

研究报告

降血尿酸益生菌株的筛选和降血尿酸机理的探索

金方 杨虹*

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

摘要:【背景】高尿酸血症是人体内血尿酸含量显著高于正常水平的代谢性疾病,利用益生菌降解食物中外源性嘌呤类成分成为治疗高尿酸血症的新方法。【目的】筛选具有降低血尿酸作用的益生菌,并探索其作用机制。【方法】利用 HPLC 从多株实验菌株中筛选降解核苷酸(腺苷酸、鸟苷酸)、核苷(腺苷、鸟苷)、嘌呤(黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤)、尿酸能力最强的益生菌。首次利用质谱定性与定量检测菌株降解核苷与核苷酸过程中代谢物的变化,结合菌株对高尿酸血症模型大鼠血尿酸水平的影响,初步探索其降低血尿酸的机理。【结果】首次筛选出具有较强降解核苷酸与核苷能力的干酪乳杆菌 ZM15 (CGMCC No.13980),高尿酸血症模型大鼠验证其具有降低血尿酸的作用。结果显示菌株 ZM15 在胞内降解核苷酸、核苷后,胞内、外均测到鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤,且胞内 3 种嘌呤含量显著高于正常菌体内含量($P<0.01$),尿酸和尿囊素在胞内、外均未发现。【结论】干酪乳杆菌 ZM15 具有较强的降解核苷酸、核苷的能力,推测其主要通过与肠道上皮细胞竞争吸收核苷酸与核苷,从而对高尿酸血症模型大鼠具有降血尿酸作用。

关键词: 血尿酸, 嘌呤类成分, 降解, 高尿酸血症大鼠

Isolation of hypouricemic probiotics and exploration their effects on hyperuricemic rats

JIN Fang YANG Hong*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Background] Hyperuricemia is well-known as a kind of metabolic disease with abnormal higher serum uric acid level. It is becoming a new method for treating hyperuricemia by degrading exogenous purine components ingested from food through probiotics. [Objective] Thirty probiotic strains of thirteen species were investigated for their abilities of lowering serum uric acid, we preliminarily propose the mechanism of its effects on hyperuricemic rats. [Methods] The ability of degrading nucleotides (adenosine monophosphate, guanosine monophosphate), nucleosides (adenosine, guanosine), purines (xanthine, hypoxanthine and guanine) and uric acid by different probiotics were determined with HPLC, the probiotic strain with the fastest degrading ability was selected as the candidate strain for further test on hyperuricemic rats. Metabolites in the process of

*Corresponding author: Tel: 86-21-34205343; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

Received: November 21, 2017; Accepted: December 28, 2017; Published online (www.cnki.net): January 19, 2018

*通信作者: Tel: 86-21-34205343; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-21; 接受日期: 2017-12-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-01-19

degrading nucleosides and nucleotides by probiotics were detected by mass, the mechanism of probiotics lowering the blood uric acid was preliminarily explored. **[Results]** *Lactobacillus casei* ZM15 was selected with the highest degradation rates of nucleosides and nucleotides. The animal experimental results showed that ZM15 had effects on hyperuricemia. Mass spectrometry results showed that after degradation of nucleotides and nucleotides in cell, guanine, xanthine and hypoxanthine appeared both inside and outside ZM15 cells, three kinds of purine content were markedly higher than those in normal cells, uric acid and allantoin were not found both inside and outside. **[Conclusion]** *Lactobacillus casei* ZM15 has the fasted degradation ability of nucleotide and nucleotide, and it has obvious effects of lowering uric acid on hyperuricemic model rats by mechanism of competition.

Keywords: Blood uric acid, Purine compounds, Degradation, Hyperuricemic rats

高尿酸血症是一种血液中尿酸含量显著性超过正常范围的慢性临床综合征,国际上将血液中尿酸浓度男性 $>420\ \mu\text{mol/L}$,女性 $>357\ \mu\text{mol/L}$ 诊断为高尿酸血症^[1]。近年的研究表明,高尿酸血症不仅是痛风的生化基础,而且与高血压、动脉粥样硬化、胰岛素抵抗等疾病的发生密切相关,已经逐渐发展成为威胁人类健康的代谢疾病^[2-3]。

高尿酸血症的发病受到多方面因素的影响,例如遗传、性别、生活方式、饮食习惯等。人体血液中尿酸的浓度取决于尿酸的生成量和排泄量,尿酸生成增多或排泄减少或两者同时发生均可以导致高尿酸血症的发生。由于进化的原因,人体缺乏尿酸氧化酶,含有嘌呤骨架的嘌呤类物质(核苷酸、核苷、嘌呤等)在人体内被代谢为尿酸,这些嘌呤类成分的摄入量直接影响血液中尿酸水平,所以高尿酸血症患者通常需要严格的饮食控制,然而限制这些成分的摄入是极其困难的^[4],因为动植物细胞、食物调味剂中均含有嘌呤类成分。

目前治疗高尿酸血症的药物有限,主要依赖黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇和促尿酸排泄药丙磺舒、苯溴马隆等,但这些药物存在毒副作用强、患者耐受度低的问题。近些年,因为具有较高的安全性,中药也成为治疗高尿酸血症的主要方法,例如除湿化痰法、健脾化浊法^[5-6]。西安交通大学医学院发现向SD大鼠肠道中加入蒙脱石可以通过吸附作用达到降血尿酸的作用,为治疗高尿酸血症提供

参考^[7]。寻找新型高效低毒的治疗方法是目前研究的热点。

人体内的尿酸约 2/3 由肾脏排出, 1/3 由肠道直接排出体外或者由肠道菌群分解。益生菌一方面作为人类肠道重要的生理菌群,具有增强免疫系统、降低胆固醇、治疗泌尿系统感染等作用^[8];一方面含有尿酸氧化酶,可以将尿酸代谢为水溶性好、对人体无毒的尿囊素。大连医科大学^[9]、日本明治株式会社^[10]、大冢制药株式会社^[11]相继发现某些益生菌具有降低血尿酸的能力,并利用动物实验验证其有效性,相关菌株已经被申请了专利,其中日本明治株式会社的 PA-3 益生菌产品目前已在日本上市^[12]。

本研究中,我们从多株实验菌株中首次筛选到一株具有降解核苷酸与核苷能力且降解速率较高的干酪乳杆菌 ZM15,并利用高尿酸血症模型大鼠验证其具有降血尿酸的作用,首次利用质谱对菌株 ZM15 降解核苷、核苷酸过程中胞外和胞内代谢物进行定性与定量,初步探讨了菌株 ZM15 降低血尿酸的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和实验动物

实验所用益生菌株由嘉兴益诺康生物科技有限公司提供,菌种信息如表 1 所示。菌种存于 40% 甘油管中, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存。

表 1 实验菌种
Table 1 *Lactobacillus* strains in experiment

种属名称 Species name	菌株名称 Strains name	来源 Origins
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ZM23	Human
<i>Lactobacillus casei</i>	ZM15 (CGMCC No.13980)	Human
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ZM122	Human
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ZM05	Human
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ZM529	Human
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ZM79	Human
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZM55	Human
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ZM18	Human
<i>Streptococcus salivarius</i>	ZM252	Oral mucosa
<i>Bifidobacterium longum</i>	YH295, HM44, HM11, HM12, HM14, HM34, HM51, HM270, HM31, HM410, HM32, HM8, HM211	Human
<i>B. adolescentis</i>	HM29	Human
<i>B. bifidum</i>	HM24, HM21	Human
<i>B. pseudocatenulatum</i>	HM37, HM13, HM2, HM52, HM56	Human

