的改善[15]。

综上，基于糖尿病视网膜病变围术期敏感指标体系的干预，可有效控制患者血糖，提高患者配合度，促进视力恢复，减少并发症，并提高患者对服务的满意度，提升整体服务质量。

参考文献

[1] WADHWANI M，BALI S，BHARTIYA S，et al. Long term effect of panretinal photocoagulation on retinal nerve fiber layer parameters in patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. Oman J Ophthalmol，2019，12(3)：181-185.

[2] KIM J S，KIM J Y，KIM K T，et al. Near reading speed changes after panretinal photocoagulation in diabetic retinopathy patients：a prospective study using an iPad application for the measurement of reading speed[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol，2019，257(12)：2631-2638.

[3] 钱丽珍. 293 例糖尿病视网膜病变激光光凝术的综合护理及效果[J]. 皖南医学院学报，2017，36(6)：606-608.

[4] 沈美萍，陈朔晖，刘鑫鑫，等. 以 Donabedian 结构-过程-结果理论构建儿科护理敏感性质量指标评价体系[J]. 中国实用护理杂志，2018，34(26)：2035-2041.

[5] 周婉瑜. 糖尿病性视网膜病变[M]. 上海：科学技术文献出版社，2011：18.

[6] ISHIBAZAWA A，DE PRETTO L R，ALIBHAI A Y，et al. Retinal nonperfusion relationship to arteries or veins observed on widefield optical coherence tomography angiography in diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2019，60(13)：4310-4318.

[7] FUJIWARA Y，IWASE T，YAMAMOTO K，et al. Effect of intravitreal or sub-tenon triamcinolone acetonide injection at completion of vitrectomy on peripheral retinochoroidal thickness in eyes with proliferative diabetic retinopathy[J]. Sci Rep，2019，9(1)：171.

[8] FALLATAH M O. Knowledge，awareness，and eye care-seeking behavior in diabetic retinopathy：a cross-sectional study in Jeddah，Kingdom of Saudi Arabia[J]. Ophthalmol Ther，2018，7(2)：377-385.

[9] 王玲，徐静，刘君颖，等. 构建生殖中心辅助生育治疗患者护理质量评价指标体系[J]. 中国实用护理杂志，2019，35(7)：544-548.

[10] 富晶晶，杨艳，贾芸，等. 糖尿病住院患者护理质量评价指标体系的构建[J]. 护理学杂志，2019，34(12)：34-37.

[11] 葛修茹，彭韫丽，张翠翠. 专科护理质量指标管理在失代偿期乙肝肝硬化患者中的应用[J]. 中华现代护理杂志，2017，23(23)：3037-3040.

[12] 李小银，黄天雯，杨云英，等. 肿瘤内科护理质量评价关键指标在专科护理质量持续改进中的应用[J]. 中国实用护理杂志，2018，34(36)：2847.

[13] 李莉，朱伟斌，孙丽娟. 护理质量敏感指标在烧伤患者中的应用评价[J]. 中国实用护理杂志，2019，35(7)：492-496.

[14] 宦红美，金小芹，张艳. 护理质量敏感指标在神经内科老年住院患者安全管理中的应用研究[J]. 中国实用护理杂志，2019，35(7)：501-505.

[15] 卢素芬，曾素华，黄玩英，等. 眼科住院患者临床护理质量评价指标体系的构建与实施[J]. 中国实用护理杂志，2016，32(31)：2444-2448.

（收稿日期：2021-12-26　修回日期：2022-04-28）

· 临床探讨 ·　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.024

不同浓度游离脂肪酸对 HA-VSMC 增殖活性的影响*

杨兴文[1]，马小芳[2△]，李德红[1]，颜　丽[1]，袁秀梅[1]，杨晓燕[1]，杨　阳[1]，司玉春[1]

