

苦味西葫芦提高缺氧耐受性及其相关机制

李奕彤^{1,2#}, 张欢^{3#}, 胡灿颖², 童江辉², 付兴^{1,2}, 王增明⁴, 郭浩³, 谭亚芳², 杨瑞馥², 邓胜群^{1*}, 毕玉晶^{1,2*}

- 1 安徽医科大学 基础医学院, 安徽 合肥
- 2 军事医学研究院, 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京
- 3 中国中医科学院西苑医院, 安全性评价实验室, 北京
- 4 国家安全特需药品全国重点实验室, 北京

李奕彤, 张欢, 胡灿颖, 童江辉, 付兴, 王增明, 郭浩, 谭亚芳, 杨瑞馥, 邓胜群, 毕玉晶. 苦味西葫芦提高缺氧耐受性及其相关机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1326-1341.

LI Yitong, ZHANG Huan, HU Canying, TONG Jianghui, FU Xing, WANG Zengming, GUO Hao, TAN Yafang, YANG Ruifu, DENG Shengqun, BI Yujing. Hypoxia tolerance and its underlying mechanisms in *Cucurbita pepo cv Dayangua*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1326-1341.

摘要:【目的】明确苦味西葫芦(*Cucurbita pepo cv Dayangua*, CPD)对机体缺氧的改善能力, 并探究其可能通过调节肠道菌群及代谢产物发挥作用的潜在机制。【方法】将雄性昆明小鼠随机分为2组: 对照组(normoxia ddH₂O, ND)、CPD干预组(normoxia CPD, CPD)。CPD干预组剂量为800 mg/(kg·d), 对照组给予相同体积的ddH₂O, 连续给药15 d于最后一次给药1 h后将各组小鼠置于广口瓶内, 观察并记录小鼠在广口瓶中的生存时间。在最后一次给药前收集小鼠粪便, 进行16S rRNA基因扩增子测序和靶向代谢组检测, 并开展肠道微生物和代谢物的关联性分析。【结果】与对照组相比, CPD干预后显著延长了小鼠在缺氧条件下的存活时间。CPD干预可改变小鼠肠道菌群结构组成。线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析发现, ND组与CPD组之间存在显著差异的细菌类群: CPD组中芽孢杆菌门(*Bacillota*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、别样杆菌属(*Alistipes*)等微生物的相对丰度较高。与小鼠生存时间呈正相关的菌属有副普雷沃氏菌属(*Paraprevotella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)等。靶向代谢组学表明CPD干预后有9种代谢物上调, 31种代谢物下调, 其中代谢物棕榈油酸(*palmitoleic acid*)、乙醛酸(*glyoxylic acid*)、十一烷酸(*hendecanoic acid*)、L-天冬氨酸(*L-aspartic acid*)、O-琥珀酰高丝氨酸(*O-succinyhomoserine*)、尿囊酸(*allantoic acid*)在CPD干预后显著富集, 并且与小鼠生存时间呈显著正相关。通过差异代谢物KEGG富集分析, 色氨酸代谢通路和甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢

资助项目: 国家自然科学基金重大项目(32394045)

This work was supported by the National Natural Science Foundation for Key Program of China (32394045).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: BI Yujing, byj7801@sina.com; DENG Shengqun, dengshengqun@163.com

Received: 2025-10-21; Accepted: 2025-11-27; Published online: 2025-12-10

通路的富集程度最高。【结论】CPD 干预可显著延长缺氧小鼠的存活时间。CPD 干预富集了包括乳杆菌属在内的有益微生物, 并提升了胆碱(choline)、尿囊酸等有益代谢物的水平。这些发现提示调节“肠道微生物-代谢物”轴可能是 CPD 增强机体缺氧耐受性的机制之一, 为开发针对缺氧相关疾病的微生态干预策略提供了理论依据和潜在靶点。

关键词: 缺氧耐受性; 苦味西葫芦; 肠道微生物; 作用机制

Hypoxia tolerance and its underlying mechanisms in *Cucurbita pepo cv Dayangua*

LI Yitong^{1,2#}, ZHANG Huan^{3#}, HU Canying², TONG Jianghui², FU Xing^{1,2}, WANG Zengming⁴, GUO Hao³, TAN Yafang², YANG Ruifu², DENG Shengqun^{1*}, BI Yujing^{1,2*}

1 School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, China

3 Safety Evaluation Laboratory, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China

4 State Key Laboratory of National Security Specially Needed Medicines, Beijing, China

Abstract: [Objective] To determine the efficacy of *Cucurbita pepo cv Dayangua* (CPD) in alleviating hypoxia and explore the potential mechanisms involving the modulation of the gut microbiota and its metabolites. [Methods] Male Kunming mice were randomly assigned into two groups: a control group (normoxia ddH₂O, ND) and a CPD intervention group (normoxia CPD, CPD). The CPD group received a dose of 800 mg/(kg·d) of CPD, while the ND group received an equal volume of ddH₂O for 15 consecutive days. One hour after the final administration, mice from each group were placed in wide-mouth bottles, and the survival time was observed and recorded. Fecal samples collected prior to the last administration were subjected to 16S rRNA gene amplicon sequencing and targeted metabolomics analysis. Correlation analysis between gut microbiota and metabolites was subsequently performed. [Results] CPD intervention significantly prolonged the survival time of mice under hypoxic conditions compared to the ND group. CPD altered the structural composition of the gut microbiota in mice. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) revealed significantly different bacterial taxa between the ND group and the CPD group, with higher relative abundance of *Bacillota*, *Lactobacillus*, and *Alistipes* in the CPD group. Microbial genera, including *Paraprevotella* and *Lactobacillus*, showed a positive correlation with survival time. Targeted metabolomics identified 9 upregulated and 31 downregulated metabolites in the CPD group. Notably, metabolites such as palmitoleic acid, glyoxylic acid, hendecanoic acid, L-aspartic acid, *O*-succinylhomoserine, and allantoic acid were significantly enriched and positively correlated with the survival time of mice after CPD intervention. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of differential metabolites showed the highest enrichment in the tryptophan metabolism and glycine, serine, and threonine metabolism pathways. [Conclusion] CPD intervention significantly prolonged the survival time of hypoxic mice. CPD

intervention enriched beneficial microorganisms, including *Lactobacillus*, and elevated the levels of beneficial metabolites such as choline and allantoic acid. These findings suggest that modulating the “gut microbiota-metabolite” axis may be one mechanism through which CPD enhances host hypoxia tolerance, providing a theoretical basis and potential targets for developing microecological intervention strategies against hypoxia-related diseases.

Keywords: hypoxia tolerance; *Cucurbita pepo cv Dayangua*; gut microbiota; mechanism of action

高原地区在全球分布广泛, 约占陆地总面积的 45%, 海拔超过 2 500 m 的地区居住着 8 160 万人^[1]。近年来, 由于工作、生活或其他原因, 前往高海拔地区的人类活动逐渐增多, 人们必须面对高海拔地区独特环境带来的挑战, 例如低压、低氧、低气温和强烈辐射等^[2-3]。急性高原缺氧是指人体从低海拔地区迅速到达高海拔地区, 在急性低压、低氧暴露期间, 因身体暂时无法适应环境变化而出现生理不适^[4]。超过 50% 的人在高原暴露期间会出现急性反应, 如恶心、呕吐、腹泻和腹胀等^[5]。长期处于高原环境后, 机体对高原低氧环境的代偿适应会出现慢性高山病(chronic mountain sickness, CMS), 严重危害人体健康。

肠道是人体最大的微生物栖息地, 肠道微生物群落和机体在这里维持着一种互惠关系。肠道微生物群被称为“人类第二基因组”, 在促进宿主适应高海拔缺氧环境方面发挥着重要作用^[6-7], 因此高原病与肠道微生态之间的关系愈发受到关注。研究表明, 肠道微生物的衍生代谢物是肠道微生物与宿主间通讯和相互作用的关键机制因素, 也是影响宿主健康与疾病发生的重要环节^[8-9]。低氧环境对肠道微生物群及其代谢产物产生显著影响, 三者形成复杂的相互作用网络, 共同调节宿主的代谢稳态和健康^[7,10]。

苦味西葫芦(*Cucurbita pepo cv Dayangua*, CPD), 别名大烟瓜, 是葫芦科南瓜属西葫芦的一个变种, 主要分布于内蒙古多伦地区^[11-12]。研究表明南瓜属植物具有抗炎^[13]、抗菌^[14]、抗氧化^[15]、抗病毒^[14]及解热镇痛^[16]等作用。本实

