构建动物实验模型, 评估筛选出的益生菌对 HUA 的缓解效果, 以期对 HUA 的治疗提供新的思路和理论依据, 同时为微生态药物的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基及试剂

脑心浸液 (BHI) 固体培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0, 脱水小牛脑浸粉 12.5, 脱水牛心浸粉 5.0, 氯化钠 5.0, 葡萄糖 2.0, 磷酸氢二钠 2.5, 琼脂 15.0, 121 °C 灭菌 20 min。

BHI 液体培养基: BHI 液体培养基预制粉末 54.0 g/L, 调整 pH 值至 5.7±0.2, 121 °C 灭菌 20 min。

模拟胃液: 根据《中华人民共和国药典 (2015 版)》^[18]提供的方法, 准确量取 16.4 mL 的 1 mol/L HCl, 加入 800 mL 去离子水, 再加入 10 g 胃蛋白酶, 混匀, 加水定容至 1 000 mL。用 1 mol/L HCl 调整 pH 为 2.5, 充分溶解后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 于 4 °C 冰箱中保存。

模拟肠液: 根据《中华人民共和国药典 (2015 版)》^[18]提供的方法, 准确称取磷酸二氢钾

6.8 g, 加 500 mL 去离子水。用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 6.8; 另取胰蛋白酶 10 g 加水适量使其溶解, 将两液混合后定容至 1 000 mL。0.1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 8.0, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 于 4 °C 冰箱中保存。

20 mmol/L 中性磷酸二氢钾: 准确称取 1.359 g 磷酸二氢钾, 定容至 500 mL, 用 NaOH 调配 pH 至 7.0。

0.1 mol/L NaOH 溶液: 称取 4 g NaOH, 加入 1 L 的去离子水。

尿酸、腺嘌呤-鸟苷、肌苷-腺苷标准液: 分别称取 20 mg 的肌苷、鸟苷、尿酸、腺苷、腺嘌呤, 将腺嘌呤和鸟苷标准品放在同一烧杯中, 肌苷和腺苷放在同一烧杯中, 加入 10% 的 0.1 mol/L NaOH 和 90% 的 20 mmol/L 中性磷酸二氢钾溶解尿酸、腺嘌呤-鸟苷、肌苷-腺苷, 配制得到 20 mL 的 500 μ g/mL 的尿酸、腺嘌呤-鸟苷、肌苷-腺苷标准液; 将 500 μ g/mL 的尿酸、腺嘌呤-鸟苷、肌苷-腺苷标准液分别稀释为 400、300、200、100、50 μ g/mL。

300 mg/kg 氧嗪酸钾: 称取 0.24 g 氧嗪酸钾加入 8 mL 的 0.5 % CMC-Na 溶液, 置于涡旋搅拌器搅拌, 直至完全溶解。

1.1.2 动物

雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只, 6 周龄, 购自广东药康生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2023-0067。所有动物实验均经宜春学院医学伦理委员会批准, 审批号: 2023-JCYX-013。

1.1.3 主要试剂和仪器

色谱级尿酸、肌苷、腺苷、腺嘌呤、鸟苷标准品、磷酸二氢钾、羧甲基纤维素钠、别嘌呤醇, 上海麦克林生化科技有限公司; PBS 缓冲液(pH 7.2–7.4)、生理盐水(0.9%), 武汉普诺赛生命科技有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶、牛胆盐, 北京索莱宝科技有限公司; BHI 液体培养基预制粉末、琼脂粉, 广东环凯微生物科技

有限公司; 甲醇(分析纯)、NaOH(分析纯), 西陇科学股份有限公司; 尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒、肌酐(creatinine, Cr)试剂盒, 深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司; 黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)试剂盒、尿酸试剂盒, 南京建成生物工程研究所; QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, Qiagen 公司; DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司; 冷冻离心机、Multiskan™ GO 分光光度计、Qubit® 2.0 荧光仪, 赛默飞世尔科技公司; HH 恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; Hirayama 高压灭菌锅, 施都凯仪器设备(上海)有限公司; 酶标仪, 帝肯(上海)实验器材有限公司; 厌氧培养箱, 上海铂温仪器有限公司; 恒温摇床培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 菌株分离纯化

菌株来源于福建、江西、东北等地区健康成人的粪便样本。首先, 将人体粪便稀释 9 倍后, 将稀释液涂布于 BHI 固态培养基上, 置于 37 °C 厌氧培养箱中培养 24 h。从培养基上挑选分离良好、形态呈圆形且不透明的菌落进一步培养。挑取单菌落进行 3 轮划线纯化, 最终获得纯化菌株。随后, 选择单个菌落进行革兰氏染色, 选择革兰氏阳性菌落进行纯化培养, 直至获得纯染色。所用菌株均保存在厦门承葛生物科技有限公司微生态医疗技术创新中心实验室。

1.3 菌株的培养

对筛选得到的菌株进行分子生物学鉴定。将单菌落接种至 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 再取 1.0 mL 的菌液接种于 10 mL BHI 液体培养基中, 于 37 °C 厌氧培养 24 h, 即为目标菌液, 用于后续实验。

1.4 菌株的鉴定

采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌株的基因组 DNA。以提取获得的基因组 DNA 为模板, 使用 16S rRNA 基因全长引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (30 μ L): 2 $\times$ T5 direct PCR Mix (Plant) 15 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 3 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行基因测序。

1.5 筛选具有降解尿酸、嘌呤、核苷的乳酸菌

配制浓度为 50、100、200、300、400、500 μ g/mL 的尿酸、腺嘌呤-鸟苷、肌苷-腺苷标准液, 使用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤备用。色谱条件: 流速 1.0 mL/min, 波长 254 nm, 洗脱时间 40 min, 温度 40 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L, 等度洗脱, 流动相组成: 磷酸二氢钾: 甲醇=100:1。

参考 Fong 等^[19]和 Walther 等^[20]的方法, 将分离得到的菌株接种于 BHI 固体培养基活化, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养箱中培养 24 h。挑取单菌落接种于 10 mL BHI 培养基中培养 24 h, 将 OD_{600} 调整至 0.8 后, 接种至 3 份 40 mL BHI 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 48 h 后, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 用 PBS 洗涤菌体沉淀 2 次, 去掉残留培养基, 加入 2.5 mL PBS, 获得菌悬液。吸取 750 μ L 至无菌无酶的 2 mL 离心管中, 加入 750 μ L 400 μ g/mL 的尿酸、腺嘌呤-鸟苷、肌苷-腺苷标准液, 混匀, 200 r/min 培养 6 h。将共培养 6 h 的培养液放入 95 $^{\circ}$ C 的水浴锅中, 高温灭菌 10 min, 0.22 μ m 过滤器过滤, 用于 HPLC 分析。降解率按照公式(1)进行计算。

$$a = (1 - \frac{C}{C_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: a 为降解率(μ g/mL); C_0 为标准溶液的初始浓度(μ g/mL); C 为剩余标准溶液的浓度(μ g/mL)。

1.6 益生菌的无细胞提取物抑制 XOD 能力的研究

黄嘌呤氧化酶抑制能力评价方法参照吴世芳的方法进行测定^[21], 将 1.3 节的菌液 8 000 r/min 离心 10 min 后, 菌体沉淀用无菌 PBS 洗涤 2 次, 用无菌 PBS 调节菌液浓度至 1×10^9 CFU/mL, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 12 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 过滤得到无细胞提取物。

根据表 1 的体系, 将 1.5 mL 无细胞提取物、1.5 mL XOD 酶液 (0.1 U/mL) 及 0.5 mL PBS 混匀, 再加入 1.5 mL 黄嘌呤溶液以启动反应。在 295 nm 紫外波长下于第 4 min 记录吸光度值。对照组以灭菌 PBS (pH 7.5) 缓冲液替代 XOD 酶液。XOD 活性通过 XOD 抑制率(%)表示, 计算时需扣除未加样品和酶的吸光度值。每个样品进行 3 次平行实验, 使用酶标仪在 295 nm 波长下检测反应液吸光度。以 0.1 g/L 别嘌呤醇作为阳性对照, XOD 抑制率的计算如公式(2)所示。

$$\text{抑制率} = \left[1 - \frac{C-D}{A-B} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中: A 为有 XOD 不含样品的吸光度; B 为不含 XOD 和样品的吸光度; C 为有 XOD 和样品的吸光度, D 为有样品但不含 XOD 的吸光度。

1.7 菌株生理生化特征

1.7.1 生长曲线

对筛选得到的菌株进行活化, 接种环挑取

表1 XOD 抑制率测定的反应体系

Table 1 Reaction system for XOD inhibition rate determination

Group	PBS (mL)	Sample (mL)	Xanthine (mL)	XOD (mL)
A	2.0	0.0	1.5	1.5
B	3.5	0.0	1.5	0.0
C	0.5	1.5	1.5	1.5
D	2.0	1.5	1.5	0.0

BHI 固体培养基上的单菌落, 接种至 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 24 h 获得种子液。将种子液吸光值(OD_{600})调整至 0.8, 按照 3% 的接种量接入 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 期间每隔 2 h 取出, 测定菌液在 600 nm 处的吸光值, 直至 24 h 结束。

1.7.2 最适温度和最适 pH

参考尚天翠^[22]的方法进行最适温度测定: 将种子液吸光值(OD_{600})调整至 0.8, 按照 3% 的接种量接入 BHI 液体培养基中, 放入不同温度梯度(27、32、37、42、47 °C)的 200 r/min 摇床培养 10 h 后, 测定 600 nm 处的吸光值。

