

肠道菌群与颈椎病因果关系的双向孟德尔随机化分析

温博智, 陈月峰, 王宝剑, 马睿辰, 戴文康, 马玉峰

(北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

摘要 **目的:**探讨肠道菌群与颈椎病的因果关系。**方法:**分别从 IEU OpenGWAS project 数据库和 MiBioGen 数据库获取颈椎病和肠道菌群的全基因组关联研究数据,从中筛选符合要求的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点作为工具变量进行两样本双向孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)分析。采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)作为主要分析方法,并采用 MR-Egger、加权中位数法、加权模式、简单模式进行补充分析。采用 Cochran's Q 检验对 IVW 和 MR-Egger 法的分析结果进行异质性检验,采用 MR-Egger 回归进行水平多效性检验,采用留一法进行敏感性分析。**结果:**共筛选出颈椎病的 SNP 位点 70 个;肠道菌群的 SNP 位点 46 个,其中 δ -变形菌纲 11 个、肠杆菌科 8 个、瘤胃球菌属 UCG011 7 个、狭义梭菌属 4 个、粪球菌属 8 个、瘤胃梭菌属 8 个。正向 MR 分析结果显示, δ -变形菌纲与颈椎病存在负向因果关系,狭义梭菌属、粪球菌属与颈椎病存在正向因果关系;反向 MR 分析结果显示,颈椎病与肠道菌群之间不存在明显的因果关系。水平多效性检验和异质性检验结果显示,不存在水平多效性和异质性;留一法分析结果显示,无明显离群值,提示 MR 分析结果稳健。**结论:**肠道菌群中的 δ -变形菌纲、狭义梭菌属、粪球菌属与颈椎病存在可靠的因果关系。

关键词 颈椎病;痹证;脾(中医);肠道微生物群;孟德尔随机化分析

Investigation on the causal relationship between gut microbiota and cervical spondylosis: a bidirectional mendelian randomization analysis

WEN Bozhi, CHEN Yuefeng, WANG Baojian, MA Ruichen, DAI Wenkang, MA Yufeng

The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate the causal relationship between gut microbiota (GM) and cervical spondylosis (CS). **Methods:** The genome-wide association study (GWAS) datasets about GM and CS were extracted from the IEU OpenGWAS project database and MiBioGen database, respectively. The eligible single nucleotide polymorphism (SNP) loci were screened as instrumental variables for two-sample bidirectional mendelian randomization (MR) analysis. Inverse variance weighted (IVW) were selected as the main analysis method, and MR-Egger, weighted median estimator (WME), weighted mode (WM) and simple mode (SM) as supplemental analysis method. Cochran's Q test was performed on the heterogeneity of the results analyzed by IVW method and MR-Egger method. In addition, the horizontal pleiotropy was examined by MR-Egger regression, and the sensitivity of the MR analysis results was evaluated by leave-one-out (LOO) test. **Results:** Seventy CS SNP loci and 46 GM (11 δ -proteobacteria, 8 enterobacteriaceae, 7 ruminococcus UCG011, 4 clostridium sensu stricto, 8 coprococcus, and 8 ruminal clostridium) SNP loci were included and served as the instrumental variables. The results of forward MR analysis showed an inverse causal relationship between δ -proteobacteria and CS, and a positive causal relationship between clostridium sensu stricto, coprococcus and CS. The results of reverse MR analysis showed that there was no obvious causal relationship between CS and GM. The results of horizontal pleiotropy test and heterogeneity test indicated that there was no horizontal pleiotropy and heterogeneity. The results of LOO test showed no outlier, suggesting the results of the MR analysis in this study were stable and reliable. **Conclusion:** GM, including δ -proteobacteria, clostridium sensu stricto and coprococcus, has a reliable causal relationship with CS.

