

骨质疏松症与牙周炎的因果关系： 一项两样本孟德尔随机化研究

陈跃圻 罗睿 向涵 余泳妍 余挺

广州医科大学附属口腔医院·广东省口腔组织修复与重建工程技术研究中心·广州市
口腔再生医学基础与应用研究重点实验室,广州 510182

通信作者:余挺,Email:dent_yu@163.com

【摘要】 目的 采用孟德尔随机化研究探索骨质疏松症与牙周炎是否存在因果关系。方法 从两个全基因组关联研究(GWAS)数据库(GEFOS,欧洲人, $n=142\ 487$;BBJ,东亚人, $n=212\ 453$)中筛选与骨质疏松症(暴露因素)密切相关且相互独立的单核苷酸多态性(SNP)位点。从另外两个GWAS数据库(GLIDE,欧洲人, $n=45\ 563$;BBJ,东亚人, $n=212\ 453$)获取牙周炎(结局事件)的SNP位点,选出与暴露因素对应的SNP作为工具变量。采用逆方差加权(IVW)、MR-Egger回归和加权中位数等方法进行两样本孟德尔随机化分析,以OR值评价骨质疏松症与牙周炎的因果关联。结果 从欧洲人群和东亚人群中筛出207和7个SNP。逆方差加权法不支持骨质疏松症与牙周炎存在因果关系(欧洲:OR=0.964, $P=0.281$;东亚:OR=0.892, $P=0.090$)。MR-Egger回归截距不为0,表明无遗传多效性(截距=0.000 3, $P=0.909$)。“leave-one-out”分析未发现特异性SNP。结论 针对欧洲和东亚人群的孟德尔随机化研究,不支持骨质疏松症与牙周炎存在因果关系。

【关键词】 牙周炎; 骨密度; 骨质疏松症; 孟德尔随机化

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515010497、2023A1515030037);广州市科技局基础研究计划市校(院)联合资助项目(2023A03J0324);广州医科大学口腔医学院本科生创新能力提升计划(广口医学[2022]3);广州医科大学本科教学质量工程项目(2021-28-2、2021-159-48、2022-124-1)

引用著录格式:陈跃圻,罗睿,向涵,等.骨质疏松症与牙周炎的因果关系:一项两样本孟德尔随机化研究[J/OL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2023,17(4):292-298.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.04.010

The causal association between osteoporosis and periodontitis: A two - sample Mendelian randomization study

Chen Yueqi, Luo Rui, Xiang Han, Yu Yongyan, Yu Ting

Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University · Guangdong Engineering Research Center of Oral Restoration and Reconstruction, Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research of Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, China

Corresponding author: Yu Ting, Email: dent_yu@163.com

【Abstract】 Objective To explore the causal relationship between osteoporosis and periodontitis with Mendelian randomization (MR) analysis. **Methods** Mutually independent SNPs associated with osteoporosis (exposure) were screened out from two Genome-wide association study (GWAS) databases (GEFOS, European, $n=142\ 487$; BBJ, East Asian, $n=212\ 453$). The SNP data on periodontitis (outcome) were obtained from another two GWAS databases and relevant SNPs corresponding to the exposure were selected as instrumental variables. Two - sample MR analysis was conducted with methods of inverse variance weighted (IVW), MR-Egger regression and weighted median. The causal association between osteoporosis and periodontitis was estimated with odds ratios. **Results** Totally 207 and 7 SNPs were screened out from European and East Asian populations, respectively. IVW did not support a causal

relationship between osteoporosis and periodontitis (European: odds ratio=0.964, $P=0.281$; East Asian: odds ratio=0.892, $P=0.090$). The intercept of MR-Egger regression was unequal to zero, suggesting there was no genetic pleiotropy (intercept=0.000 3, $P=0.909$). Specific SNP was not found with leave-one-out analysis. **Conclusion** MR study does not support a causal association between osteoporosis and periodontitis in European and East Asian populations.

