

Nod2 基因在肺炎克雷伯菌肝脓肿中的作用研究

孟宝¹, 伍婷¹, 苏丛², 孙雅婷¹, 唐明洋¹, 郭明娟³, 兰燕虎^{4,5}, 李家斌^{1,3,5}

摘要 目的 建立肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)感染 *Nod2* 基因肝组织条件敲除小鼠模型,初步探究 *Nod2* 基因在 *K. pneumoniae* 感染引起肝脓肿过程中的作用及机制。方法 将引进的 *Nod2*^{flox/+} 小鼠自交获得 *Nod2*^{flox/flox} 小鼠,同时将 *Alb-Cre*⁺ 小鼠与 *Nod2*^{flox/+} 进行杂交获得 *Nod2*^{flox/+}; *Alb-Cre*⁺ 的子代小鼠;将上述两种基因型的子代小鼠进行杂交,获得 *Nod2* 基因肝组织条件性敲除小鼠(*Nod2*^{flox/flox}; *Alb-Cre*⁺)和同窝阴性对照组小鼠(*Nod2*^{flox/flox})。提取小鼠脚趾基因组 DNA,经 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定子代小鼠基因型并提取小鼠肝脏,利用 RT-qPCR 和 Western blot 验证 *Nod2* 基因在肝脏中的敲除效果。实验组和对照组小鼠分别感染 *K. pneumoniae*,观察不同时间点小鼠生存率及肝组织病理变化;利用 RT-qPCR 检测实验组和对照组小鼠感染 *K. pneumoniae* 48 h 后肝组织内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和趋化因子 CXC 配体 1 (CXCL1) 的 mRNA 的表达水平。结果 *Nod2*^{flox/flox}; *Alb-Cre*⁺ 小鼠肝脏 NOD2 mRNA 表达量降低($P < 0.05$),Western blot 结果显示 NOD2 蛋白表达量降低;与对照组小鼠比较,实验组小鼠在感染 *K. pneumoniae* 后生存率降低(中位生存时间 60.5 h, $P = 0.0469$),肝组织出现了更为严重的病理损伤;实验组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 CXCL1 的 mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NOD2 在 *K. pneumoniae* 感染诱导肝脓肿的过程中起保护作用。

关键词 肺炎克雷伯菌肝脓肿; *Nod2* 基因; 炎症反应; 保护作用

中图分类号 R 575.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1380-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.007

2022-01-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81973983,82100017);安徽高校合作攻关和公共卫生协同创新项目(编号:GXXT-2020-018);安徽省高校自然科学基金项目(编号:KJ2020A0176)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 感染病科,² 感染管理科,合肥 230022

³安徽省细菌耐药性监控中心,合肥 230022

⁴安徽医科大学细菌耐药研究所,合肥 230022

⁵安徽医科大学附属巢湖医院感染病科,巢湖 238000

作者简介:孟宝,男,硕士研究生;

兰燕虎,男,博士,责任作者,E-mail:zixinhu@163.com;

