



# 持续低氧条件下大鼠肠道微生物变化及其与心肌损伤的关联研究

王珍<sup>1,2#</sup>, 周亚洲<sup>2#</sup>, 王立坤<sup>2#</sup>, 黄自然<sup>2</sup>, 常宇骁<sup>2</sup>, 侯凤仪<sup>2</sup>, 张欢<sup>2</sup>, 凌慧<sup>2,3</sup>, 孙一凡<sup>2</sup>, 谭亚芳<sup>2</sup>, 杨瑞馥<sup>2</sup>, 毕玉晶<sup>2\*</sup>, 潘志远<sup>2\*</sup>

1 赣南医学院公共卫生与健康管理学院, 江西 赣州 341000

2 军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物与生物安全国家重点实验室, 北京 100071

3 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230000

王珍, 周亚洲, 王立坤, 黄自然, 常宇骁, 侯凤仪, 张欢, 凌慧, 孙一凡, 谭亚芳, 杨瑞馥, 毕玉晶, 潘志远. 持续低氧条件下大鼠肠道微生物变化及其与心肌损伤的关联研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3054-3067.

WANG Zhen, ZHOU Yazhou, WANG Likun, HUANG Ziran, CHANG Yuxiao, HOU Fengyi, ZHANG Huan, LING Hui, SUN Yifan, TAN Yafang, YANG Ruifu, BI Yujing, PAN Zhiyuan. Alterations in gut microbiota and their associations with cardiac injury in rats after exposure to continuous normobaric hypoxia[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3054-3067.

**摘要:** 【目的】研究持续性常压低氧对大鼠肠道微生物的影响, 并分析其与低氧性心肌肥厚的关联性。【方法】雌性无特异性病原体(specific-pathogen-free, SPF)级 SD (Sprague-Dawley)大鼠, 按随机数字表法分为 2 组: 常氧组和低氧组。实验开始后, 低氧组大鼠置于低氧舱中, 氧气浓度设定为 10%, 持续暴露 30 d, 常氧组大鼠正常条件饲养。每天记录大鼠体重, 并于低氧前(0 d)和低氧后(30 d)分别收集粪便进行 16S rRNA 基因扩增子测序, 测定肠道微生物组的变化。实验结束后进行血常规、血生化和器官指数分析; 采用实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测右心室组织中 4 种分子标志物心房利钠肽基因(atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽基因(brain natriuretic peptide, BNP)、心肌肌球蛋白重链 6 基因(myosin heavy chain 6, Myh6)、心肌肌球蛋白重链 7 基因(myosin heavy chain 7, Myh7)的 mRNA 表达; 并在肠道微生物组和各类指标之间进行 Spearman 关联分析。【结果】低氧大鼠体重降低, 红细胞数量、红细胞比容、血红蛋白浓度均明显升高。低氧大鼠右心指数显著升高, 血清肌酸激酶(creatinine kinase, CK)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性增高, BNP 和 Myh7 的表达

资助项目: 国家自然科学基金(81790632, 31970863)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81790632, 31970863).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: PAN Zhiyuan, pzhy1104@163.com; BI Yujing, byj7801@sina.com

Received: 2022-11-21; Accepted: 2023-02-07; Published online: 2023-02-09

显著升高而 *Myh6* 的表达降低, 表明低氧导致大鼠心肌损伤并发生了右心室病理性肥厚。低氧改变了大鼠肠道微生物的  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性; 线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析结果提示常氧组大鼠的普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)相对丰度较高, 而低氧组大鼠的乳酸杆菌科(*Lactobacillaceae*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度较高。LDH 与摩根菌属(*Monoglobus*)和帕鲁迪杆菌(*Papillibacter*)正相关, 与苜蓿科(*Defluviitaleaceae\_UCG-011*)负相关; CK 与菌株 RF39 正相关; *Myh6* 的表达量与 *Prevotellaceae\_NK3B31\_group* 和幽门螺杆菌(*Helicobacter*)正相关; *BNP* 的表达量与瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae\_UCG\_009*)正相关。【结论】持续性低氧显著改变了大鼠肠道微生物的丰富度、均匀度和菌群结构; 该变化与心肌损伤指标之间存在显著相关性, 表明肠道菌群可能在低氧性心肌肥厚中发挥重要作用。

关键词: 常压低氧; 病理性心肌肥厚; 器官指数; 肠道微生物; 脑钠肽; 肌球蛋白重链

## Alterations in gut microbiota and their associations with cardiac injury in rats after exposure to continuous normobaric hypoxia

WANG Zhen<sup>1,2#</sup>, ZHOU Yazhou<sup>2#</sup>, WANG Likun<sup>2#</sup>, HUANG Ziran<sup>2</sup>, CHANG Yuxiao<sup>2</sup>, HOU Fengyi<sup>2</sup>, ZHANG Huan<sup>2</sup>, LING Hui<sup>2,3</sup>, SUN Yifan<sup>2</sup>, TAN Yafang<sup>2</sup>, YANG Ruifu<sup>2</sup>, BI Yujing<sup>2\*</sup>, PAN Zhiyuan<sup>2\*</sup>

1 School of Public Health and Health Management, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China

3 School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230000, Anhui, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the alterations in gut microbiota and their associations with the biomarkers of myocardial hypertrophy induced by continuous normobaric hypoxia in rats. **[Methods]** Sixteen specific-pathogen-free female Sprague-Dawley rats were randomly assigned into two groups: the normoxia group and the hypoxia group. After adaptation for 1 week, the rats in the hypoxia group were immediately placed into the hypoxic chamber with the oxygen concentration at 10% for 30 d, and the rats without hypoxia treatment were set as the control. We monitored the body weight of each rat daily, determined the haematological and biochemical parameters as well as the organ coefficients at the end of the experiments. Further, we collected stools from each rat before (day 0) and after hypoxia challenge (day 30) to test the gut microbiota by using 16S rRNA gene sequencing. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to determine the mRNA levels of gene *ANP* (atrial natriuretic peptide), *BNP* (brain natriuretic peptide), *Myh6* (myosin heavy chain 6), and *Myh7* (myosin heavy chain 7), the biomarkers of myocardial hypertrophy in the right ventricular tissue. Spearman correlation analysis was performed to explore the links between intestinal

microbiomes and parameters. **[Results]** Hypoxia reduced the body weight, increased the erythrocyte count, hemoglobin level, and hematocrit, and failed to affect the counts of leukocytes and platelets. Hypoxia increased the right ventricular index, enhanced the activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) in the serum, and up-regulated the mRNA levels of *BNP* and *Myh7* in right ventricular tissue, which suggested pathologically myocardial hypertrophy after hypoxia challenge for 30 d. Hypoxia significantly altered the alpha diversity and beta diversity of gut microbiota in rats. The results of linear discriminant analysis effect size (LEfSe) showed that the rats exposed to hypoxia had lower relative abundance of *Prevotellaceae* and *Lachnospiraceae* and higher relative abundance of *Lactobacillaceae* and *Lactobacillus* than the control rats. LDH was positively correlated with *Monoglobus* and *Papilibacter* and negatively correlated with *Defluviaceae\_UCG-011*. CK was positively correlated with strain RF39. The expression of *BNP* was positively correlated with *Ruminocochaceae\_UCG\_009*, and that of *Myh6* was positively correlated with *Prevotellaceae\_NK3B31\_group* and *Helicobacter*. **[Conclusion]** The species richness, evenness, and composition of gut microbiota in rats are greatly affected after exposure to continuous normobaric hypoxia. The changes of gut microbiota have correlations with the biomarkers of myocardial hypertrophy induced by hypoxia, indicating that gut microbiota plays a crucial role in hypoxia-induced myocardial hypertrophy.

