

植物乳酸杆菌对小鼠草酸钙结石的干预效果

臧杨, 鲁泽宇, 宋宁, 张文龙, 张乃生, 靳朝*

吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062

臧杨, 鲁泽宇, 宋宁, 张文龙, 张乃生, 靳朝. 植物乳酸杆菌对小鼠草酸钙结石的干预效果[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1799-1810

Zang Yang, Lu Zeyu, Song Ning, Zhang Wenlong, Zhang Naisheng, Jin Zhao. Effect of *Lactobacillus plantarum* on calcium oxalate stone in mice[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1799-1810

摘要:【背景】草酸钙结石是一种临床常见且易复发的疾病, 由于结石质地坚硬, 只能通过外科手术的方法治疗, 给患者带了很大的痛苦。已有研究证实, 肠道菌群可影响草酸钙结石的形成, 降低草酸钙结石的发病率。【目的】探究植物乳杆菌对小鼠草酸钙结石的干预效果。【方法】体外实验: 在 MRS 培养基中加入 0.02 mol/L 草酸钠, 制备菌株筛选培养基(MRS-OX)。接种 200 μ L 的 3.48×10^{12} CFU/L 植物乳杆菌悬液至 MRS-OX 制备含菌培养基(B+MRS-OX)。将等体积 MRS-OX 和 B+MRS-OX 于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 2 d, 测剩余草酸浓度。体内实验: 以 10 周龄雄性昆明小鼠为实验动物, 随机分为对照组、植物乳杆菌组、结石组和植物乳杆菌干预组, 每组 5 只小鼠。通过乙醛酸诱导小鼠建立草酸钙结石模型, 并给予 200 μ L 的 3.48×10^{12} CFU/L 植物乳杆菌进行干预治疗以观察其预防小鼠草酸钙结石的效果。实验结束后, 绘制各组小鼠平均体重变化趋势图并计算小鼠肾脏脏器指数, 检测每只小鼠血液学指标和氧化应激指标总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA), 对肾脏进行病理组织学观察并计算小鼠肾脏结晶评分, 通过以上实验初步探究植物乳杆菌对小鼠草酸钙结石的干预效果。【结果】体外实验表明, 植物乳杆菌在菌株筛选培养基(MRS-OX)中的草酸分解效率为 10%; 体内实验表明, 植物乳杆菌可有效改善小鼠体重下降且降低血肌酐、尿素氮和血草酸水平。通过病理组织学观察发现, 植物乳杆菌干预组小鼠肾脏结晶明显减少, 结晶评分与结石组相比存在极显著差异($P < 0.01$), 并有效缓解因草酸钙结石造成的肾脏氧化应激损伤。【结论】植物乳杆菌可缓解草酸钙结石对肾脏的损伤, 减少肾脏结晶的产生, 有望预防草酸钙结石的发生。

关键词: 草酸钙结石; 小鼠; 植物乳杆菌; 氧化应激

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0501009)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0501009)

*Corresponding author: E-mail: dwyy2008@163.com

Received: 2021-10-29; Accepted: 2022-01-06; Published online: 2022-02-11

Effect of *Lactobacillus plantarum* on calcium oxalate stone in mice

ZANG Yang, LU Zeyu, SONG Ning, ZHANG Wenlong, ZHANG Naisheng, JIN Zhao*

College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] For calcium oxalate stone, a common clinical disease with high recurrence rate, surgery is the only solution due to the hardness of the stones, from which, however, patients suffer a lot. It has been verified that intestinal flora affects the formation of calcium oxalate stones and thus reduces the incidence. [Objective] To investigate the effect of *Lactobacillus plantarum* (BNCC 194165) on calcium oxalate stones in mice. [Methods] For *in vitro* experiment, a total of 0.02 mol/L sodium oxalate was added to the MRS broth to prepare the screening medium (MRS-OX) and then 200 μ L 3.48×10^{12} CFU/L *L. plantarum* suspension was inoculated into the MRS-OX to yield the bacteria-containing medium (B+MRS-OX). MRS-OX and B+MRS-OX at equivalent volume were cultured at 37 °C for 2 days and the concentration of residual oxalic acid was measured by the oxalic acid kit. As for the *in vivo* experiment, 10-week-old male Kunming mice were randomized into the control (C) group, *L. plantarum* group (B), glyoxylic acid (GA) group, and *L. plantarum*+glyoxylic acid (B+GA) group, with 5 in each group. Glyoxylic acid was used to induce calcium oxalate stone in mice. A total of 200 μ L 3.48×10^{12} CFU/L *L. plantarum* suspension was given to the model mice and then the effect on calcium oxalate stones was observed. After the experiment, the variation of body weight in each group was plotted and kidney index was calculated. Then we detected the haematological indexes (creatinine, blood urea nitrogen, blood concentration of oxalic acid) and oxidative stress indexes of total superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Moreover, the pathological sections of kidney were observed and renal crystallization score was calculated. Through the above experiments, the effect of *L. plantarum* on calcium oxalate stone formation in mice was preliminarily explored. [Results] In the *in vitro* experiment, the oxalic acid-decomposing efficiency of *L. plantarum* in MRS-OX was 10%. In the *in vivo* experiment, *L. plantarum* significantly inhibited the weight loss of mice and reduced the levels of plasma creatinine, urea nitrogen, and oxalic acid. Pathological observation showed that the renal crystals of B+GA group were significantly reduced and the crystallization score was different from that of the GA group ($P < 0.01$). Moreover, the oxidative stress damage of kidney caused by calcium oxalate stones was alleviated in the B+GA group. [Conclusion] *L. plantarum* can relieve the damage of calcium oxalate stones to kidney and reduce the generation of kidney crystals, which can be used for preventing the formation of calcium oxalate stones.

