

论著·临床研究

孤立低高密度脂蛋白胆固醇表型与血浆 miR-9-3p、miR-28-5p 的表达分析*

孙泽宁¹, 吴冰^{1,2}, 刘梦迪³, 李金荣¹, 田卫^{1,2}, 周云涛^{1,2△}

(1. 华北理工大学附属唐山市工人医院, 河北唐山 063000; 2. 唐山市临床分子诊断与治疗重点实验室, 河北唐山 063000; 3. 保定市第一中心医院, 河北保定 071000)

摘要:目的 探讨孤立低高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)表型血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 的变化模式及其相关性。方法 选取唐山市工人医院体检中心 2014 年 1 月至 2015 年 12 月 174 例健康体检者资料, 收集其外周血血浆样本。根据血清 HDL-C 水平分为血脂正常表型组(86 例)和孤立低 HDL-C 表型组(88 例)。实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法测定血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 的表达水平。结果 脂代谢表型正常组和孤立低 HDL-C 表型组血浆中 miR-9-3p 的检出率分别为 86.05%(74/86)和 64.78%(57/88), 差异有统计学意义($\chi^2=10.58, P=0.001$); 女性 miR-9-3p 水平在脂代谢正常组和孤立低 HDL-C 异常表型组血浆中的表达水平平均高于男性[正常组: 0.041(0.024, 0.111) vs. 0.018(0.009, 0.039), $Z=3.05, P=0.002$; 孤立低 HDL-C 表型组: 0.029(0.024, 0.059) vs. 0.013(0.007, 0.027), $Z=3.35, P=0.001$]。线性回归显示, 表观健康者血浆 miR-9-3p 的相对表达水平与性别($\beta=-1.337, P<0.001$)、血清 HDL-C($\beta=1.638, P=0.041$)、空腹血糖($\beta=0.475, P=0.044$)相关。血浆 miR-28-5p 女性组高于男性组, 差异有统计学意义[0.003(0.002, 0.008) vs. 0.004(0.003, 0.011), $P=0.028$], 而不同表型组中男、女比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 血浆 miR-9-3p 是孤立低 HDL-C 表型的分子病理特征, 性别、血清 HDL-C、空腹血糖是其循环水平变化的主要影响因素。

关键词:孤立低高密度脂蛋白胆固醇表型; 血浆; miR-9-3p; miR-28-5p

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.009

中图法分类号:R446.11

文章编号:1673-4130(2019)09-1057-05

文献标识码:A

Analysis of expression levels of plasma miR-9-3p and miR-28-5p in isolated low HDL-C phenotype*

SUN Zening¹, WU Bing^{1,2}, LIU Mengdi³, LI Jinrong^{1,2}, TIAN Wei^{1,2}, ZHOU Yuntao^{1,2△}

(1. Tangshan Gongren Hospital Affiliated to North China

University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Tangshan Key Laboratory of Clinical Molecule Diagnosis and Treatment, Tangshan, Hebei 063000, China;

3. the First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To investigate the change pattern and the correlation of miR-9-3p and miR-28-5p in plasma with isolated low (HDL-C) phenotype. **Methods** The data of 174 apparent health examinees from January 2014 to December 2015 in Tangshan Gongren Hospital Physical Examination Center were collected to collect peripheral blood plasma samples. According to the level of serum HDL-C, the patients were divided into normal lipid phenotype group (86 cases) and isolated low HDL-C phenotype group (88 cases). The expression levels of microRNA-9-3p and microRNA-28-5p in plasma were determined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** The detection rates of microRNA-9-3p in plasma of normal lipid metabolism phenotype group and isolated low HDL-C phenotype group were 86.05% (74/86) and 64.78% (57/88), respectively, and the difference was statistically significant ($\chi^2=10.58, P=0.001$). The expression of microRNA-9-3p in plasma of women with normal lipid metabolism and isolated low HDL-C abnormal phenotype was higher than that of men in the normal lipid phenotype group[in the normal group: 0.041 (0.024, 0.111)

* 基金项目:唐山市科技局研发平台重点实验室建设基金资助项目(17140210A)。

作者简介:孙泽宁,女,硕士研究生,主要从事临床分子诊断方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: yuntaozhou@hotmail.com。

本文引用格式:孙泽宁,吴冰,刘梦迪,等.孤立低高密度脂蛋白胆固醇表型与血浆 miR-9-3p,miR-28-5p 的表达分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1057-1061.

