

激活哺乳动物免疫系统的酵母突变体筛选

谌佳, 李雨晴, 刘意博, 中西秀树*

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡

谌佳, 李雨晴, 刘意博, 中西秀树. 激活哺乳动物免疫系统的酵母突变体筛选[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4061-4075.

CHEN Jia, LI Yuqing, LIU Yibo, Hideki Nakanishi. Screening of yeast mutants for activating the mammalian immune system[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4061-4075.

摘要: 酵母 β -葡聚糖是一种公认的免疫调节剂。与营养体细胞相比, 酵母突变体孢子表面暴露的 β -葡聚糖展现出更强的免疫刺激效应。【目的】筛选并鉴定具有增强哺乳动物免疫系统激活能力的酵母突变体。【方法】构建 2 株孢子壁 β -葡聚糖暴露的酵母突变体(*osw1 Δ* 和 *mum3 Δ*), 采用体外巨噬细胞刺激实验与体内小鼠模型评价其孢子裂解物的免疫刺激潜能; 通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 介导的基因敲低实验验证 C 型凝集素 1 (Dectin-1) 受体信号通路的作用。【结果】*osw1 Δ* 和 *mum3 Δ* 突变体孢子裂解物可诱导哺乳动物巨噬细胞产生白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症细胞因子, 二者的免疫激活作用均主要依赖于 Dectin-1 介导的信号通路。体内研究表明, 口服 *osw1 Δ* 突变体孢子裂解物后, 小鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平较口服野生型孢子裂解物组分别升高 1.8 倍和 1.7 倍。同时, *osw1 Δ* 突变体孢子裂解物表现出显著的抑瘤效应。【结论】本研究发现, *osw1 Δ* 突变体孢子裂解物具有显著的免疫激活效应, 该突变体有望成为新型免疫调节剂研发的候选菌株。

关键词: 酿酒酵母; 孢子; *OSW1*; 免疫激活; β -葡聚糖; C 型凝集素 1

资助项目: 国家自然科学基金(32071467)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071467).

*Corresponding author. E-mail: hideki@jiangnan.edu.cn

Received: 2026-02-13; Accepted: 2026-04-03; Published online: 2026-04-23

Screening of yeast mutants for activating the mammalian immune system

CHEN Jia, LI Yuqing, LIU Yibo, Hideki Nakanishi*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: Yeast β -glucan is a well-established immunomodulatory agent. Studies have demonstrated that compared with vegetative yeast cells, β -glucan exposed on the surface of mutant yeast spores exhibits enhanced immunostimulatory effects. **[Objective]** To screen and identify yeast mutants with enhanced ability to activate the mammalian immune system. **[Methods]** Two yeast mutants (*osw1* Δ and *mum3* Δ) exposing β -glucan on the spore wall were constructed, and their immunostimulatory activity was evaluated *via* the macrophage stimulation assay and a mouse model. The role of the Dectin-1 signaling pathway was verified through small interfering RNA-mediated gene knockdown experiments. **[Results]** The spore lysates of *osw1* Δ and *mum3* Δ induced the production of inflammatory cytokines including interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in macrophages. Their immune activation was mainly dependent on the Dectin-1-mediated signaling pathway. *In vivo* studies showed that after oral administration of the *osw1* Δ spore lysate, the levels of IL-6 and TNF- α in the mouse serum increased by 1.8-fold and 1.7-fold, respectively, compared with those after oral administration of the wild-type spore lysate. Moreover, the *osw1* Δ spore lysate exerted a significant tumor-suppressive effect. **[Conclusion]** The spores of *osw1* Δ exhibit strong immune-activating effects. This mutant could be a candidate for the development of novel immunomodulators.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; spore; *OSW1*; immune activation; β -glucan; Dectin-1

β -葡聚糖是一类由 β -D-葡萄糖单体通过 β -1,3 和 β -1,6 糖苷键连接形成的多糖^[1-2]。在自然界中,这类多糖主要分布于微生物与植物的细胞壁中^[3]。 β -葡聚糖因具备抗氧化、免疫激活、抗肿瘤等多种生物学活性,现已被广泛应用于药物及食品添加剂领域^[4-6]。

β -葡聚糖能够结合细胞表面受体,并以此介导免疫刺激效应^[7]。C 型凝集素 1 (Dectin-1)在巨噬细胞和树突状细胞中表达,该受体可特异性识别 β -1,3-葡聚糖;Dectin-1 的激活可诱导细胞吞噬,并促进炎症因子的分泌^[8-10]。 β -葡聚糖进入小肠后,含有 β -葡聚糖的颗粒或细胞可通过派尔集合淋巴结中的微皱褶细胞(M 细胞)从肠腔

转运至淋巴组织,该区域富含巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞^[11-12]。因此,口服 β -葡聚糖可通过 Dectin-1 通路产生免疫刺激效应。

酿酒酵母是一种公认安全的微生物,其菌体本身或从中提取的 β -葡聚糖均已被用作膳食补充剂^[13-14]。此外,由于其遗传背景清晰、代谢调控机制明确,在微生物学、生物技术及免疫学等多个领域均具有重要研究价值与应用前景^[15-16]。在酵母细胞壁中, β -葡聚糖的主链骨架主要由 β -1,3-糖苷键连接而成,而侧链分支则通过 β -1,6-糖苷键形成^[17]。酵母细胞壁除 β -葡聚糖外,还含有甘露聚糖和几丁质。这些成分共同构成细胞壁的分层结构,其中 β -葡聚糖层位于

内侧, 并被甘露聚糖层所包被^[18-19]。

在营养供给不足的环境下, 酿酒酵母的二倍体细胞可经分化过程转变为休眠状态的孢子^[20]。在孢子形成阶段, 减数分裂产生的 4 个单倍体细胞核各自被孢子质膜与孢子壁包被; 这一系列过程均在母细胞内部完成, 最终母细胞发育为含有 4 个孢子的子囊^[21]。酵母孢子的细胞壁由内至外依次排列为: 甘露聚糖层、 β -葡聚糖层、壳聚糖层以及二酪氨酸层。孢子壁由内向外逐层合成^[22]。由于壳聚糖的合成是二酪氨酸层形成的前提条件^[23], 因此壳聚糖合成缺陷型突变体(如 *chs3 Δ* 突变体)的孢子壁中壳聚糖层和二酪氨酸层均缺失^[24-25]。值得注意的是, 孢子壁中的甘露聚糖层位于 β -葡聚糖层内侧, 因此 *chs3 Δ* 突变体的孢子表面会直接暴露 β -葡聚糖层; 研究发现, *chs3 Δ* 孢子诱导的促炎反应强度显著高于酵母营养体细胞^[26]。

除 *chs3 Δ* 突变体外, 还有多种酵母突变体的孢子壁 β -葡聚糖层可暴露于孢子表面, *ssp2 Δ* 突变体即为其中之一。尽管 *ssp2 Δ* 突变体无法形成形态可辨的成熟孢子, 但其可产生含有 β -葡聚糖层、形态不可见的未成熟孢子。研究表明, *ssp2 Δ* 突变体孢子表面同样暴露 β -葡聚糖, 并具有免疫刺激作用, *ssp2 Δ* 孢子诱导的免疫应答强度高于 *chs3 Δ* 孢子^[26]。目前 Ssp2 蛋白的功能尚不明确, *ssp2 Δ* 孢子免疫刺激活性增强的分子机制也有待解析, 但该结果为筛选其他具有免疫激活能力的酵母孢子壁突变体提供了重要线索。现有研究显示, *mum3 Δ* 和 *osw1 Δ* 突变体均可形成有活力的孢子, 细胞学检测结果证实, 与 *chs3 Δ* 孢子壁结构相似, 这 2 种突变体的孢子壁 β -葡聚糖层均发生暴露, 但 Mum3 和 Osw1 蛋白的功能目前仍未明确^[27]。因此, 本研究对 *mum3 Δ* 和 *osw1 Δ* 突变体进行了分析。综上所述, 本研究比较了 *osw1 Δ* 、*mum3 Δ* 、*ssp2 Δ* 及 *chs3 Δ* 突变体孢子裂解物的免疫刺激活性, 并探究了小鼠口服 *osw1 Δ* 突变体孢子裂解物对黑色素瘤

