

简 报

白假丝酵母 *CFL1* 基因通过转录调控参与氧化压力应答

彭丽萍 张冰 喻其林 李建荣 梁超 任彤彤 李明春*

(南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘 要:【背景】*CFL1* 基因是白假丝酵母高铁还原酶基因,介导胞外铁离子的还原,在白假丝酵母胞内铁稳态的维持方面发挥着重要作用。【目的】研究 *CFL1* 基因调节氧化压力应答的分子机制。【方法】采用液体培养及巨噬细胞模型,测定 *CFL1* 缺失对氧化压力耐受性和杀伤巨噬细胞能力的影响;使用羟基自由基清除剂二甲基亚砜(DMSO)分析其对缓解氧化压力敏感性的影响;采用实时荧光定量 PCR 分析 *CFL1* 缺失对氧化压力应答基因表达的影响;采用过氧化氢酶(CAT)活性测定方法研究 *CFL1* 缺失对 *CAT1* 基因表达的影响;通过构建 WT-CAT1-GFP 和 *cfl1Δ/Δ*-CAT1-GFP 菌株分析过氧化氢酶基因过表达对 *cfl1Δ/Δ* 氧化压力敏感性的影响。【结果】白假丝酵母 *CFL1* 基因的缺失会造成杀伤巨噬细胞能力的减弱,氧化压力应答基因表达的下降。过氧化氢酶基因的过表达则能恢复与野生型几乎一致的氧化压力水平。【结论】*CFL1* 基因通过转录调控参与白假丝酵母氧化压力应答过程。

关键词: 白假丝酵母, 氧化压力, *CFL1* 基因, 转录调控

CFL1 regulates oxidative stress response genes in transcriptional levels in *Candida albicans*PENG Li-Ping ZHANG Bing YU Qi-Lin LI Jian-Rong LIANG Chao
REN Tong-Tong LI Ming-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Background] *CFL1* is one of the ferric reductase genes in *Candida albicans*, and mediates the reduction of iron in the cell surface to maintain iron stability in the cell. [Objective] To study the sensitivity and mechanism of *CFL1* to oxidative stress. [Methods] We analyzed the growth and the ability to kill macrophages under the oxidative stress condition by means of liquid culture and macrophages model. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to verify if it released the oxidative stress. The quantitative real-time PCR was used to analyze the expression of oxidative stress response genes in *cfl1Δ/Δ*. We constructed the strain WT-CAT1-GFP and *cfl1Δ/Δ*-CAT1-GFP to test

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670146, 81873961, 31870139); Natural Science Foundation of Tianjin City (17JCZDJC33300)

*Corresponding author: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

Received: May 22, 2018; Accepted: June 20, 2018; Published online (www.cnki.net): June 27, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31670146, 81873961, 31870139); 天津市自然科学基金(17JCZDJC33300)

*通信作者: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

收稿日期: 2018-05-22; 接受日期: 2018-06-20; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-27

if the over-expression of catalase changed the sensitivity. **[Results]** The deletion of *CFLI* caused the decrease of the ability to kill macrophages and the expression of oxidative stress response genes. Besides, it resulted in the down-expression of catalase. However, the over-expression of catalase in *cfl1Δ/Δ* could recover nearly the same ability of oxidative stress response as the wild type. **[Conclusion]** *CFLI* regulates the oxidative stress response genes in the transcriptional levels.

Keywords: *Candida albicans*, Oxidative stress, *CFLI* gene, Transcriptional regulation

白假丝酵母是临床常见的条件致病性真菌, 菌落特征为白色、光滑、圆形或卵圆形^[1]。通常情况下白假丝酵母与健康人体共生, 不会危害人体健康。但是当人体免疫力降低造成菌群失衡后, 会导致白假丝酵母的迅速生长, 轻则引起浅层感染, 导致鹅口疮、阴道炎等疾病, 重则造成致病性的深度感染, 导致菌血症、败血症的发生^[2]。目前, 随着全球免疫缺陷患者的增多, 由白假丝酵母感染导致的念珠菌病成为人们广泛关注的健康问题^[3]。此外, 由于抗真菌药物的广泛使用, 白假丝酵母进化出一定的耐药性, 给治疗带来了更大的困难。因此, 寻找白假丝酵母的药物治疗靶点, 从而为白假丝酵母的治疗提供理论支撑, 是科研工作关注的重点。

