

肠道菌群与急性髓系白血病发病风险： 两样本双向孟德尔随机化研究

周艳群^{1,2}, 赵世波^{1,2}, 黄礼明^{1,2}

(¹ 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵阳 550000; ² 贵州中医药大学第二附属医院血液科, 贵阳 550000)

摘要 **目的** 通过两样本双向孟德尔随机化的(MR)方法探索肠道菌群(IF)丰度与急性髓系白血病(AML)发病风险的因果关联。**方法** IF丰度以及AML全基因组关联数据集分别来自MiBioGen联盟以及FinnGen数据库。方差逆加权方法作为主要分析方法,以Weighted median检验补充,Cochran's Q检验评估异质性,MR-随机化多效性残差和异常值(MR-PRESSO)检测是否存在离群值,MR-Egger intercept检验评估是否存在水平多效性。**结果** 遗传决定的较高丰度的小杆菌属($P=0.034$, $OR=4.373$, 95% CI : 1.329 ~ 14.392)、韦荣球菌科($P=0.009$, $OR=2.029$, 95% CI : 1.839 ~ 3.866)、毛螺科 UCG008 属($P=0.034$, $OR=3.827$, 95% CI : 1.107 ~ 13.228)与较高的AML发病风险相关;较高丰度的瘤胃球菌科($P=0.042$, $OR=0.176$, 95% CI : 0.033 ~ 0.939)、消化球菌科($P=0.025$, $OR=0.168$, 95% CI : 0.035 ~ 0.803)与较低的AML发病风险相关。**结论** 遗传决定较高水平的小杆菌属、韦荣球菌科、毛螺科 UCG008 属是AML发病危险因素,瘤胃球菌科、消化球菌科是AML发病保护因素。

关键词 肠道菌群;急性髓系白血病;孟德尔随机化;因果关联;发病风险

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-2047-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.021

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人最常见的白血病类型,病因和发病机制尚不明确。近年来,对AML的诊断和治疗取得了进展,但仍有35%~45%的患者难治或复发^[1],总体预后不佳。这表明除了遗传学与表观遗传学改变以外,还有其他因素参与了AML的发生与发展。研究^[2]发现,肠道菌群(intestinal flora, IF)的变化与AML密切相关,IF稳定的患者临床结局更好,感染风险更低;而IF失调加速AML进展,菌群移植能扭转这一过程^[3]。提示IF与AML相互影响。然而,由于缺乏随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)的证据,IF与AML之间是否存在因果关系尚不清楚。孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是一种有效的探索因果关联的研究方法,可以排除混杂因素的影响,在推断危险因素和疾病结局之间的因果关系方面应用广泛^[4]。因此该研究从目前最全面的IF的GWAS数据中选择工具变量

(instrumental variables, IVs),通过MR方法评估IF丰度与AML发病的遗传关联,为本病病因学探索以及预防、治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源 IF的GWAS数据来源于MiBioGen联盟(<https://mibogen.gcc.rug.nl/>)在2021年发表的迄今为止最大IF的16S rRNA基因测序谱和基因分型数据,该联盟包括24个基于人群的队列,共有18 340名参与者,研究小组确定了211个分类群(从属到门水平)中的122 110个变异位点,以分析不同种群中转基因分类群的变异。其中15个未知科或属被排除,剩下196个微生物分类群用于MR分析^[4]。AML的GWAS数据来源于R9版本的FinnGen数据库(<https://www.finnngen.fi/en>),根据ICD-10编码诊断,包括231例成人AML病例,287 136例对照,中位发病年龄66.10岁,患有其他恶性肿瘤的个体均未纳入研究。

1.2 研究设计 IVs 筛选 首先,将IF丰度的GWAS数据作为暴露,AML的GWAS数据作为结局,探索IF丰度与AML风险是否具有因果关系;随后以AML的GWAS数据作为暴露,IF丰度的GWAS数据作为结局,开展反向MR研究,以探索遗

2024-09-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:82460911);贵州中医药大学研究生教育创新计划项目(编号:YCXKYB2023008)

作者信息: 周艳群,女,博士研究生;

