

·临床论著·

基于孟德尔随机化研究探讨肠道菌群与肌少症表型的因果关联

王宁¹ 刘彦哲¹ 吴紫莹¹ 曾超^{1,2,3,4} 雷光华^{1,2,3,4} 沙婷婷^{1,2,4} 王伊伦^{1,2,4}

【摘要】 目的 本研究拟采用MR研究设计,以探讨肠道菌群与肌少症表型指标——握力和骨骼肌质量之间的因果关联。**方法** 数据来源于英国生物银行数据库和公开发表且可获取数据的全基因组关联研究,选择131种肠道具体菌属的遗传变异作为工具变量。单核苷酸多态性(SNPs)筛选标准包括在全基因组水平显著关联、SNP之间相互独立以及工具变量的强度足够高。只有当 $F > 10$ 才被认为是一个足够强的工具变量,具有较低的工具偏倚可能性。采用逆方差加权法(IVW)作为主要分析方法,采用加权中位数法、MR Pleiotropy RESidual Sum and Outlier(MR-PRESSO)法以及“留一法”作为敏感性分析方法,评估131种肠道具体菌属与握力和骨骼肌质量之间的因果关联。使用MR-PRESSO方法检验水平多效性和解决异质性。**结果** 本研究共纳入324 976名研究对象。工具变量SNPs数量为3~22,遗传预测因子效应度检验的最小F值为14.6。IVW结果提示,共计9个经遗传学预测的肠道特定菌属与握力之间存在因果关联($P < 0.05$),其中Alloprevotella菌属($\beta = 0.012$ kg, 95% CI: 0.002, 0.022)和Sellimonas菌属($\beta = 0.014$ kg, 95% CI: 0.006, 0.022)相对丰度与握力水平呈现正向因果关联;Olsenella菌属($\beta = -0.012$ kg, 95% CI: -0.023, -0.001)和Paraprevotella菌属($\beta = -0.014$ kg, 95% CI: -0.023, -0.004)和握力水平呈现负向因果关联。并且,此4个肠道特定菌属与宿主握力之间的因果关联在不同MR敏感性分析方法中均存在统计学差异,提示结果稳定可靠,MR-PRESSO结果提示受水平多效性和异质性影响的可能较小。此外,本研究还发现,共计7个经遗传学预测的肠道特定菌属与骨骼肌质量之间存在因果关联($P < 0.05$),其中Eubacterium nodatum group菌属($\beta = 0.069$ kg, 95% CI: 0.012, 0.125)与骨骼肌质量呈现正向因果关联;Erysipelatoclostridium菌属($\beta = -0.090$ kg, 95% CI: -0.162, -0.019)和Ruminococcaceae UCG011菌属($\beta = -0.104$ kg, 95% CI: -0.199, -0.010)与骨骼肌质量呈现负向因果关联。此3个肠道特定菌属与骨骼肌质量之间的因果关联在不同MR敏感性分析方法中均存在统计学差异,提示结果稳定可靠,MR-PRESSO结果提示受水平多效性和异质性影响的可能较小。**结论** 本研究探讨了与肌少症可能存在因果关联的肠道特定菌属,其中Alloprevotella菌属、Sellimonas菌属和Eubacterium nodatum group菌属与肌少症表型指标存在潜在正向因果关联,Olsenella菌属、Paraprevotella菌属、Erysipelatoclostridium菌属和Ruminococcaceae UCG011菌属与肌少症表型指标存在潜在负向因果关联。这些发现为阐明肌少症发病机制、开发治疗新方法提供了理论参考。

【关键词】 肠道菌群; 肌少症; 孟德尔随机化

Causal associations of gut Microbiota with phenotype indicators of sarcopenia: A mendelian randomization study Wang Ning¹, Liu Yanzhe¹, Wu Ziyang¹, Zeng Chao^{1, 2, 3, 4}, Lei Guanghua^{1, 2, 3, 4}, Sha Tingting^{1, 2, 4}, Wang Yilun^{1, 2, 4}. ¹Department of Orthopaedics, ²Key Laboratory of Aging-related Bone and Joint Diseases Prevention and Treatment, Ministry of Education, ³National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, ⁴Hunan Key Laboratory of Joint Degeneration and Injury, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

【Abstract】 Objective This study aims to clarify the causal relationship between gut microbiota and phenotype indicators of sarcopenia, grip strength and skeletal muscle mass, based on Mendelian randomiza-

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2023.06.002

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2022JJ40821);中南大学湘雅医院青年科研基金项目(2021Q14)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院骨科¹,老年骨关节疾病防治教育部重点实验室²,国家老年疾病临床医学研究中心³,骨关节退变与损伤湖南省重点实验室⁴

通信作者:王伊伦,Email:yilun_wang@csu.edu.cn

tion (MR) study design. **Methods** According to the data derived from the British Biological Bank database and the published genome-wide association study with available data, the genetic variation of 131 specific intestinal bacteria was selected as the tool variable. The Single Nucleotide Polymorphism (SNP) selection criteria include being significantly associated with gut microbiota at the whole-genome level, mutually independent among SNPs, and having a sufficiently high instrumental variable strength. An instrumental variable is considered sufficiently strong when $F > 10$. The inverse variance method (IVW) was used as the main analysis method, as well as the weighted median method and MR Pleiotropy RESidual Sum and Outlier (MR-PRESSO) method were used as the sensitivity analysis methods, to evaluate the causal relationship among 131 gut microbiota species and grip strength and skeletal muscle mass. The MR-PRESSO method is used to test for horizontal pleiotropy and address heterogeneity. **Results** A total of 324, 976 subjects were included in this study. The number of SNPs ranges from 3 to 22, with a minimum F value of 14.6. The IVW results suggested a causal relationship between the 9 genetically predicted bacterial genera and host grip strength ($P < 0.05$). Among them, *Alloprevotella* ($\beta = 0.012$ kg, 95% CI: 0.002, 0.022) and *Sellimonas* ($\beta = 0.014$ kg, 95% CI: 0.006, 0.022) showed a positive causal effect, while *Olsenella* ($\beta = -0.012$ kg, 95% CI: -0.023, 0.001) and *Paraprevotella* ($\beta = -0.014$ kg, 95% CI: -0.023, 0.004) showed negative causality. The causal associations between these four gut specific bacteria and host grip strength were statistically different in different MR sensitivity analyses, suggesting that the results were stable and reliable. In addition, a total of 7 genetically predicted gut specific bacterial genera had causal associations with host skeletal muscle mass ($P < 0.05$), among which *Eubacterium nodatum* group ($\beta = 0.069$ kg, 95% CI: 0.012, 0.125) showed a positive causal association with host skeletal muscle mass, while *Erysipelatoclostridium* ($\beta = -0.090$ kg, 95% CI: -0.162, 0.019) and *Ruminococcaceae* UCG011 ($\beta = -0.104$ kg, 95% CI: -0.199, 0.010) showed a negative causal association with host skeletal muscle mass. The causal associations between these three specific gut bacteria and host skeletal muscle mass were statistically different in different MR sensitivity analyses, suggesting that the results were stable and reliable. The results of MR-PRESSO suggest that the potential influence of horizontal pleiotropy and heterogeneity may be relatively small. **Conclusion** This study investigated specific gut microbiota have a causal relationship with host grip strength and skeletal muscle mass, such as *Alloprevotella*, *Seimonas*, and *Eubacterium nodatum* group, which have a positive causal relationship with phenotype indicators of sarcopenia, while *Olsenella*, *Paraprevotella*, *Erysipelatoclostridium* and *Ruminococcaceae* UCG011 have a negative causal relationship with phenotype indicators of sarcopenia, so as to provide theoretical references for elucidating the pathogenesis of sarcopenia and developing new treatment methods.

