

巨噬细胞识别酿酒酵母孢子的研究

汪沁, 中西秀树, 高晓冬*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 酿酒酵母是一种对人类和动物重要的益生菌, 在不同的营养条件下有营养态和孢子态两种形态。为了研究酵母孢子对免疫系统的作用, 初步探讨了巨噬细胞对酵母孢子的响应机制。通过比较巨噬细胞对营养态酵母和野生型孢子的内吞效率, 发现巨噬细胞对野生型孢子的内吞效率更高。通过 Syk 或 PI3K 抑制剂抑制实验, 发现野生型酵母孢子和营养态酵母的内吞都依赖于 Syk 途径。但野生型酵母孢子的内吞更依赖于 PI3K 途径, 这表明酵母孢子和营养态酵母的内吞都是受体介导的吞噬, 但其吞噬途径不同。高盐和蛋白酶处理实验表明, 野生型孢子的配体是紧密结合到孢子壁, 并且配体物质不是蛋白质。糖竞争抑制剂实验表明, 葡聚糖能够抑制巨噬细胞吞噬营养态酵母, 但不能抑制其吞噬野生型酵母孢子。野生型孢子和突变体孢子吞噬实验进一步表明, 野生型孢子的吞噬与二酪氨酸层结构有关。本研究表明, 巨噬细胞吞噬野生型酵母孢子的信号途径和配体分子不同于营养态酵母, 为后续酿酒酵母的免疫应用提供一定的参考价值。

关键词: 酿酒酵母; 酵母孢子; 吞噬; 葡聚糖; 二酪氨酸

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2021)07-0065-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.008

Study on Macrophage Recognition of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Spores

WANG Qin, NAKANISHI Hideki, GAO Xiaodong*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae*, which has vegetative yeast state and spore state under different nutrient conditions, is an important probiotics for human beings and animals. In order to investigate the effect of yeast spores on immune system, the response mechanism of macrophages to yeast spores was preliminarily explored. By comparing the endocytic efficiency of macrophages on vegetative yeasts and wild type spores, it was found that the endocytosis of macrophage to wild type spores was more efficient. Syk or PI3K inhibitor inhibition experiments revealed that the endocytosis of wild type yeast spores and vegetative yeasts were both dependent on the Syk pathway. The endocytosis of wild type yeast spores was more dependent on the PI3K pathway, indicating that the endocytosis of yeast spore and vegetative yeasts was both receptor mediated phagocytosis, however, their phagocytosis pathways were different. High salt and protease treatment experiments demonstrated that the ligands of wild type spores were tightly bound to the spore wall, and the ligands were not protein. Sugar inhibitors competition experiments showed that the macrophages phagocytosis of

收稿日期: 2019-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(21778023;21576118)。

* 通信作者: 高晓冬(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事细胞糖生物学、生物化学、分子生物学等方面的研究。

E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

vegetative yeast, not wild type spores, was inhibited by glucan. The spore phagocytosis of wild-type spores and mutants further showed that the phagocytosis of wild type spores was related to the structure of dityrosine layer. This study demonstrated that the signaling pathway and ligand molecules related to phagocytosis of wild type yeast spores were different from those of vegetative yeasts, which could be regarded as a theoretical reference for the follow-up immune application of *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, spore, phagocytosis, glucan, dityrosine

酿酒酵母是公认的有益于人类的真菌^[1],在营养条件充足的情况下它进行有丝分裂,此时的酵母以营养态细胞状态存在。但是,在碳源或氮源等营养条件匮乏的情况下,酿酒酵母为了传宗接代,会进行减数分裂,产4个孢子包裹于子囊中^[2-3]。营养态酵母细胞壁有两层,分别是内层葡聚糖层和外层的甘露糖蛋白层^[4-5]。酵母孢子壁有4层,从内到外依次是甘露糖层、葡聚糖层、壳聚糖层和二酪氨酸层^[6]。二酪氨酸层是酵母孢子壁特有的结构,其单体是由两个甲基酪氨酸分子构成^[7]。这种特殊的孢子壁结构能帮助减数分裂后的细胞核抵御严酷的大自然环境,等待适宜的生长环境,从而发芽成长,再次成为营养细胞形态,维持酵母的繁衍^[4]。

巨噬细胞属于免疫细胞的一种,能够吞噬和降解外源颗粒以及微生物并激活免疫反应。巨噬细胞的吞噬过程依赖于细胞表面的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),该受体能够识别微生物表面保守的分子模式(microbe associated molecular pattern, MAMP)并且激活受体上酪氨酸基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)^[8-9]。被激活的ITAM序列进一步招募脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)启动巨噬细胞的吞噬过程^[10-11]。Syk信号能够激活诸如磷脂酶C γ (PLC γ)和磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphoinositide 3-kinase, PI3K)等下游信号,从而增加吞噬效率^[11-13]。吞噬过程中,较大颗粒(>2 μ m)吞噬依赖于PI3K