白假丝酵母入侵宿主时会受到宿主免疫系统的攻击, 巨噬细胞、嗜中性粒细胞等免疫细胞在杀伤白假丝酵母时会释放大量活性氧(Reactive oxygen species, ROS), 造成白假丝酵母的氧化压力显著升高, 产生很强的毒害作用^[4]。因此, 为了在宿主体内存活, 白假丝酵母进化出了较为完备的氧化压力应答机制。Cap1 途径是目前研究得较为透彻的转录调控途径。在正常条件下, Cap1 穿梭于胞质和细胞核之间, 维持白假丝酵母胞内氧化水平的稳定。当受到氧化压力刺激时, Cap1 能够进入细胞核, 并发生磷酸化, 失去与 Crm1 核输出序列(Nuclear export sequence, NES)的结合能力, 进而结合在包括 *TRR1*、*GLR1* 和 *CAT1* 等氧化压力应答(Oxidative stress response, OSR)基因的启动子上, 起始靶基因的表达, 应对氧化压力^[5-6]。

铁离子是生物体生长必需的元素, 人体中的

铁主要以转铁蛋白和乳铁蛋白的形式存在, 而游离铁离子含量较低^[7]。为了在宿主体内这一低铁环境下生存, 白假丝酵母进化出复杂而高效的铁离子储存、转运和利用系统。其中, 高铁还原酶能够将不可利用的三价铁离子(Fe^{3+})还原为可被细胞利用的二价铁离子(Fe^{2+}), 促进铁离子的吸收和利用^[8]。在酿酒酵母中, 典型的高铁还原酶有 FRE1、FRP1 和 FRE10 等。

CFLI 基因(*Candida* ferric reductase-like gene)是首个被克隆出的白假丝酵母高铁还原酶编码基因。Cfl1 属于还原性铁离子吸收系统的成员^[9]。据文献报道^[10-11], 白假丝酵母 *CFLI* 基因与酿酒酵母的 *FRE1* 基因同源, 并且在 *FRE1* 基因缺失后能够弥补其功能, 其转录受到铜和铁含量的调节。

本实验室前期研究发现, 白念珠菌 *CFLI* 基因的缺失会因其它替代高铁还原酶基因表达水平上调而导致细胞表面高铁还原酶活性的升高, 进而造成胞内亚铁离子的聚集。在菌丝发育和小鼠毒力方面, *CFLI* 基因的缺失也会造成缺陷^[12]。此外, *CFLI* 基因在氧化压力应答方面发挥作用, 但是其调控过程并不清楚, 其中发挥作用的元件也并未明确。在此基础上, 本研究首次探讨 *CFLI* 基因对氧化压力应答的调控机理, 探索 *CFLI* 的调控靶点, 从而丰富对白假丝酵母氧化压力应答的认识, 在铁稳态与氧化压力应答之间建立深层次的联系, 进而为白假丝酵母的临床治疗提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

实验所用菌株、质粒及引物见表 1 和表 2。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype and description	References
<i>C. albicans</i> strains		
BWP17 (WT)	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	This study
<i>cfl1Δ/Δ</i>	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>cfl1::ARG4/cfl1::URA3-dpl200</i>	[12]
<i>cfl1Δ/Δ+CFL1</i>	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>cfl1::ARG4/cfl1::URA3-dpl200 CFL1</i>	[12]
WT-CAT1-GFP	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG pACT-CAT1-GFP</i>	This study
<i>cfl1Δ/Δ-CAT1-GFP</i>	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>cfl1::ARG4/cfl1::URA3-dpl200 pCAT1-GFP</i>	This study
Plasmids		
pRS-ARG4ΔSpeI	Containing <i>ARG4</i> marker, Amp ^r	[12]
pDDB57	Containing <i>URA3</i> marker, Amp ^r	[12]
pDDB78	Containing <i>HIS1</i> marker, Amp ^r	[12]
pDDB78- <i>CFL1</i>	Containing <i>HIS1</i> marker, Amp ^r , <i>CFL1</i>	This study
pCAT1-GFP	Containing <i>URA3</i> marker, Amp ^r	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
TRR1-5RT	TGGAGGATCTGAATTGATGG
TRR1-3RT	CACCAGTAGCAATGATAACG
SOD1-5RT	CGAATCCGCTCCAACCACAA
SOD1-3RT	CCTTTAGCAACACCATACCATT
GLR1-5RT	GGAGATTTCGATTGGGCTAA
GLR1-3RT	GACTTCAACTTCACCTTCAG
CAT1-5RT	TCCAGAACCATTGCCACTCA
CAT1-3RT	GGAACCTTTAGCGTGGACAAC

