

阑尾切除术与结直肠癌发病风险关联的孟德尔随机化研究

常宇¹, 胡云峰¹, 王会丰², 郭静¹, 张跳¹, 郝雅琴¹, 刘雨¹

(延安大学附属医院 1. 放射治疗科; 2. 消化内科, 陕西 延安 716000)

摘要: **目的** 采用两样本孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)方法在遗传水平上探究阑尾切除术与结直肠癌之间的因果关系。**方法** 采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、MR Egger、加权中位数、简单模式和加权模式等方法进行分析。利用全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)汇总数据, 评估阑尾切除术与结直肠癌之间的因果关系。采用留一法、Cochran's Q 检验, MR-Egger 回归截距项检验、MR-PRESSO检验进行敏感性分析, 评估工具变量的异质性、多效性和稳定性。**结果** 随机效应 IVW 结果显示, 阑尾切除术与结直肠癌无遗传因果关系($OR=1.13$, $95\% CI: 0.29\sim 4.36$, $P=0.86$)。MR Egger、加权中位数、简单模式和加权模式的分析结果与随机效应 IVW 一致。无异质性、水平多效性。MR 分析结果不受单个 SNP 的影响。**结论** 阑尾切除术与结直肠癌在遗传水平上无因果关系。

关键词: 阑尾切除术; 结直肠癌; 孟德尔随机化; 遗传水平; 因果推断

中图分类号: R735.34

文献标志码: A

A mendelian randomization study on the association between appendectomy and the risk of colorectal cancer

CHANG Yu¹, HU Yunfeng¹, WANG Huifeng², GUO Jing¹, ZHANG Tiao¹, HAO Yaqin¹, LIU Yu¹

(1. Department of Radiotherapy; 2. Department of Gastroenterology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the causal relationship between appendectomy and colorectal cancer at the genetic level by a two-sample Mendelian randomization (MR). **Methods** The analysis was conducted using methods such as inverse variance weighting (IVW), MR Egger, weighted median, and both simple and weighted modes. Using summary data from genome-wide association studies (GWAS), the causal relationship between appendectomy and colorectal cancer was assessed. Sensitivity analyses were performed using leave-one-out analysis, Cochran's Q test, MR-Egger regression intercept test, and MR-PRESSO test to evaluate the heterogeneity, pleiotropy, and stability of the instrumental variables. **Results** The random-effects IVW results indicated that appendectomy has no genetic causal relationship with colorectal cancer ($OR = 1.13$, $95\% CI: 0.29-4.36$, $P = 0.86$). The analysis results from MR Egger, weighted median, simple mode, and weighted mode were consistent with those of the random-effects IVW. There was no heterogeneity, horizontal pleiotropy. The MR analysis results were not influenced by any single SNP. **Conclusion** There is no causal relationship between appendectomy and colorectal cancer at the genetic level.

Key words: Appendectomy; Colorectal cancer; Mendelian randomization; Genetic level; Causal inference

结直肠癌是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一,病因主要包括遗传因素与环境因素。具有遗传倾向的相关疾病包括家族性腺瘤性息肉病、遗传性非息肉性结直肠癌以及其他罕见病^[1]。在环境相关的危险因素中,肠道微生物群的变化也是一个关键的因素^[2]。目前对于结直肠癌的治疗方式主要包括化疗、放疗、靶向及免疫治疗,然而对于晚期结直肠癌患者治疗效果仍然较差。所以进一步探究影响结直肠癌发生发展的因素至关重要。

阑尾是一个位于盲肠底部回盲瓣处的圆柱状的肌肉结构,被认为是盲肠的憩室。阑尾周围有许多淋巴滤泡,是人体内一个重要的免疫器官,特别是在儿童时期,阑尾的免疫功能扮演着非常重要的角色^[3-4]。阑尾切除术是目前急慢性阑尾炎患者的首选治疗方案,有研究认为阑尾切除术能够降低结直肠癌的发病风险^[5]。然而其他一些研究认为阑尾切除术可能会增加结直肠癌的发病风险,是结直肠癌的危险因素^[6-7]。近期研究认为阑尾切除术后发生结直肠癌的风险显著增加,但是阑尾切除术患者发生结直肠癌的风险在手术后的前两年内增加,之后逐渐降低^[8]。因此,进一步研究阑尾切除术与结直肠癌发生风险的关系对于结直肠癌的预防具有潜在的临床价值。

