

# 肠道微生物群与胃食管反流病的因果关系：两样本孟德尔随机化分析

周嘉伟 李晓锋 李海量 杨 侗 黎 程  
暨南大学附属广东省第二人民医院 广东 广州 510630

**摘要：**目的：利用孟德尔随机化（Mendelian randomization, MR）分析研究肠道微生物群与胃食管反流病（Gastroesophageal reflux disease, GERD）的因果关系，为研究GERD的发病机制及其潜在的预防和治疗策略提供遗传学视角。方法：筛选数据后使用逆方差加权法（inverse variance weighted, IVW）、加权众数法（weighted mode estimate）、模型选择法（MR-Egger）和加权中位数法（weighted median estimate）进行MR分析；再行敏感性分析和反向MR分析，从而确保结果的有效性。结果：两样本孟德尔随机化（two-sample Mendelian randomization, TSMR）分析结果显示8类细菌与GERD相关，包括4种危险因素和4种保护因素。GERD的风险与双歧杆菌科、双歧杆菌目、克里斯滕森菌科、臭杆菌属呈负相关，与柔膜体纲、软壁菌门、理研菌科和普雷沃氏菌属9呈正相关；敏感性分析未发现异质性和水平多效性，反向MR分析未发现肠道菌群与GERD之间存在反向因果关系。结论：通过TSMR，我们确立了肠道菌群（8类）与GERD之间的因果关系，从而为研究GERD发病机制及其预防和治疗的潜在策略提供了创新性的遗传学观点。

**关键词：**孟德尔随机化；肠道菌群；胃食管反流病；因果关系

## 1 前言

胃食管反流病(GERD)是一种常见的消化疾病，是胃食管腔因过度接触（或暴露于）胃液而引起的临床胃食管反流症和食管黏膜损伤的疾病。常见的症状有反酸和胃灼热，吞咽疼痛和吞咽困难，并可能导致Barrett食管和食管癌<sup>[1]</sup>，其典型特征为症状反复发作，不仅影响患者的身心健康和生活质量，还会给社会带来显著的经济和医疗保健负担<sup>[2]</sup>。尽管目前认为其机制主要与下食管括约肌(low esophageal sphincter, LES)功能障碍相关，但仍需要进一步的研究来阐明具体机制。

人体微生态系统包括口腔、皮肤、泌尿和胃肠道四个部位，其中以肠道微生态系统最为主要且最为复杂。肠道微生态系统由肠道正常菌群及其所生活的环境共同构成，其中，肠道正常菌群是其核心组成部分。人体肠道微生物组通常也被称为“第二基因组”<sup>[3]</sup>，在人类身心健康中扮演着至关重要的角色。目前随着技术的进步，如：组织化学和高通量16S rRNA测序，肠道菌群与GERD之间的关系逐渐被认识<sup>[4]</sup>。有研究利用从口腔、食管至肠道的菌群样本对GERD患者进行了微生物学分析；结果一致显示GERD患者与健康个体之间的肠道菌群存在显著差异<sup>[5]</sup>。但由于成本高昂和伦理方面的限制，很难对肠道微生物群和胃食管反流病进行大规模、多中心的流行病学研究。

孟德尔随机化（MR）分析是一种广受欢迎的方法，是一种用于估计暴露因素(如生活方式或生物标志物等)对结果变量(如疾病或健康结果等)的因果效应的统计方法。这种方法通常被视为一种自然的随机对照试验，它利用常见遗传变异的内在特性来探究环境暴露，并揭示这些暴露与疾病之间的潜在因果关系。单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）是基因组水平上丰富多样的DNA序列变异，由单核苷酸的改变引起。一般来说，SNP表示频率超过1%的单核苷酸变异。本研究利用最新的全基因组关联研究（Genome-wide association studies, GWAS）数据库<sup>[6]</sup>进行TSMR分析，探讨肠道微生物群与胃食管反流病之间的潜在因果关系。以此来达到为研究GERD的发病机制及其潜在的预防和治疗策略提供遗传学视角。

## 2 资料与方法

### 2.1 暴露数据

这项MR研究中使用的数据是公开的。肠道微生物的GWAS数据来自16S rRNA基因测序图谱和基因分型数据，这些数据由MiBioGen国际联盟<sup>[7]</sup>（<https://mibiogen.gcc.rug.nl/>）精心策划和分析。收集了不同种族的数据，并协调了来自美国、加拿大、以色列和韩国等11个国家24个队列的18,340名参与者的基因分型数据和16S核糖体RNA基因测序图谱。主要目的是探索人类常染色体基

因变异与肠道微生物群组成之间的相关性。与肠道细菌类型相关的变异在五个不同的分类级别上进行了评估，即门、纲、目、科和属。

## 2.2 结果数据

获取了 IEU Open GWAS 项目 (<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>) 中记录的数据。简而言之，胃食管反流病的遗传

汇总数据来自英国生物库 (U.K. Biobank) 的一项全球基因组研究 (id: ebi-a-GCST90000514)，涉及欧洲血统的 129080 个病例和 473524 个对照。胃食管反流病的定义是根据 ICD9/10 编码，或医生诊断或裁定，或两者兼而有之；详细信息见图 1。

