

儿童哮喘与血清 25 羟维生素 D 的双向两样本孟德尔随机化研究

纪展鹏, 魏兵

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2021HJ2/10300060)

作者单位:110847 沈阳,辽宁中医药大学 2021 级中西医结合专业研究生(纪展鹏);110016 沈阳,北部战区总医院新生儿科(魏兵)

作者简介:纪展鹏(1998—),男,辽宁中医药大学 2021 级硕士研究生在读。研究方向:中西医结合儿科治疗

通信作者:魏兵,E-mail:weib71@sina.com

【摘要】 **目的** 通过两样本双向孟德尔随机化(MR)方法评估儿童哮喘与血清 25-羟维生素 D [25(OH)D]之间的因果关系。**方法** 利用从公开可用的欧洲人群全基因组关联研究中与血清 25(OH)D 相关的遗传数据及从英国生物银行中获得与儿童哮喘相关的遗传数据进行双样本双向 MR 分析。采用逆方差加权法(IVW)、一般模型、加权模型、加权中值法、MR Egger 方法进行分析,并进行异质性检验,敏感性分析及多效性分析。**结果** MR 分析结果表明,血清 25(OH)D 水平与儿童哮喘存在因果关系(IVW OR:0.997,95%CI:0.995~0.999, $P=0.018$),儿童哮喘与血清 25(OH)D 水平不存在因果关系(IVW OR:1.627,95%CI:0.244~10.871, $P=0.615$)。在血清 25(OH)D 水平对儿童哮喘的 MR 分析中,工具变量不存在水平多效性及异质性。使用留一法(leave-one-out 法)和可视化散点图进行的敏感性分析发现,MR 分析结果稳健。在儿童哮喘对血清 25(OH)D 水平的 MR 分析中,工具变量不存在水平多效性,存在异质性。使用留一法和可视化散点图进行的敏感性分析发现,MR 分析结果不稳健。**结论** 双样本 MR 分析表明了一种单向因果关系,即血清 25(OH)D 水平越低,患儿童哮喘的风险越大。然而,儿童哮喘似乎并不影响血清 25(OH)D 水平。

【关键词】 哮喘; 维生素 D; 孟德尔随机化; 儿童

doi:10.3969/j.issn.1674-3865.2024.02.011

【中图分类号】 R725.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3865(2024)02-0148-07

Bidirectional two-sample Mendelian randomization study of childhood asthma and serum 25 hydroxyvitamin D

Ji Zhanpeng, WEI Bing, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the causal relationship between childhood asthma and serum 25-hydroxyvitamin D[25(OH)D] by two-sample bidirectional Mendelian randomization. **Methods** A two-sample bidirectional MR analysis was performed using pool-level genetic data associated with serum 25(OH)D from publicly available European population-wide association studies and pool-level genetic data associated with childhood asthma from UK Biobank. Inverse variance weighted (IVW) method, simple mode method, weighted mode, weighted median method, and MR Egger method were used for analysis, and heterogeneity test, sensitivity analysis and pleiotropic analysis were conducted. **Results** The results of MR analysis showed that there was a causal relationship between serum 25(OH)D level and childhood asthma (IVW OR: 0.997, 95% CI: 0.995, 0.999, $P=0.018$). There was no causal relationship between childhood asthma and serum 25(OH)D level (IVW OR: 1.627, 95% CI: 0.244, 10.871, $P=0.615$). In MR analysis of serum 25(OH)D level in children with asthma, there was no horizontal pleiotropy or heterogeneity of instrumental variables. Sensitivity analysis using the leave-one-out method and visual scatter plots showed robust MR analysis results. In reverse MR analysis, there was no horizontal pleiotropy of instrumental variables, but there was heterogeneity. Sensitivity analysis using the leave-one-out method and visual scatter plots found that MR analysis results were not robust. **Conclusion** Two-sample MR analysis shows a unidirectional causal relationship, that is, the lower the serum 25(OH)D level, the greater the risk of childhood asthma. However, childhood asthma does not

appear to affect serum 25(OH)D levels.

