

基于 GC-MS 的妊娠糖尿病小鼠尿液代谢组学研究

王 彬 陈君君 王 军 苟小军 张若曦

摘 要 **目的** 运用代谢组学考察妊娠糖尿病小鼠机体内源性代谢物的变化。**方法** 采用高脂高糖饲料喂养妊娠小鼠建立妊娠糖尿病小鼠模型,将小鼠分为正常组(NB)、正常饮食妊娠组(NP)、高脂高糖饮食未妊娠组(HB)和妊娠糖尿病模型(HP)组,收集小鼠尿液,应用 GC-MS 的方法检测各组小鼠尿液中代谢物,利用主成分分析法和偏最小二乘-判别分析对各组小鼠尿液进行代谢组学的分析。观察各组间代谢轮廓差异并寻找生物标志物。**结果** 利用主成分分析法和偏最小二乘-判别分析能将样本分开,谱库分析得到 18 种生物标志物。**结论** 基于气相色谱-质谱联用仪的代谢组学可以很好的从内源性代谢物的变化过程反应妊娠糖尿病的发生情况,为妊娠糖尿病的早期诊断提供参考。

关键词 妊娠糖尿病 代谢组学 生物标志物 代谢紊乱

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.019

Urinary Metabonomics Study of Gestational Diabetes Mellitus Rats. Wang Bin, Chen Junjun, Wang Jun, et al. Shanghai Sixth People's Hospital East Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201306, China

Abstract Objective To study the influences and variation of gestational diabetes mellitus rats on endogenous metabolites of urinary in rats by using metabonomic method. **Methods** The pregnant rats were fed on high fat and glucose (HFG) diet to induce gestational diabetes mellitus. Mice were divided into normal group, normal diet without pregnant group, HFG diet without pregnant group and gestational diabetes mellitus group. The urinary samples were underwent preparation, derivation and GC/MS analysis. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed to detect the metabolic profile difference between the four groups. **Results** Through the metabonomic research, 18 biomarkers were found. **Conclusion** Metabonomic study based on GC-MS shows a good recognition of gestational diabetes mellitus rats which will provide reference for early diagnosis of gestational diabetes mellitus.

Key words Gestational diabetes mellitus; Metabonomics; Biomarkers; Metabolic disorders

妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指孕妇在妊娠期首次发生的糖代谢异常情况,往往会引发不良妊娠结局、医疗费用增多和远期 2 型糖尿病易感^[1]。近年来,国内外的 GDM 发生率呈上升趋势^[2]。因 GDM 处于特殊时期,目前还没有较好的治疗方法,早期诊断不仅能够及时的控制病情,又能为防治并发症提供了良机,降低对母儿的危害。探索 GDM 的发病机制,寻找准确、简捷的临床诊断指标成为研究的必要。

然而,GDM 疾病的妊娠特殊时期的复杂特点局

限于体内动态过程的研究,采用复杂科学的方法研究复杂性问题已成为当今医药发展的新趋势^[3]。代谢组学通过考察机体受到刺激后体内低分子代谢物的变化来研究生物体系的一门科学^[4,5]。主要研究反映病理生理等刺激和扰动引发的机体内源性代谢物的变化,在生物标志物发现、疾病早期诊断、发病机制研究、药理药效评价等方面具有极大的优势^[6-12]。气相色谱-质谱(gas chromatography/mass spectrometry, GC-MS)是一种应用广泛的代谢组学分析方法,敏感度高、分离效率高,在色谱分析方面具有明显优势。

因此,本研究采用 GC-MS 技术分析高脂高糖诱导的妊娠糖尿病模型小鼠的尿液,对照高脂高糖喂养的未孕小鼠、正常饮食妊娠小鼠和正常饮食未孕空白小鼠尿液代谢物的变化,筛选差异代谢物并加以鉴定,寻找妊娠糖尿病机体内潜在的代谢变化情况,为妊娠糖尿病的早期诊断的提供参考。