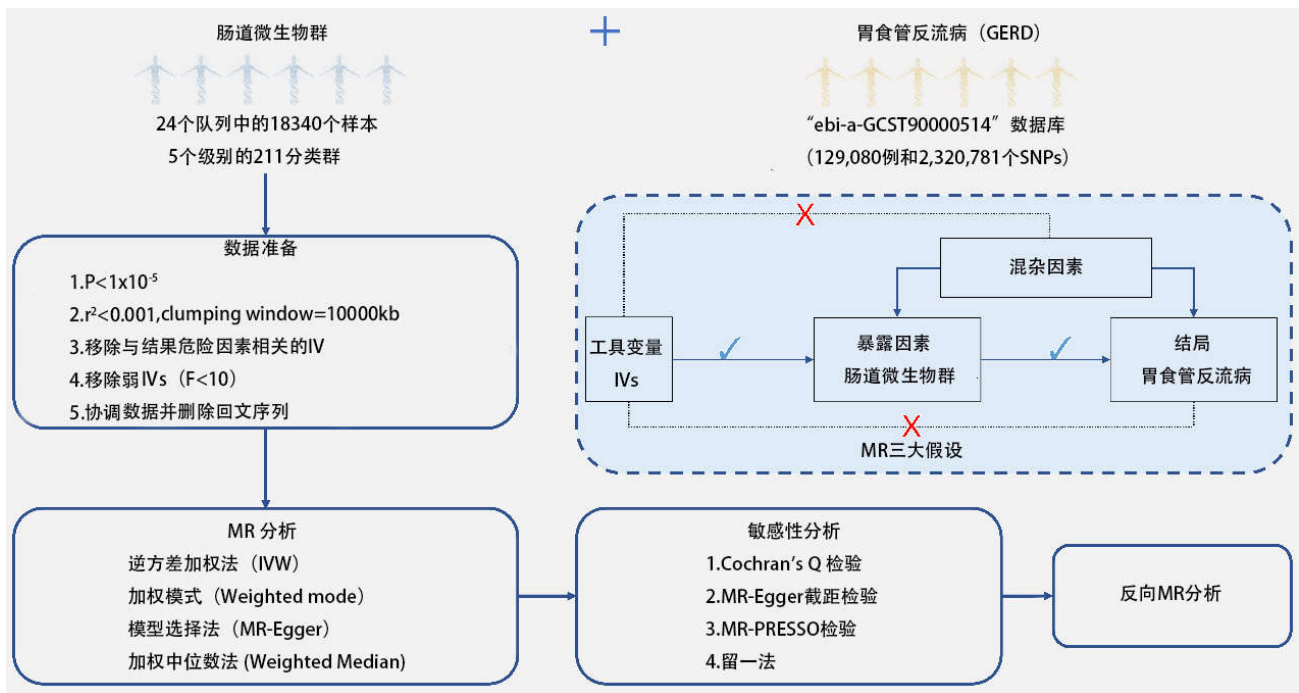


图1 数据的获取及孟德尔随机化分析原理及流程图

## 2.3 工具变量选择

在分析的初步阶段，排除了 15 类缺乏特定命名的细菌；因此，选择了 196 种细菌：9 个门、16 个纲、20 个目、32 个科和 119 个属。同时仔细执行了一系列质量保证措施，以验证最合适的工具变量 (instrumental variable, IV)，并确保关于肠道微生物群与胃食管反流病之间因果关系的结论的可靠性和精确性。

选择了与肠道微生物群明显相关的 SNPs 作为工具变量。选择 SNPs 的阈值比全基因组统计显著性阈值 ( $P < 1.0 \times 10^{-5}$ ) 更低，这样以获得更全面的结果。同时常使用 F 统计量作为工具变量的筛选阈值，来检验遗传变异与暴露之间的相关性强弱。通常认为 F 统计量越小，说明遗传变异与暴露之间的相关性就越弱，这可能导致 MR 研究结果产生偏倚。所以对于大多数 MR 研究，至少应有  $F \geq 10$ 。此外，在 MR 方法中，所选的 IVs 不应表现出连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD)，因为这会给结果带来偏差。因此，本文 "TwoSampleMR" 软件包采用了  $R^2 <$

0.001 的严格 LD 临界值和 10,000 kb 的聚类距离来尽量避免这一问题。同时 SNP 对暴露的影响与 MR 中对结果的影响的等位基因一致，以保持一致性并避免任何潜在偏差。因此，排除了等位基因为 A/T 或 G/C 的 SNP，以防止链方向或等位基因编码的扭曲。作为协调工作的一部分，等位基因与人类基因组参考序列也进行了比对，并剔除了任何不明确或重复的 SNP。在提取每个 SNP 的效应等位基因和效应大小 (包括贝塔值、标准偏差和 P 值) 等相关数据后，使用以下公式计算可解释  $R^2$  和 F 统计量，以衡量工具的强度： $R^2 = 2 \times \text{MAF} \times (1 - \text{MAF}) \times \beta^2$ ， $F = R^2(n - k - 1) / (k(1 - R^2))$ ，其中 MAF 是作为 IVs 的 SNP 的次要等位基因频率，n 是样本量， $R^2$  是 IV 解释暴露的程度，k 是 IVs 的数量<sup>[8,9]</sup>。196 种细菌的 F 统计量超过了 10，表明遇到弱工具偏差的可能性较低。

## 2.4 MR 分析

在 MR 分析中，对于具有多个 IVs 的特征，使用了四种常用的 MR 方法：逆方差加权法、加权众数法、模型

选择法和加权中位数法。涉及多个自变量的研究结果主要基于 IVW 方法，其余三种方法作为补充分析。因为该方法在效应估计方面具有无与伦比的精确性，而且在几乎所有 MR 研究中被广泛用作主要分析模式。

### 2.5 统计效能检验

为了验证 MR 分析结果的稳健性和一致性，还需要进行敏感性分析，以确保因果关系的可靠性外推。包括以下三项：（1）多效性检验；（2）异质性检验；（3）“leave-one-out”法。采用留一法（leave-one-out法），即逐步剔除每个SNP，计算剩余SNP的meta效应，观察剔除每个SNP后结果是否发生变化。其次为解决潜在的横向多效性问题，又进行MR-PRESSO和MR-Egger截距检验。MR-Egger是检验是否存在水平多效性手段之一。如果截距的  $P$  值小于 0.05，则 SNPs 可能存在水平多效<sup>[10]</sup>。MR-PRESSO 检验，用来识别 SNPs 之间任何可能的异常值,包括三个测试，每个测试解决了MR分析中可能出现的不同问题。简单来说就是在检测出潜在的异常值后，通过排除这些异常值校正关联结果。此外，当数据来自多

个GWAS队列研究时，为了避免不同基因注释、不同病例诊断标准可能带来的影响，还需要进行Cochran's Q 异质性检验，如果 Q 统计量的  $P$  值小于 0.05，则表明存在异质性<sup>[11,12]</sup>。所有数据分析，包括双样本 MR 分析，均使用 R 软件包进行<sup>[13]</sup>。

### 2.6 反向MR

反向孟德尔随机化是指通过反向方法，从表型或者表型组的结果出发，反向推导出导致该结果的基因型或者基因型组合之间是否成立因果关系。（确保反向因果不存在）通过双向孟德尔随机化确认因果关系是否是单向的，如果是单向的，那么这个因果关系成立。它可以在较大程度上消除研究中的混杂偏倚，提高研究结果的可靠性。