【Keywords】 Asthma; Vitamin D; Mendelian randomization; Children

哮喘是一种以慢性气道炎症和气道高反应性为特征的异质性疾病^[1],也是儿童时期最常见的慢性气道疾病之一。暴露于过敏原、遗传因素、饮食变化和营养状况均可能诱发哮喘和过敏的发生。缺乏某些营养物质,如维生素 D,可能是哮喘和过敏的潜在原因^[2]。哮喘通常是由 Th2 细胞活性增强引起的, Th2 细胞可诱导 IgE 产生,并促进气道炎症和气道高反应性^[3]。

维生素 D 可能通过影响肺的发育、调节免疫反应和气道平滑肌的重塑在哮喘发病机制中发挥作用^[4]。维生素 D 能抑制 Th2 细胞功能^[5], IgE 减少^[6]。临床上通常测量 25-羟维生素 D [25-hydroxyvitamin D, 25(OH)D] 浓度以确定个体维生素 D 状态^[7]。低水平血清 25(OH)D 在哮喘中非常普遍^[8]。然而,关于低水平血清 25(OH)D 是否与儿童哮喘有关,有相互矛盾的发现。部分流行病学研究发现,儿童哮喘会伴随 25(OH)D 低水平^[9],相反,低水平血清 25(OH)D 与哮喘发作次数和住院时间增加有关^[10],然而,也有研究认为低水平血清 25(OH)D 并不会导致儿童哮喘的发生^[11]。观察性研究只能反映两者之间是否存在相关性,难以直观清晰地阐明血清 25(OH)D 水平与儿童哮喘之间复杂的因果关系。

孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是一种评估因果关系的方法^[12]。MR 使用遗传变异作为工具变量可克服传统观察性流行病学研究中的混杂和反向因果问题,因为等位基因在配子形成时遵循孟德尔随机分配定律,基因与结局的关联关系不会受到后天环境因素、行为生活方式等常见混杂因素的影响,且符合因果推断中“先因后果”的时序性要求,是一种天然的随机对照试验。因此,我们通过基因组范围关联研究(genome-wide association study, GWAS)数据库的两样本双向 MR 方法,以研究儿童哮喘与血清 25(OH)D 水平之间可能的因果关系。

1 资料与方法

1.1 方法设计

主要目标:探讨血清 25(OH)D 水平与儿童哮喘之间的因果关系。次要目标:探究儿童哮喘是否影响血清 25(OH)D 水平,以建立研究的双向性。MR 使用单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)作为工具变量,基于 MR 工具变量需要满足 3 个假设^[13]:相关性假设:工具变量与暴露因素密切相关(假设 I);独立性假设:工具变量与

已知的潜在混杂因素无关联(假设 II);排他性假设:工具变量与结局指标不能直接相关(假设 III)。本研究为两样本双向 MR 研究,分别对血清 25(OH)D→儿童哮喘和儿童哮喘→血清 25(OH)D 进行 MR 分析,研究设计见图 1。

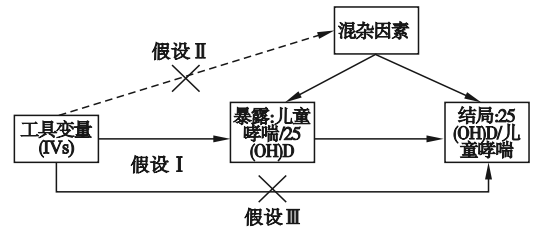


图 1 双向 MR 研究流程图

1.2 数据来源

使用与血清 25(OH)D 水平和儿童哮喘相关的遗传变异作为工具变量。这些数据从大规模基因组关联研究(GWAS 数据库)中提取,即从英国生物银行(UK biobank, UKB)和其他欧洲人群研究的数据库中获取。我们的 MR 研究是使用公开发表的数据库进行的,这些研究的伦理审查和知情同意已在原始研究中获得。

