孟德尔随机化

DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003398

基于孟德尔随机化探讨胃食管反流与间质性肺病的双向因果关系

张　静[1]，李　芳[1]，赖　芳[2]，周耿标[2]

（1. 广州中医药大学第二临床医学院，广州　510405；2. 广州中医药大学第二附属医院重症医学科，广州　510145）

【摘　要】目的：临床观察及流行病学调查发现胃食管反流病（gastroesophageal reflux disease，GERD）与间质性肺疾病（interstitial lung disease，ILD）具有相关性，本文章旨在通过孟德尔随机化分析（Mendelian randomization，MR）方法，研究GERD与ILD是否相互存在因果关联，以及这些关联的方向性。**方法：**从全基因组关联研究（genome-wide association studies，GWAS）汇总数据中选择符合条件的单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs）作为工具变量（instrumental variables，IVs）进行分析，分别采用逆方差加权法（inverse-variance weighted，IVW）、MR-Egger回归分析、加权中位数法（weighted median estimator，WME）等进行两样本孟德尔随机化分析，其中IVW用于主要分析；在进行敏感性分析时，采用MR-PRESSO检验和MR-Egger回归分析以检测和纠正水平多效性；采用留一法、Cochran's Q检验、漏斗图以评估MR结果的稳定性和可靠性，以*OR*值评价GERD与ILD的因果关系。**结果：**IVW结果显示GERD可增加患ILD的风险，GERD对数变换后每增加一个标准差，会导致ILD的风险增加22%（*OR*=1.22，95%CI=1.11~1.33，*P*=3.52e-05）。反之，ILD也可增加患GERD的风险。**结论：**GERD与ILD具有双向因果关系。

【关键词】胃食管反流病；间质性肺病；孟德尔随机化

【中图分类号】R571；R563　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-10-10

Mendelian randomization-based exploration of bidirectional causal relationship between gastroesophageal reflux disease and interstitial lung disease

Zhang Jing[1]，*Li Fang*[1]，*Lai Fang*[2]，*Zhou Gengbiao*[2]

（*1. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine；2. Department of Critical Care Medicine，The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine*）

【Abstract】*Objective*：Clinical observations and epidemiological investigations have found an association of gastroesophageal reflux disease（GERD）with interstitial lung disease（ILD）. We aimed to investigate whether GERD and ILD are causally associated with each other and the direction of the association through Mendelian randomization（MR）analysis. ***Methods*：**Eligible single nucleotide polymorphisms（SNPs）were selected as instrumental variables（IVs）from the pooled data of genome-wide association studies（GWAS）. Two-sample Mendelian randomization analyses were performed using the inverse-variance weighted method（IVW），the MR-Egger regression method，and the weighted median estimator（WME）. The IVW method was used as the main causal analysis. The MR-PRESSO test and MR-Egger regression method were used in sensitivity analysis to detect and correct for horizontal pleiotropy. The leave-one-out method，Cochran's Q test，and funnel plot were used to assess the stability and reliability of MR results. The odds ratio（*OR*）was used to evaluate the causality between GERD and ILD. ***Results*：**The IVW results showed that GERD increased the risk of ILD，and each standard deviation increase in log-transformed GERD resulted in a 22% increase in the risk of ILD（*OR*=1.22，95%CI=1.11-1.33，*P*=3.52e-05）. Conversely，ILD also increased the risk of GERD. ***Conclusion*：**GERD and ILD have a bidirectional causal relationship.

【Key words】gastroesophageal reflux disease；interstitial lung disease；Mendelian randomization

作者介绍：张　静，Email：zzyuzuru@163.com，研究方向：中西医结合治疗呼吸危重症。

通信作者：赖　芳，Email：laifang@gzucm.edu.cn。

基金项目：广东省中医急症研究重点实验室资助项目（编号：2023B1212060062）；广东省中医院朝阳人才科研专项资助项目（编号：ZY2022YL30）；广东省中医院晁恩祥学术经验传承工作室资助项目（编号：中医二院〔2014〕89号）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231227.1646.038（2023-12-29）

