

# 如何撰写高质量的流行病学研究论文

## 第二讲 遗传关联性研究及其 Meta 分析报告规范

余灿清 詹思延

**【导读】** 随着遗传流行病学和分子流行病学的兴起,复杂疾病的遗传危险因素日益得到关注。但目前遗传关联性研究仍存在许多问题,如样本量小、研究结果不一致、研究报告质量偏低。因此,规范地报告遗传关联性研究,采用 Meta 分析将现有研究证据进行系统汇总是亟需完成的工作,以提供更准确的基因-疾病关联效应。为此,本文综述了遗传关联性分析及其 Meta 分析报告规范(MOOSE),并提出了报告遗传关联性研究的 Meta 分析时需注意的特殊问题。

**【关键词】** Meta 分析; 流行病学; 遗传关联性研究

随着分子遗传生物学技术的发展,越来越多的流行病学研究开始从分子水平上探索遗传因素在人类疾病中的作用。目前该领域研究可以分为三个层次<sup>[1]</sup>:①描述基因在人群中的分布,并评价基因型-疾病关联;②评价基因-环境以及基因-基因交互作用对发病危险的影响;③评价人群基因检测的作用和影响。其中描述基因型频率和研究遗传关联性是研究的基础,开展较多,其研究方法也较为成熟,是发现常见疾病的遗传危险因子最为有效的方法<sup>[2]</sup>,但目前仍存在不少问题。

### 1. 遗传关联性研究的主要问题:

(1)研究样本量普遍较小:理想的关联性研究应该具备三个特征,即研究样本量大, $P$ 值小,研究关联具有生物学意义或研究位点对基因表达产物的影响具有生理学意义<sup>[3]</sup>。在人类基因组中,许多常见遗传危险因子通常与常见复杂疾病只有轻度的关联(关联强度 $1.20 \sim 1.50$ )<sup>[4]</sup>,这种情况下,样本量太小通常导致研究结果的把握度不够,只有大样本(一般要求大于 1000)研究才能真实地反映基因和疾病之间的关联<sup>[4]</sup>。但是,Ioannidis 等<sup>[5,6]</sup>对收集的 55 个 Meta 分析中的 579 个遗传关联性研究进行分析发现,绝大多数关联性研究的样本量在 100~300。Boffetta, Pearce<sup>[7]</sup>也发现已发表的遗传关联性研究的把握度一般在 20%~70%,很少有研究能准确地发现真实存在的关联。可见,此类研究样本量偏小是普遍存在的问题,有可能存在大量假阳性结果,从而过高甚至错误地估计了某些遗传因子的影响<sup>[8]</sup>。

(2)研究结果存在广泛的异质性:Ioannidis 等<sup>[6]</sup>研究发现,在某基因多态性和疾病的关联研究中,大样本研究的结果往往与小样本研究的结果存在差异,更容易得到“有利的”结果,而大样本研究往往比多个小样本的 Meta 分析结果更

为保守。此外,这种异质性还表现在同一问题首次研究结果与随后研究的结果不一致,前者往往有更大的遗传效应<sup>[9]</sup>。Ioannidis 等<sup>[6]</sup>还发现约有 26%的研究结果前后不一致,并且这种异质性和上述样本量差异并没有完全的联系。

(3)研究文献质量有待提高:遗传流行病学研究文献还存在诸多问题,有流行病学背景的研究者往往不能充分考虑遗传流行病学中特定的生物学和遗传学背景,而遗传学者和临床工作者也经常忽视统计分析模型的特殊性<sup>[10]</sup>。Bogardus 等<sup>[11]</sup>根据 7 个研究方法标准对该领域 4 个主流医学期刊的研究文献进行质量评价发现,63%的文章至少有两个方面不符合撰写要求标准。

2. 遗传关联性研究报告规范:基因与疾病的关联涉及范围非常广泛,从单基因疾病到多因素综合征,但关联性研究有相同的方法学基础,流行病学中的分析性研究仍然是主要方法<sup>[12]</sup>。

