

DOI: 10.13376/j.cblls/2018070

文章编号: 1004-0374(2018)05-0580-05

肠源性氧化三甲胺在慢性肾病中的作用

杨波^{1,2}, 熊婉媛², 蔡小玲¹, 曾通旭¹, 徐倩¹, 哈小琴^{1*}

(1 兰州军区兰州总医院检验科, 兰州 730050; 2 甘肃中医药大学, 兰州 730000)

摘要: 氧化三甲胺是由人体正常消化产生并进入血液中的一种物质, 一直以来被认为是正常的血液循环物质。但是近年来研究发现, 氧化三甲胺具有生物活性, 对多种慢性疾病都会产生不利影响。氧化三甲胺的产生主要依靠肠道菌群的代谢。在慢性肾脏疾病中, 很多原因可导致肠道菌群发生改变, 并且可以代谢生成氧化三甲胺的菌群种类明显升高, 这就使慢性肾脏病患者血液中的氧化三甲胺含量上升。由于氧化三甲胺主要通过肾脏排泄, 肾脏功能障碍可造成其在体内的积累, 从而加剧慢性肾脏病患者的肾脏损伤。

关键词: 肠道微生物; 氧化三甲胺; 慢性肾脏疾病; 益生菌; 粪菌移植

中图分类号: R692.55 **文献标志码:** A

Effect of intestinal TMAO on chronic kidney disease

YANG Bo^{1,2}, XIONG Wan-Yuan², CAI Xiao-Ling¹, ZENG Tong-Xu¹, XU Qian¹, HA Xiao-Qin^{1*}

(1 Department of Clinical Laboratory, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China; 2 Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: TMAO is a normally digestion product which can enter human blood system. Considered as a normal blood circulation material, it has been found to have biological activity in recent years and has a negative effect on a variety of chronic diseases. The production of TMAO is mainly dependent on the metabolism of intestinal microbes. In chronic kidney disease, major changes in intestinal flora occur for a variety of reasons and can result in a significant increase in metabolites of TMAO-producing bacteria. This leads to an increase of blood TMAO in patients with chronic kidney disease and damage to the kidneys. Due to renal excretion of TMAO, and kidney dysfunction can lead to its accumulation, and further cause damage to kidney, which will exacerbate kidney damage in patients with chronic kidney disease.

Key words: intestinal microbes; trimethylamine-N-oxide; chronic kidney disease; probiotics; fecal microbiota transplantation

1 TMAO的产生

1.1 TMAO的形成与排泄

氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO)存在于血液循环中, 对慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)及心血管疾病有着极其重要的影响, 近年来越来越受到关注。在人体中, TMAO主要是由食物中的胆碱转化而来^[1]。胆碱通过细菌代谢生成三甲胺(trimethylamine, TMA)^[2], TMA被吸收进入血液循环后, 在肝脏单加氧酶的作用下氧化生成TMAO^[3]。很多食物中都含有较高比例的胆碱, 尤其是蛋类和动物肝脏, 并且大部分食物中都含有一

定量的胆碱或胆碱化合物^[4]。胆碱在食物中以游离胆碱和胆碱酯的形式存在^[5], 不同形式的胆碱在肠内通过不同的途径被吸收: 游离胆碱通过主动运输被吸收到肠上皮细胞中, 而胆碱酯通过淋巴系统被吸收, 或被胰脂肪酶水解为甘油磷酸胆碱后被吸收^[6]。

TMAO的相对分子质量较小, 易于滤过, 可通过肾近端小管被排泄。实验中给予TMAO放射性标记, 发现24 h内94.5%的TMAO通过尿液排出,

收稿日期: 2017-10-15; 修回日期: 2017-12-20

基金项目: 江苏省科技专项(SBA2016020050)

*通信作者: E-mail: haxiaoqin2013@163.com

只有4%通过粪便排泄,<1%通过呼吸排出^[7]。肾功能减退患者的血液中TMAO浓度随肾功能损失程度而升高,因此人体中TMAO的含量取决于饮食、肠道微生物组成、肝功能和肾脏的排泄能力。

最初TMAO只被认为是胆碱等物质的代谢废物,现在人们逐渐认识到这种物质具有生物活性,可能会加剧慢性肾脏疾病、心血管疾病、糖尿病等慢性疾病的病程^[8-10],这为相关疾病的研究及治疗提供了一个新方向。

