

免疫细胞特征与骨质疏松症因果关系的 双向孟德尔随机化研究

王振宇, 张洪美, 荆琳, 何名江, 闫奇, 唐海, 李园源, 刘思治, 陈彦百, 王晓庆

(中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

摘要 **目的:**探讨免疫细胞特征与骨质疏松症(osteoporosis, OP)的因果关系。**方法:**分别从 IEU OpenGWAS project 数据库和 FINNGEN 数据库中筛选并获得 731 个免疫细胞特征的全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)数据集和 OP 的 GWAS 数据集。基于工具变量筛选标准,筛选符合要求的免疫细胞特征的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点和 OP 的 SNP 位点。将筛选的免疫细胞特征的 SNP 位点作为工具变量,采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、MR-Egger、加权中位数、简单模式和加权模式等进行正向孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)分析,评估免疫细胞特征与 OP 的因果关系。采用 MR-presso 检验进行水平多效性检验,采用 Cochran's *Q* 检验评估 IVW 法和 MR Egger 法分析结果的异质性,采用留一法评估 MR 分析结果的稳定性。将筛选的 OP 的 SNP 位点作为工具变量,以正向 MR 分析获得的与 OP 具有可靠因果关系的免疫细胞特征为结局进行反向 MR 分析。**结果:**32 个免疫细胞特征与 OP 存在可靠的因果关系,其中包含 7 个绝对细胞计数(absolute cell counts, AC)特征、13 个中位荧光强度(median fluorescence intensity, MFI)特征、12 个相对细胞计数(relative cell counts, RC)特征。在 7 个 AC 特征中,Sw mem AC、IgD⁻CD38dim AC、HLA DR⁺NK AC 与 OP 呈负向因果关系,CD62L⁻myeloid DC AC、CD33br HLA DR⁺AC、DN(CD4⁻CD8⁻)AC、CD25⁺CD8br AC 与 OP 呈正向因果关系;在 13 个 MFI 特征中,BAFF⁻R on IgD⁻CD38br、CD3 on CD8br、CD3 on CD39⁺CD4⁺、CD16⁻CD56 on NK、CD28 on CD4 Treg、CD16 on CD14⁻CD16⁺monocyte、CD8 on TD CD8br 与 OP 呈负向因果关系,CD19 on IgD⁻CD38br、CD86 on myeloid DC、HLA DR on CD14⁺CD16⁻monocyte、HLA DR on CD14⁺monocyte、CD45 on CD33br HLA DR⁺CD14⁻、HLA DR on CD33br HLA DR⁺CD14dim 与 OP 呈正向因果关系;在 12 个 RC 特征中,IgD⁺CD38dim % lymphocyte、CD11c⁺CD62L⁻monocyte % monocyte、TD CD8br % CD8br、CD39⁺CD8br % T cell 与 OP 呈负向因果关系,IgD⁻CD38dim % B cell、CD62L⁻DC % DC、CD8br % leukocyte、CD8br and CD8dim % leukocyte、NKT % T cell、NKT % lymphocyte、HLA DR⁺CD8br % lymphocyte、CD3⁻lymphocyte % leukocyte 与 OP 呈正向因果关系。**结论:**部分免疫细胞特征与 OP 之间存在因果关系,这为探究免疫系统与 OP 间的作用机制提供了线索和方向。

关键词 骨质疏松;免疫细胞特征;孟德尔随机化分析;全基因组关联研究

The causal relationship between immune cell signatures and osteoporosis: a bidirectional mendelian randomization study

WANG Zhenyu, ZHANG Hongmei, JING Lin, HE Mingjiang, YAN Qi, TANG Hai, LI Yuanyuan, LIU Siye, CHEN Yanbai, WANG Xiaoqing

Wangjing Hospital of CACMS, Beijing 100102, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the causal relationship between immune cell signatures and osteoporosis (OP). **Methods:** The genome-wide association study (GWAS) datasets about 731 immune cell signatures and OP were retrieved and extracted from the IEU OpenGWAS project database and FINNGEN database, respectively. According to the instrumental variable screening criteria, the eligible single nucleotide polymorphism (SNP) loci for immune cell signatures and OP were screened as the instrumental variables, and then a forward mendelian randomization (MR) analysis was conducted by using inverse variance weighted (IVW), MR-Egger regression, weighted median estimator, simple mode, and weighted mode to assess the causal relationship between immune cell signatures and OP. In addition, the horizontal pleiotropy was examined by MR-presso test, the heterogeneity of the results analyzed by IVW method and MR-egger regression was assessed by Cochran's *Q* test, and the stability of the MR analysis results was evaluated by leave-one-out (LOO) test. Furthermore, a reverse

MR analysis was conducted by taking the screened OP SNP loci as instrumental variable, and the immune cell signatures having a reliable causal relationship to OP obtained from the forward MR analysis as the outcome variable. **Results:** Seven absolute cell counts (AC) signatures, 13 median fluorescence intensity (MFI) signatures and 12 relative cell counts (RC) signatures exhibited a reliable causal relationship with OP. Among the 7 AC signatures, the Sw mem AC, IgD⁻ CD38dim AC, and HLA DR⁺ NK AC showed a inverse causal relationship with OP, while the CD62L⁻ myeloid DC AC, CD33br HLA DR⁺ AC, DN (CD4⁻ CD8⁻) AC, and CD25⁺ CD8br AC presented a positive causal relationship with OP. Among the 13 MFI signatures, the BAFF⁻ R on IgD⁻ CD38br, CD3 on CD8br, CD3 on CD39⁺ CD4⁺, CD16⁻ CD56 on NK, CD28 on CD4 Treg, CD16 on CD14⁻ CD16⁺ monocyte, and CD8 on TD CD8br showed a inverse causal relationship with OP, while the CD19 on IgD⁻ CD38br, CD86 on myeloid DC, HLA DR on CD14⁺ CD16⁻ monocyte, HLA DR on CD14⁺ monocyte, CD45 on CD33br HLA DR⁺ CD14⁻, HLA DR on CD33br HLA DR⁺ CD14dim presented a positive causal relationship with OP. Among the 12 RC signatures, the IgD⁺ CD38dim % lymphocyte, CD11c⁺ CD62L⁻ monocyte % monocyte, TD CD8br % CD8br, and CD39⁺ CD8br % T cell showed a inverse causal relationship with OP, while the IgD⁻ CD38dim % B cell, CD62L⁻ DC % DC, CD8br % leukocyte, CD8br and CD8dim % leukocyte, NKT % T cell, NKT % lymphocyte, HLA DR⁺ CD8br % lymphocyte, and CD3⁻ lymphocyte % leukocyte presented a positive causal relationship with OP. **Conclusion:** A causality exists between partial immune cell signatures and OP, which provides the clues and directions for exploring the mechanism of action between the immune system and OP.

