

• 实验研究 •

DCE-MRI 评价 H₂S 干预糖尿病重症肢体缺血兔骨髓血管内皮细胞氧化应激水平

高宇凡, 费紫嫣, 李亮, 刘昌盛, 查云飞

【摘要】目的:采用定量 DCE-MRI 评价外源性硫化氢(H₂S)干预糖尿病重症肢体缺血兔骨髓血管内皮细胞氧化应激水平。**方法:**将 15 只糖尿病合并重症肢体缺血模型兔随机分为 DM+CLI+Saline 组(n=7)、DM+CLI+NaHS 组(n=8),另设置空白对照组(NC 组,n=6)。连续 3 周予 DM+CLI+NaHS 组实验兔耳缘静脉注射 NaHS 溶液(30 μmol/kg/d)。分别于造模后第 0、1、2、3 周对各组实验兔行 MRI 右侧股骨斜冠状位 DCE-MRI 序列扫描,通过后处理计算得到右股骨上段骨髓的血容量转移常数(K^{trans})、速率常数(K_{ep})和对比剂血管外细胞外间隙的容积(V_e)等定量参数。取第 3 周各组实验兔股骨上段行 CD31 免疫组化染色,计算骨髓微血管密度(MVD),并检测造模后第 3 周原代骨髓内皮祖细胞(EPCs)内活性氧(ROS)水平、骨髓组织超氧化物歧化酶(SOD)水平、血清可溶性细胞间粘附分子 1(sICAM-1)、血管生成素-1(Ang-1)水平和骨髓来源 EPCs 迁移和成管功能。**结果:**外源性 H₂S 干预第 2、3 周股骨上段骨髓 K^{trans}、V_e 和 K_{ep} 值较未干预组减低($P<0.05$),股骨上段 MVD 较未干预组增加($P<0.05$)。干预第 3 周骨髓 EPCs 胞内 ROS 水平下降,骨髓组织 SOD 水平升高,血清 sICAM-1 显著降低,血清 Ang-1 浓度显著增加,且骨髓来源 EPCs 迁移和成管功能上调($P<0.05$)。第 3 周股骨上段骨髓 MVD 与 K^{trans} 值呈负相关($r=-0.780, P<0.05$)、与 K_{ep} 值和 V_e 值呈正相关($r=0.808, 0.889, P<0.05$),骨髓内皮祖细胞 ROS 阳性率与股骨上段骨髓 K^{trans} 值、K_{ep} 值、V_e 值呈正相关($r=0.714, 0.872, 0.877, P<0.05$),而与骨髓组织 SOD 水平呈负相关($r=-0.754, -0.856, -0.880, P<0.05$)。血清 sICAM-1、Ang-1 水平与股骨上段骨髓 K^{trans}、K_{ep}、V_e 值之间均无显著相关关系($P>0.05$)。**结论:**利用 DCE-MRI 定量参数评价外源性 H₂S 干预兔糖尿病重症肢体缺血骨髓氧化应激水平是可行的,外源性 H₂S 通过降低骨髓血管内皮细胞氧化应激水平,降低骨髓微血管渗透性。

【关键词】 糖尿病;慢性肢体威胁性缺血;硫化氢;磁共振成像

【中图分类号】 R587.1; R543.5; R194.3; R445.2 **【文献标志码】** A

【文章编号】 1000-0313(2024)10-1298-08

DOI: 10.13609/j.cnki.1000-0313.2024.10.004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The effects of H₂S on oxidative stress levels in bone marrow vascular endothelial cells in diabetic rabbits with critical limb ischemia evaluate by DCE-MRI GAO Yu-fan, ZHA Yun-fei, FEI Zi-yan, et al. Department of Radiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 **Objective:** To evaluate the effects of H₂S on oxidative stress levels in bone marrow vascular endothelial cells using DCE-MRI in diabetic rabbits with critical limb ischemia. **Methods:** Fifteen diabetic rabbits with severe limb ischemia were randomly divided into three groups: DM+CLI+Saline group (n=7), DM+CLI+NaHS group (n=8), and blank control group (NC group, n=6). Rabbits in the DM+CLI+NaHS group were injected with NaHS solution (30 μmol/kg/d) through the auricular vein for 3 consecutive weeks. The right femur oblique coronal DCE-MRI sequential scanning was performed at 0, 1, 2 and 3 weeks after modeling. Quantitative parameters, including volume transfer constant (K^{trans}), efflux rate constant (K_{ep}), and extracellular extra-vascular volume fraction (V_e) of the right upper femoral bone marrow, were computed through post-processing. CD31 performed on the upper femur of each group at week 3. Bone marrow microvascular density (MVD) was calculated.

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院放射科

作者简介:高宇凡(1998—),女,湖北黄冈人,硕士研究生,住院医师(规培),主要从事血管及肌肉骨骼影像学。

通讯作者:查云飞,E-mail:zhayunfei999@126.com

基金项目:国家自然科学基金(82171895;81871332);武汉大学人民医院交叉创新人才项目(JCRCZN-2022-013)

The levels of reactive oxygen species (ROS) in primary bone marrow endothelial progenitor cells (EPCs), superoxide diastase (SOD) in bone marrow tissue, serum soluble inter-cellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), Angiopoietin-1 (Ang-1), migration and tubular function of bone marrow-derived EPCs were measured at 3 weeks after model creation. **Results:** The values of K_{trans} , V_e , and K_{ep} of bone marrow in the upper femur were lower than those in the non-intervention group at the 2nd and 3rd weeks after exogenous H_2S intervention ($P < 0.05$), and the MVD in the upper femur was increased compared with those in the non-intervention group ($P < 0.05$). At the 3rd week of intervention, the intracellular ROS level of bone marrow EPCs decreased, SOD level of bone marrow tissue increased, serum sICAM-1 decreased significantly, serum Ang-1 concentration increased significantly, and migration and tubular function of bone marrow derived EPCs were up-regulated ($P < 0.05$). At the 3rd week, bone marrow MVD in the upper femoral segment was negatively correlated with K_{trans} value ($r = -0.780, P < 0.05$), positively correlated with K_{ep} value and V_e value ($r = 0.808, 0.889, P < 0.05$). The positive rate of ROS in bone marrow endothelial progenitor cells was positively correlated with K_{trans} value, K_{ep} value and V_e value in the bone marrow of the upper femur ($r = 0.714, 0.872, 0.877, P < 0.05$), but negatively correlated with SOD level in the bone marrow ($r = -0.754, -0.856, -0.880, P < 0.05$). There was no significant correlation between serum sICAM-1 and Ang-1 levels and K_{trans} , K_{ep} and V_e values in bone marrow of upper femur ($P > 0.05$). **Conclusion:** It is feasible to use DCE-MRI quantitative MRI to evaluate the intervention of exogenous H_2S on bone marrow oxidative stress level changes in diabetic rabbit with critical limb ischemia. Exogenous H_2S reduces the bone marrow microvascular permeability by reducing the oxidative stress level of bone marrow vascular endothelial cells.