**Keywords:** hypoxia; myocardial hypertrophy; organ coefficient; gut microbiota; brain natriuretic peptide (BNP); myosin heavy chain (Myh)

低氧应激，如高原环境暴露或伴有缺血缺氧性疾病时，机体会出现一系列代偿反应，包括呼吸系统和循环系统<sup>[1]</sup>。研究表明，低氧暴露会导致肺动脉高压，继发心肌肥厚，以补偿机体氧气利用度的下降<sup>[2]</sup>；当长期处于低氧环境时，会出现病理性心肌损伤，甚至发生心力衰竭<sup>[3]</sup>。目前低氧引起的心肌肥厚可能与氧化应激损伤、激酶活性改变和炎症反应相关，但具体的机制仍不清楚<sup>[2]</sup>。

肠道中有着丰富的微生物，对维持机体内稳态发挥重要作用<sup>[4]</sup>。正常情况下，人类与其肠道微生物群是一种互惠共生关系，共同维护着肠道微生态的平衡<sup>[5]</sup>。这种平衡状态常常受到诸多因素的影响，如饮食、运动、生活环境等<sup>[6]</sup>。当稳态遭到破坏时，肠道微生态的失衡会导致各种疾病的发生和发展，因此，人们越来越注重肠道微生态的研究。

研究表明，无论是持续性低氧还是间歇性低氧均会引起肠道菌群的变化<sup>[7-9]</sup>。人体研究表明，高海拔暴露后胃肠道菌群组成的变化体现在致病菌的丰度增加，而以双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 为代表的益生菌丰度下降<sup>[10]</sup>。在另一项研究中，用培养的方法发现接受减压低氧暴露后印度人的粪便菌群中需氧菌总数显著减少，兼性厌氧菌总数和严格厌氧菌总数增加<sup>[11]</sup>。最近的研究表明，肠道菌群中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 与普雷沃氏菌 (*Prevotella*) 比例的改变与减压低氧引起的急性高原反应相关<sup>[12]</sup>。汉族人群进入高原减压低氧环境 4-6 d，肠道菌群即可发生显著变化，并可维持 3 个月之久<sup>[13]</sup>。在动物实验中，慢性间歇性低氧暴露 6 周显著改变了小鼠粪便菌群的组成和多样性，以厚壁菌门 (*Firmicutes*) 丰度升高而拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*) 丰度降低为主要特

征<sup>[14]</sup>。同时,慢性间歇性减压低氧暴露 30 d 也可使大鼠肠道微生物群发生明显变化,表现为总需氧菌密度降低,总厌氧菌数量增加<sup>[15]</sup>。然而,低氧对肠道微生物的影响受到环境、实验动物品系及性别、饮食等诸多因素的影响,低氧条件下肠道微生物的变化特征仍未完全阐明。

最近,我们发现持续性减压低氧处理 28 d 后,大鼠心脏出现病理性心肌肥厚和纤维化;经 16S rRNA 基因扩增子测序发现大鼠肠道菌群构成发生显著变化,主要表现为副拟杆菌(*Parabacteroides*)、另枝菌(*Alistipes*)和乳球菌(*Lactococcus*)的丰度增加;另枝菌(*Bacteroides*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)的比例增大<sup>[3]</sup>。值得注意的是,减压低氧和常压低氧是 2 种不同的低氧应激类型,它们引起的生理学效应存在明显不同<sup>[16]</sup>。例如,与常压低氧相比,减压低氧引起的氧化应激损伤更严重<sup>[17]</sup>,对组织中某些重要基因的表达也存在不同影响<sup>[18]</sup>。目前,常压低氧和减压低氧对肠道微生物的影响是否存在差异还有待阐明,持续性常压低氧对大鼠肠道微生物的影响还未见报道。

本研究中,我们将雌性大鼠置于低氧舱内,模拟常压低氧环境暴露并持续 30 d,氧浓度设定为 10%。实验结束后,分析了大鼠的血常规、血生化、器官指数以及心肌损伤分子标志物等指标的变化特点;通过 16S rRNA 基因扩增子测序,测定肠道微生物组的变化;并研究了上述指标之间的相关关系。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验动物

雌性无特异性病原体(specific-pathogen-free, SPF)级 SD (Sprague-Dawley)大鼠,体重为 200–220 克,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK-(京)2021-0011]。所有

动物饲养于微生物流行病学研究所实验动物中心,恒温[(23±2) °C]、相对湿度(35%±5%)、光照/暗周期 12 h,自由饮水、进食。所有器材和饲料都进行了高温灭菌。实验操作符合伦理准则,并得到军事医学研究院医学伦理委员会批准(伦理审查号:2017-006)。由于低氧持续暴露可显著诱导 SD 大鼠出现右心室病理性肥厚,且这一效应并不存在性别差异<sup>[19]</sup>;同时,考虑到实验过程周期较长,同笼饲养的雄性大鼠更容易发生侵袭性行为(aggressive behavior)<sup>[20]</sup>,造成动物受伤,影响实验结果;因此,在本研究中我们选择雌性 SD 大鼠作为实验对象。

### 1.2 试剂和仪器

逆转录试剂盒和 qRT-PCR Mix 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;TRIzol 试剂购自赛默飞世尔科技公司;氯化钠注射液(即生理盐水)购自石家庄四药有限公司;基因引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

低氧设备(北京隆福佳生物科技有限公司 0320GC-A06 包括低氧舱和气体混合机,低氧舱用于饲养动物,气体混合机可调控低氧舱内氧浓度,通过向低氧舱内灌入 N<sub>2</sub> 和压缩空气来达到低氧环境);NanoDrop 2000 型分光光度计(Thermo Fisher Scientific);实时荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD CFX Opus 96 Real-Time PCR System);IDEXX ProCyte Dx<sup>®</sup> 血细胞分析仪(IDEXX);BECKMAN COULTER 全自动血液生化检测仪(AU480)。

### 1.3 实验分组

所有实验大鼠混养一周,降低本底差异后,采用随机数字表法将大鼠分为常压常氧组(normoxia)和常压低氧组(hypoxia),每组 8 只,常氧组大鼠饲养于动物中心,低氧组放入低氧舱内,实验时氧浓度设定为 10%,持续 30 d 低氧状态。

#### 1.4 粪便样本采集

在 0 d 和 30 d 将大鼠放入单独无菌的盒子中, 收集新鲜粪便样本, 置于 1.5 mL 无菌离心管中, 并迅速转移到 $-80^{\circ}\text{C}$  冷冻冰箱保存。

#### 1.5 器官指数计算

实验结束后, 摘取大鼠心脏、肝脏、脾、肺脏组织, 用生理盐水进行洗涤, 并用滤纸吸干水分, 进行称重(湿重)并拍照。其中将心脏分离出右心室, 并对右心室(right ventricle, RV)、左心室和室间隔(LV+S)分别进行称重。所有组织分别用铝箔纸包裹后立即放于液氮冷冻, 然后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中。以每只大鼠各器官的湿重(mg)与体重(g)的比值来反映器官指数, 以右心室(RV)湿重(mg)与左心室加室间隔(LV+S)湿重(mg)的比值来评估右心室肥厚水平。

