

谷丙转氨酶与胆石症之间的因果关系： 一项双样本孟德尔随机研究

王浩¹, 程源², 潘晓维², 杨明久², 陈政², 植俊华², 陈铎新³,
李秀云^{4*}

¹重庆医科大学附属第二临床医院肝胆外科, 重庆

²重庆市垫江县中医院肝胆外科, 重庆

³重庆医科大学第二临床学院, 重庆

⁴重庆市垫江县人民医院肝胆外科, 重庆

收稿日期: 2024年4月21日; 录用日期: 2024年5月14日; 发布日期: 2024年5月21日

摘要

背景: 转氨酶, 即丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 主要存在于肝脏细胞中。转氨酶水平升高通常是肝细胞损害的指标。胆系结石的形成主要与胆汁中的胆盐、胆固醇等成分的平衡失调有关, 一些肝脏疾病或损害, 例如肝炎、脂肪肝、肝硬化等, 可能间接地增加胆结石的风险。丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平升高是否会导致胆系结石的发病率升高的因果关系尚不清楚。本研究使用两个样本孟德尔随机化(MR)来阐明丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平升高是否会提高胆系结石发病率的潜在因果关系。**方法:** 使用逆方差加权(IVW)、加权中值和MR-Egger回归方法进行双样本孟德尔随机化(MR)分析。我们使用公开的全基因组关联研究(GWAS)荟萃分析汇总统计数据集, 对欧洲血统个体($n = 437,267$)的谷丙转氨酶(Alanine Transaminase)进行暴露, 并使用GWAS进行非癌症疾病代码自我报告: 胆石症(Cholelithiasis)中包含的个体(总数 = 487,553)作为结果。**结果:** 我们从谷丙转氨酶(Alanine Transaminase)的GWAS中选择了240个具有全基因组意义的单核苷酸多态性作为工具变量。IVW方法显示证据支持谷丙转氨酶(Alanine Transaminase)和胆石症(Cholelithiasis)之间存在因果关系($\beta = 1.959$, $SE = 0.542$, $P = 0.0003$)。MR-Egger回归显示, 定向多效性不太可能使结果产生偏差(截距 = 0.0027, $P = 0.549$), 但显示谷丙转氨酶和胆石症之间没有因果关系($\beta = 1.44$, $SE = 1.021$, $P = 0.1596$)。然而, 加权中位数方法得出了Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)和胆石症(Cholelithiasis)之间存在因果关系的证据($\beta = 1.959$, $SE = 0.5422$, $P = 0.0003$)。Cochran的Q检验和漏斗图表明没有异质性和不对称性的证据, 表明没有方向性多效性。**结论:** 孟德尔随机化分析结果支持丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平升高会提高胆石症发病率。

关键词

孟德尔随机化, 胆石症, 转氨酶, 病因, 肝功能不全

*通讯作者。

Association between Alanine Transaminase and Cholelithiasis: A Two-Sample Mendelian Randomization Study

Hao Wang¹, Yuan Chen², Xiaowei Pan², Mingjiu Yang², Zheng Chen², Junhua Zhi², Xinxin Chen³, Xiuyun Li^{4*}

¹Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

²Department of Hepatobiliary Surgery, Traditional Chinese Medicine Hospital, Dianjiang, Chongqing, Chongqing

³The Second Clinical College, Chongqing Medical University, Chongqing

⁴Department of Hepatobiliary Surgery, Dianjiang County People's Hospital of Chongqing, Chongqing

