

基于代谢组学研究原花青素 B₁ 的肠道微生物代谢

刘若男^{1,2,3}, 陈婉冰^{1,2,3}, 朱晓玲⁴, 杨宏¹, 宋哲^{4*}, 刘睿^{1,2,3*}

(¹华中农业大学食品科学与技术学院 环境食品学教育部重点实验室 武汉 430070

²武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心 武汉 430070

³农业农村部华中都市农业重点实验室 武汉 430070

⁴湖北省食品质量监督检验研究院 武汉 430073)

摘要 目的:利用猪盲肠微生物通过体外静态培养的方式探究原花青素 B₁ 的肠道微生物代谢。方法:在厌氧操作条件下,从新鲜屠宰的猪盲肠肠腔中获得孵育模型所需肠道微生物,配制培养基,孵育原花青素 B₁。采集 0,2,4,6,10,18 h 的孵育液,用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪(UHPLC-TOF-MS/MS)检测不同时间点的代谢产物,借助非靶向代谢组学分析方法,确定原花青素 B₁ 代谢过程中的差异性代谢产物,并以此解析原花青素 B₁ 的代谢。结果:共筛选和鉴定到 21 种代谢产物,其中原花青素 B₁ 经肠道菌群的代谢快速,在 6 h 时消耗殆尽;代谢产物儿茶素和 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯在 2~4 h 间大量产生;苯丙酸和苯甲酸等为主的代谢产物,在 6 h 达到峰值,在 4~18 h 间持续产生。通过以上结果分析原花青素 B₁ 的代谢路径,原花青素 B₁ 可能通过 3 种路径代谢,分别是:经历黄烷键断裂,下部结构形成儿茶素,儿茶素进一步发生 C 环开环,形成儿茶素开环产物(DHP-OL);原花青素 B₁ 下部结构单元经历 A 环裂解,形成苯基- γ -戊内酯;原花青素 B₁ 上部结构单元裂解直接形成酚酸类化合物。

关键词 原花青素 B₁; 猪盲肠微生物; 代谢路径; 代谢组学

文章编号 1009-7848(2022)09-0013-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.09.002

原花青素 B₁ 是膳食多酚黄烷-3-醇类化合物二聚体的典型代表(结构见图 1),黄烷-3-醇类化合物基本组成单位的分子骨架是 C6-C3-C6,即在两个芳香环(A 环、B 环)之间以 1 个三碳链的吡喃环(C 环)相连,形成最基本的黄烷-3-醇单体,再以此聚合形成黄烷-3-醇聚合物(即原花青素,包括二聚体、三聚体直至高聚体等)。原花青素分为 A 型原花青素和 B 型原花青素,B 型原花青素是基本结构单元之间通过 C4-C8 键或 C4-C6 键连接而成,而 A 型原花青素在 C2-C7,C2-C5 之间形成醚键^[1]。黄烷-3-醇类化合物分布广泛,水果及其制品、豆类、坚果、谷物、中草药等都是黄烷-3-醇类化合物的重要来源^[1-2]。许多国内外研究都证明黄烷-3-醇类化合物在促进健康方面发挥着重

要作用,如:抗氧化、抗炎,预防心血管疾病、癌症以及衰老相关的代谢综合症^[3-4]。

自 1964 年,Griffiths 等^[5]首次提出黄烷-3-醇类化合物的某些代谢产物的形成依赖于肠道菌群的作用后,研究者就对黄烷-3-醇类化合物的肠道微生物转化产生了极大的兴趣。尽管对黄烷-3-醇类化合物的代谢机制和生物利用度的认识有了很大的进步,然而,不同结构黄烷-3-醇类化合物经肠道微生物代谢的特征还不明确。黄烷-3-醇类化合物的结构虽有一定的相似性,但代谢产物出现差异,比较两种均以表儿茶素(Epicatechin,简称为 EC)聚合形成的 B 型二聚体和 A 型二聚体的肠道微生物体外模型代谢时,发现两者都发生 C4-C8 间黄烷键的早期断裂和 C 环的开环,且均存在不同的代谢产物,在 A 型二聚体的代谢产物中检测到一种未知的代谢产物及更多的低分子量酚酸,而在 B 型二聚体中未有类似的发现,这可能是由于这两种二聚体经历了不同的降解途径^[6-7]。此外,黄烷-3-醇类化合物低聚体间存在生理活性及作用机制的差异,荔枝核黄酮干预四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的研究发现,相比原花青素 B₄,原

收稿日期: 2021-09-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272331);中央高校基本科研业务费专项资金项目(2662019PY034)

作者简介: 刘若男(1995—),女,硕士

通信作者: 宋哲 E-mail: 43611243@qq.com

刘睿 E-mail: liurui@mail.hzau.edu.cn

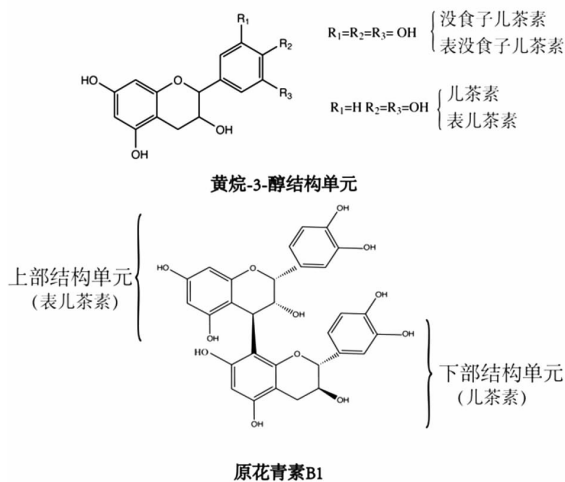


图1 黄烷-3-醇的结构单元和原花青素 B₁ 的结构

Fig.1 The structure of flavan-3-ols unit and procyanidin B₁

花青素 A₂ 是更为重要的 Q-maker(中药质量标志物)^[8]。而原花青素 B₁ 在细胞炎症^[9-10]和激活交感神经活动^[11]等方面具有重要意义。Nakagawa 等^[12]发现 EC 以及由 EC 构成的 B 型二聚体(原花青素 B₂)、B 型三聚体(原花青素 C₁)、B 型四聚体([EC(4 β ->8)]₃-EC) 等分别通过不同的作用机制改善小鼠能量消耗,如:二聚体和四聚体显著提高了血浆去甲肾上腺素,而三聚体在血浆儿茶酚胺水平和棕色脂肪组织解偶联蛋白的表达等方面有显著的改善效果。这些可能与上述黄烷-3-醇类化合物的代谢途径和代谢特征密切相关。确定原花青素 B₁ 的肠道微生物代谢途径与代谢产物,对于探究其生理活性意义重大。

