

[文章编号] 1000-4718(2019)03-0530-06

血红素氧合酶 1 通过影响脓毒症大鼠血栓调节蛋白表达发挥肾脏保护作用*

南川川¹, 李楠², 李威¹, 洪澄英¹, 陈怀生¹, 刘雪燕^{1△}
(暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学附属第一医院, 深圳市人民医院¹重症医学科,
²口腔医学中心, 广东 深圳 581000)

[摘要] 目的: 探讨血红素氧合酶 1 (HO-1) 对脓毒症大鼠肾脏的保护作用及其机制, 观察肾脏血栓调节蛋白 (TM) 表达的变化以及 HO-1 对 TM 的影响。方法: 采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 法制作脓毒症大鼠模型。将 72 只脓毒症大鼠随机分为对照组、CLP 组、CLP + HO-1 诱导剂组和 CLP + HO-1 抑制剂组, 每组 18 只; 按分组处理后分时相处死大鼠, 留取血浆和肾脏组织, 分析各组之间血清肌酐 (Cr)、胱抑素 C (Cys-C)、碳氧血红蛋白 (COHb)、凝血酶原时间 (PT) 和活化部分凝血活酶时间 (APTT) 的差别, ELISA 法检测血浆 TM、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 水平变化, 肾脏组织经马休黄/猩红/天青石蓝染色 (MSB) 法对比各组之间病理变化, 并应用 Western blot 分析肾脏组织 TM 表达水平。结果: 与对照组相比, 脓毒症组中大鼠肾脏微血栓形成明显, 凝血功能障碍, 炎症反应明显, 肾脏功能受损; 在 HO-1 诱导剂组中大鼠肾脏微血栓及炎症反应较脓毒症组显著减轻 ($P < 0.05$), 肾脏功能得到改善, TM 表达较脓毒症组上调 ($P < 0.05$); 而 HO-1 抑制剂起到了相反的作用。结论: HO-1 能够增加脓毒症大鼠肾脏 TM 的表达, 发挥抗凝血及抗炎作用, 从而改善脓毒症大鼠的肾脏功能。

[关键词] 血红素氧合酶 1; 脓毒症; 肾脏功能; 血栓调节蛋白

[中图分类号] R631^{+.2}; R363.2 **[文献标志码]** A doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.03.024

Heme oxygenase-1 protects renal function in septic rats via influencing expression of thrombomodulin

NAN Chuan-chuan¹, LI Nan², LI Wei¹, HONG Cheng-ying¹, CHEN Huai-sheng¹, LIU Xue-yan¹

(¹ICU, ²Stomatology Center, Shenzhen People's Hospital, The Second Clinical Medical College of Jinan University, The First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518000, China. E-mail: 1736574753@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the protective effect of heme oxygenase-1 (HO-1) on the kidney of septic rats and the influence of HO-1 on the expression of thrombomodulin (TM) in the kidney. **METHODS:** Sepsis in rats was developed with cecal ligation and puncture (CLP). The septic rats were randomly divided into sham group, CLP group, CLP + HO-1 inducer group and CLP + HO-1 inhibitor group ($n = 18$). The plasma levels of creatinine (Cr), cystatin-C (Cys-C), carboxyhemoglobin (COHb), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and TM, and the changes of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) in each group were measured. Histopathological examination was performed in the kidney. The expression of TM in the kidney tissue was detected by Western blot. **RESULTS:** Compared with sham group, significantly elevated plasma levels of Cr, Cys-C, TNF- α , IL-1 β and TM ($P < 0.05$), shortened PT and APTT ($P < 0.05$), significantly increased microthrombus formation, and lowered TM expression in the kidney ($P < 0.05$) of CLP group were observed. The administration of hemin lowered the plasma levels of Cr, Cys-C, TNF- α , IL-1 β and TM ($P < 0.05$), prolonged PT and APTT ($P < 0.05$), attenuated microthrombus formation, and up-regulated the expression of TM in the kidney ($P < 0.05$). In contrast, ZnPP had the opposite effects. **CONCLUSION:** HO-1 increases the expression of TM in the kidney and exerts anticoagulatory and antiinflammatory effects, thereby

[收稿日期] 2018-06-25 [修回日期] 2018-08-09

* [基金项目] 深圳市卫生计生系统科研项目 (No. SZXJ2017027)

△通讯作者 Tel: 0755-22948318; E-mail: 1736574753@qq.com

improving renal function in the septic rats.

