

## · 基础研究 ·

## 不同剂型的辛伐他汀通过 iNOS/eNOS 的平衡调节对脓毒症血管内皮细胞的保护效应

张望 郭明杰 胡晓彤 郑霞

浙江大学医学院附属第一医院综合 ICU, 杭州 310003

通信作者: 郑霞, Email: zxicu@zju.edu.cn

**【摘要】目的** 研究不同剂型的辛伐他汀通过调节诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) / 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 平衡对脓毒症小鼠模型中的腹主动脉血管及脓毒症血管内皮细胞损伤模型产生的影响。**方法** 使用 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 形成脓毒症血管内皮细胞损伤模型, 分别给予普通辛伐他汀制剂 (SV) 及辛伐他汀纳米粒制剂 (NP) 进行处理, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 用酶联免疫吸附测定法检测细胞培养上清液中的 IL-6、TNF- $\alpha$  释放情况。Western blot 法检测 eNOS 和 iNOS 蛋白表达; CLP 法诱导脓毒症小鼠造模, 免疫组化法检测腹主动脉组织中 iNOS 和 eNOS 蛋白表达情况。计量资料以均数  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK-*q* 检验或 Tamhane T2 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。**结果** 与对照组比较, LPS 诱导形成的脓毒症内皮细胞凋亡率明显增加, 与对照组比较, 细胞凋亡率为  $(52.6 \pm 1.6) \% vs (5.7\% \pm 1.1) \%$ ,  $P < 0.01$ 。而应用 SV 和 NP 均能减轻 HUVEC 凋亡, 与 LPS 处理组比较, 细胞凋亡率分别为  $(36.4 \pm 1.2) \%$ 、 $(37.0 \pm 1.0) \% vs (52.6 \pm 1.6) \%$ , 均  $P < 0.01$ 。经 LPS 刺激 24 h 后, IL-6 和 TNF- $\alpha$  释放量显著增加; 而应用 SV 和 NP 处理对于 LPS 刺激增加的 IL-6 水平并无抑制效应。辛伐他汀可以降低 HUVEC 中由 LPS 诱导增加的 TNF- $\alpha$  释放量, 而 NP 组较 SV 组抑制作用差异无统计学意义。应用 Western blot 测定 HUVEC 中 eNOS 和 iNOS 蛋白表达, eNOS 表达在 LPS 组降低明显, iNOS 表达则在 LPS 组明显升高 (eNOS/GAPDH:  $0.36 \pm 0.02 vs 0.57 \pm 0.01$ , iNOS/GAPDH:  $0.80 \pm 0.19 vs 0.55 \pm 0.18$ , 均  $P < 0.01$ ), NP 组对于 eNOS 的恢复效应高于 SV 组 ( $P < 0.05$ ); NP 和 SV 均能明显降低 iNOS 水平, 但是两组之间差异无统计学意义。动物腹主动脉免疫组化显示, 在 CLP 组, eNOS 蛋白半定量表达明显降低, 而 iNOS 蛋白的半定量表达则明显增高 (均  $P < 0.01$ ); 辛伐他汀不同制剂均可提高 eNOS 蛋白水平, 且 NP 组对于 eNOS 的恢复效应要明显高于 SV 组, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 CLP 组中 iNOS 的表达上调, 应用辛伐他汀可以使其水平明显下降 (均  $P < 0.01$ ), 但 SV 组和 NP 组间差异无统计学意义。脓毒症体内与体外模型中 iNOS/eNOS 比值显著升高, 辛伐他汀的应用可使比值降低, 但 SV 组与 NP 组间差异无统计学意义。**结论** 辛伐他汀可以抑制内皮细胞中 TNF- $\alpha$  的释放, 阻遏内皮细胞的凋亡, 可能涉及到 iNOS/eNOS 的平衡, 新型的纳米粒制剂仅在部分指标上与静脉制剂存在差异, 仍需进一步深入剂型改良。

**【关键词】** 辛伐他汀; 纳米药物; 脓毒症; 内皮细胞; 一氧化氮合酶

**基金项目:** 浙江省自然科学基金 (LY16H150002); 浙江省医学会临床科研基金项目 (2011ZYC-A50)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.01.011

