·论著·

血红素氧合酶-1/一氧化碳通路对脂多糖诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞线粒体融合的影响

贾浩娟 史佳 董树安 张圆 余剑波

300100 天津医科大学南开临床学院,天津市南开医院麻醉科

通讯作者:余剑波,Email:jianboyu99@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.03.004

【摘要】 目的 探讨血红素氧合酶-1/一氧化碳(HO-1/CO)通路对脂多糖(LPS)诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞(AECⅡ)线粒体融合的影响。**方法** 体外培养大鼠AECⅡ细胞株RLE-6TN,待细胞融合度达到85%时传代培养,并随机分为7组(n=5):空白对照组细胞常规培养;LPS组加入10 mg/L的LPS制备内毒素攻击AECⅡ模型;外源性一氧化碳释放分子-2(CORM-2,体外CO释放剂)+LPS组(CL组)和氯高铁血红素(Hemin,HO-1诱导剂)+LPS组(HL组)分别加入100 μmol/L的CORM-2或20 μmol/L的Hemin预处理1 h,再加入10 mg/L LPS孵育;锌原卟啉-Ⅸ(ZnPP-Ⅸ,HO-1活性抑制剂)+LPS组(ZL组)加入10 μmol/L的ZnPP-Ⅸ预处理0.5 h,然后加入10 mg/L的LPS孵育;CORM-2+ZnPP-Ⅸ+LPS组(CZL组)和Hemin+ZnPP-Ⅸ+LPS组(HZL组)先分别加入100 μmol/L的CORM-2或20 μmol/L的Hemin预处理1 h,其余处理同ZL组。LPS孵育24 h后,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定细胞上清液中白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量;用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定HO-1、线粒体融合蛋白1和蛋白2(Mfn1、Mfn2)以及视神经萎缩蛋白1(OPA1)的蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,各处理组细胞上清液中IL-6和TNF-α含量升高,HO-1蛋白表达上调,线粒体融合相关蛋白Mfn1、Mfn2和OPA1蛋白表达下调。与LPS组比较,给予CORM-2或Hemin预处理后,IL-6、TNF-α含量均明显降低〔IL-6(ng/L):48.6±3.7、48.4±3.1比58.7±2.5,TNF-α(ng/L):40.7±5.3、39.4±4.3比51.8±5.1〕,HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1蛋白表达均明显上调(HO-1蛋白:0.873±0.051、0.839±0.061比0.671±0.044,Mfn1蛋白:0.673±0.037、0.654±0.025比0.568±0.021,Mfn2蛋白:0.676±0.044、0.683±0.035比0.571±0.043,OPA1蛋白:0.648±0.031、0.632±0.031比0.554±0.032,均P<0.05);而给予ZnPP-Ⅸ预处理后,IL-6、TNF-α含量及HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1蛋白表达的变化趋势与CORM-2或Hemin预处理组相反,与LPS组比较差异均有统计学意义〔IL-6(ng/L):69.8±5.1比58.7±2.5,TNF-α(ng/L):61.9±3.3比51.8±5.1,HO-1蛋白:0.545±0.023比0.671±0.044,Mfn1蛋白:0.406±0.051比0.568±0.021,Mfn2蛋白:0.393±0.051比0.571±0.043,OPA1蛋白:0.372±0.050比0.554±0.032,均P<0.05〕。CL组与HL组间,LPS组、CZL组与HZL组间上述各指标比较差异均无统计学意义。**结论** HO-1/CO通路可上调LPS诱导的大鼠AECⅡ细胞线粒体融合蛋白表达,促进线粒体融合,从而减轻细胞炎症反应。

【关键词】 血红素氧合酶-1;一氧化碳;线粒体融合;肺泡上皮细胞,Ⅱ型

基金项目:国家自然科学基金(81372096);天津市卫生计生委基金项目(2014KZ048);天津“131”创新型人才团队基金(2016-1-22)

Effects of heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway on the mitochondrial fusion in rat alveolar epithelial type Ⅱ cells stimulated by lipopolysaccharide

