



# 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠肠道形态、抗氧化功能、菌群结构及屏障功能的影响

赵文轩, 吴建民, 党苗苗, 汪晶\*, 朱伟云

南京农业大学动物科技学院 国家动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏 南京 210095

赵文轩, 吴建民, 党苗苗, 汪晶, 朱伟云. 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠肠道形态、抗氧化功能、菌群结构及屏障功能的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4356-4371.

ZHAO Wenxuan, WU Jianmin, DANG Miaomiao, WANG Jing, ZHU Weiyun. Combination of hesperidin and rosmarinic acid affects cecal morphology, antioxidant function, microbiota structure, and barrier function of finishing pigs[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4356-4371.

**摘要:**【目的】本研究旨在探究橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪生长性能与盲肠的肠道形态、抗氧化功能、菌群结构及屏障功能的影响。【方法】选取 24 头 90 日龄的杜×长×大三元杂交公猪, 随机分为 4 组, 每组 6 个重复, 每个重复 1 头猪, 进行为期 90 d 的试验。对照组(control, Con)饲喂基础日粮, 橙皮苷组(hesperidin, Hes)在基础日粮中添加 600 mg/kg 橙皮苷, 迷迭香酸组(rosmarinic acid, RA)在基础日粮中添加 40 mg/kg 迷迭香酸, 橙迷组(Hes×RA)在基础日粮中添加 300 mg/kg 橙皮苷与 20 mg/kg 迷迭香酸。【结果】与 Con 组相比, 橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪前期、后期、全期的平均日采食量, 显著提高了前期、全期的平均日增重, 显著降低了全期的料重比( $P<0.05$ ); 橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪盲肠的黏膜厚度, 同时显著提高了盲肠的总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性并增强了核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)的相对 mRNA 表达量( $P<0.05$ ); 橙皮苷与迷迭香酸组合显著降低了变形杆菌(*Proteobacteria*)、*Terrisporobacter*、*Clostridium sensu stricto 1* 和 *Romboutsia* 的相对丰度, 显著提高了拟杆菌(*Bacteroidota*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*Muribaculaceae\_norank*、*Phascolarctobacterium* 和 *Rikenellaceae RC9* 的相对丰度, 并显著提高了盲肠食糜中异丁酸与丁酸的浓度, 同时显著提高了闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens 1, ZO-1)、闭合蛋白-1 (*Claudin-1*)、黏蛋白-2 (mucin-2, MUC-2)的相对 mRNA 表达量, 显著降低了白细胞介-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )的含量, 并显著提高了分泌性免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A,

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFE0135200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFE0135200).

\*Corresponding author. E-mail: jwang8@njau.edu.cn

Received: 2023-04-04; Accepted: 2023-06-27; Published online: 2023-07-07

SIgA)的含量( $P<0.05$ )。【结论】橙皮苷与迷迭香酸组合提高了育肥猪的生长性能,改善了盲肠的肠道形态,调节了盲肠食糜菌群组成并增强了盲肠的抗氧化能力与屏障功能。

关键词: 橙皮苷; 迷迭香酸; 生长性能; 肠道形态; 菌群结构; 屏障功能

## Combination of hesperidin and rosmarinic acid affects cecal morphology, antioxidant function, microbiota structure, and barrier function of finishing pigs

ZHAO Wenxuan, WU Jianmin, DANG Miaomiao, WANG Jing\*, ZHU Weiyun

National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the effect of hesperidin (Hes) and rosmarinic acid (RA) combination on the growth performance and the cecal morphology, antioxidant function, microbiota, and barrier function of finishing pigs. **[Methods]** Twenty-four 90-day-old Duroc×Landrace×Yorkshire male pigs were randomly assigned to control (Con), Hes, RA, and Hes×RA groups ( $n=6$ ). The Con, Hes, RA, and Hes×RA groups were given a basal diet, a basal diet supplemented with 600 mg/kg Hes, a basal diet supplemented with 40 mg/kg RA, and a basal diet supplemented with 300 mg/kg Hes and 20 mg/kg RA, respectively. The trial period was 90 d and divided into two stages: early fattening stage (1–40 d) and late fattening stage (40–90 d). **[Results]** Compared with the Con group, Hes×RA increased the average daily feed intake in the early fattening stage, late fattening stage, and whole period, increased the average daily gain in the early fattening stage and whole period, and decreased the feed/gain ratio in the whole period ( $P<0.05$ ). Hes×RA increased the mucosal thickness, total antioxidant capacity (T-AOC), and superoxide dismutase (SOD) activity and up-regulated the relative mRNA levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) and heme oxygenase-1 (*HO-1*) of cecum ( $P<0.05$ ). The combination decreased the relative abundance of *Proteobacteria*, *Terrisporobacter*, *Clostridium sensu stricto 1*, and *Romboutsia*, increased the relative abundance of *Bacteroidota*, *Lactobacillus*, *Muribaculaceae\_norank*, *Phascolarctobacterium*, and *Rikenellaceae RC9*, and increased the concentrations of isobutyrate and butyrate in the cecal digesta compared with the Con group ( $P<0.05$ ). Furthermore, this combination up-regulated the relative mRNA levels of zonula occludens 1 (*ZO-1*), *Claudin-1*, and mucin-2 (*MUC-2*), reduced the content of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and increased the content of secretory immunoglobulin A (SIgA) in the cecum ( $P<0.05$ ) compared with the Con group. **[Conclusion]** The Hes×RA combination improved the growth performance and the cecal morphology, microbiota structure, antioxidant capacity, and barrier function of finishing pigs.

**Keywords:** hesperidin; rosmarinic acid; growth performance; intestinal morphology; microbiota structure; barrier function

肠道是动物消化吸收营养物质的重要器官,但其经常会受到各种病原体的攻击。在过去的几十年中,养殖业从业者将亚治疗剂量的抗生素添加到饲料中以减少致病菌的定殖、改善肠道健康、提高动物生长性能<sup>[1]</sup>。然而,长期使用抗生素也导致了致病菌耐药性增加及抗生素残留等一系列问题<sup>[2]</sup>。因此,世界上越来越多的国家和地区开始限制抗生素在养殖业中的使用<sup>[3]</sup>。禁止抗生素作为饲料添加剂有助于保障动物产品安全,但也使动物的健康变得难以保障。因此,养殖业从业者迫切需要找到新的能够保障动物机体健康的物质。而近些年来植物提取物因其良好的抗炎、抗菌、抗氧化等特性而在饲料添加剂的行列中受到广泛关注<sup>[4]</sup>。

植物提取物是指从植物中提取的天然物质,将其作为饲料添加剂使用时能够改善动物的机体健康、提高动物的生长性能<sup>[5]</sup>。橙皮苷是一种从柑橘类水果中提取出的类黄酮,许多体内外实验均已表明其具备良好的促生长、抗氧化等功能<sup>[6]</sup>。Park 等<sup>[7]</sup>的研究发现,饲料中添加 0.5%橙皮苷提高了生长猪的营养消化率。Goliomytis 等<sup>[8]</sup>的研究发现,饲料中添加 750 mg/kg 橙皮苷提高了鸡肉的抗氧化能力、降低了鸡肉中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。迷迭香酸是一种从唇形科、紫草科和伞形科等植物中提取出的酚酸,研究表明其具有良好的抗氧化、抗炎等功能<sup>[9]</sup>。Domitrović 等<sup>[10]</sup>的研究表明,连续 2 d 口服 1–5 mg/kg 体重的迷迭香酸能够抑制氧化应激与炎症、改善顺铂诱导的小鼠肾损伤。因此,橙皮苷和迷迭香酸作为饲料添加剂在养殖业中有着良好的应用潜力。

提高植物提取物的功效将有利于其在养殖业中的实际应用。多种植物提取物同时使用时可以因其不同的作用机制、不同的作用靶点而发挥更好的效果<sup>[11]</sup>。本实验室前期的研究发现橙皮苷和迷迭香酸的组合可以缓解脂多糖攻毒大鼠的