【Key words】 Diabetes mellitus; Chronic limb-threatening ischemia; Hydrogen sulfide; Magnetic resonance imaging

重症肢体缺血(critical limb ischemia, CLI)是糖尿病患者下肢外周动脉疾病(peripheral artery disease, PAD)的终末期,是导致患者下肢静息痛、溃疡、坏疽和截肢的主要原因,占所有非外伤性低位截肢手术的 15%~24%^[1,2]。骨髓是糖尿病的一个重要靶器官,慢性、低度炎症和氧化应激状态引起持久的骨髓微环境异常,介导了 1 型和 2 型糖尿病骨髓脂肪化和微血管稀疏导致的灌注减低,并导致与骨髓干细胞动员相关的内源性血管修复机制严重受损^[3,4]。近年来,通过靶向骨髓微环境的抗炎和抗氧化应激治疗策略可通过建立骨髓微血管稳态、恢复骨髓干细胞动员功能,显著改善糖尿病下肢缺血性疾病的组织灌注^[5-7]。硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是一种内源性气体信号分子,可通过降低机体在高血糖状态下的炎症和氧化应激水平、恢复糖尿病小鼠的骨髓干细胞功能,发挥重要的内皮细胞保护作用^[8-10]。

我们前期研究^[11-13]利用磁共振动态增强扫描技术(dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI)证实了糖尿病兔骨髓微血管渗透性及微血管密度的改变,基于 DCE-MRI 定量参数 K_{trans} 图的纹理分析可准确识别糖尿病兔重症肢体缺血的骨髓微结构改变。此外,结合 DCE-MRI 渗透性参数和

定量计算机断层扫描技术(QCT)证实糖尿病兔骨髓微血管渗透性参数的变化与骨密度(BMD)相关,为揭示糖尿病骨髓微血管病变提供可视化了影像学证据。

目前尚未见利用 DCE-MRI 评价硫化氢干预糖尿病重症肢体缺血骨髓氧化应激水平的研究报道,本研究利用 DCE-MRI 定量参数评价外源性 H_2S 干预兔糖尿病重症肢体缺血骨髓氧化应激水平、微血管渗透性的相关性,旨在为 H_2S 在糖尿病重症肢体缺血并发症的血管内皮细胞保护机制提供定量影像学证据。

材料与方法

本实验所有动物处置均遵循实验动物伦理原则,并获武汉大学人民医院实验动物伦理委员会批准审核,批准文号为 WDRM 动(福)20220604D 号。由武汉大学人民医院实验动物中心提供健康新西兰雄性大白兔 26 只,体重 2.3~2.8 kg,单笼饲养。

1. 实验动物分组与模型制备

26 只实验兔适应性饲养 1 周后,随机选取 6 只实验动物作为空白对照组(NC 组),另 20 只实验动物用于建立糖尿病合并重症肢体缺血模型。造模方法:禁食不禁水 12 h 后快速经耳缘静脉注入 5% 浓度的四氧嘧啶(100 mg/kg, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis,

MO, USA)^[14]。48 h 后用血糖仪 (Sannuo blood glucose meter) 测定外周血糖浓度, 以单次外周血糖 $\geq 14 \text{ mmol/L}$ 或者两次测量值 $\geq 11 \text{ mmol/L}$ 认定为糖尿病造模成功^[12]。

糖尿病兔模型稳定 4 周的基础上建立肢体缺血模型。造模方法: 经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg) 麻醉实验兔, 于右后肢腹股沟韧带中点处切开皮肤, 分离脂肪及筋膜层, 暴露、游离股动脉, 双线结扎后从中间剪断血管, 术毕逐层缝合^[15]。造模成功后的实验兔随机分为 DM+CLI+NaHS 组 ($n=10$) 和 DM+CLI+Saline 组 ($n=10$)。

股动脉结扎术后采用数字化 X 线透视摄影系统 Sonialvision G4 (Shimadzu, Japan) 进行检查。摄影参数为: 68 kV, 160 mA, 8.1 ms。由一名具有 5 年以上工作经验的介入科医师经腹主动脉入路插入肝素浸泡的 3F 微导管, 头端置于腹腔干平面腹主动脉内手动匀速(流率约 2~3 mL/s) 注射碘佛醇 (320 mg/mL, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 中国) 20 mL, 数字减影血管造影结果如图 1a。

DM+CLI+NaHS 组实验兔连续 3 周予耳缘静脉缓慢注射 NaHS 溶液 ($30 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{d}$, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA), DM+CLI+Saline 组实验兔予等量注射 0.9% 生理盐水。

2. MRI 扫描及定量参数评价

各组实验兔分别于造模成功后 0、1、2、3 周在麻醉状态下进行 MRI 扫描, 麻醉方法同 2.1。所有扫描均在 3.0 T 超导 MR 机 (SIGNA™ Architect, GE-Healthcare, Milwaukee, WI, USA) 上进行, 使用 18 通道膝关节专用相控阵线圈行右股骨斜冠状位基于笛卡尔采集的 K 空间共享三维容积快速动态增强成像 (differential sub-sampling with cartesian ordering, DISCO)。