Received: Apr. 21st, 2024; accepted: May 14th, 2024; published: May 21st, 2024

Abstract

Background: Transaminases, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), are found primarily in liver cells. Elevated aminotransferase levels are usually an indicator of liver cell damage. The formation of stones in the biliary system is mainly related to an imbalance in the balance of bile salts, cholesterol, and other components of bile. Some liver diseases or damage, such as hepatitis, fatty liver, and cirrhosis, may indirectly increase the risk of gallstones. Whether elevated alanine aminotransferase (ALT) levels causally contribute to the increased incidence of biliary system stones is not known. This study used two-sample Mendelian randomization (MR) to elucidate the potential causality of whether elevated alanine aminotransferase (ALT) levels increase the incidence of gallstones. **Methods:** Two-sample Mendelian randomization (MR) analyses were performed using inverse variance weighting (IVW), weighted median, and MR-Egger regression methods. We used publicly available genome-wide association study (GWAS) meta-analysis summary statistics sets for exposure to alanine transaminase in individuals of European ancestry (n = 437,267) and self-reporting of non-cancer disease codes using the GWAS: individuals included in Cholelithiasis (Total = 487,553) as outcomes. **Results:** We selected 240 single nucleotide polymorphisms of genome-wide significance as instrumental variables from the GWAS of alanine transaminase. IVW methods showed evidence supporting a causal relationship between alanine transaminase and cholelithiasis ($\beta = 1.959$, SE = 0.542, P = 0.0003). MR-Egger regression showed that directed pleiotropy was unlikely to bias the results (intercept = 0.0027, P = 0.549), but showed no causal relationship between ghrelin and cholelithiasis ($\beta = 1.44$, SE = 1.021, P = 0.1596). However, the weighted median approach yielded evidence of a causal relationship between liver enzyme levels (Alanine Transaminase) and cholelithiasis ($\beta = 1.959$, SE = 0.5422, P = 0.0003). Cochran's Q-test and funnel plots showed no evidence of heterogeneity or asymmetry, indicating no directional pleiotropy. **Conclusion:** The results of Mendelian randomization analysis support that elevated alanine aminotransferase (ALT) levels increase the incidence of cholelithiasis.

Keywords

Mendelian Randomization, Cholelithiasis, Transaminases, Etiology, Hepatic Insufficiency



1. 引言

肝内外胆管结石(胆石病)是一种在胆囊或胆管中形成结石的疾病, 结石主要由胆固醇、胆盐和钙等成分组成。受胆石症影响的人数较多, 估计占成年人口的 10%~20%, 给世界各地的社会带来了重大的经济压力[1]。为了减轻这种健康负担, 我们进行了大量的工作来确定导致胆石症发生的危险因素。胆囊是负责储存胆汁的器官, 而胆汁是由肝脏分泌, 用于帮助消化脂肪。当胆囊中的胆汁成分失衡或胆囊排空减慢时, 就容易导致结石的形成。胆石症的病因并不完全明确, 但与一些因素和条件有关, 包括胆囊排空减慢、胆汁成分不平衡、遗传因素、不良的生活方式和饮食习惯, 以及糖尿病等, 其中胆汁成分不平衡是胆石病形成的主要原因[2] [3]。胆汁的成分发生改变可以由多种潜在因素引起, 如饮食习惯的改变和肝脏疾病(肝硬化或肝炎等); 还有胆囊排空减慢, 如长时间的禁食、胃肠道运动减缓或胆囊功能障碍等情况可能导致胆囊排空减慢, 使胆汁在胆囊内停留时间过长, 影响胆汁成分的平衡[4]; 除此之外有家族遗传史的个体可能更容易出现胆汁成分的改变, 增加结石形成的风险等[5]。目前, 较为明确的是胆石症常常引起肝功损伤, 导致丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平上升, 有观察性研究显示, 一次全国健康和营养检查调查(NHANES)的队列数据, 在长达 21 年的随访期间中, 通过超声检查确定患有胆石症($n = 833$)的人是否更有可能出现丙氨酸氨基转移酶(ALT)高于未接受胆囊切除术或胆石症的人($n = 8027$), 结果显示既往有胆石症的人血清 ALT 升高的可能性比未接受胆囊切除术的人高(比值为 1.8, 95% CI 1.3~2.5)。且没有发现胆石症与血清 ALT 水平之间存在独立关联[6]。然而, 目前尚未有明确的证据证明谷丙转氨酶水平升高是否会导致胆石病发病率升高。

观察性研究很容易出现反向因果关系和残余混杂等偏差, 因此限制了我们关于转氨酶对胆石症发病率影响的理解。孟德尔随机化(MR)是一种使用遗传变异作为工具变量(IV)来评估风险因素与结果之间的观察关联是否与因果效应一致的技术。双样本 MR 估计因果效应, 其中暴露数据和据我们所知, 之前没有研究使用 MR 方法来测试谷丙转氨酶对胆石病发病风险的因果影响。因此, 本研究旨在通过双样本 MR 分析来检验谷丙转氨酶是否与胆石病的发生存在因果关系。

