

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2024.20240517

· 研究快报 ·

桥本甲状腺炎与原发性胆汁性胆管炎的因果关联推论： 一项两样本孟德尔随机化研究

刘羽鸣¹, 高 强^{2*}

1. 上海市老年医学中心肝肿瘤科, 上海 201104

2. 复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科, 上海 200032

[摘要] **目的** 采用两样本孟德尔随机化 (two-sample Mendelian randomization, TSMR) 方法, 探讨桥本甲状腺炎 (Hashimoto thyroiditis, HT) 和原发性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) 之间的潜在因果关联。**方法** 使用 IEU OpenGWAS project 数据库获取不同研究来源的 HT 和 PBC 的全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 数据。以 HT 为暴露因素、PBC 为结局, 选择与暴露因素显著性相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 作为工具变量 (instrumental variables, IVs), 采用逆方差加权法 (inverse-variance weighed, IVW) 作为主要分析方法, 探讨 HT 和 PBC 的潜在因果关联。采用异质性检验、水平多效性检验等敏感性分析评价研究结果的稳定性和可靠性。**结果** 随机效应逆方差加权法 (rIVW) 结果显示, HT 与发生 PBC 的风险增加相关 ($OR=1.853$, 95% CI 1.241~2.768, $P=0.003$), 其余 4 种基于不同假设的 MR 方法结果与 rIVW 类似。敏感性分析显示, 研究结果不受水平多效性影响, 留一法检验证实了结果的稳定性。反向 MR 分析存在水平多效性及异质性, 暂不能认为 HT 与 PBC 存在反向因果关联。**结论** HT 可能是 PBC 发生的危险因素, 暂无依据支持反向因果关联。这项 TSMR 研究可能为进一步探讨两种疾病的发病机制提供新的见解, 并为两种疾病的防治提供线索。

[关键词] 桥本甲状腺炎; 原发性胆汁性胆管炎; 孟德尔随机化; 因果关联**[中图分类号]** R 581.4; R 575.7**[文献标志码]** A

Inference of the causal association between Hashimoto thyroiditis and primary biliary cholangitis: a two-sample Mendelian randomization study

LIU Yuming¹, GAO Qiang^{2*}

1. Department of Hepatic Oncology, Shanghai Geriatric Medical Center, Fudan University, Shanghai 201104, China

2. Department of Liver Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** Two-sample Mendelian randomization (TSMR) method was used to explore the potential causal association between Hashimoto thyroiditis (HT) and primary biliary cholangitis (PBC). **Methods** The genome-wide association study (GWAS) data of HT and PBC from different research sources were obtained through the IEU OpenGWAS project database. Taking HT as the exposure factor and PBC as the outcome, single nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with exposure factor were selected as the instrumental variables (IVs), and inverse-variance weighed (IVW) was used as the main analysis method to explore the potential causal relationship between HT and PBC. Additionally, multiple sensitivity analyses such as heterogeneity test and horizontal multiple effect test were employed to evaluate the robustness and consistency of the findings. **Results** The results of random-effects inverse-variance weighed (rIVW) method indicated a significant association between HT and the development of PBC ($OR=1.853$, 95%CI 1.241-2.768, $P=0.003$), and the results of the other four MR methods based on different assumptions were similar to the rIVW. Sensitivity analysis showed that the results were not affected by horizontal pleiotropy, and the robustness of the results was confirmed by leaving-one test. Reverse MR analysis, due to the presence of horizontal pleiotropy and failure to meet the criteria of the MR Egger test, could not establish a reverse causality of PBC on HT. **Conclusions** HT may be a risk factor for the occurrence of PBC, and there is no evidence to support reverse causality. This may potentially offer novel insights into the pathogenesis of both diseases, thereby providing avenues for further research, as well as clues for the prevention and treatment of these two conditions.

