

肠道微生物与失眠之间的因果关系 ——一项两样本孟德尔随机化分析

郑雅丹¹, 李磊¹, 李洋¹, 夏翠宏¹, 黄茂茂^{1,2,3}, 胡月^{1,2,3}, 李丹^{1,2,3}, 胥章彧^{1,2,3}, 胥方元^{1,2,3}, 王剑雄^{1,2,3}

1.西南医科大学附属医院康复医学科,四川 泸州 646099;2.西南医科大学康复医学系,四川 泸州 646099;
3.康复医学与工程泸州市重点实验室,四川 泸州 646099

摘要:目的 利用两样本孟德尔随机化方法探讨肠道微生物与失眠之间的因果关系。方法 使用了来自 MiBioGen 联盟进行的最大的全基因组关联研究荟萃分析的肠道微生物群的汇总统计数据。失眠的汇总统计数据来自全基因组关联研究 GWAS:失眠测量。采用逆方差加权、MR-Egger、加权中位数、简单众数法和加权众数法来研究肠道微生物群与失眠之间的因果关系。通过一系列敏感性分析来评估结果的稳定性。结果 MR 分析显示柔膜菌纲($\beta=-0.86$, $OR=0.42$, $95\% CI:0.25 \sim 0.71$)和未知科($\beta=-0.86$, $OR=0.42$, $95\% CI:0.25 \sim 0.71$)对失眠具有保护作用。此外,本研究还发现了其他 14 个类群与失眠之间存在潜在因果关系 ($P<0.05$), 分别为草酸杆菌科 ($F=170.153$, $P=0.034$)、马文布赖恩特菌属($F=162.702$, $P=0.006$)、瘤胃球菌 UCG002 属($F=298.323$, $P=0.046$)、罕见小球菌属($F=198.442$, $P=0.045$)、厌氧棒状菌属($F=222.074$, $P=0.032$)、伽玛变形菌纲($F=91.816$, $P=0.006$)、巴斯德菌目($F=231.141$, $P=0.010$)、巴斯德菌科($F=231.141$, $P=0.010$)、毛螺菌科属($F=138.761$, $P=0.045$)、消化球菌属($F=287.210$, $P=0.036$)、活泼瘤胃球菌属($F=162.913$, $P=0.031$)、多尔属($F=112.086$, $P=0.049$)、解黄酮菌属($F=95.307$, $P=0.020$)及未知属($F=89.189$, $P=0.001$)。未检测到显著的异质性或多效性。结论 孟德尔随机化结果显示柔膜菌纲、未知科和其他 14 个类群与失眠有因果关系。肠道微生物可能成为改善失眠的治疗方法之一。

关键词:肠道微生物;失眠;孟德尔随机化

中图分类号:R256.23 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2024)07-1153-08

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202311112

Causal relationship between gut microbiota and insomnia: a two-sample Mendelian randomized analysis

ZHENG Ya-dan*, LI Lei, LI Yang, XIA Cui-hong, HUANG Mao-mao, HU Yue, LI Dan, XU Zhang-yu, XU Fang-yuan, WANG Jian-xiong

*Department of Rehabilitation Medicine, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

Abstract: Objective To investigate the causal relationship between gut microbiota and insomnia by two-sample Mendelian randomization analysis. **Methods** The summary statistics of gut microbiota came from a meta-analysis of the largest genome-wide association study conducted by the MiBioGen Alliance. The summary statistics for insomnia came from the genome-wide association study of insomnia measurement. Inverse variance weighted, MR-Egger, weighted median, simple mode method, and weighted mode method were used to study the causal relationship between gut microbiota and insomnia. The stability of the results was evaluated by a series of sensitivity analyses. **Results** MR analysis showed that soft membrane Mollicutes RF9 [$\beta=-0.86$, $OR(95\%CI):0.42(0.25-0.71)$] and unknown family [$\beta=-0.86$, $OR(95\%CI):0.42(0.25-0.71)$] had protective effect on insomnia. In addition, 14 other groups were found to be potentially causally associated with insomnia in this study including Oxalobacteraceae ($F=170.153$, $P=0.034$), Marvinbryantia ($F=162.702$, $P=0.006$), Ruminococcaceae UCG002 ($F=298.323$, $P=0.046$), Subdoligranulum($F=198.442$, $P=0.045$), Anaerostipes($F=222.074$, $P=0.032$), Gammaproteobacteria($F=91.816$, $P=0.006$), Pasteurellales ($F=231.141$, $P=0.010$), Lachnospiraceae UCG010 ($F=138.761$, $P=0.045$), Peptococcus ($F=287.210$, $P=0.036$), Ruminococcus gnavus group ($F=162.913$, $P=0.031$), Dorea ($F=112.086$, $P=0.049$), Flavonifractor ($F=95.307$, $P=0.020$), and unknown genus ($F=89.189$, $P=0.001$). No significant heterogeneity or pleiotropy was detected. **Conclusion** Mendelian randomization shows that the flexurales, unknown families, and 14 other taxa are causally related to insomnia. The gut microbiota may be one of the treatments to improve insomnia.

Keywords: Gut microbiota; Insomnia; Mendelian randomization

基金项目:四川省科学技术厅社会发展项目(23ZDYF2793);泸州科学技术和人才工作局重点研发项目(22097);合江县人民医院-西南医科大学一般项目(2021HJXNYD11)