现有黄烷-3-醇类化合物肠道微生物代谢机制的研究大都以其单体(儿茶素、表儿茶素等)展开,黄烷-3-醇单体经肠道微生物群介导的生物转化后,产生 5-碳环裂变代谢产物,如:5-(羟基苯基)- γ -戊内酯和 5-(羟基苯基)- γ -戊酸,进而可降解为几种酚酸,即苯丙酸、苯乙酸、苯甲酸和马尿酸^[13-14]。对于不同聚合度的二聚体、三聚体以及 A 型结构和 B 型结构的黄烷-3-醇类化合物的代谢与转化机制鲜有报道。目前对于特定结构黄烷-3-醇类化合物代谢产物的研究主要有原花青素 A₂^[15]、表没食子儿茶素没食子酸酯构成的 A 型二聚体^[7]、表儿茶素构成的三聚体(EC-(2 β ->7, 4 β ->8)-EC-(4 β ->8)-EC)^[15]、原花青素 B₂^[16],然

而,这些研究均未完全明确代谢路径。

体外模型是探究黄烷-3-醇类化合物代谢机制的有效方法,这种方法容易进行,且母体化合物不受体内吸收和代谢的影响,代谢物以相对高的浓度存在^[17]。现有的体外模拟研究主要以大鼠粪便、人类粪便展开,然而,Almeida 等^[18]的研究证实盲肠菌群与粪便微生物群有很大不同,即使采用人类粪便标本也不能准确反映黄烷-3-醇类化合物在体内经盲肠微生物的代谢与转化情况。有研究进而提出猪盲肠模型,这是因为猪相对于其它非灵长类哺乳动物而言,与人类更加相近,消化解剖学、生理和营养上都存在相似之处,而且与结肠接近的一端盲肠被认为对摄入的食物具有最高的发酵速率^[19]。也有研究采用 16S rRNA 寡核苷酸探针荧光原位杂交,证实猪盲肠的微生物群特征对人体肠道微生物代谢研究的适用性^[20]。猪盲肠模型不失为研究食品成分的肠道微生物群代谢的较理想的工具。

本研究目的是尝试解析原花青素 B₁ 的代谢路径。主要以猪盲肠微生物体外孵育为研究模型开展,采用 TOF-MS/MS 检测不同时间点的代谢产物,借助代谢组学分析方法,根据鉴定与筛选到的代谢产物,明确原花青素 B₁ 可能的代谢路径。为揭示结构更复杂的黄烷-3-醇类膳食多酚的体内代谢及调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原花青素 B₁(HPLC 纯度 98%),源叶生物科技有限公司;刃天青,上海伊卡生物公司;L-半胱氨酸,德国 Biofrox 公司;甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯),美国 Thermo Scientific 公司;盐酸、乙酸乙酯,上海沪试化工有限公司;配置厌氧培养基的化学试剂,均来自上海沪试化工有限公司。

1.2 仪器与设备

Triple TOF 5600 高分辨飞行时间质谱仪,加拿大 AB Sciex 公司;ULTIMATE 300 超高效液相色谱仪,美国 Thermo Scitific 公司;855-AC 厌氧操作台,美国 PLAS LABS 公司;LC-DCY-12G 干式氮吹仪,上海立辰科技有限公司;BXM-30R 高压灭菌锅,上海博讯公司。

1.3 方法

1.3.1 猪盲肠微生物的获取 从新鲜屠宰的猪中获得所需的盲肠末端内容物。猪年龄 10~12 个月,屠宰过程中取得整个肠组织,立即放入厌氧袋,并迅速带回实验室,在厌氧操作台中解剖盲肠,取得盲肠末端内容物,分装于无菌离心管中,并在厌氧条件下称重、标记。最后在离心管中加入 50% 甘油、密封、保存于 -80 °C 条件下。

1.3.2 厌氧培养基的制备 培养基的配置参考 Ou 等^[21]的方法,并进行了改良。

配置厌氧基础培养基(g/L): NaHCO₃ 9.240、Na₂HPO₄·2H₂O 3.542、NaCl 0.470、KCl 0.450、Na₂SO₄·10H₂O 0.227、CaCl₂ 0.055、MgCl₂·6 H₂O 0.100、尿素 0.400。

配置微量元素溶液 (mg/L): FeSO₄·7H₂O 3 680、MnSO₄·H₂O 1 159、ZnSO₄·7H₂O、CoCl₂·6H₂O 120、CuSO₄·5H₂O 98、(NH₄)₆MO₂₄·4H₂O 17.4。

每升基础培养基分别加入 10 mL 的微量元素溶液、0.5 mL 0.1% 的 C₁₂H₁₇NO₄(刃天青,厌氧指示剂)、0.5 g L-半胱氨酸(还原剂),最后使用 6 mol/L 盐酸调 pH 值至 6.0~6.5。

将培养基放在连续氮气气流下吹若干小时,以便排除培养基中的气泡,直至厌氧指示剂变为无色,然后进行高压灭菌(121 °C、20 min)。

1.3.3 原花青素 B₁ 与猪盲肠微生物共孵育培养

取出预先保存好的猪盲肠内容物,将其放在 37 °C 培养箱中复苏。

以下所有操作均在厌氧操作台中进行,并且所有使用的工具均进行了高压灭菌处理。

根据盲肠内容物的质量,用 1.3.2 节的厌氧培养基制备菌悬液,使菌悬液浓度为 10 g/100 mL 厌氧培养基,摇匀菌悬液,依次用 1 层纱布和 4 层纱布进行过滤。将过滤的菌悬液分成 3 份,其中 1 份进行高压灭菌处理(121 °C、20 min)。

孵育过程设置 3 个分组,具体如下:1) B₁ 组:原花青素 B₁ 样品以 0.25 mmol/L 的浓度加入未灭菌的菌悬液中,混合均匀,分装于小培养皿中,制备 2 mL 的厌氧孵育培养基;2) 灭菌组:原花青素 B₁ 样品以 0.25 mmol/L 的浓度加入已灭菌的菌悬液中,混匀并制备 2 mL 孵育培养基;3) 空白组:只含有未灭菌的菌液,混匀并制备 2 mL 培养基。

