

3, 3-二甲基-1-丁醇抑制肠道三甲胺生成可缓解溃疡性结肠炎及继发性肝损伤

王鑫楠^{1,2}, 刘丽芳^{1*}

(¹ 中国药科大学中药学院生药学系, 南京 211198; ² 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

摘要 溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是多种因素导致的肠道慢性疾病, 严重的肠炎会引起肝脏损伤。肠道炎症诱发菌群紊乱, 导致肠道中过多的胆碱转化为三甲胺; 宿主中过低的胆碱生物利用度是造成肝脏损伤的重要原因。3, 3-二甲基-1-丁醇 (3,3-dimethyl-1-butanol, DMB) 作为胆碱的结构类似物, 可有效抑制肠道中胆碱转化为三甲胺, 本研究旨在探究 DMB 能否通过减少肠道内的胆碱的不良转化来改善 UC 小鼠结肠炎症及继发性肝损伤。采用葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎模型, 造模结束后, 评估结肠及肝组织病理, 检测肝功能相关生化指标, 使用超高效液相色谱串联质谱法检测 UC 所致的体内胆碱代谢变化。结果表明, DMB 能够减轻 UC 小鼠体重下降指数, 缓解结肠炎症, 减少肝脏损伤, 对小鼠的血清、肠道内容物与肝脏进行胆碱相关代谢物的检测, 发现 DMB 能够有效抑制肠道中胆碱转化为三甲胺, 提高宿主的胆碱利用度, 有效缓解结肠炎的恶化, 从而减少由于严重的肠道病变导致的肝脏受损。

关键词 胆碱代谢; 结肠炎; 肠道菌群代谢; 三甲胺

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)02-0246-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023080801

引用本文 王鑫楠, 刘丽芳. 3, 3-二甲基-1-丁醇抑制肠道三甲胺生成可缓解溃疡性结肠炎及继发性肝损伤 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(2): 246–256.

Cite this article as: WANG Xinnan, LIU Lifang. 3, 3-Dimethyl-1-butanol attenuates ulcerative colitis and secondary liver injury by reducing trimethylamine production[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(2): 246–256.

3, 3-Dimethyl-1-butanol attenuates ulcerative colitis and secondary liver injury by reducing trimethylamine production

WANG Xinnan^{1,2}, LIU Lifang^{1*}

¹Department of Pharmacognosy, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

²Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China

Abstract Ulcerative colitis (UC) is a chronic intestinal disease caused by a variety of factors. Severe intestinal inflammation can also cause liver injury. Based on the previous research, microbial dysbiosis in the inflammatory state leads to the conversion of excess choline into trimethylamine (TMA) by the intestinal flora, which competes with the host for the use of the nutrient choline, and induces liver injury. 3, 3-dimethyl-1-butanol (DMB), a structural analogue of choline, can reduce TMA levels from choline conversion. The aim of this study was to investigate the protective effect and possible mechanism of DMB on UC and secondary liver injury. Dextran sulfate sodium-induced acute colitis model in mice was established. The weight of mice, and collected serum, liver and intestinal contents after mice sacrifice were measured. The morphological changes of colon and liver were observed; liver function was detected with the kit of biochemical indexes; UHPLC-MS/MS was applied to detect changes in choline metabolism *in vivo*. The experimental results showed that DMB could attenuate body weight loss index, improve colonic inflammation, and reduce liver injury in UC mice. The detection of choline-related metabolites in serum, intestinal contents and liver showed that DMB could effectively inhibit the production of trimethylamine in the intestine, improve the availability of host choline, effectively alleviate colitis

收稿日期 2023-08-08 * 通信作者 Tel: 13813941057 E-mail: liulifang69@126.com

基金项目 国家自然科学基金项目 (No.82074089)

鉴于 DMB 的结构特征,它可能是相对无毒的,并且作为一种天然产品存在于现有的食品或酒水饮料中。参考“Drugging the gut microbiota”的概念,借助 DMB,抑制肠道内胆碱转化为 TMA,提高胆碱生物利用度,考察 DMB 能否改善结肠炎及继发性肝损伤。本研究建立了胆碱代谢的定量方法,用于检测葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)诱导的 UC 小鼠体内的胆碱代谢变化,进一步明确服用 DMB 后对肠道菌群与宿主的胆碱代谢所产生的影响。

1 材料

1.1 试剂

通用型组织固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司);葡聚糖硫酸钠(美国 MP Biomedicals 公司);丙氨酸氨基转移酶(ALT/GPT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST/GOT)与碱性磷酸酶(AKP)测试盒(南京建成生物工程研究所);乙腈(质谱级)、甲醇(质谱级)、甲酸(色谱级)、甲酸铵(色谱级)、胆碱(99%)、乙酰胆碱(99%)、三甲胺盐酸盐(98%)、甜菜碱(98%)、卵磷脂(98%)、三甲胺 *N*-氧化物二水合物(98%)、DMB 与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)(纯度 99%)(上海阿拉丁生化科技公司);氯化胆碱-(三甲基-d9)(纯度 98%,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 仪器

UHPLC system Qsight LX50 液相色谱仪、Qsight 220 质谱仪(美国 PerkinElmer 公司);组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司);5415D 离心机、移液器(1000/200/50/10 μ L)(美国 Eppendorf 仪器有限公司);NanoZoomer 2.0 RS 数字病理切片扫描仪(日本 Hamamatsu 公司);BP 211D 精密天平(德国 Satorius 有限公司);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 动物

雄性 C57BL/6J 小鼠,6~8 周龄,体重 16~20 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于中国药科大学动物实验中心。所有动物研究均遵循国际医学伦理规范,并经中国药科大学动物伦理委员会批准。