清洁级 Wistar 雄性大鼠,7 周龄,体重 200–220 g,由国家实验动物种子中心上海分中心暨上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:SCXK(沪) 2017-0005。

1.1.2 主要试剂和仪器

腺苷酸、腺苷、鸟苷酸、鸟苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤、尿酸、尿囊素、圆酵母核糖核酸、氧嗪酸钾、羧甲基纤维素钠、乙酸铵、磷酸、磷酸钾、高氯酸均购自 Sigma-Aldrich 公司;MRS 培养基购自青岛海博生物技术有限公司;酵母粉购自安琪酵母股份有限公司;别嘌呤醇购自国药集团化学试剂有限公司;甲醇购自天地高纯溶剂有限公司;普通鼠粮购自上海福贝世亨生物医药有限公司。所有用于 HPLC 与 HPLC/MS 分析的有机试剂、水、标准品纯度均为色谱纯,其他为分析纯。

RP-HPLC 流动相 I (1 000 mL ,pH 2.5) :20 mmol/L Phosphate Buffer (PB)溶液。RP-HPLC 流动相 II (1 000 mL , pH 5.0) : 20 mmol/L 磷酸二氢钾溶液。质谱流动相: 10 mmol/L 乙酸铵溶液,缓冲液 I (100 mL) : 0.2 g/L 尿酸-10 mmol/L 中性磷酸钾

缓冲液,缓冲液 II (100 mL) : 38.1 μg/mL 黄嘌呤-34.5 μg/mL 次黄嘌呤-36.5 μg/mL 鸟嘌呤-10 mmol/L 中性磷酸钾缓冲液,缓冲液 III (100 mL) : 0.828 g/L 腺苷-0.822 g/L 鸟苷-10 mmol/L 中性磷酸钾缓冲液,缓冲液 IV (100 mL) : 0.83 g/L 腺苷酸-0.90 g/L 鸟苷酸-10 mmol/L 中性磷酸钾缓冲液,缓冲液 V (100 mL) :0.83 g/L 腺苷酸-0.90 g/L 鸟苷酸-0.828 g/L 腺苷-0.822 g/L 鸟苷-10 mmol/L 乙酸铵缓冲液,质谱标准品溶液(100 mL) :54 μg/mL 黄嘌呤-108 μg/mL 次黄嘌呤-320 μg/mL 鸟嘌呤-40 μg/mL 尿酸-80 μg/mL 尿囊素-10 mmol/L 乙酸铵溶液,高嘌呤鼠粮(普通鼠粮 100 g,酵母粉 40 g,圆酵母核糖核酸 2 g)委托上海福贝世亨生物医药有限公司完成重新制粒工作。

高效液相色谱仪、三重四级杆质谱仪、反相色谱柱 Agilent Bonus-RP C18 (250 mm×4.0 mm , 4.6 μm)购自 Agilent Technologies 公司;反相色谱柱 COSMOSIL-PAQ (250 mm×4.0 mm , 4.6 μm)购自 Nacalai Tesque 公司;反相色谱柱 Dikma Spursil C18-EP (250 mm×4.0 mm , 4.6 μm)购自迪马科技公司。

1.2 方法

1.2.1 益生菌筛选

(1) 筛选具有降解尿酸能力的益生菌

取 900 μL 缓冲液 I 与 100 μL 高氯酸溶液 (0.1 mol/L) 混合均匀后吸取 20 μL , 外标法测定尿酸保留时间并制作定量标准曲线。HPLC 条件: 高效液相色谱仪, 反相色谱柱: COSMOSIL-PAQ, 流动相为等梯度 20 mmol/L PB 溶液, 流速 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 测定波长 254 nm, 保留时间 40 min。

益生菌分别通过 3 次接种传代, 按 1% 接种量重新接种于 7 mL 新鲜 MRS 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 20 h 过夜至平台期。取 2 mL 培养液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 1 mL PBS 重复洗涤菌体 3 次。向菌体沉淀中添加 750 μL 缓冲液 I, 厌氧条件 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min, 取 90 μL 上清与 10 μL 终止剂高氯酸溶液 (0.1 mol/L) 混合均匀, 取 20 μL 用于 HPLC 分析。所有进入 HPLC 的溶液均需要使用孔径 0.22 μm 的无菌过滤器过滤。根据 HPLC 色谱图与定量标准曲线, 计算不同益生菌降解尿酸的速率。

(2) 筛选具有降解嘌呤(黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤)能力的益生菌

取 900 μL 缓冲液 II 与 100 μL 高氯酸溶液 (0.1 mol/L) 混合均匀后吸取 20 μL , 外标法测定 3 种嘌呤的保留时间并制作定量标准曲线, HPLC 条件参考筛选具有降解尿酸能力的益生菌部分。

益生菌通过传代培养后, 取 2 mL 菌体沉淀与 750 μL 缓冲液 II 培养 30 min 后离心(具体操作参考筛选具有降解尿酸能力的益生菌部分), 90 μL 上清与 10 μL 终止剂高氯酸溶液混合均匀, 取 20 μL 用于 HPLC 分析。根据 HPLC 色谱图与标准曲线, 计算不同益生菌降解黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤的速率。

(3) 筛选具有降解核苷(腺苷、鸟苷)能力的益生菌

取 900 μL 缓冲液 III 与 100 μL 高氯酸溶液

(0.1 mol/L) 混合均匀后吸取 20 μL , 外标法测定腺苷与鸟苷的保留时间并制作定量标准曲线, HPLC 条件参考筛选具有降解尿酸能力的益生菌部分。

益生菌通过传代培养后, 取 2 mL 菌体沉淀与 750 μL 缓冲液 III 培养 30 min 后离心(具体操作参考筛选具有降解尿酸能力的益生菌部分), 90 μL 上清与 10 μL 终止剂高氯酸溶液混合均匀, 取 20 μL 用于 HPLC 分析。根据 HPLC 色谱图与标准曲线, 计算不同益生菌降解腺苷、鸟苷的速率。

(4) 筛选具有降解核苷酸(腺苷酸、鸟苷酸)能力的益生菌^[13]

取 900 μL 缓冲液 IV 与 100 μL 高氯酸溶液 (0.1 mol/L) 混合均匀后吸取 20 μL , 外标法测定腺苷酸与鸟苷酸的保留时间并制作定量标准曲线, HPLC 条件: 高效液相色谱仪, 反相色谱柱: Agilent Bonus- RP C18 , 流动相为等梯度 20 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 5.0), 流速 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 测定波长 254 nm, 保留时间 40 min。

益生菌通过传代培养后取 2 mL 菌体沉淀与 750 μL 缓冲液 IV 培养 30 min 后离心(具体操作参考筛选具有降解尿酸能力的益生菌部分), 90 μL 上清与 10 μL 终止剂高氯酸溶液混合均匀, 取 20 μL 用于 HPLC 分析。根据 HPLC 色谱图与定量标准曲线, 计算菌株 ZM05、ZM15 益生菌降解腺苷酸、鸟苷酸的速率。