1.2 主要试剂和仪器

聚乙二醇 3350 (PEG3350)、醋酸锂(LiAc)和碘化丙啶(PI)等购自 Sigma 公司; M-MLV 反转录酶、Oligo-dT、RNA 酶抑制剂等购自 Promega 公司; SYBR Green qPCR SuperMix 购自 TransGen 公司。PCR 仪购自 Gene Company Limited 公司; 荧光显微镜购自 Olympus 公司。

1.3 培养基

白假丝酵母的培养使用 YPD 培养基和 SC 培养基, 使用前均需添加 0.1% 的无菌尿苷(浓度为 0.08 g/L, SC-Ura 无需添加)^[13]。大肠杆菌的培养使用 LB 培养基, 根据需要添加 0.1% 的氨苄青霉素(浓度为 25 mg/L)^[13]。巨噬细胞 RAW264.7 的培养

使用 RPMI-1640 培养基, 并加入 10% 胎牛血清(用前添加 0.1% 的 0.08 g/L 无菌尿苷)。

1.4 菌株的构建

通过 PCR 介导的同源重组法, 构建白假丝酵母的缺失株 *cfl1Δ/Δ*。将 *CFL1* 基因克隆至 pDDB78 质粒上, 并通过醋酸锂转化法将重组质粒转化 *cfl1Δ/Δ*, 构建回补菌株 *cfl1Δ/Δ+CFL1*^[12]。将 pCAT1-GFP 质粒转化 WT 与 *cfl1Δ/Δ*, 构建 WT-CAT1-GFP 和 *cfl1Δ/Δ-CAT1-GFP* 重组菌株。

1.5 生长能力的测定

将 WT、缺失株 *cfl1Δ/Δ* 和回补菌株 *cfl1Δ/Δ+CFL1* 的初始菌浓分别调整 OD₆₀₀ 为 0.1, 30 °C、180 r/min 振荡培养 4 h, 测定 OD₆₀₀。加入 5 mmol/L H₂O₂, 每隔 2 h 测定 OD₆₀₀, 记录菌株的生长情况。在研究羟基自由基清除剂二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)对缓解氧化压力的作用时, 向 H₂O₂ 处理的菌液中加入 75 mmol/L DMSO。

1.6 巨噬细胞损伤能力的测定

取 2 mL RAW264.7 巨噬细胞加入 6 孔细胞板, 培养至生长状况良好。收集对数生长期的 WT、缺失株 *cfl1Δ/Δ* 和回补菌株 *cfl1Δ/Δ+CFL1*, 调整浓度为 1×10⁶ cells/mL。将白假丝酵母加入细胞培养

板, 置于 37 °C 培养箱中共孵育 3 h, 向培养板中加入 200 μ L 浓度为 0.1 mg/mL 的 PI 染料。收集菌体与细胞混合物, 8 000 r/min 离心 2 min, PBS 洗涤 3 次, 显微镜观察, 计算巨噬细胞死亡率。

1.7 ROS 的测定

处理方法: 向对数生长初期的 WT、缺失株 *cf11* Δ/Δ 和回补菌 *cf11* Δ/Δ +*CFL1* 中分别加入 5 mmol/L H_2O_2 , 30 °C、180 r/min 振荡培养 2 h, 加入 75 mmol/L DMSO, 继续培养 2 h 后 8 000 r/min 离心 2 min。ROS 测定方法: 向菌液中加入 10 μ mol/L DCFH-DA 探针, 避光孵育 30 min, 加入适量 PBS 洗涤 2 次, 在激发波长 488 nm 和发射波长 520 nm 条件下测定荧光强度。

1.8 氧化压力应答基因表达的测定

将 WT、缺失株 *cf11* Δ/Δ 和回补菌株 *cf11* Δ/Δ +*CFL1* 培养至对数生长初期, 加入 5 mmol/L H_2O_2 , 振荡培养 2 h, 8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 使用 RNA 提取试剂盒提取胞内总 RNA^[13]。将 RNA 反转录为 cDNA, 通过 qRT-PCR 的方法检测胞内 *TRR1*、*SOD1*、*GLR1*、*CAT1* 等氧化压力应答(Oxidative stress response, OSR)基因的表达量。

1.9 CAT 活性的测定

向对数生长初期的 WT、缺失株 *cf11* Δ/Δ 和回补菌株 *cf11* Δ/Δ +*CFL1* 中加入 5 mmol/L H_2O_2 , 培养 2 h 后 8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 提取胞内总蛋白。采用过氧化氢酶检测试剂盒测定 CAT 活性^[14]。

