

胞浆识别受体 NODs 及其信号通路在侵袭性肺曲霉病中的作用

罗闵丹^{1,2△} 谢卫华^{3△} 苏明声¹ 李祥¹ 石青⁴ 谢小梅^{1*}

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室 江西 南昌 330004)

(2. 湖南中医药大学 药学院 湖南 长沙 410208)

(3. 江西中医学院 药学院 江西 南昌 330004)

(4. 南昌大学医学院 微生物学教研室 江西 南昌 330006)

摘要:【目的】研究天然免疫系统中胞浆识别受体 NODs 及其信号通路在小鼠侵袭性肺曲霉病(IPA)中的作用。【方法】小鼠随机分为正常对照组、正常+接种烟曲霉菌组(正常感染组)和免疫抑制+接种烟曲霉菌组(IPA组),经鼻吸入烟曲霉孢子后在不同时相点处死小鼠,无菌取肺组织分别进行病理切片,烟曲霉菌落计数,RT-PCR法、Western blot法动态检测小鼠感染烟曲霉菌过程中肺组织 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 表达,促炎细胞因子 TNF- α 含量的变化规律。【结果】鼻吸入烟曲霉菌后 72 h 时,IPA 组肺组织出现严重炎症反应,并有大量的菌丝生成,同时各时相点的烟曲霉菌负荷均高于正常感染组;与正常感染组比较,IPA 组 NOD1、RIP2 mRNA 持续低表达,而 NOD2 mRNA 则在感染最早期(24 h)异常高表达,而在随后的感染过程中一直处于低表达状态;正常小鼠感染烟曲霉菌后,肺组织中促炎细胞因子 TNF- α 在感染前期皆呈高表达,且最高表达量均出现在 48 h 或 72 h,之后下降并恢复至正常水平。而 IPA 小鼠促炎细胞因子 TNF- α 缓慢且低水平释放。【结论】NOD1、RIP2 的表达受到长期抑制,NOD2 在感染最早期的过度激活以及随后的抑制表达,引起促炎细胞因子低表达,可能导致了侵袭性肺曲霉病的发生发展。

关键词:侵袭性肺曲霉病, NODs, RIP2, 发病机理

Role of NODs and their signaling pathways in invasive pulmonary aspergillosis

LUO Hong-Dan^{1,2} XIE Wei-Hua³ SU Ming-Sheng¹ LI Xiang¹ SHI Qing⁴ XIE Xiao-Mei^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

(2. Department of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

(3. Department of Pharmacy, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30560147, 30760236)

*通讯作者: ✉: jxxm1964@sina.com

△同为第一作者;第一、二单位并列第一署名单位

收稿日期: 2013-04-07; 接受日期: 2013-06-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

(4. Department of Microbiology, Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: [Objective] To study the role of the nucleotide binding oligomerization domain-like receptor (NODs) and their signaling pathways in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in mice. **[Methods]** Mice were randomly divided into three groups: negative control, mice infected with *Aspergillus fumigatus* only and mice of combination of immunosuppression and *Aspergillus fumigatus* infection (IPA group). Only IPA mice were immunosuppressed with Cyclophosphamide (100 mg/d) for 2 d before *Aspergillus fumigatus* spores were inhaled into mice of different groups, normal saline was used instead for negative control. Then mice were killed at different time points and lung tissues were collected for biopsy and *Aspergillus fumigatus* colony count. RT-PCR and Western blot were used to measure NOD1, NOD2, RIP2 mRNA level and TNF- α protein expression in lung tissues, respectively. **[Results]** At 72 h of post-infection, severe inflammation and a large number of hyphae were observed in lung tissues of IPA mice. Their *Aspergillus fumigatus* load at all time points were higher when compared with mice infected with *Aspergillus fumigatus* only, and their NOD1 and RIP2 mRNA levels were continuously lower. While NOD2 mRNA was abnormally highly expressed at 24 h and stayed at low expression level afterwards. TNF- α was highly expressed in mice infected with *Aspergillus fumigatus* only and reached the peak at 48 h and 72 h post-transfection. However, TNF- α was released slowly and lowly in IPA mice. **[Conclusion]** Persistently inhibited NOD1 and RIP2 expression along with late-stage inhibited NOD2 expression in IPA mice resulted in the low-expression of proinflammatory cytokine, which may led to the development of invasive pulmonary aspergillosis.

