

亚甲蓝在重度失血性休克中的治疗效果

朱华栋, 于春华, 王厚力, 王 仲, 于学忠

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院急诊科, 北京 100730

通信作者: 于学忠 电话: 010-65295301, 传真: 010-65295327, 电子邮件: yxz@medmail.com.cn

摘要: **目的** 研究亚甲蓝在重度失血性休克中的治疗效果。**方法** 采用兔失血性休克-复苏模型, 分为休克组、亚甲蓝组(复苏时应用亚甲蓝), 观察休克前后肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素(IL)-6、IL-8、一氧化氮(NO)、乳酸(LA)、平均动脉压(MAP)的变化, 及动物12 h存活率。**结果** 动物失血性休克后, 血浆TNF α 、IL-6、IL-8、NO、LA水平较休克前显著升高($P < 0.01$); 复苏后, 亚甲蓝组动物MAP明显高于休克组($P < 0.01$), 而血浆中TNF α 、IL-6、IL-8、NO、LA水平显著低于休克组($P < 0.01$); 两组动物的存活率差异无显著性。**结论** 尽管亚甲蓝未改善重度失血性休克动物的预后, 但能帮助升高并维持休克动物的血压, 对休克的治疗有一定价值。

关键词: 失血性休克; 细胞因子; 一氧化氮; 亚甲蓝

中图分类号: R605.971 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2008)02-0136-04

Effects of Methylene Blue on Refractory Hemorrhagic Shock

ZHU Hua-dong, YU Chun-hua, WANG Hou-li, WANG Zhong, YU Xue-zhong

Department of Emergency Medicine, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: YU Xue-zhong Tel: 010-65295301, Fax: 010-65295327, E-mail: yxz@medmail.com.cn

ABSTRACT: Objective To evaluate the effects of methylene blue (MB) on refractory hemorrhagic shock. **Methods** Totally 24 rabbits subjected to prolonged hemorrhagic shock and resuscitation were randomly divided into hemorrhagic shock group (12 rabbits) and MB group (12 rabbits; MB was administered immediately after resuscitation was performed). The plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL)-6, IL-8, nitric oxide (NO), lactic acid (LA), and mean arterial pressure (MAP) were detected before shock, immediately after resuscitation, and 0.5, 2, and 4 hours after resuscitation. The 12-hour survival rates were observed. **Results** The plasma levels of TNF α , IL-6, IL-8, NO and LA after shock were significantly higher than before shock ($P < 0.01$), and maintained at high levels. Compared with the shock group, higher MAP and lower plasma levels of TNF α , IL-6, IL-8, NO, and LA were observed in the MB group after resuscitation ($P < 0.01$). The 12-hour survival rates were not significantly different between shock group and MB group. **Conclusion** Although MB can not improve the prognosis of refractory hemorrhagic shock, it can increase and maintain the MAP and thus play a beneficial role in the treatment of hemorrhagic shock.

Key words: hemorrhagic shock; cytokines; nitric oxide; methylene blue

Acta Acad Med Sin, 2008, 30(2): 136-139

在失血性休克的发展过程中, 许多因素参与其中, 如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-8、一

氧化氮 (nitric oxide, NO) 均促进休克的发生、发展, 消除它们的作用将有助于休克的纠正。亚甲蓝对一氧化氮合酶和鸟苷酸环化酶均有抑制作用^[1],

本研究主要探讨亚甲蓝在重度失血性休克中的治疗效果。

材料和方法

实验动物 24只新西兰大白兔(北京协和医院动物房提供)4~6月龄,体重 (2.68 ± 0.35) kg,雌雄各半,随机分成失血性休克(shock, S)组和亚甲蓝(methylene blue, M)组,每组12只,动物在实验前禁食12 h,禁水8 h。

实验方法 S组按Wiggers改良法^[2],经股动脉放血制作失血性休克模型。大白兔用3%戊巴比妥钠溶液30 mg/kg腹腔麻醉成功后,行右侧股、动静脉插管术,动脉插管接换能器与多功能监护仪连接,用来监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP),静脉插管用作补液和取血,术中严格无菌操作,术后伤口缝合。上述操作完成后,静脉注射肝素6 mg/kg将大白兔全身肝素化,经右股动脉快速放血(约10 min)使MAP降至30~35 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),维持90 min,然后回输全部失血及等量的林格氏液进行复苏30 min,以后用5%葡萄糖盐水以 $2.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度静脉维持点滴。M组休克模型制作同S组,在进行复苏时,除回输全部失血及等量的林格氏液外,同时在10 min内静脉注射1%亚甲蓝(江苏济川制药有限公司提供)2 mg/kg。

