

• 论 著 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.07.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210225.1525.018.html\(2021-02-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210225.1525.018.html(2021-02-25))

高通量测序研究不同程度间歇性低氧致大鼠肠道微生物菌群改变^{*}

李 雯^{1,2},赵 丹^{1,2},万自芳^{1,2},张湘燕^{1,2△}

(1. 贵州医科大学,贵阳 550004;2. 贵州省人民医院呼吸与危重症医学科/
贵州省人民医院肺脏免疫性疾病重点实验室,贵阳 550002)

[摘要] **目的** 研究不同程度间歇性低氧(CIH)导致大鼠肠道菌群改变。**方法** 分别建立 4 周、8 周 CIH 大鼠模型与对照组,留取各组大鼠粪便样品,利用 Illumina MiSeq PE300 平台进行高通量测序,测定所有粪便细菌的 16SrRNA 基因 V3、V4 区序列,使用 Qimme 软件分析菌群物种分类、物种多样性指数、样本间差异和各组生物学标志物。**结果** 高通量测序及相关分析显示,低氧状态下大鼠肠道菌群较对照组大鼠发生明显改变。间歇性低氧增加了 α 多样性(shannon 指数、simpson 指数, $P<0.05$),引起肠道菌群的改变(β 多样性的非参数多元方差分析, $P<0.05$)。间歇性低氧暴露的大鼠较对照组表现出更多的梭菌目、毛螺菌科、瘤胃球菌科等和更少的乳酸杆菌。**结论** 间歇性缺氧改变了大鼠粪便微生物群的组成和多样性,使得肠道菌群紊乱,进而引发一系列疾病的发生。

[关键词] 间歇性低氧;肠道菌群紊乱;高通量测序;大鼠

[中图法分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)07-1087-07

High throughput sequencing for studying changes of intestinal microflora in rats caused by different degrees of intermittent hypoxia^{*}

LI Wen^{1,2},ZHAO Dan^{1,2},WAN Zifang^{1,2},ZHANG Xiangyan^{1,2△}

(1. Guizhou Medical University,Guiyang,Guizhou 550004,China;2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine,Guizhou Provincial People's Hospital/Key Laboratory of Pulmonary Immune Diseases,Guizhou Provincial People's Hospital,Guiyang,Guizhou 550002,China)

[Abstract] **Objective** To study the changes of rat intestinal microflora caused by different degrees of intermittent hypoxia. **Methods** The 4-week and 8-week intermittent hypoxic rat models and the control group rats were established respectively. The fecal samples of each group were collected. The high-throughput sequencing was performed by using the Illumine MiSeq PE300 platform. The sequences of V3 and V4 regions of 16SrRNA gene of all fecal bacteria were determined. The species classification,species diversity index,differences among samples and biomarkers of each group were analyzed with the Qimme software. **Results** The high-throughput sequencing and correlation analysis showed that the rat intestinal flora in hypoxia status had significant change compared with the control group. The intermittent hypoxia increased α diversity (shannon index,simpson index, $P<0.05$),and caused the changes of intestinal flora (nonparametric multivariate analysis of β diversity, $P<0.05$). The rats exposed to intermittent hypoxia showed more clostridiales,lachnospiraceae,ruminococcus,and fewer lactobacillus compared with those in the control group. **Conclusion** Intermittent hypoxia changes the composition and diversity of fecal microbiota,which leads to the disorder of intestinal microbiota and the occurrence of a series of diseases.

[Key words] intermittent hypoxia;intestinal flora disorder;high throughput sequencing;rats

慢性间歇性低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)是阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstruc-

^{*} 基金项目:贵州省科技计划项目(黔科[2016]支撑 2907);贵州省人民医院青年基金项目(GZSYQN[2016]16 号)。 作者简介:李雯(1994—),在读硕士,主要从事呼吸病学研究。 △ 通信作者,E-mail:Zxy35762@126.com。

tive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)特有的特殊低氧模式^[1]。OSAHS 是临床常见的综合征,目前普遍认为其是一种全身性疾病,可致多器官损害,是高血压的致病因素,也是中风、缺血性心脏病、心力衰竭、心律失常、糖尿病等疾病的独立危险因素^[2]。肠道微生物作为人或动物的“共生体”,辅助宿主进行营养吸收和能量代谢^[3]。正常生理状态下肠黏膜处于高灌注状态,对缺血、缺氧十分敏感,机体整体或肠道缺血、缺氧的状态会直接损伤肠黏膜,进一步影响肠道微生物的定殖^[4]。CIH 所致睡眠剥夺可引起多种应激反应,目前认为肠道菌群移位所致的菌血症和毒素血症是应激反应恶性发展的主要原因,睡眠剥夺可影响大鼠肠道菌群,促进有害的产气荚膜梭菌增殖^[5]。本研究采用高通量测序研究不同程度 CIH 条件下大鼠肠道微生物菌群的变化。