1.3 工具变量的选择

对于血清 25(OH)D 水平:选择与 25(OH)D 水平强相关的 SNPs。对于儿童哮喘:选择与儿童哮喘强相关的 SNPs。

工具变量标准:确保工具变量与暴露有关,但不直接与任何混杂因素或结果相关(除通过暴露之外)。满足基于 MR 筛选工具变量的 3 个假设,从数据库中筛选出全基因组显著相关($P < 5 \times 10^{-6}$),连锁不平衡参数(r^2)阈值为 0.001,遗传距离为 10 000 kb 的 SNPs,以保证各个 SNP 相互独立排除基因多效性对结果的影响。剔除与日晒、体力活动、吸烟^[14]、体质量指数^[15]等相关的 SNPs,排除工具变量混杂因素以降低多效性。

1.4 统计学方法

采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、一般模型、加权模型、加权中值、MR Egger 5 种统计学方法分别对每个方向[血清 25(OH)D→儿童哮喘和儿童哮喘→血清 25(OH)D]进行 MR 分析,其中 IVW 在所有工具变量都满足 3 个假设时,使用工具变量的倒方差进行拟合,为无偏倚估计。本研究以 IVW 结果作为主要结果。异质性通

过 Egger 及 IVW 的 Q 及 P 表示, $P < 0.05$ 则存在异质性。采用 MR-Egger 回归检验基因多效性, 通过 MR egger intercept 及 P 表示, $P < 0.05$ 则存在多效性^[16]。敏感性分析采用留一法 (leave-one-out 法) 和视觉散点图来评估结果的稳健性。本研究所有方法均使用 R 4.2.1 软件完成^[17]。

2 结果

2.1 两样本 MR 结果[25(OH)D 为暴露因素, 儿童哮喘为结局变量]

2.1.1 工具变量的筛选

当以血清 25(OH)D 作为暴露因素时, 选取 172 个与血清 25(OH)D 关系密切的全基因组 SNPs 作为工具变量, 绘制森林图, 见图 2。

2.1.2 MR 分析

IVW 结果显示: 血清 25(OH)D 低水平会增加儿童哮喘发生的风险, $OR = 0.997$ (95%CI 0.995 ~ 0.999, $P = 0.018$)。IVW 回归分析具有重要意义, IVW 结果有统计学意义前提下, 其他无统计学意义模型效应值(β)与 IVW β 值同向时, 仍可认为暴露因素与结局指标具有因果关系, 森林图结果见表 1。工具变量的因果效应值散点图见图 3。

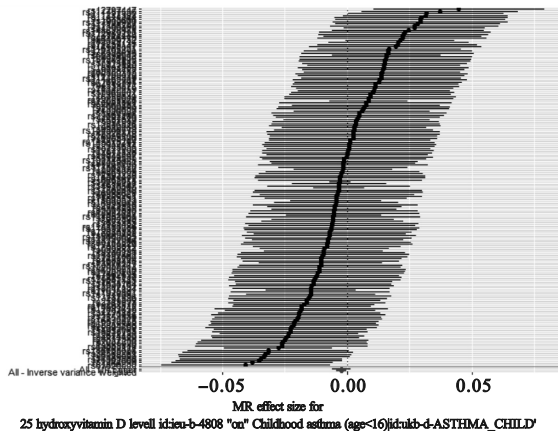


图 2 血清 25(OH)D 为暴露因素的全基因组工具变量森林图

2.1.3 可靠性分析

IVW 结果 Cochran's $Q = 171.75$, $P = 0.469$; MR Egger 结果 Cochran's $Q = 171.73$, $P = 0.448$, 25(OH)D 与儿童哮喘的因果关系不存在异质性。MR Egger 截距 $P = 0.90$, 表明不存在多效性。如图 4、图 5, 留一法 (leave-one-out 法) 示纳入的单个 SNP 较小受偏倚影响; 漏斗图基本对称。敏感性分析显示, 两者关联分析结果稳定。

表 1 5 种回归分析 25(OH)D 与儿童哮喘关系

方法	nsnp	β	SE	P	OR
MR Egger	172	-0.002	0.002	0.232	0.997(0.994~1.001)
加权中值法	172	-0.003	0.002	0.141	0.996(0.993~1.001)
IVW	172	-0.002	0.001	0.018*	0.997(0.995~0.999)
简单模型法	172	-0.004	0.004	0.325	0.995(0.986~1.004)
加权模型法	172	-0.003	0.002	0.096	0.996(0.992~1.001)

