

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.22.005  
文章编号: 1005-8982 (2025) 22-0026-08

实验研究·论著

## 氧化三甲胺对血管内皮细胞线粒体功能的作用研究\*

郑梦<sup>1</sup>, 李素娟<sup>2</sup>, 贾宇臣<sup>3</sup>, 张茹<sup>1</sup>, 郭建强<sup>1</sup>

(1. 内蒙古医科大学附属医院 心血管内科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学附属医院 消化内科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 3. 内蒙古医科大学 内蒙古自治区分子生物学重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010050)

**摘要:** **目的** 探讨氧化三甲胺 (TMAO) 对血管内皮细胞线粒体功能的影响。**方法** 使用不同浓度的 TMAO (50、100 和 150 mmol/L) 刺激人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 24 h, 或使用 100 mmol/L 浓度的 TMAO 干预 HUVEC 不同的时间 (12、24 和 36 h)。利用 CCK-8 法检测 HUVEC 的细胞活力; 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡水平; 使用酶联免疫吸附试验检测细胞上清液内皮素-1 (ET-1)、白细胞介素-18 (IL-18)、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 水平; 采用罗丹明-123 探针检测线粒体膜电位 (MMP); 采用 MitoSOX Red 探针检测线粒体活性氧 (mtROS); 使用 Calcein AM 染色检测线粒体通透性转换孔 (MPTP) 的开放程度。**结果** TMAO 浓度自 50 mmol/L 开始, 细胞活力开始降低, 且呈剂量依赖性变化 ( $P < 0.05$ )。TMAO 干预 12 h 后, 细胞活力显著降低, 且呈时间依赖性变化 ( $P < 0.05$ )。不同浓度 TMAO 组细胞凋亡率均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。对照组 ET-1 水平低于不同浓度 TMAO 组 ( $P < 0.05$ )。对照组 IL-18、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平均低于不同浓度 TMAO 组 ( $P < 0.05$ ), IL-10 水平高于不同浓度 TMAO 组 ( $P < 0.05$ )。不同浓度 TMAO 组罗丹明-123 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。TMAO 处理 24、36 h 组罗丹明-123 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。100、150 mmol/L TMAO 组 MitoSOX 相对表达量均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。不同干预时间 TMAO 组 MitoSOX 相对表达量均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。不同浓度 TMAO 组 Calcein AM 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。不同干预时间 TMAO 组 Calcein AM 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** TMAO 可诱导内皮细胞线粒体功能障碍。

**关键词:** 动脉粥样硬化; 氧化三甲胺; 内皮细胞; 线粒体功能障碍

**中图分类号:** R543.3

**文献标识码:** A

## Effect of trimethylamine-N-oxide on mitochondrial function of vascular endothelial cells\*

Zheng Meng<sup>1</sup>, Li Su-juan<sup>2</sup>, Jia Yu-chen<sup>3</sup>, Zhang Ru<sup>1</sup>, Guo Jian-qiang<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China; 2. Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China; 3. Inner Mongolia Key Lab of Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia 010050, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of trimethylamine-N-oxide (TMAO) on mitochondrial function of vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were either stimulated with varying concentrations of TMAO (50, 100, and 150 mmol/L) for 24 hours or treated with 100 mmol/L TMAO for 12, 24, and 36 hours. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. Apoptosis levels were measured by

收稿日期: 2025-04-20

\* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (No: 2023LHMS08065)

[通信作者] 郭建强, E-mail: gjq161208@126.com; Tel: 13848157954

Annexin V-FITC/PI double staining. Levels of endothelin-1 (ET-1), interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) in cell culture supernatants were quantified via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mitochondrial membrane potential (MMP) was detected using a rhodamine-123 probe. Mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) were measured with a MitoSOX Red probe. The degree of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening was evaluated by Calcein AM staining. **Results** Cell viability decreased in a dose-dependent manner starting at TMAO concentrations of 50 mmol/L ( $P < 0.05$ ). After 12 hours of TMAO exposure, cell viability significantly decreased in a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The cell viability in TMAO-treated groups was higher than that in the control group across all concentrations ( $P < 0.05$ ). ET-1 levels in the control group were lower than those in TMAO-treated groups at different TMAO concentrations ( $P < 0.05$ ). IL-18, IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels in the control group were lower than those in TMAO-treated groups at different TMAO concentrations ( $P < 0.05$ ), while IL-10 levels were higher in the control group than in TMAO-treated groups ( $P < 0.05$ ). The relative expression of rhodamine-123 in TMAO-treated groups at different concentrations was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of rhodamine-123 in the 24- and 36-hour TMAO-treated groups was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of MitoSOX in the 100- and 150-mmol/L TMAO-treated groups was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of MitoSOX in TMAO-treated groups at different intervention times was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of Calcein AM in TMAO-treated groups at different TMAO concentrations was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). At different intervention times, the relative expression of Calcein AM in TMAO-treated groups was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** TMAO induces mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells.

