

一种简便的一氧化碳递送策略及抗脓毒症肺损伤的研究

唐开城, 程立婷, 汪小又, 李 翀*

(西南大学药学院, 重庆 400716)

摘要: 一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 是机体内一种重要的化学气体信使分子, 具有明确的抗炎活性, 但作为一种气态的活性物质, 如何安全、有效地递送至病灶发挥疗效有待研究。基于一氧化碳与红细胞 (red blood cell, RBC) 主要成分血红蛋白的天然亲和性, 本文拟构建一种一氧化碳-红细胞 (CO-RBC) 复合体系, 以脓毒症肺损伤为模型, 一氧化碳释放分子 (carbon monoxide releasing molecule-2, CORM-2) 为对照, 研究其对模型小鼠肺损伤的治疗作用。以 CO-RBC 中 CO 的释放、稳定性、安全性及体内肺靶向性对 CO-RBC 复合体系进行表征; 以细胞间黏附分子 (ICAM-1)、肺表面活性蛋白-A (SP-A) 的表达评价动物模型; 以肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 炎症因子的分泌、小鼠存活时间及肺组织病理变化评价 CO-RBC 复合体系对脓毒症肺损伤的治疗作用。实验设计获得西南大学实验动物伦理审查委员会批准, 符合动物实验福利伦理准则。结果表明: CO-RBC 复合体系在氮气保护下储存, 稳定性强, 48 h 内基本无释放, 而在近生理条件下时, 12 h 内释放约 70%, 解决了 CORM-2 中 CO 突释的问题, 同时对小鼠无毒性; 体内荧光成像显示 CO-RBC 复合体系能在肺部有效聚集, 具有一定的肺靶向作用; 给药治疗后, CO-RBC 组相较于其他组, TNF- α 和 IL-6 的分泌明显降低, 肺间质水肿程度减轻, 白细胞浸润减少, 存活率显著提高。因此, 本研究制备的 CO-RBC 复合体系相比 CORM-2 对脓毒症小鼠肺部炎症反应有显著的抑制作用, 有望为脓毒症的治疗提供新思路。

关键词: 一氧化碳; 红细胞; 脓毒症; 肺损伤; 炎症反应

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0540-07

A simple strategy for delivery of carbon monoxide against septic lung injury

TANG Kai-cheng, CHENG Li-ting, WANG Xiao-you, LI Chong*

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Carbon monoxide (CO) is an important chemical gas messenger molecule in the body with anti-inflammatory activity. As an active substance in gaseous state, the method for its safe and effective delivery towards the lesion sites remains to be established. Based on the natural affinity of carbon monoxide to hemoglobin, a main component of red blood cells (RBCs), this study proposes a carbon monoxide-red blood cell (CO-RBC) composite system, and tested its therapeutic effect against lung injury in an animal model. The mouse model of septic lung injury was adopted, and the carbon monoxide release molecule (CORM-2) was used as a positive control. CO-RBC system was characterized by CO release, stability, toxicity and *in vivo* lung targeting. The expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and pulmonary surfactant protein-A (SP-A) were evaluated in the animal model and the therapeutic effect of CO-RBC system for sepsis was measured by inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), as well as survival time of mice and pathological changes of the lung. Our results show that CO-RBC system exhibited satisfactory stability with negligible CO

收稿日期: 2018-12-12; 修回日期: 2018-12-30.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目资助 (XDJK2018AC003).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68251225, E-mail: chongli2009@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1105

release during 48 h storage under nitrogen protection, while the CO release was about 70% within 12 h under physiological condition, in contrast to CO burst release from CORM-2. The CO-RBC system showed no significant toxicity in the animal model, and *in vivo* fluorescence imaging results showed effective accumulation in the lungs, supporting its lung targeting effects. The secretion of TNF- α and IL-6 in the CO-RBC group was significantly lower than that in other groups, the degree of pulmonary interstitial edema was relieved, the white blood cell infiltration was decreased, and the survival rate was significantly improved. Therefore, the CO-RBC system has a significant inhibitory effect on the pulmonary inflammatory response in septic mice compared with CORM-2. This system provides a new hope for therapeutic treatment of sepsis.

