

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.08.001

• 基础研究 •

模拟海拔 5000 m 低氧环境对小鼠肠道免疫和肠道菌群的影响 *

秦鹏蕊 王迦南 刘诗颖 王 茜 柴佳敏 宋巧玥 徐成丽^Δ

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 北京 100005)

摘要 目的:研究模拟海拔 5000 m 低压低氧环境下,不同低氧暴露时间对小鼠肠道组织结构、免疫因子和肠道菌群的影响。**方法:**采用低压低氧舱模拟海拔 5000 m 高度,构建 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠低氧模型,随机分为 1、3、5、7、14 和 30 d 低氧组及其常氧对照组,每组 6 只常规饲养,记录体重。在对应时间点取材,HE 染色制作小鼠回肠组织切片、免疫组织化学染色分析小鼠肠道紧密连接 occludin 蛋白表达,ELISA 检测小鼠血浆免疫因子 IL-6、IL-22 和 TNF- α 水平,16S rDNA 测序分析肠道菌群变化。**结果:**与常氧对照组相比,各低氧组小鼠体重均显著降低($P<0.05$)。小鼠回肠组织 HE 染色及免疫组化染色显示,各低氧组均出现不同程度的肠上皮绒毛缺损,淋巴细胞增多等变化,且 7、14 d 组低氧组小鼠紧密连接 occludin 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。与常氧组相比,7 d 低氧组小鼠血浆 IL-6 水平显著降低($P<0.05$),14 d 低氧组小鼠血浆 IL-6 水平显著增加($P<0.05$);与相应的常氧组对比,低氧组 TNF- α 和 IL-22 的水平没有显著差异,但在各低氧组间出现差异。不同低氧时间组与其常氧对照组的肠道菌群构成具有显著差异;在菌属水平上,低氧组中普雷沃菌属(*Prevotella*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、颤螺菌属(*Oscillospira*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)和臭气杆菌属(*Odoribacter*),相对丰度较高且具有显著性差异($P<0.05$);血浆免疫因子与肠道菌群相关分析表明,乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)与 IL-6、IL-22 水平呈显著正相关($r=0.27, P<0.05$; $r=0.27, P<0.05$)。**结论:**模拟海拔 5000 m 低压低氧环境显著改变 C57BL/6 小鼠肠道组织结构及其屏障功能和肠道菌群组成,肠道菌群的变化与免疫因子水平显著相关,这些变化与低氧暴露时间相关,是小鼠低氧应激响应肠道功能的适应性变化。

关键词:低氧;小鼠;肠道菌群;Occludin;IL-6**中图分类号:**R-33;R135.6;R134.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)08-1401-07

Effects of Simulated Hypoxic Environment at 5000 m Altitude on Intestinal Immunity and Gut Microbiota in Mice*

QIN Peng-rui, WANG Jia-nan, LIU Shi-ying, WANG Xi, CHAI Jia-min, SONG Qiao-yue, XU Cheng-li^Δ

(Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing, 100005, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of simulated hypobaric hypoxic environment at 5000 m altitude on intestinal tissue structure, immune factors, and gut microbiota in mice with different hypoxia exposure times. **Methods:** 72 male C57BL/6 mice were divided into hypoxia groups and control groups. The hypoxia model was established by hypobaric chamber with simulated altitude of 5000 m. The hypoxia groups were set for 1, 3, 5, 7, 14, and 30 days (6 mice per group, hypoxia time 24 h per day), body weight of mice was recorded. The histopathological sections of ileum were made by HE staining. The expression levels of occludin, an intestinal tight junction protein, were analyzed by immunohistochemical staining. The levels of IL-6, IL-22, and TNF- α in plasma were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gut microbiota was analyzed by 16 s rDNA sequencing. **Results:** Compared with that in the control group, the body weight of hypoxia groups reduced significantly ($P<0.05$). HE staining and immunohistochemical staining of hypoxia groups showed that there were injury in intestinal epithelial villi and the lymphocytes increased. The expression of occludin protein decreased significantly($P<0.05$) in 7- and 14-day hypoxia groups. IL-6 in plasma decreased significantly($P<0.05$) in 7-day hypoxia groups and then increased significantly($P<0.05$) in 14-day hypoxia groups. The characteristics of the intestinal microbial community of mice in different hypoxia exposure groups and control groups significantly changed. At genus level, the abundance of *Prevotella*, *Akkermansia*, *Oscillospira*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Odoribacter* were significantly increased ($P<0.05$) in hypoxia groups. Correlation analysis of immune factors and gut microbiota showed that *Lactobacillus* is significantly positively correlated with IL-6 and IL-22 ($r=0.27, P<0.05$; $r=0.27, P<0.05$). **Conclusions:** Hypoxia stress at an altitude simulating 5000 m significantly changed the intestinal epithelium structure

* 基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-005)

作者简介:秦鹏蕊,女,硕士研究生,主要研究方向:特殊环境生理学, E-mail: qinpengrui@ibms.pumc.edu.cn

^Δ 通讯作者:徐成丽,女,博士生导师,研究员,主要研究方向:南极特殊环境生理学医学和心理学,

E-mail: xuchengli@pumc.edu.cn, 电话:010-69156924

(收稿日期:2021-11-24 接受日期:2021-12-20)

and barrier function and the composition of gut microbiota of mice. Changes in gut microbiota were significantly correlated with the levels of immune factor in plasma. These changes may be the adaptive response to the hypoxia environment and are related to the time of hypoxia stress.

