

大肠上皮细胞中MDP活化NOD2诱导耐受性 CXCL1、CXCL2、CXCL3和CXCL8表达的分子机制

张朝¹ 曹婷¹ 胡玲¹ 胡锦跃^{2*}

(¹南华大学附属长沙中心医院检验科, 长沙 410004; ²南华大学附属长沙中心医院中心实验室, 长沙 410004)

摘要 该文探讨肠上皮细胞中胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)活化NOD2诱导趋化因子表达的调控机制。采用RT-PCR和qRT-PCR的方法检测趋化因子、细胞因子及泛素编辑酶A20的mRNA表达水平。Western blot检测A20的蛋白表达水平。ELISA检测趋化因子CXCL8(又称IL-8)的水平。脂质体转染法过表达A20。结果显示, MDP处理HCT116细胞诱导趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL3和CXCL8的表达, 但不诱导促炎因子TNF α 、IL-1 β 和IL-6的表达; MDP所诱导的反应具有耐受性, 初次处理后的再次处理所诱导的反应程度显著下降; MDP处理上调A20, 但过表达A20并不下调MDP诱导的免疫反应; 同时, IL-1 β 上调A20, 但IL-1 β 预处理同样不能下调MDP诱导的反应。总之, 大肠上皮细胞中MDP诱导耐受性CXCL1、CXCL2、CXCL3和CXCL8的表达, 且A20不参与此耐受机制的形成。

关键词 核苷酸结合寡聚化结构域2; 胞壁酰二肽; 趋化因子; 免疫耐受; 大肠上皮细胞

The Molecular Mechanism of NOD2 Activated by MDP in Colorectal Epithelial Cells to Induce Tolerant CXCL1, CXCL2, CXCL3 and CXCL8

ZHANG Zhao¹, CAO Ting¹, HU Ling¹, HU Jinyue^{2*}

(¹Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Changsha Central Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Changsha 410004, China; ²Central Laboratory, the Affiliated Changsha Central Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Changsha 410004, China)

Abstract This study explored the regulatory mechanism of MDP (muramyl dipeptide) activated NOD2 to induce chemokine expression in colorectal epithelial cells. RT-PCR and qRT-PCR were used to detect mRNA levels of chemokines, cytokines and ubiquitin editing enzyme A20. Western blot was used to detect protein level of A20. ELISA was used to detect protein level of chemokine CXCL8 (also called IL-8). The liposome transfection method was used to over-express A20. The results showed that MDP treatment of HCT116 cells induced the expression of chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3 and CXCL8, but did not induce the expression of pro-inflammatory factors TNF α , IL-1 β and IL-6. The production of chemokines induced by MDP was tolerant, because the chemokine levels induced by the re-treatment with MDP after a pre-treatment with MDP was decreased significantly compared with the non-pre-treated group. MDP treatment up-regulated A20, but A20 overexpression did not down-regulate the immune response induced by MDP. Meanwhile, IL-1 β up-regulated A20, but IL-1 β pre-treatment also failed to down-regulate

收稿日期: 2021-08-18 接受日期: 2021-09-18

湖南省卫生健康委科研计划课题(批准号: 2020JJ4636)、湖南省自然科学基金(批准号: 20201386)和南华大学研究生科研创新项目(批准号: 203YXC028)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18774009662, E-mail: jinyueh@yahoo.com

Received: August 18, 2021 Accepted: September 18, 2021

This work was supported by Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Commission (Grant No.2020JJ4636), Hunan Natural Science Foundation (Grant No.20201386) and Postgraduate Research and Innovation Project of University of South China (Grant No.203YXC028)

*Corresponding author. Tel: +86-18774009662, E-mail: jinyueh@yahoo.com

MDP-induced immune response. In conclusion, MDP induces the tolerant expression of CXCL1, CXCL2, CXCL3 and CXCL8 in colorectal epithelial cells, and A20 does not participate in the formation of this tolerance mechanism.

