

· 实验研究 ·

亚甲蓝对大鼠机械通气相关肺损伤中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性小体的影响

张本旺 蒋娟 马福国 孙立新 王明山

【摘要】 目的 评价亚甲蓝对大鼠机械通气相关损伤(VILI)中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体的影响。**方法** 清洁级成年雄性 SD 大鼠 36 只,8 周龄,体重 240~260 g,采用随机数字表法分为三组:自主呼吸对照组(C 组)、大潮气量模型组(H 组)和大潮气量+亚甲蓝组(MB 组),每组 12 只。三组大鼠均行气管切开插管术,MB 组经腹腔注射 1% 亚甲蓝 50 mg/kg,10 min 后以 V_T 20 ml/kg 行机械通气;C 组经腹腔注射等容量生理盐水后保持自主呼吸;H 组经腹腔注射等容量生理盐水,10 min 后以 V_T 20 ml/kg 行机械通气。通气参数:FiO₂ 21%,I:E 1:1,RR 80 次/分,PEEP 0,通气时间 4 h。于基础状态、通气结束时经颈总动脉取血行血气分析,通气结束后颈总动脉放血处死大鼠,收集肺组织标本、支气管肺泡灌洗液(BALF)。光镜下观察肺组织病理学改变,记录肺损伤评分,计算肺组织湿/干重比值(W/D)。采用 ELISA 法测定 BALF 中总蛋白含量以及血清、BALF 中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 浓度;鲁米诺化学发光法检测肺组织中活性氧(ROS)含量;RT-PCR 法及 Western blot 法分别检测肺组织 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)mRNA 表达量及蛋白含量。**结果** 与 C 组比较,H 组肺损伤评分、W/D 明显升高($P<0.01$),BALF 中总蛋白以及血清、BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 浓度明显升高($P<0.01$),肺组织中 ROS 含量、NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达量及蛋白含量明显升高($P<0.01$)。与 H 组比较,MB 组肺损伤评分、W/D 明显降低($P<0.05$),BALF 中总蛋白以及血清、BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 浓度明显降低($P<0.05$),肺组织中 ROS 含量、NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达量及蛋白含量明显降低($P<0.05$)。**结论** 亚甲蓝通过抑制大鼠肺组织中 NLRP3 炎性小体的激活,阻碍促炎因子 IL-1 β 及 IL-18 的形成,减轻大鼠 VILI。

【关键词】 亚甲蓝;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性小体;机械通气;机械通气相关肺损伤

Effect of methylene blue on nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome in rats with ventilator-induced lung injury ZHANG Benwang, JIANG Juan, MA Fuguo, SUN Lixin, WANG Mingshan. Department of Anesthesiology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266071, China

Corresponding author: SUN Lixin, Email: sunlixin1221@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of methylene blue on nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in ventilator-induced lung injury (VILI) in rats, and explore its function in VILI. **Methods** Thirty-six clean adult male Sprague-Dawley (SD) rats, weighing 240–260 g, aged 8 weeks, were randomly divided into three groups ($n = 12$): spontaneous breathing control group (group C), high tidal volume group (group H, V_T 20 ml/kg) and high tidal volume + methylene blue group (group MB, V_T 20 ml/kg). All of the rats underwent tracheotomy intubation. Rats in group C were kept spontaneous breathing. Rats in group H received mechanical ventilation with V_T 20 ml/kg. Methylene blue 50 mg/kg was injected intraperitoneally 10 minutes before mechanical ventilation with V_T 20 ml/kg in rats of group MB. Mechanical ventilation parameter settings were as following: FiO₂ 21%, I:E 1:1, ventilation frequency 80 times/min, PEEP 0 for 4 hours. Blood gas analysis was performed through the common carotid artery at the basic state and at the end of ventilation, the rats were sacrificed due to carotid artery bleeding, as well as bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected. Pathological changes of lung tissue were observed under light microscope, lung injury

DOI:10.12089/jca.2020.08.015

基金项目:青岛市医疗卫生优秀学科带头人项目(VDTR2017Y11)