Keywords osteoporosis; immune cell characteristics; Mendelian randomization analysis; genome-wide association study

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量低下、骨组织微结构损坏导致骨脆性增加, 易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。骨量丢失与骨吸收和骨形成的失衡关系密切^[2-3]。然而, OP 的发生机制尚未完全明确, 代谢、免疫、肠道微生物等均与 OP 的发生存在联系^[4-6]。随着骨免疫学的提出与快速发展, 多项研究^[7-13]发现, 多种免疫细胞参与骨代谢的调控。但免疫细胞特征与 OP 之间是否存在因果关系, 尚缺少可靠的证据。孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 是以遗传变异为工具变量评估暴露因素与结局之间因果关系的流行病学病因分析方法^[14], 能够有效减少混杂因素对结果产生的影响, 获得可靠的因果关系分析结果^[15-17]。本研究采用两样本双向 MR 评估免疫细胞特征与 OP 之间的因果关系, 现总结报告如下。

1 资料与方法

1.1 数据来源

遗传数据集均来自全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 数据库。免疫细胞特征的遗传数据来自 IEU Open GWAS project 数据库 (<https://gwas.mrcieu.ac.uk>), 数据目录 GCST0001391 至 GCST0002121, 包含 731 个免疫细胞特征, 其中 118 个绝对细胞计数 (absolute cell counts, AC) 特征、389 个中位荧光强度 (median fluorescence intensity, MFI) 特征, 32 个形态学特征和 192 个相对细胞计数 (relative cell counts, RC) 特征; 遗传数据源

自 3757 名欧洲人^[18]。

OP 的遗传数据来自芬兰数据库 (<https://www.finngen.fi/en>), OP 的 GWAS 数据集 ID 为 finngen_R10_M13_OSTEOPOROSIS, 包含单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 16 380 452 个; 遗传数据源自 212 778 名欧洲人, 其中 OP 患者 3203 例, 健康人 209 575 名^[19]。

1.2 工具变量筛选

1.2.1 工具变量筛选标准 ①工具变量与暴露因素之间是强相关的; ②工具变量与和暴露因素、结局变量有关联的混杂因素之间是独立的; ③工具变量只能通过暴露因素对结局产生影响^[20-21]。

1.2.2 工具变量筛选方法 基于工具变量筛选标准筛选符合要求的 SNP 位点。将免疫细胞特征的遗传数据集导入分析工具 R 包, 以 $P < 5 \times 10^{-5}$ 为条件筛选差异显著的 SNP 位点^[22]。以 $r^2 < 0.001$ 、连锁不平衡的区域长度为 10 000 kb 为条件进行连锁不平衡分析。计算 SNP 位点的 F 值, 剔除 $F < 10$ 的弱工具变量^[23]。将筛选出的免疫细胞特征的 SNP 位点作为工具变量用于正向 MR 分析。

将 OP 的遗传数据集导入分析工具 R 包, 以 $P < 5 \times 10^{-8}$ 为条件筛选差异显著的 SNP 位点。其余筛选过程同免疫细胞特征的 SNP 位点筛选。将筛选出的 OP 的 SNP 位点作为工具变量用于反向 MR 分析。

1.3 正向 MR 分析

以免疫细胞特征的 SNP 位点作为工具变量进行

正向 MR 分析。在 R4.3.2、R studio 软件上,采用 TwosampleMR、MR-PRESSO 等 R 包进行 MR 分析,分析方法包括逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)^[24]、MR-Egger、加权中位数、简单模式和加权模式等^[25-27],其中以 IVW 为主要分析方法,其他作为补充分析方法。采用 FDR 校正进行多重假设检验^[28]。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。免疫细胞特征与 OP 的具体因果关系依据 OR 值判定,OR > 1 提示免疫细胞特征与 OP 呈正向因果关系,OR < 1 提示免疫细胞特征与 OP 呈负向因果关系。

1.4 敏感性分析

采用 MR-presso 检验进行水平多效性检验^[29-30]。采用 Cochran's Q 检验评估 IVW 法和 MR Egger 法分析结果的异质性^[31-33]。采用留一法评价 MR 分析结果的稳定性。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

1.5 反向 MR 分析

以 OP 的 SNP 位点作为工具变量,以正向 MR 分析获得的免疫细胞特征为结局进行 MR 分析。MR 分析方法同 1.3,敏感性分析方法同 1.4。

2 结果

2.1 工具变量筛选结果

共筛选 2475 个免疫细胞特征的 SNP 位点作为工具变量, F 值范围为 19.55 ~ 2 435.82;共筛选 7 个 OP 的 SNP 位点作为工具变量, F 值范围为 30.02 ~ 37.13。

2.2 正向 MR 分析结果

基于 IVW 法的 MR 分析结果显示,50 个免疫细胞特征与 OP 存在因果关系。经多重假设检验剔除 7 个免疫细胞特征后,43 个免疫细胞特征与 OP 存在因果关系。43 个免疫细胞特征中有 8 个 AC 特征、19 个 MFI 特征和 16 个 RC 特征。43 个免疫细胞特征与 OP 因果关系的森林图见图 1。5 个免疫细胞特征的 SNP 位点数量过少,予以剔除后,38 个免疫细胞特征与 OP 存在因果关系。其中,7 个 AC 特征中,Sw mem AC、IgD⁻ CD38dim AC、HLA DR⁺ NK AC 与 OP 呈负向因果关系,CD62L⁻ myeloid DC AC、CD33br HLA DR⁺ AC、DN (CD4⁻ CD8⁻) AC、CD25⁺⁺ CD8br AC 与 OP 呈正向因果关系[图 1(1)];17 个 MFI 特征中,BAFF⁻ R on IgD⁻ CD38br、CD3 on CD8br、CD3 on CD39⁺ CD4⁺、CD16⁻ CD56 on NK、CD28 on CD4 Treg、CD16 on CD14⁻ CD16⁺ monocyte、CD8 on TD CD8br 与 OP 呈负向因果关系,CD19 on IgD⁻ CD38br、CD86 on

myeloid DC、HLA DR on CD14⁺ CD16⁻ monocyte、HLA DR on CD14⁺ monocyte、HLA DR on monocyte、CD45 on CD33br HLA DR⁺ CD14⁻、HLA DR on plasmacytoid DC、HLA DR on DC、HLA DR on CD33br HLA DR⁺ CD14dim、HLA DR on CD33⁻ HLA DR⁺ 与 OP 呈正向因果关系[图 1(2)];14 个 RC 特征中,IgD⁺ CD38dim % lymphocyte、CD20⁻ CD38⁻ % lymphocyte、CD11c⁺ CD62L⁻ monocyte % monocyte、TD CD8br % CD8br、CD39⁺ CD8br % T cell 与 OP 呈负向因果关系,IgD⁻ CD38dim % B cell、CD62L⁻ DC % DC、CD8br % leukocyte、CD8br and CD8dim % leukocyte、NKT % T cell、NKT % lymphocyte、HLA DR⁺ CD4⁺ % lymphocyte、HLA DR⁺ CD8br % lymphocyte、CD3-lymphocyte % leukocyte 与 OP 呈正向因果关系[图 1(3)]。

