

生物工程学报  
*Chinese Journal of Biotechnology*  
ISSN 1000-3061, CN 11-1998/Q

## 《生物工程学报》网络首发论文

题目：口服表达尿酸氧化酶的乳酸乳球菌调控小鼠血尿酸水平  
作者：程昊，熊国庆，崔佳珍，陈志励，朱晨，宋娜，王庆阳，熊向华，刘刚，陈惠鹏  
DOI：10.13345/j.cjb.240315  
收稿日期：2024-04-11  
网络首发日期：2024-05-22  
引用格式：程昊，熊国庆，崔佳珍，陈志励，朱晨，宋娜，王庆阳，熊向华，刘刚，陈惠鹏. 口服表达尿酸氧化酶的乳酸乳球菌调控小鼠血尿酸水平[J/OL]. 生物工程学报. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.240315>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

· 医药生物技术 ·

# 口服表达尿酸氧化酶的乳酸乳球菌调控小鼠血尿酸水平

程昊<sup>1</sup>, 熊国庆<sup>2</sup>, 崔佳珍<sup>1</sup>, 陈志励<sup>1</sup>, 朱晨<sup>1</sup>, 宋娜<sup>3</sup>, 王庆阳<sup>1</sup>, 熊向华<sup>1</sup>, 刘刚<sup>1</sup>, 陈惠鹏<sup>1\*</sup>

1 军事科学院军事医学研究院, 北京 100071

2 安徽大学物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230039

3 乐陵市人民医院重症医学科, 山东 乐陵 253600

**摘要:** 尿酸氧化酶(urate oxidase, Uox)是尿酸代谢的关键酶,已经用于人高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)的治疗。然而,异源性尿酸氧化酶进入血液会引发免疫排斥反应产生抗体,影响疗效。本研究采用食品级益生菌乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) NZ9000为底盘细胞,构建了表达黄曲霉源尿酸氧化酶的工程菌(NZ9000-aUox)和“恢复”活性的人源尿酸氧化酶的工程菌(NZ9000-hUox)。结果表明,表达外源尿酸氧化酶的工程菌可在体外降低尿酸,并具有时间依赖性。进一步,利用酵母膏成功诱导小鼠血尿酸升高,在第7天和第14天灌胃给予酵母膏的小鼠血尿酸均值分别升高85.4%和106.2%;同时工程菌NZ9000-aUox给药组小鼠血尿酸仅升高39.5%和48.3%,NZ9000-hUox给药组小鼠血尿酸升高57.0%和82.9%,证明工程菌能明显抑制血尿酸的升高。将效果更加显著的工程菌NZ9000-aUox与高尿酸血症一线治疗药物别嘌醇进行安全性比较,结果显示工程菌的肝脏安全性与别嘌醇相当,肾脏安全性优于别嘌醇,不仅能够缓解血尿酸升高导致的肾损伤,还能够避免别嘌醇治疗过程中可能引发的肾损伤加重风险。本研究为高尿酸血症的长期治疗和调控提供了一种有效并且更加安全的治疗方法。

**关键词:** 尿酸氧化酶; 乳酸乳球菌; 高尿酸血症模型小鼠; 高尿酸血症; 安全性

## Oral gavage of *Lactococcus lactis* expressing urate oxidase regulates serum uric acid level in mice

CHENG Hao<sup>1</sup>, XIONG Guoqing<sup>2</sup>, CUI Jiazhen<sup>1</sup>, CHEN Zhili<sup>1</sup>, ZHU Chen<sup>1</sup>, SONG Na<sup>3</sup>, WANG Qingyang<sup>1</sup>, XIONG Xianghua<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>, CHEN Huipeng<sup>1\*</sup>

1 Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

3 Department of Critical Care Medicine, People's Hospital of Laoling, Laoling 253600, Shandong, China

资助项目: 国家自然科学基金(31900669)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31900669).

\*Corresponding author. E-mail: chenhuipengbj@163.com

Received: 2024-04-11; Accepted: 2024-05-21

**Abstract:** Urate oxidase (Uox) plays a pivotal role in uric acid (UA) degradation, and it has been applied in controlling serum UA level in clinical treatment of hyperuricemia (HUA). However, because Uox is a heterogenous protein to the human body, the immune rejections typically occur after intravenous administration, which greatly hampers the application of Uox-based agents. In this study, we used *Lactococcus lactis* NZ9000, a food-grade bacterium, as a host to express exogenous Uox genes, to generate the Uox-expressing engineered strains to treat HUA. *Aspergillus flavus*-derived Uox (aUox) and the “resurrected” human-derived Uox (hUox) were cloned into vector and expressed in NZ9000, to generate engineered strains, respectively. The engineered NZ9000 strains were confirmed to express Uox and showed UA-lowering activity in a time-dependent manner *in vitro*. Next, in an HUA mice model established by oral gavage of yeast paste, the UA levels were increased by 85.4% and 106.2% at day 7 and day 14. By contrast, in mice fed with NZ9000-aUox, the UA levels were increased by 39.5% and 48.3% while in mice fed with NZ9000-hUox were increased by 57.0% and 82.9%, suggesting a UA-lowering activity of both engineered strains. Furthermore, compared with allopurinol, the first-line agent for HUA treatment, mice fed with NZ9000-aUox exhibited comparable liver safety but better kidney safety than allopurinol, indicating that the use of engineered NZ9000 strains not only alleviated kidney injury caused by HUA, but could also avoided the risk of kidney injury elicited by using allopurinol. Collectively, our study offers an effective and safe therapeutic approach for HUA long-term treatment and controlling.