参考韩庆功等^[23]的方法进行最适 pH 测定: 将种子液吸光值(OD_{600})调整至 0.8, 按照 3% 的接种量接入不同 pH 梯度(pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)的 BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h 后, 测定 600 nm 处的吸光值。

1.7.3 耐胆盐试验

将种子液吸光值(OD_{600})调整至 0.8, 按照 3% 的接种量接种于等体积、牛胆盐浓度分别为 0.1%、0.2% 和 0.3% 的 BHI 液体培养基中, 培养 2.5 h 后梯度稀释至 10^{-6} , 涂布至 BHI 固体培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h 后, 进行平板计数。

1.7.4 药敏试验

采用 WHO 推荐的改良 K-B 纸片法测定菌株的抗生素敏感性。将种子液吸光值(OD_{600})调整至 0.8, 吸取 200 μ L 菌液在 BHI 固体培养基上均匀涂布。在 BHI 固体培养基上放置 3 片同一种抗生素的药敏纸片, 包括红霉素、青霉素 G、苯唑西林、克林霉素、氯霉素、诺氟沙星、环丙沙星、卡那霉素、头孢曲松、四环素、复方新诺明。将 BHI 固体培养基置于厌氧培养箱, 37 °C 培养 24 h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。抑菌圈结果根据 CLSI 2017 M100-S31^[24]判定。

1.8 动物实验

1.8.1 益生菌冻干粉的制备

取种子液按 1% 的接种量接种于 500 mL 的

厌氧瓶中, 37 °C 厌氧培养 24 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 用 PBS 洗涤菌体沉淀 2 次, 去掉残留培养基, 加入 2.5 mL PBS, 获得菌悬液; 将菌液倒入培养皿中, 先在 -80 °C 中预冻 4 h, 再真空冷冻干燥 24 h 即为冻干粉; 取 1.0 g 的冻干粉, 采用平板计数法进行活菌数计算, 剩余样品密封保存于 -20 °C 冰箱。

1.8.2 动物实验设计

选用 24 只 6 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 体重为 20–22 g。饲养环境条件设定为温度 20–26 °C, 相对湿度 40%–70%, 通风频率 15 次/h, 光照周期为 12 h 明/12 h 暗。

小鼠进行 7 d 的适应性喂养后, 随机分为 4 组, 分别为空白对照组、高尿酸模型组、发酵黏液乳杆菌 H3260 组和阳性组(active drug control, ADC), 每组各 6 只。阳性药选择别嘌醇。在造模阶段, 除空白对照组外, 其余各组采用 0.2% 腺嘌呤饲料和腹腔注射氧嗪酸钾(300 mg/kg)联合诱导高尿酸血症肾病模型。造模 14 d 后, 空白对照组每天灌胃生理盐水, 益生菌治疗组每天灌胃 1×10^9 CFU/mL 的发酵黏液乳杆菌 H3260, 阳性组每天灌胃 5 mg/kg 的别嘌醇, 连续治疗 14 d。

1.8.3 血清生化指标测定

在治疗第 14 天, 末次给药结束 1 h 后, 对小鼠进行眼球取血。采集的血液样本置于 1.5 mL 的 EP 管中, 在室温下静置 1 h, 使血液自然凝固和分层。然后在 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清, 按照试剂盒中的方法测定血清中的 UA、Cr 和 BUN 水平。

1.8.4 组织样本检测

剪取肾脏组织, 迅速置于含 4% 多聚甲醛(体积为组织 10 倍以上)的 50 mL 离心管中, 晃动防止黏壁, 固定 48–72 h。取出固定组织, 经 70%–100% 乙醇梯度脱水(各 30 min)、石蜡包埋, 切 3–5 μ m 超薄切片, 用二甲苯及梯度乙醇脱蜡透明, HE 染色, 再经乙醇梯度脱水、二甲

苯透明，中性树胶封片，于光学显微镜下观察肾组织病理改变。

1.8.5 粪便收集及肠道菌群分析

在小鼠治疗第 14 天收集各组小鼠粪便样本并保存于 -80°C 冰箱中。通过 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 提取粪便样本中的基因组 DNA，并利用 Multiskan™ GO 分光光度计评估 DNA 浓度和纯度，再经 DNA 凝胶纯化试剂盒纯化。在 $1\times\text{Tris-acetate-EDTA}$ 缓冲液中进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 质量后，使用正向引物 338F (5'-ACTCCTACGGGGAGGCAGCA-3')和反向引物 806R (5'-TCGGACTACHVGGTWTCTAAT-3')扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 区。PCR 反应体系 (25 μL): KAPA HiFi Mix 12.5 μL ，正、反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL ，DNA 模板 2 μL ，ddH₂O 补至 25 μL 。PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。将扩增后的 25 μL PCR 产物加入 0.8 倍体积的 Vazyme VAHTS DNA Clean Beads 进行纯化，再用 Illumina 的 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒制备测序文库。文库质量经 Qubit® 2.0 荧光仪和 Agilent Bioanalyzer 2100 系统评估后，利用 Illumina MiniSeq 进行测序，以对比分析不同组小鼠肠道微生物多样性的差异。

1.9 统计分析

用方差分析对各组实验数据进行比较，所有数据均为 3 次平行实验所得的平均值，数据以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。通过 ANOVA 软件分析不同组之间的差异，其中， $P<0.05$ 为差异显著， $P<0.01$ 为差异极显著， $P<0.001$ 为差异高度显著。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定

从福建、江西、东北等地区的 20 个健康成人粪便样本中分离并鉴定了 50 株菌株，根据测

序比对确定其中 34 株为乳杆菌，包括 5 株鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)、7 株副干酪乳酪杆菌坚韧亚种 (*L. paracasei* subsp. *tolerans*)、5 株嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、5 株植物乳植杆菌 (*L. plantarum*)、9 株清酒广布乳杆菌 (*L. sakei*)、3 株发酵黏液乳杆菌 (*L. fermentum*)。表 2 为乳杆菌的测序比对结果。

2.2 降解尿酸、核苷乳的酸菌筛选

如图 1 所示，在本研究色谱条件下，尿酸的保留时间为 4.367 min，腺嘌呤的保留时间为 5.471 min，鸟苷的保留时间为 10.851 min，肌苷的保留时间为 10.216 min，腺苷的保留时间为 20.731 min。标准曲线方程分别为： $Y_{\text{尿酸}}=1.27\times 10^4x+3.01\times 10^4$ ， $R^2=1$ ； $Y_{\text{腺嘌呤}}=4.97\times 10^4x+6.35\times 10^4$ ， $R^2=0.999\ 8$ ； $Y_{\text{鸟苷}}=2.71\times 10^4x+5.65\times 10^4$ ， $R^2=0.999\ 9$ ； $Y_{\text{肌苷}}=2.27\times 10^4x+1.06\times 10^4$ ， $R^2=0.999\ 8$ ； $Y_{\text{腺苷}}=3.05\times 10^4x+5.88\times 10^4$ ， $R^2=0.999\ 8$ 。Y：峰面积；x：含量 ($\mu\text{g/mL}$)。

表2 乳杆菌鉴定结果比对

Table 2 Comparison of *Lactobacillus* identification results

ID	Species name	ID	Species name
H2177	<i>L. rhamnosus</i>	H0662	<i>L. plantarum</i>
H2181	<i>L. rhamnosus</i>	H0678	<i>L. plantarum</i>
H2186	<i>L. rhamnosus</i>	H2913	<i>L. plantarum</i>
H2287	<i>L. rhamnosus</i>	H2965	<i>L. plantarum</i>
H2290	<i>L. rhamnosus</i>	H3415	<i>L. plantarum</i>
H2621	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3536	<i>L. sakei</i>
H2624	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3537	<i>L. sakei</i>
H2626	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3538	<i>L. sakei</i>
H1286	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3539	<i>L. sakei</i>
H2629	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3545	<i>L. sakei</i>
H3312	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3546	<i>L. sakei</i>
H2190	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	H3547	<i>L. sakei</i>
H3762	<i>L. acidophilus</i>	H3548	<i>L. sakei</i>
H3771	<i>L. acidophilus</i>	H3550	<i>L. sakei</i>
H3773	<i>L. acidophilus</i>	H2060	<i>L. fermentum</i>
H3774	<i>L. acidophilus</i>	H2104	<i>L. fermentum</i>
H4987	<i>L. acidophilus</i>	H3260	<i>L. fermentum</i>