2.3 敏感性分析结果

对 38 个免疫细胞特征的 MR 分析结果进行了敏感性分析。MR-presso 检验水平多效性结果显示,HLA DR on DC、HLA DR⁺ CD4⁺ % lymphocyte、HLA DR on CD33⁻ HLA DR⁺ 存在水平多效性;异质性检验结果显示,HLA DR on monocyte、HLA DR on plasmacytoid DC、HLA DR on DC、HLA DR on CD33⁻ HLA DR⁺、CD20⁻ CD38⁻ % lymphocyte、HLA DR⁺ CD4⁺ % lymphocyte 存在异质性。剔除上述 6 个免疫细胞特征后,32 个免疫细胞特征与 OP 存在可靠的因果关系,其中包含 7 个 AC 特征、13 个 MFI 特征、12 个 RC 特征。38 个免疫细胞特征与 OP 的因果关系的水平多效性检验和异质性检验结果见表 1。留一法检验结果显示,不存在对免疫细胞特征与 OP 的因果关系造成严重影响的 SNP 位点,MR 分析结果稳健。

2.4 反向 MR 分析结果

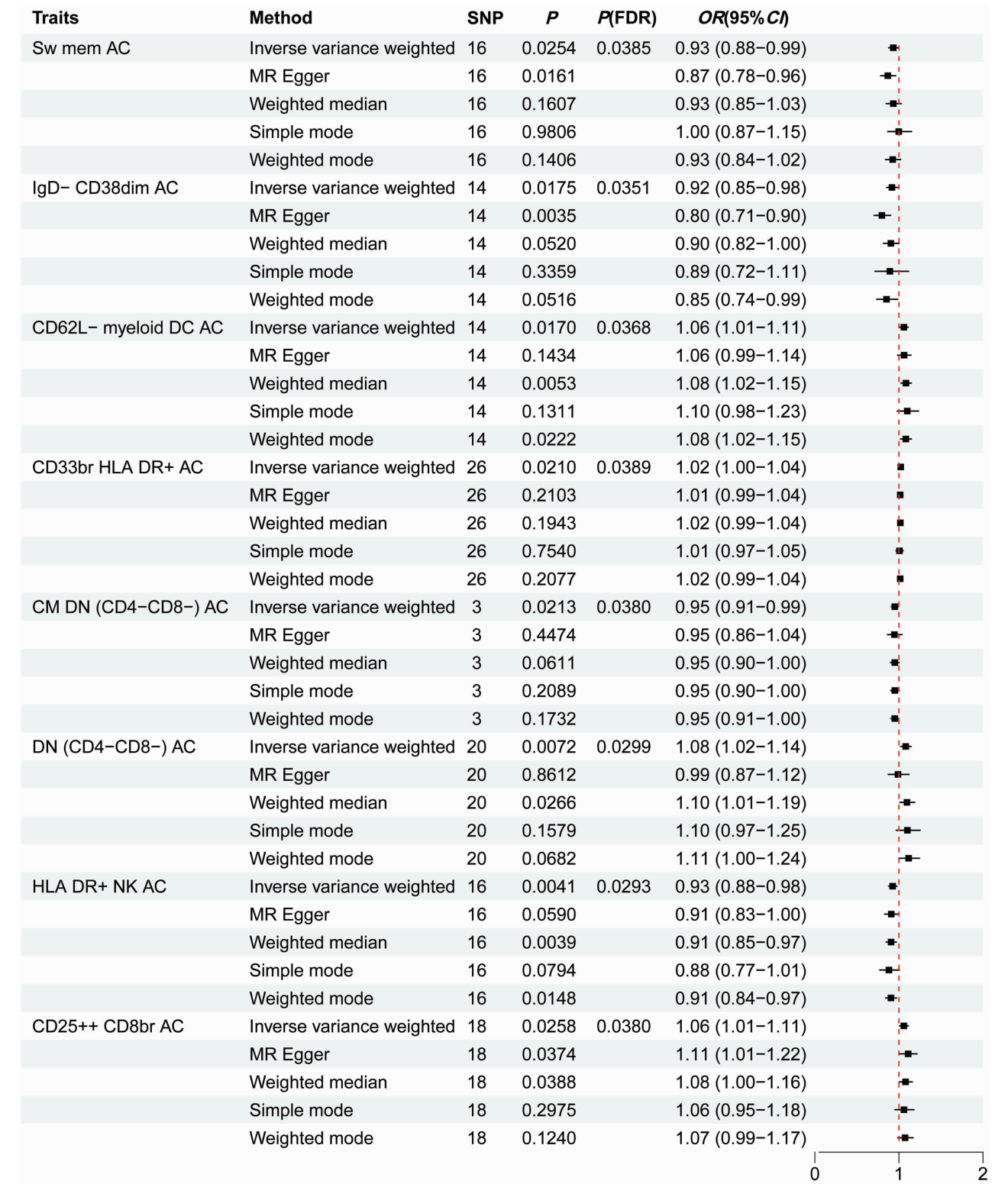
以 OP 的 SNP 位点作为工具变量,32 个免疫细胞特征为结局进行反向 MR 分析。结果显示,CD25⁺⁺ CD8br AC 与 OP 间存在反向因果关系,其余免疫细胞特征与 OP 均不存在反向因果关系(图 2)。MR-presso 检验水平多效性结果显示,CD25⁺⁺ CD8br AC 不存在水平多效性($P = 0.682$);异质性检验结果显示,CD25⁺⁺ CD8br AC 不存在异质性(MR Egger: $P = 0.524$;IVW: $P = 0.604$);提示 CD25⁺⁺ CD8br AC 与 OP 互为因果关系的结果稳健。