1.2.2 初步探究菌株 ZM15 降解核苷酸和核苷的机制

为了验证菌株 ZM15 降解核苷酸、核苷是否为胞内过程, 开展以下实验^[14-15]。菌株 ZM15 通过传代培养后, 取 2 mL 培养液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀。1 mL PBS 洗涤菌体, 重复 3 次, 收集实验菌体, 悬浮于 1 mL 缓冲液 IV, 调整菌体浓度为 10^9 CFU/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 取 450 μL 上清液(胞外分泌物)与 450 μL 缓冲液 IV 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 后加入 100 μL 终止剂高氯酸, 取 20 μL 混

合液用于 HPLC 分析。菌体沉淀重悬于 1 mL PBS 溶液中(10 mmol/L , pH 7.2) , 超声波破碎(200 W , 工作时间 5 s , 停顿 5 s) 5 min 后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min , 取 450 μ L 上清液(胞内物)与 450 μ L 缓冲液 IV 混合 , 37 °C 培养 30 min 后加入 100 μ L 终止剂高氯酸 , 0.22 μ m 滤膜过滤后 , 取 20 μ L 混合液用于 HPLC 分析。腺苷酸与鸟苷酸含量色谱分析方法参考筛选具有降解核苷酸能力的益生菌部分。

为了验证菌株是否胞内降解核苷 , 同样取胞内物与胞外分泌物分别与缓冲液 III 培养 , 步骤同核苷酸部分 , 腺苷与鸟苷含量色谱分析方法参考筛选具有降解核苷能力的益生菌部分。

1.2.3 ZM15 降解核苷酸和核苷的代谢产物检测^[16-18]

取质谱标准品溶液 , 用溶剂分别稀释为原溶液浓度的 1/2、1/4、1/8、1/16 , 利用三重四级杆质谱 MRM 模式(Multiple reaction monitoring)对黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤、尿酸、尿囊素定性及外标法定量。质谱优化后条件如下 : 三重四级杆质谱仪 , 反相色谱柱 : Dikma Spursil C18-EP , 流速 1 mL/min , 柱温 25 °C , 测定波长 254 nm , 进样 20 μ L , 流动相 : A 相为 10 mmol/L 乙酸铵溶液 , B 相为甲醇溶液 , 梯度程序设置如下 : 0 min , 1% B ; 20 min , 70% B ; 22 min , 95% B ; 24 min , 1% B ; 30 min , 1% B。质谱条件如下 : Fragmentor , 135 V ; Capillary voltage , 4 kV ; Nozzle voltage , 500 V ; Nebulizer gas pressure (N₂) , 45 Psi ; Drying gas flow (N₂) , 5 L/min ; Gas temperature , 300 °C ; Sheath gas temperature , 250 °C ; Sheath gas flow , 11 L/min , 其他参数如表 2

表 2 代谢物质谱分析条件
Table 2 MS analysis condition of metabolites

成分名称	母离子	子离子	碰撞能量	细胞加速电压
Compound name	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Cell accelerator voltage (eV)
Uric acid	169	96	30	5
Allantoin	159	116	5	5
Xanthine	153	136	10	5
Guanine	152	135	30	5
Hypoxanthine	137	119	30	5

所示。通过 Agilent MassHunter B4.0 获得数据 , Quantitative Analysis of Software 处理数据。

益生菌通过传代培养后 , 取 2 mL 培养液 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min , 收集菌体沉淀。1 mL PBS 洗涤菌体 , 重复 3 次。设置 4 组平行实验组 , 每组 ZM15 菌体重悬于 1 mL 缓冲液 V 中 , 菌液浓度调整为 10⁹ CFU/mL , 37 °C 分别培养 2、8、12、24 h。同时 , 设置 5 组平行对照实验 , 每组 ZM15 重悬于 1 mL 乙酸铵溶液中 , 菌液浓度同样调整为 10⁹ CFU/mL , 37 °C 分别培养 0、2、8、12、24 h。培养结束后 , 溶液 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min , 上清液为胞外分泌物 ; 菌体沉淀重悬于 1 mL 乙酸铵溶液中 , 超声波破碎(200 W , 工作时间 5 s , 停顿 5 s) 5 min 后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min , 上清液为胞内物。0.22 μ m 滤膜过滤后 , 用质谱测定不同时间点胞内、胞外产物中代谢物含量。

1.2.4 益生菌对高尿酸血症模型大鼠干预实验

32 只雄性 Wistar 大鼠适应饲养 7 d 后 , 随机分为高尿酸血症模型组(n=8)、益生菌治疗组(n=8)、别嘌呤治疗组(n=8)和正常对照组(n=8) 4 组。第 8 天开始 , 前 3 组大鼠饲喂高嘌呤鼠粮并按每 100 g 体重每天标准腹腔注射 250 mg 氧嗪酸钾-羧甲基纤维素钠混悬液 , 正常对照组饲喂普通鼠粮 , 各组饮水均自由。第 14 天开始 , 前 3 组继续饲喂高嘌呤鼠粮辅以腹腔注射氧嗪酸钾-羧甲基纤维素钠混悬液 , 其中益生菌干预组 : 每只大鼠按照每天 2 \times 10⁹ CFU 标准灌胃 ZM15 ; 别嘌呤组 : 每只大鼠按每 100 g 体重每天标准腹腔注射 4.2 mg 别嘌呤醇-羧甲基纤维素钠混悬液 ; 持续 14 d。

动物实验第 7、14、21、28 天收集所有大鼠的尾静脉血液,离心分离血浆,测定血尿酸、肌酐、尿素氮含量。动物实验血液测定委托上海斯莱克实验动物有限责任公司完成。

1.2.5 数据处理

所有实验均重复 3 次,结果数据表示为 $\bar{x} \pm s$,使用 IBM SPSS (Version 20.0) 软件进行统计分析。使用方差分析(One-Way ANOVA)对结果进行差异比较, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 益生菌的筛选

2.1.1 筛选具有降解尿酸能力的益生菌

高效液相结果显示 30 株益生菌对尿酸没有降解能力。

2.1.2 筛选具有降解嘌呤能力的益生菌

高效液相结果显示 30 株益生菌对黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤没有降解能力。

2.1.3 筛选具有降解核苷(腺苷和鸟苷)能力的益生菌

外标法测得腺苷和鸟苷在色谱条件下保留时间分别为 14.59 min 和 20.05 min;定量曲线分别为 $A_{\text{腺苷}} = 1611.21C_{\text{腺苷}} + 167.78$ ($R^2 = 0.9999$), $A_{\text{鸟苷}} = 3468.42C_{\text{鸟苷}} + 379.57$ ($R^2 = 0.9998$), A :峰面积, C :浓度(mmol/L)。腺苷与鸟苷的降解速率按照下面公示计算:
 $v = (C_1 - C_2) \times V / (T \times m)$, v :降解速率[mmol/(h·g)], C_2 :剩余腺苷/鸟苷浓度(mmol/L), $C_1 = 2.5$ mmol/L, $V = 1$ mL, $T = 0.5$ h, $m = 0.002394$ g。

高效液相结果显示 30 株益生菌中有 5 株对腺苷和鸟苷具有降解作用,结果如图 1 所示,其中菌株 ZM05、ZM15 降解速率显著高于其他 3 株菌。30 min 内 ZM15、ZM05 降解腺苷、鸟苷比率均达到 100%,降解腺苷速率均为 2.56 mmol/(h·g),降解鸟苷速率均为 2.57 mmol/(h·g)。