1 材料与方法

1.1 建模及分组

选取健康清洁级雄性 Sprague Dawley 大鼠 30 只分为 CIH 组[A 组(O_2 8% 4 周)、B 组(O_2 8% 8 周)]和对照组,每组 10 只。CIH 组大鼠循环给予氮气和氧气充入培养舱,每次循环 2 min,维持氧浓度在 8% 30 s,恢复氧浓度 21% 60 s,每天造模 8 h;A 组造模 4 周,B 组造模 8 周。对照组放置于常氧环境饲养 8 周。留取大鼠粪便样品,用 75%乙醇消毒大鼠肛周皮肤,刺激其排便,使用灭菌镊子从大鼠肛门口取出粪便保存于无菌 EP 管,随后迅速投入液氮,−80℃保存至备用。B 组大鼠饲养过程中死亡 2 只,对总体实验测序无影响。

1.2 测序方法

根据 E. Z. N. A.® soil 试剂盒对大鼠肠道样品进行 DNA 抽提,DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量;338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3、V4 可变区进行 PCR 扩增,扩增程序:95℃预变性 3 min,27 个循环(95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s),最后 72℃延伸 10 min,PCR 仪采用 ABI GeneAmp® 9700 型。扩增体系:20 μL,4.0 μL 5×FastPfu 缓冲液,2.0 μL 2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μL 引物(5 μmol/L),0.4 μL FastPfu 聚合酶,补 ddH₂O 至 20 μL;10 ng DNA 模板。Illumina MiSeq 测序,2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(美国 Axygen Biosciences 公司)进行纯化,Tris-HCl 洗脱,2%琼脂糖电泳检测。Quantifluor™-ST (美国 Promega 公司)进行定量检测。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩

增片段构建 PE300 的文库。构建文库步骤:(1)连接“Y”字形接头;(2)使用磁珠筛选去除接头自连片段;(3)利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;(4)氢氧化钠变性,产生单链 DNA 片段。采用美国 Illumina MiSeq PE300 平台进行测序。

1.3 生物信息分析

(1)生物信息分析的流程分析使用 QIIME2 推荐的 DADA2 方法,其插件对所有样品的全部原始序列(input)进行质量控制(filtered),去噪(纠正测序错误的序列,denoised),拼接(merged),并且去嵌合体(non-chimeric),形成 OTU。OTU 被称为扩增特征序列(ASV),以韦恩图表示两组特有或共有的 OTU 个数。将总 OTU 与数据库比对,对物种在不同分类水平上进行注释,以 profiling 柱状图表示两组物种的相对丰度。(2)LEfSe 方法是非参数检验和线性判别分析的结合,适合菌群丰度差异检验;LEfSe 寻找每一个分组的特征微生物(LDA 大于阈值的微生物,阈值为 2,每一横向柱形体代表一个物种,柱形体的长度对应 LDA 值,LDA 值越高则差异越大。柱形的颜色对应该物种是哪个分组的特征微生物,特征微生物表示在对应分组中的丰度相对较高),也就是相对于其他分组,在这个组中丰度较高的微生物组成。(3)α 多样性分析是基于 OTU 分析结果,可反映菌群丰度和多样性,包括 chaol、observed-outs、shannon、simpson、ace 和 faith-pd 等指数来评估某个样本的物种多样性,指数越高,表明样本的多样性越复杂。其中 shannon 用于估算样本微生物多样性,它的计算考虑到样品中的分类总数和每个分类所占的比例,在得到整体的 Alpha 多样性指数之后用非参数 Kruskal Wallis 检验方法比较其在各个样品分组之间是否有显著性差异。(4)β 多样性分析是对不同样品间的微生物群落构成进行比较。对每个样品的 OTU 信息构建了未加权的 Unifrac 距离矩阵(unweightedUnifrac distance matrix)。基于这一矩阵进行主成分分析,点与点之间的距离表示样本菌群差异程度,两点之间的距离越近,表明两个样本之间的微生物群落结构相似度越高,差异越小。在得到整体的 Beta 多样性指数之后,接下来结合分组信息运用非参数多元方差分析(PERMANOVA)比较在各个样品分组之间的微生物组成结构是否有显著性差异。