黄礼明,男,教授,博士生导师,通信作者, E-mail: Huanglm1963@163.com

传决定的 AML 是否对 IF 丰度有影响。MR 分析使用与环境暴露相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 作为遗传 IVs 评估暴露与结局的因果关联,合格的 IVs 必须满足以下 3 个假设:相关性,IVs 与 IF 之间存在强关联;独立性,IVs 与影响 AML 的混杂因素无关;排他性,IVs 仅通过 IF 丰度影响 AML 发病风险。根据 MR 3 大假设以及文献研究,本研究中有有效的 IVs 需要满足以下筛选条件:首先,IVs 在全基因组范围内与 IF 丰度显著相关 ($P < 5 \times 10^{-6}$);其次,统计能力弱的 IVs (F -统计量 ≤ 10) 也被排除在外;最后,设置 $R^2 < 0.001$ 和 $KB = 10\ 000$ 以排除 IVs 之间的连锁不平衡。MR 研究 3 大假设示意图见图 1。

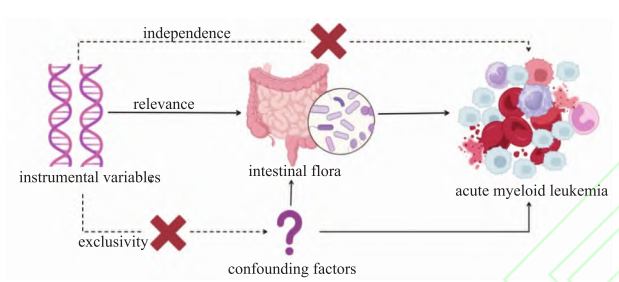


图 1 MR 研究 3 大假设
Fig. 1 Three hypotheses for MR research

1.3 统计学处理 采用 R 软件 (4.3.0 版) 中的 TwoSampleMR 包 (8.3.1 版) 对所有数据进行分析。根据 MR 研究报告指南 STROBE-MR 指示,对于两样本 MR 分析,在不存在水平多效性的情况下,逆方差加权 (inverse variance weighted, IVW) 检验结果作为主要结果,加权中位数 (weighted median)、加权众数法 (weighted median)、MR Egger 检验作为补充,以评估结果的稳健性;如果具有异质性的 SNPs 比例大于 50%,则加权中位数检验稳健性更强;如果具有水平多效性 SNPs 的比例大于 50%,则 MR-Egger 检验结果更可靠,以上检验均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Cochran's Q 检验评估异质性,当异质性显著时 (Cochran's $Q P < 0.05$) 采用随机效应

IVW,反之,采用固定效应 IVW;采用 MR-随机化多效性残差和异常值 (MR-PRESSO) 检测所选 SNPs 中是否存在离群值,MR-PRESSO 检验使用 MRPRESSO 包 (1.0 版) 执行,如果存在离群值,则剔除后再次进行分析;采用 MR-Egger 评估是否存在水平多效性,MR-Egger intercept $P < 0.05$ 提示存在水平多效性,反之则无水平多效性存在。

2 结果

2.1 研究纳入数据及有效 IVs 严格按照 IVs 筛选标准,196 个 IF 丰度 GWAS 数据共有 14 587 个 IVs 达到了全位点显著性水平 ($P < 1 \times 10^{-5}$)。去除特定菌群的连锁不平衡效应、弱 IVs 后,最终纳入 1 482 个有效的 IVs 进行后续分析。

2.2 IF 丰度与 AML 发病风险的相关性 两样本 MR 分析中 IVW 检验显示,在 196 个菌群数据中,遗传决定的较高水平的小杆菌属 (*Dialister*)、韦荣球菌科 (*Veillonellaceae*)、毛螺科 UCG008 属 (*Lachnospiraceae* UCG008) 与较高的 AML 发病风险相关;瘤胃球菌科 (*Ruminococcaceae*)、消化球菌科 (*Peptococcaceae*) 与较低的 AML 发病风险相关。与 AML 发病风险具有遗传关联的 IF 检验结果见表 1。韦荣球菌科、小杆菌属、毛螺科 UCG008 属、消化球菌科、瘤胃球菌科丰度与 AML 发病风险的 4 种 MR 分析结果散点图见图 2。其中,小杆菌属 GWAS 数据中有效 IVs ≤ 2 个,因此加权中位数、加权众数法、MR Egger 分析方法不适用。

