

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.27.005

[http://www.crter.org]

阳旭明, 袁坚, 雷鸣, 张泽. 构建可分解草酸的成人骨髓间充质干细胞系[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(27):4974-4979.

构建可分解草酸的成人骨髓间充质干细胞系***◆

阳旭明, 袁坚, 雷鸣, 张泽(广州医学院第一附属医院, 广东省泌尿外科重点实验室, 广东省广州市 510230)

文章亮点:

1 实验成功提取草酸代谢关键酶编码基因 *Frc* 和 *Oxc*, 并通过反转录病毒载体将 *Frc* 和 *Oxc* 基因成功转入正常成人骨髓间充质干细胞内。

2 实验结果证实, 转染后的人骨髓间充质干细胞表达 *myc*-甲酰辅酶 A 转移酶和 *flag*-草酰辅酶 A 脱羧酶, 并具有分解草酸的能力。

3 实验成功构建了具有高代谢草酸能力的骨髓间充质干细胞系, 为以后诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞, 解决基因移植治疗内源性高草酸尿奠定基础。

关键词:

干细胞; 骨髓间充质干细胞; 骨髓间充质干细胞; 产甲酸草酸杆菌; 高草酸尿; 反转录病毒载体; 草酸分解; *Frc*; *Oxc*; 转基因; 基因工程; 国家自然科学基金

缩略语:

甲酰辅酶 A 转移酶: *formyl-CoA transferase*, *FCoAT*; 草酰辅酶 A 脱羧酶: *oxaly1-CoA decarboxylase*, *OCoAD*; 产甲酸草酸杆菌: *Oxalobacter formigenes*, *Ox.F*

摘要

背景: 高草酸尿是结石形成的危险因素之一, 利用基因工程和干细胞技术构建具有高代谢草酸能力的细胞系, 将成为防治草酸钙结石的有效手段。

目的: 将产甲酸草酸杆菌的草酸分解基因 *Frc* 和 *Oxc* 共转染至正常成人骨髓间充质干细胞, 构建可分解草酸的成人骨髓间充质干细胞系, 使之获得分解草酸的功能。

方法: PCR 法扩增出 *Frc* 和 *Oxc* 基因的编码序列, 构建真核表达载体 *pLEGFP-N1-myc-Frc* 和 *pBaBE-puro-flag-Oxc*, 将其共转染至正常成人骨髓间充质干细胞, 以转染空载体及未进行转染的正常成人骨髓间充质干细胞作为对照。采用 Western blot 检测目的基因表达情况; 离子色谱法测定转基因后细胞培养液中草酸浓度。

结果与结论: 酶切鉴定和测序结果显示实验成功扩增了 *Frc* 和 *Oxc* 基因, 并构建了 *pLEGFP-N1-myc-Frc* 和 *pBaBE-puro-flag-Oxc* 载体。将其转染至正常成人骨髓间充质干细胞后, Western blot 检测结果显示其可稳定表达目的蛋白 *myc*-甲酰辅酶 A 转移酶和 *flag*-草酰辅酶 A 脱羧酶; 离子色谱仪检测结果显示, 随着培养时间的延长, 转染目的基因的人骨髓间充质干细胞培养液中草酸浓度逐渐下降。而转染空载体及未进行转染的正常成人骨髓间充质干细胞无目的蛋白表达, 也无分解草酸能力。说明实验成功构建了可分解草酸的成人骨髓间充质干细胞系, 该细胞系可稳定表达草酸分解蛋白 *Frc* 和 *Oxc*, 并具有草酸分解能力。

Construction of oxalate-degrading adult bone marrow mesenchymal stem cell lines

Yang Xu-ming, Yuan Jian, Lei Ming, Zhang Ze (The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Key Laboratory of Urology, Guangzhou 510230, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: High oxalic acid urine is a risk factor for stone formation. Constructing cell lines with high oxalate metabolic ability using genetic engineering and stem cell technology will become the effective method to prevent and treat calcium oxalate stone.

OBJECTIVE: To construct the adult bone marrow mesenchymal stem cell lines that can decompose the oxalic acid, through co-transfecting the oxalic acid degradation genes *Frc* and *Oxc* of *oxalobacter formigenes* into the normal adult bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: *Frc* and *Oxc* were amplified by PCR, and the eukaryotic expression vectors of *pLEGFP-N1-myc-Frc* and *pBaBE-puro-flag-Oxc* were constructed, then co-transfected into the normal adult bone marrow mesenchymal stem cells. The non-transfected bone marrow mesenchymal stem cells and the cells transfected with empty vectors were as control. Western blot was performed to detect the expression of the objective genes; the concentration of oxalate in the culture medium after transgenic was determined by ion chromatography.