作者简介:郑雅丹(1997—),女,硕士在读,研究方向:康复医学与理疗学

通信作者:王剑雄, E-mail: jianxiongwang_swmu@126.com

失眠(insomnia)是以频繁而持续入睡困难或睡眠维持困难并导致睡眠满意度不足为特征的睡眠障碍^[1],长期的失眠会导致患者出现焦虑、抑郁等精神症状,与多种慢性疾病的发生也有一定关联^[2]。据调查结果显示,21.3%的中青年^[3]和 51.3%的老年人群^[4]患有失眠症状。失眠通常与不良饮食习惯、昼夜节律、压力情绪、生活方式、疼痛炎症、以及慢性疾病等有关^[5]。近年来,大量研究发现,肠道微生物(gut microbiota)改变与睡眠之间可能存在相关性,J Bienenstock 等学者^[6]的研究证实了“微生物-肠-脑轴”的存在,“微生物-肠-脑轴”学说认为肠道内环境中微生物菌群的稳态与神经内分泌网络失调类疾病密切相关,“微生物-肠-脑轴”与睡眠生理和行为有关,肠道微生物失调可能是失眠的重要机制^[7]。除此之外,下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)轴也是失眠的关键影响因素,过度激活的 HPA 轴可能会导致失眠的发生,肠道微生物也能够影响 HPA 轴的发育及其功能^[8-9]。目前国内外关于失眠与肠道微生物有明确关系的研究报道相对较少,肠道微生物在失眠发病机制中的作用研究尚不充分,本次课题将在前人研究基础上探讨肠道微生物与失眠的相关性。

孟德尔随机化(Mendelian randomisation, MR)^[10]是一种采用遗传变异为工具变量的研究方法,可以有效降低因果关系估计值的偏倚,加强因果推断。遗传变异是先天获得并在受孕时随机分配,因此一种暴露通常与其他性状或环境因素无关,同随机对照试验中将

受试者随机分配至试验组和对照组相同,因而 MR 已经广泛应用于研究暴露与疾病的因果分析中,如:对失眠和抑郁症之间的因果关系进行 MR 分析提示失眠会导致患抑郁症风险升高,而抑郁症对失眠的效应不显著^[11]。研究显示,肠道微生物与失眠存在关联,但因果关系仍需进一步探究。因此,本研究拟利用两样本 MR 方法,探究肠道微生物和失眠的因果关系。

1 资料与方法

1.1 数据来源

本 MR 研究基于大规模全基因组关联研究(Genome-Wide Association Study, GWAS)汇总数据集。在所有这些相应的原始研究中,所有受试者都给予了知情同意,由于本研究只使用了摘要级统计数据,因此不需要额外的伦理批准。本研究选择了 211 个肠道微生物(131 属,35 科,20 目,16 个纲和 9 个门)作为暴露数据,暴露数据来源于 MiBioGen 联盟迄今为止发表的最大的肠道微生物群组成全基因组荟萃分析。微生物群的 GWAS 统计数据主要来自对来自 24 个队列的 14 306 个体的大规模多种族 GWAS meta 分析 <https://mibiogen.gcc.rug.nl/>。失眠的 GWAS 数据来自全基因组关联研究 GWAS:失眠测量(失眠的量化,例如失眠的发生频率和严重程度),利用当前最新、相关位点最多、包含样本量最大的欧洲人群数据集(nCase=1 402, nControl=485 225)的汇总统计数据^[12],其中共 486 627 例失眠患者,24 196 985 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)纳入本研究。见表 1。

表 1 分析中使用的全基因组关联研究和数据集的详细信息

Table 1 Details of the genome-wide association studies and datasets used in our analyses

暴露或结局	样本量	人群	SNPs	数据下载地址
肠道微生物	14 306	混合人群	122 110	https://mibiogen.gcc.rug.nl
失眠	486 627	欧洲人	24 196 985	https://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/gwas/summary_statistics/GCST90018001-GCST90019000/GCST90018869/

1.2 工具变量(instrumental variable, IV)的选择

本研究满足了 MR 分析的三个假设^[13]。(1)选择用于 MR 分析的 SNP 需要与所选微生物群密切相关。在本研究中,为了确保包括足够的工具变量,选择 P 值 $< 1 \times 10^{-5}$ 的 SNP 位点进行分析。通过将 SNP 连锁不平衡值(R^2)设置为 0.001,遗传距离设置为 10 000 kb,以消除连锁不平衡影响,Eaf 值小于 0.01 的也被排除在外。为了确保工具变量和暴露因子之间的稳健关联,使用不重叠的数据,尽量使用强的工具变量(F statistics),排除了具有 F 值的工具变量,公式为 $R^2/(R^2-1) \times [(N-K-1)/K] < 10$,其中 N 为肠道微生物数据库的样本量, K 为 SNP 的数量, R^2 代表肠道微生物由 SNP

解释的变异占比,计算公式 $R^2 = 2 \cdot (1-EAF) \cdot EAF \cdot \beta^2$,当 $F > 10$ 时,一般认为不存在工具变量的偏倚。(2)所选的工具变量必须独立于混杂因素,Phenoscanner 还用于排除与各种混杂因素相关的工具变量。(3)遗传变异只通过暴露而非其他途径影响结局,排除了与失眠相关的工具变量。以上工具变量的选择保证了研究结果的可靠性。

1.3 MR 分析

本研究主要采用逆方差加权(inverse variance weighted, IVW)作为此次分析的主要方法^[14]。IVW 法具有较强的因果检测能力,但是 IVW 法特别要求遗传变异仅通过研究中的暴露影响结局。尽管此研究尽可能排除了已知的与混杂相关的 SNP,然而

仍有许多未知的混杂因素可能会对结果产生偏倚。因此,本研究还采用了 MR-Egger 回归、简单众数法 (simple mode, SM)、加权中位数 (weighted median, WME) 和加权众数法 (weighted mode, WM) 4 种方法进行 MR 分析^[15-16]。MR-Egger 检验用于检查水平多效性。使用 MR-Egger 可以对是否存在水平多效性做出判断。如果 P 值大于 0.05, 则认为水平多效性不以统计显著的方式存在。WME 方法通过评估每个 SNP 与结果相关性的逆方差的权重, 充分利用所有可用的遗传变异的中间效应, 以得出估计值。采用众数为基础的方法, SM 和 WM 能够将具有类似因果效应的 SNP 聚集在一起, 并返回大部分聚类 SNP 的因果效应估计。在这个过程中, WM 会根据 SNP 对聚类的影响程度, 按照其结果效应的逆方差来加权处理。基于 Bonferroni 检验^[17], 不同分类群水平的显著性阈值设置为门 $P=0.0056$ (0.05/9), 纲 $P=0.0031$ (0.05/16), 目 $P=0.0025$ (0.05/20), 科 $P=0.0014$ (0.05/35), 属 $P=0.00038$ (0.05/131)。