Keywords: Invasive pulmonary aspergillosis (IPA), NODs, RIP2, Pathogenesis

侵袭性肺曲霉病(Invasive pulmonary aspergillosis, IPA)是烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)侵入免疫受损宿主所导致的严重感染性疾病,近二十年来,随着恶性肿瘤、HIV感染、白血病和器官移植等免疫功能受损患者的增多,IPA的发病率呈上升趋势,现已成为仅次于念珠菌病的主要肺部真菌感染性疾病。侵袭性肺曲霉病以菌丝侵入及组织破坏为主要特征,进一步发展可经血液播散导致骨骼、脑、肝、肾、心脏等全身多器官受累,其病理表现主要为急性坏死性出血性肺炎,预后极差,死亡率高达60%–95%。迄今侵袭性肺曲霉病的发病机理仍不清楚。

核苷酸结合寡聚域受体(The nucleotide binding oligomerization domain-like receptor, NODs)是天然免疫系统中重要的一类胞浆内 PRRs。其代表 NOD1 和 NOD2 已被证实在抗细菌感染中起着重要的作用,但其介导抗真菌感染的研究还很少^[1],研究表明 *A. fumigatus* 可以上调 NOD2 的表达^[2]。本研究通过建立小鼠 IPA 模型,无菌取肺组织进行病理切片和烟曲霉菌落计数;提取肺组织总 RNA,利用 RT-PCR 法检测 NOD1、NOD2 和 RIP2 mRNA

表达水平;提取总蛋白,利用蛋白印迹法检测下游细胞因子 TNF- α 的表达水平,体内研究 NODs 信号通路在小鼠 IPA 发生发展中的作用,为进一步阐明侵袭性肺曲霉的发病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

BALB/c 清洁级小鼠,雄性,6–8 周龄,20–25 g,上海西普尔-必凯实验动物中心提供。小鼠随机分成 3 组:(1) 正常对照组(Normal Group, N): 正常健康小鼠($n=10$);(2) 正常感染组(N+A. *fumigatus*): 正常健康小鼠感染烟曲霉菌组($n=10$);(3) IPA 组: 免疫抑制小鼠感染烟曲霉菌组($n=10$)。

1.2 菌株及培养

A. fumigatus (临床分离株,分离号:3910),购自中国医学真菌中心(南京)。将 *A. fumigatus* 接种于蔡氏固体培养基(NaNO_3 3.0, K_2HPO_4 1.0, MgSO_4 0.5, KCl 0.5, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.01,蔗糖 30.0,加 1 000 mL 蒸馏水溶解,调整 pH 为 5.5–5.6,加入 2%琼脂。 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 4 °C 保存),置于霉菌恒温培养箱中,26.5 °C 恒温培养 4–7 d,收集孢子调整

其浓度为 10^7 cells/mL, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 实验试剂及 PCR 引物

兔抗小鼠 β -Actin 多抗, 羊抗小鼠 TNF- α 多抗, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, HRP 标记的兔抗山羊 IgG 抗体, Santa Cruz 公司; Trizol 试剂, Invitrogen 公司; TaKaRa RNA PCR Kit 3.0 (AMV) 试剂盒, 大连宝生物工程有限公司; 引物合成, 上海生工公司, PCR 引物如表 1 所示。

1.4 小鼠 IPA 模型建立^[3]

IPA 组小鼠分别腹腔注射 cy100 mg/(kg·d), 其它两组小鼠腹腔注射等量的生理盐水, 连续 2 d。除正常对照组小鼠外, 乙醚麻醉其它两组小鼠, 取 1.1 制备的 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的烟曲霉孢子悬液, 由鼻孔滴入, 放松腹部, 小鼠即吸入菌液。为维持小鼠免疫抑制状态, 接种烟曲霉 96 h 时补充腹腔注射 cy100 mg/(kg·d)。

1.5 小鼠肺组织烟曲霉菌培养(菌负荷)

无菌条件下取 100 mg 小鼠肺组织匀浆, 稀释 100 倍后取 0.1 mL 接种于蔡氏固体培养基, 5 d 后计数烟曲霉菌落数。

1.6 小鼠肺组织病理观察

取各组小鼠肺组织做石蜡切片, 常规 HE 染色, 观察其病理变化。

1.7 RT-PCR 检测小鼠肺组织中 NOD1、NOD2 和 RIP2 mRNA 的表达

取 100 mg 肺组织采用 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。采用 β -Actin 作为内参。NOD1、RIP2 和 β -Actin 的扩增产物大小分别为: 261、264 和 409 bp。PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $57.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (NOD1、NOD2), $59.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RIP2) 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 扩增产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 应用凝胶成像系统灰度扫描。

1.8 Western blot 检测肺组织中 TNF- α 含量

取 100 mg 的肺组织匀浆提取总蛋白^[4], Bradford 法测定蛋白质浓度, $40\text{ }\mu\text{g}$ 上样进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、杂交、显色, 以 β -Actin 作为内参, 所得结果灰度扫描后用 Bandscan 软件进行分析。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠肺部烟曲霉菌负荷

