

血浆氧化三甲胺水平与结直肠肿瘤性病变的相关性研究

黄健^{1,2*}, 钟清连^{1,2}

1.中山大学附属第八医院 消化内科,广东 深圳 518033

2.中山大学·深圳,广东 深圳 518033

【摘要】 目的 探讨血浆氧化三甲胺(triethylamine-N-oxide, TMAO)与结直肠肿瘤性疾病的关系。方法 分析2016年8月至2019年8月于中山大学附属第八医院消化内科就诊的120例结肠腺瘤患者,138例结直肠癌患者和138例健康体检对照者。患者均接受了结肠镜检查,检测并比较各组空腹血浆TMAO及其前提物质胆碱、甜菜碱、肉碱、左旋肉碱等水平,分别评价上述物质与结直肠肿瘤性疾病发生的相关性。结果 TMAO的升高与结肠腺瘤及结直肠癌的发生中具有相关性($P<0.05$),其中与结肠腺瘤的相关性更为密切($r=0.744, P<0.05$)。TMAO前体物质胆碱在结直肠癌组及结肠腺瘤组的水平均有升高($P<0.01, P<0.05$),但与两者的发生无相关性($P>0.05$)。在结直肠癌组中,TMAO的水平在年龄大于45岁患者或病灶大于3cm的患者中的升高具有统计学意义($P<0.01$)。结论 血浆TMAO的水平与结直肠肿瘤性疾病的发生具有相关性。

【关键词】 氧化三甲胺; 结直肠癌; 结直肠腺瘤; 肠道菌群

Study on the correlation between plasma trimethylamine oxide level and colorectal neoplasms disease

Huang Jian^{1,2*}, Zhong Qinglian^{1,2}

1. Department of Gastroenterology, The Eighth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong 518033, China

2. Sun Yat-sen University·Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518033, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between plasma triethylamine-N-oxide (TMAO) and colorectal neoplasms disease. **Methods** From August 2016 to August 2019, 120 patients with colon adenoma, 138 patients with colorectal cancer and 138 healthy controls were analyzed in the Gastroenterology Department of the Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University. All patients underwent colonoscopy. The fasting plasma levels of TMAO and its prerequisite substances choline, betaine, carnitine, and L-carnitine were tested and compared in each group to evaluate the correlation between these substances and the occurrence of colorectal neoplastic diseases. **Results** The increase of TMAO was correlated with the occurrence of colon adenoma and colorectal cancer ($P<0.05$). Among them, the correlation with colorectal adenoma is more closely ($P<0.05$), and the correlation coefficient is 0.744. The level of TMAO precursor choline was increased in the colorectal cancer group and colon adenoma group ($P<0.01, P<0.05$), but there was no correlation with the occurrence of the two ($P>0.05$). In the colorectal cancer group, the increase in TMAO levels in patients older than 45 years old or patients with lesions larger than 3 cm was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The level of plasma TMAO is correlated with the occurrence of colorectal neoplastic diseases.

【Key words】 Trimethylamine-N-oxide; Colorectal cancer; Colorectal adenomas; Gut microbiome

结直肠肿瘤性疾病包括了腺瘤性疾病及结直肠癌(colorectal cancer, CRC),其中CRC目前在中国发病率逐年递增^[1],已经分别占据发病率及死

亡率的第三和第四位,近几年在CRC的发病机制研究人体内肠道菌群数目多,各大类菌群的分布特点及发挥的致病功能作用不同,导致各种研究结果不尽相同。目前研究主要集中在肠道菌群的共同代谢产物氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO),TMAO参与了许多疾病的发生^[2-3]。

基金项目:2018年深圳市科技研发资金基础研究项目(JCYJ20170818162840647)