Jia Haojuan, Shi Jia, Dong Shu'an, Zhang Yuan, Yu Jianbo

Department of Anesthesiology, Tianjin Nankai Hospital, Nankai Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China

Corresponding author: Yu Jianbo, Email: jianboyu99@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of heme oxygenase-1/carbon monoxide (HO-1/CO) pathway on mitochondrial fusion in rat alveolar epithelial type Ⅱ cells (AECⅡ) stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Once the cultured *in vitro* rat AECⅡ cells line RLE-6TN reached confluency of 85%, they were subcultured and randomly divided into seven groups (n = 5 each). RLE-6TN cells were routinely cultured in control group. The cells in LPS group was stimulated with 10 mg/L LPS to reproduce the model of endotoxin challenge in AECⅡ cells. The cells in carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2, *in vitro* CO release agent) + LPS group (CL group) and Hemin (HO-1 inducer) + LPS group (HL group) were pretreated with 100 μmol/L CORM-2 or 20 μmol/L Hemin for 1 hour, respectively, followed by 10 mg/L LPS stimulation. The cells in zinc protoporphyrin-Ⅸ (ZnPP-Ⅸ, HO-1 inhibitor) + LPS group (ZL group) was pretreated with 10 μmol/L ZnPP-Ⅸ for 0.5 hour followed by 10 mg/L LPS stimulation. The cells in CORM-2 + ZnPP-Ⅸ + LPS group (CZL group) and Hemin + ZnPP-Ⅸ + LPS group (HZL group) were pretreated with 100 μmol/L CORM-2 or 20 μmol/L Hemin respectively for 1 hour, and other treatments were similar to those previously described in ZL group. At 24 hours after LPS stimulation, interleukin-6 (IL-6)

and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the supernatant were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the protein expressions of HO-1, mitochondrial fusion related proteins 1 and 2 (Mfn1, Mfn2) and optic atrophy 1 (OPA1) were determined by Western Blot. **Results** Compared with control group, IL-6 and TNF-α contents in the supernatant were increased, HO-1 protein expression was up-regulated, Mfn1, Mfn2 and OPA1 protein expressions were down-regulated in all treatment groups. Compared with LPS group, IL-6 and TNF-α contents were significantly decreased after CORM-2 or Hemin pretreatment [IL-6 (ng/L): 48.6±3.7, 48.4±3.1 vs. 58.7±2.5; TNF-α (ng/L): 40.7±5.3, 39.4±4.3 vs. 51.8±5.1], the protein expressions of HO-1, Mfn1, Mfn2 and OPA1 were significantly up-regulated (HO-1 protein: 0.873±0.051, 0.839±0.061 vs. 0.671±0.044; Mfn1 protein: 0.673±0.037, 0.654±0.025 vs. 0.568±0.021; Mfn2 protein: 0.676±0.044, 0.683±0.035 vs. 0.571±0.043; OPA1 protein: 0.648±0.031, 0.632±0.031 vs. 0.554±0.032; all $P < 0.05$); while opposite effects were found after ZnPP-Ⅸ preincubation, and there were significant differences in IL-6 and TNF-α contents and protein expressions of HO-1, Mfn1, Mfn2 and OPA1 as compared with those of LPS group [IL-6 (ng/L): 69.8±5.1 vs. 58.7±2.5, TNF-α (ng/L): 61.9±3.3 vs. 51.8±5.1, HO-1 protein: 0.545±0.023 vs. 0.671±0.044, Mfn1 protein: 0.406±0.051 vs. 0.568±0.021, Mfn2 protein: 0.393±0.051 vs. 0.571±0.043, OPA1 protein: 0.372±0.050 vs. 0.554±0.032; all $P < 0.05$]. There were no significant differences in the parameters mentioned above between HL group and CL group, as well as among LPS, CZL and HZL groups. **Conclusion** HO-1/CO pathway promotes mitochondrial fusion and alleviates inflammatory response in LPS-induced rat AEC Ⅱ cells.