vs. 0.018 (0.009, 0.039), $Z=3.05$, $P=0.002$; in the isolated low HDL-C phenotype group: 0.029 (0.024, 0.059) vs. 0.013 (0.007, 0.027), $Z=3.35$, $P=0.001$]. Linear regression showed that the relative expression level of plasma microRNA-9-3p was correlated with gender ($\beta=-1.337$, $P<0.001$), serum HDL-C ($\beta=1.638$, $P=0.041$), fasting blood glucose ($\beta=0.475$, $P=0.044$). The level of plasma microRNA-28-5p in female group was higher than that in male group, and the difference was statistically significant [0.003(0.002, 0.008) vs. 0.004(0.003, 0.011), $P=0.028$] while there was no significant difference among the other groups ($P>0.05$). **Conclusion** Serum microRNA-9-3p is a molecular pathological feature of isolated low HDL-C phenotype. Gender, serum HDL-C and fasting blood-glucose are the main influencing factors of circulatory changes.

Key words: isolated low HDL-C phenotype; plasma; miR-9-3p; miR-28-5p

孤立低高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)表型是一种单纯的 HDL-C 水平减低,而三酰甘油(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)值正常的一种表现^[1]。孤立低 HDL-C 表型在亚裔人种中的发生率高于非亚裔人种,与冠心病、卒中的风险增加相关^[2]。不仅如此,心血管疾病治疗过程中,尽管他汀类药物强化治疗已经进一步减低了心血管事件和病死风险,但是“残留风险”问题却更加凸显出来^[3]。低 HDL-C 血症是“残留风险”发生的重要因素之一。近年来,低 HDL-C 表型与相关疾病间的分子机制研究已经成为脂代谢领域中的一个重要部分。

miRNA 是一类长约 22 个核苷酸的非蛋白编码的 RNA。通过转录后翻译抑制作用,在分子水平参与基因表达和调控。miRNA9(miR-9)是一个靶向调节沉默信息调节因子 2 家族基因 sirtuin-1(SIRT1)的 RNA 分子,参与糖代谢和脂代谢途径的调节,与胰岛素抵抗关系密切^[4]。研究显示,孤立低 HDL-C 表型人群,除了低 HDL-C 水平外,也常伴有胰岛素抵抗特征。MIR28 是一个通过靶向抑制 ERK2,上调 HDL-C 代谢调节关键基因三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)的 RNA 分子,在 HDL-C 代谢途径发挥作用^[5]。本研究旨在利用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)技术,检测 miR-9-3p 和 miR-28-5p 在孤立低 HDL-C 表型人群血浆中的表达水平,并探讨其与血清 HDL-C 水平的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取唐山市工人医院 2014 年 1 月至 2015 年 12 月健康体检者共 174 例,其中脂代谢表型正常组 86 例和孤立低 HDL-C 表型异常组 88 例。分组参照中国脂代谢异常防治指南、唐山地区健康居民体检血清 HDL-C 分布特征等^[6], TG<1.7 mmol/L 和 LDL-C<3.30 mmol/L、血清 HDL-C<1.04 mmol/L(男性)或 1.16 mmol/L(女性)判别为孤立低 HDL-C 表型异常组。排除标准:糖尿病、心脑血管病史、代谢综合征等病史。本研究经唐山市工人医院伦

理委员会批准,征得受试者的知情同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血浆 RNA 提取 参照 mirVana RNA 分离试剂盒(美国 Ambion 公司)操作手册。简易操作流程如下:(1) 两步离心法分离血浆样本(4 °C, 3 000 r/min 离心 15 min, 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min);(2) 500 μ L 血浆,经过变性液、酸化苯酚、无水乙醇、洗脱液等处理步骤,分离液相至 RNeasy Mini 吸附柱内;(3)加入预热 90 μ L 稀释液,静置 1 min, 8 000 \times g 离心 1 min。经血浆 RNA 分离,起始体积 500 μ L 的血浆样本转化为 90 μ L RNA 样本。