Key words: carbon monoxide; red blood cell; sepsis; lung injury; inflammation

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 病情凶险, 发病率和死亡率一直居高不下, 是严重创 (烧) 伤、休克及感染后常见的并发症, 进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征 (multi-organ dysfunction syndrome, MODS)^[1,2]。研究表明, 脓毒症是由多因素参与的多器官受累综合征, 肺脏由于其组织疏松, 血流丰富, 易受细菌感染引起免疫机能紊乱, 而成为 MODS 的重要靶器官^[3-5]。即使在医学高度发展的现代, 也很难使功能衰竭的脏器逆转, 因此预防和减轻脓毒症早期的脏器损害尤为重要。

近年来研究结果证实, 一氧化碳 (CO) 是机体内一种重要的化学气体信使分子, 参与了炎症反应引起的氧化应激反应、内毒素休克及缺血再灌注损伤^[6,7]等病理过程, 发挥着重要的抗炎、抗凋亡和细胞保护作用。CO 具有成为炎症治疗“药物”的应用前景, 但作为一种气态的活性物质, 如何安全、有效递送值得研究。早期曾有临床研究报道^[8], 直接给予患者吸入一定浓度 CO, 其“药效”明显, 但该方法在医院的推广性存在困难且有安全隐患。一氧化碳释放分子 (CORM) 是近年来出现的一大类一氧化碳复合物, 其经适当溶剂溶解在生理环境中后可以持续释放出 CO^[9]。目前, 基于过渡金属羰基物设计得到的 CORM-2 分子得到了广泛研究, 但 CO 半衰期极短, 释放极快, 在 10 min 内 CO 释放即达到 70%, 这是其用于治疗的主要障碍^[10,11], 并且还还具有毒性较大的问题, 这些弊端严重影响其成药性和应用性^[12]。发展更为优良的载体、进一步拓宽递释思路, 正成为该领域的努力方向。

红细胞是 CO 天然优良载体, CO 与血红蛋白的亲合力比氧与血红蛋白的亲合力高 200 余倍, 因此 CO 极易与血红蛋白结合, 形成碳氧血红蛋白, 使血红蛋白暂时丧失携氧的能力和作用, 从而出现 CO 中毒的情况^[13]。红细胞的平均直径为 7 μm , 可以被肺的最小毛细管床以机械滤过方式截留, 被单核细胞摄取进入肺组织或肺气泡。因此, 设想是否可以在一定条件下将

上述 CO 中毒及红细胞被动肺靶向的原理用于 CO 递送, 以克服 CORM-2 分子突释、毒性大的问题? 例如, 提取一定量红细胞后通入 CO, 再将携带 CO 的红细胞静脉注射入体内, 即以红细胞作为主要的“运载工具”, 利用其能够实现一定肺靶向的性质将 CO 运输至脓毒症主要的受累脏器—肺; 基于此, 本文拟构建一种简便、安全、高效的具有一定肺靶向作用的 CO 递送方法, 以脓毒症肺损伤小鼠模型为研究对象, 初步探讨该策略的可行性及对脓毒症肺损伤的有效性。

材料与方法

药品与试剂 CORM-2 (Sigma 公司); 1,1-(十八烷基)-3,3,3,3'-四甲基碘代吡啶 (DiR, 美国 Invitrogen 公司); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒、白细胞介素-6 (IL-6) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

实验动物 KM 小鼠, SPF 级, 6 周龄, 重庆市中药研究院提供, 使用许可证编号: SYXK (渝) 2014-0002。实验小鼠由西南大学药学院实验动物中心进行屏障系统 SPF 级动物房饲养, 自由饮食和饮水。实验设计获得西南大学实验动物伦理审查委员会批准, 符合中国动物实验福利伦理准则, 并对实验动物给予人道关怀。

主要仪器 小动物活体成像系统 (IVIS lumina II, 美国 PerkinElmer 公司); 550 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司, UV-2700); 恒温振荡器 (常州澳华仪器有限公司); 高速低温台式离心机 (美国 Beckman 公司)。

