

芍药苷减弱真菌葡聚糖诱导的支气管上皮细胞内 NLRP3 炎性小体活化

黄燕华, 华 檬, 崔学范*

(南京医科大学第一附属医院呼吸科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)联合真菌葡聚糖能否活化支气管上皮细胞 16HBE 内 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3,NLRP3)炎性小体,芍药苷(paeoniflorin,PF)对该 NLRP3 炎性小体的活化是否有抑制作用及相关机制。**方法:**LPS 联合真菌葡聚糖建立感染模型,RT-PCR 检测细胞内 NLRP3、caspase-1、白细胞介素(interleukin,IL)-1 β mRNA 的表达;ELISA 检测细胞上清中 IL-1 β 含量;caspase-1 活性检测试剂盒检测胞内 caspase-1 活化程度;流式检测胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)变化;Western blot 检测胞内 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达变化。**结果:**LPS 联合真菌葡聚糖联合作用于支气管上皮细胞,胞内 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 表达转录加强,细胞上清中 IL-1 β 含量增加,caspase-1 活性上调,细胞内 ROS 升高;PF 预作用细胞后,胞内 ROS 随着药物浓度增加而逐渐降低,NLRP3、caspase-1、IL-1 β 的转录表达也随之受抑制而下调。**结论:**LPS 联合真菌葡聚糖可有效活化支气管上皮细胞内 NLRP3 炎性小体,而 PF 能有效抑制胞内 ROS 产生从而抑制炎性小体活化、抑制真菌葡聚糖所致的炎症反应。

[关键词] 支气管上皮细胞;脂多糖;真菌葡聚糖;炎性小体;芍药苷

[中图分类号] R519

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)03-0287-06

doi:10.7655/NYDXBNS20170306

Paeoniflorin attenuates the activation of NLRP3 inflammasome induced by fungal glucan in human bronchial epithelial cells

Huang Yanhua, Hua Meng, Cui Xuefan*

(Department of Respiration, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate if lipopolysaccharide (LPS) combined with fungal glucan (curdlan) activates Nod-like receptor pyrin domain-containing protein (NLRP3) inflammasome, and the activation could be influenced by paeoniflorin (PF) in human bronchial epithelial cells (16HBE), as well as the underlying mechanism. **Methods:** 16HBE cells were stimulated by LPS combined with curdlan to establish inflammation models. The expressions of NLRP3, caspase-1, and interleukin (IL)-1 β mRNA were analyzed by RT-PCR. The level of IL-1 β in supernatants was evaluated by ELISA. The activity of caspase-1 was measured using a caspase-1 activity kit. Reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. The expressions of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β protein in cells were determined by Western blot. **Results:** The expressions of NLRP3, caspase-1, IL-1 β mRNA and protein were up-regulated in 16HBE cells activated by LPS combined with curdlan. The activity of caspase-1 and the levels of IL-1 β in supernatants, as well as the concentrations of intracellular ROS were significantly increased; these effects were inhibited effectively by PF, especially in high concentration, through reducing the production of intracellular ROS. **Conclusion:** NLRP3 inflammasome plays an important role in combined LPS and curdlan infection in 16HBE cells, and PF may possess a certain anti-fungal infection effect via inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome.

[Key words] human bronchial epithelial cells; LPS; fungal glucan; inflammasome; paeoniflorin

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(03):287-292]

随着药物使用和免疫缺陷(或受损)的易感患者增加,侵袭性真菌发病率日益上升,造成高达过

半的死亡率,机会性病原体比如白色念珠菌、曲霉菌和隐球菌的感染则在真菌感染中占据了绝大部分^[1]。近二十年来,真菌感染的发生率不断上升,但临床上真菌感染的治疗却一直未得到预想的效果。

[基金项目] 江苏省呼吸病临床医学研究中心项目(BL2012012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xuefancui@163.com