【Key words】 Gut microbiota; Sarcopenia; Mendelian randomization

肌肉减少症,简称肌少症,是一种以肌量减少和肌力下降为主要特征的肌骨系统常见退行性疾病,主要表现为随着年龄的增长,肌肉质量、功能和体能表现的进行性下降,现已成为全球公共卫生健康威胁^[1-2]。握力和骨骼肌质量是肌少症的主要评价指标,低握力和低骨骼肌质量也被证明是老年人群诸多不良预后的重要预测因素^[3-5]。最新研究证明,肌少症不仅影响老年人的运动功能以及生活质量,还会加重肝硬化、恶性肿瘤、糖尿病等疾病的进展,带来巨大的医疗卫生经济负担^[6]。随着老龄化的加剧,肌少症的患病率也在逐年升高。2019年的两项研究表明,因肌少症而住院的患者,每年平均医疗费用已达2 316美元和2 707英镑^[7-8]。据估计,如果肌少症的患病率降低10%,美国医疗保健系统每年将节省11亿美元的相关医疗开支^[9]。由此可见,

肌少症已造成严重的社会、经济以及家庭负担,现已成为一类重大公共卫生问题和临床医疗难题^[10-11]。

遗憾的是,肌少症的发病机制和治疗方式尚不明确,目前仍缺乏针对肌少症的安全有效的治疗药物^[12]。抗阻运动是目前最为推崇的改善肌肉质量和功能的肌少症主要治疗方式^[13],但肌少症患者往往是老年人群,其依从性相对较差^[14],且抗阻运动对人群身体素质和运动表现的要求较高,故对此类患者存在适用性欠佳等不足^[15]。补充蛋白质、必需氨基酸及其衍生物、抗氧化剂、多不饱和脂肪酸、矿物质和维生素D等营养/保健品,也曾被报道对老年人的肌肉质量和功能改善存在有益作用^[16-20]。然而,此类研究的人群主要为运动员人群,而非原发性肌少症患者,且疗效往往存在争议。因此,亟需进一步阐明肌少症发病机制、探明潜在干预新靶点,开发安全有

效、延缓甚至逆转肌少症病情进展的治疗新方式。

人类肠道居住着数以万亿计的共生细菌,已有大量研究证实它们的存在对维持宿主健康至关重要^[21-22]。肠道微生物可参与机体内分泌功能、能量稳态和营养吸收效率等生理调节^[23]。研究表明,肠道菌群可通过分解碳水化合物、蛋白质和脂质为宿主提供能量。此外,肠道菌群产物可以穿过肠道屏障或经其他器官进一步代谢进入循环系统以影响其他重要组织或器官^[24-25]。已有越来越多的证据表明,肠道菌群与宿主肌肉组织代谢密切相关。Fielding等^[26]的研究发现,Prevotella菌科和Barnesiella菌属可能参与了老年人群肌肉力量维持。一项在178名老年研究对象中进行的研究发现,老年受试者肠道菌群中存在与衰老相关的独特菌群组分^[27]。一些继发肌少症表型的慢性病患者也被证实存在肠道菌群改变:Ren等学者^[28]的研究发现,合并肌少症的肝硬化患者,其肠道菌群多样性发生显著下降;Margiotto等学者^[29]的研究发现,与未合并肌少症的患者相比,合并有肌少症的老年慢性肾病患者肠道菌群的群落组成改变明显。但遗憾的是,这些研究均为横断面研究设计,由于受到混杂偏倚的影响,且研究暴露与研究结局处在同一时间点,故无法对二者之间的因果关联进行探讨。

孟德尔随机化(mendelian randomization, MR)是一种遗传流行病学研究方法,它通过选择与研究暴露相关的遗传变异作为工具变量,以实现对研究暴露和疾病结局之间的因果关联探讨^[30]。与横断面研究等传统流行病学研究设计相比,MR方法利用了等位基因减数分裂时DNA独立组合的随机性特点,有效避免了混杂因素对研究暴露与疾病之间相关性的影响,并且由于生殖细胞系基因组的不可修饰性,故也不会由此发生反向因果关联^[30]。基于此优势,针对上述肠道菌群与宿主肌肉以横断面研究为主的研究现状,本研究拟采用MR研究设计,以明确肠道菌群与肌少症表型指标——握力和骨骼肌质量之间的因果关联。

综上,本研究拟基于英国生物银行数据库(UK Biobank, UKB),采用MR研究设计,以明确肠道菌群与肌少症表型指标——握力和骨骼肌质量之间的因果关联,为开发肌少症治疗新方法提供思路。

材料与方法

一、研究设计

MR是利用单核苷酸多态性(single nucleotide

polymorphism, SNPs)作为工具变量,探讨暴露因素与结局之间因果关联的研究方法。本研究采用双样本MR的研究设计方法,分别从目前已公开发表且可获取的全基因组范围关联研究(genome-wide association studies, GWAS)^[31]中提取肠道菌群汇总数据,从UKB数据库^[32]骨骼肌质量和握力结局指标GWAS数据中提取肠道菌群工具变量对应的相关汇总数据,研究设计流程图如图1所示。与肠道菌群相关的SNPs是从大型的血统全基因组关联荟萃分析中确定的。SNPs与握力和骨骼肌质量之间关系的相应汇总统计数据可从UKB获得。

