

· 综述 ·

氧化三甲胺与慢性疾病关系的研究进展及测定方法概述

李春欣, 朱光泽*

(长春中医药大学附属医院检验科, 长春 130021)

【摘要】 氧化三甲胺(TMAO)为肠道微生物代谢产物,是近年来被关注较多的缺血损伤标志物。随着对肠道菌群研究的不断深入,研究者发现 TMAO 与慢性疾病,尤其是心脑血管疾病、糖尿病、慢性肾脏病等的关系越来越密切。这些疾病通常潜伏期较长,临床症状不明显,病程常表现为不可逆,预后不良。因此,对这些慢性疾病早发现、早治疗尤为重要。本文简要总结了 TMAO 与上述慢性疾病的关系及现阶段测定 TMAO 的主要方法,以期为临床及早干预此类慢性疾病提供理论依据。

【关键词】 慢性病;氧化三甲胺;测定方法

【中图分类号】 R969.1

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.12.199

A review of the progress in relationship between trimethylamine oxide and chronic diseases and its determination

LI Chun-Xin, ZHU Guang-Ze*

(Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

【Abstract】 Trimethylamine oxide (TMAO), a metabolite of intestinal microorganisms, has been much focused on a marker of ischemic injury in recent years. With deepening research on the intestinal flora, researchers have found that TMAO is closely related to chronic diseases, especially cardiovascular and cerebrovascular diseases, diabetes, and chronic kidney disease. These diseases usually feature a long latent period, no obvious clinical symptoms, irreversible course, and poor prognosis. Therefore, early detection and treatment of these chronic diseases are particularly important. This article briefly summarizes the relationship between TMAO and the above chronic diseases and the main methods used to determine TMAO with a view of providing theoretical basis for early intervention of such chronic diseases.

【Key words】 chronic disease; trimethylamine oxide; determination method

This work was supported by Projects for Science and Technology Development Plan of Jilin Province (20170204034YY) and Projects for Science and Technology Plan of Changchun Municipality (18DY030).

Corresponding author: ZHU Guang-Ze, E-mail: zhuguangze820@126.com

氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)是一种易溶于水、甲醇、乙醇等溶剂的小分子胺。人体内 TMAO 主要是以卵磷脂、胆碱、肉碱等为原料,在肠道微生物菌群的作用下生成三甲胺(trimethylamine, TMA),TMA 经过门静脉流入肝脏,在肝脏中黄素单加氧酶的作用下活化成 TMAO^[1]。人体内 TMAO 含量较少,其血浆浓度主要与人们的饮食习惯、肠道菌群活性及关键性酶的活性有关。本文主要针对 TMAO 与几种常见慢性病的诊断及检测 TMAO 的主要方法进行综述,以期为临床研究提供理论参考。

1 TMAO 与慢性病的关系

1.1 TMAO 与心脑血管疾病

2011年,Wang等^[2]研究表明,TMAO在血浆中的浓度与人体动脉粥样硬化的形成及面积大小有关。研究者发现,与正常组比较,喂食 TMAO 20周后的小鼠主动脉根部出现动脉粥样硬化斑块,继续喂食 TMAO 以提高 TMAO 血浆浓度后,小鼠粥样硬化斑块面积也随之增加。Tang等^[3]历时3年的队列研究检测了4007名受试者,结果发现 TMAO 血浆浓度高的研究对象比 TMAO 血浆浓度低的研究

收稿日期:2019-04-20;接受日期:2019-08-30

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20170204034YY);长春市科技计划项目(18DY030)