## 3 结果

### 3.1 筛选196种细菌与胃食管反流病风险的关系

按照严格的方案对肠道微生物群和胃食管反流病进行了严格的 TSMR 分析（图1）。最终选择了 8 种与胃食管反流病相关的细菌(图2)。

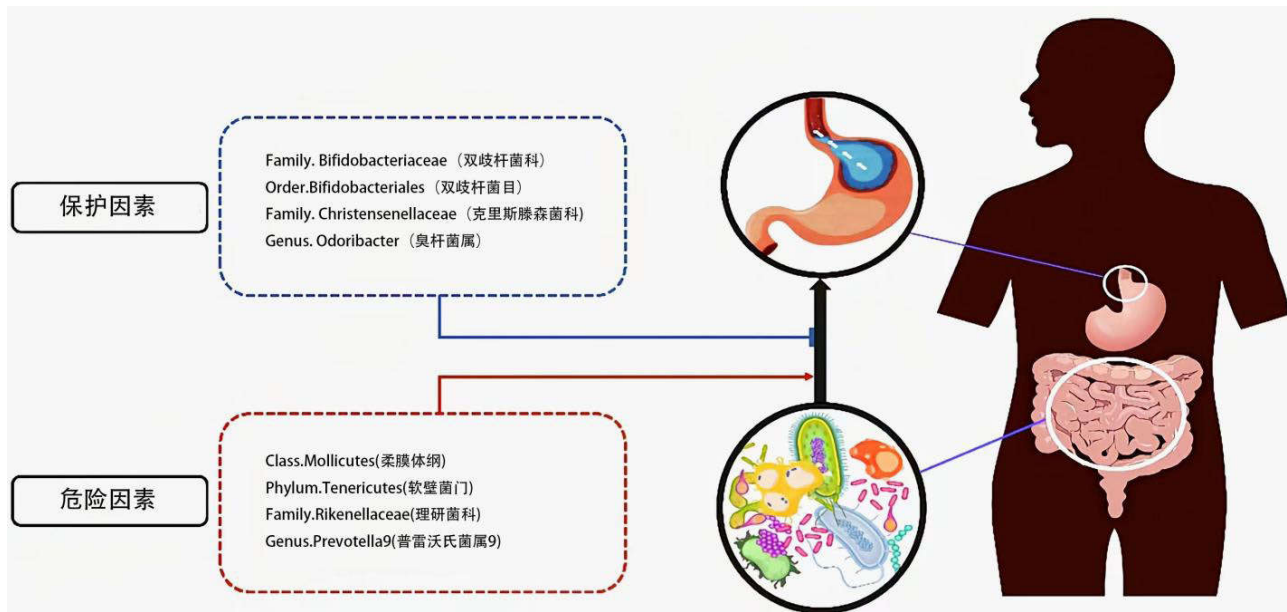


图2 MR分析确定的与胃食管反流病相关的细菌类群。蓝色表示细菌类群可能对结果起保护作用，红色表示细菌类群可能对结果起风险作用。（*Family. Bifidobacteriaceae*: 双歧杆菌科；*Order. Bifidobacteriales*: 双歧杆菌目；*Family. Christensenellaceae*: 克里斯滕森菌科；*Genus. Odoribacter*: 臭杆菌属；*Class. Mollicutes*: 柔膜体纲；*Phylum. Tenericutes*: 软壁菌门；*Family. Rikenellaceae*: 理研菌科；*Genus. Prevotella9*: 普雷沃氏菌属9）

### 3.2 四种细菌类群与胃食管反流病风险呈负相关

图5提示了与胃食管反流病呈负相关的四种细菌类群的MR分析结果，它们可能是胃食管反流病的保护因素。在 IVW 方法中，这四种细菌类群与胃食管反流病呈负

相关（双歧杆菌科 OR: 0.90; 95% CI: 0.84, 0.96;  $P = 0.026$ ; 双歧杆菌目 OR: 0.90; 95% CI: 0.84, 0.96;  $P = 0.002$ ; 克里斯滕森菌科OR: 0.90; 95% CI: 0.85, 0.95;  $P = 0.000$ ; 臭杆菌属OR: 0.95; 95% CI: 0.90,

1.00;  $P = 0.024$  )。

### 3.3 四种细菌类群与胃食管反流病风险呈正相关

图5同样提示了与胃食管反流病呈正相关的四种细菌类群的MR分析结果，它们可能是胃食管反流病的风险因素。在IVW方法中，四种细菌类群与胃食管反流病呈正相关（柔膜体纲 OR: 1.09; 95% CI: 1.00, 1.19;  $P = 0.003$ ; 软壁菌门OR: 1.09; 95% CI: 1.00, 1.19;  $P = 0.003$ ; 理研菌科OR: 1.00; 95% CI: 1.00, 1.00;  $P = 0.015$ ; 普雷沃氏菌属9 OR: 1.05; 95% CI: 1.01, 1.10;  $P = 0.013$  )。

### 3.4 统计效能检验

通过图3留一法 (leave-one-out法) 结果，提示这8种肠道菌群种不存在单个的 SNP 对该MR 分析的稳健性产生较大影响。此外，根据MR-Egger 回归检验 (图4) 以及把MR-Egger的截距项Egger intercept和0进行统计检验，结果提示8种细菌的 $P$ 值均  $> 0.05$ ，没有统计学差异，可以认为没有水平多效性的存在。图6提示了8种细菌的Cochrane's Q的 $P$ 值均  $> 0.05$ ，从Cochrane's Q检验中也未发现异质性证据。综上，MR 分析结果显示支持此8种肠道菌群和GERD有因果效应。

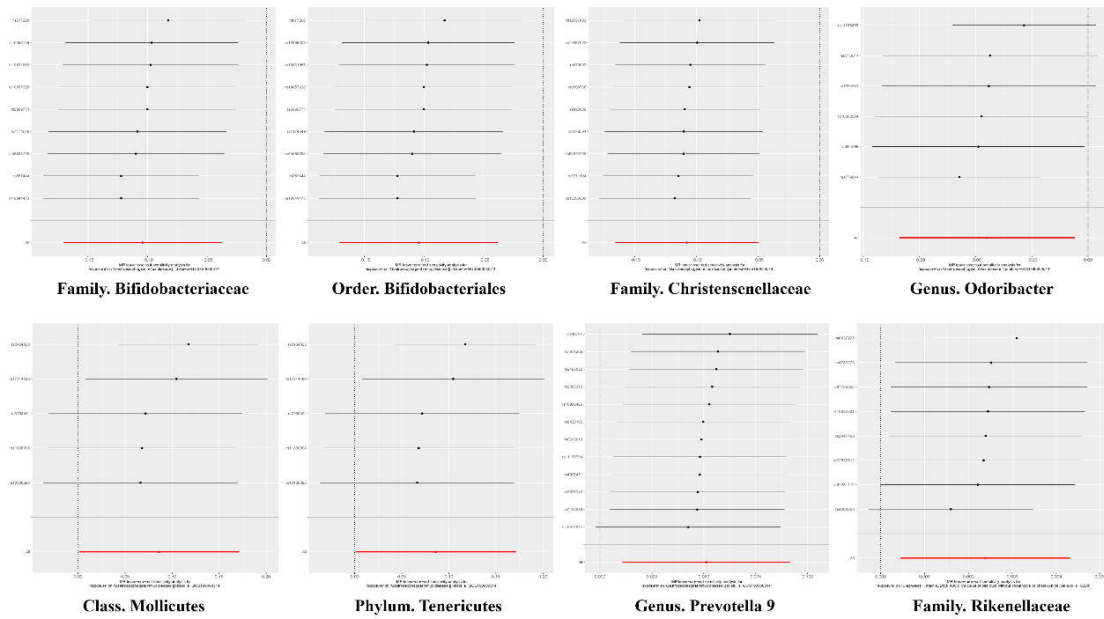


图3 留一法 (leave-one-out法)