【Key words】 Periodontitis; Bone mineral density; Osteoporosis; Mendelian randomization study

Fund programs: Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2022A1515010497, 2023A1515030037); Basic Research Program of Guangzhou Science and Technology Bureau (2023A03J0324); Fundings of School of Stomatology, Guangzhou Medical University for Improving Innovation Capability of Undergraduates (Guangkouyixue [2022]3); Undergraduate Teaching Quality and Teaching Reform Engineering Projects of Guangzhou Medical University (2021-28-2, 2021-159-48, 2022-124-1)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.04.010

牙周炎是一种具有系统性、感染性和炎症性的慢性疾病,可导致牙周组织破坏甚至失牙。牙周炎的破坏程度主要由宿主易感性决定。多种全身疾病,特别是炎症性疾病,可增加牙周炎易感性。调查显示,我国牙周炎的患病率超过70%^[1]。骨质疏松症是一种以骨密度降低、骨微结构破坏为特征的炎症性疾病,我国的患病率约24.62%^[2]。已有队列研究证实,骨质疏松症可能是牙周炎的潜在风险因素,然而由于牙周炎的诊断标准、年龄等偏倚,目前结论尚未统一^[3]。随机对照试验不能人为地将疾病和健康自由分配给实验组和对照组,只能对两种疾病的关联进行十分有限的探索。因此两种疾病的关联研究仍存在争议。

孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是新应用于医学领域的因果关联推断方法。MR将遗传变异作为工具变量,直接检验暴露因素与结局事件是否存在因果关系。其核心思想是孟德尔分离定律,即减数分裂时等位基因分离并独立遗传,相当于将疾病天然地随机分配给实验组,实验组与对照组的差异可归因于疾病易感性的差异。故MR能有效避免混杂因素和反向因果关系的影响。随着全基因组关联研究数据库公开,MR研究逐渐兴起,研究指南也已发表^[4]。在口腔领域,MR研究支持牙周炎与高血压等疾病存在因果关联^[5]。然而,骨质疏松症与牙周炎的MR研究仍缺乏,本研究运用两样本MR方法探索骨质疏松症与牙周炎的因果关系。

材料与方法

一、数据来源与研究设计

本研究对欧洲和东亚人群进行MR分析,探究

结果在不同人群的普适性。欧洲人群的骨质疏松症(以骨密度表征)全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)数据($n=142\ 487$)从骨质疏松症遗传因素研究联盟(Genetic Factors for Osteoporosis Consortium, GEFOS)数据库获得,该GWAS数据分析了17 166 351个与骨质疏松症相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点。牙周炎GWAS数据($n=45\ 563$)来源于基因与生活方式的相互作用和牙科端点(gene-lifestyle interaction and dental endpoint, GLIDE)数据库,分析了461 031个与牙周炎相关的SNP位点。东亚人群暴露($n=212\ 453$)和结局($n=178\ 726$)的GWAS数据均来源于日本生物银行(Biobank of Japan, BBJ)数据库。暴露因素与结局事件的GWAS数据的基本信息见表1。本研究采用MR分析,筛选与骨质疏松症密切相关且相互独立的SNP作为工具变量,检验骨质疏松症与牙周炎的因果效应,并对结果进行可靠性检验(图1)。

二、工具变量

筛选与骨质疏松症显著相关的SNP(欧洲: $P<5\times 10^{-8}$;东亚: $P<5\times 10^{-6}$),剔除存在连锁不平衡的SNP($r^2<0.001$, kb=10 000),以保证纳入的SNP之间相互独立。为查验所筛选的SNP是否存在水平多效性,将SNP上传至Phenoscanner(<http://www.phenoscanner.medschl.cam.ac.uk/>)网站进行检查,剔除5个与2型糖尿病、低密度脂蛋白、高血压及抽烟相关的SNP。最终筛选出207个(欧洲)和7个(东亚)与骨质疏松症显著相关的SNP作为工具变量。

1. 计算F统计量:检验是否存在弱工具变量偏倚,F统计量计算公式为

表1 两样本研究全基因组关联分析(GWAS)数据信息

人群	变量	下载文件名	样本量(人)	SNP位点(个)	数据库	缩写	年份
欧洲 ^a	骨密度	UKBB eBMD GWAS Data Release 2017	142 487	17 166 351	http://www.gefos.org/?q=content/ukbb-ebmd-gwas-data-release-2017	GEFOS	2017
	牙周炎	GWAS summary statistics for dental caries and periodontitis	45 563	461 031	https://data.bris.ac.uk/data/dataset/2j2rqgzedxlq02oqbb4vmcnc2	GLIDE	2019
东亚 ^b	骨质疏松症	Osteoporosis	212 453	-	https://jenger.riken.jp/result	BBJ	2021
	牙周病	Periodontal disease	178 726	-	https://pheweb.jp/pheno/Periodontal_Disease	BBJ	2021