1.4 统计学处理

采用 SPSS25.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OTU 和丰度分析

在数据按照 barcode 拆分之后每个样品的实际序列为 1 540 848 条序列,平均每个样品为 55 030 条。对照组大鼠 OTU 为 890 条,A、B 组分别为 1 289、1 126 条,见图 1。根据物种注释结果,各样本物种在门、属水平分类中组成柱状图,可见各样本丰度较高的物种及其比例(图 2、3)。门水平:CIH 组大鼠共有的优势菌门且丰度从高到低依次为厚壁菌门(Firmicutes)70%、拟杆菌门(Bacteroidetes)22%、螺旋体门(Spirochaetes)3%、放线菌门(Actinobacteria)3%、变形菌门(Proteobacteria)1.2%、TM7 1.2%,对照组大鼠共有的优势菌门且丰度从高到低依次为厚壁菌门(Firmicutes)73%、拟杆菌门(Bacteroidetes)25%、螺旋体门(Spirochaetes)0.1%、放线菌门(Actinobacteria)0.5%、变形菌门(Proteobacteria)0.6%、TM7 0.2%。属水平:CIH 组大鼠共有的优势菌群丰度从高到低依次为乳酸菌(Lactobacillus)25%、Unspecified_S24_7 10%、未指明的梭菌目(Unspecified_Clostridiales)10%、未指明的毛螺菌科(Unspecified_Lachnospiraceae)6%、瘤胃球菌属(Ruminococcus)5%、未指明的瘤胃球菌科(Unspecified_Ruminococcaceae)4%、未指明的消化链球菌科(Unspecified_Peptostreptococcaceae)4%、普雷沃菌属(Prevotella)4%、普氏菌-1(Prevotella_1)3%、颤螺旋体菌属(Oscillospira)3%、未指明的梭菌科(Unspecified_Clostridiaceae)3%、密螺旋体属(Treponema)3%、拟杆菌属(Bacteroides)2%、苏黎世杆菌属(Turicibacter)2%、粪球菌属(Coprococcus)1%、未指明的 F16(Unspecified_F16)1%、蜚蠊目(Blautia)1%、Dorea 1%,对照组大鼠共有的优势菌群丰度从高到低依次为乳酸菌(Lactobacillus)46%、Unspecified_S24_7 12%、普雷沃菌属(Prevotella)8%、未指明的梭菌目(Unspecified_Clostridiales)6%、未指明的毛螺菌科(Unspecified_Lachnospiraceae)4%、瘤胃球菌属(Ruminococcus)3%、未指明的瘤胃球菌科(Unspecified_Ruminococcaceae)3%、未指明的消化链球菌科(Unspecified_Peptostreptococcaceae)3%、普氏菌-1(Prevotella_1)3%、颤螺旋体菌属(Oscillospira)2%、未指明的梭菌科(Unspecified_Clostridiaceae)2%、未指明的拟杆菌属(Unspecified_Bacteroidales)1%。

2.2 OTU 差异性分析

门水平 LEfSe 差异分析:在 CIH 组起主要作用的微生物群为螺旋体门(Spirochaetes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria),见图 4。CIH 组大鼠肠道菌群丰度较高的有梭菌目、瘤胃球菌科、螺旋体纲、螺旋体门、螺旋体目、密螺旋体属、毛螺菌科等;对照组大鼠肠道菌群丰度较高的有乳酸杆菌