作者单位:266071 青岛大学附属青岛市市立医院麻醉科

通信作者:孙立新,Email: sunlixin1221@sina.com

score and wet/dry (W/D) ratio of lung tissue were measured. The contents of total protein in BALF and the levels of interleukin (IL)-1 β and IL-18 in blood serum and BALF were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The content of reactive oxygen species (ROS) in lung tissue was determined by chemiluminescence technique. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of NLRP3, apoptosis-related spot-like protein (ASC), and caspase-1 in lung tissue. **Results** Compared with group C, the lung injury score and W/D ratio of group H were significantly increased ($P < 0.01$). The levels of IL-1 β and IL-18 in serum and BALF of group H were increased ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression of NLRP3, ASC, and caspase-1 of group H were up-regulated in lung tissue ($P < 0.01$). Compared with group H, the lung injury score and W/D ratio of group MB were significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β and IL-18 in serum and BALF of group MB were decreased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of NLRP3, ASC, and caspase-1 of group MB were down-regulated in lung tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** Methylene blue alleviates VILI in rats by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome, as well as hindering the formation of IL-1 β and IL-18 in the lung tissue of rats.

【Key words】 Methylene blue; Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome; Mechanical ventilation; Ventilator-induced lung injury

机械通气相关肺损伤 (ventilator-induced lung injury, VILI) 是机械通气的常见并发症之一,其主要发生机制是机械外力对肺泡的直接损伤,以及机械损伤引发的肺泡和全身循环系统中炎症因子的释放^[1]。VILI 主要病理生理改变包括肺泡结构改变、肺泡毛细血管通透性增加、炎症细胞因子激活释放、氧化抗氧化平衡失调等^[2]。VILI 可引起肺泡巨噬细胞线粒体中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生^[3], ROS 可激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体^[4]。NLRP3 炎性小体激活后可促进促炎因子白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 的成熟与释放,介导“瀑布样”炎症反应^[5]。亚甲蓝属于吩噻嗪类化合物,能够抑制氧自由基及超氧化物的产生,稳定线粒体,减少细胞凋亡^[6-7],可改善动脉氧合,减轻肺泡损伤,发挥一定的肺保护作用^[8]。但是亚甲蓝在 VILI 中的作用尚不明确,本实验拟通过建立大鼠 VILI 模型,探讨亚甲蓝对 VILI 的影响。

材料与方 法

实验仪器与试剂 Trizol 总 RNA 提取试剂, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (货号: RR047A), SYBR® Premix Ex Taq™ II (货号: RR820A), 内参 β -actin、NLRP3、ASC、caspase-1 引物, NLRP3、ASC、caspase-1 及内参 β -actin 一抗 (批号: ARG58568、ARG55122、ARG57293、BE0021), 山羊抗兔二抗 (批号: BE0101), ROS 检测试剂盒, BCA 蛋白浓度试剂盒, IL-1 β 和 IL-18 ELISA 试剂盒, 小动物呼吸机 (型号: RWD407), PCR 仪 (型号: MP-32), nanodrop 分光光度计, 紫外分析仪 (型号:

JY02S), 荧光定量 PCR 仪 (型号: ABI7500)。AVL 全自动血气分析仪。

实验动物与分组 清洁级成年雄性 SD 大鼠 36 只, 8 周龄, 体重 240~260 g, 由济南朋悦实验单位繁育有限公司提供, 动物合格证号: SCXK (鲁) 20140007。于室温 23~26 °C、安静环境下常规饲养 1 周以适应环境。采用随机数字表法将大鼠分为三组: 自主呼吸对照组 (C 组)、大潮气量模型组 (H 组)、大潮气量+亚甲蓝组 (MB 组), 每组 12 只。