2. 材料和方法

2.1. 数据来源和遗传变异的选择

我们搜索了 MR Base 数据库(<http://www.mrbase.org/>), 该数据库包含来自数百个全基因组关联研究(GWAS)的大量汇总统计数据。我们使用欧洲血统个体($n = 437,267$; 英国生物银行参与者) Liver enzyme levels (Alanine Transaminase) [7]的 GWAS 荟萃分析的公开汇总统计数据集作为暴露。基于 $5.00E-08$ 的 P 值阈值(全基因组显著性), 使用与 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)相关的遗传变异的双样本 MR 研究作为工具变量(IV)来改进推理。我们获得了与 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)相关的 240 个单核苷酸多态性(SNP)的汇总统计数据(β 系数和标准误差), 作为来自 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)的 GWAS 的 IV, 并随后去除具有连锁不平衡(LD)的 SNP ($r^2 < 0.01$, 聚集窗口大小 = 10,000 kb)。最后, 我们使用 F 统计量来评估工具变量(IV)的强度。该指标是使用公式 $[F = R^2 \times (N - k - 1) / k \times (1 - R^2)]$ 得出的, 该公式考虑了各种因素, 包括总方差(R^2)、样本大小(N)和数量分析中包含的 IV 数量(k) [8]。弱遗传仪器被定义为 F 统计量 < 10 的仪器, 因此被排除在我们的分析之外[9]。本研究使用的胆石病

的 GWAS 摘要统计数据于 2021 年 9 月公开, 其中包含 Cholelithiasis 个体总数 = 487,553 (<https://doi.org/10.1038/s41588-021-00931-x>)作为结果[10]。

2.2. 孟德尔随机化的统计分析

孟德尔随机化分析要求遗传变异与暴露相关, 但不要求暴露的潜在混杂因素[11]。首先, 我们评估了 SNP 与 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)的独立关联。其次, 我们检查了每个 SNP 与胆石症风险之间的关联。第三, 我们结合这些发现, 利用 MR 分析来估计 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)与胆石症风险之间的非复合因果关系。我们进行了双样本 MR, 这是一种使用不同 GWAS 的汇总统计数据来估计暴露(谷丙转氨酶 Alanine Transaminase)对结果(胆石症 Cholelithiasis)因果影响的方法[12], 使用汇总数据评估 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)与胆石症(Cholelithiasis)风险之间的因果关系来自 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)和胆石症(Cholelithiasis) GWAS, 其中 240 个 SNP 作为工具变量(IV) (表 1)。

当每个遗传变异满足 IV 的假设时, 逆方差加权(IVW)方法使用荟萃分析方法来结合从不同 SNP 获得的因果效应的 Wald 比估计, 并提供暴露对结果的因果效应的一致估计[13]。尽管 MR 分析中包含多个变异会导致统计功效增加, 但它有可能包含无效 IV 的多效性遗传变异。12 为了探索和调整多效性, 由于遗传变异与多个变量之间存在关联, 因此采用了加权中位数和 MR-Egger 回归方法。MR-Egger 回归分析对无效仪器具有鲁棒性, 通过合并来自多个个体变异的因果效应的汇总数据估计, 引入用于这种偏差的参数来测试和解释不平衡多效性的存在。14MR-Egger 应用加权线性基因结果系数对基因暴露系数的回归[14]。该回归的斜率代表因果效应估计, 截距可以解释为对遗传变异的平均水平多效性效应的估计[15]。加权中位数即使贡献分析的信息中有高达 50%来自无效 IV 的遗传变异, 估计器也能提供对因果效应的一致估计。与 MR-Egger 分析相比, 加权中值估计器的优点是保留估计的精度更高。当 $P < 0.05$ 时, 测试被认为具有统计显著性。所有 MR 分析均在 MR Base 平台中进行[16]。

2.3. 异质性和敏感性测试

为了评估我们研究结果的重要性, 我们进行了各种敏感性分析。Cochran 的 Q 检验用于评估与谷丙转氨酶相关的 SNP 之间的异质性。进行留一分析以评估单个 SNP 对总体估计的影响, 从而识别任何显著影响因果效应估计的异常工具变量[17]。此外, 我们采用 MR-Egger 回归来评估水平多效性[18]。MR-Egger 回归使我们能够评估工具变量是否对结果具有多效性影响。如果 MR-Egger 截距的 P 值 > 0.05 , 则每个 SNP 满足孟德尔假设, 并且使用 IVW 获得的结果被认为是可靠的。相反, 如果截距的 P 值 < 0.05 , 则工具变量表明潜在的方向多效性。