肠道形态损伤,并通过调节肠道微生物群和缓解炎症反应改善了大鼠的肠道健康<sup>[12]</sup>。盲肠中宿居了大量微生物,这些微生物能够通过参与营养物质代谢影响育肥猪的肠道健康与营养利用<sup>[13]</sup>。然而,目前还未见研究报道橙皮苷与迷迭香酸组合使用时对育肥猪盲肠健康及其菌群组成的影响。因此,本研究旨在探究橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪生长性能及盲肠的肠道形态、菌群组成和屏障功能等的影响,从而为橙皮苷与迷迭香酸组合在养殖业中的实际应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验于 2021 年 10 月至 2022 年 1 月在南京农业大学实验动物房完成。试验选用 90 日龄杜×长×大三元杂交公猪;试验所用橙皮苷与迷迭香酸(纯度≥98%)均购于山西玉宁生物科技有限公司。

### 1.2 试验动物和试验设计

将 24 头 90 日龄初始体重为(40.07±1.93) kg 的健康杜×长×大三元杂交公猪随机分为 4 组,每组 6 个重复,每个重复 1 头猪。其中,对照组(control, Con)饲喂基础日粮,橙皮苷组(hesperidin, Hes)在基础日粮中添加 600 mg/kg 的橙皮苷,迷迭香酸组(rosmarinic acid, RA)在基础日粮中添加 40 mg/kg 的迷迭香酸,橙迷组(Hes×RA)在基础日粮中添加 300 mg/kg 的橙皮苷和 20 mg/kg 的迷迭香酸。试验期共包括 90 d,试验日粮为玉米-豆粕型日粮,基础日粮组成及营养成分见表 1。每头育肥猪都被放在 1 个单独的代谢笼内,猪舍内温度控制在(22±1) °C,相对湿度始终保持在 65%–75%。试验期间,每周对猪舍进行消毒和清洁。每个代谢笼都有单独的料槽和饮水系统以确保育肥猪在试验期间可以自由获得饮水和饲料。

表 1 基础日粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)

Item	Body weight (kg)		
	20-50	50-80	80-120
Ingredients (%)			
Corn	68.17	71.70	75.00
Soybean meal	21.96	18.81	16.00
Corn gluten meal	1.00	1.00	1.00
Soybean oil	2.06	1.89	1.50
Limestone	0.63	0.59	0.56
Dicalcium phosphate	1.02	0.98	0.96
NaCl	0.31	0.26	0.26
Premix <sup>1</sup>	4.00	4.00	4.00
L-lysine	0.50	0.45	0.43
Methionine	0.10	0.10	0.10
Threonine	0.20	0.18	0.16
Tryptophan	0.05	0.04	0.03
Calculated nutrient value			
Digestive energy (MJ/kg)	14.57	14.52	14.41
Crude protein (%)	16.36	15.19	14.18
Ca (%)	0.63	0.59	0.56
AP (%)	0.35	0.33	0.32
Lysine (%)	1.08	0.96	0.88
Methionine (%)	1.21	1.19	1.18
Threonine (%)	0.67	0.61	0.55
Tryptophan (%)	0.18	0.15	0.13

<sup>1</sup>: Premix provided per kg of diet. Vitamin A, 1 280 IU; Vitamin D<sub>3</sub>, 3 140 IU; Vitamin E, 10.8 IU; Vitamin K<sub>3</sub>, 0.48 mg; Vitamin B<sub>1</sub>, 1 mg; Vitamin B<sub>2</sub>, 2 mg; Vitamin B<sub>6</sub>, 1 mg; Vitamin B<sub>12</sub>, 0.004 8 mg; Niacin, 20 mg; Pantothenic acid, 10 mg; Folic acid, 0.3 mg; Biotin, 0.2 mg; Choline chloride, 200 mg; Fe, 40 mg; Cu, 3 mg; Zn, 40 mg; Mn, 2 mg; I, 0.14 mg; Se, 0.1 mg.

### 1.3 样品采集

在试验第 90 天时, 将育肥猪禁食 12 h 后称重并屠宰取样。采集盲肠食糜及黏膜并保存于液氮中, 切取 2 cm 盲肠中段组织储存于 4%多聚甲醛中, 以便进行后续试验。

### 1.4 测定指标及方法

#### 1.4.1 生长性能

在试验第 1、40、90 天时将育肥猪禁食 12 h 后称重并记录, 用以计算平均日增重。此外, 统计育肥猪在试验第 1-40 天及第 40-90 天的采食量, 用以计算平均日采食量及料重比(F/G)。

#### 1.4.2 肠道形态

将 4%多聚甲醛中固定的盲肠肠段用手术刀

切去多余组织, 使用乙醇作为脱水剂进行梯度脱水后用石蜡进行包埋。将每个样品进行切片、脱蜡, 最后使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后封片。切片通过虚拟显微镜(Simon-01)拍照, 并通过 Image-Pro Plus6.0 测量肠道黏膜厚度、隐窝深度, 每个样品选取 6 个值后计算其平均值用以统计分析。

#### 1.4.3 盲肠黏膜抗氧化能力及细胞因子的测定

从液氮中取出盲肠黏膜样品并称取 0.1 g, 加入 9 倍的生理盐水后进行匀浆。以 3 500 r/min 的速度离心 10 min 后收集上清液。用相应试剂盒检测盲肠黏膜中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶

(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)和 MDA 含量,试剂盒均购于南京建成生物工程研究所有限公司,试验操作严格按照试剂盒说明书进行。分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, SIgA)、白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )采用酶联免疫吸附测定法进行测定,试剂盒均购于上海酶联生物科技有限公司,操作步骤严格按照说明书进行。

#### 1.4.4 盲肠黏膜抗氧化及屏障相关基因 mRNA 表达

从液氮中取出盲肠黏膜样品,用 TRIzol 溶液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取样品 RNA,通过微量分光光度计检测 RNA 浓度和

纯度。使用 HiScript III All-in-one RT Super Mix Perfect for qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)按照说明书将 1  $\mu$ g 总 RNA 逆转录成 cDNA 并置于-80  $^{\circ}$ C中保存。使用特异性引物(表 2)通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, *NRF2*)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (kelch-like ECH-associated protein 1, *KEAP1*)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, *HO-1*)、醌氧化还原酶 1 (NADPH: quinone oxidoreductase 1, *NQO1*)、闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens 1, *ZO-1*)、闭锁蛋白(*Occludin*)、闭合蛋白-1 (*Claudin-1*)、黏蛋白 2 (mucin 2, *MUC2*)的转录水平。以  $\beta$ -肌动蛋白(beta actin,  $\beta$ -actin)作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行分析。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'→3')	GenBank
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F: ATGCTTCTAGACGGACTGCG	XM_003357928.4
	R: GTTTCAGGAGGCTGGCATGA	
<i>NRF2</i>	F: TTGTCTGTGATGCCAACGTG	XM_021075133.1
	R: TTGGAACCGTGCTAGTCTCA	
<i>KEAP1</i>	F: CGTGGAGACAGAAACGTGGA	XM_021076667.1
	R: CAATCTGCTTCCGACAGGGT	
<i>NQO1</i>	F: GATCATACTGGCCCACTCCG	NM_001159613.1
	R: GAGCAGTCTCGGCAGGATAC	
<i>HO-1</i>	F: CAAGCAGAAAATCCTCGAAG	NM_001004027.1
	R: GCTGAGTGTCAGGACCCATC	
<i>ZO-1</i>	F: GAGGATGGTCACACCGTGGT	XM_021098896.1
	R: GGAGGATGCTGTTGTCTCGG	
<i>Occludin</i>	F: ATGCTTTCTCAGCCAGCGTA	NM_001163647.2
	R: AAGGTTCCATAGCCTC	
<i>Claudin-1</i>	F: GCCACAGCAAGGTATGGTAAC	NM_001244539.1
	R: AGTAGGGCACCTCCCAGAAG	
<i>MUC-2</i>	F: GGTCATGCTGGAGCTGGACAG	XM_021082584.1
	R: TGCCTCCTCGGGGTCGTAC	

