

亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠肝脏诱导型一氧化氮合酶的影响

张雄峰 戴成 王毅 杜欣欣 高云 帕孜丽亚·库尔班 阿地兰·艾尔肯 于湘友

830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学第一附属医院重症医学科

通讯作者: 于湘友, Email: yu2796@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.03.001

【摘要】 目的 探讨亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠肝脏诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响。**方法** 按随机数字表法将 126 只成年雌性 Wistar 大鼠分为假手术组、脓毒症组和亚甲蓝组, 每组再按术后第 0、6、12、18、24、30、36 h 给药分为 7 个亚组, 每个亚组 6 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症动物模型; 假手术组仅行开腹、分离盲肠系膜, 不进行结扎和穿孔。亚甲蓝组术后 0、6、12、18、24、30、36 h 经尾静脉注射亚甲蓝 15 mg/kg; 脓毒症组和假手术组给予等量生理盐水。各组于给药后 6 h 处死大鼠取肝组织, 用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 iNOS mRNA 表达, 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 iNOS 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 脓毒症组术后 0、6、12、18 h 肝组织 iNOS mRNA 表达明显升高($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 16.66±2.81 比 1.00±0.36, 12.26±5.78 比 1.00±0.30, 6.08±1.33 比 1.00±0.18, 2.42±0.64 比 1.00±0.12, 均 $P<0.01$), 24 h 后则无明显改变; 术后 6、12、18、36 h 肝组织 iNOS 蛋白表达明显升高(灰度值: 0.350±0.011 比 0.210±0.005, 1.460±0.085 比 0.090±0.005, 0.230±0.012 比 0.180±0.008, 0.310±0.017 比 0.200±0.010, 均 $P<0.01$)。与脓毒症组比较, 亚甲蓝组术后 0、12、18 h 肝组织 iNOS mRNA 表达明显降低($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 9.90±3.06 比 16.66±2.81, 1.56±0.58 比 6.08±1.33, 1.11±0.15 比 2.42±0.64, 均 $P<0.05$), 术后 6、12、18、36 h 肝组织 iNOS 蛋白表达明显降低(灰度值: 0.150±0.008 比 0.350±0.011, 0.950±0.009 比 1.460±0.085, 0.150±0.007 比 0.230±0.012, 0.170±0.009 比 0.310±0.017, 均 $P<0.05$)。**结论** 脓毒症大鼠 24 h 内肝脏 iNOS mRNA 和蛋白表达明显升高; 亚甲蓝可明显抑制脓毒症时肝脏 iNOS 表达。

【关键词】 脓毒症; 诱导型一氧化氮合酶; 亚甲蓝; 肝损伤

基金项目: 国家自然科学基金(81160232)

Effect of methylene blue on liver inducible nitric oxide synthase in rats with different stages of sepsis

Zhang Xiongfeng, Dai Cheng, Wang Yi, Du Xinxin, Gao Yun, Paziliya · Kuerban, Adilan · Aierken, Yu Xiangyou

Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, China

Corresponding author: Yu Xiangyou, Email: yu2796@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of methylene blue on the expression of liver inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rats with different stages of sepsis. **Methods** One hundred and twenty-six adult female Wistar rats were randomly divided into three groups: sham operation group, sepsis group and methylene blue group, each group was again subdivided into 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 hours subgroups, each subgroup 6 rats. The model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP) method, and in the sham operation group, the abdominal incision was performed and the intestinal mesentery was separated only, without ligation and perforation. In methylene blue group, 15 mg/kg methylene blue was injected into a caudal vein at 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 hours after CLP in the rats in corresponding subgroups, respectively; in the sepsis and sham operation subgroups, the same amount of 0.9% normal saline was given. After administration for 6 hours in various groups, the rats were sacrificed and the liver tissue was harvested immediately. The expression of iNOS mRNA of liver tissues was determined by the real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the protein expression of iNOS was determined by Western Blot. **Results** Compared with sham operation group, the liver tissue expression of iNOS mRNA was significantly up-regulated in sub-sepsis groups at 0, 6, 12 and 18 hours after CLP ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 16.66±2.81 vs. 1.00±0.36, 12.26±5.78 vs. 1.00±0.30, 6.08±1.33 vs. 1.00±0.18, 2.42±0.64 vs. 1.00±0.12, all $P<0.01$), after 24 hours the expression of iNOS mRNA had no significant change; the liver tissue expression of iNOS protein was obviously up-regulated in sub-sepsis groups at 6, 12, 18 and 36 hours after CLP (gray value: 0.350±0.011 vs. 0.210±0.005, 1.460±0.085 vs. 0.090±0.005, 0.230±0.012 vs. 0.180±0.008, 0.310±0.017 vs. 0.200±0.010, all $P<0.01$). Compared with sepsis group, the expression of the liver tissue iNOS mRNA was down-regulated in methylene blue subgroups at 0, 12 and 18 hours after CLP ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 9.90±3.06 vs. 16.66±2.81, 1.56±0.58 vs. 6.08±1.33, 1.11±0.15 vs. 2.42±0.64, all $P<0.05$), and the expression of iNOS protein was down regulated in methylene blue subgroups at 6, 12, 18 and 36 hours after CLP (gray value: 0.150±0.008 vs. 0.350±0.011, 0.950±0.009 vs. 1.460±0.085, 0.150±0.007 vs. 0.230±0.012, 0.170±0.009 vs. 0.310±0.017, all $P<0.05$). **Conclusion** Zero-24 hours after CLP, the expressions of mRNA iNOS and protein in liver of septic rats are significantly increased; methylene blue can markedly inhibit the expressions of iNOS mRNA and protein in the liver of rats with sepsis.

【Key words】 Sepsis; Inducible nitric oxide synthase; Methylene blue; Liver injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81160232)

现代观点认为,脓毒症早期机体在经受“第一次打击”时激活了诱导型一氧化氮合酶(iNOS),导致相应组织微血管内皮中大量一氧化氮(NO)生成;NO可使血管张力减弱,血压降低,甚至出现顽固性低血压,使各器官组织灌注不足,最终导致多器官功能障碍;而肝功能障碍是多器官功能障碍的重要组成部分,同时也是导致脓毒症患者病死率增加的主要原因^[1],故尽早采取干预措施抑制iNOS生成可能会减轻脓毒症患者肝损伤并最终改善预后。

既往一些针对一氧化氮合酶(NOS)抑制剂的研究显示,非选择性NOS抑制剂如546C88虽然可明显升高平均动脉压(MAP),但患者病死率也有明显升高^[2-3]。而亚甲蓝可有效提高脓毒症患者MAP,在维持全身血流动力学稳定的同时改善组织灌注,提高心血管对血管升压药的反应性,减少血管升压药的使用剂量^[4]。另有研究显示,亚甲蓝对百草枯中毒致急性肝损伤大鼠肝脏具有保护作用,其可能机制为减轻氧化损伤和抑制炎症反应^[5]。故亚甲蓝也可能是脓毒症肝损伤的有效治疗药物。本研究观察亚甲蓝对脓毒症大鼠肝组织iNOS mRNA和蛋白表达的影响及其表达的时间窗,探讨其治疗脓毒症肝损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:选择成年雌性Wistar大鼠126只,体质量180~220 g,购于新疆疾病控制与预防中心,动物合格证号:SCXK(新)2011-0001。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、脓毒症组和亚甲蓝组,每组再按术后第0、6、12、18、24、30、36 h给药分为7个亚组,每个亚组6只。

1.2 脓毒症模型制备:参照文献[6]介绍的盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症动物模型。经腹腔注射2%戊巴比妥3 mL/kg麻醉大鼠,结扎盲肠末端,用20G针头穿刺盲肠2次,挤出少量粪便后将盲肠放回腹腔,逐层缝合、关腹;假手术组仅行开腹和盲肠系膜分离,不进行结扎和穿孔。术后均皮下注射生理盐水30 mL/kg补液。

