

# 牙周炎和糖尿病视网膜病变的因果关系： 一项双向两样本孟德尔随机化分析

王叶青 李利彤 李伟绪 曹猛

空军军医大学口腔医院正畸科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 口腔系统重建与再生全国重点实验室, 陕西省口腔疾病临床医学研究中心, 西安 710032

通信作者: 曹猛, Email: 1307753550@qq.com

**【摘要】目的** 利用双向孟德尔随机化(MR)研究方法探索牙周炎与糖尿病视网膜病变(DR)之间的因果关联。**方法** 从来源于欧洲人群的全基因组关联研究(GWAS)数据库GLIDE和FinnGen中分别筛选与牙周炎和DR密切相关且相互独立的单核苷酸多态性(SNP)位点作为工具变量。采用逆方差加权(IVW)、加权中位数(WM)和MR-Egger回归分析方法进行两样本MR分析, 以比值比(OR)评价牙周炎和DR疾病风险之间的因果关联。采用Cochran's Q检验分析工具变量的异质性, 孟德尔随机多态性残差和离群值(MR-PRESSO)法检测SNP异常值, MR-Egger回归截距项分析基因的水平多效性, 留一法敏感性检测分析单个SNP对结果的影响, 从而验证结果的稳定性和可靠性。**结果** IVW分析结果不支持牙周炎与DR及其不同分期背景型糖尿病视网膜病变(BDR)和增殖型糖尿病视网膜病变(PDR)之间存在因果关联[OR<sub>DR</sub> = 1.006, 95% CI<sub>DR</sub> (0.945, 1.071), P<sub>DR</sub> = 0.852; OR<sub>BDR</sub> = 0.978, 95% CI<sub>BDR</sub> (0.862, 1.109), P<sub>BDR</sub> = 0.730; OR<sub>PDR</sub> = 0.996, 95% CI<sub>PDR</sub> (0.948, 1.046), P<sub>PDR</sub> = 0.869]。WM和MR-Egger分析所得结果与IVW法一致。采用Cochran's Q和MR-PRESSO检验表明纳入的工具变量SNP之间无显著异质性(P > 0.05); MR-Egger回归截距项显示纳入的SNP不存在多效性(P > 0.05); 留一法分析未发现显著影响结果的SNP。**结论** 基于欧洲人群的MR分析结果不支持牙周炎与DR之间存在双向因果关联。

**【关键词】** 牙周炎; 糖尿病视网膜病变; 孟德尔随机化分析; 全基因组关联研究; 多态性, 单核苷酸

**引用著录格式:** 王叶青, 李利彤, 李伟绪, 等. 牙周炎和糖尿病视网膜病变的因果关系: 一项双向两样本孟德尔随机化分析[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2024, 18(3): 160-168.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.03.004

## The causal association between periodontitis and diabetic retinopathy: A bidirectional two-sample mendelian randomization analysis

Wang Yeqing, Li Litong, Li Weixu, Cao Meng

Department of Orthodontics, School of Stomatology, Air Force Medical University, National Clinical Research Center for Oral Diseases, State Key Laboratory of Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, Shaanxi Clinical Research Center for Oral Diseases, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Cao Meng, Email: 1307753550@qq.com

**【Abstract】Objective** To evaluate the causal relationship between periodontitis and diabetic retinopathy (DR) with Mendelian randomization (MR) analysis. **Methods** Mutually independent SNP associated with periodontitis and DR were screened out separately from two Genome-wide association study (GWAS) databases (GLIDE and FinnGen) and selected as instrumental variables. A bidirectional two-sample mendelian randomization analysis was conducted with methods of inverse variance weighted (IVW), MR-Egger regression and weighted median (WM). The causal association between periodontitis and DR was estimated with odds ratios (OR). Cochran's Q test was employed to assess the heterogeneity between individual single nucleotide polymorphisms (SNP). Additionally, the Mendelian randomization pleiotropy residual sum and outlier (MR-PRESSO) test was used to detect SNP outliers. The MR-Egger

intercept test was used to assess the horizontal pleiotropy of SNP, and a leave-one-out sensitivity analysis was performed to examine the influence of individual SNP on the overall results. **Results** IVW did not support a causal relationship between periodontitis and DR and its different stages background diabetic retinopathy (PDR) and proliferative diabetic retinopathy (PDR) [ $OR_{DR} = 1.006, 95\% CI_{DR} (0.945, 1.071), P_{DR} = 0.852; OR_{BDR} = 0.978, 95\% CI_{BDR} (0.862, 1.109), P_{BDR} = 0.730; OR_{PDR} = 0.996, 95\% CI_{PDR} (0.948, 1.046), P_{PDR} = 0.869$ ]. The results of Cochran's  $Q$  test, MR-PRESSO, and the MR-Egger intercept test revealed no heterogeneity or horizontal pleiotropy among instrumental variables ( $P > 0.05$ ). Furthermore, the leave-one-out sensitivity analysis confirmed that individual SNP had no significant influence on the overall results. **Conclusion** This MR study did not support a bidirectional causal association between periodontitis and DR in European populations.