2.1.4 筛选降解核苷酸(腺苷酸和鸟苷酸)速率高的菌株

外标法测得腺苷酸和鸟苷酸在色谱条件下保留时间分别为 13.98 min 和 30.09 min,定量曲线分别为

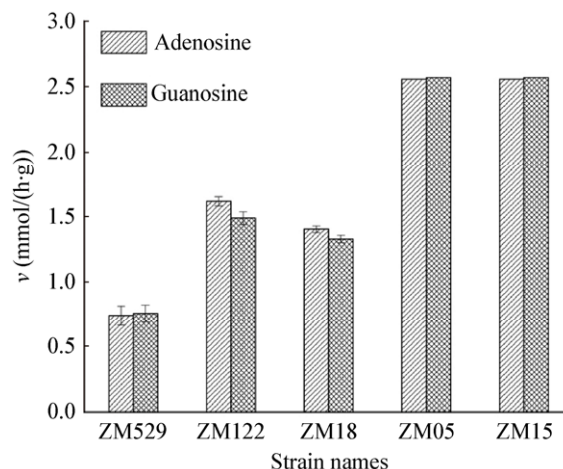


图 1 益生菌对腺苷和鸟苷的降解能力

Figure 1 The ability of degrading adenosine and guanosine by different probiotic strains

$A_{\text{腺苷酸}} = 1611.21C_{\text{腺苷酸}} + 167.78$ ($R^2 = 0.9999$), $A_{\text{鸟苷酸}} = 3468.42C_{\text{鸟苷酸}} + 379.57$ ($R^2 = 0.9998$), A :峰面积, C :浓度(mmol/L)。腺苷酸与鸟苷酸的降解速率按照下面公示计算 $v = (C_3 - C_4) \times V / (T \times m)$, v :降解速率[mmol/(h·g)], C_4 :剩余腺苷酸/鸟苷酸浓度(mmol/L), $C_3 = 2.5$ mmol/L, $V = 1$ mL, $T = 0.5$ h, $m = 0.002394$ g。

利用高效液相比较菌株 ZM05、ZM15 降解腺苷酸、鸟苷酸能力,如图 2 所示 ZM15 降解腺苷酸、鸟苷酸的速率显著高于 ZM05。30 min 内 ZM05

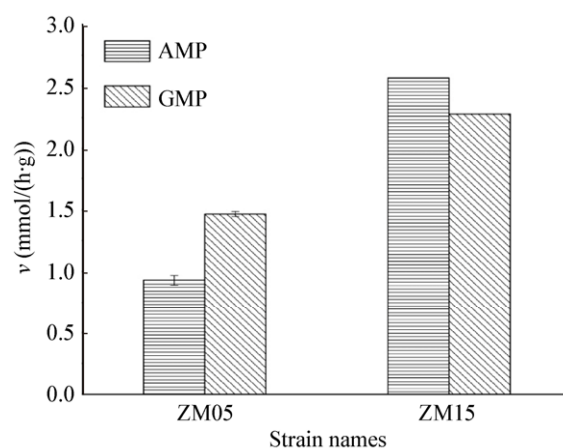


图 2 ZM05、ZM15 降解腺苷和鸟苷能力比较

Figure 2 The comparison between the ability of degrading AMP and GMP by ZM05 and ZM15

降解腺苷酸、鸟苷酸率比率分别达到 93.05%、64.87%，降解腺苷酸速率为 0.93 mmol/(h·g)、降解鸟苷酸速率为 1.46 mmol/(h·g) 30 min 内 ZM15 降解腺苷酸、鸟苷酸率比率达到 100%，降解腺苷酸速率为 2.57 mmol/(h·g)、降解鸟苷酸速率为 2.28 mmol/(h·g)。

2.2 菌株 ZM15 降解核苷酸、核苷过程

为了判断菌株 ZM15 降解核苷酸、核苷是否为胞内过程，分别取降解核苷酸、核苷后 ZM15

的胞内物与胞外分泌物重新与核苷酸、核苷进行培养。图 3 显示经过 37 °C 培养 30 min 后 ZM15 胞内物对腺苷、鸟苷的降解率和 ZM15 一样，均达到 100%，胞外分泌物对腺苷、鸟苷降解率为 0。图 4 显示 37 °C 培养 30 min 后 ZM15 胞内物对腺苷酸、鸟苷酸的降解率和 ZM15 一样，均达到 100%，胞外分泌物对腺苷酸、鸟苷酸的降解率为 0。结果明确显示益生菌对核苷酸与核苷的降解作用是胞内完成的。

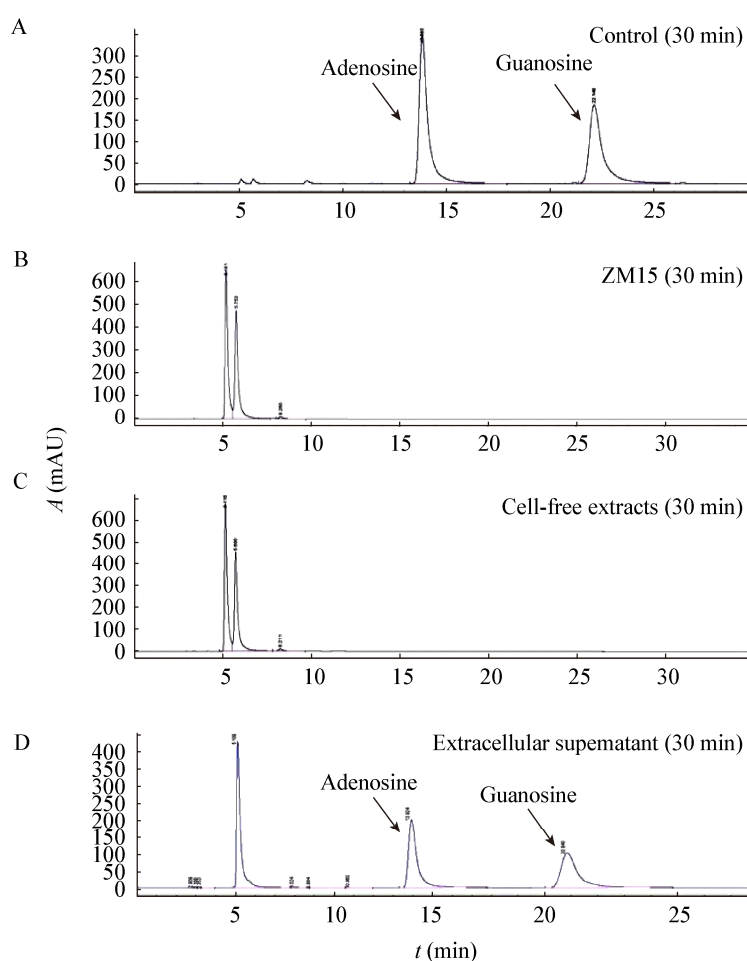


图 3 ZM15 降解腺苷和鸟苷

Figure 3 The degradation of adenosine and guanosine by ZM15

注：A：腺苷-鸟苷中性磷酸钾缓冲液(900 μ L 腺苷-鸟苷中性磷酸缓冲液 37 °C 培养 30 min 后，与 100 μ L 高氯酸混合均匀后取 20 μ L 混合液利用 HPLC 分析)；B：菌株 ZM15 与腺苷-鸟苷中性磷酸钾缓冲液 37 °C 培养 30 min；C：ZM15 胞内物与腺苷-鸟苷中性磷酸钾缓冲液 37 °C 培养 30 min；D：ZM15 胞外分泌物与腺苷-鸟苷中性磷酸钾缓冲液 37 °C 培养 30 min。具体细节参见 1.2.2。

Note: A: Adenosine-guanosine solution without incubation with ZM15 (900 μ L adenosine-guanosine solution was incubated at 37 °C for 30 min, then 100 μ L HClO_4 was added, 20 μ L of the mixture was analyzed by HPLC); B: ZM15 cells were incubated with adenosine-guanosine solution for 30 min; C: Cell-free extracts of ZM15 was incubated with adenosine-guanosine solution for 30 min; D: Extracellular supernatant of ZM15 was incubated with adenosine-guanosine solution for 30 min. See details in methods as 1.2.2.