[KEY WORDS] Heme oxygenase-1; Sepsis; Renal function; Thrombomodulin

脓毒症 (sepsis) 是指由感染引起的脏器功能障碍, 进一步发展可导致脓毒性休克和多器官功能障碍综合征。肾脏功能障碍是脓毒症常见而且严重的并发症, 急性肾功能衰竭 (acute renal failure) 发生率在一般脓症患者约为 19%, 在重度脓毒症约为 23%, 在血培养阳性的脓毒性休克患者中约为 51%^[1], 而急性肾衰会加重病情导致患者死亡^[2]。脓毒症导致肾衰的发病过程中, 凝血功能障碍及炎症反应起到了重要作用^[3]。

血栓调节蛋白 (thrombomodulin, TM) 是广泛表达于血管内皮细胞表面的跨膜蛋白受体, 作为蛋白 C 系统的重要组成部分, 它是蛋白 C 活化过程中重要的调节因子, 不仅具有改善凝血的功能, 还具有抑制炎症激活作用^[4]。

血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是体内血红素代谢的重要起始酶和限速酶, 能够催化血红素分解为一氧化碳、胆绿素和铁离子, 其代谢产物具有抑制炎症因子, 抗氧化活性, 同时具有调节血管张力、抗凋亡和细胞保护及改善凝血功能的作用^[5-6]。Sambuceti 等^[7] 和 Maruyama 等^[8] 在大鼠糖尿病模型中及内毒素体外细胞实验中观察到 HO-1 对于内皮细胞表面 TM 具有保护作用并促进其表达, 而且在脓毒性休克时 HO-1 对肾脏具有保护作用^[9]。但是, 脓毒症时 HO-1 的肾脏保护作用能否通过 TM 介导目前还没有研究。

本实验旨在探讨 HO-1 对于脓毒症大鼠肾脏的保护作用机制, 观察脓毒症大鼠肾脏 TM 表达的变化以及 HO-1 对其影响。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

HO-1 诱导剂氯化血红素 (hemin) 与抑制剂锌原卟啉 (zinc protoporphyrin, ZnPP) IX 购自 Sigma; 兔抗大鼠 TM 多克隆抗体购自 Santa Cruz; TM 的 ELISA 检测试剂盒购自中国易利生物公司; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的 ELISA 检测试剂盒购自中国蓝基生物公司; 活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin, APTT) 和凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 检测试剂盒购自北京中勤世帝公司。

2 实验分组及动物模型

脓毒症模型的制作参照传统的盲肠结扎-穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 法。72 只雄性 Wistar 大鼠, 6~8 周, 体重 220 g \pm 30 g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 动物合格证编号为 211002300018206, 随机分为 4 组: 假手术 (sham) 组、脓毒症 (CLP) 组、HO 诱导剂 (CLP + hemin) 组和 HO 抑制剂 (CLP + ZnPP) 组, 每组 18 只。CLP、CLP + hemin 和 CLP + ZnPP 3 组大鼠于术前 12 h 分别腹腔内注射 PBS、hemin (50 μ mol/kg) 和 ZnPP (50 μ mol/kg)。动物术前禁食 12 h, 自由饮水, 戊巴比妥 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧位固定大鼠, 无菌条件下作腹白线正中切口约 1.5 cm, 分离盲肠, 用 3-0 丝线在距离盲肠根部 1/3 处环形结扎, 保持肠道通路正常, 用 16 号针头分别在盲肠的近端和末端各穿一个孔, 挤出少许粪便于腹腔内, 回纳盲肠, 分层缝合腹腔。术后即刻给动物皮下注射生理盐水 30 mL/kg, 补充术中液体丢失; 假手术组仅做开腹、分离盲肠远端与大肠系膜及关腹手术。术后动物均自由进食及饮水。在术后 6、12 和 24 h 每组小鼠分别随机选取 6 只, 暴露腹主动脉, 收集动脉血, 将血液与 3.8% 枸橼酸钠以 9:1 的比例充分混合, 1 660 \times g 离心 10 min, 留取上层血浆至 -80 $^{\circ}$ C 保存; 取肾脏组织, 小部分于液氮冻存, 其余常规冲洗后多聚甲醛固定。