芍药苷(paeoniflorin, PF)是一种从白芍根部提取的水溶性单萜苷,作为传统中药已有一千余年使用历史,它具有强大的抗炎、抗氧化、抗癌、免疫调节等作用,但在抗真菌感染中的作用尚未有报道。

NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎性小体是一种多蛋白复合物,已在炎症疾病、自身免疫疾病以及肿瘤领域中被广泛研究。目前已知的能活化 NLRP3 炎性小体的因素包括各种病原微生物、穿孔毒素、ATP、颗粒晶体和聚集性等。NLRP3 炎性小体在肺部疾病如细菌与病毒感染、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、急性肺损伤、肺纤维化、肺动脉高压的发生发展中同样都扮演着重要角色^[2],但在肺部真菌感染领域的研究尚不充分。支气管上皮细胞作为呼吸道第一道机械性屏障介导着宿主体内最初的免疫应答,在维持炎症平衡中起着重要作用。Li 等^[3]发现当真菌侵入呼吸道时,支气管上皮细胞能与真菌或其成分相互作用并产生白细胞介素(interleukin, IL)-8 等细胞因子以抑制真菌的繁殖扩散。另有研究表明,未受刺激的支气管上皮细胞内可有少量的 NLRP3 蛋白表达,当细胞暴露于颗粒物或生物燃料烟雾后,胞内 NLRP3 炎性小体可被活化,表达增加,造成气道炎症^[4-5]。

本研究旨在通过体外建立支气管上皮细胞感染真菌葡聚糖模型,探讨脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合真菌葡聚糖(curdlan)能否活化胞内 NLRP3 炎性小体,芍药苷(paeoniflorin, PF)对该 NLRP3 炎性小体的活化是否有抑制作用及相关机制,为探究新的临床治疗靶标提供理论基础与策略。

1 材料和方法

1.1 材料

人支气管上皮细胞株 16HBE(ATCC 公司,美国);真菌葡聚糖、LPS、PF(纯度>98%)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)抑制剂乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)(Sigma 公司,美国);NLRP3 抗体、caspase-1 抗体(CST 公司,美国)、IL-1 β 抗体、GAPDH 抗体、 β -tubulin 抗体(Proteintech 公司,美国);人 IL-1 β ELISA Kit(OR&D Systems 公司,美国);RPMI 1640、双抗(Hyclone 公司,美国)、胎牛血清(Sciencell 公司,美国);NLRP3(#HQP063131)、caspase-1(#HQP020207)、IL-1 β (#HQP009641)、GAPDH 引物(#HQP009640)(Genecopoeia 公司,美国),TRIzol、Prime ScriptTMRT Master Mix、SYBR

Green(TaKaRa 公司,日本);caspase-1 活性检测试剂盒、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酯(2',7'-dichlorofluoresceindiacetate, DCFH-DA)(杭州碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 真菌葡聚糖与细胞共培养模型建立

取对数生长期 16HBE 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔加入 1 mL 10% 完全培养液于恒温孵箱(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)中孵育。细胞生长至 95% 融合度时,吸去旧培养基,温 PBS 洗涤 1 遍。预实验组:分别加入 10 μ g/mL、100 μ g/mL、1 mg/mL 真菌葡聚糖与细胞共培养 12 h。正式实验组:①对照组:不加任何处理因素;②curdlan 组:加入终浓度为 1 mg/mL 的真菌葡聚糖共培养 12 h;③LPS+curdlan 组:加入终浓度为 5 μ g/mL 的 LPS 培养 3 h 进行预刺激,移去 LPS,加入终浓度为 1 mg/mL 的真菌葡聚糖共培养 12 h;④PF+LPS+curdlan 组:PF 溶于 RPMI 1640,共培养浓度分别为 10、30、100 μ mol/L,预作用 1 h, LPS 作用 3 h, 1 mg/mL 真菌葡聚糖共培养 12 h;⑤NAC+LPS+curdlan 组:NAC 溶于 PBS,终浓度为 5 mmol/L,预作用 1 h, LPS 作用 3 h, 1 mg/mL 真菌葡聚糖共培养 12 h。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测胞内 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β mRNA 的表达