通信作者:朱光泽, E-mail: zhuguangze820@126.com

对象动脉粥样硬化斑块发病率明显提高;冠状动脉造影结果显示,血浆 TMAO 浓度的升高与主要不良心血管事件(脑卒中和心肌梗死)风险增加有关。

进入 21 世纪以来,心力衰竭的发病率逐年升高,已经是心脑血管疾病的主要死因。心力衰竭是由慢性炎症及其代谢产物、胃肠道功能障碍、细菌失调等多种因素通过多种渠道共同引起的。一项研究把 104 例临床心力衰竭患者分成 TMAO < 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 TMAO $\geq 5 \mu\text{mol/L}$ 组,结果证实 TMAO 血浆浓度与 N 末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)呈正相关,与左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)呈负相关^[4]。另一项通过对 720 例稳定性心绞痛患者测定血浆 TMAO 浓度的研究发现,患者空腹 TMAO 浓度均在 5 $\mu\text{mol/L}$ 上下波动,且较高的血浆 TMAO 浓度预示患者长期死亡风险增加^[5]。考虑原因可能是血浆 TMAO 浓度增加改变了血管壁原有结构和功能,增加了血管壁的通透性,促进了血管的炎症发生,减弱了对扩血管物质(一氧化氮等)的敏感性,进而加快患者的心力衰竭发展进程。Ufnal 等^[6]通过动物实验研究证实,血浆 TMAO 浓度增加还可以提高体内血管紧张素 II 的缩血管效应,促进缩血管蛋白质的合成,延长血管紧张素 II 的升压效应。这说明高水平 TMAO 可能与高血压病存在一定关系,而高血压病又是心血管疾病的重要危险因素。除此之外,有研究通过对 200 例冠心病患者研究证实,TMAO 与慢性心房颤动(房颤)的发生风险也有关,其主要机制可能是 TMAO 通过调节促炎细胞因子,或通过心房重构和心肌细胞凋亡等来诱导心房电不稳定,造成人体自主神经系统紊乱,进而诱发房颤^[7]。不仅如此,TMAO 还与脑卒中等疾病有着密切关系。徐燕飞^[8]采用高效液相色谱串联质谱技术对动脉粥样硬化性脑血管病患者(60 例)及健康对照人群(30 名)测定 TMAO 血浆浓度发现,后者 TMAO 血浆浓度显著低于前者,表明高 TMAO 血浆浓度可能是脑卒中的一个重要危险因素。Zhu 等^[9]通过对血小板功能的研究发现,高浓度 TMAO 可促进血小板的反应性增加,诱导血栓形成,考虑可能与 TMAO 通过增加细胞内 Ca^{2+} 的释放来激活多种激动剂有关。结合众多研究文献,笔者认为 TMAO 导致心脑血管疾病发生和发展的机制可能有以下几方面。(1) TMAO 改变了血管壁、肠道、肝脏、肾脏等重要器官的胆固醇代谢通路;(2) TMAO 降低了胆汁酸 Cyp7a1 和 Cyp27a1 等转运体的表达,改变了胆汁酸池的大小与构成;(3) TMAO 升高干扰了胆固醇及

脂蛋白的代谢,阻碍胆固醇从肝外组织逆向转运进肝脏;(4) TMAO 升高使巨噬细胞表面的清道夫受体数量上调,并参与泡沫细胞的形成^[10];(5) TMAO 损伤了血管壁的结构和功能,促进了血小板内 Ca^{2+} 的释放,进而活化血小板,加速血栓形成;(6) TMAO 促进环氧合酶-2、白细胞介素-6、细胞间黏附分子-1 等炎症因子的表达,从而诱导 NF- κ B 信号通路产生炎症反应。

1.2 TMAO 与糖尿病

Tang 等^[11]通过对 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2MD)患者及健康人群检测血浆 TMAO 浓度及 TMAO 前体物质(胆碱、甜菜碱)浓度发现,T2MD 患者血浆 TMAO 浓度及胆碱等前体物质浓度比健康人群测定值要高。其中前者 TMAO 血浆浓度为 4.4 (2.8, 7.7) $\mu\text{mol/L}$,后者为 3.6 (2.3, 5.7) $\mu\text{mol/L}$,这表明 TMAO 与 T2MD 的发生可能有关,但未发现与患者体内血糖水平的相关性。Shan 等^[12]通过对 2694 名参与者评估 TMAO 与 T2MD 的关系发现,TMAO 通过阻断胰岛素在细胞中的传导通路降低了患者的葡萄糖耐量和引起高血糖症的发生。另外,Gao 等^[13]研究了 TMAO 对高脂肪饮食喂养小鼠的葡萄糖耐量的影响。结果显示,模型小鼠空腹胰岛素水平升高和胰岛素抵抗增强,胰岛素信号转导相关基因如磷脂酰肌醇 3 激酶 r1 (phosphatidylinositol 3-kinase r1, PI3K r1)、胰岛素受体底物 2 (insulin receptor substrate 2, IRS2)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 等及抗炎因子 IL-10 的 mRNA 水平均降低,但促炎细胞因子巨噬细胞趋化蛋白-1 的 mRNA 表达增加,小鼠的葡萄糖耐量受损加剧。分析认为 TMAO 使肝脏中胰岛素信号通路、糖原合成、糖异生和葡萄糖转运相关的基因表达增加,但降低了抑炎因子的表达。故饮食中的 TMAO 会加剧葡萄糖耐量受损,阻碍肝脏胰岛素信号传导途径,并导致喂食高脂肪饮食的小鼠发生脂肪组织炎症。笔者认为在 T2MD 患者中,TMAO 可通过阻断胰岛素信号通路、降低细胞对胰岛素的敏感性、增加促炎细胞因子的表达等方式参与 T2MD 的发生和发展过程。