**Key words:** Urate oxidase; *Lactococcus lactis*; hyperuricemia model mouse; hyperuricemia; safety

尿酸 (uric acid, UA) 是嘌呤代谢的终产物, 人体内的尿酸约 2/3 由内源性嘌呤合成产生, 约 1/3 由外源性高嘌呤饮食产生<sup>[1-2]</sup>。尿酸生成过多或排泄减少会导致高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 或痛风。通过对尿酸代谢过程进行解析发现, 导致尿酸水平异常的关键酶包括磷酸核糖焦磷酸合成酶、嘌呤核苷磷酸化酶、黄嘌呤氧化酶和尿酸氧化酶 (urate oxidase, Uox)<sup>[3]</sup>。其中, 抑制黄嘌呤氧化酶的活性是目前治疗高尿酸血症的常用策略<sup>[4]</sup>, 代表药物有别嘌醇、非布司他等; 而尿酸氧化酶因能够将尿酸氧化成溶解度为其 5-10 倍的尿囊素, 从而达到将尿酸排出体外的目的, 也是治疗高尿酸血症的热门靶点之一<sup>[5]</sup>。人类编码尿酸氧化酶的基因在进化过程中多次突变成为假基因, 因此不能表达功能蛋白<sup>[6]</sup>。通过补充外源尿酸氧化酶, 可以促进尿酸分解代谢, 降低血尿酸水平。该类代表药物有拉布立酶和普瑞凯希等<sup>[7-8]</sup>。

拉布立酶为酿酒酵母表达的重组黄曲霉源尿酸氧化酶。临床试验结果表明, 高尿酸血症病人使用拉布立酶治疗 4 h, 尿酸水平即可恢复正常, 而使用别嘌醇则需要 24 h<sup>[9]</sup>。然而, 拉布立酶是外源蛋白类药物, 在体内可能会诱导抗体产生<sup>[10]</sup>。Jiang 等<sup>[11]</sup>在人尿酸氧化酶假基因中突变 19 个氨基酸位点, 使人尿酸氧化酶恢复了降尿酸活性, 然而免疫原性仍然限制了其在人体上的应用。合成生物学的发展为药物体内递送提供了新的方案。已有研究表明, 工程化改造细菌在一些诸如苯丙酮尿症、高氨血症、糖尿病、肥胖、酒精性脂肪肝以及癌症等疾病的治疗中展现出一定效果<sup>[12]</sup>。乳酸乳球菌是美国食品药品监督管理局 (food and drug administration, FDA) 批准的食品安全级微生物, 因自身抗原性较弱、几乎不分泌蛋白、不在肠道中定植等特性使其成为食品级表达宿主的最常用选择之一<sup>[13]</sup>。NZ9000 由 MG1363 株基因组中插入 *nisR* 和 *nisK* 基因改造而来, 广泛用于外源基因调控表达<sup>[14]</sup>。当外源基因插

入到质粒的 PnisA 启动子下游并转染 NZ9000, 加入诱导剂乳酸链球菌肽 (Nisin) 可以诱导外源基因表达。最常用于 NZ9000 的表达质粒是 pNZ8148<sup>[14-15]</sup>。已有研究表明, NZ9000 工程菌表达 HSP65-6P277 或白细胞介素-10 等外源基因可用于胰腺炎和结肠炎的治疗<sup>[16-17]</sup>。

本研究利用 NZ9000 作为底盘细胞, 将含有黄曲霉源尿酸氧化酶 (*Aspergillus flavus*-derived Uox, aUox) 和“恢复”活性的人源尿酸氧化酶 (“resurrected” human-derived Uox, hUox)<sup>[11]</sup> 基因的质粒转染 NZ9000, 通过 Nisin 诱导分别获得了能够稳定表达黄曲霉源和人源尿酸氧化酶的 NZ9000 工程菌株。之后我们评价了工程菌株在体外的降尿酸活性和在小鼠体内的降尿酸效果, 并对工程菌株对肝脏和肾脏的用药安全性进行了初步检测。以期高尿酸血症的长期治疗和调控提供一种有效并且更加安全的治疗方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株和试剂