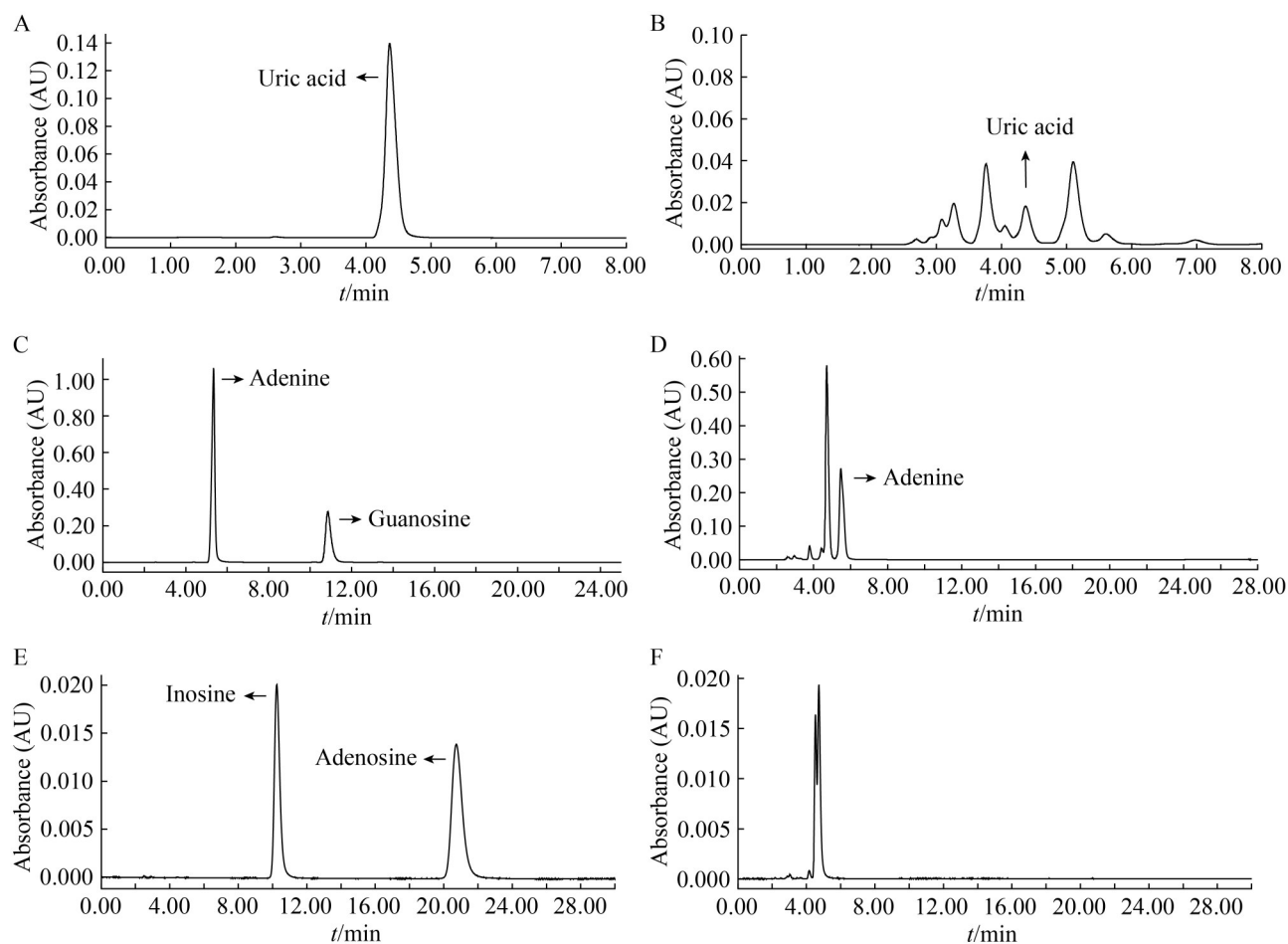


图1 H3260对尿酸、腺嘌呤、鸟苷、肌苷和腺苷的降解图。A: 尿酸标准品; B: 尿酸与H3260共孵育6 h; C: 腺嘌呤和鸟苷标准品; D: 腺嘌呤和鸟苷与H3260共孵育6 h; E: 肌苷和腺苷标准品; F: 肌苷和腺苷与H3260共孵育6 h。

Figure 1 Degradation of uric acid, adenine, guanine, inosine, and adenosine by H3260. A: Uric acid standard; B: Uric acid co-incubated with H3260 for 6 h; C: Adenine and guanine standards; D: Adenine and guanine co-incubated with H3260 for 6 h; E: Inosine and adenosine standards; F: Inosine and adenosine co-incubated with H3260 for 6 h.

如表3所示,大部分菌株对肌苷与鸟苷的降解率均低于50.00%,仅有12株菌株对肌苷和鸟苷的降解率超过50.00%。在尿酸和腺嘌呤的降解方面,仅H3260菌株对尿酸和腺嘌呤的降解率均高于50.00%。这一结果表明,尽管多数乳杆菌具有降解能力,但高效降解菌株相对较少,H3260菌株在降解尿酸和腺嘌呤方面表现突出,具有潜在的应用价值。H3260对尿酸、

腺嘌呤、鸟苷、肌苷、腺苷的降解率分别为 $(86.84 \pm 0.03)\%$ 、 $(60.84 \pm 2.21)\%$ 、 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 。

2.3 菌株对黄嘌呤氧化酶体外抑制能力的评价

如图2所示,阳性对照别嘌呤醇组对XOD的抑制率为97.23%,12株益生菌对XOD的抑制率为0–22.48%。其中,发酵黏液乳杆菌

表3 12株菌株对尿酸、腺嘌呤、鸟苷、肌苷和腺苷的降解率

Table 3 The degradation rates of 12 strains for uric acid, adenine, guanosine, inosine, and adenosine

Strain	Degradation rate (%)				
	Uric acid	Adenine	Guanosine	Inosine	Adenosine
H3762	0	9.13±0.04	75.35±2.56	98.13±0.24	100.00±0.00
H3773	0	12.22±2.13	98.79±3.24	100.00±0.0	100.00±0.00
H4987	0	9.27±1.04	76.12±2.14	88.99±1.34	100.00±0.00
H2913	0	0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
H2965	0	0	89.16±3.34	100.00±0.00	100.00±0.00
H3539	4.93±3.81	18.73±5.23	100.00±0.00	92.06±2.24	95.99±0.14
H3545	6.40±2.11	0	100.00±0.00	95.92±0.24	98.71±0.67
H3546	2.46±3.11	0	100.00±0.00	83.08±2.24	88.67±2.24
H3547	7.88±0.12	0	100.00±0.00	93.56±4.01	97.45±0.21
H3548	6.90±1.23	0	100.00±0.00	98.92±1.23	99.64±2.23
H3550	6.40±2.03	0	100.00±0.00	98.25±1.31	99.66±0.11
H3260	86.84±0.03	60.84±2.21	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

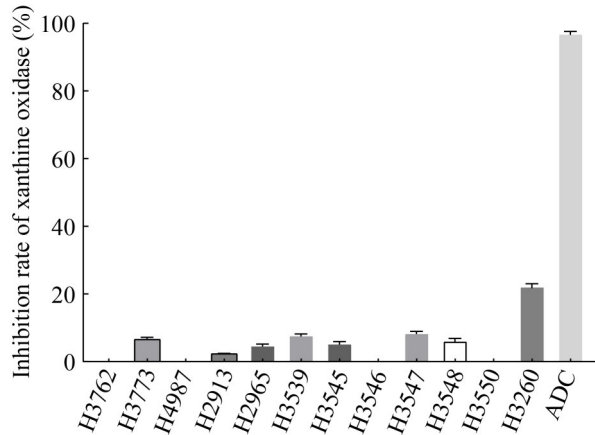


图2 乳杆菌体外抑制XOD的能力

Figure 2 The *in vitro* inhibitory ability of *Lactobacillus* on XOD.

H3260 的抑制率为 22.48%，其余 11 株益生菌对 XOD 的抑制率均小于 10.00%，因此选取发酵黏液乳杆菌 H3260 进行下一步评价。

2.4 构建发酵黏液乳杆菌 H3260 系统发育树

将菌株 H3260 的测序结果上传至 NCBI 获取登录号：PP218552，BLAST 结果显示菌株 H3260 与 *Limosilactobacillus fermentum* NBRC

15885^T 的相似性达到 99.93%。使用 MEGA 11 构建 H3260 的系统发育树如图 3 所示，结果显示，H3260 是发酵黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)。该菌株于 2023 年 10 月 20 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号为 CCTCC NO: M 20231965，地址位于湖北省武汉市武汉大学保藏中心。

2.5 发酵黏液乳杆菌 H3260 的生长曲线

发酵黏液乳杆菌 H3260 的生长曲线见图 4。发酵黏液乳杆菌 H3260 在 0–6.0 h 处于迟缓期，对该菌株在 8.0–10.0 h 时的生长情况进行了探究，发现 8.5–10.0 h 为菌株的对数期，10.0 h 后进入平台期。

2.6 发酵黏液乳杆菌 H3260 的最适温度和最适 pH

进一步探究温度和 pH 对发酵黏液乳杆菌 H3260 的影响。结果如图 5 所示，随着温度升高，发酵黏液乳杆菌 H3260 的 OD_{600} 值也逐渐升高，并在 37 °C 时达到最高点。当温度继续上升时， OD_{600} 值开始下降，因此 37 °C 为发酵黏液乳杆菌 H3260 的最适生长温度。此外，发酵黏液乳杆菌 H3260 在 pH 为 7.0 时的生长情况最