的干预作用, 以筛选免疫激活活性更强的酿酒酵母突变体。

1 材料与方法

1.1 培养基

YPAD 培养基(g/L): 酵母提取物 10.00, 蛋白胨 20.00, D-葡萄糖 20.00, 腺嘌呤 0.03。先将不含葡萄糖的 YPA 基础培养基 121 °C 灭菌 20 min, 待其降至室温后, 加入已单独灭菌的 D-葡萄糖溶液, 充分混匀。YPAce 培养基(g/L): 酵母提取物 10.00, 蛋白胨 20.00, 醋酸钾 20.00, 腺嘌呤 0.03。Kac 培养基(g/L): 醋酸钾 20.00。

1.2 酵母的培养与产孢诱导

本研究所用酵母菌株为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) SK1 (高产孢型) 背景的 AN120 (双倍体)、AN117-4B (单倍体)、AN117-16D (单倍体)^[28], 详细信息见表 1。利用同源重组技术, 将带有标记基因 *his⁵⁺* 的 DNA 序列分别替代 *OSW1* 基因和 *MUM3* 基因的完整开放阅读框, 获得 *osw1 Δ* 与 *mum3 Δ* 2 种突变体菌株^[30]。酵母产孢参照文献[31]的方法制备: 从 YPAD 固体培养基上挑取生长状态正常的酿酒酵母单菌落, 接种于 5 mL YPAD 液体培养基中, 于 30 °C、220 r/min 培养 12 h。随后按 1:50 的比例将菌液转接至 YPAce 培养基中, 在相同条件下继续振荡培养 22 h。培养结束后, 以 7 000×g 离心 1 min 或在室温下静置 30 min 的方式去除上清液, 保留菌体沉淀。接着, 选用适宜体积的三角瓶, 按相同比例加入 Kac 培养基重悬菌体, 30 °C、220 r/min 培养 24 h 以诱导孢子形成。产孢完成后, 再次以 7 000×g 离心 1 min 收集孢子沉淀, 用无菌水洗涤 2 次, 最后于 4 °C 保存备用。

1.3 孢子纯化

准确称取湿重约 0.5 g 的孢子, 置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 破壁酶缓冲液, 反复吹打混匀。随后向管内加入 5 μ L 酵母破壁酶, 于

表1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
AN120	<i>MATa/MATa trp1::hisG/trp1::hisG ARG4/arg4-NspI ura3/ura3 ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 his3ΔSK/his3ΔSK</i>	[28]
AN117-4B	<i>MATa ho::LYS2 rme1::LEU2 ura3 leu2 trp1 his3ΔSK arg4-NspI lys2</i>	[29]
AN117-16D	<i>MATa his3ΔSK lys2 ho::LYS2 ura3 leu2 trp1</i>	[29]
AN262	<i>MATa/MATa ARG4/arg4-NspI his3ΔSK/his3ΔSK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 (chs3Δ) RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3 chs3Δ::his5⁺/chs3Δ::his5⁺</i>	[29]
<i>ssp2Δ</i>	<i>MATa/MATa ARG4/arg4-NspI his3ΔSK/his3ΔSK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3 ssp2Δ::his5⁺/ssp2Δ::his5⁺</i>	[29]
<i>osw1Δ</i>	<i>MATa/MATa ARG4/arg4-NspI his3ΔSK/his3ΔSK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3 osw1Δ::his5⁺/osw1Δ::his5⁺</i>	This study
<i>mum3Δ</i>	<i>MATa/MATa ARG4/arg4-NspI his3ΔSK/his3ΔSK ho::LYS2/ho::LYS2 leu2/leu2 lys2/lys2 RME1/rme1::LEU2 trp1::hisG/trp1::hisG ura3/ura3 mum3Δ::his5⁺/mum3Δ::his5⁺</i>	This study

37 °C、220 r/min 条件下孵育 1–2 h，其间吸取 2 μL 悬液在显微镜下观察，以确认子囊壁被充分裂解。孵育完成后，将样品置于 4 °C、7 000×g 离心 2 min，收集沉淀^[29]。

1.4 产孢率计算

产孢结束后，吸取适量培养液进行显微镜观察，选取 3 个视野进行孢子计数，每个视野计数 100–150 个细胞，若孢子数过多可进行适量稀释，产孢率计算如公式(1)所示。

产孢率=含四分体的子囊数/细胞总数×100% (1)

1.5 超声冻干法制备孢子裂解物

将适量纯化后的孢子置于 50 mL 离心管中，加入无菌水重悬并放置于冰上。使用超声破碎机以 48% 功率、间歇模式处理，具体设置为超声 5 s、间歇 2 s，总处理时间为 5 min。超声结束后，将样品于–80 °C 冷冻 24 h，随后进行冷冻干燥，制成冻干粉末。最终将粉末密封于–20 °C 保存备用。

1.6 鼠源巨噬细胞培养及体外刺激实验

本研究选用中国科学院细胞库提供的鼠源巨噬细胞 RAW264.7 作为实验细胞^[32]。具体操作步骤如下：将–80 °C 冻存的细胞复苏，连续传

代培养 3 代后用于后续实验。将细胞密度调整至 1×10⁶ 个/mL，接种于 12 孔细胞培养板中。在显微镜下确认细胞已充分贴壁后，更换为含血清的新鲜 DMEM 培养基。随后加入终浓度为 7.2 mg/mL^[29] 的裂解物以进行刺激处理，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。细胞上清用于检测 IL-6、TNF-α 的分泌水平。

1.7 炎症因子检测

采用 ELISA 试剂盒检测巨噬细胞上清及小鼠血清中的细胞因子水平：(1) 经超声破碎及冻干处理的孢子裂解物刺激后，检测小鼠 RAW264.7 巨噬细胞与原代腹腔巨噬细胞培养上清中 TNF-α 与 IL-6 的分泌水平；(2) 经上述孢子裂解物灌胃干预后，检测小鼠血清中上述 2 种炎症因子的水平。所有操作步骤均严格按照试剂盒说明书的要求执行。

1.8 细胞转染

依据 Dectin-1 基因的全长序列，利用 DSIR (<http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html>) 设计并筛选出一条长度为 22 nt 的靶向 siRNA 序列，用于特异性敲低目标基因的表达，具体序列信息参见表 2。在转染操作前，将巨噬细胞以

7×10^5 个/mL 的密度接种于 12 孔板中, 待细胞汇合度达到约 80% 时进行后续转染。转染操作按照 Lipo8000TM 转染试剂说明书进行, 将形成的复合物逐滴加入细胞培养液中。培养结束后, 提取细胞总 RNA, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[29]。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测 Dectin-1 mRNA 相对表达水平

采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 技术分析哺乳动物细胞中目标基因 mRNA 的相对表达水平。RNA 的提取步骤与具体操作流程参考文献^[29]。在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上检索小鼠来源的目标基因序列, 并据此设计相应引物, 委托苏州金唯智生物科技有限公司合成。引物详细资料见表 3。qPCR 反应体系 (10 μL): $2 \times \text{Universal SYBR Green Fast qPCR Mix}$ 5 μL , cDNA 1.5 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , ddH₂O 2.7 μL 。qPCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30–34 s, 共 45 个循环。

表2 双链siRNA序列^[29]

Table 2 Double-stranded siRNA sequences^[29]

Name	siRNA sequences (5'→3')
Dectin-1 siRNA (mouse)	F: GCUGUUACCUAUUUAGCUUdTdT R: AAGCUAAAUAGGUAACAGCdTdT
Control siRNA (mouse)	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUtt R: ACGUGACACGUUCGGAGAAtt
GAPDH siRNA (mouse)	F: CACUCAAGAUUGUCAGCAAdTdT R: UUGCUGACAAUCUUGAGUGdTdT

表3 目的基因引物序列^[29]

Table 3 Target gene primer sequences^[29]

Primer names	Primer sequences (5'→3')
mRNA-M-GAPDH-F	GCCAAAAGGGTCATCATCTC
mRNA-M-GAPDH-R	GTAGAGGCAGGGATGATGTTC
mRNA-M-Dectin-1-F	GACTTCAGCACTCAAGACATCC
mRNA-M-Dectin-1-R	TTGTGTCGCCAAATGCTAGG
mRNA-M- β -actin-F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
mRNA-M- β -actin-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1.10 动物实验设计与分组

1.10.1 小鼠来源及饲养条件

本研究以 6 周龄、体重为 17–22 g 的雌性 C57BL/6J 小鼠为实验对象, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。所有动物实验方案及操作过程均经江南大学伦理与动物福利审查委员会批准, 编号为 JN.NO20251112C068181。实验期间, 小鼠自由饮水和摄食。饲养条件为: 温度 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%–70%, 噪声水平不超过 60 dB, 光照强度 15–20 lx。

