DOI:10.12441/spyswjs.20250703002 [文章编号] 1673-1689(2025)10-0132-11

橙皮素和圣草次苷对体外模拟肠道微生态的调节作用

程泽仁 蒙 霞 唐可静 沈 玲 顾 青 郦 萍*

(浙江工商大学食品与生物工程学院,浙江 杭州 310018)

摘要:【目的】比较橙皮素和圣草次苷对不同肠型肠道微生态的影响。【方法】通过构建体外肠道模拟发酵体系,结合16S rRNA高通量测序和气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,评估2种类黄酮对不同肠型肠道微生态的调节作用。【结果】经发酵处理后,2种类黄酮的添加使得拟杆菌肠型和普雷沃氏菌肠型中门水平上的Firmicutes与Bacteroidota相对丰度的比值(F/B值)降低;在属水平上,*Paeniclostridium*、*Sutterella*等促炎细菌相对丰度减少。LEfSe分析结果表明,拟杆菌肠型中橙皮素和圣草次苷的添加能显著提升*Lactobacillus*和*Lachnospiraceae*_ND3007_group等有益菌的占比。短链脂肪酸产量结果表明,拟杆菌肠型中橙皮素的添加使得乙酸和丁酸的产量显著提升,而圣草次苷的添加无明显效果。Spearman相关性分析结果表明,拟杆菌肠型中橙皮素组丁酸产量与*Lachnoclostridium*的相对丰度呈显著正相关。【结论】橙皮素的添加显著提升了拟杆菌肠型中肠道有益菌的占比,并能提高短链脂肪酸产量。该研究可为类黄酮对肠道微生态的调控提供理论基础。

关键词:橙皮素;圣草次苷;肠道菌群;短链脂肪酸

Regulatory Effects of Hesperetin and Eriocitrin on Gut Microbiota in an *in Vitro* Simulation Model

*CHENG Zeren MENG Xia TANG Kejing SHEN Ling GU Qing LI Ping**

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to compare the effects of hesperetin and eriocitrin on the gut microbiota in different enterotypes. [**Method**] An *in vitro* gut fermentation model was established, which was combined with 16S rRNA high-throughput sequencing and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique to evaluate the regulatory effects of the two flavonoids on the gut microbiota in different enterotypes. [**Result**] After fermentation, both flavonoids significantly reduced the Firmicutes-to-Bacteroidota ratio (F/B ratio) in terms of relative abundance at the phylum level in enterotype *Bacteroides* and enterotype *Prevotella*. At the genus level, pro-inflammatory bacteria including *Paeniclostridium* and *Sutterella* showed decreased relative abundance in treatment groups. LEfSe analysis result identified that both hesperetin and eriocitrin increased the proportions of beneficial genera such as *Lactobacillus* and *Lachnospiraceae*_ND3007_group in the enterotype *Bacteroides*. The quantification results of short-chain fatty acids indicated significant increases in acetate and butyrate production in hesperetin-treated enterotype *Bacteroides*, while eriocitrin treatment showed no significant alterations. Spearman correlation analysis result revealed a significant positive correlation between the relative abundance of

基金项目:浙江省“尖兵领雁+X”科技计划项目(2025C01099)。

通信作者:郦萍(1981—),女,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事益生菌资源挖掘及益生菌、益生元、后生元与机体健康研究。E-mail:ping-biology@outlook.com

收稿日期:2025-07-03 **修回日期:**2025-08-18

Lachnoclostridium and the butyrate production in the hesperetin-treated enterotype *Bacteroides*. [**Conclusion**] Hesperetin significantly enriched beneficial bacteria and enhanced the production of short-chain fatty acids in enterotype *Bacteroides*. The results can provide a theoretical foundation for the flavonoid-mediated regulation of the gut ecosystem.

Keywords: hesperetin; eriocitrin; gut microbiota; short-chain fatty acid

橙皮素和圣草次苷是2种类黄酮，它们在柑橘类水果中广泛存在且易提取[1-2]。与大多数类黄酮一样，橙皮素和圣草次苷具有良好的生物活性，能发挥抗氧化、抗炎及代谢调节等功能[3-4]，被应用于化学、食品、医疗等领域[5-6]。橙皮素和圣草次苷通过与肠道微生物相互作用产生生物活性，具体来说，它们通过饮食摄入后到达人体结肠中，被肠道微生物水解、吸收后会产生能够改善人体健康的活性物质[7]。通过动物试验和临床研究，橙皮素和圣草次苷的生物活性和益生效力在分子作用机制层面得到了广泛验证[8-10]，但它们对微生态、菌群多样性、菌落结构和菌群代谢物产量等方面的影响尚缺乏系统性研究。

肠道菌群是一个结构复杂、种类多样的生物群落，作为当前生命科学和医学领域的研究热点，肠道菌群研究涉及微生物学、代谢组学、疾病机制及个性化治疗等多个方面[11]。研究表明，年龄、饮食、精神状态及疾病等因素均可显著影响肠道菌群的结构[12]，为解析肠道菌群的作用机制，16S rRNA高通量测序和关联分析等多种分析技术被广泛应用。2011年，肠型（enterotype）概念被首次提出，为肠道菌群研究提供了新的视角。简单而言，基于优势菌属的丰度，人类肠道菌群可以被划分为三大肠型：拟杆菌（*Bacteroides*）肠型、普雷沃氏菌（*Prevotella*）肠型和瘤胃球菌（*Ruminococcus*）肠型[13]。肠型的稳定性与人类的血型类似，不易受年龄、性别、居住地或健康状况等因素影响[14]，这一特性使得复杂的肠道菌群结构可以进行降维分析，并能在临床研究中发挥重要作用。目前已有在肠型视角下对肥胖[15]、溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）[16]及阿尔茨海默病（Alzheimer disease，AD）[17]等的研究。随着肠型概念的完善及其应用范围的不断拓展，肠型逐渐成为研究肠道菌群的重要工具。

近年来，关于类黄酮生物活性的研究指出，肠道微生物群是其预防和治疗代谢性疾病的关键靶点[18]。有研究表明，类黄酮能选择性地促进产短链脂肪酸的肠道微生物生长[19]，短链脂肪酸（如乙酸、丙酸和丁酸）是肠道菌群的重要代谢产物，它们不仅能够维持肠道微生态平衡，还具有抗炎、调节糖脂代谢等多种益生功能[20-22]。然而，关于类黄酮对不同肠型人群肠道菌群的调控作用及其对不同肠道菌群代谢产物的影响仍缺乏系统性研究。

作者采取体外肠道模拟发酵体系，利用16S rRNA高通量测序技术分析肠道菌群结构变化，并结合GC-MS技术定量检测短链脂肪酸产量，再通过关联分析进一步探究肠道菌群与短链脂肪酸产量之间的联系，为类黄酮对人体肠道菌群调节作用的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