许多遗传关联性研究往往不能在基因型鉴定的准确性、选择偏倚、混杂因素、可能的基因-基因和基因-环境交互效应以及统计功效等的一个(或多个)方面给予详细准确的介绍,甚至不予介绍,最终限制了研究结果的价值。因此, Little 等<sup>[12]</sup>在人类基因组流行病学研讨小组上,主要讨论了研究对象的选择、基因型鉴定的准确性、人群分层以及统计学等方面的问题,并提出了报告和评价基因型频率和基因-疾病关联性研究的推荐标准(表 1)。该标准虽然并未涉及此类研究报告的全部问题,但还是有借鉴意义。我们在报告这类文献时,可以根据遗传关联性研究的实际情况(例如研究问题、研究方法和研究现场等)确定研究报告内容。

3. 观察性研究的 Meta 分析:随着基因-疾病关联的研究证据不断累积,而各个研究之间又存在广泛的异质性,单个研究的显著性不能确保遗传关联,同样缺乏统计学差异的研究结果也不能排除有遗传关联的可能<sup>[9]</sup>。因此,需要及时地综合总结这些研究成果,为遗传流行病学的人群基因检测打下基础<sup>[13]</sup>。Meta 分析可以在已有研究的基础上帮助确定某

作者单位:100083 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

通讯作者:詹思延, Email: siyan-zhan@bjmu.edu.cn

种关联是否存在,并定量确定研究基因和疾病之间的关联大小<sup>[14,15]</sup>。Meta 分析方法在随机临床试验中已经相当成熟;而遗传流行病学的关联性研究,其实质上属于观察性研究,其 Meta 分析与临床随机试验的 Meta 分析一样常见,但两者仍存在一定的差异<sup>[16]</sup>。

表1 报告和评价遗传关联性研究的推荐标准\*

基因型鉴定方法的有效性
生物标本种类
按研究分组报告生物标本收集和分析的时间
按研究分组报告 DNA 提取的成功率
明确研究的基因型;当存在多个等位基因时,明确需要检测的基因型
基因型鉴定的方法(例如 PCR 方法中引物序列、热循环参数、循环次数)
按研究分组报告获得合格的基因型鉴定数据的研究对象的比例
如果采用汇总分析,明确病例和对照的样本汇总的方法
质量控制措施(包括对实验室工作人员采用盲法)
相同质量控制下研究的可重复性
每批研究分析中比较组(例如病例和对照)之间的研究对象的样本
研究对象的选择
入选研究对象的所属地区
选取研究对象的时间
基因型明确的研究对象的选取方法,例如人群随机抽样、献血者、住院患者
病例和对照确定的标准
从家庭中选取病例的数目,以及计算对应研究对象的方法
病例和对照的排除标准
病例和对照的抽样率
研究对象不同性别的平均年龄及标准差(或年龄极差),及其分布情况
能否获得准确基因型数据的研究对象之间的社会人口学特征(或其他特征)的差异
确诊对照为非病例的措施
混杂以及人群分层
研究设计
在未采用病例-家庭对照研究中,分析中的种族匹配或者针对种族的调整措施
在研究设计或统计分析中识别并予以考虑的基因型之间的潜在相关性
统计分析问题
严格地区分验证研究假设和产生研究假设
如采用单倍型分析,必须明确单倍型的构建方式
研究对象的数量
统计分析方法以及统计软件
基因型关联指标的置信区间
评价分析模型的拟合度

\* 仅列出遗传关联性研究文献报告和评价相关的内容和项目

因此,在为遗传关联性研究报告提出规范格式的同时,也必须要求这类文献的 Meta 分析采用严格、标准的报告格式<sup>[17]</sup>。1997 年 4 月,由美国疾病预防控制中心资助,召集了 27 名来自临床实践、现场干预、统计学、流行病学、社会科学以及生物医学编辑等方面的专家组成专题研究小组,讨论并制定了流行病学中观察性研究的 Meta 分析报告内容的推荐一览表(Meta-analysis of observational studies in epidemiology, MOOSE)(表 2)<sup>[17]</sup>,以帮助更加规范的撰写、编辑和阅读此类文献。

遗传关联性研究 Meta 分析的可靠性不仅仅与入选的原

始研究的质量有关,同时还与汇总方法有密切关系<sup>[10]</sup>。因此,在对遗传关联性研究进行 Meta 分析时,不仅要注意一般性问题,如数据提取标准化、人群选择、发表偏倚评价、统计分析以及伦理学等问题<sup>[18]</sup>,还要注意遗传流行病学自身的特殊性,即在进行 Meta 分析必须考虑遗传学和生物统计学前提条件。需要注意的问题有:

表2 观察性研究的 Meta 分析(MOOSE)的

推荐报告内容概览

研究背景
定义研究问题
陈述研究问题假设
确定研究结局
暴露/干预措施
研究设计类型
研究人群
文献检索策略
文献检索的资格(例如图书管理员和调查员)
文献检索策略,包括文献检索的时间范围和使用的关键词
尽可能获取所有文献,包括研究文献作者的个人通信
检索的数据库和档案库
采用检索软件及其版本号,包括使用的特殊功能(例如进行主题词及其下位词的扩展检索)
手工检索(例如已有文献的参考文献清单)
列出纳入和排除的文献,以及判断标准
处理非英语文献的方法
处理只有摘要和未发表文献的方法
介绍个人通信的情况
研究方法
描述检索文献是否符合研究问题
数据整理和编码的基本原则(例如如有完善的临床编码规则或便于编码)
数据分类和编码的记录(例如多个文献评价者,盲法,以及文献评价者之间的一致性)
混杂的评估(例如入选研究中病例和对照的可比性)
评价研究质量,包括对质量评价者采用盲法,对研究结果的可能预测值进行分层分析或者回归分析
评价研究异质性
详细介绍统计分析模型,以便能重复该研究(例如详细描述采用的固定效应模型或者随机效应模型,采用该研究模型分析研究结果的理由,剂量反应关系模型,或者累积 Meta 分析)
提供合适的统计图表
研究结果
绘图总结入选各研究和汇总研究结果
列表描述入选各研究结果
研究结果的敏感度分析(例如亚组分析)
研究结果统计学稳健性的指标
讨论
定量地评价偏倚(例如发表偏倚)
解释排除标准的合理性(例如排除非英语文献)
评价入选研究的质量
研究结论
导致观察到结果的其他可能原因
根据研究所得的数据,在评价文献涉及的领域,对研究结论进行适当地外推
为以后该问题的研究提供指导意见
公布研究资助来源

(1)异质性分析:遗传关联性研究属于观察性研究,其 Meta 分析可能得到精确的结果,也可能得到虚假的结果,必须对入选研究间的异质性进行全面的考虑,而不能只着眼于研究的统计汇总<sup>[16]</sup>。这些研究中广泛异质性通常是由研究

人群和实验室方法的不同而导致的<sup>[18]</sup>。漏斗图在 Meta 分析中能通过图形象反映研究的异质性,但在描述性研究中存在诸多其他偏倚和混杂因素(例如研究对象的人群分层、基因型实验室鉴定、疾病结局的测量等)导致研究的异质性,发表偏倚就显得不那么重要了<sup>[16]</sup>。因此,在定量汇总研究结果时,可以根据入选研究的特点进行亚组分析,以探索和阐明产生异质性的原因,并检验 Meta 分析结果的稳健性。

(2) 检验 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)拟合度: HWE 是指在一定条件下群体中各世代的基因频率保持不变,且基因型频率可以表达成基因频率的特殊函数,影响等位基因遗传平衡的因素主要包括非随机婚配、突变、人群迁移等因素<sup>[19]</sup>。此外,遗传流行病学研究必须考虑其他可能的因素,如实验室基因型鉴定错误,选择对照组时存在选择偏倚、存在人群分层等<sup>[10]</sup>。因此,在汇总研究结果前必须检验 HWE 的拟合度<sup>[20]</sup>。但在病例对照研究的 Meta 分析中,病例组往往更有可能是有偏人群,所以 Schaid, Jacobsen<sup>[21]</sup>提出只在对照组中检验 HWE 的拟合度。而 Attia 等<sup>[10]</sup>建议在 Meta 分析中分别对包含和不包含 HWE 的研究进行敏感度分析,以检验研究结果的稳健性。

(3) 多组数据避免多次重复比较: 一般的观察性研究的 Meta 分析只有两组进行比较,例如病例组和对照组、或暴露组和非暴露组,在这种情况下进行 Meta 分析较为简单;而遗传关联性研究中,等位基因存在多态性,至少存在三种基因型,这类问题的 Meta 研究分析涉及多组数据之间比较。如果进行多次重复两两比较,将降低统计分析的把握度,增大 I 类错误。