#### 1.4.5 盲肠食糜微生物 16S rRNA 基因测序及分析

参考 Wang 等<sup>[14]</sup>描述的方法提取盲肠食糜总 DNA, 使用微量分光光度计对 DNA 的浓度与纯度进行检测。使用 319F (5'-ACTCCTACGGGAGGACAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')引物通过 PCR 从 DNA 样品中扩增 V3-V4 区域的细菌 16S rRNA 基因。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并通过 Qubit 2.0 荧光计测定其浓度。使用 Illumina MiSeq 进行测序和文库构建。采用 UCLUST 算法对 97% 相似水平的分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 代表序列进行分类学分析, 对比 Silva 数据库 (Release138.1 <http://www.arb-silva.de>) 进行物种注释。基于 Mothur v.1.21.1 计算 Chao1、ACE、Shannon、Simpson 多样性指数以评估盲肠食糜菌群的多样性与丰富度。利用 Mothur v.1.21.1 基于每个样本的 OTU 情况和 Bray-Curtis 算法对各组样品进行主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 分析。各组样品间物种的相对丰度比较采用 Kruskal-Wallis 检验。测序原始数据提交至 NCBI 数据库, 登录号为 PRJNA949549。

#### 1.4.6 盲肠食糜中短链脂肪酸浓度的测定

在离心管中用 0.8 mL 双蒸水稀释 0.2 g 盲肠

食糜后进行匀浆, 之后以 12 000 r/min 的速度离心 10 min。然后将 0.6 mL 上清液转移到新的离心管中, 并与 0.12 mL 25% (质量体积分数) 的偏磷酸溶液混合。随后, 将该溶液置于 -20 °C 过夜, 之后取出并解冻后以 12 000 r/min 的速度离心 10 min。使用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤取得上清液, 之后使用注射器抽取 1 μL 上清液, 并将其注射到气相色谱仪 (Shimadzu) 中, 该色谱仪配备有 30 m×0.32 mm×0.25 μm 的毛细管色谱柱 (Sigma-Aldrich), 用于测定短链脂肪酸的浓度。柱温为 135 °C, 检测器温度为 200 °C, 载气为氮气, 压力为 60 kPa, 氧气和氢气压力均为 50 kPa。

#### 1.5 数据统计分析

使用 Excel 2016 对试验数据进行初步整理, 利用 SPSS 26.0 中的单因素方差分析与 Duncan's 检验进行数据分析。最终结果用平均值±标准误表示,  $P<0.05$  时认为差异显著,  $P\geq 0.05$  表示无差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪生长性能的影响

橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪生长性能的影响如表 3 所示。结果表明, 与 Con 组相比,

表 3 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪生长性能的影响

Table 3 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on growth performance of finishing pigs

Items	Con	Hes	RA	Hes×RA	SEM	P-value
1-40 d						
Average daily gain (g/d)	665.42c	724.58bc	825.00ab	856.25a	23.86	0.007
Average daily feed intake (kg/d)	2.02d	2.06c	2.13b	2.18a	0.01	<0.001
F/G	3.06	2.86	2.62	2.59	0.07	0.057
41-90 d						
Average daily gain (g/d)	998.00	1 007.00	944.67	1 070.33	17.88	0.091
Average daily feed intake (kg/d)	3.40bc	3.43b	3.36c	3.56a	0.02	<0.001
F/G	3.41	3.42	3.60	3.35	0.06	0.505
1-90 d						
Average daily gain (g/d)	850.19c	881.48b	891.48b	975.19a	12.01	<0.001
Average daily feed intake (kg/d)	2.79c	2.82b	2.82b	2.95a	0.01	<0.001
F/G	3.28a	3.27a	3.16ab	3.02b	0.03	0.032

Different lowercase letters in the same line indicate significant differences in the different groups ( $P<0.05$ ). The same below.

橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪前期的平均日增重与平均日采食量,同时显著提高了后期的平均日采食量,并显著改善了全期的平均日增重、平均日采食量和料重比( $P<0.05$ )。此外,与 Hes 组相比,橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪前期的平均日增重与平均日采食量,同时显著提高了后期的平均日采食量,并显著改善了全期的平均日增重、平均日采食量和料重比( $P<0.05$ )。与 RA 组相比,橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪 3 个时期的平均日采食量及全期的平均日增重( $P<0.05$ )。

## 2.2 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠肠道形态的影响

橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠肠道形态的影响如图 1 和表 4 所示。结果表明,与

Con 组相比, Hes×RA 组盲肠黏膜厚度显著提高( $P<0.05$ )。此外, Hes×RA 组盲肠黏膜厚度显著高于 Hes 组( $P<0.05$ )。隐窝深度在 4 组之间并未发现显著差异( $P\geq 0.05$ )。

## 2.3 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠抗氧化功能的影响

### 2.3.1 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠抗氧化能力的影响

橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠抗氧化能力的影响如图 2 所示。结果表明,与 Con 组相比, Hes×RA 组育肥猪盲肠黏膜中 T-AOC、SOD 活性显著提高( $P<0.05$ )。此外, Hes×RA 组育肥猪盲肠黏膜中总抗氧化能力显著高于 RA 组( $P<0.05$ )。GSH-Px 活性与 MDA 含量在 4 组之间并未发现显著差异( $P\geq 0.05$ )。

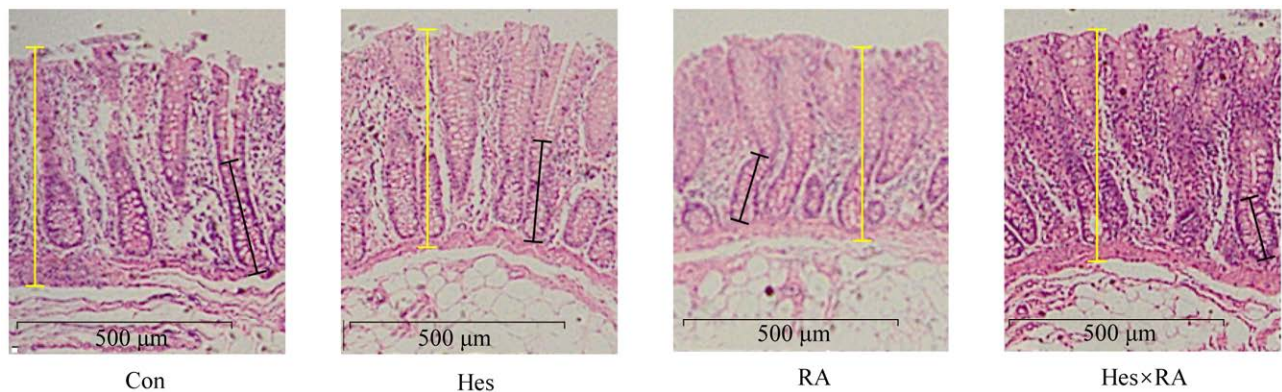


图 1 橙皮苷与迷迭香酸组合对生长育肥猪盲肠肠道形态的影响

Figure 1 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on caecum morphology of growing-finishing pigs. The length of the yellow line indicates the mucosal thickness. The length of the black line indicates the crypt depth. Con: The control group pigs; Hes: The pigs supplemented with 600 mg/kg hesperidin; RA: The pigs supplemented with 40 mg/kg rosmarinic acid; Hes×RA: The pigs supplemented with 300 mg/kg hesperidin and 20 mg/kg rosmarinic acid. The same below.