3 讨论

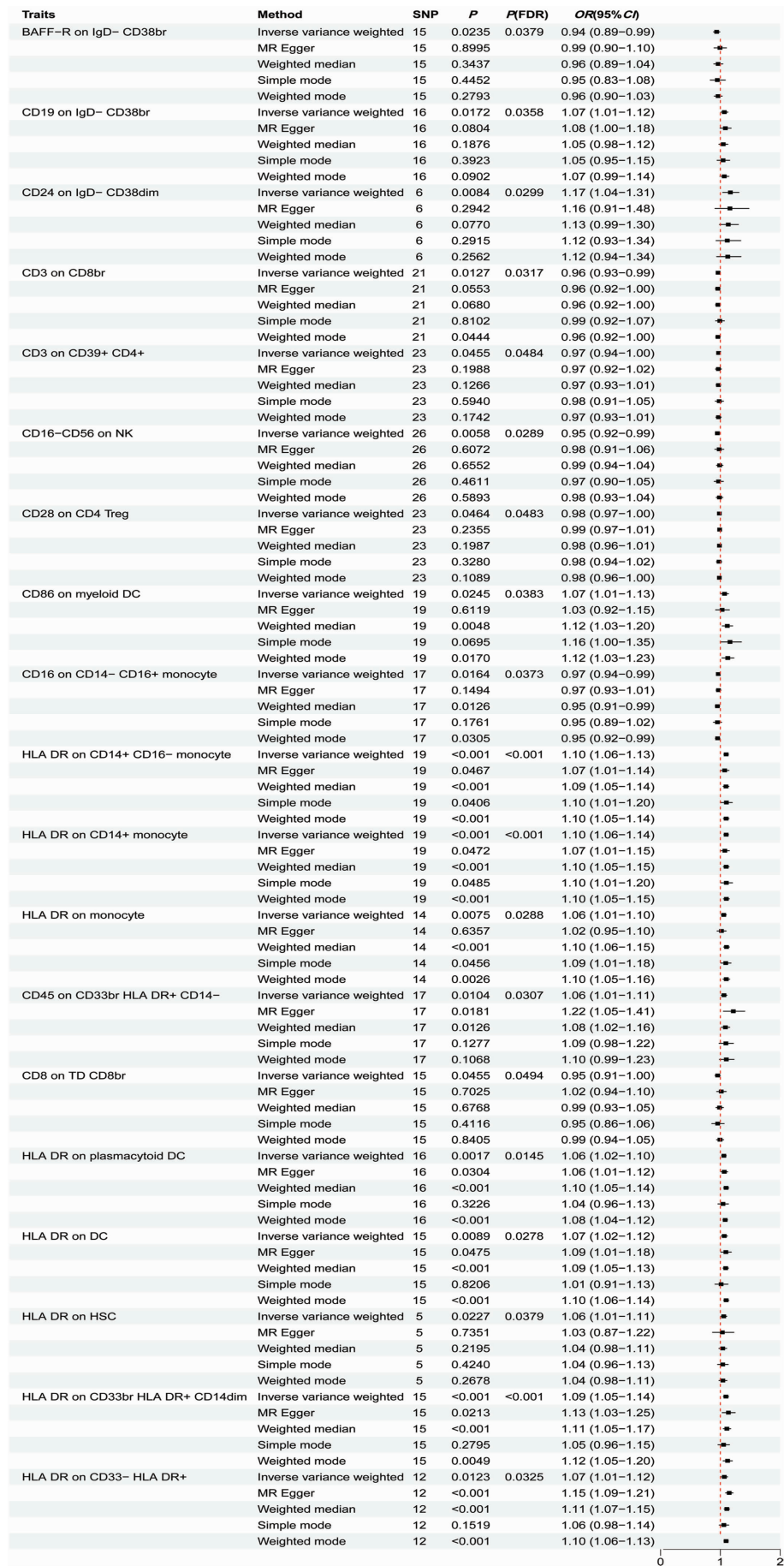
Arron 等^[7]于 2000 年提出了“骨免疫”的概念,奠

定了骨免疫学形成的基础。近 20 年来,骨免疫学发展迅速,获得了大量的研究成果。Zhang 等^[8-9]研究发现,T 细胞、B 细胞等多种免疫细胞参与骨重塑。Paul 等^[10]的研究结果表明,破骨细胞与淋巴细胞能够追溯至共同的髓系祖细胞。激活状态的 T 细胞和 B 细胞能够分泌促破骨细胞生成因子^[11-12],而干扰

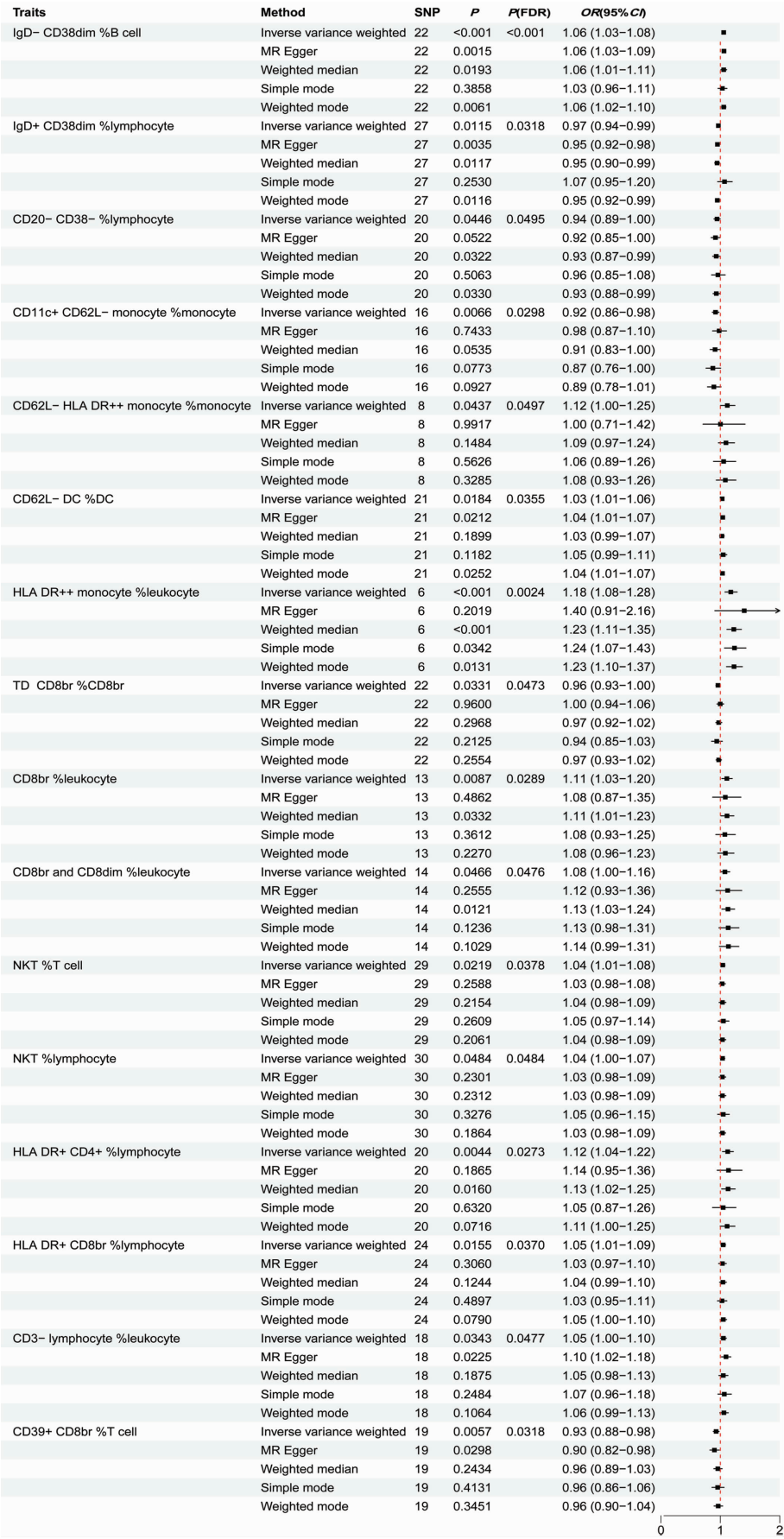
素- γ 能够促进成骨细胞分化,抑制骨髓脂肪细胞形成,并在破骨细胞分化的不同阶段发挥不同的调控作用^[13]。骨免疫学的研究成果提示免疫细胞与骨代谢之间存在复杂的联系,但许多具体机制尚未揭示。OP 作为一种全身性代谢骨病,其发生与骨代谢异常关系密切,但免疫细胞与 OP 是否存在一定的因果关