材料与方法

1. 仪器:6890/5975B 型气相色谱/质谱联用仪

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研基金资助项目(20164Y0072);上海健康医学院种子基金资助项目(HMSF-16-22-015);上海市第六人民医院东院院级基金资助项目(院人才 2015012)

作者单位:201306 上海健康医学院附属第六人民医院东院(王彬、陈君君、王军);200233 上海市第六人民医院(王彬、陈君君、王军);201999 上海市宝山区中西医结合医院(苟小军);200437 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院(张若曦)

通讯作者:王彬,电子信箱:wangbing1124@126.com

(美国 Agilent 科技有限公司), DZF-6050 真空干燥箱(上海精宏试验设备有限公司); OneTouch 血糖仪[强生(中国)医疗器材有限公司]; BP211D Sartorius 型电子天平(德国赛多利斯公司); XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); TGL-16B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); 新型大鼠代谢笼(苏州市冯氏实验动物设备有限公司)。

2. 试剂: 甘油三酯试剂盒、胆固醇试剂盒(南京建成生物科技有限公司); 胰岛素 Elisa 试剂盒(美国 Millipore 公司); 甲醇(国药集团化学试剂有限公司); 吡啶(国药集团化学试剂有限公司); 甲氧胺(美国 Sigma-Aldrich 公司); N-甲基三甲基硅基三氟乙酰胺(MSTFA)(美国 Sigma-Aldrich 公司); 超纯水(18.2M Ω)由本实验室 Milli-Q 超纯水系统(法国 Millipore 公司)制备。

3. 动物: 健康 C57BL/6J 小鼠, 20~25g, 雌鼠 32 只, 雄性 16 只, 清洁级, 7~8 周龄, 购自上海灵畅实验动物有限责任公司, 饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房; 饲养条件为 22 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~60%, 光照采用 12h 明暗交替。雌、雄鼠先分笼喂养, 自由进水饮食, 定期更换垫料。

4. 实验分组及造模: 小鼠适应性饲养 1 周后将所有雌鼠随机分为正常饮食未孕(NB)组、正常饮食妊娠(NP)组、高脂高糖饮食未孕(HB)组和妊娠糖尿病模型(HP)组。其中, HP 和 HB 两组给予高脂高糖饲料喂养(高脂高糖饲料专门订制: 15% 猪油、10% 蛋黄、10% 白砂糖、65% 普通实验动物饲料, 苏州双狮实验动物饲料科技有限公司), NP 和 NB 两组给予普通饮食喂养。所有小鼠自由进食饮水, NP 组和 HP 组雌鼠与雄鼠按 1:1 的比例合笼, 次日晨检查阴道栓或阴道分泌物涂片镜检发现精子者记为妊娠 0 天, 标记孕鼠, 计算孕期。

5. 取样及预处理: 分别于妊娠的第 0、10、18 天, 测量体重变化情况并记录, 将 4 组小鼠尾部取血测量空腹血糖。采血结束, 对伤口进行消毒并压迫止血。第 18 天将小鼠分别放入代谢笼, 禁食 12h 后, 收集其尿液以 3000r/min 离心, 将上清移至清洁的 2.5ml EP 管中, 置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。眼球取血, 按试剂盒要求检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、胰岛素(insulin), 并记录数据。取尿液样本室温下解冻摇匀, 取 1.0ml 于离心管中, 12000r/min 离心 10min; 取上清液 200 μ l 于 1.5ml 离心管中, 进行三甲基氯硅烷(TMCS)衍生化

处理, 衍生化完成后, 待进样。

6. 分析条件: 气相色谱条件^[13]: 进样口温度: 260 $^{\circ}$ C; 进样量: 1.0 μ l; 不分流进样, 载气: 高纯氮(99.999%); 流速: 1.0ml/min; 接口温度: 280 $^{\circ}$ C; 色谱柱: DB-5MS 毛细管柱。