二、肠道菌群工具变量选取

我们从大规模的全基因组关联荟萃分析中确定了肠道菌群的工具变量,该分析包括来自美国、加拿大、以色列、韩国、德国、丹麦、荷兰、比利时、瑞典、芬兰和英国的24个独立队列的18 340名个体,平均年龄47.5岁,该分析可以从MiBioGen联合研究中获得^[31]。该GWAS利用16S粪便微生物组研究了211个肠道菌群的遗传决定因素,包括9类门、16类纲、20类目、35类科和131类菌属。本研究重点关注131种菌属对肌少症表型指标(握力和骨骼肌质量)的因果关联。获取GWAS原始数据后,提取并整理本研究MR分析时所需的肠道菌群汇总数据,包含SNPs的rs编码以及相应的染色体和位置、效应等位基因和非效应等位基因信息、SNPs对应的效应值(β)、标准差(Standard error, SE)、样本量(n)、等位基因SNPs对应的 P 值、效应等位基因频率(Effect allele frequency, EAF)。

SNPs作为MR研究的工具变量是执行MR研究的基础,其筛选基于以下标准:(1)SNPs与肠道菌群在全基因组水平显著关联($P < 1 \times 10^{-5}$);(2)SNP之间相互独立,采用来自1 000G基因组计划的血统信息被用作连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析的参考,剪辑的标准为10 000 kb范围内LD的 r^2 小于0.001,并保留与肠道菌群关联最强的SNP;(3)使用R语言(<https://www.r-project.org/>)中的“Two Sample MR”软件包计算了对应代谢物的每个工具变量的 r^2 比例和 F 统计量来量化工具变量的强度,只有当相关SNPs解释的 r^2 比例大于0.1%时,才考虑肠道菌群。只有当 $F > 10$ 才被认为是一个足够强的工具变量,具有较低的工具偏倚可能性。

三、肌少症表型指标相关汇总数据来源

我们从UKB获得了与握力和骨骼肌质量的遗传关联估计值,包括结局GWAS数据库中SNPs对

应的 β 、SE、N和 P 值。UKB的存在有助于科研工作者探寻致病或预防疾病的基因和环境因素,从而维护公众健康。在这一前瞻性队列中,2006~2010年在英国纳入了约500 000名40~69岁的成人,包含了参与者的大量表型和基因型数据,包括人体测量学指标、血生化指标、医学影像学图片、疾病诊断情况和生活方式等^[32]。在排除非欧洲白种人,性别不匹配,杂合率高以及具有亲缘关系的研究对象后,剩余324 976名研究对象纳入后续分析。关于握力和骨骼肌质量的个体水平表型数据、潜在混杂因素(即年龄、性别和亲缘关系)和基因型数据可在UKB获得。采用Jamar手持式握力仪测定握力,采用生物电阻抗法(bioelectrical impedance analysis, BIA)测定骨骼肌质量。我们还获得了UKB数据库中MRC IEU联盟分析基于MR的右手/左手握力的公开汇总数据^[33]。

四、数据分析

利用逆方差加权(Inverse Variance Weighted, IVW)方法和乘法随机效应模型,对SNPs预测的肠道菌群与握力和骨骼肌质量之间的因果关联进行了主要分析。这种方法结合了工具变量比率估计值(即SNP-结局关联的 β 系数除以SNP-暴露关联的 β 系数)^[34],并且可以在假设所有SNP都是有效的工具变量或水平多效性平衡的情况下提供最精确和无偏的估计值^[35]。

使用两个MR敏感性分析方法[MR Pleiotropy RESidual Sum and Outlier (MR-PRESSO)和加权中位数(Weighted Median)]对IVW估计的因果关联进行了敏感性分析。MR-PRESSO方法被进一步用于识别和去除异常SNP,以纠正潜在的方向水平多效性和解决检测到的异质性^[36]。“留一法”分析(Leave-One-Out, LOO)能够检验离群值,每次剔除一个SNP后使用剩余的SNPs通过IVW方法重新计算因果效应估计。剔除一个SNP后得到的估计值与使用所有SNPs得到的原始估计值之间的差异反映了剔除该SNP对结果的影响,如果该差异值很大,说明该SNP是IVs中的离群值,考虑剔除;如果剔除每个SNP后的差异值都接近,说明IVs的一致性较好。我们将偶发效应估计值报告为骨骼肌质量和握力的 β_{LOO} (即均值差)和相应的95%可信区间(CI)。对均数差进行校正,以校正每增加一个遗传预测标准差(SD)单位对结局变量的影响。如果该菌在IVW和MR-PRESSO或加权中位数敏感性分析中有统计学意义(如图1),则被认为是潜在的因果特

征。所有统计学检验均为双侧, $P<0.05$ 被认为具有显著统计学差异。使用R语言(4.1.2版)中的TwoSampleMR包进行了双样本MR分析。

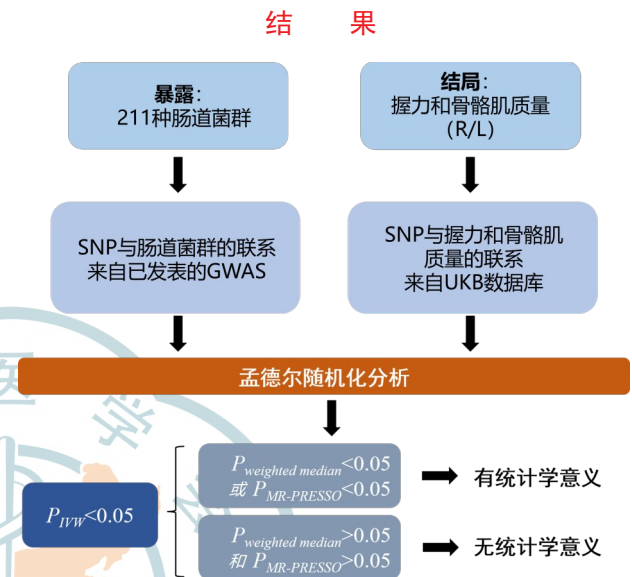


图1 本研究的设计流程图

一、研究概述

共324 976名研究对象纳入了结局的分析。研究对象的平均年龄为56.4岁,46.4%为男性,握力为22.4 kg,骨骼肌质量为32.9 kg。纳入的研究对象特征见表1。

在131类菌属中,作为工具变量的SNPs数量为3~22,中位数为11。工具变量可解释相应肠道菌群变异的0.4%~8.9%。这些遗传预测因子效度检验的最小 F 值为14.6,提示工具变量稳定可靠($F>10$)。

二、肠道菌群对握力的因果效应

经遗传学预测的肠道具体菌属对宿主握力的影响见表2。在随机效应IVW模型下,9个肠道具体菌属菌属(Eubacterium nodatum group 菌属、Alloprevotella 菌属、Faecalibacterium 菌属、Olsenella 菌属、

表1 招募时的研究对象特征

体征类别	数据
招募时的所有研究对象(例)	324 976
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	56.4 \pm 8.1
体质指数(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	27.4 \pm 4.8
女性[例(%)]	174 139(53.6)
肌少症[例(%)]	561(0.2)
握力(kg, $\bar{x} \pm s$)	22.4 \pm 5.3
骨骼肌质量(kg, $\bar{x} \pm s$)	32.9 \pm 11.3