**【Key words】** Periodontitis; Diabetic Retinopathy; Mendelian randomization analysis; Genome-wide association study; Polymorphism, single nucleotide

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2024.03.004

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者终末器官损伤在眼部的表现,作为糖尿病最常见的严重微血管并发症之一,可导致不可逆的严重视力损害,也是成年工作人群中致盲的首要病因<sup>[1]</sup>。越来越多的证据表明,炎症可能是DR发生和发展的内在机制之一<sup>[2]</sup>。牙周炎作为一种发生在牙齿支持组织的复杂炎症性疾病,同时也与多种系统性疾病相关<sup>[3]</sup>。牙周炎与DR之间存在共同的影响因素例如高血糖、吸烟和肥胖等,以及相似的发生机制,包括微血管病变、氧化应激、炎症反应和脂质代谢异常等<sup>[4]</sup>。既往研究结果也显示,牙周炎可能是DR的独立危险因素<sup>[5]</sup>,牙周炎在DR早期更为常见<sup>[6]</sup>,并且DR与牙周炎严重程度呈正相关<sup>[7-9]</sup>。还有研究发现,牙周主要致病菌牙龈卟啉单胞菌可在视网膜色素上皮细胞内存活并进行分裂增殖<sup>[10]</sup>,血清牙龈卟啉单胞菌特异性IgG抗体水平与早期DR的风险呈正相关<sup>[11]</sup>。此外,牙周炎患者龈沟液内高血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平可继发影响血视网膜屏障的破坏和病理性新血管的形成,导致视网膜的破坏甚至脱落<sup>[12]</sup>,提示牙周炎可能是促进DR发展的危险因素。但以上结果主要来自观察性研究,易受偏倚、混杂因素和反向因果关系的影响,并且缺乏直接证据,对于牙周炎和DR间的因果关系尚无明确定论,仍有待进一步验证。

孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是一种以遗传变异为工具变量(instrumental variables, IVs)的因果推断法<sup>[13-14]</sup>,它利用遗传变异的分配随机性和时序优先性,有效克服了以上问题,成为一种新的备受关注的因果关系分析方法。近年来,大

规模全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)的广泛开展及相关数据的公开,越来越多的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与所调查的风险变量有令人信服的联系,研究人员可以方便地使用这些SNP作为工具变量开展孟德尔随机化研究,探究危险因素与复杂疾病之间的因果关系,并且近年来已在牙周炎的研究中取得了一系列进展<sup>[15]</sup>。本研究拟通过双向两样本孟德尔随机化(two-sample Mendelian randomization, TSMR)方法,探索牙周炎疾病和DR及其不同分期之间的潜在因果关系。

## 资料与方法

### 一、数据来源与研究设计

牙周炎相关的GWAS汇总数据分别来自牙科终点的基因-生活方式交互作用联盟(gene-lifestyle interactions in dental endpoints consortium, GLIDE)<sup>[16]</sup>的欧洲人群,牙周炎病例由疾病和预防中心/美国牙周学学会标准、社区牙周指数(community periodontal index, CPI)或参与者的牙周炎诊断报告进行定义分类,包括12 289例牙周炎病例和22 326例对照病例,数据可在<https://data.bris.ac.uk/data/dataset/2j2rqgzedx1q02oqbb4vmync2>网站获取。DR相关的GWAS汇总数据来自FinnGen数据库(<https://www.FinnGen.fi/en>)<sup>[17]</sup>的欧洲人群,DR病例根据医院出院登记的《国际疾病分类-修订9/10》标准确定。为了进一步评估因果效应的潜在异质性,将DR类型分为DR(包括14 584例和202 082例对照)及其不同分期:背景型糖尿病视网膜病变(background diabetic retinopathy, BDR;包括2 026例和204 208例

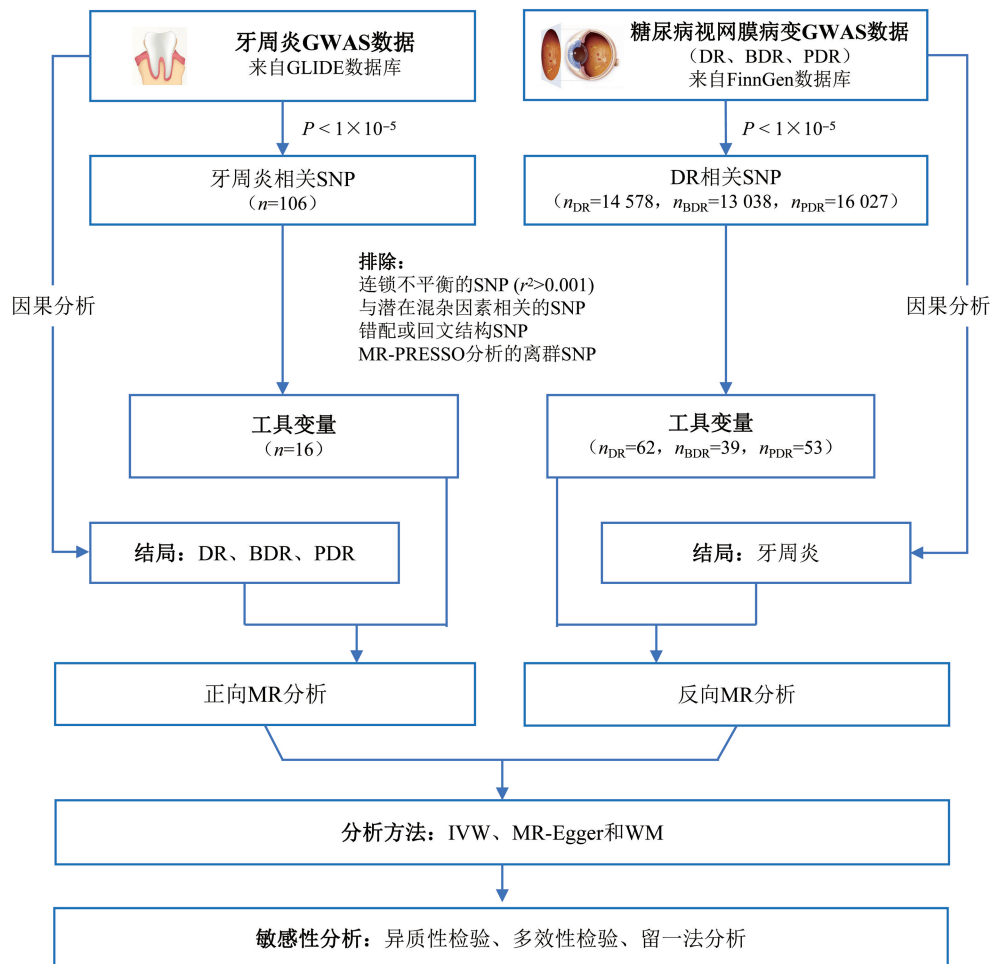
对照)和增殖型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR;包括8 681例和204 208例对照)。GWAS汇总数据的详细信息见表1,所纳入牙周炎和DR的原始队列之间无样本重叠,且均包含相应的伦理审批和患者的知情同意说明。