2.3 AML 与 IF 丰度的反向因果关系 双向 MR 分析中有统计学意义的分析结果见表 1。反向 MR 分析显示,AML 与 IF 丰度不具有遗传关联,见表 2。

2.4 敏感性检验 为了保证结果的准确性,本研究对每一个结果进行了 Cochran's Q 敏感性分析,所纳入菌群中所有 IVs 均未检测到异质性,未检测到水平多效性,提示 IVW 结果是最稳健的结果。敏感性检验结果见表 3。

表 1 IF 丰度与 AML 发病风险的遗传关联

Tab. 1 Genetic association between IF abundance and risk of developing AML								
Exposure	Outcome	nIVs	method	OR	95% CI (OR)	P	β	SE
<i>Dialister</i>	AML	2	IVW	4.373	1.329 ~ 14.392	0.034	2.778	0.783
<i>Veillonellaceae</i>	AML	9	IVW	2.029	1.839 ~ 3.866	0.009	1.821	1.304
<i>Lachnospiraceae</i> UCG008	AML	8	IVW	3.827	1.107 ~ 13.228	0.040	2.342	0.633
<i>Ruminococcaceae</i>	AML	9	IVW	0.176	0.033 ~ 0.939	0.042	-1.739	0.855
<i>Peptococcaceae</i>	AML	8	IVW	0.168	0.035 ~ 0.803	0.025	-1.784	0.799

表 2 AML 与 IF 丰度的遗传关联

Tab. 2 Genetic association between AML and IF abundance

Exposure	Outcome	nIVs	method	OR	95% CI(OR)	P	β	SE
AML	<i>Dialister</i>	2	IVW	4.373	1.329 – 14.392	0.034	2.778	0.783
AML	<i>Veillonellaceae</i>	9	IVW	2.029	1.839 – 3.866	0.009	1.821	1.304
AML	<i>Lachnospiraceae</i> UCG008	8	IVW	3.827	1.107 – 13.228	0.040	2.342	0.633
AML	<i>Ruminococcaceae</i>	9	IVW	0.176	0.033 – 0.939	0.042	-1.739	0.855
AML	<i>Peptococcaceae</i>	8	IVW	0.168	0.035 – 0.803	0.025	-1.784	0.799