1.2 血液中TMAO的产生依赖于肠道菌群

肠道菌群被称为人类第二基因组,并且代谢能力极强,对于多种疾病都有着不可忽视的影响。一般认为TMAO只与所摄入的食物有关,而忽视了肠道菌群的作用。肠道菌群强大的代谢合成能力同样在TMAO的形成过程中发挥关键作用。之前上文提到TMAO是由TMA在肝脏中代谢所形成的,而肠道菌群可以利用摄入食物中的胆碱合成TMA,无菌小鼠则无法代谢形成TMA^[11-12]。无菌小鼠和正常小鼠同时喂养高胆碱饲料,正常小鼠血液中TMAO含量明显高于无菌小鼠;当无菌小鼠暴露于正常环境接触细菌后,其血液TMAO含量明显上升^[13];而将有胆碱代谢能力的细菌定植于无菌小鼠,不仅提高了无菌小鼠盲肠TMA的含量,而且降低了血清胆碱浓度^[12]。

TMAO的产生主要和肠道菌群的CutC/CutD、YeaW/X和CntA/B基因有着密切关联^[14-15],并且研究发现产厌氧球菌(*Anaerococcus hydrogenalis*)、天门冬形梭菌(*Clostridium asparagiforme*)、生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)、弗格森埃希菌(*Escherichia fergusonii*)、彭氏变形杆菌(*Proteus penneri*)、雷氏普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、哈氏梭菌(*Clostridium hathewayi*)是生成TMAO的常见菌群^[13]。

既然肠道菌群是产生TMAO的关键,就可以通过抑制菌群来对其进行验证。研究发现,使用抗生素治疗小鼠可以减少TMA的形成^[11]。通过益生元来调节肠道菌群,也可以明显地降低血液中TMAO的含量^[16]。另外,3,3-二甲基-1-丁醇(3,3-dimethyl-1-butanol, DMB)可以特异性地减少胆碱饮食小鼠血液中TMAO浓度,因为DMB具有与胆碱相似的分子结构,可以通过结构的相似性来竞争性地抑制肠道菌群对胆碱的分解。而如果通过血液注射DMB,因不通过肠道,就不能发挥降低TMAO的作用,从而验证了肠道菌群的重要作用^[17]。

2 慢性肾脏疾病及肠道菌群

2.1 慢性肾脏疾病患者肠道菌群发生改变

肠道菌群的正常组成对人体健康有着重要的作用,肠道菌群失调会造成各种不利的影 响。慢性肾脏疾病也会引起肠道菌群的改变。CKD患者常常会伴随饮食限制,如膳食纤维摄入减少,这会导致结肠中碳水化合物和蛋白质的比例上升,并产生潜在有毒的蛋白质代谢产物。随着结肠运转时间的增加,还会引起便秘,进一步引起肠道菌群组成的改变。CKD患者往往还伴随着抗生素的使用、代谢性酸中毒、体液超负荷、肠壁充血水肿等^[18],这些因素也会导致菌群失调。CKD患者肠道微生物种群失调的另一个重要的因素是尿素的增多,尿素通过肠道微生物的水解可产生大量的氨,反过来又会影 响肠道菌群的正常结构,从而导致肠道菌群的失调^[19]。

很多研究也进一步证明CKD患者肠道微生物的组成和正常人群并不相同^[20]。Claus等^[21]研究发现,与对照组相比,慢性肾脏疾病模型小鼠有大幅度的微生物种群改变。在临床研究方面,Ramezani等^[22]研究发现,成人尿毒症患者的好氧菌和厌氧菌在十二指肠和空肠中都有大量分布,而在健康个体中,这些细菌不会大量定植。Vaziri等^[23]研究发现,随着肾脏功能的下降,CKD和终末期肾脏病患者肠道细菌数量和种类会发生明显改变,而这些改变可影响CKD进程,甚至引发其他并发症。

2.2 慢性肾脏疾病患者产TMAO菌群增加

不同的菌群组成可发挥不同的功能,肠道菌群组成的改变必然会导致菌群代谢功能的改变,从而使人体进一步受到肠道菌群代谢产物的损伤。慢性肾脏疾病也是如此,患者肠道菌群结构的改变会引起肠道菌群代谢功能改变,从而影 响TMAO的生成,最终提高血液循环中TMAO的含量。