胃食管反流病（gastroesophageal reflux disease，GERD）是由胃内容物反流引起的以胃部灼热和胃酸反流为主要症状的常见胃肠道慢性疾病[1]，全球发病人数约有10.3亿人，发病率约13.98%[2]。间质性肺疾病（interstitial lung disease，ILD）包括一组以呼吸困难、咳嗽为特征的异质性疾病，病理表现为弥漫性肺实质、肺泡炎症和间质纤维化[3]，在欧洲的年发病率约为20/10万人[4]，临床上预后极差，尤其是特发性肺纤维化（idiopathic pulmonary fibrosis，IPF），死亡率约35%~70%[5]。

Ghisa M等[6]综述表明，GERD和ILD之间存在关联，GERD是特发性肺纤维化（idiopathic pulmonary fibrosis，IPF）患者常见合并症，而IPF也可能因为胸内负压的增加导致GERD；美国胸科医师学会2018年发布的指南也有提到，GERD在ILD患者，如IPF和硬皮病相关ILD患者中非常普遍[7]。Hershcovici T等[8]研究发现，IPF患者中GERD患病率为67%，约54%的系统性硬化症相关间质性肺病（systemic sclerosis-related interstitial lung disease，SSc-ILD）患者出现食管动力异常，90%的混合性结缔组织病相关间质性肺病（mixed connective tissue disease-associated interstitial lung disease，MCTD-ILD）食管清除能力降低。然而，不同于慢性咳嗽、哮喘等与GERD具有明确关联的疾病，有研究表明GERD与ILD没有明显相关性。ILD患者是否需要辅以质子泵抑制剂（proton pump inhibitor，PPI）等抑酸药物，抗反流手术能否为ILD患者带来更大的获益目前仍未达成共识，因此，GERD与ILD的因果关系仍有待进一步探讨。

孟德尔随机化（Mendelian randomization，MR）类似随机对照试验，使用单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs）作为暴露的工具变量（in-strumental variables，IVs）来推断与结局之间的因果关联。观察流行病学研究存在许多偏差、混淆和反向因果关系[9]，而孟德尔随机化分析可以克服混杂因素和反向因果关联带来的偏倚[10-11]。本研究运用双向MR方法，探讨GERD与ILD之间的因果关联。

1 资料与方法

1.1 数据获取

GERD的GWAS数据来自IEU GWAS数据库，其中包含129 080组病例和473 524例对照[12]。ILD的GWAS数据则来自芬兰生物数据库（https://www.finngen.fi/en），包括21 806组病例和196 986组对照。以上两组数据均来自欧洲血统人群。

1.2 遗传工具变量的选择

在MR分析中的IVs必须满足以下3个假设：①作为IVs的SNPs必须与GERD密切相关。首先筛选出具有显著全基因组关联的SNPs（$P<5\times10^{-8}$），接着去除连锁不平衡[13]，设置连锁不平衡参数$r^2<0.001$，遗传距离为10 000 kb；为了尽量减少弱工具变量的偏倚，剔除F统计量<10的SNPs[14]，最后协调暴露和结果，剔除回文SNPs。②IVs必须不与任何混杂因素相关。在PhenoScanner上逐个检索选定的SNPs（http://www.phenoscanner.medschl.cam.ac.uk/），将具有混杂因素的SNPs剔除[15]。③IVs仅通过GERD影响ILD，即不存在基因多效性，在MR分析中进行评估、处理。利用MR-PRESSO方法剔除离群值[16]，同时采用MR-Egger回归模型的截距项评估水平多效性[17]。

1.3 统计学方法

使用3种互补方法：逆方差加权法（inverse-variance weighted，IVW）、MR-Egger回归分析、加权中位数法（weighted median estimator，WME）来进行MR分析以推断GERD与ILD的因果关联。IVW法以保证所有工具变量都是有效的为前提，回归时不考虑截距项的存在，最终结果是所有工具变量效应值的加权平均值。当IVs没有水平多效性时，IVW方法的结果最可靠[18-19]，本研究选取IVW作为MR的主要方法。其次，当至少一半的SNPs是有效的IVs时，加权中位数法可以提供因果效应的一致估计[20]。MR-Egger回归分析在因果估计方面的统计效力则较低，但MR-Egger回归时考虑截距项的存在，其截距表示水平多效性的效果估计，可被用于敏感性分析，检验是否违反工具变量假设[17,21]。此外，在敏感性分析方面，还采用Cochran's Q检验评估异质性，若检验结果具有统计学意义，则证明分析结果具有显著的异质性；MR-PRESSO法、留一法、漏斗图则反复用于检测离群值，若存在离群值，则将其剔除，并重新进行分析。

