

# 戈登杆菌属丰度降低与肾结石风险增加相关：一项孟德尔随机化分析与动物实验研究

潘兴旭<sup>1</sup>, 张秉祺<sup>2</sup>, 张智华<sup>1,3</sup>, 曹秋实<sup>1,3</sup>

湖北中医药大学<sup>1</sup>基础医学院,<sup>2</sup>中医学院,湖北 武汉 430065;<sup>3</sup>湖北时珍实验室,湖北 武汉 430065

**摘要:**目的 通过孟德尔随机化和动物实验探讨肠道菌群和肾结石之间的因果关系。方法 基于MiBioGen联盟肠道菌群全基因组关联(GWAS)数据和IEU Open GWAS数据肾结石数据(ukb-b-8297),分别作为暴露因素和结局变量。主要采用逆方差加权法(IVW)进行分析,并辅以MR-Egger回归法、加权中位数法(WME)、加权模式法(WM)和简单众数法(SM),同时进行异质性、多效性和留一法敏感性分析。动物实验中,将12只雄性SD大鼠随机分为对照组和模型组,6只/组,通过1%乙二醇和2%氯化铵联合建立草酸钙肾结石模型,连续干预28 d后收集尿液、血液及肠道样本。检测肾功能以及肠道屏障相关指标,并结合组织学染色以及免疫组化评估肾脏与结肠的病理学变化。采用16S rRNA测序分析肠道菌群多样性以及丰度差异,并利用Wilcoxon秩和检验及LEfSe分析筛选差异菌属。结果 MR分析显示,毛螺杆菌科NK4A136 group(*Lachnospiraceae* NK4A136 group, OR=0.9974, 95% CI: 0.9948~0.9999, P=0.0393)、戈登杆菌属(*Gordonibacter*, OR=0.9987, 95% CI: 0.9974~0.9999, P=0.0403)丰度降低与肾结石风险增加相关,未发现异质性和水平多效性(P>0.05),敏感性分析提示结果稳健。动物实验中,模型组大鼠出现明显的肾功能损伤和草酸钙结晶沉积,肠道屏障相关蛋白表达水平下降(P<0.05),16S rRNA测序结果显示,模型组菌群 $\alpha$ 、 $\beta$ 多样性均低于对照组,戈登杆菌属丰度降低,LEfSe分析亦将其鉴定为差异菌属,而毛螺杆菌科NK4A136 group在两组间的差异无统计学意义。结论 MR分析和动物实验均提示戈登杆菌属丰度降低与肾结石风险增加相关;毛螺杆菌科NK4A136 group在MR分析中显示为肾结石发生的保护因素,但在动物实验中差异没有统计学意义,具体的机制仍需进一步验证。

**关键词:**肠道菌群;肾结石;孟德尔随机化;毛螺杆菌科NK4A136 group;戈登杆菌属

## Reduced intestinal abundance of *Gordonibacter* increases risk of kidney stones: a Mendelian randomization study and evidence from rat models

PAN Xingxu<sup>1</sup>, ZHANG Bingqi<sup>2</sup>, ZHANG Zhihua<sup>1,3</sup>, CAO Qiushi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, <sup>2</sup>School of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

<sup>3</sup>Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

**Abstract: Objective** To investigate the causal relationship between gut microbiota and kidney stones. **Methods** Mendelian randomization analysis was conducted based on data from the MiBioGen consortium gut microbiota GWAS (exposure factors) and the IEU Open GWAS kidney stone dataset ukb-b-8297 (outcome variables) using the inverse variance weighted, MR-Egger regression, weighted median, weighted mode, and simple mode methods. Heterogeneity, pleiotropy, and leave-one-out sensitivity analyses were also performed. In the animal experiment, 12 male SD rats were randomized into control group with saline treatment and kidney stone model group treated with 1% ethylene glycol and 2% ammonium chloride for 28 consecutive days. Urine, blood, and intestinal samples of the rats were collected for testing the changes in renal function and intestinal barrier-related indicators, and kidney and colon pathologies were examined with histological staining and immunohistochemistry. The changes in diversity and abundance of gut microbiota were analyzed using 16S rRNA gene sequencing. **Results** Mendelian randomization analysis showed that decreased abundances of *Lachnospiraceae* NK4A136 group (OR=0.9974, 95% CI: 0.9948-0.9999, P=0.0393) and *Gordonibacter* (OR=0.9987, 95% CI: 0.9974-0.9999, P=0.0403) were associated with an increased risk of kidney stones without significant heterogeneity or horizontal pleiotropy, and sensitivity analyses suggested robustness of the results. The rat models of kidney stones exhibited significant renal function impairment and calcium oxalate crystal deposition, accompanied by decreased expressions of intestinal barrier-related proteins with lowered intestinal  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity indices. Intestinal *Gordonibacter* abundance was significantly reduced in the rat models while the *Lachnospiraceae* NK4A136 group did not differ significantly between the control and model groups. **Conclusion** Decreased *Gordonibacter* abundance in gut microbiota is associated with an increased risk of kidney stones. The protective role of the *Lachnospiraceae* NK4A136 group against kidney stones as suggested by Mendelian randomization analysis fails to be supported by the experimental evidence and awaits further investigation.

**Keywords:** gut microbiota; kidney stones; Mendelian randomization; *Lachnospiraceae* NK4A136 group; *Gordonibacter*

收稿日期:2025-06-24

基金项目:国家自然科学基金青年项目(82305082);湖北省自然科学基金计划项目资助(2023AFB396);湖北省自然科学基金中医药创新发展联合基金(2024AFD265)

Supported by Natural Science Foundation for the Youth of China (82305082).

作者简介:潘兴旭,在读硕士研究生, E-mail: 17860358705@163.com

通信作者:张智华,教授,硕士生导师, E-mail: 1868@hbucom.edu.cn;

曹秋实,副教授,硕士生导师, E-mail: 2987@hbucom.edu.cn

肾结石在全球成年人中的患病率约为10%<sup>[1]</sup>,50%的患者经过临床治疗后会在5~10年复发<sup>[2]</sup>。肾结石的高复发率以及急性发作的典型症状(如肾绞痛和血尿),严重危害患者的身心健康。草酸钙肾结石占全部肾结石的70%~80%<sup>[3]</sup>,但其发病的病理生理机制尚未完全阐明。近年来,随着“肠-肾轴”概念的提出,肠道菌群与肾

结石之间的关系逐渐受到关注。肠道菌群可以通过草酸盐降解菌及其代谢产物(如短链脂肪酸)影响肾结石的形成和进展<sup>[4,5]</sup>。产甲酸草酸杆菌(*Oxalobacter formigenes*)作为专性草酸盐降解菌,既可以降解肠道草酸盐,又可以通过调节草酸盐转运体 SLC26A6 的表达<sup>[6]</sup>,促进草酸盐由血液分泌至肠腔,从而减少机体对草酸盐的吸收,在维持草酸盐稳态方面具有重要作用。然而关于产甲酸草酸杆菌降解草酸盐的研究结论并不完全一致,既往针对原发性高草酸尿症的临床试验显示,经产甲酸草酸杆菌治疗后,患者血浆草酸盐水平较安慰剂组虽有下降趋势,但差异均无统计学意义<sup>[7,8]</sup>。此外,由于该菌株仅依赖草酸作为能量来源,且在宿主体内的定植受到个体差异的影响,使得该菌株在宿主体内的定植稳定性面临较大挑战<sup>[9]</sup>。尽管部分研究已经揭示某些特定菌群与肾结石存在关联,但是存在样本量有限、因果关系不明等问题<sup>[10,11]</sup>,因此有必要进一步探索与肾结石发病关系更为密切的肠道菌群。

