

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.19.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210526.1603.025.html\(2021-05-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210526.1603.025.html(2021-05-26))

妊娠期糖尿病对胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的影响^{*}

李金艳¹,杨根岭²,钱冠华^{3△}

(1. 重庆市中医院产科 400021;2. 重庆医科大学动物实验中心 400016;
3. 重庆医科大学附属第二医院妇产科 400010)

【摘要】 目的 明确孕鼠妊娠期糖尿病(GDM)对胎鼠原代培养的肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)形态、功能的影响及意义。**方法** SD孕鼠分为对照组和GDM组,GDM组孕鼠建立GDM模型。分离、纯化两组胎鼠的AECⅡ细胞。台盼蓝染色判断胎鼠AECⅡ活力;透射电镜观察胎鼠AECⅡ超微结构改变。苏木素-伊红(HE)染色胎肺组织计算AECⅡ和AECⅠ数量及比例;油红O染色检测胎鼠AECⅡ脂质的变化;免疫荧光检测胎鼠AECⅡ中肺泡表面活性物质相关蛋白C(SP-C,AECⅡ标记物)的表达变化;免疫细胞化学检查胎鼠AECⅡ肺泡表面活性物质相关蛋白A(SP-A)的表达变化。**结果** 原代培养可得到高产量、高纯度的AECⅡ。透射电镜下可见GDM组胎鼠AECⅡ中板层小体数较对照组胎鼠明显减少,细胞表面的微绒毛明显减少。GDM组胎鼠AECⅡ和AECⅠ细胞数量较对照组胎鼠均降低。GDM组胎鼠AECⅡ中脂滴数较对照组胎鼠明显减少。GDM组胎鼠原代培养的AECⅡ中SP-A表达低于对照组胎鼠($P<0.001$)。**结论** GDM时,AECⅡ细胞形态的改变,功能的抑制是新生儿容易出现呼吸窘迫综合征的重要原因。

【关键词】 妊娠期糖尿病;肺泡Ⅱ型上皮细胞;板层小体;肺泡表面活性物质相关蛋白A;肺泡表面活性物质相关蛋白C

【中图法分类号】 R714 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8348(2021)19-3455-06

Effect of gestational diabetes mellitus on fetal rat alveolar type Ⅱ epithelial cells^{*}

LI Jinyan¹,YANG Genling²,QIAN Guanhua^{3△}

(1. *Department of Obstetrics,the Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chongqing, Chongqing 400011,China*;2. *Laboratory Animal Center,Chongqing Medical University, Chongqing 40016,China*;3. *Department of Obstetrics and Gynecology,the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China*)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and significance of gestational diabetes mellitus (GDM) on the morphology and function of primary culture alveolar epithelial Ⅱ (AECⅡ) cells. **Methods** The pregnant Sprague-Dawley rats were divided into the control group and the GDM group. The GDM model was established in the GDM group. AECⅡ cells were isolated and purified from fetal lungs. The viability of cells was determined by trypan blue staining. Ultrastructure of AECⅡ cells were identified by transmission electron microscopy. The total number and proportion of AECⅡ and AECⅠ cells were calculated in fetal lung fragments stained by HE staining. Lipid droplets in AECⅡ cells were observed by oil red O staining. The expression of surface protein C (SP-C),the molecular maker of ACEⅡ was measured by immunofluorescence and protein A (SP-A) was measured by immunohistochemistry. **Results** High-yield,high-purity of ACEⅡ could be obtained by primary culture. Under transmission electron microscope,the number of lamellar bodies and microvilli on the surface of AECⅡ cells in the fetal lung of the GDM group were significantly decreased when compared with the fetal lung of the control group. The proportion of AECⅡ cells and AECⅠ cells in the fetal lung of the GDM group was lower than that in the fetal lung of the control group,and the number of lipid droplets of AECⅡ cells in the fetal lung of the GDM group was significantly decreased when compared with the fetal lung

^{*} 基金项目:成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划医院专项(YYZX2019068);重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目(2020)。 作者简介:李金艳(1978—),主治医师,博士,主要从事妊娠期糖尿病及妊娠期肝内胆汁淤积症的研究。 △ 通信作者,E-mail:qian-guanhua@cqmu.edu.cn。

of the control group. The expression of SP-A in AEC II cells in the fetal lung of the GDM group was lower than that of the control group ($P<0.001$). **Conclusion** The morphology and function of AEC II cells in patients with GDM are inhibited, which may lead to neonatal respiratory distress syndrome.