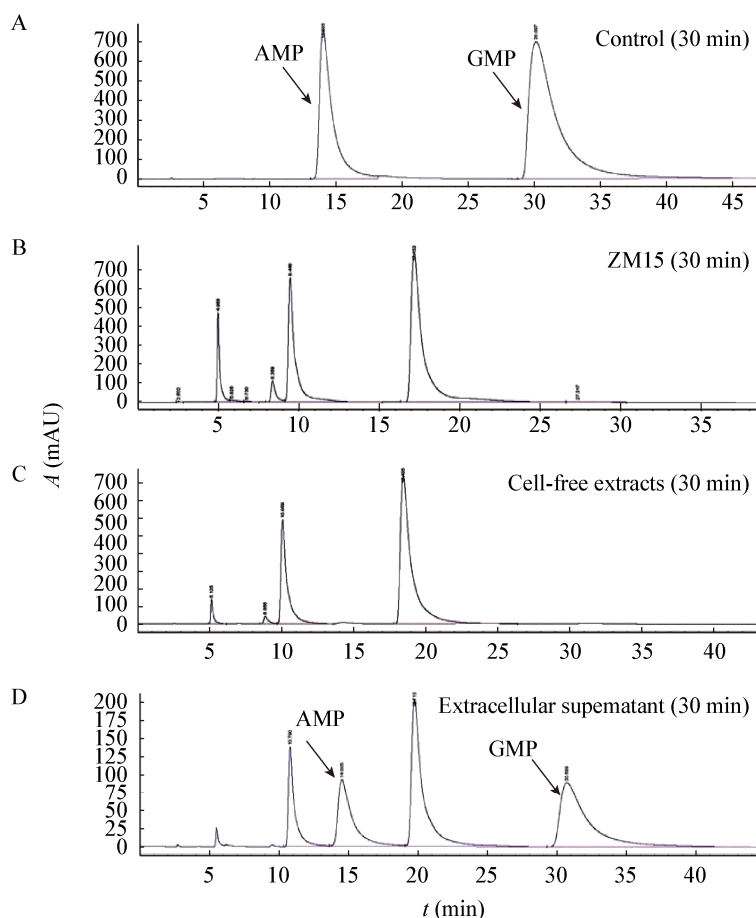


图4 ZM15降解腺苷酸和鸟苷酸

Figure 4 The degradation of AMP and GMP by ZM15

注：A：腺苷酸-鸟苷酸中性磷酸钾缓冲液(900 μ L 腺苷酸-鸟苷酸中性磷酸钾缓冲液 37 $^{\circ}$ C 培养 30 min 后，与 100 μ L 高氯酸混合均匀后取 20 μ L 混合液利用 HPLC 分析；B：菌株 ZM15 与腺苷酸-鸟苷酸中性磷酸钾缓冲液 37 $^{\circ}$ C 培养 30 min；C：ZM15 胞内物与腺苷酸-鸟苷酸中性磷酸钾缓冲液 37 $^{\circ}$ C 培养 30 min；D：ZM15 胞外分泌物与腺苷酸-鸟苷酸中性磷酸钾缓冲液 37 $^{\circ}$ C 培养 30 min。具体细节参见 1.2.2.

Note: A: AMP-GMP solution without incubation with ZM15 (900 μ L AMP-GMP solution was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 30 min, then 100 μ L HClO₄ was added, 20 μ L of the mixture was analyzed by HPLC); B: ZM15 living cells were incubated with AMP-GMP solution for 30 min; C: Cell free extract of ZM15 was incubated with AMP-GMP solution for 30 min; D: Extracellular supernatant of ZM15 was incubated with AMP-GMP solution for 30 min. See details in methods as 1.2.2.

本研究参考大连医科大学^[9]采用磷酸盐缓冲体系筛选具有降解核苷酸和核苷作用的益生菌,由于磷酸盐作为不挥发盐类通常不被允许进入质谱,虽然质谱对物质定性方面与高效液相相比具有巨大的优势,仍无法利用质谱对益生菌降解核苷酸、核酸的代谢产物进行定性与定量。本研究采用乙酸铵缓冲液替代磷酸盐缓冲液,通过平板划线法验证

了乙酸铵缓冲液替代磷酸盐缓冲液对 ZM15 的生长没有显著性差异;高效液相结果显示在乙酸铵缓冲液和磷酸盐缓冲液中 ZM15 对核苷酸和核苷的降解速率没有显著性区别;高效液相结果显示黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤、尿酸、尿囊素在乙酸铵缓冲体系中 24 h 稳定,未发生显著降解。由于乙酸铵缓冲液可以进入质谱系统,因此本研究首次利用

三重四级杆质谱定性与定量检测益生菌降解核苷酸与核苷过程中产生的代谢物。三重四级杆质谱MRM模式对黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤、尿酸、尿囊素定性结果如图5所示,外标法定量的标准曲线如下: $A_{\text{黄嘌呤}}=2\text{E}+06C_{\text{黄嘌呤}}$ ($R^2=0.992$), $A_{\text{鸟嘌呤}}=4\text{E}+06C_{\text{鸟嘌呤}}$ ($R^2=0.991$), $A_{\text{次黄嘌呤}}=5\text{E}+06C_{\text{次黄嘌呤}}$ ($R^2=0.996$); A :峰面积, C :浓度(mmol/L)。 10^9 CFU ZM15与3 μmol 腺苷酸、3 μmol 鸟苷酸、3 μmol 腺苷、3 μmol 鸟苷在1 mL 乙酸铵缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,高效液相结果显示30 min后菌体内和体外溶液检测不到外加的核苷和核苷酸;质谱结果显示2 h后

胞外、胞内均测到鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤,且胞内3种嘌呤含量显著高于对照(正常)菌体内含量。如表3所示,尿酸和尿囊素在胞内、外均未发现。

2.3 动物实验

本研究通过给大鼠腹腔注射氧嗪酸钾并辅以高嘌呤饮食建立高尿酸血症模型,用于检测菌株ZM15是否有降低大鼠血尿酸的作用。图6A显示连续7 d腹腔注射氧嗪酸钾并辅以高嘌呤饮食使高尿酸血症模型组、ZM15治疗组、别嘌呤治疗组大鼠的血尿酸水平升高至226.02 $\mu\text{mol/L}$,为对照组大鼠血尿酸水平的3.08倍($P<0.01$),认为实验条件