李家斌,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:lijia斌@ahmu.edu.cn

化脓性肝脓肿是肝脏的占位性病变,具有高的致病率和致死率,肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae*)是其主要的致病菌之一^[1-2]。核苷酸结合寡聚化结构域 2 (nucleotide binding oligomerization domain 2, NOD2) 是核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor, NLR) 家族的成员,参与激活 NF- κ B、MAPKs 等促炎通路,增强炎症反应,调节机体免疫应答^[3]。近期研究^[3-7]表明,NOD2 在肺组织防御病原菌感染过程中发挥重要保护作用。目前关于 NOD2 在肝组织防御病原菌感染过程的作用机制尚不明确。该研究通过繁育和鉴定 *Nod2* 基因肝组织条件性敲除小鼠^[8],建立 *Nod2* 基因肝组织敲除小鼠感染 *K. pneumoniae* 诱发肝脓肿模型,初步探究 *Nod2* 基因在 *K. pneumoniae* 诱导肝脓肿发生发展中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与菌株 *Nod2*^{flox/+} 小鼠共 3 只,雌鼠 1 只、雄鼠 2 只;*Alb-Cre*⁺ 工具鼠共 2 只,雌、雄各 1 只均购自赛业(广州)生物科技有限公司,20~30 g/6 周龄,小鼠品系为 C57BL/6J,无特殊病原体(SPF 级)。*K. pneumoniae* ATCC13883 由安徽省细菌耐药监测中心保存。所有实验操作均遵循安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准,伦理审批号:LLSC20190253。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:鼠尾基因组 DNA 提取试剂盒(货号:NMSC0001-50)购自上海南方模式生物科技股份有限公司;琼脂糖粉(批号:111860)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Trizol Reagent(货号:15596026)购自美国 Invitrogen 公司;RNA 反转录试剂盒(货号:6210A)、DL2000 bp DNA Marker(货号:A1A0438)、TB Green Premix Ex Taq™(货号:RR420)以及 PCR Taq Mix(货号:RR901)均购自日本 Takara 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010S)购自碧云天生物技术有限公司;小鼠抗 β -Actin 抗体(货号:AF7018)购自江苏

亲科生物研究中心有限公司;兔抗 NOD2 抗体(货号:abs152480)购自爱必信(上海)生物科技有限公司;山羊抗小鼠 IgG-HRP(货号:ZB-2305)、山羊抗兔 IgG-HRP(货号:ZB-2301)购自北京中杉金桥公司。

主要仪器:普通 PCR 扩增仪(德国 Biometra Tone 公司),核酸电泳槽(北京六一生物科技有限公司);凝胶电泳成像仪(Tanon 5200 Multi,上海天能科技有限公司),荧光定量 PCR 仪(罗氏 LightCycler 96,瑞士),Western blot 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的饲养与繁育 *Nod2* 基因条件敲除小鼠于安徽医科大学实验动物中心 SPF 级动物房内饲养与繁殖。饲养室控制在 20 ~ 25 °C,湿度 50% ~ 60%,保证 12 h 光照,昼夜交替,自由饮食和饮水。小鼠笼盒、垫料、饲料和饮用水经过高温高压消毒灭菌处理。每周更换 2 次垫料,更换水和饲料,并且给予人道关怀。

1.2.2 小鼠亲代及子代信息记录 在繁殖笼标签上,记录鼠号、基因型、出生日期、合笼日期、父母本的鼠号、产仔日期和数量。在离乳笼标签上,记录笼号、基因型、出生日期、离乳日期。

1.2.3 小鼠基因型鉴定 小鼠出生后 3 ~ 4 周与母鼠分笼,使用 75% 乙醇溶液冲洗剪刀和镊子并剪取小鼠脚趾 0.3 ~ 0.5 cm 放入 1.5 ml 无菌 EP 管中,并依据剪取的不同脚趾标记同窝小鼠。用基因组 DNA 提取试剂盒提取小鼠基因组 DNA,所得样品置 -20 °C 保存。*Nod2*^{flox/+} 小鼠基因型鉴定,上游引物:5'-CATCGCAGCCAGACTTGAAGTT-3';下游引物:5'-CCTTGTGCCCATATGATTCTGAC-3' (flox 纯合子小鼠:216 bp;flox 杂合子小鼠:216 bp 和 171 bp;flox 阴性小鼠:171 bp)。*Alb-Cre*⁺ 小鼠基因型鉴定,上游引物:5'-GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG-3';下游引物:5'-TGCAAACATCACATGCACAC-3' (*Alb-Cre*⁺ 小鼠:390 bp;*Alb-Cre*⁻ 小鼠:351 bp)。PCR 反应体系为 25 μl (Taq Mix 13 μl,去离子水 10 μl,引物 1 μl,小鼠 DNA 1 μl),反应程序:95 °C 3 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 35 个循环;72 °C 10 min,4 °C 1 h。