**Keywords:** atherosclerosis; trimethylamine-N-oxide; endothelial cell; mitochondrial dysfunction

动脉粥样硬化是大多数心血管疾病的主要病理基础, 其是炎症细胞和脂质聚集于血管壁的一种慢性炎症性疾病。血管内皮细胞的炎症损伤是动脉粥样硬化形成的初始环节<sup>[1]</sup>。线粒体是细胞内的能量中心, 能够维持细胞稳态, 参与细胞增殖、细胞凋亡和氧化应激等细胞生理过程。线粒体通过自噬、融合和分裂等过程进行线粒体的质量控制以维持细胞稳态。当线粒体DNA发生突变或线粒体融合、分裂和自噬发生异常时, 线粒体功能受损。线粒体功能损伤主要表现为线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 下降、腺苷三磷酸缺乏、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增多、线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放和线粒体形态异常。血管内皮细胞线粒体功能障碍能够导致内皮细胞损伤, 进而引起氧化应激、炎症反应、细胞衰老及凋亡等, 最终发生动脉粥样硬化<sup>[2-3]</sup>。

氧化三甲胺 (trimethylamine N-oxide, TMAO) 是胆碱和L-肉碱经肠道菌群代谢生成的衍生物, 与心血管疾病密切相关<sup>[4-5]</sup>。近年来, TMAO被认为是促进动脉粥样硬化斑块病变起始和进展的重要因素<sup>[6-7]</sup>。在动物研究中发现, 在膳食补充胆

碱的小鼠机体中, 高浓度的TMAO水平可加重小鼠动脉粥样硬化斑块的病变<sup>[8-9]</sup>。临床研究发现心血管疾病患者的血浆TMAO水平高于健康人群, 血浆高浓度的TMAO水平能够预测心血管疾病的发生风险<sup>[10]</sup>。

TMAO可通过多种机制参与动脉粥样硬化, 包括诱导内皮细胞功能障碍, 促进泡沫细胞形成, 增加血小板反应性和诱发炎症反应<sup>[11-13]</sup>。其中, TMAO与血管内皮细胞的关系受到了广泛关注。TMAO可通过减少一氧化氮合成, 增强氧化应激, 诱发内皮细胞炎症反应, 最终导致内皮细胞功能障碍<sup>[14]</sup>。CHEN等<sup>[15]</sup>发现TMAO可通过上调细胞内ROS产生, 促进内皮细胞线粒体自噬, 最终导致内皮细胞损伤, 发生细胞焦亡。近年研究已明确TMAO可通过介导血管内皮细胞损伤导致动脉粥样硬化。但是, 关于TMAO促进内皮细胞损伤的机制尚未完全明确, 并且关于TMAO对内皮细胞损伤线粒体功能影响的相关研究仍罕见。因此, 本研究通过体外培养人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 探索TMAO促进动脉粥样硬化的机制, 以及TMAO对内皮细胞线粒体功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

HUVEC (中国科学院细胞库, 货号: GNHu23), 胎牛血清 (德国 PAN 公司, 货号: P30-3306), TMAO (美国 Sigma 公司, 货号: 317594), CCK-8 试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司, 货号: MA0218), 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒: 内皮素-1 (Endothelin-1, ET-1)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-18 和 IL-1 $\beta$  (上海酶联生物科技有限公司, 货号: YJ24645、YJ058097、YJ064299、YJ22798、YJ22795), 罗丹明-123 (美国 Sigma 公司, 货号: R8004), 线粒体超氧化物检测试剂盒、线粒体通透性转换孔检测试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: S0061S、C2009S、C1062M)。

### 1.2 仪器与设备

二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司), 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司), NovoCyte™ 流式细胞仪 (杭州艾森生物有限公司), 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司), 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 株式会社)。

### 1.3 方法

**1.3.1 TMAO 溶液制备** 称取 0.15 g TMAO 粉末, 并使用 1.99 mL PBS 缓冲液充分溶解, 配制成 1 000 mmol/L 的 TMAO 母液, 过滤除菌后分装, -20 °C 保存。

**1.3.2 HUVEC 培养及分组** 细胞复苏后, 在 25 mL 细胞培养瓶中用含 12% 胎牛血清, 1% 双抗的 DMEM 培养基培养, 培养条件为 37 °C、饱和湿度、5% 二氧化碳和 95% 空气。①按照 TMAO 的不同浓度分组。对照组: 完全培养基培养, 不进行任何处理的 HUVEC。实验组: 完全培养基培养, 不同浓度的 TMAO (50、100 和 150 mmol/L) 处理 24 h 的 HUVEC。②按照 TMAO 的不同作用时间分组。对照组: 完全培养基培养, 不进行任何处理的 HUVEC。实验组: 完全培养基培养, 100 mmol/L 的 TMAO 处理不同时间 (12、24 和 36 h) HUVEC。