7. 质谱条件: 离子源温度: 230 $^{\circ}$ C; 四级杆温度: 150 $^{\circ}$ C, 溶剂延迟: 5min; 电子碰撞电离电压: 70eV, 质谱全扫描范围(m/z): 30~550, 采用全扫描方式。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 14.0 统计学软件进行统计分析, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多样本组间比较采用方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。原始数据经 Agilent MSD 工作站自带软件转化为 NetCDF 格式后, 导入 R 软件采用 XCMS 工具箱处理。经基线校正, 峰辨识, 峰对齐等计算过程, 最终得到一个由指定的峰指数(保留时间-质荷比), 样品名称, 峰面积组成的三维矩阵表, 导入 Simca-P 14.0 软件(Umetrics, Ume, 瑞典)进行多维统计分析。采用变量权重系数(variable importance in projection, VIP) >1 的差异代谢物和单维统计 $P<0.05$ 的代谢物为最终差异代谢物。通过谱库检索和确认的差异性代谢物, 再通过 KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)和 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)数据库检索代谢物代谢通路, 确定代谢通路。

结 果

1. 生化指标: 各组小鼠体重及空腹血糖变化情况见表 1, 各组小鼠的 TG、TC 和胰岛素结果见表 2。由表 1 可知, 妊娠因素导致小鼠体重在 10、18 天变化特别明显。在高脂高糖饮食诱导下, 小鼠体重和血糖均出现升高, 其中, 孕鼠体重在 10、18 天, 血糖在 18 天升高更为明显。随着高脂高糖饮食喂养天数的不断增加, 小鼠体重和血糖也出现逐渐增高的趋势, 在 18 天时血糖平均数值为 5.11mmol/L, 基本上达到妊娠糖尿病成模的标准(空腹血糖 ≥ 5.1 mmol/L)。正常饲料喂养的小鼠妊娠后 18 天与正常对照组的对比, 血糖出现差异有统计学意义($P<0.05$)。由表 2 可知, 普通饮食条件下, 妊娠小鼠胰岛素水平与未孕小鼠差异也有统计学意义($P<0.05$); 排除妊娠因素, 只在高脂高糖饮食诱导后, 小鼠血脂(甘油三酯和总胆固醇)、胰岛素含量均明显升高, 与普通饮食小鼠的总胆固醇、胰岛素水平差异均有统计学意义; 同样, 双重考虑妊娠和高脂高糖饮食影响, 妊娠糖尿病模型小鼠与正常饲养喂养未孕小鼠对照, 总胆固醇和胰岛素水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠的体重及空腹血糖变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)			血糖 (mmol/L)		
		0 天	10 天	18 天	0 天	10 天	18 天
NB 组	8	18.63 ± 0.60	19.05 ± 0.79	19.50 ± 0.89	4.04 ± 0.62	4.15 ± 0.42	4.05 ± 0.45
NP 组	8	18.66 ± 0.63	24.56 ± 0.94 *	30.26 ± 1.68 **	3.88 ± 0.52	3.90 ± 0.45	4.68 ± 0.40 *
HB 组	8	18.49 ± 0.67	19.01 ± 0.76	19.85 ± 0.63	3.95 ± 0.56	4.19 ± 0.29	4.31 ± 0.36
HP 组	8	18.71 ± 0.56	25.45 ± 1.29 **	31.33 ± 1.34 **	4.10 ± 0.54	4.49 ± 0.56	5.11 ± 0.18 **

与 NB 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组小鼠的 TG、TC 和胰岛素变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	胰岛素 (ng/ml)
NB 组	8	1.03 ± 0.15	1.95 ± 0.11	0.90 ± 0.04
NP 组	8	1.09 ± 0.23	2.12 ± 0.21	0.97 ± 0.04 *
HB 组	8	1.01 ± 0.19	2.74 ± 0.37 *	1.06 ± 0.12 *
HP 组	8	1.11 ± 0.25	2.84 ± 0.53 *	1.18 ± 0.12 *