科、乳杆菌属、乳杆菌目、杆菌纲、普雷沃氏菌属等,两组属水平肠道菌群有显著差异,见图 5。随着低氧时间延长,肠道菌群多样性越大,见图 6~8。

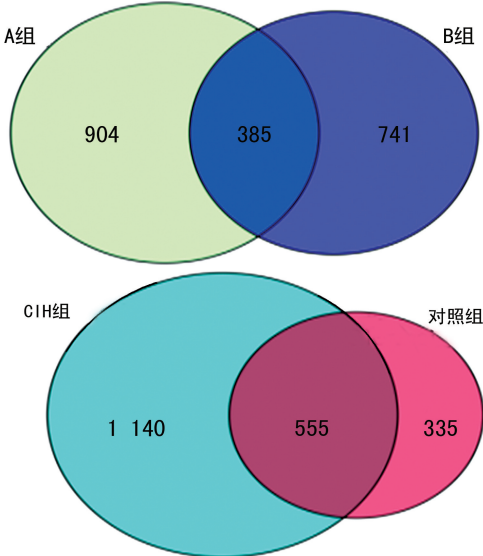
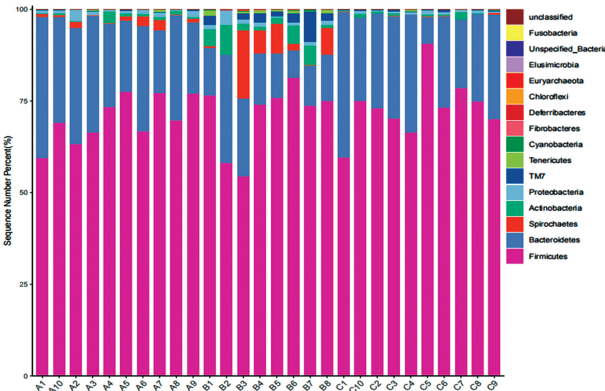
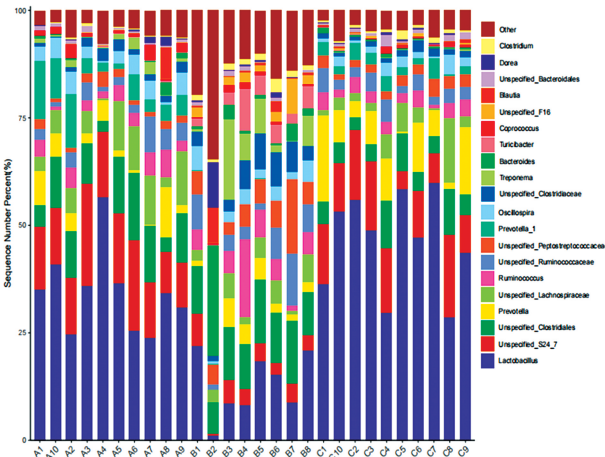


图 1 各组大鼠 OTU 韦恩图



A1~A10:A 组;B1~B8:B 组;C1~C10:对照组。

图 2 各组大鼠在门水平上物种的相对丰度



A1~A10:A 组;B1~B8:B 组;C1~C10:对照组。

图 3 各组大鼠在属水平上物种的相对丰度

2.3 α 多样性分析

对照组大鼠 shannon 指数与 simpson 指数与 A 组、B 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随着低