1.4 敏感性分析 采用 Conchran Q 评估 SNP 间的异质性^[18]。如果存在显著的异质性 ($P \leq 0.05$), 则应采用随机效应模型, 否则应采用固定效应模型。Egger_intercept 检验进行水平多效性检验, 采用多种方法评价多效性: (1) 使用 MR-Egger 截距作为评价方向多效性的指标; (2) 使用“留一法”(leave-one-out) 对结果进行敏感性分析, 从而判断单个 SNP 对因果关系的影响程度。所有的统计分析方法均是在 R 软件版本 4.2.0 中的 Two Sample MR 包完成的。只有当所有 MR 方法都支持肠道微生物群与失眠之间的关联时, 才进行反向 MR 分析。流程见图 1。

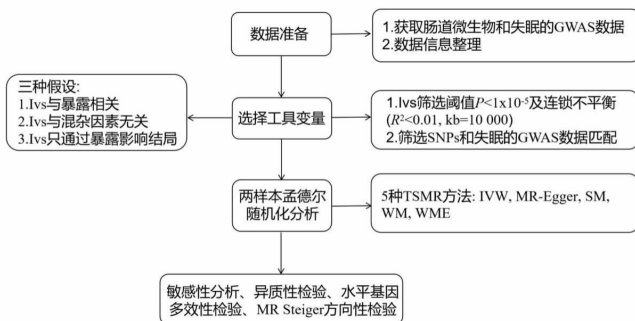


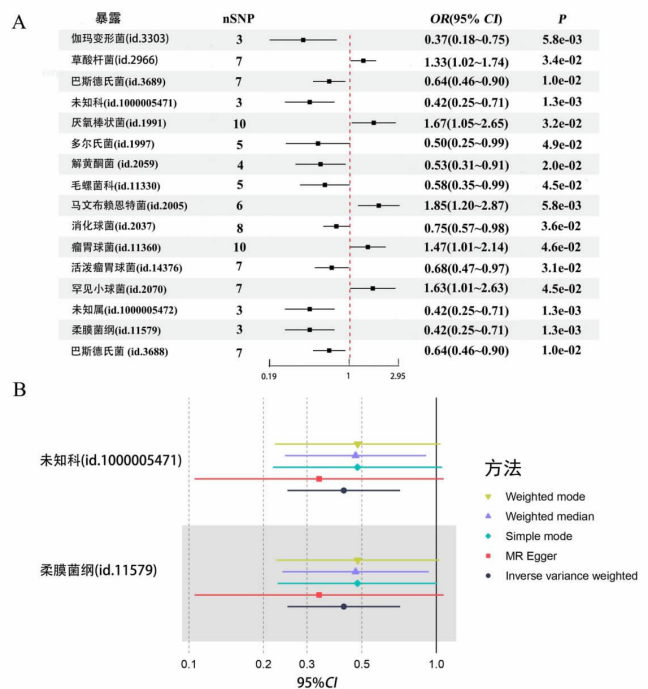
图 1 肠道微生物与失眠 MR 分析图

Figure 1 Mendelian randomization analysis of gut microbiota and insomnia

2 结果

2.1 MR 结果分析 211 种肠道微生物中, 根据 $P < 1 \times 10^{-5}$ 以及连锁不平衡分析的阈值等进行筛选, 得到不同的 SNP 数目, 所有 SNPs 与失眠发病风险强相关, 其 F 值均大于 10。在至少一种 MR 方法中发现共

有 16 种细菌被确定与失眠相关, 见表 2, 图 2、3。IVW 法结果显示, 纲水平: 伽玛变形菌 (id.3303) 与失眠风险降低有关; 目水平: 柔膜菌纲 (id.11579) 和巴斯德菌 (id.3688) 与失眠风险降低有关; 科水平: 未知科 (id.1000005471) 和巴斯德菌 (id.3689) 与失眠风险降低有关, 而草酸杆菌 (id.2966) 与失眠风险增加相关; 属水平: 毛螺菌科 (id.11330)、消化球菌 (id.2037)、活泼瘤胃球菌 (id.14376)、多尔菌 (id.1997)、解黄酮菌 (id.2059) 和未知属 (id.1000005472) 与失眠风险降低有关, 而马文布赖恩特菌 (id.2005)、瘤胃球菌 (id.11360)、罕见小球菌 (id.2070) 和厌氧棒状菌 (id.1991) 与失眠风险增加相关。应用 Bonferroni 校正后, 柔膜菌纲 RF9 目 (id.11579) ($\beta = -0.86$, $OR = 0.42$, $95\% CI: 0.25 \sim 0.71$) 和未知科 (id.1000005471) ($\beta = -0.86$, $OR = 0.42$, $95\% CI: 0.25 \sim 0.71$) 仍然是失眠的保护因素。然而, 其余肠道微生物在 Bonferroni 校正后对失眠的因果影响并不显著。MR Egger、SM、WME、WM 回归法结果显示不支持柔膜菌纲 RF9 目 (id.11579) 及未知科 (id.1000005471) 与失眠的因果关系, 但 5 种方法的结果方向一致 (OR 值均 < 1), 且 IVW 法的回归线与其余 4 种回归法得到的回归线基本一致, 证实该因果具有一定的稳定性, 见表 2、图 4。且显示随着柔膜菌纲 RF9 目 (id.11579) 和未知科 (id.1000005471) 的升高, 失眠的患病风险降低。