橙皮素、圣草次苷：色谱纯，上海源叶生物科技有限公司；盐酸吡哆醇、盐酸硫胺素、核黄素、烟酸、*D*-钙泛酸盐、对氨基苯甲酸、硫辛酸、生物素、叶酸、维生素B_{12}：分析纯，上海源叶生物科技有限公司；YCFA培养基、*L*-半胱氨酸盐酸盐、碳酸氢钠、二水氯化钙、七水硫酸镁、氯化血红素、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾：分析纯，浙江常青化工有限公司。

1.2 仪器与设备

冷冻离心机：H2050R型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；涡旋混匀仪：QL-866型，海门市其林贝尔仪器制造有限公司；气相色谱仪：TRACE 1300型，美国Thermo Fisher Scientific公司；质谱仪：ISQ 7000型，美国Thermo Fisher Scientific公司；全自动灭菌锅：MLS-3781L型，日本PHCbi公司；生物分析仪：Agilent 2100型，美国Agilent Technologies公司。

1.3 培养基和溶液的配制

1）YCFA培养基：将5 g葡萄糖、10 g蛋白胨、10 g酵母提取物、0.9 g氯化钠、0.45 g磷酸氢二钾、0.45 g磷酸二氢钾、0.09 g二水氯化钙、0.045 g七水硫酸镁、0.001 g刃天青用超纯水溶解并定容至

1 L，121 ℃高温高压灭菌 15 min，冷却至常温后将 4 g 碳酸氢钠、1 g *L*-半胱氨酸盐酸盐、0.01 g 氯化血红素加到培养基中。

2）体外模拟培养基：在 YCFA 培养基中加入经 0.22 μm 水系膜过滤的体积分数 1% 的维生素溶液，混匀，将配制好的培养基分装到灭菌后的 10 mL 西林瓶中，分装量为 3.8 mL，每个西林瓶通入氮气，压紧瓶盖，使培养基保持在无氧环境下，置于厌氧工作站中暂存，厌氧环境的温度为 37 ℃，氮气、氢气、二氧化碳的体积分数分别为 85%、5%、10%。

3）维生素溶液：将 1 mg 盐酸吡哆醇、0.5 mg 盐酸硫胺素、0.5 mg 核黄素、0.5 mg 烟酸、0.5 mg *D*-钙泛酸盐、0.5 mg 对氨基苯甲酸、0.5 mg 硫辛酸、0.2 mg 生物素、0.2 mg 叶酸和 0.01 mg 维生素 B_{12} 用超纯水溶解并定容至 100 mL，置于 4 ℃冰箱暂存。

4）体积分数 0.2% 的 DMSO 溶液：量取 200 μL DMSO 溶液加到 100 mL 超纯水中，混匀后用于后续溶液的配制。

5）2 种类黄酮标准溶液：分别准确称取橙皮素和圣草次苷标准品粉末，用体积分数 0.2% 的 DMSO 溶液溶解，混匀，配制成质量浓度为 5 mg/mL 的橙皮素和圣草次苷标准溶液。

1.4 样品采集

粪便样品由随机抽选的 10 名已知情并同意的健康志愿者（5 男 5 女）提供，在早晨指定时间利用粪便收集瓶收集 10 名志愿者的晨起粪便并进行编号。志愿者近 1 年内居住于中国浙江省杭州市，年龄为 20~35 岁，作息规律，饮食正常，精神良好，无高血压、糖尿病、胃肠道炎症等慢性疾病病史，未曾有吸烟、酗酒等不良习惯，且近期（至少 1 个月）未食用柑橘类水果、益生菌制剂和抗生素。试验方案已经过浙江工商大学食品与生物工程学院实验伦理审查，伦理编号为 25120936。

1.5 粪便样品预处理、接种和取样

1）粪便菌悬液的制备：各挑取每位志愿者的粪便样本约 2 g 于 15 mL 无菌离心管中，加入 10 mL 无菌 PBS 缓冲液后涡旋混匀，用 0.24 mm 滤网过滤，移至 15 mL 离心管中备用。此外，分别保留 2 mL 该样品于−80 ℃冰箱中保存，用于后期原始样品短链脂肪酸的测定和 16S rRNA 高通量测序，定义为原始样品组（Ori 组）。

2）样品分组接种：利用 1 mL 的无菌针筒取 0.2 mL 的粪便菌悬液，分别注射至所有培养基中，之后将培养基分成 3 组，每组中分别加入 0.8 mL 的圣草次苷标准溶液、橙皮素标准溶液和体积分数 0.2% 的 DMSO 溶液，混匀，分别将其标记为圣草次苷组（Eri 组）、橙皮素组（Hst 组）和对照组（Con 组），圣草次苷组和橙皮素组中 2 种类黄酮的终质量浓度均为 4 mg/mL，该质量浓度已被证明足以表征大多数类黄酮的生物活性[23-24]。整个接种过程均要在厌氧工作站中进行。

3）发酵培养及取样：将所有接种好的样品培养基放置在厌氧工作站中，于 37 ℃培养 24 h，涡旋摇匀后再取等量发酵好的样品保存至−80 ℃冰箱，用于后续短链脂肪酸测定和 16S rRNA 高通量测序。

1.6 16S rRNA 高通量测序

1.6.1 DNA 提取

基因组 DNA 的提取和聚合酶链式反应（PCR）扩增由杭州联川生物技术股份有限公司完成。根据制造商的说明，使用十六烷基三甲基溴化铵从粪便样本中提取 DNA，将总 DNA 用 50 μL 洗涤缓冲液进行洗涤，保存至−80 ℃冰箱，用于后续 PCR 扩增。

1.6.2 16S rRNA 高通量测序程序

根据 16S rRNA 基因的 V3—V4 高变区，采用通用引物（341F、805R）对 DNA 进行 PCR 扩增，使用 AMPure XT 磁珠纯化扩增产物，并通过 Qubit 荧光定量系统进行定量。制备扩增子文库后，分别使用生物分析仪和 Illumina 文库定量试剂盒对扩增子文库的片段大小及浓度进行质控检测。然后在 NovaSeq PE250 测序平台进行双端测序，并利用 FLASH 软件对双端序列进行拼接。对 fqtrim 软件（v0.94）设定特定过滤条件，然后进行原始序列质控过滤，获得高质量序列，随后通过 Vsearch 软件（v2.3.4）去除嵌合序列，最终经 DADA2 算法的去除冗余和降噪处理，获得特征表及特征序列。

1.7 短链脂肪酸检测

将 0.1 g 粪便样品、0.5 mL 超纯水、200 μL 硫酸、50 μL 环己酮和 1 mL 乙醚混合均匀，匀浆 1 min，在 12 000 r/min、4 ℃条件下离心 3 min，取