加入真菌葡聚糖培养 12 h 后,移去培养基,冰 PBS 洗涤 2 遍,每孔加入 1 mL TRIzol 提取细胞总 RNA,逆转录后加入 SYBR Green 进行 RT-PCR,反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,进行 40 个循环。最终结果按照 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行相对定量计算。

1.2.3 ELISA 检测细胞上清中 IL-1 β 含量

按预定时间收集细胞上清,4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 20 min 后吸去上清液至新 EP 管,冻存于-20 $^{\circ}$ C 备用,按试剂盒说明进行操作。

1.2.4 caspase-1 活性检测

caspase 活性检测是基于活化的 caspase 能将 Ac-YVAD-pNA 裂解为一种黄色甲胍物质 pNA, pNA 增加则表明 caspase 活性增加。于预定时间收集细胞,加入裂解液,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,去上清至新 EP 管中,Bradford 法检测蛋白浓度。96 孔板中每孔加入各组细胞蛋白 50 μ g,再加入 20 nmo/L Ac-YVAD-pNA 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,酶标仪检测 pNA 在 405 nm 处吸光值。

1.2.5 流式检测胞内 ROS 变化

于预定时间移去上清,温 PBS 洗涤 2 遍,不含 EDTA 胰酶消化收集细胞,加入 DCFH-DA 探针

37°C 孵育 30 min, 温 PBS 洗涤 2 遍, 流式细胞仪检测胞内 ROS。

1.2.6 Western blot 检测胞内 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达变化

细胞完成处理后, PBS 洗涤 2 遍, 胰酶消化后收集细胞, 加入裂解液 4°C 12 000 r/min 离心 15 min 提取细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。制备聚丙烯酰胺凝胶, 每个样本取 50 μ g 至对应上样孔中, 60/120 V 恒压电泳后转至 PVDF 膜; 300 mA 恒流转移膜完成后, 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h; 一抗孵育 4°C 过夜, 1 \times TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 二抗孵育 1 h, 1 \times TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 超敏发光液显影曝光摄取, Bio-Rad 软件分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析处理。实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用成组 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

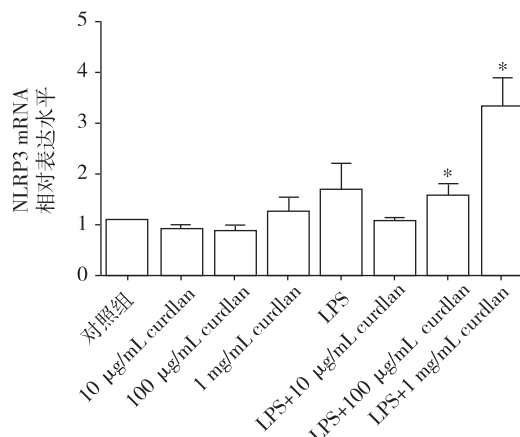
2 结果

2.1 LPS 联合真菌葡聚糖促进 16HBE 细胞内 NLRP3、IL-1 β 的表达

在最初的预实验 PCR 结果中, 直接采用不同浓度真菌葡聚糖作用于细胞 12 h, 不论多大浓度, 均不能使 NLRP3 炎性小体活化, 而真菌葡聚糖联合 LPS 后, 则能明显上调胞内 NLRP3 mRNA 表达(图 1)。经过预实验筛选, 采用 1 mg/mL 真菌葡聚糖进行后续实验。发现经 LPS 预刺激后, 1 mg/mL 真菌葡聚糖共培养 12 h 后能显著增加细胞内 NLRP3、IL-1 β mRNA 的表达(图 2A、B), 细胞上清中 IL-1 β 分泌显著增多(图 3), 胞内 NLRP3、IL-1 β 蛋白的表达也较对照组明显升高(图 4A、B、C)。