1. 甘肃省人民医院检验中心，甘肃兰州 730000；2. 兰州大学第一医院麻醉手术科，甘肃兰州 730000

摘　要：目的　探讨不同浓度的游离脂肪酸（FFA）对人主动脉血管平滑肌细胞（HA-VSMC）增殖活性的影响。**方法**　体外培养 HA-VSMC，采用不同浓度的 FFA（25、50、100、200、300、400、500、600 μmol/L）处理 HA-VSMC 24、48 h，同时以未经处理的 HA-VSMC 作为对照组；通过倒置显微镜观察细胞形态学变化，用 MTT 法和 EdU 荧光染色法两种方法检测 FFA 对 HA-VSMC 存活率和增殖活性的影响。**结果**　100、200 和 400 μmol/L 组较对照组 HA-VSMC 存活率和增殖活性均明显增强；500、600 μmol/L 组较对照组 HA-VSMC 存活率和增殖活性均明显减低；各实验组中 400 μmol/L 组 HA-VSMC 存活率和增殖活性最强。**结论**　低浓度的 FFA（≤400 μmol/L）能诱导 HA-VSMC 增殖，且有时间和剂量依赖性。

关键词：游离脂肪酸；　人主动脉血管平滑肌细胞；　存活率；　增殖

中图法分类号：R543　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2022)22-3119-05

游离脂肪酸（FFA）又称非酯化脂肪酸，大部分　FFA 与清蛋白结合存在于血液中，正常情况下血清

*　**基金项目：**甘肃省人民医院青年基金资助项目（20GSSY4-4）。

△　**通信作者**，E-mail：857036290@qq.com。

FFA 含量很少。血清中 FFA 水平与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关。在某些病理状态（如糖尿病、代谢综合征和脂代谢紊乱）下，血清 FFA 水平升高。过高的 FFA 水平引起的高 FFA 血症与代谢综合征、动脉粥样硬化、急性冠脉综合征、心力衰竭等疾病的发生和发展显著相关[1]。FFA 是导致氧化应激的物质之一[2]，其水平升高引起的氧化应激是心血管疾病尤其是糖尿病大血管病变的主要原因。有研究发现，FFA 通过多种途径诱导血管内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞（VSMC）增生，促进血管疾病的发生发展[3-4]。本研究通过培养的人主动脉血管平滑肌细胞（HA-VSMC），了解不同浓度 FFA 和不同作用时间对 HA-VSMC 增殖活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 正常 HA-VSMC 购买自美国 ATCC 细胞库；胎牛血清购买自杭州四季青生物公司；DMEM 培养基、棕榈酸和 MTT 试剂购买自美国 Sigma 公司；0.25％胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液（PBS）购买自北京索莱宝生物公司；无游离脂肪酸胎牛血清清蛋白购买自上海生工生物公司；5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷（EdU）荧光染色试剂盒购买自广州锐博生物公司；DMSO 购买自碧云天生物公司。Thermo® RMK3 型酶标仪购买自上海普林斯顿生物科技发展有限公司；RIX71-A12FL/PH 型荧光倒置显微镜购买自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 HA-VSMC 的体外培养 将 HA-VSMC 接种于含 10％胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基的 100 mm 细胞培养皿中，于 37 ℃、50％CO_2 饱和湿度条件下培养，根据细胞生长状况每 1～2 天更换培养液 1 次，当细胞在对数生长期时，用于实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 （1）0.25％胰蛋白酶消化对数生长期的 HA-VSMC；（2）PBS 吹打，收集于 15 mL 离心管中以 1 000 r/min 离心 5 min；（3）弃去 PBS 后加入含 10％胎牛血清的 DMEM 培养液吹打成单细胞悬液后细胞计数；（4）以 1.4×10^5 个/毫升密度接种于 96 孔板，空白组只加培养液和 DMSO，对照组和实验组加培养液、MTT、DMSO，每组设 5 个复孔，待细胞贴壁后，在实验组中加含不同浓度 FFA（25、50、100、200、300、400、500、600 μmol/L）的 DMEM 完全培养液孵育 24、48 h；（5）每孔加 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液后继续孵育 4 h，弃培养液，每孔加 150 μL DMSO，振荡 10 min；（6）用酶标仪在 490 nm 波长处测吸光度（A）值，计算细胞存活率，细胞存活率＝（$A_{实验组}-A_{空白组}$）/（$A_{对照组}-A_{空白组}$）。以上步骤 1～4 均在无菌条件下进行。

