

· 论 著 ·

吸烟与强直性脊柱炎关联的孟德尔随机化研究

杨红¹, 刘激¹, 骆沛洋², 宋杰¹, 蒋雨晴¹, 何志兴², 叶丁¹, 毛盈颖¹

1. 浙江中医药大学公共卫生学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 采用孟德尔随机化 (MR) 研究方法分析吸烟与强直性脊柱炎 (AS) 发生风险的关联。**方法** 通过3项大样本全基因组关联研究 (GWAS) 收集 AS 相关的 16 383 186 个单核苷酸多态性位点 (SNP), 是否吸烟相关的 378 个 SNP 和终生吸烟评分相关的 126 个 SNP 资料。以 AS 为结局变量, 以是否吸烟与终生吸烟评分为暴露因素, 筛选与吸烟存在强相关的 SNP 作为工具变量, 采用逆方差加权法 (IVW) 评估吸烟相关表型与 AS 发生风险的关联; 采用最大似然比法、MR-PRESSO 检验、MR-Egger 回归进行敏感性分析。**结果** 与不吸烟人群相比, 遗传学预测的吸烟人群发生 AS 的风险上升 33.5% ($OR=1.335$, 95% CI : 1.059 ~ 1.682); 终生吸烟评分每增加 1 个标准差, AS 发生风险上升 101.4% ($OR=2.014$, 95% CI : 1.341 ~ 3.024)。最大似然比法、MR-PRESSO 检验均得到了一致的关联效应估计。MR-Egger 回归分析未发现存在多效性。**结论** 遗传学预测的吸烟与 AS 发生风险升高有关。

关键词: 吸烟; 强直性脊柱炎; 遗传变异; 孟德尔随机化

中图分类号: R593.23

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2023) 01-0001-05

Association between smoking and ankylosing spondylitis: a Mendelian randomization study

YANG Hong¹, LIU Wei¹, LUO Peiyang², SONG Jie¹, JIANG Yuqing¹, HE Zhixing², YE Ding¹, MAO Yingying¹

1. School of Public Health, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China;

Abstract: Objective To evaluate the association of smoking with the risk of ankylosing spondylitis (AS) using a Mendelian randomization (MR) approach. **Methods** A total of 16 383 186 AS-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs), 378 smoking initiation associated SNPs and 126 lifetime smoking score-associated SNPs were collected from three large-scale genome-wide association studies (GWAS). The association of smoking phenotypes with the risk of AS was examined using inverse-variance weighted (IVW) with AS as a outcome variable, smoking initiation and lifetime smoking score as exposure factors and SNPs with strong associations with smoking as instrumental variables, and sensitivity analyses were performed with maximum likelihood-based method, MR pleiotropy residual sum and outlier (MR-PRESSO) test and MR-Egger regression analysis. **Results** A 33.5% increased risk of AS was found among genetically predicted smokers relative to non-smokers ($OR=1.335$, 95% CI : 1.059-1.682), and an increase in predicted lifetime smoking by per standard deviation resulted in a 101.4% increased risk of AS ($OR=2.014$, 95% CI : 1.341-3.024). The maximum likelihood-based method and MR-PRESSO test showed consistent correlated effect estimations and MR-Egger regression analysis identified no evidence of pleiotropy. **Conclusion** It is genetically predicted that smoking is associated with an increased risk of AS.

Keywords: smoking; ankylosing spondylitis; genetic variation; Mendelian randomization

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.01.001

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973663); 浙江省自然科学基金项目 (LY22H260005)

作者简介: 杨红, 硕士研究生在读

通信作者: 毛盈颖, E-mail: myy@zcmu.edu.cn

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种免疫介导的慢性炎症性脊柱关节病,可引起中轴骨强直和特征性炎症性背痛,导致患者脊柱、骶髂关节的结构和功能损伤,生活质量下降^[1]。欧洲 AS 患病率约为 23.8/万,我国 AS 患病率约为 29.0/万,且在不断增长^[2-3]。AS 的病因尚不明确,可能是由遗传、微生物、生活方式等多种因素共同作用导致的^[4]。观察性流行病学研究发现,吸烟可能与 AS 发生有关。一项包含 35 780 名挪威成年人的病例对照研究显示,在调整混杂因素后,吸烟与 AS 发生风险升高相关 ($OR=1.990$, $95\%CI: 1.280 \sim 3.110$)^[5]。同时,吸烟可能会促进 AS 进展,吸烟量与 AS 进展之间存在剂量-反应关系^[6-7]。

