

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.10.001

• 基础研究 •

老龄小鼠术后认知功能障碍和肠道菌群失调的关系 *

练新荣¹ 承耀中¹ 董彦鹏¹ 朱倩梅¹ 孙莉^{1,2Δ}

(1 国家癌症中心 / 国家肿瘤临床医学研究中心 / 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院 北京 100021;

2 国家癌症中心 / 国家肿瘤临床医学研究中心 / 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院 广东 深圳 518116)

摘要 目的:评价肠道菌群失调和老龄小鼠术后认知功能障碍的潜在作用机制和关系。**方法:**清洁级健康雄性老龄小鼠 C57BL/6J 20 只, 16-17 月龄, 体重 28-35 g, 采用随机数字表法分为两组: 对照组(A=10 只)和手术组(AS=10 只)。AS 组小鼠行剖腹探查术。术后 48 小时采集小鼠粪便和血清标本, 16S rDNA 测序检测粪便肠道细菌丰度变化, Elisa 法检测血清的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。术后 3 天行 Morris 水迷宫实验。**结果:**与 A 组比较, AS 组小鼠术后逃避潜伏期延长, 空间探索试验在目标象限所花的时间减少($P<0.05$); α 多样性与 β 多样性指数分析两组小鼠粪便肠道菌群的丰富度和多样性发生差异性改变, AS 组的肠道菌群结构中门(6 种)和属(15 种)水平相对丰度的差异较显著($P<0.05$); 两组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平表达对比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**肠道菌群失调改变可能与老龄小鼠术后认知功能障碍的发病机制有关。

关键词: 认知功能障碍; 肠道菌群失调; 16S rDNA 测序**中图分类号:** R-33; Q93-3; R74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)10-1801-05

Relationship between Postoperative Cognitive Dysfunction and Intestinal Dysbacteriosis in Aged Mice*

LIAN Xin-rong¹, CHENG Yao-zhong¹, DONG Yan-peng¹, ZHU Qian-mei¹, SUN Li^{1,2Δ}

(1 National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China; 2 National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital & Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Shenzhen, Guangdong, 518116, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the relationship between postoperative cognitive dysfunction and intestinal flora imbalance in elderly mice. **Methods:** Twenty pathogen-free healthy male mice C57BL/6J mice, aged 16-17 months, weighing 28-35 g, were divided into 2 groups (n=10 each) by random number table method: control group (group A) and operation group (group AS). Exploratory laparotomy was performed in AS group. Fecal and serum samples were collected 48 hours after the operation. The fecal intestinal bacterial abundance was detected by 16S rDNA sequencing. The serum levels of IL-1, IL-6 and TNF- α levels were detected by ELISA. Morris water maze test was performed at 3 days after surgery. **Results:** Compared with group A, the escape latency was significantly prolonged, the time of Probe Trains in the target quadrant was reduced ($P<0.05$). α diversity and β diversity analysis showed that levels of phylum (6 species) and genus (15 species) in as group were significantly changed ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** The intestinal dysbacteriosis may be related to the pathogenesis of postoperative cognitive dysfunction in aged mice.

Key words: Cognitive dysfunction; Intestinal dysbacteriosis; 16s rDNA sequencing**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q93-3; R74 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)10-1801-05

前言

随着人口老龄化社会进展, 认知功能障碍是老年患者术后常见的中枢神经系统并发症。认知功能障碍与患者不良预后相关, 如诱发人格改变、神经错乱、焦虑及记忆力减退等症状, 其

确切发病机制仍不清楚。许多基础实验表明肠道菌群与神经退行性变疾病以及免疫介导的神经系统疾病存在一定的相互作用, 肠道菌群与大脑的双向交流作用, 即是 "微生物 - 肠 - 脑" ("Microbiota-Gut-Brain", MGB)轴^[1]。"微生物 - 肠 - 脑" 轴是整合肠道和大脑之间的神经、内分泌和免疫因素的传递系统, 并

* 基金项目: 深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201812069)

作者简介: 练新荣(1993-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 肠道菌群与认知障碍, E-mail: xiaolian3388@163.com

Δ 通讯作者: 孙莉(1957-), 女, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 麻醉, E-mail: ykzylyssunli@126.com