Keywords cervical spondylosis; arthromyodynia; spleen (TCM); gastrointestinal microbiome; Mendelian randomization analysis

现代医学中的“肠-骨轴”理论主要探讨肠道微生物或它们产生、合成的分子对骨骼健康的影响^[1],

这为中医“从脾治痹”理论^[2]提供了现代医学依据^[3]。颈椎病属中医学“骨痹”范畴,以往已有从脾论治颈椎病的相关研究^[4-5],但肠道菌群与颈椎病之间是否存在因果关系,目前尚无定论。因此,采用可

靠的方法评估二者之间的因果关系具有重要价值。孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 是一种新兴的因果关系推断方法,利用单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 作为工具变量来评估相关暴露对结局的影响^[6-7],能够克服观察性研究无法排除混杂因素和反向因果关系干扰的问题^[8-9]。因此,本研究采用两样本双向 MR 探讨了肠道菌群与颈椎病的因果关系,现总结报告如下。

1 资料和方法

1.1 数据来源

颈椎病全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 数据来自 IEU OpenGWAS project 数据库,样本量 462 933 例,数据 ID: ukb-b-2349; 肠道菌群的 GWAS 数据来自 MiBioGen 数据库,来自 Kurilshikov 等^[10]的研究,涉及 211 个肠道菌群分类群 (从属到门级别)。所有数据均来源于欧洲人群,伦理审查及知情同意均已各原始研究中获得。

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。

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。将肠道菌群遗传数据集导入分析工具 R 包,以 $P < 1.0 \times 10^{-5}$ 为条件筛选差异显著的 SNP 位点^[11]。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。将筛选出的肠道菌群的 SNP 位点作为工具变量用于正向 MR 分析。按照相同方法筛选颈椎病的 SNP 位点作为工具变量用于反向 MR 分析。

1.3 MR 分析

1.3.1 正向 MR 分析 以肠道菌群的 SNP 位点作为工具变量进行正向 MR 分析。在 R4.3.3 软件上,采用 TwoSampleMR0.5.6 软件包、MR-PRESSO 软件包进行 MR 分析。采用逆方差加权法 (inverse variance weighted, IVW) 作为主要分析方法,根据 P 值判定肠道菌群与颈椎病是否存在因果关系, $P < 0.05$ 、 $OR < 1$ 提示二者存在负向因果关系, $P < 0.05$ 、 $OR > 1$ 提示二者存在正向因果关系。将 MR-Egger、加权中位数法、

加权模式、简单模式作为补充分析方法,当补充分析方法与 IVW 分析结果方向一致时,提示肠道菌群与颈椎病存在因果关系。采用 Cochran's Q 检验对 IVW 和 MR-Egger 法的分析结果进行异质性检验,采用 MR-Egger 回归进行水平多效性检验,采用留一法进行敏感性分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

1.3.2 反向 MR 分析 以颈椎病的 SNP 位点作为工具变量进行反向 MR 分析。MR 分析、异质性检验、水平多效性检验及敏感性分析方法同正向 MR 分析。

2 结果

2.1 工具变量筛选结果

基于工具变量的筛选标准,共筛选出颈椎病的 SNP 位点 70 个;肠道菌群的 SNP 位点 46 个,其中 δ -变形菌纲 11 个、肠杆菌科 8 个、瘤胃球菌属 UCG011 7 个、狭义梭菌属 4 个、粪球菌属 8 个、瘤胃梭菌属 8 个。

2.2 正向 MR 分析结果

IVW 分析结果显示, δ -变形菌纲、肠杆菌科、瘤胃球菌属 UCG011 与颈椎病存在负向因果关系,狭义梭菌属、粪球菌属、瘤胃梭菌属与颈椎病存在正向因果关系,但肠杆菌科、瘤胃球菌属 UCG011 及瘤胃梭菌属存在补充分析结果与 IVW 分析结果方向不一致的情况,予以剔除 (表 1、图 1)。水平多效性检验和异质性检验结果显示,不存在水平多效性和异质性 (表 2)。留一法分析结果显示,无明显离群值,提示 MR 分析结果稳健 (图 2)。

2.3 反向 MR 分析结果

MR 分析结果显示,颈椎病与肠道菌群之间不存在明显的因果关系 (表 3)。水平多效性检验和异质性检验结果显示,不存在水平多效性和异质性;留一法分析结果显示,无明显离群值,提示 MR 分析结果稳健。