#### 1.6 血液学指标检测

实验结束后采集血样, 取 200  $\mu\text{L}$  全血放于抗凝管中, 使用 IDEXX ProCytex Dx<sup>®</sup> 血细胞分析仪进行血常规分析, 检测指标包括: 红细胞数量、血红蛋白浓度、红细胞比容、白细胞数量、血小板数量。剩余血液放于 1.5 mL 无菌离心管中, 4 000 r/min、 $4^{\circ}\text{C}$  下离心 10 min, 取血清, 用 BECKMAN COULTER 全自动血生化检测仪进行生化指标检测, 检测指标包括心肌损伤指标: 肌酸激酶和乳酸脱氢酶; 肝功能指标: 谷丙转氨酶和谷草转氨酶; 肾功能指标: 肌酐和尿素。

#### 1.7 实时定量聚合酶链式反应分析

使用 TRIzol 试剂将右心室在  $4^{\circ}\text{C}$  下研磨提取总 RNA, 用 NanoDrop 2000 型分光光度计测量所得总 RNA 的浓度和质量。每个样本取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA, 在去除基因组 DNA 后, 进行逆转录反应得到 cDNA。实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)使用 SYBR Green 染料法, 反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 循环参数包括:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 min;  $95^{\circ}\text{C}$

变性 10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 扩增 40 个循环, 应用熔解曲线程序进行连续荧光测量。以 *Gapdh* 为内参基因, 使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  进行计算目标基因的相对表达水平, 引物序列见表 1。

#### 1.8 大鼠肠道微生物的 16S rRNA 基因扩增子测序

采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)方法对粪便样品进行基因组 DNA 提取, 使用琼脂糖凝胶电泳法检测提取的基因组 DNA 纯度和浓度, 采用特异性引物、New England Biolabs 公司的 Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶扩增基因序列的 V3-V4 区域以构建文库。文库合格后, 通过 NovaSeq 6000 平台进行上机测序。使用 FLASH (V1.2.11, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)<sup>[21]</sup> 软件对样本下机数据进行拼接, 得到 raw tags。随后使用 fastp 软件对 raw tags 进行质控, 得到高质量的 clean tags。采用 Usearch 软件将 clean tags 与数据库进行比对去除嵌合体得到有效数据<sup>[22]</sup>。

基于有效数据通过 DADA2 进行降噪并过滤掉丰度小于 5 的序列, 获得最终的扩增子序列变异(amplicon sequence variants, ASVs)以及特征表。使用 QIIME2 软件中的 classify-sklearn 模块将得到的 ASVs 与 Silva138.1 数据库比对, 得到每个 ASV 的物种信息。使用 QIIME2 软件计算  $\alpha$  多样性指数并对组间差异进行分析; 计算 Weighted UniFrac 距离并绘制主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)图进行  $\beta$  多样性分析, 使用 Anosim 函数分析组间群落结构差异的显著性; 采用线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析组间显著差异性物种, LDA score 阈值为 4。

#### 1.9 统计学处理

生理数据用均值 $\pm$ 标准差表示, 图表用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制, 组间比较用 GraphPad

表 1 大鼠右心室组织中 qRT-PCR 检测基因的引物序列

Table 1 Primers sequence of qRT-PCR for the target genes in right ventricular tissues in rats

Gene	Sequence (5'→3')
<i>ANP</i>	Forward: GTGTCCAACACAGATCTGATGG Reverse: GCCAGCGAGCAGAGCCCTCA
<i>BNP</i>	Forward: TGGGAAGTCCTAGCCAGTCTC Reverse: GCCGATCCGGTCTATCTTCTG
<i>Myh6</i>	Forward: GCCCTTTGACATCCGCACAGAGT Reverse: TCTGCTGCATCACCTGGTCCTCC
<i>Myh7</i>	Forward: GCGGACATTGCCGAGTCCCAG Reverse: GCTCCAGGTCTCAGGGCTTCACA
<i>Gapdh</i>	Forward: GACATGCCGCTGGAGAAAC Reverse: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

Prism 8.0 软件中的配对 *t* 检验进行, 组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。关联分析使用 Spearman correlation 计算方法, 以相关系数绝对值 $\geq 0.7$ 、 $P\leq 0.05$  为具有显著相关性的判断标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 持续常压低氧大鼠模型建立

低氧处理大鼠体重明显下降, 随后缓慢升高, 但始终低于常氧组(图 1A)。低氧后大鼠红细胞数量(图 1B)、血红蛋白浓度(图 1C)、红细胞比容(图 1D)均显著升高, 这与先前的研究结果一致<sup>[3,23-24]</sup>, 但不影响白细胞和血小板数量(图 1E、1F)。这表明, 常压低氧大鼠模型构建成功。

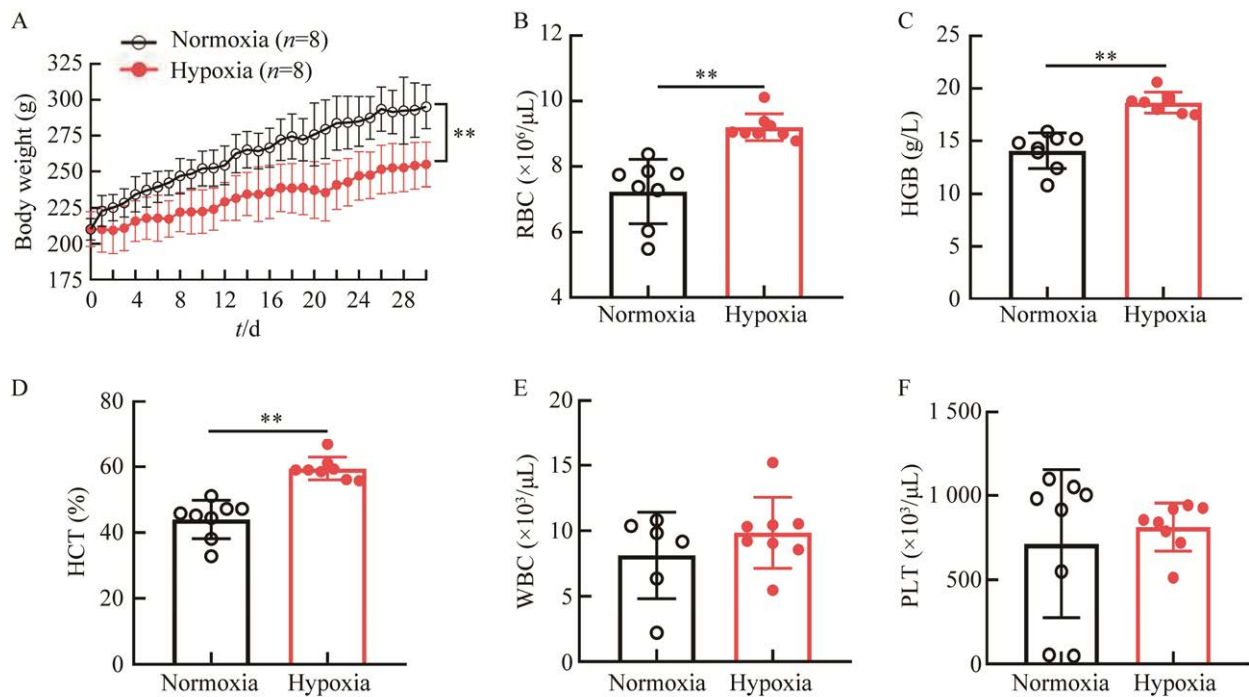


图 1 持续常压低氧对大鼠体重及血液学指标的影响

Figure 1 Alterations in body weight and hematology after normobaric hypoxia exposure in rats. A: Data of body weight was expressed as mean $\pm$ standard deviation. The standard deviation reflects the dispersion degree of data average. Statistics was carried out by one-way ANOVA in GraphPad Prism 8.0 software. B–F: Blood routine test was performed by IDEXX ProCyte DX<sup>®</sup> analyzer, and the data was statistically analyzed by paired *t* test with GraphPad Prism 8.0 software, \*\*:  $P<0.01$ .