特定的菌群与血液中TMAO含量有明显的相关性^[13]。Xu等^[24]进一步确定了CKD患者肠道微生物群落特定功能的改变,发现菌群代谢胆碱的能力明显提高;并且与健康人群对照组相比,CKD患者胆碱、甜菜碱、肉碱代谢相关基因的表达有显著差异,磷脂酰胆碱合酶基因、胆碱单加氧酶基因、甜菜碱醛脱氢酶基因、三甲胺氧化还原酶基因的表达显著提高;把CKD患者的粪便移植到小鼠体内,发现产TMAO的菌群在小鼠肠道定植,并且可以提高实验小鼠TMAO血液浓度。

3 TMAO对肾脏的损害

由于 TMAO 主要通过肾脏来排泄, 肾功能障碍时其含量升高, 是慢性肾脏疾病的一种标志物, 但它对于肾脏本身的影响并没有得到重视。近年来越来越多的研究表明, TMAO 不仅是 CKD 标志物, 而且是一种毒性物质。TMAO 可影响肾小球滤过率和肾功能^[25], 并且 TMAO 浓度与慢性肾脏疾病死亡率相关, 可以预测 CKD 患者五年死亡风险。即使在没有严重肾脏疾病的患者中, 升高的血清 TMAO 浓度也可以提示肾脏疾病的预后不良^[11], 而且尿 TMAO 浓度与肾小管间质性病变之间明显相关^[26]。

Tang 等^[27]研究发现, 与正常饮食的小鼠相比, 高胆碱饮食组 TMAO 含量升高。升高的 TMAO 水平与肾小管间质性纤维化和胶原沉积显著相关, TGF- β /Smad3 信号通路中 Smad3 的磷酸化水平也明显增加。此外, TMAO 水平还和肾损伤分子-1 水平相关。Sun 等^[28]在研究肥胖肾损伤时发现, 喂养高脂饲料的动物 TMAO 浓度明显升高, 出现肾纤维化的病理表现, 并且肾损伤分子-1 与 TMAO 含量成正比; 进一步的研究发现, TMAO 造成的损伤可能是由于氧化应激和炎症导致的。

4 TMAO对CKD心血管并发症的影响

慢性肾脏疾病相关的炎症及尿毒症毒素等都会诱导相关的心血管疾病, 心血管并发症是 CKD 最常见的并发症, 也是重要的死亡原因。在患有晚期慢性肾脏疾病的人群中可以观察到较高的 TMAO 浓度^[29], 并且血清 TMAO 浓度与晚期 CKD 患者心脑血管疾病的发生、发展有着显著的相关性^[30]。

Zhu 等^[13]发现受试者血浆 TMAO 水平可以预测血栓形成风险。血小板暴露于 TMAO 后, 可以通过增加细胞内 Ca^{2+} 释放, 从而促进血小板活化; 通过膳食胆碱和 TMAO 喂养的小鼠、无菌小鼠和粪菌移植动物模型研究证实, 肠道微生物菌群和 TMAO 在调节血小板反应性和血栓形成潜力方面发挥重要作用。

除了动脉粥样硬化, TMAO 可诱导慢性肾脏疾病血管炎症反应, 促进主动脉炎症基因如 ICAM-1、COX-2、IL-6 等的表达。通过研究 TMAO 对主动脉内皮细胞与平滑肌细胞的作用发现, TMAO 可诱导 NF- κ B 通路相关蛋白酶原的磷酸化, 并增强相关炎症因子的转录。通过相应的受体抑制剂处理细胞, 进一步确认了 TMAO 可以通过 NF- κ B 通路诱导炎

症反应^[31]。

5 降低肠源性TMAO的可行策略

尽管 TMAO 促进以上疾病的确切机制仍不清楚, 但目前的研究认为, 降低 TMAO 浓度可能是治疗这类慢性疾病的一条途径。目前有很多方法可以降低血液 TMAO 浓度。