2.2 LPS 联合真菌葡聚糖诱导 16HBE 细胞 caspase-1 活化

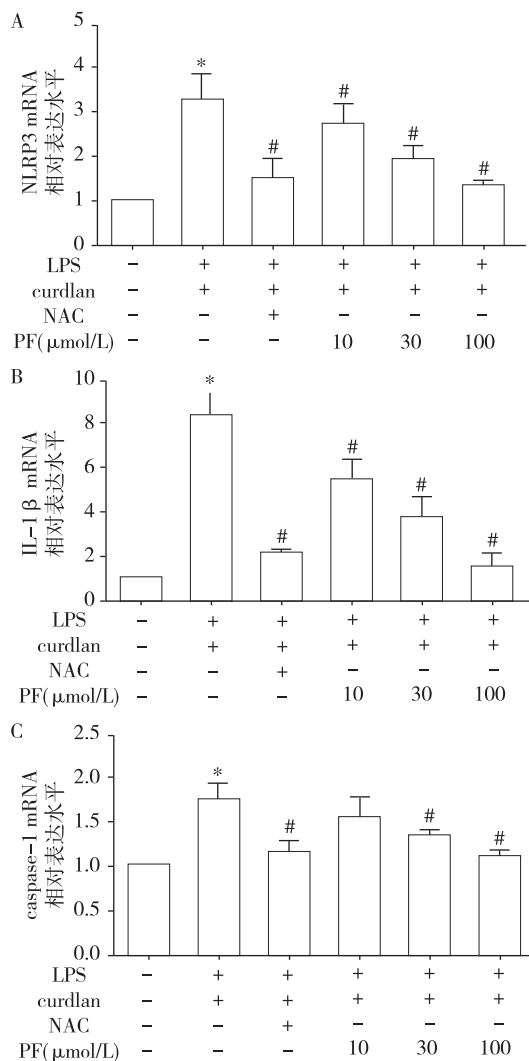
caspase-1 活化是连接 NLRP3 炎性小体与炎症因子 IL-1 β 的桥梁, RT-PCR 结果显示真菌葡聚糖处理后胞内 caspase-1 mRNA 上调明显(图 2C), 与 NLRP3 和 IL-1 β 趋势一致, Western blot 检测到了胞内 caspase-1 P20 亚单位的显著增加(图 4D、E), 与 caspase-1 活性检测实验结果一致(图 5), 表明支气管上皮细胞经预刺激启动后, 1 mg/mL 的真菌葡聚糖能有效活化胞内 caspase-1。



与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 1 Curdlan 不联合或联合 LPS 对 16HBE 细胞中 NLRP3 mRNA 的影响

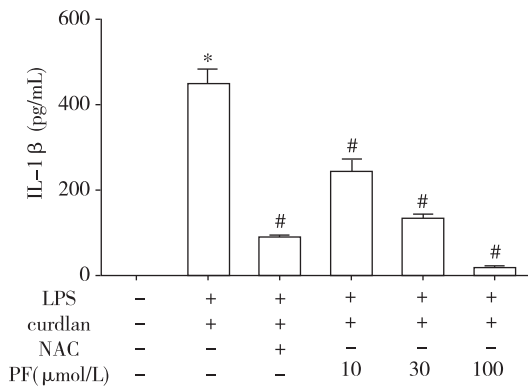
Figure 1 Effects of curdlan alone or combining with LPS on the expression of NLRP3 mRNA in 16HBE cells



与对照组比较, * $P<0.05$; 与 LPS+curdlan 组比较, # $P<0.05$ 。

图 2 16HBE 细胞中 NLRP3 炎性小体 (A)、IL-1 β (B)、caspase-1 (C) mRNA 的表达

Figure 2 Expression of NLRP3 (A), IL-1 β (B) and caspase-1 (C) mRNA in 16HBE cells