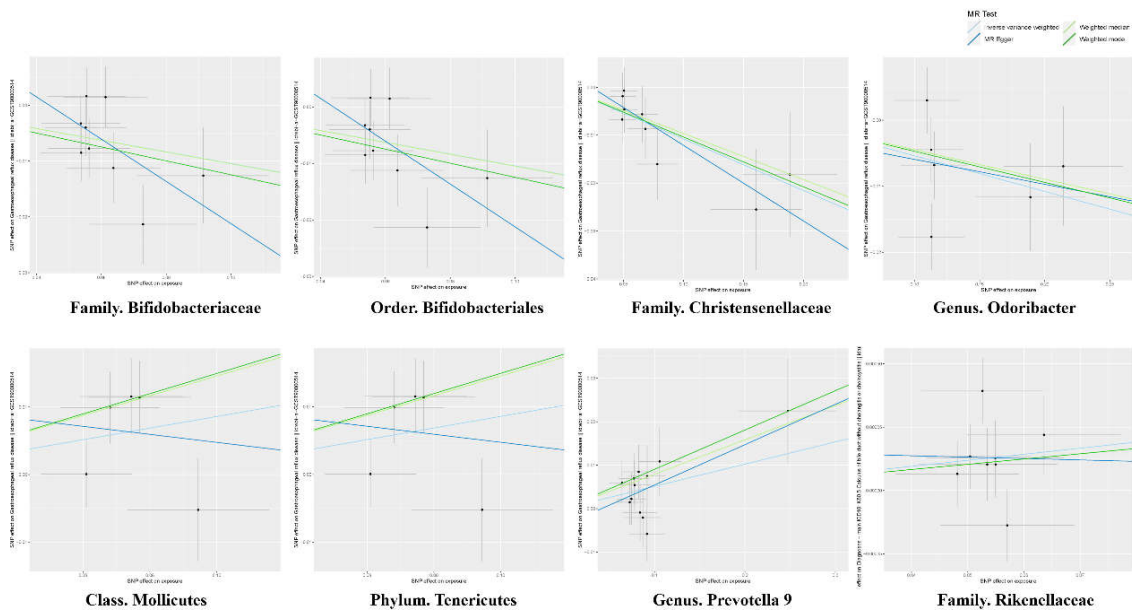


图4 用四种方法绘制的肠道微生物群遗传易感性与胃食管反流病 (GERD) 风险之间的散点图

图5列出了这 8 种细菌所使用的工具变量 (IVs) 数量, 还列出了研究中所进行检验的结果。

Taxa	Gut microbiota (exposure)	trait (outcome)	Nsnp	Methods	Beta	SE	OR(95%CL)	P value	heterogeneity		horizontal pleiourropy		
									Cochran's Q	P value	Egger intercept	SE	P value
Bifidobacteriaceae	family	GERD	14	Inverse variance weighted	-0.104	0.034	0.900(0.843-0.962)	0.026	7.705	0.359	0.017	0.013	0.252
				weighted median	-0.105	0.044	0.900(0.825-0.982)	0.137					
				MR Egger	-0.378	0.222	0.684(0.443-1.058)	0.531					
				weighted mode	-0.124	0.071	0.882(0.768-1.039)	0.534					
Bifidobacteriales	order	GERD	9	Inverse variance weighted	-0.104	0.034	0.900(0.843-0.962)	0.002	7.705	0.359	0.017	0.013	0.252
				weighted median	-0.105	0.043	0.900(0.827-0.980)	0.015					
				MR Egger	-0.378	0.222	0.684(0.443-1.059)	0.132					
				weighted mode	-0.124	0.075	0.882(0.761-1.023)	0.137					
Christensenellaceae	family	GERD	14	Inverse variance weighted	-0.108	0.03	0.897(0.847-0.951)	0.000	2.580	0.921	0.004	0.005	0.479
				weighted median	-0.096	0.037	0.908(0.813-0.977)	0.010					
				MR Egger	-0.158	0.073	0.853(0.739-0.985)	0.068					
				weighted mode	-0.104	0.06	0.901(0.801-1.031)	0.120					
Odoribacter	genus	GERD	6	Inverse variance weighted	-0.054	0.024	0.948(0.904-0.993)	0.024	8.828	0.066	-0.002	0.014	0.887
				weighted median	-0.045	0.024	0.956(0.912-1.002)	0.065					
				MR Egger	-0.038	0.11	0.963(0.777-1.194)	0.748					
				weighted mode	-0.047	0.034	0.954(0.892-1.020)	0.230					
Mollicutes	class	GERD	8	Inverse variance weighted	0.086	0.043	1.089(1.000-1.186)	0.003	6.086	0.108	0.000	0.027	0.715
				weighted median	0.146	0.049	1.157(1.150-1.274)	0.048					
				MR Egger	-0.059	0.366	0.942(0.973-1.027)	0.125					
				weighted mode	0.150	0.077	1.002(0.999-1.005)	0.881					
Tenericutes	phylum	GERD	5	Inverse variance weighted	0.086	0.043	1.090(1.000-1.187)	0.003	6.086	0.108	0.011	0.027	0.715
				weighted median	0.146	0.049	1.157(1.050-1.275)	0.048					
				MR Egger	-0.059	0.366	0.942(0.460-1.930)	0.121					
				weighted mode	0.150	0.076	1.162(1.000-1.349)	0.881					
Rikenellaceae	family	GERD	8	Inverse variance weighted	0.002	0.001	1.001(1.000-1.003)	0.015	8.468	0.206	0.000	0.001	0.836
				weighted median	0.002	0.001	1.001(0.999-1.003)	0.095					
				MR Egger	-0.001	0.014	0.999(0.990-1.026)	0.969					
				weighted mode	0.002	0.02	1.001(0.999-1.003)	0.262					
Prevotella9	genus	GERD	12	Inverse variance weighted	0.051	0.021	1.053(1.010-1.096)	0.013	6.598	0.763	-0.040	0.006	0.530
				weighted median	0.079	0.028	1.082(1.025-1.143)	0.004					
				MR Egger	0.093	0.067	1.097(0.962-1.252)	0.198					
				weighted mode	0.090	0.046	1.095(1.000-1.198)	0.076					