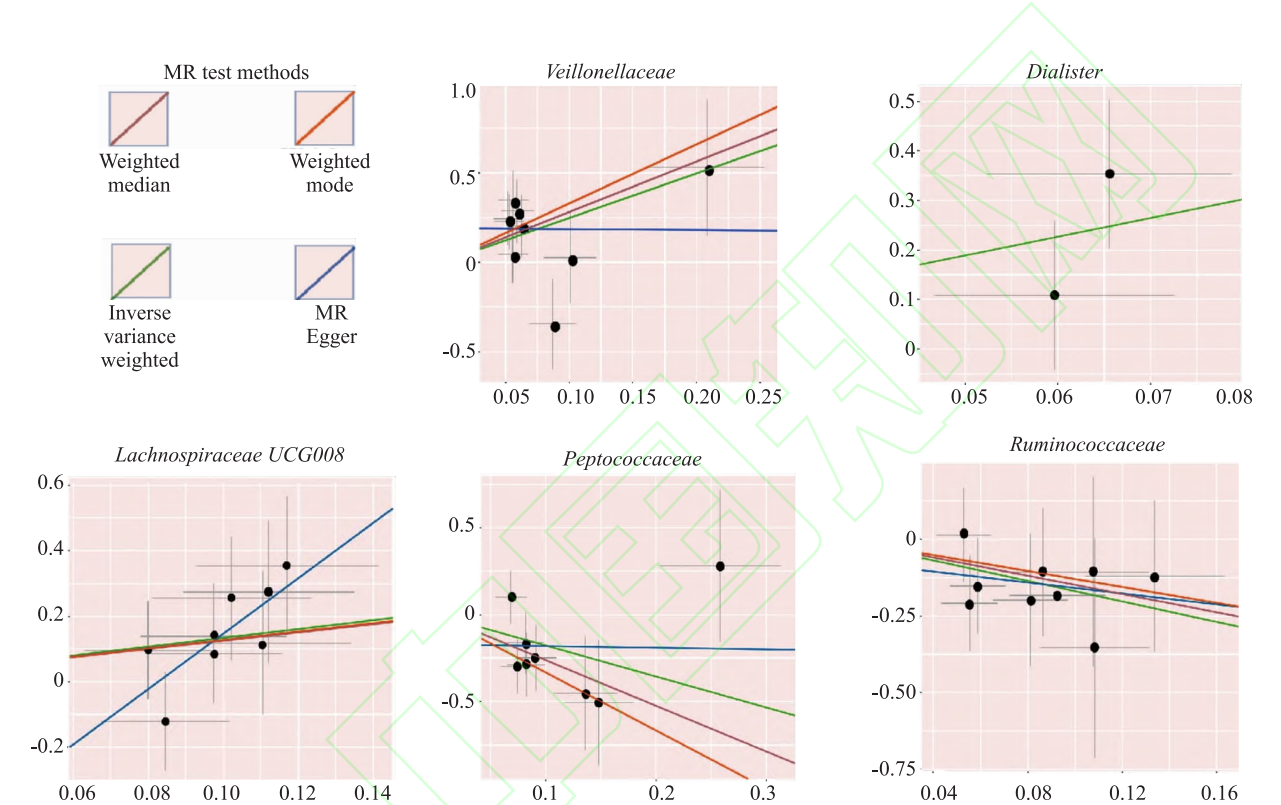


图 2 5 种菌群与 AML 发病风险的 MR 分析结果散点图

Fig. 2 Scatter plot of the results of MR analysis of five bacterial groups and the risk of AML

The horizontal axis; the effect of SNP on exposure; the vertical axis; the effect of SNP on outcome; black dot; a different SNP.

表 3 MR 敏感性检验、水平多效性检验结果

Tab. 3 Results of MR sensitivity test and horizontal pleiotropy test

Exposure	Outcome	Cochran's		MR-Egger	
		Q	P value	intercept	P value
<i>Dialister</i>	AML	0.783	0.783	0.090	
<i>Veillonellaceae</i>	AML	0.512	0.137	0.137	
<i>Lachnospiraceae</i> UCG008	AML	0.399	0.223	0.223	
<i>Ruminococcaceae</i>	AML	0.871	0.091	0.091	
<i>Peptococcaceae</i>	AML	0.621	0.371	0.371	

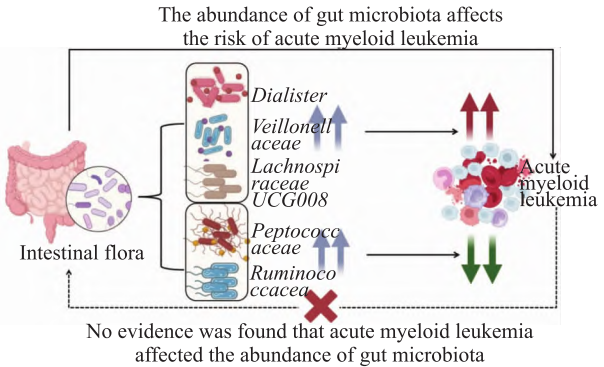


图 3 本研究结果示意图

Fig. 3 Schematic representation of the results in this study

3 讨论

通过正向两样本 MR, 韦荣球菌科、小杆菌属、毛螺科 UCG008 属是 AML 危险因素。相反, 瘤胃球菌科属、消化球菌科是 AML 发病保护因素。未发现 AML 与 IF 丰度变化相关的证据。见图 3。

一项随机、双盲、对照的 II 期临床试验关注到了 AML 治疗过程中肠道韦荣球菌科、小杆菌属的变

化,研究者分别对接受异基因造血干细胞移植和接受诱导化疗的 AML 患者进行了粪便微生物移植 (fecal microbiota transplantation, FMT), 结果发现经 FMT 治疗后, 韦荣球菌科、小杆菌属的丰度明显减少, 而几种被耗尽的厌氧共生菌丰度增加, 表明增加韦荣球菌科、小杆菌属丰度打破了肠道微生物的平衡, 清除韦荣球菌科、小杆菌属有利于 AML 病情改善^[6], 但是该研究未明确韦荣球菌科、小杆菌属与 AML 发病风险的相关性。在其他肿瘤中, 韦荣球菌科丰度明显增加, 因此有研究者^[7]认为韦荣球菌科是肿瘤发病的潜在危险因素, 本研究结论与之一致。另外, 本研究中, 较高丰度的小杆菌属增加了 AML 的发病风险, 结合近期研究^[8]结论, 小杆菌属增加后, 血清白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平也随之升高。IL-6 是调节造血和促进白血病细胞增殖的关键细胞因子, 它本身在刺激白血病细胞增殖的同时, 还增加了粒细胞刺激因子依赖性白血病细胞的增殖^[9]; 另外, IL-6 与 IL-6 受体结合可以激活下游的 JAK2/STAT3 激酶途径, 上调磷酸化 STAT3 的表达, 从而促进白血病细胞增殖、抑制凋亡, 同时促进骨髓炎性微环境的形成^[10]。结合本研究结果, 提示小杆菌属可能通过促进造血微环境中 IL-6 的分泌从而导致后续一系列细胞信号的改变, 最终促进 AML 的发病风险。毛螺菌科从出生开始就在肠道内定植, 并且在宿主一生中物种丰富度和相对丰度都在不断增加, 研究者^[11]在结直肠癌中发现毛螺菌科丰度增加, 但是毛螺菌科与 AML 的发病、治疗以及预后的相关研究较少。