本研究使用双向TSMR分析以验证牙周炎和DR的因果关系:首先,以牙周炎作为暴露,DR、BDR和PDR分别作为结局进行正向MR分析;然后再分别以DR、BDR和PDR作为暴露,牙周炎作为结局进行反向MR分析(图1)。

表1 相关表型的全基因组关联研究数据信息

疾病	样本量(例)	数据库	人群来源	网址
牙周炎	病例:12 289 对照:22 326	GLIDE <sup>[16]</sup>	欧洲	<a href="https://data.bris.ac.uk/data/dataset/2j2rqgzexlq02oqbb4vmycnc2">https://data.bris.ac.uk/data/dataset/2j2rqgzexlq02oqbb4vmycnc2</a>
DR	病例:14 584 对照:202 082	FinnGen <sup>[17]</sup>	欧洲	<a href="https://www.FinnGen.fi/en">https://www.FinnGen.fi/en</a>
BDR	病例:2 026 对照:204 208	FinnGen <sup>[17]</sup>	欧洲	<a href="https://www.FinnGen.fi/en">https://www.FinnGen.fi/en</a>
PDR	病例:8 681 对照:204 208	FinnGen <sup>[17]</sup>	欧洲	<a href="https://www.FinnGen.fi/en">https://www.FinnGen.fi/en</a>

注:DR为糖尿病视网膜病变;BDR为背景型糖尿病视网膜病变;PDR为增殖型糖尿病视网膜病变。



注:本研究采用双向两样本孟德尔随机化方法分析牙周炎与糖尿病视网膜病变(DR)及其不同分期之间的因果关系。牙周炎的工具变量来自GLIDE数据库(<https://data.bris.ac.uk/data/dataset/2j2rqgzexlq02oqbb4vmycnc2>), DR的工具变量来源于FinnGen数据库(<https://www.FinnGen.fi/en>)。GWAS:全基因组关联研究;DR:糖尿病视网膜病变;BDR:背景型糖尿病视网膜病变;PDR:增殖型糖尿病视网膜病变;SNP:单核苷酸多态性;MR-PRESSO:孟德尔随机多态性残差和离群值;MR:孟德尔随机化;IVW:逆方差加权法;MR-Egger:MR-Egger回归法;WM:加权中位数法。

图1 双向两样本孟德尔随机化方法分析流程图

## 二、工具变量的筛选和验证

在GWAS数据集中筛选符合条件的SNP作为工具变量,MR分析所用工具变量的选择基于以下3个假设:(1)关联性,SNP与暴露因素之间强相关;(2)独立性,SNP与混杂因素之间是独立的;(3)排他性,SNP只能通过暴露因素对结局产生作用<sup>[13-14]</sup>。具体步骤如下:

1. 在暴露因素的GWAS数据集中筛选与表型关联性达到全基因组显著性水平的SNP,由于牙周炎数据集中达到全基因组显著性水平( $P < 1 \times 10^{-6}$ )的SNP很少,为了获得更稳健的结果,选择具有提示性全基因组显著性水平( $P < 1 \times 10^{-5}$ )的SNP作为工具变量。

2. 去除连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)的SNP<sup>[18]</sup>:以 $r^2 < 0.001$ ,遗传距离 $> 10$  Mb进一步筛选SNP,以保证纳入的SNP之间相互独立。

3. 确定SNP在结局数据集中的存在:将获得的SNP在结局数据集中进行验证,若结局数据集中无法找到该SNP,则通过LD代理数据库(<https://ldlink.nci.nih.gov>)搜索与该SNP存在强LD的替代SNP( $r^2 > 0.8$ ),在PhenoScanner数据库(<http://www.phenoscanner.medschl.cam.ac.uk/>)进行表型验证。若不符合条件,则删除该SNP。

4. 排除不明确的SNP和具有不可推断的正向链的回文结构SNP<sup>[19]</sup>。

5. 使用 $F$ 统计量来检验是否存在弱工具变量偏倚,弱工具变量是指对于在解释暴露方面效率较低的遗传变异,该变量与暴露仅建立了低强度的关联,若SNP的 $F > 10$ ,则说明弱工具变量出现的可能性较小<sup>[20]</sup>。 $F$ 的计算公式如下:

$$F = \frac{N-K-1}{K} \times \frac{R^2}{1-R^2}$$

其中, $N$ :暴露因素的样本量; $K$ :工具变量数目; $R^2$ :工具变量解释暴露的程度(回归方程的决定系数);

$$R^2 = \frac{2 \times \text{MAF}(1-\text{MAF}) \times \beta^2}{\text{SD}^2}$$

其中,MAF:效应等位基因频率; $\beta$ :等位基因的效应值;SD:标准误。

## 三、孟德尔随机化分析

采用逆方差加权(inverse variance weighted, IVW)、MR-Egger回归和加权中位数(weighted median, WM)方法评估牙周炎与DR、BDR和PDR之间的因果效应。IVW法将所有工具变量方差的倒