氧时间延长,差异越大。A 组和 B 组大鼠 shannon 指数差异无统计学意义($P>0.05$),图 9~11,表 1、2。

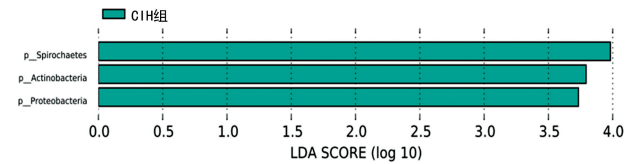


图 4 门水平 LefSe 分析 LDA 柱形图

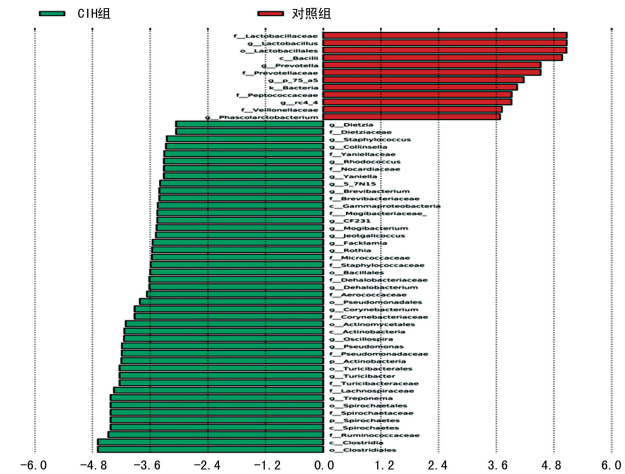


图 5 CHI 组和对照组属水平 LefSe 分析 LDA 柱形图

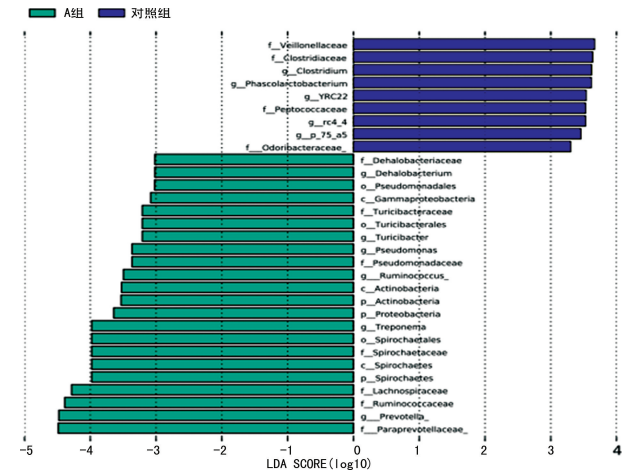


图 6 A 组和对照组属水平 LefSe 分析 LDA 柱形图

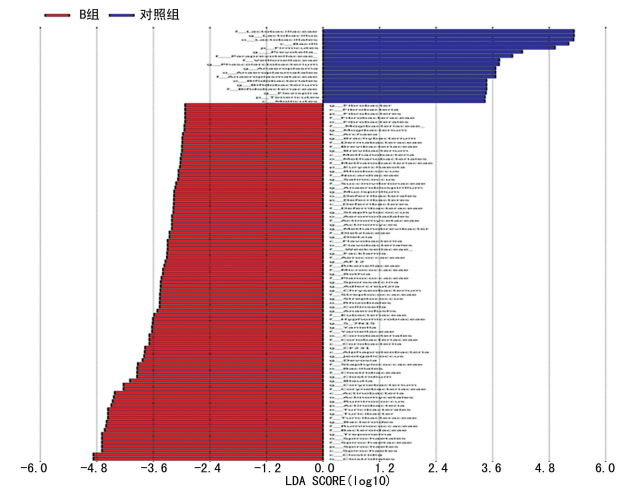


图 7 B 组和对照组属水平 LefSe 分析 LDA 柱形图

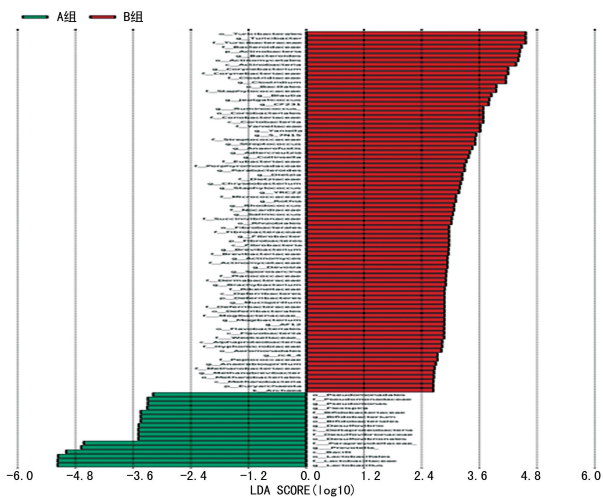


图 8 A 组和 B 组属水平 LefSe 分析 LDA 柱形图

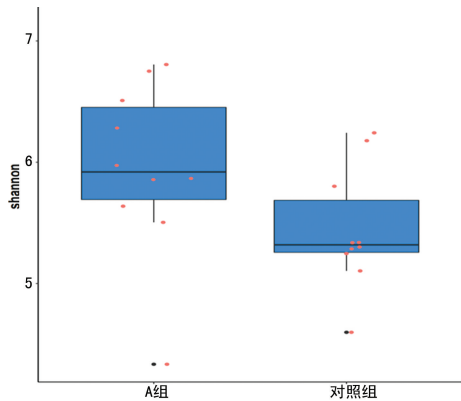


图 9 A 组和对照组 shannon 指数的箱型图

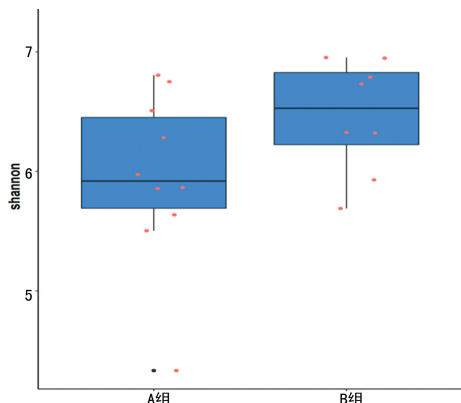


图 10 A 组和 B 组 shannon 指数的箱型图

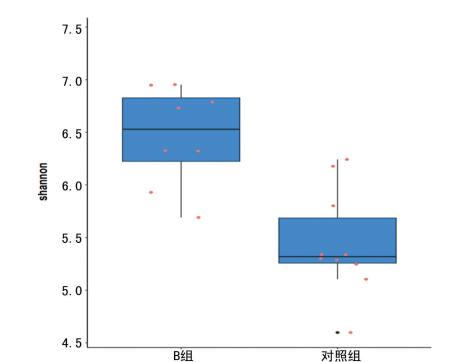


图 11 B 组和对照组 shannon 指数的箱型图

表 1 各组大鼠肠道微生物群落 α 多样性分析						
样品	observed- otus	chaol	shannon	faith- pd	simpson	ace
A1	289	289.0	5.97	19.00	0.95	289.0
A2	336	336.0	6.75	19.46	0.97	336.0
A3	227	227.0	5.87	16.28	0.94	227.0
A4	145	145.0	4.33	13.33	0.83	145.0
A5	213	213.0	5.86	16.04	0.94	213.0
A6	218	218.0	6.28	15.06	0.96	218.0
A7	274	274.0	6.81	18.26	0.98	274.2
A8	191	191.0	5.64	15.35	0.94	191.0
A9	234	234.0	6.51	16.62	0.97	234.0
A10	191	191.0	5.50	15.18	0.93	191.0
B1	459	459.0	6.95	26.53	0.98	459.0
