

## • 论著 •

# 亚甲蓝治疗对脓毒症大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶变化的影响

戴成 王毅 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:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.010

**【摘要】目的** 观察亚甲蓝对脓毒症大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 转录及蛋白表达影响的时间窗及作用机制。**方法** 将 126 只雌性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为假手术(Sham)组、脓毒症组和亚甲蓝组,每组再按术后时间分为 0、6、12、18、24、30、36 h 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,Sham 组仅开腹和分离盲肠系膜但不结扎和穿孔;亚甲蓝组于 CLP 术后各时间点分别给予 15 mg/kg 亚甲蓝,其余大鼠给予等量生理盐水。于给药后 6 h 处死各组大鼠,收集肺组织标本,用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肺组织 iNOS mRNA 表达,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织 iNOS 蛋白表达,苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察肺组织病理学改变。**结果** 与 Sham 组比较,脓毒症组术后 6、12、18、24 h 肺组织 iNOS mRNA 表达明显升高( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :6 h 为  $2.42 \pm 0.66$  比  $1.00 \pm 0.38, P=0.002$ ; 12 h 为  $2.54 \pm 0.76$  比  $1.00 \pm 0.27, P=0.000$ ; 18 h 为  $5.46 \pm 2.26$  比  $1.00 \pm 0.38, P=0.000$ ; 24 h 为  $3.03 \pm 0.62$  比  $1.00 \pm 0.33, P=0.001$ ); 12、18、24 h iNOS 蛋白表达也明显升高(灰度值:12 h 为  $2.54 \pm 0.45$  比  $1.00 \pm 0.35, P=0.000$ ; 18 h 为  $2.65 \pm 0.64$  比  $1.00 \pm 0.33, P=0.000$ ; 24 h 为  $3.03 \pm 0.59$  比  $1.00 \pm 0.24, P=0.000$ )。与脓毒症组比较,亚甲蓝组 6、12、18、24 h 肺组织 iNOS mRNA 表达明显降低( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :6 h 为  $1.55 \pm 0.82$  比  $2.42 \pm 0.66, P=0.034$ ; 12 h 为  $1.84 \pm 0.42$  比  $2.54 \pm 0.76, P=0.016$ ; 18 h 为  $2.66 \pm 1.09$  比  $5.46 \pm 2.26, P=0.003$ ; 24 h 为  $2.20 \pm 0.29$  比  $3.03 \pm 0.62, P=0.002$ ); 12、18、24 h iNOS 蛋白表达也明显降低(灰度值:12 h 为  $1.84 \pm 0.18$  比  $2.54 \pm 0.45, P=0.003$ ; 18 h 为  $1.87 \pm 0.27$  比  $2.65 \pm 0.64, P=0.008$ ; 24 h 为  $2.20 \pm 0.50$  比  $3.03 \pm 0.59, P=0.008$ )。组织病理学观察显示,各时间点脓毒症组和亚甲蓝组大鼠肺损伤程度(包括红细胞渗出、肺间质水肿、炎性细胞浸润、肺泡塌陷等)均明显重于 Sham 组,而亚甲蓝组大鼠肺损伤程度较脓毒症组无明显改善。**结论** 脓毒症大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达于 CLP 术后 6~24 h 上调,蛋白表达则于 12~24 h 上调;亚甲蓝可明显抑制脓毒症大鼠肺组织 iNOS mRNA 和蛋白表达,但不能减轻脓毒症肺损伤的程度。

**【关键词】** 脓毒症; 诱导型一氧化氮合酶; 亚甲蓝; 肺损伤

基金项目:国家自然科学基金(81160232)

**Effect of methylene blue on changes in inducible nitric oxide synthase in lung of rats with sepsis Dai Cheng,**

**Wang Yi, 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 study the time course of effect of methylene blue on inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA transcription and protein expression in lung tissue of rats with sepsis, and its mechanism.