Key words: Hypoxia; Mice; Gut microbiota; Occludin; IL-6

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R135.6; R134.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)08-1401-07

前言

平原人进入高海拔地区易产生低氧应激,使全身各脏器、系统的功能发生低氧适应性变化^[1]。肠道是有害病原微生物入侵的主要途径之一,肠黏膜内含有多重免疫细胞,共同防御入侵的有害应激原,在体内产生免疫反应^[2]。肠道的低氧易感性是高海拔地区机体易发生肠道损伤的重要原因之一^[3]。研究发现,受高海拔因素影响,病原微生物经肠道入侵的风险明显上升,一旦肠道屏障功能受损,细菌和内毒素可能通过血液转运到全身各组织或器官^[4],从而引起肠道免疫功能的改变,导致系统性炎症的发生^[5]。了解高原低氧环境引起的肠道问题的生理学和免疫学机制,对高海拔环境下维持肠道稳态与机体健康至关重要。

胃肠道是微生物定植的主要场所,肠道微生物与宿主之间存在复杂的相互作用,能通过代谢产物、自身成分以及粘附宿主细胞保持肠上皮屏障的完整性,并塑造黏膜免疫系统^[2]。大量研究表明,肠道菌群失调与多种生理心理疾病的发生有关,如炎症性肠病、神经发育障碍、情绪紊乱和肥胖等^[6]。而高海拔低氧环境可能引起肠道的微生物组成发生改变,研究发现,长期居住于高原的藏族人与平原人肠道菌群的构成差异显著^[7]。这提示高原低氧环境诱发的肠道菌群失调,可能是高海拔机体肠道屏障与免疫功能损伤的原因。本研究通过构建低氧动物模型,研究高海拔低氧环境下,宿主肠道屏障、免疫功能与肠道菌群的变化及相互作用关系,对高海拔诱发消化系统相关问题的研究十分重要。

1 材料与方法

1.1 材料

无特殊病原菌(SPF)级 C57BL/6 健康雄性小鼠(8 周龄,购自中国医学科学院基础医学研究所实验动物中心)。饲养环境为正常光照,温度为 20 ± 2 °C,湿度为 40 %-60 %,自由饮食饮水。小鼠随机分为 1、3、5、7、14 和 30 d 低氧组及其常氧对照组,每组 6 只,共 12 组。血浆免疫因子检测使用北京索莱宝科技有限公司 IL-6 (SEKM0007)、IL-22 (SEKM0023) 和 TNF- α (SEKM0034)试剂盒检测。肠道菌群 16S rDNA 测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 低氧动物模型构建 将低氧组小鼠放置于低压低氧模拟舱(贵州风雷航空军械有限公司,FLYDWC50-IIC),以平均约 10 m/s 的速度升至海拔 5000 m(O_2 含量 12.95 %,气压 404 mmHg),根据实验设计分别模拟 1、3、5、7、14 和 30 d 的持续低氧环境。持续低氧期间,每 2-3 天开舱一次,持续 20 min,进行饲料饮水添加、垫料更换、体重称量。对照组小鼠饲养于舱外的

常氧环境(北京,海拔 52 m,气压 760 mmHg)。

1.2.2 动物样品采集 持续低氧暴露后,在对应时间点处死各组小鼠取样。戊巴比妥钠溶液(1 %,50 mg/kg)腹腔注射麻醉。麻醉后,开胸心脏采血,4 °C 静置 2 h 后离心(3000 rpm,15 min),分装血浆,于 -80 °C 保存,留待 ELISA 检测血浆免疫因子水平。同时开腹取回肠中段约 2 cm 肠管置于 4 %多聚甲醛溶液中浸泡,留待检测。并取盲肠内容物与直肠末端粪便,置于冻存管中液氮冻存,留待检测。

1.2.3 回肠组织 HE 染色及免疫组化 各组小鼠回肠标本均制作病理切片并经 HE 染色,光镜下观察回肠组织病理变化。采用免疫组织化学染色法检测回肠黏膜组织中 occludin 蛋白表达水平,阳性染色均显示为棕黄色颗粒,在高倍镜下($\times 400$)每张切片随机选取 5 个阳性表达密集的视野,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像半定量分析,并计算平均光密度值。

1.2.4 肠道菌群 16S rDNA 测序分析 小鼠肠道菌群基因组 DNA 提取,以 16S rDNA V3+V4 区构建测序文库,Illumina HiSeq 测序平台上机测序。测序数据初步处理后,得到最终有效数据(Effective Tags)。QIIME 软件(version 1.9.1)将序列以 97% 的一致性聚类为 OTUs(Operational Taxonomic Units),并进行物种分类学注释,统计各组肠道菌群的相对丰度。

1.3 数据统计与分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行统计分析。使用两独立样本 t 检验分析正态分布数据,非参数独立样本 Mann-Whitney U 检验分析非正态分布数据。Graphpad prism 7.0 软件作图。

