

肠道菌群代谢物 TMAO 与非酒精性脂肪性肝病的关系

李媛媛¹⁾, 宋亚贤¹⁾, 徐玉善¹⁾, 曾晓甫¹⁾, 袁惠²⁾, 徐兆¹⁾, 江艳¹⁾
(1)昆明医科大学第一附属医院内分泌一科; 2)超声科, 云南昆明 650032)

[摘要] 目的 检测 NAFLD 患者血清氧化三甲胺(TMAO)及其前体代谢物水平, 及肠道中直肠真杆菌、多形拟杆菌、乳酸杆菌和双歧杆菌的表达量, 探讨肠道菌群代谢物 TMAO 在 NAFLD 病程进展中的作用。方法 随机选取 118 例受试者, 分为 NAFLD 组 86 例和健康对照组 32 例, 采用高效液相色谱串联质谱法检测受试者血清中 TMAO 及其前体代谢物的水平, qRT-PCR 法检测粪便中目标细菌 DNA 的表达量。结果 NAFLD 患者血清 TMAO、三甲胺(TMA)及胆碱水平明显升高($P<0.05$), 肝脏脂肪含量与 TMAO 的水平具有正相关性($P<0.05$); NAFLD 患者粪便中乳酸杆菌、直肠真杆菌表达量增加($P<0.05$), 双歧杆菌、多形拟杆菌表达量减少($P<0.05$); 血清 TMAO 水平与粪便中直肠真杆菌的数量呈正相关($r=0.280$, $P<0.05$), 与双歧杆菌的数量呈负相关($r=-0.332$, $P<0.05$)。结论 血清 TMAO 水平与 NAFLD 的严重程度呈正相关, NAFLD 患者肠道菌群结构失衡, 且与 TMAO 存在关联, 推断肠道菌群可能通过代谢生成 TMAO 在 NAFLD 病程进展中起重要作用。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 氧化三甲胺; 三甲胺; 肠道菌群

[中图分类号] R589.2 [文献标志码] A [文章编号] 2095-610X(2024)02-0077-08

The Association of Intestinal Flora Metabolite TMAO with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

LI Yuanyuan¹⁾, SONG Yaxian¹⁾, XU Yushan¹⁾, ZENG Xiaofu¹⁾, YUAN Hui²⁾, XU Zhao¹⁾, JIANG Yan¹⁾
(1) Dept. of Endocrinology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University; 2) Dept. of Ultrasound Medicine, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] Objective To explore the role of TMAO from gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), we detected the serum level of TMAO and its precursor metabolites in NAFLD, as well as the expression level of Eubacterium rectum, Bacteroidetes multiforme, Lactobacillus and bifidobacterium in the intestinal flora. Methods We collected 118 subjects and divided into NAFLD group (86 cases) and healthy control group (32 cases) randomly. We also detected the serum level of TMAO and its precursor metabolites in subjects by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry detection (LC-MS), and the expression of target bacterial DNA was detected by qRT-PCR. Results Serum TMAO, TMA and choline levels were significantly increased in NAFLD ($P<0.05$), and liver fat content was positively correlated with TMAO ($P<0.05$). The expression level of Lactobacillus and Eubacterium rectum in NAFLD group were increased ($P<0.05$); the expression level of Bifidobacterium and Bacteroides multiform were decreased ($P<0.05$). The serum TMAO level was positively correlated with Eubacterium rectum ($r=0.280$, $P<0.05$), and negatively correlated with Bifidobacterium ($r=-0.332$, $P<0.05$). Conclusion The level of TMAO in serum shows a positive correlation with

[收稿日期] 2023-10-07

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202001AY070001-195); 云南省代谢性疾病临床医学研究中心资助项目(202102AA100056); 云南省内分泌代谢性疾病临床医学中心资助项目(YWLCYXZXXYS20221005)

[作者简介] 李媛媛, (1993~), 女, 云南文山山人, 临床医学硕士, 住院医师, 主要从事内分泌与代谢工作。宋亚贤与李媛媛对本文有同等贡献。

[通信作者] 江艳, E-mail: jyan_6@126.com

NAFLD. The structure of intestinal flora in individuals with NAFLD is altered and linked to TMAO. This suggests that the intestinal flora may have a significant impact on the development of NAFLD through TMAO.