2 方法

2.1 急性结肠炎造模与样本收集

将小鼠适应性饲养 1 周,根据体重随机分为 4

组,依次为空白对照组(Control)、模型组(Model)、DMB 低剂量组(DMBL)及高剂量组(DMBH),每组 10 只。(1)空白对照组:常规饲料喂养,正常饮水;(2)模型组:本实验所用模型是为期 10 d 的急性小鼠 UC 模型。第 1 天开始自由饮用 2.5% DSS 水溶液,持续 7 d,每天更换新的 DSS 溶液,第 8 天撤掉 DSS 溶液,换为正常饮用水,持续 3 d;(3)DMB 高低剂量组:结合文献和 DMB 的毒性调研,其对啮齿类动物的半数致死量为 350~500 mg/kg,称取相应质量的 DMB 溶液,溶于 DSS 溶液中,配制成 0.1% 和 0.3% 的浓度(即 100 mL 0.1 g 和 0.3 g),低剂量为 100 mg/kg,高剂量为 300 mg/kg。

在动物实验的整个过程中,每天观察小鼠的精神状态、饮食、粪便性状及体重并进行记录。三者综合进行疾病活动指数评分(DAI)^[13]。每个参数的评分 0~4:体重减轻(0, <5%; 2, 6%~10%; 4, >10%);粪便黏附度(0, 正常粪便; 2, 粪便松散; 4, 腹泻);直肠出血情况(0, 正常粪便; 2, 粪便中带血丝或黑褐色粪便; 4, 红棕色或暗红色血便)。DAI=(粪便黏附度评分+直肠出血情况评分+体重减轻评分)/3。

第 9 天对所有组小鼠做禁食处理,第 10 天采用摘眼球取血法,血样在室温下静置,4 $^{\circ}$ C 下 3000 r/min 离心 15 min,轻轻吸取上层淡黄色血清,将血清置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。收集完血清样本之后,将小鼠脱颈椎处死,打开腹腔,分别收集结肠、结肠内容物、肝脏样本放入干净 EP 管中。结肠与肝脏组织固定部位剪下,分别放入通用型组织固定液中用于苏木精-伊红(HE)染色。其余结肠与肝脏分别放入对应的 EP 管中,置-80 $^{\circ}$ C 保存,用于后续的实验。HE 染色送样至中国药科大学病理与 PDX 药效评价平台。参照 Morris 标准评分^[14],求和并取均值:0, 结肠组织正常;1, 轻度炎症,固有层炎症浸润,基底 1/3 受损;2, 中度炎症,黏膜及黏膜下层炎症浸润,基底 2/3 受损,表面上皮完整;3, 重度炎症,透壁,整个隐窝和上皮丢失。

2.2 酶标仪法检测小鼠血清中 ALT、AST 及碱性磷酸酶

参考南京建成生物工程研究所有限公司试剂盒说明书,检测各组小鼠血清中 ALT、AST 的活力。按照说明书添加试剂,测定各孔在 510 nm 波长处的吸收度。利用绘制的标准曲线计算出各血清样本中的酶活力。参考试剂盒说明书,检测各组

小鼠血清中 AKP 的水平。按照说明书添加试剂, 然后立即测定各孔在 520 nm 波长处的吸收度。

2.3 UPLC-QQQ-MS/MS 测定小鼠肝脏、血清与肠道内容物中的胆碱代谢

2.3.1 样品前处理

血清样品: 取血清样品 5 μL 置于 1.5 mL 离心管, 加入 80% 乙腈(含 0.1% 甲酸)100 μL 提取, 涡旋 10 min, 超声 10 min, 高速离心(13 000 r/min, 10 min), 取上清溶液 50 μL 。氮气吹干之后, 用复溶液(含有内标的提取溶液)100 μL 溶解, 高速离心, 取上清液 10 μL 置于内衬管, 加复溶液 90 μL , 待测。

肝脏样品: 取肝脏组织样品 10 mg 置于 2.0 mL 离心管, 加入 80% 乙腈(含 0.1% 甲酸)400 μL 提取, 涡旋 10 min, 超声 10 min, 高速离心, 取上清溶液 20 μL 。氮气吹干之后, 用复溶液 200 μL 溶解, 高速离心, 取上清液 50 μL 置于内衬管, 加复溶液 50 μL , 待测。

肠道内容物样品: 取内容物样品 2 mg 置于 2.0 mL 离心管, 加入 80% 乙腈(含 0.1% 甲酸)400 μL 提取, 涡旋 10 min, 超声 10 min, 高速离心, 取上清溶液 20 μL 。氮气吹干之后, 用复溶液 100 μL 溶解, 高速离心, 取上清液 50 μL 置于内衬管, 加复溶液 50 μL , 待测。

2.3.2 方法学考察

线性考察: 溶剂标曲和基质标曲的梯度浓度样品, 按照从低浓度到高浓度分别测定之后, 以待测物和内标峰面积的比值为纵坐标, 以待测物浓度作为横坐标求得线性回归方程(溶剂标准曲线和基质标准曲线)。

定量限与检测限: 取信噪比大于 10 的浓度点, 平行测量 6 次, RSD 小于 20% 的样品浓度作为定量限。继续稀释, 平行测量 6 次, 直到信噪比大于 3, RSD 小于 20% 的样品浓度作为检测限。

基质效应: 通过修正性 t 检验来进行验证, 比较溶剂标曲与基质标曲的斜率是否存在显著性差异, 来进行评估。算出 t -value 后, 根据自由度, 核对(t -test)临界值表, 判断是否存在显著性差异^[15]。

精密度和准确度: 取基质标曲中, 低、中、高浓度质控样品, 1 d 内重复测定 6 次, 带入基质标准曲线计算浓度 c , 计算 c 和空白样品的相对误差(relative error, RE), 求 6 次测量的平均值作为日内准确度, RSD 作为日内精密密度; 在 3 d 内对选定的 3 个浓度

进行重复测定 9 次, 以 9 次测量的平均值作为日间准确度, RSD 作为日间精密密度。

回收率: 按照此公式进行计算 $\text{recovery} = (c_s - c_n)/c_t \times 100\%$, 将低中高浓度质控样品, 分别带入空白溶剂标准曲线计算浓度 c_s , c_s 为加标的 QC 样品, c_n 为不加标的空白样品, c_t 为标准品加入的理论浓度^[16]。