HMG-CoA 还原酶抑制剂 (他汀类药物) 是史上使用最广泛, 销量最多的药物之一<sup>[1]</sup>。除了对冠脉疾病具有常规的降脂效应外, 他汀类药物还具抗炎效应、诱导一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和影响白细胞黏附移位等效应<sup>[2-4]</sup>, 因此可以涉及到很多的炎症反应疾病, 例如自身免疫功能紊乱、多发性硬化、慢性阻塞性肺

疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 和脓毒症<sup>[5-7]</sup>。此外, 他汀类药物还具有抗菌特性, 可以对脓症患者产生额外有益的治疗效应<sup>[8-9]</sup>。

尽管近年来不断有新的关于他汀类药物对于脓毒症预后影响的研究, 结果多数都认为他汀类药物未能对脓毒症

预后产生影响<sup>[10-12]</sup>, 然而 2018 年 CHEST 杂志发表的编者案指出由于大部分研究人群的均质性未能明确, 且多为回顾性研究, 不能较好地随机, 而且因为存在不同品规的他汀制剂, 表现结果似乎更不相同<sup>[13]</sup>。Lee 等<sup>[14]</sup>研究显示, 阿托伐他汀和辛伐他汀可能会对预后产生较好的保护作用。脓毒症中出现的血管渗漏是脓毒症疾病恶化的病理生理基础, 因为血管损伤导致的病理改变如同开启了全身脏器损伤的阀门, 尤其是内皮屏障损伤与不良预后密切相关, 他汀类药物在脓毒症中的价值尚未明确, 需要从内皮细胞屏障功能保护角度, 明确他汀类非降脂效应可能的获益机制。目前他汀类药物在危重患者中仅仅只有胃肠道制剂, 尚无静脉制剂, 原因在于他汀类药物水溶性差, 脂溶性强。而纳米粒是一种新型的载药系统, 它的粒径通常在 10 ~ 100 nm, 是一种理想的静脉注射的药物载体, 因此希望进行相关的制剂改良后, 甚至通过脂质纳米粒的被动靶向血管的效应<sup>[15]</sup>, 增强辛伐他汀在脓毒症血管内皮保护中的使用价值。因此, 本研究着力比较辛伐他汀脂质纳米粒在离体和体脓毒症模型中对脓毒症血管内皮的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与药品

辛伐他汀原料药 (浙江医药股份有限公司新昌药厂); 硬脂酸、泊洛沙姆 (上海化学试剂采购供应站); 脂多糖 (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4, 美国 Sigma 公司); PVDF 膜 (美国 Bio-rad 公司); ECL 试剂 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 抗 iNOS 和 eNOS 抗体 (美国 abcam 公司); 抗 GAPDH 抗体 (中国谷歌生物有限公司); 人 IL-6 ELISA 及人 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (杭州联科生物科技公司)。

### 1.2 制剂配置

辛伐他汀静脉制剂配制: 精密称取 41.8 mg 辛伐他汀粉剂及 4 mg 氢氧化钠, 溶于 10 mL 无水乙醇中, 稀释后用稀盐酸调节 pH 至 7.2, 最终配制成浓度为 10 mmol/L 母液, 滤过除菌后分装, -20℃保存, 细胞用药浓度为 1  $\mu$ mol/L, 动物给药浓度为 1 mg/kg。

辛伐他汀纳米粒制剂配制: 精密称取辛伐他汀 12 mg 和单硬脂酸甘油酯 228 mg, 将药物和脂质置于丙酮 6 mL 和无水乙醇 6 mL 组成的有机相中, 水浴 50℃使完全溶解。以 0.2% PVA (w/v) 溶液为分散相, 置冰浴或 70℃水浴中。在 400 r/min 机械搅拌条件下, 将有机相倒入 120 mL 分散相中, 继续搅拌 5 min, 制备得到辛伐他汀纳米粒。纳米粒需现配现用。细胞用药浓度为 1  $\mu$ mol/L, 动物给药浓度为 1 mg/kg<sup>[16]</sup>。

### 1.3 细胞培养

原代人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购于美国 Sciencell 公司。正常培养传代至第 4 代子代细胞后, 分为对照组 (Ctrl 组), 脓毒症组 (LPS 组, 建立终浓度 100  $\mu$ g/mL 的 LPS 干预组, 给予 24 h 处理), 脓毒症+他汀静脉制剂组 (LPS+SV 组, 建立终浓度 100  $\mu$ g/mL 的 LPS+1  $\mu$ mol/L 辛伐他汀静脉制剂 24 h 处理), 脓毒症+他汀纳米粒制剂组 (LPS+NP 组, 建立终浓度 100  $\mu$ g/mL 的 LPS+1  $\mu$ mol/L 辛伐他汀纳米粒制剂 24 h 处理)。