Keywords nucleotide binding oligomerization domain 2; muramyl dipeptide; chemokine; immune tolerance; colorectal epithelial cells

核苷酸结合寡聚化结构域2(nucleotide-binding and oligomerization domain 2, NOD2)是细胞内病原微生物模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 属于NLR(NOD-like receptor)家族, NOD2识别来自细菌细胞壁成分肽聚糖(peptidoglycan PGN)的胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)。然后NOD2募集接头蛋白受体相互作用蛋白2(receptor-interacting protein 2, RIP2), 活化核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activation protein kinases, MAPKs), 诱导炎症反应和抗微生物天然免疫^[1]。MDP是NOD2识别的最小单位^[2]。MDP也是NOD2的激动剂, 它的激活对许多疾病的发生发展具有重要的意义^[3]。

免疫细胞在炎症部位的聚集是诱导炎症反应的基础, 而趋化因子是诱导免疫细胞移动、回巢和聚集的关键^[4]。趋化因子是一群小分子量、进化高度保守的分泌蛋白, 其功能主要是募集白细胞到炎症部位^[5], 也和造血、血管生成和伤口愈合^[6]以及肿瘤^[7]相关。趋化因子按其蛋白质序列中半胱氨酸的排列不同分为4类, 分别为CXC、CC、C和CX3C类, 其中CXC类两个半胱氨酸之间夹着任一其他氨基酸^[8]。通常, CXCL1~8趋化中性粒细胞, CXCL9~11趋化活化的T细胞, CC类趋化因子趋化单核细胞、巨噬细胞和T细胞^[4]。

克罗恩病(Crohn's Disease, CD)是胃肠道的慢性炎症疾病, 典型的临床症状有腹痛、慢性腹泻、体重减轻等, 好发于年轻人^[9]。该病目前无法治愈, 且严重影响患者的生活水平^[10]。它的发病与遗传、环境因素、以及自身免疫调控有关。NOD2突变是CD发病的重要危险因素, 可以单独与其他因素(包括环境和其他遗传突变)协同作用导致疾病的发生, 然而60%~70% CD的NOD2功能正常^[11]。而对于NOD2正常的CD患者, 其NOD2的调控可能发生异常。在专职免疫细胞中, 活化NOD2可以诱导趋化因子的表达^[12-14], 泛素编辑酶A20(又名TNFAIP3)负调控趋化因子表达, 但在肠上皮细胞中, NOD2诱导趋化因子的表达机制仍不清楚。本文通过研究大肠上皮细胞

中活化NOD2诱导趋化因子的表达情况及其调控机制, 可为临床治疗CD提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 大肠上皮细胞HCT116、单核细胞THP1购自美国ATCC。

1.1.2 主要试剂 NOD2激动剂MDP购自美国Invivogen公司; 重组人IL-1 β 、IL-8酶联免疫分析试剂盒购自美国Peprotech公司; RNA抽提试剂Trizol、转染试剂Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司; PCR引物购自深圳华大基因科技有限公司; 逆转录试剂盒购自美国Fermentas公司; 兔抗人GAPDH一抗、兔抗人A20一抗、羊抗兔二抗均购自美国CST公司; ECL化学发光检测试剂盒购自美国Biological Industries公司; A20质粒购自美国Genecopoeia公司; 细胞培养瓶24/6孔板购自上海univ-bio有限公司; DMEM高糖培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清购自杭州四季青生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏大肠上皮细胞HCT116, 培养于含有10% FBS和1%青-链霉素的DMEM培养基中; 复单单核细胞THP1, 培养于含有10% FBS和1%青-链霉素的RPMI 1640培养基中。细胞于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.2.2 RT-PCR 收集细胞, 用Trizol裂解, 提取总RNA, 分光光度计测量总RNA含量, 按照试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA, PCR扩增目的DNA片段, 在1%的琼脂糖凝胶中电泳, GelRed(Biotium)显色。所用的引物序列见表1。