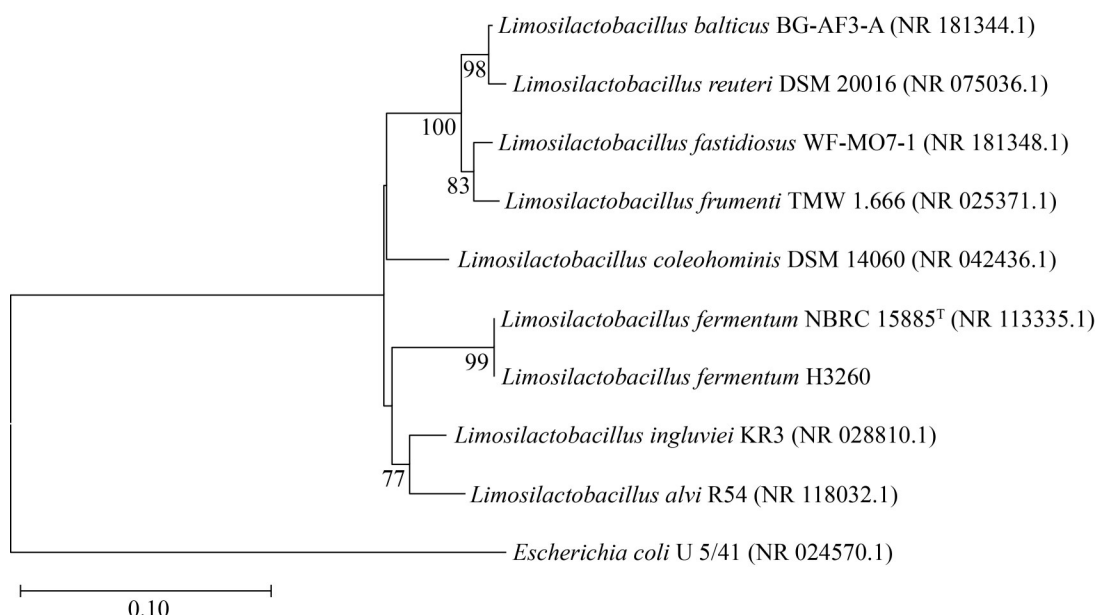


图3 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of isolate and sequences of related species. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1 000 replications. Numbers in brackets represent the sequences of accession numbers in GenBank. Bar 0.10 represents sequence divergence.

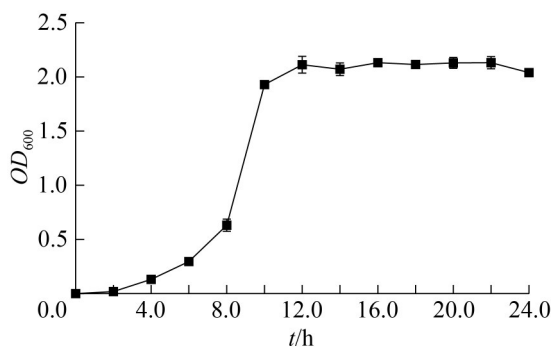


图4 发酵黏液乳杆菌H3260的生长曲线

Figure 4 Growth curve of *Limosilactobacillus fermentum* H3260.

佳, 过酸或过碱的环境均不适宜发酵黏液乳杆菌 H3260 的生长。

2.7 发酵黏液乳杆菌 H3260 的耐胆盐能力

正常人体肠道中的胆盐浓度为 0.1%–0.3%, 能在该胆盐浓度下生长的乳酸菌被认为具有开发微生态制剂的潜力^[9]。如图 6 所示, 将发酵黏

液乳杆菌 H3260 种子液(OD_{600} 为 0.8)按 3% 的接种量接种于不含胆盐的 BHI 培养基及含 0.1%、0.2%、0.3% 胆盐的环境中, 经过 2.5 h 后存活菌数分别为 $(13.60 \pm 0.20) \times 10^6$ 、 $(1.84 \pm 0.03) \times 10^6$ 、 $(1.36 \pm 0.02) \times 10^6$ 、 $(1.13 \pm 0.04) \times 10^6$ CFU/mL。发酵黏液乳杆菌 H3260 在 0.1%–0.3% 胆盐环境中经过 2.5 h 后, 存活菌数仍大于 1.00×10^6 CFU/mL, 说明菌株能够在含有胆盐的环境中良好存活。

2.8 发酵黏液乳杆菌 H3260 的抗生素敏感性

为确定发酵黏液乳杆菌 H3260 的安全性, 对其进行了抗生素敏感性实验。结果如表 4 所示, 发酵黏液乳杆菌 H3260 对红霉素、青霉素 G、苯唑西林、克林霉素、氯霉素、头孢曲松、四环素敏感, 对复方新诺明中度敏感, 对诺氟沙星、环丙沙星和卡那霉素耐药, 这一结果与郭慧玲等^[25]的研究结果相似。

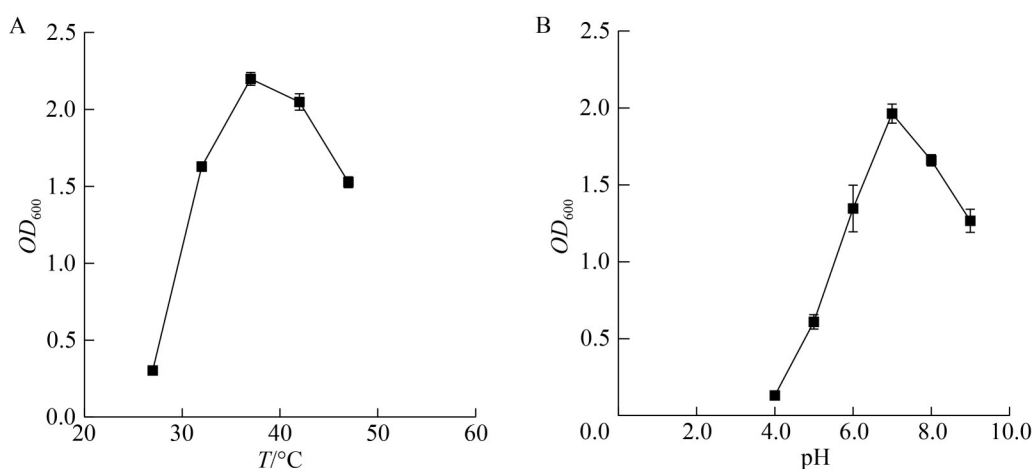


图5 发酵黏液乳杆菌H3260的最适温度(A)和最适pH (B)

Figure 5 Optimum temperature (A) and pH (B) for *Limosilactobacillus fermentum* H3260.

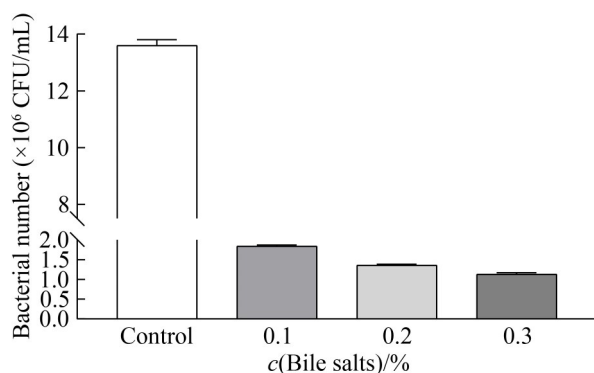


图6 发酵黏液乳杆菌H3260在胆盐环境中存活的菌株数量

Figure 6 Number of bacilli surviving *Limosilactobacillus fermentum* H3260 in bile salt environment.

2.9 动物实验结果

2.9.1 发酵黏液乳杆菌 H3260 对小鼠血清生化指标的影响

在 14 d 的治疗干预后, 各组小鼠血清尿酸水平如图 7 所示。结果表明, 与高尿酸模型组相比, 发酵黏液乳杆菌 H3260 组和别嘌呤醇组小鼠的血清尿酸水平均显著降低。其中, 发酵黏液乳杆菌 H3260 治疗组的血清尿酸水平降低了 16.45% ($P < 0.01$), 别嘌呤醇组降低了 31.56% ($P < 0.01$)。

血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)是机体蛋白质和肌肉代谢的关键终末产物, 其代谢与排泄过程与肾脏功能密切相关, 主要通过肾脏排出体外。治疗第 14 天后, 检测各组小鼠血清中的 Cr 和 BUN 水平。结果显示, 高尿酸模型组小鼠的 Cr 和 BUN 水平显著高于空白对照组($P < 0.01$), 表明腺嘌呤和氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠肾功能受损。发酵黏液乳杆菌 H3260 治疗组的 Cr 和 BUN 水平上显著低于高尿酸模型组($P < 0.05$), 表现出明显的改善趋势。

XOD 是一种在肝脏中主要表达的复杂氧化还原酶类, 在嘌呤代谢过程中发挥关键作用, 通过催化次黄嘌呤转化为黄嘌呤, 进而生成尿酸。本研究结果显示, 发酵黏液乳杆菌 H3260 能显著降低高尿酸血症小鼠血清中 XOD 的活性($P < 0.05$)。推测 H3260 可能通过降低 XOD 的活性减少 UA 的生成, 从而缓解高尿酸血症。

2.9.2 发酵黏液乳杆菌 H3260 对 HUA 小鼠肾脏损伤的影响

各组小鼠肾脏组织的 HE 染色切片, 如图 8 所示。MOD 组肾脏组织可见大量肾小管萎缩, 上皮细胞胞质嗜酸性减弱, 较多肾小管扩张, 部分管腔内可见嗜酸性蛋白液, 形成蛋白管型, 部分肾小管内可见炎性细胞及坏死细胞碎片,

表4 发酵黏液乳杆菌H3260对抗生素的敏感性结果
Table 4 Sensitivity results of *Limosilactobacillus fermentum* H3260 to antibiotics

Antibiotics	Criteria			Diameter of inhibition zone (mm)	Sensitivity level
	R	I	S		
Erythromycin	≤13	14–22	≥23	24.0±1.5	S
Penicillin	≤28	–	≥29	31.5±1.0	S
Oxacillin	≤10	11–12	≥13	18.5±1.0	S
Clindamycin	≤14	15–20	≥21	26.0±1.25	S
Chloroamphenicol	≤12	13–17	≥18	30.5±0.5	S
Norfloxacin	≤12	13–16	≥17	0	R
Ciprofloxacin	≤15	16–20	≥21	0	R
Kanamycin	≤13	14–17	≥18	0	R
Ceftriaxone sodium	≤13	14–20	≥21	23.0±1.0	S
Tetracycline	≤14	15–18	≥19	23.5±1.0	S
Co-trimoxazole	≤10	11–15	≥16	11.0±0.75	I

S: 敏感; I: 中度敏感; R: 不敏感。
S: Sensitive; I: Between sensitive and insensitive; R: Insensitive.