**1.3.3 CCK-8 检测细胞增殖** 将 HUVEC 以  $1 \times 10^4$  个/孔的细胞密度接种到 96 孔板中, 细胞培养

24 h 后, 进行 TMAO (10、25、50、100、150、200、250、300 mmol/L) 干预 24 h, 然后用 100 mmol/L 的 TMAO 干预 12、24 和 36 h。细胞处理完毕后, 吸除孔内液体, 每孔加入含 10% CCK-8 培养基 100  $\mu$ L, 37 °C 细胞培养箱中孵育 1 h。多功能酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度 (optical density, OD) 值, 计算细胞存活率。

**1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡** 将 HUVEC 以  $2.5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种于 6 孔板, 24 h 后进行 TMAO 干预。胰酶消化后收集细胞, 以 1 000 r/min 离心 5 min。加入 1 mL PBS, 重悬细胞后离心 5 min, 弃上清液。每管分别加入 100  $\mu$ L 稀释的  $1 \times$  Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。加入 2.5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 2.5  $\mu$ L PI-PE, 轻柔涡旋混匀后, 室温避光孵育 15 ~ 20 min。再加入 400  $\mu$ L 稀释的  $1 \times$  Annexin V Binding Buffer, 混匀样本, 立即上机检测。

**1.3.5 ELISA 检测细胞上清液 ET-1、IL-6、IL-10、IL-18 和 IL-1 $\beta$  水平** 将 HUVEC 以  $1 \times 10^4$  个/孔的细胞密度接种到 96 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 进行 TMAO 干预。细胞处理完毕后, 吸取 50  $\mu$ L 不同浓度的标准品加入标准品孔, 样本孔中先加入 10  $\mu$ L 样本, 再添加 40  $\mu$ L 样本稀释液, 空白孔不加。除空白孔外, 在标准品孔和样本孔中均加入酶标抗体 100  $\mu$ L, 随后 37 °C 恒温箱中避光孵育 60 min。孵育结束后, 重复洗板 5 次, 拍干。所有孔中依次加入 50  $\mu$ L 的底物 A、B, 在 37 °C 恒温箱中避光 15 min 后, 所有孔中加入 50  $\mu$ L 终止液。立即使用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的 OD 值。

**1.3.6 MMP 检测** 称取罗丹明-123 粉末 1 mg, 用 262  $\mu$ L DMSO 溶解, 配制成 10 mmol/L 的储备液。再使用无血清培养基将储备液稀释至 10  $\mu$ mol/L, 制备染色工作液。将 HUVEC 以  $2.5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种到 6 孔板中, 24 h 后进行 TMAO 干预。细胞处理完毕后, 吸去培养液, PBS 清洗 1 遍。每孔加入 1 000  $\mu$ L 染色工作液, 37 °C 细胞培养箱中孵育 40 min。孵育完毕后弃去染色液, PBS 清洗 2 遍, 加入 1 000  $\mu$ L 无血清培养基, 荧光显微镜下观察。

**1.3.7 线粒体活性氧 (mitochondrial ROS, mtROS) 检测** 将处于对数生长期的 HUVEC 细胞以  $8 \times 10^3$  个/孔的密度接种到 96 孔板中, 24 h 后进行 TMAO 干预。将 1  $\mu$ L MitoSOX Red 加入 2 500  $\mu$ L

PBS 中, 稀释为  $2 \mu\text{mol/L}$  的染色工作液。细胞处理完毕后, 吸去细胞培养液, PBS 清洗 1 遍。每孔加入  $100 \mu\text{L}$  染色工作液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  细胞培养箱孵育  $30 \text{ min}$ 。孵育完毕后弃去染色液, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  PBS 清洗 2 遍, 再加入适量 PBS, 荧光显微镜下观察。

**1.3.8 MPTP 检测** 将对数生长期的 HUVEC 细胞以  $1 \times 10^5$  个/皿的密度接种至  $20 \text{ mm}$  激光共聚焦培养皿中,  $24 \text{ h}$  后进行 TMAO 干预。将  $1 \mu\text{L}$  Calcein AM 加入  $1\ 000 \mu\text{L}$  无血清培养基中配制染色工作液。再将  $10 \mu\text{L}$  氯化钴加入  $1\ 000 \mu\text{L}$  染色液中配制荧光淬灭工作液。细胞处理完毕后, 吸去细胞培养液, PBS 清洗 1 遍。培养皿中加入染色工作液或荧光淬灭工作液  $1\ 000 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  细胞培养箱中孵育  $30 \text{ min}$ 。孵育完毕后吸去染色液, 每皿加入  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  预热的无血清细胞培养液  $1\ 000 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  细胞培养箱中孵育  $30 \text{ min}$ 。孵育结束后, 吸去培养液, 加入适量检测缓冲液, 激光共聚焦显微镜下观察。