[Key words] gestational diabetes mellitus; AEC II cells; lamellar body; SP-A; SP-C

胚胎肺发育于前肠腹侧内胚层周围被间充质细胞包围,在发育过程中腹侧变成肺上皮细胞,而间充质细胞则变为肺实质。胎肺发育经历 3 个时期:腺状期、小管期和原始肺泡形成期^[1]。宫内环境影响着胎肺发育并引起肺组织形态学改变^[2]。肺组织中肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar epithelial type II cells, AEC II) 有极其重要的作用。肺泡表面活性物质相关蛋白 (surfactant-associated protein, SP), 包括 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D。其中 SP-A 最为丰富,其表达水平的减少与哺乳动物的肺疾病密切相关。

干扰胎儿肺发育的主要因素是妊娠期糖尿病 (GDM) 和早产^[3]。GDM 时,胎肺的发育受到影响,肺成熟延迟,肺泡表面积减少,肺泡表面活性物质减少,肺泡血管通透性增加。GDM 母亲分娩的新生儿容易出现巨大儿、低血糖、先天畸形、高胆红素血症、新生儿呼吸窘迫综合征,疾病的发病率和病死率更高^[4]。而目前 GDM 对胎肺发育的影响尚不清楚。本实验旨在研究 GDM 对胎鼠 AEC II 细胞的影响及意义。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 雌鼠 30 只、SD 雄鼠 10 只,体重约 250~350 g,约 2 月龄,于重庆医科大学实验动物中心无特定病原体 (SPF) 级环境中饲养,适应性喂养 1 周。实验涉及的操作方案均通过重庆医科大学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

链脲佐菌素、油红 O 粉剂、I 型胶原酶购自美国 Sigma 公司;安稳免调血糖仪由三诺生物传感公司生产;兔抗 SP-C 多克隆抗体、兔抗 SP-A 多克隆抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 购自美国 Santa Cruz 公司;即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色剂、0.25% 胰蛋白酶溶液 (不含 EDTA)、DMEM/F12 1:1 液体培养基 (常规)、DMEM/F12 1:1 液体培养基 (含胎牛血清、青霉素、链霉素)、D-Hanks 缓冲液 (不含酚红、不含钙镁) 购自武汉博士德公司;Dnase I 酶、大鼠 IgG 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与处理

将发情的 SD 雌鼠雌雄 3:1 比例合笼,次日

8:00 取雌鼠阴道分泌物,显微镜下发现精子者记为妊娠第 1 天 (D1)。将孕鼠分为对照组和 GDM 组,每组 10 只孕鼠。GDM 组孕鼠给予 1% 链脲佐菌 (Streptozotocin, STZ) 新鲜溶液 (0.1 mol/L、pH 4.4 柠檬酸缓冲液现配) 按 40 mg/kg 行腹腔注射。给药 72 h 后测定尾静脉血血糖值,血糖值大于 15.0 mmol/L 表明建模成功。对照组孕鼠腹腔注射等量柠檬酸缓冲液。每 2 天检测 SD 大鼠血糖及体重变化情况。孕 20.5 d 后剖宫产。

1.3.2 孕鼠和胎鼠血葡萄糖的测定

采集孕鼠眼眶静脉血,抗凝、离心后取血浆,使用葡萄糖测定试剂盒,采用葡萄糖氧化酶法测定。胎鼠取腹主静脉血,测定方法同孕鼠。

1.3.3 胎鼠 AEC II 的分离纯化及原代培养

SD 孕鼠行剖宫产术,取出胎鼠肺组织,D-Hanks 液洗涤后,将胎肺组织剪至细末,再次洗涤。加入消化液 (0.25% 胰蛋白酶 + 0.1% I 型胶原酶溶液 + 0.04 g/L Dnase I 酶溶液), 37℃ 消化,不锈钢网筛过滤,收集细胞,用含 10% 胎牛血清的培养基重悬后,离心,弃上清液,加入 0.1% I 型胶原酶溶液和 0.04 g/L Dnase I 酶溶液,37℃ 再次消化,然后接种在大鼠 IgG 包被的培养皿中贴壁 (第一次贴壁)。未贴壁的细胞接种于 6 孔培养板,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,48 h 后换液,将贴附于培养皿或 6 孔培养板生长的细胞 (第二次贴壁) 采用免疫荧光染色方法进行鉴定。