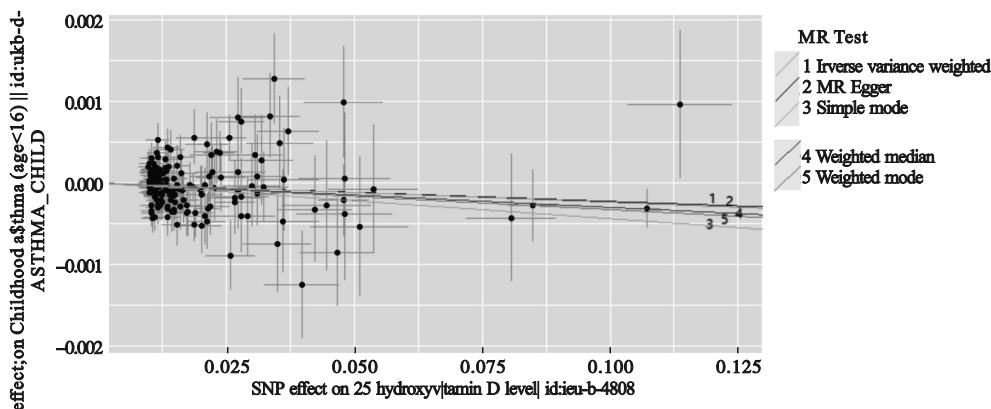


图 3 暴露因素为 25(OH)D 的 MR 散点图

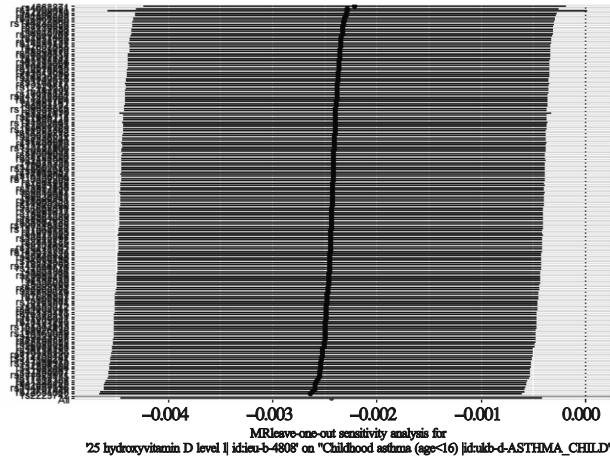


图 4 25(OH)D 为暴露因素的留一法分析

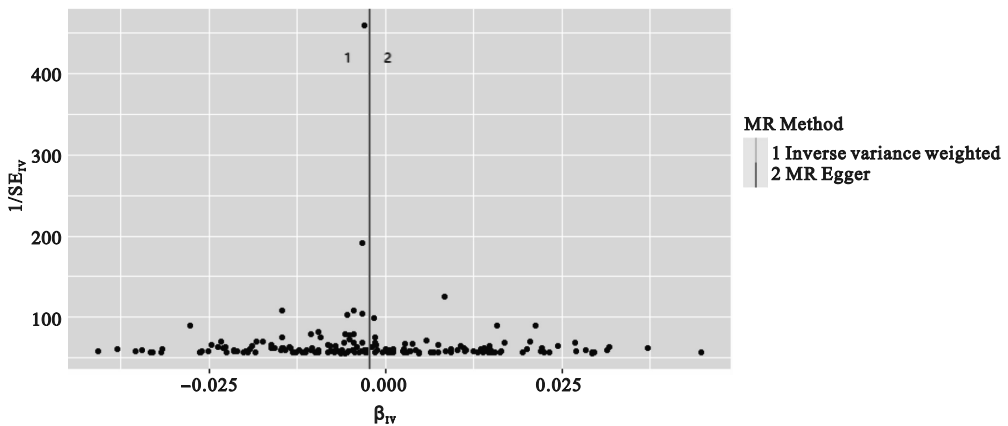


图 5 暴露因素为 25(OH)D 的漏斗图

2.2 两样本 MR 结果[儿童哮喘为暴露因素,25(OH)D 为结局变量]