(收稿日期: 2020-10-28 接受日期: 2020-11-23)

为肠道菌群及其代谢物提供了进入大脑的潜在途径。许多研究表明肠道菌群的缺失或失调会导致宿主记忆受损和学习能力下降,心理障碍如自闭症、抑郁和创伤后应激等^[23]。本研究拟初步评价老龄小鼠术后认知功能障碍与肠道菌群失调的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究已获得国家癌症中心实验动物伦理委员会批准。清洁级健康雄性老龄 C57BL/6 小鼠 20 只,16-17 月龄,体重 28-35 g,采用随机数字表法分为 2 组:对照组(A=10 只)和手术组(AS=10 只)。小鼠购自至善北京健康医学研究院有限公司,饲养于无特殊病原菌环境中,室内温度 22℃± 2℃,12 h 昼/夜交替,自由摄食水和食物。各组分别在不同的笼子中饲养,防止肠道菌群的混合。

1.2 方法

1.2.1 剖腹探查术 根据先前研究方法^[4],小鼠均采用 3%异氟醚诱导麻醉 15 分钟。手术组小鼠用 2%异氟醚+100%氧气维持麻醉,待夹尾实验阴性,翻正反射消失后将小鼠固定于实验台。腹部备皮及安尔碘溶液消毒后,在剑突下经沿腹正中线上作长约 4 cm 的切口,依次切开皮肤、腹部各层及腹膜,暴露腹腔。用探针依次探查肝脏、脾脏、胃和肠。每次探查 2 min,间歇 3 min 后进行下一次探查,手术时间 15 min,整个手术过程严格遵守无菌操作。使用 4-0 缝线依次逐层缝合腹膜、腹壁肌层及皮肤。用安尔碘溶液消毒缝合的皮肤,术后将利多卡因乳膏涂于切口疼痛处。最后把小鼠放回由 2%异氟醚+100%氧气组成的透明丙烯酸麻醉箱,继续接受 2 小时麻醉。使用热毯将小鼠的直肠温度维持在 37± 0.5℃。对照组小鼠则置于 100%氧气透明丙烯酸麻醉箱中接受同样 2 小时麻醉。实验完成后将小鼠放回各自的笼子,并随时提供食物和水。

1.2.2 水迷宫实验 所有小鼠术后 3 天开始 Morris 水迷宫训练测试,于每天下午同一时间进行。水迷宫系统(Noulds, Etho-Vision14.0, 荷兰)为直径 120 cm、高 40 cm 的圆形水池,池内水深高度 35 cm(保持水温 22℃± 1℃),在第四象限内放一个直径为 10 cm 的平台,低于水面 1 cm。水池中加入白色染料拌匀,训练期间平台位置和水池周围参照物保持不变。术后 3 天开始,连续进行 5 天的四个象限水迷宫训练测试。每天分别从四个象限的固定点将小鼠面向池壁放入,其游泳图像经水池上方处摄像机自动拍摄,并连接于路径追踪系统进行采集轨迹信息。小鼠每次游泳时限为 60 s,如在 60 s 内未找到平台者系统自动停止记录,潜伏期记为 60 s,并由测试者引导小鼠上平台,休息 30 s 后进行下一次训练。直到训练完成后的第 8 天,撤走水下平台,行空间探索试验:从第二象限将小鼠头部面向池壁

放入水中,记录其在目标象限内(第四象限)所花的时间。

1.2.3 粪便标本采集与测序 术后 48 h 从小鼠肛门收集新鲜粪便,装入 2.0 mL 离心管,立即放进 -80℃冰箱低温保存^[5]。

DNA 提取与检测 小鼠粪便标本统一寄到杭州联川生物信息技术有限公司实验室进行检测。使用 E.Z.N.A.® Stool DNA Kit 试剂盒进行微生物 DNA 提取,通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量,采用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。全部 DNA 提取完成后,进行 PCR 扩增和 Illumina NovaSeq 平台高通量测序。