质粒 pNZ8148 (军事医学研究院张惟材研究员惠赠) 用于基因克隆和蛋白表达。乳酸乳球菌 NZ9000 由实验室保存, 在 GM17 培养基、30 °C 环境静置培养。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。Nisin 和氯霉素购自北京索莱宝科技有限公司。抗 His-Tag 多克隆抗体、HRP-山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体和增强型化学发光液购自苏州博奥龙科技有限公司。酵母膏购自上海易恩化学技术有限公司。谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL)、肌酐 (creatinine, Crea)、尿素 (Urea)、胱抑素 C (cystatin C, Cys-C) 和  $\beta$ 2-微球蛋白 ( $\beta$ 2-microglobulin,  $\beta$ 2-MG) 检测试剂盒购自山东博科生物产业有限公司。

### 1.2 pNZ8148-aUox 和 pNZ8148-hUox 质粒的构建与表达

分别将 aUox 与 hUox 基因序列进行针对乳酸乳球菌表达体系的密码子优化, 并在目的基因序列 3' 端添加 6 × His Tag, 委托北京擎科生物科技有限公司进行基因合成。通过酶切连接将 2 个目的基因分别构建到 pNZ8148 载体上, 获得重组表达质粒 pNZ8148-aUox 和 pNZ8148-hUox。将重组质粒及空载质粒分别电转化 NZ9000 电转感受态细胞 (2,000 V、25  $\mu$ F、200  $\Omega$ ), 涂布适量菌液至含氯霉素 (10  $\mu$ g/mL) 抗性的 GM17 固体平板, 30 °C 静置培养 1-2 d 至出现单克隆转化子。分别挑取适量单克隆转化子至 1 mL 含有氯霉素 (10  $\mu$ g/mL) 抗性的 GM17 液体培养基内, 30 °C 静置培养 12 h 后送测序。测序正确的 NZ9000 工程菌株单克隆分别命名为 NZ9000-aUox 和 NZ9000-hUox, 并将转化空载质粒的菌株命名 NZ9000-Mock。

将过夜培养的 NZ9000-aUox 和 NZ9000-hUox 分别按 3% 体积比接种于 5 mL 含氯霉素 (10  $\mu$ g/mL) 的 GM17 培养基中, 30 °C 静置培养至对数生长期加入终浓度 10  $\mu$ g/mL 的 Nisin 诱导剂, 同时各留一组样品不加诱导剂作为对照, 继续 30 °C 静置培养 4 h 后, 12,000 r/min、20 min 离心收集菌体, 超声破碎后分别利用 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色和免疫印迹检测目的基因表达。

### 1.3 工程菌的比活性测定与制备

将过夜培养的 NZ9000-aUox、NZ9000-hUox 和 NZ9000-Mock 按照 3% 体积比接种于 50 mL 含氯霉素 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 GM17 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养至对数生长期后加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Nisin 诱导剂, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 4h。测量  $OD_{600}$  数值后, 分别将 1 OD 的 3 种培养物 12,000 r/min、5 min 离心收集菌体, 再用 4 mL 尿酸 (1 mmol/L) 溶液重悬菌体, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 孵育 16 h, 期间每 4 h 取样 200  $\mu\text{L}$  测定上清中尿酸浓度。参考酶活力单位定义<sup>[18]</sup>, 将工程菌的微生物制剂比活性单位 (probiotics activity unit, PAU) 定义为: 37  $^{\circ}\text{C}$  下, 1 OD ( $OD_{600}$ ) 工程菌每 h 可催化多少  $\mu\text{mol}$  尿酸生成尿囊素。进一步将工程菌 NZ9000-aUox 和 NZ9000-hUox 扩大培养并诱导, 检测活性后分别制备足量的 15 PAU/支的工程菌冻干粉, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用, 使用时用 100  $\mu\text{L}$  的 PBS 充分重悬并进行活性验证。

#### 1.4 工程菌干预小鼠高尿酸血症

雄性昆明小鼠 (18-22 g, 35-42 日龄) 60 只购自北京维通利华有限公司, SPF 条件下饲养于军事医学研究院实验动物中心。将小鼠随机分为 6 组 ( $n=10$ ), 空白对照组小鼠灌胃 PBS 溶液 (100  $\mu\text{L}/\text{d}$ ) 14 天 (对照组), 其他 5 组均连续灌胃给予酵母膏 (20 g/kg/d) 14 天的同时<sup>[19]</sup>, 按照 100  $\mu\text{L}/\text{d}$  的剂量分别灌胃给予 PBS 溶液 (HUA 组)、NZ9000-aUox 工程菌悬液 (15 PAU,  $10^{10}$  cfu, HUA + aUox 组)、NZ9000-hUox 工程菌悬液 (15 PAU,  $10^{10}$  cfu, HUA + hUox 组)、NZ9000-Mock 对照菌悬液 ( $10^{10}$  cfu, HUA + Mock 组) 以及别嘌呤 (20 mg/kg, HUA + Apo 组)<sup>[20]</sup>。在灌胃的第 0、7 和 14 天分别对各组小鼠进行尾静脉取血, 收集血清。血清样品稀释 5 倍后通过生化分析仪测定各组小鼠的血尿酸水平。所有动物实验经军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准 (IACUC-DWZX-2023-007, 21 March 2023)。