2.2.1 工具变量的选择

当以儿童哮喘作为暴露因素时,选取 18 个与血清 25(OH)D 关系密切的全基因组 SNPs 作为工具变量,绘制森林图,见图 6。

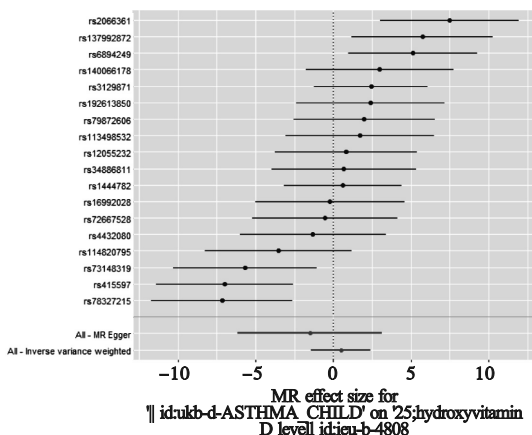


图 6 儿童哮喘为暴露因素的全基因组工具变量森林图

2.2.2 MR 分析

IVW 结果显示:儿童哮喘不会增加血清 25(OH)D 低水平发生的风险,OR = 1.627 (95% CI 0.244 ~ 10.871, $P=0.615$),置信区间较大。IVW、一般模型、加权模型、加权中值、MR Egger 回归模型 5 种回归分析,差异无统计学意义($P>0.05$),森林图结果见表 2。每个遗传工具变量的因果效应值散点图见图 7。

2.2.3 可靠性分析

IVW 结果 Cochran's $Q=55.393, P<0.001$; MR Egger 结果 Cochran's $Q=52.588, P<0.001$, 儿童哮喘与 25(OH)D 的因果关系存在异质性。MR Egger 截距 $P=0.369$,表明不存在多效性。如图 8、图 9,留一法示纳入的单个 SNP 较小受偏倚影响;漏斗图不完全对称。敏感性分析显示,两者因果关联结果不稳定。

3 讨论

大多数研究倾向于报告与健康儿童相比,哮喘患儿的血清 25(OH)D 水平较低,但较少研究关于

表 2 5 种回归分析儿童哮喘与 25(OH)D 关系

方法	nsnp	β	SE	P	OR
MR Egger	18	-1.505	2.366	0.533	0.222(0.002~22.912)
加权中值法	18	0.782	0.866	0.366	2.187(0.400~11.942)
IVW	18	0.487	0.969	0.615	1.627(0.244~10.872)
简单模型法	18	1.256	1.389	0.378	3.513(0.231~53.458)
加权模型法	18	1.256	1.289	0.342	3.513(0.283~43.684)

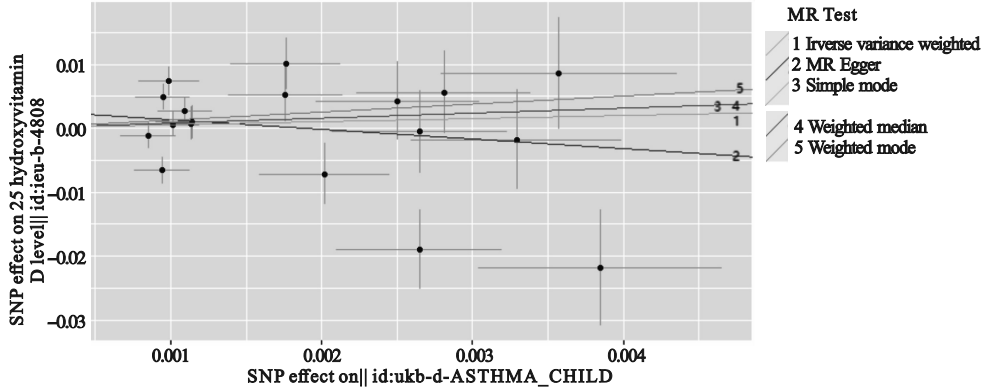
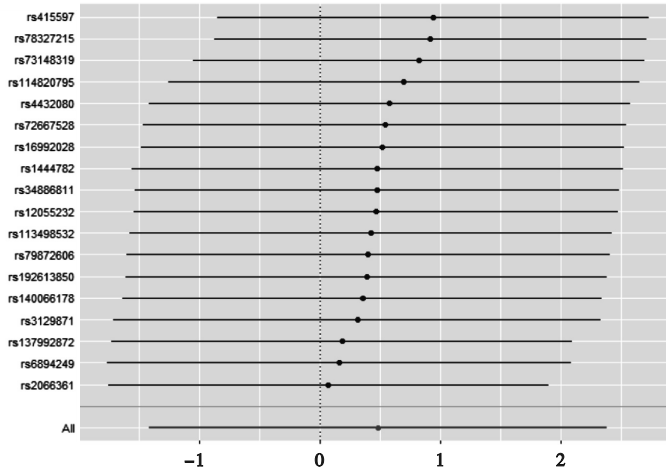