CO-RBC 体系的制备 采用甲酸在浓硫酸催化、脱水下分解制备 CO; 取小鼠血液 1 mL, 加入适量肝素钠抗凝及适量生理盐水, 轻微晃动混匀, 离心处理 (2 000 r·min⁻¹, 10 min) 3 次, 弃去上清, 以除去白细胞、血小板等杂质, 即得红细胞, 用生理盐水重悬至 1 mL。将制备的 CO 吸入注射器, 然后连接导管向红细胞悬液中通入 CO 至饱和, 得 CO-RBC 饱和体系。1 mL 血液中血红蛋白约 0.12~0.16 g, 其相对分子质量为 64 800, 即 1 mL 血液中血红蛋白约为 2×10^{-6} mol, 可携

带约 8×10^{-6} mol CO (1个血红蛋白分子可结合4个CO分子), 相当于0.7 mg CORM-2携带的CO分子(1个CORM-2分子含有6个CO分子)^[10,11]。

CO-RBC体系的表征

CO的测定 采用双波长紫外分光光度法测定CO与血红蛋白(Hb)结合率(COHb%), 间接测定CO的释放。取小鼠血液适量, 提取红细胞, 即得空白红细胞样品; 取空白样品, 向其中通入适量CO, 即得一定浓度的COHb, 即实验组样品; 取空白样品, 向其中持续通入CO, 并在通入过程中不断测定其在 $\lambda_1 = 530$ nm, $\lambda_2 = 582$ nm, $\lambda_3 = 568$ nm 波长下的吸光度值(A), 直至 $\Delta A_1(A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2})$ 、 $\Delta A_2(A_{\lambda_3} - A_{\lambda_2})$ 值不再变化时, COHb达到饱和, 即饱和组样品; 分别取空白组和实验组样品各50 μ L于EP管中, 用7 mmol·L⁻¹氢氧化铵稀释液5 mL进行稀释, 以稀释液为参比, 测定其在上述3个波长下A, 计算 $\Delta A_1(A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2})$ 、 $\Delta A_2(A_{\lambda_3} - A_{\lambda_2})$; 再测定饱和组在3个波长下A, 计算 $\Delta A_1'(A_{\lambda_1}' - A_{\lambda_2}')$ 、 $\Delta A_2'(A_{\lambda_3}' - A_{\lambda_2}')$, 最后计算COHb%含量, $\text{COHb} = (\Delta A_1 / \Delta A_1' + \Delta A_2 / \Delta A_2') / 2 \times 100\%$ 。

CO的体外释放 将饱和CO-RBC置于恒温振荡器中, 于37 °C下振荡处理(转速为100 r·min⁻¹), 使CO释放, 分别在0、1、2、4、8、12、24和48 h取适量样品, 按照双波长紫外分光光度法测定COHb%, 从而间接测定CO的释放。

稳定性考察 取饱和CO-RBC样品适量, 通入氮气保存, 封口, 以隔绝空气, 放置于4 °C条件下, 分别于0、1、2、4、8、12、24和48 h取适量样品, 按照双波长紫外分光光度法测定COHb%, 从而间接测定CO的释放, 考察CO-RBC体系的稳定性。

安全性考察 取小鼠, 雌雄各半, 随机分为4组, 每组6只, 待用; 取小鼠血液1 mL, 提取红细胞, 制备CO-RBC饱和体系, 并浓缩至400 μ L; 另配制不同浓度的CORM-2溶液, 分别按照5、15、25 mg·kg⁻¹ CORM-2及14 mL·kg⁻¹ CO-RBC(CO载药量相当于25 mg·kg⁻¹ CORM-2)对4组小鼠尾静脉给药, 连续3天, 每天1次, 用电子天平称量并记录每只小鼠在1周内的体重变化, 以评价CO-RBC相较于CORM-2的安全性。