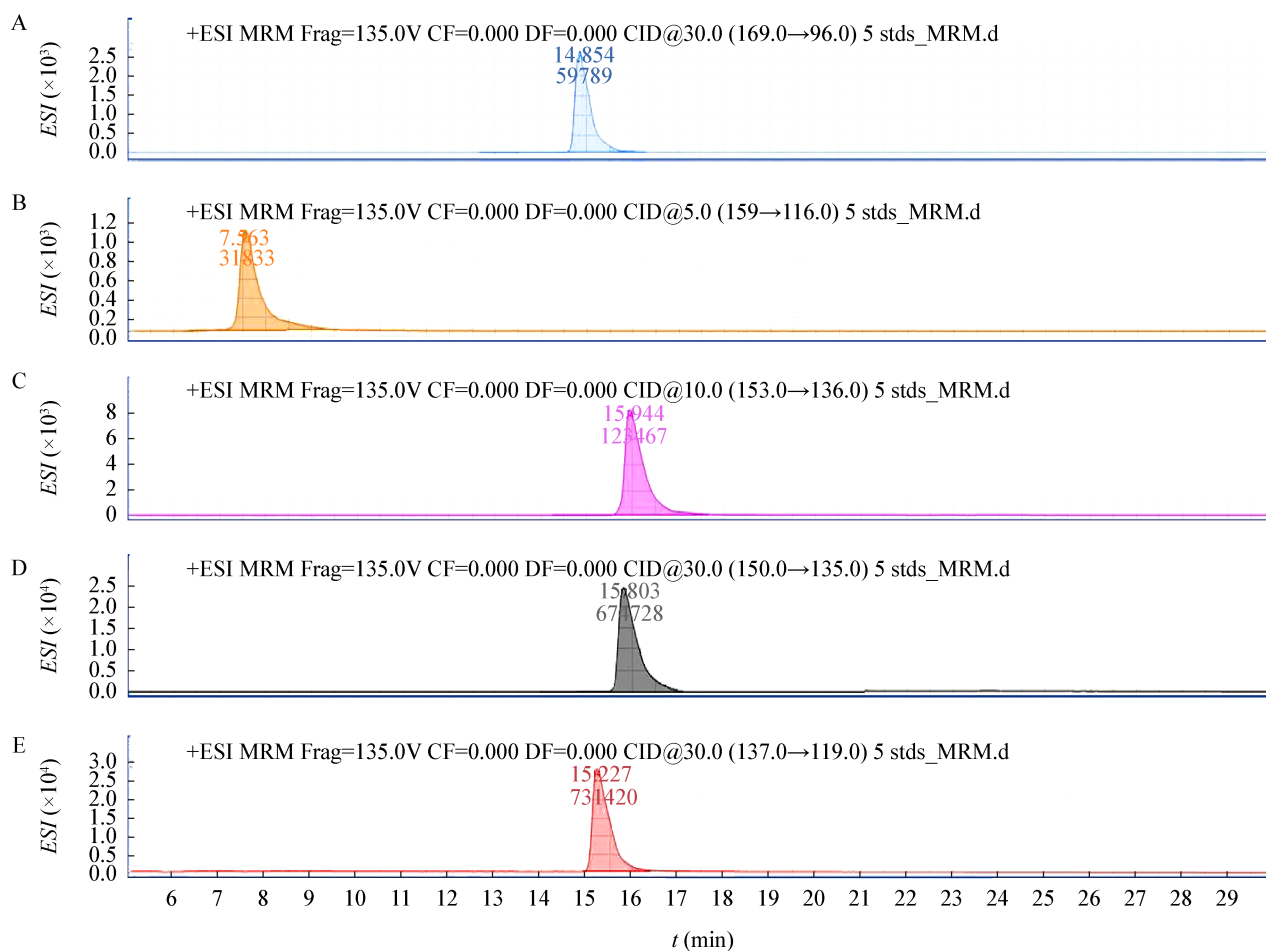


图5 三重四级杆质谱MRM模式检测5种标样

Figure 5 The mass spectrum of five standards by QQQ (MRM)

注:A:尿酸;B:尿囊素;C:黄嘌呤;D:鸟嘌呤;E:次黄嘌呤。

Note: A: Uric acid (UA); B: Allantoin; C: Xanthine; D: Guanine; E: Hypoxanthine.

表 3 三重四级杆质谱检测菌株 ZM15 降解核苷酸和核苷过程中胞内、外嘌呤含量变化
Table 3 Quantification of purines during the degradation of nucleotides and nucleosides by ZM15 extracellularly and intracellularly using QQQ (MRM)

组名 Group	黄嘌呤 Xanthine (μmol/L)		次黄嘌呤 Hypoxanthine (μmol/L)		鸟嘌呤 Guanine (μmol/L)	
	胞外 Out	胞内 In	胞外 Out	胞内 In	胞外 Out	胞内 In
Control	0.000±0.000	0.008±0.001	0.000±0.000	0.002±0.001	0.000±0.000	0.125±0.005
Experiment-2h	0.066±0.001	0.040±0.002**	0.114±0.001	0.040±0.001##	0.716±0.025	0.439±0.008△△
Experiment-8h	0.046±0.000	0.051±0.001**	0.115±0.001	0.058±0.001##	0.838±0.005	0.788±0.001△△
Experiment-12h	0.053±0.002	0.044±0.000**	0.124±0.001	0.033±0.001##	0.970±0.015	0.805±0.005△△
Experiment-24h	0.067±0.001	0.063±0.001**	0.110±0.001	0.042±0.001##	1.028±0.018	0.858±0.003△△

注：实验数据均用平均值±标准差表示，重复 3 次。 **：与胞内黄嘌呤含量对比具有极显著性差异($P<0.01$)； ##：与胞内次黄嘌呤含量对比具有极显著性差异($P<0.01$)； △△：与胞内鸟嘌呤含量对比具有极显著性差异($P<0.01$)。
Note: Each value represents Means±S, n=3. ** : $P<0.01$ compare with the content of intracellular xanthine in control; ##: $P<0.01$ compare with the content of intracellular hypoxanthine in control; △△: $P<0.01$ compare with the content of intracellular guanine in control.

下高尿酸血症模型建立。第 14 天开始对别嘌呤组大鼠给予别嘌呤治疗，连续 7–14 d 的治疗使大鼠血尿酸水平显著低于高尿酸血症模型大鼠 ($P<0.01$)。连续给大鼠灌胃 ZM15 7 d 后，ZM15 治疗组大鼠血尿酸水平与模型大鼠比显著降低 ($P<0.01$)，连续灌胃 14 d 后 ZM15 治疗组大鼠血尿酸水平与灌胃 7 d 相比进一步显著降低 ($P<0.05$)，

显示 ZM15 具有降低大鼠血尿酸的作用，同时对结果进行比较显示其治疗作用不如临床药物别嘌呤醇。图 6B、C 显示建模期间高尿酸血症组、ZM15 组、别嘌呤组大鼠的尿素氮、肌酐值显著高于对照组大鼠 ($P<0.05$)，但是仍处于正常范围^[19-20]，认为大鼠未出现肾小球滤过功能损伤，高尿酸血症模型是成功的。