#### 1.5 肝肾功能测定

将 1.4 中 Control 组、HUA 组、HUA + aUox 组、HUA + Apo 组实验小鼠脱颈处死, 解剖取出小鼠肝脏和肾脏, 用 4% 多聚甲醛浸泡 24 h。组织经固定、石蜡包埋、切片后进行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin staining, H&E) 染色; 切片进行扫描成像。小鼠血清使用生化分析仪检测 ALT、AST、TBIL、DBIL、Crea、Urea、Cys-C 和  $\beta 2\text{-MG}$  的水平。

#### 1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。采用 ANOVA 方差分析比较多组之间的差异; 采用 Student's *t* 检验比较两组之间的差异, 当  $P < 0.05$  认为具有显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 NZ9000 工程菌外源尿酸氧化酶的诱导表达检测

我们首先检测工程菌表达外源尿酸氧化酶的情况。SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色结果显示, 诱导后的工程菌 NZ9000-aUox 和 NZ9000-hUox 均产生与预期大小相一致的目的蛋白条带 (理论分子量分别为 34.2 kDa 和 36 kDa) (图 1A)。进一步使用抗 His 标签多克隆抗体对诱导前后的工程菌全菌蛋白进行免疫印迹实验, 结果显示经 Nisin 诱导的工程菌样品中可见特异性条带, 证明优化合成的 2

种外源尿酸氧化酶基因经诱导后均可在 NZ9000 工程菌中正确表达 (图 1B,C)。

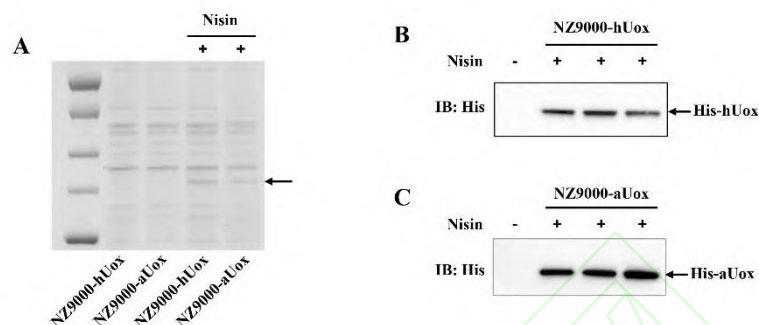


图 1 外源尿酸氧化酶在 NZ9000 中表达

Figure 1 Expression of exogenous Uox in *Lactococcus lactis* NZ9000.

A: Determination of Uox expression by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining. Determination of hUox (B) and aUox (C) expression by western blotting assay with anti-His tag antibody.

## 2.2 工程菌体外降尿酸活性评价

对工程菌体外降尿酸活性进行检测发现 NZ9000-hUox 在 16 h 内可将溶液中尿酸浓度降至 $(380.0 \pm 28.2)\mu\text{mol/L}$ , 尿酸水平降低 62.0%; 而 NZ9000-aUox 在 16 h 内可将尿酸降至 $(36.7 \pm 11.6)\mu\text{mol/L}$ , 尿酸水平降低 96.3% (图 2)。利用该数据进行计算, NZ9000-hUox 比活性约为 38.75 PAU, NZ9000-aUox 比活性约为 60.25 PAU, 表明以乳酸乳球菌作为底盘表达外源尿酸氧化酶具备体外降尿酸活性, 可以用于进一步的体内评价研究。

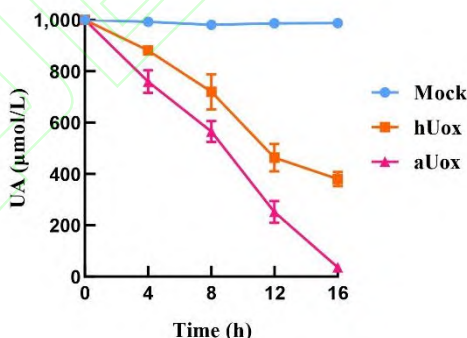


图 2 工程菌体外降尿酸效果

Figure 2 The UA-lowering activity of the engineered strains *in vitro*.

UA solution samples were taken at an interval of 4 hand the concentration of UA was determined.