验室^[17]前期对 CPD 进行的毒性评估结果显示, 小鼠灌胃 CPD 后未观察到急性或亚慢性毒性作用。鉴于炎症和缺氧暴露诱导的氧化应激是高原病的关键病理机制^[18-19], 而 CPD 具有抗炎、抗氧化特性, 本研究探讨 CPD 是否能提升机体对缺氧的耐受能力, 并从肠道微生物群及代谢产物改变的角度解析 CPD 发挥作用的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 SPF (specific-pathogen-free)级昆明小鼠(KM 小鼠), 体重(20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCKX(京)2021-0011。饲养于军事医学研究院实验动物中心, 且已通过动物伦理委员会批准, 编号为 IACUC-DWZX-2025-046。在恒温、恒湿标准条件下饲喂, 小鼠可自由饮水, 并自动控制昼夜节律。

1.1.2 CPD 溶液的制备

苦味西葫芦由黑龙江拜欧迪生物医药科技有限公司提供, 并经北京市农业与林业科学院生物技术研究所刘贵明教授鉴定。首先将新鲜的苦味西葫芦晒干, 洗净后烘干并研磨成粉, 经 25 目筛网过滤。过滤后使用激光粒度仪(Sympatec 公司)测定粉末粒径, CPD 平均粒径范围为 20–30 μm。称取筛分后的粉末, 用蒸馏水配制成 100 mg/mL 浓度的悬浮液, 随后使用均质机(上海弗鲁克科技发展有限公司)均质 3 min, 使悬浮液均匀分散, 确保制备的 CPD 悬

浮液能顺利通过小鼠灌胃针。最终将 CPD 溶液用蒸馏水配制至指定剂量浓度, 于 -80°C 冰箱保存待用。

1.2 小鼠常压耐缺氧实验

将 40 只 KM 小鼠适应性喂养 1 周后, 按照随机数字表法分为 2 组, 分别为常压常氧对照组(normoxia ddH₂O, ND)、常压常氧 CPD 干预组(normoxia CPD, CPD), 每组 20 只。实验正式开始后, 各组小鼠每日灌胃给药 1 次, CPD 给药组剂量为 800 mg/(kg·d), 对照组给予相同体积的 ddH₂O, 连续干预 15 d。每隔 3 d 称量 1 次小鼠体重。于最后 1 次给药 1 h 后, 将各组小鼠放入盛有 10 g 钠石灰的 250 mL 广口瓶内(1 只/瓶), 广口瓶内事先放置合适大小的滤纸以吸收小鼠尿液, 钠石灰主要用于吸收小鼠呼吸产生的二氧化碳和水蒸气。之后取适量凡士林涂抹瓶口, 盖严, 确保不漏气后开始计时, 以呼吸停止为指标, 观察并记录小鼠在广口瓶中的生存时间, 并进行统计分析。

小鼠灌胃剂量的选择依据: 在急性毒性实验中 CPD 半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)大于 2 000 mg/(kg·d); 而亚慢性毒性实验结果表明, 给予 200、400 及 600 mg/(kg·d)剂量的苦味西葫芦 3 个月均不会导致小鼠死亡或明显的器官损伤^[17]。因此, 在保证小鼠健康的前提下将药物剂量设定为 800 mg/(kg·d), 实验时间设定为 15 d。

1.3 粪便样本采集

于最后 1 次给药后使用无菌粪便收集盒收集小鼠粪便, 收集过程中保持粪便收集盒洁净, 尽量保证粪便不接触尿液。收集的新鲜粪便立即装入 1.5 mL 无菌 EP 管中, 并用液氮速冻。待粪便全部收集完成后立即放置于医用低温箱(-80°C)中冷冻保存。

1.4 16S rRNA 基因扩增子测序和分析

16S rRNA 基因扩增子测序样本量为每组 20 只。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 341F (5'-CCTAYGGGRBG CASCAG-3')和 806R (5'-GGACTACNNGGGTAT CTAAT-3')以高效高保真酶扩增基因序列的 V3-V4 区域构建文库。文库合格后, 通过 NovaSeq 6000 平台进行上机测序(PCR 反应由北京诺禾致源科技股份有限公司完成)。使用 FLASH (v1.2.11, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)^[20]软件对样本下机数据进行拼接, 得到 raw tags。随后使用 fastp (v0.23.1)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^[21]。

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 QIIME 2 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 QIIME 2 软件计算 α 多样性指数并对组间差异进行分析; 计算加权 UniFrac (weighted UniFrac)距离并绘制主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)图进行 β 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 LEfSe 分析组间显著差异性物种, LDA score 阈值为 4。

1.5 靶向代谢组学分析

由于小鼠粪便样本量不足, 靶向代谢组学样本量为每组 6 只。准确称取各代谢物标准品, 制备混标线性母液, 用甲醇稀释线性母液得到系列浓度的工作液。配制一定浓度的同位素内标溶液, 混匀得到内标溶液。线性、内标和质控的母液及工作溶液均保存于 -20°C 冰箱。液氮研磨样本, 分别称取 ND 组和 CPD 组一定量的粪便样本, 加入 300 μL 80% 甲醇水溶液, 涡旋混匀, 静置 10 min 后, 4°C 、15 000 r/min 离心 15 min, 取 50 μL 上清液, 加入 150 μL 衍生化

试剂, 于 40 °C 衍生 40 min; 稀释衍生后的样本到对应倍数, 取 90 μL 上清液, 加入 10 μL 的混合内标溶液, 混匀后使用超高效液相色谱-串联质谱联用(UHPLC-MS/MS)系统定量代谢物(靶向代谢组学检测由北京诺禾致源科技股份有限公司完成)。

N500 代谢组是为体外高通量绝对定量小分子代谢物而开发的靶向代谢组学技术, 一次检测可对生物样本中近 500 种物质进行绝对定量, 并且同时解决了非靶向代谢组学验证难和靶向代谢组学检测物质少的问题。涉及的关键通路包括胆汁酸生物合成、脂肪酸生物合成、三羧酸循环、氨基酸代谢、短链脂肪酸代谢等, 包含众多肠道菌群相关小分子代谢物。

差异代谢物的筛选主要参考变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)、比较对差异倍数(fold change, FC)和比较对显著性(P -value, P) 3 个参数。VIP 是指偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)模型第一主成分的变量投影重要度^[22], 反映每一个样品定量值对差异的贡献程度; FC 为每个代谢物在比较组中所有生物重复定量值的均值的比值; P 是通过 t 检验计算得到^[23], 表示差异显著性水平。设定阈值为 $\text{VIP}>1.0$, $\text{FC}>1.2$ 或 $\text{FC}<0.833$ 且 $P<0.05$ ^[24-25]。

1.6 关联性分析

为评估小鼠生存时间与肠道微生物及代谢物之间的关系, 并揭示与表型改善相关的微生态特征, 采用 Pearson 相关系数计算小鼠生存时间、差异代谢物及差异微生物之间的相关性。对相关系数进行显著性 t 检验, 筛选出具有统计学意义的相关性对, 设定 $\text{FDR}<0.05$, 将 FDR 校正后的 Q -value 作为阈值, 当 Q -value <0.05 时认为差异具有统计学意义。绘制相关性热图, 所有分析使用 R 软件(“vegan”包)完成。

1.7 统计学分析

生理数据采用 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 对于 2 组数

据之间的比较, 若数据资料满足正态分布和方差齐性等前提条件时使用独立样本 t 检验; 否则使用秩转换的非参数检验(Mann-Whitney U 检验)。以 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。所有统计分析均使用 GraphPad Prism 软件(v9.5.0)进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 CPD 对小鼠体重及抗缺氧能力的影响

整个灌胃期间, 两组小鼠体重均呈增加趋势(图 1A)。取实验终点的两组小鼠的体重进行分析, 与对照组相比, CPD 干预对小鼠体重无影响($P>0.05$, 图 1B)。连续 15 d 给予小鼠 CPD 后, 与对照组相比, CPD 组在缺氧条件下的存活时间显著延长($P<0.01$, 图 1C)。

2.2 CPD 对小鼠肠道微生物的影响

物种丰度柱形图(图 2A)展示了属水平上 ND 组和 CPD 组小鼠粪便样本中相对丰度排名前 10 的物种。在属水平上, 排名前 10 的物种分别为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、宿主关联乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、毛螺菌科 NK4A136 群(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、暂定枝状杆菌(*Candidatus_Arthromitus*)、普雷沃氏菌科 UCG-001(*Prevotellaceae_UCG-001*)、埃希氏菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、别样杆菌属(*Alistipes*)。其中, 相较于 ND 组, CPD 给药后 *Lactobacillus* ($P=0.02$)、*Alistipes* ($P=0.004$) 的丰度显著升高, 而 *Ligilactobacillus*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 丰度有升高趋势, *Bacteroides* ($P=0.03$)、*Escherichia-Shigella* ($P=0.04$)、*Akkermansia* ($P=0.007$) 的丰度显著降低, *Candidatus_Arthromitus*、*Prevotellaceae_UCG-001*、*Blautia* 的丰度有下降趋势。