2 结果与分析

2.1 *CFL1* 缺失对氧化压力敏感性的影响

在正常 YPD 培养条件下, *cf11* Δ/Δ 的生长与野生型和回补株 *cf11* Δ/Δ +*CFL1* 没有差异(数据未显示)。经过 5 mmol/L H_2O_2 处理(图 1), 8 h 后 *cf11* Δ/Δ 的生长明显弱于 WT 和 *cf11* Δ/Δ +*CFL1*, 21 h 后 *cf11* Δ/Δ 的生长迟缓现象并未缓解。这表明 *cf11* Δ/Δ 对氧化压力较为敏感, *CFL1* 基因的缺失导致生长迟缓。

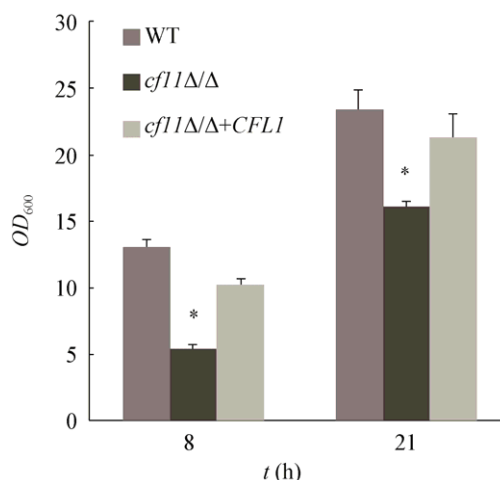


图 1 *CFL1* 缺失对氧化压力敏感性的影响

Figure 1 Effects of *CFL1* deletion on the sensitivity to oxidative stress of *C. albicans*

2.2 *CFL1* 缺失对巨噬细胞损伤能力的影响

巨噬细胞是生物体内重要的免疫细胞, 在清除入侵宿主的白假丝酵母时, 巨噬细胞会释放 ROS, 增强氧化压力, 因此可以使用巨噬细胞检测氧化压力应答水平。将巨噬细胞株 RAW264.7 与白假丝酵母进行共培养, 并对死亡的巨噬细胞进行 PI 染色, 结果表明: 野生型和回补菌均能杀死大量的巨噬细胞, 而 *cf11* Δ/Δ 对巨噬细胞的杀伤能力显著降低(图 2A)。进一步统计巨噬细胞的死亡率, 发现 WT 或回补菌株能导致 >90% 的巨噬细胞死亡, 而 *cf11* Δ/Δ 仅造成 11% 的巨噬细胞死亡。可见 *CFL1* 基因的缺失会造成白假丝酵母氧化压力应答耐受能力的显著降低。

2.3 羟基自由基清除剂对 *cf11* Δ/Δ 氧化压力敏感性的影响

CFL1 是高铁还原酶基因, 能够将胞外的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , *CFL1* 基因的缺失会造成胞内铁离子浓度的失衡。推测 *cf11* Δ/Δ 对氧化压力敏感的机理是胞内过量的 Fe^{2+} 与 H_2O_2 结合, 发生芬顿反应, 提高了羟自由基的含量, 导致胞内大量 ROS 的积累^[15]。为验证这一假设, 加入羟自由基清除剂 DMSO, 测定氧化压力条件下细胞生长情况。结果表明: DMSO 会促进 WT 野生型菌株和回补株的生

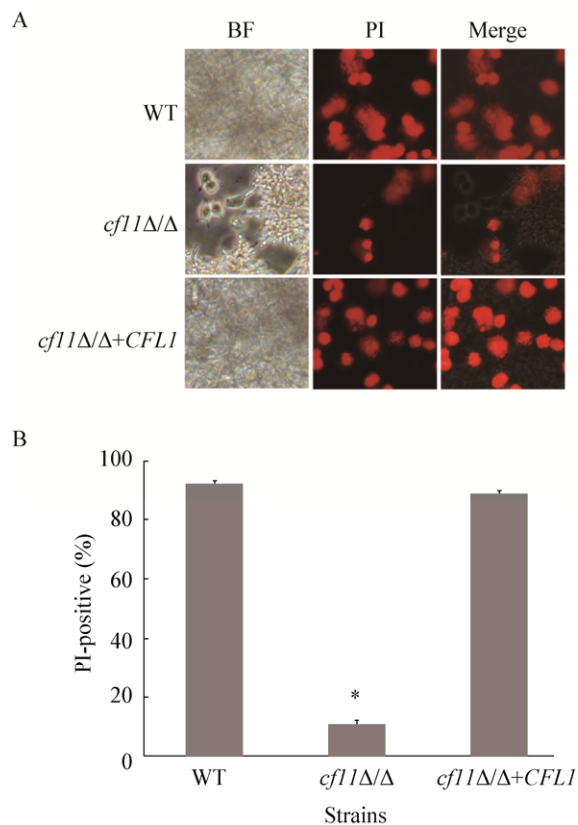
图2 *CFL1* 缺失对巨噬细胞损伤能力的影响

Figure 2 Effects of *CFL1* deletion on the ability to kill the macrophages of *C. albicans*

注: A: PI 染色分析; B: 巨噬细胞死亡率分析.