1.3 TMAO 与慢性肾脏病

TMAO 相对分子质量为 75 ku,分子量较小,容易通过肾小球基底膜随尿排出。慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者肠蠕动减慢、有毒物质在肠道堆积、肠黏膜充血水肿、发生炎症反应等都会引起肠道损伤和菌群失调^[14]。而肠道损伤和菌群失调又会造体内 TMAO 增多。Vaziri 等^[15]

通过对正常人群和 CKD 患者的粪便样品进行微生物 DNA 的提取和测定发现,在 CKD 患者肠道中有 190 种微生物水平与正常人群明显不同,提示 CKD 患者肠道菌群失衡严重。有研究采用 CKD 大鼠模型进行平行实验,也得到类似的结果。另外,Ramezani 等^[16]在尿毒症患者的十二指肠和空肠中发现大量好氧细菌和厌氧细菌,但在正常人群中没有。肠道菌群失调会引起一系列代谢异常,包括炎症反应、氧化应激、胰岛素抵抗等。我们认为 CKD 肠道菌群的改变必定会影响血浆 TMAO 浓度,而血浆 TMAO 增高,又会损伤肾脏血管,促进 CKD 的发展。Tang 等^[17]通过对 521 例 CKD 患者测定空腹 TMAO 血浆浓度发现,CKD 患者血浆 TMAO 浓度明显高于正常人群,且较高水平的 TMAO 会引发肾动脉血管粥样硬化、胶原沉积、肾组织逐渐纤维化及肾脏滤过功能受损等。当肾脏功能受损严重时又会进一步加重体内 TMAO 浓度,形成恶性循环。Sun 等^[18]研究发现在肥胖且肾损伤动物体内,肾损伤分子-1 水平与血液中 TMAO 含量成正比,提示高水平 TMAO 可能是促进肾脏纤维化的重要危险因素。总之,TMAO 升高可促进 CKD 患者发生血管炎症反应,促进环氧合酶-2、白细胞介素-6 等炎症因子表达、提高血小板反应性、加速血栓形成等,参与 CKD 的发生和发展。

2 TMAO 的测定方法

现阶段测定 TMAO 的方法主要有比色法、离子色谱法、色谱-质谱联用分析技术等方法。但这些方法均存在一定缺陷,不适合临床实验室进行大规模筛查,详述如下。

2.1 比色法

(1) 苦味酸比色法。用三氯化钛($TiCl_3$)把 TMAO 还原成 TMA,测定 TMA 的含量,进而换算成 TMAO 的含量。(2) 雷氏盐比色法。取血清样品,用浓盐酸下调 pH,在恒温箱中冷却,打开蠕动泵加入雷氏盐饱和溶液,并不断地搅拌。然后加入含水乙醚和 70% 的丙酮进行溶解洗涤,在分离柱中进行分离,525 nm 处测定吸光度值。或加入鲁米诺,在化学发光仪中进行检测^[19]。比色法虽然操作简单,但容易与人体内其他胺类物质发生反应,灵敏度较差,测定结果常偏高,并不适合人体内 TMAO 的测定^[20]。

2.2 离子色谱法

离子色谱法是指用低交换容量的离子交换树脂为固定相对 TMAO 进行分离,用流动相携带 TMAO 通过电导检测器,连续监测携带 TMAO 的流动相引起的点的变化,再按照色谱定量方法进行比对分析。

