

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.18.018

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240614.1757.027\(2024-06-17\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240614.1757.027(2024-06-17))

白细胞介素-9 水平变化与哮喘关联的双向孟德尔随机化研究

李秀娟¹, 赵文琴^{2△}

(1. 重庆医科大学附属璧山医院/重庆市璧山区人民医院儿科, 重庆 402760;

2. 重庆市璧山区第二人民医院儿科, 重庆 402764)

[摘要] **目的** 探讨哮喘与白细胞介素-9(IL-9)水平变化的关联,为早期预防哮喘发生、改善哮喘病情提供参考。**方法** 通过与哮喘、IL-9 相关的 2 项全基因组关联研究(GWAS)收集单核苷酸多态性(SNP)资料。筛选出与 IL-9 相关的 43 个 SNP 为工具变量、哮喘为研究结局进行正向孟德尔随机化(MR)分析,与哮喘相关的 3 个 SNP 作为工具变量、IL-9 水平变化为研究结局进行反向 MR 分析。采用 Cochran's Q 检验异质性,MR-Egger 回归法检验多效性,留一法检验结果的稳健性。**结果** Cochran's Q 检验显示不存在异质性($P=0.383, 0.883$),均采用固定效应模型的 MR 分析。IL-9 水平升高导致发生哮喘的风险上升 17% ($OR=1.17, 95\%CI:1.02\sim1.34$),发生哮喘导致 IL-9 水平升高 0.09 个标准差 ($OR=1.09, 95\%CI:1.01\sim1.19$)。逐个剔除 SNP 后,MR 分析结果稳健。MR-Egger 回归法未发现工具变量的多效性($P=0.995, 0.129$)。**结论** IL-9 水平变化与发生哮喘风险之间存在双向基因关联。

[关键词] 白细胞介素-9;哮喘;孟德尔随机化;单核苷酸多态性位点

[中图法分类号] R562.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)18-2815-05

Bidirectional Mendelian randomization study on association between interleukin-9 level change and asthma

LI Xiujuan¹, ZHAO Wenqin^{2△}

(1. Department of Pediatrics, Affiliated Bishan Hospital of Chongqing Medical University/

Bishan District People's Hospital, Chongqing 402760, China; 2. Department of Pediatrics,

Bishan District Second People's Hospital, Chongqing 402764, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association between asthma and IL-9 level, to provide reference for early prevention of asthma occurrence and improvement of asthma condition. **Methods** The data of single nucleotide polymorphism (SNP) were collected from two genome-wide association studies (GWAS) related to asthma and IL-9. Forty-three SNP instrumental variables associated with IL-9 were screened to conduct the forward direction Mendelian randomization (MR) analysis with asthma as the outcome. The three SNP associated with asthma served as the instrumental variables, the IL-9 level change served as the study outcome to conduct the reverse MR analysis. Heterogeneity was detected by using Cochran's Q test, and the pleiotropy was detected by using the MR-Egger regression method. The robustness of the results was tested by the a leave-one-out method. **Results** The Q-test showed that no heterogeneity existed ($P=0.383, 0.883$), and the MR analysis of fixed-effects model was used. The IL-9 level increase led to that the asthma occurrence risk was increased by 17% ($OR=1.17, 95\%CI:1.02-1.34$). The asthma occurrence led to the IL-9 level increase by 0.09 standard deviation ($OR=1.09, 95\%CI:1.01-1.19$). After removing SNP one by one, the MR analysis results were steady. The MR-Egger regression method did not find the pleiotropy of instrumental variables ($P=0.995, 0.129$). **Conclusion** There are bidirectional gene association between the IL-9 level change and asthma occurrence risk.