为评估小鼠肠道微生物群落内部物种的丰富度和均匀度, 采用 α 多样性进行表示。ND 组与 CPD 组之间的 Chao1 指数(图 2B)和 Shannon 指数(图 2C)无显著性差异, 表明短期的 CPD 给药不会影响肠道微生物群的物种丰富度和均匀

度。此外, 本研究基于加权的 UniFrac 分析(图 2D)和主坐标分析(PCoA, 图 2E)来反映 β 多样性, 其用以描述不同组别的微生物群落构成差异, 结果表明 CPD 干预可显著改变小鼠肠道菌群结构组成($P=0.001$)。进一步采用 LEfSe 分

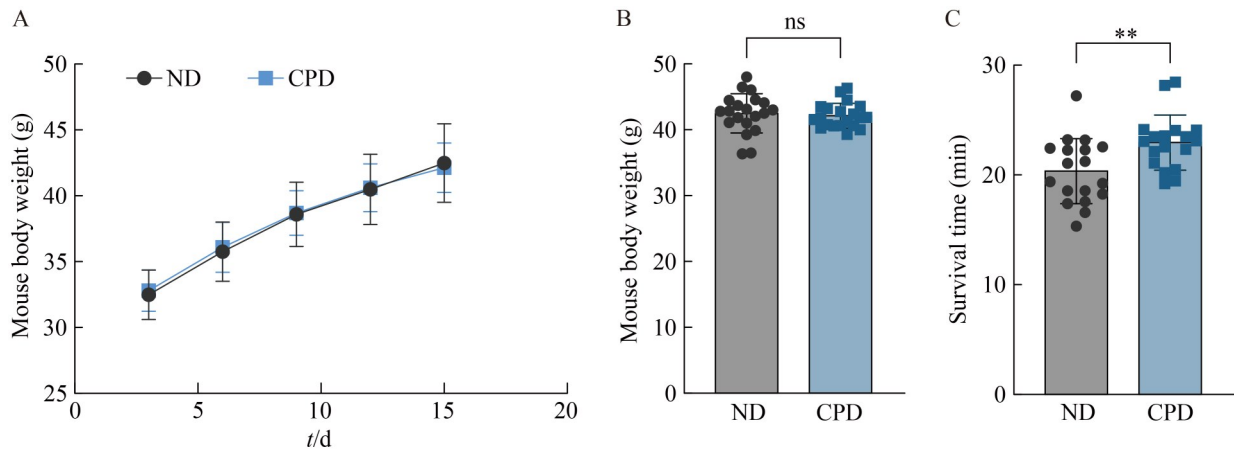
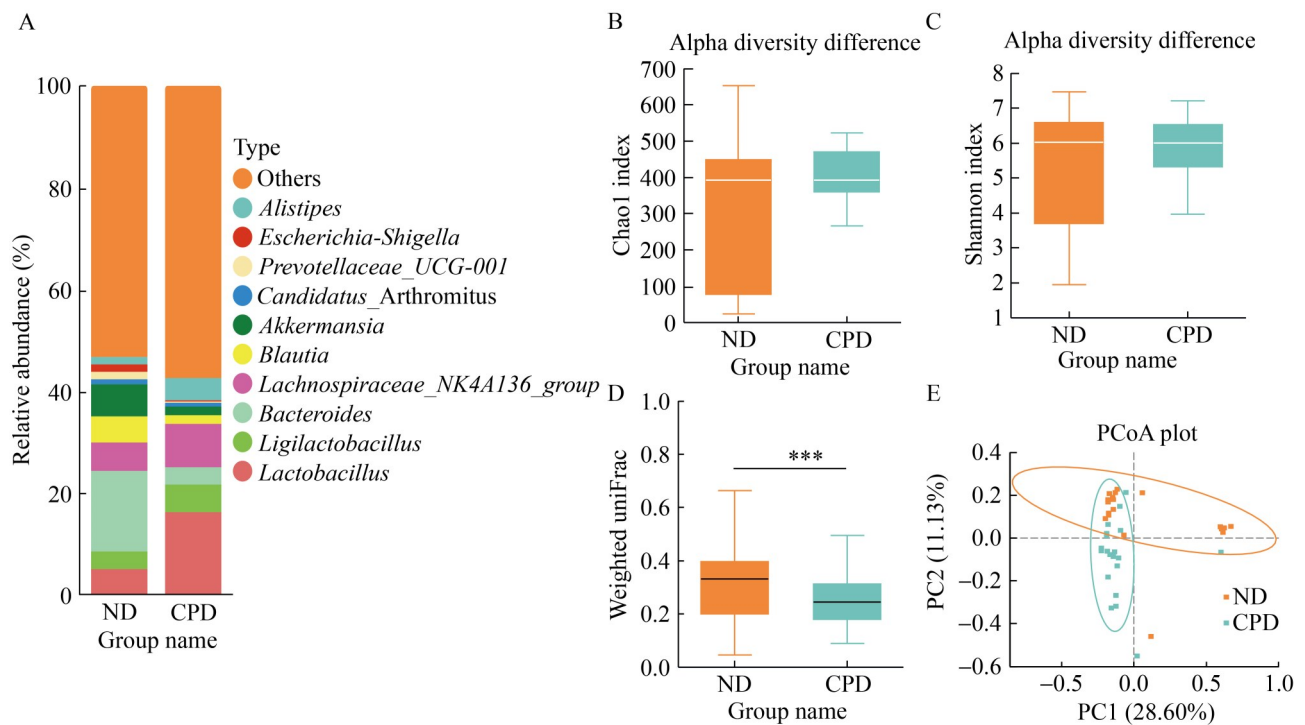


图1 CPD对小鼠体重及抗缺氧能力的影响。 A: 小鼠15 d的体重变化趋势; B: 实验终点阶段的两组小鼠体重差异; C: 小鼠在常压耐缺氧实验中的存活时间。

Figure 1 The effect of CPD on body weight and anti-hypoxic capacity in mice. A: Body weight change trend of mice over 15 days; B: Body weight difference between the two groups of mice at the experimental endpoint; C: Survival time of mice in the acute normobaric hypoxia tolerance test. ns: Not statistically significant; **: $P < 0.01$.