图 7 暴露因素为儿童哮喘的 MR 散点图



MR leave-one-out sensitivity analysis for |id:ukb-d-ASTHMA_CHILD' on '25 hydroxyvitamin D level| id:ieu-b-4808'

图 8 暴露因素为儿童哮喘的留一法分析

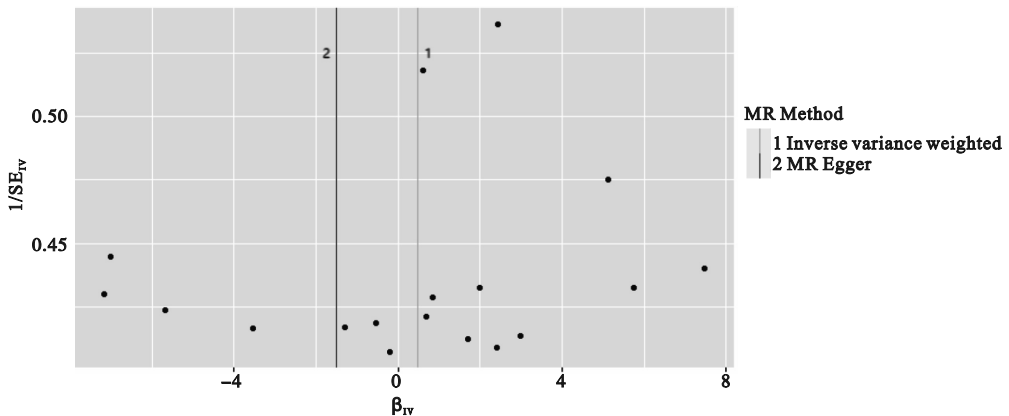


图 9 暴露因素为儿童哮喘的漏斗图

患儿哮喘与血清 25(OH)D 水平的因果关系,本研究基于 GWAS 数据库,首次使用双样本双向 MR 探讨了血清 25(OH)D 水平与儿童哮喘的因果关联,结果显示,增加血清 25(OH)D 水平可能会降低儿童哮喘发生的风险;儿童哮喘与血清 25(OH)D 水平无因果关联。

维生素 D 缺乏可能是哮喘和过敏症状增加的原因之一。25(OH)D 低水平的儿童患哮喘的风险比正常的儿童高 6.3 倍。25(OH)D 低水平哮喘患儿的血清总 IgE 水平明显升高^[18]。维生素 D 具有调节免疫系统的能力,抑制参与哮喘反应的炎症信号,抑制 Th2 反应^[19-20]。血清 25(OH)D 低水平的哮喘患者表现出气道高反应性和皮质类固醇需求增加,维生素 D 可能会增加他们对糖皮质激素的反应^[21]。血清 25(OH)D 低水平与哮喘的严重程度和肺功能受损有关。Alansari 等^[22]发现血清 25(OH)D 低水平的中度和重度哮喘儿童在补充维生素 D 后哮喘恶化改善。我们的研究与 Meta 分析结果一致^[23],补充维生素 D 可以预防哮喘的恶化。有研究发现补充维生素 D 可以降低血清 25(OH)D 浓度 < 10 μg/L 的儿童哮喘加重的风险,维生素 D 对基线 25(OH)D 低于 10 μg/L 的哮喘儿童有保护作用^[24]。这说明补充维生素 D 可能对血清 25(OH)D 低水平的哮喘患儿有效。此外,哮喘患儿血清 25(OH)D 低水平与哮喘未控制程度呈正相关^[25]。