癌症的发生是由多种基因以及多种因素共同作用的结果,既往的流行病学研究中,混杂因素会影响研究结果的准确性。孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)研究设计遵循孟德尔遗传定律,基因与结局之间的关系不会受到后期的环境以及行为习惯等外在因素的影响,进而有效避免了混杂因素的影响。基因型决定人们的表型,如果表型作为一种暴露因素与某种疾病有关,那么也可以说明基因型与这种疾病存在相关性。因此,基因型可以用作工具变量来推断表型和疾病之间的关联。目前,利用MR来推断性状与疾病之间的因果关系已经被广泛的应用^[9-11]。本研究通过MR分析,从遗传水平探讨阑尾切除术与结直肠癌的因果关系。

1 资料与方法

1.1 资料来源

分别以阑尾切除术为暴露、结直肠癌为结局变量筛选符合条件的工具变量进行MR分析。阑尾切除术的全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)汇总数据均来自英国生物数据库, ID为 ukb-b-14944,共有462 933个样本,9 851 867个

SNP,所有患者均为欧洲人群,并提供知情同意。结直肠癌的GWAS汇总数据来自IEU OpenGWAS数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>),该网站汇总数据内容包含SNP、染色体及具体位置、编码基因、效应值、效应P值和样本量等信息,其汇总数据均在网公开发表^[12]。ID为 ebi-a-GCST90018808^[13],共包括470 002个样本和24 182 361个SNP,所有患者均为欧洲人群,并提供知情同意。

1.2 方法

1.2.1 研究设计

基于阑尾切除术与结直肠癌的GWAS汇总数据,探讨阑尾切除术与结直肠癌的因果关系。本研究严格遵循MR分析的3个假设:①选择的工具变量与暴露有关;②工具变量与任何混杂因素无关;③选择的工具变量仅通过暴露影响结果,而不通过其他途径影响结果^[14]。

1.2.2 工具变量的选择

本研究通过严格的质量控制来选择工具变量,以满足MR分析的3个假设,确保MR分析的稳定性和可靠性。①获得与阑尾切除术相关的SNP($P < 5 \times 10^{-8}$)^[15];②消除SNP之间的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD),因为强LD可能导致结果偏倚($r^2 < 0.001$,聚集距离=10 000 kb)^[16];③排除与结直肠癌相关的SNP($P < 5 \times 10^{-8}$)^[17];④应用PhenoScanner数据库(<http://www.phenoscaner.medschl.cam.ac.uk/phenoscaner>)来排除混杂因素,相关研究认为结直肠癌的主要危险因素包括肥胖、体质量指数、吸烟及饮酒等^[18-19];⑤为了满足与暴露的强相关性,选择 $F > 10$ 的SNP作为工具变量^[20]。F统计量的计算公式为

$$F = \frac{R^2(n-k-1)}{k(1-R^2)},$$

R^2 的公式为

$$R^2 = \frac{2 \times \text{EAF} \times (1 - \text{EAF}) \times \beta}{[2 \times \text{EAF} \times (1 - \text{EAF}) \times \beta^2] + [2 \times \text{EAF} \times (1 - \text{EAF}) \times n \times \text{SE}^2]},$$

其中 n 为样本量;其中 k 为工具变量的数量;其中 β 为等位基因效应值;其中EAF为效应等位基因频率;其中SE为 β 的标准误差。

1.3 统计学处理

1.3.1 MR因果推断

通过R 4.3.1软件中的TwoSampleMR和MR-PRESSO软件包对阑尾切除术和结直肠癌进行两样本的MR分析。阑尾切除术对结直肠癌的遗传因果效应采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)作为主要方法,采用MR Egger、加权中位数、