1.2.3 EdU 荧光染色法检测细胞增殖活性 （1）96 孔板接种和处理细胞同 1.2.2 所述；（2）每孔加入 100 μL 50 μmol/L 的 EdU 培养基孵育 2 h，弃培养基；（3）PBS 清洗 2 次，每次 5 min；（3）每孔加入 50 μL 4％多聚甲醛室温固定 30 min，弃固定液；（4）每孔加入 50 μL 2 mg/mL 甘氨酸，脱色摇床孵育 5 min，弃甘氨酸液；（5）每孔加入 100 μL 渗透剂（0.5％Triton X-100 的 PBS）渗透 10 min；PBS 洗 1 次，5 min；（6）每孔加入 100 μL 1×Apollo® 488 荧光染料避光、室温、孵育 30 min 后，弃染色反应液；（7）每孔加入 100 μL 渗透剂（0.5％Triton X-100 的 PBS）脱色摇床清洗 3 次，每次 10 min，弃渗透剂；（8）每孔加入 100 μL 甲醇清洗 2 次，每次 5 min；PBS 清洗 1 次，每次 5 min；（9）每孔加入 100 μL Hoechst33342 反应液避光、室温孵育 30 min，弃染色反应液；（10）每孔加入 100 μL 后 PBS 清洗 1～3 次后用荧光显微镜（蓝光激发）观察并拍照记录结果。

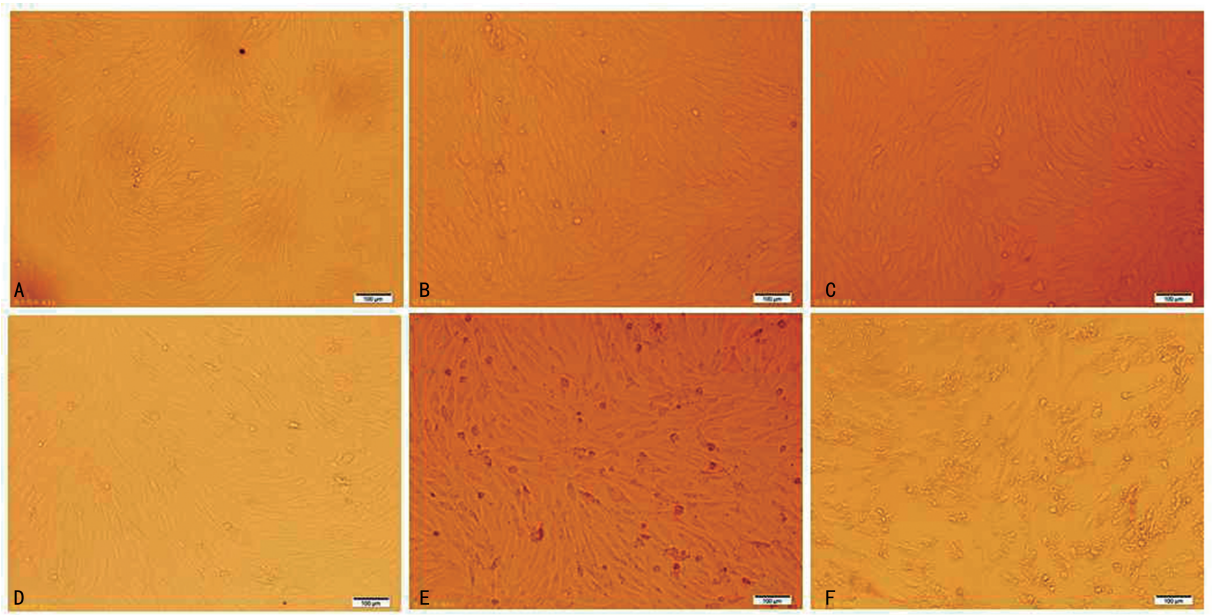
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 FFA 对 HA-VSMC 形态学的影响 不同浓度 FFA 对 HA-VSMC 形态学的影响见图 1，100、200 和 400 μmol/L 组较对照组 HA-VSMC 浓密，紧贴细胞瓶底，细胞间连接紧密且有剂量依赖性；500、600 μmol/L 组较对照组 HA-VSMC 稀疏，开始出现凋亡的形态学改变。