Parabacteroides 菌属、Paraprevotella 菌属、Ruminococcaceae UCG005 菌属、Sellimonas 菌属和 Tyzzerella3 菌属)与握力存在因果关联($P<0.05$)(图2)。

其中, Alloprevotella 菌属、Sellimonas 菌属、Olsenella 菌属和 Paraprevotella 菌属在 3 种 MR 分析结果中因果效应值方向一致,且均具有统计学意义,提示结果相对稳健。而 Alloprevotella 菌属和 Sellimonas 菌属与握力呈现正向因果关联, Olsenella 菌属和

Paraprevotella 菌属与握力呈现负向因果关联。

Alloprevotella 菌属的相对丰度每增加一个 SD, 握力增加 0.012 kg (95% CI: 0.002, 0.022), $P_{IVW}=0.020$, $P_{Weighted-Median}=0.023$, $P_{MR-PRESSO}=0.034$; 留一法分析提示结果稳健(图3~6), 一致性较好, MR-PRESSO 法未发现 IV 存在异常值。Sellimonas 菌属的相对丰度每增加一个 SD, 握力增加 0.014 kg (95% CI: 0.006, 0.022), $P_{IVW}=0.001$, $P_{Weighted-Median}=0.042$, $P_{MR-PRESSO}=0.001$ 。

表2 使用 IVW 方法总结菌属与握力之间的因果关联

组别	肠道菌群	N(SNPs)	β (95% CI)	P值
菌属*	Eubacterium nodatum group	11	0.010 (0.002, 0.017)	0.013
菌属**	Alloprevotella	6	0.012 (0.002, 0.022)	0.020
菌属*	Faecalibacterium	10	-0.025 (-0.043, -0.006)	0.011
菌属**	Olsenella	11	-0.012 (-0.023, -0.001)	0.036
菌属*	Parabacteroides	6	0.030 (0.008, 0.051)	0.006
菌属**	Paraprevotella	13	-0.014 (-0.023, -0.004)	0.007
菌属*	Ruminococcaceae UCG005	14	0.017 (0.001, 0.032)	0.032
菌属**	Sellimonas	9	0.014 (0.006, 0.022)	0.001
菌属*	Tyzzerella3	12	0.157 (0.010, 0.305)	0.037

注: * $P_{IVW}<0.05$ 且 $P_{Weighted-Median}/P_{MR-PRESSO}<0.05$; ** $P_{IVW}<0.05$, $P_{Weighted-Median}<0.05$ 且 $P_{MR-PRESSO}<0.05$ 。CI: 可信区间; IVW: 逆方差加权; SNPs: 单核苷酸多态性

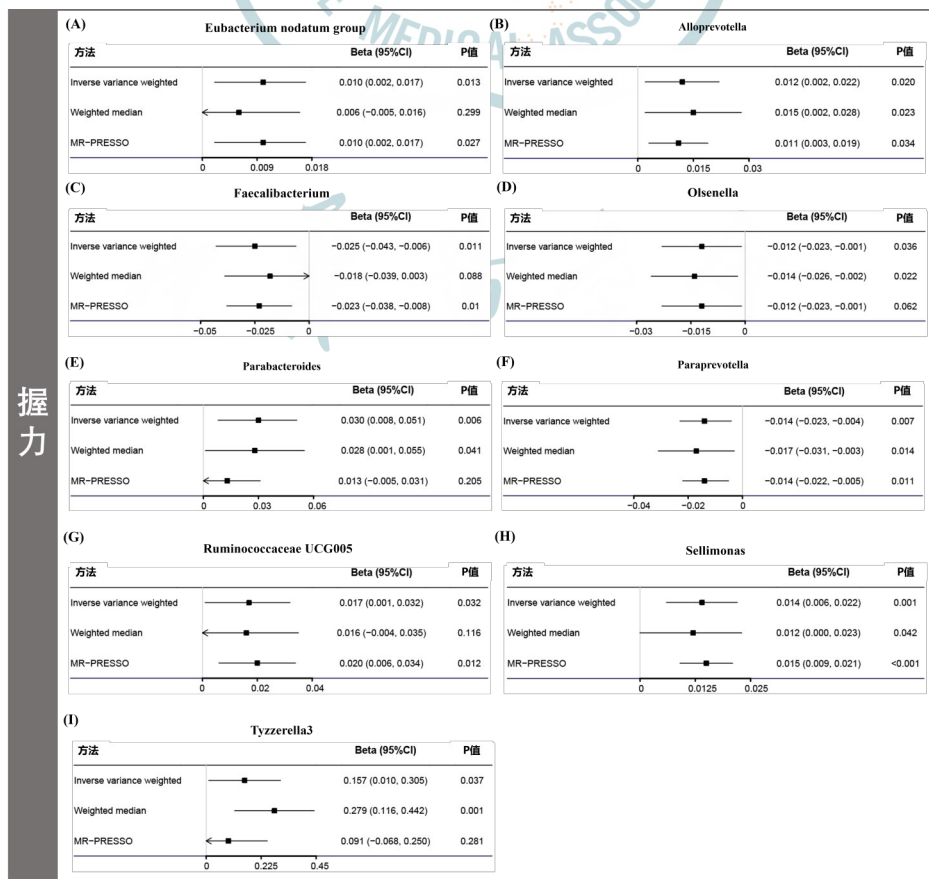


图2 经遗传学预测的肠道特定菌属与宿主握力之间提示因果关联的森林图

$so \leq 0.001$; 留一法分析提示结果稳健(图3~6), 一致性较好, MR-PRESSO法未发现IV存在异常值。Olsenella 菌属的相对丰度每增加一个SD, 握力降低 0.012 kg (95% CI: -0.023, -0.001), $P_{IVW}=0.036$, $P_{Weighted-Median}=0.022$, $P_{MR-PRESSO}=0.062$; 留一法分析提示结果稳健(图3~6), 一致性较好, MR-PRESSO法未发现IV存在异常值。Paraprevotella 菌属的相对丰度每增加一个SD, 握力降低 0.014 kg (95% CI: -0.023, -0.004), $P_{IVW}=0.007$, $P_{Weighted-Median}=0.014$, $P_{MR-PRESSO}=0.011$; 留一法分析提示结果稳健(图3~6), 一致性较好, MR-PRESSO法未发现IV存在异常值。其他5个菌属(Eubacterium nodatum group 菌属、Faecalibacterium 菌属、Parabacteroides 菌属、Ruminococcaceae UCG005 菌属和 Tyzzerella3 菌属)与握力也有显著性因果关联($P < 0.05$)。