2 结果

2.1 模拟海拔 5000 m 环境对 C57BL/6 小鼠体重的影响

对低氧暴露不同时间组的小鼠体重监测显示,与常氧组对比,各低氧组小鼠体重均显著降低($P < 0.05$),进食饮水减少,活动能力减弱。各组小鼠体重变化如表 1 所示。对 30 d 组小鼠进行体重动态监测,发现随持续低氧暴露时间的延长,低氧组小鼠平均体重呈先降低后增加的趋势,常氧组小鼠体重则持续平稳增加,但各低氧组小鼠体重始终显著低于常氧对照组($P < 0.01$)。

2.2 模拟海拔 5000 m 环境对 C57BL/6 小鼠回肠组织形态的影响

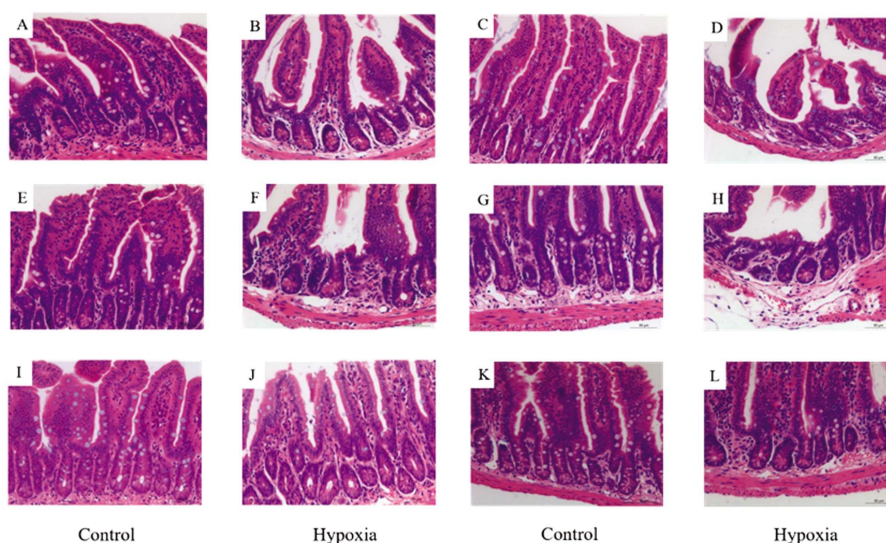
小鼠回肠组织病理切片 HE 染色结果显示,各常氧组小鼠回肠组织结构形态正常(图 1 A,C,E,G,I,K),与常氧组相比,低氧组均出现不同程度的小肠黏膜变薄,肠上皮绒毛缺损、细胞不规则、数量减少,淋巴细胞增多(图 1 B,D,F,H,J)。随持续低氧暴露时间的延长,7 d 低氧组出现肠黏膜固有层、肌层断裂(图 1 H),14 d 低氧组出现肠腺体增生(图 1 J),30 d 低氧组出现缺氧代偿性血管充血(图 1 L)。

与常氧组相比,各低氧组小鼠回肠组织 occludin 蛋白的表达量均有所下降, 对各组平均光密度值计算发现,7、14 d 低氧组下降最为显著($P<0.05$),如图 2 所示。

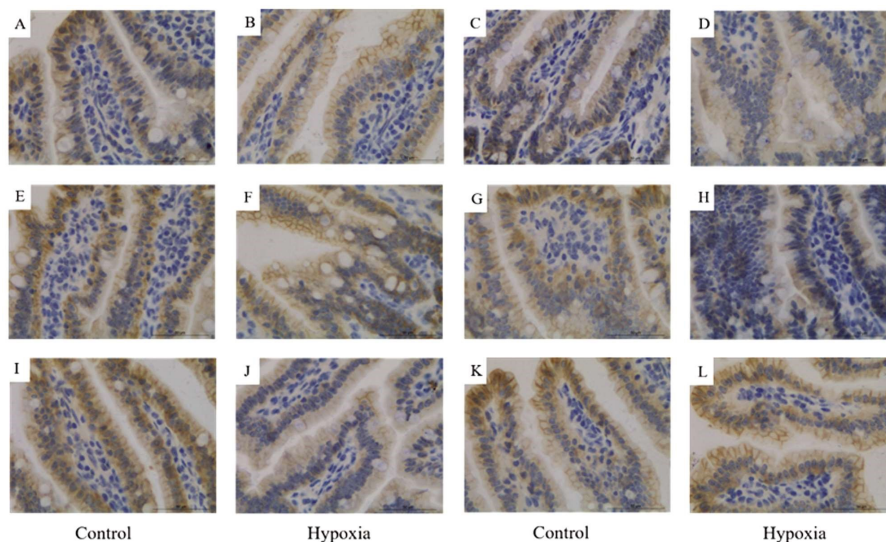
表 1 各组小鼠体重变化($\bar{x} \pm s$, n=6)Table 1 Weight of mice of each group ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Average weight (g)	
	Control	Hypoxia
1 d	25.50± 0.93	21.75± 0.71***
3 d	27.28± 1.51	22.88± 1.25***
5 d	25.63± 1.41	22.00± 0.76***
7 d	24.75± 0.46	23.50± 1.31*
14 d	27.13± 0.99	24.12± 0.64***
30 d	27.50± 1.60	24.50± 1.60**

Note: compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图 1 各组小鼠回肠组织 HE 染色结果($\times 200$)Fig.1 Ileum tissues of mice by HE staining of each group($\times 200$)

Note: 1 d group(A, B); 3 d group(C, D); 5 d group(E, F); 7 d group(G, H); 14 d group(I, J); 30 d group(K, L).

