

弓形虫感染与脑炎因果关系的双样本孟德尔随机化分析

李伊凡¹ 盛书颜² 吴梦云¹ 计永胜³ 姚 湧¹

摘要 目的 利用孟德尔随机化(MR)分析探究弓形虫感染与脑炎的因果关系,并通过免疫组化观察脑组织中的弓形虫包囊分布和炎症情况。方法 获取弓形虫感染和脑炎的全基因组关联分析数据,筛选出单核苷酸多态性(SNPs)位点,以逆方差加权法为主进行MR分析,以OR值及95%CI评价弓形虫感染与脑炎之间的因果关系。利用异质性检验、水平多效性检验、留一法进行质量控制。利用Wh6弓形虫包囊感染的小鼠脑组织切片进行免疫组化染色,使用Image J软件进行图片分析。结果 筛选出29个弓形虫感染与脑炎存在相关性的SNP,IVW方法结果提示弓形虫感染使得脑炎的患病分险为原来的0.98倍($OR=0.98$,95%CI为0.76~1.27),显示两者无因果关系。质量控制结果提示筛选出的SNPs具有稳定可靠性。弓形虫包囊在脑组织各部位分布不同。结论 弓形虫感染与脑炎具有相关性,但未有充分证据证明二者之间存在因果关系。

关键词 孟德尔随机化;弓形虫;脑炎

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0028-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.005

2023-10-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81802026);安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2019A0264、2023AH040077)

作者单位:安徽医科大学¹基础医学院病原生物学教研室、²第一临床医学院,合肥 230032

³中国科学技术大学生命科学与医学部,合肥 230027

作者简介:李伊凡,女,硕士研究生;

姚 湧,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yaoyong@ahmu.edu.cn

刚地弓形虫是一种细胞内寄生原虫,可感染包括人类在内的多种动物。孕妇急性感染会导致胎儿先天性感染,引起胎儿的死产和自然流产^[1]。弓形虫具有机会致病性,所致损伤主要发生在胎儿或免疫受损人群;在免疫功能正常的个体,弓形虫感染通常无明显临床症状,而是在宿主中枢神经系统以组织包囊形式呈慢性感染状态^[2]。有研究^[3]表明,慢性弓形虫感染可能会改变人类行为和认知功能,甚至可能增加患神经系统疾病的风险。在免疫功能低下个体中,例如患有获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的个体,隐性的弓形虫感染可能会活化,诱发弓形虫脑炎^[4]。

对于观察性流行病学的研究,因为从来不能确定关联的所有混杂因素是否已被识别,传统分析中因果结论很少是合理的,即使在测量暴露和结果之间的强大统计关联时也是如此。孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)提供了一种在流行病学研究中探索因果关系问题的替代方法,通过使用假设满足工具变量(instrumental variable, IV)假设的额外遗传变异,即以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)作为工具变量,模拟随机对照试验设计的方法,推断两者之间是否存在因果关系^[5]。目前,大规模全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)数据的公开

expression levels were reduced in the lung tissue ($P < 0.05$), and p-NF- κ B protein expression levels were elevated ($P < 0.05$); the relative mRNA expression of *Nrf2* and *HO-1* in lung tissue was decreased, and the relative mRNA expression of *Keap1* was elevated ($P < 0.05$). Compared with the FA group, the lung injury of rats in the MT group was improved; the levels of GSH and SOD in the lung tissue were increased ($P < 0.05$), and the level of 8-OHdG was decreased ($P < 0.05$); the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the alveolar lavage fluid were decreased ($P < 0.05$); and the expression levels of the *Nrf2* and *HO-1* proteins in the lung tissue were increased ($P < 0.05$). p-NF- κ B protein expression level was decreased ($P < 0.05$); the relative mRNA expression levels of *Nrf2* and *HO-1* in lung tissues were increased ($P < 0.05$), and the relative mRNA expression level of *Keap1* was decreased ($P < 0.05$) in lung tissues, and all of them were in a dose-dependent manner. **Conclusion** MT can alleviate oxidative stress and inflammatory responses and mitigate FA exposure-induced acute lung injury by regulating the *Nrf2/Keap1/HO-1* signaling pathway.