5.1 DMB的摄入

DMB 的结构与胆碱类似, 进入肠道后可以和胆碱竞争肠道菌群中的三甲胺裂解酶, 最终降低血液中的 TMAO 水平。在饮用水中提供一定量的 DMB 就可以抑制食物中的胆碱转化为三甲胺, 最终减少 TMAO 的合成。Wang 等^[17]研究发现, 小鼠暴露于高胆碱饮食时, 血液 TMAO 浓度会明显升高; 而在饮用水中加入 DMB 后, 小鼠血液中的 TMAO 水平明显下降, 而且 16 周的喂养实验发现 DMB 对小鼠没有副作用。相似的研究也表明, 饮用水中添加 1% DMB 的小鼠血液 TMAO 浓度明显降低^[32]。目前, 通过补充 DMB 来降低血液 TMAO 水平是最为简便与无副作用的方法, 并且可以作为治疗动脉粥样硬化以及慢性肾脏疾病的新思路。

5.2 益生菌

益生菌作为食品中的生物体补充剂, 当给予适量时会促进宿主健康。益生菌有着改善慢性肾脏疾病病情以及减缓病情发展的作用^[33], 相关研究越来越多, 其临床意义也越来越被重视。Ranganathan 等^[34]在一项实验中每天给予 CDK 3~4 期患者 9×10^9 CFU 的混合益生菌治疗, 发现可以降低血清尿素氮以及尿酸的浓度。

但是, 第一代益生菌产品存在污染、菌株信息错误以及活菌数不足等质量问题, 且被认可的作用并不多, 这使得第一代益生菌制品受到广泛质疑。目前已经提出了二代益生菌^[35]的概念。二代益生菌是从机制入手, 利用细菌来传递缓解病情或促进健康的分子。二代益生菌在诊断、治疗、预防等方面可以发挥重要作用, 比一代益生菌更加有效, 可以说只有二代益生菌才可以被称为“益生菌”。

5.3 粪菌移植

粪菌移植是指将微生物群落从粪便的捐赠者转移到接受者肠道中, 以引发肠道微生物有目的地改变。粪菌移植对于一些肠道感染性疾病和慢性病的治疗有着不错的效果。纠正了错误的肠道菌群组成, 也就改变了肠道菌群的疾病状态, 对患病机体症状的缓解起重要作用。

慢性肾脏疾病的肠道菌群已经发生了明显的改变,如能通过粪菌移植来改变菌群,从而降低肠源性的有害物质,这将成为一个较为有效的治疗手段。临床上在其他疾病,特别是肠道疾病研究中有不少成功的案例。Jiang等^[36]利用粪菌移植治疗艰难梭菌(*Clostridium difficile*)感染患者,采用的粪便来自8名健康志愿者,分别进行新鲜、冻干和冰冻移植。结果发现,接受新鲜粪菌移植的治愈率为100%,冰冻样本治愈率为83%,而冻干样本治愈率最低,仅为78%。但目前粪菌移植面临着一些伦理问题,比如宗教、饮食习惯等,还要面临传统观念的冲击以及监管的问题。

5.4 细菌改造

细菌改造是指通过人工操作来改造相关基因,然后对肠道的一些菌群进行更细致的监测研究,达到控制其基因表达的目的,目前已经可以实现。CKD患者肠道菌群的功能基因已经发生了较大改变,分解胆碱等物质的基因表达增加,所以可以通过控制具体基因的表达来降低血液中TMAO水平。虽然相关研究起步较晚,但是已有很大进展。Bentley等^[37]在拟杆菌(*Bacteroides*)中引入了一套基因表达调节系统,基因的表达受到工程化改造的启动子调控,通过添加合成的诱导物来调节启动子调控的基因表达。在缺乏诱导物的情况下,启动子完全被抑制;加入诱导物后,可以快速提高基因表达4~5个量级。Whitaker等^[38]在拟杆菌中引入一套噬菌体启动子及翻译调节策略,可实现精细水平下的基因表达调控,并用荧光蛋白显示特定菌株。该技术突破对以后精确研究不同细菌的定植与作用提供了前提条件。

[参 考 文 献]