## 2.2 持续常压低氧对大鼠心脏的影响

在器官指数方面,低氧大鼠心脏指数显著升高(图 2A、2B),且以右心室肥厚为主(图 2C),同时伴有肺脏指数明显升高(图 2D),但低氧不影响肝指数和脾指数(图 2E、2F)。血生化检测发现低氧大鼠肌酸激酶(图 3A)、乳酸脱氢酶(图 3B)、尿素(图 3E)、肌酐(图 3F)的水平均显著升高,但不影响谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平(图 3C、3D),说明低氧显著影响大鼠的心功能和肾功能。

为了验证低氧后大鼠心脏肥厚的类型是生理性的还是病理性的,我们检测了右心室组织中心房利钠肽基因(atrial natriuretic peptide, *ANP*)、右心室脑钠肽基因(brain natriuretic peptide, *BNP*)、心肌肌球蛋白重链 6 基因(myosin heavy chain 6, *Myh6*)、心肌肌球蛋白重链 7 基因(myosin heavy chain 7, *Myh7*)这 4 种生物标志物 mRNA 的表达情况。如图 4 所示,常压低氧后大鼠右心室组织中 *BNP* 和 *Myh7* 的 mRNA 表达显著升高(图 4B、4D),

提示该心肌肥厚是病理性的。同时,我们也发现低氧后 *ANP* 的表达未出现明显变化(图 4A),但抑制了 *Myh6* 的基因表达(图 4C),这与减压低氧引起心肌肥厚的特征不同<sup>[3]</sup>,这提示不同的低氧方式对生理指标会产生不同影响。

## 2.3 持续常压低氧对大鼠肠道微生物的影响

如表 2 所示,在  $\alpha$  多样性分析中,与常氧组相比,低氧显著降低了 Chao1、观测物种指数(observed OTUs)、Shannon 和 Pielou e 指数,表明低氧显著降低了大鼠肠道微生物的物种丰富度和均匀度。基于加权的 UniFrac 分析(图 5A)和主成分分析(PCoA,图 5B)表明,低氧后大鼠肠道微生物  $\beta$  多样性指数也明显降低,提示低氧后大鼠肠道微生物群落结构发生了较大改变。在细菌的属水平上,通过比较相对丰度前 20 的物种发现,低氧后丰度显著升高的菌属有 *Lactobacillus* ( $P=0.02$ )、*Bacteroides* ( $P=0.04$ )、*Monoglobus* ( $P=0.03$ )和 *Romboutsia* ( $P=0.01$ ),有升高趋势的

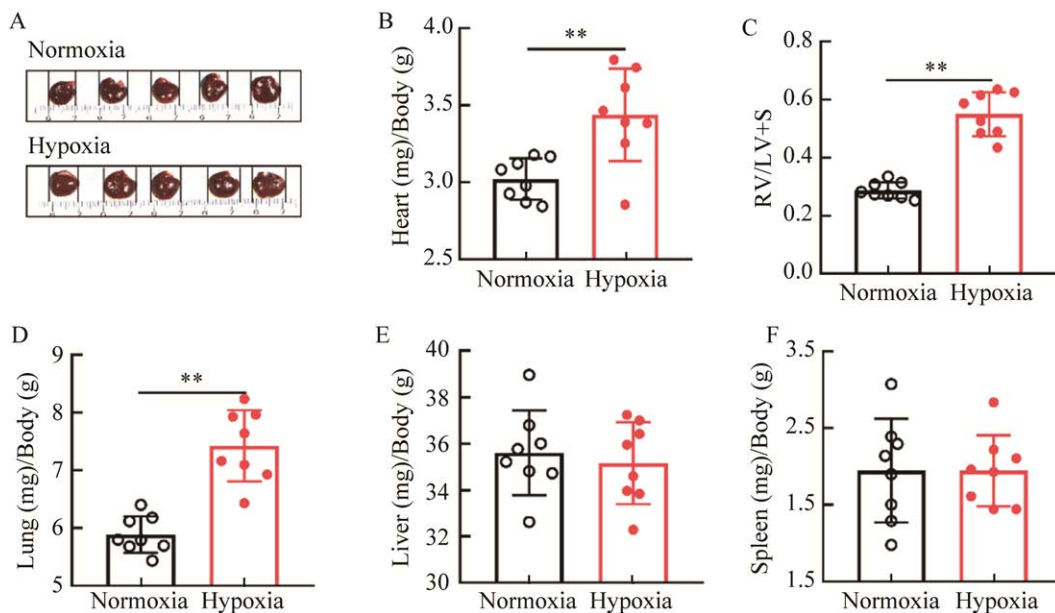


图 2 持续常压低氧对大鼠器官指数的影响

Figure 2 Changes in organ coefficients after normobaric hypoxia exposure in rats. A: Each group of rat hearts. B: Cardiac index. C: Right ventricle index. D: Lung index. E: Liver index. F: Spleen index. The organ coefficient was estimated by the ratio of organ wet weight (mg) to body weight (g). The level of right ventricular hypertrophy was evaluated by the ratio of right ventricle (RV) weight to left ventricle plus septum (LV+S) weight. The data was statistically analyzed by paired *t* test in GraphPad Prism 8.0 software, \*\*:  $P<0.01$ .

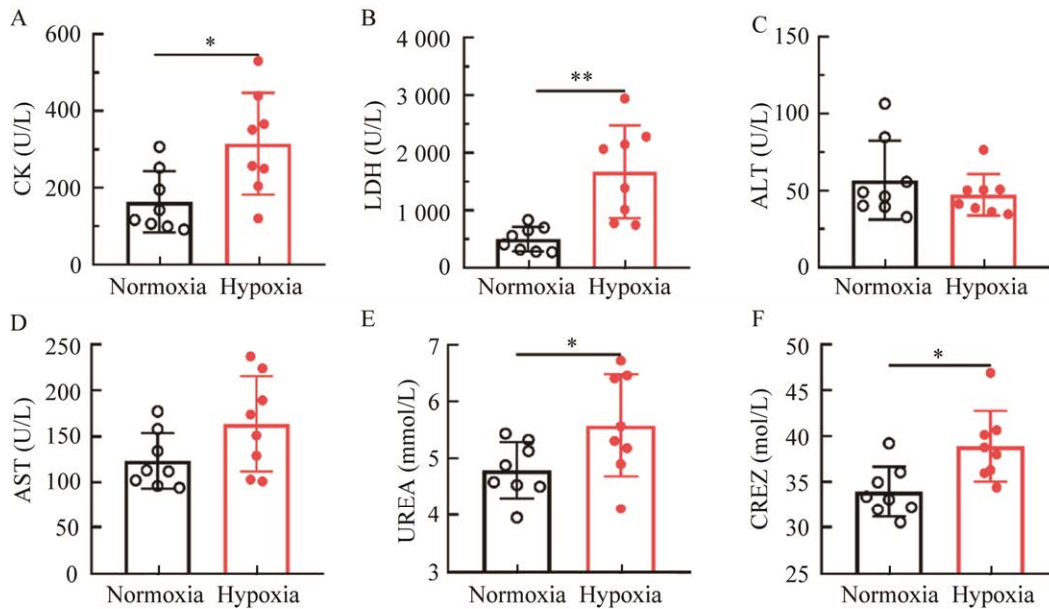


图3 持续常压低氧对大鼠血生化指标的影响

Figure 3 Alterations in serum biochemical parameters after normobaric hypoxia exposure in rats. A: Creatine kinase. B: Lactate dehydrogenase. C: Alanine transaminase. D: Aspartate transaminase. E: Urea. F: Creatinine. The serum biochemical parameters were detected by BECKMAN COULTER AU480 analyzer. Data was statistically analyzed using paired *t* test in GraphPad Prism 8.0 software, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