Key words melatonin; nuclear factor E2-related factor 2; acute lung injury; formaldehyde

发表,为 MR 研究提供了大量可靠的遗传变异,大量研究利用 MR 方法探究多个性状之间的因果关系^[6-7]。该研究利用 MR 分析探究弓形虫感染与脑炎的因果关系,并且利用免疫组化观察脑组织中弓形虫包囊的存在和病理情况,为临床弓形虫病的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 数据来源 英国医学研究理事会(Medical Research Council, MRC)整合流行病学研究部创建的 IEU Open GWAS 数据库主要包含公开可用的 GWAS 汇总数据。综合考虑目前数据的样本量、测序深度和数据更新时间等因素,本研究的弓形虫感染的 GWAS 数据选择来自 2020 年 Butler-Laporte G

团队的研究,包含 3 919 例欧洲人群荟萃分析数据的 9 173 429 个 SNPs 位点;脑炎的 GWAS 数据来自 2021 年 217 851 例欧洲人群荟萃分析数据的 16 380 466 个 SNPs 位点数据。见表 1。

1.2 工具变量的选择 从有关弓形虫感染的 GWAS 汇总数据中,以 $P < 5 \times 10^{-8}$ 为筛选条件,利用 R 软件对选出具有全基因组意义的 SNPs 位点进行整合,还进行了连锁不平衡分析($r^2 < 0.001$, 聚集距离 = 10 000 kb),为避免分析致结果发生偏倚,选择一组低于全基因组显著性水平(1×10^{-5})的 SNPs 作为工具变量,以保证满足工具变量的独立性。将获取的敏感 SNPs 在脑炎 GWAS 数据库中进行分析,去除缺失的 SNPs,最终筛选出 29 个 SNPs 与弓形虫感染和脑炎均相关。见表 2。

表 1 两样本 MR 研究中 GWAS 数据信息

变量	数据来源	人群	样本量	SNP(个)	性别
弓形虫感染	https://gwas.mrcieu.ac.uk/	欧洲人	3 919	9 173 429	男性和女性
其他脑炎	https://gwas.mrcieu.ac.uk/	欧洲人	217 851	16 380 466	男性和女性

表 2 最终的 29 个 SNPs 信息

序号	SNPs ID	CHR	EA	OA	弓形虫感染相关			脑炎相关		
					β	S_x	P 值	β	S_x	P 值
1	rs10869437	9	T	G	0.163	0.034	1.37E-06	-0.080	0.090	0.375
2	rs10899623	11	T	C	0.145	0.032	8.09E-06	0.247	0.115	0.032
3	rs112511265	4	C	T	0.189	0.042	6.05E-06	-0.184	0.136	0.176
4	rs117000365	21	T	C	0.479	0.106	6.56E-06	0.063	0.317	0.842
5	rs12930011	16	T	C	0.108	0.024	6.16E-06	0.174	0.079	0.027
6	rs12930749	16	G	A	0.151	0.030	6.15E-07	0.036	0.109	0.738
7	rs141858166	5	A	G	0.384	0.086	7.61E-06	0.158	0.314	0.614
8	rs142600277	8	A	G	0.418	0.091	3.95E-06	0.167	0.342	0.625
9	rs143797072	6	G	A	0.234	0.051	3.92E-06	0.043	0.118	0.716
10	rs148929820	5	A	G	0.442	0.072	8.49E-10	0.232	0.326	0.477
11	rs17711616	11	G	A	0.147	0.031	2.60E-06	-0.047	0.113	0.678
12	rs2093705	13	C	T	-0.116	0.023	4.56E-07	-0.010	0.077	0.892
13	rs2268356	10	T	C	-0.111	0.023	1.36E-06	0.004	0.075	0.961
14	rs2279204	10	C	T	0.254	0.049	1.75E-07	-0.105	0.117	0.371
15	rs34863121	1	T	C	0.466	0.101	3.81E-06	0.160	0.327	0.624
16	rs34970068	8	G	T	0.508	0.104	1.05E-06	-0.513	0.516	0.320
17	rs3847677	12	G	T	0.121	0.025	1.14E-06	-0.025	0.082	0.762
18	rs45508391	14	A	G	-0.247	0.050	7.23E-07	-0.430	0.176	0.014
19	rs540392	3	A	C	-0.107	0.023	2.74E-06	0.067	0.075	0.369
20	rs560868180	6	T	C	0.411	0.091	6.21E-06	0.302	0.575	0.600
21	rs61935867	12	A	G	-0.118	0.026	4.65E-06	-0.106	0.089	0.234
22	rs7249665	19	C	T	-0.115	0.024	2.24E-06	-0.014	0.082	0.868
23	rs72550836	8	C	T	0.330	0.071	3.94E-06	-0.236	0.168	0.160
24	rs72899128	6	T	G	0.369	0.081	5.30E-06	0.781	0.675	0.248
25	rs75136602	9	A	G	0.192	0.042	4.21E-06	0.008	0.144	0.955
26	rs76488573	2	A	G	0.266	0.053	4.25E-07	-0.175	0.098	0.074
27	rs77067516	18	T	G	0.461	0.099	3.06E-06	-0.193	0.516	0.708
28	rs823970	3	C	T	-0.109	0.022	1.27E-06	0.033	0.075	0.657
29	rs9363381	6	C	A	0.102	0.023	8.25E-06	-0.012	0.074	0.869