(4) 采用比较敏感的遗传模型进行分析: 在评价基因-疾病关联时,研究者往往收集不同基因型的发病危险。这样多种基因型比较分析通常简化成两组进行分析,其方法有多种:①直接比较基因频率;②通过假设遗传模型简化成两组(例如显性模型、隐性模型、共显性模型和超显性模型);③进行多次两两比较;④对上述模型多次比较,选用合适的遗传模型。不同的遗传模型具有不同的假设,这就需要在分析时利用现有遗传学和生物学专业知识,选用较为合理的模型进行分析,以获得更为准确合理的结果。需要注意的是,如果采用多个遗传模型,应当使用 Bonferroni 方法对多次两两比较进行校正,调整 P 值以减小统计分析中的 I 类错误。

结论: 常见复杂疾病的遗传流行病学研究一般样本量较小,其结果往往不一致,且难以重复。因此,在明确某一基因与疾病关联时,必须规范遗传关联性研究的报告,并综合已有研究结果进行 Meta 分析,获得更为准确的关联性结论。

#### 参 考 文 献

- 1 Khoury MJ. Commentary: Epidemiology and the Continuum from genetic research to genetic testing. *Am J Epidemiol*, 2002, 156: 297-299.
- 2 Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 2000, 405: 847-856.
- 3 Freely associating. *Nat Genet*, 1999, 22: 1-2.
- 4 Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genetics*, 2003, 33: 177-182.
- 5 Ioannidis JPA. Genetic association: false or true? *Trends in Molecular Medicine*, 2003, 9: 135-138.
- 6 Ioannidis JPA, Trikalinos TA, Ntzani EE, et al. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet*, 2003, 361: 567-571.
- 7 Boffetta P, Pearce N. Epidemiological studies on genetic polymorphism: study design issues and measures of occurrence and association. *IARC Sci Publ*, 1999, 148: 97-108.
- 8 Morgan TM, Coffey CS, Krumholz HM. Overestimation of genetic risks owing to small sample sizes in cardiovascular studies. *Clin Genet*, 2003, 64: 7-17.
- 9 Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al. Replication validity of genetic association studies. *Nature Genetics*, 2001, 29: 306-309.
- 10 Attia J, Thakkinstian A, D'Este C. Meta-analyses of molecular association studies: methodologic lessons for genetic epidemiology. *J Clin Epidemiol*, 2003, 56: 297-303.
- 11 Bogardus ST, Concato J, Feinstein AR. Clinical epidemiological quality in molecular genetic research: the need for methodological standards. *JAMA*, 1999, 281: 1919-1926.
- 12 Little J, Bradley L, Bray MS, et al. Reporting, appraising, and integrating data on genotype prevalence and gene-disease association. *Am J Epidemiol*, 2002, 156: 300-310.
- 13 Little J, Khoury MJ, Bradley L, et al. The human genome project is complete. How do we develop a handle for the pump? *Am J Epidemiol*, 2003, 157: 667-673.
- 14 Maria B, Willi S, Brigitte S, et al. Traditional reviews, meta-analyses and pooled analyses in epidemiology. *Int J Epidemiol*, 1999, 28: 1-9.
- 15 Doll R. The use of meta-analysis in epidemiology: diet and cancers of the breast and colon. *Nutr Rev*, 1994, 52: 233-237.
- 16 Egger M, Schneider M, Davey SG. Spurious precision? Meta-analysis of observational studies. *BMJ*, 1998, 316: 140-144.
- 17 Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology. a proposal for reporting. *JAMA*, 2000, 283: 2008-2012.
- 18 Taioli E, Bonassi S. Methodological issues in pooled analysis of biomarker studies. *Mutation Research*, 2002, 512: 85-92.
- 19 Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. *Fundamentals of genetic epidemiology*. New York: Oxford University Press, 1993. 49-54.
- 20 Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, 48: 361-372.
- 21 Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased tests of association: comparison of allele frequencies when departing from the Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol*, 1999, 149: 706-711.

(收稿日期: 2006-03-23)

(本文编辑: 张林东)