模型制备 禁食 8 h, 自由饮水, 三组大鼠经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg, 麻醉后均行气管切开插管术, 经右侧颈内静脉建立静脉通路。参考文献 [9] 的方法建立大鼠 VILI 模型, C 组大鼠保持自主呼吸, H 组、MB 组经右侧颈内静脉注射罗库溴铵 0.1 mg/kg, 待大鼠自主呼吸消失后连接小动物呼吸机行机械通气 4 h, V_T 20 ml/kg, FiO_2 21%, I : E 1 : 1, RR 80 次/分, PEEP 0。机械通气前 10 min, MB 组参考文献 [10] 的方法经腹腔注射 1% 亚甲蓝 50 mg/kg, C 组、H 组经腹腔注射等量生理盐水。

标本采集 于气管插管即刻、机械通气结束即刻经右侧颈动脉分别抽取血液 2 ml 行血气分析, 机械通气 4 h 后再经右侧颈动脉抽取血液 5 ml, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 取上清-80 °C 保存备检, 后颈动脉放血处死大鼠。迅速取出大鼠肺组织, 结扎大鼠右肺, 取右肺上叶置于 5 ml 离心管中备检; 取大鼠右肺中叶置于 4% 多聚甲醛中备检; 取大鼠右肺下叶保存于液氮中备检。用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 5 ml 经气管导管灌洗大鼠左肺 3 次, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF) 5 ml, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清-80 °C 保存备检。

动脉血气分析检测 气管插管前即刻、通气结

束后采集右侧颈总动脉血液,行血气分析,记录 PaO_2 。

肺组织病理学检查 取大鼠右肺中叶,4%多聚甲醛固定 24 h,经石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察各组肺组织病理学改变。

肺损伤评分和肺组织湿/干重比值(W/D)测定 参考文献[11]的方法行肺损伤评分。取大鼠右肺上叶,滤纸吸干表面水分,称湿质量,后将其放入 80℃电热烘干箱烘干至恒重,称干质量,计算肺组织 W/D。

BALF 中总蛋白含量检测 采用 BCA 法检测大鼠 BALF 中总蛋白含量,操作步骤依据 BCA 蛋白浓度试剂盒说明书进行。

血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量检测 采用 ELISA 法检测大鼠血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 浓度,操作步骤依据 ELISA 试剂盒说明书进行。

肺组织中 ROS 含量检测 采用鲁米诺化学发光法检测大鼠肺组织中 ROS 含量,操作步骤依据 ROS 检测试剂盒说明书进行。

肺组织 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 表达量检测 取大鼠右肺下叶部分组织,液氮研磨后采用 Trizol 一步法提取肺组织总 RNA,操作步骤依据说明书进行。紫外吸收测定法测定 RNA 的浓度、纯度。采用 RT-PCR 法检测肺组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 表达量,用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪扩增 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA。内参 β -actin、NLRP3、ASC 和 caspase-1 的引物序列为: β -actin-F 5'-TCCTGTGGCATCCATGAAACT-3', β -actin-R 5'-GAAGCATTTGCGGTGCACGAT-3'; NLRP3-F 5'-CAGGCGATCAACAGGCGAGAC-3', NLRP3-R 5'-AGAGATATCCCAGCAAACCTATCCA-3'; ASC-F 5'-TGTGCTTAGAGACATGGGCATACAG-3', ASC-R 5'-GCCATACAGAGCATCCAGCAA-3'; caspase-1-F 5'-ACTCGTACACGCTTGGCCCTCA-3', caspase-1-R 5'-CTGGGCAGGCAGCAAATTC-3'。RT-PCR 反应体系:95℃ 30 s 预变性,95℃ 5 s 变性,60℃ 34 s 退火,共 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参 Ct 值)进行各组间差异比较,数据分析应用仪器自带软件。

肺组织 NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白含量检测 采用 Western blot 法检测肺组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白含量。将大鼠右肺下叶部分组织剪成米粒样大小置于预冷研钵中研磨,加入组织细胞