Keywords: calcium oxalate stone; mouse; *Lactobacillus plantarum*; oxidative stress

尿石症是临床常见且复杂的泌尿道疾病, 存在很高的发病率和复发率。临床表现为严重的腰腹疼痛、呕吐、排尿困难和血尿等^[1-3]。按照结石成分分类, 主要包括磷酸铵镁、草酸盐、

胱氨酸和尿酸盐^[4]。其中草酸钙结石的发病率最高, 约占结石发病总数的 80%^[5]。草酸钙结石的治疗方式主要通过腹腔镜等其他外科手术方法^[6], 但术后仍会出现急性肾损伤、肾功能

降低和结石复发等现象^[7], 给患者造成身体和经济的双重压力^[8-9]。因此, 我们迫切需要寻找一种有效预防草酸钙结石的方法。

草酸的产生主要来自内源性肝脏代谢和摄入高草酸食物^[10-11], 由于人体缺乏分解草酸的酶, 因此, 其代谢途径主要包括消化道和肾脏排泄^[12]。此外, 草酸盐作为一种有毒性的物质, 经肾脏排泄可导致肾毒性, 诱发肾小管炎症, 促进结晶的沉积, 加速结石的形成^[13-16]。草酸钙结石的发病原因多样, 草酸和钙离子的排泄、尿量及结晶抑制剂等因素的改变可导致草酸钙结石的发生^[17]。目前预防草酸钙结石的方法主要基于降低血液和尿液中草酸浓度, 减少草酸钙晶体在肾脏的沉积, 避免草酸钙晶体对肾组织造成氧化应激损伤^[13-14]。有研究表明, 肠道菌群在维持体内草酸盐平衡过程中发挥着重要的作用^[18]。乳酸菌作为一种肠道优势益生菌, 可在肠道内大量定殖。Klimesova 等通过小鼠模型证实, 乳酸双歧杆菌作为一种乳酸菌, 可定殖在肠道中并降解肠道草酸, 从而降低草酸钙结石的发病率^[19]; 其他研究证实口服高浓度乳酸菌可减少尿草酸浓度^[3]。植物乳杆菌作为一种乳酸菌, 对维持肠道内菌群平衡、促进营养吸收、缓解乳糖不耐症和抑制肿瘤细胞的形成等方面有着广泛的应用^[20], 然而关于植物乳杆菌对小鼠草酸钙结石的预防作用尚无明确信息。本实验通过乙醛酸诱导建立小鼠草酸钙结石模型, 并给予植物乳杆菌生长对数期菌液最大浓度 3.48×10^{12} CFU/L, 初步探究植物乳杆菌对小鼠草酸钙结石的预防作用, 以期成为预防草酸钙结石的新型药物。

1 材料与方法

1.1 材料

植物乳杆菌(BNCC 194165), 北京北纳创联

生物技术研究院。MRS 培养基, 青岛海博生物技术有限公司。革兰氏染色液试剂盒和草酸含量检测试剂盒, 北京索莱宝技术有限公司; 肌酐(creatinine, CRE)测定试剂盒、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所。高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 光学显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; 酶标仪, 赛默飞世尔有限公司; 研磨仪, 上海测博生物技术有限公司。

1.2 菌液制备

挑取植物乳杆菌(BNCC 194165)单菌落接种到 MRS 肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温厌氧培养 7 h, 涂板计数得植物乳杆菌悬浊液浓度为 3.48×10^{12} CFU/L。植物乳杆菌悬浊液 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min, 弃上清, 并加入等量生理盐水, 制成植物乳杆菌悬液用于灌胃。

1.3 体外草酸分解实验

在 MRS 培养基中加入草酸钠, 制备草酸钠浓度为 $0.02\ \text{mol}/\text{L}$ 的菌株筛选培养基(MRS-OX)。分别在 6 支 10 mL 离心管中加入 8 mL 的 MRS-OX 培养基, 并随机挑选 3 支离心管接种 $200\ \mu\text{L}$ 的 3.48×10^{12} CFU/L 植物乳杆菌悬浊液制成含菌培养基(B+MRS-OX), 其余 3 支加入 $200\ \mu\text{L}$ 生理盐水。将 MRS-OX 和 B+MRS-OX 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧恒温培养 2 d, 按照草酸根检测试剂盒说明书做 3 次独立重复实验检测剩余草酸浓度。

1.4 动物实验

1.4.1 实验动物饲养

10 周龄雄性 SPF 级昆明小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司。单只小鼠体重不超出所有小鼠整体平均体重的 20%。在实验条件为温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\% \pm 5\%$ 、光照 12 h 循环、饲料饮水不限的环境下适应性饲养 7 d。

1.4.2 实验动物分组与实验流程

实验流程及动物分组如图 1 所示, 本实验周期为 28 d, 将 20 只雄性昆明小鼠随机分为 4 组, 即对照组(C)、植物乳杆菌组(B)、结石组(GA)和植物乳杆菌干预组(B+GA), 每组 5 只小鼠。乙醛酸通过生理盐水进行溶解, 用于诱导建立小鼠草酸钙结石模型。实验期间, 每天上午对所有组别进行实验操作。对照组(C)每天灌服 200 μ L 生理盐水, 第 8 天开始每日增加腹腔注射 400 μ L 生理盐水直至实验结束; 植物乳杆菌组(B)灌服 200 μ L 的 3.48×10^{12} CFU/L 植物乳杆菌(BNCC 194165)直至实验结束; 结石组(GA)第 8 天开始每日腹腔注射 400 μ L 的 80 mg/kg 乙醛酸水溶液直至实验结束; 植物乳杆菌干预组(B+GA)每日灌服 200 μ L 的 3.48×10^{12} CFU/L 植物乳杆菌(BNCC 194165), 第 8 天开始每日增加腹腔注射 400 μ L 的 80 mg/kg 乙醛酸水溶液直至实验结束。

1.5 小鼠平均体重变化

每天固定时间记录各组小鼠平均体重, 实验结束后绘制小鼠平均体重变化趋势图, 评估

口服植物乳杆菌和腹腔注射乙醛酸对小鼠体重的影响。

1.6 小鼠血液学检测

实验结束后于下颌静脉采集小鼠血液至 EDTA 抗凝管中, 3 000 r/min 离心 10 min 后取小鼠血浆, 分别使用试剂盒检测肌酐、尿素氮含量和血草酸浓度。

