

槲皮素诱导阿萨希毛孢子菌凋亡的作用机制

郭昊宸^{1,2#}, 徐龄智^{1,2#}, 杨鑫², 夏志宽^{1,2*}, 杨蓉娅^{1,2*}

1 南方医科大学 第二临床医学院, 广东 广州

2 中国人民解放军总医院第七医学中心 皮肤科, 北京

郭昊宸, 徐龄智, 杨鑫, 夏志宽, 杨蓉娅. 槲皮素诱导阿萨希毛孢子菌凋亡的作用机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1394-1411.
GUO Haochen, XU Lingzhi, YANG Xin, XIA Zhikuan, YANG Rongya. Mechanism of quercetin-induced apoptosis in *Trichosporon asahii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1394-1411.

摘要: 【目的】评估槲皮素在体外对阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)的抑菌作用, 并探究其诱导真菌凋亡的分子机制。【方法】依据 CLSI M27-A3 方案测定槲皮素对 9 株 *T. asahii* 浮游菌及生物膜形成的抑制作用。在此基础上检测槲皮素干预后菌株细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteinyI aspartate-specific proteinase 3, Caspase-3)活性的变化, 随后利用转录组测序分析差异表达基因。【结果】槲皮素对 *T. asahii* 的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentrations, MICs)为 8-32 $\mu\text{g/mL}$, 且能有效抑制其生物膜形成。细胞实验表明, 槲皮素通过诱导 ROS 累积、降低 MMP 并激活 Caspase-3 引发细胞凋亡。转录组数据从基因表达水平进一步证实了上述机制。【结论】槲皮素主要通过诱导氧化应激介导的细胞凋亡发挥抗 *T. asahii* 作用。

关键词: 槲皮素; 抗真菌; 阿萨希毛孢子菌

Mechanism of quercetin-induced apoptosis in *Trichosporon asahii*

GUO Haochen^{1,2#}, XU Lingzhi^{1,2#}, YANG Xin², XIA Zhikuan^{1,2*}, YANG Rongya^{1,2*}

1 The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China

2 Department of Dermatology, The Seventh Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

Abstract: [Objective] To evaluate the *in vitro* antifungal activity of quercetin against *Trichosporon asahii* and investigate its molecular mechanism of inducing fungal apoptosis. **[Methods]** According

资助项目: 国家自然科学基金(82373494)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82373494).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: XIA Zhikuan, zhikuan_xia@163.com; YANG Rongya, yangrya@sina.com

Received: 2025-12-23; Accepted: 2026-01-15; Published online: 2026-01-28

to the CLSI M27-A3 protocol, the inhibitory effects of quercetin on planktonic cells and biofilm formation of nine *T. asahii* strains were determined. On this basis, changes in intracellular reactive oxygen species (ROS) level, mitochondrial membrane potential (MMP), and cysteinyl aspartate-specific proteinase 3 (Caspase-3) activity were measured following quercetin intervention. Subsequently, transcriptome sequencing was utilized to verify and analyze the differentially expressed genes. **[Results]** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of quercetin against *T. asahii* ranged from 8 to 32 $\mu\text{g/mL}$, and quercetin effectively inhibited biofilm formation. Cellular experiments indicated that quercetin triggered apoptosis by inducing ROS accumulation, reducing MMP, and activating Caspase-3. Transcriptomic data further confirmed the aforementioned mechanisms at the gene expression level. **[Conclusion]** Quercetin exerts antifungal activity against *T. asahii* primarily by inducing oxidative stress-mediated apoptosis.