### 1.4 细胞凋亡检测

收集各组细胞, 并进行重悬、洗涤、离心、孵育等处理后, 使用流式细胞仪分析, 激发光波长 488 nm, 用一波长为 515 nm 的滤器检测 FITC 荧光, 另一波长大于 560 nm 的滤器检测 PI 荧光。

### 1.5 细胞因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$ 的测定

各组内皮细胞处理后, 培养 24 h 后收集上清液, 存放于 -80℃冰箱, 避免样品重复冻融。按照试剂盒说明书进行 ELISA 实验。

### 1.6 Western blot

各组细胞经不同处理药物刺激 24 h 后, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解, 4℃离心取上清液, BCA 蛋白定量后调整蛋白浓度, 加入上样缓冲液后 100℃加热 10 min。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 免来源 iNOS、eNOS 抗体 (1:1 000 稀释)、抗 GAPDH 抗体 (1:2 000 稀释) 4℃孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤, HRP 标记羊抗兔二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后加入 ECL 发光液, 暗室中胶片曝光, 显影成像, 以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 条带灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。

### 1.7 实验动物分组

本研究动物实验过程符合动物实验伦理要求。SPF 级 C57/BL6 小鼠 30 只, 8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自上海南方模式生物科技公司, 检疫合格证号 [SCXK (沪) 2010-0010], 用于 24 h 时间点标本采集 (分 4 组, 每组 6 只): 假手术对照组 (Shame 组); 盲肠结扎组 (CLP 组); 盲肠结扎+辛伐他汀静脉制剂尾静脉注射组 (CLP+SV 组); 盲肠结扎+辛伐他汀纳米粒制剂尾静脉注射组 (CLP+NP 组)。

### 1.8 CLP 模型建立

腹部常规消毒, 纵向正中切口约 1.5 cm, 逐层分离入腹腔, 寻找到游离盲肠, 结扎于盲肠游离端 1/2 长度处, 18 G 针头在结扎端中点沿肠系膜纵轴方向贯通穿刺 1 次, 挤出肠内容物后, 结肠回纳腹腔, 并逐层缝合关腹。假手术组仅开腹后, 探查取出盲肠后再行回纳。

### 1.9 免疫组化法观察小鼠腹主动脉 iNOS 和 eNOS 的变化

取小鼠腹主动脉应用免疫组织化学法检测 iNOS 和 eNOS 的表达水平。石蜡切片脱蜡和水化后等处理后，在玻片组织上滴加 iNOS 和 eNOS 一抗 50 μL (1 : 50 稀释)，放入 4℃ 冰箱过夜。次日早晨取出玻片，滴加相应二抗，处理后光镜下 DAB 显色，最后脱水，用中性树脂封片，晾干后光镜下拍照分析。

### 1.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，组间比较符合方差齐性用 SKN-q 检验；不符合方差齐性，则用 Tamhane T2 检验，利用 Graphpad prism 7.0 作图，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 辛伐他汀不同剂型对脓毒症内皮细胞凋亡的影响

LPS 处理内皮细胞 24 h 后，应用流式细胞仪检测凋亡情况，结果显示，较对照组，LPS 组凋亡细胞数百分比从  $5.7\% \pm 1.1\%$  增加到  $52.6\% \pm 1.6\%$  (图 1A)，而 SV 组与 NP 组能够减轻由 LPS 所引起的细胞凋亡，差异有统计学意义；但两组间差异无统计学意义 (图 1B)。

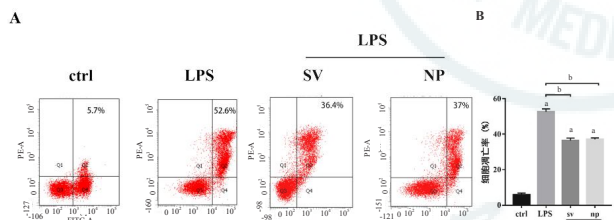


图 1 A : 流式细胞术检测 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理的 HUVEC 凋亡率；B : 各组 HUVEC 凋亡率比较， $^aP < 0.05$ ， $^bP < 0.05$ ；与 LPS 处理组比较， $^cP < 0.05$ ， $^dP < 0.01$