拟定孵育过程中的 6 个时间点(0, 2, 4, 6, 10, 18 h),每种处理与每个时间点设置 6 个平行,将所有培养基放入厌氧培养箱,在 37 °C 下进行培养。

1.3.4 发酵液样品的处理 样品的处理方法参考 Ou 等^[21]和 Stoupi 等^[22]拟定孵育过程中的 6 个时间点(0, 2, 4, 6, 10, 18 h),将每个时间点的平行样品取出立即处理。使用 6 mol/L 的盐酸调节发酵液的 pH 值,为停止微生物反应使 pH 值接近 1,加入等量乙酸乙酯萃取,进行 3 次萃取并收集上清,氮气吹干上清液,密封保存(-20 °C),

1.3.5 孵育液代谢产物的分析 进行孵育液代谢产物的分析前,取出被氮气流吹干的样品,加入 2 mL 70% 甲醇复溶,过 0.45 μm 有机滤膜,然后进行 UHPLC-TOF-MS/MS 分析,分析方法参考 Chen 等^[23]液质条件如下:

TOF-MS/MS 分析条件:使用电喷雾电离模式(ESI-),离子喷射电压为 -4 500 mV, -60 V 电压,毛细管温度为 550 °C,鞘气流速为 55 Arb,辅助气流速为 35 Arb,全扫描 TOF MS 模式中滞留时间为 250 ms,MS/MS 模式下滞留时间为 70 ms,扫描质量范围(*m/z*)为 100~1 500。

液相分析条件:采用 Thermo Hypersil GOLD C18 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱,柱温 30 °C。A 相为 0.2% 甲酸水溶液,B 相为色谱纯乙腈,分析采用梯度洗脱。具体的洗脱条件如下:0 min, 5% B、3 min, 5% B、10 min: 30% B、25 min, 40% B、26 min, 5% B;流速 0.3 mL/min;进样量为 2 μL。

1.3.6 数据分析 非靶向代谢组学分析代谢产物:使用 Progenesis QI 软件(Waters, 美国)对 UHPLC-TOF-MS/MS 原始数据进行峰提取、峰对齐、归一化等处理。

使用 Ezinfo 进行采用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和变量重要性投影分析(VIP)来筛选各组间具有显著差异的代谢物。对所有数据进行帕累托标度后进行 PCA 分析,考察无监督模式下各组差异。进而分别选取每个时间点 B₁ 组/灭菌组、B₁ 组/空白组进行 OPLS-DA 分析筛选组间差异代谢产物,筛选条件为:选择协方差 $|p(1)| > 0.05$ 、最小 OPLS-DA 载荷系数 $|p_{corr}(1)| > 0.5$ 、VIP > 1.5,同时 $P < 0.05$ (双因素方差分析)。将各个时间点的差异性代谢产物合并,

使用人类代谢组数据库 (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>)及相关文献报道对其进行解谱。

2 结果与分析

2.1 原花青素 B₁ 与猪盲肠微生物孵育后的代谢组学研究

首先,采用主成分分析法(PCA)进行代谢组学研究,该模型的第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)占个体变异的 45.9%。结果显示灭菌组与空白组和 B₁ 组形成显著的差异(见图 2)。灭菌组几乎不随孵育过程发生明显变化,而空白组和 B₁ 组随孵育时间的增加,孵育样品中代谢产物也在不断地发生变化,PCA 得分图显示了各个时间点的样品具有良好的聚类。

为了进一步说明原花青素 B₁ 的代谢与肠道菌群的关系,将微生物作为因变量,计算 PCA 图中灭菌组和 B₁ 组的欧氏距离(图 3),B₁ 组由于微生物的代谢作用持续发生变化,灭菌组在 0~18 h 变化不显著,两组样品的代谢产物之间的差异在 2 h 时表现差异($P<0.01$),并且在 6 h 时这种差异达到最大。经过猪盲肠菌群孵育后,原花青素 B₁ 代谢组学产生的显著变化是因微生物的作用而引起的。

为了筛选原花青素 B₁ 产生的主要差异代谢产物,我们采用监督多变量统计分析 OPLS-DA 对各个时间段各组间代谢物进行筛选,从 6 个时间点中分别筛选出 64,88,88,83,70,100 个差异性成分,合并后共有 205 个。

2.2 原花青素 B₁ 的差异代谢产物鉴定

基于 HMDB 数据库和相关文献报道,对 OPLS-DA 和 VIP 筛选得到的所有代谢物进行解析,共解析出 21 种差异代谢物,结果见表 1。

这些化合物在孵育 18 h 期间的动态变化在热图(图 5)中显示,颜色深浅反映了这些代谢物的标准化丰度变化,该丰度由质谱峰进行 log₂ 转化后的平均丰度值计算得到。

上述解谱所得到的代谢产物主要分为 3 类。

第一类是具有完整 C₆-C₃-C₆ 分子骨架的代谢产物,主要包括儿茶素和原花青素 B₁ 及其衍生代谢产物,这一部分的鉴定主要依赖于原花青素 B₁ 的特征碎片: m/z 577.1242 [M-H]⁻、 m/z 451.0929

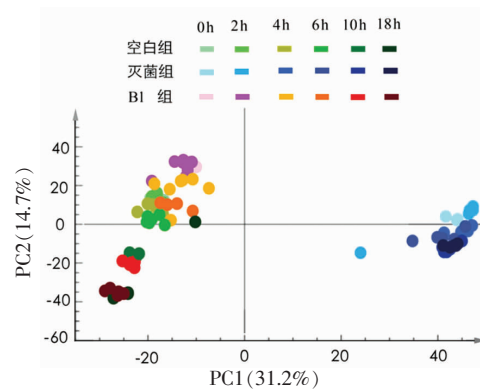
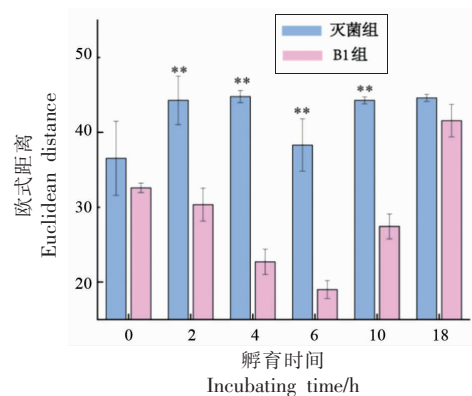