DISCO 序列扫描参数如下。DISCO 序列: TR

5.4 ms, TE 1.5 ms, 翻转角 15°, 扫描层厚 1.6 mm, 层间距 0, 层数 11, 视野 16 cm \times 16 cm, 矩阵 192 \times 192。蒙片扫描 11 s, 之后于一期末应用双筒高压注射器经兔耳缘静脉团注钆双胺, 剂量为 0.2 mmol/kg, 注射流率 1.0 mL/s, 随后以相同流率注射 0.9% 生理盐水 5 mL 冲管, 共扫描 48 期, 每期 4~6 s。

采用 PHI 科研平台 GEO mni-Kinetics 软件 (GE-Healthcare, Milwaukee, WI, USA) 对动态增强扫描数据进行后处理和分析。选取兔左侧股动脉手动勾画感兴趣区 (region of interest, ROI), 获得时间-浓度曲线, 并确定动脉输入函数 (arterial input function, AIF) 模型。随后在兔右侧股骨上段骨髓中心层面勾画 ROI, 注意避开骨皮质、骨岛及血管 (图 1), 利用药代动力学 Extended Tofts Linear 双室模型自动计算得到右股骨上段骨髓的血管容量转移常数 (K^{trans})、速率常数 (K_{ep})、对比剂血管外细胞外间隙 (extravascular extracellular space, EES) 的容积 (V_e)。各参数按上述步骤重复测量 3 次, 取平均值为最终结果。

3. 骨髓和血清氧化应激水平标志物检测

实验动物最后一次完成 MRI 扫描 12 h 内, 自耳缘静脉不抗凝抽取静脉血 5 mL, 分离血清备用。空气注射处死各组实验兔, 无菌抽取右侧股骨上段骨髓组织 2 mL, 置于 -80° 冰箱冷藏备用。分离并使用 4% 多聚甲醛保存各组实验兔右侧股骨样本。采用密度梯度离心法联合差速贴壁法提取、分离、培养得到原代骨髓内皮祖细胞 (EPCs), DCFH-DA 作为荧光探针, 孵育 30 min 后, PBS 洗涤, 搜集细胞后通过流式细胞仪检测骨髓来源 EPCs 细胞内活性氧 (ROS) 水平。组织生化法检测骨髓组织超氧化物歧化酶 (SOD) 水平; 取各组实验兔血清, 参照相应酶联免疫检测试剂盒说明书进行操作, 测定各组实验兔血清粘附分子-1 (sICAM-1)、促血管生成素-1 (Ang-1) 水平。

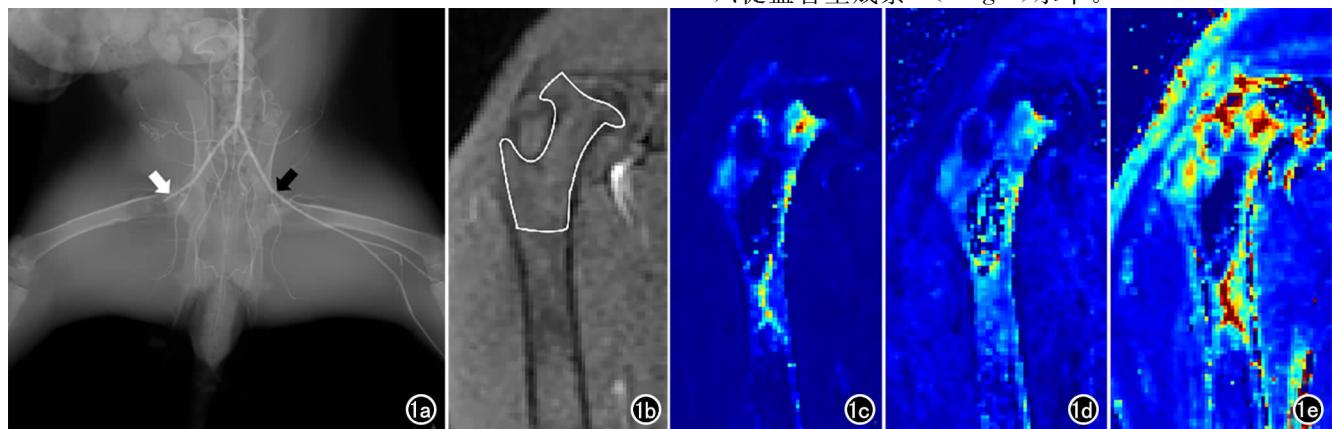


图 1 a) 四氯嘧啶诱导糖尿病兔右侧股动脉结扎术后, 数字减影血管造影显示结扎远端血管内无碘对比剂充盈(白箭), 未结扎股动脉显示远端分支通畅、碘对比剂充盈(黑箭); b) 白色线条区域为手动勾画的右侧股骨上段 ROI; c) NaHS 干预 3 周后右侧股骨上段骨髓 K^{trans} 图; d) K_{ep} 图; e) V_e 图。

4. 骨髓内皮祖细胞迁移和成管功能检测

骨髓来源 EPCs 迁移功能检测: 取上述 2.3 中原代培养的贴壁细胞制成单细胞悬液, 吹打均匀后加入 Transwell 小室的上室, 下室中加入 500 μL 含 10% FBS 的完全培养基, 将小室放入板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 下于 CO₂ (含量 5%) 培养箱中培养 24 h。洗去培养基, 0.2% 结晶紫染色 10 min, 于倒置显微镜下 ($\times 100$) 随选取 3 个视野计数, 取其平均值。体外成管功能检测: 将 3×10^4 个原代培养的 EPCs 消化后接种在 Matrigel 胶上, 并加入 100 μL 培养液培养。24 h 后于倒置显微镜下 ($\times 100$) 观察并拍照, 应用 Image J 图像分析软件分析其总分支长度 (Tot. branches length)、节点数 (Nb of nodes)。