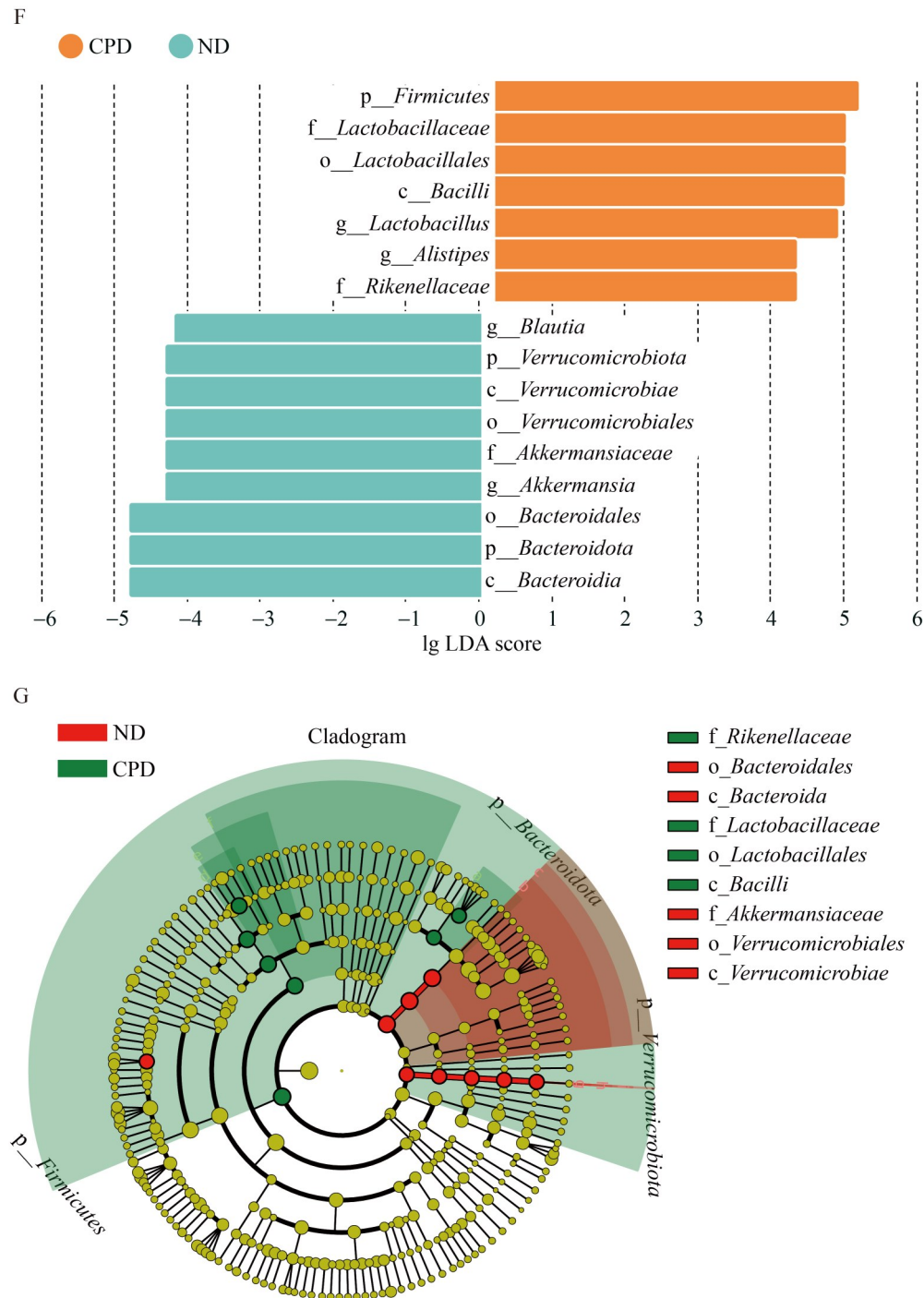


图2 CPD对小鼠肠道微生物的影响。 A: 属水平相对丰度前10的物种; B: Chao1指数; C: Shannon指数; D: 加权的UniFrac分析; E: 主坐标分析(PCoA); F: 对组间存在显著差异的物种进行LEfSe分析; G: 系统发育树图。

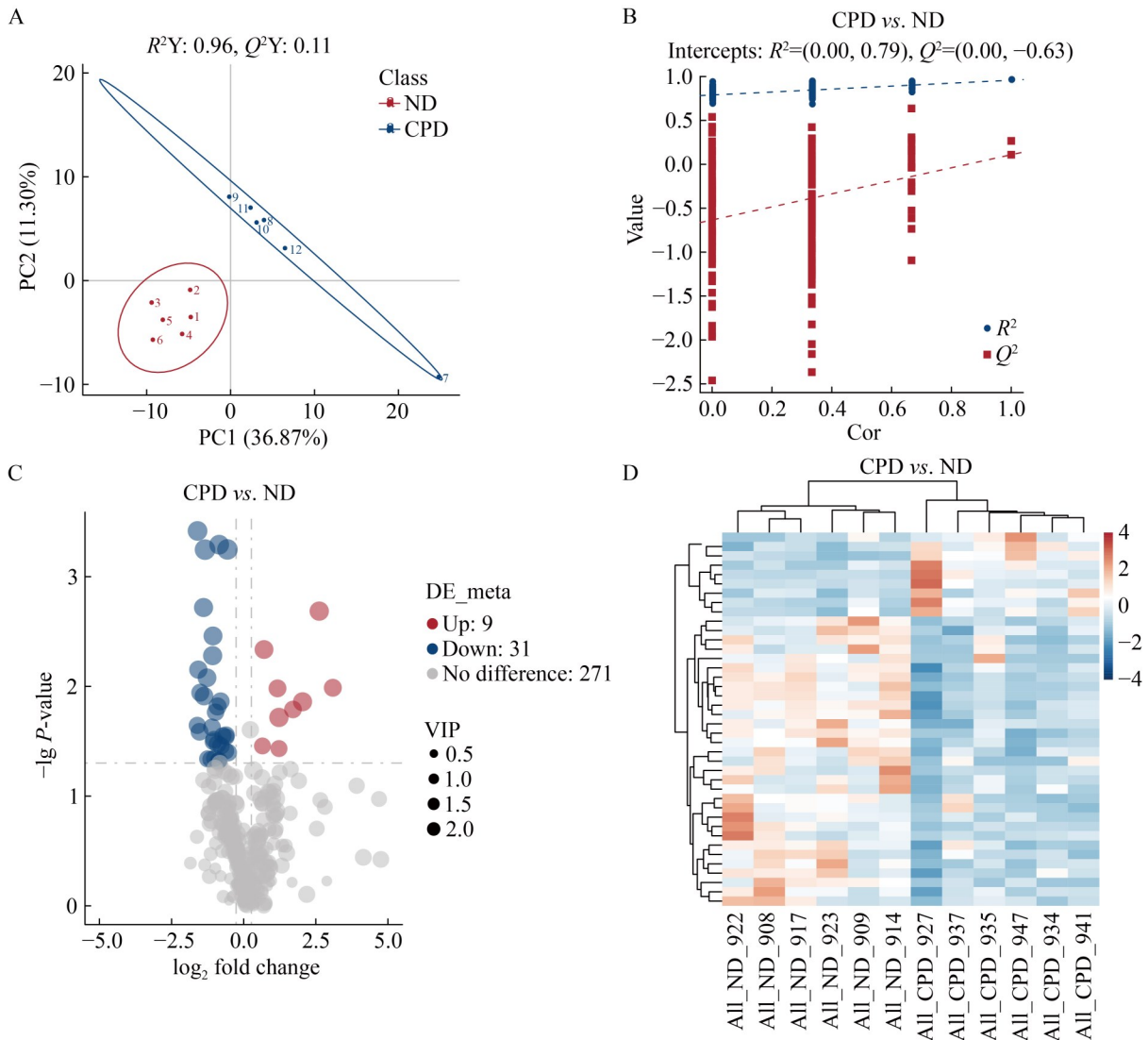
Figure 2 The effect of CPD on the gut microbiota in mice. A: Top 10 species at the genus level by relative abundance; B: Chao1 index; C: Shannon index; D: Weighted UniFrac analysis; E: Principal coordinates analysis (PCoA); F: LEfSe analysis of species with significant differences between groups; G: Phylogenetic tree diagram.

析确定组间肠道菌群的差异物种, 在 LDA 阈值设定为 4 的基础上, LDA 值分布柱状图和 LEfSe 进化分支图如图 2F、2G 所示, 在 CPD 组芽孢杆菌门(*Bacillota*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)、乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)、理化所菌科(*Rikenellaceae*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、别样杆菌属(*Alistipes*)的相对丰度较高。在 ND 组疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、疣微菌纲(*Verrucomicrobiae*)、疣微菌目(*Verrucomicrobiales*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)、阿克曼氏菌科(*Akkermansiaceae*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、阿克曼氏菌属

(*Akkermansia*)的相对丰度较高。

2.3 CPD 对小鼠粪便代谢物的影响

采用 PLS-DA 进行差异代谢物筛选。如图 3A、3B 所示, PLS-DA 模型评价参数 R^2 接近 1, 且 $R^2Y > Q^2Y$ (Y 表示 PLS-DA 模型的响应变量), 表明模型建立良好, 可作为寻找模型生物标记物群的前提。因此, 本研究以 $VIP > 1.0$, $FC > 1.2$ 或 $FC < 0.833$ 且 $P < 0.05$ 作为差异代谢物的筛选标准。研究发现, 与 ND 组相比, CPD 组小鼠的许多代谢物表现出明显改变。在 40 种代谢物中, CPD 组有 9 种代谢物上调, 31 种代谢物下调(图 3C)。样本间聚类分析(图 3D)显示,