(1) 绝对细胞计数



(2) 中位荧光强度



(3) 相对细胞计数

图 1 免疫细胞特征与骨质疏松症因果关系的森林图

表 1 免疫细胞特征与骨质疏松症的因果关系的水平多效性检验和异质性检验结果

免疫细胞特征	细胞类型	MR-presso 检验		Cochran's Q 检验 P 值	
		效应值	P 值	MR Egger	逆方差加权法
绝对细胞计数					
Sw mem AC	B 细胞	17.717	0.453	0.639	0.477
IgD ⁻ CD38dim AC	B 细胞	17.763	0.344	0.893	0.388
CD62L ⁻ myeloid DC AC	经典树突细胞	10.735	0.807	0.813	0.866
CD33br HLA DR ⁺ AC	骨髓细胞	16.372	0.947	0.949	0.942
DN (CD4 ⁻ CD8 ⁻) AC	TBNK 细胞	9.749	0.972	0.995	0.977
HLA DR ⁺ NK AC	TBNK 细胞	13.004	0.725	0.697	0.748
CD25 ⁺ CD8br AC	调节性 T 细胞	16.740	0.655	0.647	0.603
中位荧光强度					
BAFF ⁻ R on IgD ⁻ CD38br	B 细胞	14.753	0.559	0.563	0.505
CD19 on IgD ⁻ CD38br	B 细胞	19.191	0.364	0.264	0.309
CD3 on CD8br	调节性 T 细胞	20.095	0.590	0.473	0.531
CD3 on CD39 ⁺ CD4 ⁺	调节性 T 细胞	23.510	0.499	0.453	0.513
CD16 ⁻ CD56 on NK	TBNK 细胞	25.220	0.570	0.562	0.569
CD28 on CD4 Treg	调节性 T 细胞	21.722	0.612	0.578	0.512
CD86 on myeloid DC	经典树突细胞	28.031	0.109	0.121	0.129
CD16 on CD14 ⁻ CD16 ⁺ monocyte	单核细胞	18.228	0.531	0.487	0.557
HLA DR on CD14 ⁺ CD16 ⁻ monocyte	单核细胞	13.887	0.852	0.751	0.766
HLA DR on CD14 ⁺ monocyte	单核细胞	13.818	0.844	0.748	0.772
HLA DR on monocyte	TBNK 细胞	28.881	0.059	0.062	0.048
CD45 on CD33br HLA DR ⁺ CD14 ⁻	骨髓细胞	17.413	0.512	0.723	0.508
CD8 on TD CD8br	成熟 T 细胞	16.588	0.495	0.794	0.559
HLA DR on plasmacytoid DC	经典树突细胞	45.489	0.083	0.012	0.017
HLA DR on DC	经典树突细胞	54.547	0.014	0.001	0.001
HLA DR on CD33br HLA DR ⁺ CD14dim	骨髓细胞	15.111	0.550	0.509	0.530
HLA DR on CD33 ⁻ HLA DR ⁺	骨髓细胞	47.729	0.027	0.217	0.001
相对细胞计数					
IgD ⁻ CD38dim % B cell	B 细胞	17.824	0.802	0.732	0.772
IgD ⁺ CD38dim % lymphocyte	B 细胞	46.457	0.422	0.822	0.651
CD20 ⁻ CD38 ⁻ % lymphocyte	B 细胞	35.019	0.056	0.030	0.028
CD11c ⁺ CD62L ⁻ monocyte % monocyte	经典树突细胞	16.481	0.549	0.624	0.578
CD62L ⁻ DC % DC	经典树突细胞	17.907	0.741	0.699	0.693
TD CD8br % CD8br	成熟 T 细胞	22.643	0.492	0.578	0.439
CD8br % leukocyte	TBNK 细胞	19.883	0.201	0.125	0.168
CD8br and CD8dim % leukocyte	TBNK 细胞	8.062	0.917	0.876	0.906
NKT % T cell	TBNK 细胞	14.063	0.994	0.989	0.992
NKT % lymphocyte	TBNK 细胞	16.362	0.982	0.970	0.978
HLA DR ⁺ CD4 ⁺ % lymphocyte	TBNK 细胞	36.145	0.036	0.018	0.026
HLA DR ⁺ CD8br % lymphocyte	TBNK 细胞	23.483	0.556	0.490	0.533
CD3 ⁻ lymphocyte % leukocyte	TBNK 细胞	17.452	0.566	0.636	0.541
CD39 ⁺ CD8br % T cell	调节性 T 细胞	19.230	0.558	0.498	0.513