孟德尔随机化(MR)作为一种流行病学的统计学方法<sup>[12]</sup>,优势在于使用遗传变异(通常指单核苷酸多样性)来构建暴露因素的工具变量<sup>[13]</sup>,能够有效降低反向因果与混杂因素的影响,从而推断暴露与疾病之间的因果关系<sup>[14]</sup>。本研究基于 MiBioGen 和 IEU Open GWAS 数据库的全基因组关联研究(GWAS)数据,采用 MR 方法系统分析肠道菌群与肾结石的因果关联;结合动物实验与 16S rRNA 测序技术,进一步探讨肠道菌群和肾结石的关系,旨在为肾结石的预防和治疗提供新的理论依据和研究思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究设计

MR 总体设计(图 1)。为获得可靠的结果,MR 分析需满足 3 大假设:关联性假设—验证工具变量基因(SNPs)和暴露因素(肠道菌群)强相关;独立性假设—SNPs 与暴露因素外的混杂因素无关联;排他性假设—SNPs 不会直接影响结局变量(肾结石)。

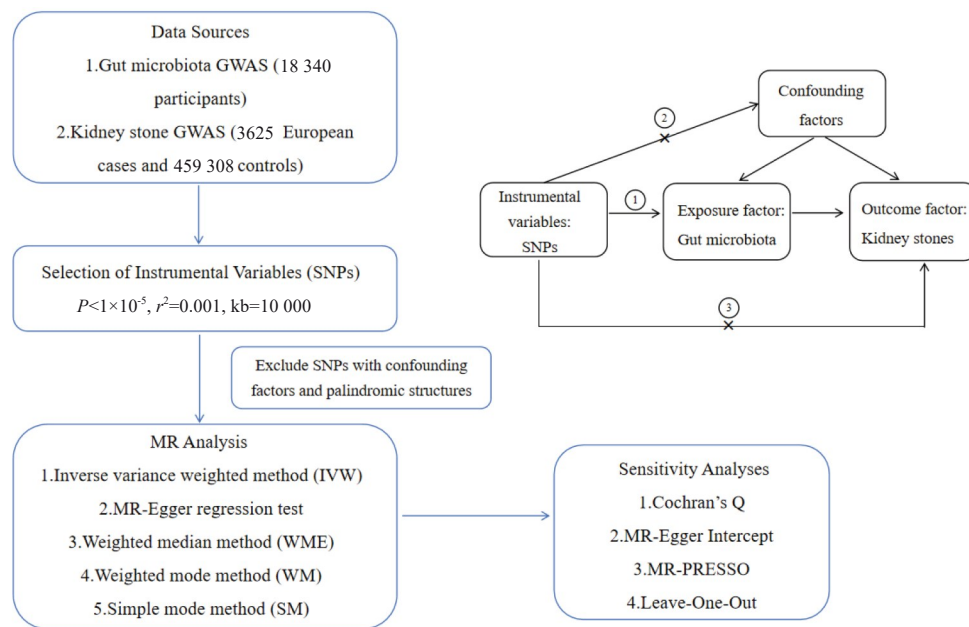


图 1 孟德尔随机化分析假设以及流程图

Fig.1 Hypotheses and flowchart of Mendelian randomization analysis.

### 1.2 资料来源

暴露因素数据来源于 MiBioGen 联盟的公共数据库(包括 18 340 个个体),结局变量肾结石数据来源于

IEU Open GWAS 数据库(包含 3625 例肾结石患者以及 459 308 例对照者,表 1)。

表 1 暴露因素和结局变量介绍

Tab.1 Exposure factors and outcome variables in Mendelian randomization analysis

Exposure and outcome	Sample size	Number of SNPs	Data source
Gut microbiota	S=18 340	122 110	<a href="https://mibiogen.gcc.rug.nl/menu/main/home/">https://mibiogen.gcc.rug.nl/menu/main/home/</a>
Kidney stones	N=462 933	9 851 867	<a href="https://gwas.mrcieu.ac.uk/">https://gwas.mrcieu.ac.uk/</a>

### 1.3 研究方法

1.3.1 工具变量的选择 工具变量选择需满足MR分析的3大假设。为提高数据准确性,从暴露因素中筛选 $P < 1 \times 10^{-5}$ 的SNPs作为工具变量。为确保SNP的独立遗传,设定连锁不平衡(LD)阈值(LD距离为10 000 kb,  $R^2 = 0.001$ )去除存在LD的SNPs<sup>[15]</sup>,并排除潜在混杂因素和回文结构的SNPs,仅保留属水平的肠道菌群相关SNPs。为减少弱工具变量偏倚,计算每个SNP的 $F$ 统计量,剔除 $F < 10$ 的弱工具变量。

1.3.2 MR分析 采用R4.3.0软件及“TwoSampleMR”包进行MR分析,采用逆方差加权法(IVW)、并结合MR-Egger回归法、加权中位数法(WME)、加权模式法(WM)以及简单众数法(SM)进行辅助分析<sup>[16]</sup>,IVW假设所有工具变量效应一致且无水平效应偏倚;MR-Egger回归法可在工具变量存在水平多效性偏倚时提供稳健估计;WME法在部分工具变量时仍可保持可靠性;WM法适用于工具变量效应不一致的情况;SM法适用于工具变量效应一致的情况。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.3.3 敏感性分析、异质性检验及基因水平多效性分析 采用留一法进行敏感性分析<sup>[17]</sup>。使用Cochran's Q统计量检验MR-Egger和IVW分析的异质性,以 $P < 0.05$ 表示存在异质性。采用MR-Egger法检测水平多效性, $P > 0.05$ 表示不存在多效性,使用MR-PRESSO全局和异常值检验<sup>[18]</sup>,进一步评估多效性对结果的影响。

### 1.4 动物实验

1.4.1 主要试剂与仪器 血清肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)浓度采用全自动生化分析仪检测。尿草酸(MM-70277R2,奥维森)和肾损伤分子-1(KIM-1, E-EL-R3019,武汉伊莱瑞特)采用酶联免疫吸附试剂盒检测,操作均严格按照说明书进行。

1.4.2 实验动物 实验动物为健康雄性SPF级SD大鼠12只,5~6周龄,体质量 $200 \pm 20$  g,购自湖北省实验动物研究中心(动物生产许可证号:42000600054193)。动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心,环境温度 $25 \pm 2$  °C,相对湿度 $50\% \pm 10\%$ ,明暗循环时间12 h/12 h,自由饮食饮水。本实验经湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:HUCMS00304830)。

1.4.3 动物实验分组及干预方法 将12只大鼠适应性饲养1周后,随机分为对照组(Control)和模型组(EN),各6只。模型组大鼠每日使用1%乙二醇自由饮水并灌胃2%氯化铵溶液,对照组灌胃0.9%生理盐水。实验持续28 d,每天记录饮食饮水以及体质量变化。28 d后,在无菌条件下采集大鼠盲肠粪便样本,用于后续分析。采用10%戊巴比妥钠麻醉,取腹主动脉血液,离心(3000 r/min, 4 °C, 15 min)后收集上清,存放在-80 °C冰箱中。取大鼠肾脏,使用4%多聚甲醛固定液固定,用于病理学检测。

1.4.4 组织病理检测 肾脏经生理盐水冲洗后置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h。石蜡包埋后进行苏木精-伊红(HE)染色及Von Kossa染色,并在共聚焦显微镜下观察。结肠组织切片经阿利新蓝(AB)染色评估肠道黏蛋白分泌情况。