PCR 扩增及 16S rDNA 测序 通过引物 341F(5'-CC-TACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R(5'-GACTACHVGGGT-ATCTAATCC-3')对细菌 16S rDNA 基因序列(V3-V4 区)进行 PCR 扩增。扩增试剂:Phusion Hot start flex 2× Master(12.5 μL), Forward primer(2.5 μL), Reverse primer(2.5 μL), Template DNA (50ng), ddH₂O(25 μL)。扩增程序:98℃初始变性 30 s;98℃变性 10 s,54℃退火 30s,持续 32 个循环;72℃延伸 45 s;接着 72℃延伸 10 min,最后 4℃终止。PCR 产物由 AMPure XT bead 纯化和 Qubit 定量后,进行 Illumina NovaSeq 平台测序。

生物信息学分析 使用 FLASH 软件对 16S rDNA 数据原始双端序列进行拼接,并根据 fqtrim(v0.94) 对拼接后数据进行质量过滤,Vsearch 软件进行嵌合序列过滤,以获得高质量的 clean 标签。利用 DADA2 进行后续分析,得到特征表和特征序列。最后与 SILVA(release 132) 数据库进行比对得到注释信息。采用 QIIME2 软件计算 α 多样性主要指数,包括 Chao1、Shannon、Simpson。β 多样性分析策略基于所有样本的加权和非加权 UniFrac 距离,进行 PCoA 聚类分析画图。

1.2.4 ELISA 法 采集小鼠全血标本于血清分离管中,室温放置 2 小时,1000× g 离心 20 分钟,取上清液。严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测血清的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析和制图。正态分布的计量资料采用均数± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。肠道菌群门、属水平的相对丰度比较采用 Wilcoxon rank-sum 检验,根据 Bonferroni 法采用 FDR 修正 P 值。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫检测

与对照组 A 比较,手术组 AS 小鼠的术后逃避潜伏期延长,目标象限所花的时间减少(P<0.05);两组的平均运动速度比较差异无统计学意义(P>0.05);见表 1。

表 1 两组小鼠 Morris 水迷宫实验各指标的比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 Indexes of Morris water maze test of the two groups(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Average speed (cm/s)	Escape latency(s)	Time in the target quadrant (s)
AS	19.42± 3.30	35.45± 13.54 ^a	15.45± 1.95 ^a
A	20.52± 3.00	26.71± 12.14	26.09± 3.27

Note: compared with the A group, ^aP<0.05.

2.2 16S rDNA 检测

本研究检测 20 个粪便标本, 根据 97% 的序列相似性聚类, 划分出 A 组 2035 个 OTU, AS 组 1273 个 OTU, 807 个 OTU 为 2 组所共有。 α 多样性是指一个特定环境或生态系统内的多样性, 主要用来反映菌群物种的丰富度和均匀度以及测序深度。 α 多样性包括: Chao1、Shannon、Simpson 指数。Chao1 指数主要反映样本中菌群的物种丰富度信息; Simpson/Shannon 主

要综合体现菌群物种的丰富度和均匀度。 α 多样性指数分析, 两组的 Chao1、Shannon 以及 Simpson 指数表明两组之间具有可比性。见图 1。

为评估菌群之间的相似程度, 使用基于 UniFrac 的 PCoA 分析方法计算 β 多样性值, 并进行 PCoA 分析。PCoA 分析可以展示肠道菌群在不同环境下的相似性和差异性。结果分析, AS 组与 A 组的个体存在显著的差异 ($P < 0.05$)。见图 2。