Keywords: quercetin; antifungal; *Trichosporon asahii*

阿萨希毛孢子菌属于酵母类条件致病菌, 可引发发病率较低但致死率高的侵袭性真菌病, 该病多见于免疫低下或重症感染的患者^[1]。2003年, 我科在国内首次报道了该菌引起的播散性毛孢子菌病^[2]。

临床治疗侵袭性毛孢子菌病的抗真菌药物主要为唑类、多烯类和棘白素类^[3]。氟康唑是常用唑类药物, 在体内外均具有良好的抑菌活性, 但由于其仅具抑菌作用, 长期或反复使用易诱导耐药性产生, 给临床治疗带来挑战^[1]。Oliveira dos Santos 等^[4]也发现毛孢子菌胆管炎对唑类药物的敏感性降低。在多烯类药物中, 两性霉素 B 对毛孢子菌属的体外抑菌活性有限, 棘白素类药物的抑菌效果也不理想^[5-7]。新药研发周期长、成本高, 而天然小分子化合物资源丰富, 成为潜在的药物开发方向。

槲皮素是一种天然黄酮类化合物, 广泛存在于苹果、葡萄、洋葱、西蓝花、茶叶及其他可食用浆果等水果和蔬菜中, 研究证实其具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤等多种生物活性, 且对念珠菌属、隐球菌属和曲霉属等多种真菌表现出广谱抗真菌潜力^[8]。然而, 其对阿萨希毛孢子菌的具体抗菌活性及相关作用机制尚不明确。

为系统评估槲皮素对阿萨希毛孢子菌的抗

真菌特性, 本研究采用微量肉汤稀释法和扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)技术测定其抑菌活性及对细胞超微结构的影响, 并通过检测胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)及 Caspase 样蛋白酶活性, 结合转录组学分析深入解析其诱导真菌凋亡的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究共使用 9 株阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)菌株, 包括 1 株临床标准株 CBS 2479 和 8 株临床分离株, 均保存在中国人民解放军总医院第七医学中心皮肤科实验室。所有菌株均在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冻存备用。实验前将冻存菌株接种于 PDA 平板, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中复苏活化, 随后转移至 YPD 液体培养基以制备 *T. asahii* 菌悬液。

1.2 药物敏感性实验

采用微量肉汤稀释法, 参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)颁布的 M27-A3 方案测定槲皮素对 *T. asahii* 的体外抗真菌活性^[9]。

槲皮素(纯度 $\geq 99.8\%$; CAS: 117-39-5),

MedChemExpress 公司, 用二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制为 25 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液, 使用时用 RPMI 1640 培养基(Gibco 公司)稀释至工作浓度, 确保各实验组 DMSO 终浓度 $\leq 1\%$ 。氟康唑(CAS: 86386-73-4), Sigma-Aldrich 公司, 以无菌蒸馏水配制成 1 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存备用。槲皮素在无菌离心管中进行倍比稀释, 获得 2–256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度梯度, 氟康唑工作浓度设为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。收集 YPD 液体培养基中培养的菌液, 1 000 r/min 离心 5 min, 用 RPMI 1640 培养基重悬洗涤后, 调整至 1×10^3 CFU/mL。在 96 孔板每孔中加入 100 μL 不同浓度药液及等体积菌悬液, 终体系为 200 μL , 同时设生长对照孔及质控菌株孔。接种后于 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养 48 h。实验独立重复 3 次, 每次设 3 个复孔。肉眼判定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 确保质控菌株 MIC 值符合 CLSI 可接受范围。

1.3 斑点稀释试验

取 PDA 平板上的新鲜 *T. asahii* 菌落, 刮取菌体重悬于 YPD 液体培养基, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min 培养过夜。收集对数期菌液, 1 000 r/min 离心 5 min 后无菌生理盐水洗涤 2 次, 重悬并调整至 1×10^6 CFU/mL。将该菌悬液与终浓度分别为 32、64、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槲皮素工作液等体积混合, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 、300 r/min 共培养 8 h。各组菌-药混合液依次进行 10、100、1 000 倍梯度稀释, 各取 10 μL 点种于 PDA 平板, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养 12 h 后观察记录并拍照。

1.4 真菌细胞活力分析

采用 CCK-8 试剂盒(北京中生奥邦生物科技有限公司)检测槲皮素对 *T. asahii* 细胞活力的影响: 取 YPD 液体培养基中对数期菌液, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤后重悬调整至 1×10^6 CFU/mL, 接种于 96 孔板并分别加入 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素工作液, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 、