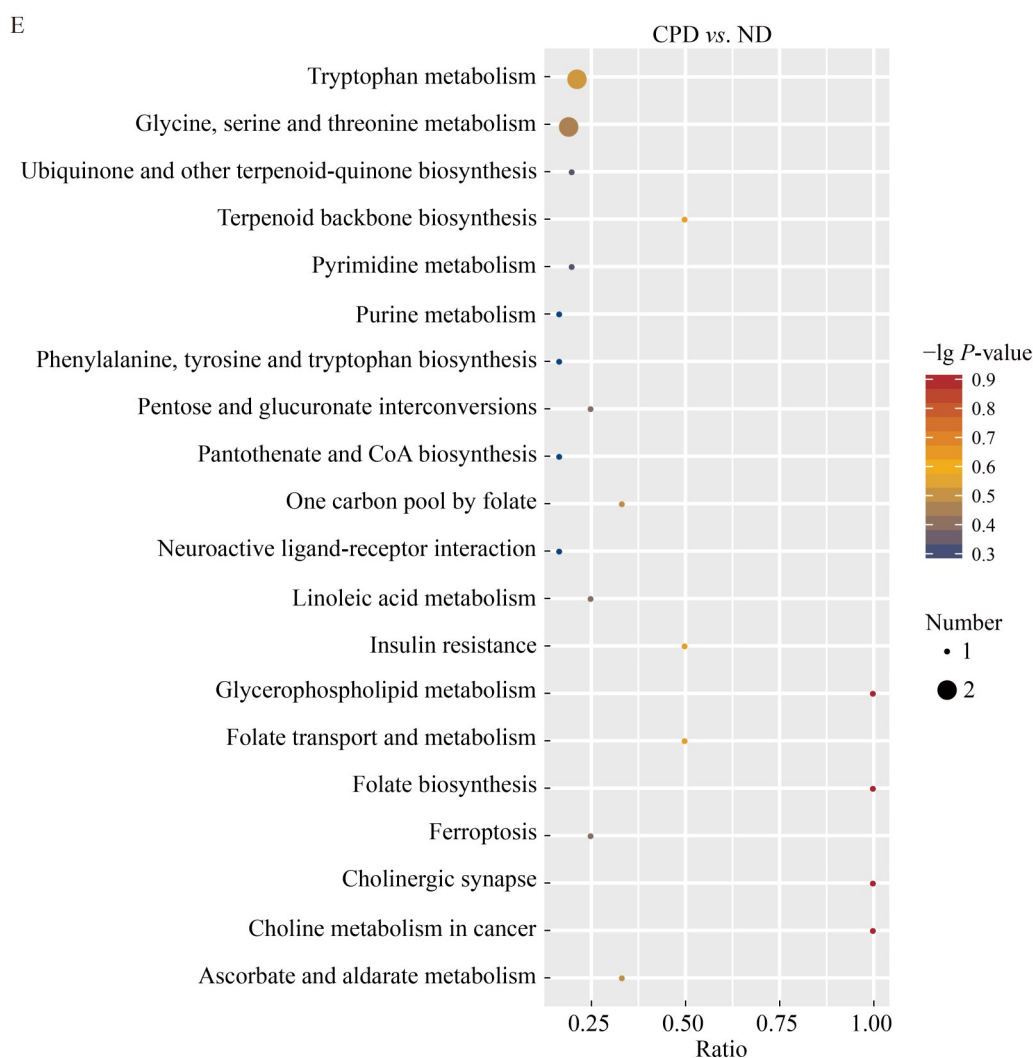


图3 CPD对小鼠粪便代谢物的影响。A: PLS-DA得分散点图; B: PLS-DA排序验证图; C: 差异代谢物火山图; D: 差异代谢物聚类热图; E: KEGG富集气泡图。

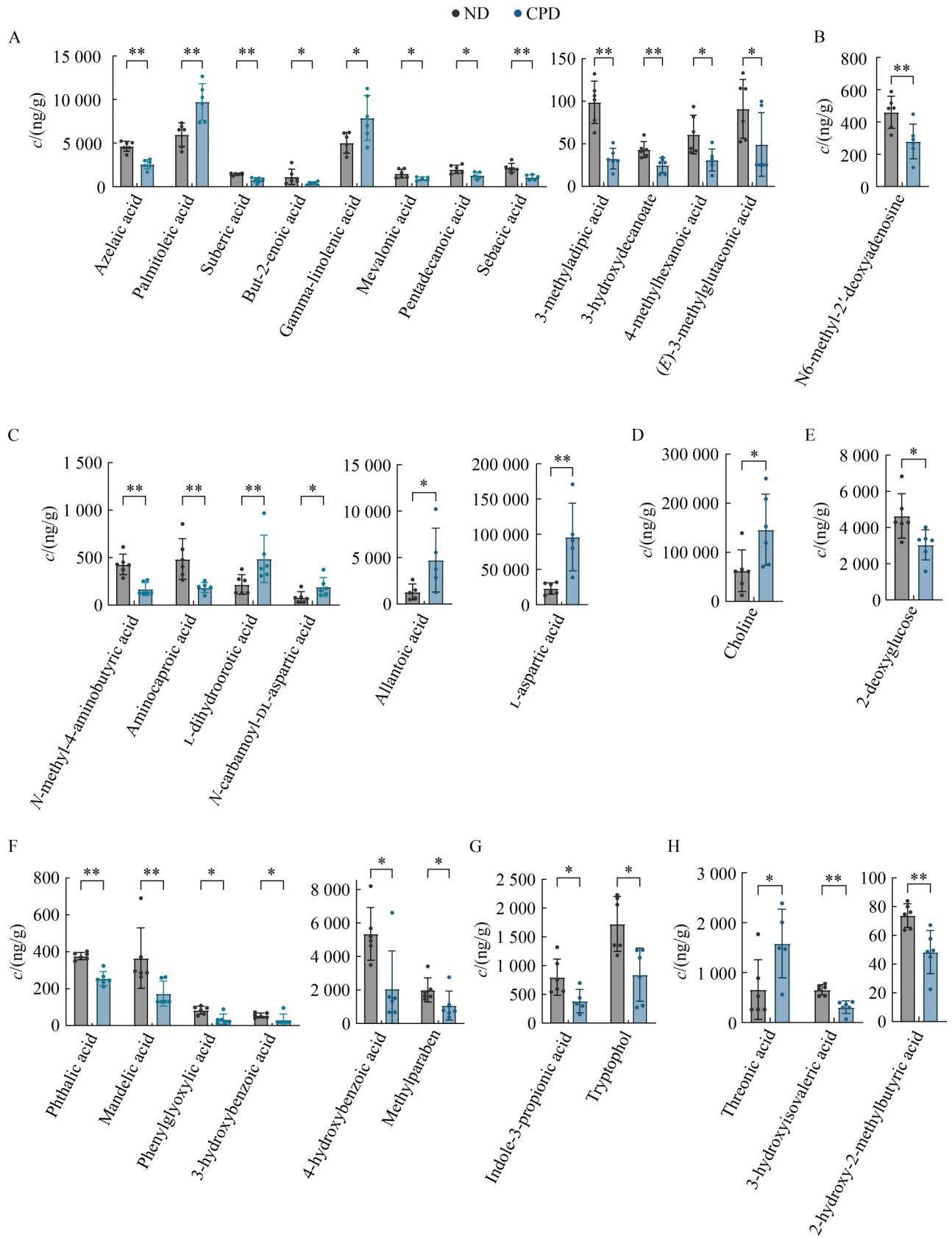
Figure 3 The effect of CPD on fecal metabolites in mice. A: PLS-DA score plot; B: PLS-DA permutation test plot; C: Volcano plot of differential metabolites; D: Clustering heatmap of differential metabolites; E: KEGG enrichment bubble plot.

各组组内样本聚类关系相近, 差异代谢物丰度一致性较高。

本研究聚焦于具体的差异代谢物, 发现主要有以下 12 类代谢产物(图 4A-4L), 其中脂肪酸类(fatty acids)、氨基酸类(amino acids)及苯环型化合物类(benzenoids)占主要地位(图 4A、4C、4F), 核苷酸及类似物(nucleosides, nucleotides and analogues)、胆碱类(cholines)、脂肪醇类

(fatty alcohols)、短链脂肪酸类(short chain fatty acids)相对较少(图 4B、4D、4E、4L)。

本研究通过差异代谢物 KEGG 富集分析(图 3E)发现, 共有 20 条通路被富集出来, 其中富集差异代谢物数量较多的 2 条通路是色氨酸代谢通路(tryptophan metabolism)和甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路(glycine, serine and threonine metabolism); 同时, 甘油磷脂代谢通