孙永等^[21]用 4 mmol/L 硝酸 + 3% 乙腈作为淋洗液测定水产品中 TMAO 含量以检测该方法的实用性,结果发现检测在 10 min 内即完成,且分离度良好、检出限低。但由于生物样品中常包含一些其他阳离子,如 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等,可能会影响测定结果,所以用离子交换色谱法测定生物样品中的 TMAO 并非最佳方法。

2.3 色谱-质谱联用分析法

色谱-质谱联用分析技术灵敏度高,适用于小分子低脂肪胺类测定。现阶段主要包括气相色谱-质谱联用分析技术和液相色谱-质谱联用分析技术两种方法。一般用色谱-质谱联用分析技术测定生物样品中 TMAO 时,需要用 $TiCl_3$ 作为还原剂,使 TMAO 转变为 TMA,再使 TMA 衍生化,加上生色基团等可被检测的物质,再进行测定。Sacher 等^[22]用苯磺酰胺作为生色基团测定 TMA、二甲胺(dimethylamine, DMA) 等化合物,结果发现该方法重复性好,灵敏度高。Chan 等^[23]利用 $TiCl_3$ 把 TMAO 还原成 TMA,用丙胺作为内标物,在碱性环境中用二乙烯基苯-羧基聚二甲硅氧烷为固定相萃取剂,吸附萃取 TMA,然后用色谱仪进行比对分析,最终使用内标法算出确切含量。由此看出,色谱-质谱联用分析技术虽灵敏度高,但步骤繁琐,成本较高,样品衍生过程可能使 TMAO 发生降解,从而影响测定结果的准确性,因此不适合临床大规模筛查。

3 小结与展望

进入 21 世纪以来,随着人们生活环境和饮食习惯的改变,慢性疾病的发病率逐年上升,对人类的威胁日益增加,已经严重阻碍了社会的进步和人类的健康。TMAO 作为近些年较为关注的缺血损伤标志物,对慢性疾病的预防和监测有重要的临床意义。现阶段测定 TMAO 的方法仍存在误差较大或步骤繁琐或成本较高等局限,因此不适合临床实验室大规模筛查。我们迫切需要一种快速、准确并适合临床实验室大规模筛查 TMAO 的方法。随着对 TMAO 测定方法的逐步试验和探索,我们希望通过调节肠道菌群来抑制 TMAO 的产生。而 TMAO 作为慢性疾病标志物的新希望,也会为临床提供更科学的预防手段和治疗方法。

【参考文献】

- [1] 林运灵. 氧化三甲胺与心血管病研究进展[J]. 心血管病学进展, 2016, 37(6): 615-617. DOI: 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2016.06.008.
Lin YL. Advance in trimethylamine oxide and cardiovascular