300 r/min 培养 24 h。培养结束弃上清, 每孔加入 100 μL RPMI 1640 培养基及 10 μL CCK-8 试剂, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 1 h。用酶标仪测定各孔吸光度(OD_{450})值, 细胞存活率计算如公式(1)所示。

$$\text{细胞存活率} = \frac{(\text{实验孔 } OD - \text{空白孔 } OD)}{(\text{对照孔 } OD - \text{空白孔 } OD)} \times 100\% \quad (1)$$

为探讨凋亡是否参与抑菌作用, 另设实验组: 用凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK (MedChemExpress 公司)预处理菌液 3 h 后, 加入 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素共培养 24 h。后续按上述步骤进行 CCK-8 检测并计算存活率。

1.5 扫描电镜观察

收集 YPD 过夜培养的菌悬液, 1 000 r/min 离心 5 min 后用生理盐水清洗 2–3 次, 重悬至 1×10^7 CFU/mL。实验组加入 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素, 对照组加入等体积生理盐水, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min 摇床培养 24 h。1 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 用生理盐水清洗 2–3 次, 40 μm 细胞滤网过滤菌丝, 再次离心保留菌沉淀, 加入电镜固定液室温避光固定 2 h 后转移至 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。样本经 30%–100% 梯度乙醇脱水(各浓度 10 min), 真空干燥仪低真空干燥后, 用导电胶将样本黏附至导电座, 用真空蒸发器喷镀 50–300 \AA 金属膜以增强导电性, 最后用扫描电子显微镜观察记录细胞形态及表面结构。

1.6 生物膜实验

YPD 过夜培养菌悬液经生理盐水清洗 3 次, RPMI 1640 重悬至 1×10^6 CFU/mL, 转移至 6 孔板构建体外生物膜, 每孔加入终浓度分别为 16、32、64、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槲皮素。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 6 h (黏附阶段), 弃上清并清洗 2–3 次去除悬浮真菌, 继续培养至 24 h (形成阶段)、48 h (成熟阶段), 每 12 h 更换药物。采用 XTT 还原法(酶标仪测 OD_{490} 值)和结晶紫染色法(酶标仪测 OD_{590} 值)分别评估生物膜代谢活性及生物量^[10–11], 按公式(2)计算。

生物膜相对代谢活性(或生物膜相对生物量)=
[(该孔OD值-阴性对照孔OD值)/
(阳性对照孔OD值-阴性对照孔OD值)] (2)
以含 RPMI 1640 培养基的真菌为阳性对照,
不含药物和真菌的孔为阴性对照, 每孔设 3 个
生物学重复。

1.7 细胞内活性氧检测

采用 DCFH-DA 探针(上海碧云天生物技术股份有限公司)检测槲皮素处理后 *T. asahii* 胞内 ROS 水平。按 1.2 节方法制备菌悬液并接种于 24 孔板, 设未处理组为对照, 干预组分别加入 32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素共培养 24 h。加入终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 探针, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 避光孵育 20 min, 用生理盐水清洗 2-3 次去除未进入细胞的探针。用荧光显微镜观察绿色荧光强度, 荧光分光光度计于激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 下定量检测荧光值。

1.8 线粒体膜电位检测

采用 JC-1 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)评估槲皮素对 *T. asahii* 线粒体膜电位的影响, 菌悬液制备及药物处理同 1.2 节。JC-1 工作液配制: 将 50 μL JC-1 (200 \times)加入 8 mL 超纯水稀释, 剧烈振荡混匀后, 再加入 2 mL JC-1 染色缓冲液(5 \times)混匀。药物干预 24 h 后, 1 000 r/min 离心 5 min, 清洗收集菌体。每 1×10^6 个真菌细胞加入 500 μL RPMI 1640 及 500 μL JC-1 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。孵育后离心弃上清, 用 JC-1 染色缓冲液(1 \times)洗涤 2 次, 缓冲液重悬后用荧光显微镜观察拍照记录。