图 2 各组小鼠回肠组织 occludin 表达情况($\times 400$)Fig.2 Expression levels of occludin in ileum tissue of each group($\times 400$)

Note: 1 d group(A, B); 3 d group(C, D); 5 d group(E, F); 7 d group(G, H); 14 d group(I, J); 30 d group(K, L).

2.3 模拟海拔 5000 m 环境对 C57BL/6 小鼠血浆免疫因子的影响

小鼠血浆免疫因子水平检测显示,与常氧组相比,7 d 低氧组小鼠血浆 IL-6 水平显著降低($P<0.05$),14 d 低氧组小鼠血浆 IL-6 水平显著增加($P<0.05$)。TNF- α 和 IL-22 的水平较常氧组

对比未出现显著差异,但在各低氧组间出现差异变化:与 1 d 低氧组相比,14 d、30 d 低氧组小鼠血浆 IL-22 水平显著降低($P<0.05$);与 5 d 低氧组相比,30 d 低氧组小鼠血浆 TNF- α 水平显著降低($P<0.05$),而各常氧组间未见显著差异。各组小鼠血浆免疫因子含量如表 2 所示。

表 2 各组小鼠血浆免疫因子水平 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 The levels of immune factor in plasma of each group ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	IL-6 (pg/mL)		IL-22 (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)	
	Control	Hypoxia	Control	Hypoxia	Control	Hypoxia
1 d	16.17 $\pm$ 17.67	8.95 $\pm$ 3.44	118.40 $\pm$ 48.19	39.33 $\pm$ 12.42	36.83 $\pm$ 11.20	26.17 $\pm$ 9.49
3 d	15.59 $\pm$ 12.24	18.87 $\pm$ 12.93	65.60 $\pm$ 29.04	157.4 $\pm$ 78.03	24.41 $\pm$ 11.50	21.44 $\pm$ 10.56
5 d	9.68 $\pm$ 3.19	13.29 $\pm$ 10.79	44.72 $\pm$ 26.93	13.66 $\pm$ 7.65	28.26 $\pm$ 11.85	31.55 $\pm$ 14.16
7 d	28.39 $\pm$ 10.15	13.46 $\pm$ 5.18*	20.58 $\pm$ 10.08	61.32 $\pm$ 31.76	25.18 $\pm$ 13.88	18.58 $\pm$ 3.45
14 d	5.36 $\pm$ 5.13	20.84 $\pm$ 8.83*	0.72 $\pm$ 0.42	11.13 $\pm$ 7.73 [#]	25.62 $\pm$ 3.43	21.44 $\pm$ 5.62
30 d	9.85 $\pm$ 3.25	14.03 $\pm$ 4.19	1.28 $\pm$ 0.62	5.91 $\pm$ 2.75 [#]	36.17 $\pm$ 16.07	16.71 $\pm$ 2.51 ^Δ

Note: compared with the control group, * $P<0.05$. compared with the 1 day hypoxia group, [#] $P<0.05$. compared with the 5 day hypoxia group, ^Δ $P<0.05$.

2.4 模拟海拔 5000 m 环境对 C57BL/6 小鼠肠道菌群的影响

对小鼠肠道菌群 16S rDNA 测序数据进行分析,共鉴定出 330 个菌属, Wilcoxon 秩和检验鉴定出相对丰度具有显著性差异($P<0.05$)的菌属共计 18 个。

2.4.1 肠道微生物群落多样性分析 各组 α 多样性指数进行了计算,见表 3。结果显示,与常氧对照组相比,各低氧组的 α 多样性指数未发生显著性变化,但 Chao1 指数和 Shannon 指数

在 5 d 低氧组和 30 d 低氧组之间,存在显著性差异($P<0.05$)。

为研究海拔 5000 m 低氧暴露对小鼠肠道微生物群落构成的差异,进行 Bray-Curtis NMDS 分析。不同组小鼠肠道微生物样品,分别用不同颜色符号表示,不同符号的空间位置距离不同,反映了不同组肠道微生物群落结构之间存在差异,其中 1、14 d 低氧组与对应常氧对照组的距离较远,如图 3 所示。

表 3 各组小鼠肠道微生物群落 α 多样性分析 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 3 Alpha diversity analysis of gut microbiota of each group ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Chao 1 index		Shannon index		Simpson index	
	Control	Hypoxia	Control	Hypoxia	Control	Hypoxia
1 d	4261.96 $\pm$ 637.27	4266.93 $\pm$ 835.95	7.17 $\pm$ 0.65	6.99 $\pm$ 0.35	0.96 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.01
3 d	4093.67 $\pm$ 903.95	3962.86 $\pm$ 963.78	6.94 $\pm$ 0.44	6.84 $\pm$ 0.48	0.96 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.01
5 d	3177.21 $\pm$ 922.91	3664.02 $\pm$ 798.55	6.23 $\pm$ 0.63	6.65 $\pm$ 0.37	0.94 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.02
7 d	4036.48 $\pm$ 494.97	4054.31 $\pm$ 887.15	6.85 $\pm$ 0.74	7.39 $\pm$ 0.49	0.96 $\pm$ 0.03	0.98 $\pm$ 0.01
14 d	4020.61 $\pm$ 1210.20	4382.85 $\pm$ 876.95	7.04 $\pm$ 0.48	7.14 $\pm$ 0.31	0.97 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.01
30 d	4042.88 $\pm$ 1063.95	4246.87 $\pm$ 743.19*	7.18 $\pm$ 0.33	7.25 $\pm$ 0.31*	0.97 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.01

Note: compared with the 3 day hypoxia group, * $P<0.05$.

