

· 生物信息学 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.021

## 基于 microRNAs 调控的轻度慢性乙型肝炎炎症活动的分子机制研究\*

张传涛<sup>1,2</sup>, 黄 群<sup>2</sup>, 刘业方<sup>2</sup>, 郭尹玲<sup>2</sup>, 辜海英<sup>1</sup>, 王芳瑜<sup>2</sup>, 胡 蓉<sup>3</sup>, 扈晓宇<sup>1△</sup>, 郑政隆<sup>2</sup>  
 (1. 成都中医药大学附属医院感染科, 成都 610072; 2. 成都中医药大学, 成都 610075;  
 3. 成都市传染病医院肝病科, 成都 610066)

**[摘要]** **目的** 研究从 microRNAs 角度揭示轻度慢性乙型肝炎炎症活动的分子机制。**方法** 将符合标准的病例分为轻度慢性乙型肝炎组与慢性 HBV 携带者组, 借助 Agilent Human microRNA 8×60 k 微阵列芯片检测血浆中 microRNAs 表达谱, 求得两组间的差异表达 microRNAs 谱 ( $P < 0.05$ ), 借助 microRNAs 生物信息学分析软件预测其靶基因并对靶基因进行 GO 功能富集分析和 pathway 分析。**结果** 两组间的差异表达 microRNAs 共 65 条 ( $P < 0.05$ ), 38 条上调, 27 条下调; GO 分析及 pathway 分析得到其功能主要涉及细胞增殖、生物黏附、生物合成过程的正/负调控、大分子生物合成过程中的正/负调控、蛋白氨基酸的磷酸化、RNA 的生物合成过程、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、Notch 信号传导途径、Hedgehog 信号通路、T 细胞受体信号通路、TGF- $\beta$  信号通路、mTOR 信号通路、趋化因子信号通路 JAK-STAT 信号通路、钙离子信号通路等。**结论** 轻度慢性乙型肝炎炎症活动受特异性 microRNAs 调控, 其涉及多个生命过程及通路。

**[关键词]** 轻度慢性乙型肝炎; 炎症活动; microRNAs 调控

**[中图分类号]** R512.6+2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)32-4527-04

## Study on molecular mechanism of mild chronic hepatitis inflammatory activity based on microRNAs regulation\*

Zhang Chuantao<sup>1,2</sup>, Huang Qun<sup>2</sup>, Liu Yefang<sup>2</sup>, Guo Yinling<sup>2</sup>, Gu Haiying<sup>1</sup>,  
 Wang Fangyu<sup>2</sup>, Hu Rong<sup>3</sup>, Hu Xiaoyu<sup>1△</sup>, Zheng Zhenglong<sup>2</sup>

(1. Department of Infection, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China; 3. Department of Liver Diseases, Chengdu Infectious Disease Hospital, Chengdu, Sichuan 610066, China)

**[Abstract]** **Objective** To reveal the molecular mechanism of inflammatory activity of mild chronic hepatitis B from the perspective of microRNAs regulation. **Methods** The cases conforming to the standard were divided into the mild chronic hepatitis B group and chronic HBV carriers group. The Agilent Human miRNA 8×60 k microarray chip was used to detect the expression profiles of microRNAs in plasma in order to achieve different expression spectrum of microRNAs between the two groups ( $P < 0.05$ ). Then the miRNA bioinformatics analysis software was used to predict the target gene, and did target genes GO functional enrichment analysis and pathway analysis. **Results** A total of 65 microRNAs bands were differentially expressed between the two groups ( $P < 0.05$ ), 38 bands were up-regulated, 27 bands were down-regulated. The GO analysis and Pathway analysis showed that the function mainly involved in cell proliferation, bioadhesion, positive/negative regulation of biosynthesis, positive/negative regulation of macromolecular biosynthesis, phosphorylated of protein amino acids, biosynthesis of RNA, Wnt signaling pathway, MAPK signaling pathway, Notch signaling transduction pathway, Hedgehog signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, mTOR signaling pathway, chemokine signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, calcium ion signaling pathway, etc. **Conclusion** The inflammatory activity of mild chronic hepatitis B is regulated by specific microRNAs, involving multiple life processes and pathways.