1.3.4 台盼蓝染色

取接种的 AEC II 细胞悬液 100 μL,加入培养基稀释至 400 μL,再加入 100 μL 的 0.4% 台盼蓝溶液,用血球计数仪计数 400 个细胞,拒染的为活细胞,蓝染的细胞为死细胞,计数活细胞所占百分比。

1.3.5 透射电镜鉴定

分别收集培养皿或 6 孔培养板的 AEC II 细胞,加入 2.5% 戊二醛固定液,沉淀 2 h,用梯度乙醇脱水,用纯丙酮加包埋液 (1:2) 包埋,37℃ 烘箱内固化,切片机切片 (50~60 nm),用 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色。HITACHI-600 透射电镜观察细胞结构。

1.3.6 苏木素-伊红 (HE) 染色

将胎鼠肺组织切片置烤箱烤至溶蜡,切片于二甲苯脱蜡;先后浸泡在 100%、95%、70% 梯度乙醇中;苏木精染色,置于 0.5% 盐酸乙醇数秒后取出,伊红染色,依次在 100%、95% 梯度乙醇中脱水,吸干乙醇,二

甲苯透明,室温过夜,中性树脂封片。

1.3.7 油红 O 染色

胎鼠肺组织冰冻切片($10\ \mu\text{m}$),10%多聚甲醛室温固定 30 min,60%异丙醇浸洗 2 min;油红 O 工作液染色 15 min,60%异丙醇调色,苏木素复染,盐酸乙醇分化,中性树脂封片。

1.3.8 免疫荧光技术检测

第 1 次贴壁和第 2 次贴壁细胞爬片后用 4%多聚甲醛固定,并固定于载玻片上。加入含 0.5% TritonX-100 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤,加入一抗 SP-C(1:50 稀释),4℃孵育过夜。洗涤后加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1:100 稀释),避光 37℃下孵育 30 min。洗涤后加入 DAPI 染色细胞核(1:50 稀释),避光室温下孵育 30 min。洗涤后在荧光显微镜下观察。

1.3.9 免疫细胞化学检测

细胞爬后片用 4%多聚甲醛固定,并固定于载玻片上。加入 0.5% TritonX-100,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤,加入一抗 SP-A(1:50 稀释),4℃过夜。洗涤后加入辣可忍受过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG(1:100 稀释),37℃下孵育 30 min。DAB 显色后,经复染、分化、脱水、封片后在显微镜下观察。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件分析数据,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物模型建立成功

对照组、GDM 组、GDM 组胎鼠、GDM 组胎鼠血糖分别为(4.68 ± 0.45)、(21.68 ± 3.51)、(4.26 ± 0.51)、(17.49 ± 2.63)mmol/L,GDM 组及 GDM 组胎鼠血糖较相应的对照组显著升高($P=0.001$),妊娠期糖尿病大鼠模型成功建立。