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS+curdlan 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 细胞上清中 IL-1β 的分泌

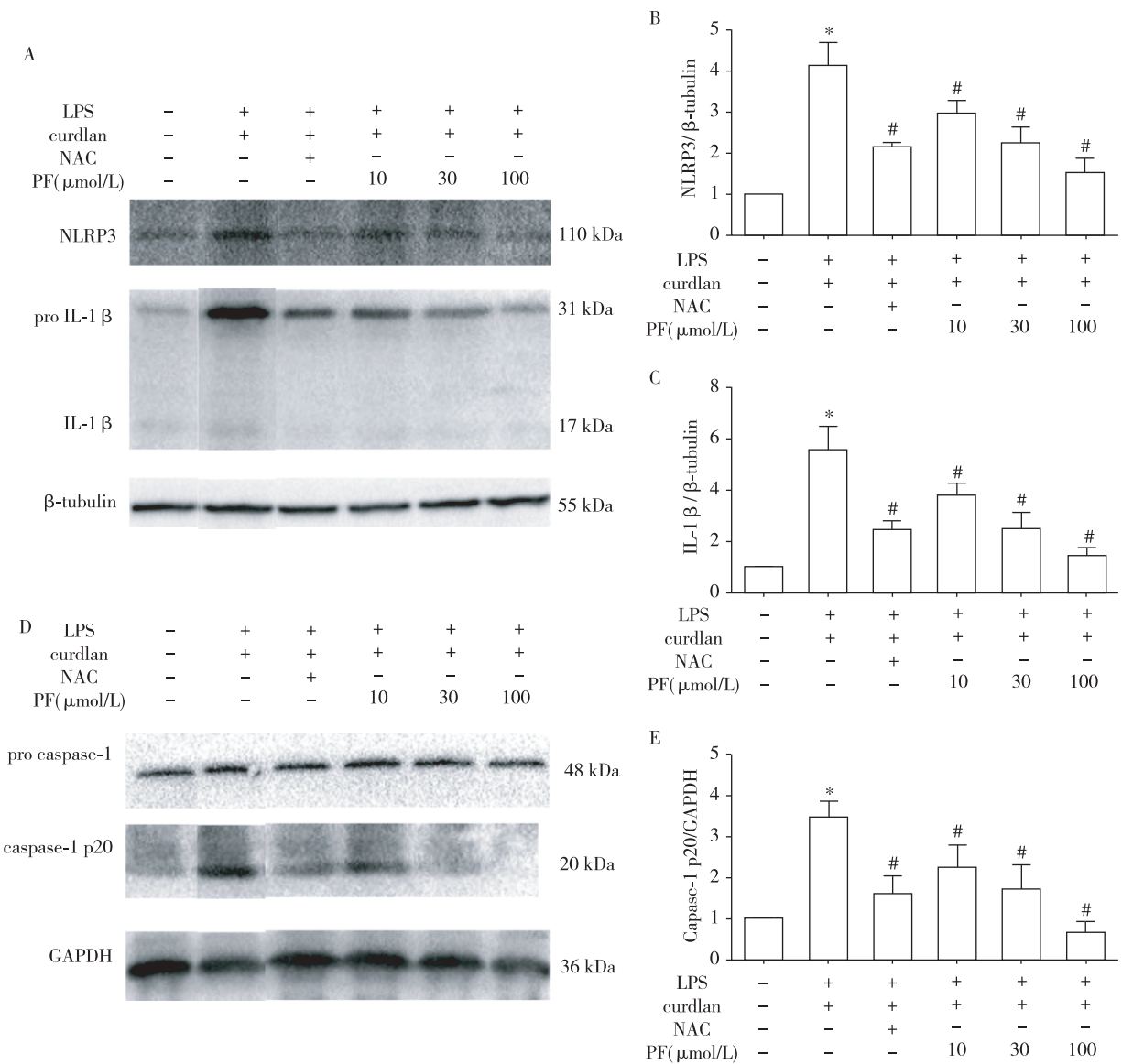
Figure 3 Changes of IL-1β secretion in cell supernatants