简单模式和加权模式作为辅助方法进行 MR 分析^[21]。孟德尔随机化中最常用 IVW 来分析,通过给予统计效力更高的遗传工具变量更大的权重,有效地利用多个变异的信息,同时保持方法的简单性和直观性。所以随机效应 IVW 结果是本研究的主要依据^[22]。MR Egger 对遗传工具变量的效应大小进行斜率回归分析,通过比较无混杂假设下的预期斜率与实际斜率,来评估工具变量是否与结果之间存在水平方向的异质性^[23]。加权中位数法计算每种工具变量的 Wald 比率,并选择中值作为因果估计,当超过一半的遗传变异满足工具变量假设时,它们提供了有效的估计^[24]。当所有遗传变异都是有效的工具变量时,IVW 估计是一种有效的分析方法。然而,即使只有一个基因变异是无效的,它也会有偏倚^[25]。简单模式为使用单个工具变量的因果效应估计来形成集群,然后将因果效应估计值作为最大工具变量簇的因果效应估计值。加权模式方法使用相同的过程,但为每个工具变量分配权重加权模式^[26]。

1.3.2 敏感性分析

采用 Cochran's Q 统计量(MR-IVW)和 Rucker's Q 统计量(MR Egger)检测 MR 分析的异质性, $P > 0.05$ 表示无异质性^[27]。采用 MR Egger 截距检验检测水平多效性, $P > 0.05$ 表示无水平多效性^[28]。留一法通过逐步剔除每个工具变量,计算剩余工具变量的总体效应,观察剔除每个工具变量后结果是

否发生变化。使用留一法来分析阑尾切除术与结直肠癌之间的因果关系是否受到单个 SNP 的影响^[29]。MR-Presso 可在存在异常值的情况下得到相对稳定的因果效应值。其包含检验水平多效性、识别工具变量中的离群值并且计算剔除离群值后的因果效应和比较校正前后的因果关联差异。所以采用 MR-Presso 分析的全局检验进行水平多效性检验, $P > 0.05$ 表示无水平多效性^[30]。

2 结果

2.1 工具变量的信息

通过筛选与暴露相关的 SNP 并去除 LD,获得 18 个与阑尾切除术相关的 SNP(表 1),进一步确定阑尾切除术与结直肠癌共有的 SNP,删掉一个回文 SNP(rs1157559)后,将剩余的 17 个 SNP 作为工具变量($F > 10$)。

2.2 MR 分析结果

随机效应 IVW 结果显示阑尾切除术与结直肠癌无遗传因果关系($OR = 1.13, 95\% CI: 0.29 \sim 4.36, P = 0.86$)。MR Egger 结果同样显示阑尾切除术与结直肠癌没有遗传因果关系($OR = 0.08, 95\% CI: 0.001 \sim 7.609, P = 0.29$)。加权中位数、简单模式和加权模式的分析结果与随机效应 IVW 一致(图 1~2)。

表 1 MR 分析使用的工具变量的信息
Table 1 Instrumental variable information used in MR analysis

SNPs	EA	OA	β	EAF	SE	P	F
rs106520	A	G	-0.004 2	0.260 5	0.000 8	4.00×10^8	30.14
rs10829663	G	A	-0.004 4	0.262 6	0.000 8	7.20×10^9	33.48
rs10849448	G	A	0.006 3	0.752 4	0.000 8	3.40×10^{15}	62.02
rs1157559	C	G	-0.003 8	0.509 6	0.000 7	1.60×10^8	31.90
rs142069498	A	G	-0.008 5	0.062 9	0.001 4	1.20×10^9	37.01
rs21525	A	G	-0.004 7	0.230 8	0.000 8	5.10×10^9	34.13
rs2171591	A	G	0.009 7	0.270 5	0.000 8	2.90×10^{37}	162.70
rs224029	C	T	0.004 2	0.600 5	0.000 7	8.30×10^{10}	37.69
rs2326394	G	A	0.006 5	0.838 2	0.000 9	1.60×10^{12}	49.91
rs2524069	T	A	0.005 2	0.171 0	0.000 9	8.30×10^9	33.21
rs2780304	A	C	0.004 4	0.287 3	0.000 8	3.50×10^9	34.88
rs34236350	T	C	-0.005 0	0.182 2	0.000 9	1.10×10^8	32.66
rs3913815	T	A	0.004 4	0.648 1	0.000 7	6.20×10^{10}	38.24
rs56259011	T	C	0.006 4	0.184 7	0.000 9	1.80×10^{13}	54.27
rs72827881	C	T	-0.009 7	0.045 5	0.001 6	2.80×10^9	35.31
rs7649870	G	A	-0.004 3	0.516 7	0.000 7	1.30×10^{10}	41.24
rs76896900	G	T	0.005 4	0.146 3	0.001 0	1.60×10^8	31.96
rs815430	T	C	-0.004 4	0.752 6	0.000 8	2.50×10^8	31.04