1.7 小鼠肾脏病理组织学

1.7.1 小鼠肾脏脏器指数计算

小鼠血液样本采集完成后, 使用乌拉坦对小鼠进行麻醉, 并对其采取颈椎脱臼法处死。沿小鼠腹部纵向切开, 取出小鼠两侧肾脏进行称重。肾脏脏器指数一定程度上可以反映小鼠肾脏及整体情况。本实验中, 根据公式: 脏器指数(%)=(双肾鲜重/小鼠活体重) \times 100, 计算出每只小鼠的肾脏脏器指数。

1.7.2 小鼠肾脏病理切片观察

将小鼠右侧肾脏放入 10%的福尔马林溶液中固定 24 h, 而后将组织放入 70%、80%、95%和 100%酒精溶液中进行梯度脱水。透明、透蜡后浸石蜡包埋制备组织蜡块。以 3 μ m 厚度切片、

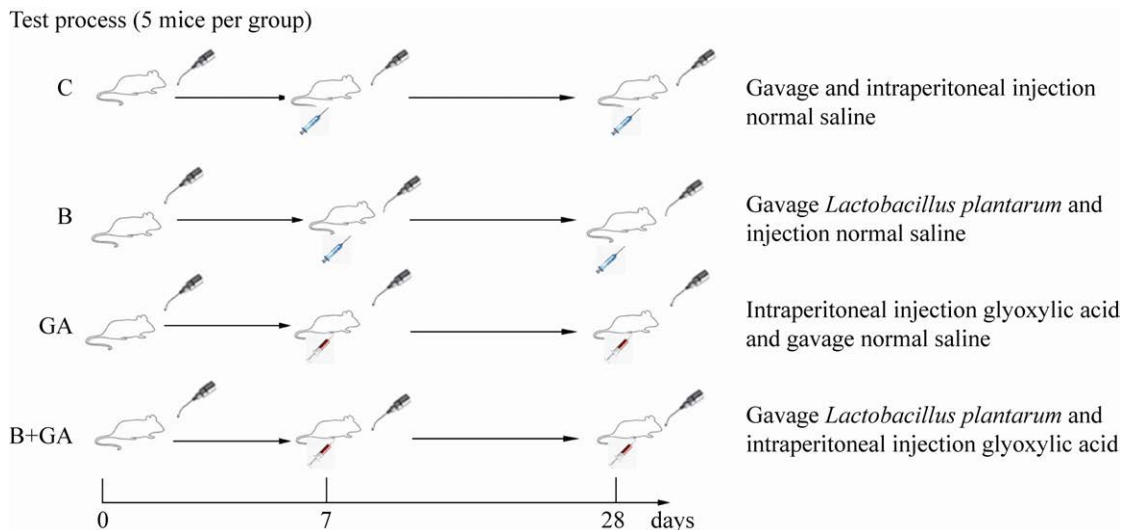


图 1 小鼠体内实验流程图

Figure 1 *In vivo* experiment procedures in mice.

贴片脱蜡后进行 HE 染色, 封片后的切片使用光学显微镜进行观察。

1.7.3 小鼠肾脏草酸钙结晶评分

根据 Tsai 等描述的方法^[21], 将小鼠肾脏病理切片按矢状面用 4 条线分为 8 个区域, 每个区域根据晶体沉淀程度不同, 分别给予 0-3 评分: 0: 无草酸钙结晶; 1: 草酸钙结晶少量出现在组织中; 2: 草酸钙结晶填充部分肾组织; 3: 大量草酸钙结晶填充肾组织。

1.8 小鼠肾脏总超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量检测

将小鼠肾脏组织剪碎, 加入无菌生理盐水用研磨仪将肾脏组织制成 10%的组织匀浆, 取一半肾脏组织匀浆 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液为 SOD 检测样本。将组织上清液和组织匀浆分别按照 SOD 检测试剂盒和 MDA 检测试剂盒操作说明书方法测得吸光度, 根据组织中 SOD 和 MDA 含量公式计算小鼠肾脏组织 SOD 活性和 MDA 含量。

SOD 活力计算公式:

(1) SOD 抑制率(%)=

$$\frac{(OD_{450\text{对照}} - OD_{450\text{对照空白}}) - (OD_{450\text{测定}} - OD_{450\text{测定空白}})}{(A_{450\text{对照}} - A_{450\text{对照空白}})};$$

(2) SOD 活力(U/mg-蛋白)=

$$\frac{\text{SOD抑制率} \times 12}{50\% \times \text{肾脏组织蛋白浓度}(\text{mg-蛋白/mL})}。$$

MDA 含量计算公式:

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/mg-蛋白}) = \frac{10 (OD_{532\text{测定}} - OD_{532\text{对照}})}{(OD_{532\text{标准}} - OD_{532\text{空白}}) \times \text{肾脏蛋白浓度}(\text{mg-蛋白/mL})}$$

1.9 统计分析

实验数据使用 SPSS 19 软件进行统计分析, 组间差异通过单因素方差分析和 Tukey 多重比较进行分析。使用 GraphPad 6.0 软件和 Adobe Photoshop 作图。

2 结果与分析

2.1 细菌体外分解草酸效率

将培养基放入 37 °C 恒温培养箱中培养 2 d 测得菌株筛选培养基(MRS-OX)和接种植物乳杆菌的培养基(B+MRS-OX)中的平均草酸根浓度分别为 0.020 μmol/L 和 0.018 μmol/L, 分解效率约为 10%, 组间差异显著($P < 0.05$, 图 2), 说明植物乳杆菌(BNCC 194165)在体外有分解草酸的能力。

2.2 小鼠平均体重的变化

实验结束后, 对照组(C)、植物乳杆菌组(B)和植物乳杆菌干预组(B+GA)组小鼠精神状态良好、背毛整洁, 而结石组(GA)小鼠精神萎靡、腹围增大、背毛凌乱。各组小鼠体重观察结果如图 3 所示。对照组(C)小鼠与植物乳杆菌组(B)小鼠平均体重呈平稳上升趋势, 说明植物乳杆菌实验所用剂量对小鼠无明显副作用。与结石组(GA)相比, 植物乳杆菌干预组(B+GA)体重明显大于结石组, 存在极显著差异($P < 0.01$)。实验

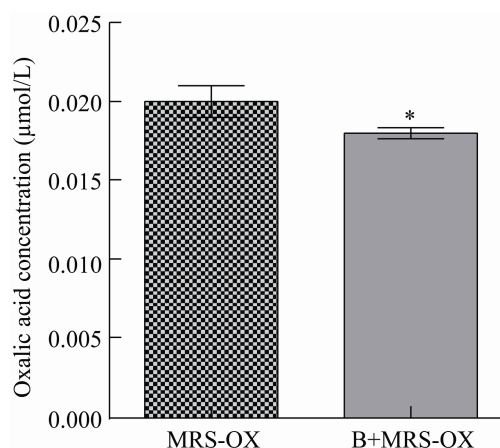


图 2 植物乳杆菌对菌株鉴别培养基中的草酸浓度影响

Figure 2 The effect of *Lactobacillus plantarum* on the concentration of oxalic acid in the culture medium for strain identification. *: $P < 0.05$.