裂解液,冰上静置 30 min 后经 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。-80℃冰箱中取出总蛋白样品,溶化后加入 5 $\times$ 上样缓冲液,95℃条件下反应 10 min,经 SDS-PAGE、PVDF 膜湿转法转膜,转膜条件为电流 130 mA,电压 60 V,转膜时间为 60 min。封闭液中封闭 1 h 后加入 NLRP3 一抗(1:1 000)、ASC 一抗(1:1 000)、caspase-1 一抗(1:1 000),内参 β -actin 一抗(1:5 000),4℃孵育过夜,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。将一抗反应膜放入山羊抗兔二抗(1:5 000)中室温孵育 1 h,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。使用 Image J 软件扫描蛋白条带灰度值,用蛋白条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值表示目的蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

大鼠 PaO_2 三组气管插管前即刻 PaO_2 差异无统计学意义。与气管插管即刻比较,通气结束后 H 组、MB 组 PaO_2 明显降低($P<0.01$)。与 C 组比较,通气结束后 H 组、MB 组 PaO_2 明显降低($P<0.01$)。与 H 组比较,通气结束后 MB 组 PaO_2 明显升高($P<0.05$)(表 1)。

表 1 三组大鼠不同时点 PaO_2 的比较(mmHg, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	气管插管前即刻	通气结束后
C 组	12	90.1 $\pm$ 11.8	91.1 $\pm$ 11.2
H 组	12	91.2 $\pm$ 14.2	50.2 $\pm$ 8.3 ^{ab}
MB 组	12	90.1 $\pm$ 11.2	61.0 $\pm$ 8.9 ^{abc}

注:与气管插管前即刻比较,^a $P<0.01$;与 C 组比较,^b $P<0.01$;与 H 组比较,^c $P<0.05$

大鼠肺组织病理学改变 光镜下,C 组肺泡结构正常,肺泡壁边界连续清楚。H 组可见肺泡壁断裂,肺间质明显水肿,中性粒细胞等炎性细胞渗出。MB 组肺组织损伤较 H 组轻,肺泡壁增厚,肺间质可见水肿,少量炎性细胞渗出(图 1)。

大鼠肺损伤评分及肺组织 W/D 与 C 组比较,H 组、MB 组肺损伤评分及 W/D 明显升高($P<0.01$)。与 H 组比较,MB 组肺损伤评分及 W/D 明显降低($P<0.05$)(表 2)。

大鼠 BALF 中总蛋白含量 与 C 组比较,H 组、

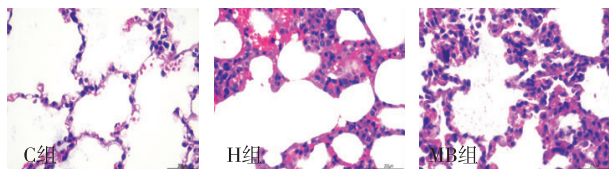


图 1 三组大鼠光镜下肺组织 HE 染色图 (×400)

表 2 三组大鼠肺损伤评分及肺组织 W/D 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肺损伤评分(分)	W/D
C 组	12	3.3±1.5	4.0±1.9
H 组	12	9.4±0.9 ^a	8.6±1.4 ^a
MB 组	12	7.1±1.4 ^{ab}	6.8±2.3 ^{ab}

注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 H 组比较,^b $P<0.05$

MB 组 BALF 中总蛋白含量明显升高 ($P<0.01$)。与 H 组比较,MB 组 BALF 中总蛋白含量明显降低 ($P<0.05$) (图 2)。

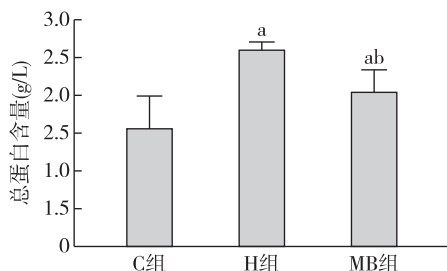
注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 H 组比较,^b $P<0.05$

图 2 三组大鼠 BALF 中总蛋白含量的比较

大鼠血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 浓度与 C 组比较,H 组、MB 组血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 浓度明显升高 ($P<0.01$)。与 H 组比较,MB 组血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 浓度明显降低 ($P<0.05$) (图 3—4)。