表 4 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠肠道形态的影响

Table 4 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on cecal morphology of finishing pigs

Items	Con	Hes	RA	Hes×RA	SEM	<i>P</i> -value
Mucosal thickness ( $\mu\text{m}$ )	497.17b	500.72b	514.36ab	554.45a	11.33	0.046
Crypt depth ( $\mu\text{m}$ )	175.97	152.28	168.00	156.11	4.10	0.226



### 2.3.2 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠 NRF2 通路相关基因 mRNA 表达的影响

如图 3 所示, 利用实时荧光定量 PCR 技术对育肥猪盲肠 NRF2 通路相关基因的 mRNA 表达进行了检测。结果表明, 与 Con 组相比, Hes×RA 组育肥猪盲肠中 *NRF2*、*HO-1* 的相对 mRNA 表达量显著提高( $P<0.05$ )。4 组之间盲肠中 *KEAP1*、*NQO1* 的相对 mRNA 表达量并未发现显著差异( $P\geq 0.05$ )。

## 2.4 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜菌群结构及其代谢产物的影响

### 2.4.1 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜菌群多样性的影响

育肥猪盲肠食糜菌群的多样性指数如图 4

所示。结果表明, 与 Con 组相比, Hes×RA 组 Chao 1、ACE、Shannon、Simpson 指数无显著变化。而与 RA 组相比, Hes×RA 组 Chao 1、ACE 指数显著提高( $P<0.05$ )。PCoA 分析显示, 4 组之间的菌群组成显著分开, 且 ANOSIM 分析表示结果出现显著性( $R=0.509, P=0.001$ )。

### 2.4.2 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜菌群结构的影响

橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜门水平菌群的影响如图 5 所示。在门水平上共发现 5 个相对丰度超过 1% 的菌门, 其中 *Firmicutes*、*Bacteroidota*、*Proteobacteria* 的总相对丰度超过 90%。统计分析结果表明, Hes×RA 组 *Bacteroidota* 和 *Fusobacteriota* 的相对丰度显著高于 Con 组与

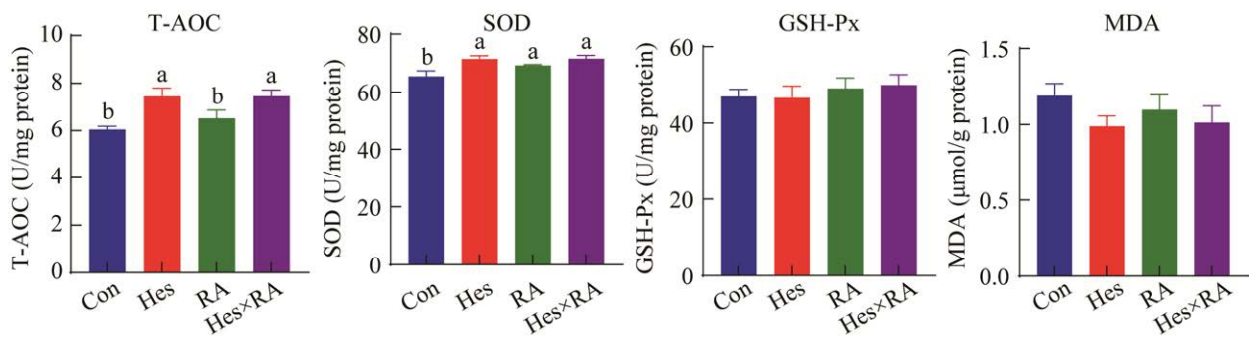


图 2 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠抗氧化功能的影响

Figure 2 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on cecal antioxidant capacity of finishing pigs. Different letters in different treatment groups indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The error bar indicated mean±SE. Different letters in different treatment groups indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The same below.

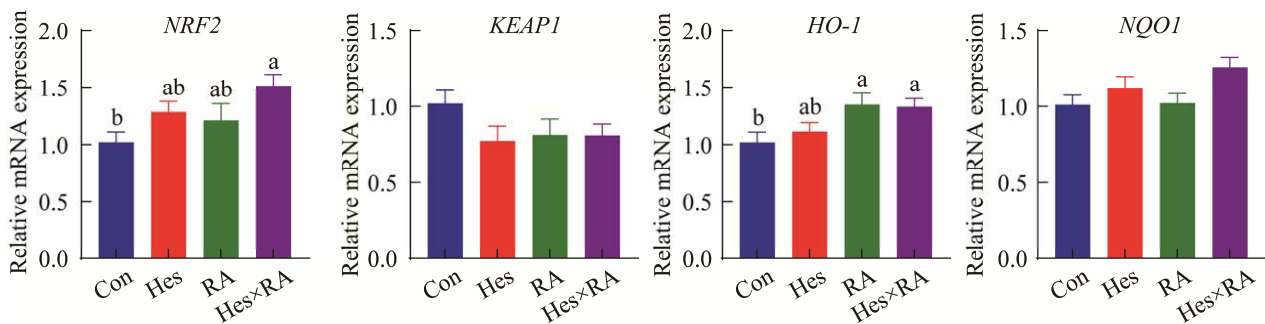


图 3 橙皮苷与迷迭香酸组合对盲肠抗氧化相关基因表达的影响

Figure 3 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on antioxidation-related gene expression in cecum.



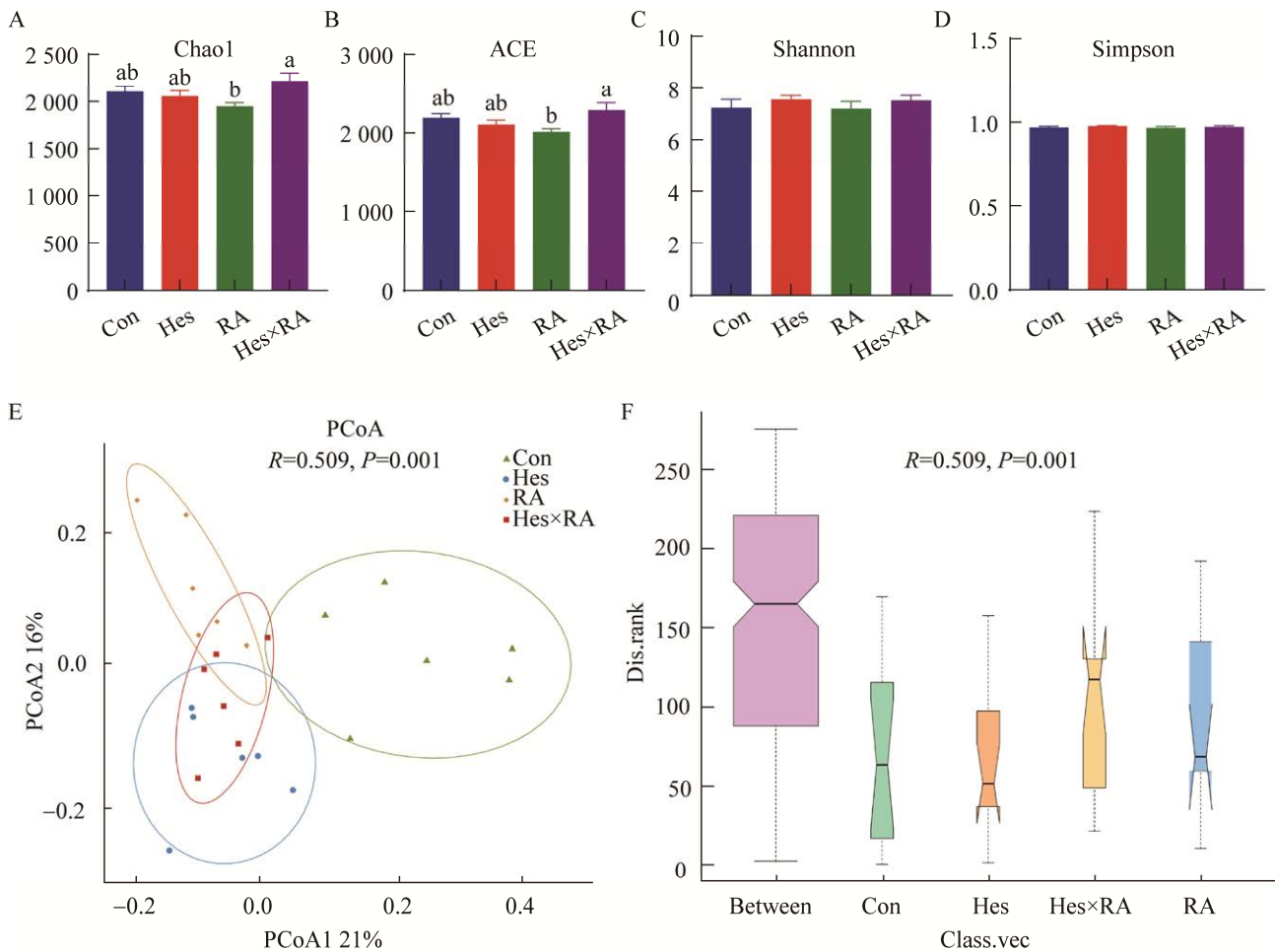


图4 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠菌群  $\alpha$  多样性(A-D)与  $\beta$  多样性(E-F)的影响

Figure 4 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on alpha diversity (A-D) and beta diversity (E-F) of cecal microbiota.

