

肠道微生物与便秘的双向孟德尔随机化研究

李红梅¹, 肖倩¹, 谢潇潇¹, 刘春强², 黄业保¹

1.广西医科大学附属柳州市人民医院, 广西 柳州 545006; 2.来宾市人民医院, 广西 来宾 546199

摘要: **目的** 采用孟德尔随机化 (MR) 研究方法分析肠道微生物与便秘的因果关系。**方法** 肠道微生物遗传变异数据来自微生物基因组联盟数据库, 便秘遗传变异数据来自综合流行病学小组开放全基因组关联研究数据库; 采用逆方差加权法, 以肠道微生物相关的 2 511 个单核苷酸多态性 (SNP) 为工具变量, 便秘为研究结局, 进行正向 MR 分析; 以便秘相关的 13 个 SNP 为工具变量, 肠道微生物为研究结局, 进行反向 MR 分析。采用 Cochran 检验评估异质性, MR Steiger 检验反向因果的 SNP, MR-PRESSO 检验和 MR-Egger 回归法检验水平多效性, 采用留一法检验结果的稳健性。**结果** 正向 MR 分析结果显示, 宿主遗传驱动的粪球菌属 1 丰度升高, 便秘风险降低 ($OR=0.791$, $95\%CI: 0.709 \sim 0.884$); 宿主遗传驱动的拟杆菌门丰度升高, 便秘风险增加 ($OR=1.240$, $95\%CI: 1.102 \sim 1.394$)。Cochran 检验显示不存在异质性 (均 $P>0.05$), MR Steiger 检验未发现反向因果的 SNP, MR-PRESSO 检验和 MR-Egger 回归法未发现工具变量的水平多效性 (均 $P>0.05$), 留一法检验显示结果稳健。反向 MR 分析未发现反向因果关系 (均 $P>0.05$)。**结论** 肠道微生物中的粪球菌属 1、拟杆菌门与便秘有关。

关键词: 孟德尔随机化; 肠道微生物; 便秘; 因果关系

中图分类号: R256.35 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2024) 03-0198-05

Bidirectional Mendelian randomization study on gut microbiota and constipation

LI Hongmei¹, XIAO Qian¹, XIE Xiaoxiao¹, LIU Chunqiang², HUANG Yebao¹

1.Affiliated Liuzhou People's Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545006, China;

2.Laibin People's Hospital, Laibin, Guangxi 546199, China

Abstract: Objective To investigate the causal relationship between gut microbiota and constipation using Mendelian randomization (MR) method. **Methods** Genetic variation data of gut microbiota were obtained from the MiBioGen Consortium database. The genetic variation data of constipation were sourced from the IEU Open GWAS database. A forward MR analysis was performed using the inverse-variance weighted (IVW) method with 2 511 SNPs associated with gut microbiota as instrumental variables, and constipation as study outcome, and a reverse MR analysis was performed with 13 microbiota-associated SNPs as instrumental variables and gut microbiota as study outcome. The heterogeneity was assessed using the Cochran test, reverse causation of SNP were examined using MR Steiger test, and the horizontal pleiotropy was assessed using the MR-PRESSO test and MR-Egger regression. In addition, the robustness of the results was verified with the leave-one-out. **Results** Forward MR analysis results showed that an increased abundance of genus Coprococcus1 driven by host genetics was associated with a decreased risk of constipation ($OR=0.791$, $95\%CI: 0.709-0.884$), and increased abundance of phylum Bacteroidetes driven by host genetics was associated with an increased risk of constipation ($OR=1.240$, $95\%CI: 1.102-1.394$). Cochran test detected no heterogeneity (both $P>0.05$),

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.03.004

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060866); 柳州市科技计划项目 (2022CAC0206); 广西壮族自治区卫生健康委自筹经费科研课题项目 (Z-B20231318); 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题项目 (GZZC2020380)

作者简介: 李红梅, 硕士, 主管药师, 主要从事药物临床试验工作

通信作者: 黄业保, E-mail: 1966265675@qq.com

MR Steiger test was not revealed reverse causation of SNP, and neither the MR-PRESSO test nor the MR-Egger regression revealed horizontal pleiotropy of instrumental variables (all $P>0.05$), and the leave-one-out method confirmed the robustness of results. Reverse MR analysis showed no association between gut microbiota and constipation (both $P>0.05$). **Conclusion** Genus Coprococcus1 and phylum Bacteroidetes in the gut microbiota are associated with constipation.