图 2 原花青素 B₁ 在猪盲肠微生物培养中的代谢组学变化 ($n=6$)

Fig.2 Metabolomics changes of procyanidin B₁ incubation with pig cecum microbiota ($n=6$)



注:**表示在 $P<0.01$ 的水平下差异显著。

图 3 PCA 图中灭菌组和 B₁ 组的欧氏距离

Fig.3 The Euclidean distance of the sterilized group and the B₁ group in PCA diagram

[经历杂环裂解途径后(HRF heterocyclic ring fission)形成]、 m/z 425.0855 [由 RDA (Retro Diels-Alder reaction) 途径形成]、 m/z 407.0750 [经历 RDA 途径,并脱去一分子 H₂O 形成]、 m/z 289.0739[C₁₅H₁₃O₆]⁻[24-25]。具体有 6 种:儿茶素(Catechin)、原花青素 B₁(Procyanidin B₁)、原花青素 B₁ 水合物(Procyanidin B₁·2H₂O)、原花青素 B₁·二硫酸盐(Procyanidin B₁·2 sulfate)、二水合-3'/4'-甲氧基-原花青素 B₁-硫酸盐(3'/4'-O-methyl procyanidin B₁ sulfate·H₂O)、二水合-3'/4'-甲氧基原花青素 B₁ (3'/4'-O-methyl procyanidin B₁·2H₂O)。大多数原花青素 B₁ 都经过了水合化、甲基化和硫酸盐化的作用。原花青素易发生的这类衍生化,在原花青素 B₂ 的代谢研究中也类似的发

表 1 原花青素 B₁ 代谢组学分析中鉴定的代谢产物的 MS 信息

Table 1 The MS information of reference metabolites in the metabolomics analysis of procyanidin B₁

编号	保留时间/min	m/z	化合物	分子式	离子碎片
1	2.62	117.0555	4-羟基异戊酸	C ₅ H ₁₀ O ₃	102.0244, 87.0451
2	3.44	738.1360(n)	原花青素 B ₁ ·二硫酸盐	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₈ S ₂	603.1430, 577.1323, 451.1053, 433.0856, 289.0845
3	3.80	628.1409(n)	二水合-3'/4'-甲氧基原花青素 B ₁	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₄	609.1231, 591.1066, 439.0712, 421.0450, 289.0709
4	3.88	137.0242	4-羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	108.0221, 93.0345,
5	3.93	109.0290	邻苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	91.0192, 65.0060
6	3.99	613.1097	原花青素 B ₁ 水合物	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₄	577.1242, 425.0855, 407.0739, 289.0653
7	4.00	577.1338	原花青素 B ₁	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	425.0849, 407.0797, 289.0734
8	4.16	137.0241	3-羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	93.0335, 95.0492, 108.0217
9	5.06	289.0712	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	245.0842, 151.0402, 125.0234
10	5.88	181.0698	3,4-二羟基苯甲酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	137.0591, 109.0283, 59,0138
11	6.23	165.0189	3,4-二羟基扁桃酸	C ₈ H ₈ O ₅	108.0216, 92.0267, 77.0412
12	6.49	121.0291	苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₂	92.0252, 120.0207
13	7.24	207.0661	5-(3',4'-二羟基苯基)-γ-戊内酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	163.0786, 122.0369, 118.9939
14	7.58	707.1973	二水合-3'/4'-甲氧基-原花青素 B ₁ -硫酸盐	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₇ S	689.1871, 633.1612, 481.1117, 289.0739, 181.0512
15	8.59	151.0397	3-甲氧基苯甲酸	C ₈ H ₈ O ₃	136.0166, 122.0373, 107.0505
16	9.40	291.0870	1-(3',4'-二羟基苯基)-3-(2'',4'',6''-二羟基苯基)-2-丙醇	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	247.0957, 205.0815, 167.0358, 135.0439
17	10.74	179.0348	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	152.0400, 135.0451, 90.9966
18	11.62	193.0505	异阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.0296, 149.0587, 134.0358
19	12.55	165.0556	3-羟基苯甲酸	C ₉ H ₁₀ O ₃	121.0658, 106.0424, 119.0502
20	14.14	209.0817	4-羟基-5-(4'-羟基苯基)-戊酸	C ₁₁ H ₁₃ O ₅	191.0727, 147.0827, 135.0454
21	17.54	149.0604	3-苯甲酸	C ₉ H ₁₀ O ₂	121.0295, 92.0267, 77.0396

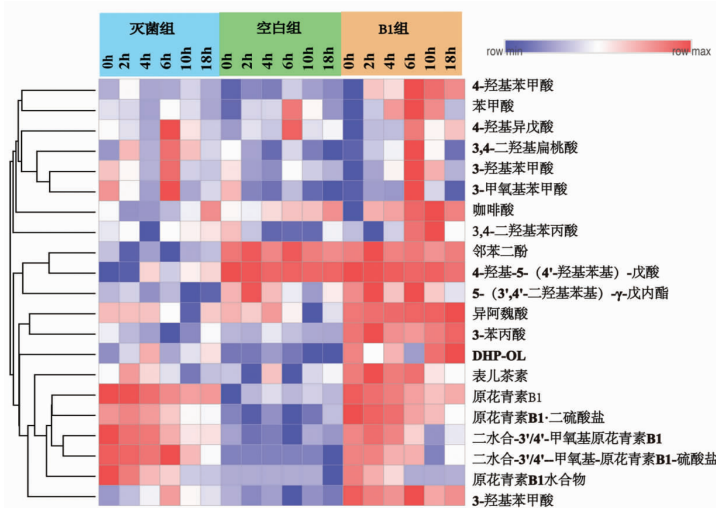


图 4 原花青素 B₁ 与猪盲肠菌群孵育过程中主要差异代谢物的变化

Fig.4 Changes of major difference metabolites that procyanidin B₁ incubation with pig cecum microflora

现^[25]。这几种代谢产物在 B₁ 组和灭菌组中均有出现。这表明可能不是微生物的作用导致了这一变化,可能是与培养基的相互作用自发形成的。在 60 °C 的水溶液中,(-)-表儿茶素、(-)-儿茶素、原花青素 B₂ 等都自发地发生了异构和聚合等化学变化^[26]。