肺靶向性考察 取小鼠血液适量, 提取红细胞, 加入两倍体积20 μ g·mL⁻¹荧光染料DiR, 放置于37 °C染色30 min, 加入适量生理盐水, 轻微晃动混匀, 离心处理(2 000 r·min⁻¹, 10 min)3次, 弃去上清, 即得DiR荧光染料标记的红细胞。再通入过量CO, 制备CO-RBC饱和体系。取模型小鼠9只, 分为A、B和C组, 每组3只, A组尾静脉注射游离DiR荧光染料为空白组, B组尾静脉注射DiR荧光染料标记的空白RBC, C组尾静

脉注射DiR荧光染料标记的CO-RBC, 于0.5、1、2、4、8、12和24 h分别对3组进行体内荧光活体成像拍摄; 另进行体内荧光离体成像考察, 给药1 h后对3组腹腔注射10%水合氯醛处死小鼠, 取出心、肝、脾、肺、肾和脑等组织, 适量生理盐水清洗后进行体内荧光离体成像拍摄。

动物模型构建 取6周龄昆明小鼠, 雌雄各半, 实验室适应性饲养1周, 术前禁食12 h。腹腔注射10%水合氯醛麻醉后, 采用盲肠结扎法(cecal ligation and puncture, CLP)构建脓毒症模型^[14,15]: 自腹中线切口, 逐层进入腹腔; 将盲肠小心取出, 提起末端, 分离肠系膜, 穿细线在盲肠近端结扎; 避开系膜血管, 用20号针头穿透结扎处远端, 自两穿孔处挤出肠内容物少许, 回纳肠管至腹腔, 逐层缝合腹壁切口。假手术组打开腹腔找到盲肠后缝合腹壁切口, 盲肠不作结扎穿刺。

模型标本采集及评价 取小鼠3只, 于CLP术后12 h腹腔注射10%水合氯醛麻醉小鼠, 打开胸腔, 收集小鼠肺组织标本, 滤纸吸干表面血迹后, 迅速放入相应标本袋, -80 °C保存待检, 另设假手术组。采用Western blot检测假手术组与模型组肺组织中ICAM-1和SP-A两种蛋白的表达, 以评价脓毒症模型的炎症状态。

CO-RBC体系药效评价 取脓毒症肺损伤模型小鼠, 随机分为5组: 生理盐水组(saline)、RBC组、CORM-2组、CO-RBC组, 另设假手术组(sham)。造模后立即尾静脉注射给药, 剂量: 生理盐水组、RBC组与CO-RBC组为5 mL·kg⁻¹, CORM-2组为3.5 mg·kg⁻¹。每组取3只, 给药12 h麻醉处死各组小鼠, 取等体积血样、等重量肺组织, 采用ELISA试剂盒测定TNF- α 和IL-6含量。每组取3只, 对肺组织进行形态学观察, 取各组右肺中叶用4%多聚甲醛固定, 常规石蜡切片。进行苏木精-伊红(HE)染色, 普通光镜下($\times 400$)观察肺组织的肺泡充血、水肿及炎症细胞浸润情况。另外, 每组取10只, 每天给药1次, 连续5天, 观察各组小鼠生理状态并统计计算生存率。

统计学分析 计算结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS20.0统计分析软件进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为显著性差异, 具有统计学意义。

结果与讨论

1 CO-RBC体系的表征

1.1 CO-RBC体系中CO的释放 研究表明, 实验通过测定48 h内饱和CO-RBC中CO的释放, 表征了CO-RBC体系的缓慢释放性质。结果如图1所示: 在37 °C条件下, 饱和CO-RBC中CO在12 h内释放约70%, 并

且持续释放; 而文献^[10,11]报道 CORM-2 在 10 min 内 CO 释放超过 70%, 因此 CO-RBC 体系能够很好地克服 CORM-2 中 CO 突释的问题。