RESULTS AND CONCLUSION: Restriction enzyme digestion and sequencing results showed that the *Frc* and *Oxc* genes were successfully amplified, and the vectors of *pLEGFP-N1-myc-Frc* and *pBaBE-puro-flag-Oxc* were constructed. After transfected into the bone marrow mesenchymal stem cells, the Western blot results showed that

阳旭明★, 男, 1983年生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 2012年广州医学院毕业, 硕士, 医师, 现工作于衡阳市中心医院, 主要从事泌尿系结石的研究。
yxm2009211835@163.com

通讯作者: 袁坚, 主任医师, 广州医学院第一附属医院, 广东省泌尿外科重点实验室, 广东省广州市 510230
Goodwin2@tom.com

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2013)27-04974-06

收稿日期: 2012-10-13

修回日期: 2013-01-05

(20120614005/WLM·C)

Yang Xu-ming★, Master, Physician, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Key Laboratory of Urology, Guangzhou 510230, Guangdong Province, China
yxm2009211835@163.com

Corresponding author: Yuan Jian, Chief physician, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Key Laboratory of Urology, Guangzhou 510230, Guangdong Province, China
Goodwin2@tom.com

Supported by: Project of Guangdong Provincial Science and Technology Department, No. 2009B080701026*; National Natural Science Foundation of China, No. 30801140*

Received: 2012-10-13

Accepted: 2013-01-05

transfected bone marrow mesenchymal stem cells could stably express the target protein myc-formyl coenzyme A transferase enzyme and the flag-oxalyl coenzyme A decarboxylase; ion chromatography test results showed with the prolonging of the culture time, the concentration of oxalic acid in the human bone marrow mesenchymal stem cell culture medium transfected with target gene was decreased gradually. While there was no target protein expression in the non-transfected human bone marrow mesenchymal stem cells as well as the cells transfected with empty vectors. The cells had the ability of oxalate-degradation. The experiment successfully constructs the adult bone marrow mesenchymal stem cell lines that can decompose the oxalic acid, and the cell lines have the ability of oxalate-degradation and can stably express the oxalate decomposition proteins Frc and Oxc.

Key Words: stem cells; bone marrow-derived stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; oxalobacter formigenes; hyperoxaluria; retrovirus vector; oxalate-degradation; Frc; Oxc; transgenic; genetic engineering; National Natural Science Foundation of China

Yang XM, Yuan J, Lei M, Zhang Z. Construction of oxalate-degrading adult bone marrow mesenchymal stem cell lines. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(27):4974-4979.

0 引言

泌尿系统结石是当今泌尿外科的常见疾病之一, 对世界范围内6%–10%的人口健康造成影响, 其中75%左右的肾结石中的主要成分为草酸钙^[1]。国内泌尿系统结石发病率为1%–10%, 10年复发率高达74%, 并且最常见的结石类型为草酸钙结石^[2]。

草酸钙结石最重要的成因是高草酸尿, 而尿草酸主要来源于肝脏的内源性代谢和外源性吸收。以往研究发现产甲酸草酸杆菌(*Oxalobacter formigenes*, Ox.F)可通过分解草酸作为自身代谢的能量来源, 其关键酶分别为甲酰辅酶A转移酶(formyl-CoA transferase, FCoAT)和草酰辅酶A脱羧酶(oxalyl-CoA decarboxylase, OCoAD), 表达这两个关键酶的编码基因分别是Frc和Oxc^[3-5]。国内Ye等^[6]已成功将Frc和Oxc转染入真核细胞, 并发现后者具有分解草酸的功能。目前基因治疗的载体效率较低, 必须寻找更高效的、稳定的载体或者干细胞进行治疗。反转录病毒载体能够高效、稳定地感染靶细胞, 并将外源基因整合到宿主细胞基因组。pLEGFP-N1和pBaBE-puro是目前最常用的病毒载体, 其容量大, 能够高效、稳定、持久地感染靶细胞, 且含有Puro和Amp基因, 易于筛选阳性克隆, 并具有CMV和SV40启动子, 在双启动子协调作用下, CMV可促进SV40的转录表达, 同时具有MCS位点, 利于外源基因的插入, 可以使重组的原核基因Frc和Oxc的表达水平提高, 易于检测。

实验通过反转录病毒载体将Frc和Oxc基因成功转染入正常成人的骨髓间充质干细胞内, 验证其分解草酸的能力, 以期诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞, 解决基因移植治疗内源性高草酸尿奠定基础。