**Methods** 126 female Wistar rats were randomly divided into sham group, sepsis group and methylene blue group. Each group was subdivided into 0-, 6-, 12-, 18-, 24-, 30-, and 36-hour subgroups according to the time after operation, with 6 rats in each subgroup. A model of sepsis was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP), and the rats in sham group were only opened the abdominal cavity and isolated the membrane of the appendix without CLP. Rats in methylene blue group were given injection of 15 mg/kg methylene blue at all time points after CLP, the remaining rats were given 0.9%NaCl solution in same amount. Six hours after the injection, the rats were sacrificed and the lung tissue was harvested immediately. The expression of iNOS mRNA and protein in lung tissues were determined by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blot respectively, and the changes in histopathology were observed using hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** Compared with sham group, the expression of iNOS mRNA was significantly up-regulated at 6, 12, 18 and 24 hours after CLP in sepsis group

( $2^{-\Delta \Delta Ct}$ :  $2.42 \pm 0.66$  vs.  $1.00 \pm 0.38$  at 6 hours,  $P = 0.002$ ;  $2.54 \pm 0.76$  vs.  $1.00 \pm 0.27$  at 12 hours,  $P = 0.000$ ;  $5.46 \pm 2.26$  vs.  $1.00 \pm 0.38$  at 18 hours,  $P = 0.000$ ;  $3.03 \pm 0.62$  vs.  $1.00 \pm 0.33$  at 24 hours,  $P = 0.001$ ), and iNOS protein expression was significantly up-regulated at 12, 18 and 24 hours (gray value:  $2.54 \pm 0.45$  vs.  $1.00 \pm 0.35$  at 12 hours,  $P = 0.000$ ;  $2.65 \pm 0.64$  vs.  $1.00 \pm 0.33$  at 18 hours,  $P = 0.000$ ;  $3.03 \pm 0.59$  vs.  $1.00 \pm 0.24$  at 24 hours,  $P = 0.000$ ). Compared with sepsis group, the expression of iNOS mRNA was significantly down-regulated at 6, 12, 18 and 24 hours in methylene blue group ( $2^{-\Delta \Delta Ct}$ :  $1.55 \pm 0.82$  vs.  $2.42 \pm 0.66$  at 6 hours,  $P = 0.034$ ;  $1.84 \pm 0.42$  vs.  $2.54 \pm 0.76$  at 12 hours,  $P = 0.016$ ;  $2.66 \pm 1.09$  vs.  $5.46 \pm 2.26$  at 18 hours,  $P = 0.003$ ;  $2.20 \pm 0.29$  vs.  $3.03 \pm 0.62$  at 24 hours,  $P = 0.002$ ), and iNOS protein expression was significantly lowered at 12, 18 and 24 hours (gray value:  $1.84 \pm 0.18$  vs.  $2.54 \pm 0.45$  at 12 hours,  $P = 0.003$ ;  $1.87 \pm 0.27$  vs.  $2.65 \pm 0.64$  at 18 hours,  $P = 0.008$ ;  $2.20 \pm 0.50$  vs.  $3.03 \pm 0.59$  at 24 hours,  $P = 0.008$ ). Histopathological observation showed that the degree of lung injury at each time point, including red blood cells effusion, lung interstitial edema, inflammatory cell infiltration, alveolar collapse etc., in sepsis group and methylene blue group were significantly higher than that of sham group, and the degree of lung injury in rats with methylene blue was not significantly improved as compared with that of sepsis group. **Conclusions** Lung iNOS mRNA expression was significantly increased at 6–24 hours after CLP induced sepsis in rat, and protein expression was increased at 12–24 hours. Methylene blue could inhibit mRNA transcription and protein expression of iNOS in lung of septic rat, but failed to reduce the degree of lung injury in sepsis.