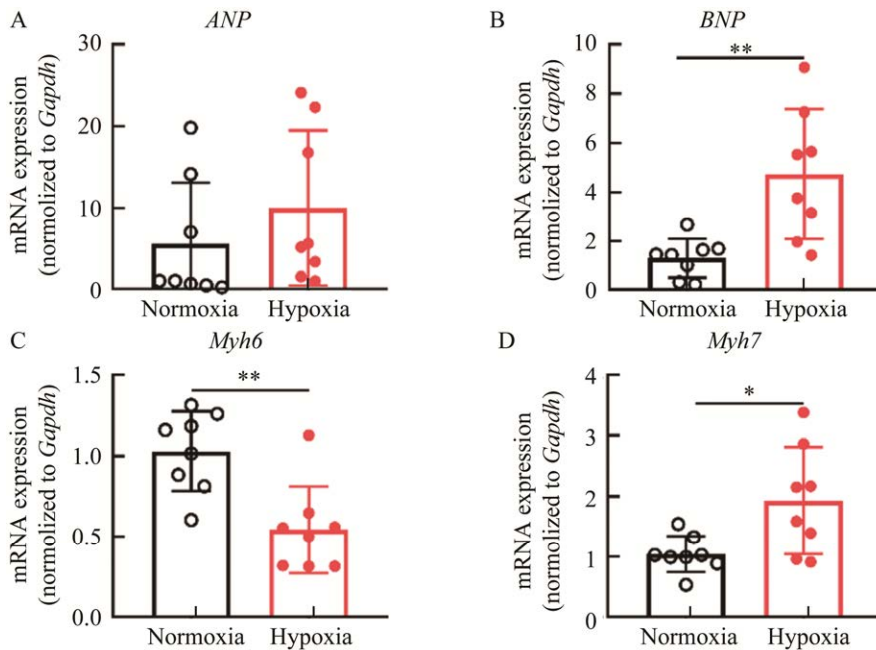


图4 持续常压低氧对大鼠右心室肥厚标志物基因表达的影响

Figure 4 Changes of hypertrophic biomarker mRNA expressions in the right ventricle after normobaric hypoxia exposure in rats. A: *ANP* gene expression level. B: *BNP* gene expression level. C: *Myh6* gene expression level. D: *Myh7* gene expression level. Relative mRNA expression levels of the biomarkers in right ventricle in rats were measured by quantitative real-time PCR method. The relative expression of target genes was calculated and normalized to that of *Gapdh* gene using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *ANP*: Atrial natriuretic peptide; *BNP*: B-type natriuretic peptide; *Myh6*: Cardiac myosin heavy chain  $\alpha$ -isoform; *Myh7*: Cardiac myosin heavy chain  $\beta$ -isoform; PCR: Polymerase chain reaction. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was performed by GraphPad Prism 8.0 software using paired *t* test, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .



表 2 低氧对大鼠肠道微生物  $\alpha$  多样性的影响

Table 2 Alpha diversity analysis of gut microbiota in hypoxia rats

Group	Shannon	Chao1	Observed OTUs	Simpson	Pielou e
Normoxia	6.07±1.20	634.52±282.29	631.62±283.68	0.89±0.17	0.66±0.14
Hypoxia	5.44±1.17**	475.13±464.59**	472.00±462.00**	0.92±0.03	0.63±0.06*

Compared with normoxia group, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

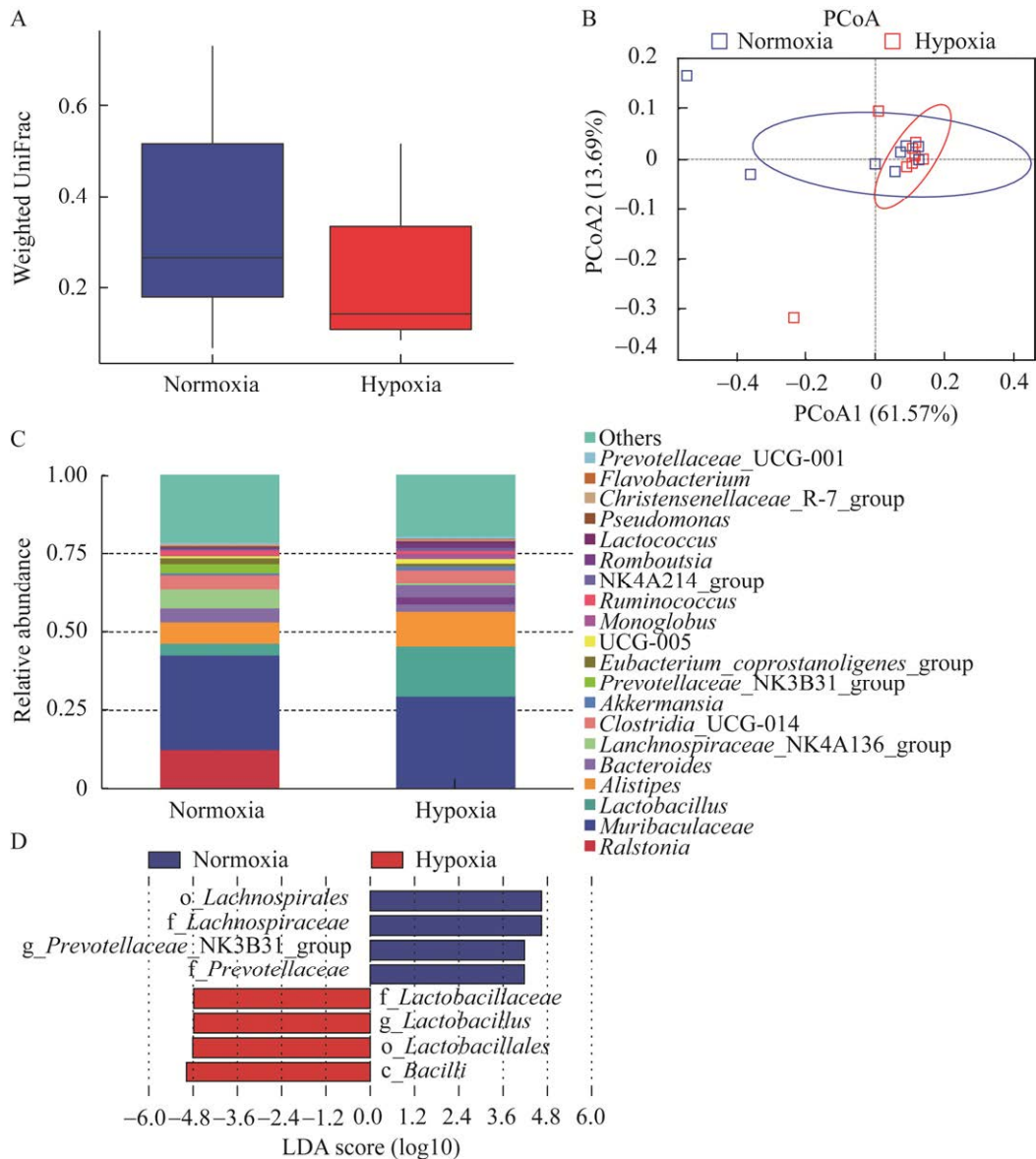


图 5 持续常压低氧对大鼠肠道微生物组的影响

Figure 5 Alterations in gut microbiome after normobaric hypoxia exposure in rats. Gut microbiome in stools of rats were characterized using 16S rRNA gene amplicon sequencing. A and B: The QIIME2 software was used to calculate the UniFrac distance and the R software was used to plot the PCoA map. The Anosim function in QIIME2 software was used to analyze the significant difference of community structure between groups. C: Top 20 species in relative abundance at genus level. Statistical significance was performed by GraphPad Prism 8.0 software using paired  $t$  test. D: LEfSe software was used to complete the LEfSe analysis, with the LDA score threshold set to 4 by default.

