



表达 GFP/mCherry 白色念珠菌的构建及其在与巨噬细胞互作中的应用

胡绍华[#], 葛佳琪[#], 韩琦^{*}

北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488

胡绍华, 葛佳琪, 韩琦. 表达 GFP/mCherry 白色念珠菌的构建及其在与巨噬细胞互作中的应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4208-4217.

HU Shaohua, GE Jiaqi, HAN Qi. A *Candida albicans* strain expressing GFP/mCherry: construction and application in the research on macrophage-*C. albicans* interaction[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4208-4217.

摘要: 白色念珠菌(*Candida albicans*)被巨噬细胞吞噬的效率与被吞噬后的形态观察是研究白色念珠菌与巨噬细胞互作的重要内容。【目的】以野生型菌株 SC5314 为母本, 构建能够表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)/mCherry 的白色念珠菌, 应用于巨噬细胞与白色念珠菌互作的研究。【方法】通过生长与形态观察、细胞活性检测及小鼠系统性感染模型确定荧光蛋白的表达对菌株生长、形态与毒力的影响; 在共培养条件下, 通过流式细胞术及荧光显微镜检测巨噬细胞的吞噬率及白色念珠菌的形态变化。【结果】构建的菌株在表型上与野生型菌株一致, 并可用于在共培养下测定巨噬细胞吞噬率的流式细胞术以及观察白色念珠菌的形态变化。【结论】表达荧光蛋白的菌株为研究巨噬细胞与白色念珠菌的互作提供了新方法。

关键词: 白色念珠菌; 巨噬细胞; 绿色荧光蛋白; mCherry; 流式细胞术

资助项目: 国家自然科学基金(32100157)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100157).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: hanqi807@163.com

Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-05-16; Published online: 2023-05-22

A *Candida albicans* strain expressing GFP/mCherry: construction and application in the research on macrophage- *C. albicans* interaction

HU Shaohua[#], GE Jiaqi[#], HAN Qi^{*}

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: The phagocytosis rate of macrophages and the morphological changes of *Candida albicans* are the key points in the research on the host-pathogen interaction. **[Objective]** To construct *C. albicans* strains expressing the green fluorescent protein (GFP) or mCherry from the wild type SC5314, and use them to study the interaction between macrophages and *C. albicans*. **[Methods]** The effects of fluorescent protein expression on the growth, morphology, and virulence of the strains in mice were determined. Under the co-culture condition, flow cytometry and fluorescence microscopy were employed to determine the phagocytosis rate of macrophages and the morphological changes of *C. albicans*, respectively. **[Results]** We constructed *C. albicans* strains expressing GFP or mCherry. These engineered strains had consistent phenotype with the wild type and could be used for flow cytometry to determine the phagocytosis rate of macrophages and the morphological changes of *C. albicans* in co-culture. **[Conclusion]** The constructed strains expressing fluorescent proteins provided a new method for studying the interaction between macrophages and *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*; macrophages; green fluorescent protein (GFP); mCherry; flow cytometry

白色念珠菌(*Candida albicans*)是一种临床上常见的条件致病真菌,可定殖于人体的皮肤、黏膜以及消化道等处^[1]。当人体免疫力低下时,白色念珠菌可引起持续的浅表感染或危及生命的深部感染^[2]。近年来,对唑类或棘白菌素类药物耐药菌株的出现和传播进一步增加了治疗的难度^[3]。宿主抵抗白色念珠菌感染的主要机制是由感染部位的巨噬细胞识别、吞噬和杀伤,并通过分泌产生细胞因子或趋化因子募集多种免疫细胞,如中性粒细胞,发挥免疫防御作用,而白色念珠菌可通过细胞壁变化、菌丝生长等发

生免疫逃逸^[4-5]。因此,通过研究白色念珠菌与巨噬细胞的互动可为研究抗真菌感染提供新的思路。

一方面,巨噬细胞吞噬白色念珠菌是发挥抗菌作用的基础,另一方面,白色念珠菌的菌丝生长与其致病性密切相关,因此巨噬细胞吞噬率检测与白色念珠菌被吞噬后的形态观察是研究白色念珠菌与巨噬细胞互动的重要内容^[6-7]。以往的研究大多都利用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记白色念珠菌,通过荧光显微镜观察检测巨噬细胞吞噬率。尽管该方法操

作简便,但无法排除 FITC 对白色念珠菌细胞壁结构以及巨噬细胞识别与吞噬能力的影响,此外, FITC 染色法也无法实时观察白色念珠菌被吞噬后的形态变化^[8-10]。据此,本研究以野生型菌株 SC5314 为母本,构建了能够表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)或红色荧光蛋白 mCherry 的菌株,检测了新构建的菌株与野生型菌株在生长、形态及毒力中的差异,建立了巨噬细胞吞噬白色念珠菌的流式细胞术以及在共培养条件下白色念珠菌形态观察的方法,为深入研究白色念珠菌与巨噬细胞互作提供了技术手段。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试 验 材 料

