

# 肠道菌群代谢产物 TMAO 对成纤维细胞氧化应激的影响

宋波 陈玉希 唐圣宣 王涵 史敏

西安培华学院医学院 陕西西安 710125

**【摘要】**目的：分析肠道菌群代谢产物 TMAO 对成纤维细胞氧化应激的表达及其调控。方法：以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理作为氧化损伤对照，探测不同浓度 TMAO 对 HSF 细胞氧化应激的影响；采用 ELISA 法检测炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  及胶原蛋白表达的水平。结果：TMAO 显著降低 HSF 细胞 GSH 酶活力，升高了细胞 MDA 水平；经 ELISA 检测发现，TMAO 显著增加 HSF 细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-6 因子表达，引起炎症反应，并减少 HSF 细胞 COL1A1 蛋白合成。结论：TMAO 可诱导 HSF 细胞产生氧化应激，促进细胞炎症反应，使胶原蛋白合成量降低，促进皮肤老化。

**【关键词】** TMAO；成纤维细胞；衰老

衰老是一个复杂的过程，主要表现为细胞衰老，细胞衰老的主要原因是过量 ROS 产生引起的氧化应激<sup>[1]</sup>。既往研究发现，TMAO 是肠道菌群常见的代谢产物，可通过损伤线粒体、诱导氧化应激等在心血管、肿瘤、神经退行性疾病和慢性炎症等多种疾病中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。肠道菌群代谢产物 TMAO 可能会引发成纤维细胞氧化应激，促进皮肤衰老发生，然而目前尚无相关研究报道。因此，本研究旨在明确 TMAO 对皮肤成纤维细胞（HSF 细胞）氧化应激的影响，并通过炎症相关因子和胶原蛋白含量表达，阐释 TMAO 对皮肤衰老影响的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人皮肤成纤维细胞细胞系源自空军军医大学。DMEM 培养基、青霉素和链霉素购自 HyClone 公司。二水氧化三甲胺、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、Human IL-6 ELISA Kit、Human TNF- $\alpha$  ELISA Kit 购自南京生物工程所，活性氧检测试剂盒、I 型胶原蛋白(COL1A1)测试盒购自 Sigma 公司。氯仿、异丙醇购自国药集团。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

将 HSF 细胞在 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 环境下培养，10%胎牛血清 DMEM 为含 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的抗生素混合物。倒置显微镜下观察，细胞在培养瓶内至长至大约 80%融合度时，胰酶消化，重悬细胞，传至 2 个培养瓶中，加入培养基混匀后继续培养。传代 3 次后，待细胞生长至大约 80%的融合度，胰酶消化，收集细胞，加细胞冻存液，混匀，移入冻存管，封口，-80℃低温冰箱中冻存。

#### 1.2.2 抗氧化系统指标的测定

取 HSF 细胞胰酶消化后，以  $1 \times 10^5$  的密度接种于 6 孔板，每孔 2mL，过夜培养。次日去除培养液，PBS 清洗，各孔加 2mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 TMAO 溶液，继续培养 24h。弃培养液后 PBS 清洗 2 遍；各孔加入 1mL PBS 液，用一次性无菌细胞刮刀收集贴壁细胞至 1.5mL 离心管。裂解细胞，在 4℃、12000 r/min 条件下离心 10min，收集上清液，根据试剂盒说明书测细胞 SOD 和 MDA 含量。所有实验重复三遍以上。

#### 1.2.3 ELISA 法测定细胞炎症因子及胶原蛋白水平

收集各组细胞上清液，300g 离心 5min，收集上清，按照试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和胶原蛋白的水平。

## 2 结果

### 2.1 TMAO 对细胞抗氧化系统的影响

表1 TMAO对细胞抗氧化指标测定结果

分组	GSH/ (U/mg)	SOD/ (U/m)	MDA/ (nmol/mg)
空白对照	40.12 ± 2.29	85.49 ± 8.48	9.58 ± 2.74
损伤对照	11.74 ± 3.96	21.56 ± 6.08	28.55 ± 4.19
T-低组	37.52 ± 4.02 <sup>a</sup>	53.89 ± 9.29 <sup>a</sup>	19.55 ± 9.90 <sup>a</sup>
T-高组	28.04 ± 5.33 <sup>a</sup>	28.61 ± 6.97 <sup>a</sup>	25.03 ± 7.92 <sup>a</sup>

注：与损伤对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.05；损伤对照（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>：20M）；T-低（25 mM TMAO处理组）；T-高（75 mM TMAO处理组）

皮肤具有较为完善的氧化调节系统，以应对内外界氧化压力。MDA 和 GSH 等是评价氧化应激程度的重要指标。GSH 是为抗氧化物质，通过氧化还原反应加速自由基的排泄。MDA 是脂质过氧化的最终代谢物，可

作为氧化应激的生物学标记物。本研究中结果表明,如表 1 所示,低、高浓度 TMAO 处理均会显著降低 HSF 细胞 GSH、SOD 酶活力 ( $p < 0.05$ ), 而促进氧化产物 MDA 的积累 ( $p < 0.05$ ), 从而破坏细胞内氧化还原动态平衡, 对细胞形成氧化损伤。