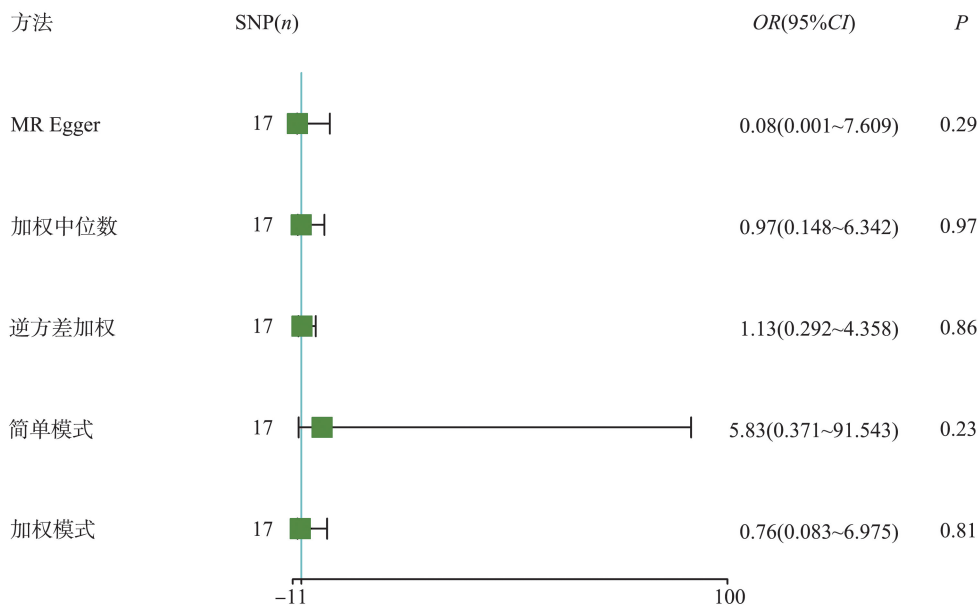


图1 阑尾切除术与结直肠癌发生风险的MR分析森林图

Figure 1 Forest plot of MR analysis of appendectomy and risk of colorectal cancer