3 讨论

颈椎病属中医学“骨痹”范畴,多由脏腑机能失调,正气亏虚,致风、寒、湿等外邪侵入机体所致^[12]。肾精亏虚是其发病之本,而脾虚也贯穿于其发病过程^[13-14]。从脾肾的关系而言,肾为先天之本,脾为后天之本;脾为气血生化之源,肾为五脏阴阳之根本,主骨生髓。因此,肾精亏虚导致的痹证,也可以从脾入手治疗。肠道内部微生物对食物的消化和吸收过程,

与中医“脾主运化”功能对应,而脾胃功能障碍引起的腹胀等症状与肠道菌群失调引起的症状一致。因此,可以通过调节肠道微环境调节“脾主运化”功能治疗痹证^[3]。MR 分析是以 SNP 位点作为工具变量来评估相关暴露对结果影响的研究方法。个体的遗传信息在出生前已确定,不受环境因素影响,因此分析结果较为可靠。应用新兴的 MR 分析探讨肠道菌群与颈椎病的因果关系,可为临床应用“从脾治痹”理论治疗颈椎病提供有力证据。

表 1 肠道菌群与颈椎病因果关系的正向孟德尔随机化分析结果

肠道菌群	分析方法 ¹⁾	SNP ²⁾ 位点数量/个	β 值	OR 值(95% CI)	P 值
δ -变形菌纲	IVW	11	-0.00222	0.998(0.996,0.999)	0.032
	MR-Egger	11	-0.00788	0.992(0.979,1.005)	0.274
	WME	11	-0.00216	0.998(0.995,1.001)	0.131
	WM	11	-0.00246	0.998(0.993,1.002)	0.465
	SM	11	-0.00246	0.998(0.993,1.003)	0.477
肠杆菌科	IVW	8	-0.00276	0.997(0.995,0.999)	0.030
	MR-Egger	8	0.00487	1.005(0.991,1.018)	0.504
	WME	8	-0.00138	0.998(0.996,1.002)	0.383
	WM	8	0.00002	1.000(0.995,1.004)	0.993
	SM	8	-0.00254	0.999(0.994,1.005)	0.927
瘤胃球菌属 UCG011	IVW	7	-0.00125	0.999(0.998,0.999)	0.035
	MR-Egger	7	0.00269	1.003(0.996,1.009)	0.472
	WME	7	-0.00099	0.999(0.997,1.001)	0.200
	WM	7	-0.00091	0.999(0.997,1.001)	0.459
	SM	7	-0.00095	0.999(0.997,1.001)	0.449
狭义梭菌属	IVW	4	0.00342	1.003(1.000,1.007)	0.034
	MR-Egger	4	0.00356	1.004(0.982,1.026)	0.781
	WME	4	0.00338	1.003(0.999,1.007)	0.075
	WM	4	0.00469	1.004(0.999,1.009)	0.163
	SM	4	0.00191	1.002(0.996,1.007)	0.511
粪球菌属	IVW	8	0.00346	1.003(1.001,1.006)	0.005
	MR-Egger	8	0.00053	1.001(0.977,1.025)	0.967
	WME	8	0.00232	1.002(0.999,1.005)	0.146
	WM	8	0.00196	1.002(0.997,1.007)	0.425
	SM	8	0.00196	1.002(0.997,1.007)	0.447
瘤胃梭菌属	IVW	8	0.00293	1.003(1.001,1.005)	0.009
	MR-Egger	8	-0.00202	0.998(0.986,1.010)	0.759
	WME	8	0.00277	1.003(1.000,1.006)	0.046
	WM	8	0.00253	1.002(0.998,1.007)	0.282
	SM	8	0.00258	1.002(0.998,1.007)	0.265