三、肠道菌群对骨骼肌质量的因果效应

经遗传学预测的肠道特定菌属与宿主骨骼肌质量之间的因果关联结果见表3。在随机效应IVW模型下, 7个肠道具体菌属(Eubacterium fissicatena group 菌属、Eubacterium nodatum group 菌属、Coprobacter 菌属、Erysipelatoclostridium 菌属、Odoribacter 菌属、Rumi-

nococcaceae UCG011 菌属和 unknowngenus.id.826 菌属)与骨骼肌质量存在因果关联($P < 0.05$)(图7)。

其中, Eubacterium nodatum group 菌属、Erysipelatoclostridium 菌属、Ruminococcaceae UCG011 菌属在3种MR分析结果中因果效应值方向一致, 且均具有统计学意义, 提示结果相对稳健。

Eubacterium nodatum group 菌属的相对丰度每增加一个SD, 肌肉质量增加 0.069 kg (95% CI: 0.012, 0.125), $P_{IVW}=0.017$, $P_{Weighted-Median}=0.034$, $P_{MR-PRESSO}=0.038$; 留一法分析提示结果稳健(图8~10), 一致性较好, MR-PRESSO法未发现IV存在异常值。Erysipelatoclostridium 菌属的相对丰度每增加一个SD, 肌肉质量降低 0.09kg (95% CI: -0.162, -0.019), $P_{IVW}=0.013$, $P_{Weighted-Median}=0.031$, $P_{MR-PRESSO}=0.019$; 留一法分析提示结果稳健(图8~10), 一致性较好, MR-PRESSO法未发现IV存在异常值。Ruminococcaceae UCG011 菌属的相对丰度每增加一个SD, 肌肉质量降低 0.104 kg (95% CI: -0.199, -0.010), $P_{IVW}=0.030$, $P_{Weighted-Median}=0.032$, $P_{MR-PRESSO}=0.066$ 。Ruminococcaceae UCG011 属在采用不同MR方法估计获得的因果效应值一致, 提示结果相对稳健。其他4个

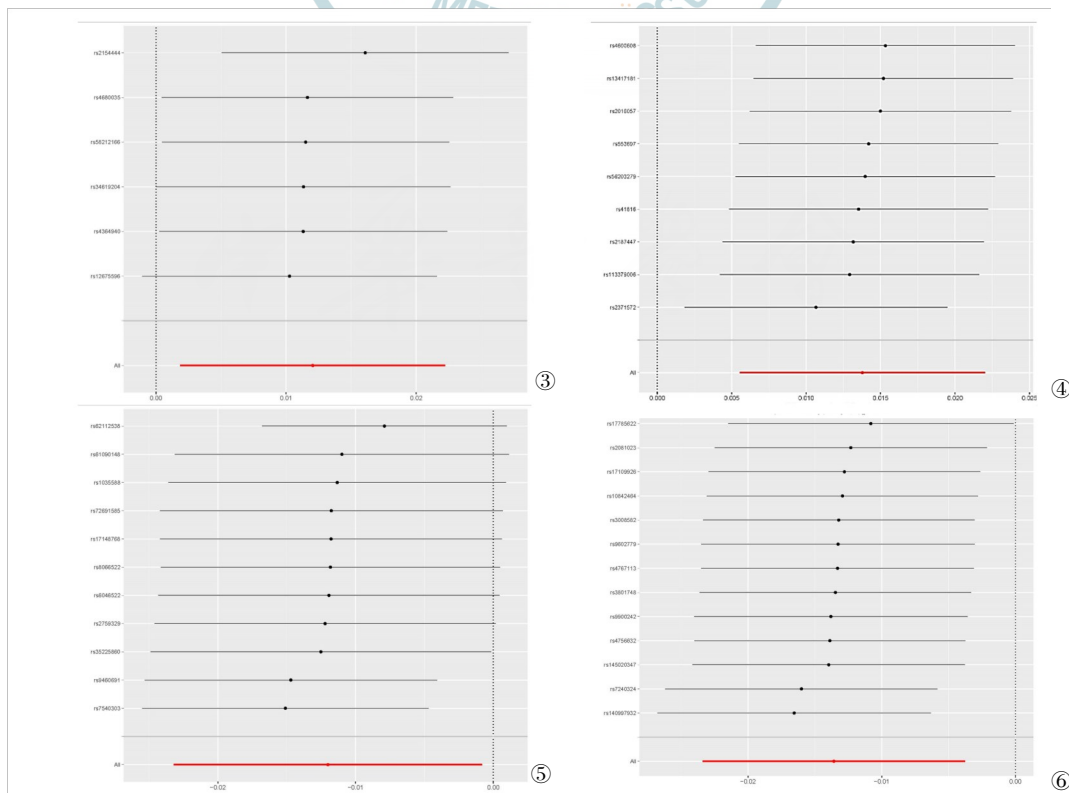


图3~6 菌属对握力因果影响的留一法分析森林图。图3 Alloprevotella 菌属;图4 Sellimonas 菌属;图5 Olsenella 菌属;图6 Olsenella 菌属

表3 利用IVW方法总结菌属与骨骼肌质量之间的因果关联

组别	肠道菌群	N(SNPs)	β (95% CI)	P
菌属*	Eubacterium fissicatena group	9	-0.055(-0.104,-0.007)	0.025
菌属**	Eubacterium nodatum group	11	0.069(0.012,0.125)	0.017
菌属*	Coprobacter	11	0.078(0.023,0.133)	0.006
菌属**	Erysipelatoclostridium	15	-0.090(-0.162,-0.019)	0.013
菌属*	Odoribacter	7	0.124(0.019,0.229)	0.021
菌属**	Ruminococcaceae UCG011	8	-0.104(-0.199,-0.010)	0.030
菌属*	unknowngenus.id.826	14	-0.073(-0.145,-0.001)	0.047

注: * $P_{IVW}<0.05$ 且 $P_{\text{weighted-median}}/P_{MR-PRESSO}<0.05$; ** $P_{IVW}<0.05$ 、 $P_{\text{weighted-median}}<0.05$ 且 $P_{MR-PRESSO}<0.05$ 。IVW:逆方差加权;SNPs:单核苷酸多态性