注:^a欧洲人群以骨密度表征骨质疏松症,作为暴露因素;^b东亚人群的数据仅包含日本;GEFOS为骨质疏松症遗传因素研究联盟;GLIDE为基因与生活方式的相互作用和牙科端点;BBJ为日本生物银行;“-”为无数据。

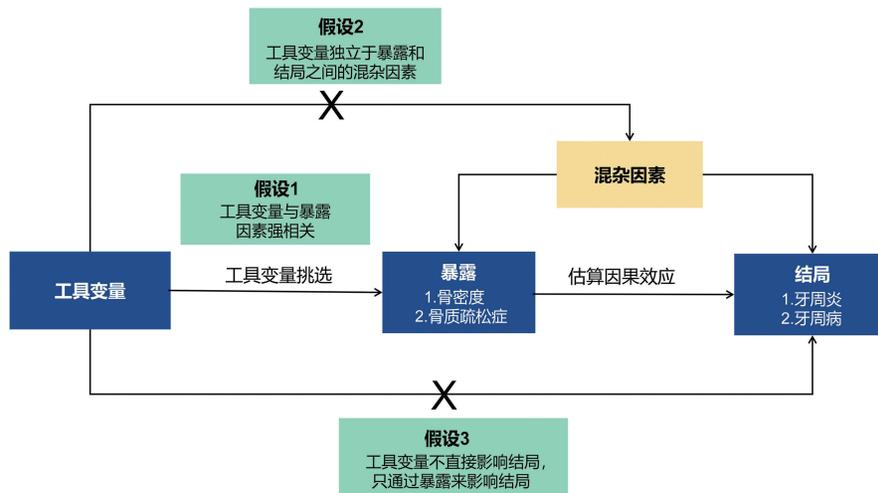


图1 骨质疏松与牙周炎因果关系的两样本孟德尔随机化设计

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

式中 N 为暴露因素的样本量; K 为工具变量数目; R^2 为工具变量解释的变异所占比例。

2. 计算 R^2 :即由遗传变异对暴露因素的贡献比, R^2 计算公式为

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

式中MAF为效应等位基因频率; β 为等位基因的效应值;SD为标准误。

若SNP的 $F > 10$, $R^2 > 0.15$,表明弱工具变量出现的可能性较小。

三、孟德尔随机化分析

本文主要使用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)估算骨质疏松症与牙周炎的因果效应。此外,采用加权中位数法(weighted median, WM)和MR-Egger回归法补充完善研究结果。IVW法是在工具变量均有效的前提下,忽略截距项,将所有遗传变异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。MR-Egger回归则不

忽略截距项,斜率为暴露与结局因果效应的估计值,截距是各SNP多效性效应估计值的平均值。在不同遗传变异所对应的估计精确度差异很大时,仅要求50%由遗传变异贡献的权重是有效的,加权中位数法仍能提供一致的估计效应。

四、敏感性分析

对MR结果进行敏感性分析,以检验工具变量是否违背核心假设,分析方法如下。

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法评估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。此外,采用MR-PRESSO方法检测是否存在离群值,若存在离群值则需要将其剔除。

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(Egger-intercept)趋近于0时,表示工具变量不存在水平多效性。

3. “leave-one-out”法:逐个别除SNP,计算剩余

SNP的分析结果,若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

以上统计学处理均使用软件 R 4.2.1 和 TwoSampleMR 包 version 0.5.6 实现。

结 果

一、弱工具变量检验

所有 SNP 的 $R^2 > 0.15$, $F > 10$, 表明不存在弱工具变量,也不会产生弱工具变量偏倚。表 2 列出部分 SNP 的相关信息。

二、分析结果

逆方差加权法结果不支持骨质疏松症与牙周炎的因果关系(欧洲:OR = 0.964, 95% CI = 0.902 ~ 1.030, $P = 0.281$; 东亚:OR = 0.892, 95% CI = 0.782 ~ 1.018, $P = 0.090$)。MR-Egger 回归、加权中位数法与逆方差加权法结果一致(表 3, 图 2 ~ 3)。

三、敏感性分析

1. 异质性检验:使用 Cochran's Q 方法和 MR-PRESSO 方法检验异质性(表 4)。Cochran's Q 方法(欧洲: $P = 0.282$; 东亚: $P = 0.423$)和 MR-PRESSO 方法(欧洲: $P = 0.287$; 东亚: $P = 0.443$)的结果均说明欧洲和东亚人群数据的检验结果不存在异质性。