然而,传统观察性流行病学研究通常样本量有限,且可能受到混杂因素、反向因果关联等偏倚影响,在因果关联推断上存在一定的局限性。孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 方法使用与待研究的暴露因素强相关的遗传变异作为工具变量,根据配子形成时遵循“亲代等位基因随机分配给子代”的遗传定律,推断暴露与结局是否存在因果关联,能有效避免遗传变异受到后天混杂因素的影响,为流行病学研究中的因果关联推断提供了新的视角。同时,吸烟表型相关的遗传变异位点在个体出生后保持不变,并且先于后天疾病的发生,在因果推断中符合先因后果的时相性,避免了反向因果关联等偏倚^[8]。因此,本研究采用 MR 研究设计分析吸烟与 AS 发生的潜在因果关联。

1 资料与方法

1.1 资料来源 AS 的遗传关联数据来自一项芬兰人群的全基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS), 包含 2 252 例 AS 病例和 227 388 名对照,采用 Illumina 和 Affymetrix 阵列进行基因分型,鉴定 16 383 186 个单核苷酸多态性位点 (single nucleotide polymorphism, SNP)^[9]。吸烟包含 2 个层面:是否吸烟与终生吸烟评分。是否吸烟的遗传关联数据来自一项包括 1 232 091 名欧洲人群的 GWAS 的 Meta 分析,该研究将吸烟者定义为在其一生中报告吸烟 ≥ 100 支者,采用 Illumina 芯片进行基因分型,鉴定了 378 个吸烟相关的 SNP^[10]。终生吸烟评分的遗传关联数据来自英国生物银行,该研究根据吸烟强度 (每天吸烟数量)、吸烟持续时间和吸烟状况 (当前吸烟/曾经吸烟/从不吸烟) 等信息构建终生吸烟评分,纳入 462 690 名研究对象,女性占 54%,

平均年龄 56.7 岁,终生吸烟评分均值为 0.359,有 126 个关联的 SNP^[11]。从上述研究中提取与吸烟、AS 关联的效应等位基因、非效应等位基因、效应值 (β) 及其标准误、 P 值和最小等位基因频率等资料。

1.2 方法

1.2.1 设计原理 AS 诊断依据《疾病和有关健康问题的国际统计分类 (第十次修订本)》(ICD-10), 编码 M45。以是否吸烟与终生吸烟评分为暴露因素,以是否患 AS 为结局变量,采用 MR 方法分析吸烟与 AS 的潜在因果关联,研究设计见图 1。MR 研究必须满足 3 个核心假设:(1) 工具变量须与待研究的暴露因素密切相关;(2) 工具变量与混杂因素相互独立;(3) 工具变量只通过暴露这条唯一的途径导致结局的发生。筛选与吸烟存在强相关的 SNP 作为工具变量以验证假设 (1)。MR 研究遵循“配子形成时,亲代等位基因随机分配给子代”的遗传规律,遗传变异的效应较少受到后天的环境、社会经济地位等混杂因素的影响,满足假设 (2)。当工具变量通过“遗传变异-暴露因素-结局”以外的其他途径影响结局发生时,认为该遗传变异具有多效性^[12],因此通过检验 SNP 的多效性以验证假设 (3)。

1.2.2 工具变量的选择 是否吸烟关联的 378 个 SNP ($P < 5 \times 10^{-8}$) 可解释约 2.3% 的遗传变异度,其中 14 个 SNP 因存在连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 被剔除 ($r^2 \geq 0.1$), 19 个 SNP 在 AS 遗传关联数据中缺失,最终纳入 345 个吸烟相关的 SNP 作为工具变量。终生吸烟评分关联的 126 个 SNP ($P < 5 \times 10^{-8}$, $r^2 < 0.1$) 中,有 2 个 SNP 在 AS 遗传关联数据中缺失,最终纳入 124 个 SNP 作为工具变量。

1.2.3 弱工具变量检验 当遗传变异与暴露因素不具有强相关关系,或遗传变异仅能解释小部分的表型变异时,遗传变异被称为“弱工具变量”^[13]。采用弱工具变量可能引起相应偏倚。因此通过计算 F 值评估工具变量与暴露因素的关联强度^[14],计算公式为:

$$F = [R^2 \times (N - 1 - K)] / [K \times (1 - R^2)]$$
$$R^2 = \beta^2 \times 2 \times MAF \times (1 - MAF)$$