#### 1.4 统计学方法

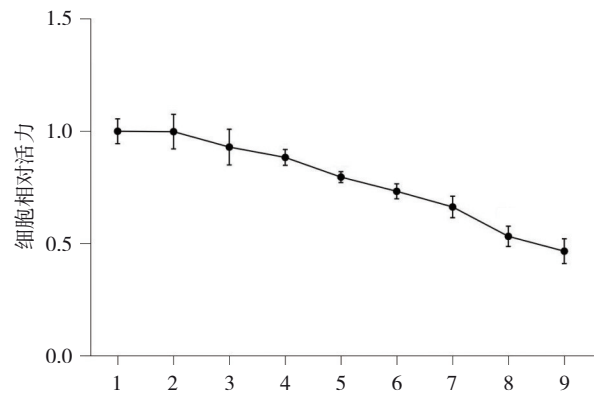
数据处理采用 GraphPad Prism 9.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较用单因素方差分析, 两两比较用 Tukey HSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TMAO 对 HUVEC 细胞活力的影响

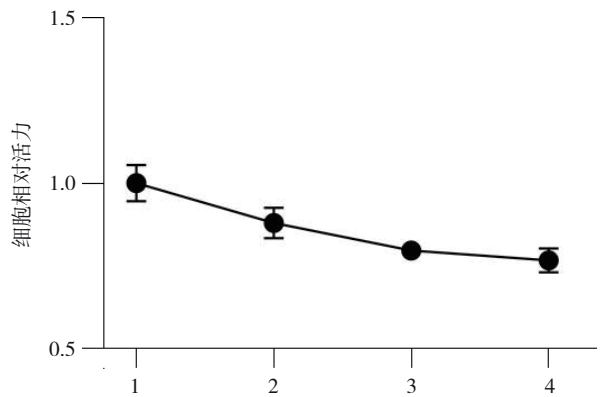
对照组和  $10$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $250$ 、 $300 \text{ mmol/L}$  TMAO 组的细胞相对活力分别为 ( $1.00 \pm 0.06$ )、( $1.00 \pm 0.08$ )、( $0.93 \pm 0.08$ )、( $0.88 \pm 0.04$ )、( $0.80 \pm 0.03$ )、( $0.73 \pm 0.03$ )、( $0.66 \pm 0.05$ )、( $0.53 \pm 0.05$ )、( $0.46 \pm 0.06$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 79.555, P = 0.000$ ); 组间两两比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果显示 TMAO 浓度自  $50 \text{ mmol/L}$  开始, 细胞活力开始降低, 且呈剂量依赖性变化 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

对照组和 TMAO 处理  $12$ 、 $24$ 、 $36 \text{ h}$  组的细胞相对活力分别为 ( $1.00 \pm 0.06$ )、( $0.88 \pm 0.05$ )、( $0.80 \pm 0.03$ )、( $0.77 \pm 0.04$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 36.178, P = 0.000$ ); 组间两两比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果显示 TMAO 干预  $12 \text{ h}$  后, 细胞活力降低, 且呈时间依赖性变化 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



1: 对照组; 2:  $10 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 3:  $25 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 4:  $50 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 5:  $100 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 6:  $150 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 7:  $200 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 8:  $250 \text{ mmol/L}$  TMAO 组; 9:  $300 \text{ mmol/L}$  TMAO 组。

图 1 不同浓度的 TMAO 对 HUVEC 细胞活力的影响



1: 对照组; 2: TMAO 处理  $12 \text{ h}$  组; 3: TMAO 处理  $24 \text{ h}$  组; 4: TMAO 处理  $36 \text{ h}$  组。

图 2 不同 TMAO 干预时间对 HUVEC 细胞活力的影响

### 2.2 TMAO 对 HUVEC 凋亡率的影响

对照组和  $50$ 、 $100$ 、 $150 \text{ mmol/L}$  TMAO 组的细胞凋亡率分别为 ( $3.46 \pm 0.06$ )%、( $9.45 \pm 0.85$ )%、( $14.97 \pm 1.77$ )%、( $19.78 \pm 2.98$ )%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 46.778, P = 0.000$ )。不同浓度 TMAO 组均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。提示 TMAO 可诱导内皮细胞凋亡。见图 3。

### 2.3 TMAO 对 HUVEC 分泌 ET-1 能力的影响

对照组和  $50$ 、 $100$ 、 $150 \text{ mmol/L}$  TMAO 组的 ET-1 水平分别为 ( $556.64 \pm 37.99$ )%、( $658.66 \pm 15.61$ )%、( $684.42 \pm 54.32$ )%、( $658.91 \pm 25.06$ )%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 7.314, P = 0.011$ ), 对照组 ET-1 水平低于不同浓度 TMAO 组 ( $P < 0.05$ )。提示 TMAO 具有导致内皮细胞损伤的作用。