IPA 组各时相点的肺组织菌落数多于正常感染组, 差异有显著性意义($P<0.05$); 正常感染组 72 h 后各时相点菌落数显著减少, 72 h 后各时相点与 48 h 前各时相比较差异有显著性意义($P<0.05$), 见图 1。

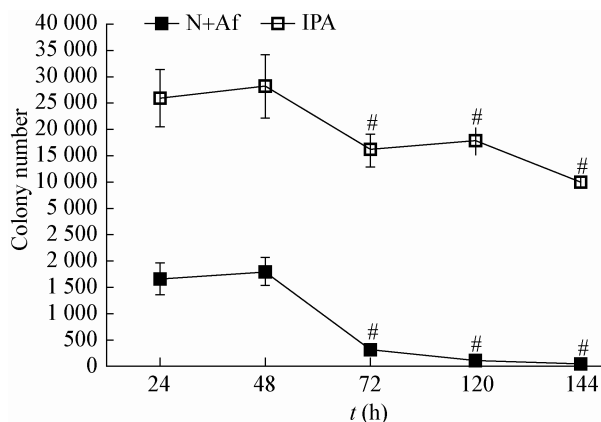


图 1 正常感染组和 IPA 组小鼠肺组织烟曲霉菌负荷趋势
Figure 1 The trend of *A. fumigatus* burden in lung tissue of normal mice with infection group and IPA group

Note: N+Af: *N. fumigatus* group; IPA: IPA group; #: $P<0.05$, vs at 24 h.

表 1 实验所用引物
Table 1 Primer sequences in this work

Aim gene	Sequences (5'→3')	Length (bp)
β -Actin reverse/anti-reverse	ACGGCCAGGTCATCACTATT/TAACAGTCCGCTAGAAGCA	409
NOD1 reverse/anti-reverse	CAACAGGGAACATCTGGTCA/GAAGGGGAGAAGCCAATTTT	261
NOD2 reverse/anti-reverse	CCGTGTCCTGTTAACCTTTG/AGGATCAGCAGGTACATGTC	438
RIP2 reverse/anti-reverse	GCCATTGTGAGCCAGATGA/ATTTGAAGCGGTGCTTTG	264

2.2 小鼠肺组织病理观察

正常感染组小鼠肺组织病变广泛,可见充血及出血,病变区域肺泡间隔增宽,有大量的中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞浸润,未见菌丝生成;24-48 h, IPA 模型组小鼠肺组织炎症反应较正常+烟曲霉接种组轻,有明显的充血、出血,大量的炎细胞浸润。在吸菌后第 72-144 h, IPA 模型组小鼠肺组织可见大量的菌丝生成,肺脓肿,较严重的出血和充血,肺泡间隔增宽,气管上皮细胞脱落,肺泡腔内多量纤

维素性渗出,并出现明显间质增生,如图 2 所示。

2.3 小鼠肺组织中 NODs、RIP2 mRNA 及 TNF- α 蛋白动态表达

2.3.1 NOD1 mRNA 表达动态分析: 正常感染组感染 24 h 后 NOD1 mRNA 表达量迅速上升,48 h 达到最高点,随后恢复至正常水平;与正常感染组比较,IPA 组 NOD1 mRNA 表达趋势较平缓,表达量在感染 24 h 后缓慢上升,至 72 h 达到最高点,随后恢复至正常水平,如图 3 所示。