Keywords: Mendelian randomization; gut microbiota; constipation; causal relationship

便秘是常见的慢性功能性或器质性胃肠道疾病,主要临床症状表现为排便次数减少、大便干结或排便困难。调查显示,我国慢性便秘患病率为4%~10%^[1]。便秘与肠道微生物失调存在相关性^[2],通过调节肠道微生物的平衡可以治疗便秘^[3]。但目前关于肠道微生物与便秘的研究主要以观察性研究为主^[4],易受到混杂因素与反向因果关系的影响,二者间的因果关系尚未明确。为探索肠道微生物与便秘的因果关系,避免混杂因素与反向因果的影响,本研究采用孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)方法^[5-6]分析肠道微生物中菌株与便秘的因果关系,为便秘防治提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

肠道微生物的遗传变异数据来自微生物基因组联盟2021年公开的全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)^[7]。该研究分析了18 340名参与者的宿主基因型和16S rRNA宏基因组数据,包括122 110个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)变异位点,共211个细菌分类群,其中包括15个未知细菌分类群。本研究纳入196个已知的细菌分类群进行分析。便秘的遗传变异数据来自综合流行病学小组开放GWAS数据库^[8],涉及15 902名便秘病例与395 721名对照,包括24 176 599个SNP变异位点。

1.2 方法

1.2.1 工具变量的选择

正向MR分析,筛选出与肠道微生物显著相关的SNP,设定显著性阈值为 $P<1.0\times 10^{-5}$ 。以千人基因组中欧洲人群基因型为参考面板^[9],设置连锁不平衡标准为 $r^2<0.001$,遗传距离10 000 kb,去除高度相关的SNP,保留最低 P 值的SNP^[10]。计算 F 值,公式为 $F = [R^2 / (R^2 - 1)] \times [(N - K - 1) / K]$,其中 N 代表肠道微生物的样本量, K 代表工具变量数量, R^2 代表SNP解释暴露的程度, R^2 的计算公式为 $R^2 = 2 \times \beta^2 \times (1 - MAF) \times MAF$, MAF 为次要等位基因频率, $F > 10$ 认为能有效避免弱工具变量带来的偏倚,因此剔除 $F < 10$ 的SNP。将暴露及结局的SNP等位基因

方向协同,当存在回文SNP时,利用等位基因频率信息推断正向链等位基因,剔除不能判断方向的回文及不相容的SNP。最后,通过在线人类基因型-表型关联数据库Phenoscanner V2 (<http://www.phenoscanner.medschl.cam.ac.uk>)检索,剔除与混杂因素相关的SNP,如2型糖尿病^[11]。共筛选出2 511个肠道微生物相关的SNP作为工具变量,分为9个门(121个SNP)、16个纲(217个SNP)、20个目(268个SNP)、32个科(426个SNP)和119个属(1 479个SNP)。所有工具变量的 F 均 > 10 ,范围为12.899~187.697。

反向MR分析,将便秘的GWAS数据作为暴露,显著性阈值设置为 $P < 5.0 \times 10^{-6}$ ^[12]。其他流程及参数同正向MR分析。共筛选出13个便秘相关的SNP作为工具变量, F 均 > 10 ,范围为534.892~1 795.058。