*通信作者:黄健, E-mail: wangkin89@163.com

本研究旨在探讨血浆 TMAO 水平及其前体代谢物质与 CRC 患者与的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象 连续选取 2016 年 8 月至 2019 年 8 月中山大学附属第八医院消化内科就诊的患者,其中结直肠癌组来源于已行结肠镜检查诊断结直肠癌的患者,男性 73 例,女性 65 例。结直肠腺瘤组来源于已行结肠镜检查诊断结直肠腺瘤患者,男性 62 例,女性 58 例。对照组来源于中山大学附属第八医院体检中心的正常体检人群,男性 71 例,女性 67 例。入选人群在年龄、性别等比较差异无统计学意义($P>0.05$)。排除标准:①年龄小于 18 岁或大于 80 岁;②既往有或者家族中有结直肠癌病史;③曾行腹部手术者;④炎症性肠病患者;⑤同时患有其他严重疾病(心力衰竭、呼吸衰竭、肾功能衰竭、严重的肝功能损害、严重的血液系统疾病);⑥正在服用益生菌或益生元制剂和 1 个月内使用过任何抗生素;⑦处于某种急性疾病状态;⑧无法完成符合本研究分析的临床资料。本研究经中山大学附属第八医院伦理委员会同意并批准(伦理审查批号 2019-082-01)。

1.2 方法 本研究患者入选后,结直肠的腺瘤或者肿瘤病灶均送病理学检测。收集临床资料。空腹用抗凝采集管抽取血液 4~5 ml,3000 r/min 超速离心后获得血浆,冻存于 -80°C ,冰箱中待统一检测。用稳定放射性核素液相色谱/质谱法测血浆 TMAO 水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行数据分析。以 Kolmogorov-Sminrow 检验检测正态分布,正态分布的数据采用均数 \pm 标准差的形式,连续性非正态资料采用中位数(四分位数)表示。TMAO 呈偏态分布,经自然对数转换后为正态分布,采用方差

分析、独立 T 检验、Mann-Whitney U 检验和非参数多个独立样本检验,事后检验使用 LSD 和 bonferrooni。采用 Spearman 相关分析法分别分析 TMAO 及其前体物质胆碱、甜菜碱、肉碱、左旋肉碱是否具有相关性,如果具有相关性,进一步采用二元 Logistic 回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMAO 及其前体代谢物质水平在结直肠腺瘤组、CRC 组、正常对照组中的比较 三组胆碱水平两两比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中胆碱在结直肠癌组与对照组比较具有统计学意义($P<0.01$)。TMAO 自然对数数值三组两两比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。左旋肉碱、甜菜碱、肉碱三组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 TMAO 与 CRC 发生的相关性分析 TMAO 与 CRC 发生相关性分析中,采取二元回归分析后,发现 TMAO 的水平高低在 CRC 组中与肿瘤的发生无相关性。TMAO 水平值与结直肠腺瘤发生的回归方程中出现相关性($P<0.05$, $r=0.744$,表 2)。

2.3 TMAO 前体物质与 CRC 发生的相关性分析 TMAO 前体物质胆碱、甜菜碱、肉碱、左旋肉碱水平高低也均与 CRC 的发生无相关性($r=0.022$ 、 0.672 、 0.843 、 0.289 , $P>0.05$)。

2.4 为了进一步分析 TMAO 水平与 CRC 组的相关性 在 CRC 组内根据结直肠癌肿瘤分期 AJCC 第八版标准进行了分组比较,结果提示 CRC 组中当患者年龄 ≥ 45 岁时或者肿瘤病灶 ≥ 3 cm 时血浆 TMAO 的升高具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。

3 讨论

TMAO 是目前研究最为广泛的肠道菌群代谢

表 1 TMAO 及其前体代谢物质在各组中的比较($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | 例数 | TMAO 自然对数 | 胆碱($\mu\text{mol/L}$) | 甜菜碱($\mu\text{mol/L}$) | 肉碱($\mu\text{mol/L}$) | 左旋肉碱($\mu\text{mol/L}$) |
|--------|-----|------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 138 | 0.56 \pm 0.88 | 17.39 \pm 3.95 | 39.00 \pm 5.22 | 50.17 \pm 7.01 | 44.52 \pm 7.56 |
| 结直肠腺瘤组 | 120 | 0.44 \pm 1.03* | 14.14 \pm 3.74† | 38.79 \pm 3.97 | 53.54 \pm 6.89 | 41.62 \pm 6.62 |
| 结直肠癌组 | 138 | 0.78 \pm 0.57* | 11.57 \pm 4.38** | 43.90 \pm 8.62 | 57.24 \pm 10.51 | 40.04 \pm 3.21 |

注: * $P<0.05$, 三组两两比较; ** $P<0.01$, 与结直肠癌组比较

表 2 TMAO 与 CRC 组之间相关关系($P>0.05$)

| 分组 | B | SE | Wals | Sig | 95%CI |
|------|--------|-------|-------|-------|-------------|
| TMAO | 0.021 | 0.057 | 0.134 | 0.714 | |
| 常量 | -0.095 | 0.297 | 0.103 | 0.748 | 0.913~1.142 |