配制 2.0% 的琼脂糖凝胶:称取 2.0 g 琼脂糖粉末溶于 100 ml 1 × TAE 电泳缓冲液中,微波炉中大火加热 4 min,冷却至 60 °C 左右加入 10 μl 红色荧光核酸染料,轻摇混匀,制胶。取 5 μl PCR 产物和 3

μl DL2000 bp DNA Marker 加入上样孔中进行电泳分析,恒压 150 V,时间 35 min;然后置于凝胶电泳成像仪中成像,观察电泳条带。

1.2.4 *Nod2* 基因敲除效果验证 取 *Nod2*^{flox/flox}; *Alb-Cre*⁺ (实验组小鼠)和 *Nod2*^{flox/flox} (对照组小鼠)的肝组织,采用 RT-qPCR 方法检测两组肝组织 *Nod2* 基因的 mRNA 的表达水平。上游引物:5'-AGAAGCTCCTCGAAGCTGTG-3';下游引物:5'-CCT-CACACTCGTACTGGCTC-3';内参 *Gapdh* 基因上游引物为 5'-GTCAAGGCCGAGAATGGGAA-3';下游引物为 5'-CTCGTGGTTCACACCCATCA-3'。Western blot 检测两组肝组织 NOD2 蛋白的表达水平:用 RIPA 裂解液提取两组小鼠的肝组织总蛋白,BCA 蛋白定量后取适量与上样缓冲液混合 100 °C 水浴 10 min 变性。将所制蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,恒压 75 V,120 min;电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别加入经一抗稀释液稀释的 β-Actin 抗体(1 : 1 000)、NOD2 抗体(1 : 800),4 °C 孵育过夜;1 × TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;加入 5% 脱脂奶粉稀释的山羊抗兔或山羊抗鼠的二抗(1 : 10 000)孵育 1.5 h,1 × TBST 缓冲液洗膜 3 次后化学发光成像系统进行拍照,观察 NOD2 蛋白表达情况,进一步验证 *Nod2* 基因在肝组织中的敲除效果。

1.2.5 小鼠感染 *K. pneumoniae* 诱发肝脓肿模型 将 *K. pneumoniae* ATCC13883 划线接种在 MHA 固体培养平板上,37 °C 过夜培养;次日,挑取单菌落于液体 MHB 培养基中,制备成 1.5 × 10⁸ CFU/ml 的细菌悬浮液;每只小鼠口腔灌胃 0.3 × 10⁸ CFU 肺炎克雷伯菌(体积为 200 μl)诱发肝脓肿。

1.2.6 小鼠肝组织病理切片制备 使用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉小鼠取出完整肝组织,放入 10% 的中性福尔马林中固定;将固定好的小鼠肝脏组织依次进行脱水透明、浸蜡包埋、切片展片、脱蜡染色,最后用中性树胶封片,存放备用。

1.2.7 小鼠肝组织炎症因子荧光定量 PCR 检测 *Nod2*^{flox/flox}; *Alb-Cre*⁺ (实验组小鼠)和 *Nod2*^{flox/flox} (对照组小鼠)分别感染 *K. pneumoniae* 48 h 后,取出肝组织,采用 RT-qPCR 方法检测两组小鼠肝脏中炎症因子肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor alpha, TNF-α)、白细胞介素 1β (interleukin 1β, IL-1β) 和趋化因子 CXC 配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1) 的 mRNA 表达量。GAPDH 上下游引物见“1.2.4”;TNF-α 上游引物为 5'-TGACAAGCCTG-