1.10.2 体外刺激小鼠腹腔原代巨噬细胞

小鼠在适应性饲养 1 周后, 采用 1.5% 异氟醚吸入麻醉联合颈椎脱臼法实施安乐死。用剪刀小心剪开小鼠腹部皮肤及腹膜, 向腹腔注入 1 mL 预冷 PBS 缓冲液并反复冲洗 3 次, 收集腹腔灌洗液并分装于 2 mL 离心管中; 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1\ 500 \times g$ 离心 5 min, 获得原代腹腔巨噬细胞。使用含血清的 DMEM 培养基将细胞重悬, 接种至 24 孔板中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内静置培养 2 h。待细胞贴壁后更换为完全培养基, 随即开始刺激处理。每孔分别加入终浓度均为 7.2 mg/mL 的商业 β -葡聚糖、酵母营养细胞、野生型孢子裂解物, 以及 *osw1* Δ 、*mum3* Δ 、*ssp2* Δ 、*chs3* Δ 突变株来源的孢子裂解物, 轻轻混匀后继续在相同条件下刺激 24 h。刺激结束后, 收集细胞上清用于炎症因子检测。

1.10.3 孢子裂解物体内刺激及样品采集

小鼠在适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组和若干实验组。对照组每日通过灌胃给予 0.9% 生理盐水; 各实验组分别灌胃给予野生型酵母孢子裂解物, 以及 *osw1* Δ 、*mum3* Δ 、*ssp2* Δ 、*chs3* Δ 突变株来源的孢子裂解物, 裂解物灌胃剂量为 12 mg/kg^[29]。每日固定时间灌胃, 连续 1 周后, 采用眼球取血法采集血液。血液置于离心管中静置 1–1.5 h (避免振荡, 以免发生溶血), 随后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000 \times g$ 离心 10–15 min, 上清即为血清, 将血清分装后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备

用。与此同时,分离小鼠腹腔原代巨噬细胞,后续操作与 1.10.2 节一致。

1.10.4 孢子裂解物干预黑色素瘤小鼠

小鼠经 1 周适应性饲养后随机分为对照组与若干实验组。对照组每日灌胃给予 0.9% 生理盐水;实验组则分别灌胃给予酵母营养细胞裂解物、野生型酵母孢子裂解物、*chs3Δ* 孢子裂解物以及 *osw1Δ* 孢子裂解物。各组在连续干预 1 周后,通过皮下注射 5×10^5 个 B16 细胞构建皮下黑色素瘤模型。

1.11 统计学分析

所有实验均设置 3 次独立生物学重复,结果以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。采用 GraphPad Prism 10.6.0 软件进行数据统计分析与图表绘制,多组间差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。统计学显著性判定标准: $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 野生型及突变体酵母的生长曲线与产孢率

为比较 *osw1Δ*、*mum3Δ* 突变体与野生型酵母营养细胞的生长差异,本研究测定了各菌株的生长曲线。如图 1A 所示,在 YPAD 培养基中各菌株的生长无明显差异;如图 1B 所示,在含 5% 乙醇的 YPAD 培养基中各菌株的生长也无明显差异。此外,本研究对各突变体菌株的产孢率进行了测定(图 1C)。正常培养条件下,野生型菌株的产孢率约为 95%,与 *osw1Δ* 突变体无显著性差异;而 *mum3Δ*、*ssp2Δ* 及 *chs3Δ* 突变体的产孢率则显著低于 *osw1Δ* 突变体($P < 0.01$)。结果表明,*osw1Δ* 突变体的产孢效率优于其他 3 种突变体。

2.2 酵母孢子与营养细胞对小鼠巨噬细胞的免疫刺激作用

本研究比较了商业纯 β -葡聚糖、酵母营养细胞、野生型孢子裂解物、*osw1Δ* 孢子裂解物以

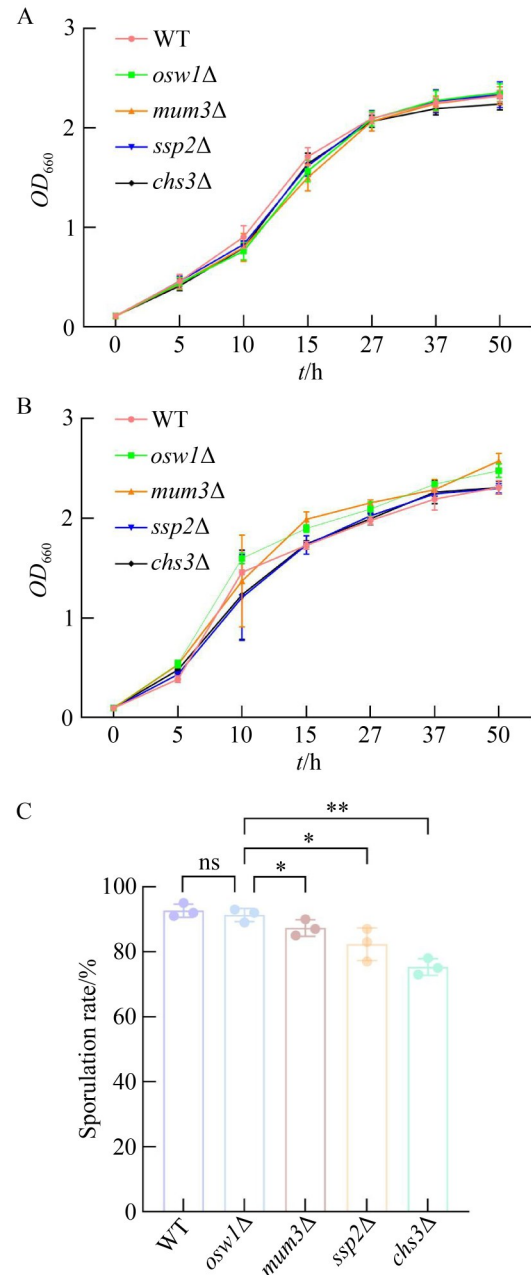


图1 野生型及突变体酵母的生长曲线与产孢率

Figure 1 Analysis of growth and sporulation rate of wild-type and mutant yeasts. A: Growth curves of yeast cells in YPAD medium at 30 °C; B: Growth curves of yeast cells in YPAD medium containing 5% ethanol at 30 °C; C: Comparison of sporulation efficiencies between wild-type and mutants (*osw1Δ*, *mum3Δ*, *ssp2Δ*, and *chs3Δ*). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: No significant difference.

及 *mum3Δ* 孢子裂解物对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的免疫刺激作用。如图 2A、2B 所示, 与野生型酵母营养细胞相比, 孢子裂解物的刺激作用更强。此外, 本研究比较了野生型孢子裂解物与 *osw1Δ*、*mum3Δ*、*ssp2Δ*、*chs3Δ* 等 4 种孢子裂解物的刺激效果差异。研究表明, *ssp2Δ* 和 *chs3Δ* 孢子裂解物也可诱导小鼠巨噬细胞产生免疫应答, 因此本研究将 *osw1Δ*、*mum3Δ* 与 *ssp2Δ*、*chs3Δ* 进行比较。突变体 *osw1Δ* 孢子裂解物诱导的免疫应答显著强于野生型酵母孢子裂解物 ($P<0.01$), 且其刺激作用也显著强于 *mum3Δ*、*ssp2Δ* 以及 *chs3Δ* 孢子裂解物 ($P<0.05$)。同时, 本研究对比了商业可溶性纯 β -葡聚糖与 *osw1Δ* 孢子裂解物的效果差异[已上传 ScienceDB 数据库 (www.scidb.cn), CSTR 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00077], 发现两组诱导的炎症因子分泌水平无显著性差异。其潜在机制可能与 *osw1Δ* 突变体孢子壁的特殊组成密切相关。一方面,

osw1Δ 孢子壁的结构可能更适宜与免疫细胞表面的 Dectin-1 受体特异性结合, 从而高效启动下游免疫激活信号。另一方面, *osw1Δ* 孢子中残留的壳聚糖或二酪氨酸等结构成分也可能通过其他模式识别受体途径, 进一步协同激活机体天然免疫应答, 从而共同介导较营养细胞更强的免疫调节效应。上述结果表明, 酵母孢子裂解物的刺激作用强于酵母营养细胞, *osw1Δ* 孢子裂解物的刺激作用强于 *mum3Δ*、*ssp2Δ* 和 *chs3Δ* 孢子裂解物, 且 *osw1Δ* 的整体效果优于商业 β -葡聚糖。