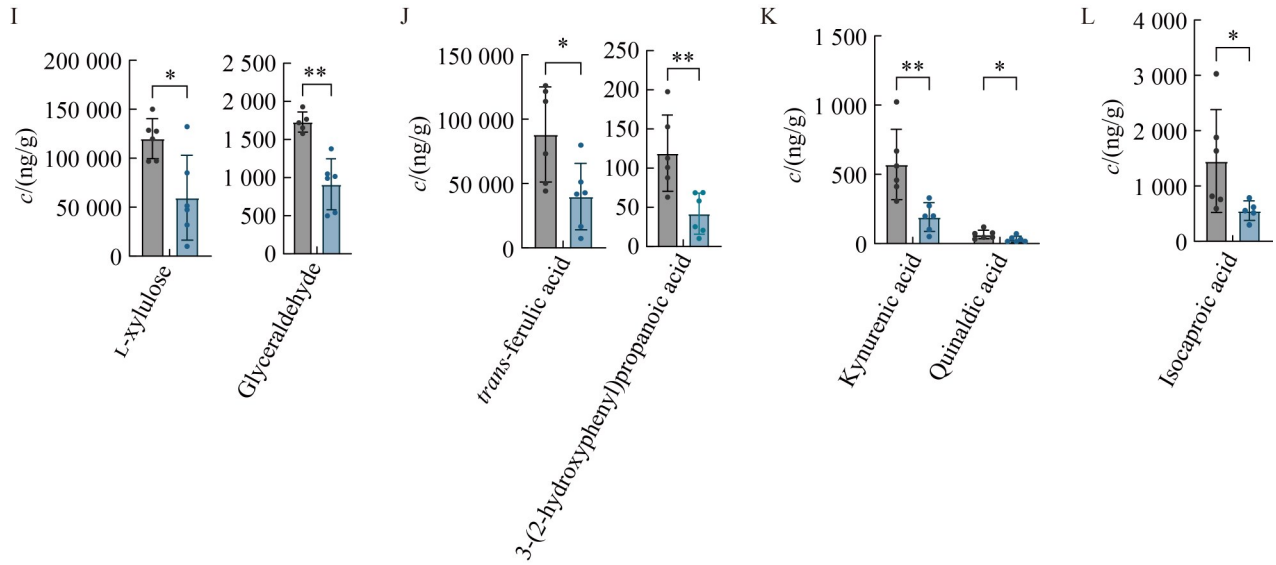


图4 两组差异代谢物比较。A: 脂肪酸类; B: 核苷、核苷酸及类似物; C: 氨基酸类; D: 胆碱类; E: 脂肪醇类; F: 苯环型化合物类; G: 吲哚类; H: 有机酸类; I: 碳水化合物类; J: 苯丙酸类; K: 喹啉类; L: 短链脂肪酸类。

Figure 4 Differential metabolite comparison: ND vs. CPD. A: Fatty acids; B: Nucleosides, nucleotides, and analogues; C: Amino acids; D: Cholines; E: Fatty alcohols; F: Benzenoids; G: Indoles; H: Organic acids; I: Carbohydrates; J: Phenylpropanoic acids; K: Quinolines; L: Short chain fatty acids. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

路(glycerophospholipid metabolism)、叶酸生物合成通路(folate biosynthesis)、胆碱能突触通路(cholinergic synapse)、癌症中的胆碱代谢通路(choline metabolism in cancer)的变化最为显著。

2.4 小鼠生存时间与肠道微生物及粪便代谢物的关联性分析

如图5所示,将两组间的差异代谢物(图4)与小鼠生存时间和实验分组进行关联,发现生存时间与差异菌属表现一致。与小鼠生存时间呈正相关的菌属有副普雷沃氏菌属(*Paraprevotella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、毛螺菌科[*Lachnospiraceae* (ASV501)]等。在CPD干预后显著富集的粪便代谢物有棕榈油酸(palmitoleic acid)、乙醛酸(glyoxylic acid)、十一烷酸(hendecanoic acid)、L-天冬氨酸(L-aspartic acid)、O-琥珀酰高丝氨酸(*O*-succinyhomoserine)、DL-3-苯乳酸(phenyllactic acid)、胆碱(choline)、尿囊酸,其中除DL-3-苯

乳酸(phenyllactic acid)、胆碱(choline)外,剩余富集代谢物与小鼠生存时间呈显著正相关($P < 0.05$)。此外,与CPD干预及生存时间负相关的代谢物包含多个氨基酸及其分解代谢物:色醇(tryptophol)、L-脯氨酸(L-proline)、L-亮氨酸(L-leucine)、3-吲哚丁酸(3-indolebutyric acid)、N-乙酰缬氨酸(*N*-acetylvaline)、丙甘氨酸(propionylglycine)、吲哚乙酸(indoleacetic acid);有机酸:4-羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid)、草酸(oxalic acid)、壬二酸(azelaic acid)、3,5-二羟基-3-甲基戊酸(mevalonic acid)、3-(甲硫基)丙酸[3-(methylthio)propanoic acid]、水杨尿酸(salicyluric acid)、延胡索酸(fumaric acid);脂肪酸:2-丁烯酸(but-2-enoic acid)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid)、二十二碳四烯酸(docosic acidtraenoic acid);胆汁酸: β -猪去氧胆酸(beta-hyodeoxycholic acid)、石胆酸(lithocholic acid)。

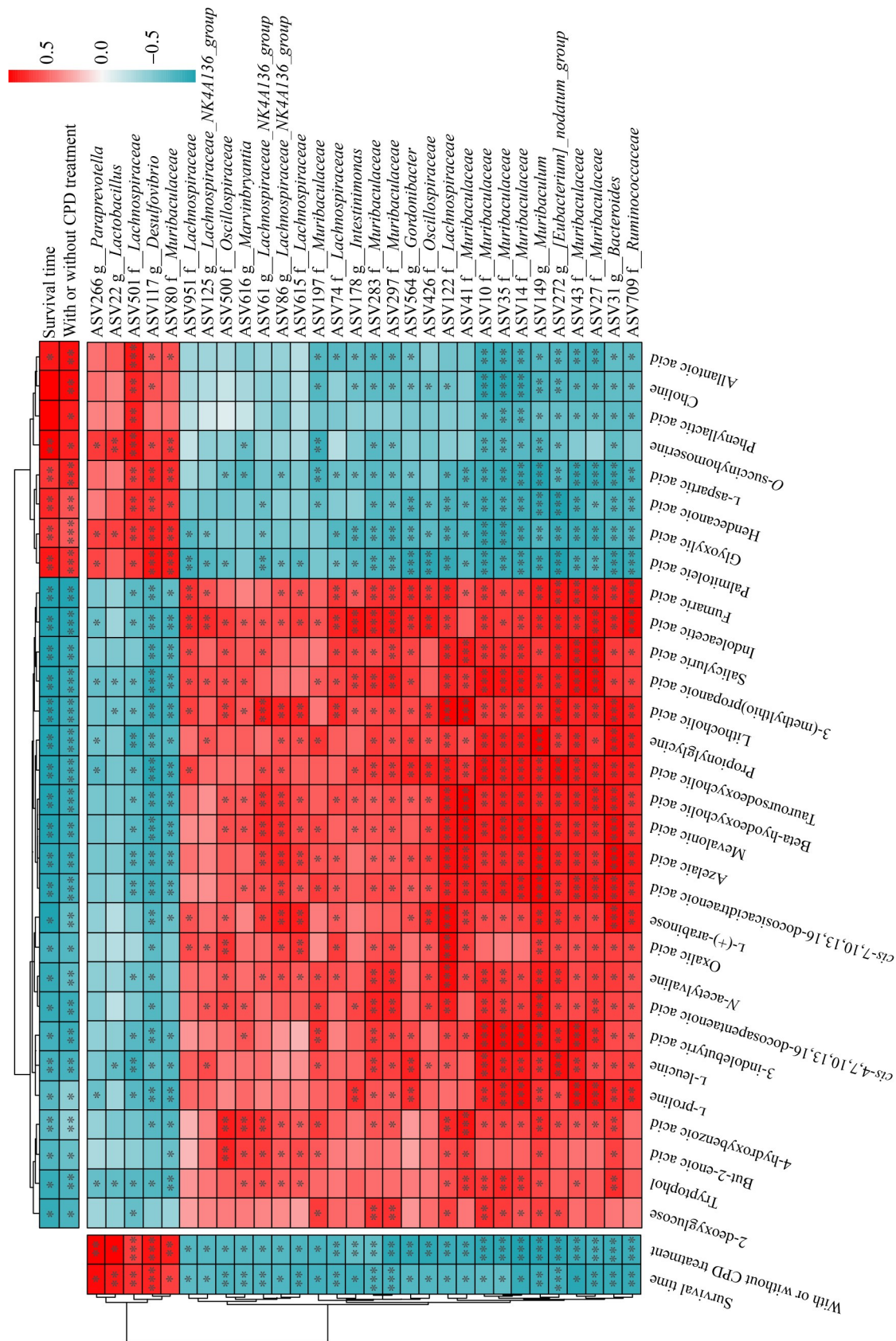


图5 小鼠生存时间与肠道微生物及粪便代谢物的关联性分析

Figure 5 Analysis of the association between mouse survival time and fecal metabolites. In a grouping with or without CPD treatment, the CPD intervention group and the control group were assigned parameter values of '1' and '0', respectively, for association analysis. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