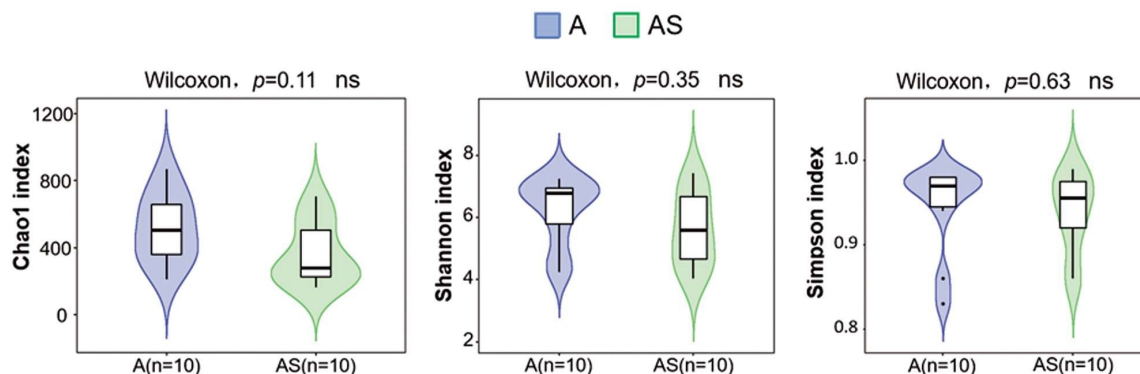


图 1 肠道菌群 α 多样性指数比较

Fig.1 Comparison of the α -Diversity between different groups

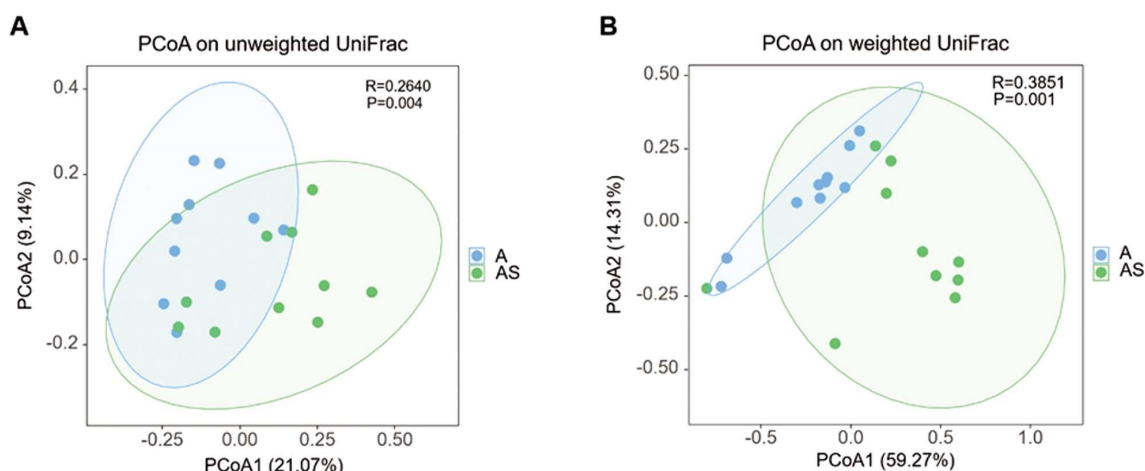


图 2 基于 UniFrac 距离的 PCoA 分析

Fig.2 PCoA analysis based on UniFrac distance

Note: A: PCoA on unweighted UniFrac, $n=10$, $P < 0.05$; B: PCoA on weighted UniFrac, $n=10$, $P < 0.05$.

进一步比较两组的肠道菌群门(phylum)和属(genus)水平。结果显示两组肠道菌群门水平的相对丰度比较, AS 组的梭杆菌门(Fusobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)比例增加, 而柔壁菌门(Tenericutes)、厚壁菌门(Firmicutes)、杆菌门(Deferribacteres)比例降低。此外, 与 A 组相比, AS 组的菌群组成在属水平上也发生了明显变化。AS 组的埃希氏菌-志贺氏菌属(Escherichia-Shigella)、梭杆菌属(Fusobacterium)相对丰度比例增加, 而瘤胃菌属(Ruminococcaceae_UCG-013)、普雷沃氏菌科 UCG-003 (Prevotellaceae_UCG-003)和链(状)球菌属(Streptococcus)等相对丰度比例降低。见图 3。

2.3 血清炎症因子水平检测

研究表明外科手术不仅能增加外周血炎症因子水平, 也能诱发中枢神经系统(CNS)的炎症反应^[6]。本研究采用 Elisa 法检测两组小鼠的血清炎症因子水平变化。与 A 组相比, AS 组的

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 无明显变化, 两组的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 见表 2。

3 讨论

本研究参照文献^[4]的方法, 在异氟醚麻醉下进行简单的剖腹探查手术。Morris 水迷宫是评价啮齿类动物空间认知功能的常用方法。研究结果显示, 老龄小鼠术后的逃避潜伏期延长, 空间探索试验的目标象限所花时间减少, 提示老龄小鼠术后认知功能障碍模型制备成功。