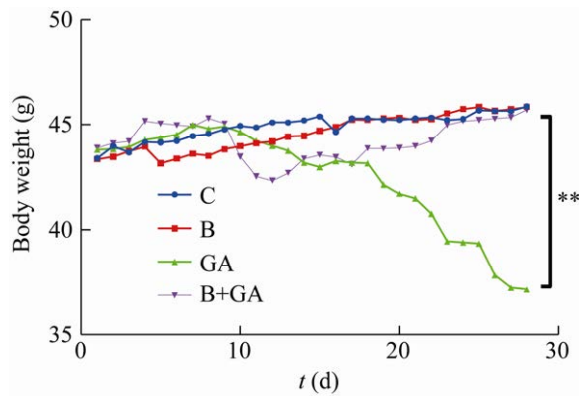


图3 植物乳杆菌对小鼠平均体重变化的影响
Figure 3 The effect of *Lactobacillus plantarum* on the average body weight of mice. **: $P < 0.01$.

结束后, 4组小鼠的平均体重依次为(45.86±0.17)、(45.59±0.28)、(37.15±0.17)和(45.69±0.39) g。结合已有研究表明, 腹腔注射乙醛酸会导致肠黏膜受到损伤, 引发小鼠发生肠炎, 进而影响小鼠食欲, 导致体重降低^[22]。因此我们认为, 本实验中腹腔注射乙醛酸可导致结石组(GA)和植物乳杆菌干预组(B+GA)小鼠肠黏膜受到刺激, 引起小鼠采食量的下降; 在植物乳杆菌的干预下, 植物乳杆菌干预组(B+GA)小鼠后期采食量基本恢复正常且体重逐渐上升, 说明灌服植物乳杆菌(BNCC 194165)可改善乙醛酸对小鼠肠黏膜的刺激, 缓解小鼠体重下降的趋势。

2.3 小鼠血肌酐、尿素氮和血草酸含量

血肌酐和尿素氮是判断肾脏功能是否正常的重要指标, 结果如图4所示。与结石组(GA)相比, 植物乳杆菌干预组(B+GA)血肌酐(图4A)和尿素氮(图4B)含量显著降低, 存在极显著差异($P < 0.01$)。图4C为小鼠血草酸浓度, 与结石组(GA)比较, 植物乳杆菌干预组(B+GA)血草酸浓度降低, 存在显著差异($P < 0.05$)。小鼠血液指标提示植物乳杆菌(BNCC 194165)可有效改善因腹腔注射乙醛酸导致的肾脏功能损伤, 同时

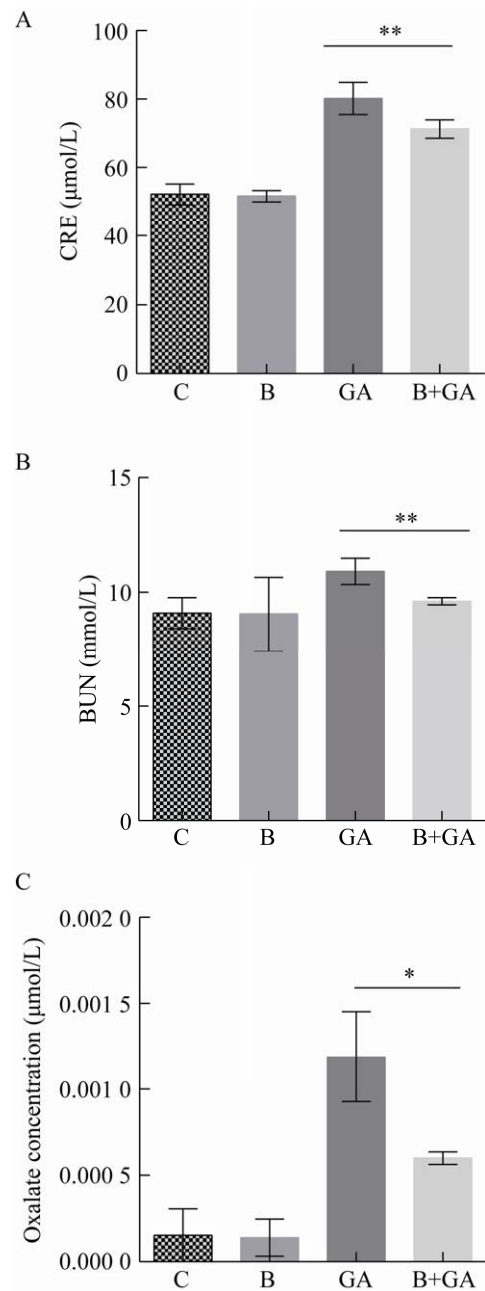


图4 植物乳杆菌对小鼠血肌酐、尿素氮和血草酸浓度的影响 A: 小鼠血肌酐浓度; B: 小鼠血尿素氮浓度; C: 小鼠血草酸浓度

Figure 4 Effects of *Lactobacillus plantarum* on serum creatinine, urea nitrogen and oxalic acid concentrations in mice. A: Serum creatinine concentration in mice; B: Blood urea nitrogen concentration of mice; C: Blood oxalic acid concentration in mice. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