图5 IVs、MR分析、敏感性检验汇总结果

Taxa	Gut microbiota (exposure)	trait (outcome)	Nsnp	Methods	Beta	SE	P value	Correct causal
Bifidobacteriaceae	family	GERD	32	Inverse variance weighted	0.02	0.23	0.95	FALSE
				weighted median	-0.14	0.33	0.68	
				MR Egger	-0.11	0.73	0.88	
				weighted mode	-0.21	0.54	0.70	
Bifidobacteriales	order	GERD	32	Inverse variance weighted	0.16	0.22	0.45	FALSE
				weighted median	0.35	0.31	0.27	
				MR Egger	0.09	0.70	0.90	
				weighted mode	0.50	0.49	0.32	
Christensenellaceae	family	GERD	32	Inverse variance weighted	-0.14	0.27	0.61	FALSE
				weighted median	-0.28	0.39	0.47	
				MR Egger	0.19	0.82	0.82	
				weighted mode	-0.44	0.63	0.49	
Odoribacter	genus	GERD	31	Inverse variance weighted	-0.46	0.45	0.31	FALSE
				weighted median	-0.35	0.59	0.55	
				MR Egger	-0.76	1.45	0.60	
				weighted mode	-0.09	0.89	0.92	
Mollicutes	class	GERD	12	Inverse variance weighted	0.27	0.29	0.36	FALSE
				weighted median	-0.10	0.43	0.82	
				MR Egger	-0.60	0.90	0.50	
				weighted mode	-0.30	0.64	0.64	
Tenericutes	phylum	GERD	32	Inverse variance weighted	0.31	0.19	0.10	FALSE
				weighted median	0.35	0.27	0.19	
				MR Egger	0.03	0.61	0.96	
				weighted mode	0.60	0.46	0.20	
Rikenellaceae	family	GERD	32	Inverse variance weighted	-0.16	0.20	0.45	FALSE
				weighted median	-0.13	0.29	0.66	
				MR Egger	-0.18	0.66	0.79	
				weighted mode	-0.13	0.46	0.77	
Prevotella9	genus	GERD	32	Inverse variance weighted	-0.25	0.20	0.22	FALSE
				weighted median	-0.68	0.29	0.02	
				MR Egger	-0.30	0.65	0.65	
				weighted mode	-0.89	0.48	0.07	

图6 8种肠道菌群与GERD反向MR分析结果

### 3.5 反向 MR 分析

如上, TSMR分析结果显示了8种肠道菌群同GERD有因果关系。随后通过孟德尔随机分析法研究了上述8个肠道微生物群是否与胃食管反流病存在反向关联。在反向MR的IVW方法中,胃食管反流病与8个肠道微生物群的P值如下(图6):双歧杆菌科  $P = 0.95$ ; 双歧杆菌目  $P = 0.45$ ; 克里斯滕森菌科  $P = 0.61$ ; 臭杆菌属  $P = 0.31$ ; 柔膜体纲  $P = 0.36$ ; 软壁菌门  $P = 0.10$ ; 理研菌科  $P = 0.45$ ; 普雷沃氏菌属9  $P = 0.22$ 。通过IVW分析,没有发现胃食管反流病与这8个肠道微生物群之间有统计学意义的因果关系。

## 4 讨论

本研究利用大规模GWAS和TSMR分析的统计数据,确定了与胃食管反流病有因果效应的8类细菌(图2)。其中,4种细菌与胃食管反流病的发病风险呈负相关,可能是保护因素,而其余4种细菌与胃食管反流病的发病风险呈正相关,可能是风险因素。如图2所示,我们首先关注胃食管反流病的危险因素,其中包括属于柔膜体纲(*Mollicutes*)、软壁菌门(*Tenericutes*)、理研菌科(*Rikenellaceae*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*) 9。软壁菌门由缺乏肽聚糖细胞壁的细菌组成<sup>[14]</sup>,有文献报道在海洋废弃物中发现了大量的软壁菌门,但具体的传播链仍不清楚<sup>[15]</sup>。包括螺原体(*Spiroplasma*)、支原体(*Mycoplasma*)和无胆甾原体(*Acholeplasma*)在内的柔膜体纲由能够独立繁殖的最小无壁细菌组成<sup>[16]</sup>。在这些细菌中,支原体是最常被研究的一种单胞菌,被认为可导致多种疾病<sup>[17]</sup>,并且在动物胃中也发现了支原体的定植<sup>[18]</sup>。有研究发现,在食道癌患者中,支原体感染可促进肿瘤的迁移、侵袭和远处转移<sup>[19]</sup>,同时,对胃癌和结肠直肠癌等其他疾病的研究也观察到类似现象<sup>[20]</sup>。此外,属于支原体目(*Mycoplasmatales*)的支原体和肝支原体可协助分解难分解的碳源<sup>[21]</sup>,从而可能产生过氧化氢等毒力因子<sup>[22]</sup>,过氧化氢会破坏胃屏障功能<sup>[23]</sup>,过多的过氧化氢也会增加血小板活化因子和前列腺素E2水平,从而降低LES张力<sup>[24]</sup>。

理研菌科属于拟杆菌门<sup>[25]</sup>。它被认为是导致小鼠患系统性红斑狼疮<sup>[26]</sup>和人类患结肠癌<sup>[27]</sup>的危险因素。在瘦素抵抗诱发肥胖或糖尿病的小鼠肠道中<sup>[28]</sup>,以及在以高脂肪饮食喂养的小鼠肠道中<sup>[29]</sup>,理研菌科家族的丰度显著增加,这表明理研菌科家族与代谢紊乱如肥胖和糖尿病有关。还有研究表明血糖水平升高超过正常范围会减缓固体和液体的胃排空,并降低LES的基础压力<sup>[30]</sup>。此外,有研究还发现,理研菌科的相对丰富度与焦虑和

抑郁的严重程度呈正相关<sup>[31]</sup>,焦虑可能会间接影响内脏敏感性,从而导致胃肠道不适<sup>[32]</sup>,还有研究指出,胃食管反流病的发病机制之一涉及内脏敏感性的变化<sup>[33]</sup>。根据上述研究结果,可推测理研菌科通过调节新陈代谢或情绪在促进胃食管反流病的发生中发挥作用。