**[Key words]** mild chronic hepatitis B; inflammatory activity; microRNAs regulation

全球约 20 亿人曾感染乙型肝炎病毒 (HBV), 其中 2.4 亿人为慢性 HBV 感染者<sup>[1]</sup>, 每年约有 65 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌<sup>[2]</sup>。2006 年全国乙型肝炎血清流行病学调查表明, 我国 1~59 岁一般人群 HBsAg 携带率为 7.18%<sup>[3-4]</sup>。2014 年全国 1~29 岁人群乙型肝炎血清流行病学调查结果显示: 1~4 岁、5~14 岁和 15~29 岁人群 HBsAg 流行率分别为 0.32%、0.94% 和 4.38%。虽然我国 HBV 感染率明显下降, 但是我国仍是肝病高发地区, 仍严重影响我国人民健康的疾病, 为社会带来巨大的经济负担。微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 是一类具有单链小分子 RNAs, 调控人

体近 1/3 基因的功能<sup>[5]</sup>, miRNAs 参与 HBV 感染后病毒与宿主之间的相互作用, 能够调控 HBV 复制、细胞外基质生成及抑癌基因的沉默等过程<sup>[6-8]</sup>。深入研究 miRNAs 调控网络有望为进一步丰富 HBV 感染的发病机制。本研究借助 Agilent Human miRNA 8×60 k 微阵列芯片技术, 从 miRNAs 调控角度揭示慢性乙型肝炎 (简称“慢乙肝”) 炎症活动的机制, 为今后控制慢乙肝肝脏炎症活动、抗 HBV 药物研发等提供研究方向。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 病例均来自成都市传染病医院等中心 2012

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202624)。 作者简介: 张传涛 (1981-), 副主任医师, 博士, 从事肝病及感染病研究。

△ 通讯作者, E-mail: zct801012@126.com。

年 8 月至 2013 年 4 月门诊,分为:携带者 8 例,轻度慢性乙型肝炎 8 例。纳入标准:(1)符合轻度慢乙肝与慢性 HBV 携带者诊断;(2)就诊前 3 个月内未进行过中西医抗病毒及保肝等治疗;(3)患者的 HBV-DNA 为阳性;(4)年龄 20~40 岁;(5)同意并签署知情同意书者;只有以上入选标准都满足者,才能纳入本临床研究。轻度慢乙肝与携带者诊断标准:参照中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病分会联合制定《病毒性肝炎防治方案》(2000 年修订版)拟定轻度慢乙肝诊断标准<sup>[9]</sup>。参照中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病分会联合制定《慢性乙型肝炎防治指南》(2005 年版)拟定慢性 HBV 携带者诊断标准<sup>[10]</sup>。

## 1.2 方法

**1.2.1 主要仪器及试剂** 微阵列扫描仪(安捷伦,批号:P/N G2565BA)、不锈钢杂交室(安捷伦,批号:P/N G2534A)、杂交室垫片幻灯片 8 微阵列(安捷伦,批号:P/N G2534A)、miRNA 的完整标签和 HYB 套件(安捷伦,批号:P/N 5190-0456)基因表达的洗涤液套装(安捷伦,批号:P/N 5188-5327)、2100 生物分析仪(安捷伦,批号:P/N g2938A)、RNA 6000 纳米试剂盒(安捷伦,批号:P/N 5067-1511)。

**1.2.2 实验方法** 用血常规管(EDTA 抗凝)采取符合标准患者肘静脉血 10 mL,4 ℃ 静置 30 min,3 000 r/min 离心 20 min,提取血浆,RNA 抽提,质控合格,标记、杂交,Agilent Human miRNA 8×60 k 微阵列芯片技术检测,芯片洗涤、扫描,在线 SAS 系统中的“DiffGene”项目行 T 检验和 SAM 筛选,对筛选出来 2 倍以上表达差异的 miRNAs 利用 miRNA 生物信息学分析软件进行靶基因预测,将筛选出来的靶基因行 GO 功能富集基因的分类和 pathway 分析。