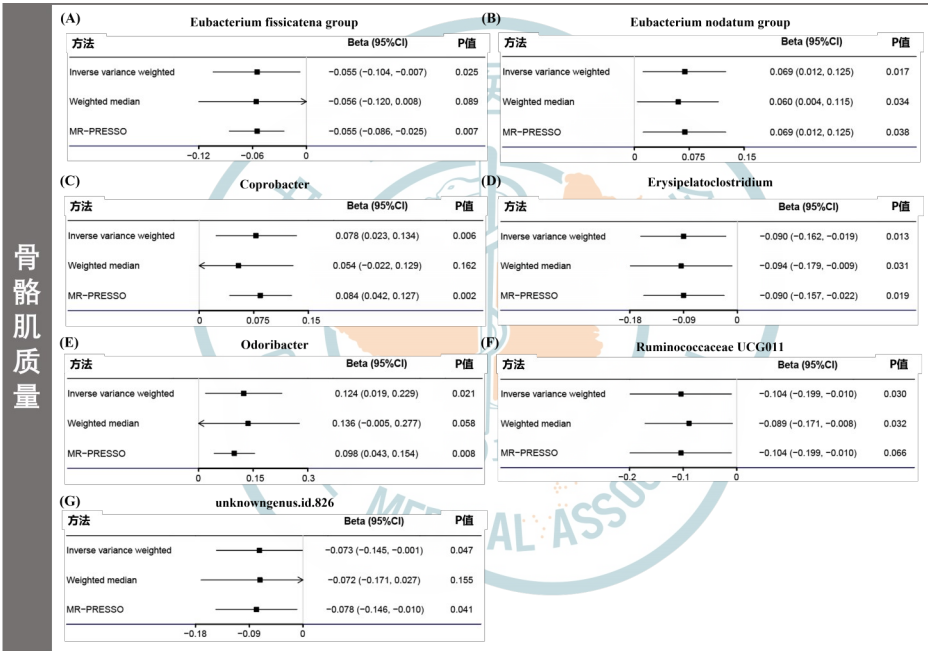


图7 经遗传学预测的肠道特定菌属与宿主骨骼肌质量之间提示因果关联的森林图

菌属(Eubacterium fissicatena group 菌属、Coprobacter 菌属、Odoribacter 菌属和 unknowngenus.id.826 菌属)与骨骼肌质量也有显著性因果关联($P<0.05$)。

讨论

本研究首次采用孟德尔随机化研究设计,通过对UKB数据库中324 976例研究对象进行数据分析,系统研究了肠道菌群与宿主握力与骨骼肌之间的因果关联。我们的研究表明,9个肠道特定菌属与握力之间存在显著性因果关联;7个肠道特定菌属与骨骼肌质量之间存在显著性因果关联。进一步开展敏感性分析,结果提示Alloprevotella 菌属、Sellimonas 菌属、Olsenella 菌属、Paraprevotella 菌属、Eubacterium nodatum group 菌属、Erysipelato-

clostridium 菌属与 Ruminococcaceae UCG011 菌属的因果效应值与IVW结果一致,结果稳定可靠。

既往有研究探讨了肌肉量、肌肉功能和肠道菌群之间的相关性。一项观察性研究发现,患有肌少症的老年人群与未患有肌少症的老年人群相比,肠道菌群的组成有显著差异^[37];另一项研究表明,体能表现高低会影响肠道菌群的组成^[38];此外,成年人的久坐或活跃行为也被发现与肠道菌群存在关联^[39-40]。具体来说,在衰弱老年人中,Lactobacilli 菌属、F. prausnitzii 菌属的相对丰度和 Bacteroides 菌属/Prevotella 菌属相对丰度的比值和正常人群相比急剧下降,Enterobacteriaceae 菌属相对丰度和正常人群相比增加^[41]。与不活动的个体相比,活动的成年人有更高的肌肉量和不同功能的优势菌^[39-40]。一项干预性研究表明,在老年女性中,与躯干肌肉训练相比,

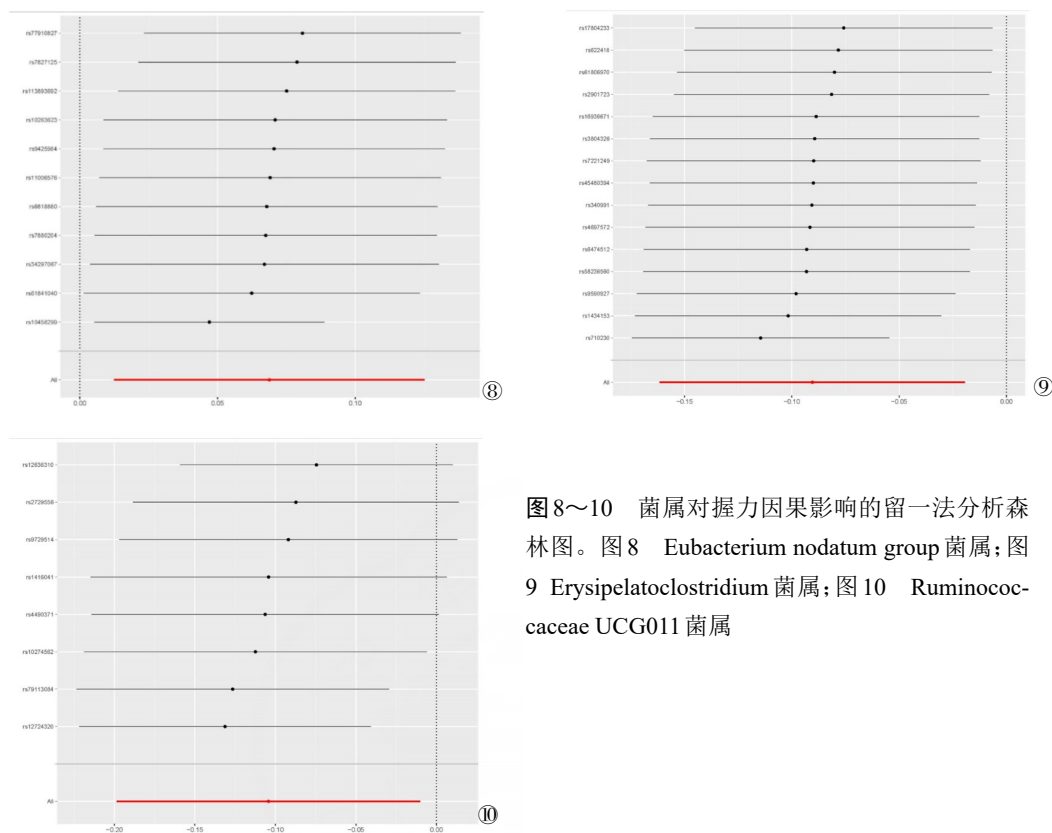


图8~10 菌属对握力因果影响的留一法分析森林图。图8 Eubacterium nodatum group 菌属; 图9 Erysipelatoclostridium 菌属; 图10 Ruminococcaceae UCG011 菌属

有氧运动并未增加肌肉量,但改变了肠道菌群丰度和身体表现^[42]。还有一项研究发现,Bacteroides 菌属相对丰度与6 min 步行试验结果呈正相关^[42]。