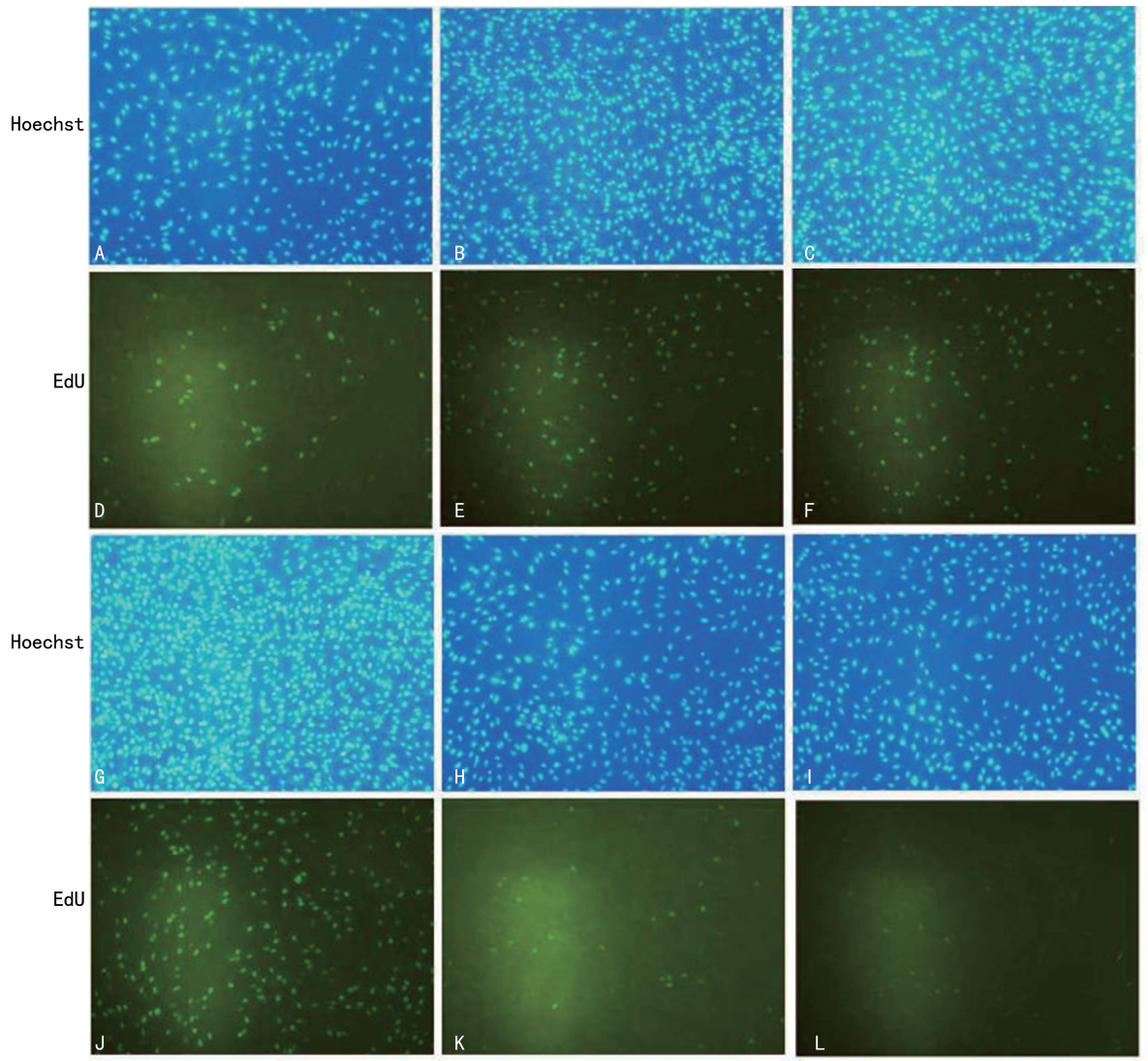
2.2 不同浓度 FFA 处理后 HA-VSMC 存活率 采用不同浓度 FFA 处理 HA-VSMC 24 和 48 h 后检测细胞存活率，结果显示，处理 24 h 后，100、200、300、400、500、600 μmol/L 组存活率均高于对照组（$P<0.01$）；处理 48 h 后，50、100、200、300、400、500、600 μmol/L 组存活率均高于对照组（$P<0.01$）。两个时间段 400 μmol/L 组存活率均最高。见表 1。