1.9 Caspase-3 检测

采用 Caspase-3 活性检测试剂盒(Caspase-3 Activity Assay Kit, 北京索莱宝科技有限公司)检测 *T. asahii* 胞内 Caspase 样蛋白酶活性。菌悬液配制同 1.2 节, 32 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素干预 24 h 后离心收集细胞, 加入 100 μL 裂解液, 冰上静置 15 min。根据说明书, 将各试剂混合后在 405 nm 检测吸光度并绘制标准曲线, 计算样本浓度。

1.10 转录组测序

在 YPD 培养基中将 *T. asahii* CBS 2479 菌悬液调整至 1×10^7 CFU/mL 作为对照组。将上述菌悬液与终浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ 的槲皮素共培养, 作为干预组。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 24 h, 收集真菌细胞并用无菌 PBS 清洗 3 次。将真菌沉淀迅速冷冻在液氮中保存。转录组实验由广州基迪奥生物科技有限公司完成, 包括总 RNA 提取、oligo (dT)富集 mRNA、RNA 断裂、随机六聚体引物 cDNA 合成、大小选择、PCR 扩增、DNBSEQ-T7 测序。

1.11 数据可用性

本转录组数据已提交至 NCBI 读取存档库(编号为 SRP638796)和 BioProject (编号为 PRJNA1355440)。

1.12 数据分析

采用 GraphPad Prism 10.4.1 软件(GraphPad Software, San Diego)进行统计学分析及绘图, 计量资料以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey 检验进行比较。 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 药物敏感性实验

根据微量棋盘稀释法, 以氟康唑作为阳性对照药物, 检测了槲皮素对 9 株 *T. asahii* 浮游细胞的体外药物敏感性, 结果见表 1。实验结果表明, 槲皮素对所有受试菌株(9/9)均表现出抑菌活性, 其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentrations, MICs)介于 8-32 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 氟康唑的 MICs 均为 4 $\mu\text{g/mL}$ 。值得注意的是, 菌株 BMT 04782 对槲皮素极为敏感, 其 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$; 当槲皮素浓度在 32 $\mu\text{g/mL}$ 及以上时该菌株 48 h 未见菌落生长, 抑菌作用具有浓度依赖性。上述结果提示, 槲皮素在体外对 *T. asahii* 有较强的抑菌作用。

表1 槲皮素和氟康唑对 *Trichosporon asahii* 体外药敏 MIC 值

Table 1 MIC of quercetin and fluconazole against *Trichosporon asahii*

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Fluconazole	Quercetin
CBS 2479	4	32
0901	4	16
0705	4	32
06198	4	16
0902	4	32
0701	4	32
0703	4	32
04782	4	8
08012	4	32

2.2 槲皮素对阿萨希毛孢子菌的生长抑制作用

为直观评估槲皮素对 *T. asahii* 的体外生长抑制效果, 本研究采用琼脂点板法进行可视化分析。将经不同浓度槲皮素处理的菌悬液分别稀释 10、100 及 1 000 倍后点种, 代表性菌株 CBS 2479 与 BMT 0901 的结果如图 1A 所示。随着槲皮素浓度升高, 菌落形态显著减小, 数量也明显减少, 在 1 000 倍稀释条件下, 多数仅见单个或零星点状菌落存在。该结果进一步证实, 槲皮素在体外可有效抑制 *T. asahii* 的生长, 且抑制效果呈浓度依赖性。

2.3 槲皮素干预后细胞活力

采用 CCK-8 法检测槲皮素对 *T. asahii* 细胞活力的影响。如图 1B 所示, *T. asahii* 标准菌株 CBS 2479 经 32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素处理 24 h 后, 细胞活力分别降至 36%、27% ($P < 0.05$), 提示槲皮素在体外可显著抑制 *T. asahii* 细胞活力, 且呈浓度依赖性。

2.4 扫描电镜

扫描电镜结果显示(图 1C), 对照组 *T. asahii* 孢子和菌丝绝大部分形态规则, 表面光滑完整, 孢子呈光滑圆形, 仅有少量皱缩。经 32 $\mu\text{g/mL}$