注:1)中 IVW 为逆方差加权法,WME 为加权中位数法,WM 为加权模式,SM 为简单模式;2)单核苷酸多态性。

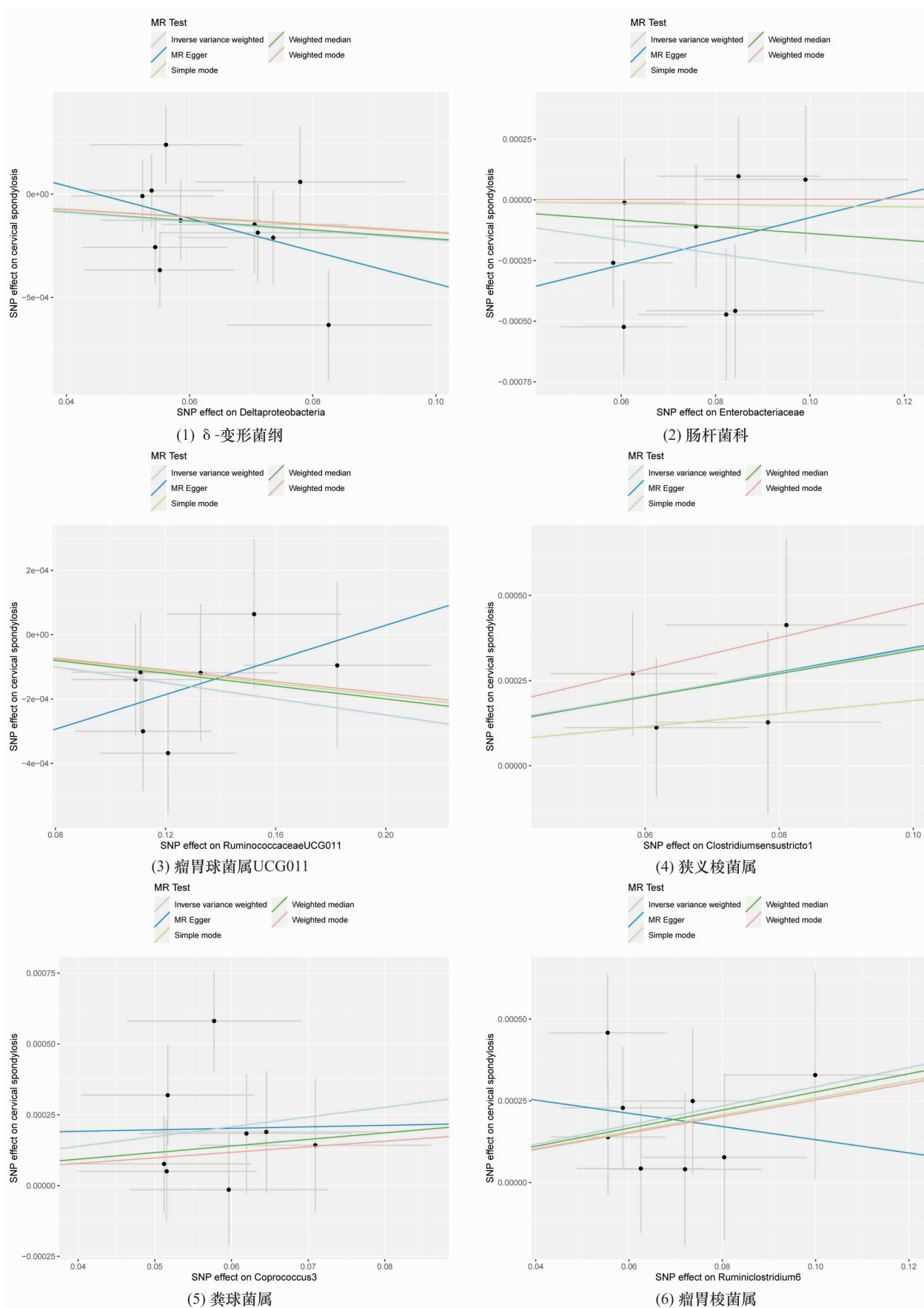


图 1 肠道菌群与颈椎病因果关系的正向孟德尔随机化分析散点图

表 2 肠道菌群与颈椎病因果关系的正向孟德尔随机化分析的异质性和水平多效性检验结果

肠道菌群	Cochran's Q 检验 P 值		MR-Egger 回归	
	逆方差加权法	MR-Egger	截距值	P 值
δ-变形菌纲	0.383	0.359	0.000355	0.419
肠杆菌科	0.238	0.269	-0.000559	0.300
瘤胃球菌属 UCG011	0.731	0.812	-0.000509	0.300
狭义梭菌属	0.813	0.622	-0.000009	0.991
粪球菌属	0.368	0.274	0.000172	0.818
瘤胃梭菌属	0.743	0.720	0.000333	0.455