注: A 为矫正前 IVW 法分析肠道微生物与失眠之间因果关系; B 为矫正后不同 MR 法分析肠道微生物与失眠之间因果关系。

图 2 肠道微生物与失眠的森林图分析结果

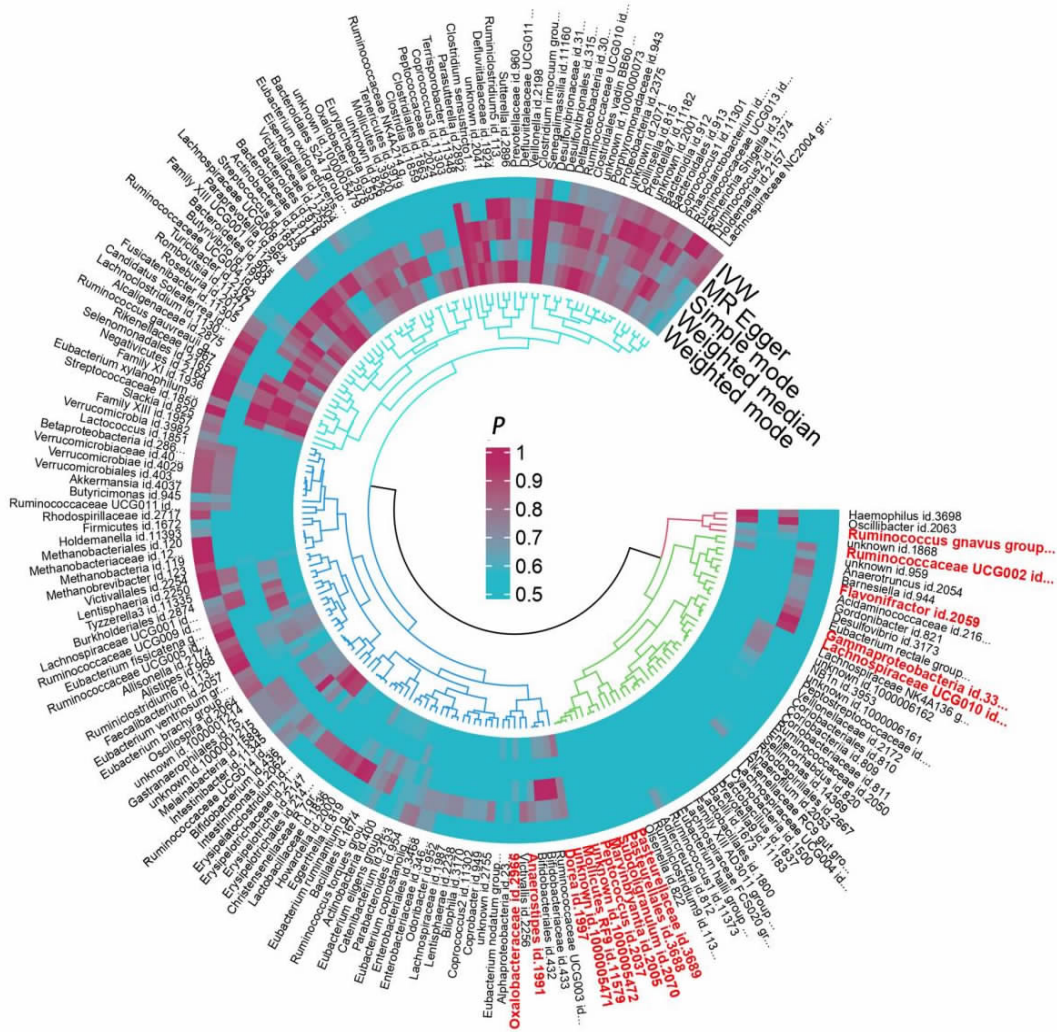
Figure 2 Forest plot of analysis results of gut microbiota and insomnia