白色念珠菌 SC5314 与质粒 pAG6 由北京师范大学桑建利教授惠赠;小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系 RAW264.7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;小鼠品系为 BALB/c,购自北京博盛锐达生物科技有限公司。

1.1.2 培 养 基

YPD 液体培养基:1%酵母提取物、2%蛋白胨、2% D-葡萄糖;配制 YPD 固体平板时,另外

加入 2%琼脂;配制含有诺尔丝菌素的 YPD 固体平板时,另外加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诺尔丝菌素。

1.1.3 主要仪器设备及试剂

酵母提取物、蛋白胨、D-葡萄糖和琼脂购自北京兰博利德商贸有限公司;诺尔丝菌素、RPMI 1640 培养基,购自北京索莱宝科技有限公司;LDH 细胞毒性检测试剂盒、酵母全基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京科顺创新科贸有限责任公司;CD11b-PE,购自上海优宁维生物科技股份有限公司。超净工作台,购自苏州苏信环境科技有限公司;恒温摇床、恒温培养箱,购自北京医疗设备二厂;台式离心机,购自南京伊若达仪器设备有限公司;荧光显微镜,购自门季(上海)生物科技有限公司;流式细胞仪,购自 FACSVANTAGE SE。

1.2 菌 株 及 细 胞 培 养

白色念珠菌培养在 YPD 液体培养基,置于 30 °C、200 r/min 振荡培养 10 h,获得对数期细胞。在菌丝诱导实验中,将对数期的白色念珠菌转接至 RPMI 1640 培养液,置于 37 °C 振荡培养。RAW264.7 细胞系培养在含 10%灭活胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中,并置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。

1.3 质 粒 和 菌 株 构 建

本研究所用白色念珠菌菌株见表 1。

表 1 本研究所用的白色念珠菌菌株和质粒

Table 1 *Candida albicans* strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype	Source
SC5314	Wild type	[11]
<i>P_{ACT1}-GFP</i>	<i>RPS10/rps10::pACT1-GFP</i>	This study
<i>P_{ACT1}-mCherry</i>	<i>RPS10/rps10::pACT1-mCherry</i>	This study
pAG6	<i>SAT1</i> -marked version of <i>Cip10</i>	[12]
pACT1-GFP	<i>SAT1</i> -marked version of <i>Cip10</i> expressing GFP under <i>ACT1</i> promoter and <i>URA3</i> terminator	This study
pACT1-mCherry	<i>SAT1</i> -marked version of <i>Cip10</i> expressing mCherry under <i>ACT1</i> promoter and <i>URA3</i> terminator	This study

质粒 pAG6 作为原始质粒^[12], 将白色念珠菌 *ACT1* 启动子(起始密码子 ATG 上游 1 kb, 含 ATG) 克隆到质粒 pAG6 的 *Kpn* I 与 *Xho* I 酶切位点之间, 将 *URA3* 3'UTR (终止密码子 UAA 下游 137 bp, 含 UAA) 克隆在质粒的 *Hind* III 与 *Mlu* I 酶切位点之间, 将密码子优化后的荧光蛋白基因 *GFP*、*mCherry* 分别克隆在质粒的 *Xho* I 与 *Hind* III 酶切位点之间, 获得质粒 pACT1-GFP 与 pACT1-mCherry。经 *Stu* I 酶切后, 通过醋酸锂转化法转化 SC5314 菌株, 在 YPD+200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诺尔丝菌素平板上筛选阳性克隆。通过基因组 PCR 与 Western blotting 对菌株进行鉴定, 获得 *P_{ACT1}-GFP* 菌株(*RPS10/rps10::pACT1-GFP*)与 *P_{ACT1}-mCherry* 菌株(*RPS10/rps10::pACT1-mCherry*)。

1.4 生长曲线测定

将处于对数生长期的酵母态白色念珠菌按照 1:100 的比例接种至新鲜的 YPD 液体培养基中, 并置于 30 °C、200 r/min 温控摇床中培养。每隔 2 h 通过酶标仪测定 OD_{600} , 设置 3 组平行。

1.5 平板克隆生长实验

收集处于对数生长期的酵母态白色念珠菌, 用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗并将细胞浓度调整为 10^6 个/mL。按照 10 倍梯度依次稀释为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 个/mL。各取 5 μL 顺序滴在待测的平板上, 并于 30 °C 静置培养 48 h, 观察并拍照。

1.6 细胞毒性检测

细胞毒性检测依据 LDH 细胞毒性检测试剂盒(Dojindo)说明书进行操作。将白色念珠菌与小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 按照 3:1 的比例共培养在 96 孔板中, 仅有细胞的对照孔中加入 Lysis Buffer, 每孔平行重复 3 次, 置于 37 °C、5% CO_2 的细胞培养箱中共培养 4 h。将共培养物上清液移至新的 96 孔板中, 在每孔中加入 Working Solution, 避光室温放置 2 h, 立即用酶