的活性^[14]。巨噬细胞对微生物表面分子模式的识别是启动直接吞噬的第一步^[15]。微生物表面的糖链结构的特殊性使其被巨噬细胞所识别而引起吞噬^[16-17]。

自然条件下,多数酵母处于营养细胞态。营养态酵母壁的葡聚糖成分能够被巨噬细胞表面葡聚糖受体识别而引起吞噬,促进巨噬细胞炎症因子TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6和IL-12的释放^[18-20],葡聚糖也能够与细菌结合从而抑制细菌在胃肠道增殖从而达到抑菌的作用^[21]。营养态酵母壁的几丁质成分也能刺激巨噬细胞分泌细胞因子TNF- α 和IL-6,并且增强巨噬细胞对假丝酵母的杀伤作用^[22]。营养态酵母壁上这些免疫活性物质的存在使得营养态酵母作为饲料添加物能够增强牛和猪的免疫力^[23-25]。

酿酒酵母虽为与人类共生的真菌,但目前其子囊孢子形态对免疫系统的作用很大程度上未知,酵母孢子的葡聚糖层被壳聚糖层和二酪氨酸层严密包裹,其免疫活性物质未知。作者以小鼠RAW264.7细胞作为巨噬细胞模型,研究了巨噬细胞识别和吞噬酵母孢子的作用机制,为后续探究野生型酵母孢子免疫作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

作者使用高效产孢率的AN120二倍体酿酒酵母菌株,以及*dit1* Δ 和*chs3* Δ 突变体菌株,均来自作者所在实验室保藏菌株,相关信息见表1。

表1 本研究中所用的酵母菌株

Table 1 *S. cerevisiae* strains used in this study

菌株	基因型	文献来源
AN120(野生型,二倍体)	<i>MATα/MATα ARG4/arg4-NspI his3ΔSK/his3ΔSK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3</i>	[26]
<i>dit1</i> Δ (<i>dit1</i> Δ , 二倍体)	As AN120, plus <i>dit1</i> Δ :: <i>his5</i> +/ <i>dit1</i> Δ :: <i>his5</i> ⁺	[27]
<i>chs3</i> Δ (<i>chs3</i> Δ , 二倍体)	As AN120, plus <i>chs3</i> Δ :: <i>his5</i> +/ <i>chs3</i> Δ :: <i>his5</i> ⁺	[28]

1.2 细胞及培养

RAW264.7 小鼠巨噬细胞,购自中科院菌种保藏库,用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基培养,条件为 5% CO₂,37 ℃。

1.3 培养基

YPAD 培养基:蛋白胨 A 10 g,酵母提取物 5 g,腺嘌呤 15 mg 溶解于 450 mL 去离子水中,灭菌后加入 50 mL 质量浓度为 20 g/dL 的葡萄糖混匀。固体培养基则加入琼脂(Agar)10 g 一起灭菌,之后加入葡萄糖混匀,倒平板。

YPAc 培养基:蛋白胨 A 20 g,酵母提取物 10 g,腺嘌呤 30 mg,醋酸钾 10 g 溶解于 1 L 去离子水中,高压湿热灭菌。

KAc 培养基:称取 20 g KAc 溶于 1 L 去离子水中,固体培养基加入 20 g 的琼脂粉,高压灭菌,倒平板。

1.4 主要试剂和仪器

主要试剂有:DMEM 高糖培养基(Gibco),胎牛血清(Gibco),昆布糖(Sigma),葡聚糖微球(Sigma),PBS(生工),胰蛋白酶(生工),蛋白酶 K(Sigma),溶菌酶(Sigma);主要仪器有:细胞培养箱(Thermo),离心机(Takara),显微镜(日立)等。

1.5 酵母培养

酵母菌株于固体 YPAD 平板划线培养 3 d 后,用粗头牙签接种于 5 mL YPAD 液体培养基,转接于 100 mL 液体 YPAD 培养基培养 3~5 h,使酵母处于对数生长期并且 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,此时收集营养态酵母,用 0.5% 吐温-20 洗 3 次后再用去离子水洗 3 次,3 000 r/min 离心,称质量备用。酵母孢子的制备:营养态酵母过夜培养后,取 10 mL 转接到 200 mL 的 YPAc 培养基中,培养 12 h 后离心转移到 2% KAc 培养基后续培养 2 d;离心收集子囊酵母,当产孢率大于 95% 时,离心收集菌体,PBS 洗 2 次,加入 5 mL 原生质体溶液(1.2 mol/L 山梨醇,0.1 mol/L PBS)和 50 μL(10 000 U/mL)溶菌酶,于 25 ℃ 摇床处理 3 h;原生质体溶液洗 2 次,去离子水洗 2 次,加入 5 mL 去离子水超声 20 min(45%功率,超声 5 s,停 2 s),用 0.5% 吐温-20 洗 3 次后再用去离子水洗 3 次,显微镜观察孢子纯化效果,将纯化后孢子制备成 100 mg/mL 的孢子悬液。