数作为权重进行拟合,是目前判断因果效应的最高标准<sup>[21]</sup>。MR-Egger法对加权线性回归进行修改,将截距解释为各SNP多效性效应估计值的平均值,斜率为暴露与结局因果效应的估计值<sup>[22]</sup>。WM法通过遗传变异对经验分布的贡献给每一个工具变量赋予权重,根据加权中位数对因果效应进行计算,减少无效工具变量对因果效应估计造成的影响,提供对因果效应的一致估计<sup>[23]</sup>。使用比值比(odds ratio, OR)及95%置信区间(confidence interval, CI)描述因果效应。

## 四、敏感性分析

对MR结果进行敏感性分析,进一步检验工具变量是否违背核心假设。

1. 异质性检验:工具变量的异质性可能来自人群、分析过程、实验等差异,从而对因果关系判别造成影响。使用IVW方法的Cochran's  $Q$ 检验评估SNP之间的异质性。若检验结果 $P > 0.05$ ,则认为工具变量的异质性不显著。采用孟德尔随机多态性残差和离群值(Mendelian randomization pleiotropy residual sum and outlier, MR-PRESSO)方法检测是否存在离群值,若存在离群值则将其剔除。

2. 水平多效性检验:采用MR-Egger回归的截距项检验水平多效性,避免违背排他性及独立性假设。当MR-Egger回归的截距趋近于0时,表示工具变量不存在水平多效性。

3. 留一法(leave-one-out):逐个剔除SNP,若SNP的分析结果与逆方差加权法合并值相近,可认为无特定SNP对分析结果产生显著影响。

## 五、统计学处理方法

数据分析和统计基于R软件(version 4.3.2)进行,MR分析使用TwoSampleMR包,水平多效性的检验应用MR-PRESSO包,相关森林图、散点图和漏斗图等的绘制应用Forstploter及TwoSampleMR包。对3个假设(1个暴露,3个结局)的检验进行Bonferroni校正(0.05/3)后,当 $P < 0.017$ 时,表示MR分析结果存在潜在的因果关系。

## 结 果

### 一、工具变量筛选结果

根据工具变量筛选标准,以牙周炎作为暴露从GLIDE数据库筛选出16个与牙周炎密切相关的SNP作为工具变量候选。分别以DR、BDR和PDR为暴露从FinnGen数据库筛选出62、39和53个SNP

作为工具变量候选。所有SNP的F统计量均大于10,排除了弱工具变量偏倚。表2~3列出部分SNP的相关信息。

二、牙周炎与糖尿病视网膜病变的双向因果效应分析

IVW结果显示,牙周炎与DR、BDR和PDR之间

表2 牙周炎作为暴露时所纳入的单核苷酸多态性(SNP)工具变量信息

SNP	chr	EA	OA	EAF	牙周炎			DR			BDR			PDR			F值
					$\beta$	SE	P值	$\beta$	SE	P值	$\beta$	SE	P值	$\beta$	SE	P值	
rs10143801	14	A	G	0.265	-0.084	0.017	$8.66 \times 10^{-7}$	0.008	0.017	0.651	0.059	0.035	0.085	0.010	0.014	0.463	24.131
rs13220384	6	A	C	0.120	0.108	0.024	$7.70 \times 10^{-6}$	0.009	0.026	0.732	0.075	0.052	0.151	0.001	0.021	0.980	20.100
rs138868497	11	T	C	0.010	1.639	0.332	$8.20 \times 10^{-7}$	0.015	0.071	0.834	-0.035	0.143	0.805	-0.013	0.056	0.821	24.304
rs139182625	16	T	C	0.136	0.102	0.023	$8.87 \times 10^{-6}$	-0.001	0.021	0.960	0.074	0.042	0.077	0.001	0.017	0.948	19.762
rs148287804	2	T	G	0.016	-0.383	0.085	$6.22 \times 10^{-6}$	-0.047	0.065	0.467	0.139	0.131	0.289	-0.029	0.051	0.568	20.436
rs151226594	11	T	G	0.018	-0.367	0.077	$1.75 \times 10^{-6}$	-0.043	0.057	0.453	-0.011	0.113	0.923	-0.047	0.045	0.297	22.848
rs17071023	3	C	G	0.020	-0.267	0.059	$6.58 \times 10^{-6}$	-0.008	0.031	0.801	-0.012	0.062	0.843	-0.001	0.024	0.963	20.334
rs184267209	12	A	G	0.026	0.246	0.055	$8.91 \times 10^{-6}$	0.001	0.048	0.990	-0.139	0.096	0.148	0.022	0.037	0.554	19.717
rs2921075	8	C	G	0.295	0.092	0.018	$5.44 \times 10^{-7}$	-0.013	0.023	0.575	-0.012	0.046	0.797	-0.006	0.018	0.725	25.055
rs35666676	1	A	C	0.102	0.124	0.028	$7.39 \times 10^{-6}$	0.017	0.026	0.508	0.067	0.052	0.197	0.000	0.021	0.991	20.039
rs3779291	7	T	C	0.140	-0.098	0.022	$7.11 \times 10^{-6}$	-0.016	0.026	0.530	0.053	0.052	0.310	-0.005	0.021	0.808	20.106
rs4811024	20	C	G	0.099	-0.134	0.029	$4.62 \times 10^{-6}$	0.010	0.032	0.765	0.031	0.065	0.637	0.001	0.025	0.960	20.965
rs72712882	9	A	G	0.085	-0.131	0.029	$5.84 \times 10^{-6}$	0.027	0.023	0.252	0.013	0.047	0.772	0.001	0.018	0.964	20.564
rs73155039	7	A	G	0.011	0.832	0.176	$2.22 \times 10^{-6}$	-0.030	0.105	0.775	0.072	0.209	0.730	-0.040	0.084	0.630	22.402
rs76734229	18	A	G	0.068	-0.176	0.037	$1.94 \times 10^{-6}$	0.008	0.029	0.790	0.032	0.058	0.577	0.008	0.023	0.730	22.652
rs9954920	18	T	C	0.337	0.077	0.016	$2.37 \times 10^{-6}$	-0.004	0.018	0.817	0.023	0.035	0.518	-0.011	0.014	0.429	22.258