表 2 与失眠相关的肠道微生物对应的五种 MR 方法的效应值

Table 2 Results of gut microbiota associated with insomnia by five MR methods

暴露	MR 方法	SNPs	β	OR 值(95%CI)	F 值	P 值
纲	伽玛变形菌 (id.3303)	IVW	-1.00	0.37(0.18 ~ 0.75)	91.816	0.006*
	MR Egger	3	-0.18	0.83(0.00 ~ 217.43)		0.959
	SM	3	-0.85	0.43(0.15 ~ 1.23)		0.254
	WM	3	-0.87	0.42(0.17 ~ 1.01)		0.052
	WME	3	-0.85	0.43(0.16 ~ 1.16)		0.238
目	柔膜菌纲(id.11579)	IVW	-0.86	0.42(0.25 ~ 0.71)	89.189	0.001**
	MR Egger	3	-1.09	0.34(0.10 ~ 1.07)		0.316
	SM	3	-0.73	0.48(0.23 ~ 1.01)		0.193
	WM	3	-0.75	0.47(0.24 ~ 0.93)		0.031*
	WME	3	-0.73	0.48(0.22 ~ 1.03)		0.200
巴斯德菌 (id.3688)	IVW	7	-0.44	0.64(0.46 ~ 0.90)	231.141	0.010*
	MR Egger	7	-0.98	0.38(0.18 ~ 0.78)		0.048*
	SM	7	-0.6	0.55(0.29 ~ 1.04)		0.118
	WM	7	-0.48	0.62(0.39 ~ 0.98)		0.040*
	WME	7	-0.45	0.64(0.35 ~ 1.16)		0.191
科	未知科(id.1000005471)	IVW	-0.86	0.42(0.25 ~ 0.71)	89.189	0.001**
	MR Egger	3	-1.09	0.34(0.11 ~ 1.07)		0.316
	SM	3	-0.73	0.48(0.22 ~ 1.05)		0.209
	WM	3	-0.75	0.47(0.24 ~ 0.91)		0.025*
	WME	3	-0.73	0.48(0.22 ~ 1.04)		0.204
草酸杆菌(id.2966)	IVW	7	0.29	1.33(1.02 ~ 1.74)	170.153	0.034*
	MR Egger	7	0.54	1.71(0.39 ~ 7.60)		0.511
	SM	7	0.12	1.13(0.72 ~ 1.77)		0.619
	WM	7	0.14	1.15(0.83 ~ 1.61)		0.402
	WME	7	0.11	1.12(0.73 ~ 1.71)		0.627
巴斯德菌(id.3689)	IVW	7	-0.44	0.64(0.46 ~ 0.90)	231.141	0.010*
	MR Egger	7	-0.98	0.38(0.18 ~ 0.78)		0.048*
	SM	7	-0.6	0.55(0.28 ~ 1.09)		0.138
	WM	7	-0.48	0.62(0.39 ~ 0.98)		0.040*
	WME	7	-0.45	0.64(0.35 ~ 1.18)		0.200
属	毛螺菌科(id.11330)	IVW	-0.54	0.58(0.35 ~ 0.99)	138.761	0.045*
	MR Egger	5	-0.09	0.91(0.11 ~ 7.25)		0.934
	SM	5	-0.58	0.56(0.24 ~ 1.30)		0.247
	WM	5	-0.56	0.57(0.30 ~ 1.11)		0.097
	WME	5	-0.58	0.56(0.25 ~ 1.26)		0.233
马文布赖恩特菌(id.2005)	IVW	6	0.62	1.85(1.20 ~ 2.87)	162.702	0.006*
	MR Egger	6	0.81	2.25(0.40 ~ 12.68)		0.410
	SM	6	0.45	1.57(0.75 ~ 3.29)		0.289
	WM	6	0.6	1.83(1.06 ~ 3.15)		0.031*
	WME	6	0.78	2.18(1.07 ~ 4.43)		0.085
消化球菌(id.2037)	IVW	8	-0.29	0.75(0.57 ~ 0.98)	287.210	0.036*
	MR Egger	8	-0.5	0.61(0.22 ~ 1.68)		0.375
	SM	8	-0.5	0.60(0.33 ~ 1.10)		0.146
	WM	8	-0.43	0.65(0.46 ~ 0.93)		0.020*
	WME	8	-0.53	0.59(0.31 ~ 1.13)		0.155
瘤胃球菌(id.11360)	IVW	10	0.38	1.47(1.01 ~ 2.14)	298.323	0.046*
	MR Egger	10	0.14	1.15(0.40 ~ 3.25)		0.795
	SM	10	0.72	2.06(0.99 ~ 4.27)		0.082
	WM	10	0.33	1.40(0.86 ~ 2.27)		0.177
	WME	10	0.18	1.20(0.62 ~ 2.34)		0.607
活泼瘤胃球菌(id.14376)	IVW	7	-0.39	0.68(0.47 ~ 0.97)	162.913	0.031*
	MR Egger	7	-2.15	0.12(0.02 ~ 0.59)		0.048
	SM	7	-0.16	0.86(0.41 ~ 1.83)		0.701
	WM	7	-0.26	0.77(0.49 ~ 1.22)		0.263
	WME	7	-0.19	0.83(0.43 ~ 1.61)		0.601
罕见小球菌(id.2070)	IVW	7	0.49	1.63(1.01 ~ 2.63)	198.442	0.045*
	MR Egger	7	0.44	1.55(0.46 ~ 5.18)		0.507
	SM	7	0.65	1.92(0.90 ~ 4.07)		0.141
	WM	7	0.53	1.70(0.92 ~ 3.16)		0.092
	WME	7	0.53	1.70(0.84 ~ 3.45)		0.190
厌氧棒状菌(id.1991)	IVW	10	0.51	1.67(1.05 ~ 2.65)	222.074	0.032*
	MR Egger	10	0.36	1.43(0.17 ~ 12.27)		0.752
	SM	10	0.22	1.24(0.51 ~ 3.00)		0.640
	WM	10	0.43	1.53(0.85 ~ 2.78)		0.159
	WME	10	0.27	1.31(0.54 ~ 3.19)		0.570
多尔菌(id.1997)	IVW	5	-0.68	0.50(0.25 ~ 0.99)	112.086	0.049*
	MR Egger	5	-0.55	0.58(0.02 ~ 14.45)		0.761
	SM	5	-0.23	0.79(0.19 ~ 3.30)		0.765
	WM	5	-0.47	0.62(0.26 ~ 1.51)		0.293
	WME	5	-0.15	0.86(0.27 ~ 2.70)		0.807
解黄酮菌 (id.2059)	IVW	4	-0.63	0.53(0.31 ~ 0.91)	95.307	0.020*
	MR Egger	4	-0.75	0.47(0.02 ~ 10.03)		0.679
	SM	4	-0.51	0.60(0.24 ~ 1.50)		0.355
	WM	4	-0.54	0.58(0.30 ~ 1.14)		0.112
	WME	4	-0.49	0.61(0.26 ~ 1.43)		0.340
未知属(id.1000005472)	IVW	3	-0.86	0.42(0.25 ~ 0.71)	89.189	0.001*
	MR Egger	3	-1.09	0.34(0.11 ~ 1.07)		0.316
	SM	3	-0.73	0.48(0.21 ~ 1.09)		0.222
	WM	3	-0.75	0.47(0.23 ~ 0.95)		0.037*
	WME	3	-0.73	0.48(0.23 ~ 1.01)		0.192

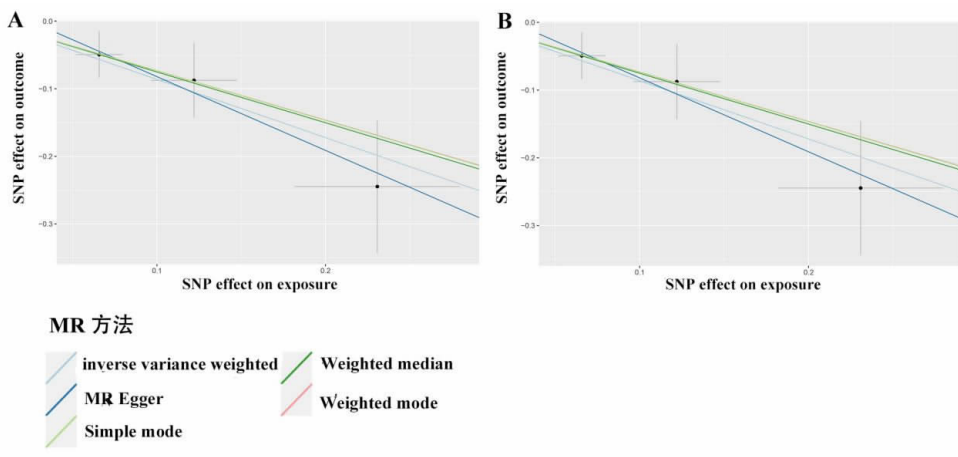
注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 Bonferroni 矫正后 P 值仍有意义。