[**Key words**] Non-alcoholic fatty liver disease; TMAO; TMA; Intestinal flora

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是目前全球最常见的肝脏疾病之一,在我国,成人 NAFLD 总患病率为 32%,明显高于全球患病率,且呈逐年上升趋势,是我国重要的公共卫生问题^[1]。目前,NAFLD 在全球范围内表现出最显著的肝硬化增长,是全世界引起肝硬化发病的高危因素^[2]。

肠-肝轴是肝脏与胃肠道在解剖上紧密联系,许多的证据表明,肠道微生物群及其代谢产物直接影响肠道形态和免疫反应,导致炎症和肠道内毒素血症的异常激活;肠道微生态失调也会导致肠道肝脏功能障碍,胆汁酸代谢途径的改变^[3]。

肠道微生物群及其代谢产物可以作为肠道和肝脏之间的分子载体,一些特定的肠道微生物群和代谢产物,包括短链脂肪酸、胆汁酸、脂多糖、胆碱和三甲胺(trimethylamine, TMA),会随着疾病的严重程度和纤维化阶段而发生变化,这表明这些物质具有作为诊断 NAFLD 标志物的潜力,因此,有必要对肠肝轴进行进一步的研究^[4]。

氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO)是肠-肝轴重要的代谢产物,由肠道微生物群代谢产生的 TMA 通过肠肝轴进入肝脏后,经含黄素单加氧酶 3(flavin-containing monooxygenases 3, FMO3)等酶的作用下氧化生成,其前体包括左旋肉碱、甜菜碱、肌酐等,主要来源于红肉、禽蛋类和牛奶等食物^[5]。随着肠道菌群研究的深入,TMAO 及其前体代谢物水平被发现与 2 型糖尿病、心血管疾病、心肌梗死、卒中、慢性肾脏病、癌症等多种疾病相关,但其具体关系仍不清楚,因而备受关注^[6-8]。越来越多临床研究表明,高循环 TMAO 与 NAFLD 以及 NASH 之间存在关联^[4, 9]。TMAO 是否与 NAFLD 的发病机制有关及是否促进 NAFLD 临床进程的发展,有待进一步的科研探索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2020 年 11 月至 2021 年 11 月期间在昆明医科大学第一附属医院内分泌一科住院及门诊体检就诊者共计 118 例。根据研究对象超声定量

肝脏脂肪含量结果,分为 2 个组。肝脏脂肪含量 $\geq 9.15\%$ 为 NAFLD 组,共 86 例,男 49 例,女 37 例,平均年龄(50.63 ± 15.02)岁;肝脏脂肪含量 $<9.15\%$ 为健康对照组,共 32 例,男 12 例,女 20 例,平均年龄(40.34 ± 12.47)岁。

所有研究对象均签署知情同意书,并经昆明医科大学第一附属医院伦理委员会批准(2022 伦审 L 第 10 号)。

NAFLD 诊断标准根据 2010 年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的《非酒精性脂肪性肝病的诊断标准》^[10],排除有大量饮酒史、肝纤维化、恶性肿瘤,伴有病毒性、药物性、自身免疫性、全胃肠外营养、肝豆状核变性等明确损肝因素导致脂肪肝的特定疾病。

健康对照组为体检健康人群,排除有高血压、血脂异常、冠心病、脑梗、糖尿病、恶性肿瘤病史;调查前 1 个月内及调查中未使用可能影响糖代谢的药物,如糖皮质激素、甲状腺素、噻嗪类药物等。

1.2 临床指标收集

详细采集研究对象相关临床资料:性别、年龄、身高、体重、腰围、臀围、吸烟史、饮酒史、既往疾病史、用药史、家族史,并准确记录受试者空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA1C)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GGT)、血清总胆汁酸(TBA)、尿酸(UA)、肾小球滤过率(GFR),根据公式计算出胰岛素抵抗指数(HOMA Insulin Resistance, HOMA-IR)^[11],公式如下:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{空腹胰岛素(mIU/L)} \times \text{空腹血糖(mmol/L)}}{22.5}$$