第二类是基本骨架中 C 环开环的代谢产物,这类化合物是黄烷-3-醇类化合物代谢途径中的关键步骤,在本研究中仅发现了 1 种,即 1-(3',4'-二羟基苯基)-3-(2'',4'',6''-二羟苯基)-2-丙醇(1-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-3-(2'',4'',6''-dihydroxyphenyl)-2-propan-ol 简称为 DHP-OL), *m/z* 为:291.0870 [C₁₅H₁₅O₆]⁻。

第三类代谢产物完全失去了 C6-C3-C6 分子骨架,它们主要是通过离子碎片和 HMDB 比对完成鉴定工作,这类化合物共有 14 种:5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯(5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone)、4-羟基-5-(4'-羟基苯基)-戊酸(4-(Hydroxyphenyl)-5-(4'-Hydroxy)valeric acid)、苯甲酸(Benzoic acid)、3-羟基苯甲酸(3-Hydroxybenzoic acid)、4-羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoic acid)、邻苯二酚(Pyrocatechol)、4-羟基异戊酸(4-Hydroxyisovaleric acid)、3,4-二羟基扁桃酸(3,4-Dihydroxymandelic acid)、异阿魏酸(Isoferulic acid)、3-苯丙酸(3-Phenylpropionic acid)、咖啡酸(Caffeic acid)、3-甲氧基苯甲酸(3-Methoxybenzoic acid)、3-羟基苯丙酸(3-Hydroxyphenylpropanoic acid)、3,4-二羟基苯丙酸(3,4-Hydroxyphenylpropanoic acid)。其中苯基戊内酯、苯甲酸、3-羟基苯甲酸也被鉴定为原花青素二聚体的主要代谢产物^[27-29]。热图(图 4)中差异性酚酸代谢产物主要是苯甲酸、4-羟基苯甲酸、3-羟基苯丙酸、3-苯丙酸和异阿魏酸等。

2.3 主要代谢产物的动态变化

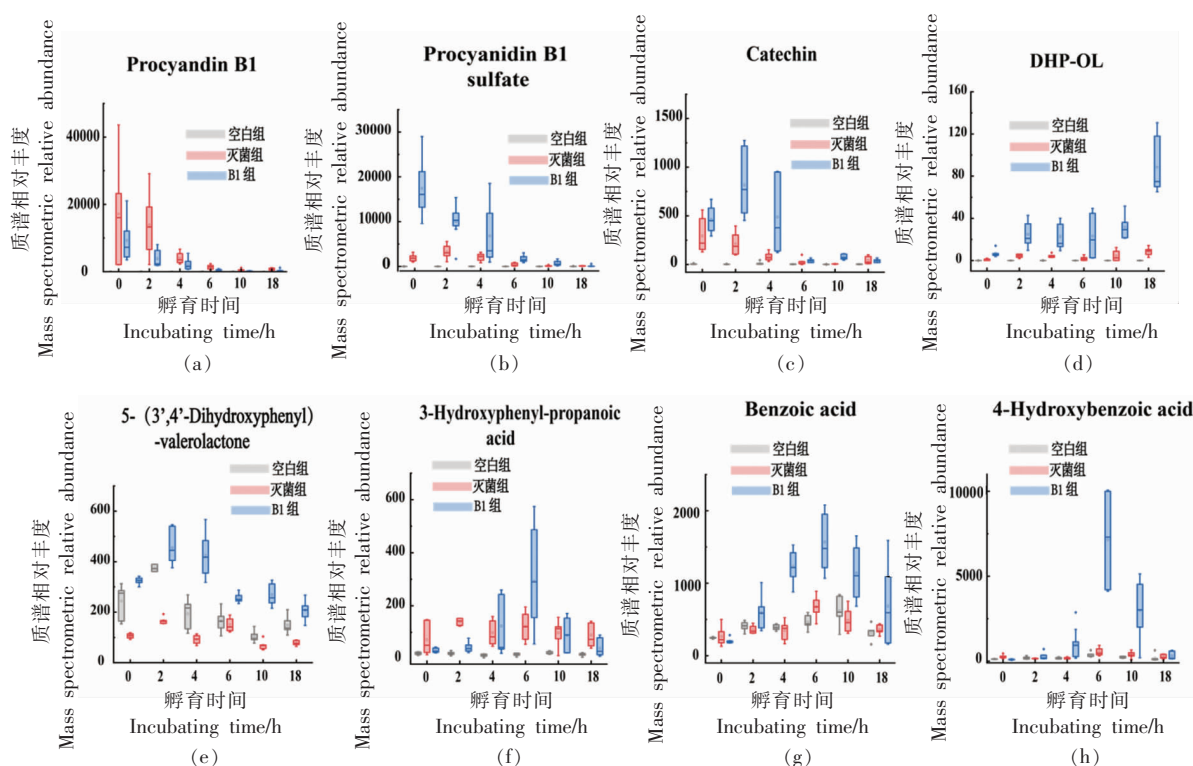
主要代谢产物的动态变化见图 5。

原花青素 B₁ 的含量随孵育时间的延长,丰度逐渐降低,在 2 h 时 50% 的原花青素 B₁ 消失,在 6 h 时基本消耗殆尽,这一代谢过程速度相当快。同样地,在 Van't 等^[30]的研究中也有类似的发现,他们也使用了猪盲肠微生物体外代谢模型,研究显示 2 h 内 62% 的原花青素 B₅ 被分解,之后降解率

降低,但是仍然几乎在 4 h 内完全消失;而原花青素 B₂ 也是在 4 h 内几乎完全降解。原花青素 A₂ 与猪盲肠微生物群孵育 6 h 后,约 80% 的原花青素 A₂ 消失^[15],这些都表明黄烷-3-醇二聚体能被肠道微生物以较高的速率进行代谢。但是在 0 h 时,B₁ 组和灭菌组的母体化合物丰度差异较大,这一现象可能与原花青素 B₁ 形成硫酸盐有关,0 h 时,B₁ 组形成硫酸盐衍生物的比例高于灭菌组,可能是未高压灭菌的培养基更容易发生与硫酸盐的结合。原花青素 B₁ 与其硫酸盐衍生物的丰度之和在 0 h 是趋于相等。我们的研究中整个孵育过程中灭菌组的母体化合物也同样在逐渐降低,这一现象同样在原花青素 B₂ 肠道菌群孵育中出现,VAN'T SLOT^[31]的研究发现在灭菌的菌悬液中孵育原花青素二聚体 8 h 后,接近 50% 二聚体消失,却未形成任何代谢产物,研究者将这种现象解释为原花青素 B₂ 与培养基中蛋白质的结合。原花青素二聚体、三聚体等低聚物的生物利用度因其与蛋白的相互作用受到影响^[32]。