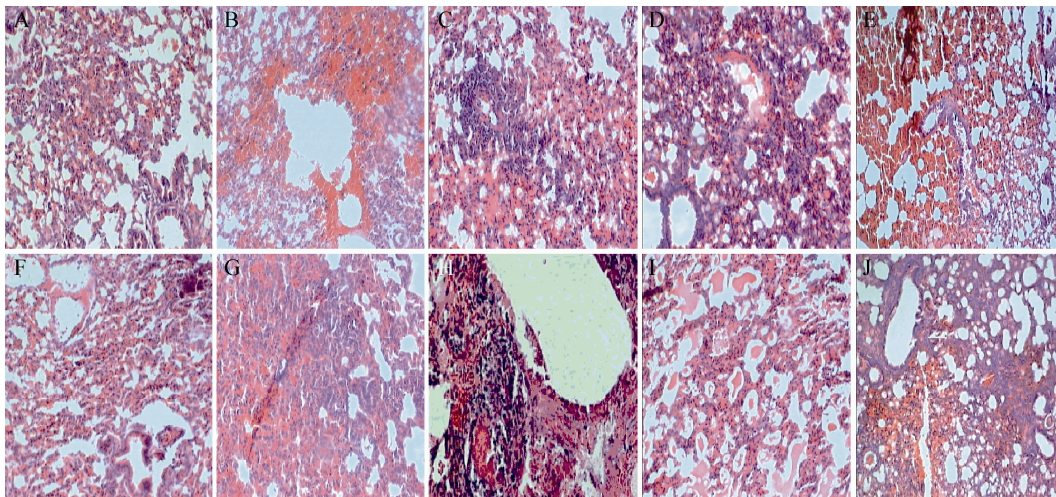


图 2 各组小鼠肺组织病理变化

Figure 2 Results of HE staining of the lungs

Note: A-E: N+A. *fumigates* group at 24, 48, 72, 120, 144 h; F-J: IPA group at 24, 48, 72, 120, 144 h.

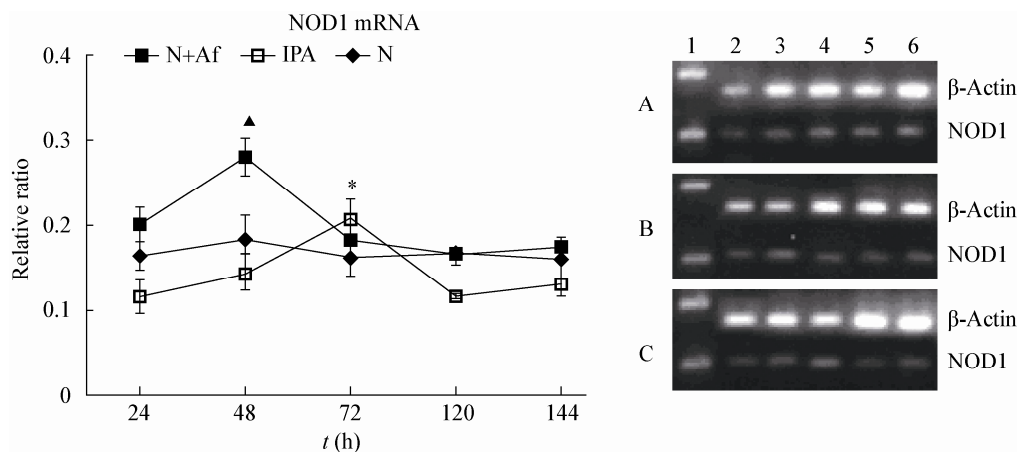


图 3 各组 NOD1 mRNA 动态表达及不同时间相点 NOD1 基因 RT-PCR 产物电泳图

Figure 3 The dynamic expression of NOD1 mRNA in different group and the product's electrophoretogram of NOD1 gene at different time point

Note: N: Normal group; N+Af: N+A. *fumigates* group; IPA: IPA group. A: Normal group; B: N+A. *fumigates* group; C: IPA group. 1: Marker; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h; 5: 120 h; 6: 144 h. \blacktriangle : $P < 0.05$, vs at 24 h in N+A. *fumigates* group; *: $P < 0.05$, vs at 24 h in IPA group.

2.3.2 NOD2 mRNA 表达动态分析: 正常感染组在感染 24 h 后 NOD2 mRNA 表达量迅速上升, 48 h 时达到最高点后呈持续较高表达; 与正常感染组比较, IPA 组在感染 24 h 后表达量缓慢上升, 至 48 h 达到最高点后持续降低表达, 最终回落至正常