5. 骨髓组织病理学检查

右侧股骨样本在 4% 多聚甲醛中固定、脱钙 1 个月后, 置于乙醇中以递增浓度脱水, 在二甲苯中洗涤并植入组织石蜡中包埋, 沿股骨纵轴切取 4 μm 切片行免疫组化染色。CD31 免疫组化切片于 400 倍光学显微镜下 ($\times 400$, Nikon Eclipse CI) 拍片, 随机选取 3 个相互不连续的区域统计并计数 3 个不连续区域染色阳性的微血管数, 测量结果的平均值作为 MVD。

6. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件 (IBM/Armonk/NY), 符合正态分布的计量资料用均数土标准差表示。各组 MRI 定量参数 (K_{trans} 、 K_{ep} 及 V_e) 和 sICAM-1 和 Ang-1 随时间变化的差异使用重复测量方差分析。使用独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验确定同一时间点组间各参数的差异。Pearson 相关系数评估 MRI 定量参数与各生物化学指标和病理组织学参数的相关性, 所有结果以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 动物模型制备结果

实验过程中有 3 只实验兔造模后血糖水平低于成模标准, 另 2 只实验兔因麻醉意外、身体健康状况差死亡, 最终糖尿病合并下肢重症缺血造模成功 15 只 (DM+CLI+Saline 组: $n=7$ 、DM+CLI+NaHS 组: $n=8$), 造模成功率 70%。实验兔分别于模型制备后出现术肢跛行、皮温降低和不同程度足底溃疡。

2. MRI 定量参数评价

结果显示各时间点间 DM+CLI+Saline 组 K_{trans} 值、 K_{ep} 值和 V_e 值差异具有统计学意义 (*F* 值分别为 3.496、5.523、3.994、3.19, $P < 0.05$); NC 组各时间点 K_{trans} 值、 K_{ep} 值和 V_e 值差异无统计学意义 (*F* 值分别为 0.035、0.060、0.097, $P > 0.05$)。NaHS 干预后, DM+CLI+NaHS 组 K_{ep} 和 V_e 值均呈下降趋势, 且干预第 2、3 周后, DM+CLI+NaHS 组 K_{trans} 值、 K_{ep} 值和 V_e 值均低于 DM+CLI+Saline 组, 差异具有统计学意义 (表 1, 图 2)。

3. 组织病理学结果

股骨上段骨髓 CD31 免疫组化检查显示 NaHS 干预 3 周后, DM+CLI+NaHS 组 MVD 较 DM+CLI+Saline 组明显增高 ($t = 3.208$, $P < 0.05$, 图 3)。Pearson 相关性分析结果显示, 第 3 周股骨上段骨髓 MVD 与 K_{trans} 值呈负相关 ($r = -0.780$, $P < 0.05$)、与 K_{ep} 值和 V_e 值呈正相关 ($r = 0.808$ 、 0.889 , $P < 0.05$)。

4. 骨髓和血清氧化应激水平标志物检测

NaHS 干预 3 周后, DM+CLI+NaHS 组骨髓内皮祖细胞 ROS 较 DM+CLI+Saline 组降低 ($t = 3.208$, $P < 0.001$)、骨髓组织 SOD 水平升高 ($t = 3.879$, $P < 0.05$, 图 4b、c)。Pearson 相关性分析结果

表 1 各组不同时间点 MRI 定量参数结果比较

DCE 定量参数/组别	NC 组 (n=6)	DM+CLI+Saline 组 (n=7)	DM+CLI+NaHS 组 (n=8)
K_{trans} (min^{-1})			
0w	0.191(0.173, 0.195) ^{***}	1.227(1.114, 1.333) ^{# #}	1.260(1.158, 1.363)
1w	0.189(0.168, 0.198) ^{**}	1.419(1.390, 1.437) ^{# #}	1.399(1.365, 1.438)
2w	0.185 \pm 0.017 ^{***}	1.504 \pm 0.044 ^{# # #}	1.425 \pm 0.032 ^{##}
3w	0.183 \pm 0.008 ^{***}	1.612 \pm 0.111 ^{# # #}	1.470 \pm 0.055 ^{##}
K_{ep} (min^{-1})			
0w	0.319 \pm 0.049 [*]	0.968 \pm 0.316 ^{# #}	0.928 \pm 0.410
1w	0.317 \pm 0.035 ^{***}	1.216 \pm 0.324 ^{# # #}	0.954 \pm 0.534
2w	0.310 \pm 0.028 ^{**}	1.515 \pm 0.296 ^{# # #}	0.910 \pm 0.398 ^{##}
3w	0.317 \pm 0.047 ^{**}	1.484 \pm 0.181 ^{# # #}	0.780 \pm 0.332 ^{## ##}
V_e			
0w	0.197 \pm 0.063 ^{**}	0.367 \pm 0.107 ^{# #}	0.354 \pm 0.116
1w	0.209 \pm 0.027 ^{**}	0.432 \pm 0.095 ^{# #}	0.407 \pm 0.167
2w	0.218 \pm 0.081 [*]	0.569 \pm 0.129 ^{# # #}	0.365 \pm 0.123 ^{##}
3w	0.209 \pm 0.09	0.627 \pm 0.254 ^{# # #}	0.322 \pm 0.022 ^{##}

注: 与 NC 组比较, [#] $P < 0.05$, ^{# #} $P < 0.01$, ^{# # #} $P < 0.001$; 与 DM+CLI+NaHS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; 与 DM+CLI+Saline 组比较, ^{##} $P < 0.05$, ^{## #} $P < 0.01$, ^{## ##} $P < 0.001$ 。