## 2.3 工程菌体内降尿酸效果评价

利用小鼠高尿酸血症模型评价工程菌体内降尿酸效果, 结果表明, 对照组小鼠血尿酸水平没有显著变化。相比之下, 造模第 7 天和 14 天, HUA 组小鼠血尿酸水平分别上升至 $(190.0 \pm 33.2)\mu\text{mol/L}$  和  $(217.5 \pm 28.2)\mu\text{mol/L}$  (表 1, 图 3), 较初始均值上升 85.4% 和 106.2%, 说明酵母膏连续灌胃法成功诱导了小鼠高尿酸血症。进一步对药物干预组小鼠血尿酸水平进行检测分析, 发现与对照组 (Control

组)相比,服用 NZ9000-Mock 菌(Mock 组)小鼠血尿酸水平在第 7 和第 14 天上升幅度为 77.1%和 101.4%,与 HUA 组小鼠相当;相比之下,aUox 干预组血尿酸水平升高均值分别为 39.5%和 48.3%,hUox 干预组血尿酸水平升高均值分别为 57.0%和 82.9%(表 1,图 3)。以上结果表明,NZ9000 底盘本身不具有降尿酸能力,过表达 2 种外源尿酸氧化酶的 NZ9000 工程菌都能够抑制造模引起的小鼠血尿酸升高,其中 NZ9000-aUox 效果更加明显。

表 1 实验各组尿酸值( $\mu\text{mol/L}$ )

	Control	HUA	HUA+Mock	HUA+aUox	HUA+hUox	HUA+Apo
0 day	96.5 $\pm$ 22.1	98.5 $\pm$ 18.4	96.5 $\pm$ 19.0	98.5 $\pm$ 20.7	92.5 $\pm$ 22.3	98.5 $\pm$ 20.1
7 day	102.5 $\pm$ 14.2	190.0 $\pm$ 33.2	181.5 $\pm$ 28.0	143.0 $\pm$ 20.1	161.0 $\pm$ 24.7	111.0 $\pm$ 13.7
14 day	105.5 $\pm$ 22.8	217.5 $\pm$ 28.2	212.5 $\pm$ 29.7	156.5 $\pm$ 22.1	193.0 $\pm$ 37.1	99.5 $\pm$ 16.4

此外,别嘌醇干预组(HUA+Apo)血尿酸水平在第 7 天和第 14 天的尿酸水平分别为(111.0  $\pm$  13.7)  $\mu\text{mol/L}$  和(99.5  $\pm$  16.4)  $\mu\text{mol/L}$  (表 1,图 3),与对照组小鼠相当,表明其降尿酸效果优于 2 组工程菌。

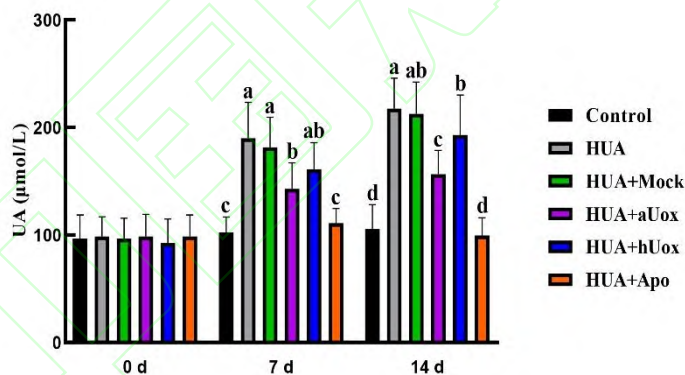


图 3 工程菌体内降尿酸效果

Figure 3 The UA-lowering activity of the engineered strain *in vivo*. Serum samples were collected from day 0, day 7 and day 14, and the UA levels were determined. Different letter represents a significant statistical difference:  $P < 0.05$ . Same letter represents non-significant between two groups.

## 2.4 工程菌与别嘌醇对小鼠肝肾功能的影响

以别嘌醇为对照药物,对 NZ9000-aUox 工程菌对肝肾组织的安全性进行评价。小鼠肝脏组织病理学分析表明各实验组均未出现肝脏组织异常(数据未给出);肝功能生化指标显示各组与对照均无统计学差异(图 4A-D);说明工程菌和别嘌醇给药不会对小鼠造成肝损伤。

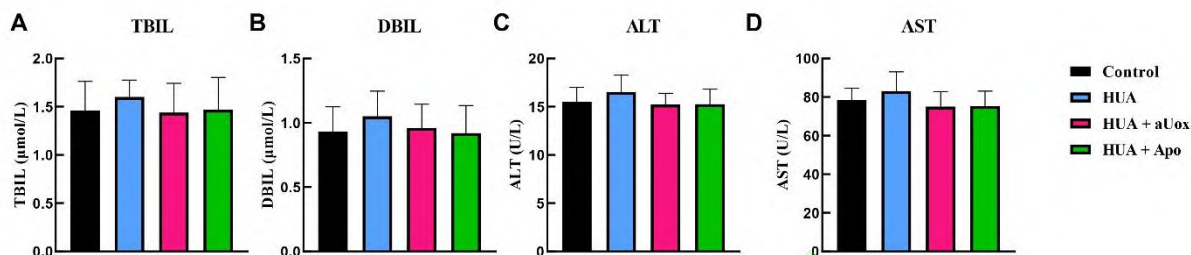


图4 工程菌对小鼠肝功能的影响

Figure 4 Effects of engineered strain on mouse liver function.