标仪测定 OD_{490} 。细胞毒性(%)=(共培养物上清液 OD_{490} /对照孔 OD_{490}) $\times 100$ 。

1.7 小鼠系统性念珠菌感染模型

选用小鼠品系为 BALB/c, 雌性, 8 周, 体重 25 g。向小鼠尾静脉注射 200 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的白色念珠菌细胞。每种菌注射 12 只小鼠, 其中 10 只小鼠用于统计生存率, 其余小鼠在注射 36 h 时用于制备肾脏组织切片。经含 10% 甲醛的 PBS 固定后, 通过过碘酸雪夫(PAS)染色, 苏木精-伊红(Hematoxylin-eddyr, HE)复染, 进行观察。

1.8 流式细胞检测

将处于对数生长期的酵母态白色念珠菌与小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 按照 1:10 的比例共培养于 RPMI 1640 完全培养液, 于 37 °C、5% CO_2 培养至指定时间, 胰酶消化并收集细胞, 经 CD11b-PE 染色, 通过流式细胞仪检测巨噬细胞的吞噬率。巨噬细胞的吞噬率=吞噬白色念珠菌的巨噬细胞数目/巨噬细胞总数 $\times 100$ 。

1.9 数据差异显著性分析

每个实验数据至少进行 3 次独立重复。通过 Student's *t* test 分析, 确定与野生型组间的差异。以 $P<0.05$ 作为数据差异显著性分析的依据。

2 结果与分析

2.1 表达 GFP/mCherry 的白色念珠菌 (*P_{ACT1}-GFP*、*P_{ACT1}-mCherry*)的构建及鉴定

质粒 pAG6 以诺尔丝菌素抗性基因 *CaSAT1* 为筛选标记替换了质粒 CIp10 中 *URA3*, 经 *Stu* I 酶切后可通过同源重组整合到白色念珠菌 *RPS10* 基因座位上^[12-13]。为了避免营养缺陷型菌株与营养筛选标记对白色念珠菌致病性的影响, 以质粒 pAG6 为原始质粒, 构建了质粒 pACT1-GFP 与 pACT1-mCherry (图 1A), 并以白色念珠菌 SC5314 为母本菌株, 通过醋酸锂转化法转入 *Stu* I 酶切后的质粒, 筛选得到具有诺尔

丝菌素抗性的克隆，并通过基因组 PCR 与 Western blotting 对菌株进行鉴定(图 1B、1C)。该结果表明以白色念珠菌 SC5314 为母本，成功构建了表达 GFP 或 mCherry 的菌株： P_{ACT1} -GFP 菌株($RPS10/rps10::pACT1$ -GFP)与 P_{ACT1} -mCherry 菌株($RPS10/rps10::pACT1$ -mCherry)。通过荧光显微镜 GFP 通道与红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)通道可观察到 P_{ACT1} -GFP 菌株与 P_{ACT1} -mCherry 细胞中的荧光蛋白表达(图 1D)。

2.2 荧光蛋白 GFP/mCherry 的表达对白色念珠菌生长与形态的影响

生长曲线(图 2A)及 YPD 平板克隆生长实验(图 2B)的结果显示， P_{ACT1} -GFP、 P_{ACT1} -mCherry

菌株的生长快慢与野生型菌株一致。在菌丝诱导 0、1、4 h, P_{ACT1} -GFP、 P_{ACT1} -mCherry 菌株具有与野生型菌株一致的菌丝生长能力(图 2C)。上述结果表明荧光蛋白 GFP/mCherry 的表达不影响白色念珠菌细胞生长的快慢与形态发生。

2.3 荧光蛋白 GFP/mCherry 的表达对白色念珠菌毒力的影响

将白色念珠菌与小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 以 3:1 的比例共培养 4 h, 通过检测共培养物上清液中的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)活性^[12], 确定白色念珠菌对巨噬细胞毒力的影响(图 3A), 检测结果显示, 野生型、 P_{ACT1} -GFP、 P_{ACT1} -mCherry 菌株之间无显著性差异。