2.3 突变体孢子裂解物对小鼠原代巨噬细胞的体外免疫激活作用

本研究进一步分离了小鼠原代巨噬细胞, 以上述突变体孢子裂解物进行体外刺激, 并检测细胞因子分泌水平。如图 3A、3B 所示, *osw1Δ*、*mum3Δ*、*ssp2Δ*、*chs3Δ* 突变体孢子裂解物刺激小鼠原代巨噬细胞产生的免疫应答强

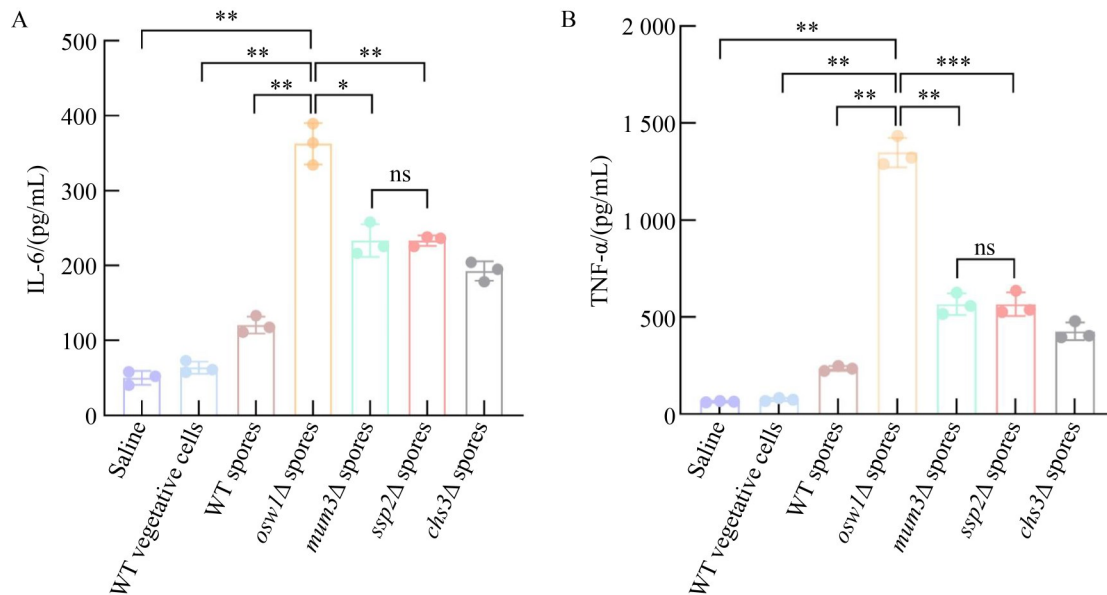


图2 孢子和酵母营养细胞对小鼠巨噬细胞分泌炎症细胞因子的影响

Figure 2 Effects of spore and vegetative-cell lysates on inflammatory cytokine production by mouse macrophages. A: ELISA analysis of IL-6 secretion levels in RAW264.7 macrophages stimulated by different samples; B: ELISA analysis of TNF- α secretion levels in RAW264.7 macrophages stimulated by different samples. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; *** $P<0.001$; ns: No significant difference.

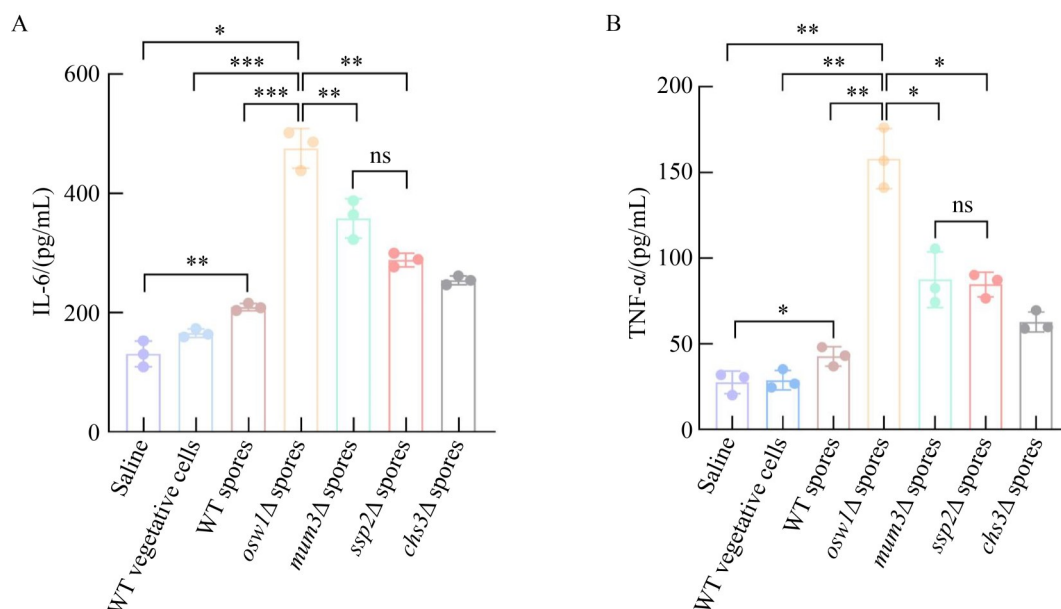


图3 孢子裂解物刺激小鼠原代巨噬细胞

Figure 3 Stimulation of mouse primary macrophages by spore lysates. A: ELISA analysis of IL-6 secretion by mouse primary macrophages stimulated *in vitro* with various spore lysates; B: ELISA analysis of TNF- α secretion by mouse primary macrophages stimulated *in vitro* with various spore lysates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

度显著高于对照组和野生型酵母孢子裂解物组 ($P < 0.05$); 其中, *osw1Δ* 突变体孢子裂解物的免疫刺激作用最强, 其诱导的免疫应答强度显著高于其他突变体裂解物 ($P < 0.05$)。该结果与前述 RAW264.7 细胞体外检测结果一致, 并在后续小鼠体内实验中得到进一步验证。

2.4 *osw1Δ*、*mum3Δ* 孢子裂解物通过 Dectin-1 介导小鼠巨噬细胞免疫应答

Dectin-1 是 β -葡聚糖的特异性受体, 降低 Dectin-1 表达可减弱 β -葡聚糖介导的免疫效应。因此, 本研究采用 siRNA 降低 Dectin-1 (小鼠 *Clec7a* 基因) 的 mRNA 表达量以减少 Dectin-1 的合成。如图 4A 所示, 经 Dectin-1 特异性 siRNA 处理后, 细胞 Dectin-1 的 mRNA 表达水平与对照组相比显著降低 ($P < 0.01$)。Dectin-1 表达减少后, 分别采用 *osw1Δ* 和 *mum3Δ* 孢子裂解物刺激转染后的鼠源巨噬细胞, 通过检测细胞因子的分泌水平验证 Dectin-1 是否介导其免疫激活作

用。结果显示, 对照组细胞因子水平显著高于 Dectin-1 敲低组 ($P < 0.05$); 同时, 经 *osw1Δ*、*mum3Δ* 孢子裂解物刺激后的细胞因子水平也显著高于未刺激组 ($P < 0.05$) (图 4B–4E)。图 4B 结果表明, Dectin-1 参与 *osw1Δ* 孢子裂解物诱导的巨噬细胞免疫应答。然而, 在 Dectin-1 表达敲低的鼠源巨噬细胞中, 经 *osw1Δ* 孢子裂解物刺激后, 细胞上清中 IL-6 的分泌水平较未刺激组仍有所升高。结合未敲低 Dectin-1 的巨噬细胞实验结果, 该现象提示 *osw1Δ* 孢子裂解物对巨噬细胞炎症因子分泌的调控作用并非仅依赖 Dectin-1 信号通路, 还可能通过 Dectin-1 非依赖性的天然免疫识别途径协同调控 IL-6 分泌, 即 *osw1Δ* 孢子裂解物还可能激活其他信号通路。综合上述实验结果可知, 突变体孢子裂解物中的 β -葡聚糖可通过 Dectin-1 信号通路对小鼠巨噬细胞的免疫应答发挥重要作用。