Hes 组, *Proteobacteria* 的相对丰度显著低于 Con 组与 RA 组( $P<0.05$ )。橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜属水平菌群的影响如图 6 所示。在属水平上共发现 25 种相对丰度超过 1% 的菌属。其中, Hes×RA 组育肥猪盲肠食糜中 *Terrisporobacter*、*Clostridium sensu stricto 1*、*Romboutsia* 的相对丰度显著低于 Con 组, *Muribaculaceae\_norank* 的相对丰度显著高于 Con 组, *Lactobacillus*、*Rikenellaceae RC9 gut group* 的相对丰度显著高于 Con 组与 Hes 组, *Phascolarctobacterium* 的相对丰度显著高于 Con 组

与 RA 组( $P<0.05$ )。此外, RA 组中 *Lachnospiraceae* XPB1014 group 的相对丰度显著低于 Con 组( $P<0.05$ )。

#### 2.4.3 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜短链脂肪酸浓度的影响

育肥猪盲肠食糜中短链脂肪酸浓度如表 5 所示。结果表明, Hes×RA 组盲肠食糜中异丁酸浓度显著高于 Con 组、Hes 组和 RA 组, 丁酸浓度显著高于 Con 组和 Hes 组( $P<0.05$ )。4 组之间乙酸、丙酸、异戊酸、戊酸和总短链脂肪酸浓度并未出现显著差异( $P\geq 0.05$ )。

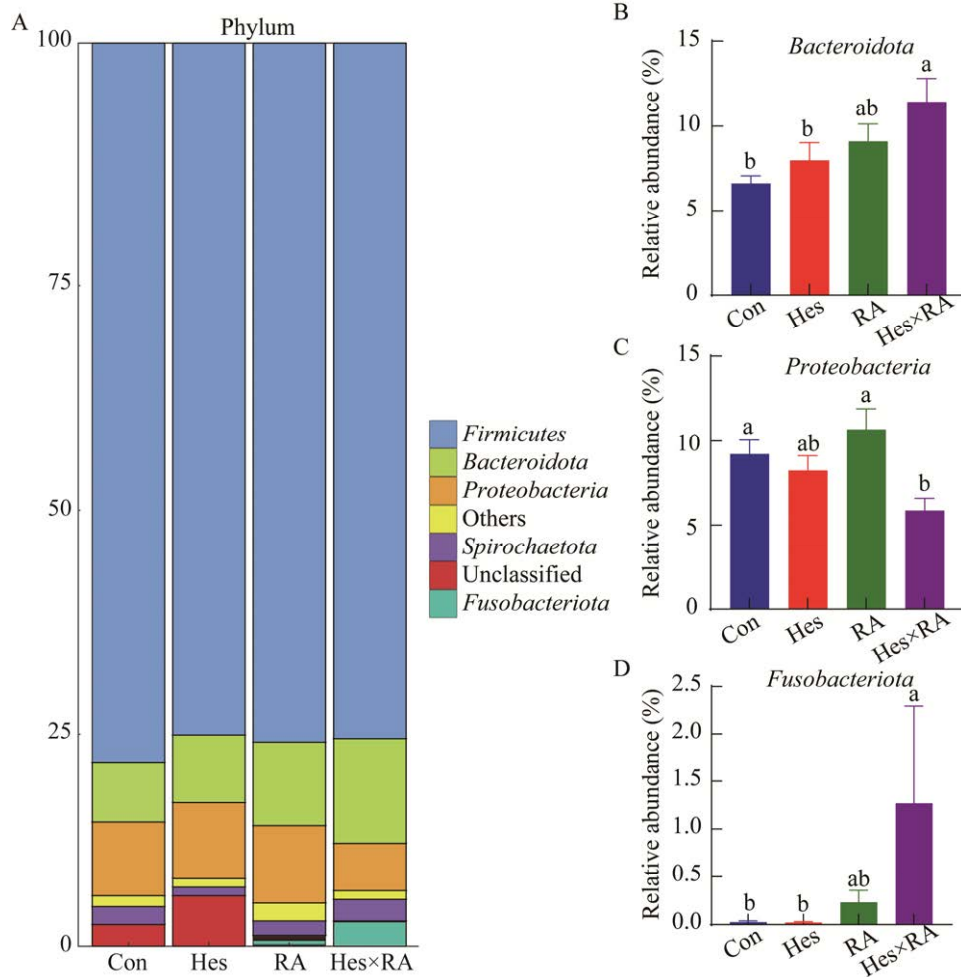


图 5 橙皮苷与迷迭香酸组合对盲肠食糜门水平菌群组成(A)和菌群变化(B-D)的影响

Figure 5 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on phylum level of microbial composition (A) and microbial change (B-D) in cecum digesta.

## 2.5 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠屏障功能相关基因 mRNA 表达的影响

橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠屏障相关基因 mRNA 表达的影响如图 7 所示。结果表明, 与 Con 组相比, 橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了 *ZO-1*、*Claudin-1* 和 *MUC-2* 的相对 mRNA 表达量( $P < 0.05$ )。此外, Hes×RA 组育肥猪盲肠中 *ZO-1* 和 *Claudin-1* 的相对 mRNA 表达量显著高于 Hes 组( $P < 0.05$ )。4 组之间 *Occludin* 的相对 mRNA 表达量并未出现显著差异( $P \geq 0.05$ )。

## 2.6 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠细胞因子和分泌型免疫球蛋白 A 含量的影响

利用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒检测了育肥猪盲肠黏膜中细胞因子及分泌型免疫球蛋白 A 的含量。如图 8 所示, 与 Con 组相比, Hes×RA 组育肥猪盲肠黏膜中 IL-1 $\beta$  的含量显著降低、SIgA 的含量显著提高( $P < 0.05$ )。此外, Hes×RA 组育肥猪盲肠黏膜中 SIgA 的含量显著高于 RA 组( $P < 0.05$ )。盲肠黏膜中 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  的含量在 4 组之间并没有显著的差异( $P \geq 0.05$ )。