- [1] Seibel BA, Walsh PJ. Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *J Exp Biol*, 2002, 205: 297-306
- [2] Brown JM, Hazen SL. Meta-organismal nutrient metabolism as a basis of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25: 48-53
- [3] Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab*, 2013, 17: 49-60
- [4] 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. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64: 1908-14
- [5] Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, et al. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J Nutr*, 2003, 133: 1302-7
- [6] Zeisel SH. Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr*, 2006, 26: 229-50
- [7] Bain MA, Fornasini G, Evans AM. Trimethylamine: metabolic, pharmacokinetic and safety aspects. *Curr Drug Metab*, 2005, 6: 227-40
- [8] Al-Waiz M, Mitchell SC, Idle JR, et al. The metabolism of ¹⁴C-labelled trimethylamine and its N-oxide in man. *Xenobiotica*, 1987, 17: 551-8
- [9] Dambrova M, Latkovskis G, Kuka J, et al. Diabetes is associated with higher trimethylamine N-oxide plasma levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124: 251-6
- [10] Chen YM, Liu Y, Zhou RF, et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Sci Rep*, 2016, 6: 19076
- [11] Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease novelty and significance. *Circ Res*, 2015, 116: 448-55
- [12] Romano KA, Vivas EI, Amador-Nogues D, et al. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio*, 2015, 6: e02481
- [13] Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell*, 2016, 165: 111-24
- [14] Falony G, Vieira-Silva S, Raes J. Microbiology meets big data: the case of gut microbiota-derived trimethylamine. *Annu Rev Microbiol*, 2015, 69: 305-21
- [15] Koeth RA, Levison BS, Culley MK, et al. γ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metab*, 2014, 20: 799-812
- [16] Poesen R, Evenepoel P, de Loor H, et al. The influence of prebiotic arabinoxylan oligosaccharides on microbiota derived uremic retention solutes in patients with chronic kidney disease: A randomized controlled trial. *PLoS One*, 2016, 11: e0153893
- [17] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell*, 2015, 163: 1585-95
- [18] 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 Ren Nutr*, 2014, 24: 110-5
- [19] Koppe L, Mafra D, Fouque D. Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2015, 88: 958-66
- [20] Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, et al. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr*, 2012, 22: 149-56
- [21] Claus SP, Tsang TM, Wang Y, et al. Systemic

- multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 219
- [22] Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25: 657-70
- [23] Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*, 2013, 83: 308-15
- [24] Xu KY, Xia GH, Lu JQ, et al. Impaired renal function and dysbiosis of gut microbiota contribute to increased trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease patients. *Sci Rep*, 2017, 7:1445
- [25] Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, et al. Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PLoS One*, 2016, 11: e0141738
- [26] Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24: 1330-8
- [27] Wang Z, Tang WH, Buffa JA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J*, 2014, 35: 904-10
- [28] Sun G, Yin Z, Liu N, et al. Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493: 964-70
- [29] Mafune A, Iwamoto T, Tsutsumi Y, et al. Associations among serum trimethylamine-N-oxide (TMAO) levels, kidney function and infarcted coronary artery number in patients undergoing cardiovascular surgery: a cross-sectional study. *Clin Exp Nephrol*, 2016, 20: 731-9
- [30] Mente A, Chalcraft K, Ak H, et al. The relationship between trimethylamine-N-oxide and prevalent cardiovascular disease in a multiethnic population living in Canada. *Can J Cardiol*, 2015, 31: 1189-94
- [31] Seldin MM, Meng Y, Qi H, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5: e002767
- [32] Li T, Chen Y, Gua C, et al. Elevated circulating trimethylamine N-oxide levels contribute to endothelial dysfunction in aged rats through vascular inflammation and oxidative stress. *Front Physiol*, 2017, 8: 350
- [33] Koppe L, Mafra D, Fouque D. Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2015, 88: 958-66
- [34] Ranganathan N, Friedman EA, Tam P, et al. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. *Curr Med Res Opin*, 2009, 25: 1919-30
- [35] O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 17057
- [36] Jiang ZD, Ajami NJ, Petrosino JF, et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection—fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 45: 899-908
- [37] Lim B, Zimmermann M, Barry NA, et al. Engineered regulatory systems modulate gene expression of human commensals in the gut. *Cell*, 2017, 169: 547-58
- [38] Whitaker WR, Shepherd ES, Sonnenburg JL. Tunable expression tools enable single-cell strain distinction in the gut microbiome. *Cell*, 2017, 169: 538-46