上述方法均采用R4.2.1版本及TwoSampleMR包和MR-PRESSO包进行统计分析。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 工具变量的选取

本研究共提取了80个与GERD密切相关的全基因组显著的SNPs，根据MR分析的方法反复筛选，最终共纳入61个SNPs作为工具变量（表1）。单一SNP对应的F统计量均>29.74，因果关联受到弱工具变量偏倚影响的可能性较小。

2.2 GERD与ILD的孟德尔随机化分析

3种方法得到的因果效应方向一致，IVW法结果显示，GERD可能会增加ILD发生的相对风险（OR=1.22，95%CI=1.11~1.33，P=3.52e-05）（图1、图2）。WME分析也同样具有显著意义（OR=1.23，95%CI=1.08~1.40，P=1.64e-03）。MR-Egger回归结果显示，GERD可增加ILD患病风险，但无显著统计学意义（OR=1.22，95%CI=0.63~2.34）（表2）。

表1 与ILD关联的SNPs的基本信息

SNPs	CHR	位置	EA	OA	EAF	*β*	*SE*	*P*
rs10010963	4	159839313	T	C	0.616 433	0.026 980 3	0.004 946 65	4.92E−08
rs1011407	2	60665768	G	A	0.121 628	0.042 061 8	0.007 359 17	1.09E−08
rs10133111	14	103377321	A	G	0.162 996	0.041 787 5	0.006 507 89	1.35E−10
……	……	……	……	……	……	……	……	……
rs2834005	21	34291708	C	T	0.315 000	0.029 699 7	0.005 173 40	9.42E−09
rs2838771	21	46501576	C	G	0.646 721	0.028 098 4	0.005 065 71	2.91E−08
rs9615905	22	48875699	T	C	0.458 193	0.027 565 7	0.004 837 80	1.21E−08

注：CHR，染色体；EA（effect allele）：效应等位基因；OA（other allele）：非效应等位基因；EAF：效应等位基因频率；β：等位基因效应值；SE：β的标准误

表2 GERD对ILD因果关系的两样本孟德尔随机化分析结果

暴露因素	方法	结局变量	*OR*值	95%CI	*P*
GERD	IVW	ILD	1.22	1.11~1.33	3.52e−05
	WME		1.23	1.08~1.40	1.64e−03
	MR−Egger		1.22	0.63~2.34	5.54e−01