**1.3 统计学处理** 差异 miRNAs 筛选采用在线 SAS 系统分析(<http://www.ebioservice.com>)。比较采用配对 *t* 检验,miRNAs 表达组间比较进行方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 差异表达 miRNAs 谱** 将归一化文件导入 SAS 系统中,轻度慢乙肝与慢性 HBV 携带者两组间的差异表达 miRNAs 共 65 条( $P < 0.05$ ),38 条上调,27 条下调;2 倍以上差异表达的 miRNAs 30 条,19 条上调,11 条下调。上调的 19 条为:hsa-

miR-1246,hsa-miR-3679-5p,hsa-miR-1275,hsa-miR-1268,hsa-miR-126,hsa-miR-4298,hsa-miR-1225-5p,hsa-miR-4270,hsa-miR-320c,hsa-miR-1207-5p,hsa-miR-223,hsa-miR-1202,hsa-miR-3162,hsa-miR-27a,hsa-miR-1915,hsa-miR-142-3p,hsa-miR-630,hsa-miR-3195,hsa-miR-4281 等。下调的 11 条为:hsa-miR-26a,hsa-miR-29a,hsa-miR-1238,hsa-miR-720,hsa-miR-122,hsa-miR-1228,hsa-miR-1280,hsa-miR-1281,hsa-miR-1234,hsa-miR-191 \* ,hsa-miR-20a 等。

**2.2 差异 miRNAs 靶基因 GO 功能分析** 利用 miRNA 生物信息学分析软件 miRDB,microRNA,TarBase 等对两组间 2 倍以上的差异 miRNAs 进行靶基因预测,利用 DAVID 在线软件对所预测的靶基因进行 GO 功能富集分析。

上调的差异 miRNAs 所对应的靶基因共参与 61 项显著生物功能(表 1),主要包括细胞增殖、生物黏附、细胞黏附、细胞内的信号级联、蛋白质转运、蛋白定位、大分子生物合成过程中的积极调控、大分子代谢过程正调控、氮化合物的代谢过程的正调控、生物合成过程中的正/负调控、细胞凋亡、蛋白氨基酸的磷酸化、细胞周期、细胞迁移等下调的差异 miRNAs 所对应的靶基因共参与 76 项显著生物功能(表 2),包括转录调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、基因表达的正/负调控、转录正/负调控、大分子代谢过程正/负调控、RNA 代谢过程正调控、氮化合物的代谢过程的正调控、细胞生物合成过程中的积极调控、酶联受体蛋白信号通路、细胞增殖、细胞迁移、蛋白定位、细胞运动、Wnt 受体信号通路、钾离子转运、RNA 的生物合成过程及核碱基、核苷、核苷酸和核酸的代谢过程的正调控等。

**2.3 差异 miRNAs 靶基因调控的 Pathway 分析** 轻度慢乙肝组/慢性 HBV 携带者组上调差异 miRNAs 的靶基因参与的显著性信号通路 28 条(图 1),包括黏着、轴突导向、胞吞作用、心脏相关疾病(肥厚性心肌病、扩张型心肌病、致心律失常性右室心肌病等)、肌动蛋白骨架的调节、白细胞跨内皮迁移、Janus 激酶(JAK)-信号转导子和转录激活子(STAT)信号传导途径、神经营养因子信号通路、Wnt 信号通路、Notch 信号传导途径、胰岛素信号通路、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、p53 信号通路等。

表 1 轻度慢乙肝组/慢性 HBV 携带者组上调差异 miRNAs 的靶基因 GO 分析

项目	类名	总数	<i>P</i>	富集	伪发现率
GO:0042127	调节细胞增殖	735	2.83E-10	1.080488756	5.58E-07
GO:0022610	生物黏附	657	4.43E-10	1.084313829	8.74E-07
GO:0007155	细胞黏附	656	4.82E-10	1.084210089	9.52E-07
GO:0007242	细胞内信号级联	1 152	1.42E-09	1.061134622	2.81E-06
GO:0010604	大分子代谢过程正调节	790	7.82E-08	1.066482944	1.54E-04
GO:0015031	蛋白质转运	705	8.41E-08	1.070389378	1.66E-04
GO:0008104	蛋白定位	812	9.51E-08	1.065111537	1.88E-04
GO:0045184	蛋白定位建立	711	1.00E-07	1.069672685	1.98E-04
GO:0009891	生物合成过程的正调控	644	1.72E-07	1.072034366	3.40E-04
GO:0010033	对有机物的反应	667	2.08E-07	1.070281982	4.10E-04
GO:0010557	正调节大分子生物合成过程	607	2.08E-07	1.073788102	4.11E-04
GO:0051173	氮化合物代谢过程的正调控	598	2.14E-07	1.074293533	4.22E-04