1.3 伦理学:本实验由新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准通过,并符合实验动物护理和使用指南。

1.3 分组处理:亚甲蓝组分别于术后0、6、12、18、24、30、36 h经尾静脉注射亚甲蓝15 mg/kg(由济川

药业集团有限公司生产,2 mL:20 mg);脓毒症组和假手术组给予等量生理盐水。

1.4 检测指标及方法:各组于给药后6 h处死大鼠取肝组织,置于液氮中,-80℃冰箱冻存待测。

1.4.1 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)测定iNOS mRNA表达:用TRIzol法提取总RNA,核酸定量仪测量总RNA浓度。反转录试剂盒反转录cDNA。荧光定量反应条件:95℃10 min,95℃变性10 s,60℃退火延伸30 s。引物由上海生工生物工程有限公司合成。iNOS引物序列:上游5'-CTCACTGTGGCTGTGGTCACCTA-3',下游5'-GGGTCTTCGGGCTTCAGGTTA-3',预期扩增产物大小101 bp;内参照基因3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH, NM_017008.4)引物序列:上游5'-GACATGCCCGCCTGGAGAAAC-3',下游5'-AGCCCA GGATGCCCTTTAGT-3',预期扩增产物大小92 bp。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

1.4.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定iNOS蛋白表达:肝组织在液氮中充分研磨后,用蛋白裂解液充分裂解,分离提纯,经电泳分离和转膜,5%脱脂牛奶封闭,4℃下加入iNOS抗体(1:1000,英国Abcam公司)和GAPDH抗体(1:1000,美国CST公司)孵育过夜,再将膜放入含二抗(美国CST公司)的溶液中37℃孵育1 h,Image J软件显色成像,并扫描灰度值。

1.5 统计学处理:使用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析,采用Kolmogorov-Smirnov法对计量资料进行正态性检验,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用LSD法,方差不齐时采用Tamhane T2法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠肝组织iNOS mRNA表达的影响(表1):脓毒症组和亚甲蓝组术后肝组织iNOS mRNA表达即较假手术组明显增高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),但随时间延长呈逐渐下降趋势,脓毒症组术后24 h降至假手术组水平,亚甲蓝组术后12 h即降至假手术组水平,且各时间点iNOS mRNA表达亚甲蓝组低于脓毒症组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

表 1 亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠肝组织 iNOS mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	iNOS mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)						
		术后 0 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 18 h	术后 24 h	术后 30 h	术后 36 h
假手术组	6	1.00 ± 0.36	1.00 ± 0.30	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.27	1.00 ± 0.23
脓毒症组	6	16.66 ± 2.81 ^a	12.26 ± 5.78 ^a	6.08 ± 1.33 ^a	2.42 ± 0.64 ^a	1.12 ± 0.14	0.97 ± 0.07	1.03 ± 0.18
亚甲蓝组	6	9.90 ± 3.06 ^{ac}	8.72 ± 1.45 ^b	1.56 ± 0.58 ^d	1.11 ± 0.15 ^d	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.10	1.03 ± 0.12
F 值		63.857	16.762	65.328	25.160	0.445	0.185	0.054
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.649	0.833	0.947

注：与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.05$ ；与脓毒症组比较，^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$

表 2 亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠肝组织 iNOS 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	iNOS 蛋白表达(灰度值)						
		术后 0 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 18 h	术后 24 h	术后 30 h	术后 36 h
假手术组	6	0.100 ± 0.004	0.210 ± 0.005	0.090 ± 0.005	0.180 ± 0.008	0.220 ± 0.007	0.150 ± 0.011	0.200 ± 0.010
脓毒症组	6	0.030 ± 0.003 ^a	0.350 ± 0.011 ^a	1.460 ± 0.085 ^a	0.230 ± 0.012 ^a	0.210 ± 0.010	0.160 ± 0.010	0.310 ± 0.017 ^a
亚甲蓝组	6	0.100 ± 0.010 ^c	0.150 ± 0.008 ^{ac}	0.950 ± 0.009 ^c	0.150 ± 0.007 ^{bc}	0.220 ± 0.011	0.160 ± 0.009	0.170 ± 0.009 ^{bc}
F 值		235.200	902.857	1 177.165	114.397	2.222	1.987	208.085
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.172	0.000