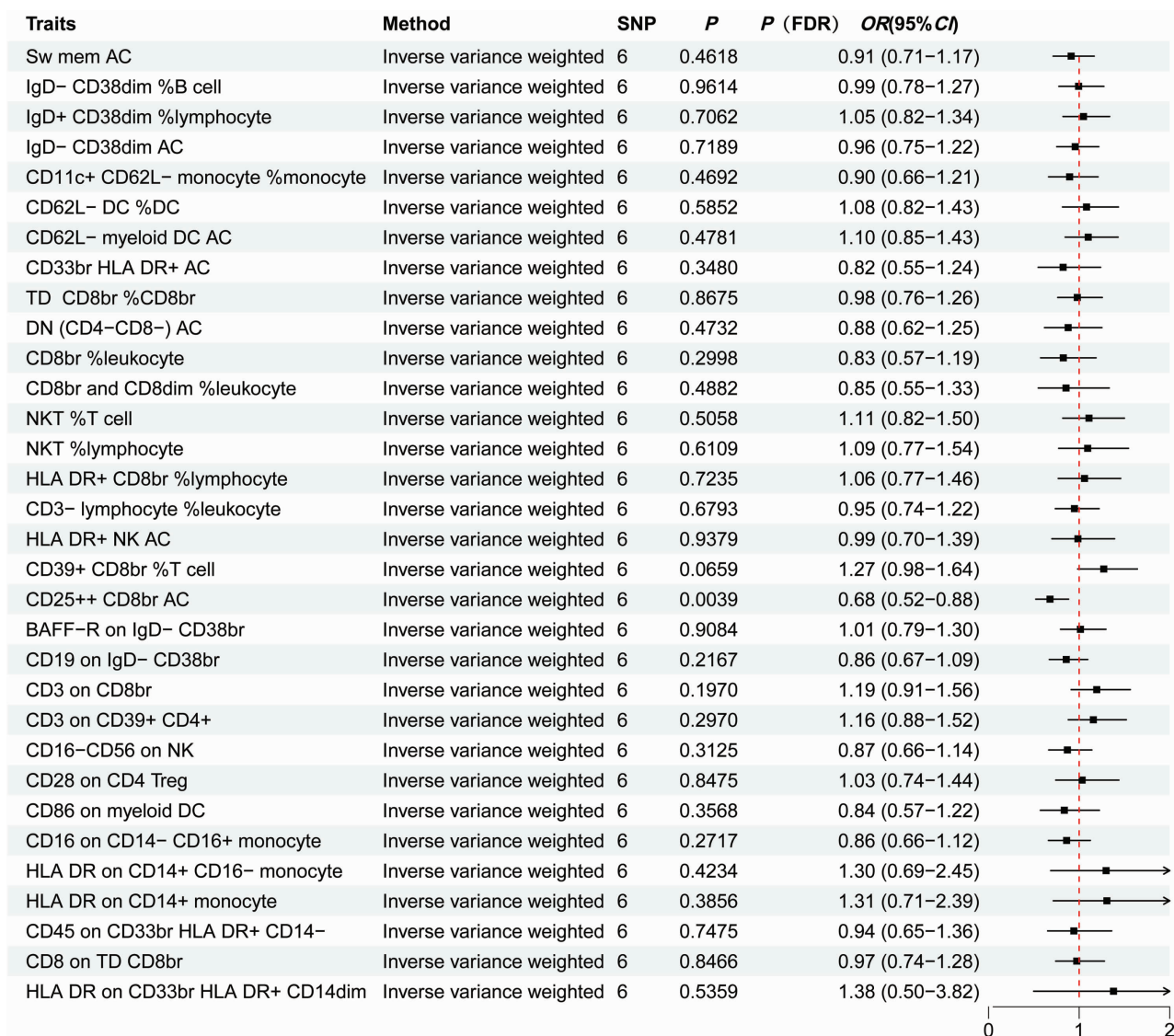


图2 骨质疏松症与免疫细胞特征因果关系的森林图

系,目前尚无定论。本研究采用 MR 分析了免疫细胞特征与 OP 的因果关系,最终结果显示 32 个免疫细胞特征与 OP 存在可靠的因果关系,其中包含 7 个 AC 特征、13 个 MFI 特征、12 个 RC 特征。

免疫细胞特征和 OP 间因果关系的临床意义体现在不同种类免疫细胞与 OP 的关系中。32 个免疫细胞特征所对应的免疫细胞按照种类划分,包括 9 种 TBNK 细胞、6 种 B 细胞、4 种经典树突状细胞、3 种骨髓细胞、5 种调节性 T 细胞、3 种单核细胞、2 种成熟 T 细胞。32 个免疫细胞特征中有 22 个免疫细胞特征对应的免疫细胞为淋巴细胞(包括 TBNK 细胞、B 细胞、调节性 T 细胞和成熟 T 细胞),而淋巴细胞中以 T 细胞为主,T 细胞中又以调节性 T 细胞为主。相关研究^[34-35]表明,调节性 T 细胞对机体免疫发挥负调控作用,能够抑制机体免疫反应、增强机体的抗原耐受。调节性 T 细胞对应的 5 个细胞特征中,仅 CD25⁺⁺

CD8br AC 与 OP 呈正向因果关系,而 CD25⁺⁺ CD8br AC 与 OP 还存在反向因果关系。相关研究表明,CD25⁺⁺ CD8br 调节性 T 细胞是干扰素- γ 的重要来源之一,在外周血中的含量很低^[36-38]。活化的 CD8⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞通过表达表面细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原和转化生长因子 β 1 抑制 CD25⁺ T 细胞的增殖,发挥机体免疫的负调控作用^[39]。Wing 等^[40]研究发现,CD25 调节性 T 细胞以幼稚细胞离开胸腺,并在外周血中被激活,认为其可能是较早参与机体免疫负调控的调节性 T 细胞。我们认为,CD8⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞对机体的强免疫反应进行调节,其在时间上和危险因素同时增高,且持续的免疫反应将促进 CD8⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的增殖,其数量增加也是自身免疫反应增强的体现。MR 分析结果提示,CD25⁺⁺ CD8br AC 与 OP 呈双向因果关系。我们认为,CD8⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的 AC 特征可能具备直

接反映 OP 进展和免疫反应强度的潜力,值得进一步探究。

CD8 on TD CD8br、TD CD8br % CD8br、CD3 on CD39⁺CD4⁺和 CD39⁺CD8br % T cell 与 OP 呈负向因果关系。CD8 on TD CD8br、TD CD8br % CD8br 代表了终末分化 CD8br T 细胞,CD3 on CD39⁺CD4⁺和 CD39⁺CD8br % T cell 代表了调节性 T 细胞。Peng 等^[41]研究发现,骨密度随 CD8⁺T 细胞减少而降低,认为 CD8⁺T 细胞可被用于预测 OP 的发生。Weitzmann 等^[42]在艾滋病患者的治疗过程中观察到,CD8⁺细胞减少会导致骨小梁骨质丢失。关于 CD8⁺T 细胞对 OP 的影响,目前尚存在争议。本研究采用 MR 分析其与 OP 的因果关系,有效控制各种混杂的因素,从遗传学的角度证明终末分化的 CD8⁺T 细胞可能与 OP 呈负向因果关系。CD39 是一种胞外酶,存在于不同的免疫细胞上,具有介导免疫抑制、催化腺苷三磷酸降解的功能^[43]。相关研究结果表明,CD39⁺是 CD8⁺调节性 T 细胞介导免疫抑制的重要标志分子^[44-46]。然而,Cao 等^[47]研究发现,CD39⁺CD8br % T cell 与 OP 呈正向因果关系。但鉴于缺少实验研究证据支持 Cao 等^[47]的研究结果,我们认为本研究的结果更加稳健。