与 NB 组比较, * $P < 0.01$

2. 尿液代谢组学分析: 本研究采用 SIMCA - P 软件对 Masslynx 软件处理 NB、HB、NP 和 HP 4 组数据进行 PLS - DA 分析, PLS - DA 得分图见图 1。建立

的模型解释能力参数 $R^2Y = 0.905$, 预测能力参数 $Q^2 = 0.758$ 。从 PLS - DA 得分图可以看出, 4 组都能达到很好的分离, 以上结果说明不同组别小鼠机体内源性代谢物的含量比较, 差异有统计学意义。根据 PLS - DA 模型的 VIP 值来筛选差异代谢物, 对分类起着关键作用的 $VIP > 1$ 的代谢物进行保留 (图 2), 经 KEGG 数据库鉴定和统计学分析后, 最终确定的内源性代谢物包括氨基酸类、碳水化合物类、不饱和脂肪酸类等。

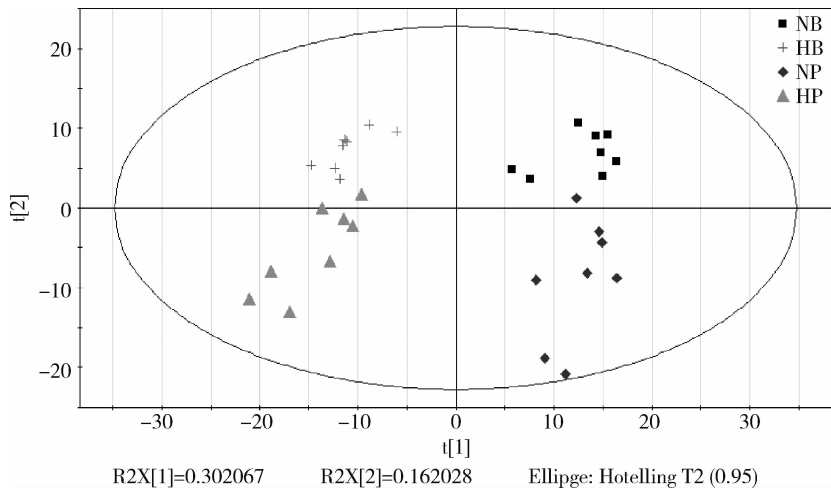


图 1 NB、HB、NP 和 HP 4 组小鼠尿液 PLS - DA 聚类得分图 ($n = 8$)