1.4.5 免疫组化 取结肠组织的石蜡切片(4  $\mu$ m),经脱蜡水化,微波抗原修复及内源性过氧化物酶阻断后,分别加一抗SLC26A6(1:200, Abcam)、ZO-1(1:200, Abcam)、Occludin(1:200, Abcam),4 °C孵育过夜,次日滴加HRP标记的山羊抗兔二抗(1:2000, Abcam),37 °C孵育后使用DAB显色(DA1010,北京索莱宝)。经苏木素复染、酒精梯度脱水及二甲苯透明后封片,显微镜下观察蛋白表达,并用Case Viewer软件拍照。

1.4.6 DNA提取与16S rRNA测序 从各组大鼠的盲肠内容物中提取DNA,进行16S rRNA测序。 $\alpha$ 多样性采用Observed species指数评估丰富度,Shannon和Simpson评估多样性。 $\beta$ 多样性分析包括主成分分析(PCA)、主坐标分析(PCoA)和非度量多维缩放(NMDS)。采用LEfSe分析以识别组间差异有统计学意义的微生物类群,LDA得分 $> 2.0$ 的物种定义为差异性菌群<sup>[19]</sup>。

1.4.7 统计学分析 采用SPSS 25.0和GraphPad Prism10.1.2软件进行统计学分析。符合正态分布且方差齐性的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验;符合正态分布但方差不齐的数据亦以均数 $\pm$ 标准差表示,采用校正 $t$ 检验(Welch's  $t$ 检验);不符合正态分布的数据用中位数(四分位间距)表示,组间比较采用非参数Mann-Whitney  $U$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肠道菌群和肾结石之间的关系

2.1.1 工具变量的选择 以毛螺杆菌科NK4A136 group为暴露因素时,共筛选出8个SNP作为工具变量,以戈登杆菌属为暴露因素时,共筛选出7个SNP。上述SNP均已排除潜藏的离群值、混杂因素及回文结构的影响,并通过MR-PRESSO检验。弱工具变量检验结果显示,所有纳入的SNP的 $F$ 值均 $> 10$ (表2)。

2.1.2 MR分析的主要结果 IVW分析显示,毛螺杆菌科NK4A136 group( $OR = 0.9974$ , 95%  $CI: 0.9948 \sim 0.9999$ ,  $P = 0.0393$ )和戈登杆菌属( $OR = 0.9987$ , 95%  $CI: 0.9974 \sim 0.9999$ ,  $P = 0.0403$ )与肾结石风险呈负相关(表3)。除IVW方法外,其余方法检测未检出显著结果,但在各方法中Beta值方向一致(表3、图2)。

2.1.3 异质性和多效性 Cochran's Q检验显示,毛螺杆菌科NK4A136 group和戈登杆菌属在IVW和MR-Egger方法中均无异质性( $P > 0.05$ ),MR-Egger截距检验及MR-PRESSO全局分析均未发现水平多效性

表2 与肾结石相关的菌属的SNPs特征

Tab.2 SNP characteristics of bacterial genera associated with kidney stones

Gut microbiota and SNPs	EA	OA	Beta	P	R <sup>2</sup>	F
<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group						
rs10952110	G	T	0.05	9.08×10 <sup>-6</sup>	0.001179	19.794033
rs11263806	A	G	-0.05	5.07×10 <sup>-6</sup>	0.001169	20.186367
rs12611395	A	G	-0.09	5.83×10 <sup>-6</sup>	0.001238	20.432599
rs160061	A	G	0.05	2.12×10 <sup>-6</sup>	0.001309	22.593643
rs28540839	A	C	0.05	9.34×10 <sup>-6</sup>	0.001258	21.121397
rs2880566	T	C	0.06	5.61×10 <sup>-6</sup>	0.001149	19.813151
rs68104925	T	C	-0.06	2.37×10 <sup>-6</sup>	0.001313	22.644336
rs954878	A	G	-0.05	1.78×10 <sup>-6</sup>	0.001321	22.779485
<i>Gordonibacter</i>						
rs13412653	A	C	0.11	8.61×10 <sup>-6</sup>	0.005404	20.218430
rs322296	G	A	0.18	4.02×10 <sup>-6</sup>	0.006203	22.426840
rs35042269	C	A	-0.18	8.11×10 <sup>-6</sup>	0.005528	19.974041
rs4596722	A	G	0.10	9.06×10 <sup>-6</sup>	0.005276	19.737801
rs71545975	A	G	-0.15	7.04×10 <sup>-6</sup>	0.005771	20.627711
rs7294633	C	T	0.13	3.44×10 <sup>-7</sup>	0.007068	26.486697
rs768830	G	A	0.15	7.76×10 <sup>-6</sup>	0.005398	20.201590

EA: Effect allele; OA: Other allele.

表3 剔除回文和混杂因素之后的MR分析的主要结果

Tab.3 Main results of Mendelian randomization analysis after excluding palindromic and confounding factors

Gut microbiota and methods	Number of SNPs	Beta	P	OR (95% CI)
<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group				
MR-Egger	8	-0.0124	0.1751	0.9877 (0.9723, 1.0034)
WME	8	-0.0017	0.3190	0.9983 (0.9950, 1.0016)
IVW	8	-0.0026	0.0393	0.9974 (0.9948, 0.9999)
SM	8	-0.0003	0.9142	0.9997 (0.9944, 1.0051)
WM	8	-0.0003	0.9148	0.9997 (0.9943, 1.0051)
<i>Gordonibacter</i>				
MR-Egger	7	-0.0012	0.7112	0.9988 (0.9926, 1.0050)
WME	7	-0.0013	0.1220	0.9987 (0.9970, 1.0004)
IVW	7	-0.0013	0.0403	0.9987 (0.9974, 0.9999)
SM	7	-0.0014	0.2828	0.9986 (0.9963, 1.0009)
WM	7	-0.0014	0.3155	0.9986 (0.9960, 1.0011)

( $P > 0.05$ , 表4)。

2.1.4 留一法敏感性分析 留一法敏感性检验未发现对结局效应具有显著影响的单一工具变量,各工具变量的效应值与总效应值大小基本接近,未见明显偏离。散点图未发现工具变量中存在异常值出现(图3)。

## 2.2 结石模型的建立及肠道菌群变化

2.2.1 肾脏功能变化 与对照组相比,模型组大鼠尿酸含量水平升高( $P < 0.01$ ,图4A),Scr、BUN和KIM-1水平升高( $P < 0.01$ ,图4B~D)。

2.2.2 组织病理学变化 HE染色结果显示模型组肾脏组织结构受损,肾小管出现不同程度的肿胀和扩张及上皮坏死,管腔内可见大量淡黄色结晶沉积(图5A)。Von Kossa染色显示模型组肾组织内大量黑褐色晶体沉积(图5B)。阿利新蓝染色结果提示,模型组结肠绒毛杯状细胞数量减少,黏蛋白面积及肌层厚度减少(图5C、G)。免疫组化结果显示,模型组结肠组织Occludin、ZO-1以及SLC26A6表达均降低(图5D~F),吸光度定量分析进一步支持了上述结果( $P < 0.05$ ,图5H~J)。