SNPs ID: SNPs 编码; CHR: 染色体序号; EA: 效应等位基因; OA: 非效应等位基因; β : 等位基因效应值; S_x : 标准误

1.3 虫株与实验动物 弓形虫 Wh6 虫株由安徽医科大学病原生物学安徽省重点实验室提供。5 周龄~8 周龄雌性昆明鼠购买于安徽医科大学实验动物中心。

1.4 研究方法

1.4.1 研究设计 本研究从 GWAS 数据库中获得弓形虫感染的相关数据,并获取脑炎的相关数据,然后筛选出与弓形虫感染和脑炎均密切相关的 SNPs 作为工具变量,进行两样本孟德尔随机化方法分析,评估弓形虫感染与脑炎的因果关系。最后进行异质性检验、水平多效性检验等验证因果关系的可靠性。MR 分析需要满足 3 个假设:假设 1,与暴露显著相关;假设 2,与混杂因素不相关;假设 3,与结局不相关。对应本研究,弓形虫感染被用作暴露因素,以与弓形虫感染显著相关的 SNPs 作为工具变量,脑炎作为结果变量。见图 1。

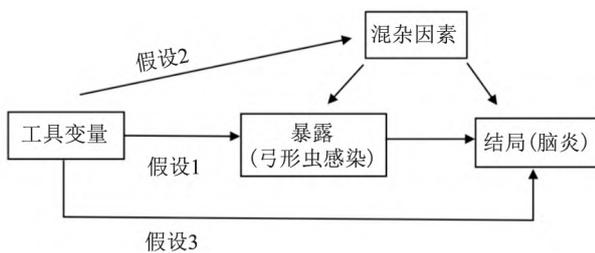


图 1 MR 分析模型

1.4.2 动物感染 取慢性感染小鼠的脑组织,研磨制备成匀浆,灌胃 50 只小鼠,每只灌胃 25 个包囊。

1.4.3 免疫组化观察包囊分布情况 石蜡切片梯度脱水,微波修复暴露抗原,3% H₂O₂ 37 °C 温箱孵育灭活内源过氧化物酶,10% 山羊血清 37 °C 封闭 30 min,加一抗(1:200)温箱孵育 15 min,4 °C 过夜,加二抗 37 °C 孵育 30 min,DAB 液显色,苏木精染核,二甲苯通透 1 h,中性树脂胶封片,晾干后采用 TG 全景组织细胞定量分析系统拍照观察。

1.5 统计学处理 采用逆方差加权(inverse-variance weighted, IVW)法、MR-Egger 法、简单众数法(simple mode, SM)、加权中位数法(weighted medi-

an, WME) 和加权众数法(weighted mode, WM) 5 种 MR 方法评估弓形虫感染与脑炎的发生是否有因果关系。采用异质性检验检验 SNPs 之间的差异,采用 MR-Egger 截距检验水平多效性的存在与否,并且采用留一法依次剔除 SNP,算出剩余 SNPs 的合并效应,然后观察各 SNP 是否对结果造成影响,来评估随机化结果的有效性和稳定性。研究采用 R4.1.2 软件和 R 软件包 Two sample MR 进行统计分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

异质性检验通过 Cochran Q 检验来评估各个 IV 间的差异,不同 IV 间的差异大,则异质性就大。MR-Egger 回归的截距项用于评估遗传变异是否通过暴露以外的途径影响结局,表示各 IV 之间是否存在水平多效性而违反了 MR 分析的假设 2、假设 3。如果该截距项接近于 0,表示不存在水平多效性。留一法(leave-one-out sensitivity test)主要是逐个剔除工具变量后计算剩余工具变量的合并效应,如果剔除某个工具变量后剩余工具变量的 MR 结果与总结果差异较小,说明 MR 分析结果具有有效性和稳健性。