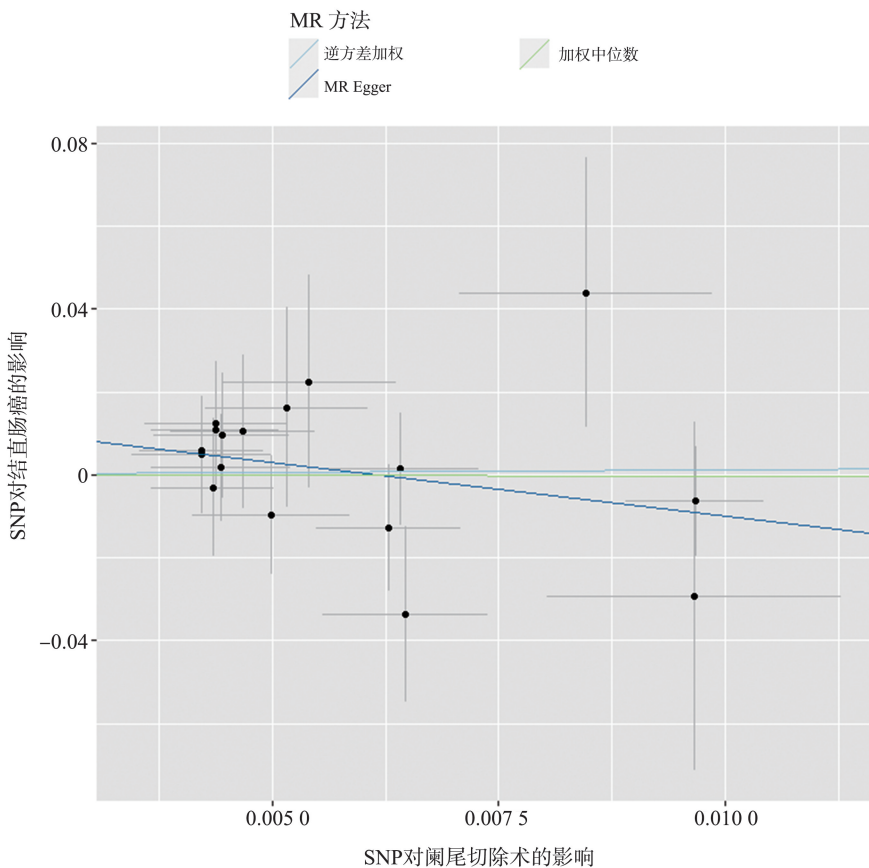


图2 阑尾切除术与结直肠癌的MR分析散点图

Figure 2 Scatter plot of MR analysis of appendectomy and the risk of colorectal cancer

2.3 敏感性分析

MR Egger分析的截距检验表明,阑尾切除术与结直肠癌的MR分析不存在水平多效性($P=0.248$)。Cochran's Q 统计量(MR-IVW)结果显示,

阑尾切除术与结直肠癌的MR分析不存在异质性($P=0.869$)。Rucker's Q 统计量(MR Egger)结果同样表明,阑尾切除术与结直肠癌的MR分析不存在异质性($P=0.902$)。“留一法”分析表明MR分析

不是由单个 SNP 驱动的(图 3)。MR-PRESSO 全局检验显示,阑尾切除术与结直肠癌 MR 分析不存在水平多效性($P=0.679$)。漏斗图结果显示阑尾切除

术与结直肠癌的 MR 分析不存在异质性以及水平多效性(图 4)。

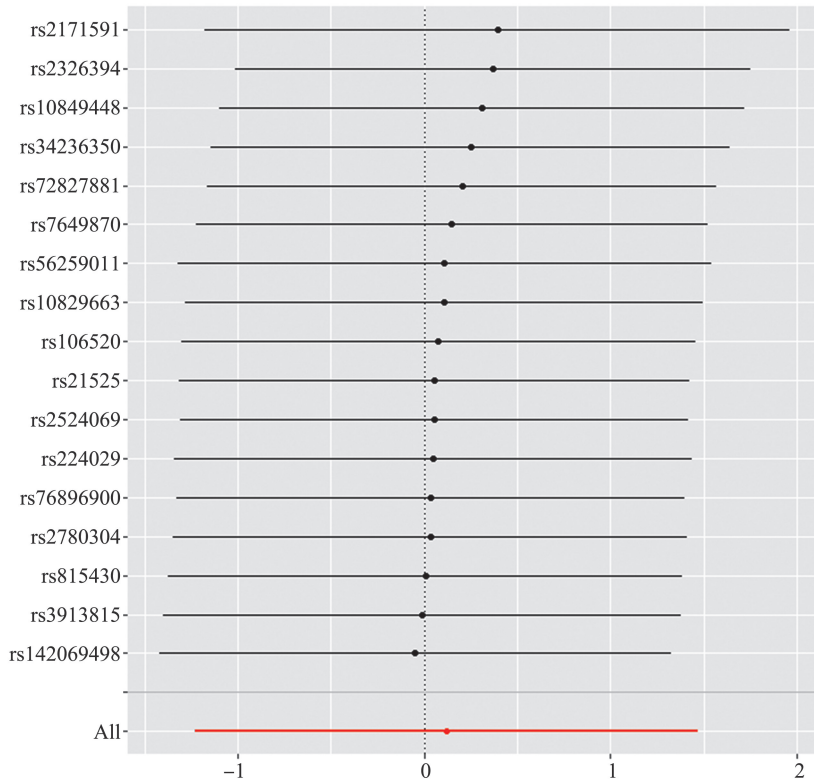


图 3 阑尾切除术与结直肠癌因果关系的留一法分析结果

Figure 3 Analysis of causality between appendectomy and colorectal cancer by leave-one-out method