观察指标 两组动物均在休克前、休克末、复苏末、复苏后0.5、2、4 h记录MAP的变化,并分别在上述时间点抽血2 ml测定血浆中TNF α 、IL-6、IL-8、NO、乳酸(lactic acid, LA)的水平;观察12 h存活率。TNF α 、IL-6、IL-8的测定采用ELISA法,试剂盒由Sigma公司提供;NO的测定采用Griess重氮化反应法,试剂盒由北京邦定泰克公司提供;LA的测定采用酶显色法,试剂盒由北京金豪制药公司提供。

统计学处理 组间相同指标的比较采用单因素方差分析,组内不同条件下同一指标比较用无重复数据的两因素方差分析,均数的两两比较用 q 检验;率的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

结 果

MAP变化情况 S组和M组动物基础血压分别为 (105.4 ± 6.9) 、 (103.9 ± 7.4) mmHg,组间比较

差异无显著性;复苏末两组动物MAP均基本恢复至休克前基础血压水平,组间比较差异无显著性[S组和M组MAP分别为 (101.3 ± 4.7) 、 (100.2 ± 6.2) mmHg];复苏后0.5 h, S组MAP (77.9 ± 10.6) mmHg与同时间点M组MAP (99.7 ± 8.8) mmHg比较,差异具有显著性($P < 0.01$);复苏后2 h, S组MAP (66.8 ± 12.7) mmHg与同时间点M组MAP (87.9 ± 9.8) mmHg比较,差异具有显著性($P < 0.01$);复苏后4 h, S组MAP (58.8 ± 13.4) mmHg与同时间点M组MAP (83.6 ± 11) mmHg比较,差异具有显著性($P < 0.01$)。

血浆TNF α 、IL-6、IL-8、NO、LA水平变化

两组动物休克末血浆TNF α 、NO、LA水平显著高于休克前($P < 0.01$);两组动物复苏末、复苏后0.5 h、复苏后2 h、复苏后4 h血浆TNF α 、IL-6、IL-8、NO、LA水平显著高于休克前($P < 0.01$);复苏后0.5 h M组动物血浆TNF α 、NO、LA水平显著低于S组($P < 0.01$);复苏后2 h、复苏后4 h M组动物血浆TNF α 、IL-6、IL-8、NO、LA水平均显著低于S组($P < 0.01$)(表1)。

两组动物存活情况 两组动物中所有个体均存活至复苏后4 h。观察至12 h, M组存活率为41.7%,与S组存活率33.3%比较,差异无显著性($P > 0.05$)。

讨 论

失血性休克的主要治疗手段是尽早液体复苏,近年又提出新的观点如小容量液体复苏或延迟复苏等^[3,4]。单纯液体复苏并不能挽救所有休克患者的生命,还需要配合其他的治疗手段。从病理生理的角度研究休克的发生发展过程发现, TNF α 、IL-6、IL-8、NO在休克向不可逆转化的过程中起着重要的作用,其机制主要由于休克后肠道缺血损害了肠道屏障,使肠道细菌、内毒素移位导致内毒素血症,内毒素可刺激单核-巨噬细胞合成、释放大量的TNF α 、IL-1、IL-6等细胞因子^[5],其中TNF α 能引起中性粒细胞的趋化、聚集和黏附于血管内皮细胞,导致内皮细胞受损,它还能诱导IL-6、IL-8等因子释放^[6]。Wang等^[7]研究显示失血性休克后肠道通透性增加与肠道局部和全身IL-6合成上调有关。IL-8对粒细胞有强大的趋化性,能使粒细胞脱颗粒,释放溶酶体酶、蛋白水解酶、氧自由基等,对组织细胞造成损害。

表 1 两组动物休克前后血浆 TNF α 、IL-6、IL-8、NO、LA 的变化Table 1 Changes of plasma levels of TNF α , IL-6, IL-8, NO, and LA before and after shock