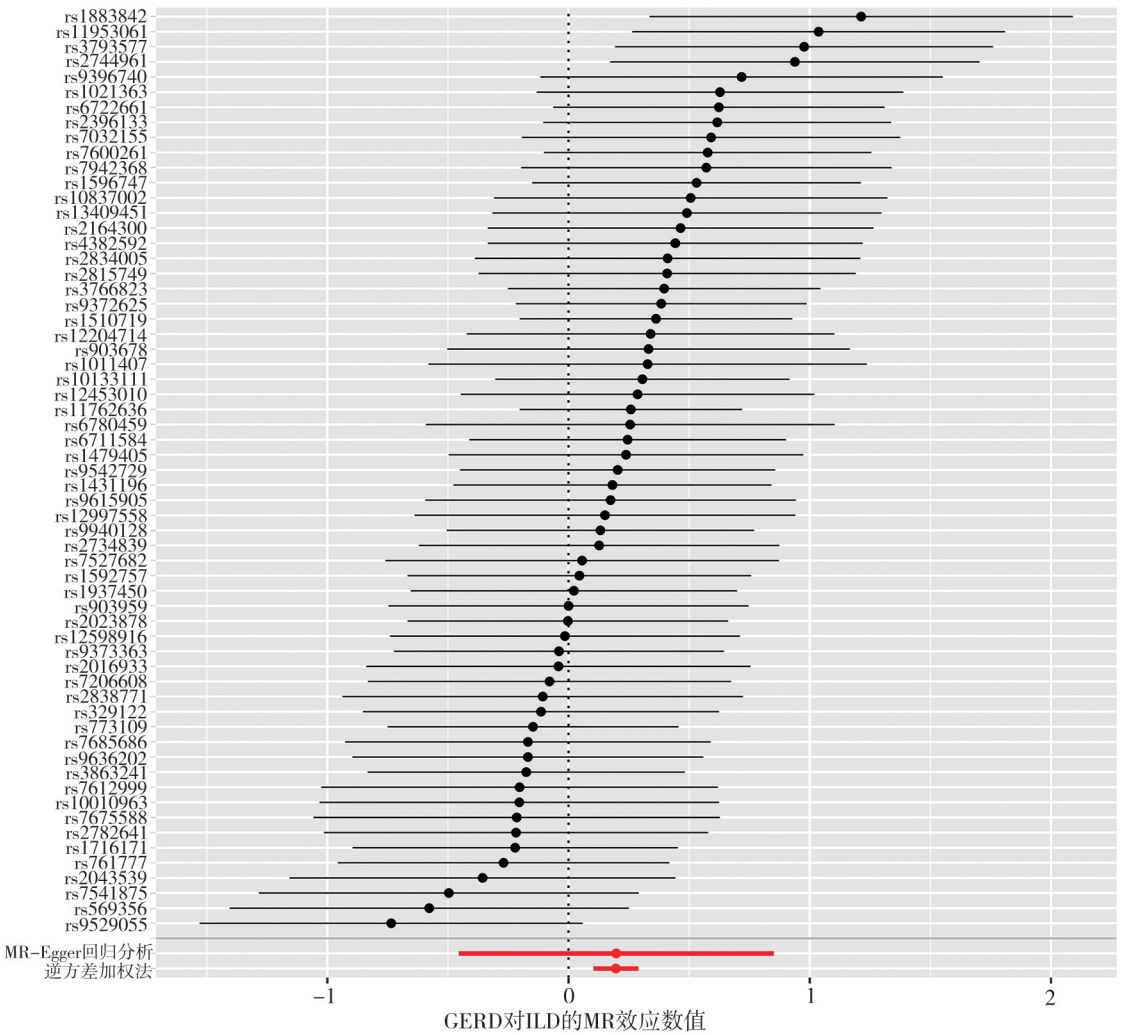


图1 GERD对ILD因果关系的两样本MR分析森林图

2.3 敏感性分析

IVW（*P*=0.49）和MR−Egger回归（*P*=0.45）的Cochran Q检验表明IVs没有异质性的存在。使用MR PRESSO研究了工具变量和结果之间的水平多效性，结果没有统计学差异（*P*=0.54）；此外，MR−Egger回归也没有发现显著的截距（截距=−5.79e−05，*SE*=0.01，*P*=1.00），表明IVs不存在水平多效

性。留一法分析结果显示MR分析较为可靠，依次剔除各SNP后，剩余的工具变量的分析结果与纳入全部SNPs的分析结果相近（图3）。漏斗图显示，当使用单一SNP作为工具变量时，代表因果关联效应的点呈对称分布，表明因果关联受到潜在偏倚影响的可能性较小（图4）。

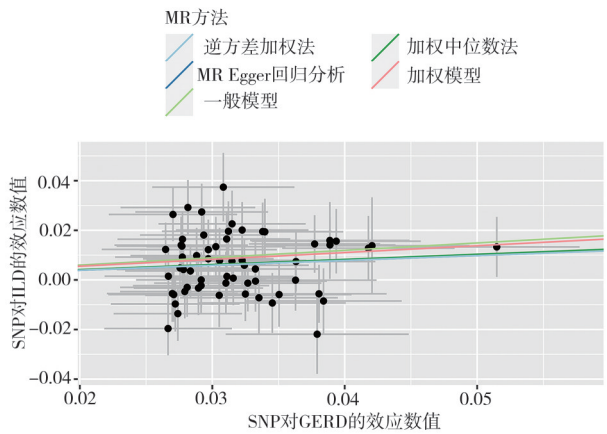


图2 GERD对ILD因果关系的两样本MR分析散点图

2.4 ILD对GERD的因果关系

在研究ILD对GERD的因果关系时，以ILD为暴露、GERD为结局进行MR分析，筛选出6个与GERD有关的工具变量（F>30.55），用这些工具变量计算ILD与GERD之间的因果关系。结果显示：ILD与GERD具有相关性IVW（OR=1.07，95%CI=1.02~1.13，P=0.01）。其他2种方法则显示ILD对GERD的效应不显著（P>0.05）（图5、表3）。