表 2 轻度慢乙肝组/慢性 HBV 携带者组下调差异 miRNAs 的靶基因 GO 分析

项目	类名	总数	P	富集	伪发现率
GO:0045449	转录调节	1 228	4. 11E-22	1. 212169663	7. 96E-19
GO:0006357	RNA 聚合酶 II 启动子的转录调节	402	3. 69E-20	1. 41970149	7. 14E-17
GO:0010628	基因表达正调节	320	1. 32E-15	1. 414097134	2. 58E-12
GO:0045941	转录正调节	312	1. 37E-15	1. 420302613	2. 58E-12
GO:0010557	大分子生物合成过程正调节	353	2. 10E-15	1. 385805731	4. 09E-12
GO:0045935	核碱基,核苷,核苷酸和核酸代谢过程的正调控	337	8. 69E-15	1. 38659844	1. 68E-11
GO:0045893	DNA 依赖性转录正调节	267	2. 92E-14	1. 437137356	5. 65E-11
GO:0051254	RNA 代谢过程的正调控	268	5. 44E-14	1. 430523886	1. 05E-10
GO:0051173	氮化合物代谢过程的正调控	343	6. 26E-14	1. 367456905	1. 21E-10
GO:0031328	细胞生物合成过程的正调控	361	9. 12E-14	1. 353075488	1. 76E-10
GO:0009891	生物合成过程的正调控	365	1. 24E-13	1. 348383582	2. 40E-10
GO:0010604	大分子代谢过程正调节	437	1. 69E-13	1. 309200043	3. 28E-10

轻度慢乙肝组/慢性 HBV 携带者组下调差异 miRNAs 的靶基因参与的显著性信号通路 51 条(图 2),包括白细胞跨内皮迁移、Hedgehog 信号通路、II 型糖尿病、脑胶质瘤、促性腺激素释放激素信号传导途径、黑色素生成、肾细胞癌、T 细胞受体信号传导途径、卵母细胞减数分裂、钙信号传导途径、肌动蛋白骨架的调节、神经营养因子信号传导途径、扩张型心肌病、胰岛素信号传导途径、慢性髓样白血病、Notch 信号传导途径、泛素介导性蛋白酶解、缝隙连接、ErbB 信号传导途径、粘着斑、粘着连接、长时程增强、癌症途径、紧密连接、胞吞作用、MAPK 信号传导途径、Wnt 信号通路、轴突导向、Notch 信号通路、mTOR 信号通路、p53 信号通路、O-聚糖的生物合成、脂肪细胞因子信号通路、趋化因子信号通路、TGF-β 信号通路、癌症途径(大肠癌、肾细胞癌、小细胞肺癌等)等。

进一步借助 miRNA 生物信息学分析软件 DAVID 对差异 miRNAs 预测靶基因功能进行 GO 富集分析发现,其功能主要涉及生物黏附、氮化合物的代谢过程的正/负调控、生物合成过程的正/负调控、大分子生物合成过程中的积极调控、细胞生物合成过程中的正/负调控、蛋白氨基酸的磷酸化、基因表达的正/负调控、Wnt 受体信号通路、钙离子转运等生命过程。KEGG 分析结果提示其主要涉及 Notch 信号通路、钙信号通路、Hedgehog 信号通路、mTOR 信号通路、p53 信号通路、O-聚糖的生物合成、轴突导向、脂肪细胞因子信号通路、趋化因子信号通路、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、胰岛素信号通路、神经营养因子信号通路、T 细胞受体信号传导途径、TGF-β 信号通路等。