2.3 PF 抑制 16HBE 细胞 NLRP3、IL-1β 的表达

经过 PF 预作用后, 真菌葡聚糖诱导支气管上皮细胞中 NLRP3、IL-1β mRNA (图 2A、B) 及胞内蛋白的表达 (图 4A、B、C), 均随着 PF 浓度的增加而减少, 当 PF 为 100 μmol/L 时抑制作用最明显, 细胞上清中 IL-1β 浓度接近空白组 (图 3), 而 PF 本身并不诱导细胞 IL-1β 增加。

2.4 PF 减弱 16HBE 细胞内 caspase-1 的活化

经过 PF 预作用后, 真菌葡聚糖诱导支气管上皮细胞中 caspase-1 mRNA 表达受抑 (图 2C), 胞内 caspase-1 P20 亚单位表达减少 (图 4), caspase-1 活性显著削弱 (图 5)。



A: Western blot 检测 NLRP3 和 IL-1β 蛋白表达情况; B: NLRP3 蛋白表达的半定量分析; C: IL-1β 蛋白表达的半定量分析; D: Western blot 检测 caspase-1 蛋白表达情况; E: Caspase-1 p20 蛋白表达的半定量分析。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS+curdlan 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 16HBE 细胞内 NLRP3 炎性小体蛋白的变化

Figure 4 Expression of NLRP3/caspase-1 p20/IL-1β in 16HBE cells

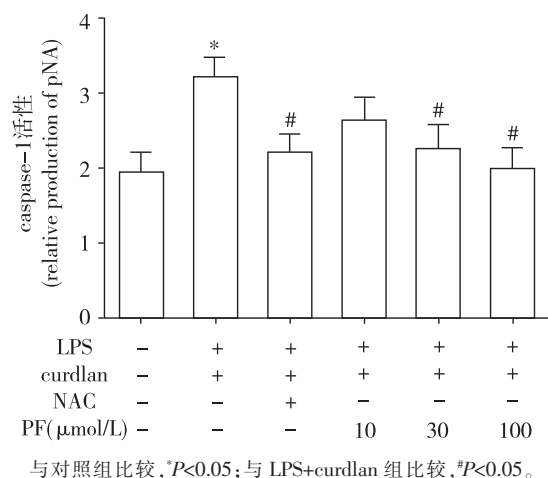


图 5 16HBE 细胞内 caspase-1 活性的变化

Figure 5 Changes of caspase-1 activity in 16HBE cells

2.5 PF 通过减少 ROS 对胞内 NLRP3 炎性小体的活化产生抑制效应

LPS 联合真菌葡聚糖作用于支气管上皮细胞后,胞内 ROS 显著增加;当给予 ROS 抑制剂 NAC 5 mmol/L 预作用后,胞内 ROS 产生明显减少,同时 NLRP3 与 IL-1 β 的合成和表达、caspase-1 合成与活化均下降,说明 16HBE 细胞内 NLRP3 炎性小体的活化通过胞内 ROS 介导;而 PF 预作用组则随着 PF 浓度增加,细胞内 ROS 产生逐渐减少,与 NLRP3 炎性小体的变化一致,表明 PF 是通过抑制胞内 ROS 从而减弱了真菌葡聚糖诱导的 NLRP3 炎性小体活化(图 6)。