图 1 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 凋亡率比较

### 2.2 LPS 和不同剂型的辛伐他汀对细胞培养基中 IL-6、TNF-α 含量的影响

培养的内皮细胞中，炎症因子 IL-6 在对照组中表达较低，经 LPS 刺激 24 h 后，IL-6 表达显著增高，而 SV 及 NP 组中，IL-6 水平较对照组也明显增加，与 LPS 组间差异无统计学意义 (图 2A)。与对照组相比，LPS 组 TNF-α 表达升高，经辛伐他汀处理后，TNF-α 含量较 LPS 组明显降低，但 SV 组与 NP 组间差异无统计学意义 (图 2B)。

### 2.3 不同辛伐他汀制剂对于 LPS 处理的内皮细胞内 iNOS 和 eNOS 蛋白表达的影响

LPS 处理 HUVEC 细胞，脓毒症细胞模型造模。用 SV

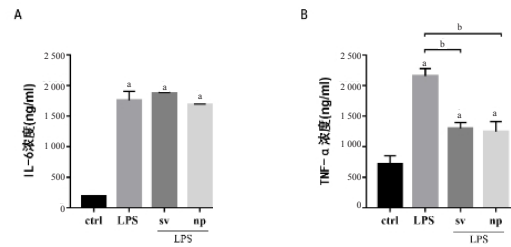


图 2 A : ELISA 检测 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理 HUVEC 培养液上清液 IL-6 含量；B : ELISA 检测 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理 HUVEC 培养液上清液 TNF-α 含量；与对照组比较， $^aP < 0.01$ ；与 LPS 处理组比较， $^bP < 0.01$

图 2 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理的 HUVEC 培养液上清液中炎症因子含量

及 NP 处理细胞后，提取细胞蛋白，Western bolt 法检测 iNOS 和 eNOS 含量。结果发现 LPS 刺激后，iNOS 表达明显升高，辛伐他汀处理后可下调 HUVEC 中 iNOS 的表达，NP 组较 SV 组存在 iNOS 水平水平的改善，但组间差异无统计学意义，eNOS 在 LPS 刺激后表达则显著降低，辛伐他汀可恢复 eNOS 在 HUVEC 中的表达，NP 组对于 eNOS 的恢复效应要明显高于 SV 组，组间差异有统计学意义；iNOS/eNOS 比值在 LPS 组显著升高，不同剂型辛伐他汀处理后明显降低，均有统计学意义，而在 SV 组和 NP 组间差异无统计学意义。见图 3。

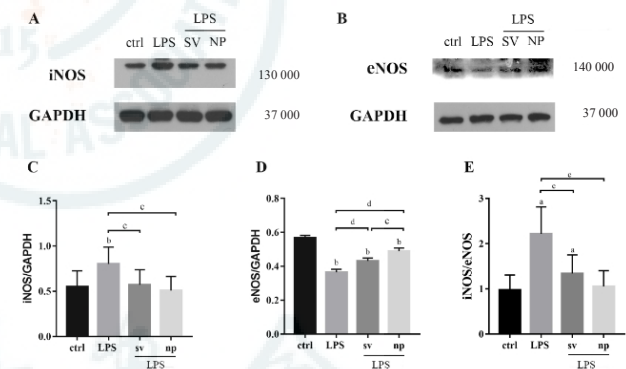
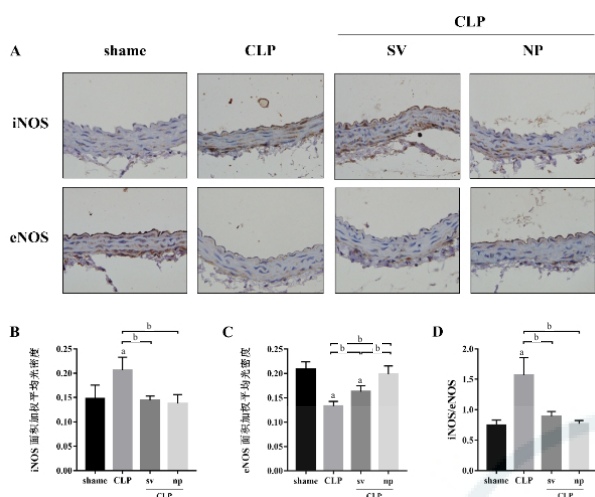