TAGCCCACG-3',下游引物为 5'-TTGTCTTTGAGAT-CCATGCCG-3'。IL-1 β 上游引物为 5'-GAAATGC-CACCTTTTGACAGTG-3',下游引物为 5'-TGGAT-GCTCTCATCAGGACAG-3';CXCL1 上游引物为 5'-ACAGGGGCGCCTATCGC-3',下游引物为 5'-ACAATTTTCTGAACCAAGGGAGC-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,每组实验重复 3 次,组间比较采用 *t* 检验,对于生存率曲线比较,使用 Log-Rank (Mantel-Cox) 检验分析结果。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果 取幼鼠脚趾进行小鼠基因型鉴定。基因型鉴定 PCR 结果如图 1 所示,1、2、5 为 flox 纯合子($Nod2^{flox/flox}$,216bp);3 和 4 为 flox 杂合子($Nod2^{flox/+}$,171 bp 和 216 bp)。Alb-Cre 基因型鉴定 PCR 结果如图 2 所示;其中 1、3 和 4 为 Alb-Cre⁺ 小鼠 (390 bp),2 和 5 为 Alb-Cre⁻ 小鼠 (351 bp)。选择 1 为实验组小鼠(基因型: $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$),2、5 为对照组小鼠(基因型为 $Nod2^{flox/flox}$)。

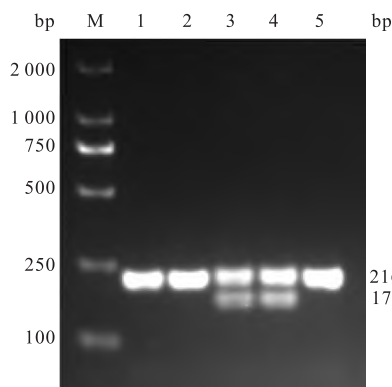


图 1 flox 基因型鉴定结果

M:Marker;1、2、5 为 $Nod2^{flox/flox}$ 纯合子小鼠;3、4 为 $Nod2^{flox/+}$ 杂合子小鼠

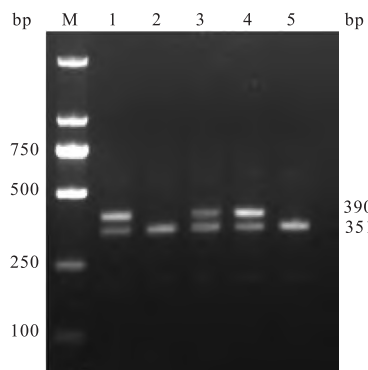


图 2 Cre 基因型鉴定结果

M:Marker;1、3、4 为 Alb-Cre⁺ 小鼠;2、5 为 Alb-Cre⁻ 小鼠

2.2 条件性基因敲除小鼠敲除效果验证 取 5 只实验组和 5 只对照组小鼠肝脏进行敲除效果验证。提取小鼠肝组织 RNA,反转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR 鉴定。结果如图 3 所示, $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$ 小鼠肝脏 NOD2 mRNA 的表达量小于 $Nod2^{flox/flox}$ 小鼠肝脏 NOD2 mRNA 的表达量[(0.419 \pm 0.097) vs (1.030 \pm 0.320), $P < 0.05$]。Western blot 实验结果如图 4 所示,与 $Nod2^{flox/flox}$ 小鼠比较, $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$ 小鼠 NOD2 蛋白降低。最终获得了可以用于后续实验的 $Nod2$ 基因肝脏条件性敲除小鼠($Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$)。

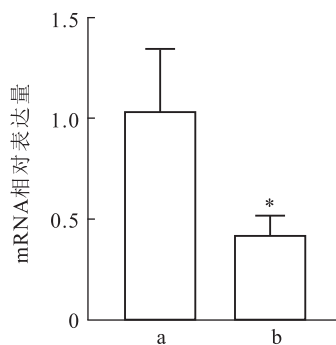


图 3 两组小鼠 NOD2 mRNA 表达量

a: $Nod2^{flox/flox}$; b: $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$;与 $Nod2^{flox/flox}$ 小鼠比较;* $P < 0.05$