菌属有 *Alistipes*、*Akkermansia* 和 UCG-005; 显著降低的菌属有 *Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group ( $P=0.02$ )、*Prevotellaceae*\_NK3B31\_group ( $P=0.01$ ), 有降低趋势的菌属有 *Ralstonia*、*Eubacterium*\_corprotanoligenes\_group (图 5C)。进一步采用 LEfSe 分析组间差异物种发现(图 5D), 在常氧组中的细菌 *Lachnospirales* 目、*Lachnospiraceae* 科、*Prevotellaceae* 科和 *Prevotellaceae*\_NK3B31\_group 属相对丰度较高; 低氧组中的细菌 *Baillia* 纲、*Lactobacillales* 目、*Lactobacillaceae* 科和 *Lactobacillus* 属的相对丰度较高[宏基因数据 NMDC10018247 存储在国家微生物科学数据中心 (National Microbial Sciences Data Center,

NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/metagenome/detail/NMDC10018247>]。

## 2.4 大鼠肠道微生物与心肌损伤标志物的关联分析

如表 3 所示, 在血生化指标层面上, 我们发现乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)与 *Monoglobus* 和 *Papillibacter* 正相关, 与 *Defluviitaleaceae*\_UCG-011 负相关; 而肌酸激酶(creatine kinase, CK)与 RF39 正相关。在右心室病理性肥厚相关基因层面上发现, *Myh6* 的表达量与 *Prevotellaceae*\_NK3B31\_group 和 *Helicobacter* 正相关; *BNP* 的表达量与 *Ruminococcaceae*\_UCG\_009 正相关。

表 3 低氧大鼠肠道微生物与心肌损伤标志物的关联性分析

Table 3 Correlation analysis between gut microbiota and cardiac injury markers

Cardiac injury marker	Associated gut microbiota	Related coefficient	P-value
LDH	<i>Monoglobus</i>	0.72	0.002
	<i>Papillibacter</i>	0.74	0.001
	<i>Defluviitaleaceae</i> _UCG-011	-0.71	0.002
CK	RF39	0.75	0.001
<i>Myh6</i>	<i>Helicobacter</i>	0.72	0.002
	<i>Prevotellaceae</i> _NK3B31_group	0.76	0.001
<i>BNP</i>	UCG-009	0.72	0.002

Using Spearman correlation analysis.

## 3 讨论与结论

研究低氧因素对肠道微生物的影响, 对于进一步阐明高原病和其他缺氧相关疾病的发病机理具有重要意义。本研究主要有 3 点发现: (1) 持续性常压低氧造成大鼠心肌肥厚, 且病理性心肌损伤标志物 mRNA 表达明显上调; (2) 常压低氧暴露后大鼠肠道微生物的均匀度、多样性显著下降, 并影响了物种丰度; (3) 发现几个关键的细菌物种, 其与低氧性心肌损伤和肥厚的生物标志物之间存在明显的关联性。

低氧应激在机体血液中的最直接表现是红细胞数量增多和血红蛋白含量升高。本研究中, 持续性常压低氧(10%氧气浓度)暴露 30 d 后, 大鼠血液中的红细胞数量、血红蛋白含量和红细胞比容均显著升高, 符合低氧应激引起的血液学变化特征<sup>[3,25]</sup>。研究表明持续性减压低氧暴露会引起大鼠的血小板和白细胞数量显著降低<sup>[3]</sup>, 但本研究中并未发现持续性常压低氧会对大鼠血液中血小板和白细胞数量产生显著影响。虽然持续性减压低氧和常压低氧暴露 30 d 都引起了右心室的病理性心肌肥厚, 但在相关生物标志物的基

因表达方面却存在差异,减压低氧会导致大鼠心肌组织中心房利钠肽(*ANP*)和脑钠肽(*BNP*) mRNA 表达显著升高,尤其以 *ANP* 的表达升高为主<sup>[3]</sup>;而本研究中,常压低氧显著升高了 *BNP* 的表达,但不影响 *ANP* 的表达。先前的研究表明,减压低氧暴露 6 周后,大鼠的右心室组织中心肌肌球蛋白重链 7 (*Myh7*)的 mRNA 表达显著升高而心肌肌球蛋白重链 6 (*Myh6*)的表达则显著下降<sup>[3,26]</sup>,这与本研究结果是一致的。事实上,越来越多的证据表明常压低氧和减压低氧这 2 种低氧方式对不同细胞基因转录的影响是存在差异的<sup>[27]</sup>。这些结果再次证明不同的低氧方式对机体的生理指标会产生不同的影响。

虽然低氧对肠道微生物影响的研究较多,但不同的低氧方式引起的肠道微生物变化规律存在明显不同。目前,在低氧对肠道微生物多样性和关键差异物种的影响方面仍存在争议。马燕等<sup>[28]</sup>报道,减压低氧 28 d 会增高大鼠的肠道菌群的  $\alpha$  多样性,如 Chao1 指数和 ACE 指数; Bai 等<sup>[9]</sup>也报道减压低氧暴露 7 d 会显著升高  $\alpha$  多样性指数,如 Pielou 指数和 Shannon 指数。但在我们前期的研究中却发现,减压低氧环境暴露 28 d 后,大鼠肠道微生物  $\alpha$  多样性并未改变,包括 Shannon 指数、Faith's 遗传指数和观测物种指数<sup>[3]</sup>。在本研究中,常压低氧暴露则显著降低了大鼠的 Chao1、Pielou 和 Shannon 指数,降低了大鼠肠道微生物群的丰富度和均匀度。通过比较减压低氧和常压低氧对关键差异微生物物种丰度的影响,我们发现在属水平上,2 种低氧模式均可引起 *Bacteroides*、*Alistipes*、*Lactobacillus* 和 *Akkermansia* 丰度的增加,而 *Prevotella* 丰度则降低<sup>[3,9]</sup>。但常压低氧引起的关键物种变化也有自身特点,表现为 *Monoglobus*、*Romboutsia*、UCG-005 等属的丰度显著升高,而 *Ralstonia*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*、*Eubacterium*