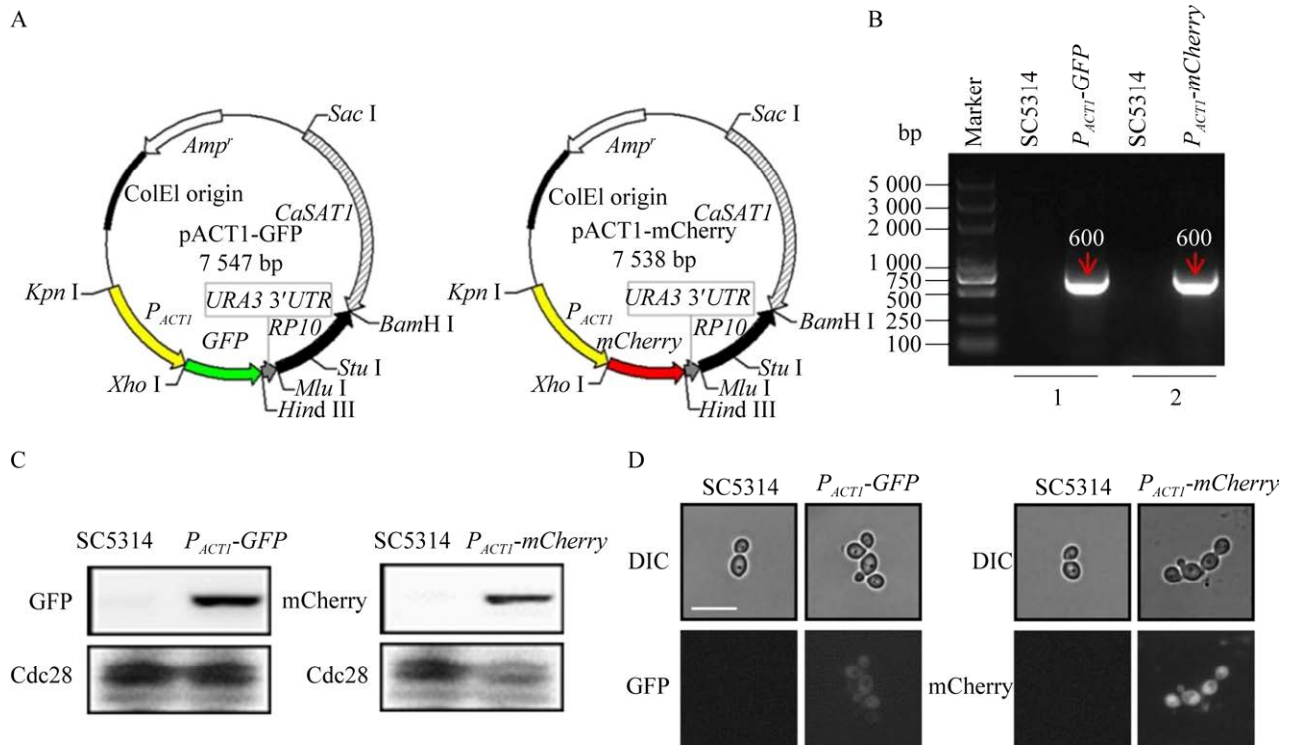


图 1 表达荧光蛋白 GFP/mCherry 的菌株构建与鉴定

Figure 1 Construction and identification of the strains expressing fluorescent proteins GFP/mCherry. A: Schematic diagram of plasmids pACT1-GFP and pACT1-mCherry. B: PCR identification of the strain genome. Primer pair 1 is primer 1 (located in the *ACT1* promoter) and primer 2 (located in the *GFP* ORF), primer pair 2 is primer 1 and primer 3 (located at *mCherry* ORF). C: Western blotting assay of the indicated strains. The protein content of Cdc28 serves as the loading control. D: Fluorescence observation of P_{ACT1} -GFP and P_{ACT1} -mCherry cells. Scale bar=12 μm.