【Key words】 Heme oxygenase -1; Carbon monoxide; Mitochondrial fusion; Alveolar epithelial type Ⅱ cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81372096); Bureau-level Project of Tianjin Municipal Health and Family Planning Committee (2014KZ048); Tianjin "131" Funded Projects of Innovative Talent Team (2016-1-22)

脓毒症最常累及的靶器官为肺脏，脓毒症急性肺损伤（ALI）的发病机制尚未阐明，但肺泡上皮细胞（AEC）损伤及毛细血管内皮细胞通透性增加是其重要发病学基础，并已达成共识。Ⅱ型肺泡上皮细胞（AEC Ⅱ）有增殖成新 AEC Ⅱ细胞、分化为 AEC Ⅰ细胞、合成和分泌肺泡表面活性物质等功能，在 ALI 中具有重要作用[1]。线粒体融合是通过合并正常线粒体，使受损线粒体恢复正常[2]。血红素氧合酶-1（HO-1）有抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡和调控细胞自噬等作用[3]。本课题组前期研究表明，脂多糖（LPS）诱导大鼠内毒素休克 ALI 时，线粒体融合减少[4]，其机制尚未明确。HO-1 是血红素代谢限速酶，可催化血红素产生等摩尔胆绿素/胆红素、游离铁和（一氧化碳）CO[5]。目前 HO-1/CO 通路对 LPS 诱导大鼠 AEC Ⅱ细胞线粒体融合的影响尚不明确，本研究则针对该问题进行探讨。

1　材料与方法

1.1　主要实验材料及试剂：大鼠 AEC Ⅱ细胞株 RLE-6TN（美国 ATCC 公司）；胎牛血清（FBS）和 DMEM 培养基（美国 Gibco 公司），青霉素和链霉素（南京凯基生物公司），胰蛋白酶、LPS、体外 CO 释放剂外源性一氧化碳释放分子-2（CORM-2）、HO-1 诱导剂氯高铁血红素（Hemin）、HO-1 活性抑制剂锌原卟啉-Ⅸ（ZnPP-Ⅸ）及兔抗大鼠线粒体融合蛋白 1 和蛋白 2（Mfn1、Mfn2）、视神经萎缩蛋白 1（OPA1）、HO-1 单克隆抗体（单抗，美国 Sigma 公司），β-肌动蛋白（β-actin）一抗（美国 Santa Cruz 公司），山羊抗兔二抗（北京康为世纪生物科技有限公司）；白细胞介素-6（IL-6）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）试剂盒（南京建成科技有限公司），BCA 蛋白定量试剂盒（美国 Thermo 公司），聚偏氟乙烯（PVDF）膜（美国 Millipore 公司）。

1.2　细胞培养：大鼠 AEC Ⅱ细胞株 RLE-6TN 培养于含有 10% FBS、1% 青链双抗的 DMEM 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中，每 24 h 更换 1 次培养液，待细胞融合度达到 85% 时，用 0.25% 胰酶消化传代。

1.3　实验分组及处理：将细胞以 2×10^5/mL 密度接种于 96 孔板，并随机分为 7 组（$n=5$）：空白对照组、LPS 组、CORM-2+LPS 组（CL 组）、Hemin+LPS 组（HL 组）、ZnPP-Ⅸ+LPS 组（ZL 组）、CORM-2+ZnPP-Ⅸ+LPS 组（CZL 组）和 Hemin+ZnPP-Ⅸ+LPS 组（HZL 组）。空白对照组细胞常规培养；LPS 组加入 10 mg/L 的 LPS 制备内毒素攻击 AEC Ⅱ模型；CL 组和 HL 组分别加入 100 μmol/L 的 CORM-2 或 20 μmol/L 的 Hemin 预处理 1 h，再加入 10 mg/L LPS 孵育；ZL 组加入 10 μmol/L 的 ZnPP-Ⅸ预处理 0.5 h，再加入 10 mg/L 的 LPS 孵育；CZL 组和 HZL 组先分别加入 100 μmol/L CORM-2 或 20 μmol/L Hemin 预处理 1 h，余处理同 ZL 组。各组给予 LPS 孵育 24 h。