1.2.2 血浆 miRNA qPCR 检测 利用 TaqMan miRNA 反转录试剂盒、TaqMan miRNA 检测试剂盒、TaqMan 通用 PCR 试剂盒(美国 ABI 公司),完成 miRNA 反转录和 PCR 定量检测(ABI 7500 定量 PCR 仪,美国 ABI 公司)。反转录反应体系包括:8.6 μ L RNA, 0.1 μ L 100 mmol/L dNTPs, 0.1 μ L RNase inhibitor (20 U/ μ L), 1.5 μ L miRNA 特异度引物, 0.5 μ L MultiScribe™ 反转录酶 (50 U/ μ L); 反转录反应步骤:16 °C 孵育 1 h; 42 °C 孵育 1.5 h; 85 °C 孵育 5 min。定量 PCR 扩增体系包括:6 μ L 反转录产物, 10 μ L 2 \times TaqMan 通用 PCR 缓冲液, 0.5 μ L TaqMan miRNA 水解探针 (2.5 μ mol/L), 3.5 μ L H₂O (无 RNA 酶和 DNA 酶); 反应条件:95 °C 变性 15 s, 60 s 退火/延伸 1 min, 共 50 个循环。miRNA 相对表达定量分析以 miR-191-5p 为参照,采用 Δ Ct 方法,计算相对表达水平, $2^{-\Delta Ct}$ 表示血浆样本中的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 GraphPAD Prism 5.0 和 Bioconductor R 3.1.1 软件进行统计分析。非正态分布的计量资料用中位数和四分位数表示,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 。多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验,采用 Benjamini & Hochberg (BH) 方法进行校正;两组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。计数资料采用 χ^2 检验。变量间相关分析采

用多元线性回归分析等。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 孤立低 HDL-C 表型组与脂代谢表型正常组一般资料比较 一般临床资料如表 1 所示, 两组间 TC、TG 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 血清水平, 差异有统计学意义, 但均在正常参考值范围。

表 1 研究对象的临床特征

指标	正常脂表型组	孤立低 HDL-C 表型组	P 值
年龄(岁)	37.00±8.00	35.00±7.64	0.078
性别(女/男)	41/45	43/45	0.881
TC(mmol/L)	4.62±0.44	4.11±0.46	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.33±0.17	0.91±0.11	<0.001
LDL-C(mmol/L)	2.56±0.33	2.55±0.34	0.935
TG(mmol/L)	0.88±0.28	1.13±0.32	<0.001
FG(mmol/L)	4.84±0.42	4.93±0.44	0.180
ALT(U/L)	14.50[10,20]	18.83±8.39	0.032
AST(U/L)	16[14,19]	16.48±3.52	0.679
GGT(U/L)	16.00[13.00,21.25]	19.65±7.76	0.282
HGB(g/L)	143.00[132.00,156.30]	144.00±10.93	0.777
PLT($\times 10^9$ /L)	243.50[216.50,271.30]	241.20±52.21	0.548
WBC($\times 10^9$ /L)	6.56±1.43	6.81±1.32	0.173
RBC($\times 10^{12}$ /L)	4.75±0.42	4.81±0.42	0.378
NEU($\times 10^9$ /L)	3.53[3.53,4.15]	3.91±1.00	0.196
LYM($\times 10^9$ /L)	2.30[1.90,2.60]	2.31±0.52	0.718

注: TC 为总胆固醇; HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C 为低密度脂蛋白胆固醇; TG 为三酰甘油; FG 空腹血糖; ALT 为丙氨酸氨基转移酶; AST 为门冬氨酸转氨酶; GGT 为谷氨酰转肽酶; HGB 为血红蛋白浓度; PLT 为血小板计数; WBC 为白细胞; RBC 为红细胞; NEU 为中性粒细胞; LYM 为淋巴细胞

2.2 血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 的检出率 脂代谢

表型正常组和孤立低 HDL-C 表型组血浆中 miR-9-3p 的检出率分别为 86.05% (74/86) 和 64.77% (57/88), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.58, P = 0.001$), 见表 2, 但性别分组条件下, miR-9-3p 在各组间的检出率, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.66, P = 0.882$)。miR-28-5p 的检出率分别为 94.19% (81/86) 和 100% (88/88), 差异无统计学意义。表观健康体检者血浆中 miR-9-3p 和 miR-28-5p 的总检出率分别为 75.29% (131/174) 和 97.13% (169/174)。

表 2 血浆 miR-9-3p 的检出率 (n)

组别	阳性	阴性	合计
孤立低 HDL-C 表型组	74	12	86
正常脂表型组	57	31	88
合计	131	43	174

注: $\chi^2 = 10.58, P = 0.001$, 有统计学意义

2.3 血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 表达水平 如图 1 所示, 孤立低 HDL-C 异常表型组与脂代谢正常表型组血浆样本中 miR-9-3p 相对表达水平分别为 0.024 (0.009, 0.039) 和 0.026 (0.012, 0.065), 差异无统计学意义 ($P = 0.167$), 图 1A; miR-28-5p 的相对表达水平分别为 0.004 (0.002, 0.010) 和 0.004 (0.002, 0.011), 差异无统计学意义 ($P = 0.871$)。见图 1B。