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

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

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS)，是导致死亡的主要原因。严重脓毒症患者的病死率波动在30%~50%，而脓毒性休克患者的病死率高达50%~87%<sup>[1-2]</sup>。林瑾等<sup>[3]</sup>观察419例严重脓毒症患者的重症加强治疗病房(ICU)病死率为43.9%，主要死因为呼吸道和胃肠道感染。在脓毒性休克导致的多器官损伤中，肺脏是最先受损的器官。近年来大量研究发现，诱导型一氧化氮合酶(iNOS)产生的一氧化氮(NO)是参与脓毒症病理生理过程的重要因素，3种一氧化氮合酶(NOS)亚型中，iNOS合成NO的能力最强<sup>[4]</sup>。iNOS产生的大量NO可调节血管平滑肌细胞可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)表达增加，使环磷酸鸟苷(cGMP)聚集，导致血管张力降低、血压下降，甚至顽固性低血压；肺内中性粒细胞表达的iNOS参与了脓毒症肺损伤，而且iNOS可增加脓毒症肺蛋白质的漏出，使肺换气难度增加，组织器官更加缺氧<sup>[5-7]</sup>。

在非选择性NOS抑制剂治疗脓毒症的Ⅲ期临床试验研究中发现，非选择性NOS抑制剂可明显升高平均动脉压(MAP)，但也增加了脓毒症患者的病死率<sup>[8-10]</sup>。而Kirov等<sup>[11]</sup>的一项研究则显示，亚甲蓝的作用不同于上述抑制剂，它可明显提高脓毒症时的MAP，维持全身血流动力学稳定，改善组织灌流，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；同时还可减少iNOS引起的肺蛋白漏出，减轻肺水肿，改善肺气体交换。因此，亚甲蓝可能是治疗脓毒症有效的药物，但脓毒症肺iNOS

mRNA转录及蛋白表达的时间窗及亚甲蓝的作用机制尚未明确，故本研究对此进行观察，以明确亚甲蓝的有效给药时机。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物：**健康成年雌性Wistar大鼠，体质量180~220 g，购自新疆维吾尔自治区疾病控制与预防中心，动物合格证号：SCXK(新)2011-0001。动物饲养于温度和光亮可控的室内[(23±2)℃，以12 h白昼/黑夜交替循环]，自由进食和饮水。

**1.2 实验分组及处理：**126只Wistar大鼠按随机数字表法分为假手术(Sham)组、脓毒症组和亚甲蓝治疗组，每组再分为术后0、6、12、18、24、30、36 h 7个亚组，每个亚组6只。亚甲蓝治疗组于术后各时间点经尾静脉给予15 mg/kg亚甲蓝(由济川药业集团有限公司生产)，脓毒症组和假手术组给予等量生理盐水。

**1.3 脓毒症模型制备：**采用改良盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型<sup>[12]</sup>。2%戊巴比妥0.03 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠，盲肠末端进行无梗阻性结扎，用20G针头穿刺盲肠2次，挤出少许粪便后还纳腹腔，勿造成肠梗阻，腹壁分2层缝合。Sham组大鼠仅行开腹手术和盲肠系膜分离，不进行结扎和穿孔。术后所有大鼠皮下注射30 mL/kg生理盐水。

**1.4 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，研究符合实验动物护理和使用指南。动物处置过程符合动物伦理学要求。

**1.5 检测指标及方法：**各组于给药后6 h处死大鼠，

取肺脏,部分组织置于液氮中-80℃冰箱储存待测iNOS mRNA和蛋白表达,剩余组织用4%多聚甲醛固定以备组织病理学观察。

**1.5.1 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织iNOS mRNA表达:**取肺脏组织,TRIzol法提取总RNA,并用核酸定量仪测量总RNA水平。用反转录试剂盒(由美国Thermo公司提供)反转录cDNA,荧光定量反应条件均为95℃10 min,95℃变性10 s,60℃退火延伸30 s。iNOS荧光定量引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,预期PCR扩增产物大小为101 bp;内参基因3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列为美国CST公司产品(NM\_017008.4),扩增产物大小预计为92 bp。表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

**1.5.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定肺组织iNOS蛋白表达:**肺组织在液氮中充分研磨后用蛋白裂解液充分裂解,分离提纯后进行电泳分离、转膜、脱脂牛奶封闭,加入iNOS抗体(英国Abcam公司产品)和GAPDH(1:1000)孵育,最后显色成像并扫描灰度值。以iNOS与GAPDH的灰度值比值作为iNOS蛋白表达量。