B2	222	222.0	5.93	14.84	0.97	222.0
B3	417	417.0	6.79	25.12	0.97	417.2
B4	347	347.0	6.33	23.51	0.97	347.0
B5	318	318.0	6.32	21.93	0.97	318.2
B6	464	464.0	6.95	27.54	0.98	464.3
B7	296	296.0	5.69	20.69	0.94	296.0
B8	413	413.0	6.73	23.58	0.97	413.6
C1	216	216.0	5.25	15.03	0.92	216.0
C2	243	243.0	4.60	18.56	0.81	243.0
C3	270	270.0	5.80	18.45	0.93	270.0
C4	316	316.0	6.24	18.89	0.95	316.0
C5	238	238.0	5.34	17.09	0.93	238.0
C6	258	258.0	5.34	17.95	0.93	258.0
C7	205	205.0	5.10	14.89	0.93	205.1
C8	304	304.0	6.18	18.75	0.95	304.0
C9	224	224.0	5.30	16.54	0.92	274.0
C10	276	276.0	5.29	18.69	0.90	276.1

A:A 组;B:B 组;C:对照组。

表 2 两组大鼠各指数比较($\bar{x} \pm s$)					
指数	CIH 组($n=18$) 对照组($n=10$)		t	P	
observed-otus	291.94±22.88	255.00±36.84	1.62	0.120	
chaol	291.94±22.88	255.00±36.84	1.62	0.120	
shannon	6.18±0.16	5.44±0.50	3.08	0.005	
faith-pd	19.35±4.43	17.49±1.53	1.62	0.118	
simpson	0.95±0.35	0.92±0.40	2.50	0.020	
ace	291.94±22.88	255.00±36.84	1.62	0.120	

2.4 β 多样性分析

对照组与 CIH 组主成分分析显示,前两个主成分分别解释了总变量的 32.8%和 9.4%,见图 12。在 X 轴的方向上两组大鼠肠道菌群相距较远,低氧造成菌群差异较大。各个样品分组之间微生物菌群有显著差异,见图 13。

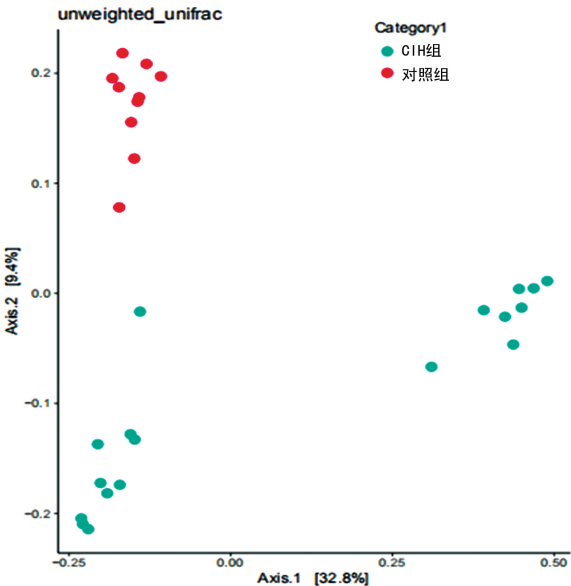
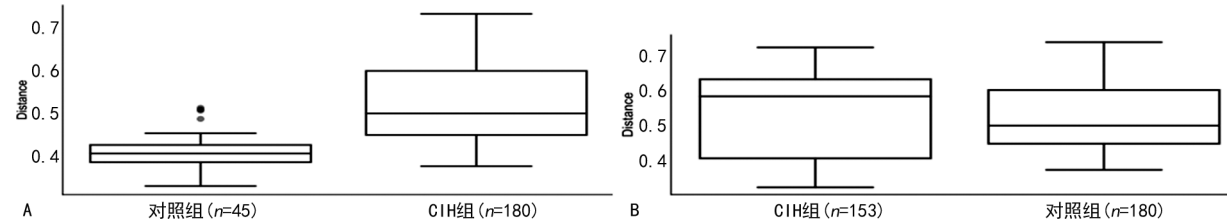