1.3 饮食结构问卷调查及超声定量肝脏脂肪含量

由本课题组的医生对所有受试者进行饮食结构问卷调查,调查方式采用一对一、面对面问卷调查。所有受试者使用 Hitachi 超声诊断仪 4C 突阵探头在受试者仰卧位,充分暴露肝区情况下采集受试者肝脏右叶肋间切面图及肝右肾矢状切面图,见图 1、图 2,联合运用超声肝脏回声衰减和

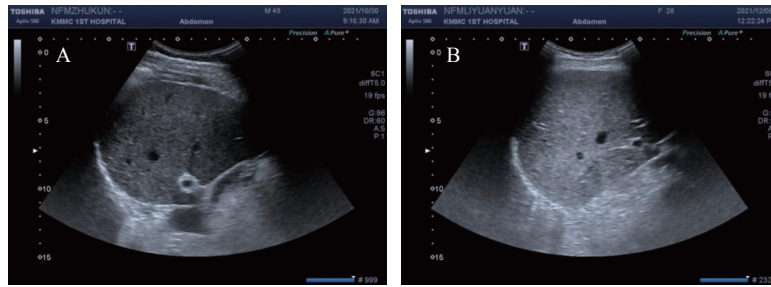


图1 肝脏右叶肋间切面图

Fig. 1 Sagittal plane of right liver and kidney

A: NAFLD 组; B: 健康对照组。

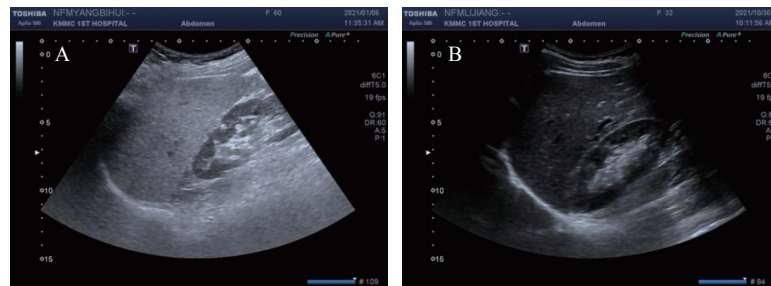


图2 肝右肾矢状切面图

Fig. 2 Intercostal view of right lobe of liver

A: NAFLD 组; B: 健康对照组。

肝肾回声比值这2项定量参数估算肝脏脂肪含量,以超声定量肝脏脂肪含量9.15%作为诊断脂肪肝的切点^[12]。

1.4 TMAO 及其前体代谢物检测

采集研究对象清晨空腹静脉全血2~3 mL,在4℃、3000 r/min离心10 min分离出血清,取200~300 μL分装于2 mL冻存管,于-80℃冰箱保存备用。在提取代谢物后,通过用高效液相色谱-质谱分析(5500 QTRAP 质谱仪 AB SCIEX)检测出TMAO及其前体代谢物水平。

1.5 粪便 DNA 提取及 PCR 反应

基于本课题组前期研究^[13],用qRT-PCR法检测粪便中目标细菌DNA的表达量。收集研究对象的新鲜粪便标本200~300 mg,采用QIAGEN的QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit试剂盒,按照操作步骤提取样品DNA。

引物及内参序列,见表1,配制PCR反应体系(总体积25 μL)。设置PCR反应条件:直肠真杆菌、多行拟杆菌采用两步法进行反应,95℃10 min为预变性阶段,95℃15 s、65℃1 min为PCR扩增阶段,共40次循环;双歧杆菌反应条件为:95℃5 min为预变性阶段,95℃15 s溶解、60℃1 min退火、72℃45 s延伸为PCR扩增阶段,共35次循环;乳酸杆菌反应条件为:95℃10 min

为预变性阶段,95℃15 s、61.6℃1 min为PCR扩增阶段,共35次循环;内参GAPDH反应条件为:95℃30 s为预变性阶段,95℃45 s溶解、61℃30 s退火、72℃34 s延伸为PCR扩增阶段,共40次循环。待反应结束后,分析溶解曲线和扩增曲线,结果使用软件以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对基因表达分析,各目标菌群扩增曲线,见图3。