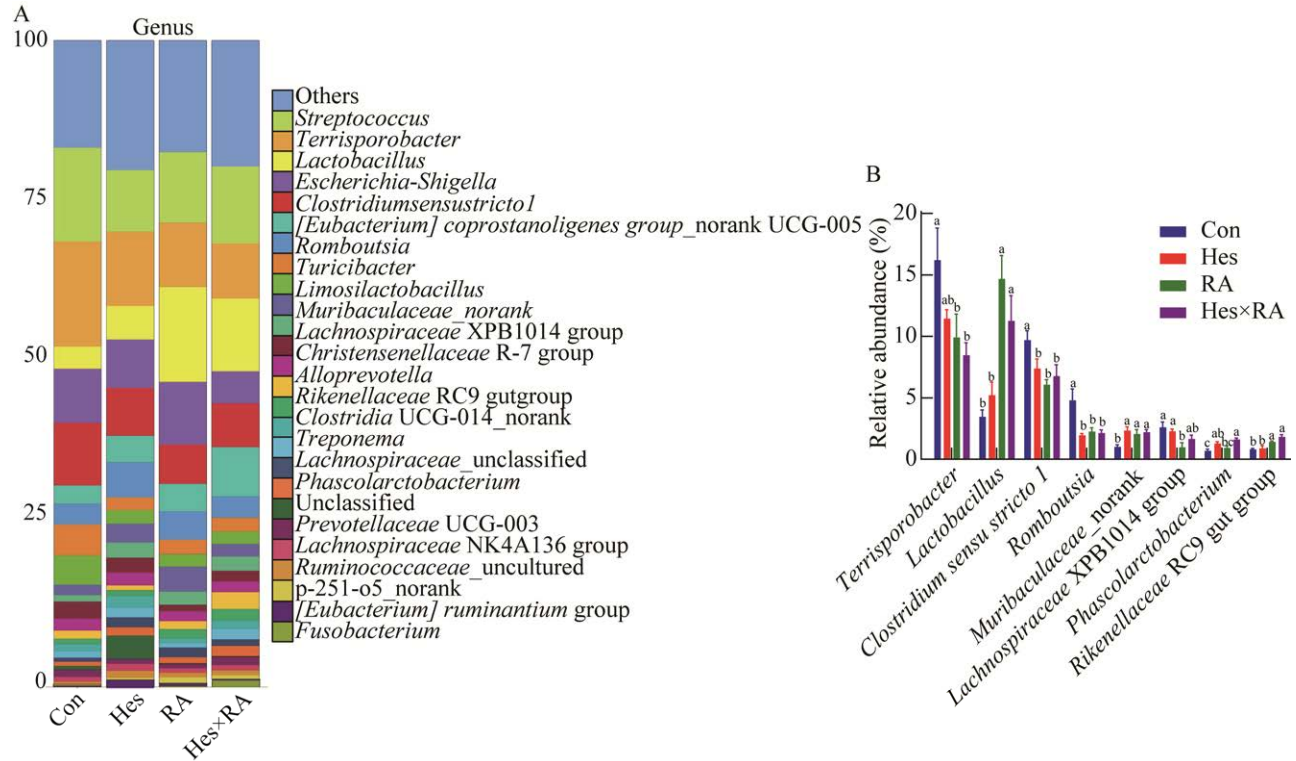


图 6 橙皮苷与迷迭香酸组合对盲肠食糜属水平菌群组成(A)和菌群变化(B)的影响

Figure 6 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on genus level of microbial composition (A) and microbial change (B) in cecum digesta.

表 5 橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪盲肠食糜短链脂肪酸浓度的影响

Table 5 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on concentrations of short chain fatty acids in cecal digesta of finishing pigs

Items	Con	Hes	RA	Hes×RA	SEM	P-value
Acetate (μmol/g digesta)	370.55	417.49	364.54	481.96	19.34	0.105
Propionate (μmol/g digesta)	105.69	129.10	114.52	140.58	5.28	0.079
Isobutyrate (μmol/g digesta)	8.81b	8.34b	11.44b	15.94a	1.90	0.009
Butyrate (μmol/g digesta)	32.38c	35.93bc	39.83ab	43.67a	1.42	0.017
Isovalerate (μmol/g digesta)	14.46	14.21	18.20	16.42	0.97	0.456
Valerate (μmol/g digesta)	9.53	10.39	10.44	11.32	0.55	0.752
Total SCFAs (μmol/g digesta)	541.43	615.46	558.97	709.90	24.83	0.056

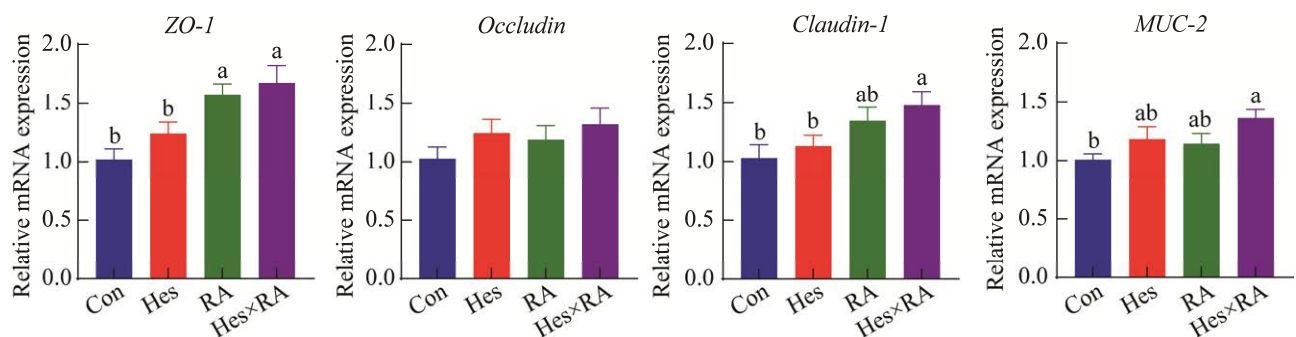


图 7 橙皮苷与迷迭香酸组合对盲肠屏障功能相关基因表达的影响

Figure 7 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on barrier-related gene expression in cecum.

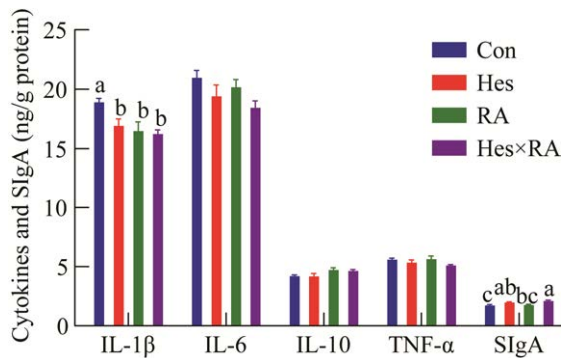


图 8 橙皮苷与迷迭香酸组合对盲肠细胞因子和分泌型免疫球蛋白 A 含量的影响

Figure 8 Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on cytokines and SIgA content in cecum.

### 3 讨论与结论

提高动物的生长性能是养殖业从业者追求的重要生产目标。前期研究表明, 橙皮苷与迷迭香酸作为饲料添加剂能够提高动物的生长性能<sup>[15]</sup>。例如, Kamboh 等<sup>[16]</sup>的研究发现, 饲料中添加 20 mg/kg 橙皮苷显著提高了肉鸡的体重并降低了其料重比。Shang 等<sup>[17]</sup>的研究发现, 饲料中添加 100–400 mg/kg 迷迭香酸显著改善了肉鸡的平均日增重与料重比。因此, 本研究首先探究了橙皮苷与迷迭香酸组合对育肥猪生长性能的影响。结果表明, 与 Con 组相比, 橙皮苷与迷迭香酸组合显著改善了育肥猪前期与全期的平均日增重及全期的料重比。此外, 橙皮苷与迷迭香酸组合在育肥猪上展现出了更好的效果, 如与 Con 组相比, 显著提高了育肥猪前期、后期和全期的平均日采食量, 并且橙皮苷与迷迭香酸组合使用的效果在一定程度上优于单独使用橙皮苷或迷迭香酸。以上结果表明, 在饲料中添加橙皮苷与迷迭香酸组合能够改善育肥猪的生长性能, 并且相较于单独添加橙皮苷或迷迭香酸, 两者组合使用时发挥的效果更好。

肠道是动物重要的消化吸收器官, 也是动物

体内最大的免疫器官。保障肠道形态的完整性有利于发挥动物的生长潜能<sup>[18]</sup>。本研究结果表明, 橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪盲肠的黏膜厚度, 并且其效果要优于单独使用橙皮苷。盲肠黏膜能够储存免疫效应分子、抑制病原菌对肠道的入侵<sup>[18]</sup>。因此, 肠道黏膜厚度的增加有助于保护肠道免受病原菌的攻击。此外, 肠道在进行正常生理活动的过程中极易产生并积累活性氧, 良好的抗氧化能力是保障肠道形态结构完整性的关键因素之一<sup>[19]</sup>。在本研究中, 与 Con 组相比, 橙皮苷与迷迭香酸组合显著提高了育肥猪盲肠黏膜中 SOD 活性和 T-AOC, 并且其效果优于单独使用迷迭香酸。NRF2 通路是动物机体内重要的抗氧化通路, 该通路的激活能够增强通路下游抗氧化酶的表达<sup>[20]</sup>。前期研究表明, 激活 NRF2 信号通路是橙皮苷、迷迭香酸提高动物机体组织抗氧化能力的重要途径之一。例如, Gur 等<sup>[21]</sup>的研究发现, 为紫杉醇处理的小鼠灌喂 200 mg/kg 体重的橙皮苷激活了肝和肾组织中的 NRF2 信号通路并提高了 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性。Cai 等<sup>[22]</sup>的研究发现, 给高脂饮食小鼠灌喂 2 mg/kg 体重的迷迭香酸提高了空肠 *NRF2* 的相对 mRNA 表达量并增强了下游抗氧化酶 *SOD*、*HO-1* 的相对 mRNA 表达量, 同时其还降低了空肠中 MDA 含量。本研究同样发现, Hes×RA 组育肥猪盲肠中 *NRF2* 和 *HO-1* 的相对 mRNA 表达量显著高于 Con 组。以上结果表明, 橙皮苷与迷迭香酸组合可能通过激活 NRF2 信号通路提高盲肠的抗氧化能力, 有助于保障肠道形态的完整性, 并且其效果在一定程度上优于单独使用橙皮苷或迷迭香酸。