水平, 如图 4 所示。

2.3.3 RIP2 mRNA 表达动态分析: 正常感染组表达呈波浪状起伏, 分别在 48 h 和 120 h 达到峰值; 与正常感染组比较, IPA 组表达持续下降, 120 h 到最低点后再上升至正常水平, 如图 5 所示。

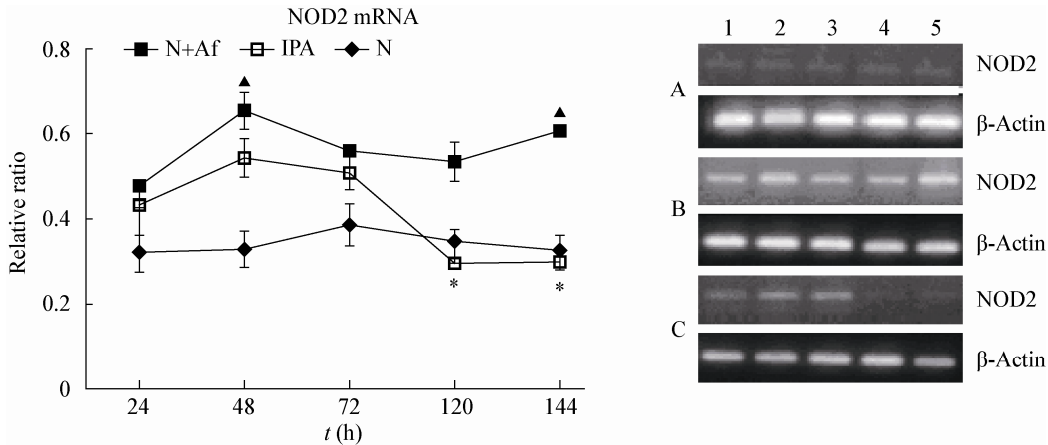


图 4 各组 NOD2 mRNA 动态表达及不同时间相点 NOD2 基因 RT-PCR 产物电泳图

Figure 4 The dynamic expression of NOD2 mRNA in different group and the product's electrophoretogram of NOD2 gene at different time point

Note: N: Normal group; N+Af: *N.A. fumigates* group; IPA: IPA group. A: Normal group; B: *N.A. fumigates* group; C: IPA group. 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h; 4: 120 h; 5: 144 h. ▲: $P < 0.05$, vs at 24 h in *N.A. fumigates* group; *: $P < 0.05$, vs at 24 h in IPA group.

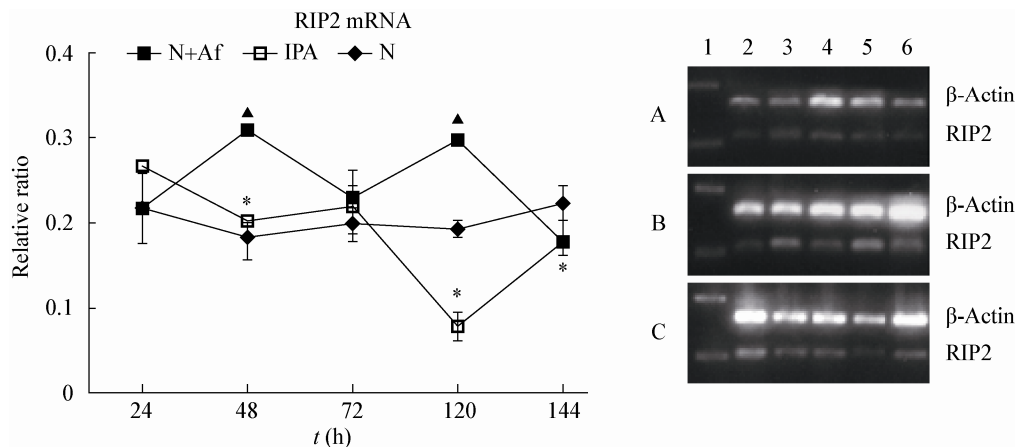


图 5 各组 RIP2 mRNA 动态表达及不同时间相点 RIP2 基因 RT-PCR 产物电泳图

Figure 5 The dynamic expression of RIP2 mRNA in different group and the product's electrophoretogram of RIP2 gene at different time point

Note: N: Normal group; N+Af: *N.A. fumigates* group; IPA: IPA group. A: Normal group; B: *N.A. fumigates* group; C: IPA group. 1: Marker; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h; 5: 120 h; 6: 144 h. ▲: $P < 0.05$, vs at 24 h in *N.A. fumigates* group; *: $P < 0.05$, vs at 24 h in IPA group.

2.3.4 TNF- α 蛋白表达动态分析: 正常感染组在感染 24 h 后 TNF- α 蛋白的表达缓慢上升, 72 h 时达到最高点后回落至正常水平; 与正常感染组比较, IPA 组呈持续低表达, 如图 6 所示。

2.4 各组同时相点 NODs、RIP2 mRNA 及 TNF- α 蛋白表达比较

2.4.1 各组同时相点 NODs、RIP2 mRNA 表达比较: 与正常组比较: 正常感染组 NOD1 mRNA 各时相点表达量均上调($P<0.05$); NOD2 mRNA 在 48、72、144 h 表达量上调($P<0.05$); RIP2 mRNA 在 48、120 h 时相点表达量上调($P<0.05$)。与正常感染组比较, IPA 组 NOD1 mRNA 在 48、120、144 h 时表达量降低($P<0.05$); NOD2 mRNA 在各时相点表达量降低($P<0.05$); RIP2 mRNA 在 24、48、120 h 时表达量降低($P<0.05$), 见图 7A-C。

2.4.2 各组同时相点 TNF- α 蛋白表达比较: 与正常对照组比较, 除 144 h 外, 正常感染组 TNF- α 的表达量均上升($P<0.05$); 与正常感染组比较, IPA 组 TNF- α 表达量降低, 其中在 48、72、120 h 的差异具有显著性意义($P<0.05$), 见图 7D。