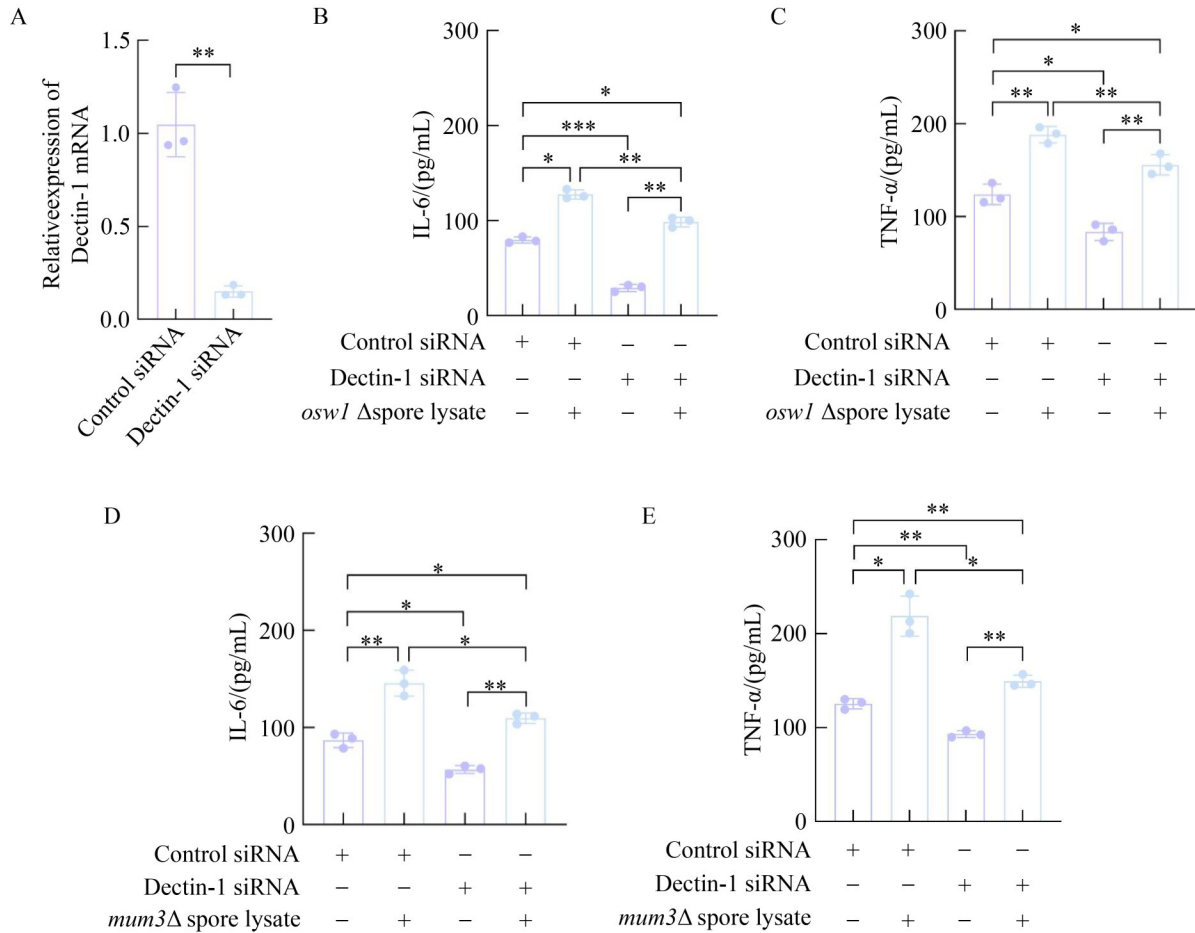


图4 酵母孢子裂解物诱导的鼠源巨噬细胞免疫应答主要由Dectin-1介导

Figure 4 Yeast spore lysate-induced immune responses in murine macrophages are mainly mediated by Dectin-1. A: Relative expression level of Dectin-1 mRNA; B: ELISA analysis of IL-6 secretion level in Dectin-1 gene (*Clec7a*)-knockdown primary macrophages stimulated by *osw1*Δ spore lysate; C: ELISA analysis of TNF-α secretion level in Dectin-1 gene-knockdown primary macrophages stimulated by *osw1*Δ spore lysate; D: ELISA analysis of IL-6 secretion level in Dectin-1 gene-knockdown primary macrophages stimulated by *mum3*Δ spore lysate; E: ELISA analysis of TNF-α secretion level in Dectin-1 gene-knockdown primary macrophages stimulated by *mum3*Δ spore lysate. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.5 突变体孢子裂解物对小鼠体内免疫应答的激活效应

为评价上述突变体孢子裂解物对小鼠体内免疫应答的影响,本研究以 C57BL/6J 品系小鼠为实验对象,通过灌胃方式给予干预。结果显示(图 5A),与生理盐水对照组相比,灌胃给予不同酵母突变体孢子裂解物后,各组小鼠体重

变化差异无统计学意义,提示所试突变体孢子裂解物未明显影响小鼠体重。为进一步评价其免疫激活效应,采用 ELISA 法检测了各组小鼠血清中炎症因子水平,如图 5B、5C 所示。数据显示,在 *osw1*Δ、*mum3*Δ、*ssp2*Δ 及 *chs3*Δ 突变体处理组中,小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平均显著升高($P < 0.05$),且 *osw1*Δ 组的细胞因子分泌水平显著高于其他突变体组($P < 0.05$)。随后检测小

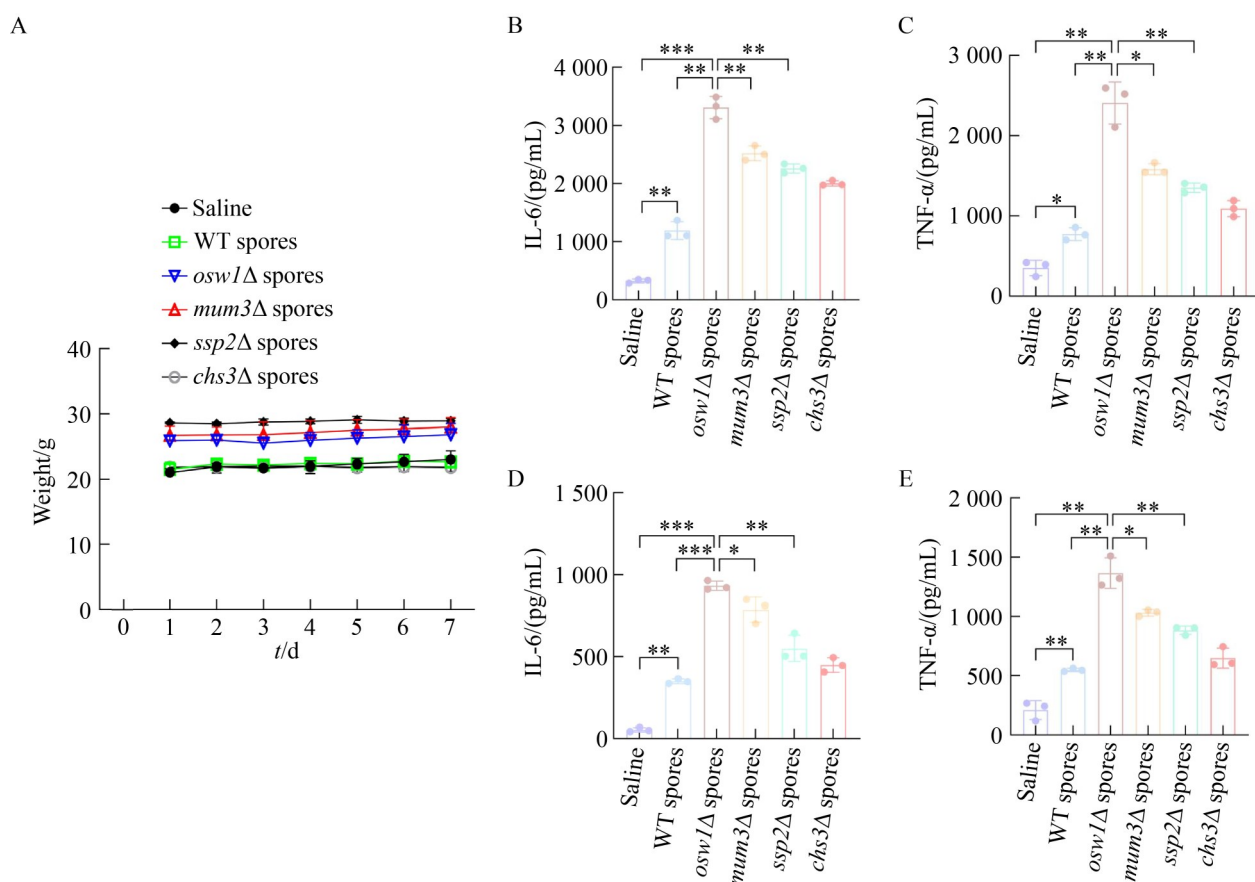


图5 孢子裂解物对小鼠体内免疫应答的影响

Figure 5 Effects of spore lysates *in vivo*. A: Mice were orally administered yeast-derived samples for 7 days, and their body weights were measured; B: IL-6 level in mouse serum detected by ELISA; C: TNF- α level in mouse serum detected by ELISA; D: IL-6 level in the supernatant of mouse primary macrophages detected by ELISA; E: TNF- α level in the supernatant of mouse primary macrophages detected by ELISA. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