1.4　检测指标及方法

1.4.1　酶联免疫吸附试验（ELISA）测定 TNF-α、IL-6 含量：用无菌管收集细胞培养液上清液，离心 20 min 取上清液，如保存过程中有沉淀形成则再次离心，于 -80 ℃保存待用。采用 ELISA 试验检测 TNF-α、IL-6 含量，严格按照试剂盒说明书操作。

1.4.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Bolt)检测蛋白表达:收集细胞,弃去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,RIPA 裂解液裂解细胞,采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白样品,加热 5 min 使蛋白变性,以 12% 分离胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰氨凝胶电泳(SDS-PAGE),随后转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入稀释度为 1∶1 000 的 HO-1、Mfn1、Mfn2 和 OPA1 兔抗大鼠单抗和 β-actin 一抗,摇匀 2 h,4 ℃下孵育过夜,含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜 3 次,每次 5 min,加入稀释度 1∶3 000 的山羊抗兔二抗,室温摇床杂交 1.5 h;TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,进行增强化学发光反应。应用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参照灰度值比值作为目的蛋白表达量。

1.5 统计学处理:应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。先将实验数据进行正态性检验,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时采用 Bonferroni 检验,方差不齐时则采用 Tamhane *T*2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

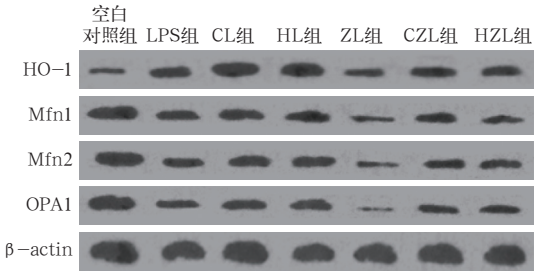
2.1 各组细胞上清液中 IL-6、TNF-α 的含量比较(表 1):与空白对照组比较,各处理组细胞上清液中 IL-6、TNF-α 含量均显著升高(均 $P<0.05$)。与 LPS 组比较,给予 CORM-2 或 Hemin 预处理后 IL-6、TNF-α 含量均明显降低,而给予 ZnPP-Ⅸ预处理后 IL-6、TNF-α 含量进一步升高(均 $P<0.05$)。CL 组与 HL 组间,LPS 组、CZL 组与 HZL 组间 IL-6 和 TNF-α 含量差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 1 各组大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞上清液中 IL-6 和 TNF-α 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(孔)	IL-6(ng/L)	TNF-α(ng/L)
空白对照组	5	40.4±4.3	13.2±2.0
LPS 组	5	58.7±2.5[a]	51.8±5.1[a]
CL 组	5	48.6±3.7[ab]	40.7±5.3[ab]
HL 组	5	48.4±3.1[ab]	39.4±4.3[ab]
ZL 组	5	69.8±5.1[ab]	61.9±3.3[ab]
CZL 组	5	59.8±4.2[a]	50.7±3.6[a]
HZL 组	5	60.8±2.9[a]	49.8±5.2[a]

注:LPS 组为脂多糖组,CL 组为外源性一氧化碳释放分子-2(CORM-2)+LPS 组,HL 组为氯高铁血红素(Hemin)+LPS 组,ZL 组为锌原卟啉-Ⅸ(ZnPP-Ⅸ)+LPS 组,CZL 组为 CORM-2+ZnPP-Ⅸ+LPS 组,HZL 组为 Hemin+ZnPP-Ⅸ+LPS 组;IL-6 为白细胞介素-6,TNF-α 为肿瘤坏死因子-α;与空白对照组比较,[a]$P<0.05$;与 LPS 组比较,[b]$P<0.05$

2.2 各组细胞 HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1 的蛋白表达比较(图 1~2):与空白对照组比较,各处理组细胞 HO-1 蛋白表达明显上调,线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2、OPA1 表达明显下调(均 $P<0.05$)。与 LPS 组比较,给予 CORM-2 或 Hemin 预处理后细胞 HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1 蛋白表达均明显上调,而给予 ZnPP-Ⅸ预处理后各蛋白表达均明显下调(均 $P<0.05$)。CL 组与 HL 组间,LPS 组、CZL 组与 HZL 组间 HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1 蛋白表达比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