3. 结果

3.1. 孟德尔随机化的工具变量

Table 1. MR Estimates for each method used to assess the effect of Liver enzyme levels (Alanine Transaminase) on the risk of cholelithiasis

表 1. 评估 Liver enzyme levels (Alanine Transaminase)对胆石症(Cholelithiasis)发病风险影响的每种方法的 MR 估计值

MR method	Number of SNPs	Beta	SE	OR	95% confidence interval	P-value
MR Egger	240	1.44	1.44	4.2207	0.57~31.22	0.1596
Weighted median	240	1.641	1.641	5.16033	2.82~9.429	9.56E-08

续表

Inverse variance weighted	240	1.959	1.959	7.09223	2.45~20.52	0.000303
Weighted mode	240	2.346	2.346	10.4437	2.08~52.39	0.004741

Beta, β 系数; MR, 孟德尔随机化; SE, 标准误; SNP, 单核苷酸多态性。

我们从谷丙转氨酶的 GWAS 中选择了 240 个独立的 SNP 作为工具变量。所有这些都与全基因组显著性的谷丙转氨酶相关(表 1, 图 1)。P 值为 5.00E08 对应于每个单一变体的 F 统计量 > 30 [11]。表明所有 IV 对于 MR 分析都足够有效。F < 10 的阈值已用于定义“弱工具变量”。因此, 弱仪器偏差可以忽略不计。