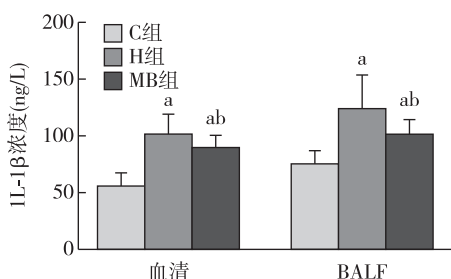
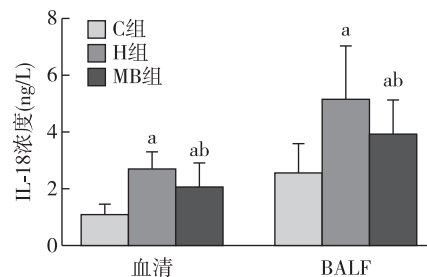
注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 H 组比较,^b $P<0.05$ 图 3 三组大鼠血清和 BALF 中 IL-1 β 浓度的比较注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 H 组比较,^b $P<0.05$

图 4 三组大鼠血清和 BALF 中 IL-18 浓度的比较

大鼠肺组织 ROS 含量与 C 组比较,H 组、MB 组肺组织中 ROS 含量明显升高 ($P<0.01$)。与 H 组比较,MB 组肺组织中 ROS 含量明显降低 ($P<0.05$) (图 5)。

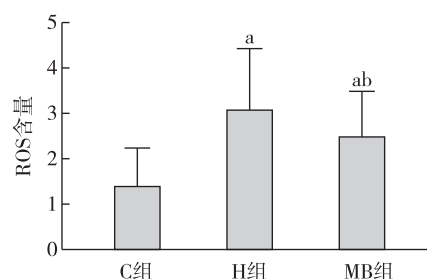
注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 H 组比较,^b $P<0.05$

图 5 三组大鼠肺组织 ROS 含量的比较

大鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达量与 C 组比较,H 组、MB 组肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达量明显升高 ($P<0.01$)。与 H 组比较,MB 组肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.05$) (图 6)。

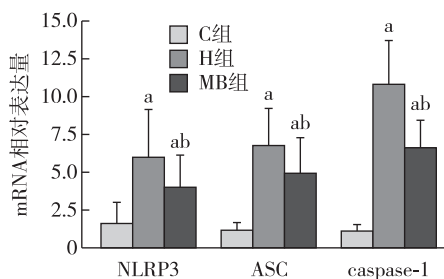
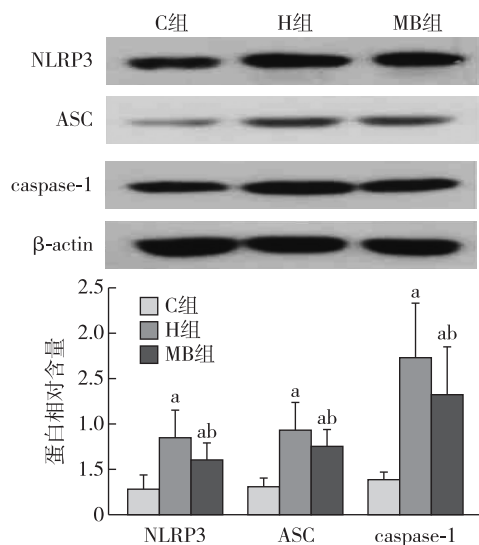
注:与 C 组比较,^a $P<0.01$;与 H 组比较,^b $P<0.05$

图 6 三组大鼠肺组织 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 表达量的比较

大鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白含量与 C 组比较,H 组、MB 组肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白含量明显升高 ($P<0.01$)。与 H 组比

较, MB 组肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$) (图 7)。



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 H 组比较, ^b $P < 0.05$

图 7 三组大鼠肺组织 NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白含量的比较

讨 论

机械通气作为一种生命支持手段和治疗措施在临床工作中扮演着重要的角色,但其应用过程中所带来的诸如 VILI 等并发症也不容忽视,探讨 VILI 及其防治措施具有重要的临床意义。亚甲蓝具有潜在的肺保护作用^[8],但其作用途径尚不明确。本实验参考文献^[9]的方法制备大鼠 VILI 模型, H 组肺损伤评分、肺组织 W/D、BALF 总蛋白较 C 组升高,肺泡壁断裂,肺间质水肿,中性粒细胞等炎性细胞渗出,提示 VILI 模型建立成功。本实验结果显示,大潮气量通气可诱导蛋白浓度的增加和炎性细胞的聚集,导致肺损伤。