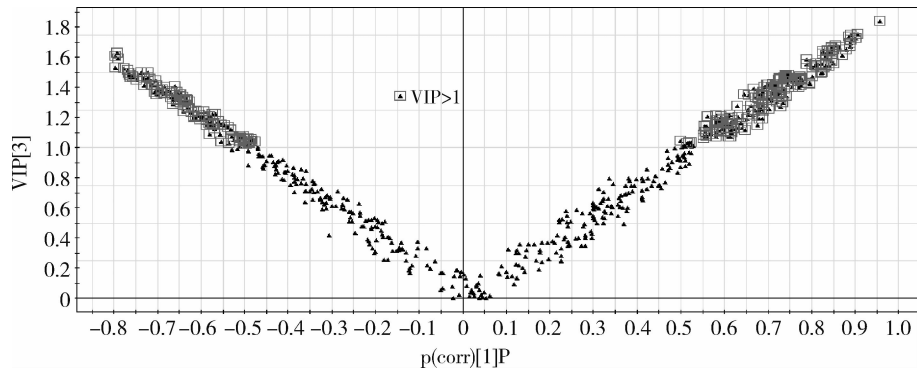


图 2 HP 和 NB 小鼠尿液的 PLS - DA 第一主成分上 V 图

3. 潜在生物标志物的指认:在代谢组学分析过程中,对潜在生物标志物的指认是一个非常重要的过程,也是代谢组学研究中的一个难点。采用 PLS - DA 对 HP 和 NB 两组小鼠尿液数据进一步分析,结果找到 18 个具有明显差异的化合物。在正常饲料喂养的条件下,小鼠妊娠与否的 NP 和 NB 两组小鼠尿液数据进行分析,结果找到 34 个具有明显差异的化合物;在小鼠妊娠的前提下,饮食喂养的 NP 和 HP 两组小鼠的尿液数据进行分析,结果找到 28 个具有明显

差异的化合物。各组之间具有明显差异的生物标志物含量之比见表 3。

4. 代谢通路的构建:将 HP 和 NB 两组具有明显差异的 18 个生物标志物导入 KEGG 数据库,构建与妊娠糖尿病相关的代谢通路,并对所构建的代谢通路进行物质能量代谢归属。代谢差异物指示的代谢通路及归属代谢类型见表 4。本研究显示,与健康机体相比,妊娠糖尿病机体的糖代谢、氨基酸代谢及脂类代谢均发生了一定程度的紊乱。

表 3 鉴定得到不同组别的小鼠尿液差异代谢物

序号	生物标志物	P	fn(NB/HP)	fn(NB/NP)	fn(NP/HP)
1	1 - Amino - 4 - methoxybenzene	0.000	0.015	0.375	4.821
2	D - Lactate	0.000	0.031	0.234	0.203
3	2 - Oxopropanoate	0.000	0.111	0.425	0.260
4	Urea	0.000	0.203	1.343	0.166
5	Pentanedioic acid	0.001	0.235	0.230	0.285
6	2 - Amino - 3 - oxohexanedioic acid	0.000	0.330	0.537	1.000
7	4 - Hydroxybutanoic acid	0.019	0.337	0.551	1.000
8	3 - Oxobutanoic acid	0.000	0.501	1.000	1.000
9	Myo - Inositol	0.004	0.531	1.000	1.000
10	D - Galactose	0.001	0.539	0.456	1.000
11	D - Sorbitol	0.004	0.595	0.687	1.000
12	L - Threonine	0.002	0.623	0.658	1.000
13	Molybdenum	0.012	0.623	0.582	1.000
14	D - Galactonate	0.006	0.714	0.471	1.000
15	L - Fucose	0.015	1.270	0.707	1.000
16	Alanine	0.003	2.001	0.487	4.110
17	D - Arabinose	0.005	3.115	0.560	5.564
18	D - Fructose	0.000	4.018	2.300	0.057

表 4 代谢差异物指示代谢通路及归属

序号	代谢通路	归属代谢类型
1	Butanoate metabolism	Carbohydrate metabolism
2	Fructose and mannose metabolism	Carbohydrate metabolism
3	Pyruvate metabolism	Carbohydrate metabolism
4	Ascorbate and aldarate metabolism	Carbohydrate metabolism
5	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	Carbohydrate metabolism
6	Citrate cycle (TCA cycle)	Carbohydrate metabolism
7	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	Amino acid metabolism
8	Glycine, serine and threonine metabolism	Amino acid metabolism
9	Tyrosine metabolism	Amino acid metabolism
10	Arginine and proline metabolism	Amino acid metabolism
11	Galactose metabolism	Galactose metabolism
12	ABC transporters	membrane transport
13	Glucagon signaling pathway	Endocrine system
14	Insulin resistance	Endocrine and metabolic diseases