3.2. 孟德尔随机化结果

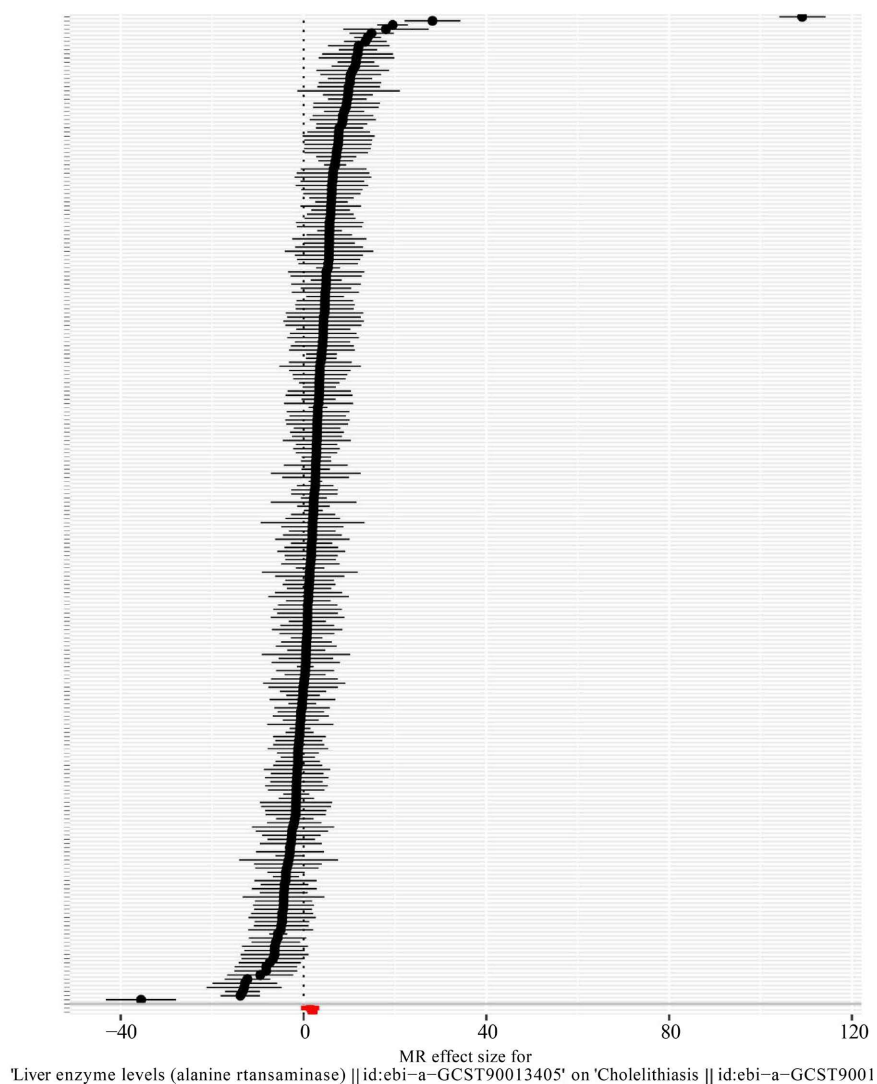


Figure 1. Forest plot of the causal effects of single nucleotide polymorphisms associated with alanine transaminase on cholelithiasis. The significance of red lines are MR results of MR-Egger test and IVW method

图 1. 与谷丙转氨酶相关的单核苷酸多态性对胆石症的因果影响的森林图。红线是 MR-Egger 测试和 IVW 方法的 MR 结果

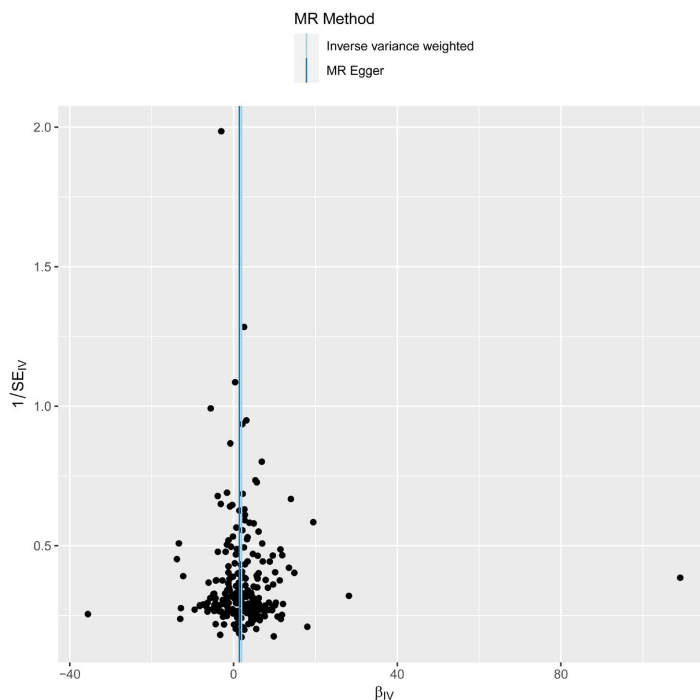


Figure 2. Funnel plot to assess heterogeneity. The blue line represents the inverse-variance weighted estimate, and the dark blue line represents the Mendelian randomization-Egger estimate

图 2. 用于评估异质性的漏斗图。蓝线代表逆方差加权估计，深蓝线代表 Mendelian randomization-Egger 估计

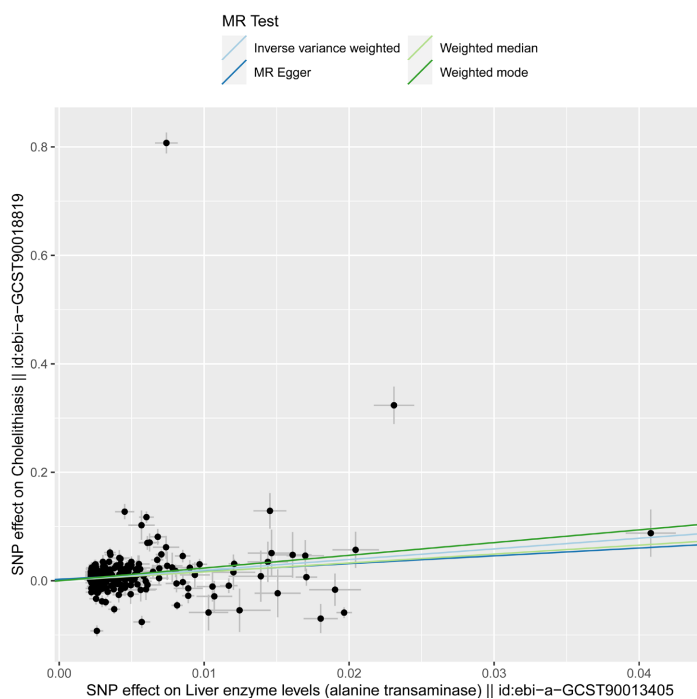


Figure 3. Scatter plots of genetic associations with alanine transaminase against the genetic associations with cholelithiasis. The slopes of each line represent the causal association for each method. The blue line represents the inverse-variance weighted estimate, the green line represents the weighted median estimate, and the dark blue line represents the Mendelian randomization-Egger estimate