2.2 原代培养胎鼠 AEC II 及鉴定

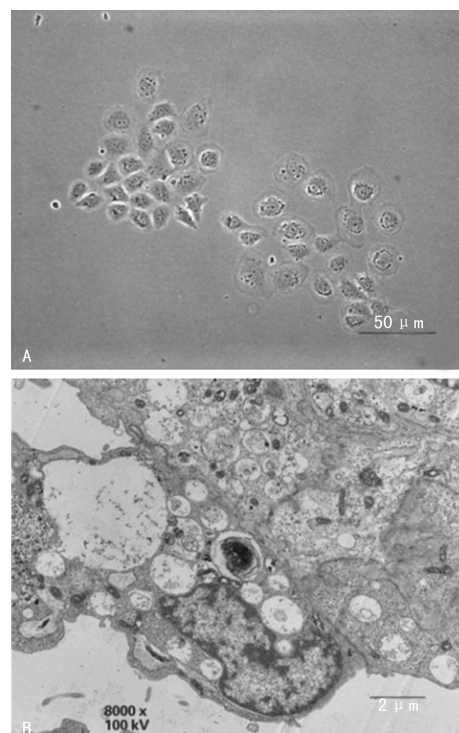
2.2.1 原代培养的胎鼠 AEC II 形态及纯度检测

AEC II 形态为多边形或立方形,细胞质内有较多粗大黑色颗粒,细胞核大,部分细胞核为双核。细胞开始生长呈岛状分布,后细胞融合为片状生长(图 1A)。每 6 只 20.5 d 胎龄的胎鼠肺组织可获得(15 ± 3) $\times 10^6$ 个 AEC II 细胞。通过台盼蓝染色方法检测到接种细胞活力为(95 ± 3)%,细胞的纯度为(98 ± 2)%。透射电镜观察原代培养的 AEC II 细胞,细胞质内见到同心圆状、多层的板层小体,板层小体为黑色,在细胞膜上可见较多微绒毛(图 1B)。

2.2.2 免疫荧光检测 SP-C 在原代培养的 AEC II 中的表达

因 SP-C 蛋白在 AEC II 细胞中为特异性表达,当

细胞表达 SP-C 时,可确定该细胞即为 AEC II。第 1 次贴壁细胞未见绿色的荧光(图 2A),细胞核见蓝色荧光(图 2B),图像合并后未见表达绿色荧光的细胞(图 2C)。第 2 次贴壁细胞细胞质中见绿色的荧光(图 2D),细胞核见蓝色荧光(图 2E),图像合并后见表达绿色荧光的细胞占全部细胞的 98%(图 2F),可见 SP-C 在该细胞有表达,细胞为 AEC II 细胞。



A:AEC II 细胞普通光镜下形态($\times 400$);B:AEC II 细胞透射电镜下形态($\times 8\ 000$)。

图 1 AEC II 细胞形态

2.3 对照组和 GDM 组胎鼠 AEC II 细胞改变

2.3.1 透射电镜观察胎鼠 AEC II 细胞形态改变

透射电镜下可见从对照组胎鼠肺原代培养的 AEC II 表面有丰富微绒毛,细胞内有较多板层小体,而 GDM 组胎鼠肺原代培养的 AEC II 表面微绒毛减少,细胞内板层小体明显减少,见图 3。

2.3.2 AEC II 和 AEC I 细胞数量变化

油镜下见 AEC I 细胞是扁平细胞,其细胞核向表面边缘突起并隔膜。AEC II 细胞由立方体细胞组成,细胞核大,有血管。GDM 组胎鼠肺组织中 AEC II 和 AEC I 细胞数量较对照组胎鼠肺组织降低。AEC II 和 AEC I 细胞数量的比例在对照组胎鼠肺组织和 GDM 组胎鼠肺组织均约为 2:1,见图 4。