Alloprevotella 菌属被认为是一种有益的肠菌,其代谢产物包括丁酸,可能产生抗炎作用,进而对肌少症这一存在慢性炎症的疾病产生益处^[43]。先前的研究已经将 Paraprevotella 与肠易激综合征的发生和发展以及相关的慢性肠道炎症联系起来。慢性肠道炎症和营养吸收不良可导致肌肉功能下降^[44]。这表明 Paraprevotella 与肌肉功能之间的关系可能受到潜在疾病状态的影响。Parabacteroides Distasonis 菌属(P.distasonis 菌属)可以加重抗生素处理的肌萎缩侧索硬化症小鼠的症状^[45],也可以诱导克罗恩病小鼠出现抑郁样行为^[46]。也有研究发现,P.distasonis 菌属可以通过增加琥珀酸的分泌以及次级胆汁酸的转化,降低高脂喂养小鼠的体重^[47]。Erysipelatoclostridium 菌属可以诱导小鼠出现肥胖,进而导致肌肉质量的减少^[48]。

本研究存在如下优势。第一,MR 研究设计由于其遗传方面的特殊性,可以一定程度上模拟随机对照试验。随机对照试验通过将受试者随机分配到不同治疗组,从而避免了组间各种混杂因素对试验

结果的影响,是具有高证据等级的临床研究方法。不仅如此,相较于传统观察性研究,MR 研究设计是一种采用遗传变异作为中介工具的分析方法,还可有效克服潜在的反向因果关系的影响。同时MR 存在三大假设,即工具变量与暴露强相关、工具变量与结局无关、工具变量与混淆因素无关,因此被广泛应用于各种疾病暴露和结局的研究中,能够帮助我们更准确地分析和理解疾病之间的关系^[49-50]。第二,MR 研究相较随机对照试验更能节省时间和人力成本,这使得MR 研究具有一定的可行性上的优势,并能同随机对照试验一样,相比传统观察性研究显著降低混杂偏倚以及并可避免反向因果关系。第三,通过利用目前最综合和最新的高质量肠道菌群 GWAS 研究,本研究使用的肠道菌群工具变量较强,有利于我们得到稳健的结果。第四,本研究采用了严格的质量控制条件和合理的分析方法,包括运用 MR-PRESSO 和加权中位数等多种敏感性分析来验证因果效应。因此,本研究的结果是可靠和稳定的。

但是,本研究同样存在一些局限。第一,本研究所用的 UKB 数据主要来自于欧洲人群,故本研究的发现是否能适用于其他种族、群体和地区仍需进一步开展研究探讨。因此,如需将本研究结果推广到

其他人群应用时需谨慎考虑结果的外推性问题。第二,与研究暴露相关的遗传变异仅具有部分解释度,且这种相关性仍更多的停留在理论层面,未来尚需进一步基于本研究的发现开展随机对照试验来进一步证实。第三,本研究结果未能在其他独立队列中得到验证,鉴于不同地理位置、不同文化人群中,其肠道菌群组成的异质性肯定存在显著差异,故基于UKB的特定肠道菌群发现可能无法在其他人群中得到复现。第四,虽然我们已经使用MR方法来一定程度上防止研究结果受到混杂因素的影响,但是我们仍然不能完全排除未知的混杂因素造成的潜在偏差。第五,由于UKB中肌少症患者数量较少,难以直接探究肠道菌群与肌少症本身的关系,因此本研究仅能探讨肠道菌群与肌少症相关指标,即握力和肌肉质量的关系。第六,本研究发现的肠道具体菌种与肌少症发生发展之间的生物学机制尚需进一步研究探讨。

肌少症已造成严重的社会、经济以及家庭负担,现已成为一类重大公共卫生问题和临床医疗难题^[10-11]。遗憾的是,肌少症的发病机制和治疗方式尚不明确,目前仍缺乏针对肌少症的安全有效的治疗药物^[12]。肠道菌群可参与机体内分泌功能、能量稳态和营养吸收效率等生理调节^[23]。更重要的是,肠道菌群具有可重塑性和可调节性的特点,此类特点表明肠道菌群可能成为未来治疗肌少症的关键靶点。本研究发现了16个经遗传学预测的肠道特定菌属与肌少症相关表型指标之间存在显著性因果关联,属首次基于人源性数据明确了肠道菌群可影响肌少症的发生发展。这一发现科学证实了“肠菌-骨骼肌”轴在肌少症发病机制中发挥重要作用,并为进一步探明肌少症相关肠道驱动菌种、开发针对菌种调控的肌少症治疗新方法提供理论依据。

本研究探讨了与宿主握力和骨骼肌质量存在因果关联的肠道特定菌属,其中Alloprevotella菌属、Sellimonas菌属、Eubacterium nodatum group菌属与肌少症表型指标存在正向因果关联,Olsenella菌属、Paraprevotella菌属、Erysipelatoclostridium菌属和Ruminococcaceae UCG011菌属与肌少症表型指标存在负向因果关联。这些发现为阐明肌少症发病机制、开发治疗新方法提供了理论参考。