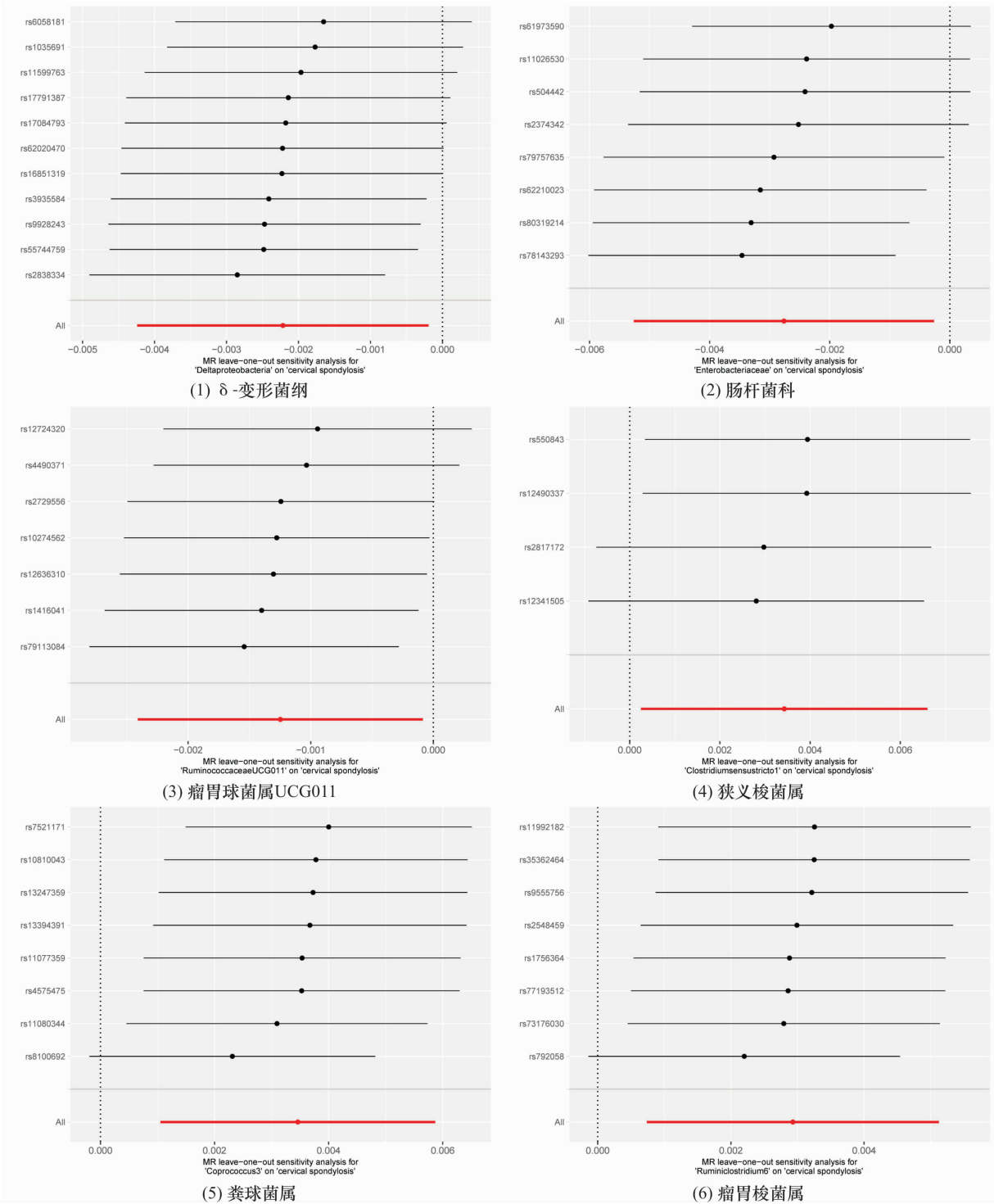


图 2 肠道菌群与颈椎病因果关系的正向孟德尔随机化分析的敏感性分析结果

表 3 肠道菌群与颈椎病因果关系的反向孟德尔随机化分析结果

分析方法 ¹⁾	SNP ²⁾ 位点数量/个	β 值	OR 值(95% CI)	P 值
IVW	70	0.00075	1.001(0.999,1.003)	0.452
MR-Egger	70	-0.00272	0.997(0.991,1.003)	0.367
WME	70	0.00072	1.001(0.998,1.004)	0.616
WM	70	0.00047	1.000(0.995,1.006)	0.854
SM	70	0.00021	1.000(0.994,1.007)	0.950

