

· 论著 ·

## 三甲胺 N-氧化物与肺动脉高压的因果关系： 两样本孟德尔随机化分析



扫描二维码  
获取更多

曹溢, 丰瑞谊, 唐燕, 罗强, 张艺文, 汪汉

**【摘要】** **目的** 采用两样本孟德尔随机化分析探讨三甲胺N-氧化物(TMAO)与肺动脉高压(PAH)的因果关系。**方法** TMAO的数据集来自全基因组关联分析(GWAS),包括弗雷明翰心脏研究的2 076名欧洲参与者的人类代谢组的汇总数据;PAH的数据集来自芬兰数据库,包括162 962名欧洲受试者的16 380 163个单核苷酸多态性(SNP)位点信息。筛选工具变量,采用逆方差加权法(IVW)评估TMAO与PAH之间的关系;其次,采用MR-Egger回归、最大似然比(ML)、加权中位数(WM)、MR多效性残差和与异常值(MR-PRESSO)及MR稳健性评分(MR-RAPS)对IVW结果进行补充。使用MR-PRESSO检测异常值,采用留一法敏感性分析探讨单个SNP对IVW分析结果的影响,采用MR-Egger法的截距表示是否存在水平多效性,采用Cochran's Q检验分析工具变量的异质性,采用漏斗图分析研究结果的潜在偏倚情况。**结果** 本研究共筛选出9个与TMAO密切相关的工具变量。IVW分析结果显示,TMAO可能会增加PAH发生风险[OR=1.777, 95%CI (1.002, 3.149), P=0.048];上述关系在ML[OR=1.806, 95%CI (1.004, 3.251), P=0.049]、MR-PRESSO[OR=2.063, 95%CI (1.165, 3.652), P=0.037]及MR-RAPS[OR=2.063, 95%CI (2.054, 2.259), P=0.015]中被证实,但在MR-Egger回归[OR=1.394, 95%CI (0.302, 6.422), P=0.685]、WM[OR=1.919, 95%CI (0.859, 4.288), P=0.112]中未被证实。留一法敏感性分析结果显示,逐一删除单个SNP后IVW分析结果无明显变化。MR-Egger法的截距分析结果显示,本研究不存在任何水平多效性(P=0.369)。Cochran's Q检验结果显示,工具变量不存在异质性(P=0.586)。漏斗图分析结果显示,所有工具变量呈非对称性分布,表明该研究结果可能存在潜在偏倚。**结论** TMAO增加可能导致PAH,TMAO与PAH可能存在因果关系。

**【关键词】** 肺动脉高压;三甲胺N-氧化物;因果关系;孟德尔随机化分析

**【中图分类号】** R 541.5 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.215

### Causal Relationship between Trimethylamine N-Oxide and Pulmonary Arterial Hypertension: Two-sample Mendelian Randomization Analysis

CAO Yi, FENG Ruiyi, TANG Yan, LUO Qiang, ZHANG Yiwen, WANG Han

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University/the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610031, China

Corresponding author: WANG Han, E-mail: 7972348@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the causal relationship between trimethylamine N-oxide (TMAO) and pulmonary arterial hypertension (PAH) by two-sample Mendelian randomization analysis. **Methods** The TMAO dataset was obtained from a genome-wide association study (GWAS), which included summary data of human metabolome from 2, 076 European participants in the Framingham Heart Study. The PAH dataset was obtained from the Finnish database, which included 16, 380, 163 single nucleotide polymorphism (SNP) loci information from 162, 962 European participants. The instrumental variables were screened, and the relationship between TMAO and PAH was evaluated by inverse variance weighting (IVW). Secondly, the results of IVW analysis were supplemented by MR-Egger regression, maximum likelihood ratio (ML), weighted median (WM), MR pleiotropy residual sum and outlier (MR-PRESSO) and MR-robust adjusted profile score (MR-RAPS). MR-PRESSO was used to detect abnormal values, and the effect of single SNP on IVW analysis results was analyzed by leave-one-out sensitivity analysis. The intercept of MR-Egger method was used to indicate whether there was horizontal pleiotropy. Cochran's Q test was used to analyze the heterogeneity of instrumental variables. Funnel plot was used to analyze the potential bias of the research results. **Results** A total of 9 instrumental variables closely related to TMAO were screened out in this study. The IVW analysis results showed that TMAO may increase the risk of PAH [OR=1.777, 95%CI (1.002, 3.149), P=0.048]. This relationship was confirmed in ML [OR=1.806, 95%CI (1.004, 3.251), P=0.049], MR-PRESSO [OR=2.063, 95%CI (1.165, 3.652), P=0.037] and MR-RAPS