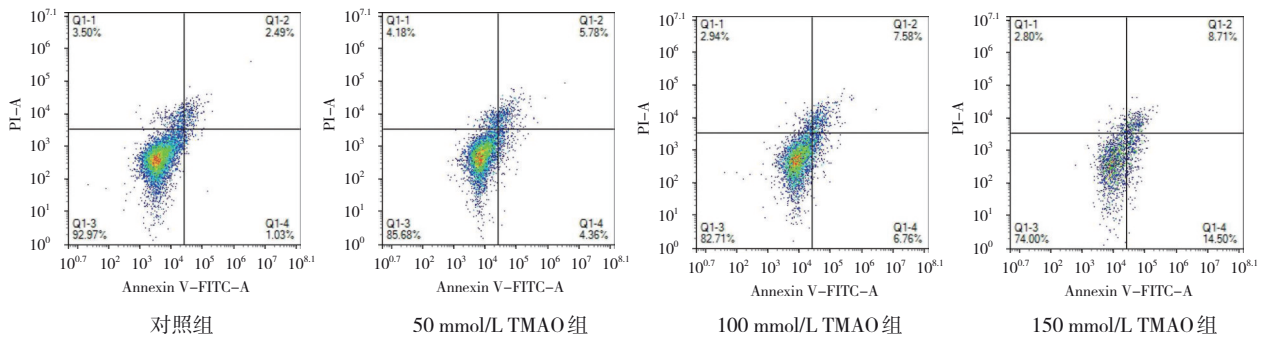


图3 各组HUVEC细胞流式细胞图

### 2.4 TMAO对HUVEC炎症反应的影响

各组 IL-18、IL-1β、IL-6、IL-10 水平比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，对照组 IL-18、IL-1β、IL-6 水平均低于不

同浓度 TMAO 组 ( $P < 0.05$ )，IL-10 水平高于不同浓度 TMAO 组 ( $P < 0.05$ )。结果提示 TMAO 具有促进内皮细胞炎症反应的作用。见表 1。

表 1 各组炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-18/(ng/L)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(ng/L)	IL-10/(ng/L)
对照组	409.09 ± 0.97	96.26 ± 0.97	15.80 ± 0.62	399.46 ± 15.10
50 mmol/L TMAO组	434.20 ± 3.49	103.11 ± 0.97	16.63 ± 0.36	390.46 ± 6.63
100 mmol/L TMAO组	454.03 ± 1.93	114.79 ± 1.89	18.27 ± 0.34	366.13 ± 7.32
150 mmol/L TMAO组	472.59 ± 16.44	114.89 ± 3.26	18.54 ± 1.05	359.04 ± 2.02
F值	30.968	63.127	11.925	13.516
P值	0.000	0.000	0.003	0.002

### 2.5 TMAO对HUVEC中MMP的影响

对照组和 50、100、150 mmol/L TMAO 组的罗丹明-123 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.14)、(0.67 ± 0.15)、(0.43 ± 0.07)、(0.32 ± 0.01)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F = 23.816$ ,  $P = 0.000$ )。不同浓度 TMAO 组罗丹明-123 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。TMAO 处理 12、24、36 h 组的罗丹明-123 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.10)、(0.89 ± 0.08)、(0.53 ± 0.00)、(0.52 ± 0.08)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F = 30.794$ ,  $P = 0.000$ )。TMAO 处理 24、36 h 组罗丹明-123 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。结果表明在 TMAO 的作用下，线粒体功能受损使 MMP 发生去极化，导致 MMP 降低。见图 4。

### 2.6 TMAO对HUVEC中mtROS的影响

对照组和 50、100、150 mmol/L TMAO 组的 MitoSOX 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.01)、(1.28 ± 0.06)、(2.00 ± 0.15)、(2.20 ± 0.23)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F = 51.576$ ,  $P = 0.000$ )，100、150 mmol/L TMAO 组 MitoSOX 相对表达量均高

于对照组 ( $P < 0.05$ )。对照组和 TMAO 处理 12、24、36 h 组的 MitoSOX 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.01)、(1.74 ± 0.13)、(2.12 ± 0.09)、(2.22 ± 0.19)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F = 61.812$ ,  $P = 0.000$ )，不同干预时间 TMAO 组 MitoSOX 相对表达量均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。结果表明 TMAO 可诱导 HUVEC 的线粒体中 mtROS 积聚，引起氧化应激，导致线粒体功能障碍。见图 5。

### 2.7 TMAO对HUVEC中MPTP的影响

对照组和 50、100、150 mmol/L TMAO 组的 Calcein AM 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.08)、(0.38 ± 0.05)、(0.25 ± 0.02)、(0.13 ± 0.03)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F = 320.748$ ,  $P = 0.000$ )，不同浓度 TMAO 组 Calcein AM 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。对照组和 TMAO 处理 12、24、36 h 组的 Calcein AM 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.10)、(0.34 ± 0.02)、(0.28 ± 0.03)、(0.29 ± 0.06)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F = 161.153$ ,  $P = 0.000$ )，不同干预时间 TMAO 组 Calcein AM 相对表达量均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