1.2.2 双向MR分析方法

本研究采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、MR-Egger法、加权中位数法(weight median estimator, WME)和约束极大似然与贝叶斯信息准则法(constrained maximum likelihood and model averaging and the Bayesian Information Criterion, cML-MA-BIC)分析肠道微生物与便秘的因果关系。IVW方法假设工具变量不存在水平多效性,先使用比值法计算单个SNP的效应值,后通过汇总比值法结果进行加权线性回归分析得到总效应值,可获得精确和无偏倚的因果估计^[13]。MR-Egger法允许工具变量存在水平多效性,加权线性回归分析时考虑截距项存在,以评估水平多效性大小^[14]。即使存在部分无效的工具变量,WME仍能提供较准确的因果效应估计^[15]。cML-MA-BIC法不依赖于工具变量多效性效应,独立于工具变量与暴露因素之间的关联假设,用于控制相干与不相干的水平多效性,从而避免工具变量的水平多效性带来的结果偏倚^[16]。IVW方法的结果作为本研究的主要参考指标,若结果存在异质性则采用随机效应模型分析,反之采用固定效应模型分析。

1.2.3 敏感性分析

通过Cochran检验的 Q 值确定工具变量的异质

性。采用 MR-PRESSO 检验分析多效性残差和离群值，检验结果水平多效性，减少偏倚^[17]。采用 MR-Egger 回归法衡量工具变量平均水平多效性的大小^[18]。采用 MR Steiger 检验单个 SNP 与结局的关系，以减轻反向因果关联的潜在影响^[19]。采用留一法检验单个 SNP 的影响。

1.3 统计分析

采用 R 4.2.2 软件的 TwoSampleMR 0.5.6 和 MR-PRESSO 程序包统计分析，采用 qvalue 程序包对不同层次的肠道微生物分别进行错误发现率 (false discovery rate, FDR) 校正，FDR 的计算采用 Benjamini-Hochberg 方法，当 $P < 0.05$ 且 $Q < 0.05$ 时，提示肠道微生物与便秘之间存在因果关系；当 $P < 0.05$ 但 $Q \geq 0.05$ 时，提示可能存在潜在因果关系^[20]。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 双向 MR 分析结果

正向 MR 分析中，IVW 方法发现 12 种肠道微生物与便秘存在关联，其中 IVW、WME、MR-Egger 和 cML-MA-BIC 结果方向一致的相对稳定因果关联共 8 种：另枝杆菌属、粪球菌属 1、脱硫弧菌属和黄杆菌属是便秘发病的潜在保护因素；产碱杆菌科、丁酸弧菌属、瘤胃球菌属 UCG005 和拟杆菌门是便秘发病的潜在危险因素 (均 $P < 0.05$)。经 FDR 矫正后，存在 2 种稳定因果关系：宿主遗传驱动的粪球菌属 1 丰度升高，便秘发病风险降低 ($Q = 0.004$)；宿主遗传驱动的拟杆菌门丰度升高，便秘发病风险升高 ($Q = 0.003$)。见图 1。未发现便秘与肠道微生物存在反向因果关系 (均 $P > 0.05$)，见表 1。