Serum levels of TBIL (A), DBIL (B), ALT (C) and AST (D) were determined at day 14.

肾脏组织病理学分析结果表明,工程菌组(HUA+aUox)与对照组小鼠肾小管、肾小球结构清楚,无明显病理性改变(图5A,C)。HUA组小鼠出现轻微的肾损伤,部分肾小管上皮细胞水肿、细胞肿胀、胞浆淡染,细胞内可见不规则空泡,但未见炎症、坏死、出血(图5B)。别嘌醇组(HUA+Apo)小鼠肾组织表现出较为明显的病理性改变,包括炎症细胞浸润(蓝色箭头)、上皮细胞坏死(红色箭头)和出血(绿色箭头)(图5D)。肾功能生化指标检测结果表明,工程菌组各项指标正常(图6A-D),而别嘌醇组Urea和Crea两项指标与对照组相比都出现显著升高,表明别嘌醇给药加重了肾功能紊乱(图6B,C),符合病理切片结果(图5D)。研究证明,长期服用别嘌醇可能导致别嘌醇代谢产物羟嘌呤醇在肾脏积蓄<sup>[21]</sup>,增加肾脏代谢负荷,进一步加重肾脏损伤<sup>[22]</sup>。以上结果说明,工程菌NZ9000-aUox肾脏安全性优于别嘌醇。

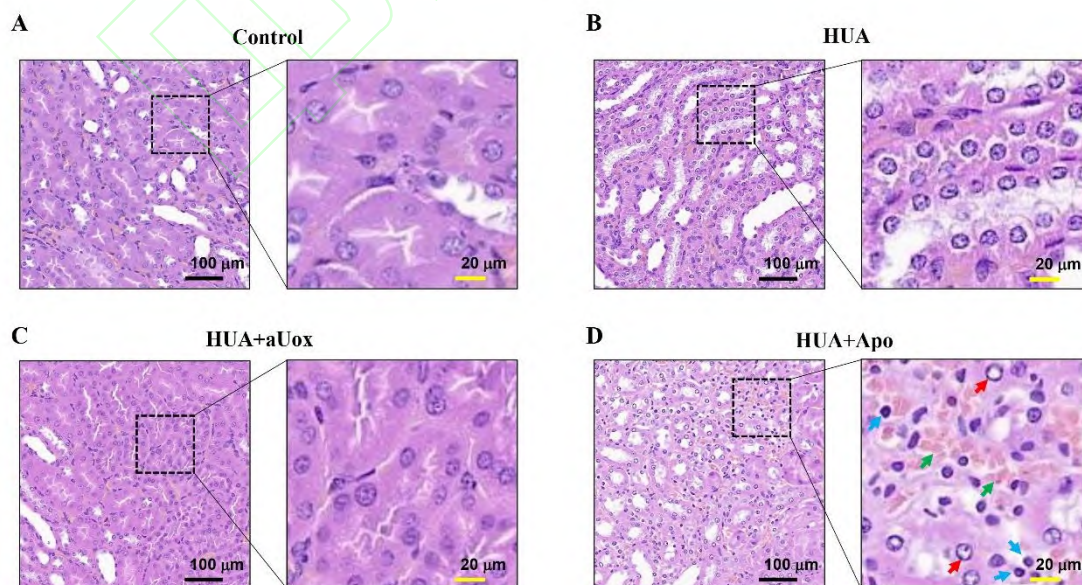


图5 小鼠肾脏病理切片 H&E 染色分析



Figure 5 H&E staining analysis for mouse kidney sections.

Mice kidney histology of Control (A), HUA (B), NZ9000-aUox (C) and allopurinol (D) was analyzed. Blue arrow represents immune cell infiltration; red arrow represents necrosis of renal cell; green arrow represents hemorrhage. Black bar indicates 100  $\mu\text{m}$ ; yellow bar indicates 20  $\mu\text{m}$ .

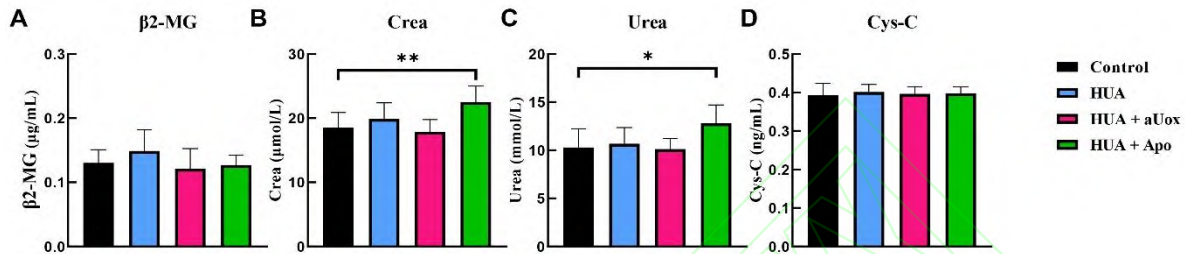


图 6 工程菌对小鼠肾功能的影响

Figure 6 Effects of engineered strain on mouse kidney function.