3 讨 论

本研究使用双向孟德尔随机化方法分析欧洲人群的GWAS数据集，研究结果支持GERD与患ILD的风险之间存在因果关系（OR=1.22，95%CI=1.11~1.33，P=3.52e−05）。同时，ILD与患GERD的风险之间也存在反向因果关系（OR=1.07，95%CI=1.02~1.13，P=0.01）。本研究在敏感性分析中，证明IVs没有异质性和多效性的存在。假设所有IVs都是有效的前提下，IVW可以提供最精确的估计结果，因此IVW作为本研究主要的分析方法以确定因果关系。MR-Egger回归——假设所有的IVs都是无效的；及WME分析——假设至少有一半的IVs有效，则作为补充证据[20]，MR结果稳健可靠。

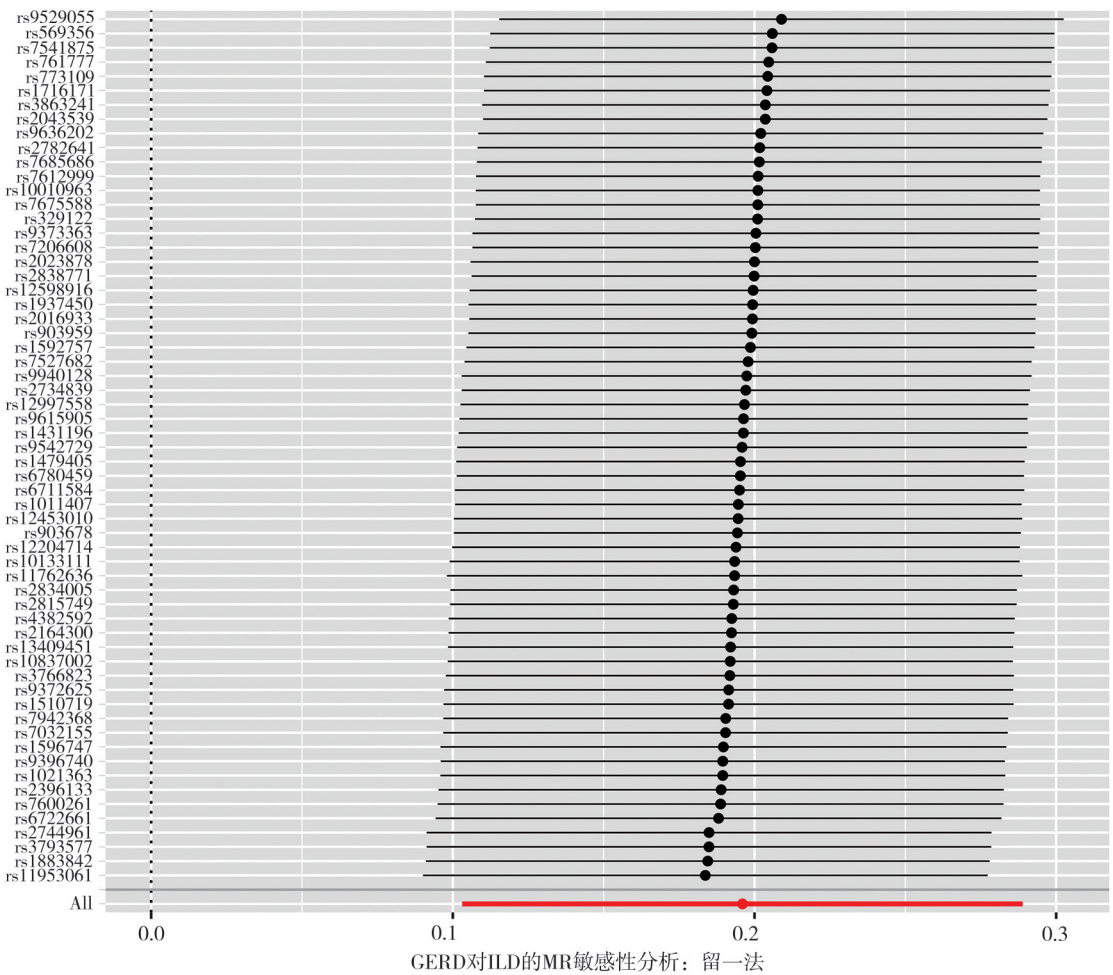