虽然 B 型原花青素的肠道微生物机制未被明确,但是其与肠道微生物共孵育过程中黄烷键断裂形成黄烷-3-醇单体一直被认为是其微生物代谢的代表路径之一,本研究中发现了儿茶素的产生,但是对于 B₁ 的初始丰度来说,相当于仅有 4% 左右的 B₁ 通过形成单体儿茶素的途径发生了代谢。此前就有报道指出,原花青素 B₂ 与人类粪便菌群孵育过程中只有不到 10% 的 B₂ 通过断裂黄烷键这一途径代谢^[33]。本研究中表儿茶素在 2~4 h 之间丰度最高,4 h 之后基本消失。事实上,Aura 等^[34]发现单体黄烷-3-醇的代谢速度很快,1 μ mol 黄烷-3-醇单体在 10 mL 5% 的粪便悬浮液发酵体系中 2 h 内就可以完全代谢。在我们的研究中发现,在 0 h 时灭菌组也出现了儿茶素,这可能是由于自然降解或者孵育基质引起的化学降解。Van't 等^[31]在没食子儿茶素没食子酸酯的灭菌组中也检测到少量没食子酸和没食子酸儿茶素,孵育基质的复杂性使我们不得不考虑到这种可能性。

DHP-OL 和 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯也被检出,它们也是原花青素经过体内微生物代谢过程中的关键性产物。DHP-OL 在 18 h 时达到峰值,5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯在 2 h

图 5 猪盲肠微生物降解过程中构成中原花青素 B₁ 主要代谢Fig.5 Changes in main metabolites of procyanidin B₁ produced by pig ceum microbial degradation

时达到峰值,由此可见 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯不一定只能经历 C 环开环途径后形成,更容易由原花青素结构单元直接裂解形成,并且这一过程非常迅速。Serra 等^[29]在一项儿茶素的体外发酵研究中,发现在孵育 24 h 后仍然有儿茶素开环产物存在,在孵育 48 h 后仍然有 5-(3',4'-二羟基苯基)-戊内酯存在,由此他们认为形成儿茶素开环产物的途径与形成 5-(3',4'-二羟基苯基)-戊内酯的途径是两个平行但不独立的代谢途径,可以同时产生,儿茶素开环产物和儿茶素都可以直接形成 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯。本研究中苯基戊内酯的转化率仅有 1.5%,已有研究表明儿茶素和表儿茶素转化为羟基苯基戊内酯的转化率最高可以达到 22%,而原花青素低聚体的转化非常有限,仅为单体转化率的 1/10^[35]。在空白组中从 0 h 开始,整个孵育过程中都有少量的 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯出现,这可能与猪盲肠样品中残留的纤维发酵有关^[29]。

3-羟基苯丙酸、苯甲酸和 4-羟基苯甲酸产生峰值的时间大约是 6 h。3-羟基苯丙酸的出现时间

主要在 4~10 h;苯甲酸和 4-羟基苯甲酸主要出现在 4~18 h,含量高于 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯,说明苯甲酸和 4-羟基苯甲酸的形不成不依赖于 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯和 4-羟基-5-(4'-羟基苯基)-戊酸等上游代谢产物。Stoupi 等^[22]在研究中发现基于原花青素 B₂ 上部结构单元 A 环裂解或 C 环裂解形成了 5-(2',4'-二羟基)苯基-2-烯戊酸、5-(3',4'-二羟基苯基)戊酸、3-羟基苯丙酸和苯乙酸,因此原花青素二聚体上部结构单元可以直接裂解形成酚酸,本研究中苯甲酸和 4-羟基苯甲酸的大量形成可能是基于原花青素 B₁ 上部结构单元的裂解。

2.4 原花青素 B₁ 的肠道微生物路径

根据原花青素 B₁ 非靶向代谢组学分析,推测原花青素 B₁ 的代谢路径见图 6。

早期代谢路径 1: 原花青素 B₁ 首先经历黄烷键断裂,下部结构形成儿茶素,儿茶素进一步发生 C 环开环,形成开环产物(DHP-OL),进一步代谢为 5-(3',4'-二羟基-苯基)- γ -戊内酯。

早期代谢路径 2: 原花青素 B₁ 下部结构单元

经历 A 环裂解形成苯基戊内酯。路径 1 和路径 2 可以同时进行。

早期代谢路径 3: 本研究中可能存在原花青素 B₁ 上部结构单元裂解直接形成酚酸类化合物的路径, 这可能是导致酚酸类化合物在原花青素 B₁ 代谢产物占主导的原因。

晚期代谢路径: 主要是 5-(3',4'-二羟基-苯基)- γ -戊内酯继续代谢为 4-羟基-5-(4'-羟基苯基)-戊酸。其次, 晚期代谢路径中 α -氧化、 β -氧化引起的侧链缩短和脱羟基作用也很重要, 使苯基戊酸进一步转化为 3,4-二羟基苯丙酸、3-羟基苯丙酸、4-羟基苯甲酸和苯甲酸等。