注:chr为染色体;EA为效应等位基因;OA为非效应等位基因;EAF为效应等位基因频率; $\beta$ 为等位基因效应值;SE为 $\beta$ 的标准误;F为SNP的F统计量;DR为糖尿病视网膜病变;BDR为背景型糖尿病视网膜病变;PDR为增殖型糖尿病视网膜病变。

表3 糖尿病视网膜病变(DR)作为暴露时所纳入的部分单核苷酸多态性(SNP)工具变量信息

暴露	SNP	chr	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P值	牙周炎			F值
									$\beta$	SE	P值	
DR	rs10456405	6	G	T	0.177	-0.240	0.024	$2.154 \times 10^{-23}$	0.048	0.028	0.090	98.924
	rs111960990	6	G	T	0.015	-0.304	0.056	$6.346 \times 10^{-8}$	-0.245	0.129	0.057	29.260
	rs7805376	7	G	T	0.525	-0.075	0.017	$7.346 \times 10^{-6}$	-0.004	0.016	0.799	20.169
	.....											
	rs7903146	10	T	C	0.296	0.114	0.021	$2.817 \times 10^{-8}$	0.003	0.017	0.869	30.762
rs8059028	16	A	C	0.649	0.078	0.017	$4.300 \times 10^{-6}$	0.008	0.016	0.630	21.138	
BDR	rs10432241	18	A	G	0.802	-0.192	0.040	$1.678 \times 10^{-6}$	0.003	0.019	0.871	22.944
	rs10947458	6	T	C	0.253	-0.212	0.038	$1.718 \times 10^{-8}$	-0.006	0.019	0.752	31.850
	rs56175143	1	A	G	0.011	0.403	0.077	$1.382 \times 10^{-7}$	-0.011	0.179	0.950	27.779
	.....											
	rs7235737	18	C	T	0.020	0.638	0.143	$7.970 \times 10^{-6}$	0.065	0.127	0.607	19.939
rs7908691	10	G	T	0.639	0.154	0.035	$9.496 \times 10^{-6}$	0.009	0.016	0.580	19.609	
PDR	rs10456405	6	G	T	0.177	-0.167	0.019	$3.601 \times 10^{-19}$	0.048	0.028	0.090	80.228
	rs10490924	10	T	G	0.238	0.180	0.015	$6.858 \times 10^{-33}$	-0.034	0.019	0.067	142.415
	rs10922098	1	T	C	0.536	-0.085	0.013	$5.191 \times 10^{-11}$	-0.017	0.016	0.290	43.315
	.....											
	rs7260507	19	C	A	0.443	-0.076	0.013	$1.045 \times 10^{-8}$	0.031	0.018	0.097	32.911
rs72933464	11	A	G	0.044	-0.130	0.029	$5.837 \times 10^{-6}$	-0.001	0.047	0.992	20.534	

注:BDR为背景型糖尿病视网膜病变;PDR为增殖型糖尿病视网膜病变;chr为染色体;EA为效应等位基因;OA为非效应等位基因;EAF为效应等位基因频率; $\beta$ 为等位基因效应值;SE为 $\beta$ 的标准误;F为SNP的F统计量。

均无显著的因果关联[ $R_{DR} = 1.006, 95\% CI_{DR} (0.945, 1.071), P_{DR} = 0.852; OR_{BDR} = 0.978, 95\% CI_{BDR} (0.862, 1.109), P_{BDR} = 0.730; OR_{PDR} = 0.996, 95\% CI_{PDR} (0.948, 1.046), P_{PDR} = 0.869$ ]。反之,DR、BDR和PDR对牙周炎的因果效应亦无显著性[DR:  $OR_{DR} = 0.999, 95\% CI_{DR} (0.963, 1.037), P_{DR} = 0.963; OR_{BDR} = 0.1010, 95\% CI_{BDR} (0.985, 1.035), P_{BDR} = 0.432; OR_{PDR} = 0.1015, 95\% CI_{PDR} (0.960, 1.074), P_{PDR} = 0.599$ ]。MR-Egger、WM法分析所得结果与IVW法一致( $P > 0.017$ ,图2)。

三、敏感性分析

异质性分析方面,经Cochran's Q检验,各工具变量之间未见显著异质性( $P > 0.05$ );MR-PRESSO检验亦未发现纳入的SNP存在异常值( $P > 0.05$ ,表4)。

多效性分析方面,MR-Egger回归截距项显示各组截距接近0,且 $P > 0.05$ ,表明无水平多效性(表4)。留一法依次剔除各SNP,所得OR值与逆方差加权法的合并值相近,未发现单个SNP显著影响整体分析结果(图3),说明该MR分析结果是稳健的。

讨论

本研究通过双向两样本MR方法,分析牙周炎与DR及其不同分期BDR和PDR之间的因果关系,结果不支持牙周炎与DR存在因果关联。

既往许多研究显示:不仅DR与牙周炎严重程度呈正相关<sup>[7-9]</sup>,牙周炎与DR严重程度也明显相关<sup>[24]</sup>,但这些关联推断主要来自观察性研究,其真正的关