[Key Words] Hashimoto thyroiditis; primary biliary cholangitis; Mendelian randomization; causal association**[收稿日期]** 2024-05-14**[接受日期]** 2024-05-31**[基金项目]** 复旦大学附属中山医院青年基金 (2023ZSQN06). Supported by Youth Fund of Zhongshan Hospital, Fudan University (2023ZSQN06).**[作者简介]** 刘羽鸣, 博士, 住院医师. E-mail: 12301010045@fudan.edu.cn

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: gao.qiang@zs-hospital.sh.cn

原发性胆汁性胆管炎（primary biliary cholangitis, PBC）是一种慢性自身免疫性肝病。PBC 的病程通常从小胆管的进行性破坏引起的胆汁淤积开始，进一步发展成纤维化，最终导致肝硬化^[1]。该病以女性患者为主，全球的患病率约 14.6/（10 万），最高可达 40.2/（10 万）^[1-2]。PBC 患者可长期伴随瘙痒、乏力、干燥综合征、腹部不适等症状，严重影响其生存质量^[3-4]。此外，常规治疗对约 40% 的患者效果不佳^[5]，这些患者可能面临肝功能衰竭、肝癌的风险，最终只能接受肝移植治疗^[6]。因此，鉴别 PBC 的危险因素对 PBC 早期防治尤为重要。

PBC 的病因尚不明确，较为公认的是基因和环境的共同因素导致^[7]。通常，肝脏能够影响甲状腺激素代谢，而甲状腺激素对维持正常的肝功能也起到重要作用^[8]。Wang 等^[8]的孟德尔随机化（Mendelian randomization, MR）研究证实了甲状腺功能低下与 PBC 互为危险因素；另一项研究^[9]则报道了 PBC 是甲状腺功能异常的危险因素。这些研究初步探讨了甲状腺功能和 PBC 的关系，但甲状腺功能异常的种类和影响因素较多，明确具体疾病类型与 PBC 的关系不仅可以为 PBC 的机制探究起到更为精准的提示作用，也可以提升防治 PBC 的效益-成本比。桥本甲状腺炎（Hashimoto thyroiditis, HT）是引起甲状腺功能降低的最常见的自身免疫性甲状腺病，考虑到自身免疫性疾病之间的关联性，以及 HT 和 PBC 共患的报道^[10]，提示 HT 和 PBC 之间可能存在因果关联。

大量的全基因组关联研究（genome-wide association study, GWAS）为汇总水平数据库的搭建提供了基础，为探究疾病-突变-疾病的关系建立了便捷、可靠的途径。MR 是一种利用基因型遗传变异为工具变量（instrumental variables, IVs）以探究暴露因素和结局关系的方法^[11]，已被广泛应用于自身免疫疾病相关的研究，如系统性红斑狼疮^[12]、类风湿性关节炎^[13]等，为梳理疾病之间的关联提供了线索。本研究使用 IEU OpenGWAS project 数据库^[14-15]中来自 GWAS 汇总水平的 HT

和 PBC 数据，采用两样本孟德尔随机化（two-sample Mendelian randomization, TSMR）的分析方法，探讨 HT 和 PBC 之间的潜在因果关系。

1 资料与方法

1.1 数据来源 汇总水平的 GWAS 数据从 IEU OpenGWAS project 数据库中获取。HT 的数据（ebi-a-GCST90018855, <https://gwas.mrcieu.ac.uk/datasets/ebi-a-GCST90018855/>）包含 15 654 例病例和 379 986 例对照，研究对象均为欧洲人群，共 24 146 037 个单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms, SNPs），原始数据来自 2021 年 Sakaue 等^[16]发表的文章；PBC 的数据（ebi-a-GCST90061440, <https://gwas.mrcieu.ac.uk/datasets/ebi-a-GCST90061440/>）包含 8 021 例病例和 16 489 例对照，研究对象均为欧洲人群，共 5 004 018 个 SNPs，原始数据来自 2021 年 Cordell 等^[17]发表的文章。本研究数据均来自公开数据库，原始研究已进行伦理声明。

1.2 IVs 筛选条件 MR 分析中选择作为 IVs 的遗传变异需要满足 3 个假设：（1）相关性假设，遗传变异需与暴露因素强相关；（2）独立性假设，遗传变异与潜在混杂因素不相关；（3）排他性假设，遗传变异仅通过暴露因素影响结局（图 1）。

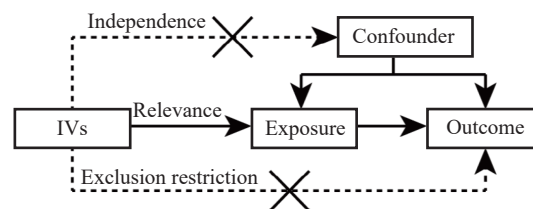


图 1 孟德尔随机化模型 3 个核心假设
Figure 1 Three core hypotheses of Mendelian randomization model