3 主要方法

3.1 碳氧血红蛋白 (carboxyhemoglobin, CoHb) 浓度测定 留取 25 μ L 血浆, 加入连二亚酸钠溶液还原后通过双波长吸光度比值法检测血浆中碳氧血红蛋白浓度: 在同等实验条件下分别应用分光光度计测得 0% COHb、100% COHb 及待检样品在 420 nm 和 432 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 应用波尔定律计算出血浆中血红蛋白及 COHb 的比例, 从而得出 COHb 的浓度, 以反映大鼠体内 HO-1 的活性。

3.2 血浆中 TM、TNF- α 和 IL-1 β 的检测 血浆中以上各种指标的检测应用酶联免疫吸附法按照试剂盒说明书要求检测。

3.3 PT、APTT、肌酐 (creatinine, Cr) 及胱抑素 C (cystatin-C, Cys-C) 的检测 按照 PT 和 APTT 试剂盒说明书要求应用 M600L 全自动凝血因子分析仪检测 PT 和 APTT。Cr 和 Cys-C 应用 FR-40 全自动生化分析仪检测。

3.4 肾脏组织血栓形成情况观察 肾组织用10%缓冲福尔马林固定,石蜡包埋,切片(5 μm)用马休黄/猩红/天青石蓝(Martius scarlet blue, MSB)染色法^[10]确认血栓形成,红色代表微血栓,并用半定量的光镜检查。随机选取50例肾小球沿赤道切取并观察。在每个肾小球中,评估肾小球毛细血管与微血栓填充到肾小球总毛细血管面积的比率,并将肾小球分为5类:5%、6%至25%、26%至50%、51%至75%和76%至100%。每组对应的肾小球数目代表各组微血栓形成的情况。

3.5 应用 Western blot 检测 TM 在肾脏的表达 液氮冻存大鼠肾脏组织裂解,提取蛋白并纯化,用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,各组取50 μg蛋白行12% SDS-PAGE (80 V, 3 h)后,转入硝酸纤维素膜,应用2%的脱脂奶粉(PBS稀释, pH 7.14)4℃封闭硝酸纤维素膜过夜,加入TM I抗,37℃孵育2 h。洗膜后,应用辣根过氧化物酶标记的II抗孵育后显影曝光,经图像分析系统分析蛋白条带。

4 统计学处理

用SPSS 16.0统计软件进行分析。数据均采用均数±标准差(mean±SD)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD法),以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1 HO-1 的活性

与sham组相比,其余3组大鼠血浆COHb浓度均显著升高(P<0.05),且CLP+hemin组COHb浓度显著高于CLP组(P<0.05),CLP+ZnPP组则显著低于CLP组和CLP+hemin组(P<0.05),表明hemin能够增强大鼠体内HO-1的活性,见表1。

2 肾功能指标

与sham组相比,术后各时点其余3组大鼠肾功能均减低(P<0.05),血浆中Cr和Cys-C水平显著增高(P<0.05);与CLP组相比,CLP+hemin组Cr和Cys-C水平下降显著(P<0.05),CLP+ZnPP组较CLP+hemin组显著升高(P<0.05),见表1。

3 凝血功能指标

大鼠CLP后PT和APTT较sham组显著缩短(P<0.05),hemin的干预使大鼠PT和APTT较CLP组显著延长(P<0.05),CLP+ZnPP组PT和APTT较CLP+hemin组显著缩短(P<0.05),见表1。

4 炎症因子水平

3组大鼠血浆炎症因子明显较sham组显著增高(P<0.05),CLP+hemin组TNF-α和IL-1β水平较CLP组显著降低(P<0.05),CLP+ZnPP组较CLP+hemin组显著升高(P<0.05),见表1。

表 1 血浆中各项指标检测

Table 1. Blood samples were taken from the rats in each group, and the levels of COHb, Cr, Cys-C, TNF-α, IL-1β, soluble TM (sTM), PT and APTT were measured (Mean ± SD. n = 6)