3 讨论

NODs 家族是新发现的一类重要的胞浆内

PRRs, 以 NOD1 和 NOD2 为代表^[5]。有大量研究结果证明 NOD1 和 NOD2 介导的天然免疫在宿主抗早期感染中起重要作用^[6-10]。烟曲霉菌感染为细胞内感染, NOD1 和 NOD2 是一类重要的胞浆内受体, 主要识别细胞内的病原体。如果 NODs 确实与抗烟曲霉菌感染有关的话, 无论是通过直接识别烟曲霉菌还是其他途径间接激活, 其在清除烟曲霉菌过程中应该起着很重要的作用。

尽管 NOD1 和 NOD2 识别的配体不同, 但是它们启动相同的信号通路。目前所有的研究结果均表明 RIP2 是 NOD 信号通路中的关键中间信号转导分子^[11-14]。RIP2 活化后, 可作用于 IKKs 诱导激活 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 入核启动相关的炎症基因表达, 释放细胞因子杀灭入侵的病原菌。细胞因子具有调节细胞生理功能、介导炎症反应、参与免疫应答和组织修复等多种生物学效应。有研究^[14-19]表明, Th1 型细胞因子(IL-1 β 、TNF- α 等)表达量的升高有利于机体杀灭侵入体内的曲霉菌。

本研究结果发现, 正常小鼠感染烟曲霉菌后, NOD1、NOD2 和 RIP2 的基因表达都有不同程度的上调, 表明正常宿主感染烟曲霉后激活了 NOD1 和 NOD2 受体, 并且通过 RIP2 进行信号传导, 与张辉军等^[20]早期的研究结果一致。但是免疫受损

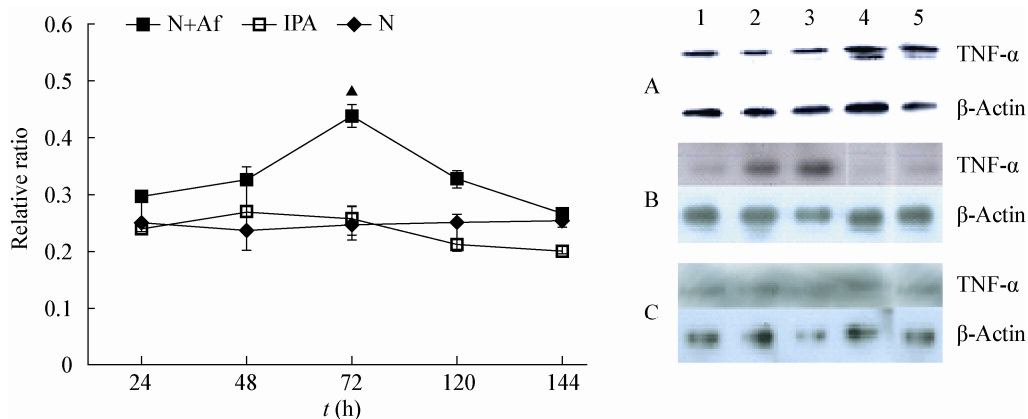
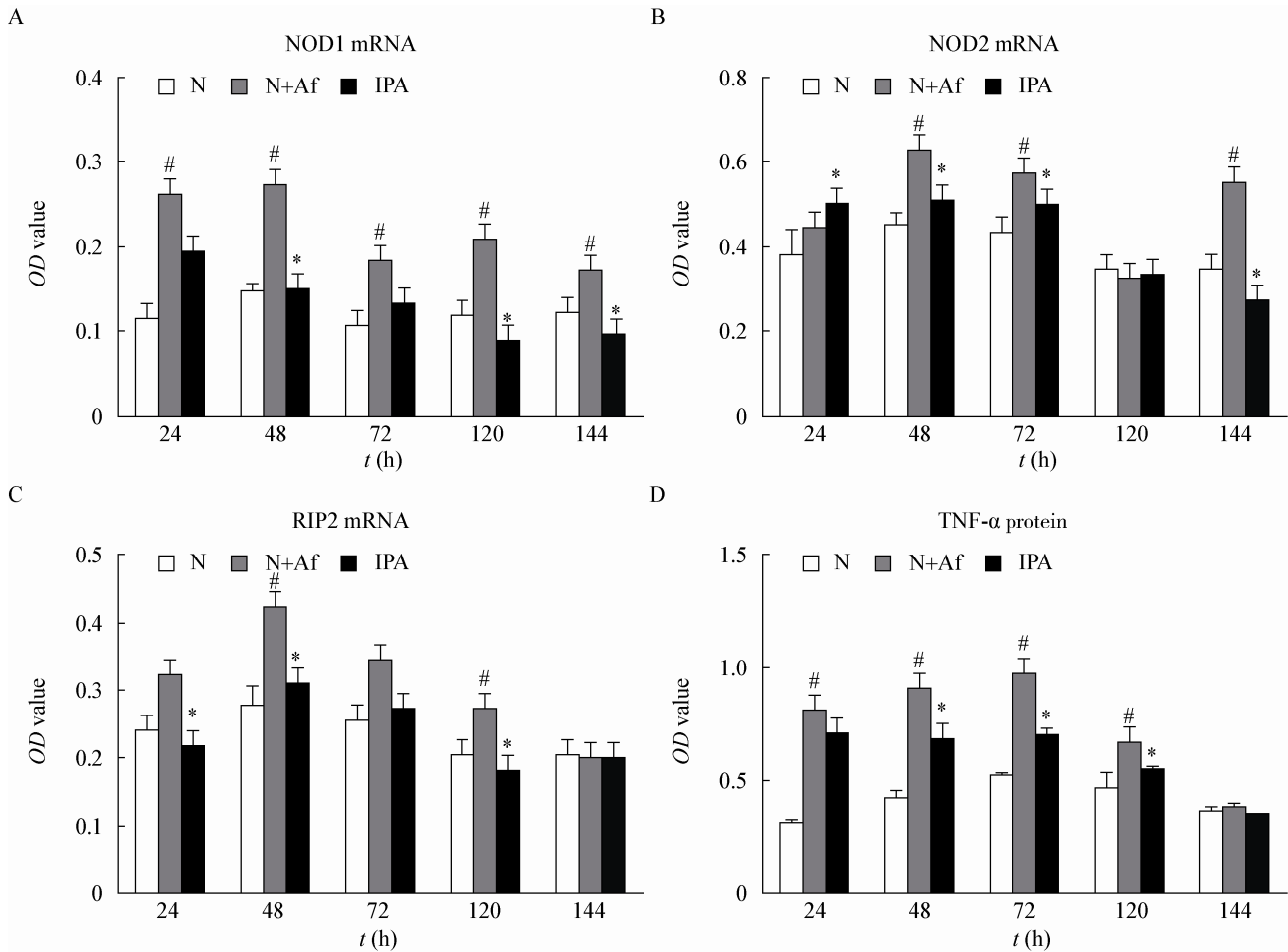