肠道菌群在大脑发育和脑功能中发挥着重要作用, 可作为宿主个体认知和功能行为学异常的驱动力^[7]。本研究中的手术组(AS)术后肠道菌群门(6 种)和属(15 种)水平发生了显著的改变。在肠道菌群门水平上, AS 组的柔壁菌门(Tenericutes)、厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度比例减少, 与先前的动物模型研

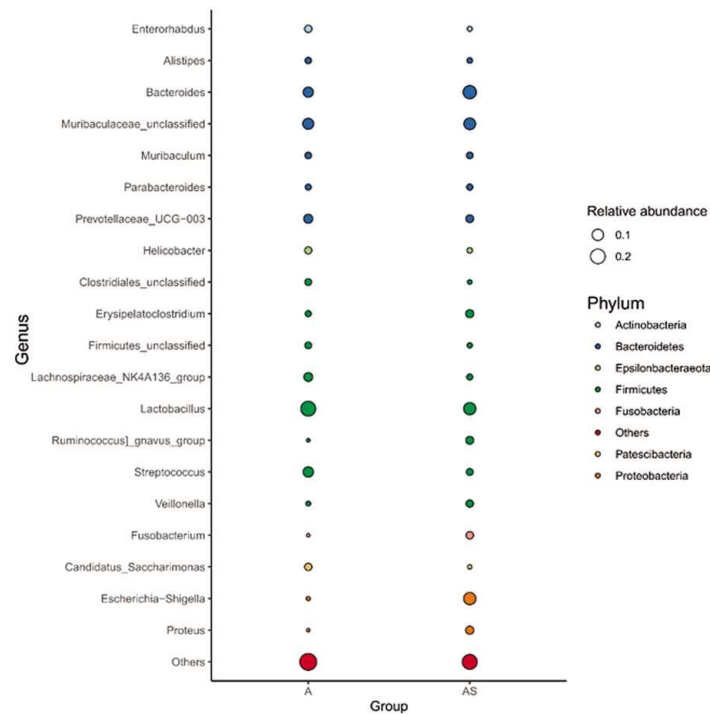


图3 肠道菌群门(phylum)和属(genus)水平比较

Fig.3 Comparison of phylum and genus between different groups

Note: compared with group A; $P < 0.05$.

究,老年小鼠胫骨骨折手术 POCD 模型的研究结果相似^[8]。AS 组的变形菌门(Proteobacteria)比例增加,据相关研究报道 Proteobacteria 与免疫失调和炎症反应有关,是疾病状态下肠道菌群失调的微生物特征^[9]。在肠道菌群属水平上,AS 组的埃希氏菌 - 志贺氏杆菌属 (Escherichia-Shigella)、梭杆菌属 (Fusobacterium) 相对丰度比例增加。某研究表明志贺氏杆菌 (Shigella) 与促炎状态相关,利用人肠道 α - 防御素 5 提升自身的粘附能力,以促进对宿主的感染^[10]。且具有粘附性 / 侵袭性的埃希氏菌 (Escherichia) 对宿主的持续感染,可导致宿主慢性和持续的周围炎症状态^[11]。另外,Escherichia 通过 NLRP3 炎症小体依赖机制,诱导促炎细胞因子的产生释放^[12]。横向研究表明,与淀粉样

蛋白阴性的认知能力完好者相比,淀粉样蛋白阳性的认知障碍者的粪便样本中,大肠杆菌和志贺氏菌类群有所增加。与健康比较,介导炎症相关微生物的埃希氏菌 (Escherichia) 和志贺氏菌 (Shigella) 在阿尔茨海默病患者的粪便样本中有所增加,与认知障碍和脑淀粉样变患者的外周炎症状态有关,这表明肠道菌群的失调与全身性炎症之间存在紧密地联系,最后可能导致全身性炎症引发或加剧阿尔茨海默病患者脑神经的退化^[13]。有趣的是,根据上述研究结果发现,手术对肠道菌群的属水平改变具有选择性的影响,某些条件性致病菌的增多或缺失可能是 POCD 的发病机制,具有重要的临床诊断和治疗参考意义。