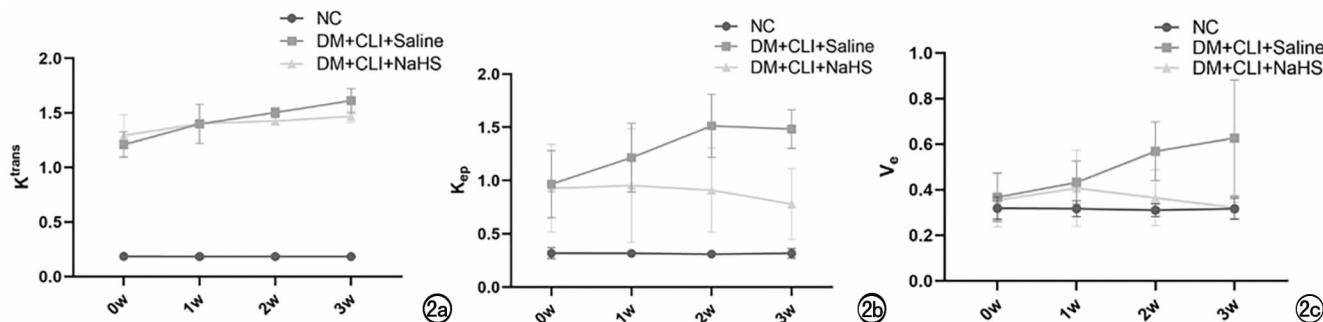


图 2 各组实验兔第 3 周股骨上段骨髓 CD31 免疫组化 ($\times 400$) 检查及 MVD 计数结果。a) NC 组;b) DM+CLI+Saline 组;c) DM+CLI+NaHS 组;与 NC 组相比。DM+CLI+Saline 组 K_{trans} 值、 K_{ep} 值、 V_e 值在造模后各时间点均较 NC 组显著升高, 造模后第 2 周后开始 DM+CLI+NaHS 组 K_{ep} 和 V_e 值均呈下降趋势, 且 K_{trans} 值、 K_{ep} 值、和 V_e 值在第 2 周和第 3 周降低低于 DM+CLI+Saline 组。

显示, 骨髓内皮祖细胞 ROS 阳性率与股骨上段骨髓 K_{trans} 值、 K_{ep} 值、 V_e 值呈正相关 ($r = 0.714, 0.872, 0.877, P < 0.05$), 而与骨髓组织 SOD 水平呈负相关 ($r = -0.754, -0.856, -0.880, P < 0.05$)。此外, NaHS 干预 3 周后, DM+CLI+NaHS 组血清 sICAM-1 显著降低 ($t = 2.861, P < 0.05$)、血清 Ang-1 ($t = 5.312, P < 0.05$) 浓度显著增加(表 2)。Pearson 相关性分析结果显示, 血清 sICAM-1、Ang-1 水平与股骨上段骨髓 K_{trans} 、 K_{ep} 、 V_e 值之间均无显著相关关系 ($P > 0.05$)。

5. 骨髓 EPCs 迁移和成管功能分析

各组第 3 周骨髓来源 EPCs 迁移和成管能力分析见图 5g~i。与 DM+CLI+Saline 组相比, NaHS 干预 3 周后 DM+CLI+NaHS 组骨髓来源 EPCs 迁移功能上调 ($t = 6.503, P < 0.001$)、DM+CLI+NaHS 组 EPCs 的总分支长度和节点数较 DM+CLI+NaHS 组明显增加 ($t = 4.417, 4.586, P < 0.001$)。

讨 论

本研究利用 DCE-MRI 评价外源性 H_2S 对合并

重症肢体缺血糖尿病兔骨髓微环境氧化应激水平及微血管渗透性的影响, 结果显示外源性 H_2S 干预 3 周后糖尿病合并重症肢体缺血兔股骨上段骨髓 K_{trans} 、 V_e 及 K_{ep} 值较未干预组减低、MVD 较未干预组增加, 且骨髓 EPCs 胞内 ROS 水平下降、骨髓组织 SOD 水平升高。股骨上段 MVD、ROS 与 SOD 与 K_{trans} 、 V_e 、 K_{ep} 值互相存在相关性。

糖尿病合并重症肢体缺血的组织代偿性生成功能不完整的病理性新生血管来维持组织灌注, 表现为内皮细胞通透性显著增加, 而微血管密度未见增多^[16-17]。本研究结果显示糖尿病合并 CLI 兔股骨上段骨髓 DCE-MRI 定量参数 K_{trans} 、 V_e 和 K_{ep} 值持续升高而骨髓微血管密度减低, 可能与高血糖导致的氧化应激损伤骨髓内环境的血管屏障有关。外源性 H_2S 具有调节氧化应激诱导的血管内皮通透性的作用^[18-21], 本研究观察到外源性 H_2S 干预 3 周后, 糖尿病合并 CLI 兔股骨上段骨髓微血管渗透性参数 K_{trans} 、 K_{ep} 和 V_e 值较未干预组减低, 且骨髓 EPCs 胞内 ROS 水平降低、骨髓组织 SOD 水平升高。研究表明, 外源

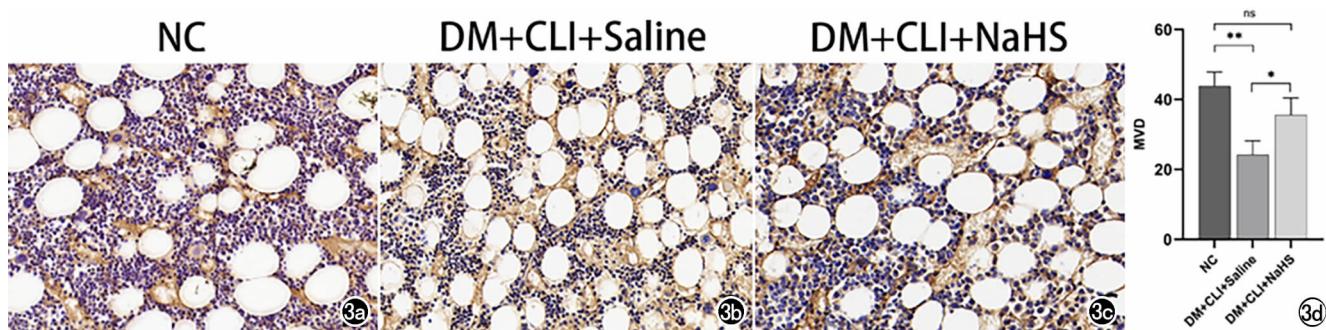


图 3 各组实验兔第 3 周股骨上段骨髓 CD31 免疫组化 ($\times 400$) 检查及 MVD 计数结果。a) NC 组;b) DM+CLI+Saline 组;c) DM+CLI+NaHS 组;d) MVD 计数结果差异柱状图。造模 3 周后, DM+CLI+Saline 组骨髓腔内 MVD 明显减少, 而 NaHS 干预 3 周后, DM+CLI+NaHS 组 MVD 增多, 但与 NC 组相比仍未恢复到正常状态。^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$, ns $P > 0.05$