1.2.3 qRT-PCR 用罗氏应用科学公司的TaqMan Universal PCR master Mix和LightCycle 96检测系统扩增目的基因片段。以3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的扩增水平作为内源性对照, 对目的基因的扩增进行归一化处理。使用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}比较法进行数据分析和计算。基因表达水平用实验组样品中基因拷贝数相对于对照组样品中的基因拷贝数的倍数来表现。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	长度/bp Length /bp
<i>GAPDH</i>	F: AGA AGG CTG GGG CTC ATT T R: CCA TCA CGC CAC AGT TTC C	280
<i>CXCL1</i>	F: TCA CCC CAA GAA CAT CCA AA R: TCC TAA GCG ATG CTC AAA CA	304
<i>CXCL2</i>	F: GCA GGG AAT TCA CCT CAA GA A R: AAC ACA TTA GGC GCA ATC CA	297
<i>CXCL3</i>	F: AAC AGC AGC TTT CTA GGG ACA R: GTG ATC CAC TAA TTG CTT GCA	311
<i>CXCL4</i>	F: AGT CAT TGG CCA CAG AGA CC R: TTC CTT CCA TTC TTC AGC GT	336
<i>CXCL5</i>	F: ACA GGC AAA TTC CTG ACT GCT R: CCA TAA ATG CTG GCC TTC TT	336
<i>CXCL6</i>	F: ACG CTG AGA GTA AAC CCC AAA R: TTT CCC CCA CAC TCT TCA AA	332
<i>CXCL7</i>	F: ACA CTG AAG GAT GGG AGG AAA R: GGG TTG AAA CCA GGC TTA TT	316
<i>CXCL8</i>	F: TTG GCA GCC TTC CTG ATT T R: TCA AAA ACT TCT CCA CAA CCC	253
<i>CXCL9</i>	F: TCT CCC AAT TCA TCC TCA CTC R: AAT GGT CTG GTT GCC ATC CT	306
<i>CXCL10</i>	F: ATG CAG TGC TTC CAA GGA TG R: ACC CCA AAG CAG AAA GAT TCC	324
<i>CXCL11</i>	F: TTG GCT GTG ATA TTG TGT GCT R: TGC TCT TTT CCA GGA CTT CA	293
<i>CXCL12</i>	F: TGT GGC ACT CAG ATA CCG ACT R: AAA GAC GGA TCT CAC AGA GGG	314
<i>CXCL13</i>	F: TTC TTC ACT CAC AGC ACC CTA R: ATG GAT TCC TTT GCC TCT TG	307
<i>CXCL14</i>	F: ATG GAT TCC TTT GCC TCT TG R: CAT TTT ATA GCT GCG TGC GAA	327
<i>CXCL16</i>	F: AGA AGC AGC CGG AAA AAA A R: TGA CGC CTA TAA TCC TCG CA	336
<i>CXCL6</i>	F: ACG CTG AGA GTA AAC CCC AAA R: TTT CCC CCA CAC TCT TCA AA	317
<i>CXCL17</i>	F: GTG CAA AGA TTG GTT CCT GA R: TGA TTT AGG GGT GGG TAC AGT	325
<i>TNF-α</i>	F: AAG CC TGT AGC CCA TGT TGT R: AGT CGG TCA CCC TTC TCC A	355
<i>IL-1β</i>	F: TTG AAG CTG ATG GCC CTA AAC R: CAC CAA GCT TTT TTG CTG TG	335
<i>IL-6</i>	F: CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT R: TTG CCT TTT TCT GCA GGA AC	391
<i>A20</i>	F: TCC CCA GGA AAG AAG GAA TT R: TGG CTT TTG CTG TCC CAA TA	300

1.2.4 Western blot 收集细胞, 加入100 μL裂解液提取蛋白质, 取50 μg总蛋白, 加入5× 蛋白上样缓冲液, 100 °C煮沸5 min, 于10% SDS-PAGE凝胶中分离蛋白,

转膜, 5%脱脂奶粉封闭, 加入一抗(1:1 000) 4 °C过夜, 加入二抗(1:2 000) 37 °C 孵育2 h, 用ECL化学发光进行显影。

1.2.5 ELISA 收集细胞培养上清, 依照ELISA试剂盒说明书的方法进行检测。主要步骤为: 取出酶标板, PBS洗3次, 加入100 μ L待测样品, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, PBS洗3次, 加入酶标二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS洗3次, 加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C避光15 min, 加入终止液, 检测波长在450 nm处的D值, 绘制标准曲线并计算IL-8的浓度。每个样品设置3个重复孔。