表2 两组小鼠血清的炎症因子表达水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Serum proinflammatory markers of the two groups($n=10, \bar{x} \pm s$)

Proinflammatory factors	A	AS	P value
IL-6 (pg/mL)	10.36 $\pm$ 0.66	11.25 $\pm$ 1.28	0.08
IL-1 β (pg/mL)	12.46 $\pm$ 1.36	13.34 $\pm$ 1.02	0.14
TNF- α (pg/mL)	54.77 $\pm$ 7.91	58.20 $\pm$ 3.89	0.26

MGB 交流的最重要和研究最深入的特征之一是细菌产生和直接响应多种神经化学物质的能力,这些神经化学信号可以通过肠 - 脑轴的生化 and 结构途径传播到大脑^[14]。特别是肠道菌群与下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴(HPA)紧密相连,HPA 是肠道菌群影响大脑发育和认知功能(包括学习和记忆)的主要神经内分泌系统。研究表明通过控制饮食、感染、压力和运动对肠道菌群的作用,宿主 HPA 激活机体系统释放改变胃肠道功能的多种神经内分泌激素,如去甲肾上腺素(NE)和多巴胺,引起肠道菌群组成的改变,导致肠道通透性、运动性和粘液生成增加的过

程;相反,各种细菌成份的易位和相互作用诱导神经炎症反应过程,通过释放促炎细胞因子和前列腺素等强激活因子导致 HPA 轴的激活,增加了肠道菌群与大脑的免疫 - 神经内分泌相互作用的复杂性^[15,16]。此外,肠道菌群的衍生代谢物包括短链脂肪酸(SCFA),三甲胺,氨基酸衍生物和维生素具有基本的代谢和信号传导功能,可以调节宿主体内包括血脑屏障(BBB)的完整性和大脑功能的平衡^[17]。

本研究存在一些局限性。(1)粪便采集时间是在术后 48 小时进行,如更全面地了解肠道菌群的动态变化,应该在术后多

时点更频繁取样检测。(2)该研究对象是术前基线状况健康的小鼠,可能不太适用于具有高代谢紊乱风险基础疾病的动物模型或者人类。总的来说,肠道菌群虽然在POCD的发病机制中具有潜在的作用,但未来鉴别和筛选关键条件致病菌,挖掘菌群代谢活性物质的功能特征和潜在价值是至关重要的。

综上所述,老龄小鼠麻醉手术后可介导肠道菌群失调变化,可能是术后认知功能障碍的发病机制,具有重要的研究潜在价值。

参考文献(References)