表 3 TMAO 与结直肠腺瘤组之间的相关关系($P<0.05$)

| 分组 | B | SE | Wals | Sig | 95%CI |
|------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| TMAO | 0.744 | 0.306 | 5.922 | 0.015 | |
| 常量 | 0.692 | 0.514 | 1.811 | 0.178 | 0.865~1.077 |

表4 结直肠癌组内一般临床资料及 TMAO 水平的比较
($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

| 临床特征 | 例数 | 血浆 TMAO 水平 | P |
|----------------|----|------------|-------|
| 年龄 | | | 0.008 |
| <45 岁 | 87 | 1.15±0.38 | |
| ≥45 岁 | 51 | 2.86±1.31 | |
| 性别 | | | 0.687 |
| 男 | 73 | 2.27±1.15 | |
| 女 | 65 | 2.97±0.82 | |
| 位置 | | | 0.489 |
| 近端结肠 | 41 | 11.40±3.17 | |
| 远端结肠 | 97 | 11.90±6.45 | |
| 肿瘤分期 | | | 0.242 |
| T ₁ | 55 | 1.96±0.40 | |
| T ₂ | 35 | 1.87±0.63 | |
| T ₃ | 30 | 2.26±0.62 | |
| T ₄ | 18 | 2.97±0.57 | |
| 肿瘤大小 | | | 0.032 |
| ≥3 cm | 62 | 3.69±0.97 | |
| <3 cm | 76 | 1.96±0.77 | |

产物之一,肠道微生物通过将宿主进食的富含胆碱等食物,代谢转化生成三甲胺(trimethylamine, TMA),借助门脉循环系统途径入肝,在肝脏被黄素单加氧化酶(flavin-containing monooxygenase 3, FMO3)氧化生成 TMAO 后释放入血^[4]。TMAO 主要来源于食物中存在的左旋肉碱和卵磷脂等,含量个体差异较大,研究均发现 TMAO 水平属于偏态分布,说明人体内 TMAO 含量与个体间遗传背景、饮食习惯等众多因素相关^[5-6]。在许多心脑血管疾病的研究中均检测到 TMAO 水平是升高的。本研究的结果与国内王珊等^[6]、刘晓梅等^[7]的研究结果一致,但检测的均值水平低于前两者,推测在饮食条件基本相同的情况下,造成数值的不同是否因为肠道内不同疾病下菌群不同所致。

国内刘晓梅等^[7]通过检测 108 例 CRC 患者血浆 TMAO 水平,发现 CRC 患者中 TMAO 水平升高并与肿瘤的进展及远处转移有相关性。但本文在 CRC 组中的分析发现 TMAO 的水平值与肿瘤的 TNM 分级无关。在随后的相关性分析中发现 TMAO 的水平值在 CRC 组和结直肠腺瘤组均与肿瘤的发生具有相关性,尤其在结直肠腺瘤组中相关性更强。本研究结果提示,在肿瘤发生的早期阶段代谢产物 TMAO 已经起一定作用。

对于 TMAO 在肿瘤发生的致病作用分析中,本文在 CRC 组中发现在年龄>45 岁患者的 TMAO

水平值高于年龄<45 岁患者,病变>3 cm 的患者体内 TMAO 水平较病灶<3 cm 的患者升高,提示 TMAO 的代谢除了与饮食相关,可能与年龄的增长、代谢能力的改变及病灶大小相关。

国外的学者 Bae 等^[8]和 Guertin 等^[9]分开对男女人群进行研究,Bae 等^[8]发现女性 TMAO 水平的升高与直肠癌的发生具有相关性。Guertin 等^[9]则提示男性中 TMAO 水平值与 CRC 的发生无关。本研究中在 CRC 组,男女性患者中 TMAO 的水平值差异无统计学意义。TMAO 的水平是否与性别相关目前尚无统一的研究结论。此外本研究发现 TMAO 的前体物质胆碱在结直肠腺瘤组和 CRC 组中均有升高,且差异具有统计学意义,此结果与既往研究结果一致^[8,9]。胆碱是甲基营养物质参与一碳代谢,并在甲基化中起关键作用反应,包括 DNA 甲基化,以及 DNA 稳定性和修复^[10-11]。其升高可能提示在 CRC 的发生过程中,先出现胆碱代谢的活跃,影响肠黏膜的甲基化从而促进黏膜的不典型增生。胆碱还可以通过肠道细菌分解代谢而形成 TMA,通过肝脏酶进一步转化为 TMA,胆碱增多导致的 TMAO 随之增加。