式中, N 为暴露的样本量; K 为纳入的 SNP 个数; R^2 为筛选的吸烟相关 SNP 所解释的变异比例; β 为吸烟相关 SNP 的效应值; MAF 为最小等位基因频率。 F 值 < 10 提示可能存在弱工具变量偏倚, F 值越大表示工具变量是弱工具变量的可能性越小。

1.2.4 逆方差加权法 (inverse-variance weighted, IVW) 分析吸烟与 AS 发生的关联 先采用 Cochran's

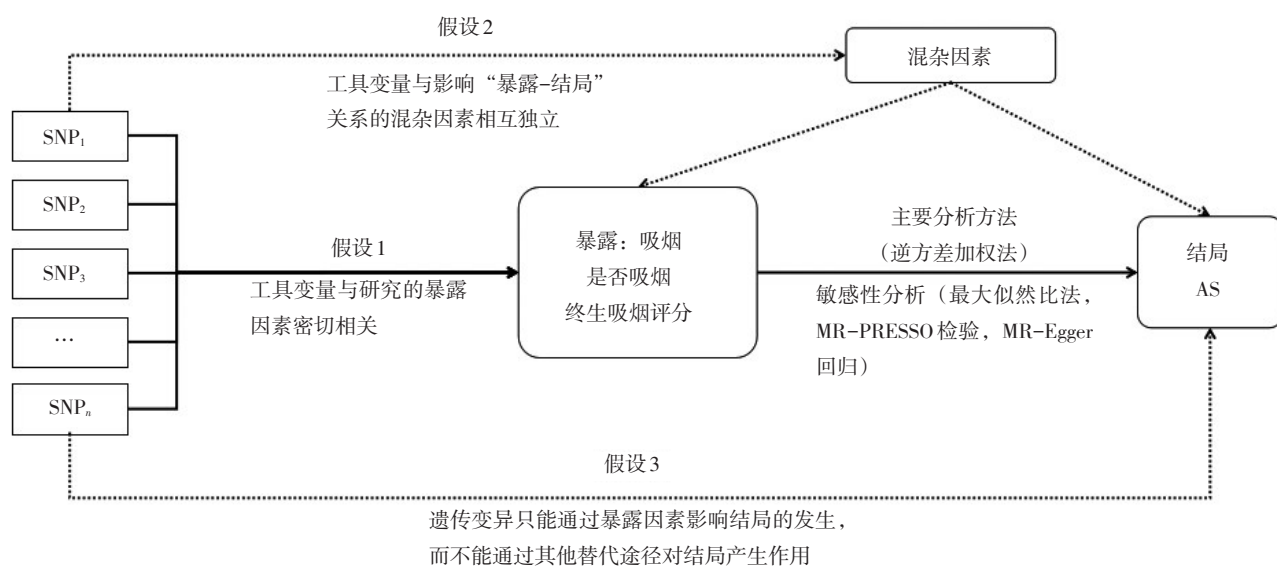


图 1 MR 研究设计方案

Figure 1 Design of the Mendelian randomization study

Q 检验判断工具变量之间是否存在异质性，若 $P > 0.05$ ，则提示 SNP 之间存在异质性的可能性较小，采用 IVW 固定效应模型分析关联；反之，则采用 IVW 随机效应模型。计算单个 SNP 对应的 Wald 比值，即用该 SNP 与 AS 间的效应值除以该 SNP 与吸烟之间的效应值，将所有 SNP 的 Wald 比值进行加权合并，最终评估遗传预测的吸烟与 AS 发生风险之间的关联。吸烟与 AS 发生的关联效应估计以不吸烟人群为参照，OR 值及其 95%CI 描述；终生吸烟评分与 AS 发生的关联效应估计以终生吸烟评分每增加 1 个标准差对应的 AS 发生风险改变的 OR 值及其 95%CI 描述。

1.2.5 敏感性分析 为检验关联结果的稳健性，采用最大似然比法、MR-PRESSO 检验、MR-Egger 回归进行敏感性分析。当暴露因素的 SNP 效应值存在测量偏倚或潜在多效性时，最大似然比法可以提供更可靠的关联效应估计^[15]。采用 MR-PRESSO 检验可剔除异常离群值，并估计校正后的关联效应。采用 MR-Egger 回归评估潜在的多效性，若 MR-Egger 回归的截距项与 0 相差较大，即截距项的 P 值 < 0.05 ，提示这些 SNP 之间存在多效性，反之则不存在多效性。