采用 Image J 软件分别统计前额叶、纹状体、小脑和海马下丘脑的弓形虫包囊数量及小鼠脑组织切片面积,计算脑组织各部位单位面积的包囊数量。使用 GraphPad Prism 9.3.1(471) 进行数据分析并制图。

2 结果

2.1 MR 分析结果 本研究采用去除连锁不平衡的方法,筛选出 29 个 SNPs 评估弓形虫感染与脑炎的因果关系。共采用了 5 种 MR 分析方法,其中 IVW 方法是 MR 分析的主要方法,见表 3。IVW 方法结果提示弓形虫感染使得脑炎的患病分险为原来的 0.98 倍(OR = 0.98,95% CI 为 0.76 ~ 1.27),显示弓形虫感染与脑炎呈负相关。根据 OR 的 95% CI 情况,弓形虫感染与脑炎没有相关关系。弓形虫感染后,脑炎的患病风险并未随弓形虫的感染而升高,提示弓形虫感染并非是脑炎发生发展的危险因素。见图 2。

表 3 脑炎与弓形虫感染对应的 5 种 MR 方法的效应值

暴露	方法	SNP(个)	Beta	OR	95% CI	P 值
ebi-a-GCST90006927	IVW	29	-0.02	0.98	(0.76 ~ 1.27)	9.08E-01
	MR-Egger		-0.20	0.82	(0.44 ~ 1.50)	5.19E-01
	SM		0.02	1.02	(0.56 ~ 1.87)	9.49E-01
	WME		-0.10	0.90	(0.62 ~ 1.30)	5.80E-01
	WM		-0.33	0.72	(0.42 ~ 1.21)	2.20E-01

ebi-a-GCST90006927: 弓形虫感染汇总数据在 GWAS 数据库中的 ID

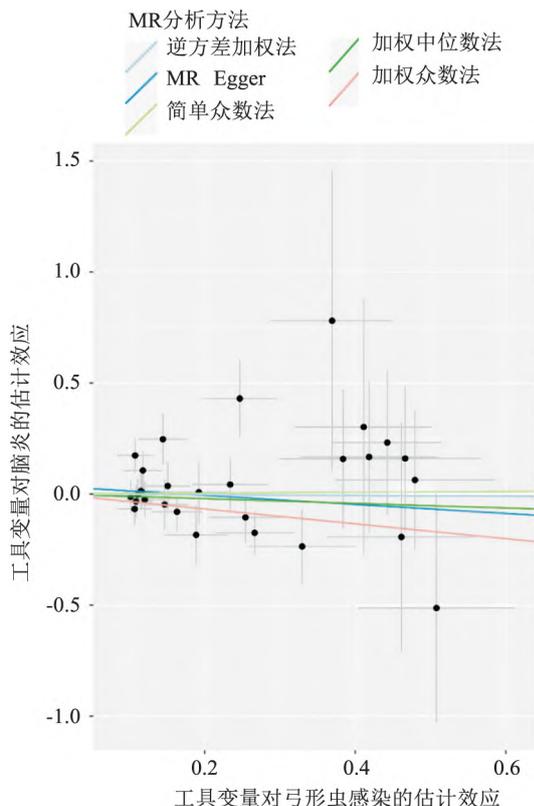


图2 脑炎与弓形虫感染的5种MR模型散点图

2.2 SNPs 质量控制 用 MR-Egger 回归和 IVW 法进行异质性检验,结果显示 $P > 0.05$, 差异无统计学意义,即无需考虑异质性对后续分析结果造成的影响。敏感性分析后显示,MR 结果具有稳定性,各 IV 的效应值与总效应值相近,逐步剔除各 SNP 后,去除任何一个 SNP 都不会有明显的影 响,表明本研究的随机化分析结果是可靠的,见图 3A。弓形虫感染与脑炎之间 MR-Egger 回归结果显示 $P > 0.05$, 表明水平多效性对 MR 分析结果造成的影响较小,见图 3B。