Serum levels of  $\beta 2$ -MG (A), Crea (B), Urea (C) and Cys-C (D) were determined at day 14. \*:  $P < 0.05$ . \*\*:  $P < 0.01$ .

### 3 讨论与结论

高尿酸血症可以导致痛风, 并与慢性肾脏疾病和心血管疾病的进展密切相关。纠正长期血液高尿酸水平对人类健康至关重要<sup>[23]</sup>。但现有的降尿酸药物存在超敏反应和免疫排斥等副作用, 极大限制了其应用<sup>[24-25]</sup>。本研究利用乳酸乳球菌作为宿主菌表达外源尿酸氧化酶, 通过口服方式给药, 避免尿酸氧化酶进入血液引发免疫反应, 同时通过肠道途径发挥降尿酸效果<sup>[26]</sup>。

本研究构建的表达外源尿酸氧化酶的乳酸乳球菌 NZ9000 工程菌株在高尿酸小鼠模型中体现了显著和稳定的降尿酸效果: 与口服对照菌株的造模组小鼠尿酸升高幅度相比, 口服 NZ9000-aUox 工程菌株小鼠在给药第 7 和 14 天尿酸升高幅度分别下降 48.7% 和 52.4%。在安全性方面, NZ9000 是 FDA 批准的食品级益生菌, 在相同给药频率下, 工程菌对小鼠肝肾功能均没有影响, 而别嘌醇则加重了小鼠肾功能轻微紊乱和肾脏病理损伤, 说明 NZ9000 工程菌的肾脏安全性优于别嘌醇, 作为替代药物能够避免应用别嘌醇引起的肾损伤加重风险<sup>[27]</sup>, 因此更适合高尿酸血症的长期治疗。

与临床一线用药别嘌醇相比, NZ9000 工程菌株在降尿酸效果上存在一定差距。可能原因是别嘌醇以游离型药物存在, 广泛分布于血液以及肝脏等组织器官中, 持续对黄嘌呤氧化酶产生竞争性抑制作用, 减少尿酸的产生<sup>[28]</sup>; 而乳酸乳球菌 NZ9000 是口服给药, 主要在肠道内发挥作用, 难以对全身血尿酸进行快速调控。然而, 口服给药和安全性优势<sup>[13-14]</sup> (图 4-6) 使工程菌更适合作为血尿酸长期控制药物。后续可以通过优化工程菌用量、延长疗程时间和增加尿酸氧化酶表达水平进一步提升降尿酸效果。

本研究采用乳酸乳球菌表达尿酸氧化酶的方式探索了利用生物底盘治疗高尿酸血症的可行性, 优化了尿酸氧化酶类药物的给药途径和作用部位, 最大程度上避免了尿酸氧化酶类药物引起免疫反应的