注：iNOS 为诱导型一氧化氮合酶；与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.05$ ；与脓毒症组比较，^c $P < 0.01$

2.2 亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠肝组织 iNOS 蛋白表达的影响(表 2；图 1)：与假手术组比较，脓毒症组和亚甲蓝组术后 6 h iNOS 蛋白即明显升高，术后 12 h 达峰值，术后 24 h 降至假手术组水平，且亚甲蓝组 iNOS 蛋白表达较同时间点脓毒症组明显降低(均 $P < 0.01$)。

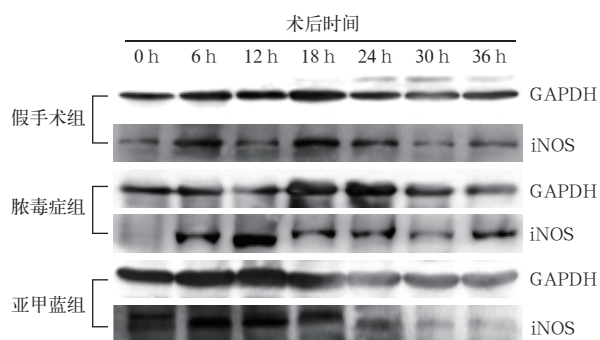


图 1 Western Blot 检测亚甲蓝治疗不同时期脓毒症大鼠肝组织 iNOS 蛋白表达

3 讨论

Sepsis 3.0 定义脓毒症为宿主对感染的反应失调，而导致危及生命的器官功能障碍^[7]，强调失调的宿主抗炎-促炎反应对各器官功能的影响。肝脏作为人体最大的“化工厂”，在机体代谢及防御方面起着重要的作用，也是脓毒症最常累及的重要器官之一。脓毒症引起的肝功能不全和肝衰竭分别占脓毒症患者的 34%~46% 和 1.3%~22.0%，减轻肝损伤可降低脓毒症患者的病死率^[8]。崔金玲等^[9]研究也显示，脓症患者早期肝功能障碍是导致死亡的一项独立预测因素，尽早采取干预措施以减轻肝功

能损害有助于改善患者预后。然而目前常用的脓毒症对症治疗，包括早期目标导向治疗(EGDT)，如足够的液体复苏、血流动力学支持及静脉抗菌药物治疗等，并不能有效改善患者病死率及预后^[10-11]。汪宗昱等^[12]研究显示，脓毒症时心肌抑制是可逆的，虽然会使左室收缩力下降和心室增大，但并不降低心排量，对其他器官功能也无影响，故脓毒症时导致肝脏损害的主要因素可能是局部微循环障碍；而脓毒症导致的局部微循环障碍在肝脏表现的尤为明显^[13]。有研究表明，姜黄素通过抑制肝细胞炎症反应、阻止细胞凋亡，从而对脓毒症大鼠肝脏起到保护作用^[14]；茵陈蒿汤则可通过提高肠内营养耐受性、降低腹内压、防止肠道菌群移位而改善脓毒症相关肝损伤患者的肝功能^[15]，表明从以上几方面着手治疗可以改善脓毒症相关急性肝损伤。