2.3 EdU 荧光染色法检测不同浓度 FFA 对 HA-VSMC 增殖活性的影响 EdU 荧光染色法结果显示，100、200 和 400 μmol/L 组较对照组 HA-VSMC 增殖活性明显增强；500 和 600 μmol/L 组较对照组 HA-VSMC 增殖活性明显减低；各实验组中 400 μmol/L 组 HA-VSMC 增殖活性最强。见图 2。



注：A～F 分别表示对照组及 100、200、400、500、600 μmol/L 组 HA-VSMC 培养 48 h 形态。

图 1　不同浓度 FFA 对 HA-VSMC 形态学的影响（×400）



注：A、B、C、G、H、I 分别为对照组及 100、200、400、500、600 μmol/L 组 Hoechst 染色结果；D、E、F、J、K、L 分别为对照组及 100、200、400、500、600 μmol/L 组 EdU 染色结果。

图 2　不同浓度 FFA 对 HA-VSMC 增殖活性的影响（×400）

表 1 不同浓度 FFA 处理后 HA-VSMC 存活率(%)

组别	24 h	48 h
对照组	100.00±0.00	100.00±0.00
25 μmol/L 组	106.17±3.13	106.67±4.59
50 μmol/L 组	108.50±2.88	111.50±10.39*
100 μmol/L 组	113.00±4.00*	117.67±5.01*
200 μmol/L 组	124.17±6.52*	132.83±6.05*
300 μmol/L 组	136.33±9.31*	140.17±6.08*
400 μmol/L 组	145.17±13.66*	146.17±8.38*
500 μmol/L 组	121.00±7.93*	140.00±8.25*
600 μmol/L 组	112.33±8.64*	115.17±10.65*

注：与对照组比较，* $P<0.01$。

3 讨 论

心脑血管疾病已成为危害中国及世界人口健康的“第一杀手”，如何提高心脑血管疾病的诊治和预防水平已成为迫切需要解决的重大医学和社会问题。近年来研究发现，FFA 与血管病变的发生、发展紧密相关[5]，FFA 在诱导血管炎症和动脉粥样硬化中起重要作用，脂代谢紊乱产生大量 FFA 参与动脉粥样硬化的形成[6-7]，2 型糖尿病、糖耐量减低、肥胖、代谢综合征等患者血清 FFA 水平显著升高[8]。FFA 水平的升高刺激血管壁细胞发生一系列应答反应，其中引起的内皮细胞活化和 VSMC 增殖和迁移是最显著的[9]。VSMC 开始增殖并朝着血管内腔迁移，从而引起血管壁的增厚及狭窄产生动脉粥样斑块，可导致冠心病及中风等严重临床后果[10]。

本实验采用不同浓度的 FFA 处理 HA-VSMC，尝试在体外建立 FFA 对血管作用模型，用 MTT 法和 EdU 荧光染色法来观察 HA-VSMC 存活率和增殖活性。MTT 法是一种检测细胞存活和生长的方法，其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓒，并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物，其炔羟基团在天然化合物中很少见，在细胞增殖时能够插入正在复制的 DNA 分子中，基于 EdU 与染料的共轭反应可以进行高效快速的细胞增殖检测分析，可以有效地检测处于 S 期的细胞数。EdU 荧光染色法可直接通过 DNA 复制检测细胞增殖，该方法简单、灵敏、快速、准确，适合各种细胞系和动物体内组织器官的细胞增殖检测，目前在细胞增殖方面的应用逐渐增多[11]。本研究发现，低浓度的 FFA(≤400 μmol/L)能诱导 HA-VSMC 增殖，且有时间和剂量依赖性，随着浓度的增高和时间的延长，细胞增殖活性增强；高浓度的 FFA(>500 μmol/L)能使 HA-VSMC 增殖减弱并出现凋亡的形态改变。