降低血草酸浓度, 减少肾草酸排泄量, 防止草酸钙结石。

2.4 小鼠肾脏病理组织学结果

2.4.1 小鼠肾脏脏器指数

根据 1.7.1 所述计算每只小鼠的肾脏脏器指数, 结果如图 5 所示。结石组(GA)与植物乳酸杆菌干预组(B+GA)小鼠肾脏脏器指数无差异。结果证明植物乳酸杆菌(BNCC 194165)对脏器指数无显著影响。

2.4.2 小鼠肾脏病理切片观察结果

小鼠肾脏病理组织观察如图 6 所示, 对照组(C)与植物乳酸杆菌组(B)小鼠肾脏组织形态正常, 肾髓质区和皮质区均未见有草酸钙结晶沉积; 肾皮质和髓质分解较为清晰, 未见有炎性

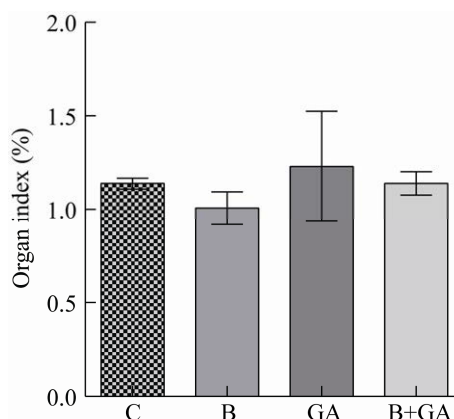


图 5 植物乳酸杆菌对草酸钙结石小鼠肾脏脏器指数的影响

Figure 5 The effect of *Lactobacillus plantarum* on renal organ index in mice with calcium oxalate calculus.

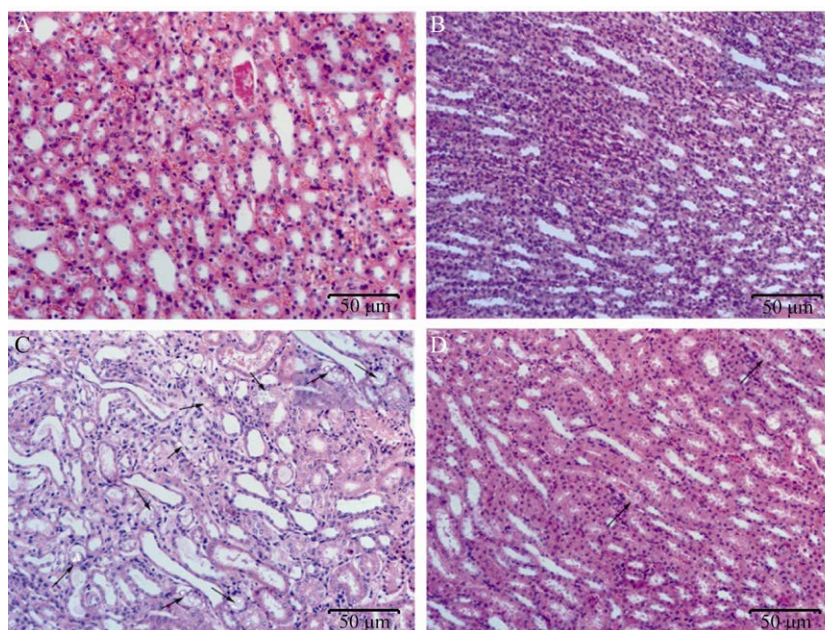


图 6 植物乳酸杆菌对小鼠肾脏形成草酸钙结晶的影响(HE 染色, 200×) A: 对照组(C)小鼠肾脏病理组织切片; B: 植物乳酸杆菌组(B)小鼠肾脏病理组织切片; C: 结石组(GA)小鼠肾脏病理组织切片; D: 植物乳酸杆菌干预组(B+GA)小鼠肾脏病理组织切片。→: 结晶沉积

Figure 6 The effect of *Lactobacillus plantarum* on calcium oxalate crystal formation in mouse kidney (HE staining, 200×). A: Histopathological sections of the kidneys of mice in the control group (C); B: *Lactobacillus plantarum* group (B) mice kidney pathological tissue section; C: Histopathological sections of the kidneys of the mice in the stone group (GA); D: Histopathological sections of the kidneys of mice in the *Lactobacillus plantarum* intervention group (B+GA). →: Crystal deposition.

渗出。结石组(GA)小鼠肾髓质和皮质内有大量不着色、带折光性的透明结晶沉积,标志着小鼠草酸钙结石模型建模成功。植物乳杆菌干预组(B+GA)小鼠的肾髓质、皮质内结晶数量减少,说明灌服植物乳杆菌(BNCC 194165)可有效减少肾脏草酸钙结晶的形成。

2.4.3 小鼠肾脏草酸钙结晶评分

根据 1.7.3 所述方法得到各组小鼠肾脏草酸钙结晶评分,结果如图 7 所示,对照组和植物乳杆菌组(B)小鼠肾脏无结晶。结石组(GA)肾脏结晶评分为 3.00 ± 0.31 ,植物乳杆菌干预组(B+GA)结晶评分为 1.50 ± 0.24 ,存在极显著差异($P < 0.01$)。

2.5 小鼠肾组织 SOD 和 MDA 指标变化

图 8A 为各组小鼠肾脏组织中 SOD 活性,与结石组(GA)相比,植物乳杆菌干预组(B+GA)小鼠的肾组织 SOD 活性升高,存在差异($P < 0.05$)。图 8B 为对照组(C)、植物乳杆菌组(B)、结石组(GA)和植物乳杆菌干预组(B+GA)的 MDA 水平。与结石组(GA)相比,植物乳杆菌干

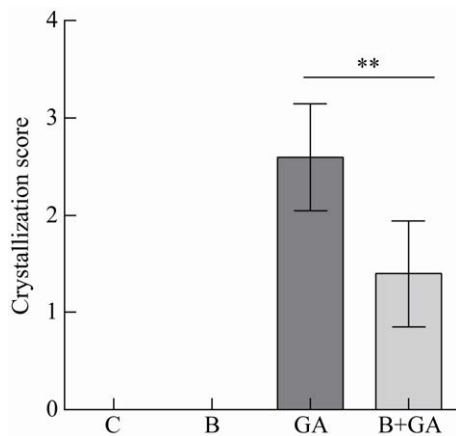


图 7 植物乳杆菌对草酸钙结石小鼠肾脏结晶评分的影响

Figure 7 The effect of *Lactobacillus plantarum* on renal crystal score of calcium oxalate calculus mice. **: $P < 0.01$.