1.2.6 A20质粒转染 细胞培养于24孔板中, 取A20质粒1 μ g, 用Lipofectamine 3000转染细胞。转染48 h后, Western blot检测转染细胞中蛋白质的表达。为获取稳定转染细胞株, 用1 μ g/mL嘌呤霉素处理3周后, 选择抗性单克隆细胞株并鉴定A20表达水平。

1.2.7 统计学分析 实验结果数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。作图、统计分析采用EXCEL、GraphPad Prism 8软件, 两组间的差异显著性统计使用双尾Student's *t*检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义(对于每个qRT-PCR和ELISA实验样品重复数 $n=3$)。

2 结果

2.1 MDP活化NOD2诱导趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL3和CXCL8的表达

大肠上皮细胞HCT116用5 μ g/mL MDP处理后, RT-PCR和qRT-PCR结果显示: 配体MDP活化NOD2

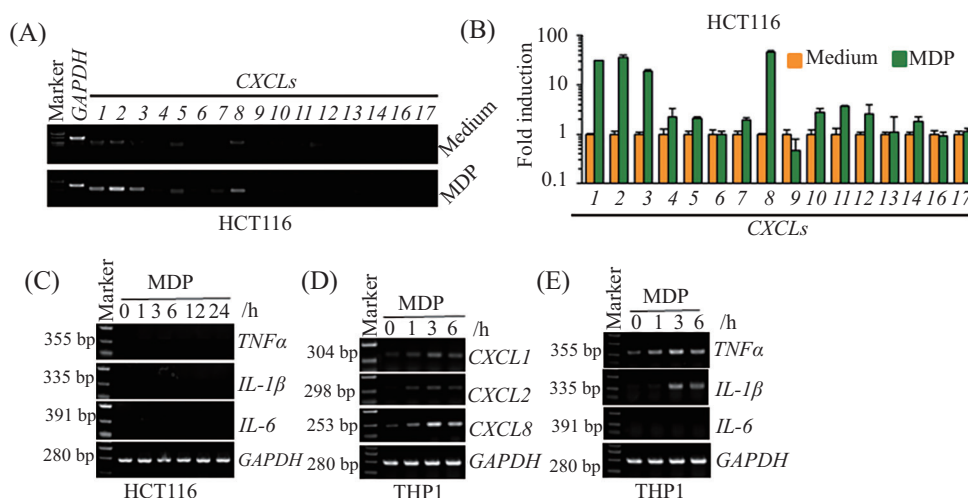
诱导了CXC类趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL3和CXCL8显著上调(图1A和图1B)。然而, MDP不诱导促炎细胞因子TNF α 、IL-1 β 和IL-6(interleukin-6)的表达(图1C)。作为对照, 在THP1单核细胞中, 用5 μ g/mL MDP处理, 可诱导CXCL1、CXCL2、CXCL3和CXCL8以及TNF α 、IL-1 β 的表达(图1D和图1E)。这些结果表明, MDP诱导的免疫反应在肠上皮细胞与单核细胞之间有差异。

2.2 NOD2诱导趋化因子具有耐受性

微生物所诱导的免疫反应均具有精细的负反馈调节机制。为了分析MDP活化NOD2诱导趋化因子的调节机制, HCT116细胞经不同浓度的MDP处理24 h后, 再次用MDP 10 μ g/mL处理3 h, qRT-PCR检测趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL8的表达水平, 结果显示NOD2初次处理后再次处理可诱导趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL8的水平显著下降, 表明MDP诱导趋化因子的表达具有耐受性(图2)。

2.3 泛素编辑蛋白A20不调节NOD2诱导的趋化因子

A20是Toll样受体诱导的免疫反应的负调控因子, 而在免疫细胞中A20也能负调控NOD2。本研究中, 用MDP处理HCT116细胞, qRT-PCR以及Western blot结果显示A20表达上调并且呈时间剂量依赖性