Group	COHb (%)	Cr (mg/dL)	Cys-C (μg/dL)	PT (s)	APTT (s)	TNF-α (ng/L)	IL-1β (ng/L)	sTM (μg/L)
Sham								
6 h	0.96 ± 0.05	0.25 ± 0.04	136.0 ± 12.8	11.35 ± 0.68	23.54 ± 0.77	143.1 ± 11.6	43.9 ± 4.8	85.2 ± 5.2
12 h	0.97 ± 0.05	0.27 ± 0.06	129.0 ± 13.2	11.41 ± 0.82	23.46 ± 0.97	158.5 ± 13.5	48.6 ± 4.9	86.6 ± 6.1
24 h	0.97 ± 0.04	0.24 ± 0.05	131.0 ± 13.3	11.39 ± 0.88	23.69 ± 1.23	163.5 ± 15.1	52.1 ± 5.1	84.8 ± 5.4
CLP								
6 h	2.58 ± 0.05*	0.45 ± 0.04*	381.0 ± 29.4*	9.71 ± 0.60*	20.12 ± 0.98*	2 532 ± 113*	346 ± 35*	163.5 ± 11.4*
12 h	2.86 ± 0.03*	0.54 ± 0.06*	452.0 ± 37.3*	9.03 ± 0.77*	19.87 ± 1.26*	3 213 ± 131*	417 ± 38*	183.1 ± 13.9*
24 h	2.64 ± 0.05*	0.57 ± 0.05*	571.0 ± 49.5*	8.52 ± 0.93*	18.04 ± 1.63*	2 857 ± 126*	363 ± 34*	175.6 ± 12.3*
CLP + hemin								
6 h	3.55 ± 0.04* [△]	0.36 ± 0.03* [△]	284.0 ± 22.6* [△]	10.64 ± 0.63* [△]	22.05 ± 1.12* [△]	1 782 ± 76* [△]	212 ± 27* [△]	117.5 ± 10.2* [△]
12 h	3.86 ± 0.05* [△]	0.41 ± 0.05* [△]	367.0 ± 35.8* [△]	10.06 ± 0.72* [△]	20.84 ± 1.24* [△]	2 190 ± 91* [△]	261 ± 26* [△]	131.4 ± 12.1* [△]
24 h	3.60 ± 0.05* [△]	0.44 ± 0.06* [△]	418.0 ± 38.6* [△]	9.75 ± 0.91* [△]	20.05 ± 1.75* [△]	1 925 ± 90* [△]	237 ± 29* [△]	128.7 ± 11.6* [△]
CLP + ZnPP								
6 h	1.78 ± 0.02* ^{△#}	0.49 ± 0.06* [#]	392.0 ± 35.9* [#]	9.32 ± 0.68* [#]	20.03 ± 1.13* [#]	2 661 ± 119* [#]	352 ± 40* [#]	171.3 ± 12.8* [#]
12 h	1.82 ± 0.04* ^{△#}	0.59 ± 0.07* [#]	489.0 ± 39.8* [#]	9.01 ± 0.97* [#]	19.46 ± 1.48* [#]	3 370 ± 128* [#]	431 ± 39* [#]	186.9 ± 15.1* [#]
24 h	2.01 ± 0.06* ^{△#}	0.61 ± 0.07* [#]	589.0 ± 50.1* [#]	8.31 ± 0.96* [#]	18.03 ± 1.75* [#]	2 995 ± 129* [#]	374 ± 37* [#]	180.7 ± 15.7* [#]

* P < 0.05 vs sham group; [△] P < 0.05 vs CLP group; [#] P < 0.05 vs CLP + hemin group.