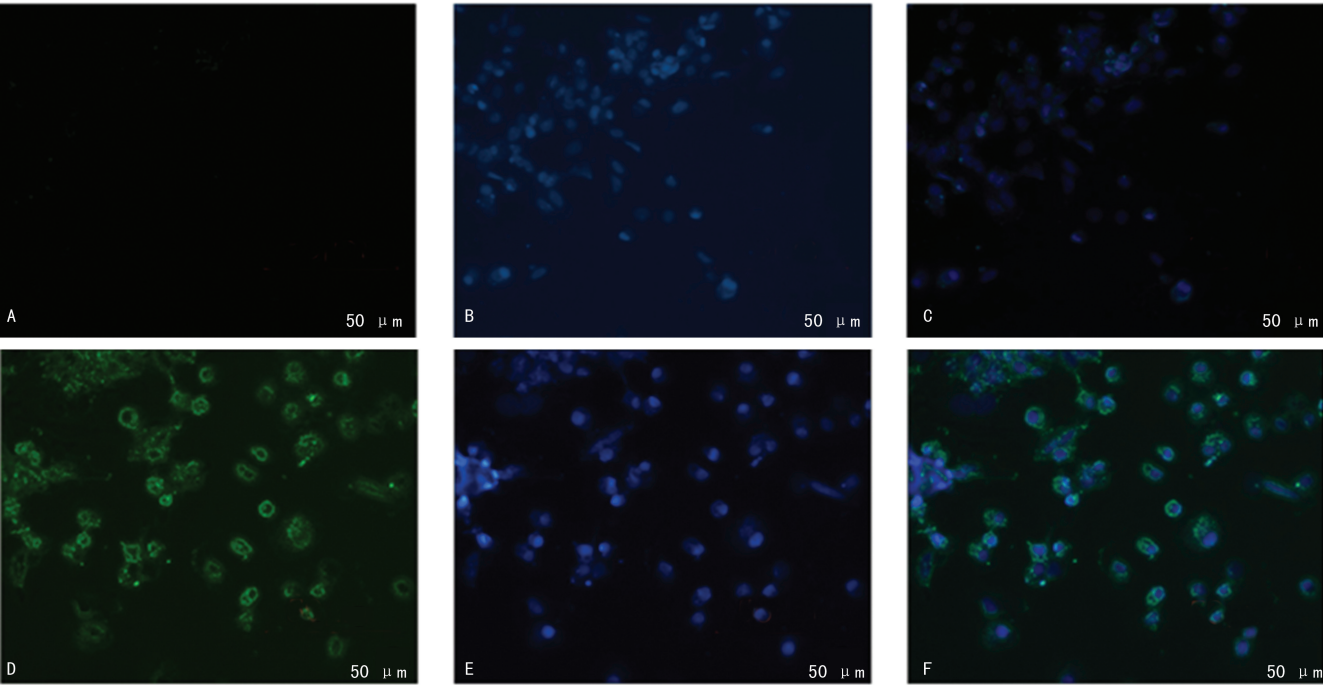
2.3.3 AEC II 细胞中脂滴变化

油红 O 染色 AEC II 细胞,对照组胎鼠肺组织原代培养的 AEC II 细胞中见大量红色脂滴,部分为团状堆积;而从 GDM 组胎鼠肺组织原代培养的 AEC II 细胞中脂滴明显减少,见图 5。

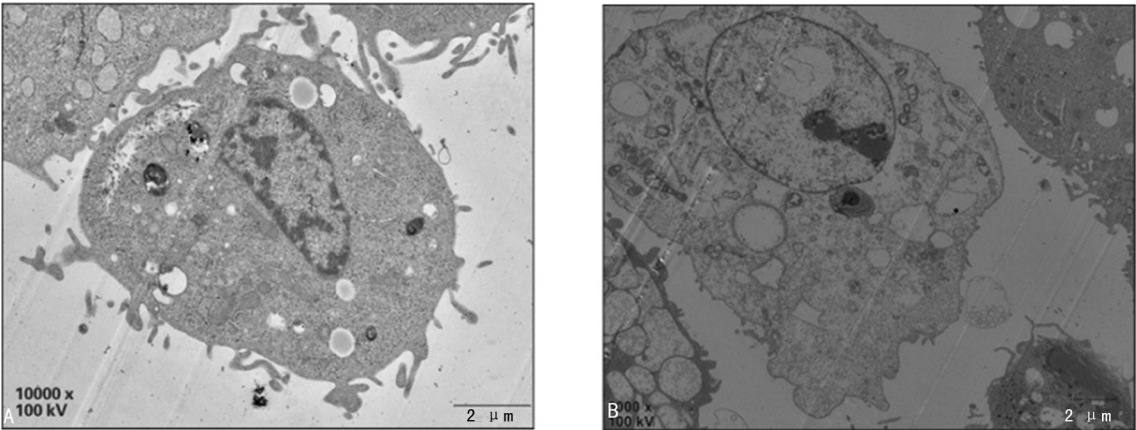
2.3.4 SP-A 在 AEC II 中的表达

对照组胎鼠肺组织原代培养的 AEC II 中 SP-A 表达于细胞质,呈棕黄色,表达水平为 0.85 ± 0.11 , GDM 组胎鼠肺组织原代培养的 AEC II 中 SP-A 表达