*coprostanoligenes\_group* 等属的丰度显著降低。

目前,对于持续低氧处理后大鼠肠道中乳酸杆菌丰度变化规律的认识仍然存在争议,尤其是在科和属水平上。据 Bai 等<sup>[29]</sup>报道,雄性 SD 大鼠置于青海省 4 800 m 高原低氧环境暴露 7 d 后,并未发现 *Lactobacillaceae* 科和 *Lactobacillus* 属丰度的显著变化。相比之下,谢亚磊等<sup>[30]</sup>发现,在模拟海拔 5 500 m 低氧环境中暴露 1–3 d,大鼠肠道内 *Lactobacillus* 属丰度较常氧组显著升高,但在低氧后 14–28 d, *Lactobacillus* 属丰度则显著降低。这与 Nijati 等<sup>[31]</sup>的研究结果相似,即在模拟 5 000 m 高原暴露的 SD 大鼠上,低压低氧处理 45 d 后大鼠肠道中的 *Lactobacillaceae* 科丰度显著降低。然而,更多的研究结果却提示低氧会增加大鼠肠道中 *Lactobacillaceae* 科和 *Lactobacillus* 属丰度。例如,将雄性 SD 大鼠暴露于高原 2 800 m (中度低氧)和 4 800 m (重度低氧) 30 d,与平原对照组相比,2 种不同程度的低氧暴露均导致 *Lactobacillus* 属丰度大幅度增高<sup>[9]</sup>。Adak 等<sup>[15]</sup>利用传统培养方法也发现,雄性 albino 大鼠经过间歇性低压低氧处理 30 d 后(模拟 4 873 m, 8 h/d),肠道中的 *Lactobacillus* spp. 是显著增加的。这些矛盾的结果可能与实验对象的种类和年龄、低压低氧处理的程度和方法、暴露时间的长短、测序方法和平台等有关系。值得注意的是,对于持续常压低氧暴露方式而言, Luo 等<sup>[32]</sup>报道持续常压低氧(氧气含量 10%)处理 3 周后,低氧小鼠肠道中 *Lactobacillaceae* 科丰度显著升高,经 LEfSe 分析提示低氧引起 *Lactobacillus* 属中的 *Lactobacillus reuteri* 丰度显著升高。这个结果与本研究结果一致,也说明常压低氧和低压低氧 2 种不同的方式引起的乳酸杆菌丰度变化存在差异。

本研究中,使用 Spearman 分析并未得到乳酸杆菌与心肌损伤标志物之间存在直接关联的

统计学证据。据我们所知,目前也无研究报道提示乳酸杆菌与心肌损伤标志物之间存在显著相关。在实验证据方面,我们用含有6种乳酸杆菌的益生菌干预低压低氧处理大鼠4周后,采用RT-PCR方法对大鼠心肌组织进行检测,发现乳酸杆菌益生菌干预对低氧引起的 *ANP*、*BNP*、*Myh6* 和 *Myh7* 基因表达的改变并无显著影响<sup>[33]</sup>,这间接提示它们之间存在关联的可能性较低。

由于乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)是公认的益生菌,其有助于维持宿主肠道黏膜屏障结构和功能的完整性<sup>[34]</sup>。而我们的研究提示乳酸杆菌等益生菌干预可以通过影响机体氨基酸代谢途径,最终改善低氧性心肌肥厚<sup>[33]</sup>。因此,我们仍然有理由推测,低氧后乳酸杆菌丰度的增高可能有利于增强宿主对低氧环境的适应能力。

在肠道特异微生物与低氧性疾病相关病理生理指标的关联性分析方面,已有研究报道,急进高原环境后,肠道中的 *Prevotalla* 丰度增高与急性高原反应的严重程度呈正相关;而低氧引起的体重降低则与 *Lactobacillus* 和 *Turicibacter* 属丰度的降低密切相关<sup>[15]</sup>。而在长期居住高原低氧地区的藏民中发现, *Succinivibrio* 和 *Sarcina* 丰度的变化跟血糖的关系最为密切<sup>[16]</sup>。本研究中,我们发现乳酸脱氢酶与 *Monoglobus* 和 *Papillibacter* 正相关,与 *Defluviitaleaceae*\_UCG-011 负相关;而肌酸激酶与菌株 RF39 正相关,这未见报道。目前,有研究证明 *Prevotellaceae* 可通过 PPAR $\alpha$ -CYP4X1 轴缓解心脏毒性<sup>[35]</sup>;但也有研究表明肠道菌群中 *Prevotellaceae* 和 *Bacteroides* 的富集易导致大鼠急性心肌缺血<sup>[36]</sup>;而在我们的研究中,通过关联分析发现 *Prevotellaceae*\_NK3B31\_group 和 *Helicobacter* 与 *Myh6* 基因表达具有正相关性,由于 *Myh6* 基因表达降低多见于心肌受损<sup>[37]</sup>,由此我们推断在低氧模型中 *Prevotellaceae* 降低可能与低氧引起的心肌损伤

有关。除此之外, *Ruminococcaceae*\_UCG\_009 与心肌受损标志物 *BNP* 的表达量正相关,亦未见文献报道。

综上所述,持续性常压低氧改变了大鼠肠道微生物的丰富度、均匀度和菌群结构,但与减压低氧引起的肠道微生物变化特征之间存在差异。常压低氧引起的关键细菌变化与右心室肥厚指标之间存在显著相关性,表明肠道菌群在低氧引起的心肌肥厚和心肌损伤中发挥重要作用,但其因果关系有待进一步揭示。

## 参考文献

- [1] DAVIES SW, WEDZICHA JA. Hypoxia and the heart[J]. *British Heart Journal*, 1993, 69(1): 3-5.
- [2] PENA E, BRITO J, EL ALAM S, SIQUES P. Oxidative stress, kinase activity and inflammatory implications in right ventricular hypertrophy and heart failure under hypobaric hypoxia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6421.
- [3] PAN ZY, HU YC, HUANG ZY, HAN N, LI Y, ZHUANG XM, YIN JY, PENG H, GAO QS, ZHANG WP, HUANG Y, CUI YJ, BI YJ, XU ZZ, YANG RF. Alterations in gut microbiota and metabolites associated with altitude-induced cardiac hypertrophy in rats during hypobaric hypoxia challenge[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(10): 2093-2113.
- [4] SCHROEDER BO, BÄCKHED F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease[J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(10): 1079-1089.
- [5] WALTER J, BRITTON RA, ROOS S. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(suppl 1): 4645-4652.
- [6] MAKKI K, DEEHAN EC, WALTER J, BÄCKHED F. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(6): 705-715.
- [7] TRIPATHI A, XU ZZ, XUE J, POULSEN O, GONZALEZ A, HUMPHREY G, MEEHAN MJ, MELNIK AV, ACKERMANN G, ZHOU D, MALHOTRA A, HADDAD GG, DORRESTEIN PC, KNIGHT R. Intermittent hypoxia and hypercapnia