对显著关联的差异代谢物与微生物菌属进行关联性分析, 结果(图 5)显示, 乳杆菌属(*Lactobacillus*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)的增加与癸二酸(sebacic acid)、3-羟基异戊酸(3-hydroxyisovaleric acid)、辛二酸(suberic acid)、壬二酸(azelaic acid)、2-羟基-2-甲基丁酸(2-hydroxy-2-methylbutyric acid)、扁桃酸(mandelic acid)、喹啉酸(quinaldic acid)、2-丁烯酸(but-2-enoic acid)、异己酸(isocaproic acid)呈显著负相关($P < 0.05$), 与棕榈油酸(palmitoleic acid)、乙醛酸、*O*-琥珀酰高丝氨酸、尿囊酸(allantoic acid)呈显著正相关($P < 0.05$), 而鼠杆状菌科(*Muribaculaceae*)、普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)等的关联结果则相反。

3 讨论与结论

随着前往高海拔地区人群的增加, 因高海拔缺氧导致的相关疾病已成为一个严重的公共卫生问题, 因此如何改善高原缺氧状况具有重要意义。本研究发现, CPD 干预可显著延长缺氧小鼠的存活时间, 表明 CPD 具有较好的抗缺氧能力, 这一积极的表型效应与肠道微生物群落结构的重塑及粪便代谢物谱的改变密切相关。

化学成分是 CPD 发挥药理作用的基础。研究表明 CPD 水提醇沉物能明显抑制蛋清、二甲苯和弗氏完全佐剂引起的炎性水肿^[13]; 此外, CPD 粗提物对鸡新城疫病毒、犬细小病毒及金黄色葡萄球菌的增殖也起到一定的抑制作用^[14]。目前, 已鉴定出 CPD 含有多种化学成分, 如 β -谷甾醇(β -sitosterol)、胡萝卜苷(daucosterol)、琥珀酸(amber acid)等^[26]。其中 β -谷甾醇^[27]和胡萝卜苷^[28-29]已被证明具有较好的抗氧化及抗炎活性, 同时琥珀酸在脑出血模型中也表现出抗炎及抗氧化作用^[30]。

虽然我们推测 CPD 的抗炎、抗氧化作用可能与上述化学成分的存在有关, 但也有研究表明肠道菌群在维持药物-宿主相互作用中扮演重

要角色, 并介导了许多中药的治疗过程^[31-33]。为阐释 CPD 提高缺氧耐受力的过程是否通过肠道菌群发挥作用, 本研究采用 Pearson 相关系数, 计算小鼠生存时间、差异代谢物与差异微生物菌属之间的相关性。

关联性分析发现, 部分毛螺菌科(ASV501)在 CPD 组富集且与小鼠生存时间延长显著正相关, 其对肠道健康有益, 与尿囊酸的代谢直接相关^[34]。尿囊酸是嘌呤核苷酸降解代谢途径中的一个中间产物, 在哺乳动物中这条通路的核心作用是处理体内老化或受损的细胞, 以及从食物中摄入的核酸, 最终生成尿酸排出体外, 这表明 CPD 促进了肠道微生物的嘌呤代谢并与胆碱、不饱和脂肪酸等保护性代谢物形成协同作用, 不仅为肠道上皮提供能量, 还具有全身性的抗炎和能量代谢调节功能^[35-36]; 同时, 尿囊酸可能与 CPD 组中升高的棕榈油酸等脂质代谢物协同作用, 共同贡献于血氧水平的改善^[7]。CPD 组关联的代谢物, 如胆碱(choline), 是磷脂代谢和神经递质乙酰胆碱的前体, 与细胞膜稳定和神经调节有关^[37]; L-天冬氨酸参与尿素循环和能量代谢^[38]。这些代谢物的升高可能反映了 CPD 干预后机体能量代谢和细胞功能趋于正常化, 从而提高小鼠在缺氧过程中的抵抗能力。

此外, CPD 组显著富集了乳杆菌属(*Lactobacillus*), 该菌的代谢产物(如乳酸、短链脂肪酸)具有维持肠道屏障完整性、调节免疫和抗炎的作用^[39]。有研究表明, 乳杆菌属具备显著的抗氧化特性, 在利用偶氮二异丁脒盐酸盐/ H_2O_2 诱导人肠上皮细胞 Caco-2 氧化损伤的模型中, 乳杆菌属干预后表现出良好的自由基清除能力, 调控多种抗氧化酶的表达。同时, 该干预还下调了多个氧化应激相关基因的表达^[40-42], 这提示乳杆菌属在抗缺氧方面具有潜在功能。乳杆菌属的富集与癸二酸(sebacic acid)、3-羟基异戊酸(3-hydroxyisovaleric acid)等 9 种代谢物水平的下降同时发生, 这强烈提示乳杆菌属可能通过直接或间接的方式参与对这些代谢物的调

控, 这些代谢物主要属于细菌发酵副产物、宿主-微生物共代谢产物以及能量代谢中间体。该现象表明 CPD 干预使小鼠肠道微生物整体代谢从以蛋白质发酵为主的代谢模式, 转向以糖类、乳酸发酵为主的代谢模式, 减少了潜在有害发酵产物的积累^[43]。

综上所述, CPD 可能通过促进乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 等有益菌的生长来调节肠道菌群平衡, 并通过提升胆碱(choline)、尿囊酸等有益代谢物水平以重塑肠道代谢谱, 从而增强小鼠对缺氧的抵抗能力。这些发现提示, 调节“肠道微生物-代谢物”轴可能是 CPD 增强机体缺氧耐受性和改善高原不良反应的重要机制之一, 为开发针对缺氧相关疾病的微生态干预策略提供了理论依据和潜在靶点。

作者贡献声明

李奕彤: 进行实验研究并撰写文章; 张欢: 完成部分实验和文章修改润色; 胡灿颖: 参与数据分析及文章润色; 童江辉: 参与协助实验操作及文献检索; 付兴: 参与协助实验操作; 王增明: 提供实验原材料; 郭浩: 参与实验方案的设计; 谭亚芳: 参与文章框架构建; 杨瑞馥: 参与实验方案的设计与选题; 邓胜群: 参与实验的研究构思和设计以及对文章的审校; 毕玉晶: 参与实验的研究构思和设计, 并参与文章的修改润色。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] TREMBLAY JC, AINSLIE PN. Global and country-level estimates of human population at high altitude[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(18): e2102463118.
- [2] FRISANCHO AR. Developmental functional adaptation to high altitude: review[J]. American Journal of Human Biology, 2013, 25(2): 151-168.
- [3] CHEN Z, CHAI ST, DING YX, PANG KY, DONG TQ, DAI DW, WANG JM, WANG SX, LIU SJ. Gut microbiota modulates lung gene expression and metabolism to aid SD rats in adapting to low-pressure hypoxia[J]. Microbiology Spectrum, 2025, 13(6): e0004525.
- [4] YU YJ, LI R, PU LL, PAN CY, GUO CJ, WANG XX. Citrus tangerine pith extract alleviates hypoxia-induced ileum damage in mice by modulating intestinal microbiota[J]. Food & Function, 2023, 14(13): 6062-6072.
- [5] MEIER D, COLLET TH, LOCATELLI I, CORNUZ J, KAYSER B, SIMEL DL, SARTORI C. Does this patient have acute mountain sickness: the rational clinical examination systematic review[J]. JAMA, 2017, 318(18): 1810-1819.
- [6] ZHAO FF, YANG LL, ZHANG T, ZHUANG DH, WU QF, YU JK, TIAN C, ZHANG ZG. Gut microbiome signatures of extreme environment adaption in Xizang pig[J]. npj Biofilms and Microbiomes, 2023, 9(1): 27.
- [7] ZHAO HW, SUN LJ, LIU JL, SHI B, ZHANG YP, QU-ZONG CR, DORJI T, WANG TY, YUAN HL, YANG JS. Meta-analysis identifying gut microbial biomarkers of Qinghai-Xizang plateau populations and the functionality of microbiota-derived butyrate in high-altitude adaptation[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2350151.
- [8] DING SJ, YAN WX, FANG J, JIANG HM, LIU G. Potential role of *Lactobacillus plantarum* in colitis induced by dextran sulfate sodium through altering gut microbiota and host metabolism in murine model[J]. Science China Life Sciences, 2021, 64(11): 1906-1916.
- [9] LAVELLE A, SOKOL H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2020, 17(4): 223-237.
- [10] SU Q, LI YC, ZHUANG DH, LIU XY, GAO H, LI D, CHEN Y, GE MX, HAN YM, GAO ZL, YIN FQ, ZHAO L, ZHANG YX, YANG LQ, ZHAO Q, LUO YJ, ZHANG ZG, KONG QP. Rewiring of uric acid metabolism in the intestine promotes high-altitude hypoxia adaptation in Humans[J]. Molecular Biology and Evolution, 2024, 41(11): msac233.
- [11] 向华, 梅妹, 邓旭明, 高慧媛, 吴立军, 蔡辉, 王大成. 苦味西葫芦果实木脂素类成分研究[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(1): 65-67.
- [12] 高立新, 高慧敏. 高效液相色谱法测定苦味西葫芦中药西瓜苦苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1694-1696.
- [13] 丁艳丽, 邓旭明, 王学林, 王占庆, 张艳萍. 苦味西葫芦的抗炎作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2002, 21(4): 3-4.
- [14] 王学林, 刘军, 陈志宝, 高丰, 柳巨雄, 王晓峰, 田宝磊, 邓旭明, 阎继业. 苦味西葫芦药理作用初步研究[J]. 中兽医医药杂志, 2001, 20(3): 6-9.