NOS 根据存在的部位分为 iNOS、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和神经型一氧化氮合酶(nNOS)3 种。正常生理情况下，eNOS、nNOS 产生的少量 NO 参与正常生理过程；病理情况下，iNOS 产生大量的 NO 并长时间作用于相应器官^[16]。对肝脏来说，NO 既是对抗损伤刺激因子的保护性物质，又是细胞损伤的基本介质，这在很大程度上依赖于 NO 的量以及诱导 NO 生成的 NOS 类型：在肝脏损伤过程中发挥主要作用的是 eNOS 和 iNOS，nNOS 不参与肝缺血/再灌注损伤过程^[17]；而在炎症状态下，iNOS 产生 NO 的能力远大于 eNOS，所以，iNOS 在肝脏病变中的作用可能更大。iNOS 诱导生成的大量 NO 会导致肝脏血循环障碍，进而造成肝脏生物

转化障碍、获得性免疫系统激活、线粒体损伤、DNA 损伤、细胞凋亡,最终导致肝损伤^[18-20]。La Mura 等^[21]研究发现,iNOS 表达上调可导致内毒素肝微血管功能障碍,甚至微血管内皮细胞凋亡,血管通透性增加。内皮功能障碍又是脓毒症进一步演变为多器官功能障碍的重要环节^[22]。

亚甲蓝是一种非选择性 NOS 抑制剂,能在病理情况下有效抑制 iNOS 的转录和表达,从而防止过量 NO 的生成。Huang 等^[23]研究发现,亚甲蓝通过降低细胞内核转录因子- κ B (NF- κ B) 及信号转导和转录激活因子 1 (STAT1) 与 iNOS 启动子结合,降低 iNOS mRNA 表达。而内毒素脂多糖介导的 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号转导通路正是通过对 NF- κ B 的活化来催化促炎反应,抑制 NF- κ B 的活化是治疗脓毒症的重要手段^[24]。Evgenov 等^[25]认为,亚甲蓝能减少脓毒症早期肺泡内液渗出,而对晚期脓毒症无效。本研究结果亦显示,脓毒症发生后 24 h 内肝脏 iNOS mRNA 和蛋白表达明显升高,24 h 及以后其表达无明显改变;而亚甲蓝对 iNOS mRNA 和蛋白的抑制作用亦表现在早期,这与 Chen 等^[26]的研究结果相符。但赵光举等^[27]研究发现,感染发生 1 h 后 iNOS 活性明显增强,24 h 后仍有较高活性,与本研究结果有所差异,仍待更多的实验来证实脓毒症时 iNOS 表达的时间窗。亚甲蓝可抑制 iNOS mRNA 转录,减少 iNOS 表达,同时还能直接抑制 iNOS 的活性^[28-29],减少 NO 的合成,从而减轻脓毒症的器官损伤程度。但戴成等^[30]研究并未发现亚甲蓝对脓毒症大鼠各时间点肺损伤程度有明显改善,故亚甲蓝治疗对脓毒症过程中各重要器官损伤的保护作用仍需进一步探讨。

综上所述,亚甲蓝能抑制脓毒症大鼠早期肝脏 iNOS 的转录和表达,从理论上来说,其可以通过抑制脓毒症时 NO 的过度释放而达到改善肝脏微循环的目的,使亚甲蓝防治脓毒症相关肝功能障碍具有一定可能性,但本研究仍存在测量指标单一等不足之处,贾冬等^[31]和李雄辉等^[32]的研究均显示,脓毒症时血乳酸水平与肝损伤密切相关,在后续研究中,可进一步探究亚甲蓝治疗对脓毒症大鼠血 NO、乳酸、转氨酶水平的影响,以明确亚甲蓝对脓毒症肝损伤的治疗价值。