1.6 统计学处理

数据运用SPSS 26.0和Graphpad Prism 9统计软件进行统计学分析和图形制作。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组数据间比较采用t检验;不符合正态分布的计量资料以中位数(P_{25} , P_{75})表示,数据间比较采用非参数秩和检验;等级资料使用非参数秩和检验分析;相关分析采用Pearson相关性分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本信息及一般临床指标比较

NAFLD组与健康对照组相比,年龄、BMI、腰围、臀围、FPG、HbA1C、HOMA-IR、TG、ALT、γ-GGT、TBA、UA、GFR升高,HDL-C降低,差异有统计学意义($P<0.05$);2组间性别、

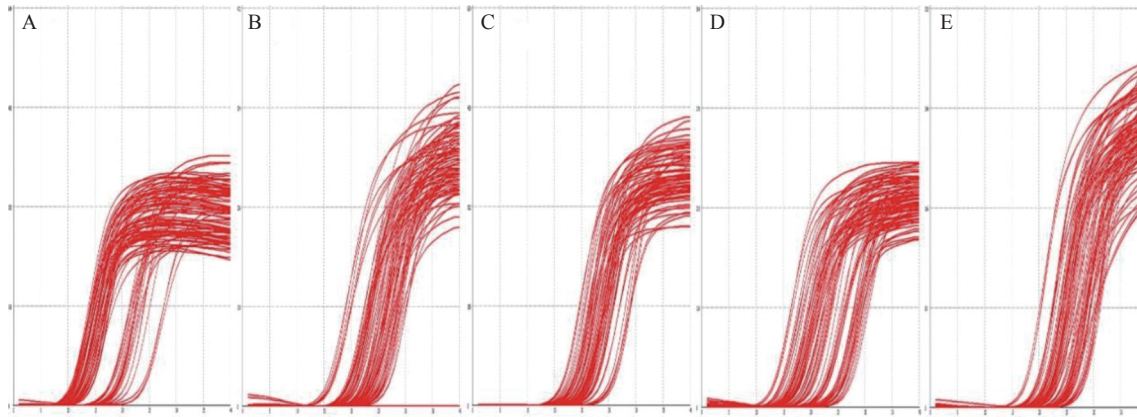


图 3 肠道目标菌群 PCR 扩增曲线图

Fig. 3 The real-time PCR curve of the target intestinal flora

A: 直肠真杆菌; B: 乳酸杆菌; C: 多形拟杆菌; D: 双歧杆菌; E: GAPDH。

表 1 引物及内参序列

Tab. 1 The sequences of primer and internal reference

细菌名称	序列(5'-3')
直肠真杆菌	F: GGGTGACCGCCACATTGGG R: ATCAGACTTGCCGCACCGCC
乳酸杆菌	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG
双歧杆菌	F: GATTCTGGCTCAGGATGAACGC R: CTGATAGGACGCGACCCAT
多形拟杆菌	F: CCGCCTCCGTTAGCTGCGTG R: ACGTAGGCTGCACAGCCGGT
GAPDH(内参)	F: TCGGCATCATCGAAGGTCTG R: TGCCATTCAAGTTCTGGCAGT

F: 上游引物 R: 下游引物

TC、LDL-C、AST 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.2 研究对象 TMAO 及其前体代谢物比较

与健康对照组相比, NAFLD 组 TMAO、TMA 及胆碱水平均明显高于健康对照组 ($P < 0.05$)。但 2 组间甜菜碱和左旋肉碱的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。进一步对 2 组肝脏脂肪含量与 TMAO、TMA 及胆碱进行相关性分析, 发现肝脏脂肪含量与 TMAO 的水平具有正相关性 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.3 研究对象肠道目标菌群表达量比较

与健康对照组相比, NAFLD 组乳酸杆菌、直肠真杆菌表达量明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 双歧杆菌、多形拟杆菌数量明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.4 研究对象 TMAO 和肠道菌群之间的关系