[Key words] interleukin-9; asthma; Mendelian randomization; single nucleotide polymorphism locus

△ 通信作者, E-mail: 65406518@qq.com。

哮喘是一种复杂的遗传性呼吸道炎症疾病^[1],通常表现为广泛的可逆性气流受限,引起患者反复发作性的喘息、咳嗽、胸闷或气促等症状。其中过敏性哮喘是最常见的哮喘类型,占 30 岁以下患者的 90%^[2]。临床和实验研究提示了 Th2 细胞及其产生的细胞因子在过敏性哮喘的发病机制中发挥重要作用^[3]。

白细胞介素-9(interleukin-9, IL-9)是一种新型的 Th2 细胞因子,目前多项研究表明,IL-9 在过敏性哮喘病情进展中发挥着关键作用^[4]。在动物和体外细胞模型中发现,IL-9 水平的升高可导致哮喘的发生^[5]。同时,在既往队列研究中发现,哮喘患者的高反应性气道 IL-9 水平影响哮喘患者的发作和预后^[6]。这些研究为 IL-9 水平与哮喘发生风险的因果关联提供了支持性证据,但同时受到患者的过敏原暴露、饮食习惯、生活方式等混杂因素的影响,可能导致因果推断不准确。孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是使用单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为工具变量分析的一种类型,它使用遗传变异作为工具变量来检测和量化因果关系,遵循“亲代等位基因随机分配给子代”的遗传定律,克服潜在混杂和反向因果关系的影响,从而弥补观察性研究的不足^[7]。本研究旨在使用双向 MR 评估 IL-9 水平与发生哮喘风险之间的因果关联,为哮喘的早期防治提供新的理论依据,有助于进一步开发抗 IL-9 抗体的相关药物,减轻哮喘患者的疾病负担。

1 资料与方法

1.1 资料来源

本研究中,与 IL-9 相关的全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)数据来源于欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute, EBI)数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>)^[8],该研究纳入了 9 567 876 例欧洲人群,其中 3 634 例为 IL-9 多态性。与哮喘相关的 GWAS 数据来源于 DEMENAIIS 等^[9]针对欧洲人群大样本哮喘相关的 meta 分析,包括病例组 19 954 例和对照组 107 715 例。所有研究获得了各自机构审查委员会的伦理批准。

1.2 方法

1.2.1 工具变量

本研究选择了 SNP($P < 5 \times 10^{-8}$)的遗传变异作为工具变量,其满足以下基本假设:(1)与研究的暴露高度相关;(2)与任何其他影响结局的混杂因素无关;(3)仅通过暴露影响结局,本身与结局无关^[10]。从相关数据集中选择了与 IL-9 相关的 SNP,这些多态性在整个基因组中达到显著水平($P < 5 \times 10^{-8}$)。在人

群中去除由连锁不平衡引起的遗传关联后,筛选阈值 $r^2 < 0.1$ 且距离大于 10 000 kb 来确保工具变量的独立性。然后获得了每个 SNP 的数据,并计算 F 统计量。

$$F = (N - \kappa - 1) \times R^2 / [\kappa \times (1 - R^2)] \quad (1)$$

N 代表总样本量, κ 代表用于 MR 分析的 SNP 的数量, R^2 代表每个 SNP 的 IL-9(不确定性系数)变异比例, $F > 10$ 。使用 PhenoScanner 数据库(<http://www.phenoscaner.medschl.cam.ac.uk/>)检查并删除了所有不满足假设(2)和(3)的 SNP,以避免多效性的影响。

1.2.2 双向 MR 研究设计

正向 MR 分析以 IL-9 相关的 43 个 SNP 作为工具变量,以哮喘作为研究结局;反向 MR 分析以哮喘相关的 3 个 SNP 作为工具变量,以 IL-9 水平变化作为研究结局。使用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、MR-Egger 回归法和加权中位数法(weighted median, WM)进行 MR 分析。IVW 假设所有的工具变量均为有效工具变量,不考虑截距项的存在并且用结局方差的倒数作为权重进行模型拟合^[11],该方法通过应用 Wald 比率结合了 SNP 特异性估计,通过 meta 分析法综合了 IL-9 对哮喘的汇总因果效应。MR-Egger 回归法以结局方差的倒数作为权重进行拟合,用来评估暴露对结局的效应^[11]。而 WM 则假设一半的工具变量是有效的,用于分析暴露与结局之间的因果关联^[12]。