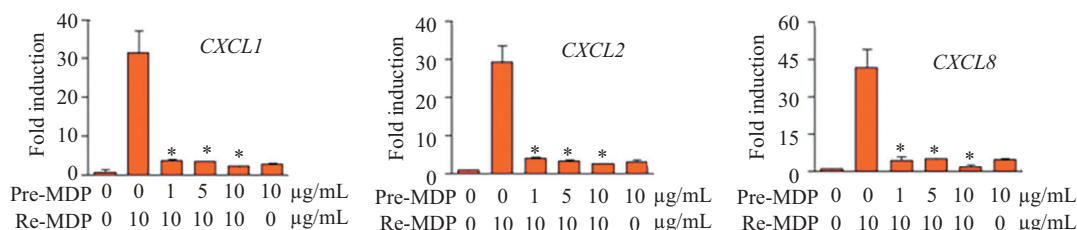


A、B: RT-PCR(A)和qRT-PCR(B)检测HCT116经5 μ g/mL MDP处理3 h后趋化因子的表达水平。C: RT-PCR检测HCT116细胞经5 μ g/mL MDP处理不同时间后炎症因子的mRNA表达水平。D、E: RT-PCR检测THP1细胞经5 μ g/mL MDP处理不同时间后趋化因子(D)和促炎细胞因子(E)的mRNA表达水平。

A,B: RT-PCR (A) and qRT-PCR (B) analysis of mRNA levels of chemokines in HCT116 cells treated with 5 μ g/mL MDP for 3 h. C: RT-PCR analysis of mRNA levels of cytokines in HCT116 cells treated with 5 μ g/mL MDP for indicated time periods. D,E: RT-PCR analysis of mRNA levels of chemokines (D) and pro-inflammatory cytokines (E) in THP1 cells treated with 5 μ g/mL MDP for indicated time periods.

图1 MDP诱导HCT116细胞趋化因子表达

Fig.1 MDP induces chemokine expression in HCT116 cells

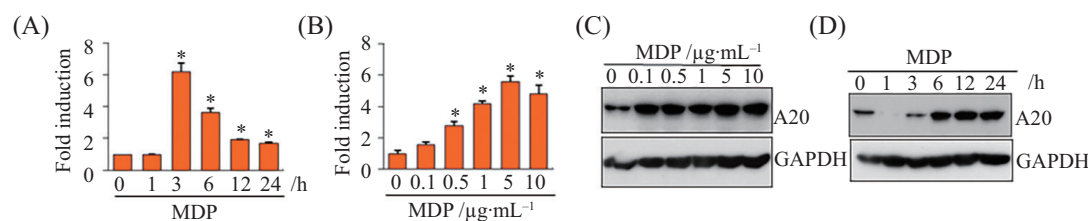


Pre-MDP为预处理, Re-MDP为再次处理。* $P < 0.05$, 与MDP未预处理组(第2组)比较。

Pre-MDP is pre-processing, and Re-MDP is re-processing. * $P < 0.05$ compared with the group without MDP pre-treatment (the second group).

图2 MDP诱导HCT116表达趋化因子具有耐受性

Fig.2 MDP induces HCT116 to express chemokines with tolerance

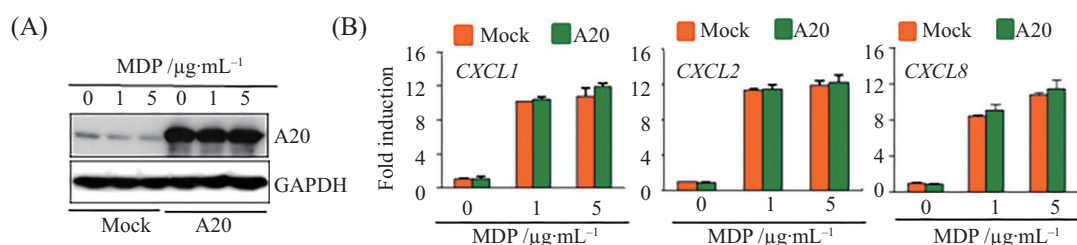


A, B: qRT-PCR检测HCT116细胞经5 µg/mL MDP处理不同时间(A)或不同浓度MDP处理3 h(B)后A20的表达。* $P < 0.05$, 与空白对照组相比。C、D: Western blot检测HCT116细胞经不同浓度MDP处理24 h(C)或5 µg/mL MDP处理不同时间(D)后A20的表达。