2.3.3 UHPLC-QQQ-MS/MS 分析

色谱条件: UHPLC 采用液相色谱仪 Qsight LX50, 色谱柱为 Acquity BEH HILIC(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm); 流动相(A): 0.1% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵的水溶液; 流动相(B): 乙腈。梯度洗脱程序: 1~2 min, 80%~75%B; 2~3 min, 75%~65%B; 3~5 min, 65%~50%B; 5~5.5 min, 50%~40%B; 5.5~6.0 min, 80%B。柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速 0.2 mL/min。进样量: 2 μL 。

质谱条件: 采用质谱仪 Triple Quad Qsight 220, ESI 离子源, 利用正离子 MRM 多重反应监测模式对待测物进行定量。离子对及电压参数见表 1。

2.4 统计分析

数据使用 SPSS 19.0 软件和 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组独立样本的均值比较使用 Mann-Whitney U 检验进行显著性差异检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 表示差异极显著。

3 结 果

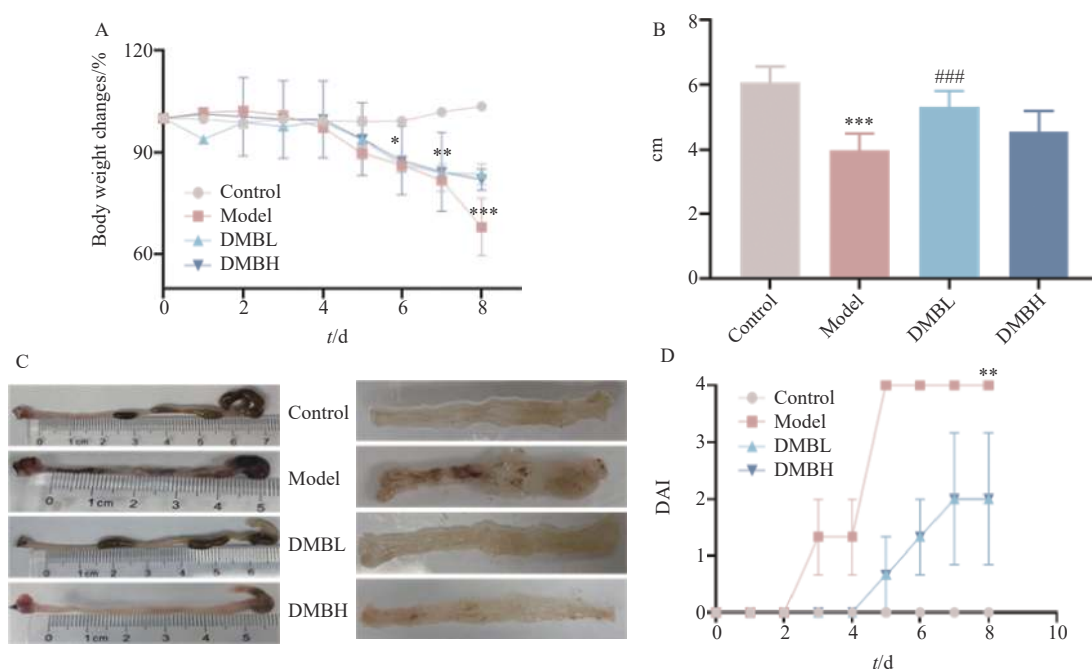
3.1 饮用 DMB 溶液能够缓解小鼠结肠炎

整个实验过程中, 正常对照组小鼠体重稳定增长, 饮食饮水量均正常, 粪便正常, 为棕黄色成型软便。UC 模型组自由饮用 2.5% 的 DSS 溶液 3 d 后, 体重下降缓慢, 第 4 天呈现显著下降, 且开始出现便血, 粪便呈稀状。第 5 天开始, 体重下降与便血情况更加严重, 小鼠后期的肛周可见血痂, 表明 UC 小鼠模型造模成功。DMB 高低剂量组能够有效缓解由结肠炎导致的体重下降(图 2-A)。在造模过程中, DMB 组的小鼠的生存情况要明显好于模型组。不同组别的小鼠结肠长度如图 2-B 所示。造模结束后, 正常组小鼠肠壁光滑透亮, 无增厚或增生的情况, 未见明显充血, 各个肠段形态正常, 结肠内容物成型。模型组小鼠结直肠长度明显缩短, 结肠内容物不成型, 出现血便, 腥臭(图 2-C)。DMB

Table 1 MRM transition parameters, LLOD, LLOQ, and RSD for the targeted analytes in choline metabolism

Analyte	MRM	DP ^a	CE ^b	Sensitivity			
				LLOD/ (ng/mL)	RSD	LLOQ/ (ng/mL)	RSD
TMA	60.1>45.1	25	20	2	16.95	5	10.34
TMAO	75.9>59.1	40	30	0.5	16.39	2	7.74
CHO	104.0>45.0	100	35	0.005	19.05	0.05	14.24
CHO-D9 (IS)	113.1>69.0	100	35				
ACH	147.2>88.0	70	20	0.05	14.69	0.1	14.91
Bet	118.1>59.1	120	30	0.1	8.46	0.5	7.97
PC	758.2>86.0	130	40	5	14.56	10	12.66
DMPC (IS)	678.4>86.0	130	40				

a:Declustering potential;b:Collision energy

TMA: Trimethylamine; TMAO: Trimethylamine *N*-oxide; CHO: Choline; Bet: Betaine; PC: Phosphatidylcholine; ACH: Acetylcholine; CHO-D9: Chloride-(trimethy-d9) choline; DMPC: 1 2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine**Figure 2** Influence of oral DMB on colitis miceA: Percentage change chart of body weight; B: Mean colon length of each group; C: Representative images in each group; D: DAI score of each group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; $n \geq 6$)