表 2 单核苷酸多态性(SNP)工具变量信息表

人群	SNP	chr	EA	OA	EAF	骨质疏松症			牙周炎			R^2	F 值
						β	SE	P 值	β	SE	P 值		
欧洲	rs10022648	4	A	G	0.614	0.023	0.003	5.45×10^{-11}	-0.002	0.015	0.899	0.000 25	37.1
	rs10130587	14	G	C	0.594	-0.063	0.004	3.53×10^{-69}	0.012	0.016	0.472	0.001 91	286.7
	rs1013339	22	C	T	0.667	0.021	0.004	2.09×10^{-9}	0.009	0.015	0.566	0.000 21	30.8
	rs10139279	14	G	A	0.659	0.042	0.004	1.40×10^{-32}	-0.012	0.016	0.466	0.000 81	121.3
												
	rs9327301	5	G	A	0.743	0.024	0.004	6.29×10^{-10}	0.008	0.018	0.670	0.000 22	32.6
	rs884205	18	A	C	0.249	-0.033	0.004	2.76×10^{-17}	-0.005	0.018	0.800	0.000 41	61.9
	rs9524200	13	A	G	0.052	-0.046	0.008	2.46×10^{-9}	0.009	0.033	0.775	0.000 21	30.8
	rs9606139	22	G	A	0.890	0.114	0.006	1.06×10^{-93}	0.042	0.030	0.170	0.002 53	381.0
	合计 ^a											0.000 58	87.7
东亚	rs114207218	1	G	T	0.114	-0.138	0.030	4.47×10^{-6}	-0.025	0.026	0.340	0.003 83	817.8
	rs12525228	6	C	T	0.804	0.119	0.024	9.03×10^{-7}	-0.009	0.021	0.681	0.004 49	958.5
	rs1576901	9	A	T	0.714	0.096	0.020	1.47×10^{-6}	0.032	0.017	0.064	0.003 80	811.1
	rs2864700	1	C	T	0.762	0.144	0.028	2.23×10^{-7}	-0.044	0.023	0.050	0.007 55	1 615.3
	rs4635671	3	G	T	0.213	-0.103	0.022	3.41×10^{-6}	0.031	0.019	0.103	0.003 54	755.2
	rs73573476	19	G	A	0.739	0.238	0.050	1.91×10^{-6}	0.011	0.041	0.795	0.021 77	4 728.3
	rs77430782	19	C	T	0.729	0.101	0.022	4.86×10^{-6}	-0.019	0.019	0.318	0.004 01	855.6
	rs948367	11	C	T	0.175	-0.087	0.019	4.14×10^{-6}	0.008	0.016	0.629	0.002 19	465.9
	合计 ^a											0.006 40	1 376.0

注:SNP 为单核苷酸多态性;chr 为染色体;EA (effect allele) 为效应等位基因;OA (other allele) 为非效应等位基因;EAF (effect allele frequency) 为效应等位基因频率; β 为等位基因效应值;SE (standard error) 为 β 的标准误;^a 表示所有 SNP (包括表格内 SNP) 的 F 统计量及 R^2 的平均值。

表 3 孟德尔随机化(MR)分析结果

人群	结局	暴露因素	方法	OR	95% CI	P 值
欧洲	牙周炎	骨密度 ^a	IVW	0.964	0.902 ~ 1.030	0.281
			WM	0.986	0.886 ~ 1.097	0.797
			MR-Egger	0.896	0.781 ~ 1.027	0.117
东亚	牙周病	骨质疏松症	IVW	0.892	0.782 ~ 1.018	0.090
			WM	0.916	0.760 ~ 1.104	0.387
			MR-Egger	1.110	0.656 ~ 1.842	0.734