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81300243); 四川省科技厅面上项目(19YYJC0580)

作者单位: 610031四川省成都市, 西南交通大学附属医院 成都市第三人民医院心内科

通信作者: 汪汉, E-mail: 7972348@qq.com

[ $OR=2.063$ , 95% $CI$  (2.054, 2.259),  $P=0.015$ ], but not in MR-Egger regression [ $OR=1.394$ , 95% $CI$  (0.302, 6.422),  $P=0.685$ ] and WM [ $OR=1.919$ , 95% $CI$  (0.859, 4.288),  $P=0.112$ ]. The results of leave-one-out sensitivity analysis showed that there was no significant change in IVW analysis results after deleting a single SNP one by one. The results of the intercept analysis of the MR-Egger method showed that there was no level of pleiotropy in this study ( $P=0.369$ ). Cochran's  $Q$  test results showed that there was no heterogeneity in the instrumental variables ( $P=0.586$ ). The results of funnel plot analysis showed that all instrumental variables were asymmetrically distributed, indicating that there may be potential bias in the results of this study. **Conclusion** TMAO may increase the risk of PAH and there may be a causal relationship between TMAO and PAH.

**【Key words】** Pulmonary arterial hypertension; Trimethylamine N-oxide; Causation; Mendelian randomization analysis

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种进行性肺血管疾病, 其临床特征是持续的肺血管收缩、肺血管重塑和原位血栓形成导致肺动脉顺应性降低和肺血管阻力增加, 最终导致右心衰竭和死亡<sup>[1]</sup>。PAH的发病率和病死率均较高, 估计每100万成年人中就有10.6人罹患PAH<sup>[2]</sup>。尽管目前PAH治疗方面有了新的进展, 但尚缺乏有效药物, 故其病死率仍居高不下<sup>[3]</sup>。因此, 继续探讨可能参与PAH的其他病理生理学机制非常必要。研究表明, 肠道菌群代谢产物三甲胺N-氧化物 (trimethylamine N-oxide, TMAO) 与PAH密切相关<sup>[4]</sup>, 但具体因果关系尚未完全明确。孟德尔随机化方法是探索暴露因素与结局关系的一种流行病学方法<sup>[5]</sup>, 其可克服观察性研究中的反向因果关系和潜在混杂因素的影响。本研究基于两样本孟德尔随机化分析, 以TMAO为暴露因素、PAH为结局, 探讨了TMAO与PAH的因果关系, 以期对PAH的防治提供参考。

## 1 资料与方法

1.1 数据来源 TMAO的数据集来自全基因组关联分析 (genome wide association study, GWAS), 包括弗雷明翰心脏研究的2 076名欧洲参与者的人类代谢组的汇总数据<sup>[6]</sup>, 详见<https://academic.oup.com/nar/article/42/D1/D975/1061961>。PAH的数据集来自芬兰数据库, 包括162 962名欧洲受试者的16 380 163个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 信息, 详见<https://gwas.mrcieu.ac.uk/datasets/finn-b-I9-HYPTENSPUL/>。

1.2 工具变量的选择 由于GWAS中很少有肠道菌群代谢产物的SNP达到全基因组显著性水平 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ), 故本研究选择具有提示性全基因组显著性水平 ( $P < 5 \times 10^{-5}$ ) 的SNP作为工具变量。工具变量的选择基于以下3个条件: (1) 工具变量与TMAO显著相关; (2) 工具变量与PAH无关; (3) 仅有TMAO影响PAH。采用Plink软件提取备选SNP, 备选SNP需满足以下条件: (1)  $P < 5 \times 10^{-5}$ ; (2) 连锁不平衡参数 ( $r^2$ )  $< 0.001$ ; (3) 设置区域宽度为10 000 kb, 以保证各SNP之间相互独立。其次, 利用catalog和PhenoScanner数据库进一步分析备选SNP是否与混杂因

素相关, 本研究仅纳入与混杂因素不相关的SNP。最后, 采用 $F$ 统计量判断SNP与TMAO的相关强度, 以 $F$ 统计量 $\leq 10$ 为存在弱工具变量偏倚的可能性, 剔除存在弱工具变量偏倚可能性的SNP。

### 1.3 孟德尔随机化分析方法

1.3.1 效应量估计 采用逆方差加权法 (inverse-variance weighting, IVW) 评估TMAO与PAH之间的关系, 如存在异质性则使用随机效应模型, 否则使用固定效应模型。其次, 使用MR-Egger回归、最大似然比 (maximum likelihood, ML)、加权中位数 (weighted median, WM) 和MR多效性残差和与异常值 (MR pleiotropy residual sum and outlier, MR-PRESSO) 及MR稳健性评分 (MR-robust adjusted profile score, MR-RAPS) 对IVW的结果进行补充<sup>[7]</sup>。