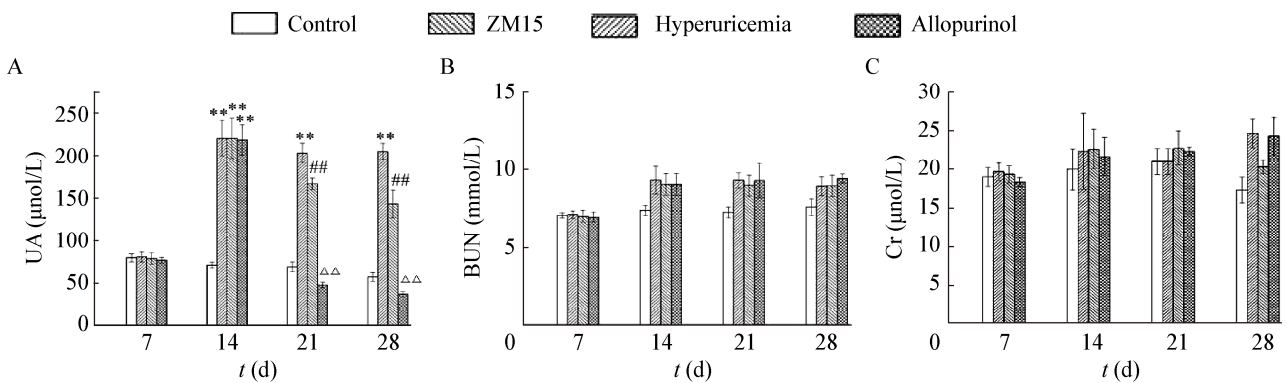


图 6 菌株 ZM15 和别嘌呤醇对高尿酸血症模型大鼠的作用
Figure 6 Effects of ZM15 and allopurinol on hyperuricemic rats

注：A：血尿酸水平； **：与对照组大鼠对比具有极显著性差异($P<0.01$)， ##：与高尿酸血症模型组大鼠对比具有极显著性差异 ($P<0.01$)， △△：与 ZM15 治疗组大鼠对比具有极显著性差异($P<0.01$)； B：尿素氮水平； C：肌酐水平； 实验数据均用平均值±标准差表示，重复 3 次。
Note: A: The level of serum uric acid (UA); ** : $P<0.01$ compare with control rats, ##: $P<0.01$ compare with hyperuricemic rats, △△: $P<0.01$ compare with allopurinol treated rats; B: The level of BUN (blood urea nitrogen); C: The level of Cr (creatinine). Each value represents Means±SD, n=3.

3 讨论与结论

高尿酸血症的显著性特点是血液中尿酸含量高于正常水平,如何降低血尿酸浓度成为治疗高尿酸血症的关键。益生菌作为人体肠道重要的菌群成员,在高尿酸血症治疗上与药物相比更有优势^[21],如何筛选到具有降低血尿酸功能的益生菌株成为目前研究的热点。大连医科大学和大冢制药株式会社将降解核苷(鸟苷、肌苷)作为筛选益生菌的标准,日本明治株式会社将降解腺苷酸作为筛选益生菌的标准^[9-11]。本研究中我们提高筛选益生菌的标准,要求菌株同时可以降解 2 种核苷酸(腺苷酸、鸟苷酸)、2 种核苷(腺苷、鸟苷)、3 种嘌呤(鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤)和尿酸,首次体外筛选到具有同时降解腺苷酸、鸟苷酸、腺苷和鸟苷能力的干酪乳杆菌 ZM15。

大连医科大学^[9]和日本明治株式会社^[10]、大冢制药株式会社^[11]均采用益生菌-核苷酸-磷酸盐缓冲体系或益生菌-核苷-磷酸盐缓冲体系筛选具有降血尿酸作用的益生菌,由于磷酸盐不被允许进入质谱,所以无法用质谱检测益生菌的代谢产物。本研究中,我们将磷酸盐缓冲体系改为乙酸铵缓冲体系,首次将质谱检测益生菌降解核苷酸与核苷代谢产物变为了可能,明显提高了检测的精确度和方便性,为今后进行进一步研究提供了有效方法。

生物化学指出嘌呤代谢中核苷酸在核苷酸酶作用下水解为核苷,核苷在核苷磷酸化酶作用下水解为嘌呤碱基和 1-磷酸核糖,嘌呤碱基一方面进入核苷酸补救合成途径,间接参与其他代谢过程,另一方面进入分解代谢形成尿酸或者尿囊素^[22]。利用高效液相色谱检测被降解底物的变化情况,结果显示 10^9 CFU ZM15 将 3 μmol 腺苷酸、3 μmol 鸟苷酸、3 μmol 腺苷、3 μmol 鸟苷完全降解转化后(菌株体内和体外溶液在转化后已测不到外加的核苷和核苷酸),利用质谱没有检测到尿酸和尿囊素生成;同时,理论上这些核苷酸与核苷应生成 12 μmol 的嘌呤,然而检测到的黄嘌呤、次黄

嘌呤、鸟嘌呤的总生成量要远低于理论估计值。我们认为 ZM15 在体内降解腺苷酸、鸟苷酸、腺苷、鸟苷生成黄嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤,3 种嘌呤部分被排出胞外部分保留在菌体内,其他形成的中间产物则通过核苷酸补救过程间接参与其他代谢活动。

本研究中通过给 7 周龄 Wistar 雄性大鼠连续 7 d 腹腔注射氧嗪酸钾辅助高嘌呤饮食建立了稳定的高尿酸血症模型,进而用于验证我们筛选的益生菌是否具有显著降低血尿酸的作用。本研究构建高尿酸血症模型大鼠时参考了大连医科大学和日本明治株式会社、大冢制药株式会社构建模型的方法^[9-11],不同之处是我们提高了大鼠的嘌呤类物质摄入量,对验证益生菌作用提出了更高的要求,动物实验结果显示了 ZM15 具有降低血尿酸的显著效果。

目前,关于益生菌降低血尿酸的机制缺乏明确的解释,主要有下面 3 种说法:(1) 大连医科大学推测益生菌 DM9218 在肠道中与上皮细胞竞争吸收食物中的核苷,但是对食物中和水解产生的嘌呤碱基没有明显降解效果,这部分嘌呤碱基仍可以被肠道吸收^[23];(2) 明治株式会社认为益生菌 PA-3 可以减少肠道对腺苷、腺苷酸的吸收达到降低血尿酸的作用^[24];(3) 大冢制药株式会社乳杆菌 ONRIC b0185 在肠道中分解由食物摄取的嘌呤类化合物降低肠道的吸收^[25],该菌株具有将肌苷、鸟苷降解生成次黄嘌呤、鸟嘌呤并进而生成尿酸的能力。结合动物实验、益生菌胞内降解核苷酸与核苷后代代谢物的定性与定量结果,关于本研究中 ZM15 降低血尿酸的机制,我们做出如下解释:ZM15 在肠道中可以通过与肠道上皮细胞竞争腺苷酸、鸟苷酸、腺苷、鸟苷,减少上皮细胞的吸收达到降低血尿酸的作用。同时,虽然 ZM15 在降解腺苷酸、鸟苷酸、腺苷、鸟苷的过程中产生少量嘌呤可被人体吸收生成尿酸,但这个量相对很小,更多生成的其他中间产物则通过参与菌体核苷酸补救合成过程间接参与