**1.6 统计学处理:**采用SPSS 17.0软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 亚甲蓝对脓毒症大鼠肺组织iNOS mRNA表达的影响(表1):**脓毒症大鼠术后随时间延长肺组织iNOS mRNA表达逐渐增加,18 h达峰值后逐渐降低。3组间于术后6 h即出现统计学差异( $P<0.01$ ),30 h才恢复至接近0 h水平。与Sham组相比,脓毒症组术后6、12、18、24 h iNOS mRNA表达明显升高(均 $P<0.01$ );而亚甲蓝组iNOS mRNA表达较同时点脓毒症组明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。术后30 h和36 h 3组大鼠肺组织iNOS mRNA表达差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。

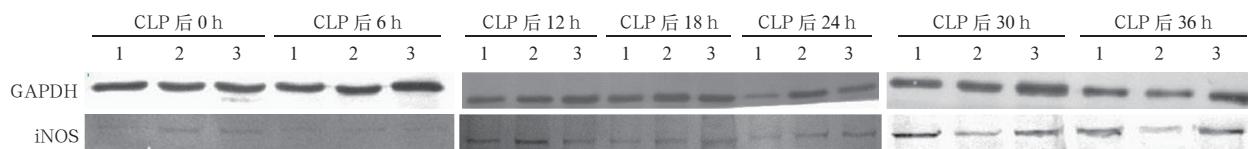
**2.2 亚甲蓝对脓毒症大鼠肺组织iNOS蛋白表达的影响(图1;表2):**脓毒症大鼠术后随时间延长肺组织iNOS蛋白表达量逐渐增加,24 h达峰值后逐渐下降。3组间于术后12 h时即出现了统计学差异( $P<0.01$ ),直至30 h时才恢复至0 h水平。与Sham组相比,脓毒症组术后12、18、24 h iNOS蛋白表达均明显升高(均 $P<0.01$ );而亚甲蓝组iNOS蛋白表达较同时点脓毒症组明显减少(均 $P<0.01$ )。术后30 h和36 h 3组大鼠肺组织iNOS蛋白表达均无明显差异(均 $P>0.05$ )。

**2.3 亚甲蓝对脓毒症大鼠肺组织病理学改变的影响(图2):**Sham组肺泡结构正常。脓毒症组术后0 h肺泡结构基本正常,6~24 h肺泡内出现了明显的红细胞渗出、肺间质水肿、细胞浸润伴肺泡塌陷,

表1 亚甲蓝对CLP致脓毒症大鼠术后不同时间点肺组织iNOS mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数 (只)	iNOS mRNA 表达量( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )						
		CLP 后 0 h	CLP 后 6 h	CLP 后 12 h	CLP 后 18 h	CLP 后 24 h	CLP 后 30 h	CLP 后 36 h
Sham组(1)	6	1.00±0.24	1.00±0.38	1.00±0.27	1.00±0.38	1.00±0.33	1.00±0.24	1.00±0.25
脓毒症组(2)	6	1.04±0.21	2.42±0.66	2.54±0.76	5.46±2.26	3.03±0.62	1.32±0.27	1.03±0.23
亚甲蓝组(3)	6	0.98±0.25	1.55±0.82	1.84±0.42	2.66±1.09	2.20±0.29	1.09±0.31	1.19±0.31
组间比较 1:2 的 P 值		0.909	0.002	0.000	0.000	0.001	0.084	0.986
1:3 的 P 值		0.727	0.194	0.005	0.000	0.849	0.719	0.650
2:3 的 P 值		0.644	0.034	0.016	0.003	0.002	0.158	0.662

注:CLP为盲肠结扎穿孔术,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,Sham为假手术



CLP为盲肠结扎穿孔术,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;

1为假手术(Sham)组,2为脓毒症组,3为亚甲蓝治疗组

图1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测亚甲蓝对CLP致脓毒症大鼠术后不同时间点肺组织iNOS蛋白表达的影响