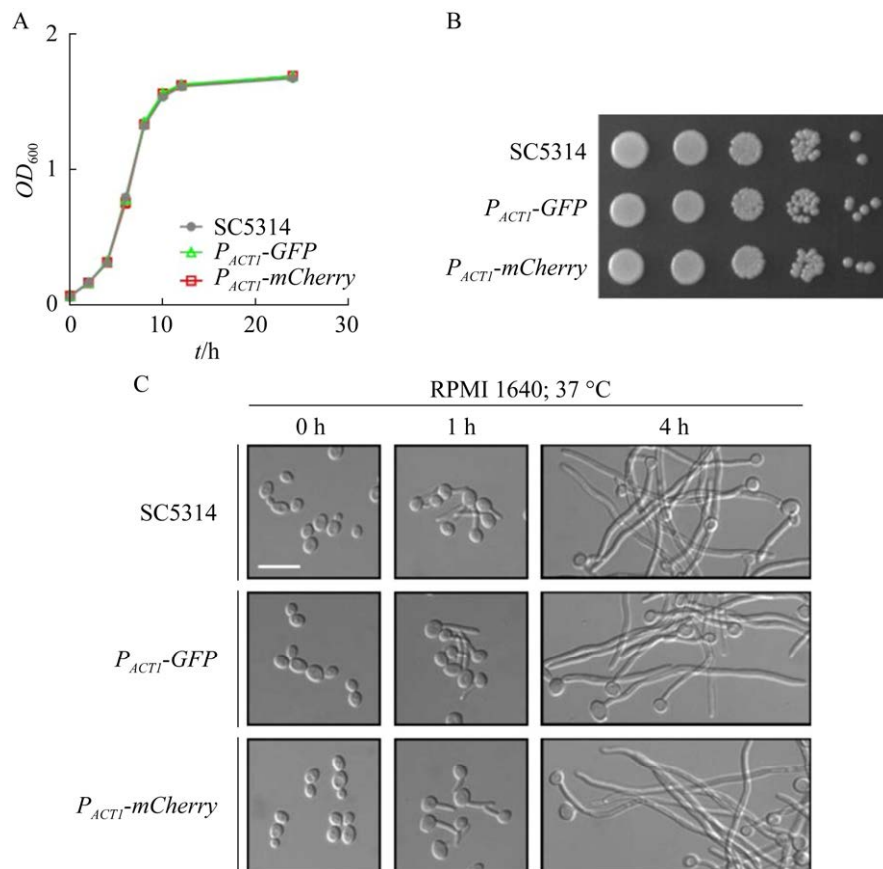


图 2 荧光蛋白 GFP/mCherry 的表达对白色念珠菌生长与形态的影响

Figure 2 Effect of expression of fluorescent protein GFP/mCherry on the growth and morphology of *Candida albicans*. A: Growth curve. B: Growth assay in YPD plate. C: Observation of hyphal growth. Scale bar=12 μm.

通过小鼠系统性念珠菌感染模型的结果显示,尾静脉注射野生型、*P_{ACT1}-GFP*、*P_{ACT1}-GFP* 菌株的小鼠在 8 d 内全部死亡,且各组小鼠生存率之间无明显差异(图 3B)。尾静脉注射后 36 h 的小鼠肾脏组织切片染色结果显示,各组小鼠肾脏组织损伤部位均可见大量的菌丝态白色念珠菌细胞,并且可观察到的菌丝长度无明显差异(图 3C)。以上结果表明,表达荧光蛋白 GFP/mCherry 不影响白色念珠菌的毒力。

2.4 巨噬细胞吞噬白色念珠菌的流式细胞术

由于小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 高表达 CD11b 受体,因此 CD11b-PE 可用于标记巨噬细胞^[14]。将白色念珠菌与小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 以 1:10 的比例共培养;A 为野生型菌

株与 RAW264.7 细胞共培养 0 h,未用 CD11b-PE 标记;B 为野生型菌株与 RAW264.7 细胞共培养 0 h,用 CD11b-PE 标记;C 为 *P_{ACT1}-GFP* 菌株与 RAW264.7 细胞共培养 0 h,未用 CD11b-PE 标记;D、E 分别为 *P_{ACT1}-GFP* 菌株与 RAW264.7 细胞共培养 0.5、1 h,用 CD11b-PE 标记;流式细胞术检测结果显示(图 4),在共培养 0.5、1 h 时,巨噬细胞的吞噬率(%)=吞噬白色念珠菌的巨噬细胞数目(图 4D、4E 双阳)/巨噬细胞总数(图 4D、4E 双阳+CD11b 单阳)×100%,分别为 5.6%、7.7%;通过计算 1-未吞噬的白色念珠菌细胞数目(图 4D、4E GFP 单阳)/白色念珠菌细胞总数(图 4C GFP 单阳)×100%,可测定吞噬白色念珠菌的比例分别为 73.0%、77.5%。该结果表明,

新构建的表达荧光蛋白的菌株可用于流式细胞术检测巨噬细胞的吞噬率与白色念珠菌的吞噬情况。

2.5 共培养条件下白色念珠菌的形态观察

将 $P_{ACT1-GFP}$ 、 $P_{ACT1-mCherry}$ 菌株与小鼠单

核巨噬细胞系 RAW264.7 以 1:1:2 的比例共培养 1 h 和 2 h, 通过荧光显微镜, 可清晰地观察到白色念珠菌被吞噬后的菌丝生长(图 5)。该结果表明, 新构建的表达荧光蛋白的菌株可用于观察与巨噬细胞互动时的菌丝生长状态。