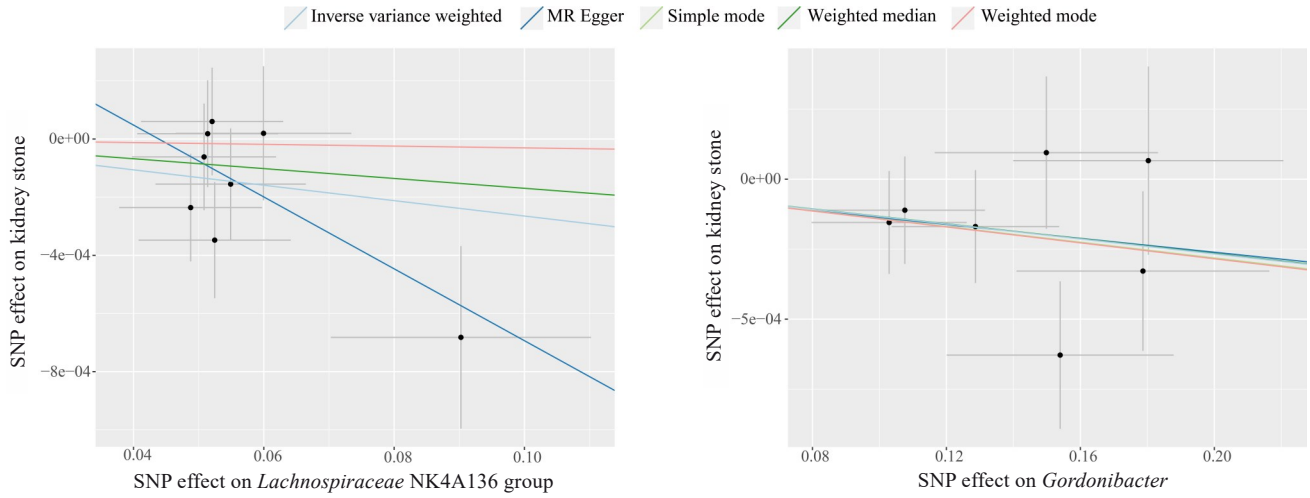


图2 孟德尔随机化分析散点图  
Fig.2 Mendelian randomization analysis scatter plot.

表4 敏感性分析

Tab.4 Sensitivity analysis

Exposure factor	Cochran's Q heterogeneity test			Genetic pleiotropy		MR-PRESSO
	Methods	Q	P	MR-Egger intercept	P	P
<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group	IVW	6.031	0.536	$5.40 \times 10^{-4}$	0.267	0.543
	MR-Egger	4.533	0.605			
<i>Gordonibacter</i>	IVW	4.719	0.580	$-1.32 \times 10^{-5}$	0.976	0.594
	MR-Egger	4.718	0.451			

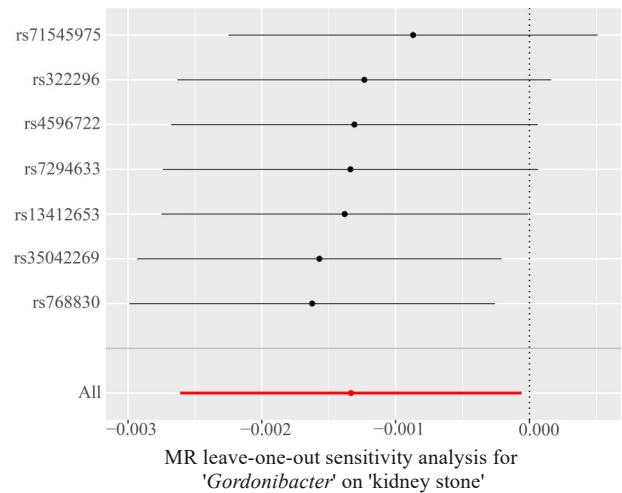
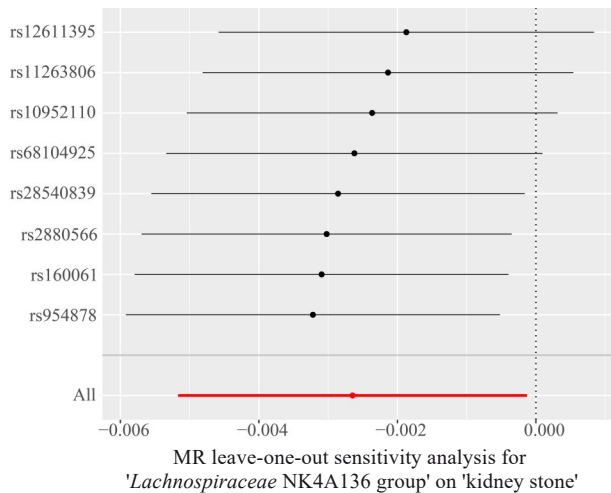


图3 留一法分析结果  
Fig.3 Leave-one-out method analysis results.

2.2.3 16S rRNA 测序 测序结果显示,模型组 Observed species、Shannon 与 Simpson 指数均低于对照组 ( $P < 0.05$ ,图 6A);PCA 和 PCoA 以及 NMDS 分析显示两组间存在相对独立类聚(图 6B)。在属水平上筛选出前 20 个差异菌属,戈登杆菌在两组间的丰度存在差异,但毛螺杆菌科 NK4A136 group 未作为差异菌属出现。

属水平的组间热图分析显示,模型组肠道菌群变化主要涉及乳杆菌属(*g\_Lactobacillus*)、瘤胃球菌科\_UCG-014 (*g\_Clostridia\_UCG - 014*)、双歧杆菌属 (*g\_Bifidobacterium*)、罗氏菌属(*g\_Romboutsia*)等有益菌及脱硫弧菌属(*g\_Desulfovibrio*)、肠球菌属 (*g\_Enterococcus*)等有害菌(图 6C~E)。

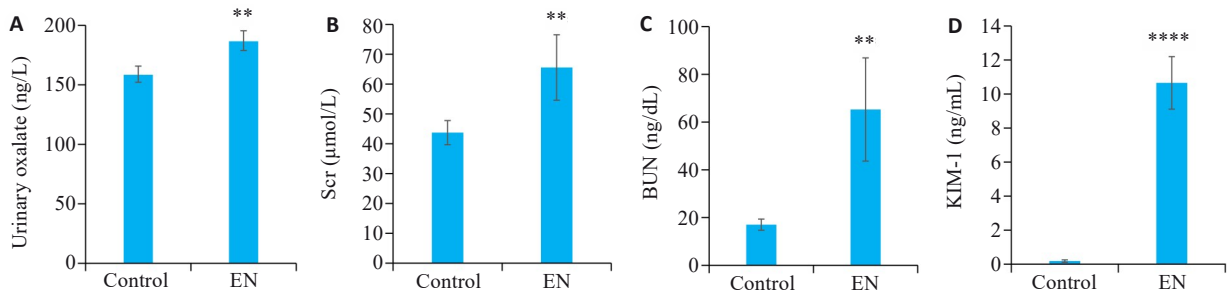


图4 草酸钙肾结石大鼠代谢和肾脏相关指标变化

Fig.4 Changes in metabolism and renal-related indicators in the rat models of calcium oxalate kidney stone. A: Urinary oxalate. B: Serum creatinine. C: Blood urea nitrogen. D: Kidney injury molecule-1 (KIM-1). (Mean±SD, n=6). \*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.0001 vs control group. EN: Model group.