A, B: qRT-PCR analysis of mRNA levels of A20 in HCT116 cells treated with 5 µg/mL MDP for indicated time periods (A), or treated with indicated concentrations of MDP for 3 h (B). * $P < 0.05$ compared with control groups. C, D: Western blot analysis of A20 protein levels in HCT116 cells treated with indicated concentrations of MDP for 24 h (C), or treated with 5 µg/mL MDP for indicated time periods (D).

图3 MDP上调A20的表达

Fig.3 MDP up-regulates the expression of A20



A: Western blot检测质粒转染后A20的过表达情况。B: qRT-PCR检测过表达A20的HCT116中MDP诱导3 h后的趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL8的表达情况。

A: Western blot analysis of A20 pretein levels after A20 plasmid transfection. B: qRT-PCR analysis the expression of chemokines CXCL1, CXCL2 and CXCL8 in HCT116 overexpressing A20 after 3 h of induction by MDP.

图4 过表达A20不调控MDP所诱导的趋化因子

Fig.4 A20 over-expression does not regulate the expression of chemokines induced by MDP

(图3)。利用过表达A20质粒转染HCT116, A20表达上调(图4A); 但过表达A20不能下调NOD2所诱导的趋化因子(图4B), 提示A20在大肠上皮细胞中不调控NOD2所诱导的趋化因子。

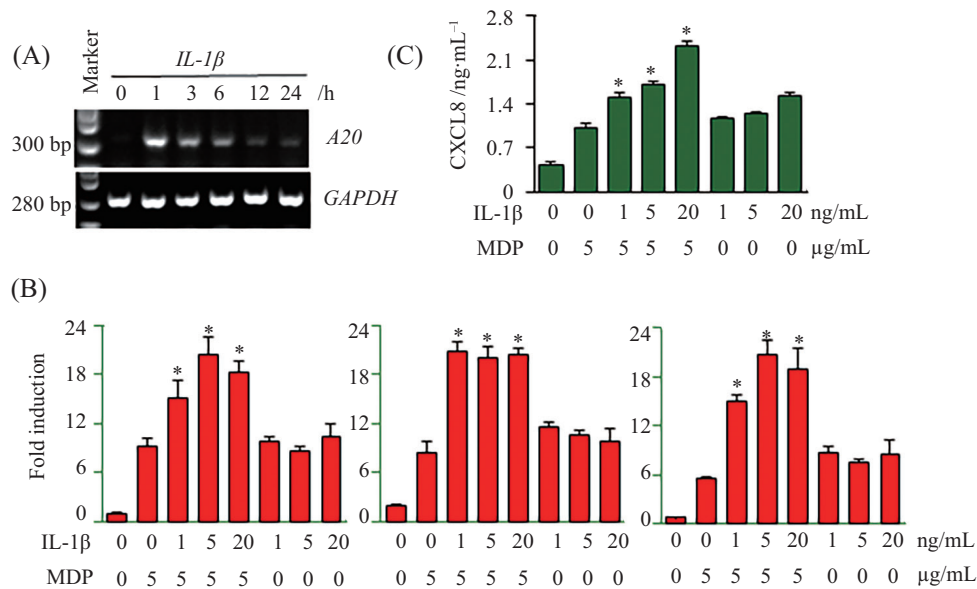
2.4 IL-1 β 诱导的A20不下调MDP诱导的趋化因子

细胞因子诱导A20的上调。本研究中, 利用IL-1 β 处理HCT116, RT-PCR检测A20的表达, 结果显示A20的表达上调(图5A)。随后, 用不同浓度IL-1 β 预处理HCT116细胞, 再用MDP进行处理。

qRT-PCR(图5B)以及ELISA(图5C)的结果显示与MDP或IL-1 β 单独处理组相比, IL-1 β 预处理不仅不抑制NOD2所诱导的趋化因子CXCL1、CXCL2、CXCL8, 反而上调其表达, 提示肠上皮细胞中IL-1 β 诱导的A20不调控NOD2所诱导的免疫反应。