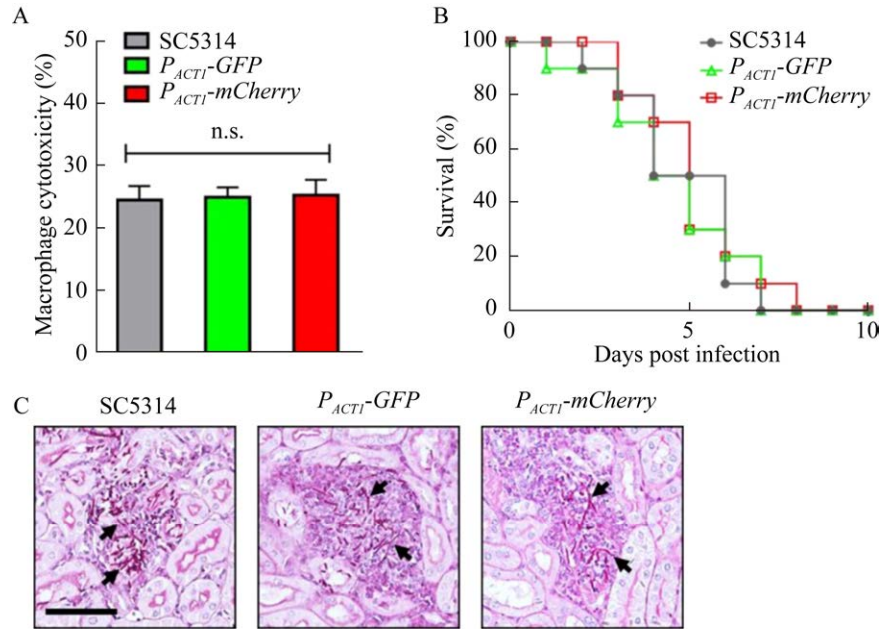


图 3 荧光蛋白 GFP/mCherry 的表达对白色念珠菌毒力的影响

Figure 3 The effects of expression of fluorescent protein GFP/mCherry on the virulence of *Candida albicans*. A: Detection of the killing rate of *C. albicans* against mouse monocyte RAW264.7 macrophage. n.s. represents no statistical difference. B: Survival rate of mice in a mouse model of systemic infection. C: PAS-HE staining of renal tissue sections. The black arrow indicates *C. albicans* cells; Scale bar=60 μ m.

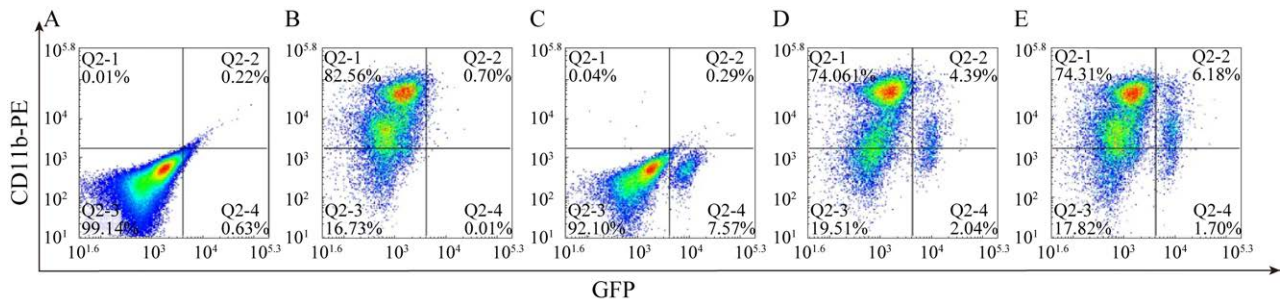


图 4 巨噬细胞吞噬白色念珠菌的流式细胞术

Figure 4 Flow cytometry for phagocytosis of *Candida albicans* by macrophages. A: Wild type cells co-cultured with RAW264.7 cells for 0 h without CD11b-PE labeling. B: Wild type cells co-cultured with RAW264.7 cells for 0 h and labeled with CD11b-PE. C: $P_{ACT1-GFP}$ cells co-cultured with RAW264.7 cells for 0 h without CD11b-PE labeling. $P_{ACT1-GFP}$ cells co-cultured with RAW264.7 cells for 1 h (D) and 2 h (E), labeled with CD11b-PE.