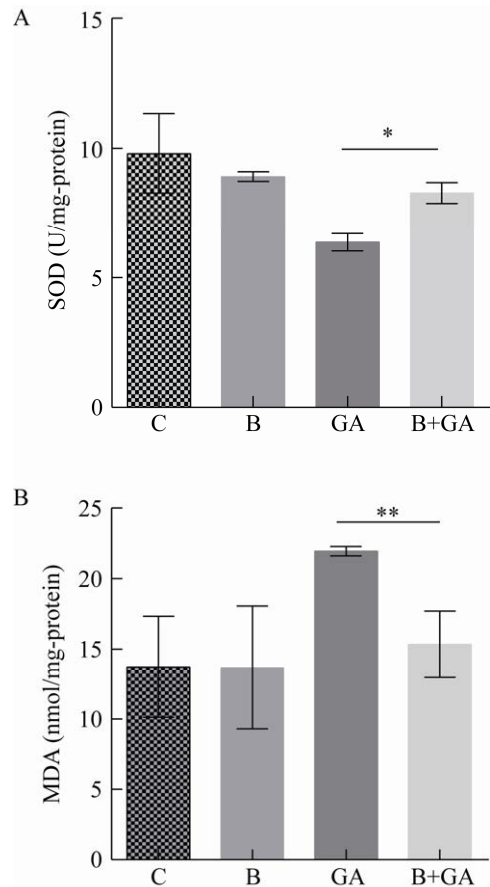


图 8 植物乳杆菌对草酸钙结石小鼠肾脏氧化应激水平的影响 A: 小鼠肾脏 SOD 活性; B: 小鼠肾脏 MDA 水平

Figure 8 The effect of *Lactobacillus plantarum* on the level of oxidative stress in the kidneys of mice with calcium oxalate calculus. A: Kidney SOD activity of mouse; B: MDA level in mouse kidney. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

预组(B+GA)小鼠 MDA 水平显著下降,差异极显著($P < 0.01$)。结果均提示植物乳杆菌(BNCC 194165)可缓解草酸钙结石引起的小鼠肾脏氧化应激损伤。

3 讨论与结论

草酸钙(CaOx)结石是尿路结石中最常见的结石类型^[23],游离的草酸根离子常与钙离子结

合形成草酸钙结晶, 草酸钙结晶常诱发近端肾小管发生氧化应激损伤, 进一步促进草酸钙结晶沉积形成结石, 严重影响肾脏功能, 甚至死亡^[24]。体内草酸盐主要通过肾脏和消化道代谢排出体外, 因此肠道菌群在草酸盐排泄过程中发挥着重要的作用^[18]。随着人们对植物乳杆菌的不断研究发现, 植物乳杆菌可调节肉鸡免疫力, 促进肉鸡生长发育^[25]; 还可以缓解硫酸葡聚糖钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导小鼠结肠氧化应激损伤, 早期干预可缓解溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)^[26]。然而对于植物乳杆菌影响肾草酸钙成石效果的研究尚未有报道, 因此本实验探讨植物乳杆菌对小鼠草酸钙结石成石的干预影响。

体外实验结果显示, 植物乳杆菌(BNCC 194165)的草酸分解效率约为 10%, 我们通过体外实验初步验证了植物乳杆菌(BNCC 194165)在体外可以分解草酸, 进而建立小鼠草酸钙结石模型, 探究植物乳杆菌(BNCC 194165)在小鼠草酸钙结石形成过程中的干预效果。体内实验结果显示, 结石组(GA)体重出现明显下降; 血肌酐和尿素氮是反映肾脏功能是否正常的重要指标, 结石组(GA)血肌酐、尿素氮水平明显升高, 提示肾脏功能严重受损。血草酸浓度的升高可诱发草酸钙结石的形成, 结石组(GA)血草酸浓度明显升高; 并且通过肾脏组织病理学观察发现结石组(GA)肾组织内出现大量结晶并伴有不同程度的肾组织损伤, 炎性渗出; SOD 是人体内存在的一种抗氧化酶, 其可以诱导超氧化物阴离子对细胞内的氧化应激损伤起到抑制作用^[27]。MDA 是氧化应激反应后产生的代谢产物, 其含量越高说明机体的氧化应激程度越严重^[28]。因此, 我们通过检测结石组(GA)

肾组织 SOD 活性和 MDA 水平发现, 草酸钙结晶引起肾脏发生严重的氧化应激反应。结石组(GA)的结果说明, 我们成功地建立了小鼠草酸钙结石模型, 同时也提示草酸钙结石对小鼠肾脏造成严重的损伤。植物乳杆菌干预组(B+GA)结果提示, 通过给予小鼠植物乳杆菌(BNCC 194165), 小鼠的体重与结石组比较有明显的改善($P<0.01$); 血肌酐、尿素氮和血草酸浓度明显降低, 均存在差异($P<0.05$); 肾组织内结石减少, 损伤减轻; 与结石组相比肾组织 SOD 活性升高($P<0.01$), MDA 含量明显降低, 存在极显著差异($P<0.01$)。综上所述, 植物乳杆菌可以维持肾脏的正常结构和功能、降低血草酸浓度、减轻肾组织氧化应激损伤、减少小鼠肾脏草酸钙结晶的沉积, 从而有效预防小鼠草酸钙结石的形成。