志谢 真诚感谢新疆医科大学第一附属医院科技楼实验室老师的指导和帮助

参考文献

[1] Nessler N, Launey Y, Aninat C, et al. Clinical review: the liver in

- sepsis [J]. Crit Care, 2012, 16 (5): 235. DOI: 10.1186/cc11381.
- [2] Grover R, Zaccardelli D, Colice G, et al. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock [J]. Crit Care Med, 1999, 27 (5): 913-922.
- [3] López A, Lorente JA, Steingrub J, et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock [J]. Crit Care Med, 2004, 32 (1): 21-30. DOI: 10.1097/01.CCM.0000105581.01815.C6.
- [4] Kirov MY, Evgenov OV, Evgenov NV, et al. Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study [J]. Crit Care Med, 2001, 29 (10): 1860-1867.
- [5] 戴利, 庞庆丰, 张鹏, 等. 亚甲蓝对百草枯中毒大鼠急性肝损伤的保护作用及机制 [J]. 徐州医学院学报, 2015, 35 (3): 146-151.
Dai L, Pang QF, Zhang P, et al. Methylene blue attenuates acute liver injury induced by paraquat in rats [J]. Acta Academiae Medicinae Xuzhou, 2015, 35 (3): 146-151.
- [6] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 31-36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.
- [7] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [8] Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis [J]. Int Rev Immunol, 2014, 33 (6): 498-510. DOI: 10.3109/08830185.2014.889129.
- [9] 崔金玲, 任新生. 脓毒症发生早期肝功能障碍的临床研究 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2007, 12 (4): 251-252. DOI: 10.3969/j.issn.1671-301X.2007.04.005.
Cui JL, Ren XS. Early hepatic dysfunction in sepsis [J]. Lingnan J Emerg Med, 2007, 12 (4): 251-252. DOI: 10.3969/j.issn.1671-301X.2007.04.005.
- [10] Cawcutt KA, Peters SG. Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management [J]. Mayo Clin Proc, 2014, 89 (11): 1572-1578. DOI: 10.1016/j.mayocp.2014.07.009.
- [11] Mouncey PR, Osborn TM, Power GS, et al. Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock [J]. N Engl J Med, 2015, 372 (14): 1301-1311. DOI: 10.1056/NEJMoa1500896.
- [12] 汪宗显, 李宏亮, 么改琦, 等. 脓毒症心肌抑制对脓毒性休克患者血流动力学和器官功能及预后的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (3): 180-184. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.005.
Wang ZY, Li HL, Yao GQ, et al. Impacts of sepsis-induced myocardial dysfunction on hemodynamics, organ function and prognosis in patients with septic shock [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (3): 180-184. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.005.
- [13] Kanoore EVS, Dubin A, Ince C. The microcirculation as a therapeutic target in the treatment of sepsis and shock [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2011, 32 (5): 558-568. DOI: 10.1055/s-0031-1287864.
- [14] 尹海燕, 主有峰, 陶珮, 等. 姜黄素对脓毒症大鼠肝细胞的剂量保护效应 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (3): 252-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.03.012.
Yin HY, Zhu YF, Tao P, et al. The dose-dependent protective effect of curcumin on hepatocyte of rats with sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (3): 252-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.03.012.
- [15] 杨润华, 陈娇, 高戎, 等. 茵陈蒿汤治疗脓毒症相关肝损伤的临床应用研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (3): 248-252. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.007.
Yang RH, Chen J, Gao R, et al. The clinical research of yinchenhao decoction for treatment of liver injury induced by sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (3): 248-252. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.007.
- [16] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition [J]. Biochem J, 2001, 357 (Pt 3): 593-615.
- [17] Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, et al. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion [J]. Am J Surg, 2003, 185 (6): 589-595.
- [18] Clemens MG. Nitric oxide in liver injury [J]. Hepatology, 1999, 30 (1): 1-5. DOI: 10.1002/hep.510300148.