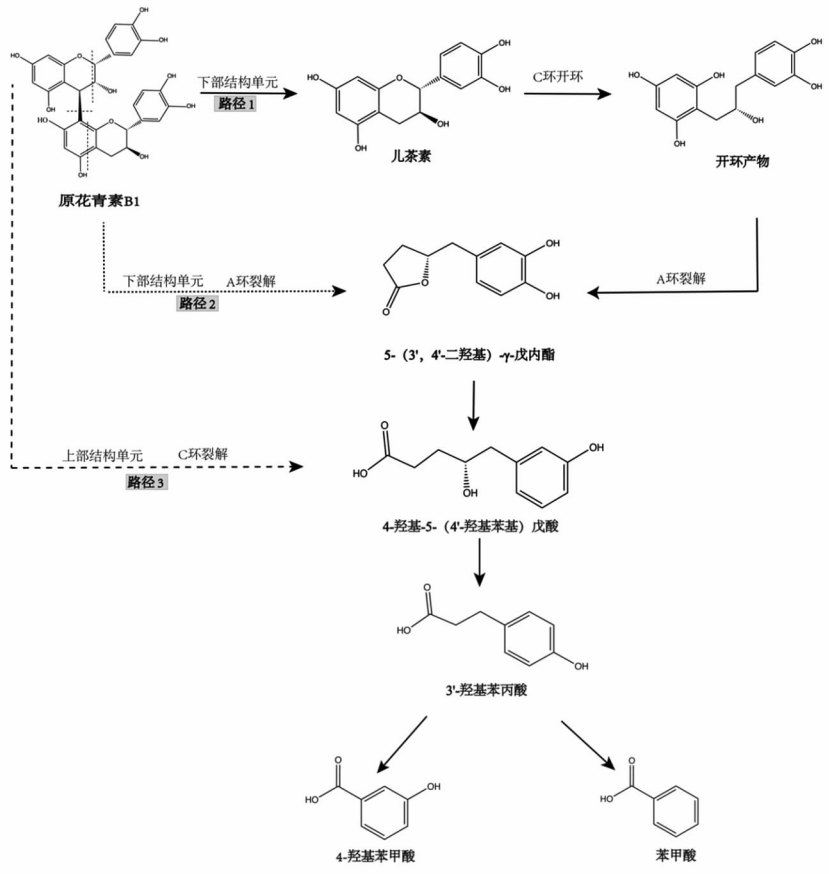


图 6 原花青素 B₁ 的代谢途径

Fig.6 The metabolic pathway of procyanidin B₁

3 结论

通过代谢组学的分析方法, 在猪盲肠微生物体外代谢研究中筛选和鉴定到 21 种与原花青素 B₁ 直接相关的代谢产物, 这些代谢产物的动态变化显示: 原花青素 B₁ 经过肠道菌群的代谢相当快速, 基本在 6 h 时消耗殆尽; 相应地, 代谢产物儿茶素和 5-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯在 2~4 h 之间大量产生, 此外, 苯丙酸和苯甲酸等在 6 h 达到峰值, 在 4~18 h 之间持续产生。对原花青素 B₁ 的代谢路径的解析表明: 原花青素 B₁ 可能通过 3 种路径进行代谢, 分别是: 经历黄烷键断裂, 下部结构形成儿茶素, 儿茶素进一步发生 C 环开环,

形成儿茶素开环产物; 原花青素 B₁ 下部结构单元经历 A 环裂解形成苯基- γ -戊内酯; 原花青素 B₁ 上部结构单元裂解直接形成酚酸类化合物。本研究可为揭示结构更复杂的黄烷-3-醇类膳食多酚的体内代谢以及对体内各种代谢综合征的调控提供代谢方面的理论依据。

致谢:

武汉中粮肉食品有限公司以及陈鹏老师和其同事在论文写作过程中给予了非常大的帮助, 在此, 表示由衷的感谢。

参 考 文 献

- [1] GU L, KELM M A, HAMMERSTONE J F, et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption[J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(3): 613–617.
- [2] WANG Y, CHUNG S J, SONG W O, et al. Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the US diet[J]. *The Journal of Nutrition*, 2011, 141(3): 447–452.
- [3] NAWROT -HADZIK I, MATKOWSKI A, KUBASIEWICZ -ROSS P, et al. Proanthocyanidins and flavan-3-ols in the prevention and treatment of periodontitis -immunomodulatory effects, animal and clinical studies[J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 239.
- [4] KIM M Y, KIM H J, LEE Y Y, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin extracts of various cultivars in oxidative - damaged HepG2 cells and LPS - induced raw 264.7 macrophages[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 9(2): 973–984.
- [5] GRIFFITHS L J B J. Studies on flavonoid metabolism. Identification of the metabolites of (+)-catechin in rat urine[J]. *Biochemical Journal*, 1964, 92(1): 173–179.
- [6] GE Z Z, DONG X Q, ZHU W, et al. Metabolites and changes in antioxidant activity of A-type and B-type proanthocyanidin dimers after incubation with rat intestinal microbiota[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, 63(41): 8991–8998.
- [7] LI J, ZENG J, PENG J, et al. Simultaneous determination of the pharmacokinetics of A-type EGCG and ECG dimers in mice plasma and its metabolites by UPLC-QTOF-MS[J]. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2020, 71(2): 211–220.
- [8] 冯茵怡, 严炯艺, 夏星, 等. 荔枝核总黄酮对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在 Q-marker 的预测[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(23): 152–161.
- FENG Y Y, YAN J Y, XIA X, et al. Effect and mechanism of total flavonoids of Lichi Semen on CCl₄-induced liver fibrosis in rats, and prediction of Q-marker[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(23): 152–161.
- [9] 张宸豪, 李瑶, 李正祎, 等. 原花青素 B₁ 对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 损伤的保护作用及其机制[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2019, 45(6): 1243–1247.
- ZHANG C H, LI Y, LI Z Y, et al. Protective effect of procyanidine B₁ on LPS-induced injury of mouse macrophages RAW264.7 and its mechanism[J]. *Journal of Jilin University(Medicine Edition)*, 2019, 45(6): 1243–1247.
- [10] 王青, 宋丽娟, 李艳花, 等. 原花青素 B₁ 与 B₂ 抑制脂多糖诱导的 BV-2 细胞炎症反应作用的比较[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(8): 1486–1490.
- WANG Q, SONG L J, LI Y H, et al. Inhibitory effect of proanthocyanidins B₁ and B₂ on inflammation of BV-2 cells induced by lipopolysaccharide[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2018, 34(8): 1486–1490.
- [11] FUSHIMI T, KOIZUMI R, SATO Y, et al. B-type procyanidins affect on blood flow and NO production through the sympathetic nervous system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 159(1): S90–S91.
- [12] NAKAGAWA Y, ISHIMURA K, OYA S, et al. Comparison of the sympathetic stimulatory abilities of B-type procyanidins based on induction of uncoupling protein-1 in brown adipose tissue (BAT) and increased plasma catecholamine (CA) in mice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201203.
- [13] SERRA, A, MACIA A, ROMERO M P, et al. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(2): 383–393.
- [14] GU L, HOUSE S E, ROONEY L, et al. Sorghum bran in the diet dose dependently increased the excretion of catechins and microbial-derived phenolic acids in female rats[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55(13): 5326–5334.
- [15] ENGEMANN A, HUBNER F, RZEPPA S, et al. Intestinal metabolism of two A-type procyanidins using the pig cecum model: detailed structure elucidation of unknown catabolites with Fourier transform mass spectrometry (FTMS)[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(3): 749–757.
- [16] XIAO Y, HU Z, YIN Z, et al. Profiling and distribution of metabolites of procyanidin B₂ in mice by UPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS(n) technique[J]. *Front*