注:初步评估肠道微生物群与失眠风险之间的关联;从内圈到外圈,它们分别表示以下 MR 方法 Weighted Mode, Weighted Median, Simple Mode, MR-Egger, IVW;颜色阴影反映了 P 值的大小,标红的肠道微生物表示与失眠具有因果关系。

图 3 肠道微生物及失眠的环状图

Figure 3 Ring diagram of gut microbiota associated with insomnia



注:A 为柔膜菌纲(id.11579);B 为未知科(id.1000005471)。

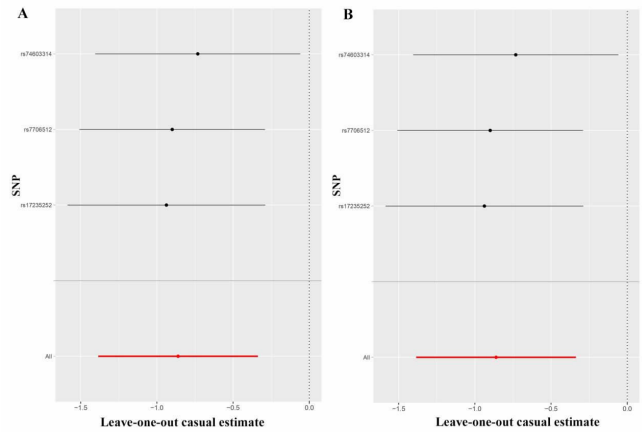
图 4 肠道微生物与失眠的散点图

Figure 4 Scatter plot of gut microbiota associated with insomnia

2.2 质量控制分析 留一法敏感性分析分析显示纳入的大部分 IVs 的效应值和总效应值大小比较接近,未发现对效应估计值影响较大的 SNP,这表明因果关

系具有一定的稳定性,见图 5。其次,经过异质性和基因多效性检验,发现 $P > 0.05$,提示无需考虑异质性和基因多效性对结果的影响。经过 MR Egger 的截距

项和 Egger-intercept 与 0 进行统计检验,所有的 P 值均大于 0.05, 这意味着没有发现水平多效性的存在。这说明 IVs 与结局之间的关系不受潜在的混杂因素的影响。而 IVs 对结局的影响主要是通过直接路径而非间接路径发生的。通过 MR Egger 方法对核心假设 (2)和(3)进行验证后,排除了混杂因素的影响,并确定 IVs 对结局的影响具有独立性。这表明本研究结果可靠, 并且能够更准确地评估 IVs 对结局的因果影响。此外,根据 MR Steiger 方向性检验的结果显示为 TRUE, 在 IVs- 肠道微生物相对丰度与 IVs- 失眠之间的相关性方面,前者更为显著,这表明本研究的分析结果与预期的方向一致。表 3 中呈现了上述三种检验的结果。



注: A 为柔膜菌纲(id.11579); B 为未知科(id.1000005471)。

图 5 肠道微生物与失眠的留一法图

Figure 5 Leave-one-out analysis of gut microbiota and insomnia

表 3 肠道微生物与失眠的两样本 MR 报告

Table 3 Results of two-sample MR of gut microbiota associated with insomnia

暴露	异质性检验			基因多效性检验			MR Steiger 方向性检验	
	方法	Q	P 值	Egger-intercept	Se 值	P 值	correct_causal_direction	steiger_P 值
柔膜菌纲(id.11579)	MR Egger	0.172	0.678	0.027	0.062	0.738	TRUE	0.715
	IVW	0.362	0.834					
未知科(id.1000005471)	MR Egger	0.172	0.678	0.027	0.062	0.738	TRUE	0.715
	IVW	0.362	0.834					

3 讨论

本研究使用 MiBioGen 联盟最大 GWAS 荟萃分析中肠道微生物群的汇总统计数据 and IEU 数据库的失眠汇总统计数据, 首次进行了双样本 MR 分析, 全面评估了 211 个肠道微生物(从门到属水平)对失眠的因果效应。最后, 本研究共确定了 16 个肠道微生物与失眠存在的因果关系, 其中 14 个是名义上的因果关系, 2 个是强因果关系。

肠道微生物是“微生物-肠-脑轴”功能的重要调节者之一, 近年来在神经精神疾病、神经发育等研究领域备受关注。已有研究表明肠道微生物与失眠密切相关, 本研究也得到类似结果, 确定了两种强烈的因果关系, 柔膜菌纲 RF9 (id.11579) 和未知科(id.1000005471)降低了 Bonferroni 校正后的失眠风险。柔膜菌纲属于厚壁菌门^[19], 柔膜菌纲寄生于人类与其他动植物身上(包括昆虫), 但也可形成互利共生。透过 16S 核糖体 RNA 序列与基因的分析指出, 柔膜菌纲非常接近乳酸杆菌。本 MR 研究发现其对失眠有潜在影响, 然而, 迄今为止, 没有研究报告失眠患者中柔膜菌纲的改变, 目前可以检索到的关于人体内的柔膜菌纲的相关研究也有限。但一项对微生物组组成的分析表明, 厚壁菌门的丰度与睡眠质量呈正相关^[20], 另一项研究表明^[21], 乳酸杆菌 NK33 与青少年双歧杆菌