近几十年中，心脏病学家在研究动脉粥样硬化、冠心病机制及冠心病预防的临床试验中发现，多种炎症细胞、炎症介质参与了动脉粥样硬化和血栓形成[10]。研究认为，血管病变是一种慢性炎症反应性疾病。炎症过程中涉及多种因素以不同的形式参与血管疾病的发生、发展[10]。高啸波等[12]也发现，FFA 能引起 HA-VSMC 表达单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)，TLR4/核因子(NF)-κB 信号通路介导了软脂酸诱导的 HA-VSMC 的 MCP-1 基因表达。以上研究结果说明，FFA 引起的 HA-VSMC 增殖可能与 FFA 引起的血管无菌性炎症有关，这为临床通过抗炎治疗动脉硬化等血管疾病提供了新思路和实验依据，具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 于佳雪，徐亚伟，肖丹，等. 游离脂肪酸与心血管疾病[J]. 现代生物医学进展，2013，27(10)：1979-1982.

[2] HANSSON G K. Inflammation，atherosclerosis，and coronary artery disease[J]. New Engl J Med，2005，352(16)：1685-1695.

[3] QUAN J，LIU J，GAO X，et al. Palmitate induces interleukin-8 expression in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4/nuclear factor-κB pathway[J]. J Diab，2014，6(1)：33-41.

[4] LAMERS D，SCHLICH R，HORRIGHS A，et al. Differential impact of oleate，palmitate，and adipokines on expression of NF-κB target genes in human vascular smooth muscle cells[J]. Mol Cell Endocrinol，2012，362(1)：194-201.

[5] 孙瑞娟，朱毅，汪南平，等. 血管病变机制与血管功能调控研究的现状与趋势[J]. 中国科学(生命科学)，2013，43(2)：103-111.

[6] WU D，LIU J，PANG X，et al. Palmitic acid exerts pro inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C reactive protein，inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-α[J]. Int J Mol Med，2014，34(6)：1706-1712.

[7] DORONZO G，VIRETTO M，BARALE C，et al. Oleic acid increases synthesis and secretion of VEGF in rat vascular smooth muscle cells：role of oxidative stress and impairment in obesity[J]. Int J Mol Sci，2013，14(9)：18861-18880.

[8] 马慧娟，宋光耀，王智华，等不同糖耐量者血清游离脂肪酸与胰岛素抵抗的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志，2003，3(19)：228-291

[9] 张文杰，史英钦，宋光耀，等. 不同的脂肪酸对人血管内皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志，2005，25(11)：1312-1314.

[10] 李杰，阎伟. 炎症因子与血管损伤的相关性研究进展[J]. 实用医药杂志，2009，26(11)：78-80.

[11] 王惠丽，陈志江，姚芳，等. 5-氟尿嘧啶对 EdU 方法检测细胞增殖准确性的影响[J]. 广东医学，2014，35(10)：1495-1497.

[12] 高啸波，权金星，杨海静，等. 果蝇样受体 4 介导游离脂肪酸调节人血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白-1 的表达[J]. 中华糖尿病杂志，2013，5(2)：108-113.