低剂量组小鼠结肠长度要明显长于模型组, 结肠萎缩及充血现象得到明显改善。DMB 高剂量组的小鼠结肠长度有一定恢复, 但没有显著性差异。

3.2 DMB 改善结肠炎小鼠的结肠病理

正常对照组小鼠结肠黏膜上皮细胞完整, 隐窝正常并且可见许多杯状细胞, 固有层腺体形态正常且排列整齐, 未见炎性细胞浸润, 无变形坏死。UC 模型组小鼠结肠组织表现为严重的病变, 黏膜下层炎症, 表现为隐窝畸形, 结肠黏膜明显变薄, 黏膜上皮缺损且杯状细胞严重破坏, 并且肌层出现大量炎

性细胞的浸润。与模型组相比, DMB 高低剂量干预组小鼠结肠状况恢复良好, 结肠黏膜下层水肿减轻, 黏膜上皮细胞恢复完整并且可见部分杯状细胞, DMB 干预能明显减轻结肠炎状况(图 3)。

3.3 DMB 溶液改善结肠炎小鼠的肝脏病理与肝脏生化指标

通过肝脏病理表明, 正常组肝细胞分布均匀, 排列正常, 细胞核位于细胞中央, 包浆内颗粒感不明显。模型组肝细胞水肿, 肝小叶结构紊乱, 肝索拥挤; 肝细胞肿大, 肝囊扭曲、狭窄、闭塞, 肝细胞包

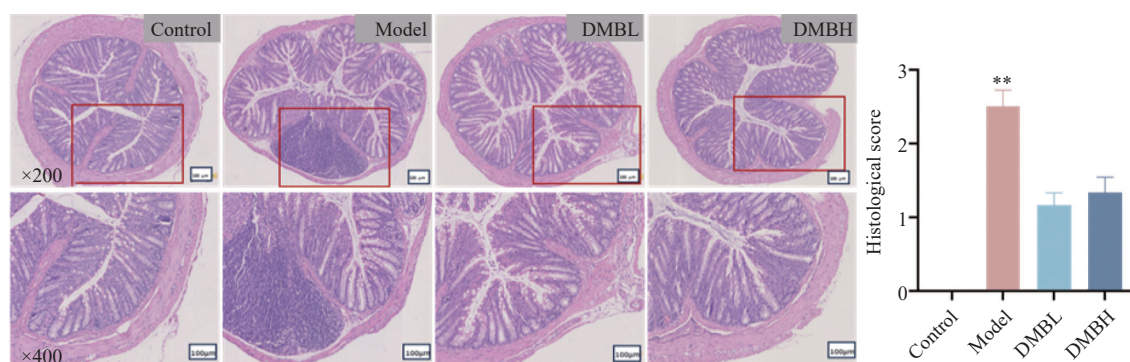


Figure 3 Hematoxylin and eosin staining of colon tissues and histological score in each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; $n \geq 6$ per group

浆疏松变孔,呈网状或透明,胞核悬浮于中央,染色变浅,双核细胞发生率增加,提示肝脏疾病严重。DMB 组的肝脏病理切片结果趋近于正常对照组,表明 DMB 能缓解由结肠炎导致的肝损伤(图 4-A)。

进一步表征结肠炎对肝功能的影响,测定了 DSS 诱导的模型组小鼠的血清中 ALT、AST 和 AKP 水平,如图 4-B 所示,结果显示与空白对照组相比,UC 小鼠的血清中 ALT 和 AST 水平显著升高,提示肝功能异常,DMB 组回调了这两项指标。UC 导致血清中 AKP 的水平出现明显下降,但 DMB 对其改变不明显。

3.4 胆碱代谢通路测定的方法学考察

线性考察结果见表 2,两条标准曲线拟合指数 R^2 均大于 0.99,说明具有良好的线性关系。在定量范围内,待测物的响应和浓度线性关系良好,能够保证该方法计算内容物中各个代谢物浓度的准确性。定量范围适中,能够满足不同浓度样品的测定。

该方法的灵敏度用定量限和检测限表示,如表 1 所示,LOD 在 0.005~5 ng/mL 范围内,相对标准偏差在 8.46%~19.05% 之间,LOQ 水平在 0.05~10 ng/mL 之间,相对标准偏差在 7.74 %~14.91% 之间。

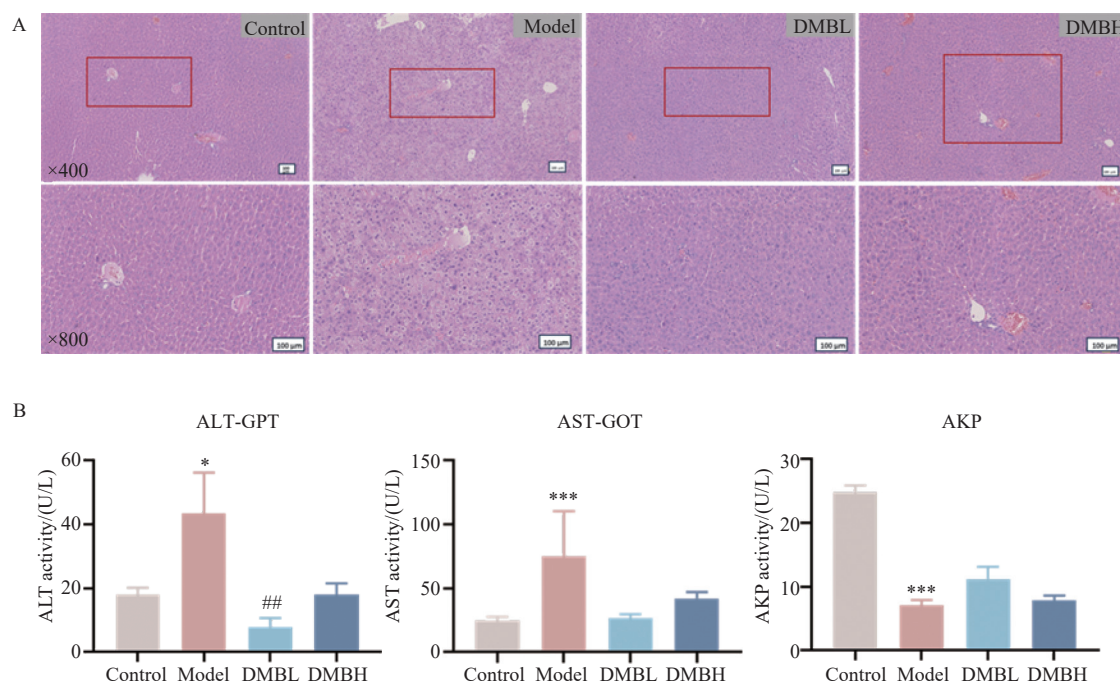


Figure 4 DMB intervention ameliorated secondary liver injury

A: Hematoxylin and eosin staining of liver tissues of each group; B: Alanine transaminase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) and alkaline phosphatase(AKP) activity in plasma