与 MR 相比,观察性研究较难排除混杂因素。患有哮喘的儿童通常避免阳光照射和户外活动^[26]。因此,哮喘患儿平均日照量明显低于健康儿童。缺乏阳光照射可能是哮喘儿童血清 25(OH)D 低水平的原因之一。此外,肤色较深的人患哮喘的风险更高^[27],也更容易出现血清 25(OH)D 水平的不足^[28]。

本研究运用 MR 方法与传统观察性研究相比具有显著优势。首先,遗传变异可避免混杂因素的影响,且不存在逆向因果的可能。其二,本研究应用大样本量的基因数据,能更精确地检验研究假设,其三,本研究采用两种不同人群的数据库,排除了异质性的存在。然而本研究存在一些不足,第一,可能存在基因差异,样本均为欧洲白人人,需进一步地验证不同种族人群的样本基因差异;第二,本研究只通过 MR 研究血清 25(OH)D 水平与儿童哮喘的因果关系作用,而不是细胞水平的作用^[29]。

4 结论

本研究采用双向双样本 MR 的分析方法,证实增加血清 25(OH)D 水平可能会降低哮喘发生的风险;儿童哮喘与血清 25(OH)D 无因果关联。血清 25(OH)D 低水平人群为儿童哮喘的易感人群,应注意儿童哮喘的防治。

参考文献

- [1] Mims JW. Asthma: definitions and pathophysiology[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2015, 5 Suppl 1: S2-S6.
- [2] Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3): 724-733.
- [3] Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2019, 56(2): 219-233.
- [4] Mailhot G, White JH. Vitamin D and immunity in infants and children[J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1233.
- [5] Vasilou JE, Lui S, Walker SA, et al. Vitamin D deficiency induces Th2 skewing and eosinophilia in neonatal allergic airways disease[J]. Allergy, 2014, 69(10): 1380-1389.
- [6] Rolf L, Muris AH, Hupperts R, et al. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1317: 84-91.
- [7] Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide[J]. Eur J Clin Nutr, 2020, 74(11): 1498-1513.
- [8] 马秀丽, 甄艳芬. 支气管哮喘儿童血清 25-(OH)D₃ 和总免疫球蛋白 E 的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(7): 551-553.
- [9] Kolokotroni O, Middleton N, Kouta C, et al. Association of serum vitamin D with asthma and atopy in childhood: review of epidemiological observational studies [J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(11): 881-899.
- [10] Aziz DA, Abbas A, Viqar W, et al. Association of vitamin D levels and asthma exacerbations in children and adolescents: experience from a tertiary care center[J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2022, 93(1).
- [11] Abi-Ayad M, Nedjar I, Chabni N. Association between 25-hydroxy vitamin D and lung function (FEV₁, FVC, FEV₁/FVC) in children and adults with asthma: A systematic review[J]. Lung India, 2023, 40(5): 449-456.
- [12] Hu X, Zhao J, Lin Z, et al. Mendelian randomization for causal inference accounting for pleiotropy and sample structure using genome-wide summary statistics[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(28): e2106858119.
- [13] Bowden J, Davey Smith G, et al. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator[J]. Genet Epidemiol, 2016, 40(4): 304-314.
- [14] Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases[J]. Eur Clin Respir J, 2015, 2.
- [15] Vimalaswaran KS, Berry DJ, Lu C, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status; bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts [J]. PLoS Med, 2013, 10(2): e1001383.
- [16] Slob EAW, Groenen PJF, Thurik AR, et al. A note on the use of Egger regression in Mendelian randomization studies[J]. Int J Epidemiol, 2017, 46(6): 2094-2097.
- [17] Yavorska OO, Burgess S. MendelianRandomization: an R package for performing Mendelian randomization analyses using summarized data[J]. Int J Epidemiol, 2017, 46(6): 1734-1739.
- [18] Mohammadzadeh I, Darvish S, Quejé D, et al. Association of serum 25-OH vitamin D with serum IgE and the Pediatric Asthma Severity Score in patients with pediatric asthma[J]. Allergy Asthma Proc, 2020, 41(2): 126-133.