上清液装入进样瓶中。通过GC-MS仪获得短链脂肪酸谱图。进样口、色谱柱和检测器温度分别保持为220、230、220 ℃。温度梯度程序：0~1 min，60 ℃；1~3 min，以升温速率30 ℃/min升至210 ℃。上样量为1 μL，流量为1 mL/min。以环己酮为内标计算短链脂肪酸产量。

1.8　数据统计与分析

每组试验均进行了5次生物学重复，采用LEfSe分析微生物物种的差异，并通过线性判别分析（LDA）筛选lg（LDA值）≥2.0的最终生物标志物。采用迈维云平台进行Spearman相关性可视化。采用GraphPad Prism 8软件分析数据，结果以平均值±标准差表示，$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2　结果与讨论

2.1　2种类黄酮对肠道菌群的影响

2.1.1　16S rRNA高通量测序结果

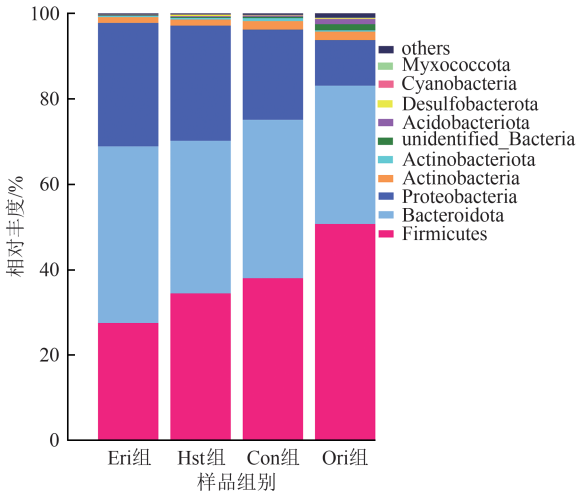
16S rRNA高通量测序常用于分析细菌群落的多样性，利用16S rRNA中V3—V4区的特征，建立了一个关于小片段DNA的特异性文库，再利用Illumina数据库量化工具和NovaSeq 6000测序器完成该文库的双端测序，从而进一步挖掘橙皮素和圣草次苷对模拟肠道模型的影响。结果表明，40个样品共测得5 137 347条序列，之后经过拼接和过滤得到5 098 447条高质量读取序列。根据操作分类单元聚类结果，发现Ori组、Con组、Eri组和Hst组中，分别存在2 783、1 495、1 930、1 790种微生物物种。

2.1.2　物种组成变化

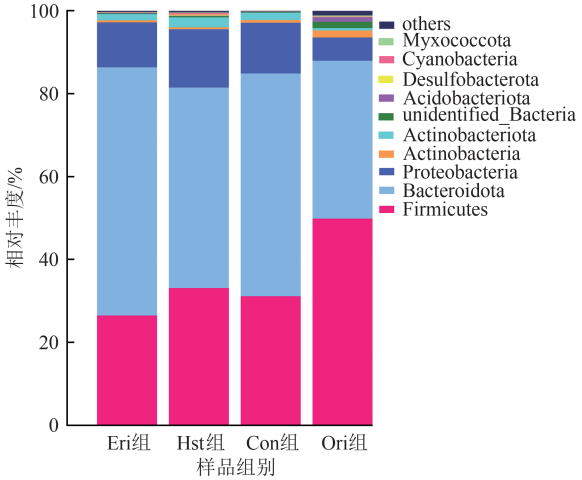
参照物种丰度表和物种注释表，默认选取不同水平上丰度最高的十几个物种分类，进行相对丰度计算，获得相对丰度文件，绘制比较样品相对丰度的堆叠柱状图，以便更直观地比较样品的相对丰度。在各个不同层级中，可以直观地看到优势物种的表达情况及在各个组别中的变化趋势。

参照Costea等[25]提供的肠型分类学方法，人类的肠型可分为拟杆菌肠型、普雷沃氏菌肠型和瘤胃球菌肠型。根据Ori组在微生物属水平的物种组成规律，将10名志愿者的肠型分为以*Bacteroides*为优势菌的拟杆菌肠型和以*Prevotella*_9为优势菌的普雷沃氏菌肠型，其中6位志愿者（1号、4号、5号、8号、9号、10号）为拟杆菌肠型；4位志愿者（2号、3号、6号、7号）为普雷沃氏菌肠型。将4组（Ori组、Con组、Eri组和Hst组）样本按肠型进一步编号，用于后续组间和个体间肠道菌群变化分析。拟杆菌肠型个体编号分别为：Ori1、Ori4、Ori5、Ori8、Ori9、Ori10；Con1、Con4、Con5、Con8、Con9、Con10；Eri1、Eri4、Eri5、Eri8、Eri9、Eri10；Hst1、Hst4、Hst5、Hst8、Hst9、Hst10。普雷沃氏菌肠型个体编号分别为：Ori2、Ori3、Ori6、Ori7；Con2、Con3、Con6、Con7；Eri2、Eri3、Eri6、Eri7；Hst2、Hst3、Hst6、Hst7。