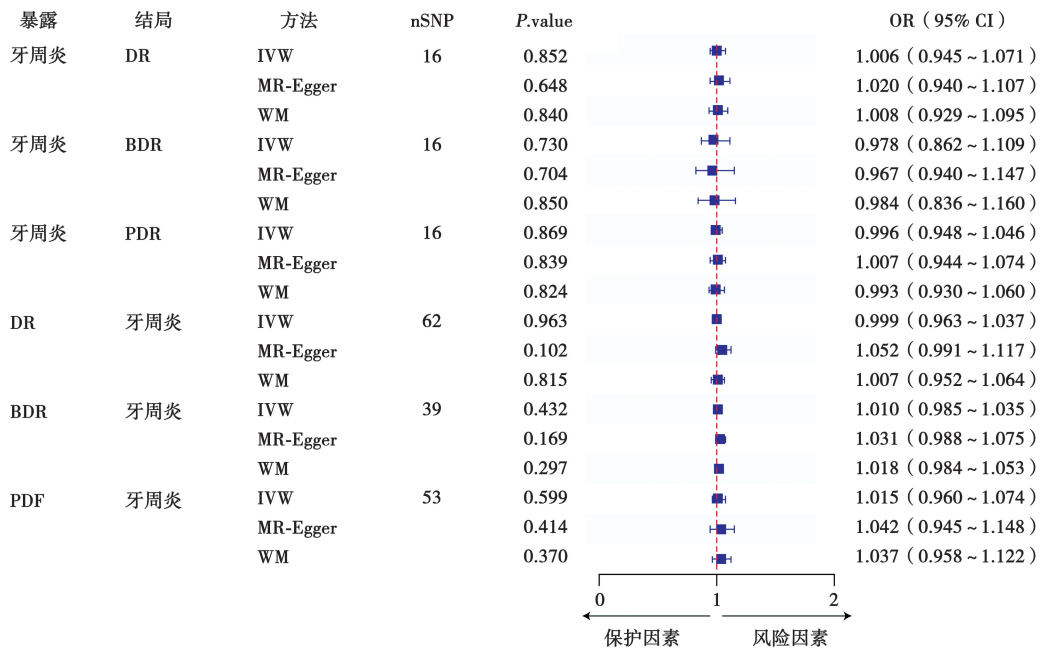


图2 3种不同方法获得的两样本孟德尔随机化(MR)估计值的森林图 森林图展示了MR不同方法的分析结果。蓝色方块代表暴露增加导致结局风险的比值比(OR),蓝色水平线表示估计值的95%置信区间(CI)。采用Bonferroni法校正检验水准,当 $P < 0.017$ 时,表示分析结果存在潜在的因果关系。nSNP:单核苷酸多态性位点数目;DR:糖尿病视网膜病变;BDR:背景型糖尿病视网膜病变;PDR:增殖型糖尿病视网膜病变;IVW:逆方差加权法;WM:加权中位数法。

表4 异质性和多效性检验

暴露	结局	Cochran's Q			MR-PRESSO	MR-Egger		
		Q值	df	P值	P值	截距	SE	P值
牙周炎	DR	2.486	5	0.779	0.996	0.009	0.010	0.427
	BDR	3.117	4	0.538	0.562	0.019	0.025	0.485
	PDR	0.005	5	0.962	0.998	0.006	0.013	0.642
DR	牙周炎	12.002	8	0.151	0.481	0.010	0.014	0.494
BDR	牙周炎	2.025	3	0.567	0.318	-0.022	0.020	0.390
PDR	牙周炎	5.698	9	0.770	0.159	0.012	0.013	0.395

注:MR-PRESSO为孟德尔随机多态性残差和离群值法;df为自由度;SE为标准误;DR为糖尿病视网膜病变;BDR为背景型糖尿病视网膜病变;PDR为增殖型糖尿病视网膜病变。