表2 亚甲蓝对CLP致脓毒症大鼠术后不同时间点肺组织iNOS蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	iNOS蛋白表达量(灰度值)						
		CLP后0 h	CLP后6 h	CLP后12 h	CLP后18 h	CLP后24 h	CLP后30 h	CLP后36 h
Sham组(1)	6	1.00±0.33	1.00±0.22	1.00±0.35	1.00±0.33	1.00±0.24	1.00±0.28	1.00±0.31
脓毒症组(2)	6	1.14±0.45	1.11±0.34	2.54±0.45	2.65±0.64	3.03±0.59	0.96±0.21	1.03±0.32
亚甲蓝组(3)	6	0.97±0.38	1.00±0.13	1.84±0.18	1.87±0.27	2.20±0.50	1.07±0.24	1.19±0.28
组间比较1:2的P值		0.543	0.435	0.000	0.000	0.000	0.770	0.858
1:3的P值		0.902	0.995	0.001	0.004	0.000	0.645	0.297
2:3的P值		0.466	0.439	0.003	0.008	0.008	0.454	0.383

注: CLP为盲肠结扎穿孔术, iNOS为诱导型一氧化氮合酶, Sham为假手术

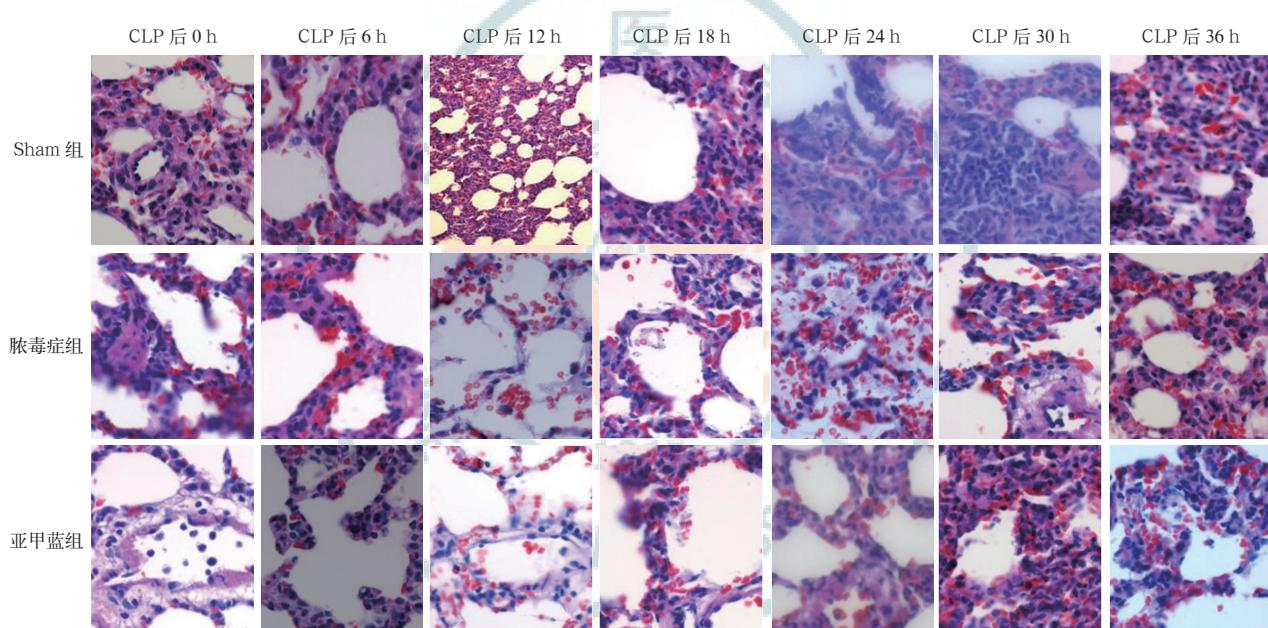


图2 光镜下观察亚甲蓝对盲肠结扎穿孔术(CLPI致脓毒症大鼠术后不同时间点肺组织病理学改变的影响 假手术(Sham)组各时间点肺泡内仅有少量红细胞,肺泡结构正常。脓毒症组术后0 h可见肺泡内有少量红细胞,肺泡结构基本正常;术后6~24 h肺泡内可见大量红细胞渗出,肺间质明显水肿,严重细胞浸润,伴有肺泡塌陷;术后30~36 h肺泡内仍可见红细胞、肺间质水肿及炎性细胞浸润。亚甲蓝组术后各时间点大鼠肺损伤程度未见明显改善 HE染色 高倍放大