将 4 种肠道菌群表达量的计算结果与 TMAO

水平进行相关性分析, 结果显示 TMAO 水平与直肠真杆菌表达量呈正相关 ($r = 0.280$, $P < 0.05$), 与双歧杆菌的表达量呈负相关 ($r = -0.332$, $P < 0.05$), 与乳酸杆菌、多形拟杆菌表达量无明显相关 ($P > 0.05$), 见表 6。

2.5 研究对象饮食结构比较

对研究对象饮食结构问卷的结果进行差异分析 (等级以 A=4, B=3, C=2, D=1 进行分析), 结果显示 NAFLD 组与健康对照组受试者在膳食搭配、每周食用鱼类频率的差异上有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余饮食结构无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 7。进一步对饮食结构与肝脏脂肪含量进行相关性分析发现, 肝脏脂肪含量越高, 受试者膳食搭配上荤菜占比越多 ($r > 0$, $P < 0.05$), 每周食用鱼类的次数越少 ($r < 0$, $P < 0.05$), 见表 8。

3 讨论

许多证据表明, 肝脏和肝外脂质代谢异常是 NAFLD 进展过程中的中心驱动因素^[14], 血脂异常是 NAFLD 的共同代谢特征, 其特征为 TG 升高、HDL-c 降低、LDL-c 升高^[15]。NAFLD 与肥胖密切相关, 肥胖人群中 NAFLD 的患病率及其危险因素已经引起了相当大的关注^[16]。

本研究结果显示, NAFLD 患者年龄、BMI、腰围、肝功能、血脂、尿酸、糖代谢指标明显异常, 提示年龄、BMI、腰围、血脂异常都是 NAFLD 的危险因素, 与糖脂代谢密切相关, 肝脏脂肪堆积影响肝功能, 特别是 ALT 和 GGT, 可促进 NAFLD 的进展。与健康对照组相比, NAFLD 组胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 明显升高, 进一步验证了胰岛素抵抗在 NAFLD 发病机制中发挥重

表 2 2 组受试者的一般临床指标比较 [$M(P_{25}, P_{75})/\bar{x} \pm s$]Tab. 2 Comparison of the general data between the two groups [$M(P_{25}, P_{75})/\bar{x} \pm s$]

临床指标	NAFLD组($n=86$)	健康对照组($n=32$)	Z/t	P
性别(男/女)	49/37	12/20	3.543	0.060
年龄(岁)	50.63±15.02	40.34±12.47	3.454	0.001*
BMI(kg/m ²)	25.01±3.04	21.06±2.23	6.794	<0.001*
腰围(cm)	93.5(84.75, 102.25)	81.5(75.25, 84.0)	-5.911	<0.001*
臀围(cm)	99.5(94.0, 105.0)	93.0(89.25, 95.75)	-4.318	<0.001*
FPG(mmol/L)	5.77(5.05, 7.67)	4.96(4.09, 5.25)	-4.147	<0.001*
HbA1C(%)	6.65(5.70, 9.25)	5.45(5.33, 5.58)	-6.861	<0.001*
HOMA-IR	2.46(0.52, 3.82)	0.27(0.23, 0.50)	-6.435	<0.001*
TC(mmol/L)	4.65±1.17	4.45±0.75	0.873	0.385
TG(mmol/L)	2.25(1.64, 3.33)	0.89(0.70, 1.30)	-5.203	<0.001*
HDL-C(mmol/L)	1.03±0.26	1.34±0.33	-5.386	<0.001*
LDL-C(mmol/L)	2.93±1.06	2.71±0.59	1.128	0.262
AST(IU/L)	21.00(16.05, 27.33)	21.35(14.60, 25.28)	-1.595	0.111
ALT(IU/L)	23.75(15.68, 36.90)	15.15(12.23, 20.18)	-3.562	<0.001*
γ-GGT(U/L)	46.50(23.00, 83.00)	18.50(13.25, 27.50)	-5.238	<0.001*
TBA(μmol/L)	3.85(2.20, 7.15)	1.6(0.95, 3.10)	-2.177	0.030*
UA(μmol/L)	390.92±124.92	328.80±70.15	2.657	0.009*
GFR(mL/min)	103.05(82.25, 130.81)	84.86(69.03, 107.11)	-2.851	0.004*