代表 B 细胞的免疫细胞特征有 6 个,其中 5 个同时涉及了免疫球蛋白 D (Immunoglobulin D, IgD) 和 CD38。然而,CD19 on IgD⁻CD38br、IgD⁻CD38dim % B cell 与 OP 呈正向因果关系,而 IgD⁻CD38dim AC、BAFF⁻R on IgD⁻CD38br、IgD⁺CD38dim % lymphocyte 与 OP 呈负向因果关系。IgD 是免疫球蛋白之一,其功能尚存在争议。相关研究^[48-49]结果表明,IgD 是一种免疫调节蛋白,可能与 B 细胞的成熟有关。CD38 的功能也存在较大争议,其既可以作为受体,也可以作为酶发挥作用,在机体免疫反应中发挥的具体作用也因疾病、细胞类型、动物模型的不同而不同^[50]。Nigam 等^[51]研究发现,CD38 的缺乏会导致免疫进程加速,如 CD27⁺CD38⁻记忆性 B 细胞产生核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 会促进破骨细胞增殖和分化,进而导致牙槽骨损伤。Breuil 等^[52]研究发现,绝经后 OP 患者的 CD19⁺CD27⁺CD5⁻CD38⁺记忆 B 细胞的数量减少。目前,尚无直接的证据解释 IgD⁻CD38dim % B cell 和 IgD⁻CD38dim AC 分别与 OP 呈正向因果关系和负向因果关系的原因。我们推测,这可能与不同类型的

B 细胞与 OP 的发生发展存在复杂的动态影响有关。

代表 TBNK 细胞的免疫细胞特征有 9 个,其中属于 RC 的免疫细胞特征有 6 个,且与 OP 均呈正向因果关系。Tilkeridis 等^[53]研究发现,在绝经后 OP 患者中,恒定自然杀伤 T 细胞过表达 RANKL,而 RANKL 在破骨细胞增殖和破骨细胞介导的骨质破坏进程中扮演重要角色。Melgar-Rodríguez 等^[54]研究证实,自然杀伤 T (natural killer T, NKT) 细胞的多个亚型参与骨吸收过程。目前关于 NKT 细胞与 OP 关系的研究较少,本研究的结果尚需更多的实验研究予以验证。

代表单核细胞的免疫细胞特征有 3 个,HLA DR on CD14⁺CD16⁻monocyte 与 HLA DR on CD14⁺monocyte 均与 OP 呈正向因果关系,CD16 on CD14⁻CD16⁺monocyte 与 OP 呈负向因果关系。CD14 单核细胞在抗原呈递中发挥重要作用,单核细胞抗原呈递主要依赖主要组织相容性复合物 II (major histocompatibility complex II, MHC II),而 MHC II 反式激活剂是一种转录共激活剂,也是破骨细胞分化的重要调节因子^[55-56]。

Cao 等^[47]于 2022 年首次采用两样本双向 MR 分析了免疫细胞与 OP 的因果关系。然而,本研究与其存在显著的差异:①Cao 等^[47]的研究采用骨密度作为结局,而本研究采用 OP 作为结局。以 OP 作为结局能够避免青少年时期骨密度改变(与 OP 患者骨密度改变的原因完全不同)对结果产生的不利影响,同时对于临床实践具有更重要的指导意义。②本研究选择的数据的样本量更大、质量更高。这在一定程度上能够增加研究结果的准确性和可靠性。MR 随机化是强大的因果关系分析方法,但也存在一定的局限性。为了尽可能降低方法局限性对研究结果的影响,我们采取了以下措施:①采用不同的方法进行 MR 分析,并评估了不同方法间的一致性,尽可能降低水平多效性对研究结果的影响;②采用 F 检验降低弱工具变量的影响,并通过异质性检验降低异质性问题带来的影响。此外,MR 分析的结果毕竟是统计学分析的结果,在临床实践中需结合实际的生物学机制进一步分析。

本研究结果表明,部分免疫细胞特征与 OP 之间存在因果关系,这为探究免疫系统与 OP 间的作用机制提供了线索和方向。

参考文献

- [1] 中华中医药学会. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南[J]. 中医正骨, 2023, 35(1): 1-9.

- [2] NOH J Y, YANG Y, JUNG H. Molecular mechanisms and emerging therapeutics for osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7623.
- [3] GAO Y, PATIL S, JIA J. The development of molecular biology of osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15):8182.
- [4] LISCO G, TRIGGIANI D, GIAGULLI V A, et al. Is there a therapeutic role in natural products? [J] *EndocrMetab Immune Disord Drug Targets*, 2023, 23(10):1278–1290.
- [5] LI J, CHEN X, LU L, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 52:88–98.
- [6] DING K, HUA F, DING W. Gut microbiome and osteoporosis [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(2):438–447.
- [7] ARRON J R, CHOI Y. Bone versus immune system [J]. *Nature*, 2000, 408(6812):535–536.
- [8] ZHANG W, DANG K, HUAI Y, et al. Osteoimmunology: the regulatory roles of T lymphocytes in osteoporosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11:465.
- [9] LI S, LIU Q, WU D, et al. PKC- δ deficiency in B cells displays osteopenia accompanied with upregulation of RANKL expression and osteoclast-osteoblast uncoupling [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9):762.
- [10] PAUL F, ARKIN Y, GILADI A, et al. Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors [J]. *Cell*, 2015, 163(7):1663–1677.
- [11] IKEBUCHI Y, AOKI S, HONMA M, et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signaling [J]. *Nature*, 2018, 561(7722):195–200.
- [12] WANG T, HE C. TNF- α and IL-6: the link between immune and bone system [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(3):213–227.
- [13] TANG M, TIAN L, LUO G, et al. Interferon-gamma-mediated osteoimmunology [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1508.
- [14] BIRNEY E. Mendelian randomization [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2022, 12(4):a041302.
- [15] SMITH G D, EBRAHIM S. Mendelian randomization: can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? [J]. *Int J Epidemiol*, 2003, 32(1):1–22.
- [16] BOWDEN J, HOLMES M V. Meta-analysis and Mendelian randomization: a review [J]. *Res Synth Methods*, 2019, 10(4):486–496.
- [17] BOEF A G, DEKKERS O M, LE CESSIE S. Mendelian randomization studies: a review of the approaches used and the quality of reporting [J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(2):496–511.
- [18] ORRÙ V, STERI M, SIDORE C, et al. Complex genetic signatures in immune cells underlie autoimmunity and inform therapy [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(10):1036–1045.
- [19] KURKI M I, KARJALAINEN J, PALTA P, et al. FinnGen provides genetic insights from a well-phenotyped isolated population [J]. *Nature*, 2023, 613(7944):508–518.
- [20] GAGLIANO TALIUN S A, EVANS D M. Ten simple rules for conducting a mendelian randomization study [J]. *PLoS Comput Biol*, 2021, 17(8):e1009238.
- [21] SEKULA P, DEL GRECO M F, PATTARO C, et al. Mendelian randomization as an approach to assess causality using observational data [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(11):3253–3265.
- [22] XUE H, CHEN J, ZENG L, et al. Causal relationship between circulating immune cells and the risk of Alzheimer's disease: a Mendelian randomization study [J]. *Exp Gerontol*, 2024, 187:112371.
- [23] PRITCHARD J K, PRZEWORSKI M. Linkage disequilibrium in humans: models and data [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(1):1–14.
- [24] BURGESS S, BUTTERWORTH A, THOMPSON S G. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data [J]. *Genet Epidemiol*, 2013, 37(7):658–665.
- [25] BOWDEN J, DEL GRECO M F, MINELLI C, et al. Assessing the suitability of summary data for two-sample Mendelian randomization analyses using MR-Egger regression: the role of the I^2 statistic [J]. *Int J Epidemiol*, 2016, 45(6):1961–1974.
- [26] BOWDEN J, DAVEY SMITH G, BURGESS S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression [J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(2):512–525.
- [27] BURGESS S, THOMPSON S G. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method [J]. *Eur J Epidemiol*, 2017, 32(5):377–389.
- [28] STOREY J D, TIBSHIRANI R. Statistical significance for genomewide studies [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(16):9440–9445.
- [29] HEMANI G, BOWDEN J, DAVEY SMITH G. Evaluating the potential role of pleiotropy in Mendelian randomization studies [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(R2):R195–R208.
- [30] VERBANCK M, CHEN C Y, NEALE B, et al. Detection of widespread horizontal pleiotropy in causal relationships inferred from Mendelian randomization between complex traits