5 肾脏血栓形成情况

对肾脏 MSB 染色切片中血栓形成的分析表明, 在 CLP 组中, 所有肾小球充满微血栓, 占肾小球毛细

血管的大部分; 与 CLP 相比, hemin 预给药可显著降低肾小球微血栓形成; ZnPP 的预处理对肾小球微血栓形成无影响, 见图 1。

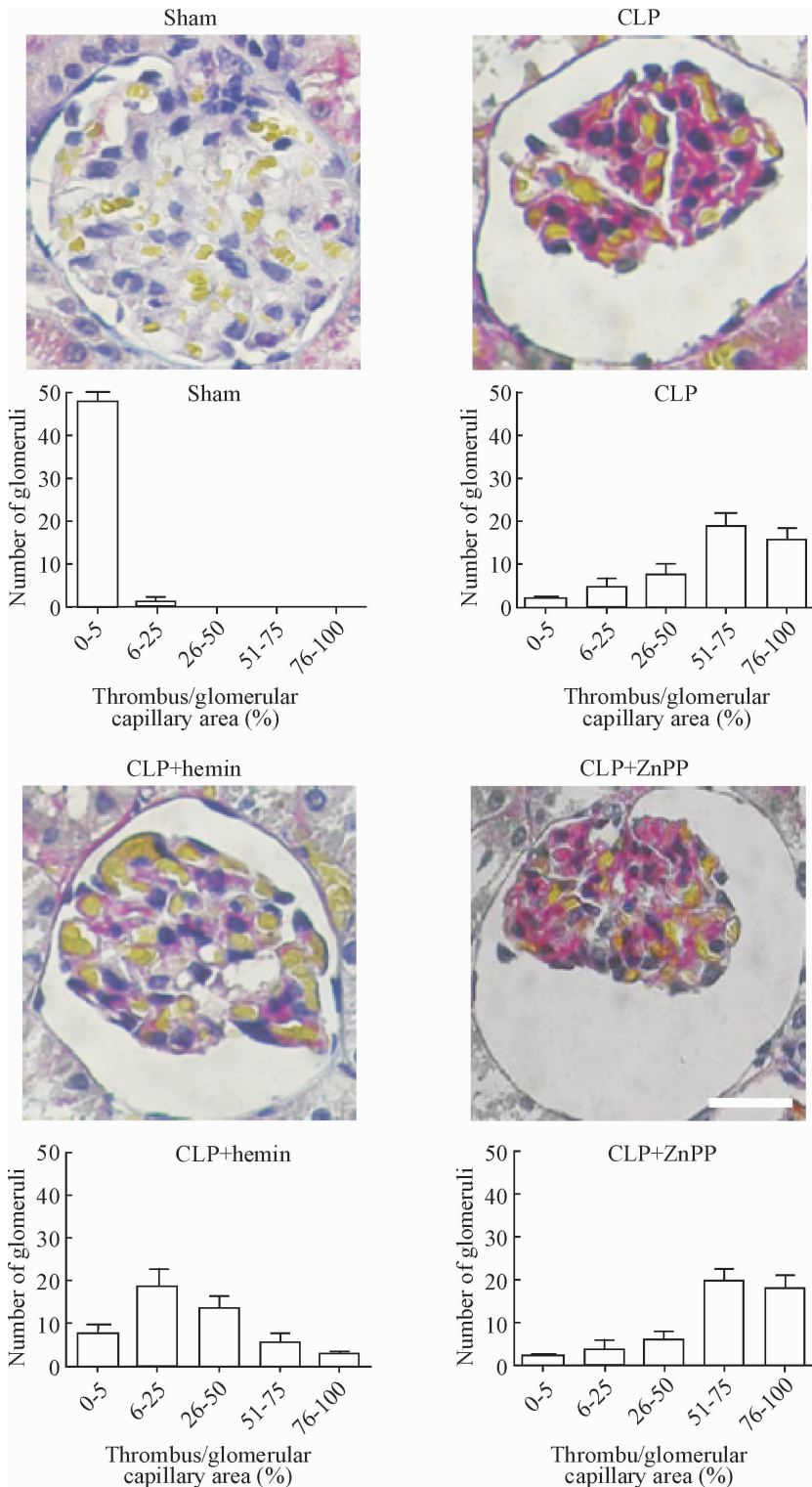


Figure 1. HO-1 attenuates microthrombus formation in the glomeruli during sepsis. The scale bar = 25 μ m.

图 1 HO-1 减轻脓毒症大鼠肾小球微血栓形成

6 TM 的表达

与 sham 组相比, CLP 组大鼠肾脏 TM 表达显著下降 ($P < 0.05$), 血浆游离 TM 显著增加 ($P <$

0.05), 而 hemin 干预可以使 CLP 大鼠肾脏 TM 表达显著增加 ($P < 0.05$), 血浆游离 TM 显著下降 ($P < 0.05$), ZnPP 则起到相反作用, 见图 2、表 1。