普雷沃氏菌属广泛存在于人体的各个部位,在维持健康与疾病之间的平衡方面发挥着重要作用<sup>[34]</sup>。粘膜部位普雷沃氏菌数量的增加与局部和全身炎症相关疾病的发生有关,包括类风湿性关节炎、牙周炎和代谢紊<sup>[35]</sup>。产黑色素普雷沃氏菌(*Prevotella Melaninogenica*)是最近发现的普雷沃特氏菌属中的一个物种,具有产生脂多糖(LPS)的独特能力<sup>[36]</sup>。据报道,用LPS喂养的小鼠LES张力降低,胃排空明显延迟<sup>[37,38]</sup>。此外,巴雷特食管患者的食管微生物多样性减少,而革兰氏阴性菌(如普雷沃氏菌和幽门螺杆菌)可能是该病的发病机制之一<sup>[39]</sup>。有关孟德尔分析显示,普雷沃特氏菌属9的丰度与PD-1的表达呈正相关<sup>[40]</sup>。我们知道,在胃食管反流病、消化性溃疡病、胃炎和十二指肠炎等胃肠道疾病中,都有PD-1的表达明显上调<sup>[41]</sup>。

除了以上的危险因素,幸运的是,研究结果还表明,双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)、双歧杆菌目(*Bifidobacteriales*)、克里斯滕森菌科(*Christensenellaceae*)和臭杆菌属(*Odoribacter*)可能是胃食管反流病的保护因子。克里斯滕森菌科<sup>[42]</sup>是最近真菌门中发现的一个科。研究发现,在中国<sup>[43]</sup>、韩国<sup>[44]</sup>和意大利<sup>[45]</sup>的百岁老人中,克里斯滕森菌科的丰度高于年轻人,此外,还有人发现这些有益细菌具有遗传效应<sup>[46]</sup>。在与炎症有关的疾病中,如炎症性肠病<sup>[47]</sup>和多发性硬化症<sup>[48]</sup>,与健康人相比,这些患者体内克里斯滕森菌的数量显著减少。因此,克里斯滕森菌科被认为是肠道健康的标志。此外,研究表明,克里斯滕森菌科与中心型肥胖<sup>[49]</sup>和甘油三酯水平升高<sup>[50]</sup>呈负相关。已知肥胖和甘油三酯水平升高是胃食管反流病的已知风险因素<sup>[51,52]</sup>。考虑到这些发现,研究结果再次证明了克里斯滕森菌科作为一种益生菌对胃食管反流病的保护作用。

臭杆菌属由厌氧、革兰氏阴性、杆状细菌组成,属于类杆菌目<sup>[53]</sup>。在一项关于溃疡性结肠炎的研究中,厚壳贻贝多糖抑制了NF- $\kappa$ B信号通路的激活,并发挥了抗炎作用,此外,研究还发现肠道中有益的臭杆菌属菌种数量有所增加<sup>[54]</sup>。上述研究的不足之处在于没有讨论臭杆菌与NF- $\kappa$ B之间的关系。不过,有研究发现,臭杆菌属能刺激免疫细胞产生IL-10(又称人类细胞因子合成抑制因子),从而表明其具有抗炎活性<sup>[55]</sup>。在臭杆菌属

中, 内脏臭杆菌 (*Odoribacter splanchnicus*) 能诱导肠道 Th17 细胞的发育, 对结肠炎和结肠直肠癌有保护作用<sup>[56]</sup>。黑臭杆菌 (*Odoribacter laneus*) 是一种很有前景的益生菌, 有研究发现其可改善葡萄糖耐量和炎症反应<sup>[57]</sup>。此外, 大量研究表明, IL-4、TNF- $\alpha$  和 IL-10 等炎症标志物与胃食管反流病之间存在相关性<sup>[58-60]</sup>。炎症标志物水平的变化可能与肠道微生物群失调导致的全身炎症状态升高有关, 从而影响胃食管反流病的发生和发展。这些研究结果表明, 臭杆菌属通过调节粘膜免疫对胃食管反流病的发生和发展具有保护作用。

研究表明, 双歧杆菌科和双歧杆菌目细菌的存在与胃食管反流病风险的降低有关。双歧杆菌是双歧杆菌科中的一个属, 被广泛认为是一种益生菌<sup>[61]</sup>。这些细菌天然大量存在于结肠中, 分别占成人和婴儿粪便中可存活细菌的 25% 和 80%<sup>[62]</sup>。益生菌菌株, 包括乳酸杆菌和双歧杆菌, 在维护粘膜屏障的完整性方面发挥着积极作用<sup>[63]</sup>。有小鼠研究发现, 双歧杆菌可在食管近端黏膜定植<sup>[64]</sup>。此外, 在胃溃疡患者中, 双歧杆菌还能发挥保护作用, 诱导宿主修复机制<sup>[65]</sup>。并且, 在患有功能性便秘的成年人中, 肠道中双歧杆菌的数量明显减少<sup>[66]</sup>。还有研究发现, 使用双歧杆菌和其他益生菌治疗可改善胃肠道蠕动<sup>[67]</sup>。还有人提出, 在婴儿配方奶粉中添加双歧杆菌可软化粪便, 缓解便秘问题<sup>[68]</sup>。除此之外, 有学者提出 Toll 样受体 2 (TLR2) 的激活与胃食管反流病密切相关<sup>[69]</sup>, 巧合的是, 双歧杆菌恰恰可以减少 TLR2 的表达<sup>[70]</sup>。综上所述, 这些研究结果表明, 双歧杆菌可通过多种机制抵消胃食管反流病的风险, 如增强粘膜屏障、改善胃肠道蠕动和发挥抗炎作用。

总的来说, 这种设计不仅避免了临床试验的昂贵和漫长的研究周期, 还避免了混杂偏差, 因为遗传变异先于疾病发展, 不受出生后生活方式和环境因素的影响。但后续应利用更大规模的胃食管反流病结局基因组研究和更广泛的观察性研究以及未来涉及欧洲白人后裔以外人群的研究, 开展更多的 TSMR 调查, 使结果更具有说服力。此外, 还应进一步实施临床实验进行验证。总而言之, 本研究全面提供了支持肠道微生物群与胃食管反流病之间密切关系的潜在证据, 并确定了参与分析的 8 种细菌。

## 5 结论

通过 TSMR, 我们确定了肠道微生物群与胃食管反流病之间的因果关系。其中, 4 类细菌: 双歧杆菌科 (*Bifidobacteriaceae*)、双歧杆菌目 (*Bifidobacteriales*)、克里斯滕森菌科

(*Christensenellaceae*) 和臭杆菌属 (*Odoribacter*) 与胃食管反流病的因果效应呈负相关, 可能是保护因素。其余 4 类细菌: 柔膜体纲 (*Mollicutes*)、软壁菌门 (*Tenericutes*)、理研菌科 (*Rikenellaceae*) 和普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 9 与胃食管反流病的因果效应呈正相关, 可能是风险因素。综上, 本研究为胃食管反流病的发病机理以及潜在的预防和治疗策略提供了一个开创性的遗传学视角。