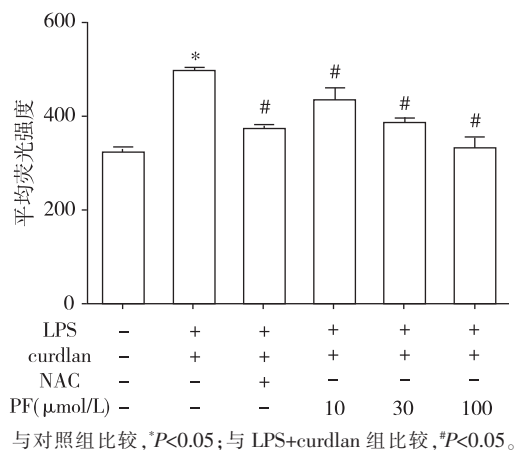


图 6 16HBE 细胞内 ROS 的变化

Figure 6 ROS detected by flow cytometry in 16HBE cells

3 讨论

炎性小体作为先天免疫的组成部分,充分感知内源性与外源性危险因素,起着阻断感染播散的屏障作用并促进病原体消灭后受损组织的修复。在诸

多炎性小体中,NLRP3 是研究得最多最详细的炎性小体,它广泛表达于巨噬细胞、树突状细胞、上皮细胞及角质形成细胞。据推测,NLRP3 的激活需要两步:①启动:由各种损伤相关分子模式和病原相关分子模式触发,诱导 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 表达上调;②活化:由第二信号介导 NLRP3 炎性小体各成分组装,活化 pro-caspase-1 成为 caspase-1,后者促进 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 裂解为有生物活性的 IL-1 β 和 IL-18,发挥炎症效应^[6-7]。其具体的活化机制可能涉及胞内 ROS 的产生(尤其是线粒体内)、钾离子外流、钙离子内流、溶酶体失稳定性、线粒体内 DNA15 和心磷脂的释放、细胞内细胞器的空间重排,硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)上调和内质网应激等^[6-7]。随着真菌感染日趋增多与严重,NLRP3 炎性小体在真菌感染中的地位也逐渐显现,参与多种真菌感染的发生发展。已有研究发现白色念珠菌在体外可通过其菌丝和(或)芽孢活化细胞内组织蛋白酶 B,促进细胞内吞,诱导 LPS 激活的单核巨噬细胞分泌 IL-1 β ,但在 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck like protein containing a CARD,ASC) 和 caspase-1 缺陷的单核巨噬细胞中,IL-1 β 的产生表现出明显缺陷^[8-11];在白色念珠菌^[10,12-13]、烟曲霉^[14-15] 或隐球菌^[16-18] 感染小鼠模型中,均提示小鼠体内 NLRP3 炎性小体活性增加并具有保护作用。真菌葡聚糖作为真菌胞壁的主要成分之一,亦能通过免疫细胞表面 TLR2、Dectin-1 等受体活化经典 NLRP3/ASC/caspase-1 或非经典 NLRP3/ASC/caspase-8 途径,介导 IL-1 β 生成产生炎症反应,并可诱导细胞凋亡^[10-11,19]。本研究首次发现真菌葡聚糖作用于支气管上皮细胞后,细胞内 NLRP3 炎性小体活化且 IL-1 β 分泌明显增加,与之前在免疫细胞中的研究结果一致。

面对侵袭性真菌病的发展,各种新型抗真菌药物不断被发掘,然而抗真菌治疗不能避免药物相关的肝肾毒性与输液反应,临床上由于不良反应而停药者可达 18.6%^[1,20],因此抗真菌治疗仍有很大的提升与开发空间。PF 作为传统中药,其生物作用已得到多项研究证明,其能诱导支气管上皮细胞产生 β -防御素 2,增强上皮的抗感染能力,并可通过调节小鼠体内促炎与抗炎因子平衡从而降低致命性 LPS 所致的小鼠死亡率^[21-22]。此外,在一定浓度范围,随着 PF 浓度的升高,其抑制肝癌细胞侵袭、转移与黏附的能力随之增强^[23]。本研究结果也表明 PF 可明显抑制真菌葡聚糖所致的 NLRP3 炎性小体活化以