1 材料和方法

设计: 基因工程技术, 细胞学对比观察实验。

时间及地点: 于2010年6月至2012年2月在广州医

学院第一附属医院, 广东省泌尿外科重点实验室完成。

材料:

细胞、菌株、质粒及病毒: 293FT细胞为ATCC产品; DH5 α 、病毒载体 pLEGFP-N1 和 pBaBE-puro 购自 TaKaRa 公司; 正常成人骨髓间充质干细胞购自广州赛业公司。

可分解草酸成人骨髓间充质干细胞系的构建实验中所用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
TRIzol、DNAase I	Invitrogen 公司
GAPDH; Flag; Myc	Pierce 公司
凝胶成像系统	Bio-Rad 公司
离子色谱仪	瑞士万通公司
细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 限制性内切酶 EcoR I、Xho I、BamH I	TaKaRa 公司
PVDF 膜和化学发光液	Pierce 公司
磷酸钙	广州化学试剂厂
胎牛血清、DMEM 培养基	HyClone 公司

方法:

Frc、Oxc基因的扩增及鉴定: 提取广东省泌尿外科重点实验室保存的Ox.F基因组DNA为模板进行扩增, 根据Frc、Oxc基因序列设计引物, BamH I 和 Xho I 酶切Frc, BamH I 和 EcoR I 酶切Oxc。引物Frc-F: 5'-CCG CTC GAG GCC ATG GAG CAG AAA CTC ATC TCT GAA GAG GAT CTG ATG ACT AAA CCA TTA GAT GGA A-3'; Frc-R: 5'-CGG GAT CCT CAA ACT ACC TGT TTT GCA T-3'; Oxc-F: 5'-GAA GAT CTG CCA TGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGA TGA GTA ACG ACG ACA ATG T-3'; Oxc-R: 5'-CGC GGA TCC CCT TAT TTC TTG CCA ACT TTA CTT AC-3'。PCR反应结束后, 电泳、胶回收、酶切、连接, 转化DH5 α , 菌落PCR, 酶切鉴定后测序, 测序由上海英俊公司完成。PCR反应体系为20 μ L, 包括5 \times PrimeSTAR Buffer(Mg²⁺ plus) 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, 上下游引物各1 μ L, 2.5 U/ μ L PrimeSTAR HS 0.2 μ L, 灭菌水12.3 μ L, 模板0.5 μ L。PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 98 $^{\circ}$ C变性10 s, 57 $^{\circ}$ C退火10 s, 72 $^{\circ}$ C延伸80 s, 共28个循环,

最后72 °C延伸7 min。

反转录病毒载体的构建: 采用磷酸钙法包装病毒, 参考转染试剂说明书将包装质粒PIK及病毒载体pLEGFP-N1-myc-Frc和pBaBE-puro-flag-Oxc混匀后加293FT细胞培养皿中, 收集病毒液。

正常成人骨髓间充质干细胞的培养及基因转染: 在病毒感染细胞前, 用胰酶消化处于对数生长期的人骨髓间充质干细胞, 1 000×g离心5 min, 用无抗生素的含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬细胞, 并进行细胞计数。取 5×10^5 人骨髓间充质干细胞铺于培养皿中, 待细胞贴壁后向平皿中加入2 mL病毒上清液(含8 mg/L的聚凝胺); 37 °C孵育3 h, 吸弃病毒液, 换新病毒上清2 mL, 重复2次, 末次感染后换为正常培养基过夜, 感染72 h后换为筛选培养基(Puro 0.5 mg/L、G418 400 mg/L)进行筛选; 筛选1周后细胞达到稳定状态。以转染空载体和为转染的人骨髓间充质干细胞作为空载体组及对照组。

Western blot检测转染后人骨髓间充质干细胞myc-FCoAT和flag-OCoAD的表达: 取转染组、空载体组及对照组成人骨髓间充质干细胞, 各取20 μg蛋白, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜、封闭, 加入GAPDH、Flag、Myc一抗4 °C孵育过夜, 25 mL TBST洗膜3次, 每次10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠二抗室温孵育120 min; TBST漂洗3次, 每次10 min, 均在摇床上进行。洗膜、曝光、显影定影。

转基因人骨髓间充质干细胞分解草酸功能的鉴定: 取转染组、空载体组及对照组成人骨髓间充质干细胞, 分别按 5×10^4 /孔接种于24孔板中, 每组细胞5孔, 每孔细胞设5个复孔; 另外留5孔, 每孔设5个复孔, 作为空白对照。向含体积分数10%胎牛血清的DMEM细胞培养基中加入经过滤除菌的草酸钠储备液, 使培养液中的草酸钠浓度达到2.0 g/L。向有细胞的每个培养孔加入上述培养液2 mL, 并分别于0, 24, 48, 72, 96 h收取孔板中的培养液, 滤膜过滤后, 经离子色谱仪检测草酸浓度。