槲皮素处理的 *T. asahii* 形态不规则, 表面粗糙, 部分外观可见严重萎缩畸形, 菌丝有明显的扭曲和折叠, 失去正常孢子/菌丝的形态。这些结果表明, 槲皮素会破坏 *T. asahii* 的正常形态。

2.5 生物膜实验

采用 XTT 法与结晶紫染色法检测生物膜的代谢活性与生物量(图 2)。结果显示, 槲皮素对 *T. asahii* 生物膜各发育阶段均呈现不同程度的抑制作用, 且呈剂量依赖性。XTT 法结果显示, 32 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素可有效抑制生物膜的黏附与形成阶段, 随着生物膜发育至成熟阶段, 菌体对槲皮素的耐受性逐渐增强, 128 $\mu\text{g/mL}$ 处理组使代谢活性下降约 25%。结晶紫染色结果进一步表明(图 3), 与对照组相比, 槲皮素可显著降低生物膜生物量, 然而即便在高浓度(128 $\mu\text{g/mL}$) 干预下, 其对成熟生物膜的抑制效果仍较有限, 生物量仅降低约 30%, 这与 XTT 法所反映的趋势一致。槲皮素可显著干扰阿萨希毛孢子菌生物膜早期黏附与形成, 虽成熟生物膜对其耐受性增强, 但整体抑制效果仍彰显其重要研究价值。

2.6 槲皮素诱导 *T. asahii* 发生氧化应激与线粒体功能障碍

氧化应激与线粒体功能障碍是许多抗真菌化合物引发细胞死亡的关键上游事件。为进一步探究其潜在的作用机制, 本研究检测了槲皮素处理对 *T. asahii* 细胞 ROS 水平和线粒体膜电位的影响。如图 4A、4B 所示, 与对照组相比, 经 32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素处理后, 胞内 ROS 水平显著升高, 其荧光强度分别达到对照组的 1.83 倍和 2.68 倍。

荧光显微镜下绿色荧光信号随浓度升高显著增强。JC-1 染色结果显示(图 4C), 对照组细胞中红色荧光聚集明显, 绿色荧光较弱; 而经槲皮素处理后, 细胞内绿色荧光随药物浓度增加而增强, 提示 MMP 呈浓度依赖性下降。