1.3 统计学处理

采用 R4.2.3 软件 TwoSample MR 程序包进行数据统计分析。 $OR > 1$ 被视为危险因素, $OR < 1$ 被视为保护因素。使用 Cochran's Q 检验评估使用 MR-Egger 回归法和 IVW 的 SNP 之间是否存在异质性,如果 $P > 0.05$,表示无异质性,将使用固定效应模型的 IVW 作为主要方法,否则使用随机效应模型。采用留一法检验结果的稳健性,验证每个 SNP 对总体因果估计的影响,然后计算剩余 SNP 的结果。如果这些剩余 SNP 的结果与 MR 分析的总效应量基本一致,那么表明分析结果稳健^[7]。采用 MR-Egger 回归法进行多效性检验,如果截距项的 $P < 0.05$,说明存在多效性^[11]。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-9 水平变化与哮喘关联的正向 MR 分析结果

Cochran's Q 检验显示不存在异质性($P > 0.05$),故采用固定效应模型的 MR 分析,见表 1。结

果显示,IL-9 水平升高导致发生哮喘的风险上升 17% ($OR=1.17,95\%CI:0.86\sim1.34$),见表 2、图 1。逐个剔除 SNP 后,MR 结果稳健。MR-Egger 回归法未发现工作变量的多效性。

2.2 IL-9 水平变化与哮喘关联的反向 MR 分析结果

Cochran's Q 检验显示不存在异质性 ($P>0.05$),故采用固定效应模型的 MR 分析,见表 1。结果显示,发生哮喘导致 IL-9 水平升高 0.09 个标准差

($OR=1.09,95\%CI:1.01\sim1.19$),见表 2、图 2。逐个剔除 SNP 后,MR 结果稳健。MR-Egger 回归法未发现工作变量的多效性。

表 1 敏感性 & 多效性分析

暴露	结局	MR-Egger 回归法		Cochran's Q 检验	
		Egger 截距	P	Q	P
IL-9	哮喘	-0.001	0.995	0.759	0.383
哮喘	IL-9	-0.019	0.129	30.550	0.883

表 2 IL-9 水平变化与哮喘关联的双向 MR 分析结果

暴露	结局	SNP	分析方法	OR	95%CI	P
IL-9	哮喘	43	IVW	1.17	1.02~1.34	0.031
			MR-Egger 回归法	1.18	0.86~1.67	0.528
			WM	1.16	0.87~1.38	0.097
哮喘	IL-9	3	IVW	1.09	1.01~1.19	0.044
			MR-Egger 回归法	1.31	1.02~1.68	0.037
			WM	1.08	0.95~1.24	0.241