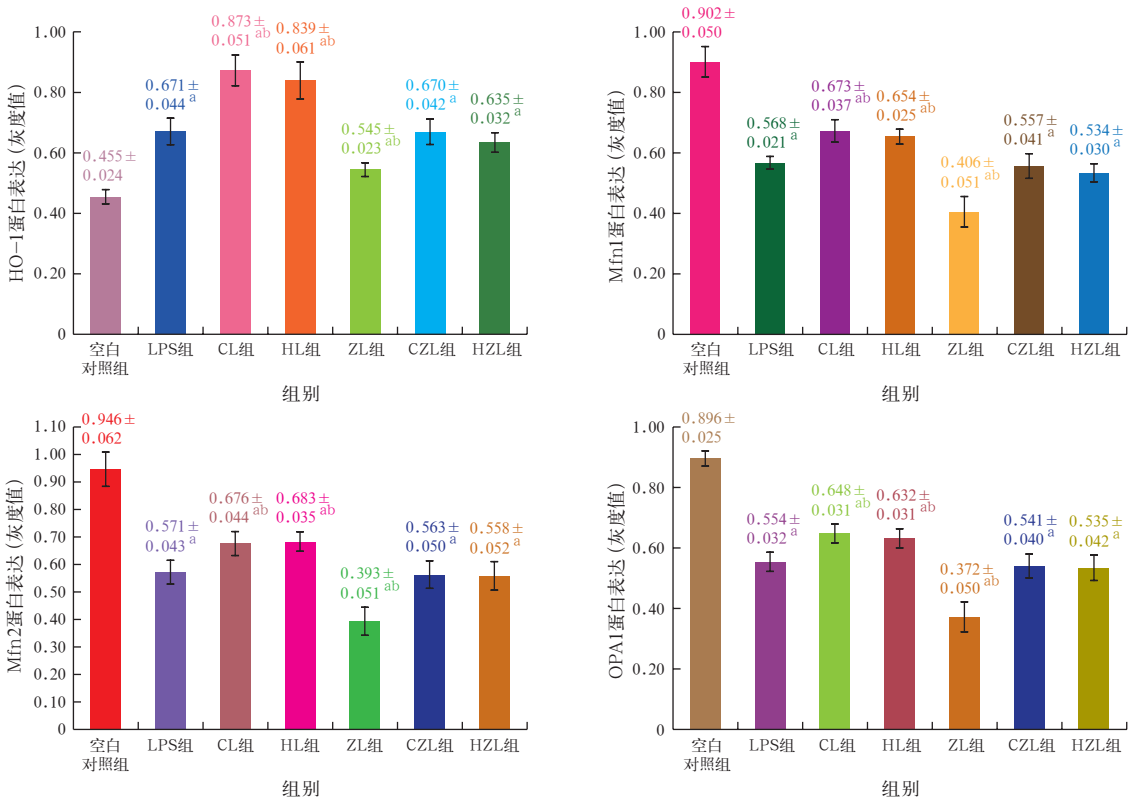


LPS 组为脂多糖组,CL 组为外源性一氧化碳释放分子-2(CORM-2)+LPS 组,HL 组为氯高铁血红素(Hemin)+LPS 组,ZL 组为锌原卟啉-Ⅸ(ZnPP-Ⅸ)+LPS 组,CZL 组为 CORM-2+ZnPP-Ⅸ+LPS 组,HZL 组为 Hemin+ZnPP-Ⅸ+LPS 组;HO-1 为血红素氧合酶-1,Mfn1、Mfn2 为线粒体融合蛋白 1 和蛋白 2,OPA1 为视神经萎缩蛋白 1,β-actin 为 β-肌动蛋白

图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞 HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1 蛋白表达