分别对2种肠型样品的物种组成进行分析，在门水平上选取相对丰度最高的10个物种进行分类。如图1所示，2种肠型的优势菌门均为



(a) 拟杆菌肠型门水平上肠道菌群的相对丰度



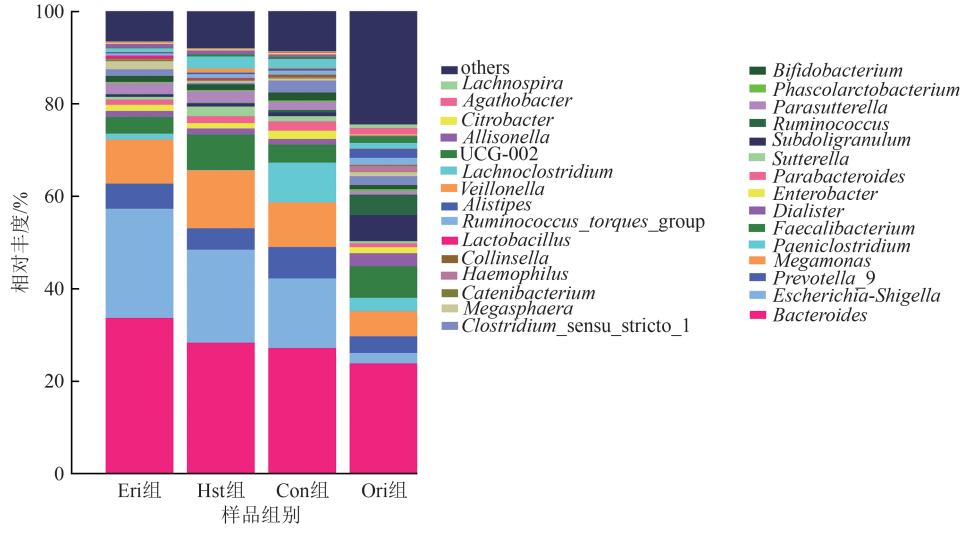
(b) 普雷沃氏菌肠型门水平上肠道菌群的相对丰度

图1　门水平上肠道菌群的相对丰度

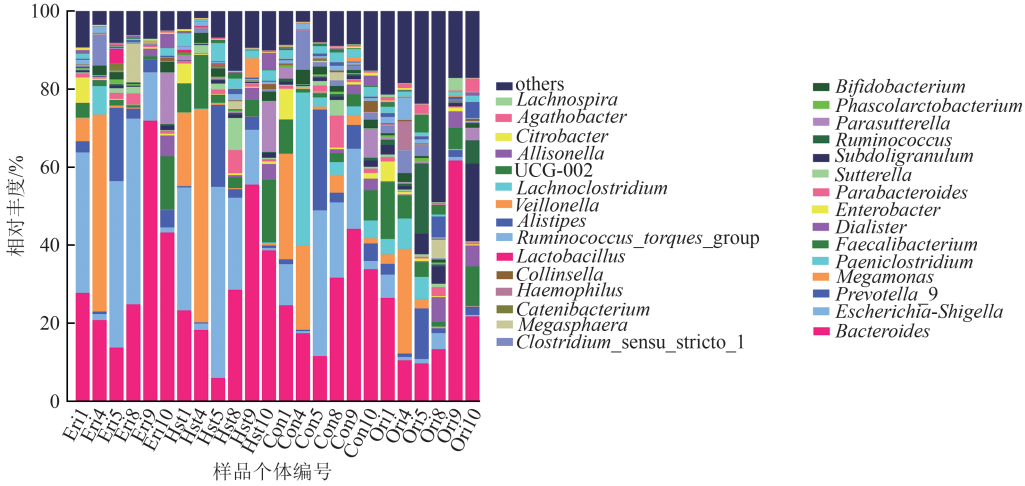
Fig. 1　Relative abundance of gut microbiota at the phylum level

Firmicutes、Bacteroidota 和 Proteobacteria。拟杆菌肠型中，各组中 Firmicutes 和 Bacteroidota 的总相对丰度为 70%~80%；而在普雷沃氏菌肠型中，各组中这 2 个菌门的总相对丰度约为 90%。经发酵处理后，与 Ori 组相比，2 种肠型的 Con 组、Eri 组和 Hst 组的 Firmicutes 相对丰度从 50% 左右降至 30%~40%，而 Proteobacteria 的相对丰度增加至 Ori 组的 2 倍左右。已有研究发现，F/B 值能粗略表征机体的健康程度，且 F/B 值的降低与抑制肥胖和保护代谢能力呈正相关[26-27]。而本研究结果表明，与 Con 组相比，2 种肠型中的 Eri 组和 Hst 组的 F/B 值总体降低，由此合理推测橙皮素和圣草次苷可能与预防肥胖和代谢疾病相关。

在属水平上，选取了相对丰度最高的前 30 个物种进行分类，6 名拟杆菌肠型志愿者在属水平上肠道菌群的相对丰度见图 2。各组中，*Bacteroides* 均为最大优势菌属，其中排名前 3 的优势菌属除 *Bacteroides* 外，还有 *Escherichia-Shigella* 和 *Megamonas*。与 Ori 组相比，经发酵的其他 3 组样品的 *Escherichia-Shigella* 相对丰度增加到了 Ori 组的 7~10 倍，*Megamonas* 相对丰度则增加至 Ori 组的 2 倍左右。*Escherichia-Shigella* 多数为非致病菌，属于人体正常肠道菌群的一部分[28]，而 *Megamonas* 作为一种促进脂质吸收的肠道细菌，其相对丰度的增加与肥胖发生密切相关[29]。值得注意的是，有研究报道，与普雷沃氏菌相比，拟杆



(a) 拟杆菌肠型属水平上组间肠道菌群的相对丰度



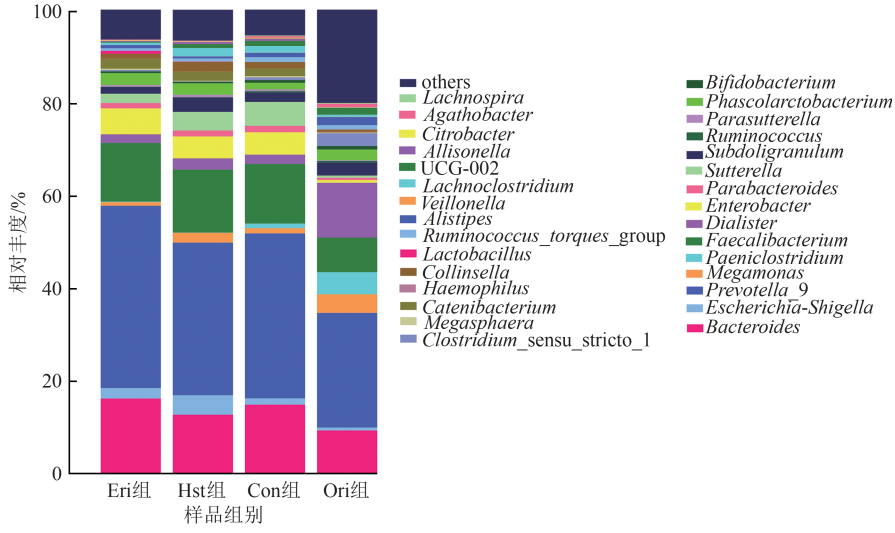
(b) 拟杆菌肠型属水平上个体间肠道菌群的相对丰度

图 2　拟杆菌肠型属水平上肠道菌群的相对丰度

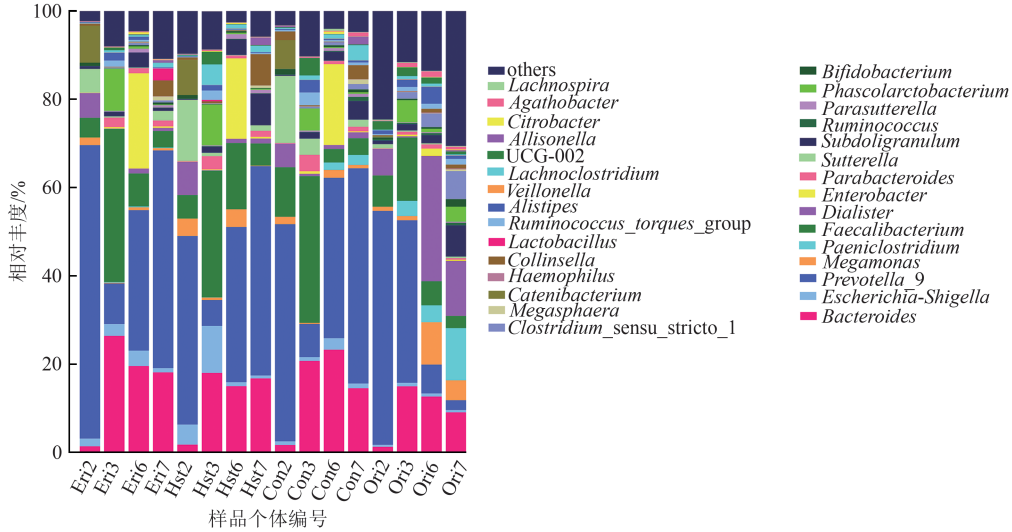
Fig. 2　Relative abundance of gut microbiota in enterotype *Bacteroides* at the genus level