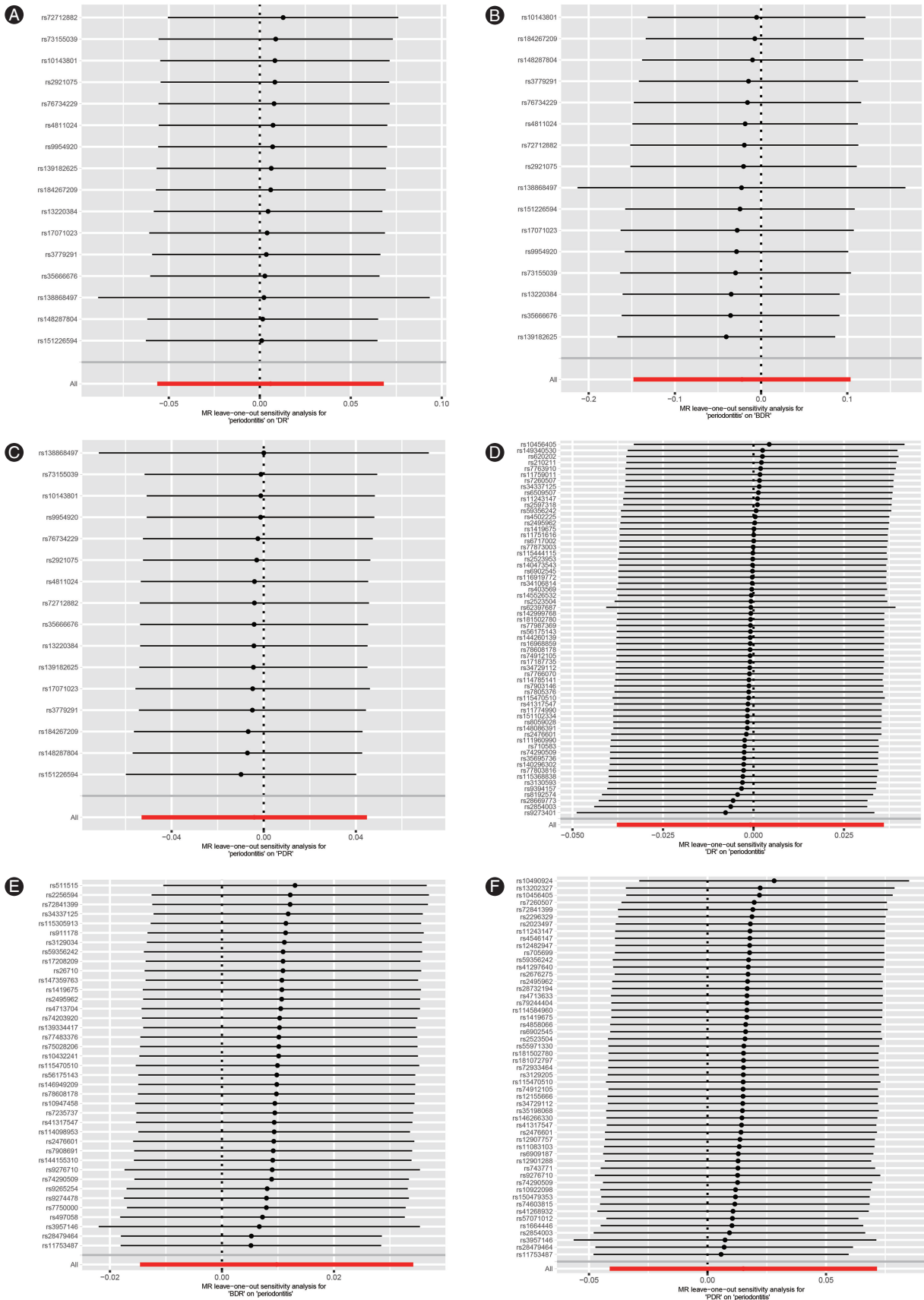


图3 留一法(leave-one-out)检验孟德尔随机化(MR)分析的敏感性 A~C:牙周炎作为暴露,糖尿病视网膜病变(DR)、背景型糖尿病视网膜病变(BDR)和增殖型糖尿病视网膜病变(PDR)依次作为结局;D~F:DR、BDR和PDR依次作为暴露,牙周炎作为结局。横坐标表示去除SNP后因果效应的置信区间;Periodontitis:牙周炎。

联模式和因果方向还未充分阐明。主要存在以下问题:(1)观察性研究样本量常有限,难以均衡多种混杂因素,并且存在反向因果效应,使因果分析的准确性大大降低<sup>[13-14]</sup>;(2)牙周炎与DR存在共同的危险因素<sup>[4]</sup>,可能作为混杂因素造成结果偏倚;(3)牙周炎与DR均为系统性疾病,受制于伦理要求,不适合开展长期随访的队列研究。本研究利用现有的GWAS数据结果,引入遗传变异作为工具变量,采用双向TSMR分析探究牙周炎与DR之间的因果关联,可以有效克服以上不足。首先,由于等位基因的分配特点,人群被天然随机地分为携带或不携带某种遗传变异的2个亚组,从而确保各亚组之间混杂因素的均衡。其次,基因和疾病之间的关联具有更合理的因果次序,不受反向因果关联所影响。最后,基于大样本GWAS数据,采用多个遗传变异作为工具变量,提升了MR方法的检验效能。为进一步评估因果效应的潜在异质性,本研究还将DR类型分为DR及其不同分期BDR和PDR。采用IVW、MR-Egger和WM 3种方法进行双向TSMR分析的结果一致,不支持牙周炎对DR、BDR或PDR有因果效应,也不支持DR、BDR或PDR对牙周炎的因果效应。采用Cochran's Q检验、MR-PRESSO检验、MR-Egger回归截距和留一法等多种敏感性分析方法,未发现纳入的SNP存在异质性和多效性,说明该MR分析结果是稳健的。

本研究获得的阴性结果与以往观察性研究不同,有几个可能的原因:(1)已有的牙周炎与DR之间相关性的研究尚存在不足,流行病学研究结果受到混杂因素、选择偏倚和反向因果的干扰;(2)MR模型假设暴露与结局之间呈线性相关,但牙周炎和DR发生、发展的机制复杂,也存在非线性相关的可能性<sup>[25]</sup>,使得3种线性MR方法未能探测到相应的阳性关联;(3)牙周炎和DR常与其他疾病共发,可能使两者产生间接关联,不能排除牙周炎和DR之间的相关性可能是一种伴随现象。但无论如何,本研究结果提示以往关于牙周炎和DR相关性的研究可能受到混杂因素干扰较多,临床层面还需谨慎审视其关联性背后的真正含义,两种疾病以分别防治为主。

本研究也存在一定的局限性。首先,由于研究数据都来自欧洲血统的人群,因此研究结果不能代表真正随机的人口样本,是否可向欧洲种族以外的人群推广仍待验证。其次,口腔领域的GWAS数据

的样本量普遍不足,在探索牙周炎对全身疾病的影响时常面临病例定义不统一,数据不完善,强相关的工具变量数量不足和SNP表型解释率低等问题,例如本研究就面临在阈值放宽至 $P < 1 \times 10^{-6}$ 的情况下仍筛选出很少有效SNP的问题。最后,尽管已进行了各种敏感性分析来验证MR研究的假设,但依然难以完全排除工具变量的水平多效性。因此,所得结果还需要基于更大规模、更为严谨的GWAS汇总数据,以及更多相关临床研究进行验证。