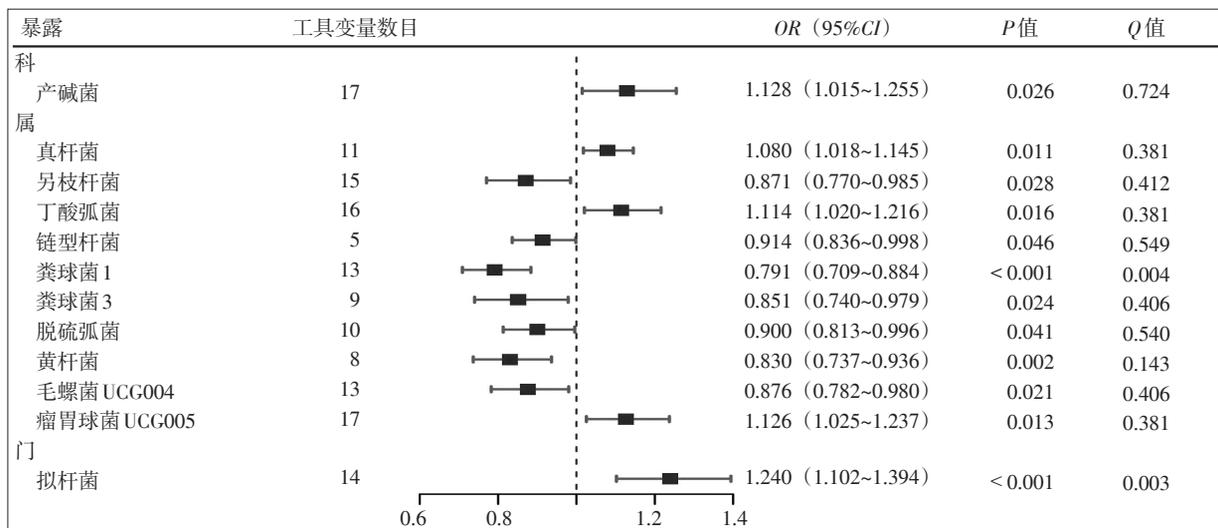


图 1 肠道微生物与便秘关联的正向 MR 分析森林图

Figure 1 Forest plot for forward MR analysis of association between gut microbiota and constipation

表 1 肠道微生物与便秘关联的反向 MR 分析结果

Table 1 Results of reverse MR analysis of association between gut microbiota and constipation

暴露	结局	工具变量数目	分析方法	OR 值 (95%CI)	P 值
便秘	粪球菌属 1	13	IVW	1.074 (0.960~1.201)	0.211
			cML-MA-BIC	1.074 (0.959~1.205)	0.216
			MR-Egger	1.629 (0.935~2.838)	0.113
			WME	1.065 (0.921~1.232)	0.394
	拟杆菌门	13	IVW	0.976 (0.877~1.086)	0.656
			cML-MA-BIC	0.974 (0.872~1.086)	0.635
			MR-Egger	0.715 (0.425~1.202)	0.231
			WME	1.037 (0.895~1.202)	0.625