菌肠型主导的肠道菌群类型表现出更强的减肥抵抗性[30]，这一发现与本研究中 *Megamonas* 是拟杆菌肠型中的优势菌属结果吻合。*Bacteroides* 和 *Prevotella*_9 的相对丰度虽然也有一定程度增加，但并没有显著提升。与 Con 组相比，Eri 组和 Hst 组中 *Paeniclostridium* 的相对丰度明显变少，*Paeniclostridium* 是一种潜在的促炎细菌，对机体无益[31]。此外，*Bacteroides* 和 *Escherichia-Shigella* 的相对丰度呈增加趋势，但差异不显著。

在属水平上，4 名普雷沃氏菌肠型志愿者肠道菌群的相对丰度见图 3。各组中，*Prevotella*_9 均为最大优势菌属，另外两大优势菌属分别为 *Bacteroides* 和 *Faecalibacterium*。与 Ori 组相比，经发酵的其他 3 组样品的 *Sutterella* 相对丰度明显增加，尤其是 Con 组的变化最明显；3 组发酵样品的 *Enterobacter* 相对丰度也增加至 Ori 组的 5 倍。此外，*Prevotella*_9 和 *Faecalibacterium* 等菌属在 3 组发酵样品中也有少量的增加。与 Con 组相比，Eri 组和 Hst 组的 *Escherichia-Shigella* 相对丰度有一定程度增加，而 *Sutterella* 相对丰度有一定程度减少。有研究表明，*Sutterella* 相对丰度与肠道炎症的发展呈正相关[32]。综上，橙皮素和圣草次苷能显著改变拟杆菌肠型志愿者的肠道菌群结构。



(a) 普雷沃氏菌肠型属水平上组间肠道菌群的相对丰度



(b) 普雷沃氏菌肠型属水平上个体间肠道菌群的相对丰度

图 3　普雷沃氏菌肠型属水平上肠道菌群的相对丰度

Fig. 3　Relative abundance of gut microbiota in enterotype *Prevotella* at the genus level

2.1.3　差异物种分析

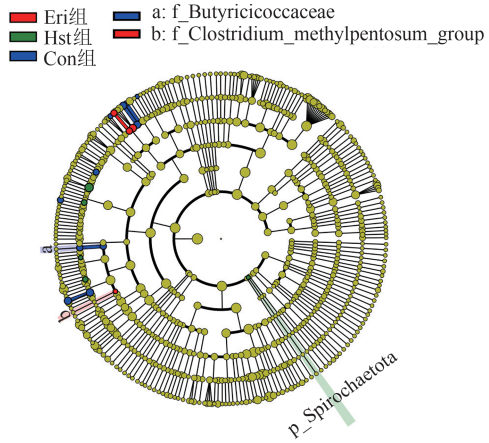
为进一步研究橙皮素和圣草次苷对肠道菌群的影响，利用 LEfSe 分析法筛选 Con 组、Eri 组和 Hst 组之间的差异微生物，选择 lg（LDA 值）≥2.0 的微生物作为研究对象。结果表明，2 种肠型中拟杆菌肠型的差异微生物具有统计学意义，因此对其进行研究分析。如图 4 所示，聚类树图中由内至外辐射的圆圈代表由门水平至属水平的分类级别，不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类，小圆圈的直径大小代表相对丰度的大小。颜色无显著差异的物种统一着色为黄色，差异显著的物种跟随组别进行着色，红色节点表示在红色组别中起重要作用的微生物类群，蓝色节点表示在蓝色组别中起重要作用的微生物类群。条形图展示了 lg（LDA 值）大于预设值的差异物种，即具有统计学差异的生物标志物。

结果表明，在门水平上，与 Con 组相比，Hst 组的 Spirochaetota 相对丰度显著增加，而 Eri 组无显著变化；在科水平上，Con 组的 Butyricicoccaceae 起主要差异作用，Eri 组的 Clostridium_methylpentosum_group 起主要差异作用，Hst 组在该水平上并无优势菌科；在属水平上，Con 组的优势菌属为 *Ruminococcus*、*Coprococcus* 和 *Butyricicoccus* 等，Eri 组的优势菌属为 *Lactobacillus* 和 *Ligilactobacillus*，Hst 组的优势菌属为 *Lachnospiraceae*_ND3007_group 和 *Intestinimonas* 等，*Lactobacillus* 和 *Ligilactobacillus* 是对健康有益的益生菌，能预防和治疗多种疾病[33]，且 *Lachnospiraceae*_ND3007_group 是已被证实为能够分泌多种短链脂肪酸的有益菌[34]；在种水平上，Con 组的优势菌为 *Lactiplantibacillus_plantarum*、*Lachnospiraceae_bacterium*_GAM79、*Lacticaseibacillus_rhamnosus* 和 *Limosilactobacillus_fermentum* 等，Eri 组的优势菌为 *Lactobacillus_murinus*，而 Hst 组在该水平上并无优势菌。结果表明，橙皮素和圣草次苷能明显影响拟杆菌肠型肠道菌群的结构组成，且表现为增加 *Lactobacillus* 和 *Lachnospiraceae*_ND3007_group 等有益菌的占比，因此合理推测，2 种类黄酮能对肠道菌群产生正向调节作用。LEfSe 分析结果也验证了该推测，即橙皮素和圣草次苷对拟杆菌肠型志愿者的肠道菌群可产生显著影响，具体作用效果体现为几种有益菌丰度的增加。

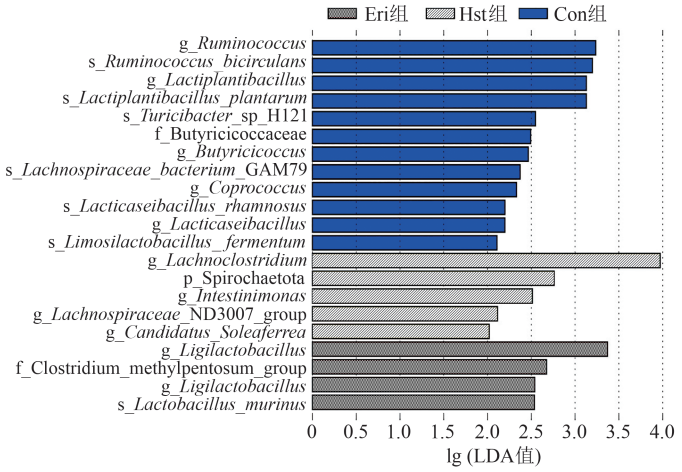
2.2　2 种类黄酮对短链脂肪酸产量的影响

7 种短链脂肪酸（乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸）产量的测定结果表明，乙酸产量在 7 种短链脂肪酸中的占比最多。此外，选择变化较明显的乙酸、丙酸和丁酸进行更具体的分析。