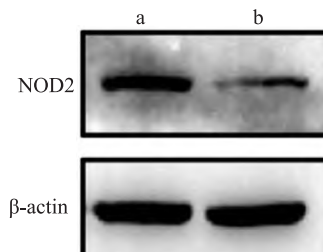


图 4 两组小鼠 NOD2 蛋白表达水平

a: $Nod2^{flox/flox}$; b: $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$

2.3 $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$ 小鼠感染肺炎克雷伯菌后表型变化 为探究 $Nod2$ 基因在小鼠肝脏感染 *K. pneumoniae* 中发挥的作用,实验组小鼠(基因型: $Nod2^{flox/flox};Alb-Cre^{+}$)和对照组小鼠(基因型: $Nod2^{flox/flox}$)各取 10 只,通过口腔灌胃的方法制备肝脓肿模型,检测小鼠和肝组织病理变化和 72 h 死亡率。结果发现,实验组小鼠和对照组小鼠感染 *K. pneumoniae* 48 h 后,与对照组比较,实验组肝组织整体结构大面积受到破损,病理损伤程度严重(图 5);对照组小鼠 72 h 死亡率为 30%,实验组小鼠组 72 h 死亡率为 70% (中位生存时间 60.5 h, $P = 0.046$)。

9), 差异有统计学意义(图6)。

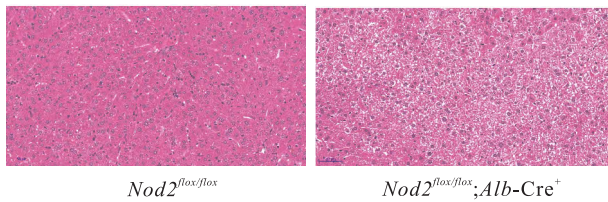


图5 两组小鼠肝组织病理学改变 HE ×200

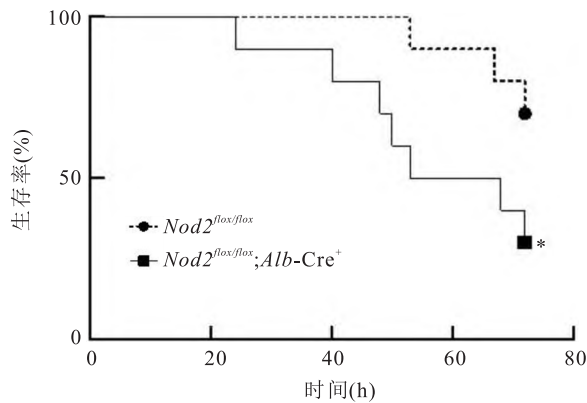


图6 两组小鼠感染肺炎克雷伯菌后生存率曲线
与 $Nod2^{flox/flox}$ 小鼠比较: * $P < 0.05$

2.4 $Nod2^{flox/flox}; Alb-Cre^+$ 小鼠感染 *K. pneumoniae* 后肝脏炎症因子表达水平改变 比较实验组小鼠(基因型: $Nod2^{flox/flox}; Alb-Cre^+$)和对照组小鼠(基因型为 $Nod2^{flox/flox}$)感染 *K. pneumoniae* 48 h 后肝组织炎症因子的表达水平。结果如图7所示,与对照组比较,实验组小鼠肝脏内的炎症因子 TNF- α ($t = 3.736, P = 0.020$)、IL-1 β ($t = 3.114, P = 0.036$)和 CXCL1 ($t = 3.264, P = 0.031$)的相对表达量降低,差异有统计学意义。