鼠原代巨噬细胞上清的细胞因子水平, 结果显示相同趋势(图 5D、5E)。上述现象的可能机制在于, *osw1Δ* 突变体孢子壁中暴露的 β -葡聚糖可在小鼠体内诱导较强的免疫应答。综上所述, 本研究证实所试突变体孢子裂解物可作为免疫刺激剂激活小鼠机体免疫应答, 其中以 *osw1Δ* 孢子裂解物的免疫激活效应最为显著。

2.6 *osw1Δ* 孢子裂解物诱导小鼠免疫应答的最低有效剂量

在黑色素瘤和膀胱癌的体内小鼠模型中, 采用 β -葡聚糖制剂预处理小鼠可显著抑制肿瘤

生长; 而当摄入的孢子裂解物浓度达到一定阈值时, 其 β -葡聚糖摄入量可达到诱导免疫应答的阈值, 可有效诱导小鼠产生免疫应答^[33]。

为明确 *osw1Δ* 孢子裂解物诱导小鼠产生免疫应答的最低有效浓度阈值, 并将该阈值浓度应用于后续肿瘤相关研究, 以筛选出具有较强抗肿瘤免疫活性的突变体, 本研究开展了 2 轮孢子裂解物的浓度梯度筛选。第 1 轮设置多组不同浓度的 *osw1Δ* 孢子裂解物进行初筛, ELISA 检测小鼠血清炎症因子水平的结果显示(图 6A、6B), 当孢子裂解物浓度为 15 mg/kg

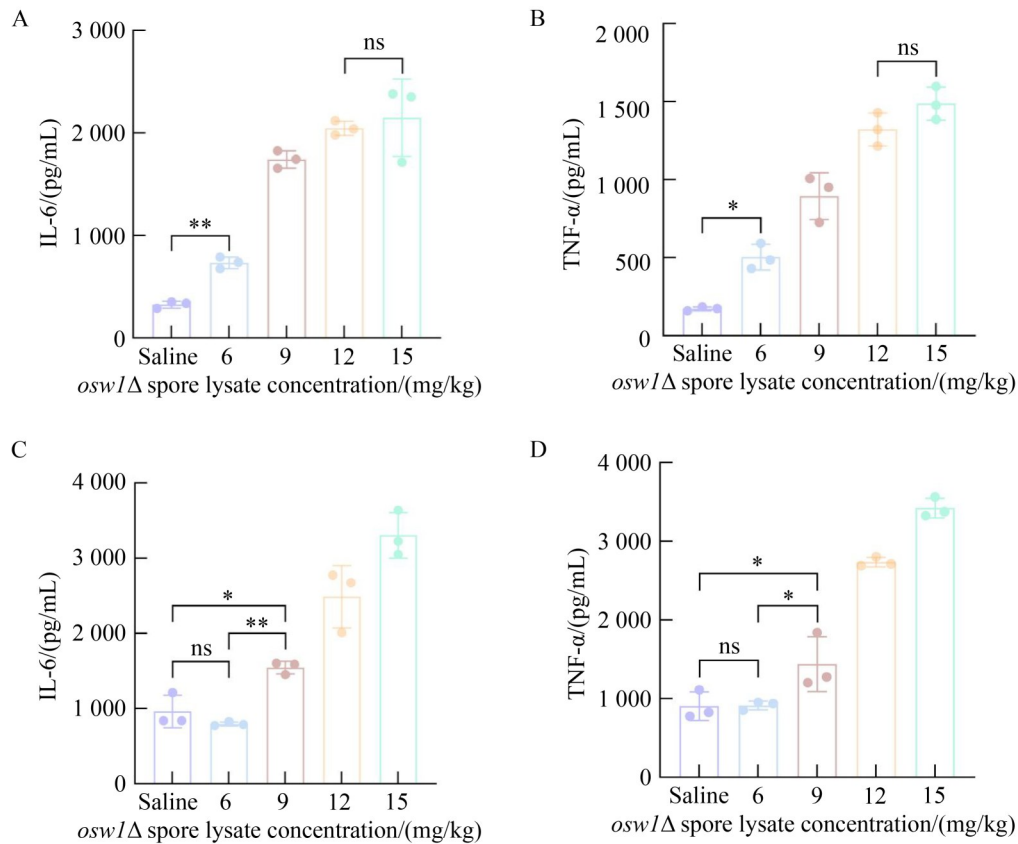


图6 不同孢子裂解物浓度产生的免疫应答效果

Figure 6 Immune response effects induced by different concentrations of spore lysates. A, C: ELISA analysis of IL-6 levels in mouse primary macrophages stimulated by *oswIΔ* spore lysate at various concentrations; B, D: ELISA analysis of TNF-α levels in mouse primary macrophages stimulated by *oswIΔ* spore lysate at various concentrations. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: No significant difference.

时, 与 12 mg/kg 的灌胃浓度引起的免疫应答效果相比无显著性差异, 表明在较高浓度刺激下小鼠免疫应答已趋饱和; 当孢子裂解物给药浓度为 6 mg/kg 时, 小鼠血清中炎症因子水平显著高于对照组($P < 0.05$), 提示该浓度可有效触发小鼠免疫应答, 但尚不能确定其是否为最低有效浓度。为进一步确定最低有效浓度, 避免浓度过高导致免疫过度激活而影响后续肿瘤研究中突变体免疫活性筛选的准确性, 本研究开展第 2 轮细化浓度梯度验证。结果显示(图 6C、6D), 当孢子裂解物浓度为 0.5 mg/kg 时, 小鼠血清炎症因子水平与对照组无显著性差异, 说明该浓度未达到免疫应答诱导阈值; 当浓度为

1.5 mg/kg 时, 血清中炎症因子水平显著高于对照组($P < 0.05$), 表明 1.5 mg/kg 为本实验条件下 *oswIΔ* 孢子裂解物诱导小鼠产生免疫应答的最低有效浓度。综上所述, 本研究确定 1.5 mg/kg 为 *oswIΔ* 孢子裂解物的最低有效给药浓度, 可将其应用于后续肿瘤免疫相关研究。

2.7 孢子裂解物对小鼠黑色素瘤模型的干预作用

研究表明, 酵母营养细胞对黑色素瘤具有抑制作用^[34]。当灌胃浓度为 12 mg/kg 时, *chs3Δ* 孢子裂解物和酵母营养细胞裂解物均可抑制小鼠黑色素瘤生长, 但二者间无显著性差异。这

可能是由于 *chs3Δ* 孢子裂解物的免疫激活作用在低剂量时即已达到饱和^[29]。因此,本研究首先确定了能引起小鼠免疫应答的孢子裂解物最低有效给药浓度,随后采用该浓度对小鼠进行灌胃干预,将小鼠分为对照组、野生型酵母细胞裂解物组、野生型酵母孢子裂解物组、*chs3Δ* 孢子裂解物组和 *osw1Δ* 孢子裂解物组。如图 7A 所示,经过 16 d,各组小鼠黑色素瘤体积均呈增长趋势,且 *osw1Δ* 孢子裂解物组的肿瘤体积显著低于其他 4 组($P<0.001$),其余 4 组间肿瘤体积差异无统计学意义。对剥离的肿瘤称重并拍照(图 7B、7C),*osw1Δ* 孢子裂解物组的肿瘤重量显著低于其他 4 组($P<0.05$),其余 4 组间肿瘤重量无显著性差异。此外,本研究分析了 5 组小鼠的生存情况(图 7D),*osw1Δ* 孢子裂解物组的小鼠存活率显著高于其他 4 组($P<0.05$)。接种肿瘤后,各组小鼠体重变化无显著性差异(图 7E)。上述结果表明,在裂解物浓度最低时,*osw1Δ* 孢子裂解物所产生的免疫刺激效果最佳,可诱导小鼠产生抗肿瘤免疫应答。