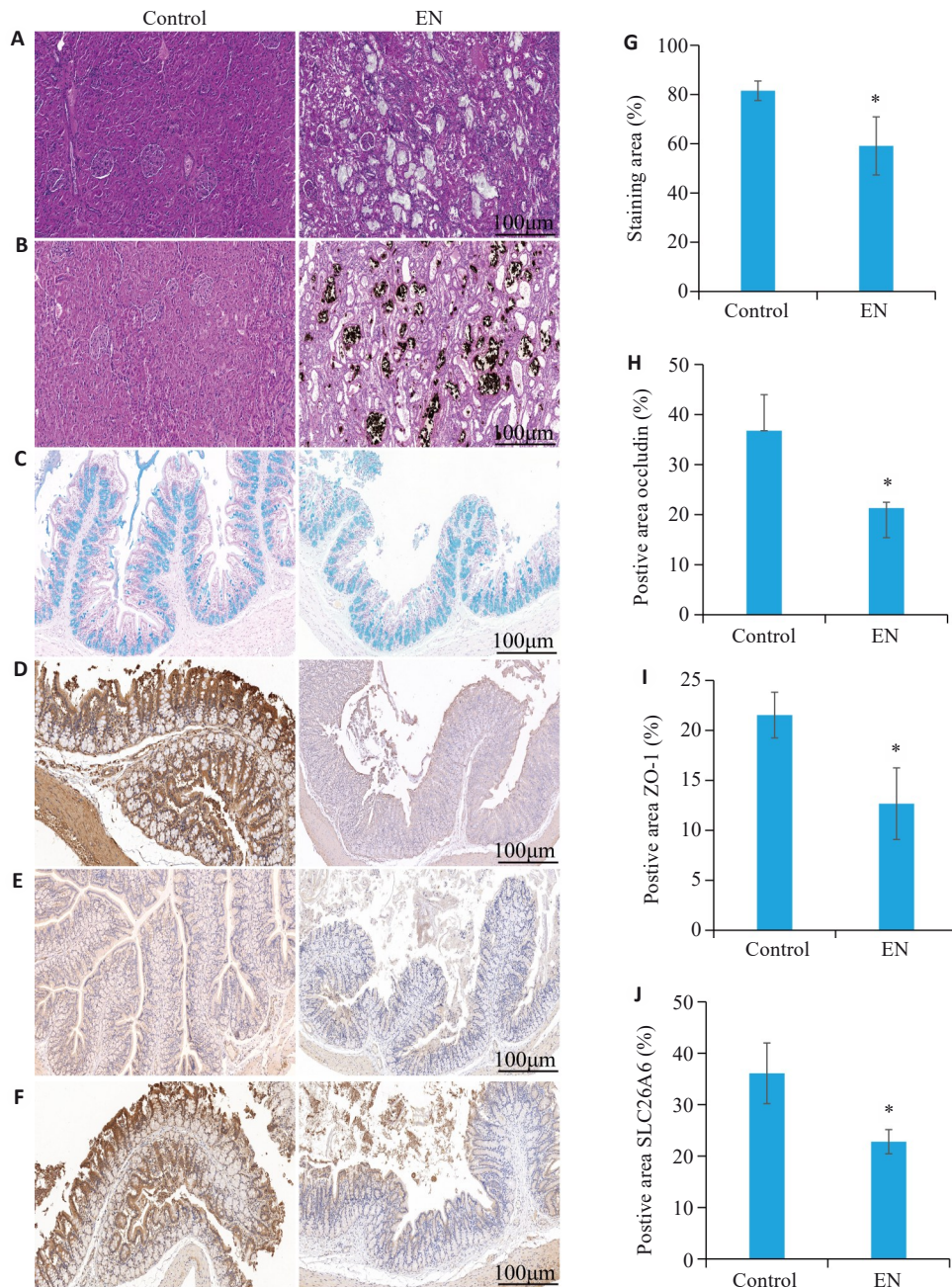


图5 乙二醇联合氯化铵造模对肾脏和肠道组织形态的影响

Fig.5 Changes in renal and intestinal tissue morphology in the rat modes of calcium oxalate kidney stone. A: HE staining. B: Von Kossa staining. C: Alcian blue staining of the intestine (scale bar=100 μm). D-F: Immunohistochemical staining showing changes in Occludin, ZO-1, and the oxalate transporter SLC26A6 in the intestine. G: Quantitative analysis of mucin by Alcian blue staining. H-J: Optical density (OD) values of Occludin, ZO-1, and SLC26A6 (Mean±SD, n=3). \*P<0.05 vs control group.

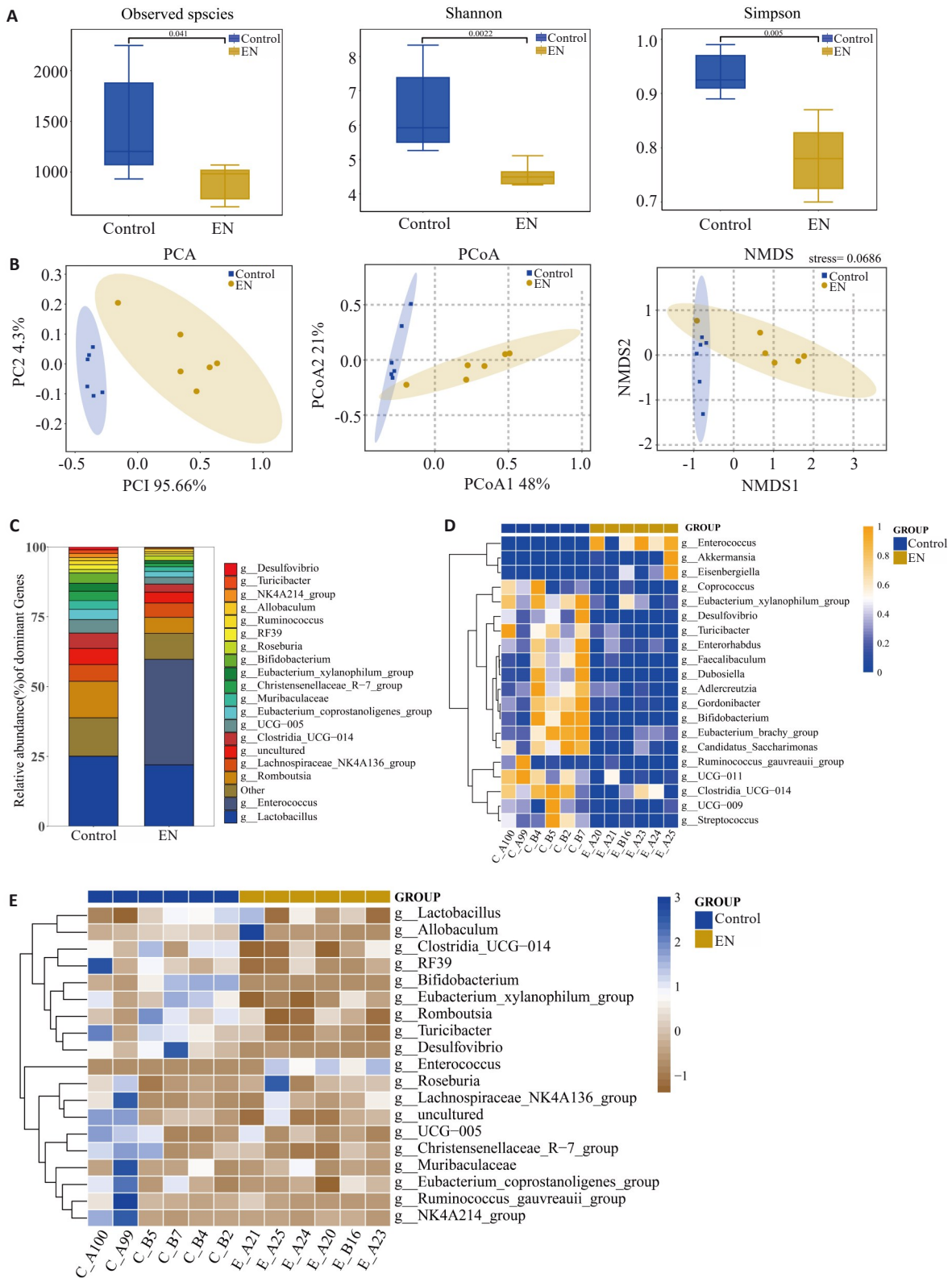


图6 草酸钙肾结石模型下肠道微生物组成发生改变

Fig.6 Changes in the composition of gut microbiota in the rat modes of calcium oxalate kidney stones. **A:**  $\alpha$ -diversity assessed using Observed species, Shannon, and Simpson indices. **B:**  $\beta$ -diversity evaluated by PCA, PCoA, and NMDS analyses. **C:** Bar chart of bacterial community composition at the genus level. **D:** Heatmap of the differential genera identified by Wilcoxon rank-sum test. **E:** Heatmap analysis of the control and model groups at the genus level further illustrates that the relative abundance of bacterial taxa is positively correlated with color intensity.