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, vs model group; $n \geq 6$ per group

Table 2 Solvent-only and matrix-matched calibration curves and R^2 of samples

Compd.	Solvent-only		Matrix-matched		Dynamic range/ (ng/mL)
	Calibration curves	R ²	Calibration curves	R ²	
Intestinal contents					
TMA	y = 0.001 7x + 0.005 7	0.995 3	y = 0.001 5x + 0.034 9	0.998 0	3.75–375
TMAO	y = 0.014 3x + 0.037	0.998 9	y = 0.013 0x + 0.039 3	0.998 0	1.25–125
CHO	y = 0.011 5x – 0.007 3	0.999 7	y = 0.011 2x + 1.927 9	0.997 8	5–500
ACH	y = 0.002 8x – 0.001	0.998 0	y = 0.002 7x + 0.002 5	0.993 1	0.5–50
Bet	y = 0.038 3x + 0.057 6	0.999 3	y = 0.034 3x + 0.975 8	0.999 0	1–100
PC	y = 0.770 3x + 0.021 7	0.997 5	y = 0.517 6x + 1.168 3	0.993 9	12.5–12 500
Liver					
TMA	y = 0.009 5x + 0.003 8	0.999 7	y = 0.008 9x + 0.196 8	0.997 2	1.25–125
TMAO	y = 0.016 2x + 0.040 2	0.998 8	y = 0.015 0x + 0.032 9	0.998 8	1.25–125
CHO	y = 0.011 6x + 0.022 7	0.999 9	y = 0.011 8x + 1.898 6	0.997 6	10–1 000
ACH	y = 0.001 3x – 0.000 7	0.999 2	y = 0.001 3x + 0.002 1	0.993 7	1.25–125
Bet	y = 0.018 1x + 0.048 1	0.999 3	y = 0.017 6x + 5.186 7	0.995 5	4–400
PC	y = 0.420 9x + 0.140 4	0.994 3	y = 0.353 3x + 11.624	0.991 8	300–30 000
Serum					
TMA	y = 0.005 7x + 0.019 7	0.995 5	y = 0.005 3x + 0.019 2	0.998 0	1.8–180
TMAO	y = 0.015 9x + 0.076 1	0.998 2	y = 0.015 0x + 0.050 2	0.999 8	2.25–225
CHO	y = 0.012 9x + 0.006 8	0.999 9	y = 0.013 4x + 0.922 9	0.999 5	6.75–675
ACH	y = 0.002 8x – 0.000 6	0.998 1	y = 0.002 8x + 0.000 5	0.998 0	0.9–90
Bet	y = 0.039 5x + 0.159 3	0.998 6	y = 0.037 1x + 0.801 1	0.999 7	4.5–450
PC	y = 0.000 6x + 0.077 5	0.995 0	y = 0.000 4x + 3.367 4	0.996 7	90–9 000

如表 3 所示, 日内精密度的 RSD 在 1.44%~13.33% 之间, 日间精密度的 RSD 在 1.21%~14.45% 之间, 说明仪器在检测时间内稳定。日内、日间准确度分别在 -18.76%~18.63% 和 -17.42%~18.58% 之间, 说明应用该方法定量表征血清、肠道内容物及肝脏中胆碱类生物标志物的准确度良好。

在基质效应的评估中, t -value 所对应的 P 都小于 0.05 所对应的临界值, 说明基质标曲与溶剂标曲的 K 不存在显著性差异, 说明基质效应对该方法干扰较小。在回收率评估中, 均值在 80.61%~114.08% 之间, 满足 80%~120% 的要求。

3.5 DMB 对结肠炎小鼠体内胆碱代谢的影响

胆碱是宿主必需的膳食营养物质, 是合成神经递质乙酰胆碱、细胞膜脂质卵磷脂和鞘磷脂, 以及甲基供体——甜菜碱所必需的^[17]。DSS 诱导的 UC 小鼠肠道内容物中的胆碱与 PC 水平显著性升高, 其来源可能是因为由于结肠黏膜损伤, 黏膜屏障的 PC 严重流失, 肠道菌群过度水解 PC, 产生游离胆碱^[18]。该发现与临床研究相一致, 黏膜损伤导致大量的 PC 水解为胆碱, 过多的胆碱转变为 TMA。

在模型组的肠道内容物中, TMA、胆碱与卵磷脂含量均发生显著性增加(图 5-A)。

DMB 组小鼠同时服用 DSS 与 DMB 混合的溶液后, 其肠道内容物中的胆碱代谢通路变化明显, DMB 组回调了 TMA、胆碱与卵磷脂的水平, 如图 5-A 所示。有研究表明, 含有胆碱的前体物质(如胆碱、甜菜碱、PC 等)也能够产生 TMA, DMB 能够抑制这些 TMA 的前体物质的产量。但在结果中仅观察到模型组的甜菜碱含量显著性增加, DMB 组对其存在一定的下调趋势, 但不具有显著性差别。在 DMB 减少 TMA 生成的同时, 肠道内的生成 TMA 的前体物质的含量也发生减少, 由此可以推断服用适当剂量的 DMB 能够减少肠道胆碱的不良转化, 提高宿主的生物利用度。