图3 GERD对ILD因果关系的两样本MR分析“留一法”结果

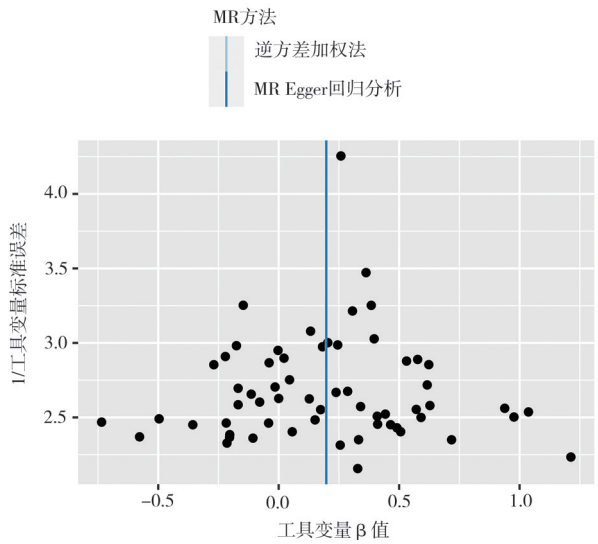
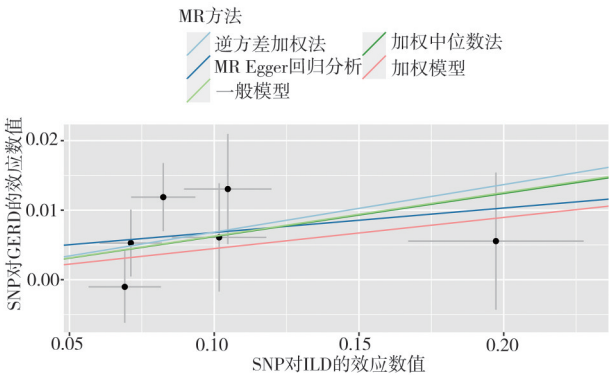
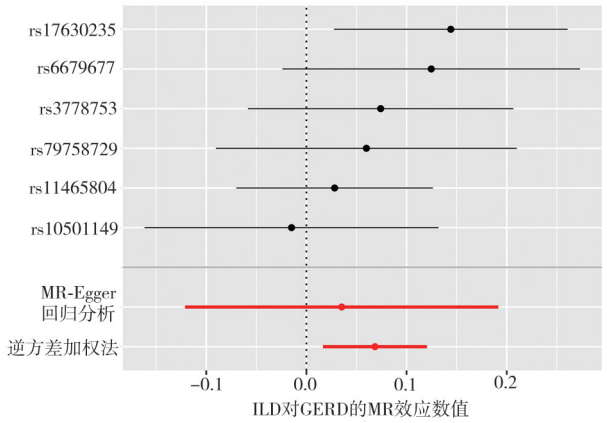


图4　GERD对ILD因果关系的两样本MR分析漏斗图



A. 散点图



B. 森林图

图5　ILD对GERD因果关系的两样本MR分析结果

表3　ILD对GERD因果关系的两样本孟德尔随机化分析结果

暴露因素	方法	结局变量	*OR*	95%CI	*P*
ILD	IVW	GERD	1.07	1.02~1.13	0.01
	WME		1.06	0.99~1.14	0.09
	MR-Egger		1.04	0.89~1.21	0.68