本研究具有一定的局限性,样本量受限,未能完全排除饮食因素的干扰。另外对于肿瘤的疾病研究,本研究缺乏随访。总而言之,TMAO 对于 CRC 诊治是否具有临床价值等一系列问题,都需要大规模及长期随访的前瞻性研究来深入探讨。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委,中国结直肠癌诊疗规范(2020年版),中国实用外科杂志,2020,40(6):601-625.
- [2] DUVALLET C, GIBBONS SM, GURRY T, et al. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses[J]. Nat Commun, 2017,8(1):1784.
- [3] SCHMIDT TSB, RAES J, BORK P. The human gut microbiome: from association to modulation[J]. Cell, 2018,172(6):1198-1215.
- [4] WANG Z, KLIPFELL E, BENNETT BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. Natur, 2011,472(7341):57-63.
- [5] XU R, WANG Q, LI L. A genome-wide systems analysis reveals strong link between colorectal cancer and trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut microbial metabolite of dietary meat and[J]. BMC Genomics, 2015, 6(Suppl 7):S4.
- [6] 王珊,夏耿红,何彦,等.氧化三甲胺分布特征及其与肠道菌群的关联性[J].南方医科大学学报,2016,36(4):455-460.

- [7] LIU X, LIU H, YUAN C, et al. Preoperative serum TMAO level is a new prognostic marker for Colorectal cancer [J]. Biomark Med, 2017, 11(5):443-447.
- [8] BAE S, ULRICH CM, NEUHOUSER ML, et al. Plasma choline metabolites and colorectal cancer risk in the women's health initiative observational study [J]. Cancer Res, 2014, 74 (24): 7442-7452.
- [9] GUERTIN KA, LI XS, GRAUBARD BI, et al. Serum trimethylamine N-oxide, carnitine, choline, and Betaine in relation to colorectal cancer risk in the alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017, 26(6): 945-952.
- [10] MASON JB. Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon (methyl) metabolism[J]. J Nutr, 2003, 133:941S-947S.
- [11] CHO CE, TAESUWAN S, MALYSHEVA OV, 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.
- [12] SÁNCHEZ-ALCOHOLADO L, ORDÓÑEZ R, OTERO A, et al. Gut Microbiota-Mediated Inflammation and Gut Permeability in Patients with Obesity and Colorectal Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18):E6782.
- [13] GRIFFIN LE, DJURIC Z, ANGILETTA CJ, et al. A Mediterranean diet does not alter plasma trimethylamine N-oxide concentrations in healthy adults at risk for colon cancer [J]. Food Funct, 2019, 10(4):2138-2147.
- [14] CHAN CWH, LAW BMH, WAYE MMY, et al. Trimethylamine-N-oxide as One Hypothetical Link for the Relationship between Intestinal Microbiota and Cancer - Where We Are and Where Shall We Go? [J]. J Cancer, 2019, 10(23):5874-5882.
- [15] 黄健, 钟清连, 张安业等. 氧化三甲胺与结直肠癌的相关性研究进展 [J/CD]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2018, 10(1): 38-40.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1 统计学研究设计 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等);临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法等)。主要做法应围绕4个原则:随机、对照、重复、均衡进行概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2 资料的表达与描述 用 $(\bar{x} \pm s)$ 表达近似正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的意义表达清楚,可使用表注在表格下方进行详细说明;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上的刻度值的标法符合数学原则,可使用图注进行必要的说明;用相对数时,分母不宜少于20,要注意区分百分率和百分比。

3 统计分析方法的选择 对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料条件和分析目的,选择合适的统计方法,不能盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选择合适的统计分析方法,不能盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不能盲目套用简单直线回归分析,对于具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面和合理的解释和评价。

4 统计结果的解释和表达 当 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间的两两比较的 q 检验等)、统计量的具体值(如 $t=3.12, \chi^2=4.36, F=6.86$ 等)、具体的 P 值(如 $P=0.012$);当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出95%可信区间。