线性判别分析效应大小(LEfSe)进一步识别了不同组的主要优势细菌。结果显示,戈登杆菌在对照组与

模型组间丰度差异显著(LDA>2,图7A),其样本组间差异(图7B)。

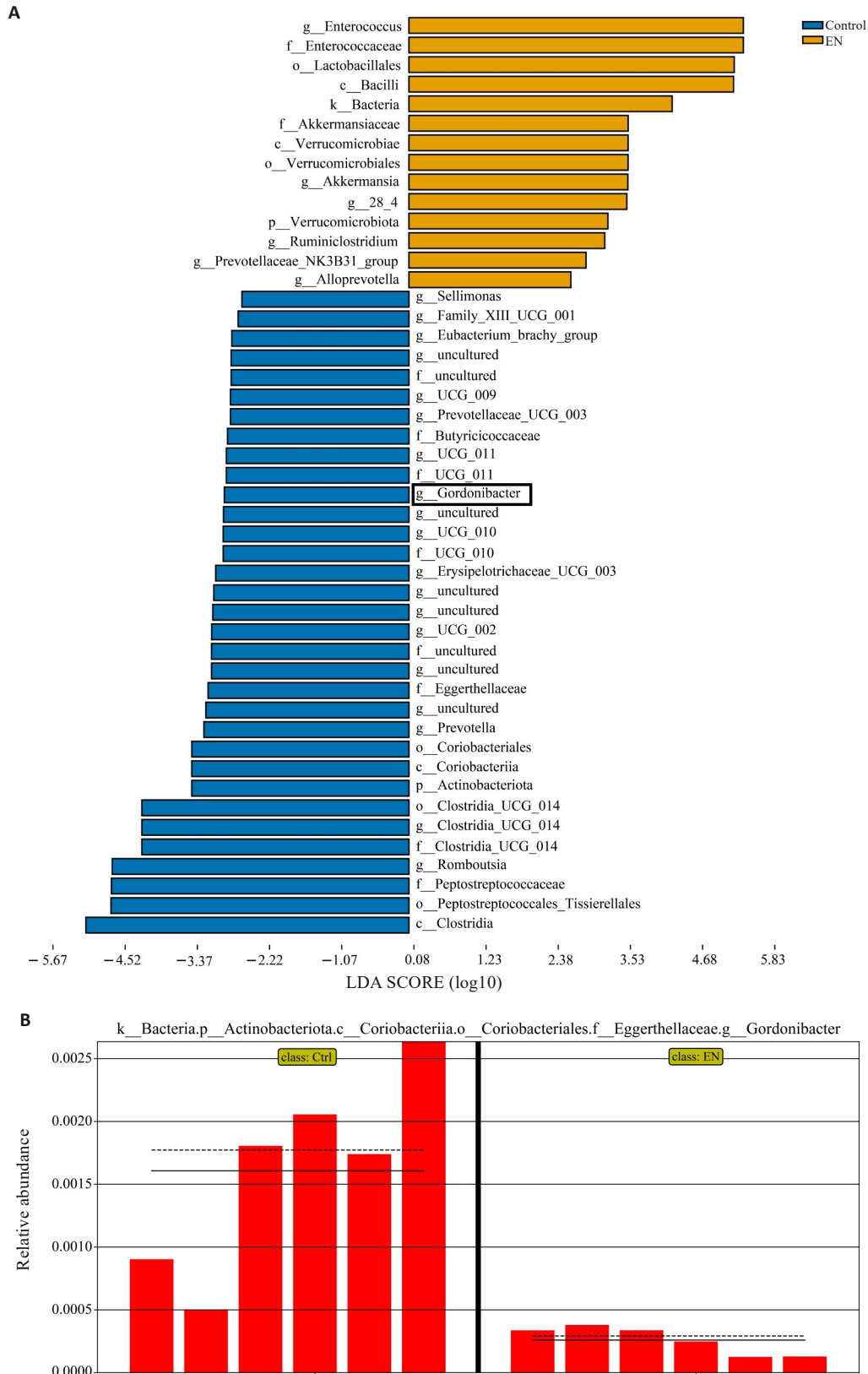


图7 LefSe分析

Fig.7 LefSe analysis. A: Bar chart showing the major differential taxa between the control and model groups identified by LefSe analysis. B: Bar chart of intergroup differences in *Gordonibacter* (the solid line represents the mean, and the dashed line represents the median).

### 3 讨论

MR 分析应用遗传变异作为工具变量并整合 GWAS 汇总数据,可有效减少混杂因素的影响,常用于

推断暴露因素与结局之间的因果关系<sup>[13]</sup>,为研究特定菌群和肾结石之间的关系提供了指导。本研究通过两样本 MR 分析发现,毛螺杆菌科 NK4A136 group 与戈登杆

菌属可能为肾结石发生的保护因素。本研究共筛选出8个与毛螺杆菌科NK4A136 group、7个与戈登杆菌属显著相关的SNPs,这些SNPs在MR各分析方法中均呈现一致的效应方向,且 $F$ 统计量均 $>10$ ,表明不存在弱工具变量的偏倚<sup>[20]</sup>。然而,在采用多种分析方法中,仅IVW方法结果达到显著差异,其他分析方式(如MR-Egger、WME和WM/SM)均未达到显著性,其具体的原因可能与不同方法的假设条件和统计效力差异有关。MR-Egger作为一种改进的MR分析方法,在对于工具变量存在水平多效性时具有显著的统计学优势,但是统计效力受到工具变量数目的影响<sup>[21]</sup>;而WME和WM/SM在部分工具变量无效的情况下可提供稳健评估,但是其显著性同样与有效SNP数量及加权集中度密切相关<sup>[22,23]</sup>。因此,虽然本研究中工具变量的质量和方向一致性均得到验证,但是受限于可用SNP数量,在解读不同的方法时仍需谨慎。

为进一步验证肾结石模型中的菌群变化情况,研究采用乙二醇联合氯化铵诱导建立大鼠草酸钙肾结石模型<sup>[24]</sup>。HE染色显示肾小管管腔中可见大量的淡黄色结晶沉积,Von Kossa染色可见黑褐色结晶,表明结石模型构建成功。16S rRNA测序结果显示,与对照组相比,结石模型组的 $\alpha$ 和 $\beta$ 多样性均降低,提示菌群结构和丰富度发生明显改变。进一步分析发现,多个短链脂肪酸产生菌属的丰度降低,如乳杆菌属<sup>[25]</sup>、瘤胃球菌科\_UCG-014<sup>[26]</sup>、双歧杆菌属以及罗氏菌属<sup>[27,28]</sup>。短链脂肪产生菌属的减少可能导致肠道内短链脂肪酸水平的下降,进而影响草酸盐转运和肾脏草酸钙晶体沉积,破坏肠-肾轴平衡,增加肾结石形成风险<sup>[29]</sup>。Wilcoxon秩和检验和LEfSe分析均提示戈登杆菌属在组间存在差异,戈登杆菌属能够代谢多酚类物质生成尿石素A<sup>[30]</sup>,尿石素A可以通过抑制炎症反应、增加黏液层厚度以及短链脂肪酸生成,显著增强肠道屏障功能<sup>[31-33]</sup>,其在模型组中的丰度降低提示该菌可能通过肠-肾轴机制影响肾结石形成。相比之下,毛螺杆菌科NK4A136 group虽然在两组之间均有检出,但其丰度差异无统计学意义。作为重要的丁酸盐产生菌,毛螺菌科NK4A136 group对维持肠道屏障完整性和调节肠道通透性具有关键作用<sup>[34,35]</sup>。丁酸盐作为主要的短链脂肪酸之一,可以增强上皮完整性、抑制炎症以及调控肠道草酸盐的转运<sup>[36]</sup>。因此,毛螺菌科NK4A136 group可能通过影响短链脂肪酸的产生(如丁酸盐),维持肠道稳态,从而减少草酸盐的肠道吸收,在肾结石形成过程中发挥保护作用。本研究未检出差异有统计学意义,可能与样本量(每组 $n=6$ )有限导致低丰度菌属统计效力不足有关。其次,乙二醇和氯化铵诱导的草酸钙肾结石模型可能引发了广泛的肠道菌群紊乱<sup>[4]</sup>,使得其他显著变化的菌属如与尿路感染相关的肠