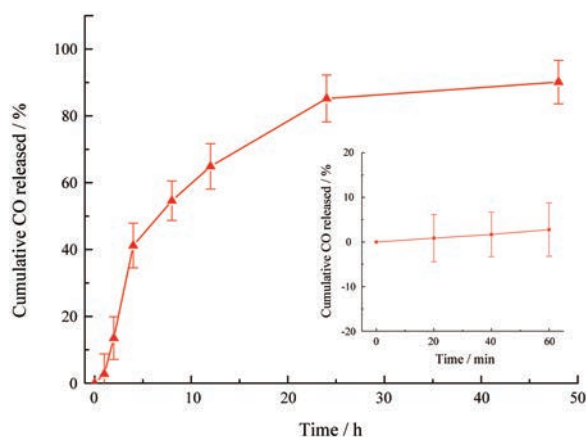


Figure 1 *In vitro* release profiles of carbon monoxide (CO) from carbon monoxide-red blood cell (CO-RBC)

1.2 CO-RBC 体系的稳定性考察 通过将 CO-RBC 体系保存于 4 °C、氮气环境中, 测定其 48 h 内 CO 的释放, 从而表征 CO-RBC 体系的稳定性。结果如图 2 所示: CO-RBC 体系在 4 °C、氮气保存条件下, 48 h 内仅释放了约 0.4%, 基本无释放, 在实际应用中其稳定性能够得到可靠的保证。

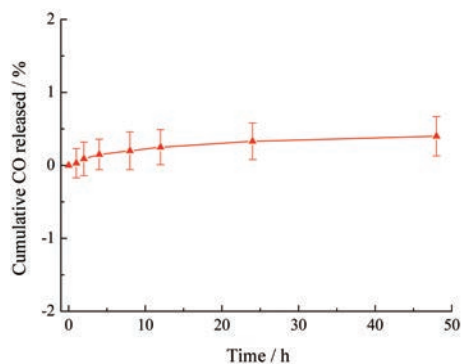


Figure 2 The stability of CO-RBC under nitrogen's protection

1.3 CO-RBC 体系的安全性考察 通过分别测定给予 CO-RBC 或 CORM-2 后小鼠的体重变化, 表征 CO-RBC 体系的安全性。结果如图 3 所示: 在给予不同剂量 5、15 和 25 mg·kg⁻¹ CORM-2 后小鼠均出现不同程度的体重下降, 并且在 25 mg·kg⁻¹ 剂量下体重下降明显, 表明 CORM-2 在一定浓度条件下对于小鼠有明显的毒性作用。而 CO-RBC 组 (CO 载药量相当于 25 mg·kg⁻¹ CORM-2) 小鼠体重未见下降趋势, 体重稳定, 提示 CO-RBC 体系对于小鼠没有毒性作用, 可以在保证 CO 载药量的同时解决 CORM-2 毒性大的安全性问题。

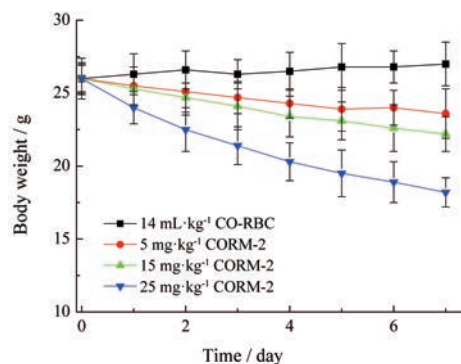


Figure 3 Body weight changes in septic mice with different treatments. CORM-2: Carbon monoxide release molecule

1.4 CO-RBC 体系的体内肺靶向性考察 荧光活体成像实验结果 (图 4A) 显示, 在设置的一系列时间点中, RBC 组、CO-RBC 组在肺部的蓄积量明显, 而空白组在肺部没有蓄积。同时, 荧光离体成像实验结果 (图 4B) 也进一步验证了该实验结果, 说明 RBC 及 CO-RBC 体系具有一定的肺靶向性。

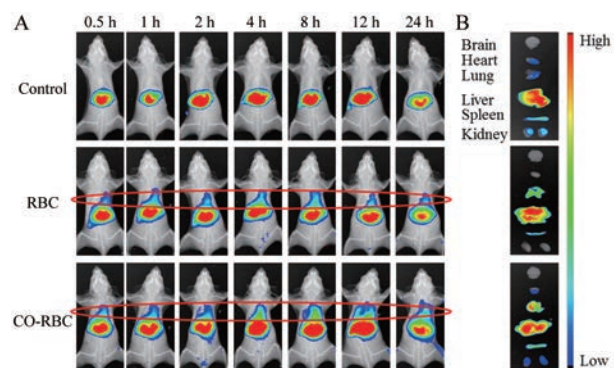


Figure 4 *In vivo* (A) and *ex vivo* (B) images of real-time whole body imaging. *In vivo* images were collected at 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. *Ex vivo* images of various tissues from sepsis mice were collected, and mice were sacrificed at 1 h after injection