基于 MR 分析的 3 个假设，本研究筛选 IVs 的标准如下：（1）设定全基因组显著性（ $P < 1 \times 10^{-7}$ ）^[18]，以保证纳入更多与暴露强相关的 IVs；统计量 $F > 10$ ，以排除弱 IVs^[19]；反向因果研究中除全基因组显著性（ $P < 5 \times 10^{-8}$ ）不同，其余条件相同。（2）协调暴露与结局的等位基因

和效应,在结局中匹配(1)中筛选的 SNPs,去掉不重合及回文 SNPs;(3)设置 $r^2 < 0.001$, kb=10 000,去除连锁不平衡的 SNPs^[8,20]。

1.3 TSMR 和敏感性分析 以 HT 为暴露因素,以 PBC 为结局,采用 TSMR 方法,探究二者的因果关联。采用基于不同假设的 5 种 MR 方法,以逆方差加权法(inverse-variance weighed, IVW)为主要分析方法,结合 MR Egger 回归法、加权中位数法(weighted median, WME)、简单模式法(simple mode, SM)和加权模式法(weighted mode, WM)对结果进行解释^[20]。

采用留一法、异质性检验(Cochran's Q 检验)、水平多效性检验(MR-Egger intercept)等敏感性分析对结果的可靠性和稳定性进行评估。当存在异质性时,主要参考随机效应 IVW(random-effects inverse-variance weighed, rIVW)的结论;当存在水平多效性时,主要参考 MR Egger 回归法的结果。

1.4 统计学处理 采用 R 4.2.2 中的 TwoSampleMR 包(版本 0.5.10)^[15,21]进行 MR 分析和统计学分析。主要参考 rIVW 结果,当结果存在显著性($P < 0.05$, OR 值的 95%CI 不包括 0),且不存在水平多效性,初步认为暴露因素和结局存在显著的因果关联。留一法中,如果某一种 SNP 的改变导致主效应方向改变,则认为该 SNP 为离群值,予以去除。Cochran's Q 检验中, $P < 0.05$ 认为存在异质性;水平多效性检验中,Egger 截距与 0 差异显著($P < 0.05$),认为存在水平多效性^[8-9,20]。

2 结果

2.1 IVs SNPs 的筛选结果 从 IEU OpenGWAS project 数据库下载汇总水平的 HT 的 SNPs 数据,根据全基因组显著性($P < 1 \times 10^{-7}$)和 F 阈值(> 10),筛选与 HT 高度相关的 SNPs。去除连锁不平衡后,15 个 SNPs 通过初筛,其中 10 个同时存在于 PBC 中。协调暴露和结局的等位基因和效应后,剔除 3 个回文 SNPs,最终纳入 7 个 SNPs(图 2)。

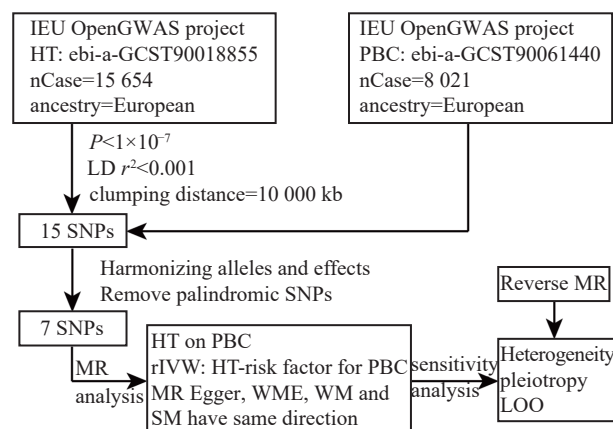


图2 孟德尔随机化分析流程

Figure 2 Process of Mendelian randomization analysis

HT: Hashimoto thyroiditis; PBC: primary biliary cholangitis; LD: linkage disequilibrium; SNPs: single nucleotide polymorphisms; MR: Mendelian randomization; rIVW: random-effects inverse-variance weighed; WME: weighted median; WM: weighted mode; SM: simple mode; LOO: leave-one-out.