3 讨论与结论

本研究发现,β-葡聚糖暴露于孢子壁外层后可显著增强免疫刺激效果,其中 *osw1Δ* 孢子裂解物的免疫激活作用最强。研究证实,*osw1Δ* 孢子壁中的 β-葡聚糖部分暴露于孢子表面,*OSW1* 基因缺失可使孢子壁外层结构松散、不完整,导致 β-葡聚糖层因失去外层屏蔽而暴露,但孢子壁上仍有微量壳聚糖及二酪氨酸残留^[27],暴露的 β-葡聚糖被宿主免疫细胞表面的 Dectin-1 等 C 型凝集素受体识别,启动促炎信号^[9],而野生型酵母孢子因外层甘露糖蛋白层遮挡,β-葡聚糖难以被识别,免疫激活较弱^[35]。此外,*osw1Δ* 的产孢效率与野生型酵母相比无显著性差异,且显著优于 *mum3Δ*、*ssp2Δ* 和 *chs3Δ* ($P<0.05$)。本研究还发现,同等用量的商业 β-葡聚糖与 *osw1Δ* 孢子裂解物在诱导免疫应答方面表现出相当的活性。这一结果值得关注,因为 *osw1Δ* 孢

子裂解物中 β-葡聚糖的实际含量有限。据此推测,*osw1Δ* 孢子壁中的 β-葡聚糖可能具有更利于激活 Dectin-1 受体的特殊结构;残留在 *osw1Δ* 孢子壁上的壳聚糖或二酪氨酸也可能通过其他受体途径协同激活免疫系统。Dectin-1 受体机制研究显示,siRNA 介导的 Dectin-1 敲低使细胞因子分泌显著降低($P<0.01$),表明“β-葡聚糖-Dectin-1”信号轴是主要激活途径,但 Dectin-1 敲低后 IL-6 水平仍有所升高,提示可能存在其他信号通路参与炎症因子分泌调控,相关机制仍需进一步研究。体外研究结果显示,*osw1Δ* 孢子裂解物刺激原代巨噬细胞产生的 TNF-α 达野生型孢子裂解物组的 3.7 倍($P<0.001$)。体内灌胃结果进一步验证其系统性免疫激活能力:*osw1Δ* 组血清 IL-6 水平较野生型组升高 1.8 倍($P<0.001$),且显著优于其他突变体($P<0.05$)。各突变体处理组与对照组小鼠体重变化差异无统计学意义。

研究表明,酵母营养细胞具有黑色素瘤抑制作用^[34],在较高灌胃浓度下,酵母营养细胞裂解物与 *chs3Δ* 孢子裂解物均能激活小鼠免疫应答并抑制黑色素瘤生长^[29],但二者间无显著性差异,因此本研究通过浓度梯度筛选与功能验证明确了酵母突变体孢子裂解物诱导小鼠产生免疫应答的最低有效浓度为 1.5 mg/kg。在该最低有效浓度下,进一步比较了酵母营养细胞裂解物、野生型酵母孢子裂解物、*chs3Δ* 孢子裂解物及 *osw1Δ* 孢子裂解物对黑色素瘤生长的影响。结果显示,*osw1Δ* 孢子裂解物对小鼠黑色素瘤的抑制效果最为显著,其肿瘤体积和质量均显著低于其他 4 组(分别为 $P<0.001$ 和 $P<0.05$),且该组小鼠存活率显著高于其余 4 组($P<0.05$)。综上所述,*osw1Δ* 突变体孢子裂解物在最低有效剂量(1.5 mg/kg)下即具有较强的免疫刺激活性,可有效诱导小鼠产生抗肿瘤免疫应答,对黑色素瘤发挥显著抑制作用,是具有潜力的肿瘤免疫调控候选制剂。然而,本研究仅在小鼠黑色素瘤模型中验证了酵母突变体孢子裂解物的抑瘤效应,未在肺癌、结肠癌等其他常见肿瘤模

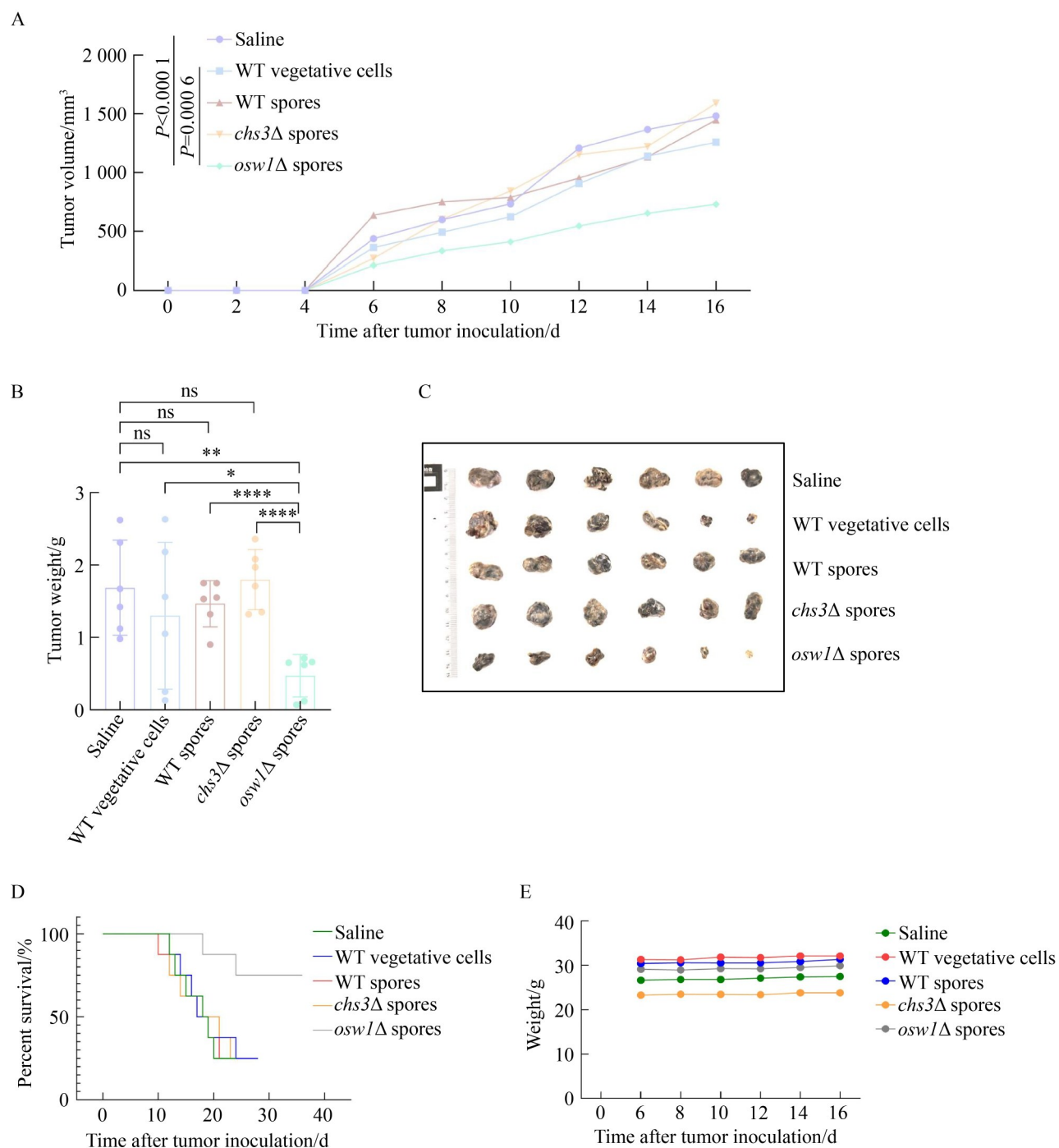


图7 孢子裂解物对小鼠黑色素瘤的影响

Figure 7 The effect of spore lysate on melanoma in mice. A: Volume of mouse melanoma grown in mice administrated with or without spores; B: Weight of mouse melanoma grown in mice administrated with or without spores; C: Images of melanoma grown in mice administrated with or without spores; D: Survival rate of mice administrated with or without spores; E: Body weight of mice 16 days after melanoma inoculation. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$; ns: No significant difference.