1.3 统计分析 采用 R 4.1.2 软件“Mendelian Randomization”和“MRPRESSO”程序包分析，检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 遗传学预测的吸烟与 AS 的关联 作为吸烟的

工具变量，345 个吸烟相关 SNP 对应的 F 值范围为 119.211 ~ 844.577，中位数为 154.419，均 > 10 ，存在弱工具变量偏倚的可能性较小。Cochran's Q 检验 P 值为 5.21×10^{-9} ，因此采用 IVW 随机效应模型进行关联效应估计。结果显示，与不吸烟人群比较，遗传学预测的吸烟人群发生 AS 的风险上升 33.5%。采用最大似然比法进行敏感性分析得到了一致的关联效应估计。MR-PRESSO 检验发现 2 个离群值，剔除后的结果显示吸烟与 AS 发生风险相关。MR-Egger 回归分析未发现潜在多效性 ($P_{\text{截距项}} = 0.094$)。见图 2 和图 3。

2.2 遗传学预测的终生吸烟评分与 AS 的关联 124 个终生吸烟评分相关的 SNP 对应的 F 值范围为 25.511 ~ 163.320，中位数为 34.365，均 > 10 ，存在弱工具变量偏倚的可能性较小。Cochran's Q 检验的 P 值为 0.178，因此采用 IVW 固定效应模型进行关联效应估计。结果显示，终生吸烟评分每增加 1 个标准差，AS 发生风险上升 101.4%。最大似然比法得到了一致的关联效应估计。MR-PRESSO 检验并未发现离群值。MR-Egger 回归分析未发现存在多效性 ($P_{\text{截距项}} = 0.691$)。见图 2 和图 4。

3 讨论

已有观察性流行病学研究证据提示，吸烟可能与 AS 发生、进展及预后有关^[16-18]。本研究采用 MR 研究设计，避免了传统观察性流行病学研究在因果关联推断上的局限，从遗传学角度验证了吸烟与 AS 发生之间存在潜在的因果关联。

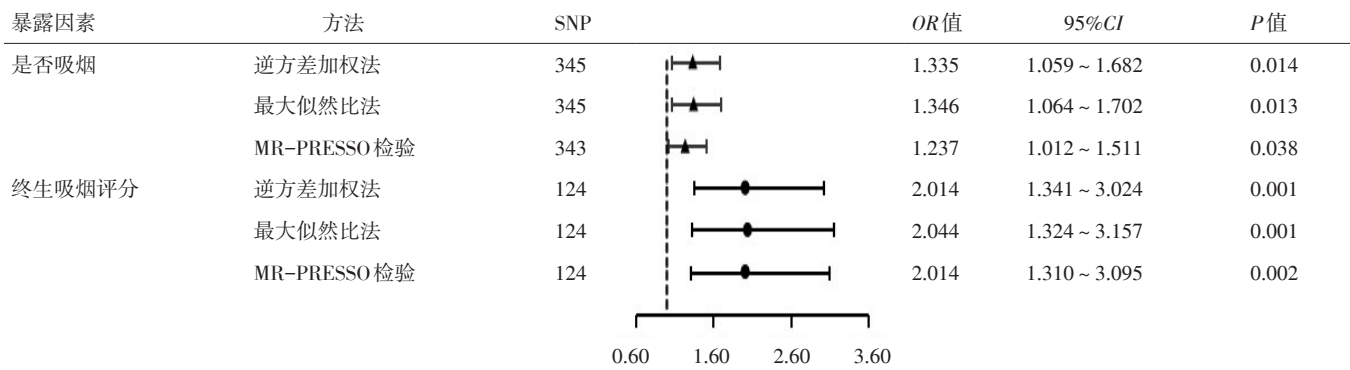


图2 遗传学预测的吸烟与 AS 关联的森林图

Figure 2 Forest plot for the association between genetically predicted smoking and ankylosing spondylitis