图 6 各组 TNF- α 蛋白动态表达及不同时间相点 TNF- α 蛋白印迹产物

Figure 6 The dynamic expression of TNF- α protein in different group and the western blotting gram of TNF- α protein at different time point

Note: N: Normal group; N+Af: N+A. *fumigates* group; IPA: IPA group. A: Normal group; B: N+A. *fumigates* group; C: IPA group. 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h; 4: 120 h; 5: 144 h. \blacktriangle : $P<0.05$, vs at 24 h in N+A. *fumigates* group; *: $P<0.05$, vs at 24 h in IPA group.

图7 各组同时相点 NODs、RIP2 mRNA 及 TNF- α 蛋白表达比较Figure 7 The expression of NODs, RIP2 mRNA and TNF- α protein at the same time in different groups

Note: N: Normal group; N+Af: N+A. *fumigates* group; IPA: IPA group. #: $P < 0.05$, vs N group; *: $P < 0.05$, vs N+A. *fumigates* group.

小鼠感染烟曲霉菌后出现了 NOD1、RIP2 mRNA 的持续低表达以及 NOD2 在感染最早期异常高表达和随后的低表达。

病灶组织的炎性细胞因子变化是病变局部炎症反应的真实体现,测定其浓度变化有助于了解发病机制。在曲霉菌病动物模型中,首先可以检测到的细胞因子是 TNF- α ;当 TNF- α 缺失时,可导致感染动物极高的死亡率^[21]。因此, TNF- α 在曲霉菌的感染中起着重要的保护作用。本实验结果提示,小鼠肺组织中细胞因子 TNF- α 表达水平与 IPA 的病情及出血关系密切。感染前期,正常感染组小鼠吸入烟曲霉菌后,肺组织中促炎细胞因子 TNF- α

表达水平也缓慢升高,其表达水平显著高于正常对照组;结合肺组织菌负荷及肺组织病理切片结果,说明正常小鼠感染烟曲霉菌前期即出现炎症反应,以促炎细胞因子大量释放为主,通过产生炎症反应清除烟曲霉孢子,抑制菌丝的形成;而 IPA 组小鼠吸入烟曲霉菌后, TNF- α 表达水平上升缓慢,且显著低于正常感染组,结合肺组织菌负荷和病理切片结果,说明免疫受损小鼠感染烟曲霉菌后促炎细胞因子分泌受到抑制,不能及时释放促炎细胞因子参与炎症反应抑制菌丝生成,导致出现严重肺组织损伤。Kamei 等^[22]实验表明,在烟曲霉感染动物模型早期即可见 IFN- γ 伴随 IL-1 α 和细胞间黏附分子