肠道生态平衡对维持动物肠道的功能与健康有着重要的意义。前期研究表明, 橙皮苷与迷迭香酸在抑制病原菌生长、调节肠道菌群组成上有良好的效果<sup>[23-25]</sup>。微生物的多样性指数是判



断微生物群丰富度、多样性及组成差异的重要指标。在本研究中, PCoA 分析显示 4 组的微生物组成存在显著差异, 表明橙皮苷、迷迭香酸及其组合能够改变育肥猪盲肠食糜菌群组成。因此, 在门水平与属水平上进行了进一步的分析以探究不同处理组中的差异微生物。结果表明, Hes×RA 组中 *Proteobacteria* 相对丰度显著低于 Con 组与 RA 组。*Proteobacteria* 中包含许多致病菌, 该菌门丰度的增加往往被认为是肠道疾病或生态失调的标志<sup>[26-27]</sup>。此外, 在属水平上, 与 Con 组相比, 橙皮苷与迷迭香酸组合显著降低了 *Terrisporobacter*、*Clostridium sensu stricto 1* 和 *Romboutsia* 的相对丰度。*Terrisporobacter* 能够产生三甲胺 N-氧化物, 并且三甲胺 N-氧化物浓度的增加会导致宿主体内的氧化应激<sup>[28-29]</sup>。因此, *Terrisporobacter* 相对丰度的降低将有助于改善肠道的氧化还原稳态, 这与本研究中 Hes×RA 组盲肠黏膜抗氧化能力的提高所一致。在以往研究中, *Clostridium sensu stricto 1* 被认定为肠道中的致病菌<sup>[30]</sup>。例如, Wang 等<sup>[31]</sup>的研究发现, 高丰度的 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1* 破坏了断奶仔猪的肠道黏膜屏障并引起了肠道炎症。此外, *Romboutsia* 相对丰度的增加往往与肠道疾病密切相关。例如, Wu 等<sup>[32]</sup>的研究发现, 在葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠的结肠食糜中, *Romboutsia* 的相对丰度显著增加。Wu 等<sup>[33]</sup>的研究表明, *Romboutsia* 的相对丰度在肠易激综合征大鼠的结肠食糜中显著增加。以上结果表明, 橙皮苷与迷迭香酸组合能够改变盲肠食糜菌群组成, 减少肠道中致病菌的定植, 有助于降低肠道疾病风险。

肠道中定殖的微生物能够通过产生短链脂肪酸来改善肠道的健康与功能。本研究发现, Hes×RA 组中 *Bacteroidota* 和 *Fusobacteriota* 的相对丰度显著提高。在前期研究中, *Bacteroidota*

中的许多微生物被鉴定为短链脂肪酸产生菌, 如 *Muribaculaceae\_norank*、*Rikenellaceae RC9 gut group* 等<sup>[34-35]</sup>。并且在本研究中, *Muribaculaceae\_norank* 和 *Rikenellaceae RC9 gut group* 在 Hes×RA 组中的相对丰度显著高于 Con 组。*Fusobacteriota* 中的微生物在以往研究中被发现能够利用碳水化合物及黏蛋白等产生丁酸, 该菌门丰度的提高有助于肠道食糜中短链脂肪酸浓度的提高<sup>[36]</sup>。此外, Hes×RA 组中 *Lactobacillus* 与 *Phascolarctobacterium* 的相对丰度显著高于 Con 组。Wang 等<sup>[37]</sup>的研究发现, 利用 *Lactobacillus* 体外发酵大豆不溶性膳食纤维能够促进短链脂肪酸的产生。此外, *Phascolarctobacterium* 在以往的研究中也被鉴定为短链脂肪酸产生菌<sup>[38]</sup>。在本研究中, 与 Con 组相比, Hes×RA 组中异丁酸和丁酸的浓度显著增加, 并且其浓度显著高于 Hes 组或 RA 组。以上结果表明, 橙皮苷与迷迭香酸组合能够通过促进肠道中短链脂肪酸产生菌的定植来增加肠道食糜中短链脂肪酸的浓度。

许多研究表明, 高浓度的短链脂肪酸有利于肠道屏障功能的提高。紧密连接能够封闭肠道上皮细胞间的空隙从而保障肠道屏障的完整性, 是肠道屏障的关键组成部分<sup>[39]</sup>。Wang 等<sup>[40]</sup>通过体外培养小肠上皮细胞发现, 丁酸盐的添加显著提高了紧密连接蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 的蛋白表达量。本研究同样发现, 与 Con 组相比, Hes×RA 组盲肠黏膜中 *ZO-1* 和 *Claudin-1* 的相对 mRNA 表达量显著提高, 且其效果显著优于 Hes 组。肠道上皮细胞上覆盖有一层黏液能够防止病原菌与肠道上皮细胞直接接触, 而 *Muc-2* 是形成肠道黏液层的主要黏蛋白<sup>[41]</sup>。Nielsen 等<sup>[42]</sup>通过体外培养结肠上皮细胞发现, 丁酸盐的添加显著提高了 *MUC-2* 的相对 mRNA 表达量。同样, 本研究中 Hes×RA 组盲肠黏膜中 *MUC-2* 的相对

mRNA 表达量显著高于 Con 组。此外, 肠道中存在的细胞因子与免疫球蛋白等免疫效应分子有利于维持肠道的免疫稳态, 是肠道免疫屏障的重要组成部分<sup>[43]</sup>。前期研究表明, 短链脂肪酸能够通过扩散或主动转运进入肠道细胞从而调节肠道免疫效应分子的表达<sup>[44]</sup>。本研究结果发现, 与 Con 组相比, Hes×RA 组育肥猪盲肠中 IL-1 $\beta$  的含量显著降低, 同时 SIgA 的含量显著增加并高于 RA 组。以上结果表明, Hes×RA 组育肥猪盲肠中高浓度的短链脂肪酸改善了盲肠的屏障功能, 并且其效果优于 Hes 组与 RA 组。

综上所述, 橙皮苷与迷迭香酸组合提高了育肥猪的生长性能, 同时提高了盲肠抗氧化能力并改善了盲肠肠道形态。此外, 橙皮苷与迷迭香酸组合调节了肠道微生物组成、提高了盲肠食糜中短链脂肪酸浓度, 有助于肠道屏障功能的提高。并且在本研究中, 橙皮苷与迷迭香酸组合使用的效果优于单独使用的橙皮苷或迷迭香酸。

## 参考文献

- [1] KIM J, GUEVARRA RB, NGUYEN SG, LEE JH, JEONG DK, UNNO T. Effects of the antibiotics growth promoter tylosin on swine gut microbiota[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(5): 876-882.
- [2] KUMAR SB, ARNIPALLI SR, ZIOUZENKOVA O. Antibiotics in food chain: the consequences for antibiotic resistance[J]. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 2020, 9(10): 688.
- [3] ZHAO Y, YANG QE, ZHOU X, WANG FH, MUURINEN J, VIRTA MP, BRANDT KK, ZHU YG. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: status and solutions[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021, 51(19): 2159-2196.
- [4] WINDISCH W, SCHEDULE K, PLITZNER C, KROISMAYR A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry[J]. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(14 suppl): E140-E148.
- [5] MORGAN NK. Managing gut health without reliance on antimicrobials in poultry[J]. *Animal Production Science*, 2017, 57(11): 2270-2279.
- [6] PYRZYNSKA K. Hesperidin: a review on extraction methods, stability and biological activities[J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 2387.
- [7] PARK JC, LEE SH, PARK SK, HONG JK, ZHANG ZF, CHO JH, KIM IH. Effects of fruit by-product extracts supplementation on growth performance and nutrient digestibility in growing pigs[J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2013, 55(4): 257-261.
- [8] GOLIOMYTIS M, KARTSONAS N, CHARISMIADOU MA, SYMEON GK, SIMITZIS PE, DELIGEORGIS SG. The influence of naringin or hesperidin dietary supplementation on broiler meat quality and oxidative stability[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141652.
- [9] LUO CX, ZOU L, SUN HJ, PENG JY, GAO C, BAO LC, JI RP, JIN Y, SUN SY. A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 153.
- [10] DOMITROVIĆ R, POTOČNJAK I, CRNČEVIĆ-ORLIĆ Ž, ŠKODA M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 66: 321-328.
- [11] ABREU AC, COQUEIRO A, SULTAN AR, LEMMENS N, KIM HK, VERPOORTE R, van WAMEL WJB, SIMÕES M, CHOI YH. Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-16.
- [12] 李盼盼, 李润林, 吴佳庆, 雷铭康, 汪晶, 朱伟云. 橙皮苷和迷迭香酸组合对脂多糖攻毒大鼠回肠形态、菌群结构以及炎症反应的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(4): 2689-2701.  
LI PP, LI RL, WU JQ, LEI MK, WANG J, ZHU WY. Effects of hesperidin and rosmarinic acid combination on ileal morphology, microbiota structure and inflammatory response of lipopolysaccharide-challenged rats[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(4): 2689-2701 (in Chinese).
- [13] YANG LN, BIAN GR, SU Y, ZHU WY. Comparison of faecal microbial community of lantang, Bama, Erhualian, Meishan, Xiaomeishan, duroc, Landrace, and Yorkshire sows[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2014, 27(6): 898-906.