1.3.2 水平多效性和异质性检验 首先, 使用MR-PRESSO检测异常值, 若存在异常值, 则去除异常值后重新进行分析。然后进行留一法敏感性分析, 其是每次排除单个SNP, 对剩余SNP重新进行IVW分析, 从而判断单个SNP对IVW结果的影响。其次, 采用MR-Egger法的截距表示是否存在水平多效性, 若截距的 $P$ 值 $< 0.05$ 则认为存在水平多效性。再者, 采用Cochran's  $Q$ 检验分析工具变量的异质性; 最后, 采用漏斗图分析研究结果的潜在偏倚情况。

1.4 统计学方法 采用R软件中的TwoSampleMR包进行统计分析, 所有结果以 $OR$ 值及其95% $CI$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 工具变量的选择 经筛选, 与TMAO密切相关的工具变量共9个, 分别是rs4846884、rs12131532、rs17131718、rs1538291、rs12116428、rs7522157、rs3935570、rs6656619及rs11583422。9个工具变量的 $F$ 统计量均 $> 10$ , 提示存在弱工具变量偏倚的可能性较小。

2.2 孟德尔随机化分析结果 IVW分析结果显示, TMAO可能会增加PAH发生风险 [ $OR=1.777$ , 95% $CI$  (1.002, 3.149),  $P=0.048$ ]; 上述关系在ML [ $OR=1.806$ , 95% $CI$  (1.004, 3.251),  $P=0.049$ ]、MR-PRESSO [ $OR=2.063$ , 95% $CI$  (1.165, 3.652)],

$P=0.037$ ] 及MR-RAPS [ $OR=2.063$ ,  $95\%CI(2.054, 2.259)$ ,  $P=0.015$ ] 中被证实, 但在MR-Egger回归 [ $OR=1.394$ ,  $95\%CI(0.302, 6.422)$ ,  $P=0.685$ ] 和WM [ $OR=1.919$ ,  $95\%CI(0.859, 4.288)$ ,  $P=0.112$ ] 中未被证实, 见图1~2。

**2.3 水平多效性和异质性检验结果** MR-PRESSO分析结果显示, 本研究纳入的SNP不存在异常值。留一法敏感性分析结果显示, 逐一删除单个SNP后IVW分析结果无明显变化, 见图3。MR-Egger法的截距分析结果显示, 本研究不存在任何水平多效性 ( $P=0.369$ )。Cochran's Q检验结果显示, 工具变量不存在异质性 ( $P=0.586$ )。漏斗图分析结果显示, 所有工具变量呈非对称性分布, 表明该研究结果可能存在潜在偏倚, 见图4。

**3 讨论**

本研究基于两样本孟德尔随机化分析探讨了TMAO与PAH的因果关系, IVW分析结果显示, TMAO可能会增加PAH发生风险 [ $OR=1.777$ ,  $95\%CI(1.002,$

$3.149)$ ]; 上述关系在ML、MR-PRESSO及MR-RAPS中被证实, 但在MR-Egger回归和WM中未被证实, 考虑IVW分析的统计效应值最好, 故认为该结果比较可靠, 提示TMAO与PAH可能存在因果关系, TMAO每升高1个单位, PAH发生风险升高77.7%, 故干预TMAO或产TMAO的肠道菌群可能对预防PAH具有积极作用。

本研究孟德尔随机化分析结果与既往临床研究结果一致, 如MOUTSOGLU等<sup>[8]</sup>研究表明, PAH患者肠道菌群失调, 其中血液循环中短链脂肪酸和次级胆汁酸较低可能会促进PAH的发生。KIM等<sup>[9]</sup>通过宏基因组学分析比较了18名1型PAH患者 [平均肺动脉压为57.4 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)] 和13名对照者的粪便微生物组, 结果显示, PAH患者微生物菌落的分类和功能发生了明显变化, 与对照者相比, PAH患者精氨酸、脯氨酸和鸟氨酸的合成途径增加, 与TMAO和嘌呤代谢相关的细菌菌落增多。HONG等<sup>[10]</sup>研究表明, 肠道微生物组变化与PAH代谢组变化有关, 且这些变化受到NPS2143的影响。进一步研究发现, 特发性PAH和