* $P < 0.05$ 。表 3 2 组受试者 TMAO 及其前体代谢物比较 [$M(P_{25}, P_{75})/\bar{x} \pm s$]Tab. 3 Comparison of TMAO and its precursor metabolites between the two groups [$M(P_{25}, P_{75})/\bar{x} \pm s$]

代谢物	NAFLD组($n=86$)	健康对照组($n=32$)	Z/t	P
TMAO(ng/mL)	240.20(148.97, 386.84)	136.94(100.40, 246.37)	-3.584	<0.001*
TMA(ng/mL)	186.88(146.30, 278.83)	141.84(114.62, 231.03)	-2.312	0.021*
胆碱(ng/mL)	1 882.20±442.22	1 582.59±538.60	3.079	0.003*
甜菜碱(ng/mL)	4 121.55±973.57	4 175.00±855.83	-0.274	0.785
左旋肉碱(ng/mL)	7 736.19±2 334.51	8 084.90±1 703.53	-0.771	0.442

* $P < 0.05$ 。

表 4 肝脏脂肪含量与 TMAO、TMA 及胆碱相关性

Tab. 4 Correlation between liver fat content and TMAO, TMA and choline

项目($n=118$)	相关系数(r)	P
TMAO	0.250	0.043*
TMA	0.182	0.143
胆碱	0.173	0.166

* $P < 0.05$ 。

要作用。在饮食结构方面,若荤菜比例较高、鱼类等白肉较少的饮食可能促进 NAFLD 发展。

目前 NAFLD 的临床诊断涉及各种程序,如血液检查、B 超、瞬时弹力描记术和 MRI,但在

临床实践中很难区分非特异性症状(HBV 相关肝炎、酒精性肝炎和肝硬化),这表明临床应用中仍然需要有效和可重复的生物标志物^[17]。

TMAO 作为肠-肝轴的代谢产物,对心脑血管疾病、慢性肾脏病等疾病的影响得到越来越多证据的支持^[18-19],而与 NAFLD 关系的研究相对较少。Flores-Guerrero JL 等^[20]发现血浆 TMAO 浓度与 NAFLD 患者的全因死亡率相关。在本研究中,NAFLD 组相比健康对照组 TMAO 及前体物质 TMA 水平明显增高,且 TMAO 水平与肝脏脂肪含量呈正相关性,显示血清 TMAO、TMA 水平与 NAFLD 的存在和严重程度存在不良关联,推测 TMA/FMO3/TMAO 作为肠道菌群驱动的一个通

表 5 2 组受试者 4 种肠道菌群表达量比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]Tab. 5 Comparison of the expression levels of intestinal microbiota in the two groups [$M(P_{25}, P_{75})$]

肠道菌群	NAFLD组($n=86$)	健康对照组($n=32$)	Z	P
直肠真杆菌	3.24(1.64, 10.60)	0.93(0.27, 2.12)	-4.240	<0.001*
乳酸杆菌	9.71(0.16, 26.26)	1.06(0.46, 5.18)	-2.450	0.014*
多形拟杆菌	0.62(0.10, 3.57)	2.80(0.35, 11.08)	-2.217	0.027*
双歧杆菌	0.05(0.004, 0.30)	1.18(0.26, 2.90)	-5.453	<0.001*

* $P < 0.05$ 。表 6 TMAO 水平与 4 种肠道菌群表达量相关性($n=118$)Tab. 6 Correlation between TMAO and the expression levels of intestinal microflora($n=118$)

项目	相关系数(r)	P
直肠真杆菌	0.280	0.004*
乳酸杆菌	0.163	0.097
多形拟杆菌	-0.161	0.101
双歧杆菌	-0.332	0.001*

* $P < 0.05$ 。

表 7 饮食结构在 2 组间的差异

Tab. 7 Differences in dietary structure between the two groups

	是否按时就餐	膳食搭配(荤/素)	每日饮水量(ml)	鸡蛋	牛奶	鱼类	红肉	动物内脏	水果	油腻油炸食物	甜食饮料
Z	-0.473	-3.251	-0.136	-0.091	-0.226	-3.500	-0.882	-0.313	-0.898	-0.073	-0.482
P	0.636	0.001*	0.892	0.928	0.821	<0.001*	0.378	0.755	0.369	0.942	0.630