自身多种代谢和调节活动。通过给高尿酸血症大鼠灌胃 ZM15 可以达到显著降低血尿酸的作用效果, 可以认为 ZM15 与肠道上皮细胞竞争核苷酸、核苷吸收减少人体尿酸生成的作用显著大于其降解核苷酸、核苷过程中释放嘌呤生成尿酸的作用, 从而最终达到了降低血尿酸的作用。

本实验从所研究的菌株中筛选到了一株具有降解核苷酸和核苷能力且速率较快的干酪乳杆菌 ZM15, 且 ZM15 降解鸟苷的速率显著高于大连医科大学从泡菜中筛选到的 DM9218, 大鼠实验显示 ZM15 具有显著降低血尿酸的能力, 但是低于目前临床使用的药物别嘌呤醇。可以认为菌株 ZM15 是对于缓解高尿酸血症具有应用潜力的益生菌株。

REFERENCES

- [1] Borghi C. The management of hyperuricemia: back to the pathophysiology of uric acid[J]. Current Medical Research and Opinion, 2017, 33(S3): 1-4
- [2] Kim H, Kim SH, Choi AR, et al. Asymptomatic hyperuricemia is independently associated with coronary artery calcification in the absence of overt coronary artery disease: A single-center cross-sectional study[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(14): e6565
- [3] Liu J, Zhang H, Dong Z, et al. Mendelian randomization analysis indicates serum urate has a causal effect on renal function in Chinese women[J]. International Urology and Nephrology, 2017, 49(11): 2035-2042
- [4] Sun SZ, Flickinger BD, Williamson-Hughes PS, et al. Lack of association between dietary fructose and hyperuricemia risk in adults[J]. Nutrition & Metabolism, 2010, 7: 16
- [5] Nguyen MTT, Awale S, Tezuka Y, et al. Hypouricemic effects of acacetin and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(12): 2231-2234
- [6] Zhu JX, Wang Y, Kong LD, et al. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93(1): 133-140
- [7] Li JT, Zhang YL, Ma JQ, et al. Effects of montmorillonite in adsorbing uric acid and decreasing the concentration of uric acid in serum[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2008, 29(6): 647-650 (in Chinese)
李军涛, 张寅丽, 马婕群, 等. 蒙脱石吸附尿酸和降低血尿酸的作用[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2008, 29(6): 647-650
- [8] Bengoa AA, Llamas MG, Iraporda C, et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains[J]. Food Microbiology, 2018, 69: 212-218
- [9] Li M, Yang DB, Mei L, et al. Screening and characterization of purine nucleoside degrading lactic acid bacteria isolated from Chinese sauerkraut and evaluation of the serum uric acid lowering effect in hyperuricemic rats[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105577
- [10] Tsuboi H, Kaneko N, Satou A, et al. *Lactobacillus* having blood uric acid level-reducing activity: Chinese Patent, CN102747004A[P]. 2012-12-24 (in Chinese)
坪井洋, 金子纪子, 佐藤秋菜, 等. 具有降低血中尿酸值作用的乳酸菌: 中国专利, CN102747004A[P]. 2012-12-24
- [11] Kumemura M, Ikenaga T, Okamatsu H, et al. Composition e.g. food/beverages and pharmaceuticals for preventing and treating hyperuricemia, comprises microorganisms e.g. *Lactobacillus* and yeast capable of degrading purine compounds and lowering serum uric acid level: European Patent, EP1649863-A1[P]. 2006-04-26
- [12] Yamada N, Iwamoto C, Kano H, et al. Evaluation of purine utilization by *Lactobacillus gasseri* strains with potential to decrease the absorption of food-derived purines in the human intestine[J]. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2016, 35(10/12): 670-676
- [13] Lin HL. Simultaneous determinations of five kinds of nucleotides in nucleotide pollen capsules by HPLC[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(12): 2121-2125 (in Chinese)
林宏琳. HPLC 法同时测定核苷花粉胶囊中 5 种核苷酸含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2121-2125
- [14] Shen LJ, Liu XJ, Yao WR, et al. Study on the degradation of bisphenol A by food bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(12): 210-213 (in Chinese)
沈丽金, 刘新杰, 姚卫蓉, 等. 食品级微生物降解双酚 A 的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 210-213
- [15] Zhang Q, Zhang J, Du GC, et al. Isolation and influencing factors of lactic acid bacteria with microcystin-LR degradation ability[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(5): 745-751 (in Chinese)
张茜, 张娟, 堵国城, 等. 具有微囊藻毒素清除能力的乳酸菌的分离筛选及其影响因素[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 745-751
- [16] Li XX, Tian XW, Wang YH, et al. Metabolites research of *Lactobacillus paracasei* with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(18): 169-173 (in Chinese)
李晓雪, 田锡炜, 王永红, 等. 拟干酪乳杆菌胞内代谢产物的 GC-MS 分析方法的建立[J]. 食品工业科技, 2013, 34(18): 169-173
- [17] Wang B, Li N, Dong TX, et al. Determination of nucleosides and HPLC fingerprints of cordyceps[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(5): 952-956 (in Chinese)
王冰, 李宁, 董婷霞, 等. 冬虫夏草中核苷类成分含量测定及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 952-956
- [18] Zhao D, Du RP, Liu PF, et al. Applications of metabolomics in fermented food with lactic acid bacteria[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(8): 240-244 (in Chinese)
赵丹, 杜仁鹏, 刘鹏飞, 等. 代谢组学在乳酸菌发酵食品研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(8): 240-244

- [19] Fan J, Qin J, Liu CX, et al. Establishment of normal reference range of blood hematological and biochemical indicators of SPF wistar rats[J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2010, 21(6): 50-52 (in Chinese)
樊军, 秦俊, 刘春霞, 等. 建立 Wistar 大鼠血液及生化指标正常参考值范围的探讨[J]. 公共卫生与预防医学, 2010, 21(6): 50-52
- [20] Gao MZ, Chai WJ, Wang YY, et al. Investigation on the range of baseline hematological parameters and serum biochemical values in clean Wistar rat and immunotological parameters in clean ICR mice[J]. Chinese Journal of Pest Control, 2008, 24(9): 675-677 (in Chinese)
高珉之, 柴玮杰, 王玉燕, 等. Wistar 大鼠血液、生化指标及 ICR 小鼠免疫学指标正常参考值的研究[J]. 医学动物防制, 2008, 24(9): 675-677
- [21] Yang DB, Yuan JL. The treatment of hyperuricemia and microecological treatment progress[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(10): 950-952 (in Chinese)
杨殿斌, 袁杰利. 高尿酸血症的治疗及微生态方面治疗的相关进展[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(10): 950-952
- [22] Reginald HG, Charles MG. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 157
- [23] Yang DB, Yuan JL. Screening of serum uric acid-lowering Lactic acid bacteria and its effect on hyperuricemia in rat models[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(2): 125-128 (in Chinese)
杨殿斌, 袁杰利. 降尿酸乳酸菌筛选及其对高尿酸血症模型大鼠作用研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 125-128
- [24] Yamada N, Saito-Iwamoto C, Nakamura M, et al. *Lactobacillus gasseri* PA-3 uses the purines IMP, inosine and hypoxanthine and reduces their absorption in rats[J]. Microorganisms, 2017, 5(1): 10
- [25] Du BY, Li R. Absorption and metabolism of nucleic acid[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2002, 10(6): 702-705 (in Chinese)
杜伯雨, 李蓉. 核酸的吸收与代谢[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(6): 702-705

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxwtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.1777)