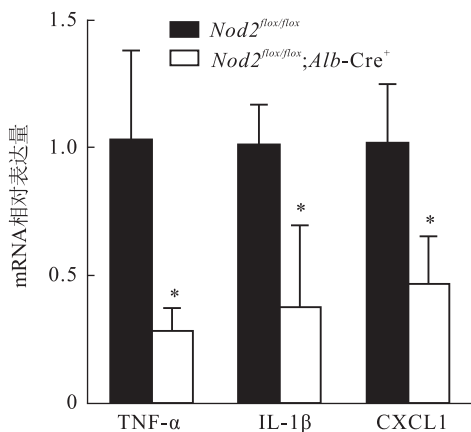


图7 两组小鼠感染肺炎克雷伯菌后肝脏炎症因子 mRNA 表达
与 $Nod2^{flox/flox}$ 小鼠比较: * $P < 0.05$

3 讨论

K. pneumoniae 是一种革兰染色阴性的条件致病菌,可引起多种感染性疾病,包括菌血症、肺炎和肝脓肿等^[9]。健康人体肠道内定值的高毒力 *K. pneumoniae*,在病理状态下可经门静脉系统进入肝脏引起肝脓肿,伴有脓毒症的 *K. pneumoniae* 肝脓肿还可以引起眼内炎、脑膜炎、坏死性筋膜炎等肝外并发症^[2,10-11]。胞质内模式识别受体 NOD2 可识别细菌产生的肽聚糖 MDP,通过招募并与接头蛋白 RIP2 或 CARD9 结合触发 NF- κ B、MAPKs 等促炎信号通路,产生炎症因子和抗菌肽,在宿主抵御细菌感染过程中发挥重要作用^[12-14]。已有研究发现 NOD2 在肺炎链球菌感染的脑膜炎中通过诱导脑部炎症和自噬发挥保护作用^[15];NOD2 在早期鲍曼不动杆菌肺部感染中通过产生活性氧/活性氮参与肺防御^[7]。目前, *Nod2* 基因在肝脏中的功能尚不明确。

本研究利用 Cre-Loxp 重组酶系统敲除小鼠肝脏中 *Nod2* 基因,通过繁育和基因鉴定,成功筛选出纯合子幼鼠 ($Nod2^{flox/flox}; Alb-Cre^+$); RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, NOD2 mRNA 表达量降低, NOD2 蛋白表达量降低,这提示小鼠肝脏 *Nod2* 基因敲除成功。

K. pneumoniae 感染肝组织后,肝脏 Kupffer 细胞、毛细血管内皮细胞、单核细胞及巨噬细胞可以通过产生 IL-1 β 、TNF α 、CXCL1 等细胞因子,产生保护性的免疫应答。本研究发现,在感染 *K. pneumoniae* 的小鼠中,肝脏 *Nod2* 基因敲除后,小鼠生存率降低且肝组织病理损伤增大,说明条件基因敲除小鼠对 *K. pneumoniae* 感染的抵抗能力减弱。此外,感染 *K. pneumoniae* 的 *Nod2* 基因条件敲除小鼠肝脏炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 CXCL1 的 mRNA 相对表达量均降低,由此可见 NOD2 可能通过其介导的炎症反应影响肝脏抗 *K. pneumoniae* 感染的免疫应答。

参考文献

- [1] Amoateng M, Osei-Bagyina P, Varughese R, et al. A rare case of recurrent klebsiella pneumoniae liver abscess[J]. Case Rep Infect Dis, 2021, 2021: 8896379.
- [2] Yin D, Ji C, Zhang S, et al. Clinical characteristics and management of 1572 patients with pyogenic liver abscess: a 12-year retrospective study[J]. Liver Int, 2021, 41(4): 810-8.
- [3] Wiese K M, Coates B M, Ridge K M. The role of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in pulmonary infection[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 57(2): 151-61.