肠道菌群代谢胆碱形成 TMA, TMA 在肝脏中被氧化形成 TMAO, 这一代谢过程在非酒精性脂肪肝的发展中起到重要作用。如图 5-B 所示, TMA 在 DSS 诱导的结肠炎模型组的肝脏中出现了显著增加, 其主要来源于肠道胆碱类物质的转化。DMB 高低剂量组均显著抑制了肝脏中的 TMA 含量。DMB

Table 3 Methodological observations including precision and accuracy, recovery and matrix effects results

Analyte	Added/ (ng/mL)	Matrix effect	Recovery		Intraday		Interday	
		<i>t</i> -value	Mean/%	RSD/%	Accuracy/%	Precision/%	Accuracy/%	Precision/%
Intestinal contents								
TMA	15	0.270 3	101.01	8.87	−6.23	6.60	−3.61	14.45
	112.5		100.50	4.12	9.05	5.27	8.29	5.21
	187.5		105.43	6.29	9.60	7.95	10.40	9.62
TMAO	5	0.157 4	90.90	10.79	4.12	6.33	2.30	6.03
	37.5		102.91	4.94	7.61	7.39	6.44	6.95
	62.5		105.53	7.33	3.58	2.92	4.43	4.52
CHO	20	0.022 1	103.49	6.02	−9.57	3.31	−6.62	2.92
	150		97.78	9.96	−8.75	4.37	−9.17	3.24
	250		90.76	6.10	−2.45	4.87	−5.47	5.08
ACH	2	0.049 3	105.14	6.73	−1.71	13.33	5.14	4.67
	15		101.74	5.70	1.74	5.33	1.74	5.37
	25		116.08	4.01	18.63	3.69	17.33	4.45
BET	4	0.242 6	89.97	9.39	−17.39	2.62	−14.80	2.64
	30		97.01	4.44	−1.92	1.76	1.97	3.97
	50		101.98	6.18	3.11	4.42	−2.73	2.17
PC	50	0.354 3	95.34	9.21	14.74	7.99	−9.03	8.34
	375		86.83	6.45	−0.83	8.41	4.89	8.25
	625		108.79	9.52	−5.41	3.40	−12.20	2.45
Liver								
TMA	5	0.125 6	102.47	10.80	−18.76	8.67	−9.70	5.82
	37.5		89.42	7.39	−1.78	5.43	−0.49	4.72
	62.5		100.64	5.70	−13.82	12.16	−16.83	11.10
TMAO	5	0.127 5	97.05	7.78	7.09	5.16	8.26	4.79
	37.5		96.94	4.75	−3.98	5.12	−2.98	4.21
	62.5		93.64	3.49	−3.90	3.65	−4.63	3.05
CHO	40	0.024 8	112.08	5.20	17.38	6.02	11.81	2.68
	300		101.53	2.61	−5.49	1.76	−5.32	1.80
	500		101.44	2.09	−9.76	1.80	−9.39	1.71
ACH	5	0.016 0	114.08	6.74	17.77	7.92	14.91	5.56
	37.5		98.90	9.06	−2.11	8.36	−1.26	8.33
	2		96.19	5.70	−7.23	12.01	−6.09	12.78
BET	16	0.039 2	87.37	8.87	4.21	3.15	13.73	3.27
	120		102.23	5.56	−4.06	3.93	−5.54	3.65
	200		94.45	9.36	−2.06	3.01	2.23	1.63
PC	1200	0.189 5	104.40	11.21	−8.68	11.10	−14.11	11.17
	9000		89.23	6.76	0.25	9.22	−8.62	8.02
	15000		100.80	13.85	7.64	6.81	0.97	6.05
Serum								
TMA	7.2	0.157 4	80.61	9.82	−8.49	7.33	−11.82	4.36
	54		89.53	1.90	−8.46	1.73	−8.36	1.91
	90		96.75	4.49	−2.05	4.26	−0.62	2.45
TMAO	9	0.200 1	94.67	6.13	−4.87	4.39	−3.41	3.55
	67.5		97.22	2.93	−2.71	2.79	−3.37	2.42

(Continued)

Analyte	Added/ (ng/mL)	Matrix effect	Recovery		Intraday		Interday	
		<i>t</i> -value	Mean/%	RSD/%	Accuracy/%	Precision/%	Accuracy/%	Precision/%
CHO	112.5	0.058 0	99.08	1.48	-0.87	1.44	-0.75	1.53
	27		90.24	12.61	-9.60	5.87	7.13	10.52
	202.5		97.89	2.75	-0.67	2.02	0.17	1.21
	337.5		99.75	2.07	0.60	1.70	0.85	1.76
ACH	3.6	0.000 0	82.76	10.97	-17.24	10.35	-17.42	7.98
	27		97.06	3.61	-2.93	3.59	-4.00	2.26
	45		97.24	5.02	-2.75	5.00	-2.86	5.16
	18		95.90	5.94	-4.09	2.63	-3.40	2.73
BET	135	0.140 4	99.76	2.40	-0.23	2.07	-0.49	2.17
	225		101.85	2.44	1.85	2.23	1.77	2.44
	360		86.66	4.24	-10.91	3.58	4.86	3.27
PC	2 700	0.543 8	95.69	9.71	0.03	2.25	2.25	1.90
	4 500		111.36	11.95	14.75	5.98	18.58	5.36

口服后, TMAO 的含量也在低剂量组显著下降, 但高剂量组下降没有形成显著性差异。模型组肝脏中胆碱水平呈现下降趋势, 但不具有显著性差异。

血清中的胆碱代谢变化是肝脏与肠道内容物的集中反映。在结肠炎的发生过程中, 血清中也出现了 TMAO 的含量增加, 补充 DMB 可显著降低血浆 TMAO 水平。除此以外, 模型组血清中的胆碱与甜菜碱含量明显升高, DMB 高低剂量组均有一定的回调作用, 如图 5-C 所示。从组织整体性来看, DMB 对肠道内胆碱代谢通路的改变最为明显, 可以推测其作用靶点在肠道菌群代谢。