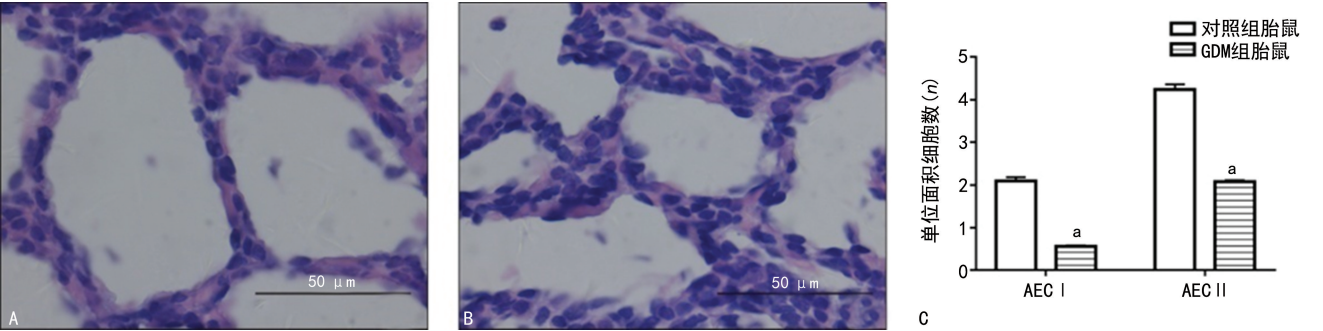
于细胞质,着色较浅,表达水平为 0.37 ± 0.05 (图 6),对照组胎鼠高于 GDM 组胎鼠,差异有统计学意义($P < 0.001$)。



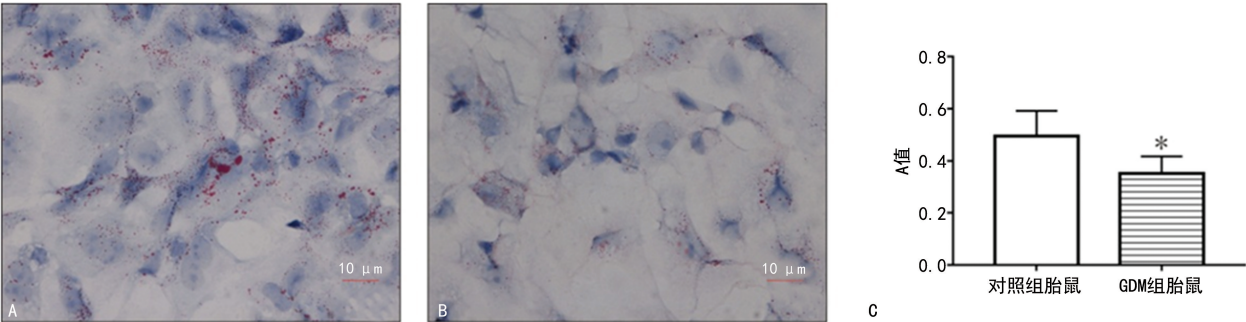
A~C:为第 1 次贴壁细胞;D~F:为第 2 次贴壁细胞。
图 2 贴壁细胞 SP-C 表达(免疫荧光染色,×400)



A: 对照组(×10 000);B:GDM 组(×5 000)。
图 3 透射电镜观察 AEC II 细胞变化

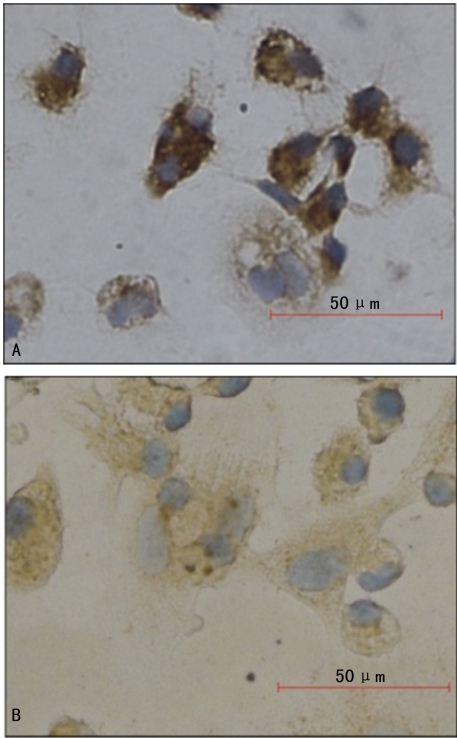


A: 对照组胎鼠;B: GDM 组胎鼠;C:AEC II 和 AEC I 数量;^a:与对照组比较。
图 4 胎鼠肺组织 HE 染色 (×1 000)



A:对照组胎鼠;B:GDM 组胎鼠;C:AECⅡ 脂滴吸光度(A);*: $P<0.05$,与对照组胎鼠比较。

图 5 AECⅡ 油红 O 染色(×400)



A:对照组胎鼠;B:GDM 组胎鼠。

图 6 AECⅡ 细胞 SP-A 表达(免疫细胞化学,×400)