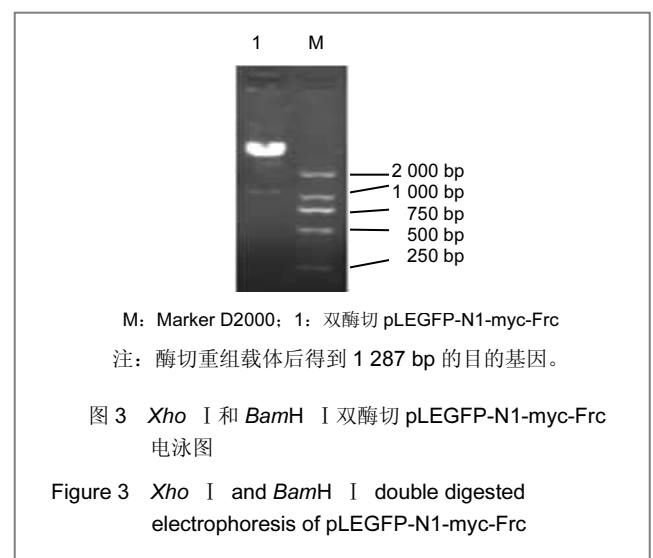
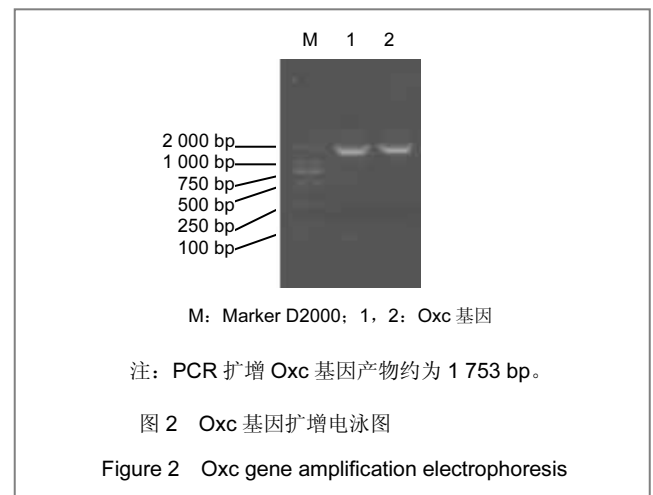
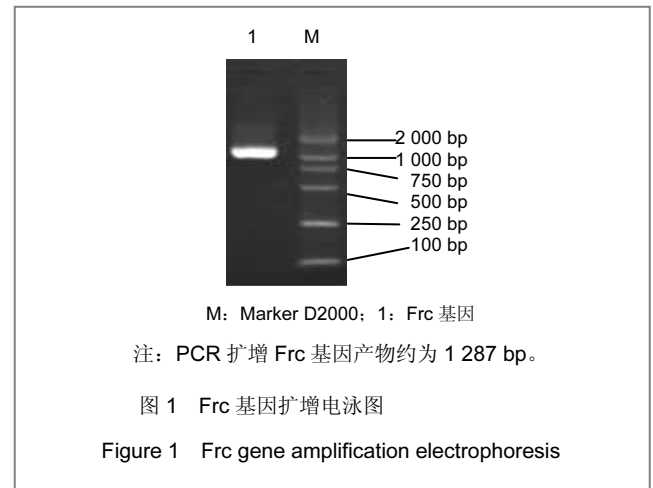
主要观察指标: ①Frc、Oxc基因扩增、电泳及测序结果。②目的蛋白myc-FCoAT和flag-OCoAD在转基因人骨髓间充质干细胞的表达。③离子色谱仪测定培养液中草酸钠的浓度变化。