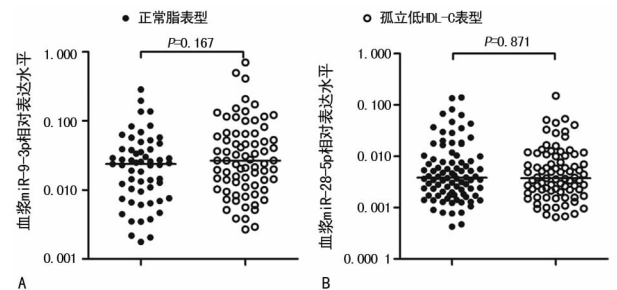
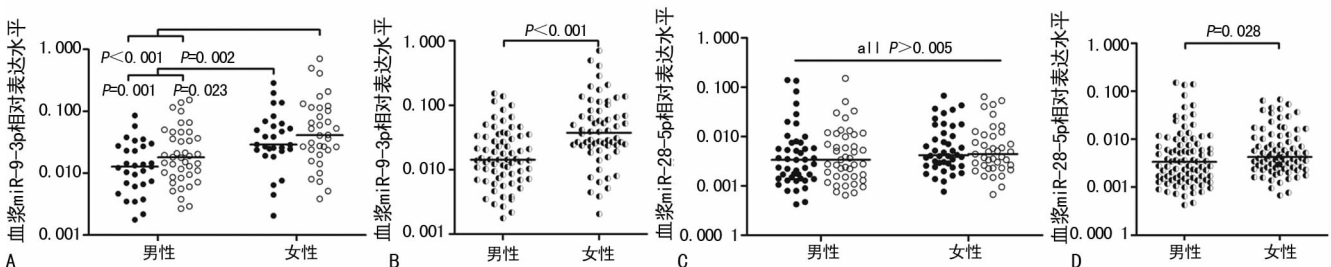


图 1 血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 的相对表达水平



注: A 为性别与表型交互分组情况下血浆 miR-9-3p 比较分析; B 为性别分组情况下血浆 miR-9-3p 比较分析; C 为性别与表型交互分组情况下血浆 miR-28-5p 比较分析; D 为性别分组情况下血浆 miR-28-5p 比较分析; ● 表示正常脂表型; ○ 表示孤立低 HDL-C 表型

图 2 性别分组下血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 的相对表达水平

2.4 性别分组情况下, 血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 表达水平 如图 2 所示, miR-9-3p 在女性脂代谢正常组和孤立低 HDL-C 异常表型组血浆样本中的表达水平平均高于男性组, 见图 2A, 与未表型分组情况下女性

组高于男性组的分析结果相一致 [0.038 (0.023, 0.082) vs. 0.014 (0.007, 0.033), $P < 0.001$], 见图 2B。而在性别和 HDL-C 异常表型分组条件下, 各组间血浆 miR-28-5p 的差异无统计学意义, 见图 2C, 仅

在未表型分组情况下女性组高于男性组[0.003(0.002,0.008) vs. 0.004(0.003,0.011), $P=0.028$], 见图 2D。

2.5 血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 与临床指标的线性回归分析 如表 3 所示,线性回归分析显示血浆 miR-9-3p 与性别因素($P<0.001$)、血清 HDL-C 水平($P=0.041$)、空腹血糖($P=0.044$)相关,见表 3;而 miR-28-5p 表达水平与血清 HDL-C 水平、空腹血糖、性别等指标均无相关性。

表 3 健康体检者血浆 miR-9-3p 的线性回归分析

项目	回归系数 β	95% 可信区间	t 值	P 值
血清 HDL-C(mmol/L)	1.638	0.067,3.210	2.065	0.041
男性	-1.337	-2.012,-0.663	-3.927	<0.001
空腹血糖(mmol/L)	0.475	0.012,0.937	2.033	0.044

注:多元线性回归模型中包括年龄、血脂、肝功能、血常规细胞绝对计数等指标,非正态分布的数据经自然对数转换,回归模型经年龄等因素调整后 $R^2=0.215, P=0.002$