1.6 巨噬细胞培养和吞噬实验

RAW264.7 小鼠巨噬细胞置于含 10% 灭活牛

血清的 DMEM 高糖培养基培养,用含 EDTA 的胰酶消化后传代。12 孔板每孔接种 5×10⁵ 个细胞,培养 24 h 后,每孔加入相同质量的营养态酵母或者酵母孢子,每组设置 5 个平行,1 300 r/min 离心 3 min,使酵母落到细胞表面,后续培养 30 min,PBS 洗 3 次,胰酶消化收集细胞于离心管,4% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗 3 次。显微镜镜检并统计每 100 个巨噬细胞吞噬营养态酵母或孢子的个数。

1.7 药物抑制实验

用培养基将母液浓度为 10 mmol/L 的 Syk 抑制剂白皮杉醇稀释为 25 μmol/L 或 50 μmol/L 的工作浓度;用培养基将母液质量浓度为 1 mg/mL 的 PI3K 抑制剂渥曼青霉素稀释为 100 ng/mL 或 200 ng/mL。进行抑制实验时,细胞接种于 12 孔板培养 24 h,更换为含有白皮杉醇或渥曼青霉素的培养基并于 37 ℃ 孵育 30 min,加入 1 mg 营养态酵母或 1 mg 酵母孢子或 200 μg 葡聚糖微球,离心并后续培养 30 min,统计相对吞噬效率。

$$\text{相对吞噬效率(\%)} = \frac{\text{细胞处理后吞噬酵母个数}}{\text{无处理细胞吞噬酵母个数}} \times 100\%$$

1.8 无血清吞噬实验

营养态酵母或孢子与巨噬细胞共培养前,更换不含血清的 DMEM 高糖培养基或含有 10% 血清的培养基处理 2 h,随后更换为处理组对应的培养基并分别加入 1 mg 的营养态酵母或酵母孢子,1 300 r/min 离心 2 min 后共培养 30 min,统计吞噬效率。

1.9 高盐以及蛋白酶处理对孢子吞噬效率的影响

野生型酵母孢子经高盐(0.6 mol/L NaCl 或 1 mol/L PBS)洗涤后,去离子水洗 3 次,离心称质量。蛋白酶处理野生型酵母孢子时,取野生型酵母孢子 100 mg,按照以下反应进行:50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),5 mmol/L CaCl₂,加入 200 μL 蛋白酶 K(600 U/mL),于 37 ℃ 处理 1 h,之后用 0.5% 吐温-20 洗涤 3 次,去离子水洗涤 3 次,超声 30 s,制备成 100 mg/mL 的孢子悬液。比较处理组与未处理组吞噬效率。

1.10 单糖或者多糖抑制实验

用培养基配制终质量浓度为 1 mg/mL 的昆布糖培养液以及 5 mg/mL 的甘露糖、甘露聚糖、半乳糖、乳糖以及盐藻糖培养液,取 1 mL 上述含糖培养液和细胞共孵育 30 min 之后,加入 1 mg 的营养态

酵母或 1 mg 酵母孢子或 200 μ g 葡聚糖微球,离心后进行吞噬实验并且统计相对吞噬效率。

1.11 野生型孢子和突变体孢子吞噬实验

取 1 mg 的野生型酵母孢子、*dit1 Δ* 孢子和 *chs3 Δ* 孢子,按照 1.6 方法进行吞噬实验。

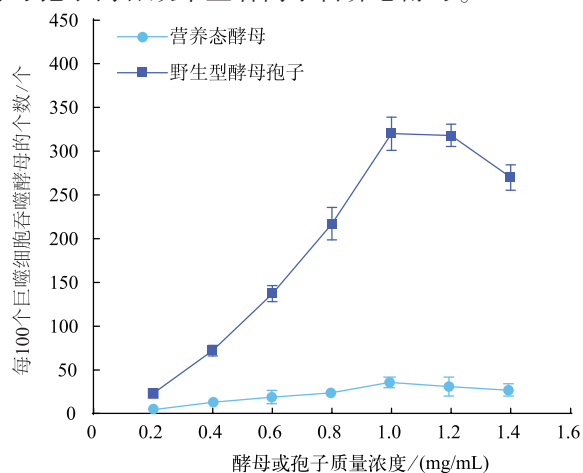
1.12 统计分析

采用 Graphprism 软件对数据进行分析作图,所有数据以平均值+标准差表示。用单因素或双因素方差分析(One-Way or Two-Way ANOVA)检验组间的差异。检验标准 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,每次实验重复 5 次。对于本实验统计结果,标记如下: $P \geq 0.05$ 标记为 ns; $0.01 < P < 0.05$ 标记为 *; $0.001 < P \leq 0.01$ 标记为 **; $P \leq 0.001$ 标记为 ***; $P \leq 0.0001$ 标记为 ****。