直至30~36 h仍可见上述变化。亚甲蓝组术后0 h和6 h肺泡结构基本正常;12 h后肺泡内红细胞渗出、肺间质水肿、炎性细胞浸润和肺泡塌陷等表现稍轻于同时间点脓毒症组,但总的说来亚甲蓝组各时间点肺损伤程度并未见明显改善。

### 3 讨论

脓毒症尤其是严重脓毒症及脓毒性休克,一直是外科ICU患者死亡的主要原因。研究表明,脓毒症是急性肺损伤(ALI)发生的危险因素,脓毒性休克是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者28 d死亡的危险因素<sup>[13]</sup>。

研究发现,脓毒症时内毒素和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等炎性介质刺激诱导iNOS合成,而肺的

氧化应激和氮化应激依赖于炎性细胞内iNOS的存在<sup>[14]</sup>。在脓毒症小鼠模型研究中发现,抑制iNOS和敲除iNOS基因后,脓毒症小鼠肺脏损伤明显轻于未经治疗者,说明iNOS可能增加了肺脏毛细血管通透性,导致肺脏富含蛋白质的渗出液增加<sup>[7]</sup>。La Mura等<sup>[15]</sup>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,使血管通透性增加;Gill等<sup>[16]</sup>发现,iNOS可损害脓毒症肺微血管屏障功能,增加肺微血管白蛋白超通透性和肺损伤。因此,脓毒症肺脏微血管上皮损伤可能是导致脓毒症肺损伤的重要原因<sup>[17]</sup>。iNOS大量合成的NO可刺激下游sGC高表达,使血管平滑肌细胞内cGMP聚集,血管平滑肌持续舒张,导致顽固性低

血压,引起组织器官缺血、缺氧,继而出现多器官功能障碍甚至衰竭,最终导致死亡。因此,调控 iNOS 表达,抑制 NO 过度合成,有可能控制脓毒症发生。

亚甲蓝是一种非选择性 NOS 抑制剂,可以抑制 NO 过度合成,逆转脓毒症低血压,维持血流动力学稳定。有研究显示,亚甲蓝可减轻肺损伤<sup>[18-19]</sup>,延迟实验动物死亡。Evgenov 等<sup>[20]</sup>认为,亚甲蓝能减少早期脓毒症肺渗出而对晚期脓毒症无效,同时还能明显降低脓毒症时的 MAP 和肺血管阻力。Kirov 等<sup>[11]</sup>的研究发现,脓毒性休克患者给予亚甲蓝后氧合指数( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ )无改变,且患者的氧传递指数明显增高,说明亚甲蓝不会改变脓毒性休克患者的氧合。刘少华等<sup>[21]</sup>的研究显示,亚甲蓝维持脓毒症血流动力学稳定的同时不影响氧合。Huang 等<sup>[22]</sup>研究发现,亚甲蓝通过抑制细胞内核转录因子-κB(NF-κB)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 的转录。本研究发现,亚甲蓝可以明显抑制 CLP 术后 6~24 h iNOS mRNA 的转录,与 Chen 等<sup>[23]</sup>的研究结果相符;同时 CLP 术后 12~24 h iNOS 蛋白表达明显增加,而同一时间点亚甲蓝组 iNOS 蛋白表达明显降低,这主要与亚甲蓝抑制 iNOS mRNA 转录、减少蛋白表达有关,但亚甲蓝是否直接影响 iNOS 蛋白表达尚需进一步研究。