可能, 为高尿酸血症患者血尿酸的长期控制提供了一种新的安全有效的方法。

## References

- [1]SU HY, YANG C, LIANG D, LIU HF. Research advances in the mechanisms of hyperuricemia-induced renal injury[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 5817348.
- [2]KANG DH, CHEN W. Uric acid and chronic kidney disease: new understanding of an old problem[J]. *Seminars in Nephrology*, 2011, 31(5): 447-452.
- [3]FATHALLAH-SHAYKH SA, CRAMER MT. Uric acid and the kidney[J]. *Pediatric Nephrology*, 2014, 29(6): 999-1008.
- [4]SUZUKI S, YOSHIHISA A, YOKOKAWA T, KOBAYASHI A, YAMAKI T, KUNII H, NAKAZATO K, TSUDA A, TSUDA T, ISHIBASHI T, KONNO I, YAMAGUCHI O, MACHII H, NOZAKI N, NIIZEKI T, MIYAMOTO T, TAKEISHI Y, INVESTIGATORS MRT. Comparison between febuxostat and allopurinol uric acid-lowering therapy in patients with chronic heart failure and hyperuricemia: a multicenter randomized controlled trial[J]. *The Journal of International Medical Research*, 2021, 49(12): 3000605211062770.
- [5]LIU XJ, WEN MJ, LI J, ZHAI FL, RUAN J, ZHANG LQ, LI ST. High-yield expression, purification, characterization, and structure determination of tag-free *Candida utilis* uricase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(3): 529-537.
- [6]ODA M, SATTA Y, TAKENAKA O, TAKAHATA N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19(5): 640-653.
- [7]YIM BT, SIMS-MCCALLUM RP, CHONG PH. Rasburicase for the treatment and prevention of hyperuricemia[J]. *The Annals of Pharmacotherapy*, 2003, 37(7/8): 1047-1054.
- [8]DAVE AJ, KELLY VM, KRISHNAN E. Pegloticase and the patient with treatment-failure gout[J]. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2012, 5(5): 501-508.
- [9]PUI CH. Rasburicase: a potent uricolytic agent[J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2002, 3(4): 433-442.
- [10]ALLEN KC, CHAMPLAIN AH, COTLIAR JA, BELKNAP SM, WEST DP, MEHTA J, TRIFILIO SM. Risk of anaphylaxis with repeated courses of rasburicase: a research on adverse drug events and reports (RADAR) project[J]. *Drug Safety*, 2015, 38(2): 183-187.
- [11]JIANG N, XU CQ, ZHANG LH, CHEN JH. "Resurrected" human-source urate oxidase with high uricolytic activity and stability[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 149: 109852.
- [12]MA JH, LYU YH, LIU X, JIA X, CUI FY, WU XH, DENG SS, YUE CW. Engineered probiotics[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 72.
- [13]SONG AAL, IN LLA, LIM SHE, RAHIM RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 55.
- [14]KUIPERS OP, de RUYTER PGGA, KLEEREBEZEM M, de VOS WM. *Quorum sensing*-controlled gene expression in lactic acid bacteria[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 64(1): 15-21.
- [15]何影影, 罗学刚, 倪萌, 马德云, 王重喜, 张同存. 瑞替普酶在乳酸乳球菌中的表达[J]. *天津科技大学学报*, 2015, 30(1): 19-24.
- HE YY, LUO XG, NI M, MA DY, WANG CX, ZHANG TC. Expression of reteplase in *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2015, 30(1): 19-24 (in Chinese).
- [16]MA YJ, LIU JJ, HOU J, DONG YK, LU Y, JIN L, CAO RY, LI TM, WU J. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105701.
- [17]FROSSARD CP, STEIDLER L, EIGENMANN PA. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, 119(4): 952-959.
- [18]LIU JG, LI GX, LIU H, ZHOU XK. Purification and properties of uricase from *Candida* sp. and its application in uric acid analysis in serum[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994, 47(1): 57-63.
- [19]DAI HN, LV S, QIAO ZA, WANG KY, ZHOU XP, BAO CY, ZHANG ST, FU XQ, LI WN. The active components of sunflower (*Helianthus annuus* L.) calathide and the effects on urate nephropathy based on COX-2/PGE2 signaling pathway and the urate transporter URAT1, ABCG2, and GLUT9[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 8: 769555.
- [20]CUBILLOS-RUIZ A, ALCANTAR MA, DONGHIA NM, CÁRDENAS P, AVILA-PACHECO J, COLLINS JJ. An engineered live biotherapeutic for the prevention of antibiotic-induced dysbiosis[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6: 910-921.

[21]黄敬群, 王军, 尹中信, 郭瑞峰, 陈健, 梁化印, 刘艺. 槲皮素、别嘌醇对高尿酸血症大鼠血清尿酸水平及肝、肾功能影响的对比研究[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(4): 458-463.

HUANG JQ, WANG J, YIN ZX, GUO RF, CHEN J, LIANG HY, LIU Y. Comparative study of quercetin and allopurinol on serum uric acid levels and function of liver and kidney in hyperuricemic rats[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2015, 46(4): 458-463 (in Chinese).

[22]STAMP LK, CHAPMAN PT, PALMER SC. Allopurinol and kidney function: an update[J]. Joint Bone Spine, 2016, 83(1): 19-24.

[23]HAO Y, LI H, CAO YP, CHEN YW, LEI MY, ZHANG TY, XIAO Y, CHU BY, QIAN ZY. Uricase and horseradish peroxidase hybrid CaHPO<sub>4</sub> nanoflower integrated with transcutaneous patches for treatment of hyperuricemia[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2019, 15(5): 951-965.

[24]STAMP LK, CHAPMAN PT. Allopurinol hypersensitivity: Pathogenesis and prevention[J]. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2020, 34(4): 101501.

[25]STRILCHUK L, FOGACCI F, CICERO AF. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: a critical review[J]. Expert Opinion on Drug Safety, 2019, 18(4): 261-271.

[26]WANG XM, SHERMAN A, LIAO GX, LEONG KW, DANIELL H, TERHORST C, HERZOG RW. Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, 65(6): 759-773.

[27]BORCHERS AT, SELMI C, MEYERS FJ, KEEN CL, GERSHWIN ME. Probiotics and immunity[J]. Journal of Gastroenterology, 2009, 44(1): 26-46.

[28]MURRELL GAC, RAPEPORT WG. Clinical pharmacokinetics of allopurinol[J]. Clinical Pharmacokinetics, 1986, 11(5): 343-353.

.....