图 3 A, C : Western blot 检测 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理的 HUVEC 中 iNOS 蛋白表达水平；B, D : Western blot 检测 LPS 及辛伐他汀不同剂型处理的 HUVEC 中 eNOS 蛋白表达水平；E : LPS 及辛伐他汀不同剂型处理的 HUVEC 中 iNOS/eNOS 比值变化；与对照组比较， $^aP < 0.05$ ， $^bP < 0.05$ ；与 LPS 处理组比较， $^cP < 0.05$ ， $^dP < 0.01$

### 2.4 脓毒症小鼠腹主动脉血管中 iNOS 和 eNOS 的表达情况

免疫组化结果 (图 4) 显示，与假手术组 (shame) 相比，CLP 组 eNOS 蛋白的半定量表达明显降低 (图 4A、C)，而 iNOS 的半定量表达明显增高；SV 和 NP 均有提高 eNOS 蛋白水平的效应，且 NP 较 SV 更有助于 eNOS 浓度的改善，差异有统计学意义；SV 组和 NP 组中 iNOS 水平较 CLP 组逐渐下降，差异有统计学意义，SV 组和 NP 组之间趋势有降低表现，差异无统计学意义；iNOS/eNOS 的比值在 CLP



A: 免疫组化检测脓毒症小鼠腹主动脉 iNOS 和 eNOS 含量, 400X 光学显微镜下拍照分析; B: 辛伐他汀不同剂型治疗的脓毒症小鼠腹主动脉 iNOS 吸光度值变化; C: 辛伐他汀不同剂型治疗的脓毒症小鼠腹主动脉 eNOS 吸光度值变化; D: 辛伐他汀不同剂型治疗的脓毒症小鼠腹主动脉 iNOS/eNOS 吸光度比值变化。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 4 脓毒症小鼠腹主动脉 iNOS/eNOS 免疫组化分析

组显著升高, 不同剂型辛伐他汀处理后明显降低, 差异均有统计学意义, 而在 SV 组和 NP 组间差异无统计学意义。

### 3 讨论

在临床实际工作中, 口服制剂在危重症患者中往往受到了制约, 比如不能吞咽或外科手术程序的患者。即便是进行了口服治疗, 是否具有较好的生物利用度, 均会影响药物的实际功效和应有的临床效应。目前虽然尚无他汀类药物的静脉制剂, 但他汀类药物具有水溶性差, 脂溶性强的特性, 很适合进行纳米粒包载, 将其转化为理想的静脉注射制剂, 有可能解决以上临床难题, 让他汀类药物可以真正合理地走入临床脓毒症治疗实践中。基于目前临床上对于脓毒症疾病发生的病理生理的理解, 脓毒症中内皮细胞的核心特征是通透性增加及屏障功能丧失。既往研究认为, 革兰阴性细菌的内毒素是细胞因子 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 合成和释放的有效诱导剂<sup>[17]</sup>。一旦损伤因素始动, 内皮细胞和巨噬细胞被诱导释放 IL-1, 然后通过激活一种转录因子 NF-IL6 刺激释放 IL-6。此外, 体内及体外研究也已证实 TNF- $\alpha$  能增加内皮细胞的通透性。在体外条件下, 凝血酶也能增加内皮细胞的通透性, 并且和 TNF- $\alpha$  协同作用使得内皮细胞屏障功能降低。既往研究显示他汀类药物影响炎症介质表达, 可能产生对脓毒症有利的效应<sup>[18]</sup>。所以本研究选择 IL-6 和 TNF- $\alpha$  两种炎症因子作为对于他汀类药物影响脓毒症的可能作用环节。本研究结果反映出辛伐他汀静脉制剂和纳米粒制剂虽然不能抑制 LPS 刺激增加的 IL-6 水平, 但是可以降低培养的内皮细胞

中由 LPS 诱导产生的 TNF- $\alpha$  释放量, 并且 NP 组较 SV 组抑制作用更佳, 同时发现显示随着辛伐他汀对这些炎症物质水平的抑制, 伴有血管内皮细胞凋亡的保护效应。