Baqir M 等[22]在1项病例对照研究中发现，与没有肺部疾病的患者相比，IPF及非IPF的ILD患者更可能患有GERD，GERD可能是导致肺间质纤维化的一个重要因素，并提出在治疗IPF时，应同时妥善治疗GERD，以减轻其对肺部损伤的影响。韩国的1项回顾性队列研究[23]也发现，质子泵抑制剂能延长IPF患者的生存期，IPF相关存活率与患者使用PPI药物超过4个月显著相关。临床随机对照试验也表明[24]，进行抗酸治疗的IPF患者，FVC下降幅度明显较小。然而，也有研究发现，GERD在ILD相关住院风险中没有预后价值，表明GERD可能对ILD患者的死亡率没有任何影响[25]。Wong AW 等[26]在基于整群的分析中也发现，GERD与IPF生存率降低有关，而对其他形式的ILD没有影响。目前对于GERD与ILD关系开展的研究，多为回顾性，存在许多混杂因素，如诊断方法的不同、纳入人群的差异等；又或是小型探索性试验，缺少进一步的研究，这些都可能使研究结果存在差异，需要设计更为严密的大样本的前瞻性研究进行验证。由于环境和生活习惯的不同，相同的疾病在不同种族群体间存在差异，本研究的暴露与结局均来自欧洲人群，具有一定的局限性。

间质性肺疾病是一类疾病的总称，是一组以肺间质间隙内的炎症或纤维化为特征的弥漫性肺实质疾病[27]，往往导致肺通气功能受损，从而导致呼吸困难，甚至呼吸衰竭和死亡，患者生活质量差，预后不良。因此，早期诊断间质性肺疾病，及时开展针对性治疗对于改变患者的生存结局尤为重要。

目前对ILD的研究，多集中在IPF这一部分，然而meta分析发现[8]，SSc-ILD及MCTD-ILD与GERD的相关性更为密切。在1项对SSc患者随访2年的研究中显示[28]，结合食管测压、肺功能检查、高分辨CT检查可发现，食管运动障碍越严重，返流量越多，SSc-ILD患病率越高。Savarino E 等[29]也认为，SSc-ILD患者的食管胃酸暴露更高，反流发作次数更多。

GERD对ILD的作用机制可能与长期的慢性误吸导致反复的肺损伤相关。慢性误吸可诱发巨噬细胞和T细胞介导的炎症反应，长期反复地误吸后TGF-β和TH1细胞因子产生增加，进一步刺激全身炎症反应，加重肺损伤，从而导致肺纤维化[30]。也有学者认为，ILD是导致GERD的原因是低肺容量和肺顺应性降低可能会增加胸内负压，使得贲门括约肌压力降低、蠕动减少，从而容易导致胃食管反流[31]。这提示在临床中，如果合并有胃食管反流的症状，ILD患者早期需要更积极地治疗，更密切地随访；在治疗方案上，对ILD人群抗反流治疗，甚至施行胃底折叠术等抗反流术可能可以获益。

GERD与ILD是否互为对方发病的独立危险因素，目前仍没有明确定论，本研究应用两样本MR对GERD与ILD发病风险的关系进行探讨，发现两者之间具有双向因果关联，GERD会增加ILD发病的风险，反之亦然，加强了GERD与ILD关系的证据。因目前缺少相关GWAS数据，无法进一步分层，未来可从不同的人群、不同类型的ILD中展开亚组分析，使研究证据更加充分，为ILD患者开发新的治疗策略。

参 考 文 献

[1] Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus[J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(8): 1900-1920; quiz1943.

[2] Nirwan JS, Hasan SS, Babar ZU, et al. Global prevalence and risk factors of gastro-oesophageal reflux disease (GORD): systematic review with meta-analysis[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5814.

[3] Drake TM, Docherty AB, Harrison EM, et al. Outcome of hospitalization for COVID-19 in patients with interstitial lung disease. an international multicenter study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2020, 202(12): 1656-1665.

[4] Duchemann B, Annesi-Maesano I, de Naurois CJ, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic County of Greater *Paris*[J]. Eur Respir J, 2017, 50(2): 1602419.

[5] Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. an international working group report[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 194(3): 265-275.

[6] Ghisa M, Marinelli C, Savarino V, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and GERD: links and risks[J]. Ther Clin Risk Manag, 2019, 15: 1081-1093.

[7] Birring SS, Kavanagh JE, Irwin RS, et al. Treatment of interstitial lung disease associated cough: chest guideline and expert panel report [J]. Chest, 2018, 154(4): 904-917.

[8] Hershcovici T, Jha LK, Johnson T, et al. Systematic review: the relationship between interstitial lung diseases and gastro-oesophageal reflux disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(11/12): 1295-1305.