3 讨 论

孤立低 HDL-C 表型是心脑血管疾病的一个风险因素。该表型人群常表现出内皮细胞功能紊乱、HDL 亚组份功能异常^[7]、抗炎作用削弱^[8]、血小板过渡活化^[9]等病理生理特征,而这些改变与心脑血管疾病的发生与发展关系密切。

研究表明,HDL-C 代谢过程中,有多种 miRNA 参与,包括 miR-33^[10],miR-28^[11],miR-144^[12]等。研究表明,miR-9 调节胰岛素分泌^[13],参与胆固醇代谢及心肌细胞血管新生过程^[14-15]。冠心病患者常伴有降低的 HDL-C 水平,并发糖尿病。因此,本研究选取 miR-28 和 miR-9 作为研究对象,探讨在孤立低高密度脂蛋白胆固醇表型下的血浆 miR-9-3p 和 miR-28-5p 变化模式。结果显示,脂代谢表型正常组和孤立低 HDL-C 表型组血浆中 miR-9-3p 的检出率分别为 86.05%(74/86)和 64.77%(57/88),差异有统计学意义,同时在女性脂代谢正常表型组和孤立低 HDL-C 表型组的表达水平均高于男性表型组,差异均有统计学意义。然而,在不考虑性别因素情况下,脂代谢正常表型和孤立低 HDL-C 表型组间差异无统计学意义。线性回归分析显示性别、血清 HDL-C 水平和空腹血糖水平是血浆 miR-9-3p 的主要影响因素,尤其是性别因素,支持了血浆 miR-9-3p 在脂代谢正常表型和孤立低 HDL-C 表型中的分布特征。国内外对于孤立低高密度脂蛋白表型的血浆 miR-9 水平鲜有报道。本研究首次利用孤立低 HDL-C 表型和正常血脂表型间的微弱差别,证实了血浆 miR-9-3p 的基线特征及其关联因素,为其在动脉硬化性疾病和糖尿病的

关联研究提供了基础数据支持。人类 miR-9 基因定位于 3 个不同的染色体(1 号、5 号和 15 号)基因座位,增加了其转录调控模式复杂性,有可能影响血浆 miR-9-3p 的分布水平。其不同基因座位对血浆 miR-9-3p 表达模式的影响有待于进一步深入研究,以期为亚临床、临床疾病诊疗的转化与应用奠定坚实的基础。

miR-28 属于内含子型的 miRNA 分子,与 LIM 域脂肪瘤优先运输辅基编码基因(LPP)协同转录加工。研究表明 LPP 基因及其内含子型 miR-28 分子与动脉粥样硬化性疾病关系密切。本研究未发现血浆 miR-28-5p 在健康体检血脂正常表型和孤立低 HDL-C 表型中存在差异,提示血浆 miR-28-5p 不是孤立低 HDL-C 表型的分子病理特征。当前 HDL-C 的亚组分研究提示,抗动脉粥样硬化的 HDL 颗粒是由一组异质亚组分组成,不仅大小和密度不同,其化学成分和生理功能也有所不同^[16]。临床实践中,冠心病患者常常伴有其他代谢性疾病,如糖尿病、高脂血症等,其相互关联的因子十分复杂。借助新型 miRNA 分子谱系特征,能为孤立低 HDL-C 表型的诊疗以及心血管事件风险预测提供新的研究思路和潜在的干预靶标,从而实现心脑血管疾病的精准医疗。

4 结 论

血浆 miR-9-3p 是孤立低 HDL-C 表型的分子病理特征之一。性别、血清 HDL-C、空腹血糖是其循环水平变化的主要关联因素。血浆 miR-9-3p 在孤立低 HDL-C 表型的基线特征及其关联因素的发现,将有助于临床工作中更加全面地了解心血管疾病危险因素携带者亚临床表型的分子病理特征,为心血管病的早期防控提供潜在的分子靶标。

参考文献

- [1] WILT, VM GUMS J G. "Isolated" low high-density lipoprotein cholesterol[J]. Ann Pharmacother, 1997, 31(1): 89-97.
- [2] HUXLEY R R, BARZI F, LAM T H, et al. Isolated low levels of high-density lipoprotein cholesterol are associated with an increased risk of coronary heart disease - an individual participant data meta-analysis of 23 studies in the asia-pacific region[J]. Circulation, 2011, 124(20): 2056-2064.
- [3] 刘梦迪, 李金容, 吴冰, 等. microRNAs: 高密度脂蛋白胆固醇干预治疗心血管疾病的新靶标[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37, (20): 2867-2870.
- [4] CAO Y, JIANG X, MA H, et al. SIRT1 and insulin resistance[J]. J Diabetes Complicat, 2016, 30: 178-183.
- [5] LIU J, LIU Y, SUN Y, et al. miR-28-5p Involved in LXR-

ABCA1 pathway is increased in the plasma of unstable angina patients[J]. *Heart, Lung Circ*, 2015, 24:724-730.