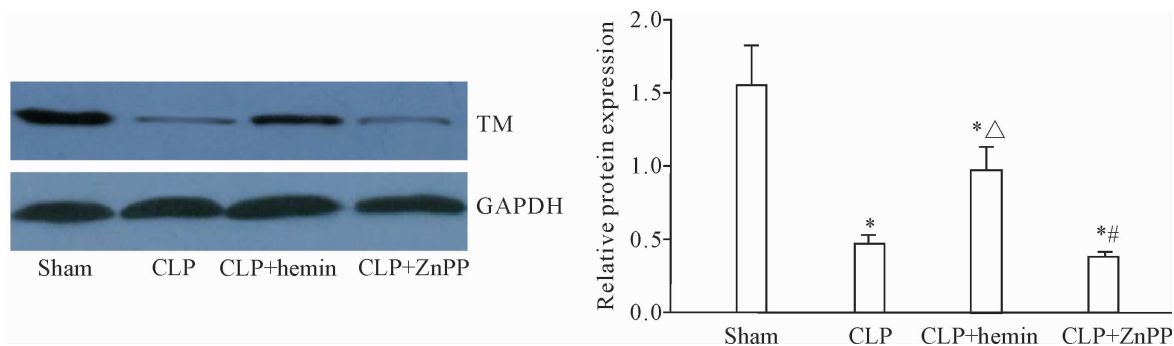


Figure 2. Western blot showed that HO-1 up-regulated the protein expression of TM in the kidney during sepsis. Mean \pm SD. $n = 6$.

* $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs CLP group; # $P < 0.05$ vs CLP + hemin group.

图2 HO-1 增加脓毒症大鼠肾脏组织 TM 的表达

讨 论

在本实验中,我们通过盲肠结扎穿孔制备脓毒症大鼠模型,分别给予 HO-1 诱导剂 hemin 和 HO-1 抑制剂 ZnPP,观察 HO-1 在脓毒症大鼠肾脏功能损伤中的作用,结果显示脓毒症大鼠血浆中炎症因子及游离 TM 增加,凝血功能障碍,肾脏 TM 表达下降,肾小球微血管内血栓形成明显,肾脏功能障碍;Hemin 干预使肾脏 TM 表达增加,血浆游离 TM 下降,炎症减轻,凝血功能改善,肾小球微血栓形成减少,肾脏功能明显改善,表明在脓毒症大鼠模型中,HO-1 能通过 TM 发挥抗炎和抗凝血作用,从而起到肾脏保护作用。

近年研究认为,凝血功能障碍和炎症反应是脓毒症引发各种器官功能障碍的重要病理过程^[11],两者相互协同,共同加重了脓毒症的病理损伤。在组织严重受损时,毒素及炎症激活凝血和纤溶系统,全身呈高凝血状态,引起弥散性血管内凝血,肾小球内微血栓形成,从而形成机械性梗阻,降低肾小球滤过率^[3,12]。

在多种病理状态下,HO-1 可被血红素和内毒素等多种因素诱导表达增加^[13],能够改善肾脏血流动力学抑制肾脏炎症反应^[14],改善肾功能^[15]。在我们的研究中,CLP 诱导的脓毒症大鼠血浆中 Cys-C 和 Cr 水平显著升高,说明肾脏功能损伤明确存在,HO-1 的诱导能够显著降低 Cys-C 和 Cr 水平,改善肾脏功能。HO-1 通过调控 cGMP 抑制血小板聚集^[16],而且外源性给予 HO-1 的代谢产物一氧化碳可以下调脓毒症小鼠及人脐静脉内皮细胞 NF- κ B 的表达,并抑制组织因子及 PAI-1,从而抑制微循环血栓形成^[17]。尽管研究表明在脓毒症大鼠模型中 HO-1 表达增强具有肾脏保护作用,但是之前的研究并没有

评估肾脏血栓形成情况^[9]。

TM 是表达于内皮细胞表面的跨膜蛋白受体蛋白,它可与凝血酶结合降低凝血酶的活性,凝血酶结合 TM 后能使凝血酶的灭活速度比在自然下快了 20 倍,直接导致循环中的凝血酶清除^[18]。同时它们的复合物特异性激活蛋白 C 使其转化为具有抗凝及抗炎活性的活化蛋白 C;TM 所含有的特定结构域可以维持细胞功能和细胞间连接的完整性,直接抑制炎症细胞黏附,阻止炎症细胞迁移,还可与 NF- κ B 等促炎因子结合抑制其活性从而起到抗炎作用^[19],因此 TM 是蛋白 C 系统行使抗凝及抗炎作用的重要因素^[20-21]。脓毒症时肾脏受到炎症因子介导的损伤,主要是 TNF- α 和 IL-1 β ,二者均可以引发其它炎症因子的释放,同时也可以导致血管的收缩,中性粒细胞的集聚,活性氧的生成,组织因子的释放和促进血栓的形成^[22],而且 TNF- α 和 IL-1 β 造成血管内皮细胞损伤,抑制 TM 转录造成内皮细胞 TM 表达下降^[23],血浆游离 TM 增加,TM 在血浆中的增加是由于 TM 从受损的血管内皮细胞释放到血流中引起的,提示炎症介导的内皮损伤确实发生^[24]。