## 参考文献

- [1] KATZKA D A, KAHRILAS P J. Advances in the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease[J]. *BMJ*, 2020,371: m3786.
- [2] MARET-OUDA J, MARKAR S R, LAGERGREN J. Gastroesophageal Reflux Disease: A Review[J]. *JAMA*, 2020,324(24): 2536-2547.
- [3] GRICE E A, SEGRE J A. The human microbiome: our second genome[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2012,13: 151-170.
- [4] SUGIHARTONO T, FAUZIA K A, MIFTAHUSSURUR M, et al. Analysis of gastric microbiota and *Helicobacter pylori* infection in gastroesophageal reflux disease[J]. *Gut Pathog*, 2022,14(1): 38.
- [5] Di PILATO V, FRESCHI G, RINGRESSI M N, et al. The esophageal microbiota in health and disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016,1381(1): 21-33.
- [6] van der VELDE K J, IMHANN F, CHARBON B, et al. MOLGENIS research: advanced bioinformatics data software for non-bioinformaticians[J]. *Bioinformatics*, 2019,35(6): 1076-1078.
- [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] PALMER T M, LAWLOR D A, HARBORD R M, et al. Using multiple genetic variants as instrumental variables for modifiable risk factors[J]. *Stat Methods Med Res*, 2012,21(3): 223-242.
- [9] 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.
- [10] BOWDEN J, DAVEY S 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.
- [11] GRECO M F, MINELLI C, SHEEHAN N A, et al. Detecting pleiotropy in Mendelian randomisation studies with summary data and a continuous outcome[J]. *Stat Med*, 2015,34(21): 2926-2940.
- [12] BOWDEN J, DEL G M F, MINELLI C, et al. Improving the accuracy of two-sample summary-data Mendelian randomization: moving beyond the NOME assumption[J]. *Int J Epidemiol*, 2019,48(3): 728-742.
- [13] HEMANI G, ZHENG J, ELSWORTH B, et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome[J]. *Elife*, 2018,7.
- [14] GUPTA R S, SAWNANI S, ADEOLU M, et al. Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order Mycoplasmoidales ord. nov., containing two new families Mycoplasmoidaceae fam. nov. and Metamycoplasmataceae fam. nov. harbouring Eperythrozoon, Ureaplasma and five novel genera[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018,111(9): 1583-1630.
- [15] ORELLANA E, DAVIES-SALA C, GUERRERO L D, et al. Microbiome network analysis of co-occurrence patterns in anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste[J]. *Water Sci Technol*, 2019,79(10): 1956-1965.
- [16] CHERNOVA O A, CHERNOV V M, MOUZYKANTOV A A, et al. Antimicrobial drug resistance mechanisms among Mollicutes[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2021,57(2): 106253.
- [17] BENEDETTI F, CURRELI S, ZELLA D. Mycoplasmas-Host Interaction: Mechanisms of Inflammation and Association with Cellular Transformation[J]. *Microorganisms*, 2020,8(9).
- [18] WANG Y, HUANG J M, WANG S L, et al. Genomic characterization of symbiotic mycoplasmas from the stomach of deep-sea isopod bathynomus sp[J]. *Environ Microbiol*, 2016,18(8): 2646-2659.
- [19] ZHANG Y, ZHANG H, SUN X, et al. Nucleic acid aptamer controls mycoplasma infection for inhibiting the malignancy of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Ther*, 2022,30(6): 2224-2241.
- [20] BONDE A, DALY S, KIRSTEN J, et al. Human Gut Microbiota-associated Gastrointestinal Malignancies: A Comprehensive Review[J]. *Radiographics*, 2021,41(4): 1103-1122.
- [21] HE L S, ZHANG P W, HUANG J M, et al. The Enigmatic Genome of an Obligate Ancient Spiroplasma Symbiont in a Hadal Holothurian[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018,84(1).
- [22] WANG Y, HUANG J M, ZHOU Y L, et al. Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli[J]. *BMC Genomics*, 2020,21(1): 408.
- [23] DUAN J L, YIN J, REN W K, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate restores gastric damages and suppressive autophagy induced by hydrogen peroxide[J]. *Free Radic Res*, 2015,49(2): 210-218.
- [24] CHENG L, HARNETT K M, CAO W, et al. Hydrogen peroxide reduces lower esophageal sphincter tone in human esophagitis[J]. *Gastroenterology*, 2005,129(5): 1675-1685.
- [25] SU X L, TIAN Q, ZHANG J, et al. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2014,64(Pt 9): 2986-2991.
- [26] WANG H, WANG G, BANERJEE N, et al. Aberrant Gut Microbiome Contributes to Intestinal Oxidative Stress, Barrier Dysfunction, Inflammation and Systemic Autoimmune Responses in MRL/lpr Mice[J]. *Front Immunol*, 2021,12: 651191.
- [27] HOANG T, KIM M J, PARK J W, et al. Nutrition-wide association study of microbiome diversity and composition in colorectal cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2022,22(1): 656.
- [28] GEURTS L, LAZAREVIC V, DERRIEN M, et al. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue[J]. *Front Microbiol*, 2011,2: 149.
- [29] KIM K A, GU W, LEE I A, et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2012,7(10): e47713.
- [30] WEI T, JIA Y, XUE W, et al. Nutritional Effects of the Enteral Nutritional Formula on Regulation of Gut



Microbiota and Metabolic Level in Type 2 Diabetes Mellitus Mice[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021,14: 1855-1869.

[31] YANG J, ZHANG Z, XIE Z, et al. Metformin modulates microbiota-derived inosine and ameliorates methamphetamine-induced anxiety and depression-like withdrawal symptoms in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022,149: 112837.

[32] ZVOLENSKY M, JARDIN C, FARRIS S G, et al. Gut interpretations: how difficulties in emotion regulation may help explain the relation of visceral sensitivity with depression and anxiety among young adults with gastrointestinal symptoms[J]. *Psychol Health Med*, 2018,23(7): 840-845.

[33] TACK J, PANDOLFINO J E. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease[J]. *Gastroenterology*, 2018,154(2): 277-288.

[34] TETT A, PASOLLI E, MASETTI G, et al. Prevotella diversity, niches and interactions with the human host[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021,19(9): 585-599.

[35] LARSEN J M. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease[J]. *Immunology*, 2017,151(4): 363-374.

[36] WANG S, KUANG J, ZHANG H, et al. Bile Acid-Microbiome Interaction Promotes Gastric Carcinogenesis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022,9(16): e2200263.