- [19] Vincent JL, Zhang H, Szabo C, et al. Effects of nitric oxide in septic shock [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161 (6): 1781–1785. DOI: 10.1164/ajrcem.161.6.9812004.
- [20] 易梦秋, 余雯. 脓毒症导致多器官功能障碍的发病机制 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32 (20): 3451–3454. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.20.048.
- Yi MQ, Yu M. Sepsis in the pathogenesis of multiple organ dysfunction [J]. *J Pract Med*, 2016, 32 (20): 3451–3454. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.20.048.
- [21] La Mura V, Pasarin M, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Liver sinusoidal endothelial dysfunction after LPS administration: a role for inducible-nitric oxide synthase [J]. *J Hepatol*, 2014, 61 (6): 1321–1327. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.014.
- [22] 杨霞, 李香琴, 马晓媛, 等. 脓毒症血管内皮损伤及调节策略的研究进展 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23 (1): 108–110. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.028.
- Yang X, Li XQ, Ma XY, et al. Research and development on the vascular endothelial injury and adjusting strategy in sepsis [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2016, 23 (1): 108–110. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.028.
- [23] Huang C, Tong L, Lu X, et al. Methylene blue attenuates iNOS induction through suppression of transcriptional factor binding amid iNOS mRNA transcription [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116 (8): 1730–1740. DOI: 10.1002/jcb.25132.
- [24] 汤超, 刘朝奇, 韩强. 脓毒症免疫干预措施的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2013, 16 (9): 1020–1022. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2013.09.019.
- Tang C, Liu CQ, Han Q. Research progress on sepsis and immune interventions [J]. *Chin Gen Pract*, 2013, 16 (9): 1020–1022. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2013.09.019.
- [25] Evgenov OV, Sager G, Bjertnaes LJ. Methylene blue reduces lung fluid filtration during the early phase of endotoxemia in awake sheep [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29 (2): 374–379.
- [26] Chen LW, Hwang YC, Chen CJ, et al. Burn-induced lung damage in rat is mediated by a nitric oxide/cGMP system [J]. *Shock*, 2003, 20 (4): 369–374. DOI: 10.1097/01.shk.0000086520.18735.df.
- [27] 赵光举, 李忠旺, 孙琦, 等. 血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶及一氧化氮的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17 (2): 99–101. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.02.011.
- Zhao GJ, Li ZW, Sun Q, et al. Effect of Xuebijing injection on inducible nitric oxide synthase activity and nitric oxide levels in lung of rats with *Vibrio vulnificus* sepsis [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2010, 17 (2): 99–101. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.02.011.
- [28] Lomniczi A, Cebal E, Canteros G, et al. Methylene blue inhibits the increase of inducible nitric oxide synthase activity induced by stress and lipopolysaccharide in the medial basal hypothalamus of rats [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2000, 8 (3): 122–127. DOI: 10.1159/000054271.
- [29] Kanter M, Sahin SH, Basaran UN, et al. The effect of methylene blue treatment on aspiration pneumonia [J]. *J Surg Res*, 2015, 193 (2): 909–919. DOI: 10.1016/j.jss.2014.08.039.
- [30] 戴成, 王毅, 于湘友. 亚甲蓝治疗对脓毒症大鼠肺脏诱导型一氧化氮合酶变化的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (2): 134–139. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.010.
- Dai C, Wang Y, Yu XY, et al. Effect of methylene blue on changes in inducible nitric oxide synthase in lung of rats with sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (2): 134–139. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.010.
- [31] 贾冬, 赵敏. 脓毒症大鼠血清乳酸、乳酸清除率及转氨酶水平与肝脏损伤关系的探讨 [J]. *中国医师杂志*, 2013, 15 (10): 1353–1357. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2013.10.016.
- Jia D, Zhao M. The levels of serum lactate, lactate clearance rate and transaminase in septic rats and their relationship with liver damage [J]. *J Chin Physician*, 2013, 15 (10): 1353–1357. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2013.10.016.
- [32] 李雄辉, 孔质彬. 脓毒症是否诱发急性肝功能障碍的危险因素及临床特征对比 [J]. *中国医师进修杂志*, 2014, 37 (27): 39–41. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4904.2014.27.014.
- Li XH, Kong ZB. Risk factors and clinical features on acute hepatic dysfunction induced by sepsis [J]. *Chin J Postgrad Med*, 2014, 37 (27): 39–41. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4904.2014.27.014.

(收稿日期: 2017-02-16)