3 讨 论

本研究改进了 AECⅡ 细胞的原代培养方法,采用了两步消化法消化细胞;第 1 次消化时,采用胰蛋白酶、I 型胶原酶、Dnase I 酶对胎肺组织进行消化^[5-6]。第 2 次消化时,仅仅采用 I 型胶原酶和 Dnase I 酶对已收集到的细胞进行再次消化^[7]。该方法减少了对细胞损伤的同时又提高了细胞的产量。纯化过程中,采用 IgG 免疫黏附纯化法的同时,对细胞进行反复贴壁,得到了高产量、高纯度的 AECⅡ 细胞^[8-9]。

AECⅡ 是成人干细胞,在慢性炎症情况下,AECⅡ 能分化成 AECⅠ^[10]。GDM 胎鼠肺组织中 AECⅠ 细胞和 AECⅡ 细胞的总数明显下降,而两者之间的比例未发生改变^[11]。其原因是高血糖可导致大量的 ROS 产生,使胚胎和胎儿中大量的细胞受损^[12-13],使肺泡间质组织和(或)肺泡组织增殖和凋亡出现异常^[14],增加肺泡成纤维细胞的增殖,减少成纤维细胞凋亡,促进肺纤维化,同时限制 AECⅠ 和 AECⅡ 发

育。研究表明高血糖只会增加肺泡间质细胞的存活率,细胞分化处于紊乱状态,大多数细胞处于分化状态,不成熟细胞不能形成典型的结构,例如已分化肺泡的囊状结构^[15]。

AECⅡ 细胞最重要的功能是产生和分泌肺泡表面活性物质。肺泡表面活性物质是复杂的脂类蛋白混合物,其中甘油磷脂约占 80%,胆固醇约占 10%,蛋白约占 10%^[16]。肺泡活性物质主要储存在板层小体内。从 GDM 组胎鼠肺组织中提取的 AECⅡ 细胞,可见板层小体体积变小、数量减少,细胞表面微绒毛减少、消失,该结果表明 GDM 时胎肺的发育出现了延迟,其原因可能是肺糖原磷酸化酶 A 活性在异常增高的血糖环境中受到抑制,进一步阻碍了糖原的降解,胎肺不能利用糖原,最终导致肺泡表面活性物质生产减少。另一方面,肺泡表面活性物质中磷脂主要是由脂质转化而来,油红 O 染色显示 GDM 组胎鼠肺组织 AECⅡ 中脂滴明显减少,这表明妊娠期糖尿病能抑制脂质的合成,进而影响肺泡表面活性物质的产生。免疫细胞化学显示 GDM 组胎鼠肺组织 AECⅡ 中 SP-A 表达明显低于对照组。表明 GDM 组胎鼠肺组织 AECⅡ 因高血糖导致其功能受到抑制,肺泡表面活性物质生成明显减少,从而进一步导致肺泡表面张力增加,使肺泡不能充分扩张,影响新生儿肺气体交换功能和肺功能,导致 GDM 孕妇分娩的新生儿容易出现呼吸窘迫症。

此研究提示在妊娠期将 GDM 患者的血糖控制在正常水平能减少新生儿呼吸窘迫症的发生,所以在临床工作中需要全面严格开展 GDM 的筛查工作及 GDM 的临床治疗指导工作。对孕早期空腹血糖大于或等于 6.1 mmol/L 的孕妇,因按照 GDM 进行管理和治疗。对确诊 GDM 的患者需要进行规范化的治疗,包括控制体重、糖尿病饮食、进行连续低强度的运动及使用胰岛素将血糖控制在合理范围,同时在整个孕期加强对胎儿的监测^[17]。血糖控制满意且不需要胰岛素治疗的 GDM 孕妇,可严密监测血糖至预产期,未自然临产者可积极终止妊娠。妊娠期间需要使用胰岛素治疗并血糖控制满意的 GDM 孕妇,建议在妊娠 38~39 周终止妊娠。血糖控制不满意的 GDM 孕

妇,结合其他高危因素,适时终止妊娠,同时在分娩前可积极采取措施提早预防新生儿呼吸窘迫综合征的发生。在分娩时应密切监测胎心的变化情况;在分娩后密切观察新生儿生命体征并注意是否出现进行性呼吸困难加重。当临床上一旦确诊为新生儿呼吸窘迫综合征应联合机械通气与肺泡表面活性物质治疗,从而减少新生儿并发症的发生^[18]。