3 讨 论

脓毒症可引起机体炎症反应失调,进一步导致多器官功能障碍。研究表明,血浆 IL-6、IL-8 水平是脓毒症患者发生凝血功能障碍的独立危险因素,而凝血功能障碍与患者预后呈明显相关关系[6]。脓毒症 ALI 是临床上常见危重病之一,病死率高达 35.1%~46.1%,新的干预方法值得探索[7]。本研究中参照文献[8]报道的方法并结合预实验结果,采用 10 mg/L 的 LPS 制备内毒素攻击大鼠 AEC Ⅱ模型,并于 LPS 孵育 24 h 后检测指标。LPS 是革兰阴性(G^-)菌的组成成分,是引起脓毒症肺损伤的重要物质,可诱导多种炎性因子表达[9-10]。IL-6 和 TNF-α 水平能反映机体感染状态,可用于辅助诊断脓毒症[11]。其中,IL-6 可诱导其他细胞因子产生,促进炎症反应发生,导致细胞和组织的炎症损伤[12]。异常表达的 TNF-α 与其受体结合,可导致溶酶体受损,直接损伤 AEC Ⅱ,引起炎症反应[13-14]。本研究表明,给予 LPS 处理后大鼠 AEC Ⅱ细胞上清液中 IL-6 和 TNF-α 含量升高,提示炎症反应加剧,表明内毒素攻击大鼠 AEC Ⅱ模型制备成功。有研究表明,LPS



注：LPS 组为脂多糖组，CL 组为外源性一氧化碳释放分子 -2（CORM-2）+LPS 组，HL 组为氯高铁血红素（Hemin）+LPS 组，ZL 组为锌原卟啉 - Ⅸ（ZnPP- Ⅸ）+LPS 组，CZL 组为 CORM-2+ZnPP- Ⅸ +LPS 组，HZL 组为 Hemin+ZnPP- Ⅸ +LPS 组；HO-1 为血红素氧合酶 -1，Mfn1、Mfn2 为线粒体融合蛋白 1 和蛋白 2，OPA1 为视神经萎缩蛋白 1；与空白对照组比较，$^{a}P<0.05$；与 LPS 组比较，$^{b}P<0.05$

图 2　各组大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞 HO-1、Mfn1、Mfn2、OPA1 蛋白表达的比较

刺激体外人肺腺癌细胞株 A549，可使细胞间黏附分子 -1（ICAM-1）和 TNF-α 等细胞因子释放增多，诱导细胞炎症损伤[10]，与本研究结果一致。

近年来，线粒体功能障碍在脓毒症中的作用逐渐受到重视[15]。线粒体融合可使毗邻的线粒体相互连接、相互融合，有利于物质交换，从而有效发挥线粒体功能[2]。与线粒体融合相关的蛋白主要有分布于其外膜的 Mfn1/2 和内膜的 OPA1。线粒体融合主要分为 3 步：① 第一步：相邻线粒体的 HR2（与 Mfn1/2 相似分子结构之一）相互作用形成同源二聚体（Mfn1-Mfn1 或 Mfn2-Mfn2）或更有效的异源二聚体（Mfn1-Mfn2）；② 第二步：两个线粒体外膜靠近启动外膜融合；③ 第三步：OPA1 介导线粒体内膜相互融合[16-17]。研究表明，单独敲除 Mfn1 或 Mfn2 基因均会减慢线粒体融合速率；敲除 OPA1 基因可导致线粒体片段化，丧失融合功能[18-19]。还有研究表明，线粒体融合功能障碍可导致线粒体呼吸复合物活性下降、线粒体膜电位降低、线粒体嵴结构破坏等，从而引起细胞凋亡[20-21]。本研究结果表明，给予 LPS 处理后大鼠 AEC Ⅱ细胞 Mfn1、Mfn2、OPA1 蛋白表达下调，提示 LPS 诱导大鼠 AEC Ⅱ损伤，可使线粒体融合减少。

Hemin 和 ZnPP 是常用的 HO-1 诱导剂和活性抑制剂[4]。CORM-2 是一种新型体外 CO 释放剂，溶解后可缓慢释放 CO，是一种安全的外源性 CO 给予方式[22]。HO-1 诱导剂或体外 CO 释放剂产生的 CO 与 HO-1 有相似的生理功能，如抗炎。Tsoyi 等[23]研究结果显示，Hemin 和 CORM-2 可下调脓毒症小鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 水平。尹晓晗等[24]研究表明，HO-1 高表达可减少炎性因子释放，减轻肠道炎症反应。牛占丛等[25]研究显示，在盲肠结扎穿孔术（CLP）致脓毒症肺损伤小鼠模型中，Hemin 预处理可增加 HO-1 表达，降低血清 IL-6、C- 反应蛋白（CRP）和高迁移率族蛋白 B1（HMGB1）水平，提高脓毒症肺损伤小鼠的存活率。