指标 Indicators	分组 Groups	休克前 Before shock	休克末 After shock	复苏末 Just after resuscitation	复苏后 0.5 h Half an hour after resuscitation	复苏后 2 h 2 hours after resuscitation	复苏后 4 h 4 hours after resuscitation
TNF α (ng/L)	S	19.22 \pm 4.07	70.69 \pm 11.33 *	77.46 \pm 10.54 *	76.27 \pm 9.03 *	66.19 \pm 11.04 *	63.99 \pm 11.48 *
	M	19.36 \pm 4.31	73.04 \pm 12.6 *	74.71 \pm 11.86 *	58.55 \pm 11.38 **	37.84 \pm 8.46 **	31.91 \pm 7.56 **
IL-6 (ng/L)	S	10.56 \pm 2.24	12.28 \pm 2.16	25.1 \pm 5.49 *	53.87 \pm 10.96 *	80.01 \pm 14.78 *	68.25 \pm 11.56 *
	M	11.44 \pm 2.77	13.47 \pm 3.79	24.87 \pm 4.09 *	54.39 \pm 9.72 *	47.85 \pm 11.86 **	20.94 \pm 6.72 **
IL-8 (ng/L)	S	45.3 \pm 8.0	48.1 \pm 8.7	69.3 \pm 11.1 *	159.3 \pm 30.6 *	258.5 \pm 50.5 *	229.0 \pm 52.2 *
	M	46.3 \pm 7.5	47.9 \pm 7.4	64.4 \pm 10.8 *	140.1 \pm 20.5 *	123.9 \pm 27.8 **	85.6 \pm 23.8 **
NO (μ mol/L)	S	22.00 \pm 4.18	69.06 \pm 11.23 *	78.29 \pm 10.52 *	93.02 \pm 8.54 *	82.22 \pm 9.16 *	73.31 \pm 10.56 *
	M	25.83 \pm 4.82	67.68 \pm 12.41 *	83.36 \pm 9.08 *	61.91 \pm 10.46 **	49.98 \pm 11.46 **	39.03 \pm 8.71 **
LA (mmol/L)	S	1.39 \pm 0.38	5.89 \pm 0.93 *	5.31 \pm 1.32 *	5.83 \pm 1.14 *	6.31 \pm 0.86 *	6.77 \pm 1.06 *
	M	1.43 \pm 0.51	6.14 \pm 1.21 *	5.45 \pm 1.18 *	4.11 \pm 0.49 **	3.98 \pm 0.45 **	3.49 \pm 0.71 **

TNF α : 肿瘤坏死因子 α ; IL: 白细胞介素; NO: 一氧化氮; LA: 乳酸; S: 休克组, M: 亚甲蓝组; 与同组休克前比较, * $P < 0.01$; 与同时时间点 S 组比较, # $P < 0.01$

TNF α : tumor necrosis factor α ; IL: interleukin; NO: nitric oxide; LA: lactic acid; S: shock group; M: methylene blue group; * $P < 0.01$ compared with the pre-shock levels in the same group; # $P < 0.01$ compared with levels of shock group at the same time

失血性休克后机体生成的大量 NO 主要是 TNF α 、IL-6、IL-8 等细胞因子激活诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的结果。iNOS 在创伤、休克、感染等病理情况下活性增加, 合成大量 NO, 参与对各脏器功能的损害, 合成 NO 的一氧化氮合酶除 iNOS 外, 还有结构型一氧化氮合酶 (constitutive nitric oxide synthase, cNOS), cNOS 合成 NO 则参与机体的正常生理功能^[8]。NO 在失血性休克的发展中有以下 3 方面的作用: (1) 通过提高血管内皮细胞中的鸟苷酸环化酶的活性, 促使磷酸鸟苷环化并产生环磷酸鸟苷, 细胞内的环磷酸鸟苷水平升高, 导致 Ca²⁺ 依赖性 K⁺ 通道开放, 血管平滑肌松弛, 最终导致血管扩张、血压下降^[9]; (2) NO 能抑制血小板和中性粒细胞的聚集和黏附, 防止血流速度减慢和血管内凝血等情况发生^[10]; (3) 升高的 NO 又能促进细胞因子的合成、释放, 主要通过上调核转录因子 κ B, 激活机体免疫系统合成大量的细胞因子, 发生瀑布反应^[11]。

消除 NO 对机体的病理损害, 主要通过应用 NOS 抑制剂。NOS 抑制剂主要有两类: (1) 对 cNOS 及 iNOS 均有抑制作用: 如 L-单甲基-精氨酸、L-硝基-精氨酸甲酯、L-硝基-精氨酸等; (2) 仅对 iNOS 具有抑制作用: 如氨基胍 (aminoguanidine)、L-刀豆氨酸 (L-canavanine)、S-甲基-异硫脲 (S-methyl-isothiourea) 等, 已有多项研究证实 iNOS 抑制剂对休克有治疗作用^[12, 13]。