- [15] 杜京. 西葫芦提取液的抗氧化、降血糖及抑菌活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2021.
DU J. Study on antioxidant, hypoglycemic and antibacterial activity of zucchini extract zucchini[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2021 (in Chinese).
- [16] 高立新. 苦味西葫芦水提物镇痛作用的实验研究[J]. 临床医药实践, 2009, 18(17): 1754-1756.
GAO LX. Study on the analgesic activity of the water extract of fructus of *Cucurbita pepo*[J]. Proceeding of Clinical Medicine, 2009, 18(17): 1754-1756 (in Chinese).
- [17] ZHANG H, ZHOU YZ, PAN ZY, WANG BK, YANG L, ZHANG N, CHEN BY, WANG XN, JIAN ZG, WANG LK, LING H, QIN XM, ZHANG ZL, LIU T, ZHENG AP, TAN YF, BI YJ, YANG RF. Toxicity assessment of *Cucurbita pepo cv Dayangua* and its effects on gut microbiota in mice[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2024, 24(1): 243.
- [18] LI XF, ZHANG JH, LIU GA, WU GF, WANG R, ZHANG JM. High altitude hypoxia and oxidative stress: the new hope brought by free radical scavengers[J]. Life Sciences, 2024, 336: 122319.
- [19] PHAM K, FROST S, PARIKH K, PUVVULA N, OEUNG B, HEINRICH EC. Inflammatory gene expression during acute high-altitude exposure[J]. The Journal of Physiology, 2022, 600(18): 4169-4186.
- [20] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [21] 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.
- [22] KIEFFER DA, PICCOLO BD, VAZIRI ND, LIU SM, LAU WL, KHAZALI M, NAZERTEHRANI S, MOORE ME, MARCO ML, MARTIN RJ, ADAMS SH. Resistant starch alters gut microbiome and metabolomic profiles concurrent with amelioration of chronic kidney disease in rats[J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2016, 310(9): F857-F871.
- [23] CHEN X, XIE CS, SUN LX, DING JH, CAI HB. Longitudinal metabolomics profiling of Parkinson's disease-related α -synuclein A53T transgenic mice[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136612.
- [24] HEISCHMANN S, QUINN K, CRUICKSHANK-QUINN C, LIANG LP, REISDORPH R, REISDORPH N, PATEL M. Exploratory metabolomics profiling in the kainic acid rat model reveals depletion of 25-hydroxyvitamin D3 during epileptogenesis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31424.
- [25] SREEKUMAR A, POISSON LM, RAJENDIRAN TM, KHAN AP, CAO Q, YU JD, LAXMAN B, MEHRA R, LONIGRO RJ, LI Y, NYATI MK, AHSAN A, KALYANA-SUNDARAM S, HAN B, CAO XH, BYUN J, OMENN GS, GHOSH D, PENNATHUR S, ALEXANDER DC, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression[J]. Nature, 2009, 457(7231): 910-914.
- [26] 何乐, 王大成, 吴立军, 邓旭明. 苦味西葫芦化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2007, 9(7): 10-12.
HE L, WANG DC, WU LJ, DENG XM. Studies on the chemical constituents of *Cucurbita pepo cv Dayangua*[J]. Modern Chinese Medicine, 2007, 9(7): 10-12 (in Chinese).
- [27] ZHANG P, LIU NC, XUE MY, ZHANG MJ, LIU W, XU C, FAN YD, MENG Y, ZHANG QH, ZHOU Y. Anti-inflammatory and antioxidant properties of β -sitosterol in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 391.
- [28] SHENG SH, WU PP, WU C, SU HM, GUO ZQ, WANG RS, LI JX, DUAN YJ, ZHANG S, MA LK. Daucosterol ameliorates acute inflammation and fibrosis following myocardial infarction via regulation of the ZBTB16 protein[J]. British Journal of Pharmacology, 2025. DOI: 10.1111/bph.70174.
- [29] BUI THANH T, DUC LV, NGUYEN THANH H, NGUYEN TIEN V. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds of ethanol extract from *Sanchezia speciosa* Leonard's leaves[J]. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 2017, 28(1): 79-84.
- [30] WANG YC, HUANG CY, WANG XY, CHENG R, LI X, WANG JH, ZHANG L, LI FH, WANG H, LI XY, LI Y, XIA YQ, CHENG J, PAN XF, JIA J, XIAO GD. Succinate activates uncoupling protein 2 to suppress neuroinflammation and confer protection following intracerebral hemorrhage[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2025, 42(13/14/15): 687-710.
- [31] ZOU YT, ZHOU J, ZHU JH, WU CY, SHEN H, ZHANG W, ZHOU SS, XU JD, MAO Q, ZHANG YQ, LONG F, LI SL. Gut microbiota mediates the protective effects of traditional Chinese medicine formula Qiong-yu-Gao against cisplatin-induced acute kidney injury[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(3): e0075922.
- [32] LIU W, LIU ZJ, FAN XN, LI DT, ZHAO TT, NIU YL, BAIMA YJ, WEN DX, LI B, HUANG XD. *Brassica rapa* L. polysaccharide mitigates hypobaric hypoxia-induced oxidation and intestinal damage via microbiome modulation[J]. npj Science of Food, 2024, 8(1): 112.
- [33] SU JQ, EFFAT K, DING MY, CAI CY, REN DX, HU SX, YE JZ, GAO S, NIU WN, SHANG XY. Polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* makino modulates the oxidative stress response under an acute hypobaric hypoxia environment by enhancing the relative abundance of anti-inflammatory gut microbiota[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(24): 15027-15045.
- [34] 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.

- [35] LI TZ, KANG XJ, ZHANG SJ, WANG YH, HE JS, LI HY, SHAO C, KANG JS. Integrating machine learning and multi-omics analysis to reveal nucleotide metabolism-related immune genes and their functional validation in ischemic stroke[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16: 1561544.
- [36] ZHAO XX, CHEN PP, YU L, GAO CC, WANG SN, YANG ZM, FENG ZT. Analysis of energy metabolism and lipid spatial distribution in hypoxic-ischemic encephalopathy revealed by MALDI-MSI[J]. *Biomedicine*, 2025, 13(6): 1431.
- [37] VANCE DE. Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014, 1838(6): 1477-1487.
- [38] HOLEČEK M. Aspartic acid in health and disease[J]. *Nutrients*, 2023, 15(18): 4023.
- [39] 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.
- [40] 李瑞盈, 张怡琳, 游春苹. 鼠李糖乳杆菌 B6 抗氧化活性和细胞保护作用研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(17): 57-63.
- LI RY, ZHANG YL, YOU CP. Effects of antioxidant activity and cell protection of *Lactobacillus rhamnosus* B6[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(17): 57-63 (in Chinese).
- [41] 李唤宇. 植物乳杆菌 Y44 对人肠上皮细胞模型 Caco-2 抗氧化功能的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
- LI HY. Effect of *Lactobacillus plantarum* Y44 on the antioxidative function of human intestinal epithelial cell model Caco-2[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019 (in Chinese).
- [42] HOU YC, LI XS, LIU XY, ZHANG YS, ZHANG W, MAN CX, JIANG YJ. Transcriptomic responses of Caco-2 cells to *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus plantarum* J26 against oxidative stress[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(9): 7684-7696.
- [43] LARSEN N, VOGENSEN FK, GØBEL R, MICHAELSEN KF, ABU AL-SOUD W, SØRENSEN SJ, HANSEN LH, JAKOBSEN M. Predominant genera of fecal microbiota in children with atopic dermatitis are not altered by intake of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(3): 482-496.