脓毒症时给予 HO-1 激动剂可以通过 MAPK 等多个途径抑制内毒素刺激的炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的释放^[25]。在本研究,脓毒症大鼠血浆中 TNF- α 和 IL-1 β 及游离 TM 增加,凝血功能障碍,肾脏 TM 表达下降,肾小球微血管内血栓形成明显;Hemin 干预使肾脏 TM 表达增加,血浆 TNF- α 和 IL-1 β 及游离 TM 下降,凝血功能得到改善,肾小球微血栓形成减少,表明在脓毒症大鼠模型中,HO-1 能通过 TM 发挥肾脏保护作用。

血红素氧合酶在多种病理过程中表现出了明显的作用,但具体机制至今尚未完全阐明,本实验进一步从 TM 途径研究了 HO-1 对于肾脏功能的保护作

用,丰富了 HO-1 改善凝血功能障碍及抗炎的机制,为 HO-1 的临床应用提供参考资料。

[参 考 文 献]

- [1] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure[J]. *Lancet*, 2005, 365(9457):417-430.
- [2] Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RJ. The effect of acute renal failure on mortality a cohort analysis [J]. *JAMA*, 1996, 275(19):1489-1494.
- [3] Klenzak J, Himmelfarb J. Sepsis and the kidney [J]. *Critical care clinics*, 2005, 21(2):211-222.
- [4] Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(8):1374-1383.
- [5] Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, et al. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony stimulating factor in macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(6):739-745.
- [6] Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, et al. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver [J]. *FASEB J*, 2004, 18(7):854-856.
- [7] Sambucetti G, Morbelli S, Vanella L, et al. Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme oxygenase-1, and adiponectin [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(2):399-407.
- [8] Maruyama K, Morishita E, Sekiya A, et al. Effects of heme oxygenase-1 on tissue factor and thrombomodulin in the endothelial cell [J]. *Jpn J Thromb Haemost*, 2009, 20(3):315-322.
- [9] Yu JB, Zhou F, Yao SL, et al. Effect of heme oxygenase-1 on the kidney during septic shock in rats [J]. *Transl Res*, 2009, 153(6):283-287.
- [10] Yang HL, Jiang XC, Zhang XY, et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation [J]. *BMC Infect Dis*, 2006, 6:19.
- [11] D'Angelo A, Della Valle P, Giudici D, et al. Protein C and coagulation in sepsis [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2004, 70(5):339-350.
- [12] Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(2):159-169.
- [13] Esmon CT. The protein C pathway [J]. *Chest*, 2003, 124(3):26S-32S.
- [14] Tracz MJ, Juncos JP, Grande JP, et al. Renal hemodynamic, inflammatory, and apoptotic responses to lipopolysaccharide in HO-1^{-/-} mice [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6):1820-1830.
- [15] Botros FT, Dobrowolski L, Navar LG. Renal heme oxygenase-1 induction with hemin augments renal hemodynamics, renal autoregulation, and excretory function [J]. *Int J Hypertens*, 2012, 2012:189512.
- [16] Johnson FK, Johnson RA. Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 285(3):R536-R541.
- [17] Fujita T, Toda K, Karimova A, et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis [J]. *Nat Med*, 2001, 7(5):598-604.
- [18] Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, et al. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(6):739-745.
- [19] Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, et al. Lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(5):565-577.
- [20] Liaw PC, Esmon CT, Kahn moui K, et al. Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C [J]. *Blood*, 2004, 104(13):3958-3964.
- [21] Ding BS, Hong N, Christofidou-Solomidou M, et al. Anchoring fusion thrombomodulin to the endothelial lumen protects against injury-induced lung thrombosis and inflammation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(3):247-256.
- [22] Thijs A, Thijs LG. Pathogenesis of renal failure in sepsis [J]. *Kidney Int Suppl*, 1998, 53(66):S34-S37.
- [23] Esmon CT. New mechanisms for vascular control of inflammation mediated by natural anticoagulant proteins [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(5):561-564.
- [24] Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms [J]. *J Clin Invest*, 1984, 74(1):1-6.
- [25] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4):422-428.

(责任编辑:林白霜,罗森)