有研究显示亚甲蓝能改善感染性休克和心脏术

后低血压患者的预后^[14, 15], 甚至对常规治疗效果欠佳的过敏性休克也有较好的治疗效果^[16]。其机制主要通过氧化对鸟苷酸环化酶活化起关键作用的亚铁血红蛋白和 (或) 硫醇, 选择性抑制鸟苷酸环化酶。阻断了鸟苷酸环化酶的后续过程, 纠正休克的低血压状态, 同时还能将细胞内鸟苷酸环化酶中 Fe²⁺ 氧化为 Fe³⁺ 而直接抑制 NOS 活性, 抑制了 NO 的病理性生成, 因而对休克的病理过程具有一定的逆转作用^[17, 18]。

本研究显示亚甲蓝在一定阶段内能改善重度失血性休克的低血压状态, 减少细胞因子的生成, 降低乳酸水平, 对失血性休克有一定治疗价值, 但并未影响重度失血性休克的预后, 可能有以下几方面原因: (1) 失血性休克的晚期阶段有许多病理因素参与, 单纯阻断一种因素并不能解决所有问题; (2) NO 在失血性休克的发生、发展中发挥着双刃剑的作用, 既有病理性作用, 又有生理性调节作用, 应用亚甲蓝在阻断其病理作用的同时, 其有益的生理调节作用也随之消失, 导致预后不佳; (3) 亚甲蓝的剂量和使用方法可能需要改进。

综上, 本研究从动物实验角度, 证实亚甲蓝在重度失血性休克中有一定效果, 但仍需要进行更大规模、更细致的研究去评价该药在失血性休克中的具体价值。

参 考 文 献

[1] Jeroukhimov I, Weinbroum A, Ben-Avraham R, et al.

- Effect of methylene blue on resuscitation after hemorrhagic shock [J]. *Eur J Surg*, 2001, 167(10):742-747.
- [2] Wiggers HC, Ingraham RC. Hemorrhagic shock: definition and criteria for its diagnosis [J]. *J Clin Invest*, 1946, 25(1):30-36.
- [3] Stern SA. Low-volume fluid resuscitation for presumed hemorrhagic shock: helpful or harmful [J]? *Current Opinion Crit Care*, 2001, 7(6):422-430.
- [4] Xiao N, Wang XC, Diao YF, *et al.* Effect of initial fluid resuscitation on subsequent treatment in uncontrolled hemorrhagic shock in rats [J]. *Shock*, 2004, 21(3):276-280.
- [5] Jiang JX, Bahrami S, Leichtfried G, *et al.* Kinetics of endotoxin and tumor necrosis factor appearance in portal and system circulation after hemorrhagic shock in rats [J]. *Ann Surg*, 1995, 221(1):100-106.
- [6] Dinarello CA. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1997, 11(3):91-103.
- [7] Wang W, Smail N, Wang P, *et al.* Increased gut permeability after hemorrhage is associated with upregulation of local and systemic IL-6 [J]. *J Surg Res*, 1998, 79(1):39-46.
- [8] Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases [J]. *Inflammopharmacology*, 2007, 15(6):252-259.
- [9] Szabo C, Billiar TR. Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock [J]. *Shock*, 1999, 12(1):1-9.
- [10] Kurose I, Wolf R, Grisham MB, *et al.* Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide [J]. *Circ Res*, 1994, 74(3):376-382.
- [11] Hieholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, *et al.* Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(6):917-928.
- [12] Bakker J, Grover R, McLuckie A, *et al.* Administration of the nitric oxide synthase inhibitor N^G-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(1):1-12.
- [13] Siegemund M, van Bommel J, Schwarte LA, *et al.* Inducible nitric oxide synthase inhibition improve intestinal microcirculatory oxygenation and CO₂ balance during endotoxemia pigs [J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(7):985-992.
- [14] Memis D, Karamanlioglu B, Yuksel M, *et al.* The influence of methylene blue infusion on cytokine levels during severe sepsis [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2002, 30(6):755-762.
- [15] Levin RL, Degrange MA, Bruno GF, *et al.* Methylene blue reduces mortality and morbidity in vasoplegic patients after cardiac surgery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(2):496-499.
- [16] Evora PR, Simon MR. Role of nitric oxide production in anaphylaxis and its relevance for the treatment of anaphylactic hypotension with methylene blue [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2007, 99(4):306-313.
- [17] Kwok ES, Howes D. Use of methylene blue in sepsis: a systematic review [J]. *J Intensive Care Med*, 2006, 21(6):359-363.
- [18] Chiassi S, Sun YS, Kim VB, *et al.* Methylene blue enhancement of resuscitation after refractory hemorrhagic shock [J]. *J Trauma*, 2004, 57(3):515-521.

(2007-11-06 收稿)