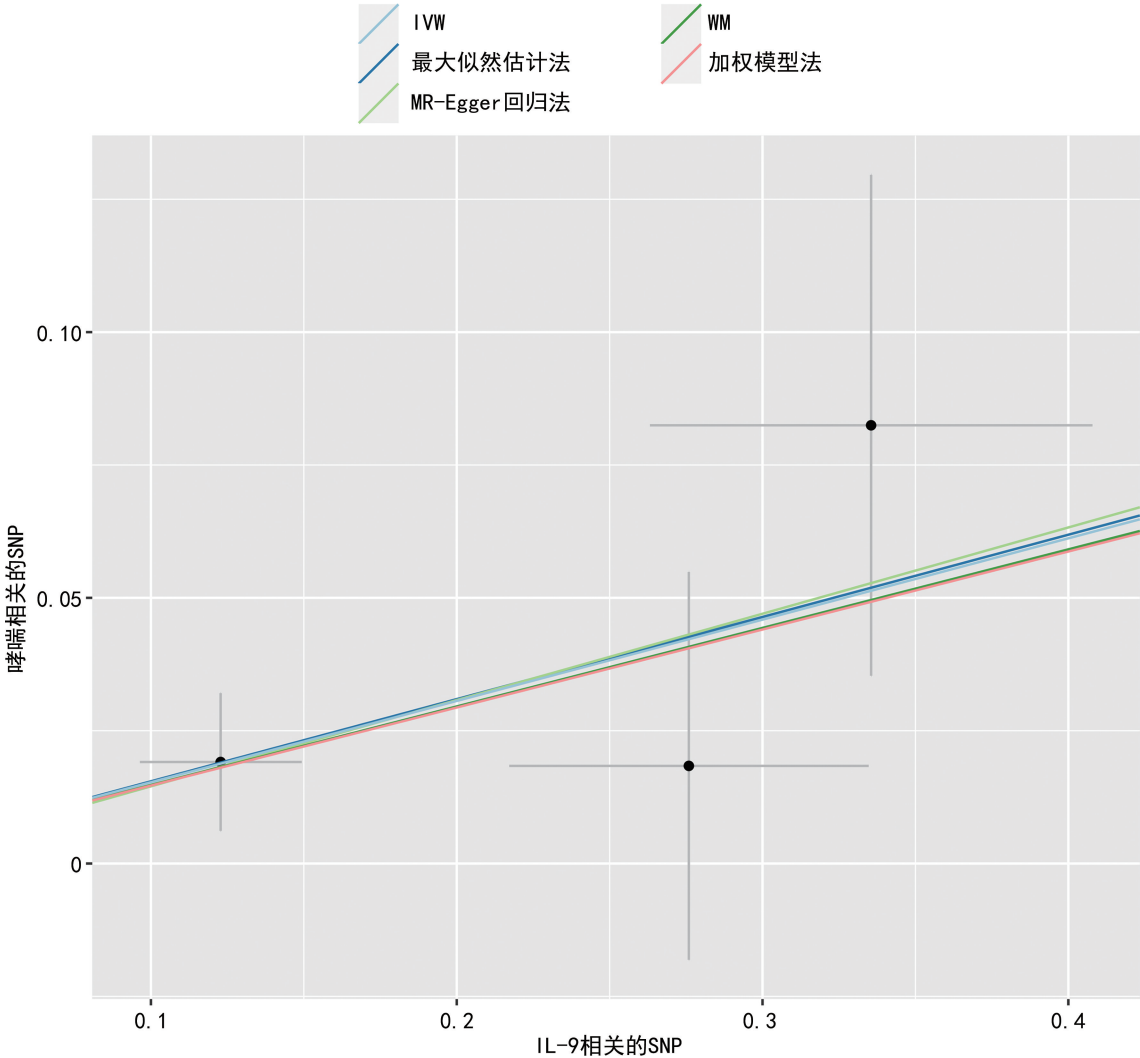


图 1 IL-9 水平变化与哮喘关联的正向 MR 分析散点图

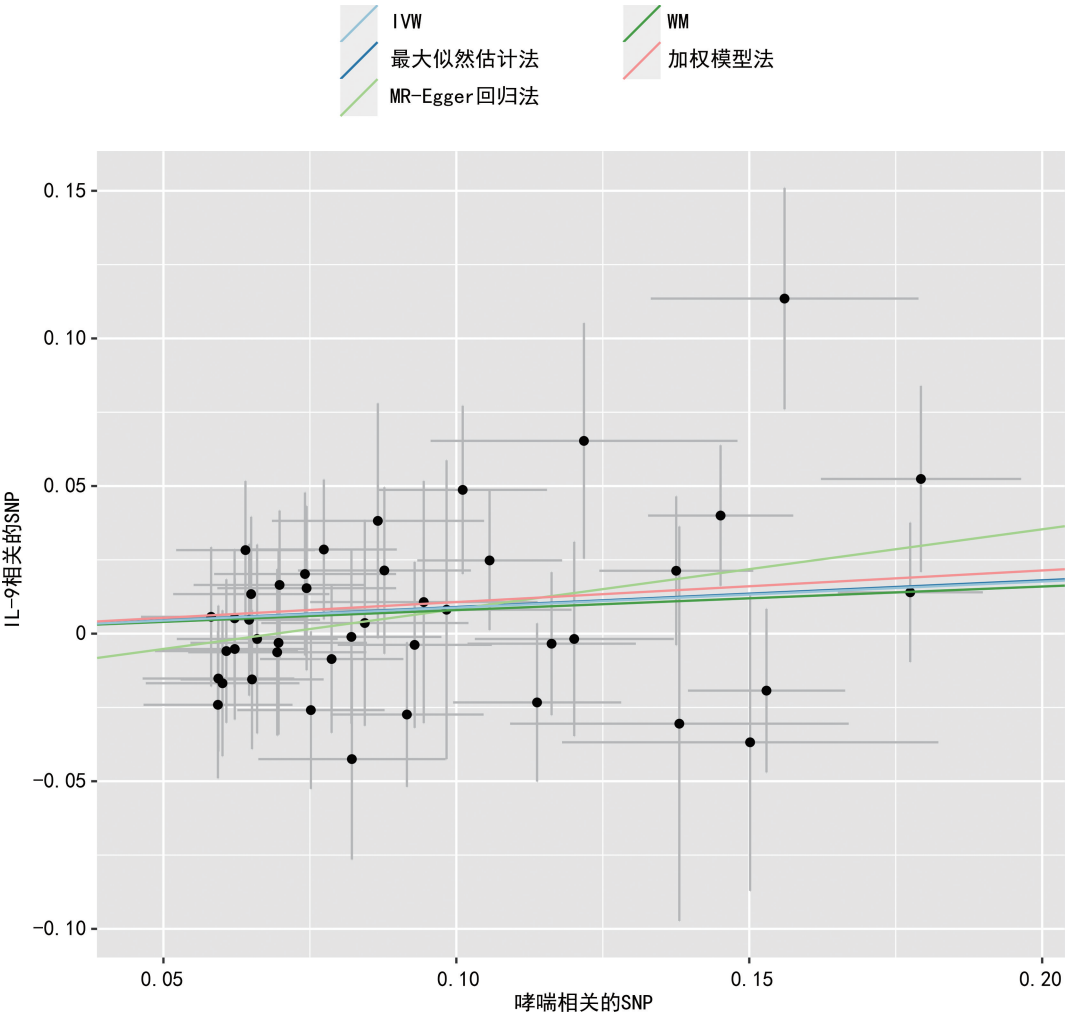


图 2 IL-9 水平变化与哮喘关联的反向 MR 分析散点图

3 讨 论

IL-9 在很多慢性炎症疾病的发生、发展中发挥重要作用。IL-9 在过敏性鼻炎中能够促进过敏原特异性 T 细胞的增殖和活化,诱导鼻黏膜组织中炎症细胞的聚集和炎症介质的释放,从而引发过敏性鼻炎的进展。在特发性肺纤维化发病机制中,IL-9 能够刺激肺成纤维细胞的增殖和胶原蛋白的合成,促进肺部纤维化的发展。此外,IL-9 还能够影响肺部免疫调节和炎症反应,进一步加剧肺组织的纤维化和功能损伤。但对于哮喘来说,IL-9 尤其与过敏性哮喘密切相关。IL-9 能够促进气道炎症性细胞的增殖和活化,导致气道炎症、黏液过度产生和气道重塑等哮喘的典型特征,更为重要的是 IL-9 可调节免疫细胞的极化和功能,影响免疫反应的平衡,从而进一步加重患者的哮喘症状。

本研究通过双向 MR 研究 IL-9 水平变化与发生哮喘风险存在的双向关联,有助于早期预防哮喘的发生,为评估 IL-9 作为哮喘发病和严重程度的生物标志物提供了参考依据,促进开发抗 IL-9 抗体的相关药物,降低哮喘的发病率。正向 MR 分析结果显示:IL-9 水平升高可能增加哮喘的发病风险,与 OH 等^[13]发现一致。但考虑到患者的过敏原暴露、饮食习惯、生