已有研究显示, 他汀类药物能在脓毒症中发挥有益作用的可能机制是通过调整 iNOS 与 eNOS 之间的平衡, 保护内皮功能, 避免了脓毒症时因广泛内皮功能损伤而引发的一系列严重的病理生理变化。因为 iNOS 可以通过 TNF- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$  等刺激细胞, 经由细胞内核转录因子  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) 系统和信号转导因子和转录激活因子信号转导通路调控合成, 所以如果他汀类药物对于 TNF- $\alpha$  的影响, 可能会改变 iNOS 的表达, 从而下调 NO 合成, 从而阻止毛细血管渗漏, 改善脓毒症预后。同样既往研究显示, 他汀类药物能通过抑制小 G 蛋白 rho 和影响小窝蛋白功能而调节 eNOS 的表达<sup>[19]</sup>。提示他汀类药物可以一方面增加 eNOS 表达水平, 一方面抑制 iNOS 活性, 所以在脓毒症时评价药物对 iNOS 与 eNOS 比例失衡状态的调节, 可能是评价脓毒症内皮细胞保护, 或内皮功能保护的重要机制<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, 应用 Western blot 测定内皮细胞中 eNOS 和 iNOS 蛋白表达, eNOS 表达在 LPS 组降低明显, NP 组对于 eNOS 的恢复效应要明显高于 SV 组; iNOS 在 LPS 组表达则明显升高, 辛伐他汀处理后可下调 HUVEC 中 iNOS 的表达, NP 组较 SV 组存在 iNOS 水平的改善, 但组间差异无统计学意义; iNOS/eNOS 的比值在 LPS 组显著升高, 不同剂型辛伐他汀处理后明显降低, 差异均有统计学意义, 而在 SV 组和 NP 组间差异无统计学意义。动物腹主动脉免疫组化显示出相同的趋势。CLP 组 eNOS 蛋白半定量表达明显降低, 而 iNOS 蛋白的半定量表达则明显增高; 辛伐他汀不同剂型均可提高 eNOS 蛋白水平, 且 NP 组较 SV 组更有助于 eNOS 水平的升高; 而用辛伐他汀则同时可以使 iNOS 水平较 CLP 组明显下降, 差异有统计学意义, 而 SV 组和 NP 组之间虽有降低趋势, 差异无统计学意义; iNOS/eNOS 的比值在 CLP 组显著升高, 不同剂型辛伐他汀处理后明显降低, 均有统计学意义, 而在 SV 组和 NP 组间差异无统计学意义。本研究结果提示 iNOS/eNOS 的平衡确实涉及了他汀类药物对于脓毒症血管内皮屏障功能的保护效应, 尽管研究中仅有 eNOS 的表达在 NP 组与 SV 组差异有统计学意义, 笔者推测可能是因为纳米粒辛伐他汀制剂存在一定的被动靶向效应, 正如近年来体外和体内研究表明纳米粒对内皮细胞具有一定的靶向性。已有研究将匹伐他汀制备成纳米粒后, 体外实验显示纳米粒对内皮细胞的亲和力和明显高于对比的骨骼肌细胞, 将纳米粒进行肌注后, 纳米粒可选择性靶向动静脉血管内皮细胞, 并可在局部维持药物疗效达 14 d<sup>[15, 21]</sup>。而近年来更多出现的主动靶向血管内皮的纳米粒制剂, 确实带来了更多的展望, 所以进一步改良纳米粒制剂,

建立主动靶向的纳米制剂型, 明确其有益效应, 可能是今后研究的方向。

综上所述, 辛伐他汀可以抑制血管内皮细胞中 TNF- $\alpha$  炎症因子的释放, 阻遏内皮细胞的凋亡, 可能涉及对 iNOS/eNOS 失衡的调节。纳米制剂与静脉制剂在保护效应上略有差异, 可能需要进一步优化制剂, 改良为主动靶向的纳米粒, 并进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参 考 文 献