[6] 吴冰, 曲淑君, 孟军华, 等. 唐山市城镇健康居民体检血清高密度脂蛋白胆固醇水平的分布[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(2):120-123.

[7] YETUKURI L, SODERLUND S, KOIVUNIEMI A, et al. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51:2341-2351.

[8] HOLVEN K B, RETTERSTOL K, UELAND T, et al. Subjects with low plasma HDL cholesterol levels are characterized by an inflammatory and oxidative phenotype [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8:e78241.

[9] VAZZANA N, GANCI A, CEFLU A B, et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation as potential contributors to increased cardiovascular risk in the low-HDL phenotype[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2:e000063.

[10] ROTLLAN N, RAMIREZ C M, ARYAL B, et al. Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice—brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8):1973-1977.

[11] LIU J, LIU X Q, LIU Y, et al. MicroRNA 28-5p regulates ATP-binding cassette transporter A1 via inhibiting extracellular signal-regulated kinase 2[J]. *Mol Med Rep*, 2016,

13(1):433-440.

[12] TQ D A V, TE J, KIM T, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor[J]. *Circ Res*, 2013, 112(12):1602-1612

[13] YAN C, CHEN J, MIN L, et al. A decrease in hepatic microRNA-9 expression impairs gluconeogenesis by targeting FOXO1 in obese mice[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(7):1524-1532.

[14] ZHANG J, CHINTAL V, SHIH T, et al. MicroRNA-9 is an activation-induced regulator of PDGFR-beta expression in cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(3):337-346.

[15] XU J, HU G, LU M, et al. MiR-9 reduces human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 to decrease THP-1 macrophage-derived foam cell formation[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(11):953-962.

[16] 米春芳, 刘庆平. 血浆低密度脂蛋白和高密度脂蛋白亚组分的临床意义及检测研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(10):1054-1060.

(收稿日期:2018-09-24 修回日期:2018-11-12)

(上接第 1056 页)

hepatitis B viral replication and genetic variability[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1):4-16.

[4] KIM H J, CHO Y K, JEON W K, et al. Clinical characteristics of patients with chronic hepatitis B who developed genotypic resistance to entecavir; Real-life experience[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2017, 23(4):323-330.

[5] GUO X, WU J, WEI F, et al. Trends in hepatitis B virus resistance to nucleoside/nucleotide analogs in north China from 2009 to 2016; a retrospective study[J]. *Int J of Antimicrob Agents*, 2018, 52(2):201-209.

[6] LIN C L, KAO J H. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3):249-255.

[7] 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2016, 19(3):1-18.

[8] 伍宵, 魏少峰, 徐楠, 等. 中国慢性 HBV 感染者基因型分布及其临床意义 Meta 分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2017, 20(3):271-275.

[9] 陈武, 雷香菊, 陈萍, 等. 乙肝病毒基因型、耐药基因突变与血清病毒学指标的相关性[J]. *现代预防医学杂志*, 2018, 45(22):4153-4156.

[10] YANG H I, YE H S H, CHEN P J, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk

of hepatocellular carcinoma[J]. *J Nati Cancer Inst*, 2008, 100(16):1134-1143.

[11] CHAN H L, TSE C H, MO F, et al. High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(2):177-182.

[12] ZENG G, WANG Z, WEN S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China[J]. *J Viral Hepa*, 2005, 12(6):609-617.

[13] SUMI H, YOKOSUKA O, SEKI N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease[J]. *Hepatology*, 2003, 37(1):19-26.

[14] LITTLEJOHN M, DAVIES J, YUEN L, et al. Molecular virology of hepatitis B virus, sub-genotype C4 in northern Australian indigenous populations[J]. *J Med Virol*, 2014, 86(4):695-706.

[15] LOK A S, MCMAHON B J, JR B R, et al. Antiviral therapy for chronic hepatitis B viral infection in adults; A systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2016, 63(1):284-306.

(收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-11-14)