本研究结果显示，LPS 攻击可使大鼠 AEC Ⅱ细胞 HO-1 蛋白表达增多，与前期研究结果一致[4]。本研究中参照文献[4, 8]报道的方法，并结合前期预实验结果，确定了 CORM-2、Hemin、ZnPP- Ⅸ的剂量和作用时间。结果表明，给予大鼠 AEC Ⅱ细胞

Hemin 或 CORM-2 预处理后可诱导 HO-1 蛋白表达增加，IL-6、TNF-α 含量降低，线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2、OPA1 表达增多；与此相反，给予 ZnPP-Ⅸ预处理后 HO-1 蛋白表达被阻断，IL-6、TNF-α 含量增多，线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2、OPA1 表达减少。提示 HO-1/CO 通路可上调 LPS 诱导的 AEC Ⅱ细胞线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2、OPA1 表达，从而促进线粒体融合，减轻 AEC Ⅱ细胞炎症反应。

综上所述，HO-1/CO 通路可以促进线粒体融合，减轻 AEC Ⅱ细胞炎症反应，但具体机制仍有待进一步探讨。

参考文献

[1] Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, et al. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type Ⅱ pneumocytes in acute lung injury [J]. Am J Pathol, 1996, 149 (3): 845-852.

[2] Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. Science, 2012, 337 (6098): 1062-1065. DOI: 10.1126/science.1219855.

[3] 蓝升，李金泰，刘毅. 自噬在血红素氧合酶 1 抑制大鼠肝脏缺血/再灌注损伤中的作用[J]. 中华危重病急救医学，2017, 29 (3): 233-238. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.008.
Lan S, Li JT, Liu Y. Study on the role of autophagy in heme oxygenase 1 preventing hepatic ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (3): 233-238. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.008.

[4] Yu J, Wang Y, Li Z, et al. Effect of Heme Oxygenase-1 on Mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36530. DOI: 10.1038/srep36530.

[5] 曹顺琪，郑虹，孙超. 胆道闭锁患儿血清血红素氧化酶 -1 水平的检测及其临床意义 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志，2017, 5 (1): 15-17. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2017.01.006.
Cao SQ, Zheng H, Sun C. The level of serum hemeoxygenase-1 in biliary atresia and its clinical significance [J/CD]. Prac J Organ Transplant (Electronic Version), 2017, 5 (1): 15-17. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2017.01.006.

[6] 曾文美，毛璞，黄勇波，等. 脓毒症预后影响因素分析及预后价值评估 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2015, 22 (2): 118-123. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.003.
Zeng WM, Mao P, Huang YB, et al. Analyses of factors affecting prognosis of patients with sepsis and evaluation of their predicting values [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (2): 118-123. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.003.

[7] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. N Engl J Med, 2005, 353 (16): 1685-1693. DOI: 10.1056/NEJMoa050333.

[8] Shi J, Yu JB, Liu W, et al. Carbon monoxide alleviates lipopolysaccharide-induced oxidative stress injury through suppressing the expression of Fis1 in NR8383 cells [J]. Exp Cell Res, 2016, 349 (1): 162-167. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.10.009.

[9] 黄日红，万献尧. 乌司他丁对脂多糖诱导的大鼠肺组织 Toll 样受体 4 信号通路表达的影响 [J]. 中华急诊医学杂志，2012, 21 (11): 1226-1229. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2012.11.010.
Huang RH, Wang XY. Effects of ulinastatin on Toll-like receptor 4 signaling pathway in lung tissue of rats after lipopolysaccharide insult [J]. Chin J Emerg Med, 2012, 21 (11): 1226-1229. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2012.11.010.