3 讨论

固有免疫系统在防御病原微生物入侵方面发挥重要的作用, 一旦遭受微生物入侵, 系统就会及时



A: RT-PCR检测HCT116细胞经10 ng/mL IL-1 β 处理不同时间A20 mRNA的表达水平。B: qRT-PCR检测大肠上皮细胞IL-1 β 预处理24 h后MDP诱导3 h的趋化因子的表达。* P <0.05, 与MDP或IL-1 β 单处理组相比。C: ELISA检测大肠上皮细胞用IL-1 β 预处理24 h后, MDP处理24 h诱导CXCL8的表达情况。* P <0.05, 与MDP或IL-1 β 单处理组相比。

A: RT-PCR analysis of A20 mRNA levels in HCT116 cells treated with 10 ng/mL IL-1 β for indicated time periods. B: qRT-PCR analysis of chemokine mRNA levels in HCT116 cells pre-treated with indicated concentration of IL-1 β for 24 h, and re-treated with MDP for 3 h. * P <0.05 compared with MDP or IL-1 β treated alone groups. C: ELISA analysis of CXCL8 protein levels in HCT116 cells pre-treated with indicated concentration of IL-1 β for 24 h, and re-treated with MDP for 24 h. * P <0.05, compared with MDP or IL-1 β treated alone groups.

图5 IL-1 β 预处理对MDP再刺激诱导趋化因子表达的影响

Fig.5 The effect of IL-1 β pre-treatment on chemokine expression induced by MDP re-treatment

启动免疫反应以便清除入侵的微生物。然而免疫系统活化所产生的免疫反应需要严格控制程度, 系统初次活化以后的再次活化所诱导的反应程度显著下降, 避免过度活化损伤正常组织和器官, 从而维持机体的内稳态。免疫系统中的这种低反应状态被称为免疫耐受^[15]。NOD2所诱导的炎症反应同样具有这种精细的负反馈调节机制^[16]。

在诱导脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)耐受中发挥重要作用的A20^[17], 在巨噬细胞中能够抑制NOD2所活化的信号转导^[18]。本课题组以往研究发现, TNF α 诱导的A20负调节TNF α 自身所诱导的免疫反应^[19], 但TNF α 诱导的A20不能调节MDP诱导的免疫反应^[20]。在免疫细胞中A20是NOD2的负调控分子, A20在肠上皮细胞中对NOD2的调控作用仍不清楚。

本研究发现, 在大肠上皮细胞中MDP诱导趋化因子的产生, 表明大肠上皮细胞表达功能性NOD2受体。随后发现MDP初次处理后, 再次处理大肠上皮细胞所诱导的趋化因子水平下降, 表明大肠上皮细胞中, NOD2所诱导的免疫反应也具有耐受机制。文献报道Toll样受体的负调控蛋白A20可以负调控

NOD2的信号转导^[21]。本研究中发现, MDP上调A20的表达, 但是A20的过表达并不下调MDP诱导的趋化因子, 表明A20不调控MDP所诱导的免疫反应。进一步研究发现, IL-1 β 预处理诱导了A20的表达, 但诱导的A20仍然不参与MDP诱导的趋化因子的调控。然而, 在专职免疫细胞中A20能负调控NOD2的免疫反应, 并产生耐受现象。综合文献以及此研究结果, 我们认为在大肠上皮细胞中, NOD2所诱导的趋化因子虽然同样存在耐受机制, 但并不由A20介导, 表明肠上皮细胞NOD2产生耐受的机制与巨噬细胞的机制不一致, 可能具有特殊性, 其特殊机制有待进一步探究。

综上所述, 本研究分析了肠上皮细胞中NOD2诱导CXC类趋化因子表达情况及其调控机制, 旨在为临床选择相关分子作为靶点干预NOD2相关疾病提供理论依据。

参考文献 (References)

- [1] TRINDADE B C, CHEN G Y. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases [J]. Immunol Rev, 2020, 297(1): 139-61.
- [2] LUO X, WANG X, HUANG S, et al. Paeoniflorin ameliorates