NK98 复合益生菌 NVP-1704 可提高睡眠质量, 并能够增加双歧杆菌科和乳酸杆菌科, 由此本研究推测柔膜菌纲丰度的增加可能降低失眠障碍的患病风险。虽然这项研究首先揭示了柔膜菌纲与失眠风险之间的潜在因果关系, 但仍需要进一步的研究来探索两者之间潜在的生物学机制。未知科 (id.1000005471)是指在肠道微生物组研究中, 通过基因测序或其他生物信息学方法识别出的一类微生物, 但由于它们的遗传序列与已知种类存在差异, 或因为缺乏足够的研究, 其具体归属于生物分类中的哪一个科尚未明确^[22]。标识符“id.1000005471”是用于跟踪和标记这些微生物的唯一编码。未知科 (id.1000005471)与降低失眠风险之间的关联需要进一步的研究来验证和解释, 但这一发现突显了对未知或未充分研究的微生物进行深入研究的重要性, 肠道微生物组的研究是一个迅速发展的领域, 对于理解人类健康和疾病有重要意义。随着研究的深入, 许多此类“未知”微生物可能会被更准确地分类和描述。通过识别和了解这些微生物, 能更好地理解人体微生物群落的复杂性和其对健康的影响。

值得注意的是, Bonferroni 修正可能会导致假阴性。本研究结果显示, 14 个肠道微生物类群具有名义上的因果关系, 但这些相关性在应用 Bonferroni 校正后消失了。这可能是由于肠-脑轴之间的联系通常

由多个因素协调,而单一微生物群在属水平上引起疾病的作用可能不像以前认为的那么重要。事实上,本研究中确定的几个具有名义因果关系的肠道微生物类群证实了先前的研究结果。例如,Zhou Jing 等人^[23]发现,与健康对照组相比,失眠患者中瘤胃球菌科显著减少。一项关于围绝经期失眠女性的粪便研究发现^[24],瘤胃球菌的数量占比显著减少。海法大学和以色列理工学院之间的一项合作研究项目发现^[25],毛螺菌属与睡眠质量呈负相关。此外,Qi Zhang 等人^[26]的研究发现在属水平上,多尔菌同时与抑郁症和睡眠质量有关。虽然这些肠道微生物类群与失眠只发现了名义上的因果关系,但不同肠道微生物类群之间的协调和对话仍值得进一步深入研究。

许多共病性睡眠障碍也表现出肠道微生物群的变化。许多情绪障碍和精神障碍都会表现出睡眠方面的问题,如:对 36 名重度抑郁症患者和 45 名健康对照的粪便进行分析^[26],多尔菌与抑郁和睡眠质量同时相关,肠道杆菌和睡眠问题的关系更为密切,粪球菌和肠道杆菌与睡眠质量相关,与抑郁症的严重程度无关。双相情感障碍患者的乳酸菌数量与睡眠质量呈正相关^[27],表明乳酸菌可能改善睡眠。在一项人类研究中^[28],来自健康捐赠者的粪菌移植改善了肠易激综合征患者的睡眠,也改善了他们的抑郁和焦虑。这仍需要进一步探索肠道微生物与失眠之间的关系。

肠道微生物与失眠之间的机制尚未完全确定。肠道微生物与 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺、 γ -氨基丁酸 (GABA)、短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs)、褪黑素等多种神经递质、细胞因子及代谢物的生成密切相关^[29]。某些乳酸杆菌和双歧杆菌可以产生 GABA。在失眠患者中也常观察到 GABA mRNA 的异常表达。大肠杆菌产生去甲肾上腺素、5-羟色胺和多巴胺,芽孢杆菌产生去甲肾上腺素和多巴胺,链球菌和肠球菌产生 5-羟色胺。此外,肠道微生物可以影响 HPA 轴的水平^[30],越来越多的研究表明,睡眠与 HPA 轴活动之间存在相互关系。高水平的 HPA 轴可引起睡眠障碍,表现为睡眠片段化、深慢波睡眠、缩短睡眠时长等。相应地,睡眠紊乱,如失眠症和阻塞性睡眠呼吸暂停,又会进一步使 HPA 轴功能失调恶化^[31]。这为失眠的发生机制提供了新的参考方向。

本研究的几个优势,一是采用 MR 分析来确定肠道微生物群与失眠之间的因果关系,从而排除了混杂因素的干扰和对因果推理的反向因果关系;二是肠道微生物群的遗传变异是从最大的 GWAS 荟萃分析中获得的,确保了 MR 分析中工具的强度。然而本研究

也存在一些局限性:(1) 本研究包括为具有欧洲血统的个体,因此研究结果是否能外推到其他人尚有待进一步研究;(2) 本研究纳入的肠道微生物数量有限,未来还需要获取更多的肠道微生物 GWAS 数据;(3) 由于暴露数据集中最低的分类水平是属,这种限制使我们无法在物种水平上进一步探索肠道微生物群与失眠之间的因果关系。