（收稿日期：2021-12-16　修回日期：2022-04-08）

· 临床探讨 ·　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.025

妊娠期糖尿病患者不同孕期 Hcy 水平变化及临床价值*

黄立伟，杨建彬，何丹枫

广西壮族自治区南溪山医院检验科，广西桂林 541002

摘　要：目的　探讨妊娠期糖尿病(GDM)患者不同孕期同型半胱氨酸(Hcy)水平的变化及临床应用价值。**方法**　选取 2018 年 1 月至 2020 年 12 月于该院产检并住院分娩的 71 例 GDM 产妇作为 GDM 组，另选取该院同期 80 例健康产妇作为对照组。分别在孕早期、孕中期和孕晚期采用速率法检测血清 Hcy 水平，免疫透射比浊法测定血胱抑素 C(Cys-C)、β_2 微球蛋白(β_2-MG)、视黄醇结合蛋白(RBP)水平。比较两组及不同孕期 GDM 患者各生化指标的水平；并根据 GDM 组是否发生微血管病变进行分组，比较两组各生化指标水平及不良妊娠结局发生情况。**结果**　GDM 组 Hcy、Cys-C、β_2-MG 及 RBP 水平在孕早期、孕中期及孕晚期均高于对照组($P<0.05$)；GDM 组 Hcy、Cys-C、β_2-MG 及 RBP 水平，在不同孕期间的变化差异有统计学意义($P<0.05$)；伴有微血管病变的 GDM 患者 Hcy、Cys-C 水平及不良妊娠结局发生率均明显高于未伴有微血管病变的 GDM 患者($P<0.05$)。**结论**　Hcy、Cys-C、β_2-MG 水平随着孕周的增加呈上升趋势，孕晚期 Hcy、Cys-C 水平与 GDM 患者的微血管病变及不良妊娠结局可能相关，监测 GDM 患者孕期 Hcy、Cys-C 水平对预测肾损伤、微血管病变、妊娠结局均有一定的临床价值。

关键词：妊娠期糖尿病；　不同孕期；　同型半胱氨酸；　临床价值

中图法分类号：R446.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2022)22-3123-04

妊娠期糖尿病(GDM)是确认妊娠后，首次发现的各种程度的糖耐量减低或糖尿病。它的发病率在孕期女性中达 5%，并逐年增高，若不及时控制血糖则可能引发不良妊娠结局[1]。GDM 的病因和发病机制极为复杂，至今未完全阐明。妊娠期糖代谢的主要特点是葡萄糖需要量增加、胰岛素抵抗加重和胰岛素分泌相对不足，这可能导致部分妊娠期女性发生 GDM。血清同型半胱氨酸(Hcy)水平的增加，除已被证实是心血管疾病的危险因素外，也有研究表明其与 GDM 有关[2]。在妊娠期间，Hcy 水平较高的 GDM 女性，其产后有较高的风险发展成为糖尿病。Hcy 水平升高可导致机体血管内皮细胞受损，使缩血管因子内皮素的分泌增加，进而引起妊娠期高血压的发生。Hcy 还与 GDM 病变程度及不良妊娠结局有着密切的关系[2-3]。但是 Hcy 在不同孕期的变化鲜有报道。本研究通过对本院 71 例 GDM 患者血清 Hcy 水平的监测和分析，探讨和评估不同孕期血清 Hcy 水平的变化及其临床应用价值。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取 2018 年 1 月至 2020 年 12 月在本院门诊进行建卡产检并住院分娩的 GDM 产妇 71 例作为 GDM 组，年龄 22～39 岁，平均(31.97±4.72)岁；孕周 32～41 周，平均(37.97±1.69)周。再选取同期在本院进行产检并分娩的 80 例健康产妇作为对照组，年龄 21～38 岁，平均(30.91±3.87)岁；孕周 34～41 周，平均(38.13±1.85)周。两组在孕周、年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2　纳入和排除标准　(1)均在妊娠 24～26 周进行葡萄糖耐量测试(OGTT)，符合 2011 版原国家卫生部规定的 GDM 诊断标准[4]；(2)年龄 20～40 岁，并为单胎妊娠；(3)首次检查孕周在 8～12 周；(4)所有研究对象知情同意，本研究通过本院伦理委员会批准。排除标准：有糖尿病家族史；合并心血管系统疾病及其他内科疾病。

1.3　仪器与试剂　仪器采用罗氏 C702 全自动生化分析仪，β_2 微球蛋白(β_2-MG)试剂盒(试剂批号 20062106)购自北京德曼公司，Hcy(试剂批号 200327)、胱抑素 C(Cys-C)(试剂批号 200309)、视黄醇结合蛋白(RBP)(试剂批号 20200311)试剂盒购自北京九强公司，操作均按照试剂盒说明书进行，并做好相应的质量控制。

1.4　方法

*　**基金项目：**广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(Z2011027)。

网络首发　https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20221102.1614.008.html(2022-11-03)