间质可见结缔组织轻度增生，偶见淋巴细胞散在浸润，表明 HUA 诱导了严重的肾脏损伤。ADC 组肾脏组织病理损伤较模型组有所减轻，但仍可见少量肾小管萎缩、扩张及炎性细胞浸润。H3260 组肾脏组织病理损伤进一步减轻，肾小管萎缩和扩张程度较轻。这些结果表明，发酵黏液乳杆菌 H3260 对高尿酸血症引起的小鼠肾脏损伤具有一定的缓解作用。

2.9.3 发酵黏液乳杆菌 H3260 对 HUA 小鼠肠道菌群的影响

Shannon 指数分析显示(图 9A)，发酵黏液乳杆菌 H3260 的干预并未显著改变小鼠肠道菌群的整体物种数量和均匀性。β 多样性分析通过 PCoA 显示(图 9B)，各组小鼠肠道菌群的分布存在显著差异($P<0.001$)。特别是 H3260 组与 MOD 和 ADC 组相比，菌群结构有显著差异，表明 H3260 对肠道菌群结构有调节作用。

在门水平上(图 9C、9D)，H3260 组与 MOD 组相比，芽孢杆菌门与拟杆菌门(*Bacillota/Bacteroidota*)的比例无显著差异($P>0.05$)。在属水平上(图 9E)，H3260 组经益生菌治疗后，嗜

黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK)的相对丰度显著增加，而不动杆菌属(*Acinetobacter*)的相对丰度降低，*Acinetobacter* 的减少可能减少了条件致病菌的丰度^[26]。进一步相关性分析表明(图 9F)，AKK 的相对丰度与血清 UA 及 Cr 水平呈负相关，推测 AKK 的增加可能有助于降低血清尿酸水平，从而缓解 HUA。*Acinetobacter* 与这些指标的正相关性表明，其可能通过促进炎症反应或干扰嘌呤代谢来加重 HUA。

总之，发酵黏液乳杆菌 H3260 能显著影响高尿酸血症小鼠的肠道菌群结构和组成，增加有益菌的丰度，通过调节肠道菌群的代谢功能发挥降尿酸和改善肠道健康的作用。

3 讨论

HUA 是一种系统性疾病，其主要特征为体内嘌呤代谢紊乱和血清 UA 水平显著升高^[27]。在人体内，腺嘌呤、肌苷、鸟苷、腺苷等嘌呤核苷的代谢终产物为尿酸。当嘌呤核苷摄入过量或代谢过程发生紊乱时，会导致血液中 UA 水

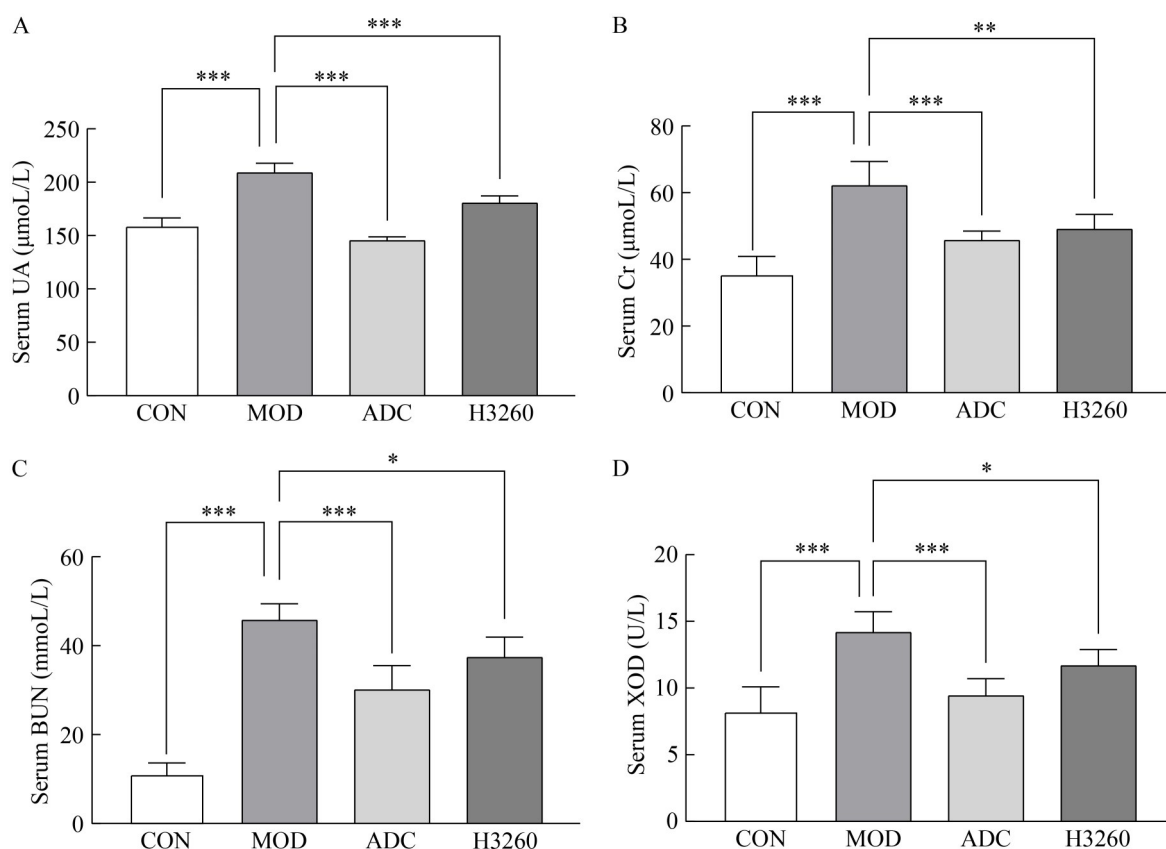


图7 发酵黏液乳杆菌H3260对小鼠血清生化指标的影响。A: 血清尿酸浓度; B: 血清肌酐浓度; C: 血清尿素氮浓度; D: 血清黄嘌呤氧化酶活性。CON: 空白对照组; MOD: 高尿酸模型组; ADC: 阳性药物对照组; H3260: 发酵黏液乳杆菌H3260治疗组。*差异显著($P<0.05$); **差异极显著($P<0.01$); ***差异高度显著($P<0.001$)。

Figure 7 Effects of fermented mucoid *Limosilactobacillus fermentum* H3260 on serum biochemical indicators in mice. A: Serum uric acid concentration; B: Serum creatinine concentration; C: Serum urea nitrogen concentration; D: Serum xanthine oxidase activity. CON: Control group; MOD: Hyperuricemia model group; ADC: Positive drug control group; H3260: *Limosilactobacillus fermentum* H3260 treatment group. *: Significant difference ($P<0.05$); **: Highly significant difference ($P<0.01$); ***: Extremely significant difference ($P<0.001$).

平升高,从而引发HUA。研究表明,HUA与多种代谢性疾病存在密切关联,例如高血压、慢性肾病、胰岛素抵抗等。近年来,由于不健康饮食结构和生活作息,HUA的患病率呈现急剧上升的趋势。目前,HUA的患病率已位居第四,仅次于高脂血症^[28]。鉴于现有治疗方法存在诸多局限性,探索安全、便捷的新疗法以缓解或预防HUA的发生显得尤为重要。值得注意的是,嘌呤代谢与肠道菌群,特别是与肠道中的

乳酸菌之间存在密切关联^[29]。研究显示,发酵黏液乳杆菌F40-4可以降低HUA小鼠的血清UA,促进UA代谢水平^[30];此外,副干酪乳酪杆菌X11也被证实可有效降低HUA小鼠的血UA水平^[31]。基于这些发现,本研究拟通过筛选具有嘌呤、核苷及尿酸降解能力的益生菌,进一步验证其对黄嘌呤氧化酶的抑制能力,并通过体内实验验证益生菌对尿酸的降解效果。