活方式等混杂因素,因此临床上相关的研究可能会出现偏倚。本研究使用遗传变异作为工具变量,克服了混杂因素的影响,使结果更有说服力。LEVITT 等^[14]研究也表明,IL-9 水平升高可能诱导肺嗜酸性粒细胞增多和血清 IgE 水平升高从而增加哮喘的发病风险。NICOLAIDES 等^[15]在哮喘动物模型中发现,IL-9 可以通过增加气道中的肥大细胞中 IgE 的数量和活性来调节气道炎症,促进气道高反应性;PARKER 等^[16]研究发现,在儿童支气管上皮细胞中 IL-9 可影响气道重塑,从而使患者的肺功能下降。同时 VERMEER 等^[17]研究表明,阻断 IL-9 可减少气道重塑并预防哮喘的发作。反向 MR 分析结果显示:发生哮喘导致 IL-9 水平升高,与 DUGAS 等^[18]研究结果一致。ZHOU 等^[19]在病例对照研究中通过高通量蛋白质微阵列分析发现,哮喘患者的血浆 IL-9 水平明显升高。BOTTCHEER 等^[20]也发现患有特异性哮喘的儿童比正常对照组产生更高水平的过敏原诱导的 IL-9。但仍需要进一步的详细研究 IL-9 与哮喘发生、发展的潜在关系。