iNOS 是导致脓毒症低血压和肺脏损伤的主要原因。赵光举等<sup>[24]</sup>研究发现, iNOS 的活性在感染发生 1 h 后明显增强,24 h 后仍维持较高活性。亚甲蓝不仅可通过抑制 iNOS mRNA 转录减少 iNOS 的表达,而且可直接抑制 iNOS 活性,减少 NO 合成,从而可能减轻脓毒症器官损伤程度<sup>[25-26]</sup>,因此,抑制 iNOS 可能是治疗脓毒性休克的重要途径。虽然亚甲蓝能有效维持血流动力学稳定,提高组织灌注、增加氧摄取<sup>[27]</sup>,但其不能明显改善脓毒症大鼠肺损伤的程度<sup>[28]</sup>。本研究中的病理学观察结果也表现出相似的现象,提示可能存在其他的因素导致脓毒症器官损伤。

综上所述,亚甲蓝因价廉、低毒、副作用少,可有效逆转脓毒症相关的难治性低血压,改善血管对血管升压药物的反应性,使其成为治疗脓毒症的理想药物,但其治疗脓毒症的作用机制及临床应用价值有待进一步研究证实。

**志谢** 衷心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] Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, et al. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost [J]. J Crit Care, 2005, 20 (1): 46-58. DOI: 10.1016/j.jcrc.2004.10.005.
- [2] Rodríguez F, Barrera L, De La Rosa G, et al. The epidemiology of sepsis in Colombia: a prospective multicenter cohort study in ten university hospitals [J]. Crit Care Med, 2011, 39 (7): 1675-1682. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318218a35e.
- [3] 林瑾, 刘培, 庄海舟, 等. 重症监护病房 419 例重度脓毒症患者的临床分析 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (3): 171-174. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.009.
- [4] Lin J, Liu P, Zhuang HZ, et al. The clinical analysis of 419 severe sepsis patients in intensive care unit [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (3): 171-174. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.009.
- [5] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition [J]. Biochem J, 2001, 357 (Pt 3): 593-615. DOI: 10.1042/bj3570593.
- [6] Wang L, Taneja R, Razavi HM, et al. Specific role of neutrophil inducible nitric oxide synthase in murine sepsis-induced lung injury in vivo [J]. Shock, 2012, 37 (5): 539-547. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31824dcb5a.
- [7] Farley KS, Wang LF, Razavi HM, et al. Effects of macrophage inducible nitric oxide synthase in murine septic lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290 (6): L1164-1172. DOI: 10.1152/ajplung.00248.2005.
- [8] Lange M, Nakano Y, Traber DL, et al. Role of different nitric oxide synthase isoforms in a murine model of acute lung injury and sepsis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 399 (2): 286-291. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.071.
- [9] Cobb JP, Natanson C, Hoffman WD, et al. N omega-amino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin [J]. J Exp Med, 1992, 176 (4): 1175-1182. DOI: 10.1084/jem.176.4.1175.
- [10] Grover R, Zaccardelli D, Colice G, et al. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock [J]. Crit Care Med, 1999, 27 (5): 913-922. DOI: 10.1097/00003246-199905000-00025.
- [11] 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.
- [12] 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. DOI: 10.1097/00003246-200110000-00002.
- [13] Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal [J]. J Surg Res, 1980, 29 (2): 189-201. DOI: 10.1016/0022-4804(80)90037-2.
- [14] Ge QG, Yao ZY, Wang TH, et al. Risk factors of the occurrence and death of acute respiratory distress syndrome: a prospective multicenter cohort study [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (11): 773-779. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.002.
- [15] Razavi HM, Wang L, Weicker S, et al. Pulmonary oxidant stress in murine sepsis is due to inflammatory cell nitric oxide [J]. Crit