- [1] Jackevicius CA, Chou MM, Ross JS, et al. Generic atorvastatin and health care costs[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(3):201-204. DOI: 10.1056/NEJMp111312.
- [2] Mermis JD, Simpson SQ. HMG-CoA reductase inhibitors for prevention and treatment of severe sepsis[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2012, 14(5):484-492. DOI: 10.1007/s11908-012-0277-1.
- [3] Ma S, Ma CC. Recent developments in the effects of nitric oxide-donating statins on cardiovascular disease through regulation of tetrahydrobiopterin and nitric oxide[J]. *Vascul Pharmacol*, 2014, 63(2):63-70. DOI: 10.1016/j.vph.2014.08.001.
- [4] Bi XY, He X, Zhao M, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase and vagal activity in the endothelial protection of atorvastatin in ischemia/reperfusion injury[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 61(5):391-400. DOI: 10.1097/fjc.0b013e318286baf3.
- [5] Smeeth L, Douglas I, Hall AJ, et al. Effect of statins on a wide range of health outcomes: a cohort study validated by comparison with randomized trials[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2009, 67(1): 99-109. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2008.03308.x.
- [6] Feng Y. Efficacy of statin therapy in patients with acute respiratory distress syndrome/acute lung injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10):3190-3198. DOI: 10.26355/eurrev\_201805\_15080.
- [7] Lee MG, Lee CC, Lai CC, et al. Preadmission statin use improves the outcome of less severe sepsis patients - a population-based propensity score matched cohort study[J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(4):645-654. DOI: 10.1093/bja/aex294.
- [8] Masadeh M, Mhaidat N, Alzoubi K, et al. Antibacterial activity of statins: a comparative study of atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2012, 11:13. DOI: 10.1186/1476-0711-11-13.
- [9] Caffrey AR, Timbrook TT, Noh E, et al. Evidence to support continuation of statin therapy in patients with staphylococcus aureus bacteremia[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(3). pii: e02228-16. DOI: 10.1128/AAC.02228-16.
- [10] Deshpande A, Pasupuleti V, Rothberg MB. Statin therapy and mortality from sepsis: a meta-analysis of randomized trials[J]. *Am J Med*, 2015, 128(4):410-417.e1. DOI: 10.1016/j.amjmed.2014.10.057.
- [11] Kruger PS, Venkatesh B. Are there any benefits from statin treatment for the septic patient?[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2014, 16(1):378. DOI: 10.1007/s11883-013-0378-9.
- [12] Tralhão AF, Cês de Souza-Dantas V, Salluh J, et al. Impact of statins in outcomes of septic patients: a systematic review[J]. *Postgrad Med*, 2014, 126(7):45-58. DOI: 10.3810/pgm.2014.11.2832.
- [13] Mermis JD, Simpson SQ. Statin effect on sepsis mortality[J]. *Chest*, 2018, 153(4):769-770. DOI: 10.1016/j.chest.2017.12.004.
- [14] Lee CC, Lee MG, Hsu TC, et al. A population-based cohort study on the drug-specific effect of statins on sepsis outcome[J]. *Chest*, 2018, 153(4):805-815. DOI: 10.1016/j.chest.2017.09.024.
- [15] Oda S, Nagahama R, Nakano K, et al. Nanoparticle-mediated endothelial cell-selective delivery of pitavastatin induces functional collateral arteries (therapeutic arteriogenesis) in a rabbit model of chronic hind limb ischemia[J]. *J Vasc Surg*, 2010, 52(2):412-420. DOI: 10.1016/j.jvs.2010.03.020.
- [16] 汪日红, 郑霞, 姜赛平, 等. 辛伐他汀纳米粒降低脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤的初步研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2013, 22(10):1123-1127. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.10.012.
- [17] Song R, Kim J, Yu D, et al. Kinetics of IL-6 and TNF- $\alpha$  changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 146(2):143-149. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.02.008.
- [18] Gornik I. The effects of statins in sepsis and acute inflammatory response[J]. *Acta Med Croatica*, 2015, 69(3):197-201.
- [19] Balakumar P, Kathuria S, Taneja G, et al. Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins?[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1):83-92. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.09.014.
- [20] Subramani J, Kathirvel K, Leo MD, et al. Atorvastatin restores the impaired vascular endothelium-dependent relaxations mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factors but not hypotension in sepsis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54(6):526-534. DOI: 10.1097/fjc.0b013e3181bfaf6d.
- [21] Kubo M, Egashira K, Inoue T, et al. Therapeutic neovascularization by nanotechnology -mediated cell-selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6):796-801. DOI: 10.1161/atvbaha.108.182584.

(收稿日期: 2019-02-27)

(本文编辑: 郑辛甜)