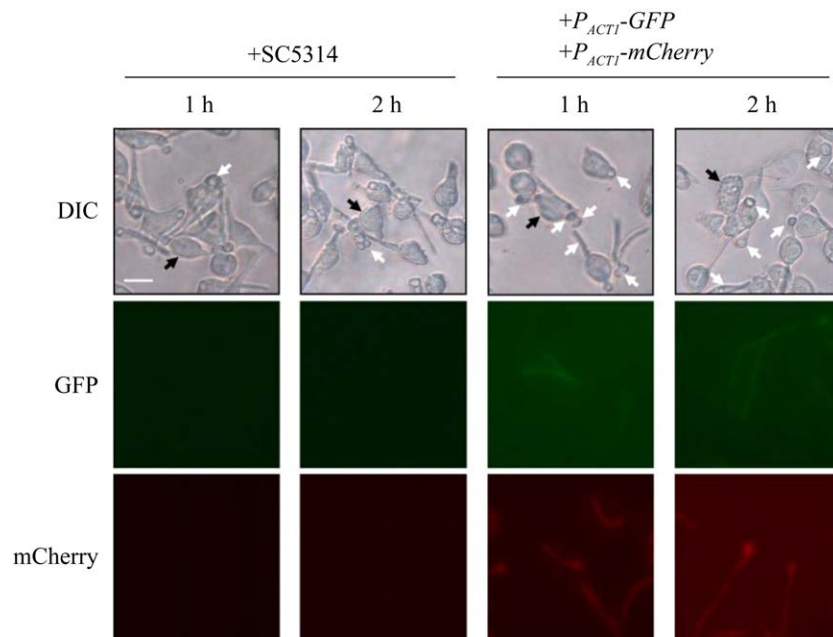


图5 表达荧光蛋白 GFP/mCherry 的菌株与巨噬细胞共培养下的形态观察

Figure 5 Morphological observation of a strain expressing fluorescent protein GFP/mCherry in co-culture with macrophages. *Candida albicans* SC5314 or P_{ACT1} -GFP and P_{ACT1} -mCherry strains were co-cultured with RAW264.7 cells for 1 h and 2 h, and observed under a fluorescence microscope. The white arrow indicates *C. albicans* cells, the black arrow indicates macrophages; Scale bar=12 μ m.

3 讨论与结论

对白色念珠菌进行遗传改造的方法目前主要以营养缺陷型菌株为母本, 如 CAI4 ($ura3^-$)、RM1000 ($ura3^-$, $his1^-$)、BWP17 ($ura3^-$, $his1^-$, $arg4^-$), 利用相应的营养标记筛选转化株^[15-19]。然而, 营养缺陷型菌株与营养标记存在以下问题: (1) 营养标记 *URA3* 的拷贝数目、在染色体的基因座位均可影响白色念珠菌菌丝发生、黏附能力以及毒力^[20-21]; (2) 在构建这些营养缺陷型菌株的过程中破坏了 *IRO1*, 而 *IRO1* 与铁离子的摄取与毒力相关^[22-23]。因此, 本研究采用诺尔丝菌素抗性为标记, 筛选并获得了具有野生型菌株 SC5314 遗传背景且能够表达绿色荧光蛋白 GFP 或红色荧光蛋白 mCherry 的菌株。此外, 构建的质粒 pACT1-GFP 与 pACT1-mCherry 也可

用于转化临床上分离出的白色念珠菌。

固有免疫是机体抵御病原体入侵的第一道防线, 巨噬细胞在宿主抵抗白色念珠菌的感染中具有重要作用。感染部位的巨噬细胞通过吞噬白色念珠菌, 启动自身的杀菌机制, 同时也激活了细胞因子或趋化因子的合成和分泌, 发挥免疫防御^[24]。白色念珠菌也可通过抵抗巨噬细胞的吞噬作用, 发挥免疫逃逸, 如通过菌丝生长机械刺破巨噬细胞、通过转录重编程适应吞噬小体微环境、诱导巨噬细胞非裂解性外排等^[25-27]。因此建立巨噬细胞吞噬白色念珠菌的检测方法以及共培养条件下白色念珠菌形态、定位观察的方法, 对于研究白色念珠菌与巨噬细胞相互作用具有重要实用价值。

新构建的能够表达 GFP/mCherry 的菌株在生长、形态与毒力等表型上均与野生型菌株一

致。选用表达 GFP 的菌株, 通过流式细胞术检测发现在共培养 0.5、1 h 时, 巨噬细胞的吞噬率为 5.6%、7.7%。由于一个巨噬细胞可吞噬超过一个白色念珠菌细胞, 因此通过计算 1-未吞噬的白色念珠菌细胞数目/白色念珠菌细胞总数, 可测定吞噬白色念珠菌的比例分别为 73.0%、77.5%。此外, 新构建的表达荧光蛋白的菌株也可用于观察与巨噬细胞互动时的菌丝生长状态, 并且也有可能用于检测白色念珠菌在动物体内的定殖及与宿主细胞的相互作用等。综上所述, 本研究通过构建能够表达荧光蛋白的菌株, 建立了基于流式细胞术的巨噬细胞吞噬白色念珠菌检测方法以及在共培养条件下白色念珠菌形态实时观察的方法, 为研究白色念珠菌与巨噬细胞互动以及为筛选能够影响互作的药物提供了新手段。