综上所述,本研究评估了肠道微生物对失眠风险的潜在因果作用,发现柔膜菌纲和未知科两个细菌类群可能与失眠风险存在提示性因果关系,可为失眠的发病机制和新疗法提供线索,也证实了调节肠道微生物是改善睡眠的可行路径之一,后续仍需要进一步的随机对照试验来阐明肠道微生物对失眠的保护作用及其特定的保护机制。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Sateia MJ. International classification of sleep disorders—third edition: highlights and modifications [J]. Chest, 2014, 146 (5): 1387–1394.
- [2] Grandner M, Olivieri A, Ahuja A, et al. The burden of untreated insomnia disorder in a sample of 1 million adults: a cohort study [J]. BMC Public Health, 2023, 23(1): 1481.
- [3] 王欣琦,李雪梅,蔡梦怡,等. 中青年人群失眠发生率及影响因素的系统评价[J]. 中风与神经疾病杂志,2023,40(3):222–228. Wang XQ, Li XM, Cai MY, et al. Systematic review of incidence and influencing factors of insomnia in young and middle-aged adults [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2023, 40(3): 222–228.
- [4] Hwang H, Kim KM, Yun CH, et al. Sleep state of the elderly population in Korea: Nationwide cross-sectional population-based study [J]. Frontiers in Neurology, 2022, 13: 1095404.
- [5] 滑宏巨,张淑娟,雷冰冰,等. 慢性失眠症病因及相关危险因素分析[J]. 世界睡眠医学杂志,2019,6(5):532–535. Hua HJ, Zhang SJ, Lei BB, et al. Clinical analysis of etiology and risk factors of chronic insomnia [J]. World Journal of Sleep Medicine, 2019, 6(5): 532–535.
- [6] Bienenstock J, Collins S. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: psycho-neuroimmunology and the intestinal microbiota: clinical observations and basic mechanisms [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2010, 160(1): 85–91.
- [7] Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, et al. The Microbiota–Gut–Brain axis [J]. Physiological Reviews, 2019, 99(4): 1877–2013.
- [8] Manosso LM, Duarte LA, Martinello NS, et al. Circadian rhythms and sleep disorders associated to major depressive disorder: pathophysiology and therapeutic opportunities [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2023, 25: 378.
- [9] Lan YM, Lu JJ, Qiao GH, et al. Bifidobacterium breve CCFM1025 Improves Sleep Quality via Regulating the Activity of the HPA Axis: A Randomized Clinical Trial [J]. Nutrients, 2023, 15(21): 4700.
- [10] Zheng J, Baird D, Borges MC, et al. Recent developments in

- mendelian randomization studies[J]. *Curr Epidemiol Rep*, 2017, 4(4): 330–345.
- [11] 李若樨, 张权, 饶安琪, 等. 失眠与抑郁症之间的因果关联研究: 孟德尔随机化分析 [J]. *联勤军事医学*, 2023, 37(2): 140–143.
- Li RX, Zhang Q, Rao AQ, et al. Causal relationship between insomnia and depressive disorder: a mendelian randomization analysis[J]. *Military Medicine of Joint Logistics*, 2023, 37(2): 140–143.
- [12] Sakaue S, Kanai M, Tanigawa Y, et al. A cross-population Atlas of genetic associations for 220 human phenotypes [J]. *Nature Genetics*, 2021, 53(10): 1415–1424.
- [13] 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.
- [14] He M, Wang WJ, He Q, et al. Genetic causal association between the gut microbiome and intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage: a Two-Sample mendelian randomization study [J]. *Neurology and Therapy*, 2023, 12(5): 1695–1707.
- [15] Hwang LD, Lawlor DA, Freathy RM, et al. Using a two-sample Mendelian randomization design to investigate a possible causal effect of maternal lipid concentrations on offspring birth weight[J]. *International Journal of Epidemiology*, 2019, 48(5): 1457–1467.
- [16] Wootton RE, Lawn RB, Millard L, et al. Evaluation of the causal effects between subjective wellbeing and cardiometabolic health: mendelian randomisation study [J]. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 2018, 362: k3788.
- [17] Long YW, Tang LH, Zhou YY, et al. Causal relationship between gut microbiota and cancers: a two-sample Mendelian randomisation study[J]. *BMC Medicine*, 2023, 21(1): 66.
- [18] Nazarzadeh M, Rahimi K. Heterogeneity between genetic variants as a proxy for pleiotropy in mendelian Randomization-Reply [J]. *JAMA Cardiol*, 2020, 5(1): 108.
- [19] Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome[J]. *Cell Host & Microbe*, 2008, 3(4): 213–223.
- [20] Smith RP, Easson C, Lyle SM, et al. Gut microbiome diversity is associated with sleep physiology in humans [J]. *PLOS One*, 2019, 14(10): e0222394.
- [21] Lee HJ, Hong JK, Kim JK, et al. Effects of probiotic NVP-1704 on mental health and sleep in healthy adults: an 8-Week randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled trial [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2660.
- [22] Almeida A, Nayfach S, Boland M, et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 105–114.
- [23] Zhou J, Wu XL, Li ZL, et al. Alterations in gut microbiota are correlated with serum metabolites in patients with insomnia disorder[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 722662.
- [24] 杨希茜. 基于肠道菌群研究天王补心颗粒对围绝经期失眠的疗效及作用机制[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2020.
- Yang XQ. Study on the efficacy and mechanism of action of Tianwang Tonic Heart Granules on perimenopausal insomnia based on intestinal flora[D]. Wuhan: HuBei University of Chinese Medicine, 2020.
- [25] Carasso S, Fishman B, Lask LS, et al. Metagenomic analysis reveals the signature of gut microbiota associated with human chronotypes[J]. *FASEB Journal*, 2021, 35(11): e22011.
- [26] Zhang Q, Yun YJ, An HM, et al. Gut microbiome composition associated with major depressive disorder and sleep quality [J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2021, 12: 645045.
- [27] Aizawa E, Tsuji H, Asahara T, et al. Bifidobacterium and lactobacillus counts in the gut microbiota of patients with bipolar disorder and healthy controls[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2018, 9: 730.
- [28] 唐文娟. 粪菌移植治疗不同严重程度的腹泻型肠易激综合征的临床研究[D]. 广州:广州医科大学, 2020.
- Tang WJ. Clinical study of faecal bacterial transplantation for the treatment of diarrhoeal irritable bowel syndrome of varying severity [D]. Guangzhou: GuangZhou Medical University, 2020.
- [29] Needham BD, Funabashi M, Adame MD, et al. A gut-derived metabolite alters brain activity and anxiety behaviour in mice[J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 647–653.
- [30] Ge TT, Yao XX, Zhao HS, et al. Gut microbiota and neuropsychiatric disorders: Implications for neuroendocrine-immune regulation [J]. *Pharmacological Research : the Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 2021, 173: 105909.
- [31] 尤青海, 刘荣玉. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者应激事件和下丘脑-垂体-肾上腺轴相互作用的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2006, 26(6): 438–440.
- You QH, Liu RY. Progress on the interaction between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stress events in obstructive sleep apnea syndrome patients[J]. *International Journal of Respiration*, 2006, 26(6): 438–440.

收稿日期: 2023-11-10