图 3. 谷丙转氨酶遗传关联与胆石症遗传关联的散点图。每条线的斜率代表每种方法的因果关联。蓝线代表逆方差加权估计，绿线代表加权中值估计，深蓝线代表 Mendelian randomization-Egger 估计

IVW 方法显示证据支持谷丙转氨酶水平(Alanine Transaminase)和胆石症(Cholelithiasis)之间存在因果关系($\beta = 1.959$, $SE = 0.542$, $P = 0.0003$; 表 1, 图 1 和图 2)。IVW 和加权中位数方法表明谷丙转氨酶(Alanine Transaminase)水平升高会导致胆石症(Cholelithiasis)发病风险升高(图 3)。截距代表遗传变异的平均多效性(变异对结果的平均直接影响)。截距不为零(MR-Egger 检验)表示方向多效性。MR-Egger 回归显示, 方向多效性不太可能使结果产生偏差(截距 = 0.0027; $P = 0.549$)。漏斗图中的不对称表明方向水平多效性, 这可能会使 MR 方法产生偏差; 然而, 漏斗图和 MR Egger 回归测试没有显示不对称的证据(图 2)。MR-Egger 分析相比, 加权中位数估计量具有保持估计精度更高的优点, MR 分析的结果可能支持。尽管 Cochran Q 检验显示我们的数据存在异质性($Q = 2933$, $P < 0.05$), 但我们的结果仍然稳健, 因为使用了 IVW, 留一结果的森林图(图 1)。

4. 结论和展望

各种引起胆汁成分改变的条件被认为是胆石症发生的危险因素[19]。胆石症常常伴随着肝功能的损伤, 导致血清谷丙转氨酶水平升高。然而, 血清谷丙转氨酶水平是否会导致胆石病发病率升高的因果关系尚不确定。我们采用了三种不同的估计方法(逆方差加权法、加权中值法和 MR-Egger 回归)进行 MR 分析。我们的研究表明谷丙转氨酶是导致胆石病发病率升高的潜在危险因素。尽管使用 IVW、MR Egger 和加权中值分析得出的 MR 估计值并不一致, 但 IVW 和加权中值分析支持谷丙转氨酶水平升高导致胆石病发病率升高。考虑到与 MR-Egger 分析相比, 加权中值估计量的优点是在估计中保持更高的精度。孟德尔随机化最大限度地减少了观察性研究固有偏差的可能性。然而, MR 研究很容易受到多效性偏差的影响, 具有多个变量的遗传变异。遗传变异可能与多种表型相关, 这是一种称为“多效性”的现象, 这可能会导致 MR 的估计混杂, 并可能导致因果估计有偏差[20]。在 MR 分析中包含多个变异通常会提高统计功效, 还可能导致包含无效工具变量的多效性遗传变异[21]。因此, 需要应用敏感性分析方法来测试结论的有效性取自孟德尔随机化研究。为了消除多效性, 我们采用了加权中值估计器, 即使 50% 的 SNP 不是有效工具, 它也能提供有效的估计[22], 并且我们使用 MR-Egger 回归来提供不平衡多效性的检验以及对不平衡多效性影响的因果估计[14]。我们的结果在所有三种方法中并不一致。MR-Egger 方法会导致精度和功效的损失, 并且我们的加权中值估计器结果也与 IVW 估计器结果相似, 从而为这些关联提供了额外的置信度。