图 12 两组肠道菌群的主成分分析



A:CIH 组对对照组箱型图;B:对照组对 CIH 组箱型图。

图 13 两组样品之间的距离绘制箱型图

3 讨 论

人体消化道中存在丰富的绒毛、微绒毛,微生物可以通过分泌黏液因子在其中定殖。人体肠道中有约 100 万亿个细菌,生理状况下,各系统、器官的相互协调、肠道特有的屏障功能保护,细菌和各类有毒物质不会对机体产生伤害。如果这些屏障遭到破坏,微生态平衡被打破,细菌和各种毒素可穿过肠壁,侵入

机体各个系统及器官,如淋巴结、血液、肝、脾等,即肠道菌群移位。人或动物的肠黏膜处于高灌注状态,因此对缺血、缺氧十分敏感。机体整体或肠道缺血、缺氧的状态会直接损伤肠道黏膜系统,导致肠道微生物菌群发生改变、菌群移位^[6-8]。CIH 是 OSAHS 的一种低氧模式,机体反复发生低氧、复氧过程中,可能引起类似缺血-再灌注的病理生理改变,产生大量的活性

氧(reactive oxygen species, ROS),进一步激活炎症反应,引起全身性效应。笔者通过肠道菌群高通量测序发现对照组大鼠肠道菌群结构与 CIH 组有显著差异。属水平 CIH 组大鼠肠道菌群丰度较高的有梭菌目、瘤胃球菌科、螺旋体纲、螺旋体门、螺旋体目、密螺旋体属、毛螺菌科等,对照组大鼠肠道菌群丰度较高的有乳酸杆菌科、乳杆菌属、乳杆菌目、杆菌纲、普雷沃氏菌属、普雷沃氏菌科等。从以上可看出,低氧条件下大鼠肠道菌群发生改变,有害细菌增殖,益生菌减少。CIH 所致肠道菌群改变类似于现代“肺-肠”轴理论的变化,它是肺部与肠道的双向连接,故肺部发生疾病时,肠道微生物也会产生影响。就如同中医有“肺病治肠、肠病治肺、肺肠同治”的观念。肠道是人体微生物菌群最丰富的地方,虽然下呼吸道细菌少之又少但其菌群组成上与肠道相似。共同黏膜反应观点指出机体在一个黏膜部位接收抗原递呈细胞刺激后,细胞可以迁移至其他黏膜部位,肠道菌群的微生态可以从局部影响全身的免疫反应,从而影响肺黏膜^[9]。微生物群与固有免疫系统的模式识别受体相互作用,调节炎症反应和固有免疫反应。其次肠道菌群代谢产生如乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐等短链脂肪酸,其可以通过激活核因子- κ B 信号通路影响免疫细胞迁移、激活、增殖和凋亡,从而发挥抗炎作用,诱导产生调节性 T 细胞,调节免疫功能,预防过敏性气道炎症的发生^[10-11]。益生菌可以通过对免疫细胞发挥直接作用,促进健康的代谢物的释放,进一步影响微生物群。THORBURN 等^[12]实验研究通过高纤维或乙酸盐喂养小鼠,增加了肺组织中调节 T 细胞数量和功能,抑制过敏性气道疾病。有实验研究建立脓毒血症老鼠模型,在实验性脓毒症结束后,通过细菌 16S 核糖体 RNA 编码基因的测序发现肺群落以存活的肠道相关细菌为主,表明肺微生物群的肠-肺易位和改变可能是脓毒症和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发病的共同机制^[13]。有关文献报道将大鼠建立睡眠剥夺模型,分为模型组及对照组,结果显示模型组肠道内产气荚膜梭菌数量增加,而其他菌群数量如大肠杆菌、双歧杆菌、乳酸杆菌则呈现不同程度下降^[14]。

有研究推断毛螺菌在无菌受者中,毛螺菌株的定植,导致空腹血糖升高、肝脏和肠系膜脂肪组织重量增加、血浆胰岛素水平降低等,从而推测毛螺菌促进细菌脂多糖移位从消化道进入血液^[15]。有研究发现睡眠碎片化小鼠引起食物摄入增加和可逆的肠道微生物群变化,其特征是毛螺菌和瘤胃球菌的细菌成员优先生长,乳酸杆菌科减少,这些导致全身和内脏白色脂肪组织炎症,进一步导致肠道上皮屏障破坏^[16]。