- and diseases[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(5):693–698.
- [31] GRECO M F D, MINELLI C, SHEEHAN N A, et al. Detecting pleiotropy in Mendelian randomisation studies with summary data and a continuous outcome[J]. *Stat Med*, 2015, 34(21):2926–2940.
- [32] BOWDEN J, DEL GRECO M F, MINELLI C, et al. Improving the accuracy of two-sample summary-data Mendelian randomization: moving beyond the NOME assumption[J]. *Int J Epidemiol*, 2019, 48(3):728–742.
- [33] BURGESS S, SMALL D S, THOMPSON S G. A review of instrumental variable estimators for Mendelian randomization[J]. *Stat Methods Med Res*, 2017, 26(5):2333–2355.
- [34] SHRESTHA S, YANG K, GUY C, et al. Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(2):178–187.
- [35] HUYNH A, DUPAGE M, PRIYADHARSHINI B, et al. Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(2):188–196.
- [36] MAGGI E, COSMI L, LIOTTA F, et al. Thymic regulatory T cells[J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(8):579–586.
- [37] BIENVENU B, MARTIN B, AUFRAY C, et al. Peripheral CD8⁺ CD25⁺ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity[J]. *J Immunol*, 2005, 175(1):246–253.
- [38] CHURLAUD G, PITOISE F, JEBBAWI F, et al. Human and mouse CD8⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy[J]. *Front Immunol*, 2015, 6:171.
- [39] COSMI L, LIOTTA F, LAZZERI E, et al. Human CD8⁺ CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺ CD25⁺ regulatory thymocytes[J]. *Blood*, 2003, 102(12):4107–4014.
- [40] WING K, EKMARK A, KARLSSON H, et al. Characterization of human CD25⁺ CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood[J]. *Immunology*, 2002, 106(2):190–199.
- [41] PENG C, GUO Z, ZHAO Y, et al. Effect of lymphocyte subsets on bone density in senile osteoporosis: a retrospective study[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022:3337622.
- [42] WEITZMANN M N, VIKULINA T, ROSER-PAGE S, et al. Homeostatic expansion of CD4⁺ T cells promotes cortical and trabecular bone loss, whereas CD8⁺ T cells induce trabecular bone loss only[J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(9):1070–1079.
- [43] MOESTA A K, LI X Y, SMYTH M J. Targeting CD39 in cancer[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(12):739–755.
- [44] PARODI A, BATTAGLIA F, KALLI F, et al. CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8⁺ T regulatory lymphocytes[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(5):851–862.
- [45] SCHÄKEL L, MIRZA S, WINZER R, et al. Protein kinase inhibitor ceritinib blocks ectonucleotidase CD39—a promising target for cancer immunotherapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(8):e004660.
- [46] TIMPERI E, BARNABA V. CD39 regulation and functions in T cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15):8068.
- [47] CAO R R, YU X H, XIONG M F, et al. The immune factors have complex causal regulation effects on bone mineral density[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:959417.
- [48] CHEN K, CERUTTI A. The function and regulation of immunoglobulin D[J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(3):345–352.
- [49] CHEN K, CERUTTI A. New insights into the enigma of immunoglobulin D[J]. *Immunol Rev*, 2010, 237(1):160–179.
- [50] PIEDRA-QUINTERO Z L, WILSON Z, NAVA P, et al. CD38: an immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:597959.
- [51] NIGAM L A, VANIKAR A V, KANODIA K V, et al. Small round tumour cells (CD38, CD 79a positive) in the adrenal gland[J]. *Urol Case Rep*, 2017, 16:22–24.
- [52] BREUIL V, TICCHIONI M, TESTA J, et al. Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the Immunos study[J]. *Osteoporos Int*, 2010, 21(5):805–814.
- [53] TILKERIDIS K, KIZIRIDIS G, VERVERIDIS A, et al. Immunoporosis: a new role for invariant natural killer T (NKT) cells through overexpression of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:2151–2158.
- [54] MELGAR-RODRÍGUEZ S, CAFFERATA E A, DÍAZ N I, et al. Natural killer T (NKT) cells and periodontitis: potential regulatory role of NKT10 cells[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021:5573937.
- [55] WANG X, ZHANG X, HAN Y, et al. Role of the major histocompatibility complex class II protein presentation pathway in bone immunity imbalance in postmenopausal osteoporosis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:876067.
- [56] BENASCIUTTI E, MARIANI E, OLIVA L, et al. MHC class II transactivator is an in vivo regulator of osteoclast differentiation and bone homeostasis co-opted from adaptive immunity[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(2):290–303.

(收稿日期:2024-06-29 本文编辑:吕宁)