目前的研究结果可能为确定肝功损伤导致胆石病发病率升高的潜在机制提供了机会。本研究有几个局限性。首先, 遗传变异对给定暴露(谷丙转氨酶)的影响不大, 因为它们只能解释特定暴露中很小比例的方差[23]。我们的分析检测关联的能力可能有限。其次, 谷丙转氨酶和胆石症的研究是基于欧洲血统的参与者。由于因果关系可能取决于种族和选择偏差, 因此需要对其他人群进行进一步的孟德尔随机化的研究。第三, 由于我们使用了 GWAS 汇总级统计数据, 我们无法根据性别、年龄或其他因素调查分层效应。这些因素只有在拥有 GWAS 个体层面的统计数据后才能进行研究。重要的是, 目前转氨酶水平尚未被证明是胆石症的潜在危险因素, 且从未进行过 MR。据我们所知, 这是第一个关于谷丙转氨酶水平(Alanine Transaminase)和胆石症(Cholelithiasis)之间因果关系的此类研究。总之, MR 分析的结果支持谷丙转氨酶水平(Alanine Transaminase)升高会导致胆石症(Cholelithiasis)发病率增加。且后续需要大量的基础研究和临床研究去验证这一结论。

胆石症是一种常见的胆道系统疾病, 其病因至今尚未完全清楚, 但包括遗传、生活方式和环境因素在内的多种因素可能对其发病起着作用。未来针对胆石症病因的研究方向可以从以下几个方面展开: 第一, 通过深入研究与胆石症相关的基因变异, 探索遗传因素在疾病发展中的作用。利用基因组学技术, 如全基因组关联分析(GWAS), 寻找与胆石症发生和发展相关的关键基因, 揭示遗传易感性和疾病发病机

制；第二，开展针对胆石症的代谢组学研究，探索体内代谢物在疾病发生发展中的变化，寻找特定的生物标志物，用于早期诊断、预测疾病进展以及评估治疗效果；第三，探究肠道菌群与胆石症之间的关系，研究肠道微生物的种群结构和功能，在疾病的发生和发展中的作用，以及肠道菌群与胆汁成分、胆囊功能的关联性。第四，深入研究生活方式(如饮食习惯、运动等)和环境因素(如污染、化学物质暴露等)与胆石症的关系，探索这些因素如何影响胆囊功能、胆汁成分以及胆石形成。最后，可以深入研究胆囊和胆道系统的分子生物学机制，探讨胆囊黏膜细胞、胆道上皮细胞等在胆石形成过程中的作用和变化。

未来的研究方向应该是综合利用多种高通量技术和系统生物学方法，从分子水平到组织水平，深入探索胆石症的发病机制和相关因素。这将有助于提高对胆石症的预防、诊断和治疗水平，为未来个性化医疗和精准健康提供更深入的科学支持。