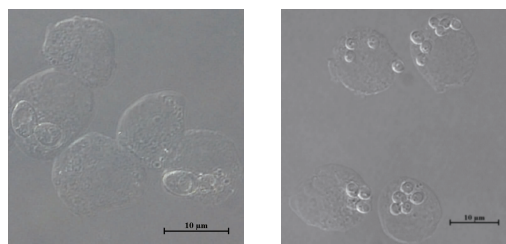
2 结果与分析

2.1 巨噬细胞内吞野生型酵母孢子效率高于营养态酵母

营养态酵母壁和野生型酵母孢子壁的结构有所不同,比较巨噬细胞对营养态酵母和野生型酵母孢子的响应,结果见图 1(a)。随着营养态酵母或野生型酵母孢子质量浓度的增加,巨噬细胞吞噬营养态酵母和野生型孢子的数目呈上升趋势。当营养态酵母和孢子质量均为 1 mg 时,巨噬细胞吞噬营养态酵母和孢子的情形见图 1(b)。统计分析表明,此时每 100 个巨噬细胞吞噬酵母或孢子的个数分别为 35 个和 320 个。质量为 1 mg 时,酵母孢子个数约为营养态酵母个数的 3.7 倍,此时孢子被吞噬个数约为营养态酵母个数的 9 倍。这表明巨噬细胞对酵母孢子内吞效率显著高于营养态酵母。



(a) 巨噬细胞吞噬营养态酵母和野生型酵母孢子的效率



营养态酵母

野生型酵母孢子

(b) 巨噬细胞内吞营养态酵母和孢子

图 1 巨噬细胞对营养态酵母和野生型酵母孢子吞噬效率比较($\bar{x} \pm SD, n=5$)

Fig. 1 Phagocytosis efficiency of vegetative yeast and wild type spores($\bar{x} \pm SD, n=5$)

2.2 巨噬细胞对酵母孢子的内吞是依赖于 Syk 和 PI3K 的吞噬过程

巨噬细胞对大颗粒微生物的内吞主要是通过巨胞饮和吞噬过程^[29]。巨胞饮指的是细胞依赖于细胞膜流动性的非特异内吞大颗粒过程^[30];吞噬过程指的是免疫细胞膜上受体介导的并且依赖于 Syk 途径的内吞过程^[10,31]。已有的研究表明,巨噬细胞吞噬葡聚糖微球依赖于 Syk, 通过白皮杉醇抑制 Syk 能够抑制巨噬细胞对葡聚糖微球的吞噬^[32]。利用 Syk 抑制剂白皮杉醇阻断 Syk 所介导的信号通路见图 2(a)。与对照组相比,增加白皮杉醇的浓度会增强抑制巨噬细胞对葡聚糖微球、营养态酵母和野生型孢子的吞噬作用,这表明巨噬细胞对野生型酵母孢子和酵母的内吞途径是依赖于 Syk 受体介导的吞噬过程。有研究表明,巨噬细胞吞噬较大颗粒依赖于 PI3K^[33],配制不同浓度的渥曼青霉素测定其对巨噬细胞吞噬营养态酵母和野生型酵母孢子的影响。如图 2(b)所示,与对照组相比,渥曼青霉素对巨噬细胞吞噬酵母和葡聚糖微球无显著影响;随着渥曼青霉素质量浓度的增加,其对巨噬细胞吞噬野生型酵母孢子的抑制作用增强。这表明尽管野生型孢子直径小于营养态酵母,其吞噬途径是极其依赖于 PI3K 的过程,而营养态酵母的吞噬过程不是显著依赖于 PI3K 的过程。因此,巨噬细胞对营养态酵母和野生型酵母孢子的吞噬依赖 Syk 下游不同激酶,表明巨噬细胞吞噬营养态酵母和孢子所依赖的信号途径不同。