注:1)中 IVW 为逆方差加权法,WME 为加权中位数法,WM 为加权模式,SM 为简单模式;2)单核苷酸多态性。

本研究使用公共数据库中的肠道菌群和颈椎病数据,通过 MR 分析发现, δ -变形菌纲与颈椎病存在负向因果关系,狭义梭菌属、粪球菌属与颈椎病存在正向因果关系。狭义梭菌属中的某些梭菌产生的孢子发育后会产生毒素,可导致肌肉僵硬,这可能与颈椎病的发病有关^[15]。有研究表明,骨关节炎患者的毛螺菌属和瘤胃球菌属的相对丰度明显低于健康人群^[16]。这些研究均提示肠道菌群异常可能与骨关节疾病的发生存在关联。

本研究的结果提示,肠道菌群中的 δ -变形菌纲、狭义梭菌属、粪球菌属与颈椎病存在可靠的因果关系。本研究的数据来源于欧洲人群,所得结论是否适合国内人群,还有待进一步的研究验证。

参考文献

- [1] VILLA C R, WARD W E, COMELLI E M. Gut microbiota-bone axis[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(8):1664-1672.
- [2] 赵利敬,李沛,陈玉琦,等. 颈椎病从脾论治初探[J]. 按摩与康复医学, 2015, 6(6):4-6.
- [3] 徐芳茹,周全. 基于“肠-关节轴”浅析“从脾治痹”[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(3):1-5.
- [4] 杨永龙. 痹证从脾论治浅析[J]. 中医研究, 2001, 14(6):7-8.
- [5] 郭元琦,陈丽仪,符文彬,等. 腹针治疗颈椎病临床随机对照研究[J]. 中国针灸, 2007, 27(9):652-656.
- [6] SANNA S, VAN ZUYDAM N R, MAHAJAN A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases[J]. Nat Genet, 2019, 51(4):600-605.
- [7] XU Q, NI J J, HAN B X, et al. Causal relationship between gut microbiota and autoimmune diseases: a two-sample mendelian randomization study [J]. Front Immunol, 2021, 12:746998.
- [8] 包绮晗,李承圣,王浩桦,等. 基于孟德尔随机化法的 BMI 与 2 型糖尿病因果关系研究[J]. 郑州大学学报(医学版), 2022, 57(5):645-649.
- [9] 马玮玮,陈虹谷,李彤彤,等. 基于孟德尔随机化分析肠道菌群与骨密度的因果关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(12):1780-1785.
- [10] KURILSHIKOV A, MEDINA-GOMEZ C, BACIGALUPE R, et al. Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition [J]. Nat Genet, 2021, 53(2):156-165.
- [11] LI M, LIN J, LIANG S, et al. The role of age at menarche and age at menopause in Alzheimer's disease: evidence from a bidirectional mendelian randomization study [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(15):19722-19749.
- [12] 张燕霞,张成博. 骨痹古代中医文献研究[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(3):223-225.
- [13] 黄旦,刘健,万磊,等. 从脾治痹探讨[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(1):46-50.
- [14] 庞军,胡云丹,李高焱,等. 中医从脾肾辨证论治颈型颈椎病临床浅探[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(12):47-48.
- [15] 李聪健. 基于网络分析的梭菌属系统发育基因组学研究[D]. 昆明:云南大学, 2022.
- [16] 卢耀鸣,郭达,卢晓敏,等. 中国广东地区膝骨关节炎患者与健康人群肠道菌群差异性分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(11):1679-1684.

(收稿日期:2024-07-02 本文编辑:李晓乐)