消化球菌科是革兰阳性厌氧菌的一个生理和系统发育上多样化的群体, 研究者^[12]发现患有炎症性疾病个体肠道中, 消化球菌科的水平降低, 然而恢复消化球菌科的正常水平后, 有助于减轻炎症反应, 进而起到保护肠黏膜作用。在 AML 中, 体外实验已经观察多种炎症因子均能明显促进 AML 细胞的生长, 越高循环炎症因子水平与越差的 AML 预后有关^[13], 提示消化球菌可能是通过改善炎症而降低 AML 发病风险。目前研究发现消化球菌科对多种机体有害物质 (比如苯、二氯甲烷) 具有降解作用, 而苯^[14]、二氯甲烷^[15]暴露是 AML 的发病危险因素之一, 提示消化球菌科可能通过降解苯、二氯甲烷等有害元素从而降低 AML 发病风险。瘤胃球菌科是一组存在于健康人结肠黏膜中的严格厌氧细菌, 研究发现, 较高丰度的瘤胃球菌科丰度与较高的抗肿瘤免疫反应相关, 具有增强肿瘤微环境中的 CD8⁺T

细胞功能, 从而提高抗肿瘤免疫治疗疗效的作用^[16], 提示瘤胃球菌科可能是一种保护性菌群, 本研究结论与之一致。

本研究结果为后续对 AML 病因学探索提供了新的认识, 为未来预防和治疗 AML 提供了新的思路, 表明 IF 可能是 AML 治疗的新靶点, 临床上可以通过调节 IF, 如补充有益菌、调控有害菌等预防 AML 发病, 改善 AML 患者的预后。但是本研究仍有局限性。首先, 由于本研究纳入群体为欧洲人群, 因此研究结论对亚洲群体的适用性可能需要后续研究方能阐明。其次, 本研究虽然鉴定出了一些与 AML 发病相关的 IF, 除了遗传因素外, 饮食、环境等多种因素对 IF 的影响也需要进一步研究; 最后, 虽然本研究是基于目前大型 GWAS 数据库, 仍需要开展后续的基于细胞、动物甚至人群的进一步研究, 以证实所鉴定出来的肠道菌群与 AML 发病风险的相关性并探索其可能的机制。

参考文献

- [1] Bejanyan N, Weisdorf D J, Logan B R, et al. Survival of patients with acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a center for international blood and marrow transplant research study [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(3): 454–9. doi:10.1016/j.bbmt.2014.11.007.
- [2] Galloway-Peña J R, Smith D P, Sahasrabhojane P, et al. Characterization of oral and gut microbiome temporal variability in hospitalized cancer patients [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 21. doi:10.1186/s13073-017-0409-1.
- [3] Wang R, Yang X, Liu J, et al. Gut microbiota regulates acute myeloid leukaemia via alteration of intestinal barrier function mediated by butyrate [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2522. doi:10.1038/s41467-022-30240-8.
- [4] 吴 闵, 安祯祥, 何远利, 等. 运用孟德尔随机化探索肠道微生物与非酒精性脂肪性肝病的因果关联 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(2): 236–42. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.009.
- [4] Wu M, An Z X, He Y L, et al. Using Mendelian randomization to explore the causal association between gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(2): 236–42. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.009.
- [5] Lopera-Maya E A, Kurilshikov A, van der Graaf A, et al. Effect of host genetics on the gut microbiome in 7, 738 participants of the Dutch Microbiome Project [J]. *Nat Genet*, 2022, 54: 143–51. doi:10.1038/s41588-021-00992-y.
- [6] Rashidi A, Ebadi M, Rehman T U, et al. Randomized double-blind phase II trial of fecal microbiota transplantation versus placebo in allogeneic hematopoietic cell transplantation and AML [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(34): 5306–19. doi:10.1200/JCO.22.