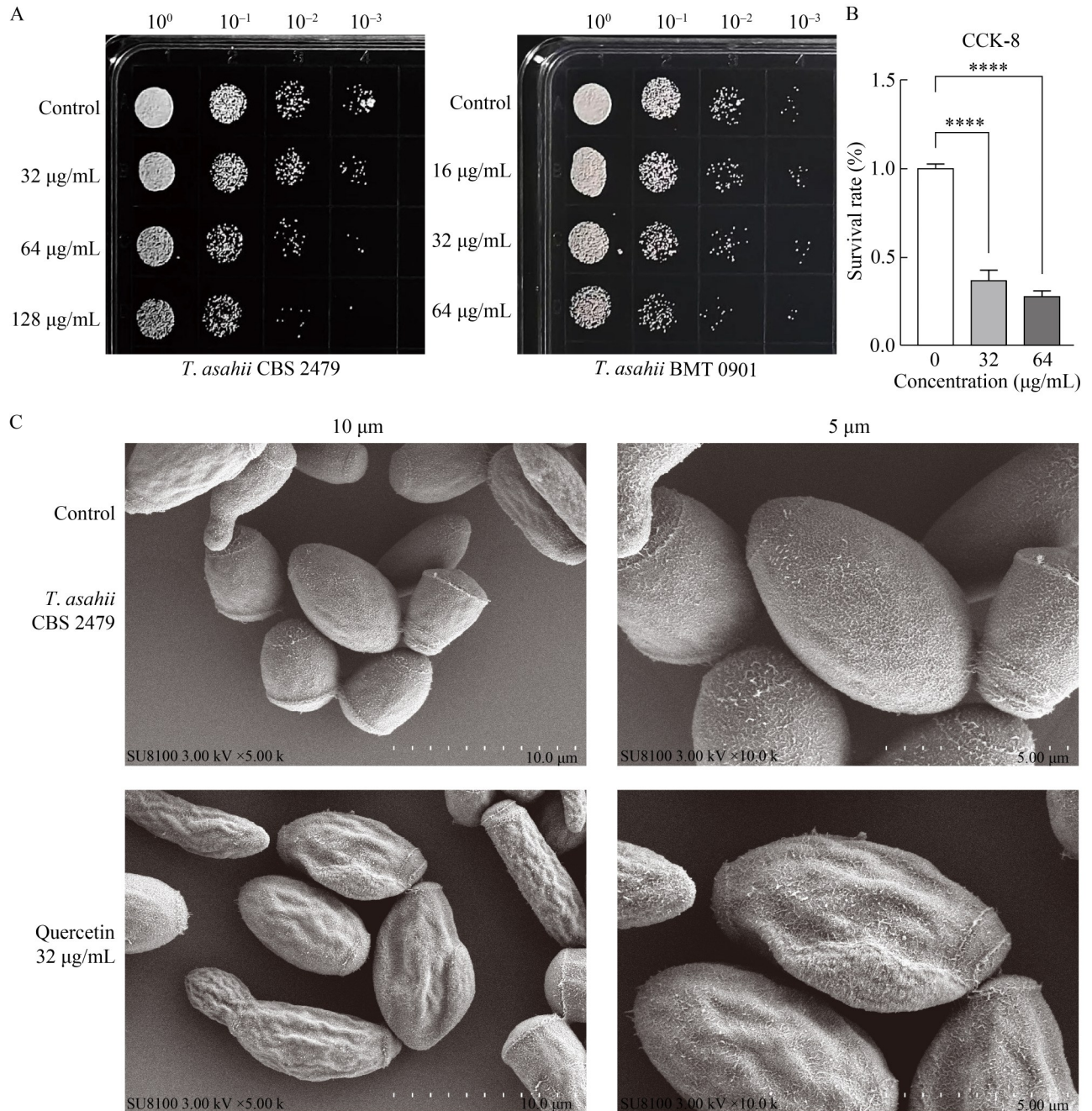


图1 槲皮素显著抑制阿萨希毛孢子菌增殖并破坏其细胞超微结构。A: 菌株CBS 2479和BMT 0901的斑点稀释试验; B: 不同浓度药物处理后CBS 2479的细胞活力测定($n=3$) (与生长对照相比, ****: $P<0.0001$); C: 扫描电镜(SEM)观察细胞表面的超微结构特征。

Figure 1 Quercetin inhibits the proliferation of *Trichosporon asahii* and disrupts cellular ultrastructure. A: To visualize quercetin's inhibitory effects on *T. asahii* growth, agar spot assays were conducted using representative strains CBS 2479 and BMT 0901 diluted 10, 100, and 1 000 fold; B: Following treatment with *T. asahii* (standard strain CBS 2479), CCK-8 assay results were assessed at varying doses ($n=3$) (****: $P<0.0001$ vs. growth control); C: Scanning electron microscopy (SEM) revealed the ultrastructural details of cell surfaces.