本研究发现 miRNA 可以影响 JAK-STAT 信号传导途径,HBV 及其抗原成分能够选择性地抑制干扰素 α(interferon-α)JAK-STAT 信号传导途径分子和抗病毒蛋白的表达。IFN-αJAK-STAT 信号传导途径分子 STAT1 的下调表达可能是 HBV 抑制 IFNα 抗病毒活性的机制之一<sup>[11]</sup>。作者推测特异性 microRNA 可能调控了 JAK-STAT 信号传导途径增强了 IFN-α 作用,增强机体免疫,进步引起肝脏炎症活动。本研究发现 miR-320c 可能参与 Wnt 信号通路、TGF-β 信号通路、细胞周期、MAPK 信号通路等,TGF-β1 诱导的肝星状细胞细胞及 HepG2 细胞中 Smad3C 及 Smad3L 磷酸化,进而促进 Smad2/3/4 复合物形成,及其转位入核和靶基因 I 型纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)mRNA 表达可能是肝纤维化-肝癌发病的重要机制,肝纤维化中 MAPK 信号通路能够对肝星状细胞活性产生影响<sup>[12]</sup>。MAPK 抑制因子均能明显抑制 HSC 细胞内 TGF-β1 诱导的靶基因 PAI-1 mRNA 的表达,MAPK 通路参与 HSC 细胞内 TGF-β1 信号通路靶基因 PAI-1 转录活性的调控而影响肝纤维化。作者推测特异性 miRNA 通过影响 MAPK 通路调控下经 TGF-β1/Smad 信号途径而影响慢乙肝向肝纤维化发展,这为今后开展防治乙肝后肝纤维化提供思路<sup>[13]</sup>。Th17 作为一种新发现的辅助性 T 细胞(Helper T cells, Th),参与乙型肝炎疾病的病程发展和转归<sup>[14-15]</sup>。PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与 Th17 的增殖、分化<sup>[16]</sup>,此信号通路的过度激活可导致正常细胞的自噬和凋亡紊乱,PI3K/Akt/mTOR 信号通路可能激活 Th17,促使 CHB 向肝硬化、肝细胞癌发展,推测特异性 miRNA 调控 mTOR 信号通路参与了慢乙肝炎症活动进展为肝硬化、肝癌进程。阻断 Notch 信号通路可减少慢性乙型肝炎患者外周单个核细胞 Foxp3 mRNA 的表达,Notch 信号通路可能是持续

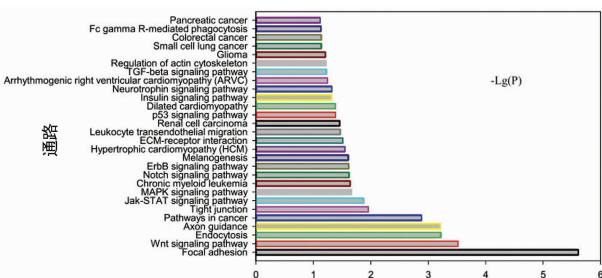


图 1 轻度慢乙肝组/慢性 HBV 携带者组上调差异 miRNAs 的靶基因通路

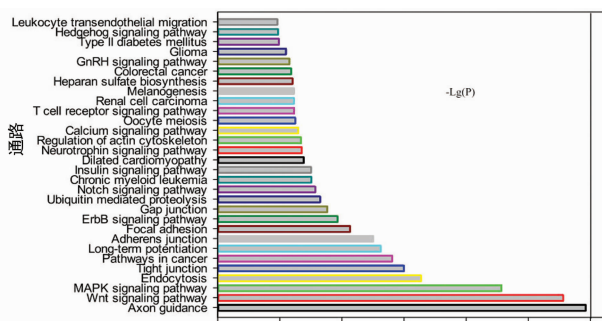


图 2 轻度慢乙肝组/慢性 HBV 携带者组下调差异 miRNAs 的靶基因通路

3 讨 论

本研究借助 Agilent Human miRNA 8×60 k 微阵列芯片技术筛选慢乙肝组与慢性 HBV 携带者组之间差异 miRNAs 谱,其中显著性(2 倍以上)差异表达 30 条,19 条上调,11 条下

感染的一个因素<sup>[17]</sup>,推测 miRNA 调控 Notch 信号通路可能是 HBV 持续感染的作用机制之一。另外,本研究发现差异 miRNA 还影响了细胞增殖、生物黏附、细胞粘附、蛋白质转运、建立蛋白定位、大分子生物合成过程中的积极调控、氮化合物的代谢过程的正调控、生物合成过程中的正/负调控、细胞凋亡、蛋白氨基酸的磷酸化、转录调控、基因表达的正/负调控、RNA 的生物合成等多个生命过程,这些影响在慢乙型肝炎活动中的作用仍需进一步验证。