2 脓毒症模型病理评价

研究表明, 患有脓毒症时, 机体丧失对感染早期炎症反应的调控而产生系统性全身炎症反应。细胞间黏附分子 (ICAM-1) 激活白细胞和内皮细胞, 促进各种炎症因子的释放, 导致系统炎症反应综合征、急性呼吸窘迫综合征和多器官功能障碍综合征^[16-19]; 对肺表面活性蛋白-A (SP-A) 表达水平进行检测, 可以分析制剂对炎症过程中肺功能的影响^[20-22]。本实验通过 Western blot 对假手术组及模型组小鼠 ICAM-1、SP-A 表达进行检测, 结果显示与假手术组比较 (图 5), CLP 模型组小鼠 ICAM-1 表达增加, SP-A 表达减少, 进一步说明模型小鼠处于炎症状态。

3 CO-RBC 体系的药效评价

3.1 炎症因子水平检测 TNF- α 和 IL-6 作为机体炎

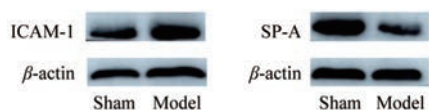


Figure 5 The protein expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and pulmonary surfactant protein-A (SP-A) in lung tissue, the protein signals of β -actin were performed as a control

症反应早期重要的细胞因子,能诱发脓毒性休克和多器官功能障碍综合征,是系统性全身炎症反应的重要介质^[23,24]。测定治疗后各组肺组织及血液中TNF- α 和IL-6的含量,对CO-RBC体系的抗炎作用进行评价。实验结果如图6显示:与假手术组比较,其他4组术后肺组织及血液中TNF- α 和IL-6的含量均不同程度的上升。与saline组相比,CO-RBC及CORM-2组均降低,但CO-RBC组下降明显,在肺组织中TNF- α 和IL-6的含量均具有显著性差异($P < 0.001$),表明CO-RBC体系能够明显降低肺组织及血液中TNF- α 及IL-6的含量,即有效地控制炎症。

3.2 生存率考察 统计给药后造模小鼠存活时间,以评价各组的药效。假手术组在14天内无死亡,表明手术对生存率无影响;saline组与RBC组在给药第6天开始出现死亡,并且持续死亡,直至第13天全部死亡;CORM-2组在第8天开始出现死亡,在第14天仍有30%生存率,表明CORM-2对脓毒症有一定的治疗作用,但存在一定毒性。而CO-RBC组小鼠生存率在14天内显著高于CORM-2组(图7)及其他组,有效地延长了脓毒症肺损伤小鼠的存活时间,表明CO-RBC体