本研究的局限主要在于因果关系实际上基于“遗传倾向”,如果工具变量数据处理不当,很容易受到影响。由于数据库和软件的限制,本研究对象为小样本

的欧洲人群,统计效力不足,今后应使用多地区、多种族人群大样本进一步验证。

参考文献

- [1] MCFADDEN E R, GILBERT I A. Asthma[J]. *N Engl J Med*, 1992, 327(27): 1928-1937.
- [2] BULLER M C, JOHNSON L R, OUTERBRIDGE C A, et al. Serum immunoglobulin E responses to aeroallergens in cats with naturally occurring airway eosinophilia compared to unaffected control cats[J]. *Vet Intern Med*, 2020, 34(6): 2671-2676.
- [3] HIRAHARA K, AOKI A, KIUCHI M, et al. Memory-type pathogenic T2 cells and ILC2s in type 2 allergic inflammation[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(6): 2063-2066.
- [4] HULTNER L, DRUEZ C, MOELLER J, et al. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFⅢ (interleukin 9)[J]. *Eur J Immunol*, 1990, 20(6): 1413-1416.
- [5] WHITEHEAD G S, THOMAS S Y, NAKANO K, et al. A neutrophil/TGF- β axis limits the pathogenicity of allergen-specific CD4⁺ T cells[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(4): e150251.
- [6] DOHERTY T A, BROIDE D H. Insights into the biology of IL-9 in asthma[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2022, 150(3): 585-586.
- [7] CARNEGIE R, ZHENG J, SALLIS H M, et al. Mendelian randomisation for nutritional psychiatry[J]. *Lancet Psychiat*, 2020, 7(2): 208-216.
- [8] AHOLA-OLLI A V, WURTZ P, HAVULINNA A S, et al. Genome-wide association study identifies 27 loci influencing concentrations of circulating cytokines and growth factors[J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 1(1): 40-50.
- [9] DEMENAI S F, MARGATITTE-JEANNIN P, BARNES K C. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks[J]. *Nat Genet*, 2018, 1(1): 42-53.
- [10] EVANS D M, SMITH D G. Mendelian randomization; new applications in the coming age of hypothesis-free causality[J]. *Annu Rev Genom Hum G*, 2015, 16: 327-350.
- [11] BURGESS S, THOMPSON S G. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method[J]. *Eur J Epidemiol*, 2017, 32(5): 377-389.
- [12] BOWDEN J, SMITH D G, HAYCOCK P C, et al. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator[J]. *Genet Epidemiol*, 2016, 40(40): 304-314.
- [13] OH C K, LEIGH R, MCLAURIN K K, et al. A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma[J]. *Respir Res*, 2013, 7(1): 93.
- [14] LEVITT R C, MCLANE M P, MACDONALD D, et al. IL-9 pathway in asthma; new therapeutic targets for allergic inflammatory disorders[J]. *Allergy Clin Immunol*, 1999, 103(5): 485-491.
- [15] NICOLAIDES N C, HOLROYD K J, EWART S L, et al. Interleukin 9: a candidate gene for asthma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(24): 13175-13178.
- [16] PARKER J C, THAVAGNANAM S, SKIBINSKI G, et al. Chronic IL-9 and IL-13 exposure leads to an altered differentiation of ciliated cells in a well-differentiated paediatric bronchial epithelial cell model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e61023.
- [17] VERMEER P D, HARSON R, EINWALTER L A, et al. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(3): 286-295.
- [18] DUGAS B, RENAULD J C, PENE J, et al. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes[J]. *Eur J Immunol*, 1993, 23(7): 1687-1692.
- [19] ZHOU T, HUANG X, ZHOU Y, et al. Associations between Th17-related inflammatory cytokines and asthma in adults: a case-control study[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15502.
- [20] BOTTCHER M F, BJURSTROM J, MAI X M, et al. Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2003, 14(5): 345-350.

(收稿日期: 2023-12-07 修回日期: 2024-05-22)

(编辑: 唐 璞)