2.3 弓形虫包囊在脑组织中的分布情况 经灌胃感染弓形虫包囊的小鼠,一个月后在其脑组织切片中观察到,包囊完整时,有少量或者没有单核细胞浸润现象;在包囊破裂后,包囊周围存在大量单核细胞浸润现象;在机体的免疫作用下,随后逐渐恢复,见图 4。包囊在脑组织的不同部位分布不均匀,在前额叶和海马下丘脑分布最多且两者无明显差异;两者内包囊数量高于纹状体,小脑分布最少,见图 5。结果表明,在个体免疫力正常的情况下,包囊可以长期存在于个体的脑组织中,当机体免疫力降低的时

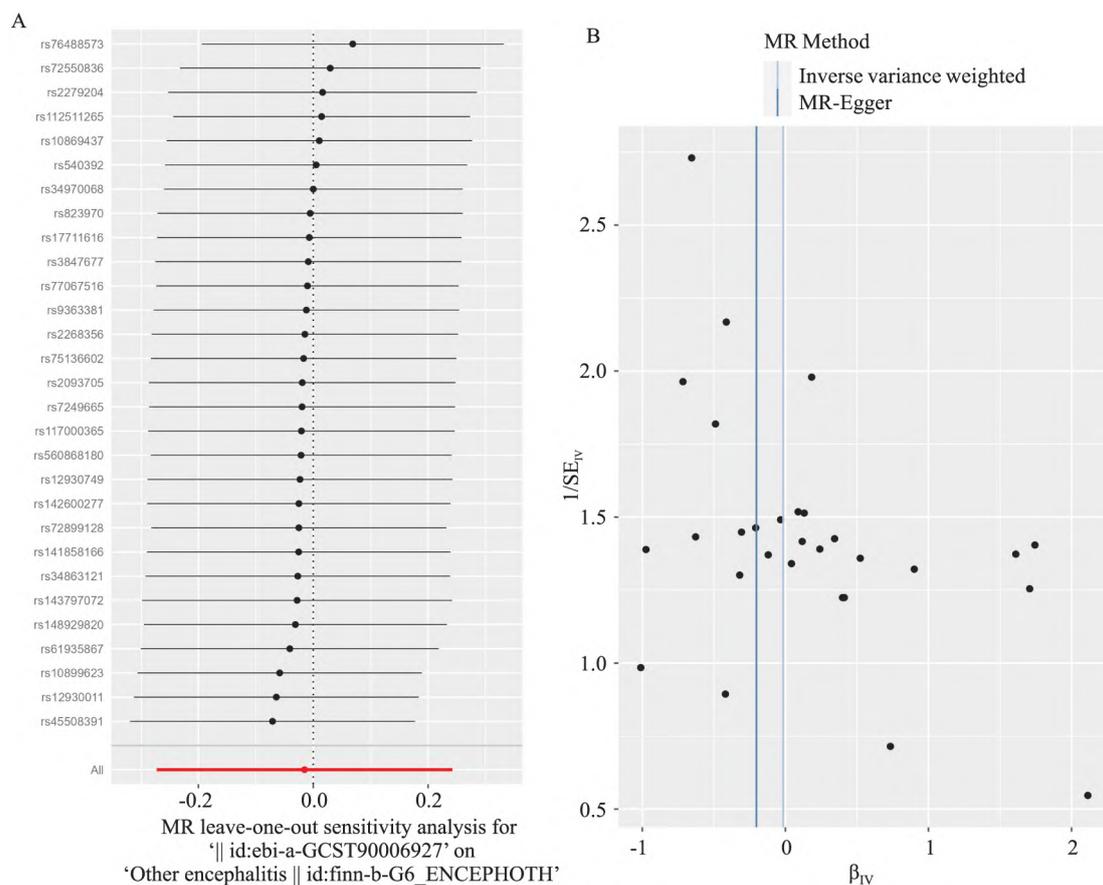


图3 “留一法”分析结果森林图(A)和MR分析漏斗图(B)