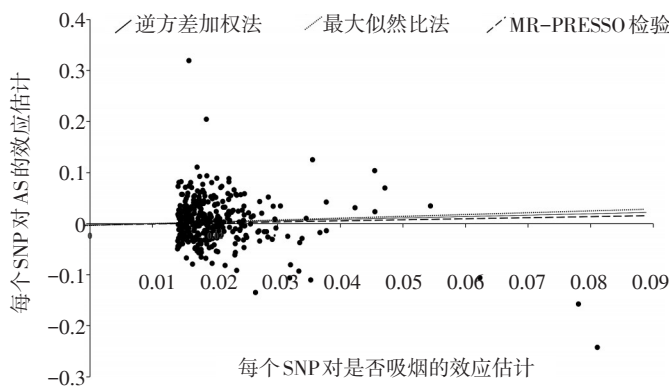


图3 遗传学预测的吸烟与 AS 关联的散点图

Figure 3 Scatter plot for the association between genetically predicted smoking initiation and ankylosing spondylitis

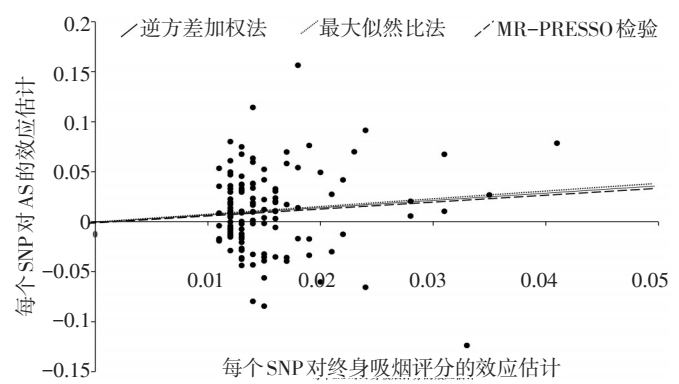


图4 遗传学预测的终生吸烟评分与 AS 风险关联的散点图

Figure 4 Scatter plot for the association between genetically predicted lifetime smoking score and ankylosing spondylitis

吸烟与 AS 发生之间的生物学机制尚未明确，但已有研究提供了一些可能的解释，如吸烟与炎症有关。ROM 等^[19]发现与非吸烟人群相比，吸烟人群急性期 C 反应蛋白，白细胞计数，以及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等促炎细胞因子水平增加。王寅丹等^[20]实验证实暴露于含 25 mg/mL 尼古丁的电子烟气溶胶 3 h 后，小鼠肺内炎症水平升高。SHEN 等^[21]研究表明 AS 患者外周血中 Th17 细胞的比例高于正常对照组。吸烟可通过核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 途径介导激活炎症细胞，影响 Th17 细胞的分化和激活，而 Th17 通路与 AS 发生发展密切相关^[22-23]。此外，来自小鼠关节炎模型的研究结果也发现，烟草中的尼古丁可加剧炎症性关节炎^[24]。

本研究基于大样本 GWAS 数据，从遗传学角度探讨了吸烟与 AS 发生的因果关联，样本量大，统计效能充足，但也存在一些局限性。第一，纳入的研究

对象仅包含了欧洲人群，由于不同种族人群的遗传背景、生活方式等存在一定差异，结论外推到其他种族受限，但同时本研究减少了人群分层偏倚。第二，吸烟、AS 在男性中更常见，本研究无法根据获得的汇总数据按照性别分层，因此无法评估吸烟对不同性别人群 AS 发生风险的作用。第三，关于 MR 研究有效性的最后一个假设“工具变量仅通过暴露这条途径影响结局发生”，尽管 MR-Egger 回归提示存在多效性的可能性较小，但仍不能完全排除多效性的存在及其可能对研究结果造成的影响。本研究结果仍需随机对照试验和体内外实验研究进一步验证，以期更好地阐明吸烟在 AS 发生发展中的确切作用和机制。

参考文献

[1] VORUGANTI A, BOWNESS P. New developments in our understanding of ankylosing spondylitis pathogenesis [J]. Immunology, 2020, 161 (2): 94-102.