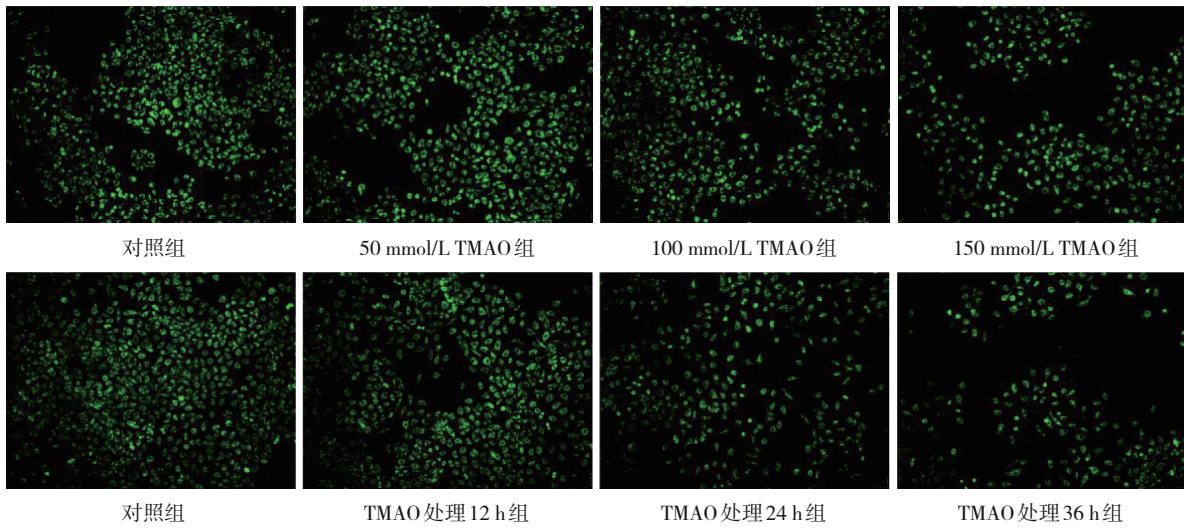


图 4 各组 HUVEC 细胞罗丹明染色 (× 10)

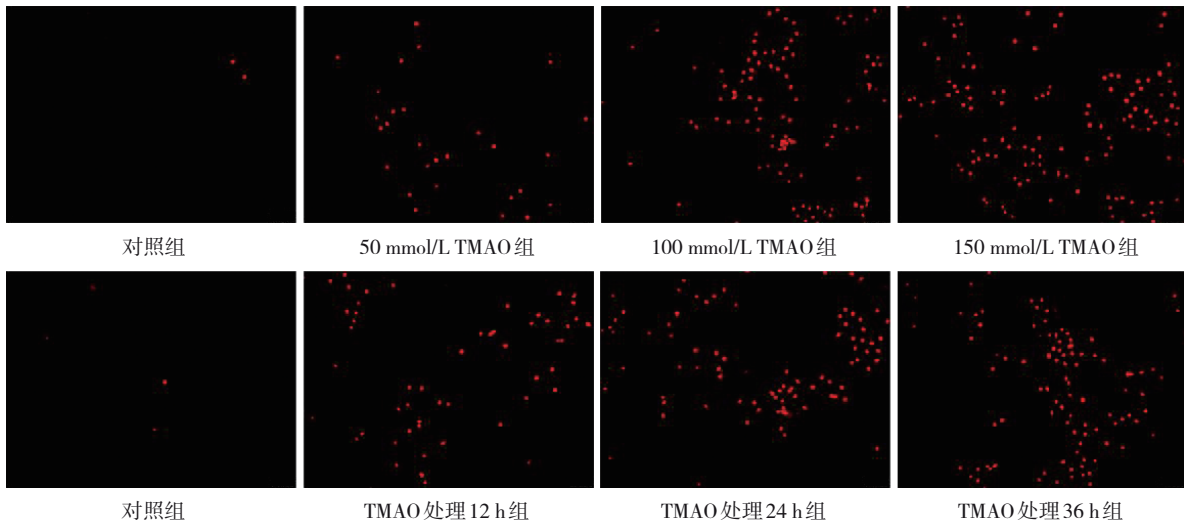


图 5 各组 HUVEC 细胞 MitoSOX 染色 (× 10)