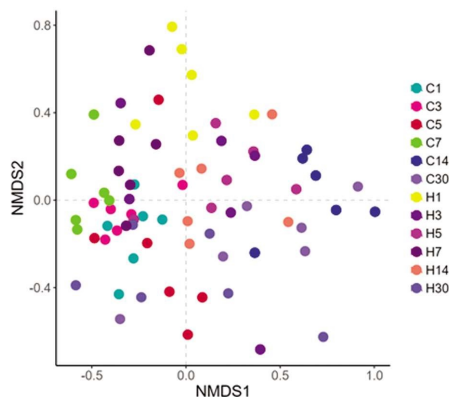


图 3 Bray-Curtis NMDS 分析各组小鼠肠道微生物群落构成

Fig.3 Bray-Curtis NMDS analysis of gut microbiota of each group

2.4.2 肠道微生物群落组间差异性和相对丰度分析 根据物种注释结果,选取各组在分类学水平上相对丰度排名前十的物种,以柱型图展示各组内肠道菌属百分比构成的差异,见图 4。LEfSe 分析研究低氧暴露时间对小鼠肠道菌群构成的影响,发现各低氧组与其常氧对照组在菌属水平上均存在显著差异,见图 5。综合分析发现,在属水平上,普雷沃菌属(*Prevotella*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、颤螺菌属(*Oscillospira*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)和臭气杆菌属(*Odoribacter*)在低氧应激急性期(1-7 d),小鼠肠道微生物群落组成中相对丰度较高且具有显著差异($P<0.05$),普雷沃菌属在低氧应激慢性期(14-30 d),小鼠肠道微生物群落组成中相对丰度较高且具有显著差异($P<0.05$)。

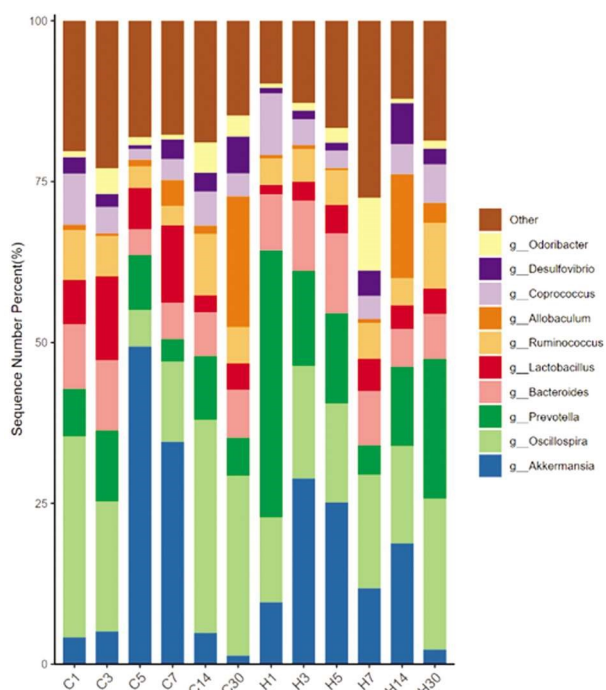


图4 菌属水平上各组小鼠肠道微生物的相对丰度

Fig.4 Community composition of gut microbiota at the level of genus of each group