NLRP3 炎性小体隶属于 NLR 家族,是细胞质中的一类模式识别受体 (PRR)^[12]。有研究表明,其在巨噬细胞、淋巴细胞等多种细胞中表达,其结构包括 NLRP3、ASC 以及 pro-caspase-1 三个部分^[13]。机械通气时,机械外力作用于肺脏,对肺泡细胞造成直接机械损伤,同时机械力刺激可导致肺泡巨噬细胞线粒体内 ROS 的聚集^[3, 5]。NLRP3 在感知 ROS 等刺激后通过自身 NOD 结构域寡聚化暴露其效应结构域,进而募集 ASC。ASC 是一种包含半胱天冬酶募集域 (CARD) 和热蛋白结构域 (PYD) 的接头蛋白,ASC 被募集后,其 PYD 与具有相似结构的

NLRP3 N 末端结合,其 CARD 募集 pro-caspase-1 并与之结合形成 NLRP3 炎性小体^[14-16]。NLRP3 炎性小体激活后,其组成部分 pro-caspase-1 可自身剪切裂解为 caspase-1,从而使前体 IL-1 β 、前体 IL-18 转化为 IL-1 β 、IL-18, IL-1 β 、IL-18 释放入血启动级联式炎症反应^[17-18]。因此, NLRP3 炎性小体激活时,其组成部分 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 表达上调,引起 caspase-1 高表达。caspase-1 介导 IL-1 β 、IL-18 的形成,导致炎症反应。既往研究^[19]表明,以 NLRP3、ASC、caspase-1 高表达证明 NLRP3 炎性小体的激活,以 IL-1 β 、IL-18 高表达证明 NLRP3 炎性小体介导的炎症反应。本研究结果显示, H 组大鼠肺组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达较 C 组明显升高,提示 VILI 时 NLRP3 炎性小体被激活,激活后的 NLRP3 炎性小体介导 pro-caspase-1 转化为 caspase-1。同时 H 组大鼠血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 的含量较 C 组明显增加,提示 caspase-1 介导前体 IL-1 β 、前体 IL-18 转化为 IL-1 β 、IL-18,从而介导炎症反应,导致肺损伤。

亚甲蓝是一种临床应用较为安全的抗氧化剂,可通过与分子氧竞争黄嘌呤氧化酶转移电子抑制氧自由基及超氧化物的生成,以减轻氧化性损伤^[20]。近几年研究^[21-22]表明,亚甲蓝可通过降低 NO 水平、抑制过氧亚硝酸盐的生成,抑制氧化应激,以减轻外伤或缺血-再灌注引起的肺部损伤。参考文献^[10]并结合预实验,本实验 MB 组于机械通气前 10 min 经腹腔注射 1%亚甲蓝 50 mg/kg。本实验结果显示, MB 组 PaO₂ 较 H 组升高,肺组织病理学损伤、肺组织 W/D、肺损伤评分、BALF 总蛋白含量较 H 组降低,提示亚甲蓝可减轻大鼠 VILI。

亚甲蓝可通过稳定线粒体膜,降低线粒体内 ROS 的生成来抑制细胞凋亡、坏死^[23],也可通过抑制骨髓巨噬细胞中 NLRP3 炎性小体的激活,在神经系统疾病及代谢性疾病中发挥抗炎作用^[24]。本实验结果显示, MB 组大鼠在亚甲蓝预处理后,肺组织中 ROS 含量, NLRP3、ASC、caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达较 H 组降低,同时血清、BALF 中 IL-1 β 、IL-18 的含量较 H 组减少,提示亚甲蓝可抑制肺组织中 ROS 聚集,阻碍 NLRP3 炎性小体的激活,从而抑制 pro-caspase-1 转化为 caspase-1,阻碍前体 IL-1 β 、前体 IL-18 转化为 IL-1 β 、IL-18,减轻炎症反应。亚甲蓝阻碍 NLRP3 炎性小体激活的机制可能与抑制 ROS 的聚集有关,但有待进一步研究。