[9] Evans DM, Davey Smith G. Mendelian randomization: new applications in the coming age of hypothesis-free causality[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2015, 16: 327-350.

[10] Gupta V, Walia GK, Sachdeva MP. 'Mendelian randomization': an approach for exploring causal relations in epidemiology[J]. Public Health, 2017, 145: 113-119.

[11] Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, et al. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology[J]. Stat Med, 2008, 27(8): 1133-1163.

[12] Ong JS, An JY, Han XK, et al. Multitrait genetic association analysis identifies 50 new risk loci for gastro-oesophageal reflux, seven new loci for Barrett's oesophagus and provides insights into clinical heterogeneity in reflux diagnosis[J]. Gut, 2022, 71(6): 1053-1061.

[13] Myers TA, Chanock SJ, Machiela MJ. *LDlinkR*: an R package for rapidly calculating linkage disequilibrium statistics in diverse populations[J]. Front Genet, 2020, 11: 157.

[14] Burgess S, Thompson SG. Use of allele scores as instrumental variables for Mendelian randomization[J]. Int J Epidemiol, 2013, 42(4): 1134-1144.

[15] Staley JR, Blackshaw J, Kamat MA, et al. PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations[J]. Bioinformatics, 2016, 32(20): 3207-3209.

[16] Verbanck M, Chen CY, Neale B, et al. Publisher Correction: detection of widespread horizontal pleiotropy in causal relationships inferred from Mendelian randomization between complex traits and diseases[J]. Nat Genet, 2018, 50(8): 1196.

[17] Burgess S, Thompson SG. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method[J]. Eur J Epidemiol, 2017, 32(5): 377-389.

[18] Yang J, Ferreira T, Morris AP, et al. Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits[J]. Nat Genet, 2012, 44(4): 369-375, S1-3.

[19] Burgess S, Davey Smith G, Davies NM, et al. Guidelines for performing Mendelian randomization investigations: update for summer 2023[J]. Wellcome Open Res, 2019, 4: 186.

[20] Bowden J, Davey Smith G, Haycock PC, et al. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted Median estimator[J]. Genet Epidemiol, 2016, 40(4): 304-314.

[21] Haycock PC, Burgess S, Wade KH, et al. Best (but oft-forgotten) practices: the design, analysis, and interpretation of Mendelian randomization studies[J]. Am J Clin Nutr, 2016, 103(4): 965-978.

[22] Baqir M, Vasirreddy A, Vu AN, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and gastroesophageal reflux disease: a population-based, case-control study[J]. Respir Med, 2021, 178: 106309.

[23] Lee CM, Lee DH, Ahn BK, et al. Protective effect of proton pump inhibitor for survival in patients with gastroesophageal reflux disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2016, 22(3): 444-451.

[24] Lee JS, Collard HR, Anstrom KJ, et al. Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of data from three randomised controlled trials[J]. Lancet Respir Med, 2013, 1(5): 369-376.

[25] Alqalyoobi S, Little BB, Oldham JM, et al. The prognostic value of gastroesophageal reflux disorder in interstitial lung disease related hospitalizations[J]. Respir Res, 2023, 24(1): 97.

[26] Wong AW, Lee TY, Johannson KA, et al. A cluster-based analysis evaluating the impact of comorbidities in fibrotic interstitial lung disease[J]. Respir Res, 2020, 21(1): 322.

[27] Wijsenbeek M, Suzuki A, Maher TM. Interstitial lung diseases[J]. Lancet, 2022, 400(10354): 769-786.

[28] Marie I, Dominique S, Levesque H, et al. Esophageal involvement and pulmonary manifestations in systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheum, 2001, 45(4): 346-354.

[29] Savarino E, Bazzica M, Zentilin P, et al. Gastroesophageal reflux and pulmonary fibrosis in scleroderma: a study using pH-impedance monitoring[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(5): 408-413.

[30] Appel JZ 3rd, Lee SM, Hartwig MG, et al. Characterization of the innate immune response to chronic aspiration in a novel rodent model [J]. Respir Res, 2007, 8(1): 87.

[31] Tobin RW, Pope CE 2nd, Pellegrini CA, et al. Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(6): 1804-1808.

（责任编辑：周一青）