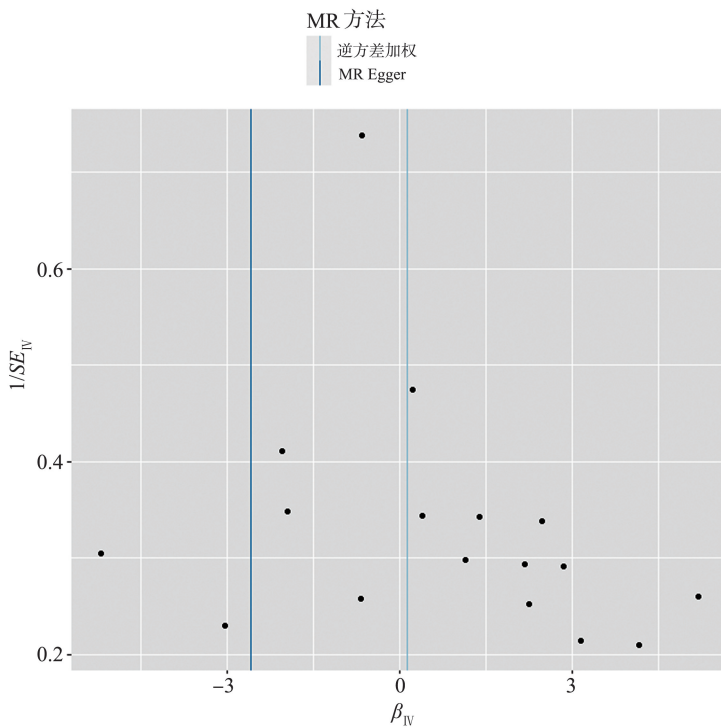


图 4 漏斗图评估 MR 分析的异质性

Figure 4 Funnel plot for assessing heterogeneity in MR analysis

3 讨论

本研究通过汇总 GWAS 数据库中的数据,采用 MR 方法分析阑尾切除术与结直肠癌之间的遗传因果关系。MR 方法从基因水平对阑尾切除术与结直肠癌进行因果分析,有效避免了传统观察性研究受混杂因素影响所造成的干扰。虽然结果表明阑尾切除术与结直肠癌与不存在因果关系,但不能排除阑尾切除术与结直肠癌在除遗传学之外的其他水平上存在相关性。

阑尾为盲肠末端的一个蚓状附属物,曾经被认为是进化肠残余的一部分,在人体中不存在任何功能^[31]。然而现有研究认为人类阑尾是一个淋巴器官,包含致密淋巴组织,具有重要的免疫功能,临床观察性研究表明阑尾切除术与帕金森症、克罗恩病、溃疡性结肠炎、结直肠癌等疾病存在一定的因果关系^[32-33]。人出生后的2周阑尾开始生长发育,婴幼儿和年轻人的阑尾中有较高水平的淋巴组织。青年期时,阑尾的生发中心开始萎缩,老年时已基本完全萎缩,老年人体内阑尾淋巴组织明显减少^[34]。所以幼年时期阑尾具有一定的免疫功能,可参与 B 淋巴细胞的产生和成熟,随着年龄的增长,该功能逐渐降低或者消失。阑尾切除术后导致疾病发生的主要原因在于阑尾切除术后肠道菌群的组成发生了改变^[35]。人体肠道微生物群极其复杂,约由 10^{13} 至 10^{14} 种微生物组成,其基因多样性远超人类基因组。这些微生物可分为有益菌和致病菌,前者有助于增强免疫功能和维持肠道屏障,而后者可能引起肠道感染^[36]。肠道微生物的失衡与多种疾病的发展有关。阑尾在维持肠道微生物平衡中起关键作用,阑尾切除可能导致肠道微生物多样性降低,进而影响肠道稳态,增加疾病发生的风险^[33]。