[2] DEAN L E, JONES G T, MACDONALD A G, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis [J]. Rheumatology, 2014, 53

- (4): 650–657.
- [3] ZHAO J, HUANG C, HUANG H, et al. Prevalence of ankylosing spondylitis in a Chinese population: a systematic review and meta-analysis [J]. *Rheumatol Int*, 2020, 40 (6): 859–872.
- [4] HWANG M C, RIDLEY L, REVEILLE J D. Ankylosing spondylitis risk factors: a systematic literature review [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40 (8): 3079–3093.
- [5] VIDEM V, CORTES A, THOMAS R, et al. Current smoking is associated with incident ankylosing spondylitis: the HUNT population-based Norwegian health study [J]. *J Rheumatol*, 2014, 41 (10): 2041–2048.
- [6] AKAR S, KAPLAN Y C, ECEMIŞ S, et al. The role of smoking in the development and progression of structural damage in axial SpA patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Rheumatol*, 2019, 6 (4): 184–192.
- [7] VILLAVARDE-GARCÍA V, COBO-IBÁÑEZ T, CANDELAS-RODRÍGUEZ G, et al. The effect of smoking on clinical and structural damage in patients with axial spondyloarthritis: a systematic literature review [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2017, 46 (5): 569–583.
- [8] BURGESS S, SMALL D S, THOMPSON S G. A review of instrumental variable estimators for Mendelian randomization [J]. *Stat Methods Med Res*, 2017, 26 (5): 2333–2355.
- [9] KURKI M I, KARJALAINEN J, PALTA P, et al. FinnGen: Unique genetic insights from combining isolated population and national health register data [J/OL]. *MedRxiv*, 2022 [2022-11-29]. <https://doi.org/10.1101/2022.03.03.22271360>.
- [10] KARLSSON LINNÉR R, BIROLI P, KONG E, et al. Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetic influences [J]. *Nat Genet*, 2019, 51 (2): 245–257.
- [11] WOOTTON R E, RICHMOND R C, STUIJFZAND B G, et al. Evidence for causal effects of lifetime smoking on risk for depression and schizophrenia: a Mendelian randomisation study [J]. *Psychol Med*, 2020, 50 (14): 2435–2443.
- [12] 高雪, 王慧, 王彤. 孟德尔随机化中多效性偏倚校正方法简介 [J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40 (3): 360–365.
- [13] 王玉琢, 沈洪兵. 孟德尔随机化研究应用于因果推断的影响因素及其结果解读面临的挑战 [J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41 (8): 1231–1236.
- [14] BOWDEN J, DAVEY SMITH G, BURGESS S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression [J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44 (2): 512–525.
- [15] HEMANI G, ZHENG J, ELSWORTH B, et al. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenome [J/OL]. *Elife*, 2018, 7 [2022-11-29]. <https://doi.org/10.7554/eLife.34408>.
- [16] MATTEY D L, DAWSON S R, HEALEY E L, et al. Relationship between smoking and patient-reported measures of disease outcome in ankylosing spondylitis [J]. *J Rheumatol*, 2011, 38 (12): 2608–2615.
- [17] ZHANG H, WAN W, LIU J, et al. Smoking quantity determines disease activity and function in Chinese patients with ankylosing spondylitis [J]. *Clin Rheumatol*, 2018, 37 (6): 1605–1616.
- [18] WARD M M, HENDREY M R, MALLEY J D, et al. Clinical and immunogenetic prognostic factors for radiographic severity in ankylosing spondylitis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 61 (7): 859–866.
- [19] ROM O, AVEZOV K, AIZENBUD D, et al. Cigarette smoking and inflammation revisited [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2013, 187 (1): 5–10.
- [20] 王寅丹, 李婷, 张国庆, 等. 电子烟急性暴露对小鼠 BALF 及肺表面活性蛋白的影响研究 [J]. *预防医学*, 2022, 34 (5): 456–460.
- [21] SHEN H, GOODALL J C, HILL GASTON J S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60 (6): 1647–1656.
- [22] TSUKAZAKI H, KAITO T. The role of the IL-23/IL-17 pathway in the pathogenesis of spondyloarthritis [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (17) [2022-11-29]. <https://doi.org/10.3390/ijms21176401>.
- [23] KAZANTSEVA M G, HIGHTON J, STAMP L K, et al. Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis [J/OL]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14 (5) [2022-11-29]. <https://doi.org/10.1186/ar4046>.
- [24] LEE J, LURIA A, RHODES C, et al. Nicotine drives neutrophil extracellular traps formation and accelerates collagen-induced arthritis [J]. *Rheumatology*, 2017, 56 (4): 644–653.

收稿日期: 2022-10-06 修回日期: 2022-11-29 本文编辑: 徐文璐