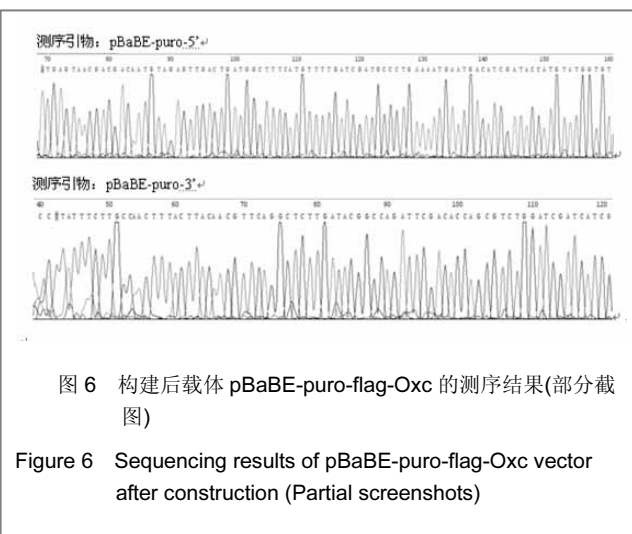
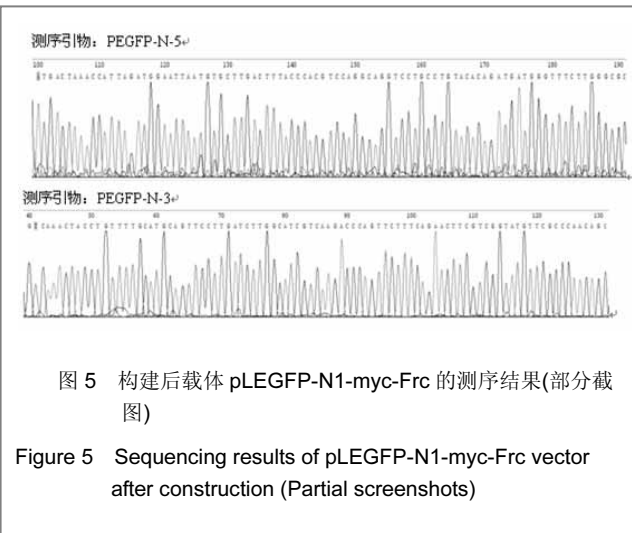
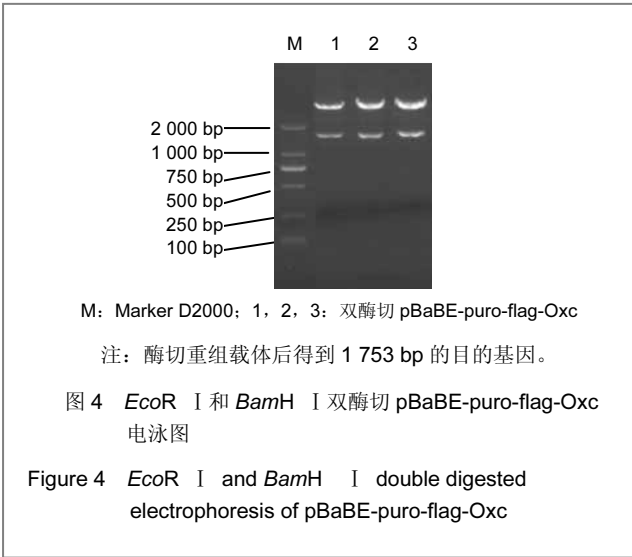
统计学分析: 由第一作者使用SPSS 13.0统计学软件进行统计, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Frc、Oxc基因的扩增及反转录病毒载体的构建结果 琼脂糖凝胶电泳显示经PCR扩增的Frc和Oxc片段

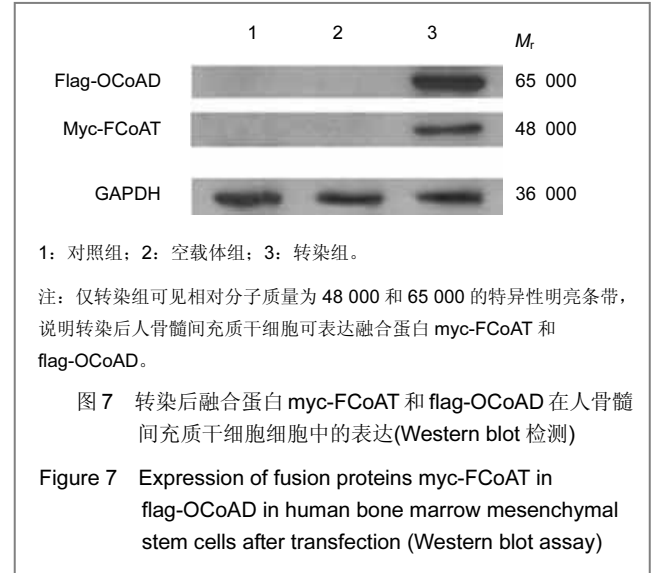
大小分别约为1 287 bp和1 753 bp, 胶回收产物见图1, 2; pLEGFP-N1、pBaBE-puro载体分别进行酶切、连接、转化、电泳后, 其大小与理论一致, 见图3, 4。测序结果证实实验扩增的Frc和Oxc基因与GenBank一致(Frc为U82167、Oxc为M77128), 见图5, 6。