[37] FAN Y P, CHAKDER S, GAO F, et al. Inducible and neuronal nitric oxide synthase involvement in lipopolysaccharide-induced sphincteric dysfunction[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001,280(1): G32-G42.

[38] CALATAYUD S, GARCIA-ZARAGOZA E, HERNANDEZ C, et al. Downregulation of nNOS and synthesis of PGs associated with endotoxin-induced delay in gastric emptying[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002,283(6): G1360-G1367.

[39] LV J, GUO L, LIU J J, et al. Alteration of the esophageal microbiota in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2019,25(18): 2149-2161.

[40] HUANG Y F, ZHANG W M, WEI Z S, et al. Causal relationships between gut microbiota and programmed cell death protein 1/programmed cell death-ligand 1: A bidirectional Mendelian randomization study[J]. *Front Immunol*, 2023,14: 1136169.

[41] ADEWUYI E O, O'BRIEN E K, NYHOLT D R, et al. A large-scale genome-wide cross-trait analysis reveals shared genetic architecture between Alzheimer's disease and gastrointestinal tract disorders[J]. *Commun Biol*, 2022,5(1): 691.

[42] MOROTOMI M, NAGAI F, WATANABE Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012,62(Pt 1): 144-149.

[43] KONG F, HUA Y, ZENG B, et al. Gut microbiota signatures of longevity[J]. *Curr Biol*, 2016,26(18): R832-R833.

[44] KIM B S, CHOI C W, SHIN H, et al. Comparison of the Gut Microbiota of Centenarians in Longevity Villages of South Korea with Those of Other Age Groups[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019,29(3): 429-440.

[45] BIAGI E, FRANCESCHI C, RAMPPELLI S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity[J]. *Curr Biol*, 2016,26(11): 1480-1485.

[46] GOODRICH J K, WATERS J L, POOLE A C, et al. Human genetics shape the gut microbiome[J]. *Cell*, 2014,159(4): 789-799.

[47] KENNEDY N A, LAMB C A, BERRY S H, et al. The Impact of NOD2 Variants on Fecal Microbiota in Crohn's Disease and Controls Without Gastrointestinal Disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018,24(3): 583-592.

[48] WIESEL P H, NORTON C, GLICKMAN S, et al. Pathophysiology and management of bowel dysfunction in multiple sclerosis[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001,13(4): 441-448.

[49] LIM M Y, YOU H J, YOON H S, et al. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome[J]. *Gut*, 2017,66(6): 1031-1038.

[50] FU J, BONDER M J, CENIT M C, et al. The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids[J]. *Circ Res*, 2015,117(9): 817-824.

[51] ALIMY Y, AZAGURY D E. Gastroesophageal Reflux Disease and the Patient with Obesity[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2021,50(4): 859-870.

[52] NOMURA M, TASHIRO N, WATANABE T, et al. Association of symptoms of gastroesophageal reflux with

metabolic syndrome parameters in patients with endocrine disease[J]. *ISRN Gastroenterol*, 2014,2014: 863206.

[53] HIIPPALA K, BARRETO G, BURRELLO C, et al. Novel *Odoribacter splanchnicus* Strain and Its Outer Membrane Vesicles Exert Immunoregulatory Effects in vitro[J]. *Front Microbiol*, 2020,11: 575455.

[54] XIANG X W, WANG R, YAO L W, et al. Anti-Inflammatory Effects of *Mytilus coruscus* Polysaccharide on RAW264.7 Cells and DSS-Induced Colitis in Mice[J]. *Mar Drugs*, 2021,19(8).

[55] LIMA S F, GOGOKHIA L, VILADOMIU M, et al. Transferable Immunoglobulin A-Coated *Odoribacter splanchnicus* in Responders to Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis Limits Colonic Inflammation[J]. *Gastroenterology*, 2022,162(1): 166-178.

[56] XING C, WANG M, AJIBADE A A, et al. Microbiota regulate innate immune signaling and protective immunity against cancer[J]. *Cell Host Microbe*, 2021,29(6): 959-974.

[57] HUBER-RUANO I, CALVO E, MAYNERIS-PERXACHS J, et al. Orally administered *Odoribacter laneus* improves glucose control and inflammatory profile in obese mice by depleting circulating succinate[J]. *Microbiome*, 2022,10(1): 135.

[58] LI J, CHEN X L, SHAKER A, et al. Contribution of immunomodulators to gastroesophageal reflux disease and its complications: stromal cells, interleukin 4, and adiponectin[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016,1380(1): 183-194.

[59] CREMA E, MONTEIRO I O, GOMES M G, et al. Evaluation of cytokines (MIG, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy[J]. *Clin Immunol*, 2006,119(2): 213-218.

[60] ROTHENBERG M E. Scientific journey to the first FDA-approved drug for eosinophilic esophagitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2022,150(6): 1325-1332.

[61] HIDALGO-CANTABRANA C, DELGADO S, RUIZ L, et al. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects[J]. *Microbiol Spectr*, 2017,5(3).

[62] PICARD C, FIORAMONTI J, FRANCOIS A, et al. Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005,22(6): 495-512.

[63] LIU Q, YU Z, TIAN F, et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier[J]. *Microb Cell Fact*, 2020,19(1): 23.

[64] BRUSILOVSKY M, BAO R, ROCHMAN M, et al. Host-Microbiota Interactions in the Esophagus During Homeostasis and Allergic Inflammation[J]. *Gastroenterology*, 2022,162(2): 521-534.

[65] NAGAOKA M, HASHIMOTO S, WATANABE T, et al. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides[J]. *Biol Pharm Bull*, 1994,17(8): 1012-1017.

[66] CHASSARD C, DAPOIGNY M, SCOTT K P, et al. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012,35(7): 828-838.

[67] DIMIDI E, CHRISTODOULIDES S, SCOTT S M, et al. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation[J]. *Adv Nutr*, 2017,8(3): 484-494.

[68] VIVATVAKIN B, MAHAYOSNOND A, THEAMBOONLERS A, et al. Effect of a whey-predominant starter formula containing LCPUFAs and oligosaccharides (FOS/GOS) on gastrointestinal comfort in infants[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2010,19(4): 473-480.

[69] NORTUNEN M, VAKIPARTA N, PORVARI K, et al. Pathophysiology of reflux oesophagitis: role of Toll-like receptors 2 and 4 and Farnesoid X receptor[J]. *Virchows Arch*, 2021,479(2): 285-293.

[70] YANG X, GAO X C, LIU J, et al. Effect of EPEC endotoxin and bifidobacteria on intestinal barrier function through modulation of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in intestinal epithelial cell-18[J]. *World J Gastroenterol*, 2017,23(26): 4744-4751.