2.2 HT 与 PBC 因果关联的 MR 分析 使用 rIVW、MR Egger、WME、SM 和 WM 5 种方法进行 MR 分析,以 rIVW 方法为主,结合其余 4 种方法解释结果。rIVW 的结果显示,HT 与 PBC 存在因果关联,HT 是 PBC 发生的危险因素($\beta = 0.617$, OR=1.853, 95%CI 1.241~2.768, $P = 0.003$)。MR Egger($\beta = 0.306$, $P = 0.599$)、WME($\beta = 0.363$, $P < 0.001$)、SM($\beta = 0.307$, $P = 0.045$)和 WM($\beta = 0.289$, $P = 0.019$)的效应方向相同(图 3),其中,WME、SM、WM 的结果差异有统计学意义,验证了 rIVW 的结果(图 4)。

2.3 敏感性分析 留一法分析结果显示:纳入分析的 7 个 SNPs 中,分别进行逐一去除后,总体效应与总效应之间差异无统计学意义(图 5),提示所有的 SNPs 无离群效应。Cochran's Q 检验(表 1)显示:MR Egger 及 rIVW 分析存在异质性($P < 0.001$),因此以 rIVW 分析结果为主要参考结果。MR Egger 截距检验结果(Egger intercept=0.0543, $P = 0.561$)显示,IVs 之间无显著水平多效性,表明结果不受基因多效性影响,验证了 rIVW 结果的稳定性。

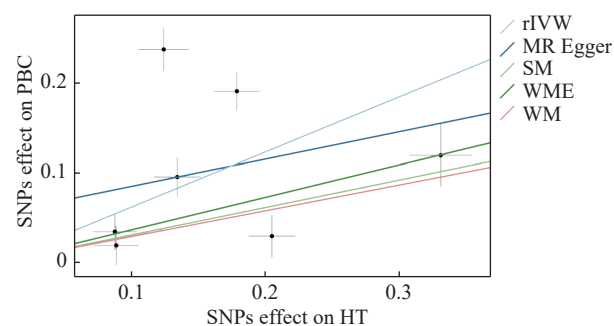


图3 HT与PBC因果效应的5种MR模型散点图
Figure 3 Scatter plots of five MR models of effect of HT on PBC

SNPs: single nucleotide polymorphisms; HT: Hashimoto thyroiditis; PBC: primary biliary cholangitis; rIVW: random-effects inverse-variance weighted; SM: simple mode; WME: weighted median; WM: weighted mode.

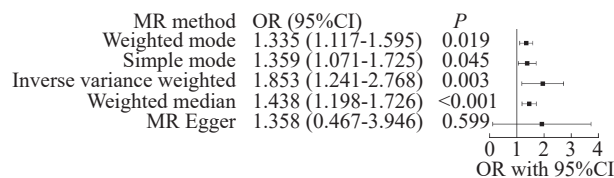


图4 HT对PBC因果效应的MR分析结果
Figure 4 Results of MR analysis of effect of HT on PBC

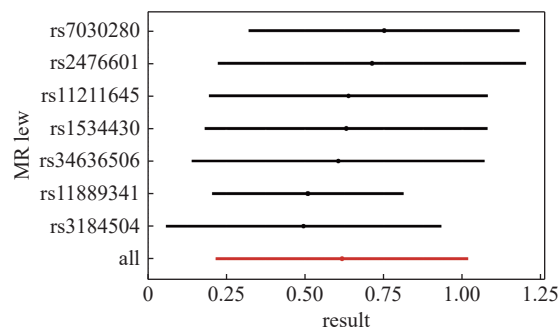


图5 HT与PBC因果效应的MR分析结果的留一法敏感性分析

Figure 5 Leave-one-out sensitivity analysis of MR analysis of effect of HT on PBC

表1 rIVW和MR Egger方法的Cochran's Q检验

Table 1 Cochran's Q test for rIVW and MR Egger methods

Exposure	Outcome	Method	Q	Q df	Q pval
HT	PBC	MR Egger	76.433 66	5	4.67×10 ⁻¹⁵
HT	PBC	rIVW	82.356 62	6	1.16×10 ⁻¹⁵

rIVW: random-effects inverse-variance weighted; HT: Hashimoto thyroiditis; PBC: primary biliary cholangitis.