Note: A: PI dye; B: Death rate of macrophages.

长, 其 OD_{600} 分别增加了 0.16 和 0.07, 但是对 *cf11Δ/Δ* 并无促进作用, OD_{600} 仅增加 0.02 (图 3A)。这说明 DMSO 对 *cf11Δ/Δ* 的生长并无显著作用。

为验证 DMSO 清除羟自由基是否缓解氧化压力, 测定了氧化压力下 DMSO 处理后的 ROS 水平。结果显示: 在野生型 WT、缺失株 *cf11Δ/Δ* 和回补株中, DMSO 处理并未导致胞内 ROS 的含量显著下降(图 3B)。这表明 *cf11Δ/Δ* 对氧化压力的敏感性与羟自由基的增加无关。

2.4 *CFL1* 缺失对氧化压力应答基因表达的影响

由于羟自由基的增加并非 *cf11Δ/Δ* 对氧化压力敏感的原因, 因此继续在基因表达水平上探究 *cf11Δ/Δ* 对氧化压力敏感的机制。实时荧光定量 PCR 结果显示: 无氧化压力时, WT、*cf11Δ/Δ* 和回

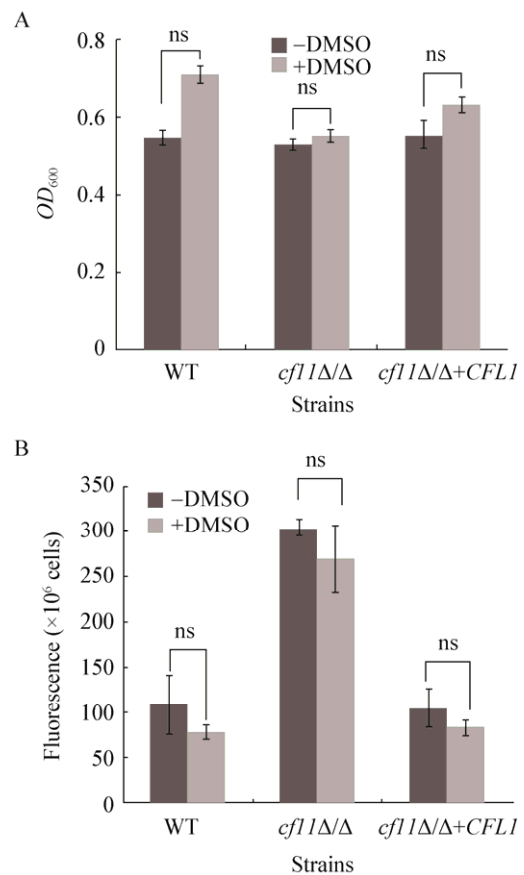
图3 羟自由基清除剂 DMSO 对 *cf11Δ/Δ* 氧化压力敏感性的影响

Figure 3 Effects of hydroxyl radical DMSO scavenging agent on the sensitivity of oxidative stress in *cf11Δ/Δ*

注: A: 加入 DMSO 后菌液的生长情况; B: 加入 DMSO 后胞内 ROS 水平.

Note: A: Growth after adding DMSO; B: ROS levels after adding DMSO.

补株中 OSR 基因的表达均处于较低水平(图 4A); 在 5 mmol/L H_2O_2 刺激 2 h 后, *cf11Δ/Δ* 中 OSR 基因 *TRR1*、*SOD1*、*GLR1* 和 *CAT1* 的表达均明显下降(图 4B)。说明 *CFL1* 基因对 OSR 基因的正常功能发挥着调控作用, *cf11Δ/Δ* 的缺失会显著降低 OSR 基因的应答水平。

2.5 *CFL1* 缺失对过氧化氢酶活性的影响

CAT1 基因编码过氧化氢酶(Catalase, CAT), 在受到氧化压力刺激时能够被大量表达, 从而分解过氧化氢, 清除胞内含量过高的 ROS。正常条件下, CAT 活性在 WT、*cf11Δ/Δ* 和回补株中都处于