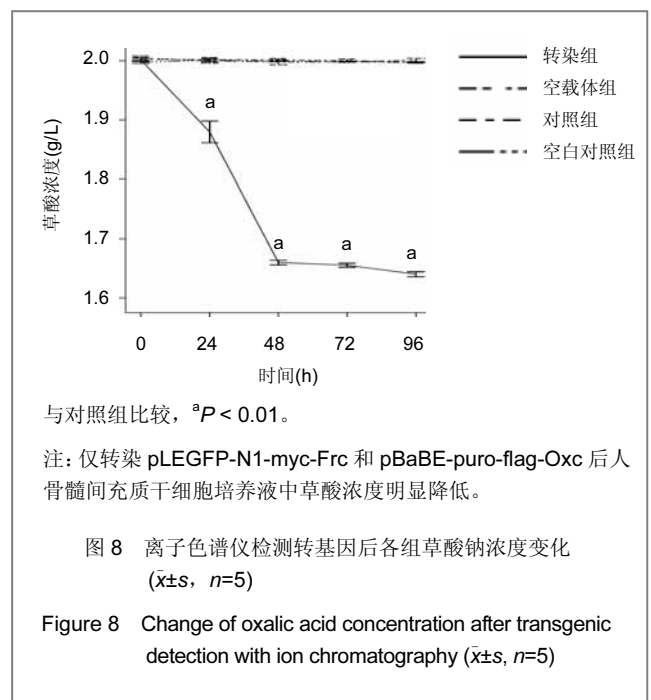


2.2 基因转染后人骨髓间充质干细胞融合蛋白 myc-FCoAT 和 flag-OCoAD 的表达 Western blot 结果显示, 转染 pLEGFP-N1-myc-Frc 和 pBaBE-puro-flag-Oxc 的人骨髓间充质干细胞经电泳后可见相对分子质量为

48 000 和 65 000 的特异性明亮条带, 而正常成人骨髓间充质干细胞和转染空白载体的正常成人骨髓间充质干细胞都未见特异性条带, 见图 7。可见基因转染后的人骨髓间充质干细胞可表达融合蛋白 myc-FCoAT 和 flag-OCoAD。



2.3 基因转染后人骨髓间充质干细胞分解草酸的能力 离子色谱仪检测结果显示, 转染组培养液中草酸浓度明显低于相应时间点的空载体组、对照组和空白对照组培养液中的草酸浓度 ($P < 0.01$), 而后 3 组培养液中的草酸浓度比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。随着培养时间的延长, 空载体组、对照组和空白对照组培养液中的草酸浓度变化很小, 各时间点之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。而转染组培养液中草酸浓度在最初的 24-48 h 内下降明显, 在 48 h 以后变化不明显, 见图 8。



3 讨论

中国是世界上三大结石高发地区之一, 一般人群发病率为1%–10%, 需要住院治疗的占发病总数的25%^[7]。虽然随着体外冲击波碎石术、输尿管镜取石术、经皮肾镜取石术、腹腔镜取石术等各种治疗新技术手段的发展, 泌尿系结石的治疗技术和设备逐渐成熟, 但是其复发率仍然较高。因此, 针对泌尿系的病因学诊断与治疗已经成为当今研究的重点。

草酸是日常饮食中常见的组分之一, 也是代谢的副产物, 假如不能有效地降解, 在人体内蓄积, 最终将导致结石形成和其他异常^[8]。既往许多研究已经证实草酸可作用于肾上皮细胞, 引发程序性事件的发生, 包括启动基因表达、引发DNA复制、细胞生长和凋亡等, 可能与上皮细胞损伤和结石形成有关^[9–14]。鉴于此, 在针对泌尿系结石病因学研究时, 需要重点研究如何降解草酸, 进而达到有效预防泌尿系结石发生的目的。

目前国外学者对肠源性高草酸的研究已有一定了解。Sidhu等^[15–16]用含体积分数1.5%草酸的食物喂养小鼠, 成功建立了高草酸尿小鼠模型, 然后以浓度为 2×10^9 的产甲酸草酸杆菌喂养2 d后收集尿液标本, 经检测发现尿液草酸浓度下降65%; 随后以体积分数1%的草酸饮食搭配浓度为 2×10^9 的产甲酸草酸杆菌混合喂养, 连续观察2周后发现其疗效也是确切的。进一步研究发现人体摄入产甲酸草酸杆菌同样也具有降低尿液草酸浓度的功能^[17–18]。