- experimental colitis by inhibiting gram-positive bacteria-dependent MDP-NOD2 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107224.
- [3] MA X, QIU Y, SUN Y, et al. NOD2 inhibits tumorigenesis and increases chemosensitivity of hepatocellular carcinoma by targeting AMPK pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 174.
- [4] CHEN K, BAO Z, TANG P, et al. Chemokines in homeostasis and diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(4): 324-34.
- [5] CRIJNS H, VANHEULE V, PROOST P. Targeting chemokine-glycosaminoglycan interactions to inhibit inflammation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 483.
- [6] HUGHES C E, NIBBS R. A guide to chemokines and their receptors [J]. *Febs J*, 2018, 285(16): 2944-71.
- [7] 阮鹏, 谭爱丽. 趋化因子CXCL5通过调控ERK/MAPK信号通路抑制肿瘤免疫促进鼻咽癌恶化的机制研究[J]. *中国免疫学杂志* (RUAN P, TAN A L. CXCL5 promotes deterioration of nasopharyngeal carcinoma via modulating ERK/MAPK signaling mediated inhibition of tumor immune [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2020, 36(21): 2613-8.
- [8] MOLLICA P V, MASSARA M, CAPUCETTI A, et al. Chemokines and chemokine receptors: new targets for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 379.
- [9] TORRES J, MEHANDRU S, COLOMBEL J F, et al. Crohn's disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1741-55.
- [10] 王娟, 张朝阳, 邵志林, 等. IL-12单克隆抗体通过调节肠黏膜免疫缓解克罗恩病模型小鼠肠道炎症[J]. *细胞与分子免疫学杂志* (WANG J, ZHANG C Y, SHAO Z L, et al. IL-12 monoclonal antibody alleviates intestinal inflammation in IL-10^{-/-} mice by regulating intestinal mucosal immunity [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 2018, 34(8): 678-83.
- [11] ECKMANN L, KARIN M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function [J]? *Immunity*, 2005, 22(6): 661-7.
- [12] BHOSLE V K, MUKHERJEE T, HUANG Y W, et al. SLIT2/ROBO1-signaling inhibits macropinocytosis by opposing cortical cytoskeletal remodeling [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4112.
- [13] CHEN H L, DAI G Z, ZHOU A W, et al. Hypothetical protein Cpn0423 triggers NOD2 activation and contributes to Chlamydia pneumoniae-mediated inflammation [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 153.
- [14] WARNER N, BURBERRY A, PLIAKAS M, et al. A genome-wide small interfering RNA (siRNA) screen reveals nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-independent regulators of NOD2-induced interleukin-8 (IL-8) secretion [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(41): 28213-24.
- [15] WU Y X, JIN S H, CUI J. Autophagy and immune tolerance [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 635-65.
- [16] COLL R C, O'NEILL L A. New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors [J]. *J Innate Immun*, 2010, 2(5): 406-21.
- [17] 陈千, 王森林, 林晨, 等. ABIN蛋白家族结合泛素链与A20参与调控NF-κB的影响与意义[J]. *中国免疫学杂志* (CHEN Q, WANG S L, LIN C, et al. The influence and significance of ABIN protein family combined with ubiquitin chain and A20 in regulating NF-κB [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2017, 33(7): 1101-5.
- [18] XUAN N T, WANG X, NISHANTH G, et al. A20 expression in dendritic cells protects mice from LPS-induced mortality [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(3): 818-28.
- [19] ZHOU X, AN D, LIU X, et al. TNFα induces tolerant production of CXC chemokines in colorectal cancer HCT116 cells via A20 inhibition of ERK signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 296-302.
- [20] CHEN X, XIAO Z, XIE X, et al. TNF-α-induced NOD2 and RIP2 contribute to the up-regulation of cytokines induced by MDP in monocytic THP-1 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5072-81.
- [21] LI S, DENG P, WANG M, et al. IL-1α and IL-1β promote NOD2-induced immune responses by enhancing MAPK signaling [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(9): 1321-34.