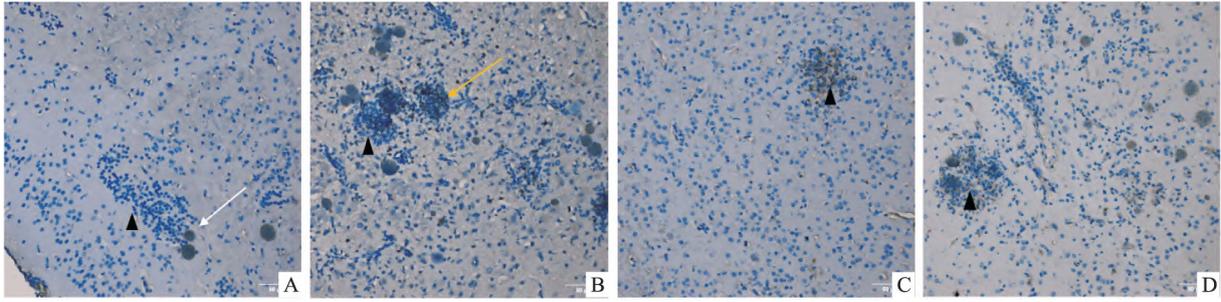


图4 形虫感染的病理学分析 免疫组化 ×200

A: 包裹完整时期的脑组织切片; B: 包裹破裂初期的脑组织切片; C、D: 包裹破裂后期的脑组织切片; 白色箭头: 指示弓形虫包裹; 黑色三角形: 炎性细胞浸润; 黄色箭头: 破裂的弓形虫包裹

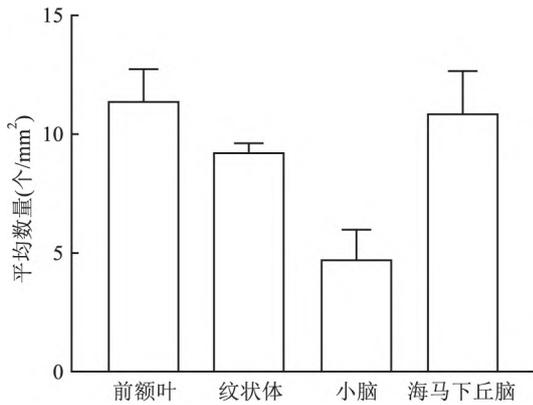


图5 弓形虫慢性感染小鼠脑组织不同部位单位面积的包裹数量

候,包裹会破裂引起脑组织单核细胞浸润,诱发脑炎。

3 讨论

该研究观察性分析显示弓形虫感染与脑炎之间具有相关性,但二者之间不存在因果关系。我们的基因分析得出的群体平均估计表明,未有足够的证据证明弓形虫感染和脑炎之间存在因果关系。然而,脑炎是弓形虫病最常见的疾病形式之一。有研究^[8]表明,免疫功能低下患者的弓形虫感染率高于对照组,弓形虫感染的脑炎更易发生在免疫抑制人群中,如 HIV 感染者和接受造血干细胞或实体器官移植的患者^[9-10]。以上表明,弓形虫感染与脑炎并不存在直接的因果关系,弓形虫感染是否会诱发脑炎取决于个体的免疫功能。

该研究显示,弓形虫慢性感染期间包裹在动物脑组织呈不均匀分布的特点,前额叶和海马下丘脑分布最多,小脑分布最少。郭子璇等^[11]也发现,用分离于老虎的弓形虫(TgTigerCHn1株)建立的小鼠慢性感染模型中,包裹同样呈现不均匀分布的特点,

分布在大脑灰质的最多,小脑最少。研究^[12]证实,弓形虫包裹在小鼠大脑的分布存在个体差异性,但动物行为的变化水平和包裹数量存在正相关性。因此,确定弓形虫包裹具体分布部位和动物精神行为变化的关系值得进一步研究。

有研究^[13]观察了弓形虫感染小鼠的海马体细胞超微结构,发现 TgCtwh3(强毒株)感染细胞出现核皱缩坏死、轴突空泡化、细胞器消失等一系列不可恢复的病理变化,TgCtwh6(弱毒株)感染对于脑组织海马体细胞的影响多表现为慢性的累积性损伤。该结果表明两种相同基因型但毒力不同的虫株造成的机体损伤存在差异,然而其脑损伤的机制仍不清楚,需进一步探索不同毒力弓形虫虫株感染的脑损伤机制。

本研究也存在诸多局限性。尽管该研究的变体都来自与弓形虫感染特别相关的基因区域,但数据的样本来源于欧洲人,这一限制意味着该研究结果可能不适用于其他人群。该研究的样本来自于 GWAS 数据库,由于数据来源的局限性,无法根据年龄、健康状况或性别进行亚组分析^[14]。