讨 论

由于妊娠期时期的特殊性,一些探索性、创新性

研究无法直接在人体上开展,理想的动物模型将对 GDM 的研究提供良好的基础和平台。鉴于 GDM 的

综上所述,本研究发现妊娠糖尿病患者与健康人比较,机体的糖代谢、氨基酸及脂质代谢呈现显著的

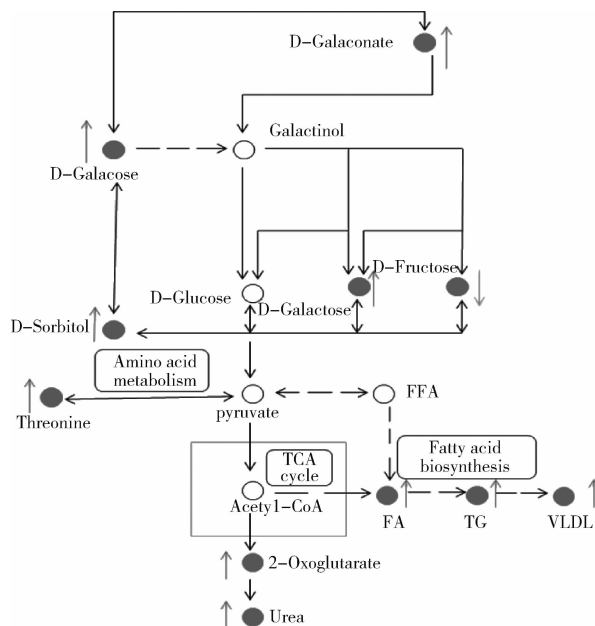


图3 重要差异代谢物在相关代谢通路中的变化

上升趋势。代谢组学作为疾病代谢物特征分析的有效手段,鉴定的差异代谢物有望成为潜在的生物标志物,并为妊娠糖尿病的临床诊断及机制的深入研究提供参考依据。

参考文献

- 1 Halperin IJ, Feig DS. The role of lifestyle interventions in the prevention of gestational diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2014, 14 (1): 452 – 458
- 2 韩欢, 应豪. 妊娠期糖尿病对母儿的影响[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2013, 4 (29): 244 – 246
- 3 Su SB, Yan GL. Exploration of traditional Chinese medicine complexity research [J]. *World Sci Technol Modern Tradit Chin Med*, 2011, 13: 362 – 366
- 4 Junwei F, Wenyu W, Shujun S, *et al.* Metabolomics study of renal fibrosis and intervention effects of total aglycone extracts of *Scutellaria baicalensis* in unilateral ureteral obstruction rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 20 – 29
- 5 Priori R. Metabolomics in rheumatic diseases: the potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy [J]. *Autoimmun Rev*, 2013, 12 (10): 1022 – 1030
- 6 Sato Y, Suzuki Ik, Nakamura T, *et al.* Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53 (3): 567 – 576
- 7 Huynh J, Xiong G, Bentley – Lewis R. A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus [J]. *Diabetologia*, 2014, 57: 2453 – 2464
- 8 Tan Y, Yin P, Tang L, *et al.* Metabolomics study of stepwise hepatocarcinoma genesis from the model rats' to patients: potential biomarkers effective for small hepatocellular carcinoma diagnosis [J]. *Mol Cell*

- Proteomics, 2012, 11(2):694
- 9 Legg K. Metabolomics: gaining insight into pain [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(3): 188-189
 - 10 Bentley-lewis R, Huynh J, Xing G, et al. Metabolomic profiling in the prediction of gestational diabetes mellitus [J]. Diabetologia, 2015, 58(6):1329-1332
 - 11 Patti GJ, Yanes O, Shriver LP, et al. Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin[J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(3): 232-234
 - 12 Scarlet F, Brockmüller. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor stat [J]. J Proteome Res, 2012, 11(2): 850-860
 - 13 Fang J W, Wang W Y, Sun S J, et al. A urine metabonomics study of

chronic renal failure and intervention effects of total aglycone extracts of *Scutellaria baicalensis* in 5/6 nephrectomy rats [J]. RSC Adv, 2015, 92: 75612-75621