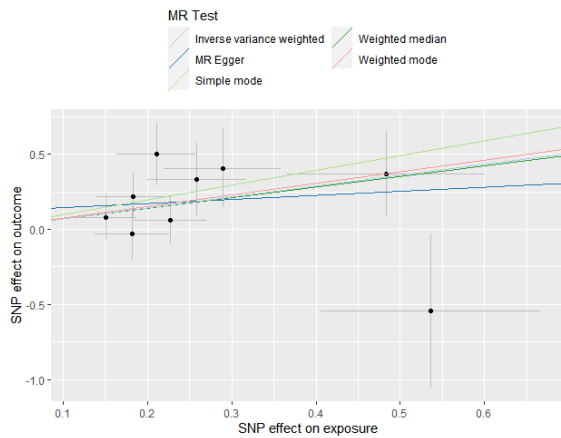


图1 主效应图  
Figure 1 Main effect diagram

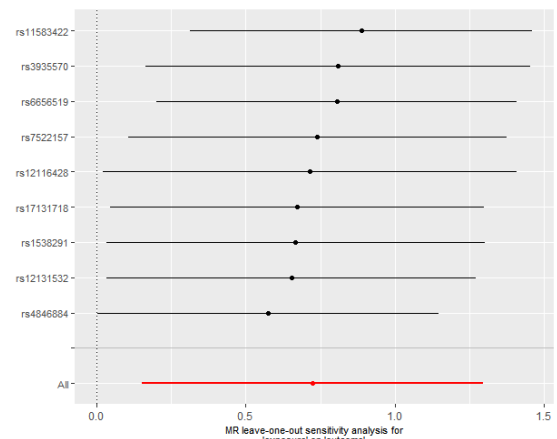


图3 留一法敏感性分析结果  
Figure 3 The results of leave-one-out sensitivity analysis

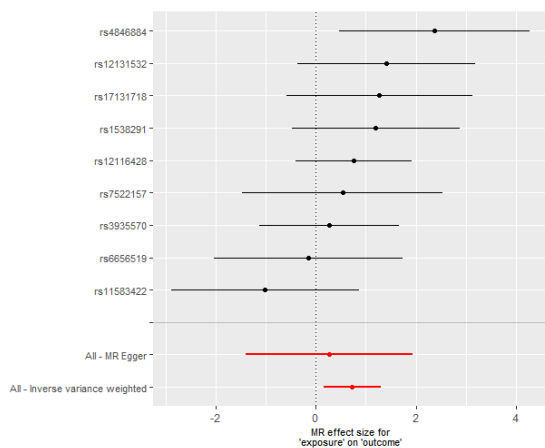


图2 每个SNP对PAH影响的森林图  
Figure 2 Forest map of the effects of each SNP on PAH

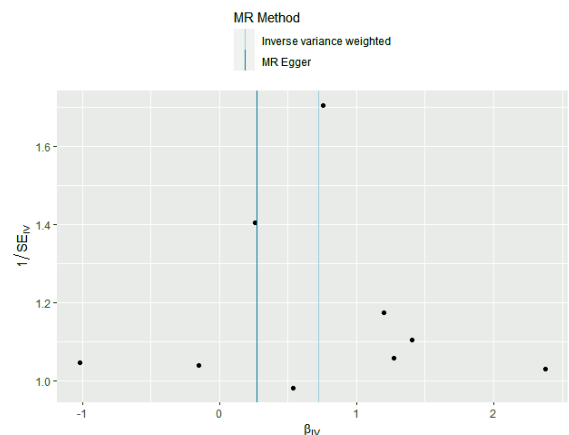


图4 漏斗图  
Figure 4 Funnel plot

野百合碱诱导的PAH高风险大鼠模型TMAO水平升高,而特发性多环芳烃或缺氧诱导的PAH低风险小鼠模型TMAO水平则未升高,表明TMAO表达升高可能仅发生于严重PAH患者;此外,3,3-二甲基-1-丁醇是TMAO合成抑制剂,可以减轻PAH的病理改变,如其可以降低野百合碱诱导的PAH高风险大鼠模型的收缩压、最大右心房压,减轻右心室肥厚和减小肺血管厚度<sup>[11]</sup>,提示TMAO在PAH进展中具有重要作用,可能是治疗PAH的靶点。