参考文献

- [1] Garnaud C, Fricker-Hidalgo H, Evengård B, et al. *Toxoplasma gondii*-specific IgG avidity testing in pregnant women [J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(9): 1155-60.
- [2] Smith N C, Goulart C, Hayward J A, et al. Control of human toxoplasmosis [J]. Int J Parasitol, 2021, 51(2-3): 95-121.
- [3] Fuglewicz A J, Piotrowski P, Stodolak A. Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: a review [J]. Adv Clin Exp Med, 2017, 26(6): 1031-6.
- [4] Wohlert E A, Blader I J, Wilson E H. Brains and Brawn: *Toxoplasma* infections of the central nervous system and skeletal muscle [J]. Trends Parasitol, 2017, 33(7): 519-31.
- [5] Bowden J, Holmes M V. Meta-analysis and Mendelian randomization: a review [J]. Res Synth Methods, 2019, 10(4): 486-96.

- [6] Emerging Risk Factors Collaboration/EPIC-CVD/Vitamin D Studies Collaboration. Estimating dose-response relationships for vitamin D with coronary heart disease, stroke, and all-cause mortality: observational and Mendelian randomisation analyses [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(12): 837–46.
- [7] Hartwig F P, Borges M C, Horta B L, et al. Inflammatory biomarkers and risk of schizophrenia: a 2-sample Mendelian randomization study [J]. *JAMA Psychiatry*, 2017, 74(12): 1226–33.
- [8] Lima K D F, Queiroz A L G, Teixeira H S, et al. An atypical case of neurotoxoplasmosis in immunocompetent patient [J]. *Radiol Case Rep*, 2021, 16(7): 1766–9.
- [9] Elsheikha H M, Marra C M, Zhu X Q. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral *Toxoplasmosis* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2020, 34(1): e00115–9.
- [10] Xiao J, Bhondokhan F, Seaberg E C, et al. Serological Responses to *Toxoplasma gondii* and matrix antigen 1 predict the risk of subsequent *Toxoplasmic* encephalitis in people living with human immunodeficiency virus (HIV) [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(7): e2270–7.
- [11] 郭子璇, 苏瑞景, 肖传斌, 等. 小鼠感染 Chinese1 型弓形虫慢性期中枢神经系统的损伤和包囊分布研究 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(7): 1356–60.
- [12] Boillat M, Hammoudi P M, Dogga S K, et al. Neuroinflammation-associated aspecific manipulation of mouse predator fear by *Toxoplasma gondii* [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(2): 320–34.
- [13] 王崇, 蔡亦红. 弓形虫 Chinese 1 基因型虫株感染对小鼠海马体细胞超微结构的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10): 1564–8.
- [14] Li P, Wang H, Guo L, et al. Association between gut microbiota and preeclampsia-eclampsia: a two-sample Mendelian randomization study [J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 443.

Two-sample Mendelian randomization analysis of the causal relationship between *T. gondii* infection and encephalitis

Li Yifan¹, Sheng Shuyan², Wu Mengyun¹, Ji Yongsheng³, Yao Yong¹

(¹Dept of Parasitology and Microbiology, School of Basic Medicine, ²The First Clinical Medical College, Anhui Medical University Hefei 230032; ³Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Abstract Objective Mendelian randomization analysis was used to explore the causal relationship of *T. gondii* infection and the cyst distribution and inflammation in brain tissue by immunohistochemistry. **Methods** Genome-wide association analysis data of *T. gondii* infection and encephalitis were obtained, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected, Mendelian randomization analysis was conducted by inverse variance weighting, and the causal relationship between *T. gondii* infection and encephalitis was evaluated by OR value and 95% CI. Quality control was carried out by using heterogeneity test, horizontal multi-efficiency test and leave-one-out sensitivity test. Immunohistochemical staining was performed using brain sections of mice infected with tissue cysts of Wh6 strain for image analysis using Image J software. **Results** A total of 29 SNPs were associated with toxoplasmic encephalitis. The results of IVW method suggested that *T. gondii* infection made encephalitis risk 0.98 times higher (OR = 0.98, 95% CI = 0.76 to 1.27), indicating no causal relationship between the two. The quality control results suggested that the selected SNPs were stable and reliable. *Toxoplasma* cysts were distributed in various parts of the brain tissue. **Conclusion** *T. gondii* infection and encephalitis are related, but there is no sufficient evidence to prove the causal relationship between the two.

Key words Mendelian randomization; *Toxoplasma gondii*; encephalitis