- reproducibly change the gut microbiome and metabolome across rodent model systems[J]. *mSystems*, 2019, 4(2): e00058-e00019.
- [8] LUCKING EF, O'CONNOR KM, STRAIN CR, FOUHY F, BASTIAANSEN TFS, BURNS DP, GOLUBEVA AV, STANTON C, CLARKE G, CRYAN JF, O'HALLORAN KD. Chronic intermittent hypoxia disrupts cardiorespiratory homeostasis and gut microbiota composition in adult male Guinea-pigs[J]. *eBioMedicine*, 2018, 38: 191-205.
- [9] BAI X, LIU GQ, YANG JX, ZHU JB, WANG Q, ZHOU Y, GU WQ, LA LL, LI XY. Changes in the gut microbiota of rats in high-altitude hypoxic environments[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(6): e0162622.
- [10] KLEESSEN B, SCHROEDL W, STUECK M, RICHTER A, RIECK O, KRUEGER M. Microbial and immunological responses relative to high-altitude exposure in mountaineers[J]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2005, 37(8): 1313-1318.
- [11] ADAK A, MAITY C, GHOSH K, PATI BR, MONDAL KC. Dynamics of predominant microbiota in the human gastrointestinal tract and change in luminal enzymes and immunoglobulin profile during high-altitude adaptation[J]. *Folia Microbiologica*, 2013, 58(6): 523-528.
- [12] KARL JP, BERRYMAN CE, YOUNG AJ, RADCLIFFE PN, BRANCK TA, PANTOJA-FELICIANO IG, ROOD JC, PASIAKOS SM. Associations between the gut microbiota and host responses to high altitude[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2018, 315(6): G1003-G1015.
- [13] JIA ZL, ZHAO XJ, LIU XS, ZHAO L, JIA Q, SHI JL, XU X, HAO LJ, XU ZG, ZHONG Q, YU K, CUI SJ, CHEN HN, GUO JY, LI X, HAN Y, SONG XY, ZHAO CH, BO XC, TIAN YP, et al. Impacts of the plateau environment on the gut microbiota and blood clinical indexes in Han and Tibetan individuals[J]. *mSystems*, 2020, 5(1): e00660-e00619.
- [14] MORENO-INDIAS I, TORRES M, MONTSERRAT JM, SANCHEZ-ALCOHOLADO L, CARDONA F, TINAHONES FJ, GOZAL D, POROYKO VA, NAVAJAS D, QUEIPO-ORTUÑO MI, FARRÉ R. Intermittent hypoxia alters gut microbiota diversity in a mouse model of sleep apnoea[J]. *The European Respiratory Journal*, 2015, 45(4): 1055-1065.
- [15] ADAK A, MAITY C, GHOSH K, MONDAL KC. Alteration of predominant gastrointestinal flora and oxidative damage of large intestine under simulated hypobaric hypoxia[J]. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 2014, 52(2): 180-186.
- [16] COPPEL J, HENNIS P, GILBERT-KAWAI E, GROCCOTT MP. The physiological effects of hypobaric hypoxia versus normobaric hypoxia: a systematic review of crossover trials[J]. *Extreme Physiology & Medicine*, 2015, 4(1): 1-20.
- [17] RIBON A, PIALOUX V, SAUGY JJ, RUPP T, FAISS R, DEBEVEC T, MILLET GP. Exposure to hypobaric hypoxia results in higher oxidative stress compared to normobaric hypoxia[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2016, 223: 23-27.
- [18] ROSS CI, SHUTE RJ, RUBY BC, SLIVKA DR. Skeletal muscle mRNA response to hypobaric and normobaric hypoxia after normoxic endurance exercise[J]. *High Altitude Medicine & Biology*, 2019, 20(2): 141-149.
- [19] DOCHERTY CK, NILSEN M, MACLEAN MR. Influence of 2-methoxyestradiol and sex on hypoxia-induced pulmonary hypertension and hypoxia-inducible factor-1-A[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2019, 8(5): e011628.
- [20] GIAMMANCO M, TABACCHI G, GIAMMANCO S, Di MAJO D, la GUARDIA M. Testosterone and aggressiveness[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2005, 11(4): RA136-RA145.
- [21] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [22] HAAS BJ, GEVERS D, EARL AM, FELDGARDEN M, WARD DV, GIANNOUKOS G, CIULLA D, TABBAA D, HIGHLANDER SK, SODERGREN E, METHÉ B, DeSANTIS TZ, CONSORTIUM HM, PETROSINO JF, KNIGHT R, BIRREN BW. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [23] BISWAS HM, SAHA RC, BISWAS NM. Hematologic and body fluid changes during simulated high altitude exposure in naproxen-treated rats[J]. *The Japanese Journal of Physiology*, 1996, 46(1): 67-73.
- [24] SHEPPARD RL, SWIFT JM, HALL A, MAHON RT. The influence of CO<sub>2</sub> and exercise on hypobaric hypoxia induced pulmonary edema in rats[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 130.

- [25] HAN N, PAN ZY, HUANG ZY, CHANG YX, HOU FY, LIU GW, YANG RF, BI YJ. Effects of myeloid *Hif-1 $\beta$*  deletion on the intestinal microbiota in mice under environmental hypoxia[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 89(1): e00474-e00420.
- [26] NAKANISHI K, NAKATA Y, KANAZAWA F, IMAMURA SI, MATSUOKA R, OSADA H, KAWAI T, UENOYAMA M, AURUES T, IKEDA T. Changes in myosin heavy chain and its localization in rat heart in association with hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *The Journal of Pathology*, 2002, 197(3): 380-387.
- [27] EBNER LA, SAMARDZIJA M, STORTI F, TODOROVA V, KARADEMIR D, BEHR J, SIMPSON F, THIERSCH M, GRIMM C. Transcriptomic analysis of the mouse retina after acute and chronic normobaric and hypobaric hypoxia[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 16666.
- [28] 马燕, 马爽, 尚春香, 格日力. 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(1): 120-129.  
MA Y, MA S, SHANG CX, GERILI. Effects of hypoxic exposure on rats' gut microbiota[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(1): 120-129 (in Chinese).
- [29] BAI X, YANG JX, LIU GQ, ZHU JB, WANG Q, GU WQ, LA LL, LI XY. Regulation of CYP450 and drug transporter mediated by gut microbiota under high-altitude hypoxia[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 977370.
- [30] 谢亚磊, 梅颂, 熊艳蕾, 刘诗颖, 徐成丽. 模拟海拔 5 500 m 低压低氧环境对大鼠 HPT 轴和肠道菌群的影响. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5): 432-437.  
XIE YL, MEI S, XIONG YL, LIU SY, XU CL. Effects of simulated 5 500 m hypobaric and hypoxia on HPT axis and intestinal flora in rats[J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2020, 36(5): 432-437 (in Chinese).
- [31] NIJIATI Y, MAIMAITIYIMING D, YANG T, LI H, AIKEMU A. Research on the improvement of oxidative stress in rats with high-altitude pulmonary hypertension through the participation of irbesartan in regulating intestinal flora[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2021, 25(13): 4540-4553.
- [32] LUO LJ, CHEN QH, YANG L, ZHANG ZX, XU JH, GOU DM. MSCs therapy reverse the gut microbiota in hypoxia-induced pulmonary hypertension mice[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 712139.
- [33] HU YC, PAN ZY, HUANG ZY, LI Y, HAN N, ZHUANG XM, PENG H, GAO QS, WANG Q, LEE BJY, ZHANG HP, YANG RF, BI YJ, XU ZZ. Gut microbiome-targeted modulations regulate metabolic profiles and alleviate altitude-related cardiac hypertrophy in rats[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0105321.
- [34] XUE J, ALLABAND C, ZHOU D, POULSEN O, MARTINO C, JIANG LJ, TRIPATHI A, ELIJAH E, DORRESTEIN PC, KNIGHT R, ZARRINPAR A, HADDAD GG. Influence of intermittent hypoxia/hypercapnia on atherosclerosis, gut microbiome, and metabolome[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 663950.
- [35] CHEN YX, LIU YZ, WANG Y, CHEN XW, WANG CL, CHEN XH, YUAN X, LIU LL, YANG J, ZHOU XY. *Prevotellaceae* produces butyrate to alleviate PD-1/PD-L1 inhibitor-related cardiotoxicity via PPAR $\alpha$ -CYP4X1 axis in colonic macrophages[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 2022, 41(1): 1.
- [36] SUN LL, JIA HM, LI JJ, YU M, YANG Y, TIAN D, ZHANG HW, ZOU ZM. Cecal gut microbiota and metabolites might contribute to the severity of acute myocardial ischemia by impacting the intestinal permeability, oxidative stress, and energy metabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1745.
- [37] SHI HR, GAO Y, DONG Z, YANG JE, GAO RF, LI X, ZHANG SQ, MA LL, SUN XL, WANG Z, ZHANG F, HU K, SUN AJ, GE JB. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury[J]. *Circulation Research*, 2021, 129(3): 383-396.