型中开展有效性验证, 其抗肿瘤作用的适用范围有待进一步验证; 同时, 本研究未与临床化疗或免疫检查点抑制剂等药物开展联合用药或疗效比较, 难以直接评价其在临床治疗体系中的应用潜力。

本研究证实 *osw1Δ* 突变体具有较强的免疫刺激作用, 同时揭示了通过工程化改造孢子壁可调控免疫反应强度。本研究还确定了酵母突变体孢子裂解物诱导小鼠免疫应答的最低有效剂量, 为后续剂量标准化、安全性评价及剂量优化提供了参考。此外, 本研究表明 *osw1Δ* 突变体孢子裂解物在最低有效剂量下可显著抑制黑色素瘤, 为肿瘤免疫治疗提供了新的候选制剂。与传统 β -葡聚糖制剂相比, 酵母孢子裂解物来源广泛、制备工艺相对简单, 且 *osw1Δ* 突变体的筛选进一步提高了免疫活性, 具有潜在应用价值。

作者贡献声明

谌佳: 收集实验原始数据、图片绘制及数据分析, 论文撰写及修改; 李雨晴: 辅助动物实验; 刘意博: 辅助动物实验及数据收集; 中西秀树: 指导本研究及论文修改, 数据核查, 提供资金支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Tamura K, Dejean G, van Petegem F, Brumer H. Distinct protein architectures mediate species-specific β -glucan binding and metabolism in the human gut microbiota[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100415.
- [2] Caseiro C, Dias JNR, de Andrade Fontes CMG, Bule P. From cancer therapy to winemaking: the molecular structure and applications of β -glucans and β -1,3-glucanases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(6): 3156.
- [3] Wan YJ, Xu XJ, Gilbert RG, Sullivan MA. A review on the structure and anti-diabetic (type 2) functions of β -glucans[J]. *Foods*, 2022, 11(1): 57.
- [4] Ameri Shah Reza M, Najafi S, Kahfi M, Safari M, Mahjoor M. Beta-glucans in oncology: revolutionizing treatment with immune power & tumor targeting[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2026, 399(2): 1711-1720.
- [5] Zhong X, Wang G, Li F, Fang S, Zhou S, Ishiwata A, Tonevitsky AG, Shkurnikov M, Cai H, Ding F. Immunomodulatory effect and biological significance of β -glucans[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(6): 1615.
- [6] Amirinia F, Jabroini A, Morovati H, Ardi P, Motamedi M. Fungal β -glucans: biological properties, immunomodulatory effects, diagnostic and therapeutic applications[J]. *Infectious Diseases and Clinical Microbiology*, 2025, 7(1): 1-16.
- [7] Dowdall N, Hoare T. β -1,3 glucan microparticles & nanoparticles: fabrication methods & applications in immunomodulation & targeted drug delivery[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2025, 14(14): 2501006.
- [8] Mata-Martínez P, Bergón-Gutiérrez M, del Fresno C. Dectin-1 signaling update: new perspectives for trained immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 812148.
- [9] Malamud M, Brown GD. The Dectin-1 and Dectin-2 clusters: C-type lectin receptors with fundamental roles in immunity[J]. *EMBO Reports*, 2024, 25(12): 5239-5264.
- [10] Tam JM, Mansour MK, Khan NS, Yoder NC, Vyas JM. Use of fungal derived polysaccharide-conjugated particles to probe Dectin-1 responses in innate immunity[J]. *Integrative Biology*, 2012, 4(2): 220-227.
- [11] De Marco Castro E, Calder PC, Roche HM. β -1,3/1,6-glucans and immunity: state of the art and future directions[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021, 65: 1901071.
- [12] Van Steenwijk HP, Bast A, de Boer A. Immunomodulating effects of fungal beta-glucans: from traditional use to medicine[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1333.
- [13] Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Sazanova SN, Budkevich RO, Fedortsov NM, Veziryan AA. The probiotic properties of saccharomycetes (review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2023, 59(2): 111-121.
- [14] Sarkar N, Mahajan AA, Pathak S, Seth P, Chowdhury A, Ghose I, Das S, Chowdhury R, Bera A, Dey A, Dutta A, Majumder I, Ghosh S, Rajendran RL, Gangadaran P. Beta-glucans in biotechnology: a holistic review with a special focus on yeast[J]. *Bioengineering*, 2025, 12(4): 365.
- [15] Liu JH, Li YY, Xu XH, Wu YK, Liu YF, Li JH, Du GC, Chen J, Lv XQ, Liu L. Multiplexed engineering of cytochrome P450 enzymes for promoting terpenoid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* cell factories: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2025, 81: 108560.
- [16] Fernández-Pacheco P, Ramos Monge IM, Fernández-González M, Poveda Colado JM, Arévalo-Villena M. Safety evaluation of yeasts with probiotic potential[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 659328.
- [17] Yan M, Wang X, Zhang J, Yang S, Pan C, Liu S, Liu J, Yu Y, Ding F, Duan S, Huang H, Liu G, Yuan P. Extraction, structural characterization, and *in vitro* immunomodulatory activities of *Saccharomyces cerevisiae* spore wall β -glucan[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2025, 22102116-102116.
- [18] Baek KR, Rani Ramakrishnan S, Kim SJ, Seo SO. Yeast

- cell wall mannan structural features, biological activities, and production strategies[J]. *Heliyon*, 2024, 10(6): e27896.
- [19] Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(2): 317-343.
- [20] Neiman AM. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(4): 565-584.
- [21] Durant M, Mucelli X, Huang LS. Meiotic cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*: spores that just need closure[J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(2): 132.
- [22] Lee-Soety JY, Resch G, Rimal A, Johnson ES, Benway J, Winter E. The MAPK homolog, Smk1, promotes assembly of the glucan layer of the spore wall in *S. cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2024, 41(7): 448-457.
- [23] 潘华平, 丁成华, 潘荣斌, 韩平畴, 孙悦, 高晓冬, 中西秀树. 酿酒酵母孢子壁结构及其合成相关基因研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1323-1330.
Pan HP, Ding CH, Pan RB, Ray Han PS, Sun Y, Gao XD, Nakanishi Hideki. Spore wall structure and its synthesis-associated genes in *Saccharomyces cerevisiae*: a review[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(4): 1323-1330 (in Chinese).
- [24] Zhang K, Needleman L, Zhou S, Neiman A. A novel assay reveals a maturation process during ascospore wall formation[J]. *Journal of Fungi*, 2017, 3(4): 54.
- [25] Coluccio A. Interspore bridges: a new feature of the *Saccharomyces cerevisiae* spore wall[J]. *Microbiology*, 2004, 150(10): 3189-3196.
- [26] 杜聪聪, 李雨晴, 刘国玉, 周小满, 中西秀树. 酵母子囊裂解物作为免疫刺激性膳食的补充剂[J]. *微生物学报*, 2025, 65(8): 3657-3670.
Du CC, Li YQ, Liu GY, Zhou XM, Zhong X. Yeast asci lysate as an immunostimulatory dietary supplement[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3657-3670 (in Chinese).
- [27] Coluccio A, Bogengruber E, Conrad MN, Dresser ME, Briza P, Neiman AM. Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(6): 1464-1475.
- [28] 成卓. 酿酒酵母细胞静止期退出机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2024.
Cheng Z. Studies on the mechanism of exit from quiescent state in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024 (in Chinese).
- [29] 杜聪聪. 酵母子囊裂解物的免疫活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2025.
Du CC. Studies on the immunological activity of yeast asci lysates[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2025 (in Chinese).
- [30] Liu GY, Yang Y, Tachikawa H, Gao XD, Nakanishi H. Application of yeast spores as β -glucan particles[J]. *Particuology*, 2022, 71: 34-40.
- [31] 成卓, 刘国玉, 中西秀树. 3-磷酸甘油醛对酵母孢子萌发的抑制作用分析[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(4): 42-48.
Cheng Z, Liu GY, Nakanishi Hideki. Analysis of inhibitory effect of 3-glyceraldehyde phosphate in yeast spore germination[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 51(4): 42-48 (in Chinese).
- [32] Son J, Hwang Y, Hong EM, Schulenberg M, Chai H, Jo HG, Lee D. Effects of dietary yeast β -1,3/1,6-D-glucan on immunomodulation in RAW 264.7 cells and methotrexate-treated rat models[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(20): 11020.
- [33] Vuscan P, Kischkel B, Hatzioannou A, Markaki E, Sarlea A, Tintoré M, Cuñé J, Verginis P, de Lecea C, Chavakis T, Joosten LAB, Netea MG. Potent induction of trained immunity by *Saccharomyces cerevisiae* β -glucans[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1323333.
- [34] Xu JL, Ma QL, Zhang Y, Fei ZY, Sun YF, Fan Q, Liu B, Bai JY, Yu Y, Chu JH, Chen JR, Wang C. Yeast-derived nanoparticles remodel the immunosuppressive microenvironment in tumor and tumor-draining lymph nodes to suppress tumor growth[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 110.
- [35] Pradhan A, Nev AO, Leaves I, Nev AO, Ma Q, Milne G, Patterson G, Netea GM, Erwig PL, Farrer R, Brown G, Berg AH, Gow NAR, Brown AJ. Protein kinase A signaling regulates immune evasion by shaving and concealing fungal β -1,3-glucan[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(24): e2423864122.