- [4] Kale S D, Dikshit N, Kumar P, et al. *Nod2* is required for the early innate immune clearance of *Acinetobacter baumannii* from the lungs [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):17429.
- [5] Shimada K, Chen S, Dempsey P W, et al. The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydia pneumoniae* lung infection [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4):e1000379.
- [6] 朱莉萍, 贾春敏, 陈南山. NOD2 基因在巨噬细胞抗结核分枝杆菌中的作用 [J]. *现代免疫学*, 2021, 41(3):190-4.
- [7] Kale S D, Dikshit N, Kumar P, et al. *Nod2* is required for the early innate immune clearance of *Acinetobacter baumannii* from the lungs [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):17429.
- [8] 苏丛, 伍婷, 徐方明, 等. 巨噬细胞 *Lamtor2* 基因敲除小鼠对肺炎克雷伯菌易感性的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(4):505-9.
- [9] Wang G, Zhao G, Chao X, et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(17):6278.
- [10] Li S, Yu S, Peng M, et al. Clinical features and development of sepsis in *Klebsiella pneumoniae* infected liver abscess patients; a retrospective analysis of 135 cases [J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1):597.
- [11] Siu L K, Yeh K M, Lin J C, et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(11):881-7.
- [12] Magalhaes J G, Lee J, Geddes K, et al. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by *Nod1* and *Nod2* ligands [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5):1445-55.
- [13] Geddes K, Rubino S, Streutker C, et al. *Nod1* and *Nod2* regulation of inflammation in the *Salmonella colitis* model [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(12):5107-15.
- [14] Zhang M, Pan L, Xu D, et al. The NF-kappaB signaling pathway serves an important regulatory role in *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6):5443-9.
- [15] Wang G, Fu Y, Ma K, et al. NOD2 regulates microglial inflammation through the TAK1-NF-kappaB pathway and autophagy activation in murine pneumococcal meningitis [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 158:20-30.

Study of the role of *Nod2* gene in *Klebsiella pneumoniae* liver abscess

Meng Bao¹, Wu Ting¹, Su Cong², Sun Yating¹, Tang Mingyang¹, Guo Mingjuan³, Lan Yanhu^{4,5}, Li Jiabin^{1,3,5}

(¹*Dept of Infectious Diseases*, ²*Dept of Infection management*, *The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*; ³*Anhui Center for Surveillance of Bacterial Resistance, Hefei 230022*;

⁴*Institute of Bacterial Resistance, Anhui Medical University, Hefei 230022*; ⁵*Dept of Infectious Diseases, The Chaohu Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Chaohu 238000*)

Abstract Objective To establish the liver conditional knockout mouse model of *Nod2* gene infected by *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), and to explore the role and mechanism of *Nod2* gene in the process of liver abscess caused by *K. pneumoniae* infections. **Methods** *Nod2*^{flox/flox} mice were obtained by self-crossing of *Nod2*^{flox/+} mice, and *Alb-Cre*⁺ mice were hybridized with *Nod2*^{flox/+} to obtain *Nod2*^{flox/+}; *Alb-Cre*⁺ mice, then the above two genotypes mice were crossed to obtain liver conditional knockout mice of *Nod2* gene (*Nod2*^{flox/flox}; *Alb-Cre*⁺) and negative control mice in the same litter (*Nod2*^{flox/flox}). The genomic DNA of mice toe was extracted and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The genotypes of offspring were identified by agar-gel electrophoresis and the livers of mice were extracted. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to verify the knockout efficiency of *Nod2* gene in the liver. Both experimental group and control group mice were infected with *K. pneumoniae*, and the survival rate and pathological changes of livers were observed at different time points, and mRNA expression levels of Tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) in the livers of experimental group and control group were detected by RT-qPCR 24h post *K. pneumoniae* infections. **Results** The expression of NOD2 mRNA in the liver of *Nod2*^{flox/flox}; *Alb-Cre*⁺ mice decreased, and the Western blot results showed that the expression of NOD2 protein decreased. Compared with the control group, the survival rate of mice infected with *K. pneumoniae* in the experimental group decreased (median survival time = 60.5 h, $P = 0.0469$) and the liver tissue showed more serious pathological damage, furthermore the mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β and CXCL1 in the livers of experimental group were lower than those of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NOD2 plays a protective role in the process of liver abscess induced by *K. pneumoniae* infections.

Key words *Klebsiella pneumoniae* liver abscess; *Nod2* gene; inflammatory response; protective role