参 考 文 献

- 1 Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque,

- New Mexico, October 19-21, 1988 [J]. Am J Clin Nutr, 1989, 50: 1121-1235.
- 2 Beaudart C, Rizzoli R, Bruyère O, et al. Sarcopenia:burden and challenges for public health [J]. Arch Public Health, 2014, 72(1): 45.
- 3 Kelley GA, Kelley KS. Is sarcopenia associated with an increased risk of all-cause mortality and functional disability? [J]. Exp Gerontol, 2017, 96: 100-103.
- 4 Yeung SSY, Reijnierse EM, Pham VK, et al. Sarcopenia and its association with falls and fractures in older adults: A systematic review and meta-analysis [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(3): 485-500.
- 5 Wong RMY, Wong H, Zhang N, et al. The relationship between sarcopenia and fragility fracture- a systematic review [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(3): 541-553.
- 6 Tagliafico AS, Bignotti B, Torri L, et al. Sarcopenia: how to measure, when and why [J]. Radiol Med, 2022, 127(3): 228-237.
- 7 Pinedo-Villanueva R, Westbury LD, Syddall HE, et al. Health Care Costs Associated With Muscle Weakness: A UK Population-Based Estimate [J]. Calcif Tissue Int, 2019, 104: 137-144.
- 8 Goates S, Du K, Arensberg MB, et al. Economic impact of hospitalizations in US adults with sarcopenia [J]. J Frailty Aging, 2019, 8(2): 93-99.
- 9 Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, et al. The healthcare costs of sarcopenia in the United States [J]. J Am Geriatr Soc, 2004, 52(1): 80-85.
- 10 Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis [J]. Age Ageing, 2019, 48(1): 16-31.
- 11 Chen LK, Woo J, Assantachai P, et al. Asian working group for sarcopenia: 2019 consensus update on sarcopenia diagnosis and treatment [J]. J Am Med Dir Assoc, 2020, 21(3): 300-307.e2.
- 12 Kwak JY, Kwon KS. Pharmacological interventions for treatment of sarcopenia: current status of drug development for sarcopenia [J]. Ann Geriatr Med Res, 2019, 23(3): 98-104.
- 13 Cruz-JentoftAJ,SayerAA.Sarcopenia[J].Lancet,2019,393:2636-2646.
- 14 Hawley-Hague H, Horne M, Campbell M, et al. Multiple levels of influence on older adults' attendance and adherence to community exercise classes [J]. Gerontologist, 2014, 54(4): 599-610.
- 15 Milanović Z, Pantelić S, Trajković N, et al. Age-related decrease in physical activity and functional fitness among elderly men and women [J]. Clin Interv Aging, 2013, 8: 549-556.
- 16 Beaudart C, Dawson A, Shaw SC, et al. Nutrition and physical activity in the prevention and treatment of sarcopenia: systematic review [J]. Osteoporos Int, 2017, 28(6): 1817-1833.
- 17 Yoshimura Y, Wakabayashi H, Yamada M, et al. Interventions for treating sarcopenia: a systematic review and Meta-Analysis of randomized controlled studies [J]. J Am Med Dir Assoc, 2017, 18(6): 553.e1-553.e16.
- 18 Robinson SM, Reginster JY, Rizzoli R, et al. Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? [J]. Clin Nutr, 2018, 37(4): 1121-1132.
- 19 van Dronkelaar C, van Velzen A, Abdelrazek M, et al. Minerals and sarcopenia; the role of Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Selenium, Sodium, and Zinc on muscle mass, muscle strength, and physical performance in older adults: a systematic review [J]. J Am Med Dir Assoc, 2018, 19(1): 6-11.e3.
- 20 Kamei Y, Hatazawa Y, Uchitomi R, et al. Regulation of skeletal mus-

- cle function by amino acids [J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 261.
- 21 Qin JJ, Li RQ, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464 (7285): 59-65.
- 22 Bakhtiar SM, LeBlanc JG, Salvucci E, et al. Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 342(1): 10-17.
- 23 Delzenne NM, Cani PD. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition [J]. *Annu Rev Nutr*, 2011, 31: 15-31.
- 24 Frampton J, Murphy KG, Frost G, et al. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function [J]. *Nature Metabolism*, 2020, 2(9): 840-848.
- 25 Krautkramer KA, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(2): 77-94.
- 26 Fielding RA, Reeves AR, Jasuja R, et al. Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults [J]. *Exp Gerontol*, 2019: 110722.
- 27 Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly [J]. *Nature*, 2012, 488 (7410): 178-184.
- 28 Ren X, Hao S, Yang C, et al. Alterations of intestinal microbiota in liver cirrhosis with muscle wasting [J]. *Nutrition*, 2021: 111081.
- 29 Margiotta E, Caldiroli L, Callegari ML, et al. Association of sarcopenia and gut microbiota composition in older patients with advanced chronic kidney disease, investigation of the interactions with uremic toxins, inflammation and oxidative stress [J]. *Toxins (Basel)*, 2021: 13.
- 30 Emdin CA, Khera AV, Kathiresan S. Mendelian Randomization [J]. *Jama*, 2017, 318: 1925-1926.
- 31 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.
- 32 Sudlow C, Gallacher J, Allen N, et al. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age [J]. *PLoS Med*, 2015, 12(3): e1001779.
- 33 Hemani G, Zheng J, Elsworth B, et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome [J]. *Elife*, 2018, 30: e34408.
- 34 Burgess S, Bowden J, Fall T, et al. Sensitivity analyses for robust causal inference from mendelian randomization analyses with multiple genetic variants [J]. *Epidemiology*, 2017, 28(1): 30-42.
- 35 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.
- 36 Verbanck M, Chen CY, 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.
- 37 Picca A, Ponziani FR, Calvani R, et al. Gut microbial, inflammatory and metabolic signatures in older People with physical frailty and sarcopenia: results from the BIOSPHERE study [J]. *Nutrients*, 2019, 12(1): 65.
- 38 Castro-Mejía JL, Khakimov B, Krych L, et al. Physical fitness in community-dwelling older adults is linked to dietary intake, gut microbiota, and metabolomic signatures [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13105.
- 39 Bressa C, Bailén-Andrino M, Pérez-Santiago J, et al. Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171352.
- 40 Castellanos N, Díez GG, Antúnez-Almagro C, et al. A critical Mutualism-Competition interplay underlies the loss of microbial diversity in sedentary lifestyle [J]. *Front Microbiol* 2019: 3142.
- 41 van Tongeren SP, Slaets JJP, Harmsen HJM, et al. Fecal microbiota composition and frailty [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 6438-6442.
- 42 Morita E, Yokoyama H, Imai D, et al. Aerobic exercise training with brisk walking increases intestinal bacteroides in healthy elderly women [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 868.
- 43 Pietrucci D, Teofani A, Milanesi M, et al. Machine learning data analysis highlights the role of parasutterella and alloprevotella in autism spectrum disorders [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8):2028.
- 44 Chen YJ, Wu H, Wu SD, et al. Parasutterella, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(11): 1844-1852.
- 45 Blacher E, Bashardes S, Shapiro H, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice [J]. *Nature*, 2019, 572(7770): 474-480.
- 46 Gomez-Nguyen A, Basson AR, Dark-Fleury L, et al. Parabacteroides distasonis induces depressive-like behavior in a mouse model of Crohn's disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 98: 245-250.
- 47 Wang K, Liao MF, Zhou N, et al. Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(1): 222-235.e5.
- 48 Chen GJ, Peng YJ, Huang YJ, et al. Fluoride induced leaky gut and bloom of Erysipelatoclostridium ramosum mediate the exacerbation of obesity in high-fat-diet fed mice [J]. *J Adv Res*, 2023, 50: 35-54.
- 49 Yuan S, Larsson SC. Assessing causal associations of obesity and diabetes with kidney stones using Mendelian randomization analysis [J]. *Mol Genet Metab*, 2021, 134(1/2): 212-215.
- 50 Yuan S, Carter P, Mason AM, et al. Genetic liability to rheumatoid arthritis in relation to coronary artery disease and stroke risk [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74(10): 1638-1647.

(收稿日期:2023-08-09)

(本文编辑:吕红芝)

王宁, 刘彦哲, 吴紫莺, 等. 基于孟德尔随机化研究探讨肠道菌群与肌少症表型的因果关联 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2023, 9(6): 333-342.