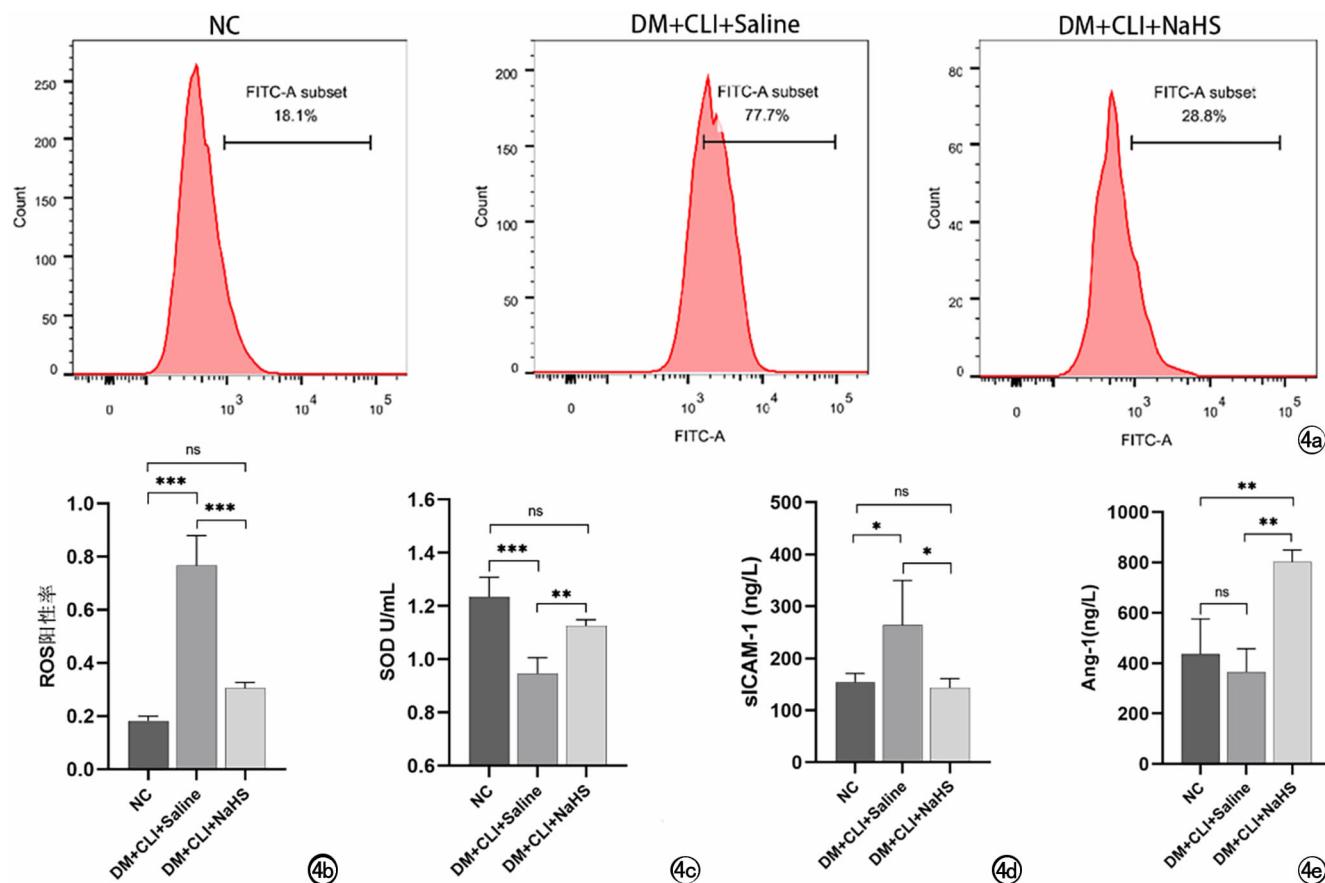


图 4 a) 流式细胞术检测第 3 周各组骨髓 EPCs DCFH-DA 平均荧光强度反应胞内 ROS 阳性率;b) 实验第 3 周各组骨髓 EPCs 细胞 ROS 阳性率差异柱状图;c) 实验第 3 周各组骨髓组织 SOD 水平差异柱状图;d) 实验第 3 周各组血清 sICAM-1 水平差异柱状图;e) 实验第 3 周各组血清 Ang-1 水平差异柱状图。NaHS 干预 3 周后,DM+CLI+NaHS 组 EPCs 胞内 ROS 水平明显降低、骨髓组织 ROS 水平明显降低、SOD 水平显著上调、血清 sICAM-1 显著降低、血清 Ang-1 浓度显著增加。^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$, ns $P > 0.05$

性 H₂S 通过减少内皮细胞 ROS 生成、抑制紧密连接蛋白(tight junction proteins, TJPs)甲基化,从而显著改善氧化应激介导的内皮细胞功能障碍,表现为内皮细胞通透性下降^[22],还可通过降低基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达减轻氧化应激诱导的血管内皮通透性升高^[18,19]。本研究结果表明外源性 H₂S 通过发挥其抗氧化应激作用,维持糖尿病合并 CLI 时的骨髓微血管稳态,有助于阻止肢体骨髓微血管病变的进展并预防截肢,DCE-MRI 定量参数可以作为无创影像学生物标志物,用于糖尿病合并 CLI 的早期抗氧化应激治疗效果评价。