目前,TMAO诱导PAH的具体机制尚不清楚。HUANG等<sup>[11]</sup>研究发现,DMB可以阻止巨噬细胞分泌炎症因子,从而减轻肺血管损伤。此外,PAH的最重要病理生理学机制是肺动脉平滑肌细胞增殖,而TMAO可以促进肺动脉平滑肌细胞增殖和巨噬细胞迁移<sup>[8]</sup>。TMAO仅是肠道菌群代谢产物的一种,尽管目前对其研究较多,但肠道菌群本身及其他代谢产物也可能对PAH的发生发展具有一定作用,如肠道菌群失调导致肠壁渗透性改变,细菌或细菌成分从肠道直接转移到血液循环中<sup>[12-13]</sup>;血液循环中的微生物代谢产物负荷改变可以诱导巨噬细胞激活、炎性细胞因子释放、血小板异常聚集和泡沫细胞形成,从而促进PAH的发生发展。另外,微生物菌落其他代谢产物如短链脂肪酸可激活G-蛋白偶联受体或通过抑制组蛋白去乙酰酶来改变表观遗传,进而激活调节性T淋巴细胞,发挥抗炎作用<sup>[14]</sup>。

综上所述,TMAO增加可能导致PAH,TMAO与PAH可能存在因果关系,这为临床设计PAH的微生物组依赖性代谢产物干预措施提供了思路。本研究基于大数据探讨了TMAO与PAH的因果关系,此外,ML和MR-RAPS分析结果与IVW分析结果一致,表明本研究结果比较稳健。但本研究结果仍存在一定局限性:首先,不能完全排除饮食-基因或基因-环境之间的相互作用,这可能会影响研究结果;其次,无法解决孟德尔随机化分析中未观察到的多效性;最后,本研究对象为欧洲人群,该结果是否能推广至其他国家的人群尚不清楚。

作者贡献:曹溢、汪汉进行文章的构思与设计,研究的实施与可行性分析,负责撰写、修订论文;唐燕、罗强、张艺文进行数据收集、整理、分析;丰瑞谊、罗强进行结果分析与解释;汪汉负责文章的质量控制及审核,并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

## 参考文献

- [1] HASSOUN P M. Pulmonary arterial hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385 (25): 2361-2376. DOI: 10.1056/NEJMra2000348.
- [2] MORRELL N W, ALDRED M A, CHUNG W K, et al. Genetics

- and genomics of pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53 (1): 1801899. DOI: 10.1183/13993003.01899-2018.
- [3] MAYEUX J D, PAN I Z, DECHAND J, et al. Management of pulmonary arterial hypertension [J]. *Curr Cardiovasc Risk Rep*, 2021, 15 (1): 2. DOI: 10.1007/s12170-020-00663-3.
- [4] CHEN Y H, YUAN W, MENG L K, et al. The role and mechanism of gut microbiota in pulmonary arterial hypertension [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (20): 4278. DOI: 10.3390/nu14204278.
- [5] BOEHM F J, ZHOU X. Statistical methods for Mendelian randomization in genome-wide association studies: a review [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 2338-2351. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.05.015.
- [6] RHEE E P, HO J E, CHEN M H, et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort [J]. *Cell Metab*, 2013, 18 (1): 130-143. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.06.013.
- [7] LUO Q, HU Y L, CHEN X, et al. Effects of gut microbiota and metabolites on heart failure and its risk factors: a two-sample Mendelian randomization study [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 899746. DOI: 10.3389/fnut.2022.899746.
- [8] MOUTSOGLU D M, TATAH J, PRISCO S Z, et al. Pulmonary arterial hypertension patients have a proinflammatory gut microbiome and altered circulating microbial metabolites [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 207 (6): 740-756. DOI: 10.1164/rccm.202203-04900C.
- [9] KIM S, RIGATTO K, GAZZANA M B, et al. Altered gut microbiome profile in patients with pulmonary arterial hypertension [J]. *Hypertension*, 2020, 75 (4): 1063-1071. DOI: 10.1161/hypertensionaha.119.14294.
- [10] HONG W, MO Q D, WANG L Y, et al. Changes in the gut microbiome and metabolome in a rat model of pulmonary arterial hypertension [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1): 5173-5183. DOI: 10.1080/21655979.2021.1952365.
- [11] HUANG Y H, LIN F J, TANG R D, et al. Gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66 (4): 452-460. DOI: 10.1165/ajrmb.2021-04140C.
- [12] FREDRICKS D N. The gut microbiota and graft-versus-host disease [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (5): 1808-1817. DOI: 10.1172/JCI125797.
- [13] KUL S, CALISKAN Z, GUVENC T S, et al. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide and biomarkers of inflammation are linked to endothelial and coronary microvascular function in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Microvasc Res*, 2023, 146: 104458. DOI: 10.1016/j.mvr.2022.104458.
- [14] WITKOWSKI M, WEEKS T L, HAZEN S L. Gut microbiota and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2020, 127 (4): 553-570. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316242.

(收稿日期: 2023-02-21; 修回日期: 2023-06-25)

(本文编辑: 谢武英)