(ICAM-1)的释放而释放,而高水平的 IFN- γ 可以增强机体对真菌感染的抗病能力;相对应的,低水平的 IFN- γ 则促进曲霉病的发展。因此本实验后续将测定 IFN- γ 在模型中的表达也是极有意义的。

模式识别受体识别微生物病原体是激活天然免疫和适应性免疫的关键,多重的分子调控机制保证了复杂适当的信号激活,然而信号通路中上游分子的激活发生紊乱时其下游信号也会受到影响,最终导致感染性疾病的发生^[23]。本研究结果提示,NODs 信号通路参与了小鼠侵袭性肺曲霉病的发病过程。在小鼠侵袭性肺曲霉病的发生过程中,NOD1 和 RIP2 的表达受到长期抑制,NOD2 在感染最早期的过度激活以及随后的抑制表达,引起促炎细胞因子的低表达,可能导致了侵袭性肺曲霉的发生发展。

参 考 文 献

- [1] 石青,李祥,刘金辉,等. NOD1和 NOD2介导天然免疫的两种胞浆蛋白[J]. 医学分子生物学杂志, 2009, 6(3): 265-268.
- [2] Zhang HJ, Qiu JM, Shao CZ, et al. *Aspergillus fumigatus* conidia upregulates NOD2 protein expression both *in vitro* and *in vivo*[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2008, 29(10): 1202-1208.
- [3] 罗阔丹,谢小梅. 侵袭性肺曲霉病实验小鼠模型的建立[J]. 江苏医药, 2008, 34(1): 66-68.
- [4] Marc P, Patrick V, Guy T, et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia[J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 177-204.
- [5] Dana JP, Stephen EG. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection[J]. Molecular Immunology, 2004, 41(11): 1099-1108.
- [6] Boughan PK, Argent RH. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of β -defensins during helicobacter pylori infection[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281: 11637-11648.
- [7] Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract flavell[J]. Science, 2005, 307(2): 731-734.
- [8] 王玉刚,吴昊,孟甌,等. 黄芩总黄酮对金葡萄菌感染模式识别受体 TLR2/NOD2及其相关炎症因子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 866-870.
- [9] Mathias C, Naohiro I, Gabriel N. Battling enteroinvasive bacteria: Nod1 comes to the rescue[J]. Trends in Microbiology, 2004, 12(12): 529-533.
- [10] Barton JL, Berg T, Didon L, et al. The pattern recognition receptor Nod1 activates CCAAT/enhancer binding protein β by *Aspergillus fumigatus* in lung epithelial cells[J]. European Respiratory Journal, 2007, 30(8): 214-222.
- [11] Inohara N, Ogura Y, Chen FF, et al. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(1): 2551-2554.
- [12] Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, et al. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*[J]. EMBO Report, 2001, 2(8): 736-742.
- [13] Marriott I, Rati DM, McCall SH, et al. Induction of Nod1 and Nod2 intracellular pattern recognition receptors in murine osteoblasts following bacterial challenge[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(5): 2967-2973.
- [14] Brieland JK, Jackson C, Menzel F, et al. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(3): 1554-1560.
- [15] Gafá V, Remoli ME, Giaconfini E, et al. *In vitro* infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment[J]. Microbes and Infection, 2007, 9(8): 971-980.
- [16] Roilides E, Dimitriadou-Georgiadou A, Sein T, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(12): 5999-6003.
- [17] Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1999, 162(2): 1633-1640.
- [18] Netea MG, Warris A, Van der Meer, et al. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2006, 16: 1620-1622.
- [19] Balloy V, Huerre M, Latge JP, et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(1): 494-503.
- [20] 张辉军,瞿介明,邵长周,等. NOD 相关蛋白在烟曲霉感染小鼠肺组织总的表达[J]. 中国临床医学, 2005, 12(6): 1007-1009.
- [21] Reichard U. The significance of secretory and structure associated protease of *Aspergillus fumigatus* for the pathogenesis of invasive aspergillosis[J]. Mycosis, 1998, 41(suppl.1): 78-82.
- [22] Kamei JFC, Wierenga ATJ, Hiemstra PS, et al. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of pro-inflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1997, 176(2): 300-303.
- [23] Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, et al. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease[J]. Journal of Endotoxin Research, 2006, 12(3): 133-150.