- Pharmacol, 2017, 8: 231.
- [17] SÁNCHEZ-PATÁN F, CUEVA C, MONAGAS M, et al. *In vitro* fermentation of a red wine extract by human gut microbiota: changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(9): 2136-2147.
- [18] ALMEIDA A, MITCHELL A L, BOLAND M, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota[J]. Nature, 2019, 568(7753): 499-504.
- [19] JENSEN B B, JRGENSEN H. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 1897.
- [20] HEIN E M, ROSE K, VANT SLOT G, et al. Deconjugation and degradation of flavonol glycosides by pig cecal microbiota characterized by Fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(6): 2281.
- [21] OU K, SARNOSKI P, SCHNEIDER K R, et al. Microbial catabolism of procyanidins by human gut microbiota[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2014, 58(11): 2196-2205.
- [22] STOUPI S, WILLIAMSON G, DRYNAN J W, et al. A comparison of the *in vitro* biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B₂ by human faecal microbiota[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(6): 747-759.
- [23] CHEN W, ZHU X, LU Q, et al. C-ring cleavage metabolites of catechin and epicatechin enhanced antioxidant activities through intestinal microbiota[J]. Food Research International, 2020, 135: 109271.
- [24] STOUPI S, WILLIAMSON G, DRYNAN J W, et al. Procyanidin B₂ catabolism by human fecal microflora: partial characterization of 'dimeric' intermediates[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 501(1): 73-78.
- [25] 肖瀛, 尹志婷, 胡中志, 等. 原花青素 B₂ 代谢产物在小鼠体内组织的分布[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 168-173.
- XIAO Y, YIN Z T, HU Z Z, et al. Distribution of procyanidin B₂ metabolites in mice[J]. Food Science, 2017, 38(9): 168-173.
- [26] DE TAEYE C, KANKOLONGO CIBAKA M L, JERKOVIC V, et al. Degradation of (-)-epicatechin and procyanidin B₂ in aqueous and lipidic model systems. first evidence of "chemical" flavan-3-ol oligomers in processed cocoa[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(36): 9002-9016.
- [27] APPELDOORN M M, VINCKEN J P, AURA A M, et al. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone as the major metabolites[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(3): 1084-1092.
- [28] ZHAO H, JIANG Z, CHANG X, et al. 4-Hydroxyphenylacetic acid prevents acute APAP-induced liver injury by increasing phase II and antioxidant enzymes in mice [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 653.
- [29] SERRA A, MACIÀ A, ROMERO M P, et al. Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids [J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1127-1137.
- [30] VANT SLOT G, MATTERN W, RZEPPA S, et al. Complex flavonoids in cocoa: synthesis and degradation by intestinal microbiota[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(15): 8879-8886.
- [31] VANT SLOT G, HUMPF H U. Degradation and metabolism of catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and related compounds by the intestinal microbiota in the pig cecum model[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(17): 8041-8048.
- [32] DE FREITAS V, MATEUS N. Structural Features of procyanidin interactions with salivary proteins [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(2): 940-945.
- [33] STOUPI S, WILLIAMSON G, DRYNAN J W, et al. Procyanidin B₂ catabolism by human fecal microflora: partial characterization of 'dimeric' intermediates[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010, 501(1): 73-78.
- [34] AURA A M, MATTILA I, SEPPENEN-LAAKSO T, et al. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method[J]. Phytochemistry Letters, 2008, 1(1): 18-22.
- [35] HOLLANDS W J, PHILO M, PEREZ-MORAL N, et al. Monomeric flavanols are more efficient sub-

strates for gut microbiota conversion to hydroxyphenyl γ -valerolactone metabolites than oligomeric procyanidins: a randomized, placebo-

controlled human intervention trial[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(10): e1901135.

Studies on the Intestinal Microbial Metabolism of Procyanidin B₁ based on Metabonomics

Liu Ruonan^{1,2,3}, Chen Wanbing^{1,2,3}, Zhu Xiaoling⁴, Yang Hong¹, Song Zhe^{4*}, Liu Rui^{1,2,3*}

¹College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Environment Correlative Dietology (Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070

²Wuhan Engineering Research Center of Bee Products on Quality and Safety Control, Wuhan 430070

³Key Laboratory of Urban Agriculture in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070

⁴Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430073)

Abstract The intestinal microbial metabolism of procyanidin B₁ was explored by using porcine caecal microorganisms through static culture *in vitro*. Under anaerobic operating conditions, firstly, we obtained the intestinal microorganisms from the cecal lumen of freshly slaughtered pigs, which required for the incubation model, then incubated the procyanidin B₁ in prepared the culture medium, and collected the incubation solution at 0, 2, 4, 6, 10, 18 h. Use UHPLC-TOF-MS/MS to detect metabolites at different time points, and use non-targeted metabolomics analysis methods to determine differential metabolites in the metabolic process of procyanidin B₁, and analyze metabolic pathway of procyanidin B₁. Results showed: 21 kinds of metabolites were screened and identified. The metabolism of procyanidin B₁ by the intestinal flora was fairly rapid, and it was exhausted at 6 h; the metabolites catechins and 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone was produced in large quantities between 2-4 h; Phenylpropionic acid and benzoic acid were the main metabolites, which reach a peak at 6 h and continued producing between 4-18 h. Analyze the metabolic pathways of procyanidin B₁ based on the results above. We believed that procyanidin B₁ can be metabolized through three pathways, namely: the flavan bond breaks, the lower structure forms catechins, and the catechins further open the C ring to form catechins. C-ring-opening product; the lower structural unit of procyanidin B₁ undergoes cleavage of the A ring to form phenyl- γ -valerolactone; the cleavage of the upper structural unit of procyanidin B₁ directly forms phenolic acids.

Keywords procyanidin B₁; porcine caecal microorganisms; metabolic pathway; metabonomics