致 谢

本研究受到重庆市卫生健康委医学科科研项目“多种微创技术联合治疗老年患者肝胆管结石的临床研究(项目编号 2023WSJK036)”资助。

由王浩，程源设计并起草了稿件；潘晓维，杨明久，陈政，植俊华，陈镛新修改稿件；李秀云对研究的进行予以指导。所有作者都阅读并批准了最终稿件。

参考文献

- [1] Lammert, F., Gurusamy, K., Ko, C.W., *et al.* (2016) Gallstones. *Nature Reviews Disease Primers*, **2**, Article No. 16024. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.24>
- [2] Wang, D.Q.-H., Zhang, L. and Wang, H.H. (2005) High Cholesterol Absorption Efficiency and Rapid Biliary Secretion of Chylomicron Remnant Cholesterol Enhance Cholelithogenesis in Gallstone-Susceptible Mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1733**, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2004.12.005>
- [3] Chen, L., Yang, H., Li, H., *et al.* (2022) Insights into Modifiable Risk Factors of Cholelithiasis: A Mendelian Randomization Study. *Hepatology*, **75**, 785-796. <https://doi.org/10.1002/hep.32183>
- [4] Shoda, J., Tanaka, N., He, B.-F., *et al.* (1993) Alterations of Bile Acid Composition in Gallstones, Bile, and Liver of Patients with Hepatolithiasis, and Their Etiological Significance. *Digestive Diseases and Sciences*, **38**, 2130-2141. <https://doi.org/10.1007/BF01297095>
- [5] Rebbholz, C., Krawczyk, M. and Lammert, F. (2018) Genetics of Gallstone Disease. *European Journal of Clinical Investigation*, **48**, e12935. <https://doi.org/10.1111/eci.12935>
- [6] Ioannou, G.N. (2010) Cholelithiasis, Cholecystectomy, and Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*, **105**, 1364-1373. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.737>
- [7] Pazoki, R., Vujkovic, M., Elliott, J., *et al.* (2021) Genetic Analysis in European Ancestry Individuals Identifies 517 Loci Associated with Liver Enzymes. *Nature Communications*, **12**, Article No. 2579. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22338-2>
- [8] Noyce, A.J., Kia, D.A., Hemani, G., *et al.* (2017) Estimating the Causal Influence of Body Mass Index on Risk of Parkinson Disease: A Mendelian Randomisation Study. *PLOS Medicine*, **14**, e1002314. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002314>
- [9] Burgess, S., Thompson, S.G., CRP CHD Genetics Collaboration (2011) Avoiding Bias from Weak Instruments in Mendelian Randomization Studies. *International Journal of Epidemiology*, **40**, 755-764. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr036>
- [10] Sakaue, S., Kanai, M., Tanigawa, Y., *et al.* (2021) A Cross-Population Atlas of Genetic Associations for 220 Human Phenotypes. *Nature Genetics*, **53**, 1415-1424. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00931-x>
- [11] Burgess, S., Butterworth, A. and Thompson, S.G. (2013) Mendelian Randomization Analysis with Multiple Genetic Variants Using Summarized Data. *Genetic Epidemiology*, **37**, 658-665. <https://doi.org/10.1002/gepi.21758>
- [12] Hartwig, F.P., Davies, N.M., Hemani, G. and Smith, G.D. (2016) Two-Sample Mendelian Randomization: Avoiding the Downsides of a Powerful, Widely Applicable but Potentially Fallible Technique. *International Journal of Epidemiology*, **45**, 1717-1726. <https://doi.org/10.1093/ije/dyx028>
- [13] Pierce, B.L. and Burgess, S. (2013) Efficient Design for Mendelian Randomization Studies: Subsample and 2-Sample

- Instrumental Variable Estimators. *American Journal of Epidemiology*, **178**, 1177-1184.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwt084>
- [14] Bowden, J., Davey Smith, G. and Burgess, S. (2015) Mendelian Randomization with Invalid Instruments: Effect Estimation and Bias Detection through Egger Regression. *International Journal of Epidemiology*, **44**, 512-525.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyv080>
- [15] Burgess, S. and Thompson, S.G. (2017) Interpreting Findings from Mendelian Randomization Using the MR-Egger Method. *International Journal of Epidemiology*, **32**, 377-389. <https://doi.org/10.1007/s10654-017-0255-x>
- [16] Hemani, G., Zheng, J., Elsworth, B., *et al.* (2018) The MR-Base Platform Supports Systematic Causal Inference Across the Human Phenome. *eLife*, **7**, e34408. <https://doi.org/10.7554/eLife.34408>
- [17] Chen, X., Kong, J., Pan, J., *et al.* (2021) Kidney Damage Causally Affects the Brain Cortical Structure: A Mendelian Randomization Study. *eBioMedicine*, **72**, Article 103592. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103592>
- [18] MacGregor, J.O. (2019) Implementing MR-PRESSO and GCTA-GSMR for Pleiotropy Assessment in Mendelian Randomization Studies from a Practitioner's Perspective. *Genetic Epidemiology*, **43**, 609-616.
<https://doi.org/10.1002/gepi.22207>
- [19] Paumgartner, G. and Sauerbruch, T. (1991) Gallstones: Pathogenesis. *The Lancet*, **338**, 1117-1121.
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91972-W](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91972-W)
- [20] Paaby, A.B. and Rockman, M.V. (2013) The Many Faces of Pleiotropy. *Trend in Genetics*, **29**, 66-73.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.010>
- [21] Smith, G.D. and Ebrahim, S. (2004) Mendelian Randomization: Prospects, Potentials, and Limitations.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15075143/>
- [22] Bowden, J., Smith, G.D., Haycock, P.C. and Burgess, S. (2016) Consistent Estimation in Mendelian Randomization with Some Invalid Instruments Using a Weighted Median Estimator. *Genetic Epidemiology*, **40**, 304-314.
<https://doi.org/10.1002/gepi.21965>
- [23] Swerdlow, D.I., Kuchenbaecker, K.B., Shah, S., *et al.* (2016) Selecting Instruments for Mendelian Randomization in the Wake of Genome-Wide Association Studies. *International Journal of Epidemiology*, **45**, 1600-1616.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyw088>