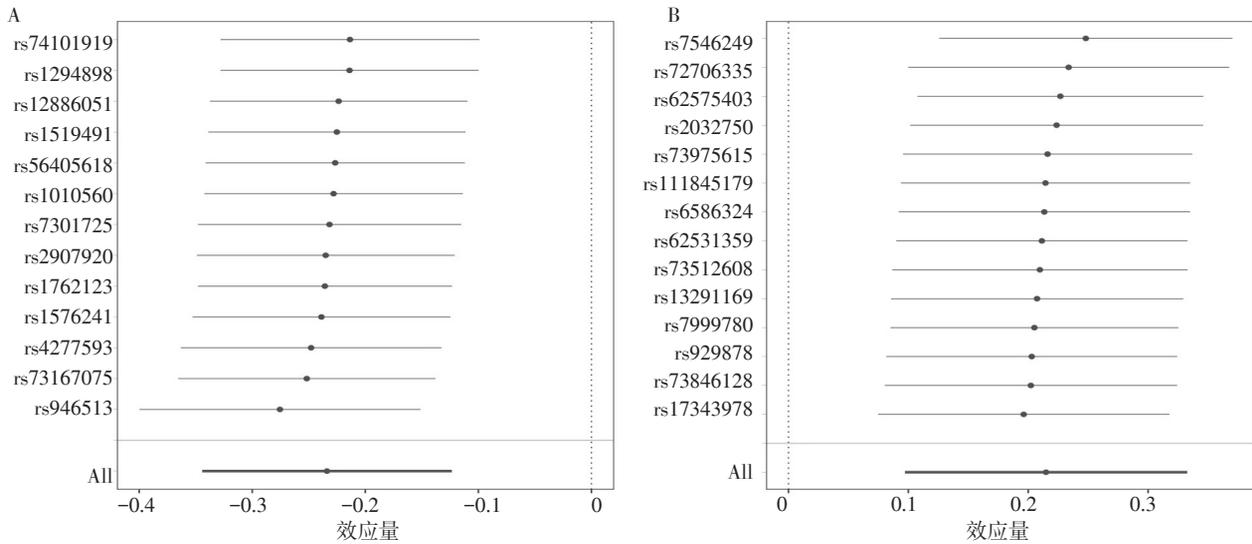
2.2 敏感性分析结果

MR Steiger 检验未发现存在反向因果关系的工具变量。MR-PRESSO 检验 (粪球菌属 1, $P = 0.759$;

拟杆菌门, $P = 0.805$) 和 MR-Egger 检验 (粪球菌属 1, $P = 0.537$; 拟杆菌门, $P = 0.526$) 显示不存在水平多效性。Cochran 检验表明结果不存在异质性 (粪球

菌属 1, $Q=8.506$, $P=0.744$; 拟杆菌门, $Q=9.030$, $P=0.771$), 验证了使用固定效应模型分析结果的可靠性。

留一法显示, 逐一剔除单个 SNP 后, 剩下 SNP 的合并效应值未发生明显变化, 提示结果稳健。见图 2。



注: A 表示粪球菌属 1, B 表示拟杆菌门。

图 2 肠道微生物与便秘关联的正向 MR 分析留一法敏感性分析

Figure 2 Leave-one-out sensitivity analysis for forward MR analysis of association between gut microbiota and constipation

3 讨论

采用 MR 研究方法分析肠道微生物与便秘的因果关系, 结果发现, 肠道微生物中的粪球菌属 1 对便秘具有保护效应, 其丰度升高, 便秘的发病风险降低。MANCABELLI 等^[21]研究发现, 便秘患者包括粪球菌在内的肠道细菌丰度会降低。YARULLINA 等^[22]研究发现, 便秘患者粪球菌属 1 的丰度下降, 而传统益生菌, 如乳酸杆菌和双歧杆菌的丰度没有下降。

本研究结果显示, 拟杆菌门丰度升高, 便秘发病风险升高。GUO 等^[23]对老年性功能便秘人群的肠道微生物群落组成进行研究, 发现老年性功能便秘患者的肠道菌群谱与健康人群有显著差异, 功能性便秘人群的拟杆菌门丰度较健康人群明显增加。拟杆菌门为革兰阴性厌氧菌, 在结肠有机质的降解和发酵中起重要作用。WU 等^[24]研究证实, 粪便中的拟杆菌门与膳食纤维摄入量呈负相关。而低纤维素饮食是便秘患者肠道菌群失调的主要原因, 纤维素缺乏导致食糜难以促进肠道蠕动, 引发便秘^[25]。本研究未发现便秘与肠道微生物之间存在反向因果关系。

本研究存在一定局限性: (1) 肠道微生物 GWAS 大部分来源于欧洲人, 可能存在人口分层引起的干扰, 因此本研究的结果可能不适用于其他群

体; (2) 敏感性分析需要纳入更多基因变异作为工具变量, 导致分析中使用的 SNP 未达到传统的 GWAS 显著性阈值 ($P < 5 \times 10^{-8}$); (3) 肠道微生物与便秘的关系不仅仅是单一因果关系, 在未来的研究中应从多角度探讨肠道微生物在便秘发病过程中的机制。

综上所述, 肠道微生物中的粪球菌属 1 是便秘的保护因素, 拟杆菌门是便秘的危险因素, 提示肠道微生物在便秘发病过程中具有重要作用。本研究结果可能有助于进一步探讨肠道微生物介导便秘的发病机制。