本研究采用HPLC方法筛选出一株对尿酸、

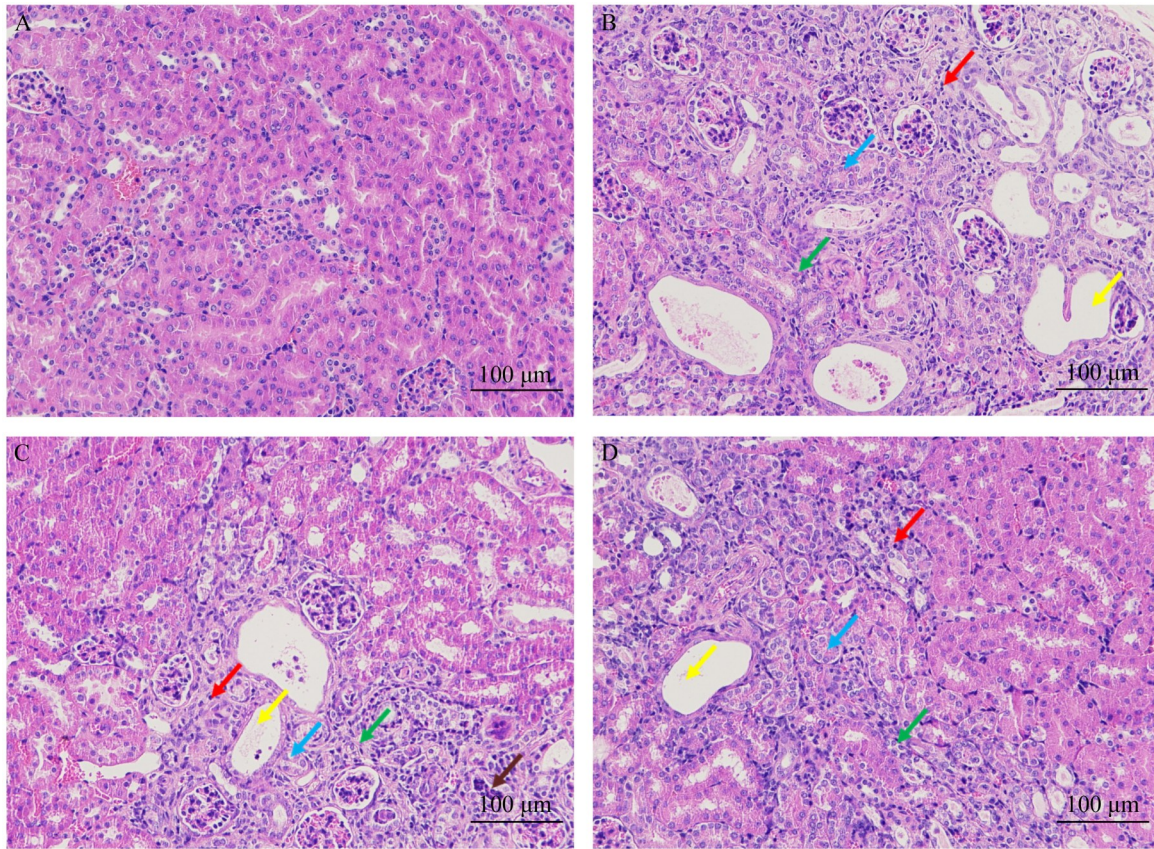


图8 肾脏病理结果。A: CON (对照组); B: MOD (高尿酸模型组); C: ADC (阳性药物对照组); D: H3260 (发酵黏液乳杆菌H3260治疗组)。红色箭头: 淋巴细胞散在浸润; 黄色箭头: 形成蛋白管型; 蓝色箭头: 上皮细胞胞质嗜酸性减弱; 绿色箭头: 结缔组织轻度增生; 棕色箭头: 炎性细胞及坏死细胞碎片。
Figure 8 Kidney pathology results. A: CON: Control group; B: MOD (Hyperuricemia model group); C: ADC (Positive drug control group); D: H3260: *Limosilactobacillus fermentum* H3260 treatment group. Red arrow: Scattered lymphocyte infiltration; Yellow arrow: Formation of protein casts; Blue arrow: Reduced eosinophilic staining of epithelial cytoplasm; Green arrow: Mild connective tissue hyperplasia; Brown arrow: Inflammatory cells and necrotic cellular debris.

腺嘌呤、鸟苷、肌苷和腺苷具有显著降解作用的发酵黏液乳杆菌 H3260。实验结果表明, 该菌株对尿酸的降解率达到 $(86.84 \pm 0.03)\%$, 腺嘌呤的降解率达到 $(60.84 \pm 2.21)\%$, 对鸟苷、肌苷和腺苷的降解率更是达到 $(100.00 \pm 0.00)\%$, 这一发现不仅表明发酵黏液乳杆菌 H3260 具有直接降低尿酸水平的潜力, 还表明其能够有效竞争性降解人体内的鸟苷、肌苷等尿酸前体物质。与现有研究相比, 发酵黏液乳杆菌 H3260 展现出更为优越的降解性能: 其降解效果显著优于肌苷

降解率为 50.12% 的嗜热链球菌(*S. thermophilus*) IDCC 2201^[32], 以及肌苷降解率为 68.86% 和鸟苷降解率为 95.75% 的短促生乳杆菌 PDD-5^[33]。此外, 与尿酸降解率为 40.9% 的发酵黏液乳杆菌 JL-3, 以及肌苷降解率为 59.0%、鸟苷降解率为 51.0% 的发酵乳杆菌 TSF331 相比, 菌株 H3260 的降解效果也更为突出^[30,34-35]。

由于小鼠体内天然存在尿酸酶, 建立稳定的 HUA 动物模型较为困难。Wen 等^[36]发现, 氧嗪酸钾与高嘌呤饮食联合使用可有效构建小鼠

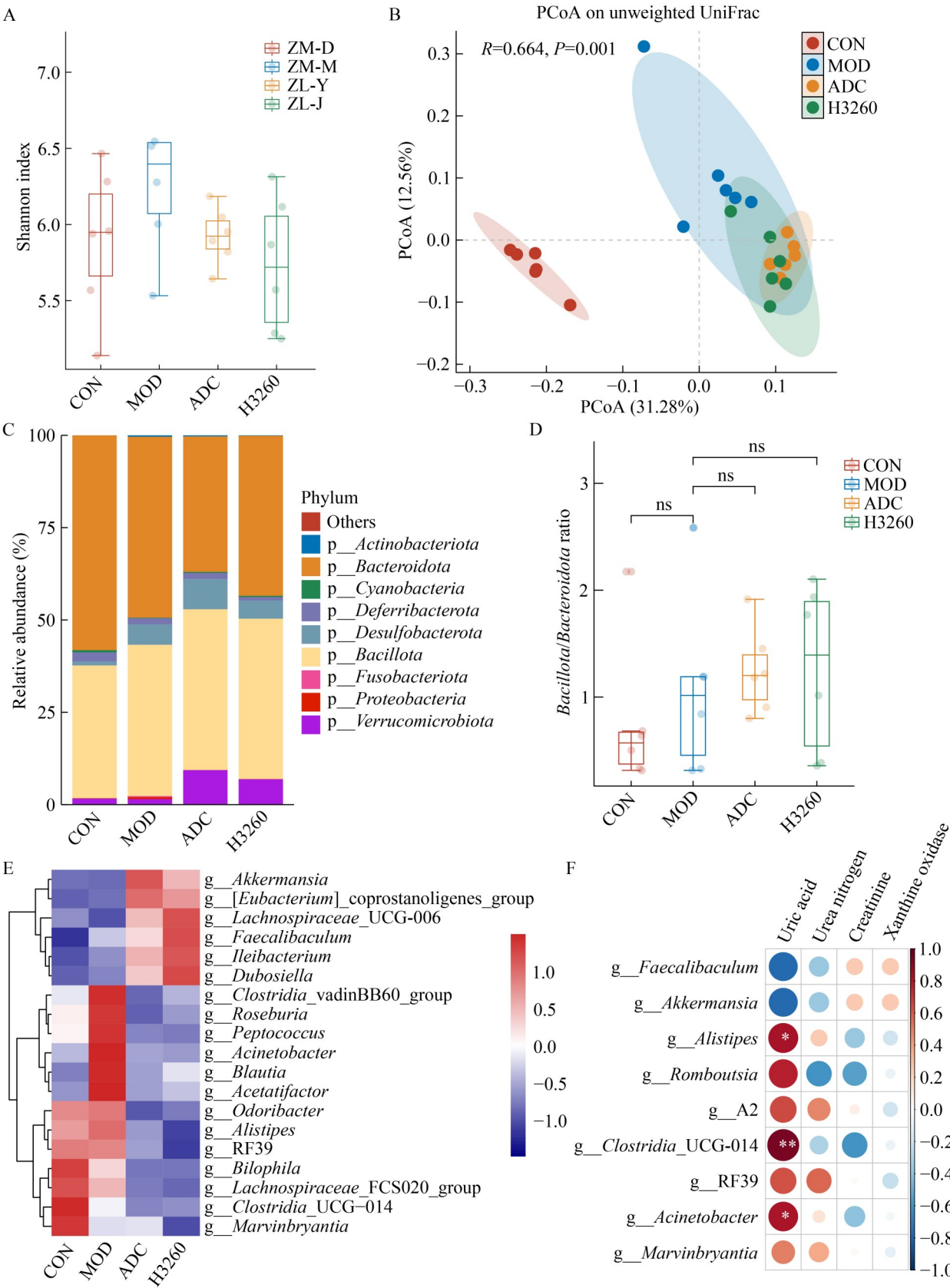


图9 发酵黏液乳杆菌H3260对小鼠肠道菌群多样性和结构的影响。A: 肠道菌群多样性的变化; B: 肠道菌群结构的差异; C: 肠道菌群在门水平上的相对丰度变化; D: 不同组间*Bacillota/Bacteroidota*比例的变化; E: 肠道菌群在属水平上的相对丰度变化; F: 模型组与发酵黏液乳杆菌H3260组差异菌与生化指标的相关性分析。CON: 空白对照组; MOD: 高尿酸模型组; ADC: 阳性药物对照组; H3260: 发酵黏液乳杆菌H3260治疗组。

Figure 9 Effects of fermented mucoid *Limosilactobacillus fermentum* H3260 on gut microbiota diversity and structure in mice. A: Changes in gut microbiota diversity; B: Differences in gut microbiota structure; C: Changes in relative abundance at the phylum level of gut microbiota; D: Variation in the *Bacillota/Bacteroidota* ratio among different groups; E: Changes in the relative abundance of gut microbiota at the genus level; F: Correlation analysis of differential bacteria and biochemical indicators between the model group and the *Limosilactobacillus fermentum* H3260 group. CON: Control group; MOD: Hyperuricemia model group; ADC: Positive drug control group; H3260: *Limosilactobacillus fermentum* H3260 treatment group. *: Significant difference ($P<0.05$); **: Highly significant difference ($P<0.01$); ***: Extremely significant difference ($P<0.001$).