4 讨 论

胆碱代谢在 UC 发生到严重化过程中起到非常重要作用。UC 发生后, 肠道内的胆碱类代谢物的变化比较复杂。除 TMA 外, 胆碱的其他代谢物, 如甜菜碱和卵磷脂的含量也在模型组中升高了。在人类饮食和人体中最丰富的胆碱形式是 PC。除了 10~20 g PC 作为胆汁成分引入胃肠道腔外, PC 还占食物中总胆碱含量的 50% 以上^[17]。PC 也被确定为结肠上皮黏膜层的主要脂质成分。在临床研究中, UC 患者的黏膜屏障的磷脂酰胆碱部分可减少 70%, 过量的肠道微生物磷脂酶活性可能加速黏膜降解, 继而释放更多的游离胆碱来影响 TMA 的产生^[19]。本次研究为阐明肠道菌群的胆碱代谢对 UC 病情进展的影响提供了一个起点, 并且补充说明了炎症导致的肠道菌群失调, 对胆碱代谢的影响

是多位点的。同时也说明了 DMB 遏制胆碱转为 TMA, 有助于改善 UC 的症状。

DMB 作为一种非致命的微生物酶靶向抑制剂的抑制剂, 其在理论上的优势是比抗生素产生耐药性的选择性压力更小。然而, 肠道微生物群被认为是非常动态和适应性的, 包括对不同的饮食输入的反应以及特定疾病的变化。从研究结果来看, 在 DMB 减少 TMA 生成的同时, 肠道内的包含胆碱的前体物质的含量也发生减少, 由此可以推断服用适当剂量的 DMB 能够减少胆碱的肠道消耗, 提高宿主的生物利用度。这样的研究发现不仅局限于心脑血管疾病中, 也存在 DMB 抑制结肠炎及其所致肝损伤中。另外也有研究表明, 高果糖诱导的高血压与血清中上升的 TMAO 相关, 而补充 DMB 能够减少血清中 TMA、TMAO、乙酸及丙酸水平^[20]。靶向肠道微生物源代谢物 TMAO 和短链脂肪酸, 早期干预高血压进程, 对降低高血压有显著影响^[21]。近期还有研究报道, 在系统性红斑狼疮小鼠模型中, 检测到激活后血浆 TMAO 水平升高, 服用 DMB 后, 肠道细菌 TMA 降低, 血浆 TMAO 水平也得到抑制。DMB 能够降低系统性红斑狼疮的疾病活动性, 提示它是一种潜在的治疗药物^[22]。除此之外, 微生物的胆碱利用会影响成年小鼠多个组织的 DNA 甲基化模式, 同时增加肥胖的风险; 且 TMAO 水平也与内脏脂肪量呈正相关^[23]。综合近期研究与本次研究结果发现, 肠道细菌能够将胆碱转化为 TMA, 不仅会增加血浆中 TMAO 的水平, 还会降低胆碱