注:^a以骨密度表征骨质疏松症;IVW 为逆方差加权法;WM 为加权中位数法;MR-Egger 为 MR-Egger 回归。

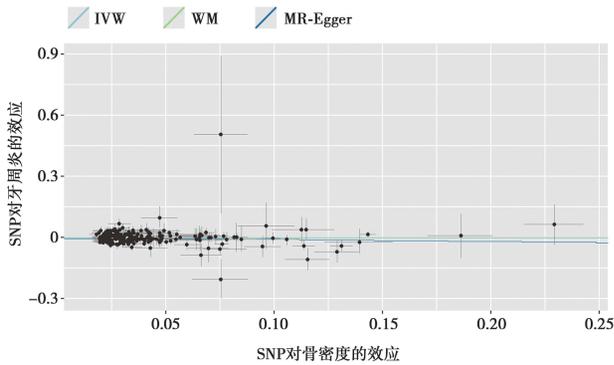


图2 欧洲人群两样本孟德尔随机化(MR)分析结果散点图 SNP为单核苷酸多态性;IVW为逆方差加权法;WM为加权中位数法;MR-Egger为MR-Egger回归。

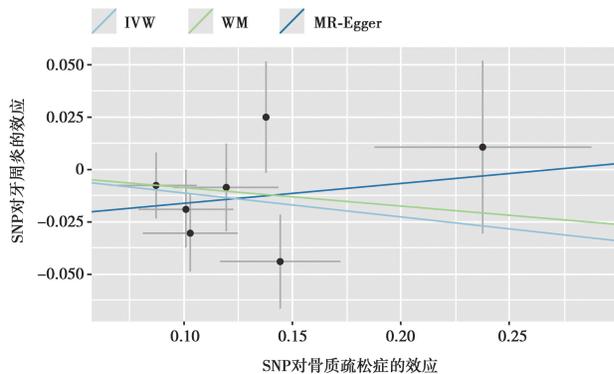


图3 东亚人群两样本孟德尔随机化(MR)分析结果散点图 SNP为单核苷酸多态性;IVW为逆方差加权法;WM为加权中位数法;MR-Egger为MR-Egger回归。

2. 多效性检验:两人群数据MR-Egger回归的截距与0之间差异不存在统计学意义(欧洲: $P=0.231$;东亚: $P=0.449$),不存在水平多效性,排他性假设成立(表5)。

3. “leave-one-out”法:依次剔除各SNP,所得OR值与逆方差加权法的合并值相近(图4~5),即剔除任意一个SNP都不会对分析结果产生显著影响,说明该MR分析结果是稳健的。

表4 异质性检验

人群	暴露因素	结局事件	Q 值	df	P 值
欧洲	骨密度	牙周炎	217.26	206	0.282
日本	骨质疏松症	牙周病	6.01	6	0.423

注:df为自由度。

表5 多效性检验

人群	暴露因素	结局事件	截距 \pm SE	P 值
欧洲	骨密度	牙周炎	0.003 3 \pm 0.002 7	0.231
日本	骨质疏松症	牙周病	-0.025 6 \pm 0.031 2	0.449

注:SE为标准误。

讨论

本研究首次通过MR方法分析骨质疏松症与牙周炎的因果关系,结果不支持两者存在因果关系。

骨质疏松症人群的牙周炎风险已得到大量研究证实,包括纵向研究、干预性研究及Meta分析。纵向研究跟踪时间一般为数月至数年,大部分研究的样本量仅有数百至数万人。鉴于较多研究支持骨质疏松症患者的牙周风险,相关纵向研究(特别是跟踪期长的)存在较高的伦理风险,即放任骨质疏松症不进行治疗。因此,大部分相关研究以回顾性研究为主,包括病例对照和横断面研究。但是,回顾性研究难以均衡多种混杂因素,研究证据级别不高。因此可以看到,相关回顾性研究的结果(OR)及方法异质性较大^[6]。不论是纵向研究还是回顾性研究,在纳入受试者时常有明显的性别偏向,如只纳入绝经后妇女。另外,大量临床研究受制于地区、国别及研究团队,样本量常有限。MR可以规避这种风险。此外,以往研究样本量有限,且纳入的对象主要为绝经后女性,有一定的性别倾向。本研究选用的GWAS样本量大,无明显的性别倾向。也有干预性研究针对牙周炎患者使用抗骨质疏松药(如双磷酸盐),探诊深度和附着丧失等指标有不同程度改善^[7]。但是,临床试验在设计无法对疾病组和对照组进行随机分配,样本量较小,结果也与干预时长有关。相比之下,本研究采用的MR分析方法能克服上述临床研究的诸多不足。第一,本研究使用的GWAS数据样本量足够大,囊括多个国家,研究结论适用整个种族。第二,MR分析以遗传变异为桥梁,分析下游两种以上表型之间的联系,理论上可规避已知的混杂因素。而且,遗传信息从始至终基本不变,相当于遗传变异施加的干预效应贯穿研究人群的整个生命周期。第三,本研究选择的GWAS数据库中的样本人群一般没有明显的性别倾向。基于MR研究的这些优势,本研究结果具有理论上的可靠性。本研究采用多种敏感性分析检验研究质量,确保分析结果足够稳健。另外,少数流行病学研究也未观察到骨质疏松症与牙周炎的相关性^[8]。因此,不排除相关临床研究可能存在发表偏倚问题,导致相关的研究结果更倾向于支持两种疾病存在关联。本研究以遗传变异作为工具变量,最大限度地排除后天混杂因素的干扰,理论上结果更加可靠。此外,本研究分析了欧洲和东亚两人