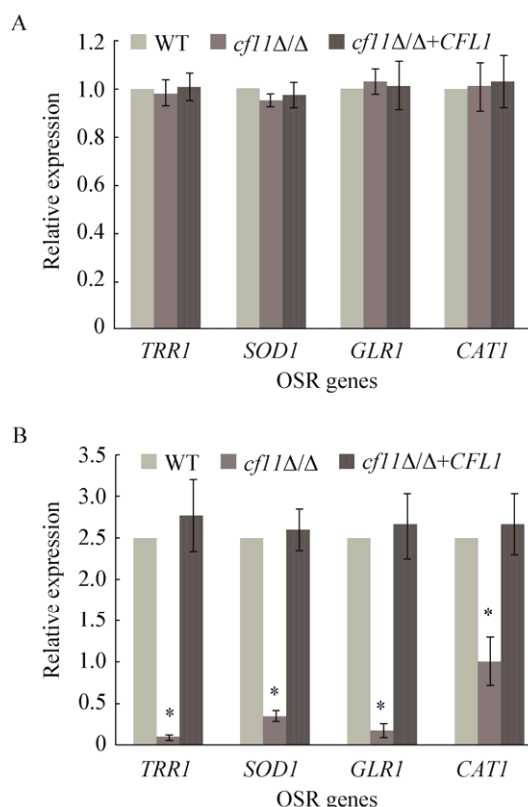
图4 *CFL1* 缺失对氧化压力应答基因表达的影响

Figure 4 Effects of *CFL1* deletion on OSR genes expression of *C. albicans* under the oxidative stress

注: A: 非氧化应激下 OSR 基因的表达; B: 氧化应激下 OSR 基因的表达。

Note: A: Expression of OSR genes under non-oxidative stress; B: Expression of OSR genes under oxidative stress.

较低的水平(图 5A)。为进一步验证 *CFL1* 的缺失对 *CAT1* 表达的影响,测定了氧化压力刺激下的 CAT 活性。结果显示: 5 mmol/L H_2O_2 处理 2 h 后, *cf11Δ/Δ* 中 CAT 活性显著偏低,只有 0.05 U/mg protein,而野生型与回补菌株的 CAT 活性可达到 1.53 U/mg protein 和 0.64 U/mg protein (图 5B)。可见, *CFL1* 的缺失导致 *CAT1* 基因表达下调,进而引起 CAT 活性显著下降。

2.6 过氧化氢酶过表达对 *cf11Δ/Δ* 氧化压力敏感性的影响

鉴于 CAT 在白假丝酵母耐受 H_2O_2 过程中的重要作用,推测 *cf11Δ/Δ* 氧化压力敏感性增强主要由于 *CAT1* 表达量的显著下降。为验证这一推测,

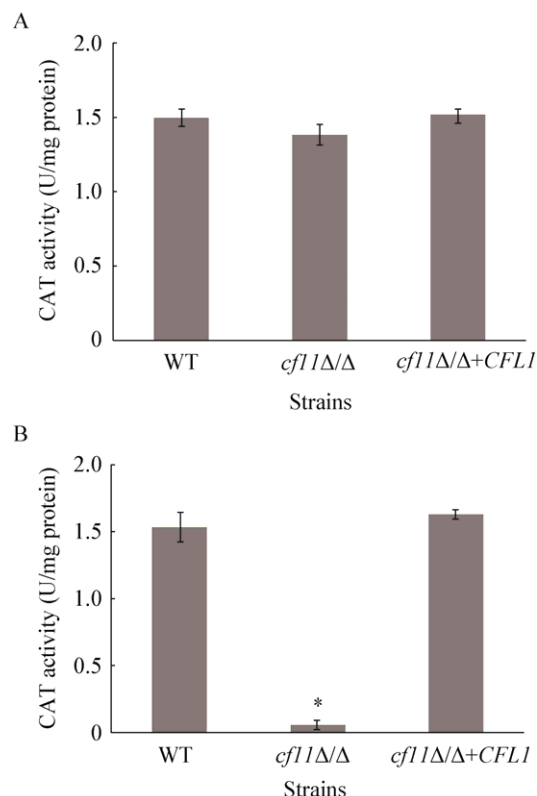
图5 *CFL1* 缺失对过氧化氢酶活性的影响

Figure 5 Effects of *CFL1* deletion on the activity of catalase

注: A: 非氧化应激下 CAT 的活性水平; B: 氧化应激下 CAT 的活性水平。

Note: A: Activity of catalase under non-oxidative stress; B: Activity of catalase under oxidative stress.