质性水平多效性检验,因此暂不能认为PBC是HT的危险因素。

3 讨论

Floreani等^[22-23]的观察性研究报道了甲状腺功能降低与PBC的并发情况。此外,干燥综合征、系统性硬化、类风湿关节炎、狼疮等自身免疫性疾病,也常与PBC并发^[24]。HT作为自身免疫性甲状腺疾病中最常见的类型,可能与PBC存在共同的自身免疫病因。当肝脏和甲状腺中存在自身反应性T细胞或类似的上皮抗原时,抗甲状腺自身抗体表现出交叉反应性^[25]。甲状腺激素对器官的发育和功能代谢都起着至关重要的作用,特别是对肝脏脂质、胆固醇和糖类代谢的调节^[26]。研究^[27]表明,甲状腺功能降低会导致肝硬化,而HT-PBC轴是其中一条可能的路径,但分子机制仍需进一步明确。本研究表明,HT是PBC的危险因素。

本研究通过反向MR的方法,探讨PBC对HT的因果关联,但结果尚不能提供PBC增加HT风险的证据。然而,既往有研究显示PBC可能影响甲状腺功能:Garber等^[28]指出,PBC可导致甲状腺功能轻度降低,表现为促甲状腺激素轻度升高;另一项MR研究^[9]也证实了PBC是甲状腺功能降低的危险因素;此外,PBC引起的肝损伤可通过D3酶影响甲状腺激素活性,也可以通过改变Y蛋白的含量影响下丘脑-垂体-甲状腺素轴,同时影响循环中甲状腺素含量^[9]。随着对PBC和HT深入的GWAS研究,未来预计会发现更多的IVs,用以佐证PBC与HT的因果关系。分子生物学和动物模型的建立也将有助于更深入解析两种疾病之间的关联机制。

自身免疫疾病的致病机制尚未明确,疾病之间的内在联系也十分复杂,且难以开展随机对照试验。本研究的优势在于使用IVs,采用TSMR的方法,最大限度减少混杂因素对试验结果的影响,同时排除水平多效性的影响,利用rIVW处理异质性,从而获得稳定的结论。同时,本研究在增加PBC风险的泛甲状腺功能降低疾病谱中缩小了范围,揭示了潜在的HT-PBC路径。

2.4 反向MR 反向MR显示:IVs未能通过异

本研究也存在一定局限性：（1）为了获得足够的 IVs，筛选相关性的 P 值未达到公认的数值（ $P < 5 \times 10^{-8}$ ），未来将纳入更大的样本量以解决该问题；（2）本研究对象为欧洲人群，结果对于其他人群的适用性可能有限；（3）尚缺乏机制研究。

综上所述，本研究采用 TSMR 方法，发现 HT 是 PBC 的危险因素，为 HT 和 PBC 之间的因果关联研究提供了新的依据和思路。期待后续能从分子层面深入探讨两种疾病的关联。

伦理声明 本研究数据均来自公开数据库，原始研究已进行伦理声明。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献 刘羽鸣：收集、分析数据，撰写论文；高强：研究设计，修改论文。