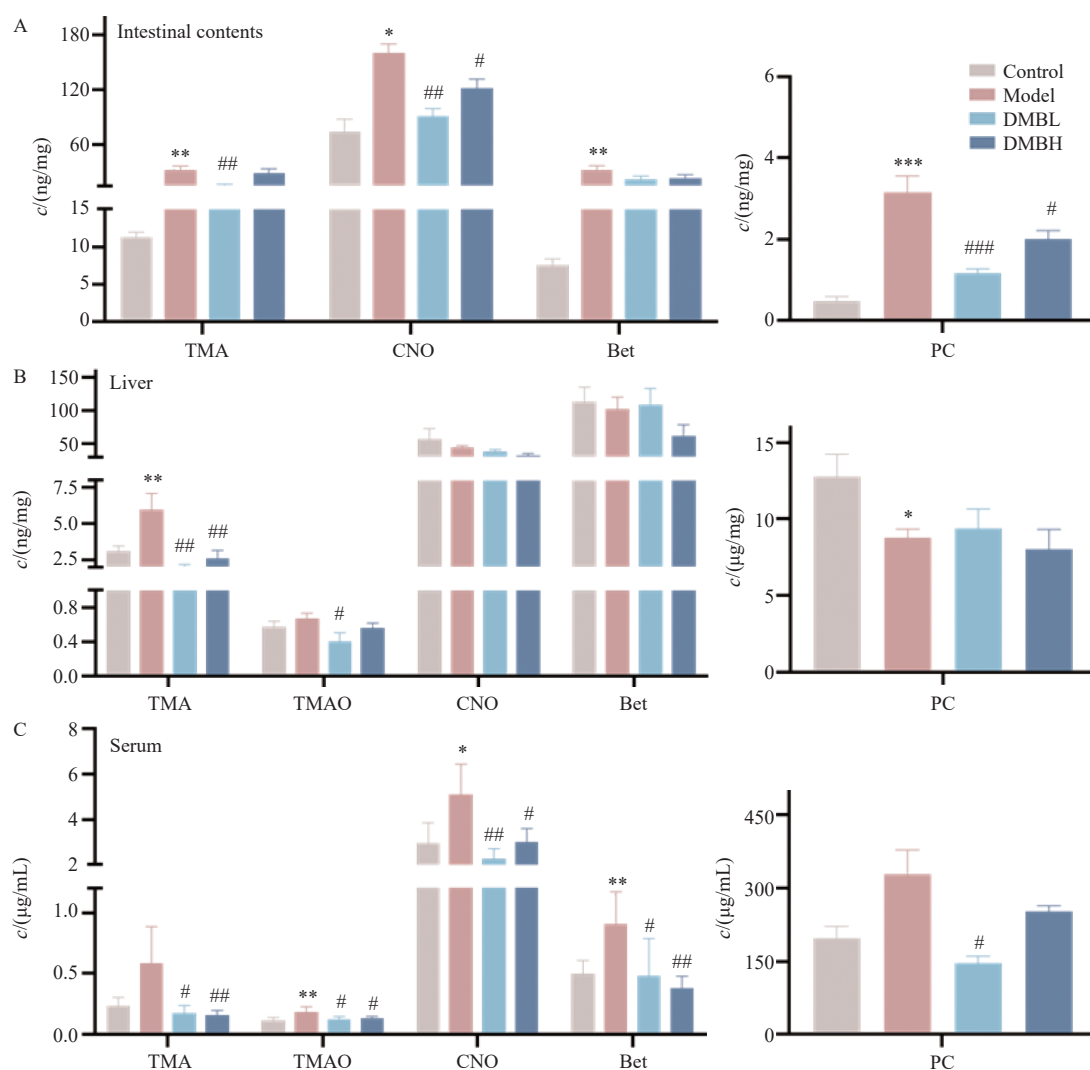


Figure 5 Bar graph of choline metabolism-associated metabolites quantification

A: Intestinal contents; B: Liver; C: Serum

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; $n \geq 6$ per group

及其下游单碳代谢产物的生物利用度^[24]。DMB在一定程度上提高胆碱的生物利用度,其作用的靶点很大可能在于抑制肠道胆碱的不良转化。

5 结论

本研究靶向胆碱的肠道菌群代谢,使用 DMB 作为药物,发现了 DMB 对于 UC 有较为明显的缓解作用。研究中建立了体内胆碱代谢通路的检测方法,考察了 3 类生物样品中胆碱相关代谢物的变化:DMB 对肠道内容物中胆碱代谢通路的改变最明显,其次是血清,最后是肝脏。在本研究设计初期,是根据 DMB 能够抑制胆碱转化为 TMA 的特性,减少肠道菌群与宿主竞争胆碱,提高其生物

利用度,缓解结肠炎所导致的肝脏损伤。但研究结果表明,抑制胆碱转为 TMA,提高胆碱的生物利用度,对肠道及宿主代谢的影响更为重要。控制肠道菌群对 TMA 前体物质的利用率,能够有效缓解结肠炎的恶化,从而降低由于严重的肠道病变导致肝脏受损。胆碱的摄入以及体内的生物利用度对维持人体健康,控制疾病发展起到非常关键的作用。胆碱代谢属于肠道菌群与宿主的相互作用,对其建立有效的评估方式能够对疾病进行更准确的评估。

References

- [1] Ordas I, Eckmann L, Talamini M, *et al.* Ulcerative colitis[J].

- Lancet*, 2012, **380**(9853): 1606-1619.
- [2] Al-Horani R, Spanudakis E, Hamad B. The market for ulcerative colitis[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, **21**(1): 15-16.
- [3] Knight C, Murray KF. Hepatobiliary associations with inflammatory bowel disease[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, **3**(6): 681-691.
- [4] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity[J]. *Nature*, 2012, **482**(7384): 179-185.
- [5] Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, *et al.* Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency[J]. *Gastroenterology*, 2011, **140**(3): 976-986.
- [6] Pogribny IP, Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(14): 2249-2261.
- [7] Glunde K, Bhujwalla ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**: 835-848.
- [8] Chittim CL, Martinez Del CA, Balskus EP. Gut bacterial phospholipase Ds support disease-associated metabolism by generating choline[J]. *Nat Microbiol*, 2019, **4**(1): 155-163.
- [9] Teodoro JS, Rolo AP, Duarte FV, *et al.* Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression[J]. *Mitochondrion*, 2008, **8**(5/6): 367-376.
- [10] Zeisel SH. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones[J]. *Mutat Res*, 2012, **733**(1/2): 34-38.
- [11] Hosseinkhani F, Heinken A, Thiele I, *et al.* The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases[J]. *Gut Microbes*, 2021, **13**(1): 1-22.
- [12] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, *et al.* Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2015, **163**(7): 1585-1595.
- [13] Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, *et al.* Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS) -induced colitis in mice by intra colonically administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1))[J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, **117**(3): 462-468.
- [14] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, *et al.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, **96**(3): 795-803.
- [15] Wang XN, Liu JQ, Shi ZQ, *et al.* Orthogonal label and label-free dual pretreatment for targeted profiling of neurotransmitters in enteric nervous system[J]. *Anal Chim Acta*, 2020, **1139**: 68-78.
- [16] Zheng J, Mandal R, Wishart DS. A sensitive, high-throughput LC-MS/MS method for measuring catecholamines in low volume serum[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, **1037**: 159-167.
- [17] Goh YQ, Cheam G, Wang Y. Understanding choline bioavailability and utilization: first step toward personalizing choline nutrition[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, **69**(37): 10774-10789.
- [18] Stremmel W, Merle U, Zahn A, *et al.* Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2005, **54**(7): 966-971.
- [19] Corbin KD, Zeisel SH. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, **28**(2): 159-165.
- [20] Wang G, Kong B, Shuai W, *et al.* 3, 3-Dimethyl-1-butanol attenuates cardiac remodeling in pressure-overload-induced heart failure mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, **78**: 108341.
- [21] Hsu CN, Chang-Chien GP, Lin S, *et al.* Targeting on gut microbial metabolite trimethylamine-*n*-oxide and short-chain fatty acid to prevent maternal high-fructose-diet-induced developmental programming of hypertension in adult male offspring[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, **63**(18): e1900073.
- [22] González-Correa C, Moleón J, Miñano S, *et al.* Trimethylamine *n*-oxide promotes autoimmunity and a loss of vascular function in toll-like receptor 7-driven lupus mice[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, **11**(1): 84.
- [23] Romano KA, Martinez-Del Campo A, Kasahara K, *et al.* Metabolic, epigenetic, and trans generational effects of gut bacterial choline consumption[J]. *Cell Host Microb*, 2017, **22**(3): 279-290.
- [24] Randrianarisoa E, Lehn-Stefan A, Wang X, *et al.* Relationship of serum trimethylamine *n*-oxide (tmao) levels with early atherosclerosis in humans[J]. *Sci Rep*, 2016, **27**(6): 26745.