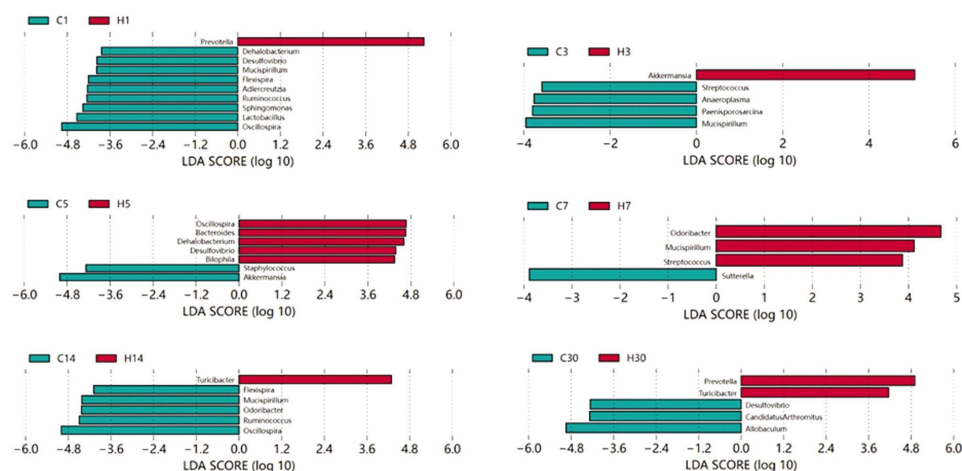


图5 LefSe 分析鉴定各组小鼠肠道显著差异菌属

Fig.5 LefSe analysis of gut microbiota at the genus level of each group

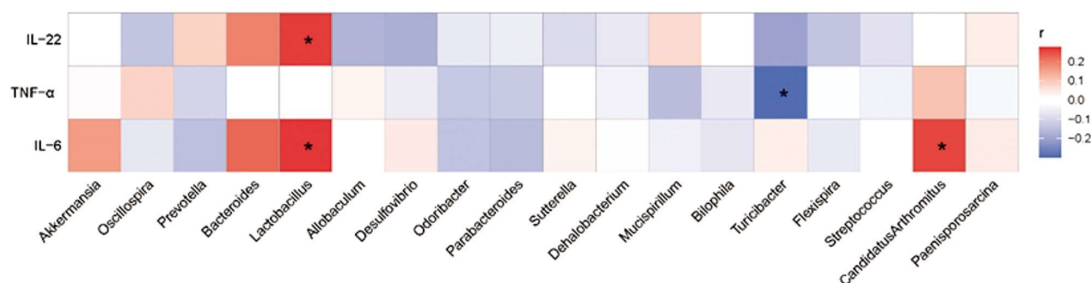


图6 小鼠肠道差异菌属与免疫因子相关性分析

Fig.6 Correlation between immune factor and gut microbiota in mice

Note: The red color representing positive correlation and the blue color representing negative correlation, the darker the color, the higher the correlation coefficient. * $P < 0.05$.

组,Dünnwald T 等认为,人在进入海拔 5000 m 以上的高原环境时,会出现体重下降的现象,这可能是低氧环境下基础代谢

2.4.3 模拟海拔 5000m 环境下小鼠血浆免疫因子与肠道菌群相关分析 为进一步研究低氧环境下小鼠肠道免疫功能与肠道菌群之间的相互作用,将低氧组小鼠全部 18 种存在显著差异的肠道菌属与小鼠免疫因子 IL-6、IL-22 和 TNF- α 进行 Spearman 秩相关性分析,结果如图 6 所示,乳酸杆菌属和 *Candidatus.Arthromitus* 菌属与 IL-6 水平显著正相关($r=0.27$, $P < 0.05$; $r=0.25$, $P < 0.05$),*Turicibacter* 菌属与 TNF- α 水平显著负相关($r=-0.30$, $P < 0.05$),乳酸杆菌属与 IL-22 水平显著正相关($r=0.27$, $P < 0.05$)。

3 讨论

平原人快速进入高原地区后,容易出现胃肠应激反应,严重者会出现消化道出血、溃疡等症状^[8]。胃肠道是人微生物群定植的主要场所,其基因组数量约为人类基因组的 100 倍^[9]。目前已发现,肠道菌群失调与多种生理心理疾病的发生有关^[9]。研究认为高海拔低氧环境有可能引起肠黏膜屏障及其微生物群的变化^[10],但具体机制尚不明确。因此研究低压低氧环境对机体免疫功能、肠道结构及屏障功能、肠道菌群的变化,及其相互作用关系,具有重要的生理和病理生理学意义。

本研究结果显示,模拟海拔 5000 m 低压低氧环境引起小鼠体重在 1-5 d 内急剧下降,各低氧组小鼠体重显著低于常氧

率增加的能量失衡状态导致的,与此同时食欲下降或出现肠道功能受损、能量摄入减少可能会引发能量负平衡,进一步加剧

体重的降低^[11]。不同低氧暴露时间组小鼠的回肠组织形态学结构出现显著改变,小肠上皮绒毛缺失,杯状细胞减少,炎性细胞增多,7 d 低氧组中肠上皮绒毛脱落最为明显,14、30 d 低氧组则开始出现部分肠道新生细胞,及血管代偿性增生,这与 Khanna K 等对 SD 大鼠回肠组织 HE 染色切片分析的结果较为一致^[12]。Zhou 等也发现 SD 大鼠回肠病理学评分随着海拔高度和低氧暴露时间的延长而增加^[13]。以上结果提示,高海拔低氧环境对肠道损害程度与低氧暴露时间存在一定关系。

肠道屏障是阻止病原微生物从肠黏膜入侵机体的重要生理防线,其中由肠上皮细胞、细胞间紧密连接构成的肠道机械屏障最为重要^[14],定位于上皮细胞之间的紧密连接结构,由 zo-1, occludin, claudin-5 等蛋白组成,各紧密连接蛋白表达量的变化,也会影响肠道屏障的完整性^[15]。本研究发现,各低氧组小鼠回肠组织均出现紧密连接 occludin 蛋白的表达量下降,提示海拔 5000 m 低压低氧环境可能导致小鼠肠道黏膜屏障受损,引起肠道稳态失衡。