目前关于产甲酸草酸杆菌在小鼠的研究中已证实是安全和可行的, 人体试验也正在佛罗里达州开展起来。在将来, 很可能有一种降低肠道草酸的产甲酸草酸杆菌作为主要原料的口服药物问世, 达到降低肠道外源性草酸的目的。然而, 对于因肝脏代谢障碍缺陷引起的内源性高草酸尿症, 饮食控制几乎是无效的, 目前最有效的治疗方法是肝移植或肝肾联合移植, 也有学者开始尝试内源性高草酸尿症的基因诊断和治疗。Koul等^[19]将正常的肝脏过氧化丙氨酸-乙醛酸盐氨基转移酶(AGT)基因导入真核表达载体pEGFP-C1, 并证实外源基因AGT在真核细胞中高效表达。随着产甲酸草酸杆菌基因组序列及蛋白组学研究的深入, 学者将产甲酸草酸杆菌的草酸分解酶相应的编码基因Frc和Oxc转入真核细胞, 并证实其具有分解草酸的能力, 为高草酸尿症的治疗提供了新的思路^[20–22]。FCoAT和OCoAD为原核基因Frc和Oxc表达的酶蛋白, 在真核细胞中难以表达, 并且只有大多数肝细胞被导入外源基因才能达到效果。实验拟通过pLEGFP-N1和pBaBE-puro将Frc和Oxc转入正常成人骨髓间充质干细胞中, 使后者表达FCoAT和OCoAD, 为以后治疗高草酸尿症奠定基础。

实验中的Ox.F基因组是前期研究保存的^[23], 来源于饲草类哺乳动物肠道的Ox.F, 其分解草酸能力强。PCR克隆出Frc和Oxc片段, 大小分别约为1 287 bp和1 753 bp, 经测序证实与文献报道的基本一致。构建分别带有myc-Frc和flag-Oxc的真核表达载体, 经鉴定构建成功。实验中的靶细胞是正常成人骨髓间充质干细胞, 此细胞具有自我更新和多向分化的潜能^[24], 可通过诱导分化为肝细胞。实验采用的是反转录病毒载体pLEGFP-N1和pBaBE-puro, 是目前最常用的病毒载体, 其容量大, 能够高效、稳定、持久地感染靶细胞, 并可使重组的原核基因Frc和Oxc的表达水平提高, 易于检测。由于目前国内暂缺乏FCoAT和OCoAD相应的一抗, Western blot利用抗myc和抗flag检测融合蛋白myc-FCoAT和flag-OCoAD在正常成人骨髓间充质干细胞中的表达, 结果显示转染后的正常成人骨髓间充质干细胞稳定表达了融合蛋白myc-FCoAT和flag-OCoAD。在进一步的功能验证中采用离子色谱仪检测, 此方法与传统的比色法比较, 不需化学试剂, 并对测定样品所要求的pH值范围广, 可重复操作, 结果相对稳定性好, 对草酸测定的敏感性、稳定性和准确性高^[25], 是目前临床代谢评估检测的应用较广的方法。但是, 由于实验在检测培养液中草酸浓度时部分结果高于初始浓度, 可能与在细胞培养过程中培养液的蒸发或者是离子色谱仪在运作时性能不太稳定相关, 属于正常范围内的系统误差。并且, 经过统计分析发现并不影响整体结果的差异性。实验结果显示, 转染组培养液中草酸浓度明显低于相应时间点空载体组及对照组培养液中的草酸浓度, 说明Frc和Oxc被成功转染至正常成人骨髓间充质干细胞内, 并且稳定表达了具有活性的蛋白酶myc-FCoAT和flag-OCoAD, 参与了草酸代谢的酶促反应, 但是由于酶底物草酸钠的耗竭以及代谢产物的堆积, 48 h后反应基本停止。

实验成功利用反转录病毒载体将草酸分解基因转入靶细胞, 构建具有代谢草酸功能的骨髓间充质干细胞株的研究在国内罕见, 课题组下一步将利用诱导剂将骨髓间充质干细胞诱导分化为具有分解草酸功能的肝细胞, 并为进一步研究高草酸尿与草酸钙结石形成的相关性奠定基础。