结果表明 TMAO 可导致 HUVEC 中的 MPTP 的开放程度增加。见图 6。

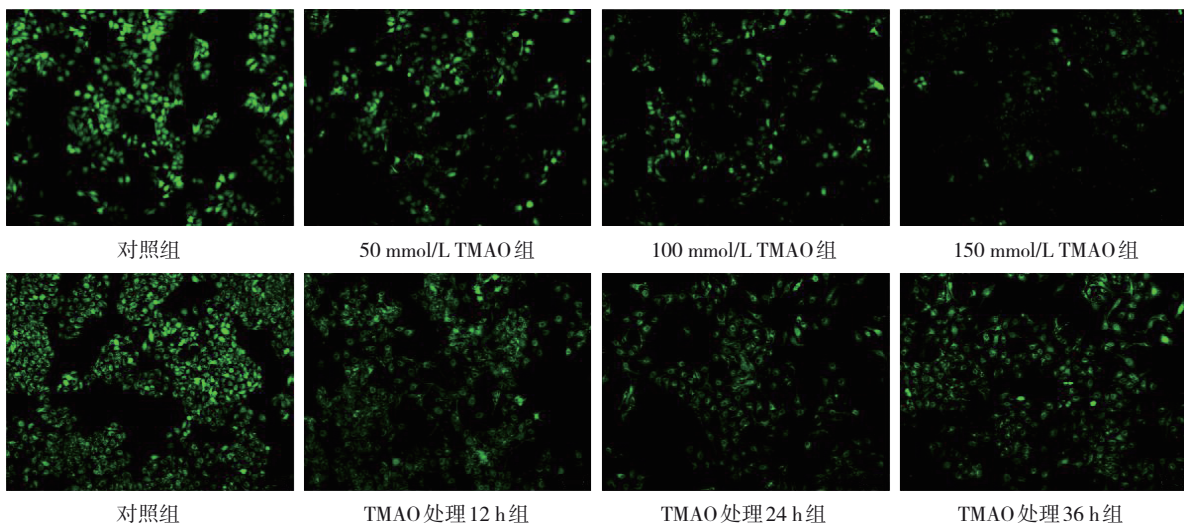


图 6 各组 HUVEC 细胞 Calcein AM 染色 (× 10)

### 3 讨论

内皮细胞损伤主要表现为细胞发生氧化应激,细胞活力、增殖和迁移能力降低,发生凋亡和炎症反应<sup>[16-17]</sup>。本研究发现TMAO可降低HUVEC的细胞活力,诱导凋亡,分泌过量ET-1和炎症因子。ET-1是由血管内皮细胞分泌的具有收缩功能的血管活性肽。内皮细胞损伤后,其分泌的ET-1水平升高,导致血管功能障碍。本研究结果发现,TMAO可促进HUVEC分泌大量的ET-1,说明TMAO导致了内皮细胞的损伤。损伤的内皮细胞可释放大量炎症因子,导致细胞内发生炎症反应。本研究结果显示,TMAO使HUVEC分泌IL-6、IL-18和IL-1 $\beta$ 水平升高,IL-10水平降低,说明TMAO可促使细胞内促炎细胞因子的表达增加,抑炎细胞因子的表达降低,导致细胞内免疫失衡,引起内皮细胞炎症反应。

线粒体是一种高度动态的细胞器,其通过自噬、融合和分裂等方式调控线粒体质量,从而调节线粒体的形态、数量、大小和细胞命运<sup>[18-19]</sup>。线粒体损伤的早期特征是MMP下降,随后导致mtROS生成增多<sup>[20]</sup>。本研究结果显示经TMAO处理的HUVEC的MMP显著降低,且呈剂量依赖性和时间依赖性递减,并伴随mtROS表达增加,表明TMAO可诱导MMP下降,发生线粒体去极化,mtROS产生增多,导致线粒体功能障碍。mtROS作为许多信号通路的重要细胞信使,对调节基因表达、信号传导和应激等细胞反应至关重要<sup>[21]</sup>。先前研究发现TMAO可诱导mtROS生成增加,并通过沉默蛋白3/超氧化物歧化酶2/mtROS信号通路激活NOD样受体蛋白3炎症小体,引起血管炎症<sup>[22]</sup>,与本研究结果一致。本研究也发现经TMAO处理的HUVEC中的mtROS表达增加,且呈剂量依赖性和时间依赖性递增。过量的ROS可激活GTP酶动力相关蛋白1的活性,进而破坏线粒体动力学,促进线粒体去极化,并加速内皮细胞中的线粒体损伤<sup>[23]</sup>。因此,本研究结果表明TMAO可能通过上调mtROS的表达,促进线粒体损伤,诱发细胞内氧化应激,最终导致血管内皮细胞功能障碍。MPTP是线粒体内外进行物质转运的通道。当细胞发生凋亡或死亡时,MPTP开放,线粒体通透性发生改变,引起钙离子过载,细胞内ROS水平升高,

MMP下降或消失<sup>[24]</sup>。同时,钙离子过载、mtROS产生增加及MMP消失也会诱导MPTP的持续激活<sup>[25]</sup>。本研究发现TMAO可增加MPTP的开放程度,且呈剂量依赖性改变。该结果表明TMAO可能通过促进内皮细胞中大量线粒体的MPTP持续性开放,导致MMP降低或消失和mtROS产生过量,引起线粒体功能障碍。经TMAO介导产生的过量mtROS又可进一步激活MPTP,从而加剧了MMP的下降,引起氧化应激和线粒体损伤。

同时,本研究有一定的局限性。首先,本研究仅进行了线粒体功能的检测,没有利用电子显微镜对线粒体形态及微观结构进行观察。其次,本研究仅探讨了TMAO对内皮细胞线粒体功能的影响,没有深入探索TMAO致线粒体功能障碍的机制。今后需进一步探究TMAO与线粒体分裂、融合和自噬的关系。