及促炎因子 IL-1 β 的分泌,具有抗炎效应。

综上所述,本研究发 现 LPS 联合真菌葡聚糖通过激活胞内 ROS 诱导支气管上皮细胞中 NLRP3 炎性小体活化,介导促炎细胞因子 IL-1 β 的分泌;而 PF 能有效抑制胞内 ROS 产生从而抑制炎性小体活化、抑制真菌葡聚糖所致的炎性反应。提示炎性小体可能成为治疗肺部真菌感染的新靶点,PF 可考虑作为一种新的策略辅助治疗真菌感染。

[参考文献]

- [1] Martín-Peña A, Aguilar-Guisado M, Cisneros JM. Does the current treatment of invasive fungal infection need to be reviewed? [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2014, 32(8):523-528
- [2] 王再亮,孔辉,曾晓宁,等. 活性氧介导脂多糖联合三磷酸腺苷诱导的人肺动脉内皮细胞炎症小体活化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(7):968-974
- [3] Li P, Wu T, Su X, et al. Activation of vitamin D regulates response of human bronchial epithelial cells to *Aspergillus fumigatus* in an autocrine fashion[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015:208491
- [4] Chen L, Huang ZH, Li WL, et al. The NLRP3 inflammasome regulates bronchial epithelial cell injury and proapoptosis after exposure to biomass fuel smoke[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(6):815-824
- [5] 孔辉. 炎症小体与肺癌及肺纤维化的相关性研究[D]. 南京:南京医科大学, 2015
- [6] Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1):35-52
- [7] Jo EK, Kim JK, Shin DM, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2):148-159
- [8] Joly S, Ma N, Sadler JJ, et al. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Immunol*, 2009, 183(6):3578-3581.
- [9] Wellington M, Koselny K, Sutterwala FS, et al. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages [J]. *Eukaryot Cell*, 2014, 13(2):329-340
- [10] Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(5):487-497
- [11] Ganesan S, Rathinam VAK, Bossaller L, et al. Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1 β production in response to β -glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans* [J]. *J Immunol*, 2014, 193(5):2519-2530
- [12] Borghi M, De Luca A, Puccetti M, et al. Pathogenic NLRP3 inflammasome activity during candida infection is negatively regulated by IL-22 via activation of NLRC4 and IL-1Ra [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(2):198-209
- [13] Bruno VM, Shetty AC, Yano J, et al. Transcriptomic analysis of vulvovaginal candidiasis identifies a role for the NLRP3 inflammasome [J]. *MBio*, 2015, 6(2):e00115-e00182
- [14] Karki R, Man SM, Malireddi K, et al. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against aspergillus infection [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(3):357-368
- [15] Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, et al. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase [J]. *PloS one*, 2010, 5(4):e10008
- [16] Lei G, Chen M, Li H, et al. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome [J]. *Cell Res*, 2013, 23(7):965-968
- [17] Guo C, Chen M, Fa Z, et al. *Acapsular cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome [J]. *Microbes and Infection*, 2014, 16(10):845-854
- [18] Chen M, Xing Y, Lu A, et al. Internalized cryptococcus neoformans activates the canonical caspase-1 and the noncanonical caspase-8 inflammasomes [J]. *J Immunol*, 2015, 195(10):4962-4972
- [19] Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, et al. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan [J]. *J Immunol*, 2009, 183(12):8061-8067
- [20] Hayes GE, Denning DW. Frequency, diagnosis and management of fungal respiratory infections [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19(3):259-265
- [21] Gan YY, Cui XF, Ma T, et al. Paeoniflorin upregulates β -defensin-2 expression in human bronchial epithelial cell through the p38 MAPK, ERK, and NF- κ B signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5):1468-1475
- [22] Cao W, Zhang W, Liu J, et al. Paeoniflorin improves survival in LPS-challenged mice through the suppression of TNF- α and IL-1 β release and augmentation of IL-10 production [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(2):172-178
- [23] Lu T, He W, Song S, et al. Paeoniflorin inhibited the tumor invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2014, 115(7):427-433

[收稿日期] 2016-09-10