骨髓来源的 EPCs 功能失调在糖尿病血管并发症中的作用尤为关键,而外源性 H₂S 可保护高糖诱导的内皮细胞功能损伤,其机制可能与抗氧化应激、线粒体保护等作用有关^[10]。本研究结果显示,外源性 H₂S 干预 3 周后,糖尿病合并 CLI 免骨髓来源的 EPCs 迁移和成管功能较未干预组上调、造模侧股骨上段 MVD 较未干预组显著增加,表明外源性 H₂S 通过恢

复骨髓来源 EPCs 功能,在糖尿病骨髓微血管病变中发挥着重要的保护作用。研究表明长期高血糖可诱导骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)向脂肪细胞分化的趋势大大增加,以骨髓脂肪沉积为主要病理特征^[3,4]。炎症、氧化应激和线粒体功能障碍等诱导的 BMSCs 生态位的重塑可在外源性 H₂S 的干预下使 BMSCs 由“成脂”向“成骨”分化^[23-25]。然而,外源性 H₂S 对 BMSCs 的“成骨-成脂”分化平衡中的作用机制仍需进一步研究。本研究结果表明外源性 H₂S 通过发挥其抗氧化应激作用,维持糖尿病合并 CLI 时的骨髓微血管稳态,有助于阻止肢体骨髓微血管病变的进展并为预防截肢等临床策略提供理论依据,DCE-MRI 定量参数可以作为无创影像学生物标志物,用于糖尿病合并 CLI 的早期抗氧化应激治疗效果评价。

本研究的局限性:①本研究采用四氧嘧啶诱导兔 1 型糖尿病进行股动脉结扎,建立了 1 型糖尿病重症肢体缺血模型,该模型与临床 2 型糖尿病合并下肢重

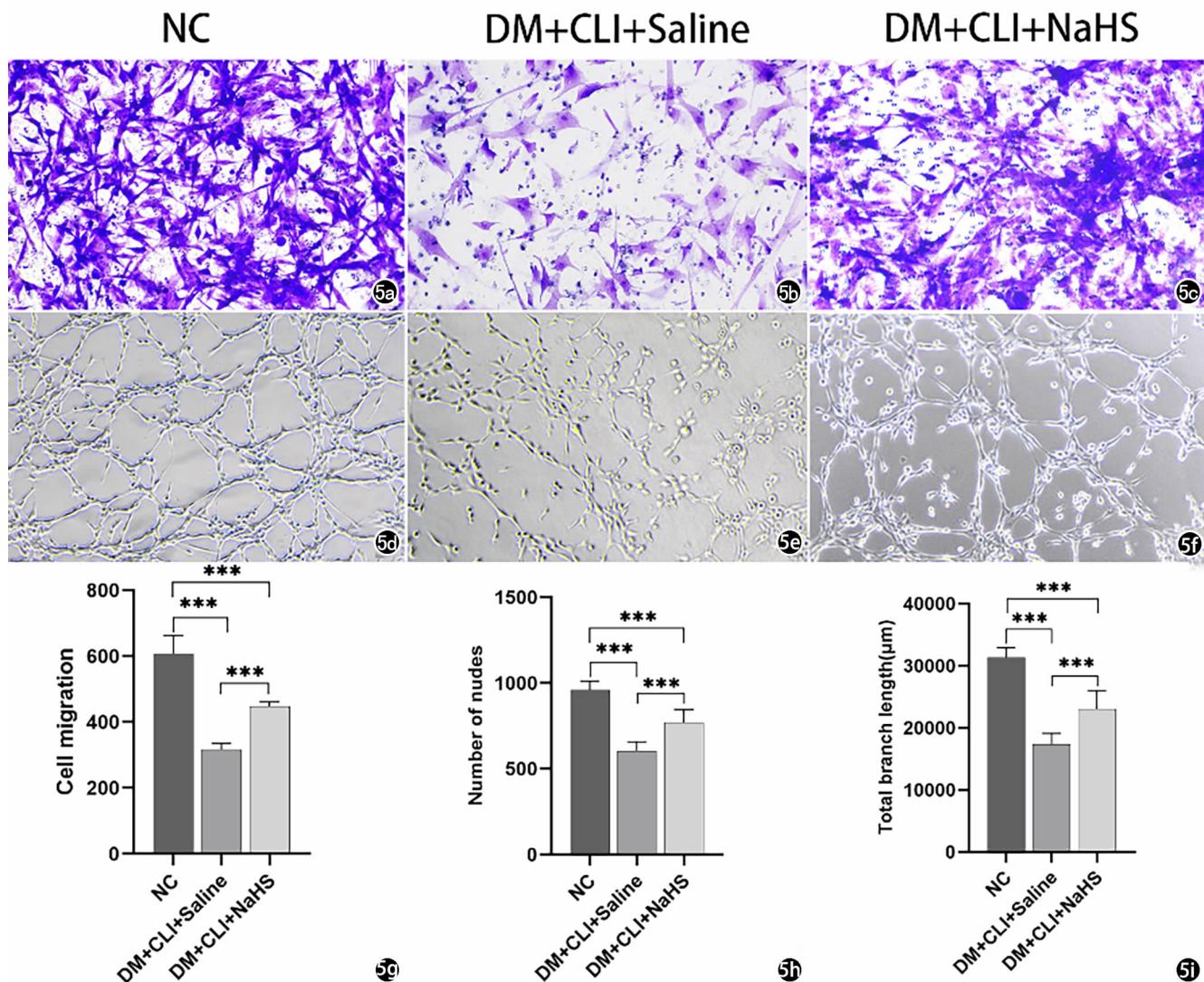


图 5 镜下各组实验兔第 3 周骨髓 EPCs 迁移($\times 100$)情况。a) NC 组; b) DM+CLI+Saline 组; c) DM+CLI+NaHS 组。镜下各组实验兔第 3 周骨髓 EPCs 成管($\times 100$)情况。d) NC 组; e) DM+CLI+Saline 组; f) DM+CLI+NaHS 组; g) 各组骨髓 EPCs 迁移数量差异柱状图; h) 各组骨髓 EPCs 总分支长度差异柱状图; i) 各组骨髓 EPCs 节点数差异柱状图。与 NC 组比较, DM+CLI+Saline 组骨髓来源 EPCs 迁移和成管功能明显受损; 与 DM+CLI+Saline 组相比, DM+CLI+NaHS 组 EPCs 迁移和成管功能上调。 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$, ns $P > 0.05$