总之,本研究得到慢乙型肝炎活动的差异 miRNAs 谱,初步揭示慢乙型肝炎活动(打破免疫耐受状态)机制,这些差异 miRNAs 可能作为慢乙型肝炎活动或其他肝脏相关疾病的潜在生物学标志物,但仍需进一步验证研究。

## 参考文献

[1] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. *Vaccine*, 2012, 30(12): 2212-2219.

[2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.

[3] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China—declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination [J]. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6550-6557.

[4] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Evaluation of the impact of hepatitis B vaccination among children born during 1992-2005 in China [J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(1): 39-47.

[5] Berezikov E, Guryev V, Van de belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 21-24.

[6] 邢同京, 徐洪涛, 王变, 等. 慢性乙型肝炎免疫清除相关微 RNA 分子的筛选及其生物信息学分析 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2014, 7(5): 441-446.

[7] 冯洪玲, 李谦. 血清 miRNA 在乙型肝炎诊断和预后中的研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2014, 23(10): 1124-1126.

[8] 鱼康康, 施光峰, 李宁. miRNA 在乙型肝炎病毒感染相关肝病中的研究进展 [J]. *中国病毒病杂志*, 2014, 4(2): 150-154.

[9] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华传染病学杂志*, 2001, 19(1): 57-58.

[10] 中华医学会肝病学分会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12): 883.

[11] 管世鹤, 杨凯, 陆蒙吉, 等. 乙型肝炎病毒及其抗原成分对干扰素信号传导途径分子和抗病毒蛋白表达的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(6): 440-444.

[12] 张琴, 黄涛, 卓强, 等. 肝纤维化中 MAPK 信号转导通路对肝星状细胞活性的影响 [J]. *成都医学院学报*, 2014, 9(4): 493-496.

[13] 谢雷. MAPK 通路调控下经 TGF-1/Smad 信号途径的肝纤维化-肝癌发病机制研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014, 10.

[14] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81-91.

[15] Ye Y, Xie X, Yu J, et al. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with Hepatitis B [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(4): 546-555.

[16] Nagai S, Kurebayashi Y, Koyasu S. Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1280(1): 30-34.

[17] 李小亮, 裴金仙, 奚敏, 等. 阻断 Notch1 信号通路对慢性乙型肝炎患者外周血 Foxp3 mRNA 表达的影响 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011, 20(1): 67-70.

(收稿日期: 2016-05-03 修回日期: 2016-07-29)

(上接第 4526 页)

al. Digoxin and mortality in atrial fibrillation: a prospective cohort study [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007, 63(10): 959-971.

[15] Gjesdal K, Feyzi J, Olsson SB. Digitalis: a dangerous drug in atrial fibrillation? An analysis of the SPORTIF III and V data [J]. *Heart*, 2008, 94(2): 191-196.

[16] Okin PM, Hille DA, Wachtell K, et al. Digoxin use and risk of mortality in hypertensive patients with atrial fibrillation [J]. *J Hypertens*, 2015, 33(7): 1480-1486.

[17] Washam JB, Stevens SR, Lokhnygina Y, et al. Digoxin use in patients with atrial fibrillation and adverse cardiovascular outcomes: a retrospective analysis of the Rivaroxaban Once Daily Oral Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in [J]. *Lancet*, 2015, 385(9985): 2363-2370.

[18] Chao TF, Liu CJ, Chen SJ, et al. Does digoxin increase the risk of ischemic stroke and mortality in atrial fibrillation? A nationwide population-based cohort study [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(10): 1190-1195.

[19] Dhaliwal AS, Bredikis A, Habib G, et al. Digoxin and clinical outcomes in systolic heart failure patients on contemporary background heart failure therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 102(10): 1356-1360.

[20] Rathore SS, Curtis JP, Wang Y, et al. Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure [J]. *JAMA*, 2003, 289(7): 871-878.

[21] Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics [M]. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 1917-2023.

(收稿日期: 2016-04-18 修回日期: 2016-08-06)