- 14 张婕,王琦,杨建军,等. 高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立[J]. 宁夏医科大学学报,2013,35(7):756-762
- 15 陈娇,周佳,韦双双,等. 基于气相色谱-质谱联用技术的痛风病人血清代谢特征分析[J]. 分析测试学报,2016,35(2):137-142
- 16 Vincent AM, Russell J W, Low P, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy[J]. Endocr Rev, 2004, 25(4): 612-628
- 17 和红兵,石先哲,陈静. 气相色谱-质谱和液相色谱-质谱联用方法用于口腔癌代谢组学分析[J]. 色谱,2012,30(3):245-251
(收稿日期:2017-10-25)
(修回日期:2017-11-06)

(上接第 81 页)

- 4 Partridge E, Hanna B, Rintoul N, et al. Brain-type natriuretic peptide levels correlate with pulmonary hypertension and requirement for extracorporeal membrane oxygenation in congenital diaphragmatic hernia [J]. J Pediatr Surg, 2015, 50(2): 263-266
- 5 Dhaun N, Vachieri J, Benza R, et al. Endothelin antagonism and uric acid levels in pulmonary arterial hypertension: clinical associations [J]. J Heart Lung Transplant, 2014, 33(5): 521-527
- 6 Xi Q, Liu Z, Zhao Z, et al. Red blood cell distribution width predicts responsiveness of acute pulmonary vasodilator testing in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. Clin Chim Acta, 2015, 446(2):72-76
- 7 陈比特,陈志斌,陈成,等. 血浆脑钠肽水平对老年慢性阻塞性肺疾病患者肺动脉高压及预后的评估价值[J]. 中国临床保健杂志, 2015, 18(5): 472-475
- 8 魏龙,李峰,秦勇,等. 慢性阻塞性肺疾病并发肺动脉高压与尿酸水平的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(26): 90-93
- 9 Galie N, Humbert M, Vachieri JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)[J]. Euro Heart J, 2016, 37(1): 67-119
- 10 Jasiewicz M, Knapp M, Waszkiewicz E, et al. Enhanced IL-6 trans-signaling in pulmonary arterial hypertension and its potential role in disease-related systemic damage[J]. Cytokine, 2015, 76(2): 187-192
- 11 Zhang C, Ma L, Wang L. Relationship between serum uric acid levels

and ventricular function in patients with idiopathic pulmonary hypertension [J]. Exp Clin Cardiol, 2013, 18(1): e37-39

- 12 Racke K, Fuhrmann M, Juergens U R, et al. Over expression of endothelin-1 (ET-1) in lung fibroblasts (LFb) from patients with pulmonary arterial hypertension (PAH), evidence for loss of inhibitory control[J]. European Respiratory Journal,2016,48(Suppl 60): PA1820
- 13 Xi Q, Wang Y, Liu Z, et al. Red cell distribution width predicts chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients with acute pulmonary embolism in a long-term follow-up [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(9): e191-195
- 14 Kurtul BE, Kabatas EU, Boybeyi SD, et al. Increased red cell distribution width levels in children with seasonal allergic conjunctivitis [J]. Int Ophthalmol, 2017;5(18):1-6
- 15 Föhrhéc Z, Gombos T, Borgulya G, et al. Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state[J]. Am Heart J, 2009, 158(4): 659-666
- 16 Seyhan EC, Özgül MA, Tutar N, et al. Red blood cell distribution and survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Chronic Obstruct Pulmonary Dis, 2013, 10(4): 416-424
- 17 Sincer I, Zorlu A, Yilmaz M B, et al. Relationship between red cell distribution width and right ventricular dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Heart Lung, 2012, 41(3): 238-243
- 18 董蕙,刘华,王小军,等. 红细胞分布宽度、脑钠肽与慢性阻塞性肺疾病并肺动脉高压的相关性研究[J]. 实用老年医学, 2016, 13(5): 436-437

(收稿日期:2017-05-07)

(修回日期:2017-06-27)