球菌属以及短链脂肪酸产生菌属粪球菌属(*Coprococcus*)在统计上掩盖了毛螺杆菌科NK4A136 group的差异<sup>[37,38]</sup>。值得注意的是,虽然毛螺杆菌科NK4A136 group组间差异并无统计学意义,但该菌属在对照组与模型组之间仍呈现一定的变化趋势,且在MR分析中显示显著的保护效应,推测毛螺杆菌科NK4A136 group与肾结石的关联可能并非在菌群丰度单一层面体现,可能通过代谢物功能而非丰度变化发挥作用,其具体的作用机制仍需有待通过宏基因组和代谢组学等技术进一步验证。

肠道屏障完整性的破坏是草酸钙肾结石发生和发展的重要环节<sup>[39]</sup>,而这一屏障功能的维持依赖于紧密连接蛋白(如ZO-1、Occludin等)的正常表达和调控<sup>[40]</sup>。ZO-1和Occludin是肠道上皮细胞紧密连接的核心蛋白,不仅提供结构支持,还参与信号传导,调节紧密连接的开闭状态,从而维持上皮屏障的完整性与通透性平衡<sup>[41]</sup>。本研究免疫组化结果显示,Occludin、ZO-1阳性表达降低,提示肠道屏障完整性受损。肠道屏障完整性对限制有害物质渗透和调节草酸等小分子转运具有关键作用。SLC26A6作为肠道草酸外排的关键转运体,其功能异常可导致肠道草酸吸收增加和尿草酸浓度升高,从而促进草酸钙结晶的形成和沉积<sup>[42]</sup>。本研究结果显示,模型组中SLC26A6蛋白表达降低,提示肠道草酸的外排功能受损,这可能导致草酸盐在肠腔内过度吸收<sup>[43]</sup>,增加尿草酸水平和结石形成的风险。

综合菌群测序以及免疫组化的结果可以推测,毛螺杆菌科NK4A136 group和戈登杆菌属等具有维持肠道屏障完整性的菌属,在肾结石模型中丰度降低,可能通过减少短链脂肪酸以及尿素素等维护肠道屏障完整性代谢产物的生成,从而影响紧密连接蛋白ZO-1、Occludin和草酸转运蛋白SLC26A6表达,上述变化可能导致肠道屏障功能受损以及草酸盐等代谢物的过度吸收,促进草酸钙结晶沉积和结石形成。因此,通过调节这些菌群的丰度,增强肠道屏障功能、抑制草酸过度吸收,可能成为预防肾结石发生的有效策略。

既往已有研究探讨了肠道菌群与肾结石之间的因果关系<sup>[16,44]</sup>,但二者结果并不一致。这种差异可能源于以下几个方面:首先,两项研究选用的数据库不同,前者<sup>[16]</sup>使用FinnGen数据;而后者<sup>[44]</sup>使用UK Biobank数据,两者在样本量和人群特征上的差异可能导致统计效力不同。其次,在工具变量的选择标准上,前者采用更为严格的显著性阈值( $P<1\times 10^{-5}$ )以减少假阳性,而后者放宽了筛选标准( $P<5\times 10^{-5}$ ),可能会引入更多的混杂因素,导致仅最显著的Coriobacteriaceae科被保留。此外,两项研究都使用了MR的分析方法,但是分析方法上存在不同,前者通过多种MR分析方法分析结果,而

后者仅依赖IVW和WME进行MR分析,分析方法的不同也可能影响最终关注菌群的差异。本研究严格统一了纳入使用的SNP的筛选标准( $P < 1 \times 10^{-5}$ ),MR分析结果表明,毛螺杆菌科NK4A136 group和戈登杆菌属可能作为肾结石发病的保护因素,并进一步通过动物实验对MR分析结果进行了验证,弥补了既往研究仅依赖遗传学分析而缺乏实验支撑的不足。同时,本研究通过免疫组化评估肠道紧密连接蛋白以及草酸转运蛋白的表达,并结合16S rRNA测序结果,揭示了相关菌属可能通过调节肠道屏障功能以及草酸代谢途径发挥保护作用,为后续的机制研究提供了依据,为肾结石的防治提供了新的思路。

本研究存在以下局限性:首先,MR分析采用的GWAS数据均来自欧洲人群,而肠道菌群的组成及其与宿主的相互作用在不同种族间存在差异<sup>[45]</sup>。特别是在亚洲人群中,特有的饮食结构(如高草酸饮食)可能影响肠道中草酸代谢菌(如*Oxalobacter formigenes*)的丰度,从而影响草酸的吸收和代谢<sup>[46]</sup>,因此该研究结果在亚洲及其他人群中的适用性需要谨慎推断。其次,尽管本研究揭示了肾结石与肠道菌群之间的关联,但在动物实验中并没有进行粪菌移植以及特定的菌株定植,未能直接证实相关菌群与肾结石之间的因果关系。此外,尚未对肠道菌群代谢产物(如短链脂肪酸、尿石素)进行定量检测。未来可以结合菌群移植、代谢组学以及单细胞测序技术,明确关键菌株及其代谢通路在肾结石发生中的作用。同时可探索基于膳食干预(如补充可发酵纤维或多酚类食物)富集戈登杆菌属和毛螺杆菌科NK4A136 group,或应用益生菌/益生元联合疗法,恢复“抗结石菌群”的生态平衡,为肾结石的预防和治疗提供新策略。

综上所述,本研究通过MR分析与动物实验验证,探讨了特定肠道菌群与肾结石发生之间的因果关系及潜在机制。MR分析与动物实验结果显示,戈登杆菌属丰度降低与肾结石风险增加显著相关,毛螺杆菌科NK4A136 group在遗传学分析中呈现保护效应,但在动物实验中未观察到显著差异。这两种菌的减少可能影响了肠道紧密连接蛋白与草酸转运蛋白的表达,提示其可能通过影响肠道屏障功能及草酸代谢参与肾结石进展。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

- [1] Singh P, Harris PC, Sas DJ, et al. The genetics of kidney stone disease and nephrocalcinosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(4): 224-40.
- [2] Geraghty R, Lovegrove C, Howles S, et al. Role of genetic testing in