HUA 模型。基于此, 本研究采用高嘌呤饲料与氧嗪酸钾联合的方法, 成功建立了高尿酸小鼠模型。实验结果显示, 经过发酵黏液乳杆菌 H3260 干预 14 d 后, 治疗组小鼠的血清 UA、Cr 和 BUN 水平显著降低, 肾脏损伤得到明显缓解, 同时肠道菌群结构发生显著改变。发酵黏液乳杆菌 H3260 显著改善了高尿酸血症小鼠的肠道菌群结构, 具体表现为嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK)的丰度显著增加, 而不动杆菌属(*Acinetobacter*)等条件致病菌的丰度降低。这一结果与张里华等^[37]的研究一致, 其发现 AKK 可通过抑制肝脏 XOD 活性减少尿酸生成, 并通过增强肠道屏障功能减少尿酸的重吸收。本研究中 AKK 与血清 UA、Cr 的负相关性进一步支持了这一机制(图 9F)。

基于 β 多样性分析的结果, H3260 干预组的肠道菌群结构与模型组和阳性对照组呈现显著差异($P<0.001$), 这一发现提示 H3260 可能通过多重机制重塑肠道微环境。具体而言, H3260 可能通过以下 2 种途径发挥作用: (1) 竞争性定植, 通过占据生态位点抑制病原菌的生长; (2) 代谢产物(如短链脂肪酸)的产生, 为肠道有益菌提供生长所需的营养基质^[38]。值得注意的是, 乳酸菌的作用机制与之具有相似性, 其通过分

泌尿酸氧化酶或嘌呤核苷水解酶来降解尿酸前体物质, 同时其代谢产物可降低肠道 pH 值, 形成不利于病原菌生长的微环境, 从而促进有益菌增殖, 这一双向调节机制为肠道菌群干预提供了新的思路^[39]。未来可结合宏基因组学技术, 进一步分析 H3260 对尿酸代谢通路的影响, 以明确其作用机制。

与先前研究相比^[40], H3260 的优势在于其对尿酸及前体物质具有高效降解能力的同时, 还具有调节肠道菌群的能力。具体而言, 植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) X3-2B 和戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) 37X-3 仅通过抑制 XOD 酶活性来减少尿酸生成, 而 H3260 则采用“降解+菌群调节”的双重机制发挥作用。这种协同效应可能使其在长期干预中展现出更显著的优势, 特别是在改善肾脏损伤和代谢综合征方面(图 7、图 8)。

综上所述, 发酵黏液乳杆菌 H3260 通过重塑肠道菌群结构, 提升有益菌丰度, 同时有效降低血清尿酸, 为缓解 HUA 提供了新的策略。未来研究方向可重点关注 H3260 代谢产物对菌群-宿主相互作用的影响机制, 并通过临床试验进一步验证其在人体中的疗效与安全性。

4 结论

本研究成功筛选出一株具有高效降解尿酸、嘌呤和核苷能力的发酵黏液乳杆菌 H3260。实验结果表明, 该菌株对尿酸、嘌呤和核苷的降解率分别达到 $(86.84 \pm 0.03)\%$ 、 $(60.84 \pm 2.21)\%$ 和 $(100.00 \pm 0.00)\%$, 展现出显著的降尿酸潜力。此外, 发酵黏液乳杆菌 H3260 对多种常见抗生素表现出敏感, 并在 0.3% 的胆盐环境中表现出优异的耐受性, 存活率超过 1.00×10^6 CFU/mL, 为其在肠道环境中的定殖和功能发挥提供了保障。

动物实验进一步验证了发酵黏液乳杆菌 H3260 的治疗效果。干预实验结果显示, 该菌株能够显著降低高尿酸血症小鼠的血清 UA、Cr 和 BUN 水平, 有效缓解肾脏损伤。同时, 发酵黏液乳杆菌 H3260 通过调节肠道菌群结构, 显著增加了有益菌(如 AKK)的丰度, 在降尿酸和改善肠道健康方面发挥双重作用。

综上所述, 发酵黏液乳杆菌 H3260 是一株具有显著降尿酸功能的优势乳酸菌。其优异的降解能力、良好的耐受性以及对其对肠道菌群的调节作用, 使其成为开发高尿酸血症相关功能产品的理想菌种资源。本研究为高尿酸血症的预防和治疗提供了新的思路和方法, 具有重要的理论意义和应用价值。

作者贡献声明

林文珍: 研究设计和论文撰写; 柳小妹: 实验操作和数据分析; 袁宋健: 实验设计, 执行了生长曲线、最适温度等测定, 并协助数据分析; 钱凯: 实验设计, 动物实验等测定, 并协助数据分析; 李源涛: 执行了耐胆盐、药敏实验等测定; 林志楷: 参与了论文校对; 徐炜: 对实验方案提出了宝贵建议, 并参与了论文校对; 张帮周: 协调了整个研究项目, 并对论文的最终版本进行了审校。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ZHANG SS, WANG Y, CHENG JS, HUANGFU N, ZHAO RC, XU ZY, ZHANG FX, ZHENG WY, ZHANG DD. Hyperuricemia and cardiovascular disease[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2019, 25(6): 700-709.
- [2] 刘红艳, 尹以瑞, 杨力权, 杨润芬, 桑鹏. 一株苍山地区产尿酸氧化酶菌株的筛选、鉴定及其酶学性质研究[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2021, 43(6): 1235-1242. LIU HY, YIN YR, YANG LQ, YANG RF, SANG P. Screening and identification of a uric acid oxidase bacteria from Cangshan and studying on its enzymatic properties[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2021, 43(6): 1235-1242 (in Chinese).
- [3] WANG ZH, SONG LQ, LI XP, XIAO YC, HUANG YM, ZHANG Y, LI JT, LI MD, REN ZH. *Lactiplantibacillus pentosus* P2020 protects the hyperuricemia and renal inflammation in mice[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1094483.
- [4] SCHLESINGER N, PÉREZ-RUIZ F, LIOTÉ F. Mechanisms and rationale for uricase use in patients with gout[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2023, 19(10): 640-649.
- [5] PASALIC D, MARINKOVIC N, FEHER-TURKOVIC L. Uric acid as one of the important factors in multifactorial disorders: facts and controversies[J]. *Biochemia Medica*, 2012, 22(1): 63-75.
- [6] MATTIUZZI C, LIPPI G. Recent updates on worldwide gout epidemiology[J]. *Clinical Rheumatology*, 2020, 39(4): 1061-1063.
- [7] 中国民族卫生协会重症代谢疾病分会, 高尿酸血症相关疾病诊疗多学科共识专家组. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识(2023年版)[J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43(6): 461-480. CRITICAL METABOLISM BRANCH OF CHINA NATIONAL HEALTH ASSOCIATION, MULTI-DISCIPLINARY EXPERT GROUP ON DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HYPERURICEMIA AND RELATED DISEASES. China multi-disciplinary expert consensus on diagnosis and treatment of hyperuricemia and related diseases (2023 edition)[J]. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*, 2023, 43(6): 461-480 (in Chinese).
- [8] 黄佳豪, 李先平, 赵军英, 乔为仓, 刘璐, 陈历俊. 益生菌缓解高尿酸血症作用机制研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(23): 282-292. HUANG JH, LI XP, ZHAO JY, QIAO WC, LIU L, CHEN LJ. Progress in understanding the mechanism by which probiotics alleviate hyperuricemia[J]. *Food Science*, 2023, 44(23): 282-292 (in Chinese).
- [9] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB,

- FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11(8): 506-514.
- [10] GEORGE KERRY R, PATRA JK, GOUDA S, PARK Y, SHIN HS, DAS G. Benefaction of probiotics for human health: a review[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, 26(3): 927-939.
- [11] De FILIPPIS F, PASOLLI E, ERCOLINI D. The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, 44(4): 454-489.
- [12] 吴忠梅, 龙方懿, 刘寒, 杜小华, 贾萍. 乳杆菌及其在阴道炎治疗中的研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(12): 1851-1854.
- WU ZM, LONG FY, LIU H, DU XH, JIA P. *Lactobacillus* and its research advances in the treatment of vaginitis[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2018, 34(12): 1851-1854 (in Chinese).
- [13] 杨靖, 管军军, 崔耀明, 郭琳娜, 任一杨, 赵斯睿. 益生菌在肠道的定植机制研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2025, 61(2): 82-88, 98.
- YANG J, GUAN JJ, CUI YM, GUO LN, REN YY, ZHAO SR. Research progress on the colonization mechanism of probiotics in intestinal tract[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2025, 61(2): 82-88, 98 (in Chinese).
- [14] ZHAO HY, CHEN XY, ZHANG L, MENG FQ, ZHOU LB, PANG XY, LU ZX, LU YJ. *Lactocaseibacillus rhamnosus* Fmb14 prevents purine induced hyperuricemia and alleviate renal fibrosis through gut-kidney axis[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 182: 106350.
- [15] SHI RJ, YE J, FAN H, XIAO CX, WANG DN, XIA B, ZHAO ZT, ZHAO BT, DAI XS, LIU XB. *Lactobacillus plantarum* LLY-606 supplementation ameliorates hyperuricemia via modulating intestinal homeostasis and relieving inflammation[J]. *Food & Function*, 2023, 14(12): 5663-5677.
- [16] LEE YJ, WERLINGER P, SUH JW, CHENG JH. Potential probiotic *Lactocaseibacillus paracasei* MJM60396 prevents hyperuricemia in a multiple way by absorbing purine, suppressing xanthine oxidase and regulating urate excretion in mice[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 851.
- [17] SEDAGHAT A, KARIMI TORSHIZI MA. Immune responses, intestinal microbiota, performance and blood characteristics of Japanese quail fed on diets containing camphor[J]. *Animal*, 2017, 11(12): 2139-2146.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 118.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume IV[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 118 (in Chinese).
- [19] FONG W, LI Q, JI FF, LIANG W, LAU HCH, KANG X, LIU WX, TO KK, ZUO Z, LI XX, ZHANG X, SUNG JJ, YU J. *Lactobacillus gallinarum*-derived metabolites boost anti-PD1 efficacy in colorectal cancer by inhibiting regulatory T cells through modulating IDO1/Kyn/AHR axis[J]. *Gut*, 2023, 72(12): 2272-2285.
- [20] WALTHER C, MEYER-LUECKEL H, CONRAD G, ESTEVES-OLIVEIRA M, HENNE K. Correlation between relative bacterial activity and lactate dehydrogenase gene expression of co-cultures *in vitro*[J]. *Clinical Oral Investigations*, 2019, 23(3): 1225-1235.
- [21] 吴世芳. 传统发酵牦牛乳中降尿酸乳酸菌的筛选及功能评价[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2023.
- WU SF. Screening and functional evaluation of uric acid-lowering lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [22] 尚天翠. 温度及 pH 条件对乳酸菌生长影响的研究[J]. *伊犁师范学院学报(自然科学版)*, 2011, 5(3): 32-36.
- SHANG TC. Effects of different temperatures and pH on the growth of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Yili Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 5(3): 32-36 (in Chinese).
- [23] 韩庆功, 崔艳红, 王元元, 朱亚茹, 何云, 刘长忠, 魏刚才. 植物乳杆菌的生理特性及体外益生效果研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2018(3): 42-46.
- HAN QG, CUI YH, WANG YY, ZHU YR, HE Y, LIU CZ, WEI GC. Physiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* and its beneficial effects *in vitro*[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2018(3): 42-46 (in Chinese).
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[S]. CLSI-2017-M100-S27.
- [25] 郭慧玲, 陈霞, 邵玉宇, 潘琳, 孟和毕力格, 张和平. 乳酸杆菌属对抗生素的耐药性[J]. *乳业科学与技术*, 2014, 37(6): 6-10.
- GUO HL, CHEN X, SHAO YY, PAN L, MENG H, ZHANG HP. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus isolates*[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2014, 37(6): 6-10 (in Chinese).
- [26] ALSAN M, KLOMPAS M. *Acinetobacter baumannii*: an emerging and important pathogen[J]. *Journal of Clinical Outcomes Management*, 2010, 17(8): 363-369.
- [27] 钟方红, 皮特俊章, 钟琴, 曹跃朋, 刘正奇. 中药对高尿酸血症患者肠道菌群影响的研究进展[J]. *陕西中医*, 2021, 42(2): 265-268.
- ZHONG FH, PI T, ZHONG Q, CAO YP, LIU ZQ. Research progress of the effect of traditional Chinese medicine on intestinal flora of patients with hyperuricemia[J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 42(2): 265-268 (in Chinese).
- [28] 朱学鑫, 孙益. 基于肠道菌群防治高尿酸血症的研究进展[J]. *蛇志*, 2021, 33(2): 214-217.
- ZHU XX, SUN Y. Research progress of prevention and treatment of hyperuricemia based on intestinal flora[J]. *Journal of Snake*, 2021, 33(2): 214-217 (in Chinese).
- [29] MÉNDEZ-SALAZAR EO, VÁZQUEZ-MELLADO J, CASIMIRO-SORIGUER CS, DOPAZO J, ÇUBUK C, ZAMUDIO-CUEVAS Y, FRANCISCO-BALDERAS A, MARTÍNEZ-FLORES K, FERNÁNDEZ-TORRES J, LOZADA-PÉREZ C, PINEDA C, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ A, SILVEIRA LH, BURGUETE-GARCÍA AI, ORBE-ORIHUELA C, LAGUNAS-MARTÍNEZ A,

- VAZQUEZ-GOMEZ A, LÓPEZ-REYES A, PALACIOS-GONZÁLEZ B, MARTÍNEZ-NAVA GA. Taxonomic variations in the gut microbiome of gout patients with and without tophi might have a functional impact on urate metabolism[J]. *Molecular Medicine*, 2021, 27(1): 50.
- [30] CAO JY, WANG T, LIU YS, ZHOU W, HAO HN, LIU QQ, YIN BX, YI HX. *Lactobacillus fermentum* F40-4 ameliorates hyperuricemia by modulating the gut microbiota and alleviating inflammation in mice[J]. *Food & Function*, 2023, 14(7): 3259-3268.
- [31] CAO JY, LIU QQ, HAO HN, BU YS, TIAN XY, WANG T, YI HX. *Lactobacillus paracasei* X11 ameliorates hyperuricemia and modulates gut microbiota in mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 940228.
- [32] KIM D, MOON JS, KIM JE, JANG YJ, CHOI HS, OH I. Evaluation of purine-nucleoside degrading ability and *in vivo* uric acid lowering of *Streptococcus thermophilus* IDCC 2201, a novel antiuricemia strain[J]. *PLoS One*, 2024, 19(2): e0293378.
- [33] XU J, TU ML, FAN XK, GUO YX, ZHANG T, ZENG XQ, CAI ZD, WU Z, PAN DD. A novel strain of *Levilactobacillus brevis* PDD-5 isolated from salty vegetables has beneficial effects on hyperuricemia through anti-inflammation and improvement of kidney damage[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(2): 898-908.
- [34] WU Y, YE Z, FENG PY, LI R, CHEN X, TIAN XZ, HAN R, KAKADE A, LIU P, LI XK. *Limosilactobacillus fermentum* JL-3 isolated from “Jiangshui” ameliorates hyperuricemia by degrading uric acid[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1897211.
- [35] KUO YW, HSIEH SH, CHEN JF, LIU CR, CHEN CW, HUANG YF, HO HH. *Lactobacillus reuteri* TSR332 and *Lactobacillus fermentum* TSF331 stabilize serum uric acid levels and prevent hyperuricemia in rats[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11209.
- [36] WEN SS, WANG D, YU HY, LIU MY, CHEN Q, BAO RX, LIU L, ZHANG Y, WANG T. The time-feature of uric acid excretion in hyperuricemia mice induced by potassium oxonate and adenine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5178.
- [37] 张里华, 刘佳秀, 夏效东. 嗜黏蛋白阿克曼氏菌对高尿酸血症小鼠血清尿酸及组织炎症的影响及机制[J]. *食品科学*, 2023, 44(5): 121-127.
- ZHANG LH, LIU JX, XIA XD. Effects and mechanism of *Akkermansia muciniphila* on serum uric acid and tissue inflammation in hyperuricemic mice[J]. *Food Science*, 2023, 44(5): 121-127 (in Chinese).
- [38] ZHAO XT, CAI P, XIONG SJ, WEI BL, DU TH, HUANG T, YU Q, XIE MY, XIONG T. *Lactisaseibacillus rhamnosus* NCUH061012 alleviates hyperuricemia via modulating gut microbiota and intestinal metabolites in mice[J]. *Food Bioscience*, 2024, 58: 103699.
- [39] 王焱. 具有潜在降尿酸能力乳酸菌的筛选及应用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- WANG Y. Screening and application of lactic acid bacteria with potential uric acid-lowering ability[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021 (in Chinese).
- [40] 王诗琪, 张美枝, 郝世奇, 李佳让, 李晓彤, 王富荣, 孙学颖, 葛雅丽, 赵丽华. 菌株 X3-2B 和 37X-3 体外抑制黄嘌呤氧化酶能力及其对小鼠高尿酸血症缓解作用的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(20): 145-152.
- WANG SQ, ZHANG MZ, HAO SQ, LI JR, LI XT, WANG FR, SUN XY, GE YL, ZHAO LH. Ability of strains X3-2B and 37X-3 to inhibit xanthine oxidase *in vitro* and their mitigating effect on hyperuricemia in mice[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(20): 145-152 (in Chinese).