### 2.2 TMAO 对成纤维细胞炎症因子表达的影响

表2 TMAO对细胞炎症因子指标测定结果

分组	TNF- $\alpha$	IL-6
空白对照	0.97 $\pm$ 0.29	1.19 $\pm$ 2.48
损伤对照	1.74 $\pm$ 0.96	8.56 $\pm$ 4.08
T-低组	1.12 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	2.99 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>
T-高组	2.64 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	6.61 $\pm$ 2.97 <sup>a</sup>

注:与损伤对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

氧化应激可诱导多种炎症因子的表达,如包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  等。本研究通过 ELISA 法检测 HSF 细胞炎症因子水平,如表 2 所示。TMAO 处理对 HSF 细胞相关炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平呈上升趋势,呈现剂量依赖性, ( $p < 0.05$ ), 且与损伤对照组有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。由此,推测 TMAO 会通过上调 HSF 细胞炎症因子的表达,对皮肤炎症反应产生影响,这可能也是衰老皮肤具有慢性炎症的原因。

### 2.3 TMAO 对成纤维细胞胶原蛋白表达的影响

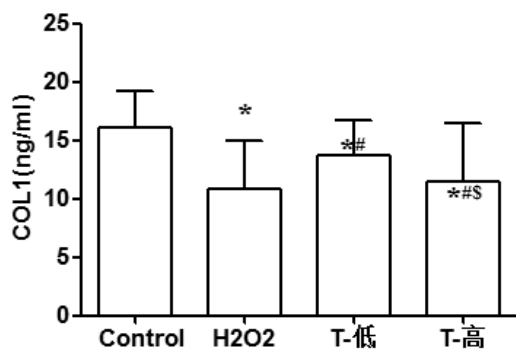


图1 TMAO 处理对成纤维细胞 COL I 表达的影响

随着年龄增长,皮下胶原蛋白含量减少,导致皮肤变薄,胶原蛋白的流失致使皮肤干燥、松弛、细纹形成,呈现老化<sup>[9]</sup>。因此,通过评价皮肤组织胶原蛋白含量可反映皮肤的衰老状态。本研究如图 1 所示,25-75 mM 的 TMAO 处理后,与空白对照组相比,成纤维细胞细胞 COL I 表达均显著下调 ( $p < 0.05$ )。表明 TMAO 处理 HSF 细胞的胶原蛋白含量合成减少,从而导致皮肤细胞胶原蛋白含量下降,促进皮肤老化进程。

### 3 讨论

随着社会整体生活水平的提高,人们对衰老问题的关注度日益提升。肠道微生物菌群与人类健康的关系近年来备受关注,有关肠道菌群与疾病的相关研究成果也不断涌现,尤其是肠道菌群代谢产物 TMAO 对机体功能的影响也日益受到重视。TMAO 是胆碱或左旋肉碱等食物在肠道微生物菌群的作用下吸收入肝脏经氧化为 TMAO,进入血液循环后通过尿液而排出。当肠道菌群比例的异常变化导致 TMAO 水平升高,引起代谢综合征相关疾病发生,如心血管、肾脏、神经退行性疾病和衰老等的发生<sup>[4]</sup>。

皮肤衰老是人体衰老最直观的外在表现。据自由基衰老理论,ROS 在皮肤衰老中发挥重要作用。已有研究表明,TMAO 可诱导氧化应激,直接或间接参与动脉粥样硬化、高血压、癌症等发病机制<sup>[5]</sup>。本研究中,TMAO 显著降低 HSF 细胞 GSH 酶活力、升高细胞 MDA 水平,激发细胞产生氧化应激,加速细胞损伤并凋亡。氧化应激与炎症是相互作用、相互促进化,衰老皮肤通常伴有慢性炎症<sup>[6]</sup>。TMAO 处理增加了 HSF 细胞炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平,还可能导致皮肤胶原蛋白合成降低,因此 TMAO 可能介导氧化应激而激活 HSF 细胞的炎症调控通路,继而导致皮肤细胞的炎症和老化。因此,本研究为 TMAO 对成纤维细胞氧化应激的影响及细胞衰老的作用机制提供一定的理论依据。

### 参考文献:

- [1]周佳雯,新建亮.衰老机制及其干预研究进展[J].医学研究生学报,2021,34(05):524-529.
  - [2]程丽珍,苗雅.肠道菌群及其代谢产物作为阿尔茨海默病诊断生物标志物的研究进展[J].重庆医科大学学报,2021,46(11):1352-1354
  - [3]K. Gelse, E. Poschl, T. Aigner, et al. Collagens—structure, function, and biosynthesis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55(12):1531-1546.
  - [4]于飞,王伟.肠道微生物代谢产物氧化三甲胺的研究进展[J].中国老年学杂志,2019,39(10):2552-2557.
  - [5]方青,欧阳冬生.氧化三甲胺与炎症性疾病[J].中国临床药理学与治疗学,2019,24(03):318-326.
  - [6]陈昆,常宝珠,郑家润.氧化损伤与皮肤疾病[J].国外医学.皮肤性病学分册,2004(02):81-84.
- 基金项目:2023年西安培华学院大学生创新创业训练计划项目(项目名称:肠道菌群代谢产物 TMAO 对细胞氧化应激的影响,编号:PHDC2023071)