[10] 刘瑞吉，徐淑凤，陈良安，等. 脂多糖诱导肺泡上皮细胞炎性损伤及损伤机制 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2011, 34 (5): 367-370. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2011.05.015.
Liu RJ, Xu SF, Chen LA, et al. A study on the inflammatory responses of alveolar epithelial cells induced by lipopolysaccharide and the underlying mechanisms [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2011, 34 (5): 367-370. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2011.05.015.

[11] 李翠如，杨举红，张瑞萍，等. PCT 在不同病理进程脓毒症诊断中的临床应用价值 [J]. 实用检验医师杂志，2016, 8 (2): 94-96, 99. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.02.009.
Li CR, Yang JH, Zhang RP, et al. Clinical application value of PCT in patients with sepsis in different pathological processes [J]. Chin J Clin Pathol, 2016, 8 (2): 94-96, 99. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.02.009.

[12] Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes [J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9 (5): 281-290. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70066-0.

[13] Fang Y, Xu P, Gu C, et al. Ulinastatin improves pulmonary function in severe burn-induced acute lung injury by attenuating inflammatory response [J]. J Trauma, 2011, 71 (5): 1297-1304. DOI: 10.1097/TA.0b013e3182127d48.

[14] Yubero S, Manso MA, Ramudo L, et al. Dexamethasone down-regulates the inflammatory mediators but fails to reduce the tissue injury in the lung of acute pancreatitis rat models [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2012, 25 (4): 319-324. DOI: 10.1016/j.pupt.2012.05.009.

[15] 龚平，李春盛. 脓毒症和线粒体功能障碍 [J]. 中华危重病急救医学，2013, 25 (4): 254-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.022.
Gong P, Li CS. Sepsis and mitochondrial dysfunction [J]. Chin Crit Care Med, 2013, 25 (4): 254-256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.022.

[16] Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, et al. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes [J]. Science, 2004, 305 (5685): 858-862. DOI: 10.1126/science.1099793.

[17] Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, et al. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20 (15): 3525-3532. DOI: 10.1091/mbc.E09-03-0252.

[18] Meeusen S, DeVay R, Block J, et al. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1 [J]. Cell, 2006, 127 (2): 383-395. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.021.

[19] Benard G, Karbowski M. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability [J]. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20 (3): 365-374.

[20] Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2003, 10 (8): 870-880. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401260.

[21] Hwang SJ, Kim W. Mitochondrial dynamics in the heart as a novel therapeutic target for cardioprotection [J]. Chonnam Med J, 2013, 49 (3): 101-107. DOI: 10.4068/cmj.2013.49.3.101.

[22] Chien PT, Lin CC, Hsiao LD, et al. Induction of HO-1 by carbon monoxide releasing molecule-2 attenuates thrombin-induced COX-2 expression and hypertrophy in primary human cardiomyocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 289 (2): 349-359. DOI: 10.1016/j.taap.2015.09.009.

[23] Tsoyi K, Lee TY, Lee YS, et al. Heme-oxygenase-1 induction and carbon monoxide-releasing molecule inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced high-mobility group box 1 release *in vitro* and improve survival of mice in LPS- and cecal ligation and puncture-induced sepsis model *in vivo* [J]. Mol Pharmacol, 2009, 76 (1): 173-182. DOI: 10.1124/mol.109.055137.

[24] 尹晓晗，陈松，胡紫薇，等. 普通肝素对脓毒症肠损伤小鼠肠黏膜血红素加氧酶 -1 表达的影响 [J]. 中华危重病急救医学，2016, 28 (5): 423-426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.009.
Yin XH, Chen S, Hu ZW, et al. Effect of unfractionated heparin on the expression of heme oxygenase-1 in intestinal mucosa of mice with sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (5): 423-426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.009.

[25] 牛占丛，段国辰，刘军肖，等. 血红素加氧酶 -1 对脓毒症小鼠肺损伤炎症反应的调节作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2016, 23 (4): 373-377. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.04.009.
Niu ZC, Duan GC, Liu JX, et al. The regulation of heme oxygenase-1 on inflammatory response in mice with lung injury induced by sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (4): 373-377. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.04.009.

（收稿日期：2017-08-07）