02366.

- [7] Liang Z, Dong C B, Liang H, et al. A microbiome study reveals the potential relationship between the bacterial diversity of a gymnastics hall and human health [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 5663. doi:10.1038/s41598-022-09355-x.
- [8] Martínez I, Lattimer J M, Hubach K L, et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements[J]. *ISME J*, 2013, 7(2): 269–80. doi:10.1038/ismej.2012.104.
- [9] Zhang S, Li J, Fan J, et al. Bisphenol A triggers the malignancy of acute myeloid leukemia cells *via* regulation of IL-4 and IL-6 [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(1): e22412. doi:10.1002/jbt.22412.
- [10] Huang B, Lang X, Li X. The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1023177. doi:10.3389/fonc.2022.1023177.
- [11] Picchianti-Diamanti A, Rosado M M, D'Amelio R. Infectious agents and inflammation; the role of microbiota in autoimmune arthritis [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2696. doi:10.3389/fmicb.2017.02696.

- [12] Li Y, Wang K, Zhang Y, et al. Revealing a causal relationship between gut microbiota and lung cancer: a Mendelian randomization study[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1200299. doi:10.3389/fcimb.2023.1200299.
- [13] Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): a focus on pro- and anti-inflammatory mediators[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 43: 8–15. doi:10.1016/j.cytogfr.2018.08.004.
- [14] Juliusson G, Hough R. Leukemia [M]. *Progress in Tumor Research*: S. Karger AG, 2016: 87–100. doi:10.1159/000447076.
- [15] Park A S, Ritz B, Ling C, et al. Exposure to ambient dichloromethane in pregnancy and infancy from industrial sources and childhood cancers in California [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2017, 220(7): 1133–40. doi:10.1016/j.ijheh.2017.06.006.
- [16] Gopalakrishnan V, Spencer C N, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371): 97–103. doi:10.1126/science.aan4236.

Intestinal flora and risk of acute myeloid leukemia: a two-sample bidirectional mendelian randomization study

Zhou Yanqun^{1,2}, Zhao Shibo^{1,2}, Huang Liming^{1,2}

(¹*The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000*; ²*Dept of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000*)

Abstract Objective To explore the causal relationship between the abundance of intestinal flora (IF) and the risk of developing acute myeloid leukemia (AML) using two-sample bidirectional Mendelian randomization (MR) methods. **Methods** The MiBioGen Consortium and FinnGen databases were utilized for the IF abundance and AML genome-wide association datasets, respectively. The primary analysis method entailed variance inverse weighting, supplemented by weighted median test, while heterogeneity was assessed using Cochran's *Q* test. Additionally, MR-PRESSO was employed to identify any outliers, while MR-Egger intercept was utilized to evaluate horizontal pleiotropy. **Results** Higher abundance of genetically determined *Dialister* ($P = 0.034$, $OR = 4.373$, 95% CI : 1.329–14.392), *Veillonaceae* ($P = 0.009$, $OR = 2.029$, 95% CI : 1.839–3.866), and *Lachnospiraceae* *UCG008* ($P = 0.034$, $OR = 3.827$, 95% CI : 1.107–13.228) were found to be linked to an increased risk of AML. In contrast, *Ruminococcaceae* ($P = 0.042$, $OR = 0.176$, 95% CI : 0.033–0.939) and *Peptococcaceae* ($P = 0.025$, $OR = 0.168$, 95% CI : 0.035–0.803) were associated with a reduced risk of this disease. **Conclusion**

Higher levels of the *Dialister*, the *Veillonellaceae*, and the *Lachnospiraceae* *UCG008* are risk factors for AML, while the families *Ruminococcaceae* and *Peptococcaceae* are identified as protective factors against AML.

Key words intestinal flora; acute myeloid leukemia; Mendelian randomisation; causal relationship; disease risk

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82460911); Graduate Education Innovation Plan Project of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (No. YCXKYB2023008)

Corresponding author Huang Liming, E-mail: Huanglm1963@163.com