- [1] Collins, S.M., M. Surette, P. Bercik. The interplay between the intestinal microbiota and the brain [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10: 735-742
- [2] Cryan, K.J., O'Riordan, K. Sandhu, et al. The gut microbiome in neurological disorders[J]. *The Lancet Neurology*, 2020, 19: 179-194
- [3] Smith, L.K. E.F. Wissel. Microbes and the Mind: How Bacteria Shape Affect, Neurological Processes, Cognition, Social Relationships, Development, and Pathology [J]. *Perspect Psychol Sci*, 2019, 14: 397-418
- [4] Xu, Z., Y.I Dong, H. Wang, et al. Age-dependent postoperative cognitive impairment and Alzheimer-related neuropathology in mice [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3766
- [5] Wilck, N., M.G Matus, S.M Kearney, et al. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease [J]. *Nature*, 2017, 551: 585-589
- [6] Terrando, N., L.I Eriksson, J.K Ryu, et al. Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline [J]. *Ann Neurol*, 2011, 70: 986-995
- [7] Davidson, G.L., A.C Cooke, C.N Johnson, et al. The gut microbiome as a driver of individual variation in cognition and functional behaviour [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018, 373 (1756): 20170286
- [8] Zhan, G., D.y Hua, N.n Huang, et al. Anesthesia and surgery induce cognitive dysfunction in elderly male mice: the role of gut microbiota [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 1778-1790
- [9] Shin, N.R., T.W. Whon, J.W. Bae. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33: 496-503
- [10] Xu, D., C.b Liao, B. Zhang, et al. Human Enteric alpha-Defensin 5 Promotes Shigella Infection by Enhancing Bacterial Adhesion and Invasion[J]. *Immunity*, 2018, 48: 1233-1244 e6
- [11] Small, C.L., S.A. Reid-Yu, J.B McPhee, et al. Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1957
- [12] De la Fuente, M., L.g Franchi, D. Araya, et al. *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304: 384-392
- [13] Sun, M.F., Y.L. Zhu, Z.L. Zhou, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF-alpha signaling pathway[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 70: 48-60
- [14] Bruce-Keller, A.J., J.M. Salbaum, H.R. Berthoud. Harnessing Gut Microbes for Mental Health: Getting From Here to There[J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83: 214-223
- [15] Farzi, A., E.E. Frohlich, P. Holzer. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15: 5-22
- [16] de Punder, K. L. Pruimboom. Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 223
- [17] Parker, A., S. Fonseca, S.R. Carding. Gut microbes and metabolites as modulators of blood brain barrier integrity and brain health[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11: 135-157
- [18] Zhan, G., D.y Hua, N.n Huang, et al. Anesthesia and surgery induce cognitive dysfunction in elderly male mice: the role of gut microbiota [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 1778-1790
- [19] Shin, N.R., T.W. Whon, J.W. Bae. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33: 496-503
- [20] Xu, D., C.b Liao, B. Zhang, et al. Human Enteric alpha-Defensin 5 Promotes Shigella Infection by Enhancing Bacterial Adhesion and Invasion[J]. *Immunity*, 2018, 48: 1233-1244 e6
- [21] Graziano Di Cianni, Emilia Lacaria, Cristina Lencioni, et al. Preventing type 2 diabetes and cardiovascular disease in women with Gestational Diabetes - the evidence and potential strategies[J]. *Diabetes Res & Clin Pract*, 2018, 145(6): 184-192
- [22] Alex Y Wang, Kei Lui, Zhuoyang Li, et al. Neonatal outcomes of live-born term singletons in vertex presentation born to mothers with diabetes during pregnancy by mode of birth: a New South Wales population-based retrospective cohort study[J]. *Bmj Paediatr Open*, 2018, 2(1): 24-31
- [23] Feng, Ru, Liu, Lu, Zhang, Yuan-Yuan, et al. Unsatisfactory Glucose Management and Adverse Pregnancy Outcomes of Gestational Diabetes Mellitus in the Real World of Clinical Practice: A Retrospective Study[J]. *Chin Med J*, 2018, 131(9): 1079-1085
- [24] Bharti Kalra, Yashdeep Gupta, Rajiv Singla, et al. Use of Oral Anti-Diabetic Agents in Pregnancy: A Pragmatic Approach [J]. *N Am J Med Sci*, 2015, 7(1): 6-12
- [25] Yumei Wei, Huixia Yang. Perspectives on diagnostic strategies for hyperglycemia in pregnancy - dealing with the barriers and challenges in China[J]. *Diabetes Res & Clin Pract*, 2018, 145(6): 84-87
- [26] Marie-Victoire Sénat, Helene Affres, Alexandra Letourneau, et al. Effect of Glyburide vs Subcutaneous Insulin on Perinatal Complications Among Women With Gestational Diabetes: A Randomized Clinical Trial[J]. *Jama*, 2018, 319(17): 1773-1780
- [27] Denney J M, Quinn K H. Gestational Diabetes: Underpinning Principles, Surveillance, and Management [J]. *N Am J Med Sci*, 2018, 45(2): 299-314
- [28] Iva Sklempe Kokic, Marina Ivanisevic, Tomislav Kokic, et al. Acute responses to structured aerobic and resistance exercise in women with gestational diabetes mellitus [J]. *Scandi J Med & Sci Sport*, 2018, 28(7): 1793-1800
- [29] Ornaghi S, Algeri P, Todyrenchuk L, et al. Impact of excessive pre-pregnancy body mass index and abnormal gestational weight gain on pregnancy outcomes in women with chronic hypertension [J]. *Jama*, 2018, 12(6): 90-95
- [30] Brian M Casey, Elaine L Duryea, Mina Abbassi-Ghanavati, et al. Glyburide in Women With Mild Gestational Diabetes: A Randomized Controlled Trial[J]. *Obs & Gyn*, 2015, 126(2): 303-309