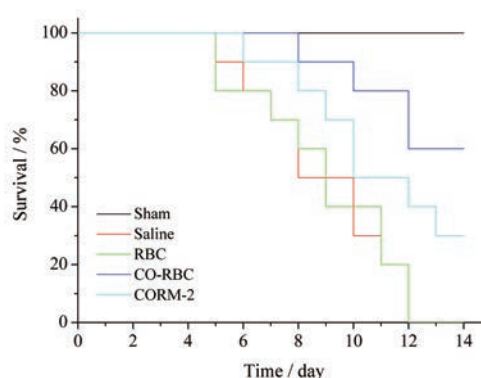


Figure 7 Survival rates of sepsis mice with different treatments

系对脓毒症肺损伤小鼠治疗作用较好且优于CORM-2。

3.3 肺组织病理染色 取肺组织切片进行HE染色评价治疗后脓毒症病理变化^[25,26]。结果显示(图8):假手术组小鼠肺组织小叶结构清晰,肺泡腔干净,肺泡间质无炎性细胞浸润,肺泡壁无增厚;生理盐水组、红细胞组小鼠肺组织充血明显,肺泡间质有炎性浸润,肺泡壁增宽,肺泡腔内可见出血和渗出,表明造模后小鼠肺组织有明显炎症且生理盐水和红细胞对脓毒症没有治疗作用;CORM-2组相较于生理盐水组和红细胞组充血得到一定改善,肺泡壁厚度有所减小,但部分细胞核不完整,细胞界限不清,仍有大量炎性细胞和中性粒细胞浸润;而CO-RBC组相较于其他组,能显著改善脓毒症小鼠肺组织结构,肺泡腔干净,减少炎症细胞浸润,肺组织小叶结构清晰,表现出抑制小鼠的肺部炎症反应,起到保护作用。

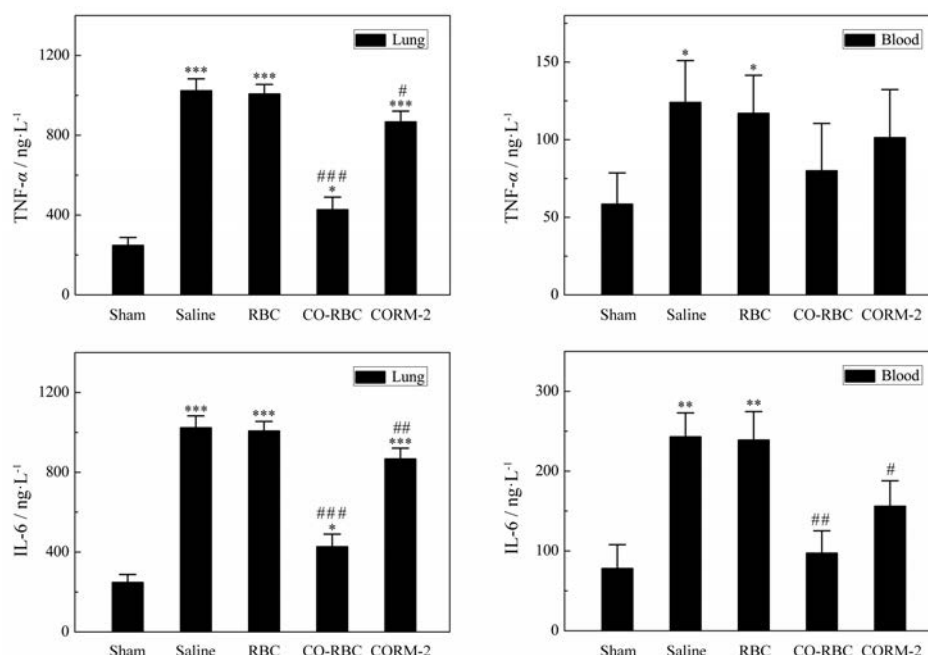


Figure 6 Expression of TNF- α and IL-6 in blood and lungs of sepsis mice with different treatments. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs saline group

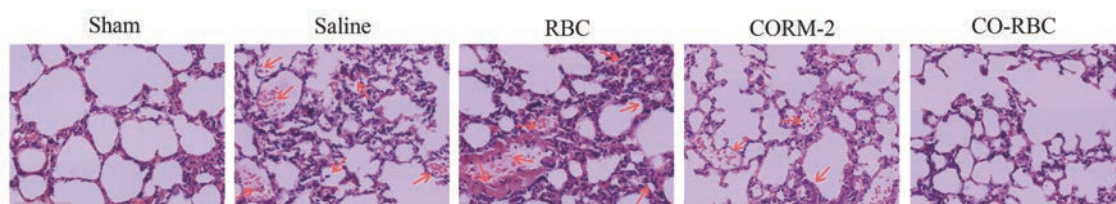


Figure 8 Morphological changes in the lung of sepsis mice (HE ×200) with different treatments