症肢体缺血的患者自然病程演变存在差异; ②本研究将糖尿病重症肢体缺血造模成功后 3 周作为实验终点, 评估外源性 H₂S 干预第 3 周股骨上段微血管密度与未干预组之间的差异, 未对微血管密度进行连续评估, 其干预作用与组间病理变化的时序关系尚不清楚; ③本研究结果表明外源性 H₂S 干预后骨髓微血管通透性减低且骨髓内皮细胞氧化应激水平下降, 但未进行骨髓微环境层面的骨髓脂肪化程度及骨微结构改变的评估, 未来研究将进一步探讨 H₂S 在骨髓间充质干细胞的“成骨”及“成脂”转化过程中的作用。

综上所述, 利用 DCE-MRI 微血管渗透性参数评价外源性 H₂S 干预兔糖尿病重症肢体缺血骨髓氧化

应激水平和微血管渗透性是可行的, 可以为 H₂S 在糖尿病重症肢体缺血并发症中的血管内皮细胞保护机制提供定量影像学证据。

参考文献:

- [1] Nanayakkara N, Curtis AJ, Heritier S, et al. Impact of age at type 2 diabetes mellitus diagnosis on mortality and vascular complications: systematic review and meta-analyses [J]. Diabetologia, 2021, 64(2): 275-287.
- [2] Yadav S, Arya DK, Pandey P, et al. ECM Mimicking biodegradable nanofibrous scaffold enriched with curcumin/ZnO to accelerate diabetic Wound healing via multifunctional bioactivity [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 30 (17): 6843-6859.
- [3] Albiero M, Fadini GP. Pharmacologic targeting of the diabetic

- stem cell mobilopathy[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 135(9):18-24.
- [4] Fadini GP, DiPersio JF. Diabetes mellitus as a poor mobilizer condition[J]. *Blood Rev*, 2018, 32(3):184-191.
- [5] Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho M, et al. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(4):738-745.
- [6] Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, et al. Bone marrow alterations and lower endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e55592.
- [7] Teraa M, Fledderus JO, Rozbeh RI, et al. Bone marrow microvascular and neuropathic alterations in patients with critical limb ischemia[J]. *Circ Res*, 2014, 114(2):311-314.
- [8] Arumugam TV, Kennedy BK. H₂S to mitigate vascular aging: a SIRT1 connection[J]. *Cell*, 2018, 173(1):8-10.
- [9] Ma W, Zhong T, Chen J, et al. Exogenous H₂S reverses high glucose-induced endothelial progenitor cells dysfunction via regulating autophagy[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1):1126-1136.
- [10] Cheng Z, Garikipati VN, Nickoloff E, et al. Restoration of hydrogen sulfide production in diabetic mice improves reparative function of bone marrow cells[J]. *Circulation*, 2016, 134(19):1467-1483.
- [11] Hu L, Zha YF, Wang L, et al. Quantitative evaluation of vertebral microvascular permeability and fat fraction in alloxan-induced diabetic rabbits[J]. *Radiology*, 2018, 287(1):128-136.
- [12] Chen P, Zha Y, Wang L, et al. Evaluation of bone marrow texture and trabecular changes with quantitative DCE-MRI and QCT in alloxan-induced diabetic rabbit models [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 22 (12):785-792.
- [13] 杨柳, 查云飞, 陈翩翩, 等. 糖尿病合并严重肢体缺血动物模型的骨髓微血管改变:DCE-MRI 及基于 K^{trans}图的纹理分析[J]. 放射学实践, 2020, 35(08):978-984.
- [14] Liu B, Hu L, Wang L, et al. Evaluation of microvascular permeability of skeletal muscle and texture analysis based on DCE-MRI in alloxan-induced diabetic rabbits[J]. *Eur Radiol*, 2021, 31(8):5669-5679.
- [15] Yang Q, Li L, Zha Y, et al. Microvascular permeability and texture analysis of the skeletal muscle of diabetic rabbits with critical limb ischaemia based on DCE-MRI[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 18(13):783-791.
- [16] Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(12):3075-3084.
- [17] Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, et al. Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(3):498-508.
- [18] Geng Y, Li E, Mu Q, et al. Hydrogen sulfide inhalation decreases early blood-brain barrier permeability and brain edema induced by cardiac arrest and resuscitation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(3):494-500.
- [19] Kundu S, Pushpakumar SB, Tyagi A, et al. Hydrogen sulfide deficiency and diabetic renal remodeling: role of matrix metalloproteinase-9[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304 (12):E1365-E1378.
- [20] Nath N, Prasad HK, Kumar M. Cerebroprotective effects of hydrogen sulfide in homocysteine-induced neurovascular permeability: involvement of oxidative stress, arginase, and matrix metalloproteinase-9[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3):3007-3019.
- [21] Pan LL, Wang XL, Wang XL, et al. Sodium hydrosulfide prevents myocardial dysfunction through modulation of extracellular matrix accumulation and vascular density[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (12):23212-23226.
- [22] Behera J, Kelly KE, Tyagi N. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced ZO-1 CpG promoter hypermethylation-dependent vascular permeability via miR-218/DNMT3a axis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(10):6852-6867.
- [23] Liu F, Yuan L, Li L, et al. S-sulphydratation of SIRT3 combats BMSC senescence and ameliorates osteoporosis via stabilizing heterochromatic and mitochondrial homeostasis[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 192(1):106-114.
- [24] Liu Y, Yang R, Liu X, et al. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca²⁺ channel sulphydratation[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1):66-78.
- [25] Zhang Q, Liu S, Li T, et al. Preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells with hydrogen sulfide improves their therapeutic potential[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36):58089-58104.

(收稿日期:2023-11-02 修回日期:2023-12-15)