在外源性刺激下,肠上皮细胞中发生促炎信号级联反应,增加释放破坏肠屏障的细胞因子 TNF- α 和 IL-6,减少形成屏障的细胞因子 IL-22,从而增强肠道通透性^[16]。IL-22 已被证明可减轻代谢紊乱并恢复小鼠的黏膜免疫,有很多研究表明 IL-22 在炎症性肠病患者的肠黏膜中表达增强,IL-22 缺陷型小鼠的结肠微生物群与普通小鼠不同^[17]。有研究发现,海拔 5800 m 以上的低氧环境,可能通过增强促炎细胞因子表达,导致肠黏膜内层的损伤,引发肠道炎症^[18]。Khanna K 等研究认为高海拔(7680 m)低氧环境能通过促进肠道 Th17 免疫,上调 IL-17 细胞因子的反应,引发 SD 大鼠肠道屏障破坏^[12]。本研究则发现,不同低氧暴露时间组小鼠的血浆免疫因子水平组间差异明显,IL-6 水平在 7 d 低氧组显著降低,在 14 d 低氧组显著升高;IL-22 水平在 3 d 低氧组中升高,之后不断降低,逐渐恢复至常氧对照组水平。这提示,随低氧暴露时间的延长,宿主体内可能响应低氧应激机制,习服低氧环境。本研究结果与相关 SD 大鼠的研究较为一致,但高海拔低氧环境引起小鼠肠道炎症和肠道屏障受损的具体机制尚需进一步研究。

通过长期共同进化,人体与肠道菌群之间建立了相互依存关系^[19]。本课题组前期研究发现,模拟海拔 5500 m 低氧应激显著改变了 SD 大鼠的肠道菌群构成,与 HPT 轴激素水平显著相关^[20]。还有类似研究发现,模拟海拔 4500 m 低氧环境显著改变了 SD 大鼠肠道微生物的群落结构,与碳水化合物代谢相关的菌属显著增加^[21]。本研究同样发现,模拟海拔 5000 m 低压低氧环境能显著改变小鼠肠道组织结构和肠道菌群的构成。

LEfSe 分析结果表明,在急、慢性低氧暴露时间组中小鼠肠道普雷沃菌属均有显著变化,有研究指出,普雷沃菌属是久居高原的藏族肠道微生物的优势菌群^[22],也是高海拔牦牛和藏系绵羊的肠道优势菌群^[23]。普雷沃菌属还具有调节免疫的功能^[24],提示可能在低氧诱导的肠道炎症中发挥主要作用。阿克曼氏菌属在肠道中的定植与宿主健康相关,可减轻糖尿病患者的炎症反应,调节机体免疫应答,具有维持肠道屏障完整的功能^[25],是已知的益生菌,且为高海拔藏羚羊肠道微生物的优势菌属^[26]。有研究发现,颤螺菌属的丰度与人体健康情况代谢水平呈正相关,可能具有抑制炎症发生的功能^[27],尚未发现低氧

相关报道,本研究中其在 5 d 低氧组中丰度显著升高,可能提示在低氧应激发生后,颤螺菌属能起到部分肠道保护作用。拟杆菌属可以参与胆汁酸代谢,降低血清胆固醇,并参与宿主免疫调节^[28],其丰度在 5 d 低氧组中显著增加,提示可能参与急性低氧应激期的肠道免疫调节。脱硫弧菌属已被证明为自闭症儿童肠道微生物特征菌群之一,可能与自闭症儿童肠道并发症的密切相关^[29],且在炎症性肠病患者中有较高丰度^[30]。在本研究中其丰度在 5 d 低氧组中显著升高,提示低氧急性期的肠道炎症情况可能在不断加重。臭味杆菌属的主要代谢产物为丁酸,有助于预防肠道疾病,调节肠道微生态平衡。研究发现内脏臭气杆菌(*Odoribacter splanchnicus*)可能参与诱导免疫抑制性 Th17 细胞,抑制结肠癌的发生,具有肠道保护作用^[31],课题组前期研究同样发现低氧应激能引起臭味杆菌属丰度显著增加,推测其可能在宿主肠道代谢调节中起重要作用^[20]。

相关性分析发现,海拔 5000 m 低氧环境下,小鼠肠道菌群中有部分显著差异菌属与血浆免疫因子水平存在显著相关性,其中乳酸杆菌属与 IL-6、IL-22 水平均具有正相关关系。乳酸杆菌属为已知重要益生菌,广泛存在于人体的肠道中。已有研究发现,罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)可以与 IL-22 协同发挥作用,促进肠道干细胞再生,保护肠黏膜完整性^[32]。上述结果提示,在高海拔低氧环境下,可能发生肠道菌群与免疫因子的相互调节作用,影响宿主肠道屏障的完整性。