参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组, 中华医学会消化病学分会功能性胃肠病协作组. 中国慢性便秘专家共识意见 (2019 广州) [J]. 中华消化杂志, 2019, 39 (9): 577-598.
- [2] PAN R L, WANG L L, XU X P, et al. Crosstalk between the gut microbiome and colonic motility in chronic constipation: potential mechanisms and microbiota modulation [J/OL]. Nutrients, 2022, 14 (18) [2024-02-22]. <https://doi.org/10.3390/nu14183704>.
- [3] YANG L, WANG Y, ZHANG Y, et al. Gut microbiota: a new avenue to reveal pathological mechanisms of constipation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106 (21): 6899-6913.
- [4] HUANG L S, ZHU Q, QU X, et al. Microbial treatment in chronic constipation [J]. Sci China Life Sci, 2018, 61 (7): 744-752.
- [5] DAVEY SMITH G, HEMANI G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies [J].

- Hum Mol Genet, 2014, 23 (1): 89–98.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] SAKAUE S, KANAI M, TANIGAWA Y, et al. A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes [J]. Nat Genet, 2021, 53 (10): 1415–1424.
- [9] ABECASIS G R, ALTSHULER D, AUTON A, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing [J]. Nature, 2010, 467 (7319): 1061–1073.
- [10] LI P S, WANG H Y, GUO L, et al. Association between gut microbiota and preeclampsia-eclampsia: a two-sample Mendelian randomization study [J/OL]. BMC Med, 2022, 20 (1) [2024-02-22]. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02657-x>.
- [11] KAMAT M A, BLACKSHAW J A, YOUNG R, et al. PhenoScanner V2: an expanded tool for searching human genotype-phenotype associations [J]. Bioinformatics, 2019, 35 (22): 4851–4853.
- [12] DONG Q, CHEN D, ZHANG Y, et al. Constipation and cardiovascular disease: a two-sample Mendelian randomization analysis [J/OL]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10 [2024-02-22]. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1080982>.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] BOWDEN J, DAVEY SMITH G, HAYCOCK P C, et al. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator [J]. Genet Epidemiol, 2016, 40 (4): 304–314.
- [16] XUE H, SHEN X, PAN W. Constrained maximum likelihood-based Mendelian randomization robust to both correlated and uncorrelated pleiotropic effects [J]. Am J Hum Genet, 2021, 108 (7): 1251–1269.
- [17] 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.
- [18] BURGESS S, THOMPSON S G. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method [J]. Eur J Epidemiol, 2017, 32 (5): 377–389.
- [19] HEMANI G, TILLING K, DAVEY SMITH G. Orienting the causal relationship between imprecisely measured traits using GWAS summary data [J/OL]. PLoS Genet, 2017, 13 (11) [2024-02-22]. <https://doi.org/1371/journal.pgen.1007081>.
- [20] 杨振国, 王蕾. 两样本孟德尔随机化: 肠道菌群与偏头痛 [J]. 现代预防医学, 2023, 50 (20): 3656–3662.
- [21] MANCABELLI L, MILANI C, LUGLI G A, et al. Unveiling the gut microbiota composition and functionality associated with constipation through metagenomic analyses [J/OL]. Sci Rep, 2017, 7 (1) [2024-02-22]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10663-w>.
- [22] YARULLINA D R, SHAFIGULLIN M U, SAKULIN K A, et al. Characterization of gut contractility and microbiota in patients with severe chronic constipation [J/OL]. PLoS One, 2020, 15 (7) [2024-02-22]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235985>.
- [23] GUO M Q, YAO J F, YANG F, et al. The composition of intestinal microbiota and its association with functional constipation of the elderly patients [J]. Future Microbiol, 2020, 15: 163–175.
- [24] WU G D, CHEN J, HOFFMANN C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes [J]. Science, 2011, 334 (6052): 105–108.
- [25] 韩旭, 许晨, 卫璐戈, 等. 慢传输型便秘和排便障碍型便秘患者肠道菌群结构分析 [J]. 胃肠病学, 2021, 26 (12): 724–731.

收稿日期: 2023-11-24 修回日期: 2024-02-22 本文编辑: 刘婧出