* $P < 0.05$, 食物种类食用频率均为每周次数。表 8 肝脏脂肪含量与饮食结构的相关性($n=118$)Tab. 8 Correlation between liver fat content and diet structure($n=118$)

项目($n=118$)	相关系数(r)	P
膳食搭配(荤/素)	0.345	0.004*
鱼类(每周次数)	-0.289	0.019*

* $P < 0.05$ 。

路, 可能促进 NAFLD 进展。

有研究显示, TMAO 可能是通过降低总胆汁酸池大小、限制胆汁酸的肠肝循环; 并通过改变胆汁酸的合成和运输来逆转胆固醇运输、葡萄糖和能量平衡的方向, 影响肝脏胰岛素抵抗及脂质沉积, 从而导致脂肪组织炎症反应^[21-22]。

胆碱作为人体必需的营养物质, 具有多种生物学功能, 参与多个体内代谢过程, 如果膳食摄入胆碱减少、胆碱内源性生物合成受损, 或胆碱的生物利用度降低, 都会增加肝内脂质, 导致脂肪肝形成^[23]。在本研究中 NAFLD 组相比健康对照组, 血清胆碱水平明显升高, 推测 NAFLD 患者可能是胆碱生物利用度降低, 导致肝脏脂质

堆积。

大量临床和动物研究表明, NAFLD 的发展与肠道微生物群失调密切相关, 其中厚壁菌门和拟杆菌门之间的平衡改变发挥重要作用, 多种菌参与调节肠道内 TMA 的合成^[24-25]。Cho C.E 等^[26]研究显示, 血清 TMAO 水平较高的人群厚壁菌门与拟杆菌门的比值增高, 而 TMAO 水平较低人群的厚壁菌门与拟杆菌门比值减小。本课题组前期研究也发现了肠道菌群结构在 NAFLD 患者的改变, 其中乳酸杆菌、直肠真杆菌数量明显增多, 双歧杆菌、多形拟杆菌数量明显减少, 其中多形拟杆菌为拟杆菌门代表菌, 直肠真杆菌为厚壁菌门代表菌^[13], 本次研究结果与之相符。笔者研究还发现血清 TMAO 水平与直肠真杆菌表达量存在正相关性, 与双歧杆菌存在负相关性, 2 种菌群都只是各种所属菌门中的 1 种, 这可为我们探索 TMAO 与各菌门之间关系提供依据和方向。

本研究的不足之处: 首先, TMA/FMO3/TMAO 作为一个物质代谢通路, 本研究仅检测了研究对象血清 TMA 和 TMAO 的水平, 未能采集到足够的肝脏样本检测肝组织 FMO3 表达水平。其次,

TMAO 及其前体代谢物水平受饮食因素影响较大, 笔者进行饮食结构问卷上着重调查受试者日常的饮食结构, 未明确到取样前的饮食摄入种类及量, 未能更好体现 TMAO 及其前体代谢物与饮食的关系。另一方面, 在本研究中纳入的健康对照组例数较少, 在今后的研究中需要更多的证据支持, 进一步探索 TMAO 在 NAFLD 中的作用。

综上所述, 肠-肝轴是 NAFLD 发生和发展的关键组成部分, 连接肠道微生物群和肝脏的确切机制是复杂的, 且肠-肝轴的靶向性一直是代谢性疾病的焦点, 并可能成为未来预防和治疗 NAFLD 的当务之急, 值得进一步深入研究。以 TMAO 为靶点探索 NAFLD 的防治手段, 首先推荐改善生活方式和控制饮食, 饮食成分是增加人体循环中 TMAO 及其前体代谢物水平的最重要因素之一, 合理的膳食搭配可能对 NAFLD 起到积极的影响。从 TMAO 生成的途径看, 肠道微生物群在其中起到至关重要的作用, 可将改变肠道菌群的组成作为策略, 同时, 抑制 TMA/FMO3/TMAO 途径有望成为治疗 NAFLD 的新靶点。

[参考文献]