- [14] WANG J, TIAN SY, YU H, WANG J, ZHU WY. Response of colonic mucosa-associated microbiota composition, mucosal immune homeostasis, and barrier function to early life galactooligosaccharides intervention in suckling piglets[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(2): 578-588.
- [15] YATAO X, SAEED M, KAMBOH AA, ARAIN MA, AHMAD F, SUHERYANI I, ABD EL-HACK ME, ALAGAWANY M, SHAH QA, CHAO S. The potentially beneficial effects of supplementation with hesperidin in poultry diets[J]. *World's Poultry Science Journal*, 2018, 74(2): 265-276.
- [16] KAMBOH AA, ZHU WY. Individual and combined effects of genistein and hesperidin supplementation on meat quality in meat-type broiler chickens[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(13): 3362-3367.
- [17] SHANG RS, CHEN LF, XIN YZ, WANG GY, LI R, LI SJ, LI LS. Evaluation of rosmarinic acid on broiler growth performance, serum biochemistry, liver antioxidant activity, and muscle tissue composition[J]. *Animals*, 2022, 12(23): 3313.
- [18] BROOM LJ. Gut barrier function: effects of (antibiotic) growth promoters on key barrier components and associations with growth performance[J]. *Poultry Science*, 2018, 97(5): 1572-1578.
- [19] CAPALDO CT, POWELL DN, KALMAN D. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, 95(9): 927-934.
- [20] PIOTROWSKA M, SWIERCZYNSKI M, FICHNA J, PIECHOTA-POLANCZYK A. The Nrf2 in the pathophysiology of the intestine: molecular mechanisms and therapeutic implications for inflammatory bowel diseases[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 163: 105243.
- [21] GUR C, KANDEMIR FM, CAGLAYAN C, SATICI E. Chemopreventive effects of hesperidin against paclitaxel-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via amendment of Nrf2/HO-1 and caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2022, 365: 110073.
- [22] CAI X, YANG F, ZHU LH, XIA Y, WU QY, XUE HQ, LU YH. Rosmarinic acid, the main effective constituent of *Orthosiphon stamineus*, inhibits intestinal epithelial apoptosis via regulation of the Nrf2 pathway in mice[J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3027.
- [23] STEVENS Y, RYMENANT EV, GROOTAERT C, CAMP JV, POSSEMIERS S, MASCLÉE A, JONKERS D. The intestinal fate of citrus flavanones and their effects on gastrointestinal health[J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1464.
- [24] BITTNER FIALOVÁ S, KELLO M, ČOMA M, SLOBODNÍKOVÁ L, DROBNÁ E, HOLKOVÁ I, GARAJOVÁ M, MRVA M, ZACHAR V, LUKÁČ M. Derivatization of rosmarinic acid enhances its *in vitro* antitumor, antimicrobial and antiprotozoal properties[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1078.
- [25] ESTRUEL-AMADES S, MASSOT-CLADERA M, PÉREZ-CANO FJ, FRANCH À, CASTELL M, CAMPS-BOSSACOMA M. Hesperidin effects on gut microbiota and gut-associated lymphoid tissue in healthy rats[J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 324.
- [26] SHIN NR, WHON TW, BAE JW. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [27] MUKHOPADHYA I, HANSEN R, EL-OMAR EM, HOLD GL. IBD—what role do *Proteobacteria* play?[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9(4): 219-230.
- [28] LI TJ, CHEN YL, GUA CJ, LI XD. Elevated circulating trimethylamine N-oxide levels contribute to endothelial dysfunction in aged rats through vascular inflammation and oxidative stress[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 350.
- [29] KYOUNG H, LEE JJ, CHO JH, CHOE J, KANG J, LEE H, LIU YH, KIM Y, KIM HB, SONG M. Dietary glutamic acid modulates immune responses and gut health of weaned pigs[J]. *Animals*, 2021, 11(2): 504.
- [30] WANG Y, XU L, LIU JH, ZHU WY, MAO SY. A high grain diet dynamically shifted the composition of mucosa-associated microbiota and induced mucosal injuries in the colon of sheep[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2080.
- [31] WANG J, JI HF, WANG SX, LIU H, ZHANG W, ZHANG DY, WANG YM. Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1953.
- [32] WU ZY, PAN D, JIANG M, SANG LX, CHANG B. Selenium-enriched *Lactobacillus acidophilus* ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by regulating inflammatory cytokines and intestinal microbiota[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 716816.



- [33] WU EQ, SONG JZ, PEI LP, LING YQ. Comparison of the gut microbiota disturbance in rat models of irritable bowel syndrome induced by maternal separation and multiple early-life adversity[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 10: 581974.
- [34] ZHANG ZC, CAO HY, SONG N, ZHANG LX, CAO YG, TAI JD. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 138: 111237.
- [35] ZHAO YC, XIE B, GAO J, ZHAO GY. Dietary supplementation with sodium sulfate improves rumen fermentation, fiber digestibility, and the plasma metabolome through modulation of rumen bacterial communities in steers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(22): e01412-e01420.
- [36] ZHANG JH, MENG H, KONG XC, CHENG XY, MA T, HE H, DU WC, YANG SG, LI SY, ZHANG LM. Combined effects of polyethylene and organic contaminant on zebrafish (*Danio rerio*): accumulation of 9-nitroanthracene, biomarkers and intestinal microbiota[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 277: 116767.
- [37] WANG BX, YU HS, HE Y, WEN LK, GU JD, WANG XY, MIAO XW, QIU GS, WANG HR. Effect of soybean insoluble dietary fiber on prevention of obesity in high-fat diet fed mice via regulation of the gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2021, 12(17): 7923-7937.
- [38] FIRRMAN J, LIU LS, MAHALAK K, TANES C, BITTINGER K, TU V, BOBOKALONOV J, MATTEI L, ZHANG HJ, van den ABEELE P. The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, 98(5): fiac038.
- [39] LEE B, MOON KM, KIM CY. Tight junction in the intestinal epithelium: its association with diseases and regulation by phytochemicals[J]. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018: 2645465.
- [40] WANG HB, WANG PY, WANG X, WAN YL, LIU YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2012, 57(12): 3126-3135.
- [41] SÁNCHEZ de MEDINA F, ROMERO-CALVO I, MASCARAQUE C, MARTÍNEZ-AUGUSTIN O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2014, 20(12): 2394-2404.
- [42] NIELSEN DSG, JENSEN BB, THEIL PK, NIELSEN TS, KNUDSEN KEB, PURUP S. Effect of butyrate and fermentation products on epithelial integrity in a mucus-secreting human colon cell line[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40: 9-17.
- [43] KONG CL, FAAS MM, de VOS P, AKKERMAN R. Impact of dietary fibers in infant formulas on gut microbiota and the intestinal immune barrier[J]. *Food & Function*, 2020, 11(11): 9445-9467.
- [44] HUNG TV, SUZUKI T. Short-chain fatty acids suppress inflammatory reactions in caco-2 cells and mouse colons[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(1): 108-117.