- Care Med, 2005, 33 (6): 1333–1339. DOI: 10.1097/01.CCM.0000165445.48350.4F.
- [15] La Mura V, Pasarín M, Rodriguez-Villarrupla 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.
- [16] Gill SE, Taneja R, Rohan M, et al. Pulmonary microvascular albumin leak is associated with endothelial cell death in murine sepsis-induced lung injury in vivo [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e88501. DOI: 10.1371/journal.pone.0088501.
- [17] 喻文, 罗红敏. 内皮功能障碍是老龄小鼠感染性休克多器官功能衰竭和死亡的潜在原因:一项盲肠结扎穿孔术小鼠模型的临床前研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (10): 736. Yu W, Luo HM. Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (10): 736.
- [18] Galili Y, Kluger Y, Mianski Z, et al. Methylene blue—a promising treatment modality in sepsis induced by bowel perforation [J]. Eur Surg Res, 1997, 29 (5): 390–395. DOI: 10.1159/000129548.
- [19] Galili Y, Ben-Abraham R, Weinbroum A, et al. Methylene blue prevents pulmonary injury after intestinal ischemia-reperfusion [J]. J Trauma, 1998, 45 (2): 222–226. DOI: 10.1097/00005373-199808000-00004.
- [20] 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. DOI: 10.1097/00003246-200102000-00028.
- [21] 刘少华, 许载, 徐鑫荣. 亚甲蓝对感染性休克犬血液动力学和氧合功能的影响 [J]. 江苏医药, 2003, 29 (2): 110–112. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3685.2003.02.011. Liu SH, Xu J, Xu XR. Effects of methylene blue on hemodynamics and oxygenation in dog with septic shock [J]. Jiangsu Med J, 2003, 29 (2): 110–112. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3685.2003.02.011.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Lomniczi A, Cebral 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.
- [26] 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.
- [27] 任同悦, 李媛, 王方, 等. 感染性休克犬应用亚甲蓝对肠道灌注和氧合的影响 [J]. 中国医师杂志, 2003, 5 (9): 1213–1214, 1218. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2003.09.030. Ren TY, Li Y, Wang F, et al. Effects of methylene blue on intestinal perfusion and oxygenation in dogs with septic shock [J]. J Chin Physician, 2003, 5 (9): 1213–1214, 1218. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2003.09.030.
- [28] 王毅, 郑晓娟, 于湘友. 亚甲蓝对不同时期脓毒症大鼠心、肺功能的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35 (7): 906–911. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2012.07.011. Wang Y, Xi XJ, Yu XY. Effects of methylene blue on heart and lung function of septic rats in different periods [J]. J Xinjiang Med Univ, 2012, 35 (7): 906–911. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2012.07.011.

(收稿日期: 2015-07-27)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)

## • 读者 • 作者 • 编者 •

### 本刊对文后参考文献著录格式的有关要求

按 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》执行,采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出,并将序号置于方括号中排列于文后。内部刊物、未发表资料(不包括已被接受的待发表资料)、个人通信等请勿作为文献引用,确需引用时,可将其在正文相应处注明。日文汉字请按日文规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过3人全部著录;超过3人可以只著录前3人,后依文种加表示“,”等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后,外国人的名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点。不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”“and”等连词。题名后标注文献类型标志,文献类型和电子文献载体标志代码参照GB 3469-1983《文献类型与文献载体代码》。外文期刊名称用缩写,可以采用国际医学期刊编辑委员会推荐的 NLM's Citing Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256>)中的格式;中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页码,对有DOI编号的文章必须著录DOI,列于末尾。参考文献必须由作者与其原文核对并无误。文后参考文献为中文时须双语著录,用双语著录参考文献时,首先应用信息资源的原语种,然后用其他语种著录。作者姓名的英译文采用汉语拼音形式表示,姓的首字母大写,名按音节首字母大写的缩写形式。中文刊名使用其刊名的英文简称,不使用汉语拼音名称,无规范英文简称者著录全部英文刊名。

#### 示例:

- [1] 支琳琳,冯伟,郭轶男,等.感染性休克患者不同时期液体负荷对机体影响的前瞻性临床研究 [J].中华危重病急救医学, 2015, 27 (1): 13–16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.01.004. Zhi LL, Feng W, Guo YN, et al. Clinical influence of liquid loading at different stages in septic shock patients [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (1): 13–16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.01.004.