综上所述,TMAO可通过诱导内皮细胞线粒体功能障碍进而引起血管内皮细胞损伤,随后发生内皮细胞活力减低、凋亡和炎症反应。这一结论不仅丰富了动脉粥样硬化的理论知识,也为TMAO诱导内皮细胞功能障碍这一机制提供了更深入的见解。TMAO有望成为未来治疗动脉粥样硬化的新靶点,通过调整饮食结构,减少机体TMAO生成和保护血管内皮也许是治疗动脉粥样硬化性心血管疾病的有效方法。

#### 参 考 文 献 :

- [1] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [2] MANOLIS A S, MANOLIS A A, MANOLIS T A, et al. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: current status of translational research/clinical and therapeutic implications[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(1): 275-313.
- [3] SALNIKOVA D, OREKHOVA V, GRECHKO A, et al. Mitochondrial dysfunction in vascular wall cells and its role in atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8990.
- [4] CHEN X F, ZHANG H, REN S C, et al. Gut microbiota and microbiota-derived metabolites in cardiovascular diseases[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(19): 2269-2284.
- [5] LATIF F, MUBBASHIR A, KHAN M S, et al. Trimethylamine N-oxide in cardiovascular disease: pathophysiology and the potential role of statins[J]. *Life Sci*, 2025, 361: 123304.
- [6] CARADONNA E, ABATE F, SCHIANO E, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as a rising-star metabolite: implications for human health[J]. *Metabolites*, 2025, 15(4): 220.

- [7] TOUSOULIS D, GUZIK T, PADRO T, et al. Mechanisms, therapeutic implications, and methodological challenges of gut microbiota and cardiovascular diseases: a position paper by the ESC working group on coronary pathophysiology and microcirculation[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(16): 3171-3182.
- [8] CHEN K, ZHENG X Q, FENG M C, et al. Gut microbiota-dependent metabolite trimethylamine N-oxide contributes to cardiac dysfunction in western diet-induced obese mice[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 139.
- [9] 李天翔, 李素娟, 郝翔宇, 等. 血管紧张素II型受体在氧化三甲胺促进 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(1): 34-43.
- [10] TANG W H W, LI X S, WU Y P, et al. Plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) levels predict future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals in the EPIC-Norfolk prospective population study[J]. *Am Heart J*, 2021, 236: 80-86.
- [11] LIU Y R, DAI M. Trimethylamine N-oxide generated by the gut microbiota is associated with vascular inflammation: new insights into atherosclerosis[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 4634172.
- [12] LUO Z S, YU X C, WANG C, et al. Trimethylamine N-oxide promotes oxidative stress and lipid accumulation in macrophage foam cells via the Nrf2/ABCA1 pathway[J]. *J Physiol Biochem*, 2024, 80(1): 67-79.
- [13] WITKOWSKI M, WITKOWSKI M, FRIEBEL J, et al. Vascular endothelial tissue factor contributes to trimethylamine N-oxide-enhanced arterial thrombosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(10): 2367-2384.
- [14] SUN X L, JIAO X F, MA Y R, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 481(1/2): 63-70.
- [15] CHEN Y M, YUAN C C, QIN W H, et al. TMAO promotes vascular endothelial cell pyroptosis via the LPEAT-mitophagy pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 703: 149667.
- [16] CITRIN K M, CHAUBE B, FERNÁNDEZ-HERNANDO C, et al. Intracellular endothelial cell metabolism in vascular function and dysfunction[J/OL]. *Trends Endocrinol Metab*. (2024-12-12). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.11.004>.
- [17] LIN A, MIANO J M, FISHER E A, et al. Chronic inflammation and vascular cell plasticity in atherosclerosis[J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2024, 3(12): 1408-1423.
- [18] 闫明静, 沈涛. 线粒体功能障碍与血管内皮损伤的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(10): 829-837.
- [19] YANG H M. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 1917.
- [20] WANG J, ZHU P J, LI R B, et al. Bax inhibitor 1 preserves mitochondrial homeostasis in acute kidney injury through promoting mitochondrial retention of PHB2[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 384-397.
- [21] BATTY M, BENNETT M R, YU E. The role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3843.
- [22] CHEN M L, ZHU X H, RAN L, et al. Trimethylamine-N-oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(9): e006347.
- [23] ZERIHUN M, SUKUMARAN S, QVIT N. The Drp1-Mediated mitochondrial fission protein interactome as an emerging core player in mitochondrial dynamics and cardiovascular disease therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5785.
- [24] BAUER T M, MURPHY E. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death[J]. *Circ Res*, 2020, 126(2): 280-293.
- [25] BERNARDI P, GERLE C, HALESTRAP A P, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1869-1885.

(李科 编辑)

**本文引用格式:** 郑梦, 李素娟, 贾宇臣, 等. 氧化三甲胺对血管内皮细胞线粒体功能的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(22): 26-33.

**Cite this article as:** ZHENG M, LI S J, JIA Y C, et al. Effect of trimethylamine-N-oxide on mitochondrial function of vascular endothelial cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(22): 26-33.