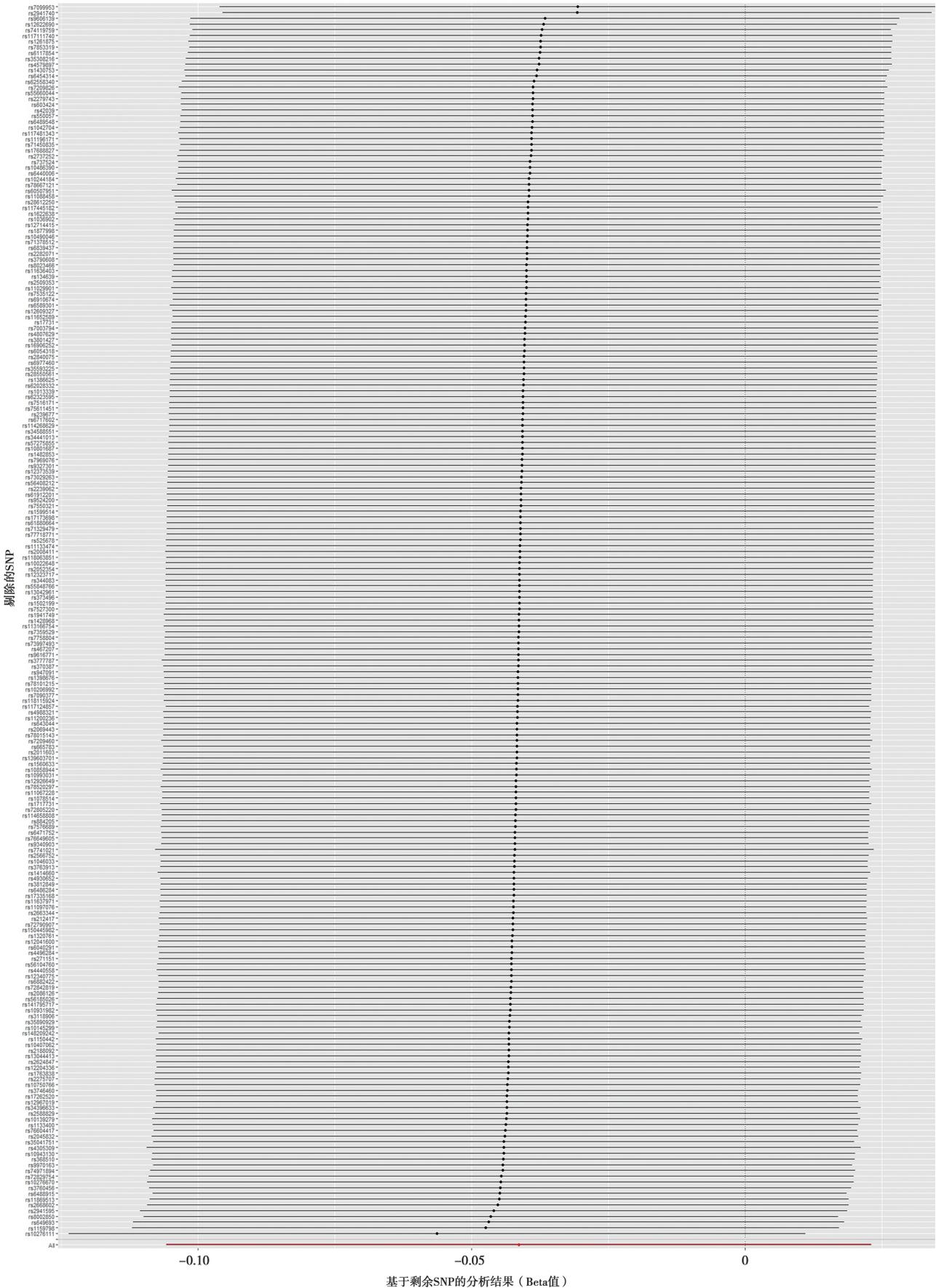


图4 欧洲人群“leave-one-out”敏感性分析结果 注:中心点均在0的左侧。

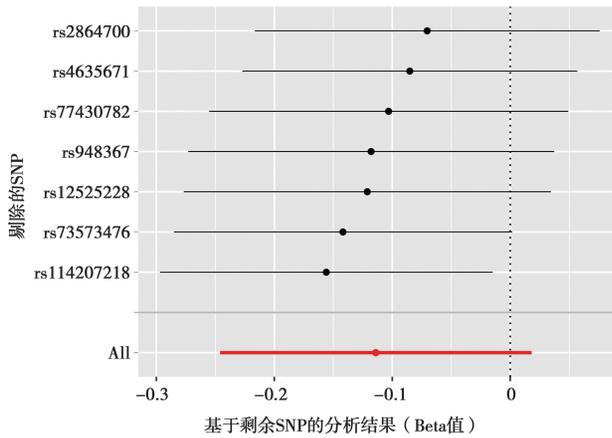


图5 东亚人群“leave-one-out”分析结果 注:中心点均在0左侧。

群,覆盖了全球1/3左右人口,然而结论可否外推至其他种群尚待验证。

本研究也存在一定的局限性。首先,口腔领域的GWAS数据的样本量普遍不足。本文选用的牙周炎GWAS数据的样本量较其他GWAS数据更大,但仍与其他领域的优质GWAS数据有一定差距。笔者曾对Neale lab、FinnGen、GWAS Catalog和IEU等网站来源的GWAS数据进行初步分析,这些GWAS数据存在样本量不足和(或)在阈值放宽($P < 5 \times 10^{-6}$)的情况下仍无法筛选出有效SNP的问题。因此,口腔领域亟待更多大样本、多种族的GWAS数据出现,以二次验证本文研究结论。其次,本研究的GWAS数据库纳入的研究中,牙周炎的诊断标准差别较大,遗传变异与牙周炎之间的联系可能受其影响。鉴于上述问题,仍需更多高质量及大样本的相关临床研究对本研究结论进行临床层面的验证。

综上,本研究得出结论,对于欧洲及东亚人群,MR研究不支持骨质疏松症和牙周炎之间存在因果关系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈跃圻、罗睿、向涵、余泳妍:数据挖掘、数据分析、论文撰写;余挺:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Jiao J, Jing W, Si Y, et al. The prevalence and severity of periodontal disease in Mainland China: Data from the Fourth National Oral Health Survey (2015 - 2016) [J]. J Clin Periodontol, 2021,48(2):168-179. DOI:10.1111/jcpe.13396.
- [2] Yu F, Xia W. The epidemiology of osteoporosis, associated fragility fractures, and management gap in China [J]. Arch Osteoporos, 2019,14(1):32. DOI:10.1007/s11657-018-0549-y.
- [3] Yu B, Wang CY. Osteoporosis and periodontal diseases—An update on their association and mechanistic links [J]. Periodontol 2000, 2022,89(1):99-113. DOI:10.1111/prd.12422.
- [4] Burgess S, Thompson SG. Mendelian randomization: Methods for using genetic variants in causal estimation [M]. New York: Chapman & Hall/CRC, 2015:210.
- [5] 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.
- [6] Xu S, Zhang G, Guo JF, et al. Associations between osteoporosis and risk of periodontitis: A pooled analysis of observational studies [J]. Oral Dis, 2021,27(2):357-369. DOI:10.1111/odi.13531.
- [7] Marjanovic EJ, Southern HN, Coates P, et al. Do patients with osteoporosis have an increased prevalence of periodontal disease? A cross-sectional study [J]. Osteoporos Int, 2013,24(7):1973-1979. DOI:10.1007/s00198-012-2246-9.
- [8] Akram Z, Abduljabbar T, Kellesarian SV, et al. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: A systematic review [J]. Br J Clin Pharmacol, 2017,83(3):444-454. DOI:10.1111/bcp.13147.

(收稿日期:2022-11-18)

(本文编辑:王嫒)