通过给予植物乳杆菌干预小鼠草酸钙结石获得的研究数据, 为进一步探究植物乳杆菌预防草酸钙结石奠定了基础。

Campieri 等发现产甲酸草酸杆菌可以与结肠上皮的 SLC26A6 阴离子交换器相互作用, 诱导结肠远端分泌草酸, 减少尿草酸的排泄量^[3]。SLC26A6 作为一种分布在肠道和其他部位的阴离子交换器, 它也是草酸根离子分泌的主要途径^[29-31]。当小鼠缺乏 SLC26A6 阴离子交换器时会导致草酸的净吸收量增加^[32]。因此, 结合文献研究及所有实验结果, 我们对植物乳杆菌(BNCC 194165)预防草酸钙结石的机制做出了推测, 如图 9 所示: (1) 植物乳杆菌在肠道内定殖并分解草酸, 增加了肠道排泄草酸的浓度, 同时减少草酸入血量; (2) 植物乳杆菌刺激结肠上皮 SLC26A6 阴离子交换器分泌草酸, 降低肾脏排泄草酸的浓度。

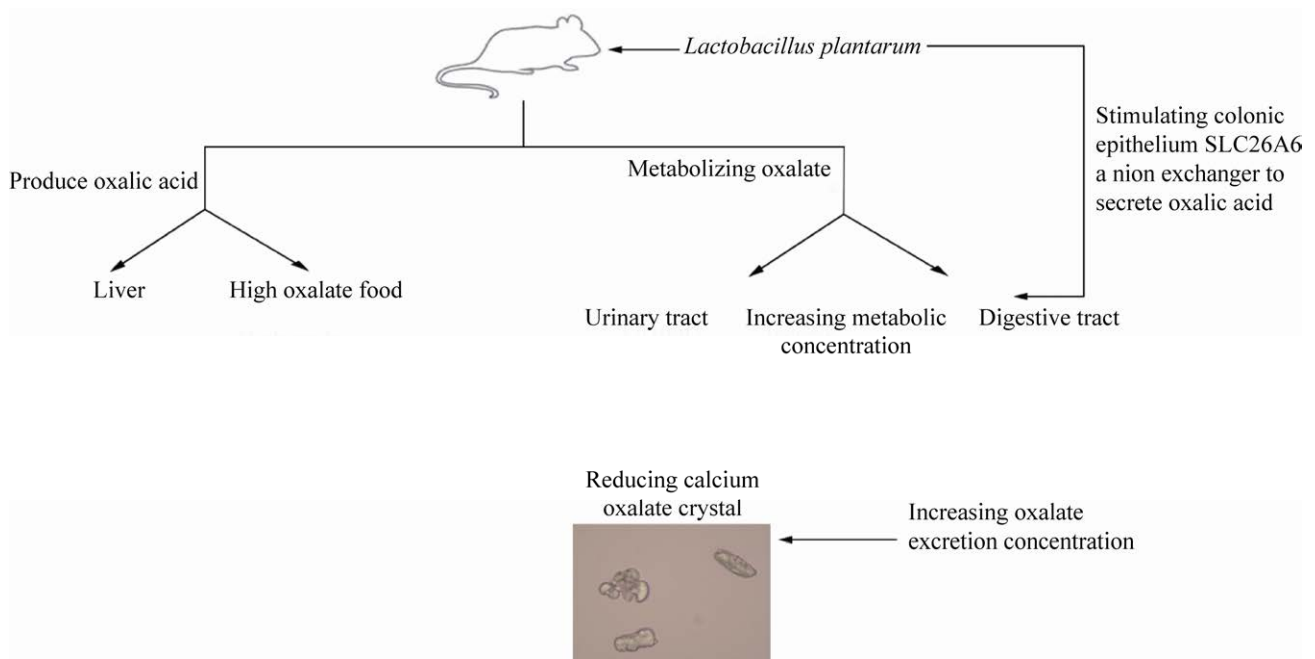


图9 植物乳杆菌预防草酸钙结石的机制推测图

Figure 9 Mechanism of *Lactobacillus plantarum* in preventing calcium oxalate stones.

REFERENCES

- [1] Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, Gambaro G, Canales BK, Doizi S, Traxer O, Tiselius HG. Kidney stones[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2016, 2: 16008
- [2] Hesse A, Brändle E, Wilbert D, Köhrmann KU, Alken P. Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000[J]. European Urology, 2003, 44(6): 709-713
- [3] Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, Swennen E, Matteuzzi D, Stefoni S, Pirovano F, Centi C, Ulisse S, Famularo G, et al. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration[J]. Kidney International, 2001, 60(3): 1097-1105
- [4] Sasikumar P, Gomathi S, Anbazhagan K, Abhishek A, Paul E, Vasudevan V, Sasikumar S, Selvam GS. Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats[J]. Journal of Biomedical Science, 2014, 21(1): 86
- [5] Wang S, Zhang Y, Zhang X, Tang Y, Li J. Upper urinary tract stone compositions: the role of age and gender[J]. International Braz j Urol, 2020, 46(1): 70-80
- [6] 尹银华, 胡莹, 宋叶, 何作瑜, 戴卫波, 谢彩英, 杨俊, 谢银彩, 宁万金. 尿石汤配方颗粒改善肾草酸钙结石大鼠肾功能效果及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(1): 17-23
- [7] Yin YH, Hu Y, Song Y, He ZY, Dai WB, Xie CY, Yang J, Xie YC, Ning WJ. Effect and mechanism of Niaoshi Tang formula granules on improving renal function of rats with calcium oxalate calculi[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2021, 41(1): 17-23 (in Chinese)
- [8] 王淡川, 冯锦杭, 孔连广. 葛根素治疗草酸钙结石的临床疗效及其初步机制研究[J]. 岭南急诊医学杂志, 2021, 26(2): 194-195
- [9] Wang DC, Feng JH, Kong LG. Study on the clinical efficacy and preliminary mechanism of puerarin in the treatment of calcium oxalate calculus[J]. Lingnan Journal of Emergency Medicine, 2021, 26(2): 194-195 (in Chinese)
- [10] Strohmaier WL. Course of calcium stone disease without treatment. What can we expect?[J]. European Urology, 2000, 37(3): 339-344
- [11] D'Costa MR, Pais VM, Rule AD. Leave no stone unturned: defining recurrence in kidney stone formers[J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2019, 28(2): 148-153
- [12] Jiang JQ, Knight J, Easter LH, Neiberg R, Holmes RP,