乙酸产量的测定结果见图 5（a）~（b）。与 Ori 组相比，发酵后的 3 组样本的乙酸产量均显著增加，且在 2 种肠型中，这种变化在拟杆菌肠型中更为显著，而在普雷沃氏菌肠型中，只有 Eri 组的乙酸产量显著高于 Ori 组（P=0.022）。此外，在拟杆菌肠型中，与 Con 组相比，Hst 组的乙酸产量增加



(a) Con组、Hst组和 Eri组的聚类树图



(b) Con组、Hst组和Eri组的LDA分析图

图 4　组间菌群结构的 LEfSe 分析

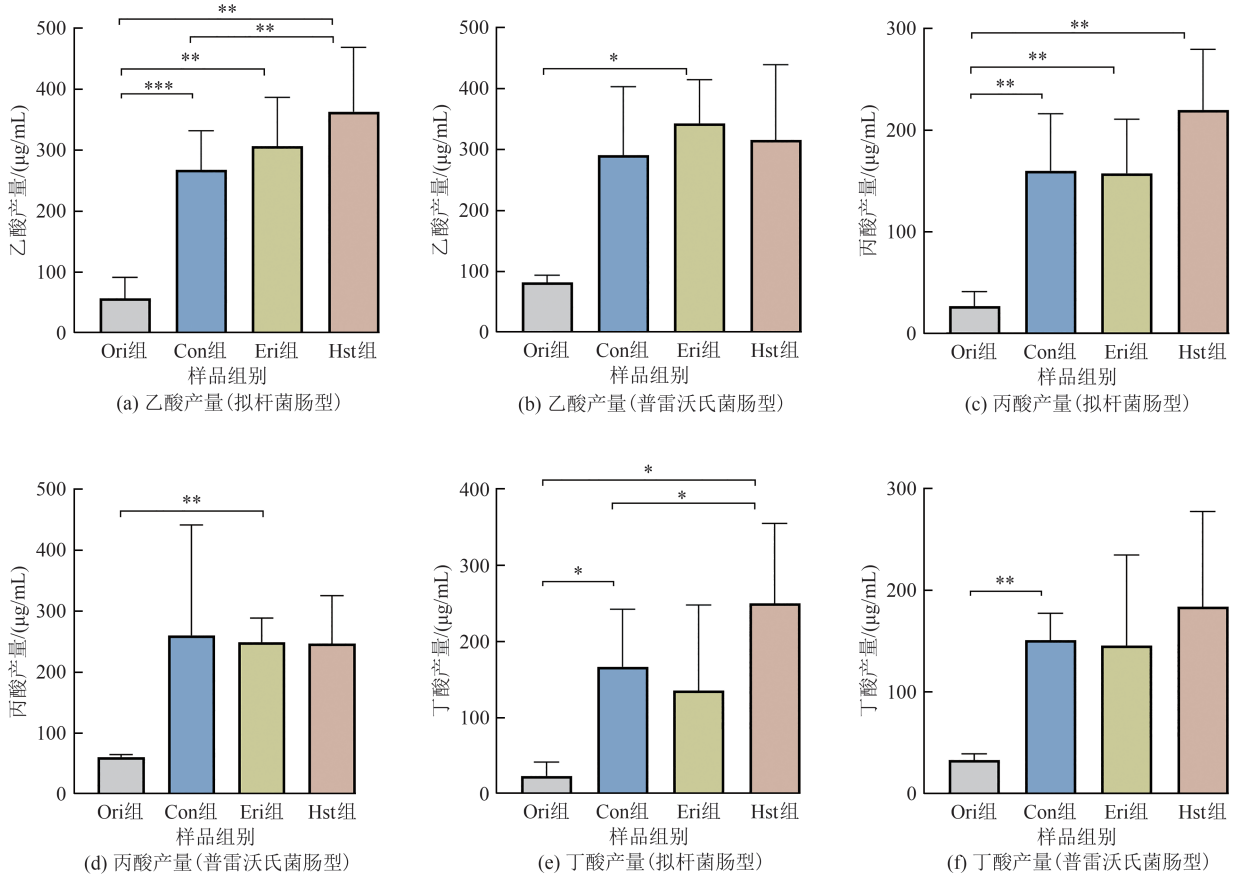
Fig. 4　LEfSe analysis of gut microbiota structure between groups

非常显著（P=0.001），说明橙皮素能促进拟杆菌肠型中乙酸产量的增加。有研究发现，乙酸作为一种肠道菌群的重要代谢产物，其作用包括调控微生物群落结构、抑制幼儿支气管肺病的发病和恶化[35]。Valdes等[36]整合验证了大量临床数据，发现膳食补充乙酸不仅能抑制超重和肥胖，在II型糖尿病的治疗中也能起到辅助治疗的作用，说明乙酸可能是一种潜在的可用于治疗慢性病和代谢性疾病的物质。

由图5（c）~（d）可知，2种肠型中样品经发酵后，丙酸产量均有所增加，且拟杆菌肠型中的丙酸产量增加更为显著。在普雷沃氏菌肠型中，只有Eri组的丙酸产量相较于Ori组增加非常显著（P=0.008），这可能是因为体外发酵的培养基促进了一些产丙酸菌的生长。研究表明，丙酸是肠道菌群和生理健康之间的主要介质，肠道菌群通过促进丙酸的产生在治疗肥胖和II型糖尿病中发挥作用[37]。

丁酸产量的变化见图5（e）~（f），与乙酸和丙酸的变化趋势相同，丁酸产量也会因发酵处理而增加。在拟杆菌肠型中，相较于Ori组，Con组（P=0.029）和Hst组（P=0.014）的丁酸产量均显著增加，且Hst组的丁酸产量显著高于Con组（P=0.034）；而在普雷沃氏菌肠型中，只有Con组的丁酸产量非常显著高于Ori组（P=0.009），其余组之间无显著差异，说明橙皮素和圣草次苷的添加并没有引起普雷沃氏菌肠型中丁酸产量的显著变化。越来越多的研究表明，丁酸在人体健康中发挥着重要作用，它不仅能加固肠道屏障，抑制结肠炎症的发生，还有抗癌、抗氧化应激等重要生理活性，是一种潜在的疾病治疗物，值得在临床试验中被深入研究[38]。