- kidney stone disease: a narrative review[J]. *Curr Urol Rep*, 2024, 25(12): 311-23.
- [3] Ming SX, Tian J, Ma K, et al. Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS-NF- $\kappa$ B signalling pathway in renal tubular epithelial cell[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 88.
- [4] Miller AW, Penniston KL, Fitzpatrick K, et al. Mechanisms of the intestinal and urinary microbiome in kidney stone disease[J]. *Nat Rev Urol*, 2022, 19(12): 695-707.
- [5] Jin X, Jian ZY, Chen XT, et al. Short chain fatty acids prevent glyoxylate-induced calcium oxalate stones by GPR43-dependent immunomodulatory mechanism[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 729382.
- [6] Arvans D, Jung YC, Antonopoulos D, et al. *Oxalobacter formigenes*- derived bioactive factors stimulate oxalate transport by intestinal epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(3): 876-87.
- [7] Ariceta G, Collard L, Abroug S, et al. ePHex: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomized study to evaluate long-term efficacy and safety of *Oxalobacter formigenes* in patients with primary hyperoxaluria[J]. *Pediatr Nephrol*, 2023, 38(2): 403-15.
- [8] Milliner D, Hoppe B, Groothoff J. A randomised Phase II/III study to evaluate the efficacy and safety of orally administered *Oxalobacter formigenes* to treat primary hyperoxaluria[J]. *Urolithiasis*, 2018, 46(4): 313-23.
- [9] Xu MY, Qin YG, Xia YJ, et al. Screening of oxalate-degrading probiotics and preventive effect of *Lactiplantibacillus plantarum* AR1089 on kidney stones[J]. *Food Funct*, 2024, 15(19): 10163-78.
- [10] Yuan TH, Xia YQ, Li BJ, et al. Gut microbiota in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 143.
- [11] Ticinesi A, Milani C, Guerra A, et al. Understanding the gut-kidney axis in nephrolithiasis: an analysis of the gut microbiota composition and functionality of stone formers[J]. *Gut*, 2018, 67(12): 2097-106.
- [12] Emdin CA, Khera AV, Kathiresan S. Mendelian randomization[J]. *JAMA*, 2017, 318(19): 1925.
- [13] Davey Smith G, Hemani G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(R1): R89-98.
- [14] 李文婕, 洪耀南, 黄蕊, 等. 自身免疫性疾病是再生障碍性贫血的危险因素: 一项孟德尔随机化分析[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(4): 871-9.
- [15] 姚辰, 李文佳, 庞瑞明, 等. 臀肌腱炎、原发性髋关节病可能导致髂胫束综合征: 一项孟德尔随机化研究[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(9): 1821-30.
- [16] Liu MH, Zhang YJ, Wu J, et al. Causal relationship between kidney stones and gut microbiota contributes to the gut-kidney axis: a two-sample Mendelian randomization study[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1204311.
- [17] Gronau QF, Wagenmakers EJ. Limitations of Bayesian leave-one-out cross-validation for model selection[J]. *Comput Brain Behav*, 2019, 2(1): 1-11.
- [18] 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): 693-8.
- [19] Hussain B, Wu CC, Tsai HC, et al. Species-level characterization of

- gut microbiota and their metabolic role in kidney stone formation using full-length 16S rRNA sequencing[J]. *Urolithiasis*, 2024, 52(1): 115.
- [20] Davies NM, Holmes MV, Davey Smith G. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians [J]. *BMJ*, 2018, 362: k601.
- [21] 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): 512-25.
- [22] 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): 304-14.
- [23] Hartwig FP, Davey Smith G, Bowden J. Robust inference in summary data Mendelian randomization via the zero modal pleiotropy assumption[J]. *Int J Epidemiol*, 2017, 46(6): 1985-98.
- [24] 曹秋实, 巴元明, 罗俊华, 等. 排石冲剂对大鼠草酸钙结石生成的干预效果及其机制研究[J]. *中国全科医学*, 2015, 18(18): 2205-9.
- [25] Li NN, Niu LL, Liu Y, et al. Taking SCFAs produced by *Lactobacillus reuteri* orally reshapes gut microbiota and elicits antitumor responses[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 241.
- [26] Zhou SK, Xu JD, Gao XQ, et al. Fructus Jujubae cooperated with water-expelling members in Shizao decoction alleviated intestinal injury and malignant ascites by modulating gut microbiota and metabolic homeostasis[J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155895.
- [27] Ye JM, Meng Q, Jin KZ, et al. Phage cocktail alleviated type 2 diabetes by reshaping gut microbiota and decreasing proinflammatory cytokines[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, 108(1): 9.
- [28] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 [J]. *Nature*, 2009, 461(7268): 1282-6.
- [29] Noonin C, Thongboonkerd V. Beneficial roles of gastrointestinal and urinary microbiomes in kidney stone prevention via their oxalate-degrading ability and beyond[J]. *Microbiol Res*, 2024, 282: 127663.
- [30] Zhang MW, Cui SM, Mao BY, et al. Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: a review on its sources, metabolic distribution, health benefits, and biotransformation[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, 63(24): 6900-22.
- [31] Yasuda T, Takagi T, Asaeda K, et al. Urolithin A-mediated augmentation of intestinal barrier function through elevated secretory mucin synthesis[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 15706.
- [32] Han DD, Wu YJ, Lu DD, et al. Polyphenol-rich diet mediates interplay between macrophage-neutrophil and gut microbiota to alleviate intestinal inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 656.
- [33] Hering NA, Luettig J, Jebautzke B, et al. The punicalagin metabolites ellagic acid and urolithin A exert different strengthening and anti-inflammatory effects on tight junction-mediated intestinal barrier function *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 610164.
- [34] Ma LY, Ni YH, Wang Z, et al. Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1-19.
- [35] Hu SW, Wang JH, Xu YL, et al. Anti-inflammation effects of fucosylated chondroitin sulphate from *Acaudina molpadioides* by altering gut microbiota in obese mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10(3): 1736-46.
- [36] Portincasa P, Bonfrate L, Vacca M, et al. Gut microbiota and short chain fatty acids: implications in glucose homeostasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1105.
- [37] Huang G, Zhou YZ, Cheng H, et al. Genome and transcriptome analysis of *Enterococcus faecium* from intestinal colonization and *Enterococcus faecium* from urinary tract infection[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1273949.
- [38] Notting F, Pirovano W, Sybesma W, et al. The butyrate-producing and spore-forming bacterial genus *Coprococcus* as a potential biomarker for neurological disorders[J]. *Gut Microbiome (Camb)*, 2023, 4: e16.
- [39] Zhou ZJ, Feng DX, Shi DH, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal bile acid profile changes in rats with ethylene glycol-induced calcium oxalate nephrolithiasis[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 381: 110570.
- [40] Shi JY, Wang YJ, Bao QW, et al. *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharide alleviates ulcerative colitis via gut microbiota-independent modulation of inflammatory immune response[J]. *Carbohydr Polym*, 2025, 356: 123387.
- [41] Kuo WT, Odenwald MA, Turner JR, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2022, 1514(1): 21-33.
- [42] Anbazhagan AN, Ge Y, Priyamvada S, et al. A direct link implicating loss of SLC26A6 to gut microbial dysbiosis, compromised barrier integrity, and inflammation[J]. *Gastroenterology*, 2024, 167(4): 704-17.e3.
- [43] Whittamore JM, Hatch M. Oxalate flux across the intestine: contributions from membrane transporters[J]. *Compr Physiol*, 2021, 12(1): 2835-75.
- [44] 陈健鑫, 李生华. 基于孟德尔随机化方法分析肠道菌群与肾结石病的关联性研究[J]. *医药前沿*, 2024(12): 6-11.
- [45] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 222-7.
- [46] Ticinesi A, Nouvenne A, Chiussi G, et al. Calcium oxalate nephrolithiasis and gut microbiota: not just a gut-kidney axis. a nutritional perspective[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 548.

(编辑:郎 朗)