综上,至少在欧洲人群中,MR研究的结果不支持牙周炎和DR之间存在因果关系。随着生命多组学、遗传流行病学与统计学的快速发展,后续研究发现更多新的疾病相关的遗传变异,MR将可望在更广泛的人群中,在探索牙周炎和DR之间因果关系方面获得更可靠的结果。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王叶青、李利彤、李伟绪:实施研究、数据挖掘与分析、文章撰写;曹猛:研究指导、论文修改、经费支持

#### 参 考 文 献

- [1] Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy [J]. Prog Retin Eye Res, 2011, 30(5): 343-358. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.002.
- [2] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3(1): 1-14. DOI: 10.1038/nrdp.2017.38.
- [3] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843. DOI: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- [4] 李凤丹,陈敬儒,江银华. 牙周炎与糖尿病性视网膜病变相关性的研究进展 [J]. 口腔医学, 2023, 43(10): 939-944. DOI: 10.13591/j.cnki.kqyx.2023.10.015.
- [5] Park MS, Jeon J, Song TJ, et al. Association of periodontitis with microvascular complications of diabetes mellitus: A nationwide cohort study [J]. J Diabetes Complications, 2022, 36(2): 108107. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2021.108107.
- [6] Lindner M, Arefnia B, Ivastinovic D, et al. Association of periodontitis and diabetic macular edema in various stages of diabetic retinopathy [J]. Clin Oral Investig, 2022, 26(1): 505-512. DOI: 10.1007/s00784-021-04028-x.
- [7] Yamamoto Y, Morozumi T, Hirata T, et al. Effect of periodontal disease on diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients: A cross-sectional pilot study [J]. J Clin Med, 2020, 9(10): 3234. DOI: 10.3390/jcm9103234.
- [8] Tandon A, Kamath YS, Gopalkrishna P, et al. The association between diabetic retinopathy and periodontal disease [J]. Saudi J



- Ophthalmol, 2021, 34(3): 167-170. DOI: 10.4103/1319-4534.310412.
- [9] Alvarenga MOP, Miranda GHN, Ferreira RO, et al. Association between diabetic retinopathy and periodontitis—A systematic review[J]. Front Public Health, 2021, 8:550614. DOI: 10.3389/fpubh.2020.550614.
- [10] Arjunan P, Swaminathan R, Yuan J, et al. Invasion of human retinal pigment epithelial cells by porphyromonas gingivalis leading to vacuolar/cytosolic localization and autophagy dysfunction *in-vitro* [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7468. DOI: 10.1038/s41598-020-64449-8.
- [11] Chiu CJ, Chang ML, Kantarci A, et al. Exposure to porphyromonas gingivalis and modifiable risk factors modulate risk for early diabetic retinopathy [J]. Transl Vis Sci Technol, 2021, 10(2):23. DOI: 10.1167/tvst.10.2.23.
- [12] Arjunan P. Eye on the enigmatic link: Dysbiotic oral pathogens in ocular diseases; The flip side[J]. Int Rev Immunol, 2021, 40(6):409-432. DOI: 10.1080/08830185.2020.1845330.
- [13] Lawlor DA, Tilling K, Davey Smith G. Triangulation in aetiological epidemiology[J]. Int J Epidemiol, 2016, 45(6):1866-1886. DOI: 10.1093/ije/dyw314.
- [14] 林丽娟,魏永越,张汝阳,等. 孟德尔随机化方法在观察性研究因果推断中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(6):619-624. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.06.015.
- [15] 宋铖杰,边梦瑶,雷利红,等. 孟德尔随机化及其在牙周炎研究中的应用进展[J]. 中华口腔医学杂志, 2022, 57(10):1072-1078. DOI: 10.3760/cma.j.cn112144-20220228-00077.
- [16] Shungin D, Haworth S, Divaris K, et al. Genome-wide analysis of dental caries and periodontitis combining clinical and self-reported data [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2773. DOI: 10.1038/s41467-019-10630-1.
- [17] Kurki MI, Karjalainen J, Palta P, et al. FinnGen provides genetic insights from a well-phenotyped isolated population [J]. Nature, 2023, 613(7944): 508-518. DOI: 10.1038/s41586-022-05473-8.
- [18] 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. DOI: 10.7554/eLife.34408.
- [19] Hemani G, Tilling K, Davey Smith G. Orienting the causal relationship between imprecisely measured traits using GWAS summary data [J]. PLoS Genetics, 2017, 13(11): e1007081. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007081.
- [20] Burgess S, Thompson SG, CRP CHD Genetics Collaboration. Avoiding bias from weak instruments in Mendelian randomization studies [J]. Int J Epidemiol, 2011, 40(3): 755-764. DOI: 10.1093/ije/dyr036.
- [21] Bowden J, Holmes MV. Meta - analysis and Mendelian randomization: A review [J]. Res Synth Methods, 2019, 10(4): 486-496. DOI: 10.1002/jrsm.1346.
- [22] Burgess S, Thompson SG. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method [J]. Eur J Epidemiol, 2017, 32(5):377-389. DOI: 10.1007/s10654-017-0255-x.
- [23] 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):304-314. DOI: 10.1002/gepi.21965.
- [24] Noma H, Sakamoto I, Mochizuki H, et al. Relationship between periodontal disease and diabetic retinopathy [J]. Diabetes Care, 2004, 27(2):615. DOI: 10.2337/diacare.27.2.615.
- [25] Burgess S, Davies NM, Thompson SG, et al. Instrumental variable analysis with a nonlinear exposure-outcome relationship [J]. Epidemiology, 2014, 25(6): 877-885. DOI: 10.1097/EDE.000000000000161.

(收稿日期:2024-02-21)

(本文编辑:王嫚)