有关研究发现益生菌如乳酸杆菌能产生 β -葡聚糖,使小肠黏膜上皮细胞表面的黏液更加黏稠,并且更能耐受外界各种有害物质及致病菌对肠道黏膜的损伤^[17]。本实验中通过 OUT 丰度分析发现,属水平 CIH 组大鼠乳酸菌(25%)远低于对照组(46%)。

Treg 缺失介导的自身免疫性疾病模型小鼠的肠道菌群进行基因检测,结果发现小鼠模型肠道菌群发生了严重的紊乱,根据肠道菌群和代谢组谱的变化,选择罗伊氏乳酸杆菌和代谢产物肌苷处理 Treg 缺失小鼠,罗伊氏乳酸杆菌和肌苷通过激活腺苷受体 A2AR 抑制了 Treg 缺失引起的自身免疫性疾病^[18]。随着人们生活质量的提高,OSAHS 确诊率的提高,目前越来越多的研究证实 OSAHS 并不是孤立的疾病,其与机体代谢、免疫、心血管系统疾病、肠道菌群紊乱密切相关。因此,更深入认识“肺-肠”轴之间的相关性,将会是了解 OSAHS 整个过程中肠道菌群的变化规律的切入点,深入研究肠道菌群改变对机体的影响,通过调节肠道菌群紊乱进一步纠正慢性 CIH 症状,有望成为治疗 OSAHS 及各种相关疾病的靶点。

参考文献

[1] RANDERATH W, BASSETTI C L, BONSIG NORE M R, et al. Challenges and perspectives in obstructive sleep apnoea: report by an ad hoc working group of the sleep disordered breathing group of the European respiratory society and the European sleep research society[J]. Eur Respir J, 2018, 52(3):1702616.

[2] 何权瀛, 王莞尔. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(基层版)[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2015, 14(4):398-405.

[3] KUNDU P, BLACHER E, ELINAV E, et al. Our gut microbiome: the evolving inner self[J]. Cell, 2017, 171(7):1481-1493.

[4] TAYLOR C T, COLGAN S P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(12):774-785.

[5] JAVAHERI S, BARBE F, CAMPOS-RODRIGUEZ Z, et al. Sleep apnea: types, mechanisms, and clinical cardiovascular consequences[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 69(7):841-858.

[6] ADAK A, MAITY C, GHOSH K, et al. Dynamics of predominant microbiota in the hu-

- man gastrointestinal tract and change in luminal enzymes and immunoglobulin profile during high-altitude adaptation [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2013, 58(6): 523-528.
- [7] ADAK A, GHOSH K, MONDAL K C. Modulation of small intestinal homeostasis along with its microflora during acclimatization at simulated hypobaric hypoxia [J]. *Indian J Exp Biol*, 2014, 52(11): 1098-1105.
- [8] ADAK A, MAITY C, GHOSH K, et al. Alteration of predominant gastrointestinal flora and oxidative damage of large intestine under simulated hypobaric hypoxia [J]. *Z Gastroenterol*, 2014, 52(2): 180-186.
- [9] WANG J, LI F, TIAN Z. Role of microbiota on lung homeostasis and diseases [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(12): 1407-1415.
- [10] TROMPETTE A, GOLLWITZER E S, YADAVA K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis [J]. *Nat Med*, 2014, 20(2): 159-166.
- [11] SMITH P M, HOWITT M R, PANIKOV N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis [J]. *Science*, 2013, 341(6145): 569-573.
- [12] THORBURN A N, MCKENZIE C I, SHEN S, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7320.
- [13] DICKSON R P, SINGER B H, MICHAEL W. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(10): 16113.
- [14] 王慧, 张艳鹤, 杨记康, 等. 小檗碱调节睡眠剥夺大鼠的肠道菌群结构以及 Th17/Treg 细胞平衡 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(6): 860-864.
- [15] KAMEYAMA K, ITOH K. Intestinal colonization by a Lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice [J]. *Microbes Environ*, 2014, 29(4): 427-430.
- [16] POROYKO V A, CARRERAS A, KHALYFA A, et al. Chronic sleep disruption alters gut microbiota, induces systemic and adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35405.
- [17] 田鹤, 张萍, 郭敏. IV 型胶原在胚胎小鼠肾脏发育过程中的表达 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2008, 13(4): 276-279.
- [18] 何宝坤. 基于肠道菌群发现用于治疗 Treg 缺失免疫缺陷病的新药 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 750.

(收稿日期: 2020-08-15 修回日期: 2020-12-21)