- disease[J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2016, 37(6): 615-617. DOI: 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2016.06.008.
- [2] Wang Z, Klipfell E, Benoit BJ, *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63. DOI: 10.1038/nature09922.
- [3] Tang WH, Wang Z, Levison BS, *et al.* Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk[J]. *New Engl J Med*, 2013, 368(17): 1575-1584. DOI: 10.1056/NEJMoal109400.
- [4] 张瑗, 杨翔, 吴宁, 等. 血清氧化三甲胺水平与高龄老年慢性心力衰竭患者心功能相关性分析[J]. *解放军医学院学报*, 2017, 38(9): 807-814. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.09.001.
- Zhang Y, Yang X, Wu N, *et al.* Correlation between serum trimethylamine level and cardiac function in very-old patients with chronic heart failure[J]. *Acad J PLA Postgrad Med School*, 2017, 38(9): 807-814. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.09.001.
- [5] Tang WH, Wang Z, Fan Y, *et al.* Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(18): 1908-1914. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.617.
- [6] Ufnal M, Jazwiec R, Dadlez M, *et al.* Trimethylamine-N-oxide; a carnitine-derived metabolite that prolongs the hypertensive effect of angiotensin II in rats[J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(12): 1700-1705. DOI: 10.1016/j.cjca.2014.09.010.
- [7] 张兰玉, 张佩生. 肠道菌群代谢产物氧化三甲胺与房颤发生的关系[J]. *世界复合医学*, 2018, 4(5): 30-33. DOI: 10.11966/j.issn.2095-994X.2018.04.05.10.
- Zhang LY, Zhang PS. Correlation between the trimethylamine oxide of intestinal microflora metabolite and occurrence of atrial fibrillation[J]. *World J Complex Med*, 2018, 4(5): 30-33. DOI: 10.11966/j.issn.2095-994X.2018.04.05.10.
- [8] 徐燕飞. 脑卒中与TMAO的相关性及痰火方对TMAO影响的初步研究[D]. 首都医科大学, 2017.
- Xu YF. A preliminary study on the relation between stroke and trimethylamine N-oxide and the effect of Tan-Huo-Fang on trimethylamine N-oxide[D]. Capital Medical University, 2017.
- [9] Zhu W, Gregory JC, Org E, *et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk[J]. *Cell*, 2016, 165(1): 111-124. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.011.
- [10] 徐燕飞, 高利. 肠道菌群对动脉粥样硬化作用机制的研究概述[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(17): 2126-2128. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1349.2017.17.012.
- Xu YF, Gao L. Overview of the mechanism of intestinal flora on atherosclerosis[J]. *Chin J Integr Med Cardio-cerebrovasc Dis*, 2017, 15(17): 2126-2128. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1349.2017.17.012.
- [11] Tang WH, Wang Z, Li XS, *et al.* Increased trimethylamine N-oxide portends high mortality risk independent of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Clin Chem*, 2017, 63(1): 297-306. DOI: 10.1373/clinchem.2016.263640.
- [12] Shan ZL, Sun TP, Huang H, *et al.* Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes[J]. *Am J Clin Nutr*, 2017, 106(3): 888-894. DOI: 10.3945/ajcn.117.157107.
- [13] Gao X, Liu XF, Xu J, *et al.* Dietary trimethylamine N-oxide exacerbates impaired glucose tolerance in mice fed a high fat diet[J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118(4): 476-481. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.03.001.
- [14] Fouque D, Casal MC, Lindley E, *et al.* Dietary trends and management of hyperphosphatemia among patients with chronic kidney disease: an international survey of renal care professionals[J]. *J Ren Nutr*, 2014, 24(2): 110-115. DOI: 10.1053/j.jrn.2013.11.003.
- [15] Vaziri ND, Wong J, Pahl M, *et al.* Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora[J]. *Kidney Intl*, 2013, 83(2): 308-315. DOI: 10.1038/ki.2012.345.
- [16] Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(4): 657-670. DOI: 10.1681/ASN.2013080905.
- [17] Tang W, Wang Z, Kennedy Y, *et al.* Gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease[J]. *Circ Res*, 2014, 116(3): 448-455. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305360.
- [18] Sun G, Yin Z, Liu N, *et al.* Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2): 964-970. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.108.
- [19] 黄国霞, 赖春华, 李军生, 等. 6种水产动物中氧化三甲胺的提取与含量测定[J]. *食品安全与检测*, 2012, 37(7): 305-307. DOI: 10.13684/j.cnki.spki.2012.07.010.
- Huang GX, Lai CH, Li JS, *et al.* The extract and determination of trimethylamine N-oxide in six sort aquatic animals[J]. *Food Safety Testing*, 2012, 37(7): 305-307. DOI: 10.13684/j.cnki.spki.2012.07.010.
- [20] 陈锦文, 崔燕芒, 赵燕. 三甲胺、二甲胺及氧化三甲胺含量测定方法的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2015, 30(2): 216-219. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2015.02.036.
- Chen JW, Cui YM, Zhao Y. Research progress of content determination methods of trimethylamine, dimethylamine and trimethylamine-N-oxide[J]. *Northwest Pharm J*, 2015, 30(2): 216-219. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2015.02.036.
- [21] 孙永, 周德庆, 柳淑芳, 等. 非抑制离子色谱法测定水产品中氧化三甲胺及其分解产物的方法[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 119-122. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7075.2012.06.018.
- Sun Y, Zhou DQ, Liu SF, *et al.* Determination of trimethylamine-N-oxide and its decomposition in fishery products by non-suppressed ion chromatography[J]. *Progr Fish Sci*, 2012, 33(6): 119-122. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7075.2012.06.018.
- [22] Sacher F, Lenz S, Brauch HJ. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2, 4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 764(1): 85-93. DOI: 10.1016/S0021-9673(96)00868-0.
- [23] Chan ST, Yao MW, Wong YC, *et al.* Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Euro Food Res Tech*, 2006, 224(1): 67-74. DOI: 10.1007/s00217-006-0290-4.