结果表明，拟杆菌肠型志愿者中，圣草次苷与橙皮素能够影响肠道菌群的乙酸、丙酸和丁酸的



*—差异显著（P<0.05）；**—差异非常显著（P<0.01）；***—差异极显著（P<0.001）。

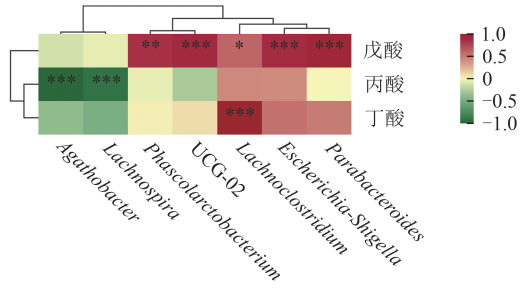
图5　短链脂肪酸产量

Fig. 5　Production of short-chain fatty acids

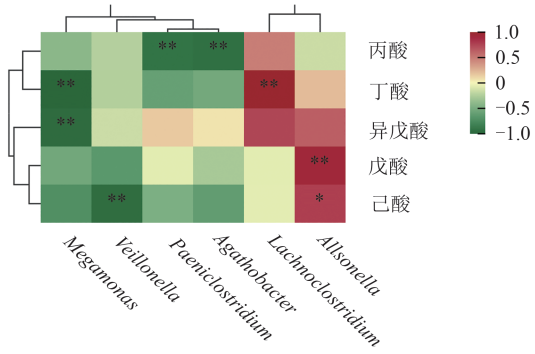
产量，其中与发酵后的 Con 组相比，橙皮素对乙酸和丁酸产量的促进效果更显著，而圣草次苷作用不明显。在普雷沃氏菌肠型志愿者中，相较于发酵后的 Con 组，圣草次苷与橙皮素对几种主要短链脂肪酸产量的影响较小。

2.3 肠道菌群与短链脂肪酸产量的相关性分析

由于橙皮素对短链脂肪酸产量的影响更为显著，为明确不同肠型肠道菌群的相对丰度与短链脂肪酸产量的相关性，分别将添加了橙皮素的 2 组肠型的属水平肠道微生物群的相对丰度与短链脂肪酸产量进行了 Spearman 相关性分析。将 Spearman 相关系数 $|R|>0.7$ 且 $P<0.05$ 的结果进行分析和可视化，见图 6。在拟杆菌肠型中，有 5 种菌属的相对丰度与部分短链脂肪酸产量呈显著正相关，有 2 种菌属的相对丰度与部分短链脂肪酸产量呈显著负相关；在普雷沃氏菌肠型中，有 2 种菌属的相对丰度与部分短链脂肪酸产量呈显著正相关，有 4 种菌属的相对丰度与部分短链脂肪酸产量呈显著负相关。



(a) 拟杆菌肠型中肠道菌群与短链脂肪酸的相关性热图



(b) 普雷沃氏菌肠型中肠道菌群与短链脂肪酸的相关性热图

*—差异显著（$P<0.05$）；**—差异非常显著（$P<0.01$）；***—差异极显著（$P<0.001$）。

图 6 肠道菌群与短链脂肪酸产量的相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis between gut microbiota and production of short-chain fatty acids

2 种肠型中，不同短链脂肪酸产量表现出与不同类别肠道菌群的关联性。丙酸产量在 2 种肠型下均与 *Agathobacter* 的相对丰度呈显著负相关；在拟杆菌肠型中，丙酸产量与 *Lachnospira* 的相对丰度呈显著负相关；在普雷沃氏菌肠型中，丙酸产量与 *Phascolarctobacterium* 的相对丰度呈显著负相关。丁酸产量在 2 种肠型中均与 *Lachnoclostridium* 的相对丰度呈显著正相关。戊酸产量则与拟杆菌肠型中 *Parabacteroides*、*Escherichia-Shigella*、*Lachnoclostridium* 等菌群的相对丰度呈显著正相关；而在普雷沃氏菌肠型中仅与 *Allisonella* 的相对丰度呈显著正相关。结果表明，在相同类黄酮的添加条件下，肠道菌群组成的变化与短链脂肪酸产量的变化存在肠型特异性关系。

3 结论

类黄酮生物活性的发挥与肠道菌群密切相关，作者构建了体外肠道模拟发酵体系，结合 16S rRNA 高通量测序和 GC-MS 技术，初步探索了橙皮素和圣草次苷对不同肠型肠道菌群的调节作用。结果表明，经体外发酵后，3 组样本在 4 mg/mL 的 2 种类黄酮处理下，均能在门水平和属水平上提高拟杆菌肠型和普雷沃氏菌肠型中有益菌群的占比。LEfSe 分析显示，相较于普雷沃氏菌肠型，橙皮素和圣草次苷对拟杆菌肠型中菌群结构的正向调节作用更显著，这体现在它们能显著增加拟杆菌肠型中 *Lactobacillus* 和 *Lachnospiraceae*_ND3007_group 等有益菌的占比，并能减少 *Paeniclostridium*、*Sutterella* 等促炎细菌的相对丰度。此外，作者采用 GC-MS 技术对发酵样本中短链脂肪酸产量进行测定，肠型和组间比较表明，橙皮素能显著提升拟杆菌肠型中乙酸和丁酸产量。综上所述，2 种类黄酮的添加对拟杆菌肠型的肠道微生态均具有正向调节作用，且橙皮素的效果要优于圣草次苷。然而，作者仅进行了橙皮素和圣草次苷与肠道菌群相互作用的关联性分析，具体的代谢产物或相关通路等内在机制仍需进一步探索。

参考文献

[1] KUMAR M，DAHIYA V，KASALA E R，et al. The renoprotective activity of hesperetin in cisplatin induced nephrotoxicity in rats：molecular and biochemical evidence

[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 89: 1207-1215.

[2] LI L Y, FENG X, CHEN Y T, et al. A comprehensive study of eriocitrin metabolism *in vivo* and *in vitro* based on an efficient UHPLC-Q-TOF-MS/MS strategy[J]. RSC Advances, 2019, 9(43): 24963-24980.

[3] MIYAKE Y, YAMAMOTO K, OSAWA T. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* Burm. f.) by human intestinal bacteria[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(10): 3738-3742.

[4] GARG A, GARG S, ZANEVELD L J D, et al. Chemistry and pharmacology of the *Citrus* bioflavonoid hesperidin [J]. Phytotherapy Research, 2001, 15(8): 655-669.

[5] PANCHE A N, DIWAN A D, CHANDRA S R. Flavonoids: an overview[J]. Journal of Nutritional Science, 2016, 5: e47.

[6] SANTOS E L, MAIA B H L N S, FERRIANI A P, et al. Flavonoids: classification, biosynthesis and chemical ecology [M]//JUSTINO G C. Flavonoids: from biosynthesis to human health. London: IntechOpen, 2017.