探究了 CAT 过表达对 *cf11Δ/Δ* 氧化压力敏感性的影响。将 pCAT1-GFP 过表达质粒分别转化白假丝酵母 WT 和缺失株 *cf11Δ/Δ*,使质粒中的强启动子 ACT1 起始 *CAT1* 的表达,并用 GFP 标记 *CAT1* 基因,分别测定 5 mmol/L H_2O_2 处理 2 h 后压力条件下各菌株的 CAT 活性和生长情况。结果表明: *CAT1* 的过表达导致缺失株中 CAT 活性明显增加,达到了 WT 中 CAT 活性的水平(图 6A)。生长能力测定进一步表明: H_2O_2 处理后, *cf11Δ/Δ*-CAT1-GFP 和 WT-CAT1-GFP 的生长量没有显著差异(图 6B)。上述结果进一步证明: *CFL1* 缺失引起的 *CAT1* 基因表达下降是缺失菌株氧化压力敏感性增强的关键原因。

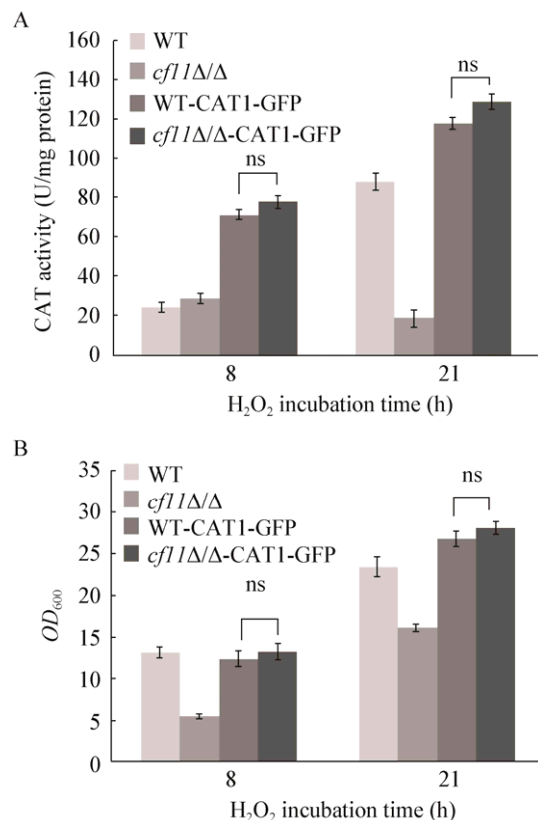


图 6 H_2O_2 处理下过氧化氢酶过表达对 *cf11Δ/Δ* 的 CAT 活性及氧化压力敏感性的影响

Figure 6 Effects of catalase over-expression on the CAT activity and the sensitivity to oxidative stress

注: A: 过氧化氢酶过表达对 *cf11Δ/Δ* 的 CAT 活性的影响; B: 过氧化氢酶过表达对 *cf11Δ/Δ* 氧化压力敏感性的影响。

Note: A: Effect catalase over-expression on the CAT activity; B: Effect catalase over-expression on the sensitivity to oxidative stress.

3 讨论与结论

本实验室前期研究表明, *CFL1* 基因在铁稳态维持、形态发生、细胞壁完整性等多方面发挥着重要作用。此外, *CFL1* 基因的缺失会导致细胞表现出对氧化压力的敏感性, 说明 *CFL1* 与氧化压力应答紧密相关, 但是其调控氧化压力应答的具体机制有待深入探讨^[12]。

本课题组前期研究结果发现, *CFL1* 基因在白假丝酵母中编码高铁还原酶, 其缺失导致胞内铁离子的大量聚集, 但该聚集与细胞表现出的氧化压力敏感性并不具有直接联系^[8]。本研究结果也证实,

cf11Δ/Δ 对氧化压力敏感性的增强与铁离子相关的芬顿反应(该反应可产生大量羟基自由基)无关。本研究发现, *CFL1* 缺失会导致细胞在氧化压力条件下 OSR 基因表达的下调, 说明该基因在激活 OSR 基因表达方面发挥正向调控作用。过氧化氢酶编码基因 *CAT1* 的过表达能够补救 *CFL1* 缺失造成的氧化压力敏感性, 该结果进一步说明, *CFL1* 基因通过未知机制参与维持 *CAT1* 等氧化压力应答相关基因在胞内稳定的表达水平, 进一步调控白假丝酵母胞内氧化压力应答过程。

白假丝酵母胞内铁稳态的维持受到严格的调控。其中转录调控的方式主要有同源 Aft-型转录因子调控系统和 Sef1-Sfu1-Hap43 转录调控通路^[14]。转录因子 Sef1 参与铁稳态维持, 对 *CFL1* 基因的表达起激活作用^[16]。Aft2 也是低铁应答调控因子, 作为转录激活因子, 能够激活 *CFL1* 基因的表达。白假丝酵母氧化压力应答调控是一个复杂的过程, Cap1 转录元件的入核和出核过程均需要多种蛋白的介导和参与, 如 Gpx3、Ybp1 和 Trx1 等^[17]。本研究通过对 *CFL1* 在氧化压力应答过程中作用机制的探索, 进一步发现 Cf11 对 Cap1 依赖性的 OSR 基因转录具有调控作用, 从而建立了 Aft2 调控的铁信号途径与 Cap1 介导的氧化压力应答途径的紧密联系。