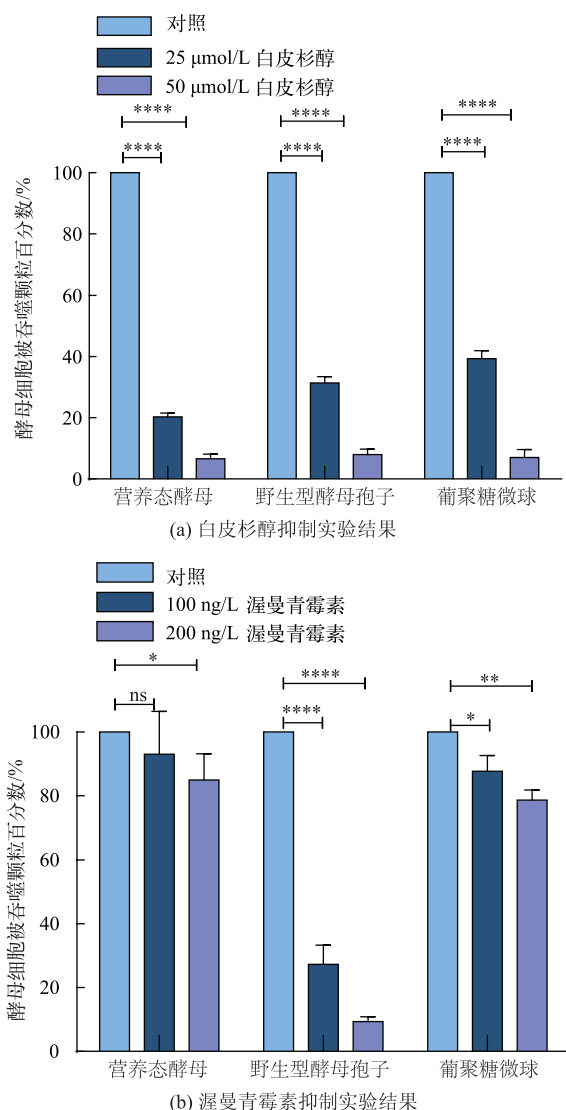


图2 Sky抑制剂白皮杉醇或PI3K抑制剂渥曼青霉素对巨噬细胞内吞营养态酵母、野生型酵母孢子和葡聚糖微球的影响($\bar{x} \pm SD, n=5$)

Fig. 2 Sky inhibitor picetannol or PI3K inhibitor wortmannin effect on the phagocytosis efficiency of vegetative yeasts, wild type yeast spores and glucan microspheres($\bar{x} \pm SD, n=5$)

2.3 巨噬细胞对野生型酵母孢子的吞噬不依赖于血清调理

为了探究巨噬细胞对酵母孢子识别是否依赖于血清中补体或抗体成分,检测无血清培养基对吞噬野生型孢子效率的影响。如图3(a)所示,每100个巨噬细胞于有、无血清情况下吞噬营养态酵母和野生型酵母孢子的个数分别为42、38和338、322,统计分析无显著性差异,这表明巨噬细胞对营养态

酵母或野生型酵母孢子的吞噬不依赖于血清中补体和免疫球蛋白成分。图3(b)显示,无血清条件下摄入营养态酵母或野生型孢子的巨噬细胞占总细胞的比率分别为18%和83%,这表明巨噬细胞对野生型孢子有更高效率的内吞作用。因此,巨噬细胞对野生型孢子的吞噬不是依赖于血清中补体和抗体调理导致的间接吞噬,这种吞噬极有可能是孢子表面存在的物质被巨噬细胞识别而引起吞噬。

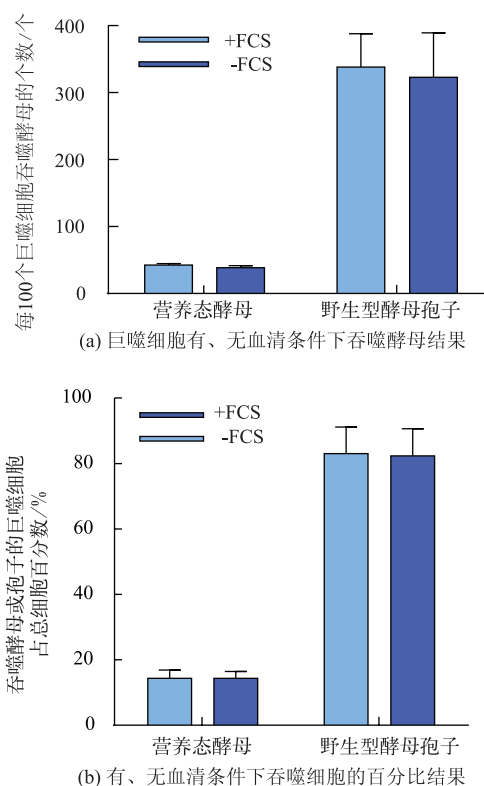


图3 血清对吞噬的影响($\bar{x} \pm SD, n=5$)

Fig. 3 Effect of serum on phagocytosis efficiency of vegetative yeast and spores($\bar{x} \pm SD, n=5$)