[7] 覃小丽, 孙慧园, 杨武, 等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS分析槲皮苷在大鼠肠道菌群中的代谢[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 357-362.
QIN X L, SUN H Y, YANG W, et al. Analysis of metabolites of quercitrin in rat intestinal flora by using UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(2): 357-362.

[8] FERREIRA P S, MANTHEY J A, NERY M S, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of eriocitrin in rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(6): 1796-1805.

[9] YAO L L, LIU W, BASHIR M, et al. Eriocitrin: a review of pharmacological effects [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 154: 113563.

[10] SALEHI B, CRUZ-MARTINS N, BUTNARIU M, et al. Hesperetin's health potential: moving from preclinical to clinical evidence and bioavailability issues, to upcoming strategies to overcome current limitations[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(16): 4449-4464.

[11] SEKIROV I, RUSSELL S L, ANTUNES L C M, et al. Gut microbiota in health and disease[J]. Physiological Reviews, 2010, 90(3): 859-904.

[12] RINNINELLA E, RAOUL P, CINTONI M, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases[J]. Microorganisms, 2019, 7(1): 14.

[13] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. Nature, 2011, 473(7346): 174-180.

[14] 魏茹楠, 毕云娇, 沈思佳, 等. 肠型的起源、争议及临床应用的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2024, 36(11): 1336-1339.
WEI Ru'nan, BI Y J, SHEN S J, et al. The origin, controversy and clinical application of enterotypes: research progress[J]. Chinese Journal of Microecology, 2024, 36(11): 1336-1339. (in Chinese)

[15] WU C, YANG F M, ZHONG H Z, et al. Obesity-enriched gut microbe degrades *myo*-inositol and promotes lipid absorption[J]. Cell Host & Microbe, 2024, 32(8): 1301-1314. e9.

[16] WU X G, ZHANG T, ZHANG T S, et al. The impact of gut microbiome enterotypes on ulcerative colitis: identifying key bacterial species and revealing species co-occurrence networks using machine learning[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2292254.

[17] LIU G S, SONG Y, YAN J S, et al. Identification of enterotype for patients with Alzheimer's disease [J]. Journal of Translational Medicine, 2025, 23(1): 299.

[18] WU Y F, GUO Y L, HUANG T R, et al. Licorice flavonoid alleviates gastric ulcers by producing changes in gut microbiota and promoting mucus cell regeneration[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 169: 115868.

[19] FENG R B, WANG Q, YU T T, et al. Quercetin ameliorates bone loss in OVX rats by modulating the intestinal flora-SCFAs-inflammatory signaling axis [J]. International Immunopharmacology, 2024, 136: 112341.

[20] 杨夕缘, 杨波, 赵建新, 等. 动物双歧杆菌乳亚种对便秘的改善研究[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(7): 22-34.
YANG X Y, YANG B, ZHAO J X, et al. Exploration of the effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis on improving constipation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(7): 22-34. (in Chinese)

[21] KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. Cell, 2016, 165(6): 1332-1345.

[22] 顾敏雯, 刘皓文, 祝晨昕, 等. 益生菌对食源性脂质代谢紊乱相关疾病的缓解作用及机制研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(10): 21-31.
GU M W, LIU H W, ZHU C X, et al. Research progress on the alleviating effects and mechanisms of probiotics on diet-induced lipid metabolism disorders[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(10): 21-31.

（in Chinese）

[23] PAN L X，YE H Y，PI X E，et al. Effects of several flavonoids on human gut microbiota and its metabolism by *in vitro* simulated fermentation [J]. Frontiers in Microbiology，2023，14：1092729.

[24] ZHAO Z L，LIU W，PI X E. *In vitro* effects of stachyose on the human gut microbiota[J]. Starch，2021，73(7/8)：2100029.

[25] COSTEA P I，HILDEBRAND F，ARUMUGAM M，et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition[J]. Nature Microbiology，2018，3(1)：8-16.

[26] 杨柳，欧仕益，黄俊卿，等. 玉米皮阿魏酰低聚糖调节小鼠肠道菌群及缓解结肠炎的研究[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：146-155.
YANG L，OU S Y，HUANG J Q，et al. Regulation of colon microbiota and alleviation of colon colitis in mice by maize feruloylated oligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(5)：146-155.（in Chinese）

[27] STOJANOV S，BERLEC A，ŠTRUKELJ B. The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease[J]. Microorganisms，2020，8(11)：1715.

[28] SANTOS BRAZ V，MELCHIOR K，MOREIRA C G. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology，2020，10：548492.

[29] DU W Q，LIU L X，MA Y，et al. Analysis of the gut microbiome in obese native Tibetan children living at different altitudes：a case-control study[J]. Frontiers in Public Health，2022，10：963202.

[30] SONG E J，HAN K，LIM T J，et al. Effect of probiotics on obesity-related markers per enterotype：a double-blind，placebo-controlled，randomized clinical trial[J]. EPMA Journal，2020，11(1)：31-51.

[31] WANG Y，NAN X M，ZHAO Y G，et al. Discrepancies among healthy，subclinical mastitic，and clinical mastitic cows in fecal microbiome and metabolome and serum metabolome[J]. Journal of Dairy Science，2022，105(9)：7668-7688.

[32] WILLIAMS B L，HORNIG M，PAREKH T，et al. Application of novel PCR-based methods for detection，quantitation，and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances[J]. mBio，2012，3(1)：e00261-11.

[33] 吴世英，魏方通，陈子琪，等. 益生菌辅助治疗幽门螺杆菌感染的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2025，44(4)：1-8.
WU S Y，WEI F T，CHEN Z Q，et al. Research progress of probiotics in the adjuvant therapy of *Helicobacter pylori* infections [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2025，44(4)：1-8.（in Chinese）

[34] NISHIWAKI H，HAMAGUCHI T，ITO M，et al. Short-chain fatty acid-producing gut microbiota is decreased in Parkinson's disease but not in rapid-eye-movement sleep behavior disorder [J]. mSystems，2020，5（6）：e00797-20.

[35] 张倩. 肠道菌群组成及乙酸在支气管肺发育不良中的作用研究[D]. 重庆：重庆医科大学，2021.

[36] VALDES D S，SO D，GILL P A，et al. Effect of dietary acetic acid supplementation on plasma glucose，lipid profiles，and body mass index in human adults：a systematic review and meta-analysis[J]. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics，2021，121(5)：895-914.

[37] AL-LAHHAM S H，PEPPELENBOSCH M P，ROELOFSEN H，et al. Biological effects of propionic acid in humans；metabolism，potential applications and underlying mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta（BBA）-Molecular and Cell Biology of Lipids，2010，1801(11)：1175-1183.

[38] LEONEL A J，ALVAREZ-LEITE J I. Butyrate：implications for intestinal function[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care，2012，15(5)：474-479.

（责任编辑：闫林红）