因此, 本研究揭示了 *CFL1* 能够在转录水平上调控 OSR 基因的表达, 进而在氧化压力耐受过程中发挥重要作用。尽管如此, *CFL1* 上游铁转录元件与 OSR 转录调控元件之间的关系仍需进一步研究, *CFL1* 对 OSR 基因的具体调控机制也需要探讨。例如, *CFL1* 在转录水平发挥调节作用的具体过程、中间介导蛋白的类型和作用、下游调节元件的应答机制等, 都需要进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Tong YQ, Tang JG. *Candida albicans* infection and intestinal immunity[J]. Microbiological Research, 2017, 198: 27-35
- [2] Pan LN, Cao CJ, Wei YJ, et al. Phenotypic transitions and their regulatory mechanisms in the human fungal pathogen *Candida albicans*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38(9):

- 1049-1059 (in Chinese)
潘丽娜, 曹承俊, 魏羽佳, 等. 白念珠菌形态转换及其调控机制的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(9): 1049-1059
- [3] da Silva Dantas A, Day A, Ikeh M, et al. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*[J]. Biomolecules, 2015, 5(1): 142-165
- [4] Diezmann S. Oxidative stress response and adaptation to H₂O₂ in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*[J]. Fungal Biology Reviews, 2014, 28(4): 126-136
- [5] Wang Y, Cao YY, Jia XM, et al. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2006, 40(7): 1201-1209
- [6] Moye-Rowley WS. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2002, 4(1): 123-140
- [7] Peng J, Zhang YT, Chen J, et al. Structural function and potential clinical value of transferrin[J]. China Journal of Modern Medicine, 2017, 27(26): 56-60 (in Chinese)
彭健, 张耀婷, 陈杰, 等. 转铁蛋白的结构功能和潜在临床应用价值[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(26): 56-60
- [8] Qian KF, Dong YJ, Xu N, et al. Research advances of cellular iron transport and storage in *Candida albicans*[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1643-1648 (in Chinese)
钱柯帆, 董义杰, 徐宁, 等. 白念珠菌胞内铁离子存储转运系统的研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1643-1648
- [9] Yamada-Okabe T, Shimmi O, Doi R, et al. Isolation of the mRNA-capping enzyme and ferric-reductase-related genes from *Candida albicans*[J]. Microbiology, 1996, 142(9): 2515-2523
- [10] Hammacott JE, Williams PH, Cashmore AM. *Candida albicans* *CFL1* encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant[J]. Microbiology, 2000, 146(4): 869-876
- [11] Georgatsou E, Alexandraki D. Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes[J]. Yeast, 1999, 15(7): 573-584
- [12] Qian KF. Functional study of ferric reductase gene *CFL1* in *Candida albicans*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Nankai University, 2014 (in Chinese)
钱柯帆. 白念珠菌高铁还原酶 *CFL1* 基因功能研究[D]. 天津: 南开大学硕士学位论文, 2014
- [13] Yu QL. Role of the calcium homeostasis system in morphogenesis and stress response in *Candida albicans*[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Nankai University, 2013 (in Chinese)
喻其林. 钙稳态系统在白念珠菌形态发生及压力应答中的功能研究[D]. 天津: 南开大学博士学位论文, 2013
- [14] Xu N, Cheng XX, Yu QL, et al. Research advances of iron homeostasis regulatory networks in *Candida albicans*[J]. Microbiology China, 2012, 39(3): 386-393 (in Chinese)
徐宁, 程欣欣, 喻其林, 等. 白念珠菌铁稳态调控网络研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 386-393
- [15] He J, Yang XF, Men B, et al. Interfacial mechanisms of heterogeneous Fenton reactions catalyzed by iron-based materials: A review[J]. Journal of Environmental Sciences, 2016, 39: 97-109
- [16] Chen CB, Pande K, French SD, et al. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 10(2): 118-135
- [17] Kos I, Patterson MJ, Znaidi S, et al. Mechanisms underlying the delayed activation of the Cap1 transcription factor in *Candida albicans* following combinatorial oxidative and cationic stress important for phagocytic potency[J]. mBio, 2016, 7(2): e00331-16