综上所述,亚甲蓝通过抑制大鼠肺组织中

NLRP3 炎性小体的激活,阻碍促炎因子 IL-1 β 及 IL-18 的形成,减轻大鼠 VILI。

参 考 文 献

- [1] Bates J, Smith BJ. Ventilator-induced lung injury and lung mechanics. *Ann Transl Med*, 2018, 6(19): 378.
- [2] Chen L, Xia HF, Shang Y, et al. Molecular mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(10): 1225-1231.
- [3] Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 35-52.
- [4] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832.
- [5] Wu J, Yan Z, Schwartz DE, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3590-3599.
- [6] Fang Q, Yan X, Li S, et al. Methylene blue ameliorates ischemia/reperfusion-induced cerebral edema: an MRI and transmission electron microscope study. *Acta Neurochir Suppl*, 2016, 121: 227-236.
- [7] Oz M, Lorke DE, Hasan M, et al. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Med Res Rev*, 2011, 31(1): 93-117.
- [8] Demirebilek S, Sizanli E, Karadag N, et al. The effects of methylene blue on lung injury in septic rats. *Eur Surg Res*, 2006, 38(1): 35-41.
- [9] Wu JY, Xiong ZH, Xiong GZ, et al. Protective effect of interleukin-10 and recombinant human keratinocyte growth factor-2 on ventilation-induced lung injury in rats. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 15642-15651.
- [10] Wang L, Chen B, Lin B, et al. Methylene blue attenuates lung injury induced by hindlimb ischemia reperfusion in rats. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 2508620.
- [11] Kiss T, Silva PL, Huhle R, et al. Comparison of different degrees of variability in tidal volume to prevent deterioration of respiratory system elastance in experimental acute lung inflammation. *Br J Anaesth*, 2016, 116(5): 708-715.
- [12] Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front Immunol*, 2013, 4: 333.
- [13] Griebel T, Maekawa T, Parker JE. NOD-like receptor cooperativity in effector-triggered immunity. *Trends Immunol*, 2014, 35(11): 562-570.
- [14] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, 2015, 4: 296-307.
- [15] Gaidt MM, Hornung V. The NLRP3 inflammasome renders cell death pro-inflammatory. *J Mol Biol*, 2018, 430(2): 133-141.
- [16] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [17] Song N, Liu ZS, Xue W, et al. NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 185-197.e6.
- [18] Parker JC. Mitochondrial damage pathways in ventilator induced lung injury (VILI): an update. *J Lung Health Dis*, 2018, 2(2): 18-22.
- [19] Wang YC, Liu QX, Zheng Q, et al. Dihydromyricetin alleviates sepsis-induced acute lung injury through inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in mice model. *Inflammation*, 2019, 42(4): 1301-1310.
- [20] Abreu M, Almeida FM, Santos K, et al. Does methylene blue attenuate inflammation in nonischemic lungs after lung transplantation. *J Bras Pneumol*, 2018, 44(5): 378-382.
- [21] Kanter M, Sahin SH, Basaran UN, et al. The effect of methylene blue treatment on aspiration pneumonia. *J Surg Res*, 2015, 193(2): 909-919.
- [22] Ayvaz S, Aksu B, Karaca T, et al. Effects of methylene blue in acute lung injury induced by blunt chest trauma. *Hippokratia*, 2014, 18(1): 50-56.
- [23] Kuliavienė I, Baniene R, Virketyte S, et al. Methylene blue attenuates mitochondrial dysfunction of rat kidney during experimental acute pancreatitis. *J Dig Dis*, 2016, 17(3): 186-192.
- [24] Ahn H, Kang SG, Yoon SI, et al. Methylene blue inhibits NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasome activation. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12409.

(收稿日期:2019-07-26)