结论

本实验将CO中毒及RBC具有一定肺靶向的原理用于CO递送,利用CO与血红蛋白高亲和力的特点,设计出CO-RBC体系,以实现CO在生物体内的缓慢释放,克服CORM-2半衰期短而疗效差的问题,同时解决CORM-2毒性大的问题。结果表明,CO-RBC体系可有效抑制肺部组织促炎因子的活化和释放,延长小鼠存活时间,疗效优于CORM-2。本实验结果对于临床治疗脓毒症具有一定的参考意义,有待进一步深入研究。

References

- Ortiz-Diaz E, Festic E, Gajic O, et al. Emerging pharmacological therapies for prevention and early treatment of acute lung injury [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2013, 34: 448-458.
- Zhang JX, Sun L, Pang J, et al. Non-targeted metabolomics in septic mice infected with *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1122-1130.
- Kepron JP, Gauvin JM, Reed DN Jr, et al. Acute lung injury: an indicator of serious systemic illness [J]. *Curr Surg*, 2006, 63: 197-201.
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock [J]. *Intens Care Med*, 2004, 30: 536-555.
- Knox DB, Lanspa MJ, Kuttler KG, et al. Phenotypic clusters within sepsis-associated multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Intens Care Med*, 2015, 41: 814-822.
- Lancel S, Hassoun SM, Favory R, et al. Carbon monoxide rescues mice from lethal sepsis by supporting mitochondrial energetic metabolism and activating mitochondrial biogenesis [J]. *J Pharm Experiment Therapeut*, 2009, 329: 641-648.
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger [J]. *Science*, 1993, 259: 381-384.
- Cepinkas G, Katada K, Bihari A, et al. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 attenuates inflammation in the liver of septic mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294: G184-G191.
- Jurga AM, Piotrowska A, Starnowska J, et al. Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-2) inhibits neuropathic pain and enhances opioid effectiveness in rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68: 206-213.
- Omer SQ, Zeb A, Akram M, et al. Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles *via* sustained carbon monoxide delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 108: 187-195.
- Kautz AC, Kunz PC, Janiak C. CO-releasing molecule (CORM) conjugate systems [J]. *Dalton Transact*, 2016, 45: 18045-18063.
- Sun B, Sun Z, Jin Q, et al. CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2008, 4: 176-183.
- Clifton J 2nd, Leikin JB. Methylene blue [J]. *Am J Therapeut*, 2003, 10: 289-291.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4: 31-36.
- Li N, Xie H, Li LK, et al. Effects of honokiol on sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats [J]. *Inflammation*, 2014, 37: 1191-1199.
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, et al. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1) [J]. *J Immunol*, 1986, 137: 245-254.
- Van Griensven M, Probst C, Müller K, et al. Leukocyte-endothelial interactions *via* ICAM-1 are detrimental in polymicrobial sepsis [J]. *Shock*, 2006, 25: 254-259.
- Hofer S, Bopp C, Hoerner C, et al. Injury of the blood brain barrier and up-regulation of ICAM-1 in polymicrobial sepsis [J]. *J Surg Res*, 2008, 146: 276-281.
- Tomasi CD, Vuolo F, Generoso J, et al. Biomarkers of delirium in a low-risk community-acquired pneumonia-induced sepsis [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54: 722-726.
- McCormack FX, Whittsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 707-712.
- Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42: 279-287.
- Silveyra P, Floros J. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury [J]. *Front Biosci*, 2012, 17: 407-429.
- Lee MY, Oh YK, Cho JH. Changes of serum tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in the sepsis of neonates [J]. *J Kor*

- Pediat Soc, 1995, 38: 1307-1314.
- [24] Zhou XQ, Su C, Li XT, et al. The inhibitory effect of *N-p*-chloro-benzenesulfonyl-4-aminosalicylic acid on dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1652-1656.
- [25] Lin HC, Lee HS, Chiueh TS, et al. Histopathological assessment of inflammation and expression of inflammatory markers in patients with ketamine-induced cystitis [J]. Mol Med Rep, 2015, 11: 2421-2428.
- [26] Wu TC, Geng J, Guo WJ, et al. Asiatic acid inhibits lung cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by destroying mitochondria [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7: 65-72.