2.4 巨噬细胞吞噬酵母孢子的配体为共价结合到孢子壁的非蛋白质成分

为了进一步探究孢子壁上何种物质作为分子配体导致野生型酵母孢子的高效吞噬,通过高盐洗涤除去吸附在野生型酵母孢子壁上的分子,利用蛋白酶处理孢子壁并比较其吞噬效率。如图4所示,处理后的酵母孢子吞噬效率与对照组吞噬效率无显著差异,这表明野生型孢子表面被巨噬细胞识别的主要配体不是吸附于二酪氨酸层的物质,而是共价结合到二酪氨酸层的物质,并且这种分子配体物质不是蛋白质。

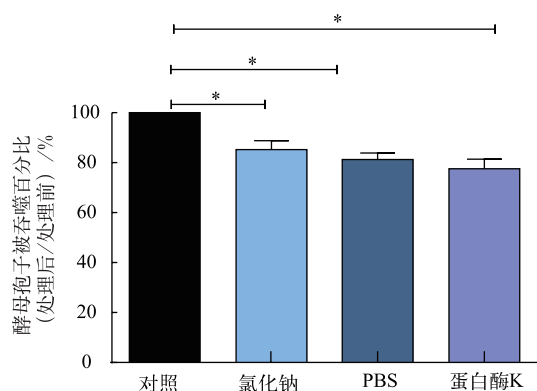


图 4 高盐洗脱和蛋白酶处理对巨噬细胞吞噬野生型酵母孢子的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=5$)

Fig. 4 Effect of high salt treatment and proteinase K treatment on the phagocytosis efficiency of wild type spores ($\bar{x} \pm SD, n=5$)

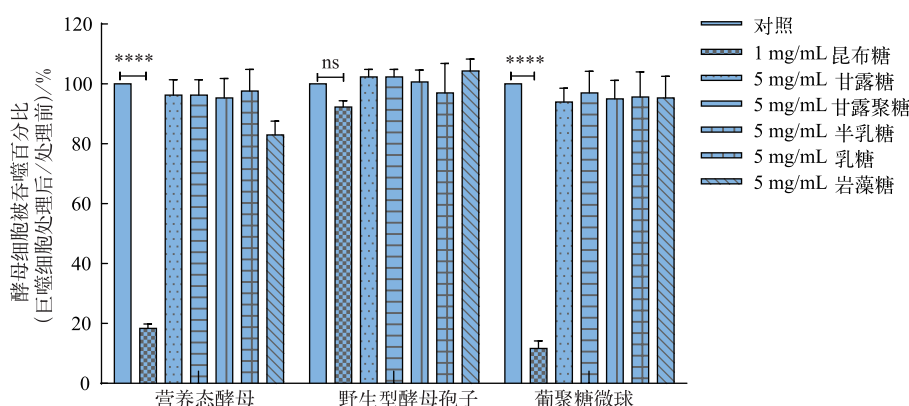


图 5 不同糖链对巨噬细胞吞噬营养态酵母和野生型酵母孢子的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=5$)

Fig. 5 Effect of different sugars on the phagocytosis efficiency of vegetative yeast, wild type spores and glucan microspheres ($\bar{x} \pm SD, n=5$)

甘露聚糖等糖链,巨噬细胞识别营养态酵母和野生型酵母孢子的配体不同。

2.6 巨噬细胞对野生型酵母孢子的识别依赖于二酪氨酸层结构

为了探究野生型孢子表面被识别的配体,比较巨噬细胞吞噬野生型酵母孢子(*AN120*孢子)、*dit1Δ*孢子和 *chs3Δ*孢子的效率。*dit1Δ*菌株是野生型酵母敲除二酪氨酸层合成基因 *DIT1* 后得到的菌株,因此 *dit1Δ*孢子无二酪氨酸层^[37]。*chs3Δ*菌株是野生型酵母敲除酵母孢子壳聚糖层合成基因 *CHS3* 后得到的菌株,因此 *chs3Δ*孢子无壳聚糖层。由于二酪氨

2.5 巨噬细胞吞噬营养态酵母依赖于葡聚糖配体,而酵母孢子不依赖

微生物表面的糖链能够被巨噬细胞所识别,从而引起吞噬^[34]。为了探究巨噬细胞吞噬营养态酵母和野生型酵母孢子与糖链配体是否有关,通过一系列糖链作为配体竞争抑制剂。昆布糖(直链的葡聚糖)能够抑制由于酵母葡聚糖配体引起的吞噬^[35-36],因此选取昆布糖作为对照组。从图 5 可知,昆布糖能够显著地抑制巨噬细胞对营养态酵母和葡聚糖微球的吞噬,但对野生型酵母孢子的吞噬无显著影响。图 5 表明,甘露糖、甘露聚糖、半乳糖、乳糖以及岩藻糖对营养态酵母以及野生型酵母孢子的吞噬均无显著影响。因此巨噬细胞通过识别营养态酵母和葡聚糖微球上葡聚糖配体介导吞噬,但野生型酵母孢子表面被巨噬细胞识别的配体不是葡聚糖或