- [1] 张金俊, 吕梦, 陈浩, 等. 我国成人非酒精性脂肪性肝病患病率的meta分析[J]. 职业与健康, 2023, 39(21): 3000-3003.
- [2] Xiao S Y, Xie W H, Zhang Y H, et al. Changing epidemiology of cirrhosis from 2010 to 2019: Results from the Global Burden Disease study 2019[J]. *Ann Med*, 2023, 55(2): 2252326.
- [3] Fang J, Yu C H, Li X J, et al. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 8(12): 997018.
- [4] Nawrot M, Peschard S, Lestavel S, et al. Intestine-liver crosstalk in type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Metabolism*, 2021, 10(123): 154844.
- [5] Wang Z, Klipfell E, Bennett B J. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.
- [6] Janeiro M H, Ram í rez M J, Milagro F I, et al. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in disease: Potential biomarker or new therapeutic target[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1398.
- [7] Jalandra R, Dalal N, Yadav A K, et al. Emerging role of trimethylamine-N-oxide (TMAO) in colorectal cancer[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(20): 7651-7660.
- [8] Tang W H, Wang Z, Kennedy D J. 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*, 2015, 116(3): 448-455.
- [9] León-Mimila P, Villamil-Ram í rez H, Li X S, et al. Trimethylamine N-oxide levels are associated with NASH in obese subjects with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab*, 2021, 47(2): 101183.
- [10] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2010, 2(4): 43-48.
- [11] Motamed N, Faraji A H, Khonsari M R, et al. Fatty liver index (FLI) and prediction of new cases of non-alcoholic fatty liver disease: A population-based study of northern Iran[J]. *Clin Nutr*, 2020, 39(2): 468-474.
- [12] Xia M F, Lin H D, Yan H M, et al. The association of liver fat content and serum alanine aminotransferase with bone mineral density in middle-aged and elderly Chinese men and postmenopausal women[J]. *J Transl Med*, 2016, 13(14): 11.
- [13] 薛平燕, 江艳, 徐玉善, 等. 肠道菌群结构在非酒精性脂肪性肝病患者中的改变[J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41(11): 62-67.
- [14] Eslam M, Sanyal A J, George J, et al. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1999-2014.
- [15] Angelico F, Baratta F, Pastori D, et al. Statins and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Liver Int*, 2019, 39(9): 1787.
- [16] Polyzos S A, Kountouras J, Mantzoros C S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics[J]. *Metabolism*, 2019, 3(92): 82-97.
- [17] Cusi K, Isaacs S, Barb D, et al. American association of clinical endocrinology clinical practice guideline for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease in primary care and endocrinology clinical settings: Co-Sponsored by the American association for the study of liver diseases(AASLD) [J]. *Endocr Pract*, 2022, 28(5):

- 528–562.
- [18] Hemmati M, Kashanipoor S, Mazaheri P, et al. Importance of gut microbiota metabolites in the development of cardiovascular diseases (CVD) [J]. *Life Sci*, 2023, 15(329): 121947.
- [19] Saaoud F, Liu L, Xu K, et al. Aorta- and liver-generated TMAO enhances trained immunity for increased inflammation via ER stress/mitochondrial ROS/glycolysis pathways [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(1): e158183.
- [20] Flores-Guerrero J L, Post A, Dijk P R, et al. Circulating trimethylamine-N-oxide is associated with all-cause mortality in subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2021, 41(10): 2371–2382.
- [21] Chen Y M, Liu Y, Zhou R F, et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults [J]. *Sci Rep*, 2016, 8(6): 19076.
- [22] Gao X, Liu X F, 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.
- [23] Yu D X, Shu X O, Xiang Y B, et al. Higher dietary choline intake is associated with lower risk of nonalcoholic fatty liver in normal-weight Chinese women [J]. *J Nutr*, 2014, 144(12): 2034–2040.
- [24] Ji Y, Yin Y, Sun L J, et al. The molecular and mechanistic insights based on gut-liver axis: Nutritional target for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Improvement [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3066.
- [25] Muralitharan R R, Marques F Z. Diet-related gut microbial metabolites and sensing in hypertension [J]. *J Hum Hypertens*, 2021, 35(2): 162–169.
- [26] Cho C E, Taesuwan S, Malysheva O V, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(1): 1600324.