- Assimos DG. Impact of dietary calcium and oxalate, and *Oxalobacter formigenes* colonization on urinary oxalate excretion[J]. The Journal of Urology, 2011, 186(1): 135-139
- [11] Holmes RP, Knight J, Assimos DG. Lowering urinary oxalate excretion to decrease calcium oxalate stone disease[J]. Urolithiasis, 2016, 44(1): 27-32
- [12] Miller AW, Choy D, Penniston KL, Lange D. Inhibition of urinary stone disease by a multi-species bacterial network ensures healthy oxalate homeostasis[J]. Kidney International, 2019, 96(1): 180-188
- [13] Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 292953
- [14] Khan SR. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome?[J]. Urological Research, 2012, 40(2): 95-112
- [15] Rule AD, Krambeck AE, Lieske JC. Chronic kidney disease in kidney stone formers[J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN, 2011, 6(8): 2069-2075
- [16] Mulay SR, Evan A, Anders HJ. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease[J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2013, 29(3): 507-514
- [17] Li ZZ, Chang LN, Ren XL, Hu YN, Chen ZH. Modulation of rat kidney stone crystallization and the relative oxidative stress pathway by green tea polyphenol[J]. ACS Omega, 2021, 6(2): 1725-1731
- [18] 王超, 董旭, 尹新玮, 周逢海. 肠道菌群对草酸钙结石的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(11): 1285-1289
- Wang C, Dong X, Yin XW, Zhou FH. Impact of intestinal flora on calcium oxalate stones[J]. Journal of Central South University: Medical Science, 2021, 46(11): 1285-1289 (in Chinese)
- [19] Klimesova K, Whittamore JM, Hatch M. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* decreases urinary oxalate excretion in a mouse model of primary hyperoxaluria[J]. Urolithiasis, 2015, 43(2): 107-117
- [20] 叶淑红, 何连芳. 植物乳杆菌的筛选及其在泡菜中的应用[J]. 中国酿造, 2004, 23(7): 19-21
- Ye SH, He LF. Screening of *Lactobacillus plantarum* and its application in making pickles[J]. China Brewing, 2004, 23(7): 19-21 (in Chinese)
- [21] Tsai CH, Chen YC, Chen LD, Pan TC, Ho CY, Lai MT, Tsai FJ, Chen WC. A traditional Chinese herbal antilithic formula, Wulingsan, effectively prevents the renal deposition of calcium oxalate crystal in ethylene glycol-fed rats[J]. Urol Res, 2008, 36(1): 17-24
- [22] 崔雅倩, 魏志涛, 曹月, 张慧, 李若琳, 王坤杰, 孙群. 丁酸钠对肾草酸钙结石大鼠肠道菌群及炎症因子的影响[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2020, 57(4): 818-824
- Cui YQ, Wei ZT, Cao Y, Zhang H, Li RL, Wang KJ, Sun Q. Effects of sodium butyrate on intestinal flora and inflammatory factors in rats with renal calcium oxalate stones[J]. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 2020, 57(4): 818-824 (in Chinese)
- [23] Wang XF, Zhang BH, Lu XQ, Wang RQ. Gastrin-releasing peptide receptor gene silencing inhibits the development of the epithelial-mesenchymal transition and formation of a calcium oxalate crystal in renal tubular epithelial cells in mice with kidney stones via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(2): 1567-1577
- [24] Mulay SR, Honarpisheh MM, Foresto-Neto O, Shi CX, Desai J, Zhao ZB, Marschner JA, Popper B, Buhl EM, Boor P, et al. Mitochondria permeability transition versus necroptosis in oxalate-induced AKI[J]. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 2019, 30(10): 1857-1869
- [25] 宋丹, 段涛, 成俊林, 乔琳, 王丽, 陈丽仙, 李爱科, 王薇薇. 包被植物乳杆菌和尿肠球菌对肉鸡生长性能、免疫和抗氧化功能以及肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 24(12): 1-11
- Song D, Duan T, Cheng JL, Qiao L, Wang L, Chen LX, Li AK, Wang WW. Effects of embedded *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, immune and antioxidant function and intestinal microflora of broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 24(12): 1-11 (in Chinese)
- [26] 张娜, 赵丽娜, 李晨, 牛志华, 康红艳, 田洪涛, 罗云波. 母乳婴儿源植物乳杆菌 BF_15 体外抗氧化活性及缓解 DSS 诱导小鼠结肠氧化损伤的研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 67-77
- Zhang N, Zhao LN, Li C, Niu ZH, Kang HY, Tian HT, Luo YB. Studies on the *in vitro* antioxidant activity and alleviation of DSS-induced oxidative damage in mice colon of *Lactobacillus plantarum* BF_15 derived from breast milk[J]. Journal of Chinese Institute of Food

- Science and Technology, 2022, 22(1): 67-77 (in Chinese)
- [27] 冯刚. 椎间盘退行性变的生物治疗研究专题[J]. 川北医学院学报, 2013, 28(2): 89-90
- Feng G. The research topic of biological treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2013, 28(2): 89-90 (in Chinese)
- [28] Sun Z, Liu ZH, Zhao XH, Sun L, Chen YF, Zhang WL, Gao Y, Zhang YZ, Wan ZY, Samartzis D, et al. Impact of direct cell co-cultures on human adipose-derived stromal cells and nucleus pulposus cells[J]. Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 2013, 31(11): 1804-1813
- [29] Waldegger S, Moschen I, Ramirez A, Smith RJH, Ayadi H, Lang F, Kubisch C. Cloning and characterization of *SLC26A6*, a novel member of the solute carrier 26 gene family[J]. Genomics, 2001, 72(1): 43-50
- [30] Lohi H, Kujala M, Kerkelä E, Saarialho-Kere U, Kestilä M, Kere JH. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of *SLC26A6*, a candidate gene for pancreatic anion exchanger[J]. Genomics, 2000, 70(1): 102-112
- [31] Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells[J]. PNAS, 2001, 98(16): 9425-9430
- [32] Mukaibo T, Munemasa T, George AT, Tran DT, Gao X, Herche JL, Masaki C, Shull GE, Soleimani M, Melvin JE. The apical anion exchanger Slc26a6 promotes oxalate secretion by murine submandibular gland acinar cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(17): 6259-6268