参考文献

- [1] LU M, ZHOU Y R, HALLER I V, et al. Increasing prevalence of primary biliary cholangitis and reduced mortality with treatment[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2018, 16(8): 1342-1350.
- [2] TRIVEDI P J, HIRSCHFIELD G M. Recent advances in clinical practice: epidemiology of autoimmune liver diseases[J]. Gut, 2021, 70(10): 1989-2003.
- [3] MELLIS G F, PELLIS G, NEWTON J L, et al. Impact of primary biliary cirrhosis on perceived quality of life: the UK-PBC national study[J]. Hepatology, 2013, 58(1): 273-283.
- [4] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: the diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis[J]. J Hepatol, 2017, 67(1): 145-172.
- [5] LINDOR K D, BOWLUS C L, BOYER J, et al. Primary biliary cholangitis: 2018 practice guidance from the American Association for the study of liver diseases[J]. Hepatology, 2019, 69(1): 394-419.
- [6] TRIVEDI P J, LAMMERS W J, VAN BUUREN H R, et al. Stratification of hepatocellular carcinoma risk in primary biliary cirrhosis: a multicentre international study[J]. Gut, 2016, 65(2): 321-329.
- [7] CAREY E J, ALI A H, LINDOR K D. Primary biliary cirrhosis[J]. Lancet, 2015, 386(10003): 1565-1575.
- [8] WANG Y J, GUO P, ZHANG Y N, et al. Joint analysis of genetic correlation, Mendelian randomization and colocalization highlights the bi-directional causal association between hypothyroidism and primary biliary cirrhosis[J]. Front Genet, 2021, 12: 753352.
- [9] HUANG P, HOU Y Q, ZOU Y X, et al. The causal effects of primary biliary cholangitis on thyroid dysfunction: a two-sample Mendelian randomization study[J]. Front Genet, 2021, 12: 791778.
- [10] BRAGA M H, CANÇADO G G L, BITTENCOURT P L, et al. Risk factors for cancer in patients with primary biliary cholangitis and autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis overlap syndrome[J]. Ann Hepatol, 2023, 28(4): 101105.
- [11] ZHANG L L, ZI L L, KUANG T R, et al. Investigating causal associations among gut microbiota, metabolites, and liver diseases: a Mendelian randomization study[J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1159148.
- [12] MO X B, GUO Y F, QIAN Q Y, et al. Mendelian randomization analysis revealed potential causal factors for systemic lupus erythematosus[J]. Immunology, 2020, 159(3): 279-288.
- [13] YUAN S, LI X, LIN A, et al. Interleukins and rheumatoid arthritis: bi-directional Mendelian randomization investigation[J]. Semin Arthritis Rheum, 2022, 53: 151958.
- [14] ELSWORTH B, LYON M, ALEXANDER T, et al. The MRC IEU OpenGWAS data infrastructure[EB/OL]. [2024-04-01]. <https://doi.org/10.1101/2020.08.10.244293>.
- [15] HEMANI G, ZHENG J, ELSWORTH B, et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome[J]. Elife, 2018, 7: e34408.
- [16] SAKAUE S, KANAI M, TANIGAWA Y, et al. A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes[J]. Nat Genet, 2021, 53(10): 1415-1424.
- [17] CORDELL H J, FRYETT J J, UENO K, et al. An international genome-wide meta-analysis of primary biliary cholangitis: novel risk loci and candidate drugs[J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 572-581.
- [18] CHOI K W, CHEN C, STEIN M B, et al. Assessment of bidirectional relationships between physical activity and depression among adults: a 2-sample Mendelian randomization study[J]. JAMA Psychiatry, 2019, 76(4): 399-408.
- [19] BURGESS S, THOMPSON S G. Mendelian randomization: methods for causal inference using genetic variants[M]. New York: Chapman and Hall, 2021.

- [20] 郭玉梦, 崔杨霖, 张宪忠. 基于孟德尔随机化探讨肠道菌群与失眠的因果关联研究[J]. 中国全科医学, 2024.
- GUO Y M, CUI Y L, ZHANG X Z. Study on the causal relationship between intestinal flora and insomnia based on Mendelian randomization[J]. Chin Gen Pract, 2024.
- [21] HEMANI G, TILLING K, DAVEY SMITH G. Orienting the causal relationship between imprecisely measured traits using GWAS summary data[J]. PLoS Genet, 2017, 13(11): e1007081.
- [22] FLOREANI A, FRANCESCHET I, CAZZAGON N, et al. Extrahepatic autoimmune conditions associated with primary biliary cirrhosis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2015, 48(2-3): 192-197.
- [23] FLOREANI A, MANGINI C, REIG A, et al. Thyroid dysfunction in primary biliary cholangitis: a comparative study at two European centers[J]. Am J Gastroenterol, 2017, 112(1): 114-119.
- [24] NARCISO-SCHIAVON J L, SCHIAVON L L. To screen or not to screen? Celiac antibodies in liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(5): 776-791.
- [25] CHALIFOUX S L, KONYN P G, CHOI G, et al. Extrahepatic manifestations of primary biliary cholangitis[J]. Gut Liver, 2017, 11(6): 771-780.
- [26] RITTER M J, AMANO I, HOLLENBERG A N. Thyroid hormone signaling and the liver[J]. Hepatology, 2020, 72(2): 742-752.
- [27] BANO A, CHAKER L, MUKA T, et al. Thyroid function and the risk of fibrosis of the liver, heart, and lung in humans: a systematic review and meta-analysis[J]. Thyroid, 2020, 30(6): 806-820.
- [28] GARBER J R, COBIN R H, GHARIB H, et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association[J]. Thyroid, 2012, 22(12): 1200-1235.
- [本文编辑] 殷悦

引用本文

刘羽鸣, 高 强. 桥本甲状腺炎与原发性胆汁性胆管炎的因果关联推论: 一项两样本孟德尔随机化研究[J]. 中国临床医学, 2024, 31(3): 445-450.

LIU Y M, GAO Q. Inference of the causal association between Hashimoto thyroiditis and primary biliary cholangitis: a two-sample Mendelian randomization study[J]. Chin J Clin Med, 2024, 31(3): 445-450.