参考文献

- [1] SEEBACHER C. *Candida* in dermatology[J]. *Mycoses*, 1999, 42(suppl 1): 63-67.
- [2] SINGH DK, TÓTH R, GÁCSEK A. Mechanisms of pathogenic *Candida* species to evade the host complement attack[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 94.
- [3] PRISTOV KE, GHANNOUM MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, 25(7): 792-798.
- [4] NEWMAN SL, HOLLY A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(11): 6813-6822.
- [5] van der GRAAF CAA, NETEA MG, VERSCHUEREN I, van der MEER JWM, KULLBERG BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(11): 7458-7464.
- [6] TANSO S, ABE S, TANSO T, YAMAGUCHI H. Effective inhibition of *Candida albicans* growth by the combination of murine peritoneal neutrophils and activated macrophages[J]. *Microbiology and Immunology*, 1999, 43(3): 235-240.
- [7] BLASI E, PITZURRA L, PULITI M, LANFRANCONE L, BISTONI F. Early differential molecular response of a macrophage cell line to yeast and hyphal forms of *Candida albicans*[J]. *Infection and Immunity*, 1992, 60(3): 832-837.
- [8] KLIPPEL N, BILITEWSKI U. Phagocytosis assay based on living *Candida albicans* for the detection of effects of chemicals on macrophage function[J]. *Analytical Letters*, 2007, 40(7): 1400-1411.
- [9] BIE XX, ZHANG SG, LUO X, QI RQ. *Candida albicans* cell wall mannoprotein synergizes with lipopolysaccharide to affect RAW264.7 proliferation, phagocytosis and apoptosis[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 131: 98-105.
- [10] DIEZ-OREJAS R, CASARRUBIOS L, FEITO MJ, ROJO JM, VALLET-REGÍ M, ARCOS D, PORTOLÉS MT. Effects of mesoporous SiO₂-CaO nanospheres on the murine peritoneal macrophages/*Candida albicans* interface[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94: 107457.
- [11] FONZI WA, IRWIN MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*[J]. *Genetics*, 1993, 134(3): 717-728.
- [12] VYLKOVA S, LORENZ MC. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(3): e1003995.
- [13] MURAD AMA, LEE PR, BROADBENT ID, BARELLE CJ, BROWN AJP. CIP10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*[J]. *Yeast*, 2000, 16(4): 325-327.
- [14] KIM DB, PARK MC, PARK BK, KWON SH, CHOI JH, KIM HJ, CHOI SY, PARK JS, LEE YH, KWON HJ. Differential expression of cell surface markers in response to 2,4-dinitrofluorobenzene in RAW 264.7 and primary immune cells[J]. *BMB Reports*, 2012, 45(9): 538-543.
- [15] CIUDAD T, HICKMAN M, BELLIDO A, BERMAN J, LARRIBA G. Phenotypic consequences of a spontaneous loss of heterozygosity in a common laboratory strain of *Candida albicans*[J]. *Genetics*, 2016, 203(3): 1161-1176.
- [16] ARBOUR M, EPP E, HOGUES H, SELLAM A, LACROIX C, RAUCEO J, MITCHELL A, WHITEWAY M, NANTEL A. Widespread occurrence

- of chromosomal aneuploidy following the routine production of *Candida albicans* mutants[J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(7): 1070-1077.
- [17] GABRIEL I, KUR K, LAFORCE-NESBITT SS, PULICKAL AS, BLISS JM, MILEWSKI S. Phenotypic consequences of *LYS4* gene disruption in *Candida albicans*[J]. Yeast, 2014, 31(8): 299-308.
- [18] DENNISON PMJ, RAMSDALE M, MANSON CL, BROWN AJP. Gene disruption in *Candida albicans* using a synthetic, codon-optimised Cre-loxP system[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(9): 737-748.
- [19] HU KD, LI WJ, GAO JX, LIU QZ, WANG HT, WANG Y, SANG JL. Role of Ppt1 in multiple stress responses in *Candida albicans*[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(31): 4060-4068.
- [20] CHENG SJ, NGUYEN MH, ZHANG ZD, JIA HY, HANDFIELD M, CLANCY CJ. Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(10): 6101-6103.
- [21] BRAND A, MACCALLUM DM, BROWN AJP, GOW NAR, ODDS FC. Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus[J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3(4): 900-909.
- [22] GARCÍA MG, O'CONNOR JE, GARCÍA LL, MARTÍNEZ SI, HERRERO E, del CASTILLO AGUDO L. Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to *URA3*, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae aft1* mutation[J]. Yeast (Chichester, England), 2001, 18(4): 301-311.
- [23] CHIBANA H, UNO J, CHO T, MIKAMI Y. Mutation in *IRO1* tightly linked with *URA3* gene reduces virulence of *Candida albicans*[J]. Microbiology and Immunology, 2005, 49(10): 937-939.
- [24] DA SILVA DANTAS A, LEE KK, RAZIUNAITE I, SCHAEFER K, WAGENER J, YADAV B, GOW NA. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 34: 111-118.
- [25] DANHOF HA, LORENZ MC. The *Candida albicans* *ATO* gene family promotes neutralization of the macrophage phagolysosome[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(11): 4416-4426.
- [26] CABEZÓN V, VIALÁS V, GIL-BONA A, REALES-CALDERÓN JA, MARTÍNEZ-GOMARIZ M, GUTIÉRREZ-BLÁZQUEZ D, MONTEOLIVA L, MOLERO G, RAMSDALE M, GIL C. Apoptosis of *Candida albicans* during the interaction with murine macrophages: proteomics and cell-death marker monitoring[J]. Journal of Proteome Research, 2016, 15(5): 1418-1434.
- [27] BAIN JM, LEWIS LE, OKAI B, QUINN J, GOW NAR, ERWIG LP. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(9): 677-678.