基金资助: 广东省科技厅资助项目(2009B080701026); 国家自然科学基金资助项目(30801140)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计、构思, 并进行实验实施、分析相关数据, 所有作者共同参与资料收集及文章撰写, 第二、三作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 高草酸尿症-患者尿液中包含高浓度草酸盐的慢性疾病。肾脏积聚过量草酸盐会导致形成肾结石。高草酸尿症既可以由遗传而得,也可以因为饮食富含草酸盐引起。正常情况下,通过食物摄入的草酸盐会在肝脏加工处理,并被肾脏作为垃圾排出体外。但高草酸尿症患者不能适当分解草酸盐,导致肾脏和尿道中存在过多这种盐。这些多余的盐会绑定钙形成不可溶性结晶形式,也被称为肾结石。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Mittal RD, Kumar R. Gut-inhabiting bacterium *Oxalobacter formigenes*: role in calcium oxalate urolithiasis. *J Endourol.* 2004;18(5):418-424.
- [2] Ogawa Y, Miyazato T, Hatano T. Oxalate and urinary stones. *World J Surg.* 2000;24(10):1154-1159.
- [3] Anantharam V, Allison MJ, Maloney PC. Oxalate: formate exchange. The basis for energy coupling in *Oxalobacter*. *J Biol Chem.* 1989;264(13):7244-7250.
- [4] Baetz AL, Allison MJ. Purification and characterization of oxalyl-coenzyme A decarboxylase from *Oxalobacter formigenes*. *J Bacteriol.* 1989;171(5):2605-2608.
- [5] Baetz AL, Allison MJ. Purification and characterization of formyl-coenzyme A transferase from *Oxalobacter formigenes*. *J Bacteriol.* 1990;172(7):3537-3540.
- [6] Ye ZQ, Kong DB, Chen ZQ, et al. Stable expression of the *oxc* and *frc* genes from *Oxalobacter formigenes* in human embryo kidney 293 cells: implications for gene therapy of hyperoxaluria. *Int J Mol Med.* 2007;20(4):521-526.
- [7] 叶章群.泌尿系结石研究现状与展望[J].中华实验外科杂志,2005,22(3):261-262.
- [8] Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, et al. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States:1976-1994. *Kidney Int.* 2003;63(5):1817-1823.
- [9] Koul H, Kennington L, Honeyman T, et al. Activation of c-myc gene mediates the mitogenic effects of oxalate in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells. *Kidney Int.* 1996;50(5):1525-1530.
- [10] Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Acute hyperoxaluria, renal injury and calcium oxalate urolithiasis. *J Urol.* 1992;147(1):226-230.
- [11] Huang MY, Chaturvedi LS, Koul S, et al. Oxalate stimulates IL-6 production in HK-2 cells, a line of human renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2005;68(2):497-503.
- [12] Koul S, Chaturvedi LS, Sekhon A, et al. Effects of oxalate on the re-initiation of DNA synthesis in LLC-PK1 cells do not involve p42/44 MAP kinase activation. *Kidney Int.* 2002;61(2):525-533.
- [13] Chaturvedi LS, Koul S, Sekhon A, et al. Oxalate selectively activates p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase signal transduction pathways in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(15):13321-13330.
- [14] Bhandari A, Koul S, Sekhon A, et al. Effects of oxalate on HK-2 cells, a line of proximal tubular epithelial cells from normal human kidney. *J Urol.* 2002;168(1):253-259.
- [15] Sidhu H, Schmidt ME, Cornelius JG, et al. Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10 Suppl 14:S334-340.
- [16] Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, et al. Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J Urol.* 2001;166(4):1487-1491.
- [17] Hoppe B, Beck B, Gatter N, et al. *Oxalobacter formigenes*: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 2006;70(7):1305-1311.
- [18] Duncan SH, Richardson AJ, Kaul P, et al. *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):3841-3847.
- [19] Koul S, Johnson T, Pramanik S, et al. Cellular transfection to deliver alanine-glyoxylate aminotransferase to hepatocytes: a rational gene therapy for primary hyperoxaluria-1 (PH-1). *Am J Nephrol.* 2005;25(2):176-182.
- [20] Azcarate-Peril MA, Bruno-Bárcena JM, Hassan HM, et al. Transcriptional and functional analysis of oxalyl-coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):1891-1899.
- [21] 陈志强,刘冠琳,叶章群,等.表达产甲酸草酸杆菌草酸分解基因的人肝细胞系的构建[J].临床泌尿外科杂志,2007,22(2):143-145.
- [22] 叶章群,刘冠琳,陈志强,等.可分解草酸小鼠肠干细胞群的构建[J].中华医学杂志,2009,89(16):1130-1134.
- [23] 赖德辉,雷鸣,李逊,等.基因工程构建表达融合蛋白GST-FCoAT的益生大肠杆菌EcN-Frc[J].实用医学杂志,2010,26(24):4480-4482.
- [24] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41-49.
- [25] 张泽,欧莉莉,曾国华,等.离子色谱法同时测定24小时尿草酸和枸橼酸的应用价值[J].中华泌尿外科杂志,2010,28(z1):75-77.