本研究结果提示,模拟海拔 5000 m 低压低氧环境显著改变 C57BL/6 小鼠肠道组织结构及其屏障功能和肠道菌群组成,肠道菌群的变化与免疫因子水平显著相关,这些变化与低氧暴露时间相关,是小鼠低氧应激响应肠道功能的适应性变化。肠道菌群失调可能通过影响宿主肠道免疫功能,加剧肠道炎症的发生,从而破坏肠道屏障完整性,但具体的分子机制仍需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Davis C, Hackett P. Advances in the Prevention and Treatment of High Altitude Illness [J]. Emergency Medicine Clinics of North America, 2017, 35(2): 241-260
- [2] Khanna K, Mishra K P, Ganju L et al. High-Altitude-Induced alterations in Gut-Immune Axis: A review [J]. International Reviews of Immunology, 2018, 37: 119-126
- [3] Tsung-Chun Lee, Yi-Chen Huang, Yen-Zhen Lu, et al. Hypoxia-induced intestinal barrier changes in balloon-assisted enteroscopy [J]. The Journal of Physiology, 2018, 596(15): 3411-3424
- [4] Wang H, Zhang W, Zuo L, et al. Intestinal dysbacteriosis contributes to decreased intestinal mucosal barrier function and increased bacterial translocation [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58 (4): 384-392
- [5] Luo H, Zhou D, Chen Z, et al. Establishment and evaluation of an experimental rat model for highaltitude intestinal barrier injury [J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 13(2): 475-482
- [6] Dinan TG, Cryan JF. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health [J]. Psychosomatic Medicine, 2017, 79(8): 920-926
- [7] Li K, Dan Z, Gesang L, et al. Comparative analysis of gut microbiota of native Tibetan and Han populations living at different altitudes [J]. PloS one, 2016, 11(5): e0155863

- [8] 张久聪, 杨永林, 马香芝, 等. 驻格尔木高原官兵急进高原胃肠道应激反应调查研究[J]. 西北国防医学杂志, 2015, 036(008): 517-519
- [9] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464 (7285): 59-65
- [10] Adak A, Maity C, Ghosh K, et al. Dynamics of predominant microbiota in the human gastrointestinal tract and change in luminal enzymes and immunoglobulin profile during high-altitude adaptation [J]. Folia Microbiol (Praha), 2013, 58: 523-528
- [11] Dünnwald T, Gatterer H, Faulhaber M, et al. Body Composition and Body Weight Changes at Different Altitude Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 430
- [12] Khanna K, Mishra K P, Ch Anda S, et al. Effects of Acute Exposure to Hypobaric Hypoxia on Mucosal Barrier Injury and the Gastrointestinal Immune Axis in Rats [J]. High Altitude Medicine & Biology, 2019, 20(1): 35-44
- [13] 周静, 许琴, 刘江伟, 等. 不同海拔高原低压缺氧环境下大鼠肠道病理损伤特点[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(27): 5238-5241+5250
- [14] Kayama H, Okumura R, Takeda K. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine[J]. Annual Review of Immunology, 2020, 38(1): 23-48
- [15] Chaithanya C, Jaewang G, Ho R S. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2018, 50(8): 1-9
- [16] Soderholm A T, Pedicord V A. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity[J]. Immunology, 2019, 158(4): 267-280
- [17] Keir M E, Yi T, Lu T T, et al. The role of IL-22 in intestinal health and disease [J]. Journal of Experimental Medicine, 2020, 217(3): e20192195
- [18] Zhang F, Wu W, Deng Z, et al. High altitude increases the expression of hypoxia-inducible factor 1 α and inducible nitric oxide synthase with intestinal mucosal barrier failure in rats.[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(5): 5189-5195
- [19] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(1): 55-71
- [20] 谢亚磊, 梅颂, 熊艳蕾, 等. 模拟海拔 5500m 低压低氧环境对大鼠 HPT 轴和肠道菌群的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(05): 432-437+531
- [21] 马燕, 马爽, 尚春香, 等. 低氧暴露对大鼠肠道微生物群落的影响 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(01): 120-129
- [22] Lan DL, Ji WH, Lin BS, et al. Correlations between gut microbiota community structures of Tibetans and geography [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 16982
- [23] Zhang ZG, Xu DM, Li W, et al. Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals[J]. Current Biology, 2016, 26 (14): 1873-1879
- [24] Didier N, Gilbert H J. Biochemistry of Complex Glycan Depolymerisation by the Human Gut Microbiota[J]. Fems Microbiology Reviews, 2018, 42(2): 146-164
- [25] Naito Y, Uchiyama K, Takagi T. A next-generation beneficial microbe: Akkermansia muciniphila [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2018: 18-57
- [26] Bai X, Lu S, Yang J, et al. Precise Fecal Microbiome of the Herbivorous Tibetan Antelope Inhabiting High-Altitude Alpine Plateau [J]. Front Microbiol, 2018, 28: 2321-2333
- [27] Kim M H, Yun K E, Kim J, et al. Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 19417
- [28] Wexler A G, Goodman A L. An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome [J]. Nature Microbiology, 2017, 2(5): 17026
- [29] Simpson C A, Artech C D, Eliby D, et al. The gut microbiota in anxiety and depression -A systematic review [J]. Clinical Psychology Review, 2021, 83: 101943
- [30] Humbel F, Rieder JH, Franc Y, et al. Association of Alterations in Intestinal Microbiota With Impaired Psychological Function in Patients With Inflammatory Bowel Diseases in Remission [J]. Clinical gastroenterology and hepatology, 2020, 18(9): 2019-2029
- [31] Xing C, Wang M, Ajibade AA, et al. Microbiota regulate innate immune signaling and protective immunity against cancer [J]. Cell host & microbe, 2021, 29(6): 959-974
- [32] Hou Q, Ye L, Liu H, et al. Lactobacillus accelerates ISCs regeneration to protect the integrity of intestinal mucosa through activation of STAT3 signaling pathway induced by LPLs secretion of IL-22[J]. Cell Death & Differentiation, 2018, 25(9): 1657-1670