肠道微生物种群的变化在结直肠癌的发生、进展及转移的过程中也起着重要的作用^[37]。结直肠癌患者相较于健康群体而言,其细菌的多样性和丰度降低,其中梭杆菌、脆弱拟杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、肝螺杆菌、厌氧消化链球菌、幽门螺杆菌、牛链球菌和牙龈卟啉单胞菌等均被认为与结直肠癌的发生和致病性相关。其主要通过刺激机体发生炎症反应、激活致癌物、破坏正常的肠道黏膜以及破坏宿主 DNA 等机制导致结直肠癌的发生^[38-39]。有研究表明,阑尾切除术后两年内可能会引起肠道微生物群的构成持续性的改变,但随着时间的推移,这种变化会逐渐恢复。尽管本研究结果表明,阑尾切除术与

结直肠癌在遗传水平上不存在因果关系,但是,结合其他相关的研究结果^[8],本研究认为阑尾切除术后可能会通过造成人类肠道微生物的稳态失衡继而导致结直肠癌的发生,阑尾切除术与结直肠癌之间的相关性可能受遗传因素之外的其他因素的影响。

本研究存在一定的局限性:①饮食因素是结直肠癌的高危因素,其中红肉和高糖饮食与结直肠癌发病率正相关,而膳食纤维、钙和酸奶摄入较高则与之负相关,本研究并未就饮食因素进行亚组分析;②由于不同地区人群饮食习惯及肠道微生物组成存在差异,本研究样本来源均为欧洲人群,故本研究结果不适用于全球所有人群;③不同年龄段人体的生理功能以及患癌的概率有很大的区别,本研究没有对患者的年龄进行详细的亚组分析,接受阑尾切除术患者的年龄与结直肠癌的发生风险之间是否会有差异仍有待进一步分析研究。

综上所述,本研究结果表明,阑尾切除术与结直肠癌在基因水平上不存在因果关系。然而,这并不排除它们在遗传以外的水平上相关的可能性,需要更深入、更广泛的调查进一步研究。

参考文献:

- [1] Qu RZ, Ma YP, Zhang ZP, et al. Increasing burden of colorectal cancer in China[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(8): 700.
- [2] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [3] Vitetta L, Chen JZ, Clarke S. The vermiform appendix: an immunological organ sustaining a microbiome inoculum[J]. *Clin Sci*, 2019, 133(1): 1-8.
- [4] Constantin M, Petrescu L, Mătanie C, et al. The vermiform appendix and its pathologies[J]. *Cancers*, 2023, 15(15): 3872. <https://doi.org/10.3390/cancers15153872>.
- [5] Rothwell JA, Mori N, Artaud F, et al. Colorectal cancer risk following appendectomy: a Pooled analysis of three large Prospective cohort studies [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(5): 486-489.
- [6] Liu Z, Ma X, Zhu C, et al. Risk of colorectal cancer after aPPendectomy: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Gastroenterol HePatol*, 2023, 38(3): 350-358.
- [7] Wu SC, Chen WT, Muo CH, et al. Association between appendectomy and subsequent colorectal cancer development: an Asian population study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118411. doi:10.1371/journal.pone.0118411.
- [8] Shi F, Liu G, Lin Y, et al. Altered gut microbiome composition by appendectomy contributes to colorectal cancer [J]. *Oncogene*. 2023, 42(7): 530-540.