酸层的合成是依赖于壳聚糖层的存在,因此 *chs3Δ*孢子也无二酪氨酸层的存在^[3]。统计每 100 个巨噬细胞吞噬野生型酵母孢子、*dit1Δ*孢子和 *chs3Δ*孢子的个数,从图 6 可知,巨噬细胞对野生型酵母孢子的吞噬效率显著高于 *dit1Δ*孢子和 *chs3Δ*孢子。如图 6(b)所示,酵母 *dit1Δ*孢子和 *chs3Δ*孢子与野生型酵母孢子大小相似,但巨噬细胞对野生型孢子的吞噬更为高效,这表明巨噬细胞对野生型酵母孢子的高效吞噬不是因为其直径小于营养态酵母,而是因为野生型酵母孢子壁最外层二酪氨酸层的存在使其能被巨噬细胞识别,从而介导吞噬的发生。

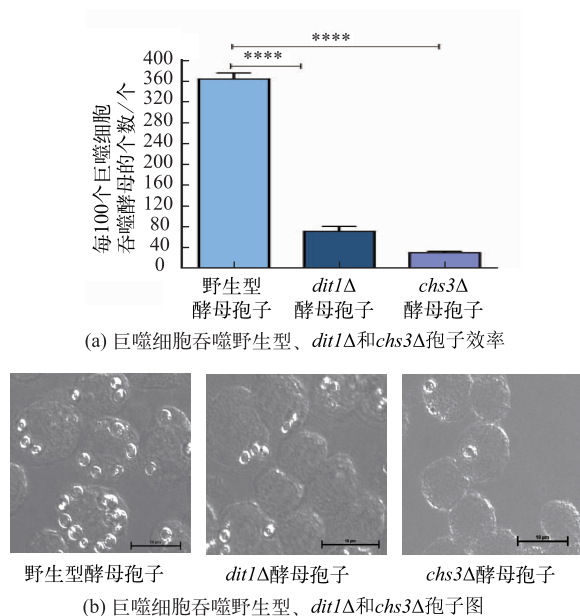


图6 巨噬细胞对野生型酵母孢子、*dit1Δ*和*chs3Δ*突变体孢子的吞噬($\bar{x} \pm SD, n=5$)

Fig. 6 Phagocytosis efficiency of wild type spores, *dit1Δ* spores and *chs3Δ* spores ($\bar{x} \pm SD, n=5$)

3 结语

酿酒酵母孢子形态对免疫细胞的作用未被详细研究,作者通过比较巨噬细胞对营养态酵母和野生型酵母孢子的内吞效率,发现野生型酵母孢子能够更高效地被巨噬细胞内吞。进一步研究表明:野生型酵母孢子和营养态酵母的内吞是依赖于 Syk 的受体介导的吞噬作用,但野生型酵母孢子的吞噬相对于营养态酵母而言极其依赖 PI3K,这表明巨噬细胞吞噬野生型孢子和营养态酵母的吞噬信号途径也有所不同。营养态酵母的吞噬配体是葡聚糖,但野生型酵母孢子的吞噬不依赖于葡聚糖配体,其高效吞噬与野生型孢子壁二酪氨酸层有关。

本研究表明,巨噬细胞高效吞噬野生型酵母孢子是依赖于二酪氨酸层,对这种配体的分子研究让我们能够找到一种可利用的、作为载体的生物分子配体,可将外源物质高效传递到巨噬细胞体内,为日后开发一种无毒、高效的靶向巨噬细胞的生物介质提供理论依据。

参考文献:

- [1] JOHNSON E A, ECHAVARRI-ERASUN C. Yeast biotechnology[M]. London: Elsevier, 2011.
- [2] NEIMAN A M. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**, 2011, 189(3): 737-765.
- [3] NEIMAN A M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2005, 69(4): 565-584.
- [4] KLIS F M, MOL P, HELLINGWERF K, et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 2002, 26(3): 239-256.
- [5] LESAGE G, BUSSEY H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2006, 70(2): 317-343.
- [6] COLUCCIO A, BOGENGRUBER E, CONRAD M N, et al. Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Eukaryotic Cell**, 2004, 3(6): 1464-1475.
- [7] BRIZA P, ECKERSTORFER M, BREITENBACH M. The sporulation-specific enzymes encoded by the *DIT1* and *DIT2* genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1994, 91(10): 4524-4528.
- [8] GREENBERG S, GRINSTEIN S. Phagocytosis and innate immunity[J]. **Current Opinion in Immunology**, 2002, 14(1): 136-145.
- [9] UNDERHILL D M, GOODRIDGE H S. The many faces of ITAMs[J]. **Trends in Immunology**, 2007, 28(2): 66-73.
- [10] GREENBERG S, CHANG P, WANG D C, et al. Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1996, 93(3): 1103-1107.
- [11] BERTON G, MOCSAI A, LOWELL C A. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation[J]. **Trends in Immunology**, 2005, 26(4): 208-214.
- [12] YUKO K, JIRO K, LIBO Y, et al. A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003, 100(16): 9470-9475.
- [13] VOLLING K, THYWISSSEN A, BRAKHAGE A A, et al. Phagocytosis of melanized *Aspergillus conidia* by macrophages exerts

- cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling[J]. **Cellular Microbiology**, 2011, 13(8):1130-1148.
- [14] BEEMILLER P, ZHANG Y, MOHAN S, et al. A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-Kinase during Fc Receptor-mediated phagocytosis[J]. **Molecular Biology of the Cell**, 2010, 21(3):470-480.
- [15] ERWIG L P, GOW N A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes[J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2016, 14(3):163-176.
- [16] SHARON N. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis[J]. **Immunology Today**, 1984, 5(5):143-147.
- [17] LU J, TEH C, KISHORE U, et al. Collectins and ficolins; sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –General Subjects**, 2002, 1572(2-3):387-400.
- [18] MAJTÁN J, KOGAN G, KOVÁCOVÁ E, et al. Stimulation of TNF-alpha release by fungal cell wall polysaccharides[J]. **Zeitschrift Fur Naturforschung C Journal of Biosciences**, 2005, 60(11-12):921-926.
- [19] BROWN G D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor[J]. **Nature Reviews Immunology**, 2006, 6(1):33-43.
- [20] GANTNER B N, SIMMONS R M, CANAVERA S J, et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2[J]. **Journal of Experimental Medicine**, 2003, 197(9):1107-1117.
- [21] HETLAND G, SANDVEN P. β -1,3-glucan reduces growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage cultures[J]. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 2002, 33(1):41-45.
- [22] RIZZETTO L, IFRIM D C, MORETTI S, et al. Fungal chitin induces trained immunity in human monocytes during cross-talk of the host with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2016, 291(15):7961-7972.
- [23] EMMANUEL D G V, JAFARI A, BEAUCHEMIN K A, et al. Feeding live cultures of *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* induces an inflammatory response in feedlot steers[J]. **Journal of Animal Science**, 2007, 85(1):233-239.
- [24] MAGALHAES V J A, SUSCA F, LIMA F S, et al. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves[J]. **Journal of Dairy Science**, 2008, 91(4):1497-1509.
- [25] WHITE L A, NEWMAN M C, CROMWELL G L, et al. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs[J]. **Journal of Animal Science**, 2002, 80(10):2619-2628.
- [26] NEIMAN A M, KATZ L, BRENNWALD P J. Identification of domains required for developmentally regulated SNARE function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**, 2000, 155(4):1643-1655.
- [27] ZHANG H, TACHIKAWA H, GAO X D, et al. Applied usage of yeast spores as chitosan beads[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 2014, 80(16):5098-5105.
- [28] COLUCCIO A, NEIMAN A M. Intersore bridges: a new feature of the *Saccharomyces cerevisiae* spore wall[J]. **Microbiology**, 2004, 150(10):3189-3196.
- [29] DOHERTY G J, MCMAHON H T. Mechanisms of endocytosis[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 2009, 78:857-902.
- [30] LIM J P, GLEESON P A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps[J]. **Immunology and Cell Biology**, 2011, 89(8):836-843.
- [31] TOHYAMA Y, YAMAMURA H. Protein tyrosine kinase, Syk; a key player in phagocytic cells[J]. **Journal of Biochemistry**, 2009, 145(3):267-273.
- [32] HERRE J, MARSHALL A S, CARON E, et al. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages[J]. **Blood**, 2004, 104(13):4038-4045.
- [33] SCHLAM D, BAGSHAW R D, FREEMAN S A, et al. Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins[J]. **Nature Communications**, 2015, 6:8623.
- [34] KERRIGAN A M, BROWN G D. C-type lectins and phagocytosis[J]. **Immunobiology**, 2009, 214(7):562-575.
- [35] HERRE J, MARSHALL A S, CARON E, et al. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages[J]. **Blood**, 2004, 104(13):4038-4045.
- [36] FUENTES A L, MILLIS L, SIGOLA L B. Laminarin, a soluble beta-glucan, inhibits macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide mediated augmentation of phagocytosis[J]. **International Immunopharmacology**, 2011, 11(11):1939-1945.
- [37] LIN P C, KIM C, SMITH S O, et al. A highly redundant gene network controls assembly of the outer spore wall in *S. cerevisiae*[J]. **PLoS Genetics**, 2013, 9(8):e1003700.