本研究在细胞水平发现,GDM 胎鼠肺组织 AEC II 形态发生改变、功能受到抑制。肺泡表面活性物质生成明显减少是 GDM 母亲分娩的新生儿容易发生呼吸窘迫综合征的重要原因,为临床工作需要加强对 GDM 的筛查及规范化治疗和管理,以降低新生儿呼吸窘迫综合征的发生率提供了理论依据。

参考文献

- [1] PAN J,ZHAN C,YUAN T,et al. Effects and molecular mechanisms of intrauterine infection/inflammation on lung development [J]. *Respir Res*,2018,19(1):93.
- [2] BRICELJ K,TUL N,LUCOVNIK M,et al. Neonatal respiratory morbidity in late-preterm births in pregnancies with and without gestational diabetes mellitus [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*,2017,30(4):377-379.
- [3] KIM M,PARK J,KIM S H,et al. The trends and risk factors to predict adverse outcomes in gestational diabetes mellitus:a 10-year experience from 2006 to 2015 in a single tertiary center[J]. *Obstet Gynecol Sci*,2018,61(3):309-318.
- [4] AZAD M B,MOYCE B L,GUILLEMETTE L,et al. Diabetes in pregnancy and lung health in offspring:developmental origins of respiratory disease [J]. *Paediatr Respir Rev*,2017,21:19-26.
- [5] MAO P,WU S,LI J,et al. Human alveolar epithelial type II cells in primary culture [J]. *Physiol Rep*,2015,3(2):e12288.
- [6] KHAN P,FYTIANOS K,TAMÒ L,et al. Culture of human alveolar epithelial type II cells by sprouting[J]. *Respir Res*,2018,19(1):204.
- [7] SHIRAISHI K,NAKAJIMA T,SHICHINO S,et al. In vitro expansion of endogenous human alveolar epithelial type II cells in fibroblast-free spheroid culture [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2019,515(4):579-585.
- [8] KIM K K,DOTSON M R,AGARWAL M,et al. Efferocytosis of apoptotic alveolar epithelial cells is sufficient to initiate lung fibrosis[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(11):1056.
- [9] LEE D F,CHAMBERS M A. Isolation of alveolar type II Cells from adult bovine lung[J]. *Curr Protoc Toxicol*,2019,80(1):e71.
- [10] LAW K P,ZHANG H. The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus:deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China [J]. *Clin Chim Acta*,2017,468:60-70.
- [11] KOSKINEN A,LUKKARINEN H,MORITZ N,et al. Fetal hyperglycemia alters lung structural development in neonatal rat [J]. *Pediatr Pulmonol*,2012,47(3):275-282.
- [12] FLORIS I,DESCAMPS B,VARDEU A,et al. Gestational diabetes mellitus impairs fetal endothelial cell functions through a mechanism involving microRNA-101 and histone methyltransferase enhancer of zester homolog-2 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2015,35(3):664-674.
- [13] MARSEGLIA L,D'ANGELO G,GRANESE R,et al. Role of oxidative stress in neonatal respiratory distress syndrome[J]. *Free Radic Biol Med*,2019,142:132-137.
- [14] HE M Y,WANG G,HAN S S,et al. Negative impact of hyperglycaemia on mouse alveolar development[J]. *Cell Cycle*,2018,17(1):80-91.
- [15] BAACK M L,FORRED B J,LARSEN T D,et al. Consequences of a maternal high-fat diet and late gestation diabetes on the developing rat lung[J]. *PLoS One*,2016,11(8):e0160818.
- [16] VALENCIA G,ROJAS V. Association between antenatal steroids for lung maturation and hypoglycaemia in the first 48 hours in premature infants between 26 and 34 weeks of gestational age [J]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*,2019,25(4):177-182.
- [17] 李宁. 妊娠期糖尿病患者血糖控制情况对妊娠结局的影响[J/CD]. *临床医药文献电子杂志*,2020,7(55):55-56.
- [18] 陈霞,张贝,皇甫佳欣,等. 新生儿呼吸窘迫综合征流行病学特点及影响因素分析[J]. *临床心身疾病杂志*,2020,26(4):158-161.