- [9] Yun Z, Guo Z, Li X, et al. Genetically predicted 486 blood metabolites in relation to risk of colorectal cancer: a Mendelian randomization study[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(12): 13784-13799.
- [10] Suzuki S, Goto A, Nakatochi M, et al. Body mass index and colorectal cancer risk: a Mendelian randomization study[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(4): 1579-1588.
- [11] Wang L, Cao W, Xi MH, et al. Appendectomy and the risk of neurodegenerative diseases: a two-sample Mendelian randomization study[J]. *Asian J Surg*, 2023, 47(1): 673-674.
- [12] Lyon MS, Andrews SJ, Elsworth B, et al. The variant call format provides efficient and robust storage of GWAS summary statistics[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 32. doi:10.1186/s13059-020-02248-0.
- [13] Sakaue S, Kanai M, Tanigawa Y, et al. A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(10): 1415-1424.
- [14] Li YW, Ye D, Zhou WK, et al. Alcohol consumption and colorectal cancer risk: a Mendelian randomization study[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 967229. doi:10.3389/fgene.2022.967229.
- [15] 常鑫, 刘世佳, 韩璐. 服用阿司匹林与子宫内膜癌发病风险的孟德尔随机化关系[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2023, 61(10): 58-62, 82. CHANG Xin, LIU Shijia, HAN Lu. A Mendelian randomization study of aspirin use and the risk of endometrial cancer[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2023, 61(10): 58-62, 82.
- [16] Yang MY, Wan XJ, Zheng HS, et al. No evidence of a genetic causal relationship between ankylosing spondylitis and gut microbiota: a two-sample Mendelian randomization study[J]. *Nutrients*, 2023, 15(4): 1057. doi:10.3390/nu15041057.
- [17] Murphy N, Song MY, Papadimitriou N, et al. Associations between glycemic traits and colorectal cancer: a Mendelian randomization analysis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2022, 114(5): 740-752.
- [18] Cho YA, Lee J, Oh JH, et al. Genetic risk score, combined lifestyle factors and risk of colorectal cancer[J]. *Cancer Res Treat*, 2019, 51(3): 1033-1040.
- [19] O'Sullivan DE, Sutherland RL, Town S, et al. Risk factors for early-onset colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022, 20(6): 1229-1240.
- [20] Papadimitriou N, Bull CJ, Jenab M, et al. Separating the effects of early and later life adiposity on colorectal cancer risk: a Mendelian randomization study[J]. *BMC Med*, 2023, 21(1): 5. doi:10.1186/s12916-022-02702-9.
- [21] Sun J, Zhao J, Jiang F, et al. Identification of novel protein biomarkers and drug targets for colorectal cancer by integrating human Plasma Proteome with genome[J]. *Genome Med*, 2023, 15(1): 75. doi:10.1186/s13073-023-01229-9.
- [22] Su YN, Hu YF, Xu YW, et al. Genetic causal relationship between age at menarche and benign oesophageal neoplasia identified by a Mendelian randomization study[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1113765. doi:10.3389/fendo.2023.1113765.
- [23] Jung SY, Papp JC, Sobel EM, et al. Mendelian randomization study: the association between metabolic pathways and colorectal cancer risk[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1005. doi:10.3389/fonc.2020.01005.
- [24] Chan II, Kwok MK, Schooling CM. Blood pressure and risk of cancer: a Mendelian randomization study[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1338. doi:10.1186/s12885-021-09067-x.
- [25] Yuan S, Kar S, Carter P, et al. Is type 2 diabetes causally associated with cancer risk? evidence from a two-sample Mendelian randomization study[J]. *Diabetes*, 2020, 69(7): 1588-1596.
- [26] Xiong J, Yang L, Deng YQ, et al. The causal association between smoking, alcohol consumption and risk of bladder cancer: a univariable and multivariable Mendelian randomization study[J]. *Int J Cancer*, 2022, 151(12): 2136-2143.
- [27] Yuan S, Mason AM, Titova OE, et al. Morning chronotype and digestive tract cancers: Mendelian randomization study[J]. *Int J Cancer*, 2023, 152(4): 697-704.
- [28] Chen X, Kong JQ, Diao XY, et al. Depression and prostate cancer risk: a Mendelian randomization study[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(23): 9160-9167.
- [29] Tan H, Wang SS, Huang FF, et al. Association between breast cancer and thyroid cancer risk: a two-sample Mendelian randomization study[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1138149. doi:10.3389/fendo.2023.1138149.
- [30] Zhou X, Wang L, Xiao J, et al. Alcohol consumption, dna methylation and colorectal cancer risk: results from pooled cohort studies and mendelian randomization analysis[J]. *Int J Cancer*, 2022, 151(1): 83-94.
- [31] Chen JZ, Sali A, Vitetta L. The gallbladder and vermiform appendix influence the assemblage of intestinal microorganisms[J]. *Future Microbiol*, 2020, 15: 541-555. doi:10.2217/fmb-2019-0325.
- [32] Liang CS, Bai YM, Hsu JW, et al. The risk of Alzheimer's disease after acute appendicitis with or without appendectomy[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2022, 23(4): 601-607.