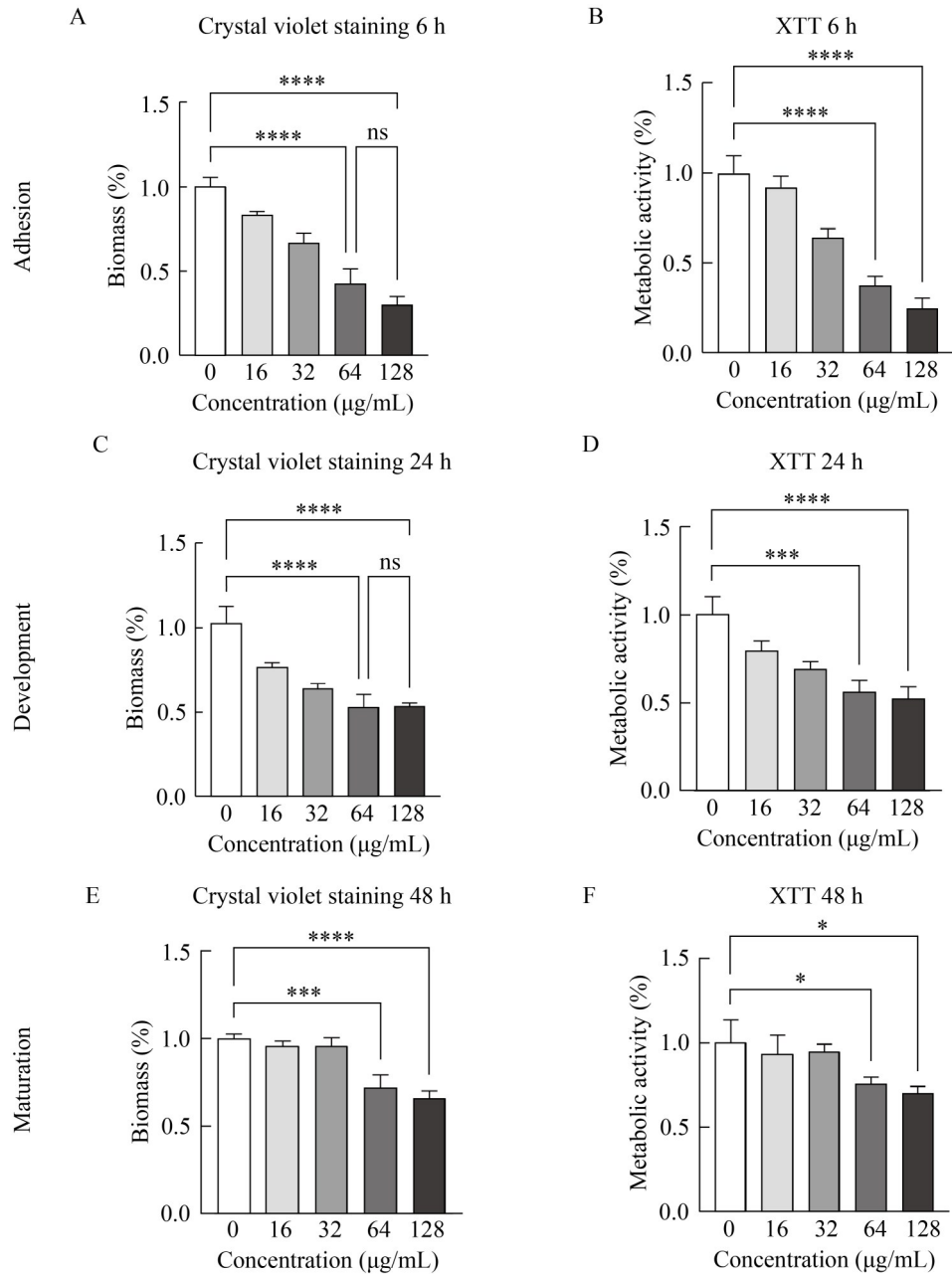


图2 槲皮素对阿萨希毛孢子菌生物膜的抑制效应。A、B：不同浓度槲皮素处理对黏附阶段生物膜生物量和代谢活性的影响；C、D：不同浓度槲皮素处理对形成阶段生物膜生物量和代谢活性的影响；E、F：不同浓度槲皮素处理对成熟阶段生物膜生物量和代谢活性的影响。*表示 $P<0.05$ ；***表示 $P<0.001$ ；****表示 $P<0.0001$ ；ns表示无显著差异($P>0.05$)。

Figure 2 Inhibitory effects of quercetin on *Trichosporon asahii* biofilms. A, B: Effects of quercetin at different concentrations on biofilm biomass and metabolic activity during the adhesion stage; C, D: Effects of quercetin at different concentrations on biofilm biomass and metabolic activity during the formation stage; E, F: Effects of quercetin at different concentrations on biofilm biomass and metabolic activity during the maturation stage. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$; ns: No significant difference ($P>0.05$).

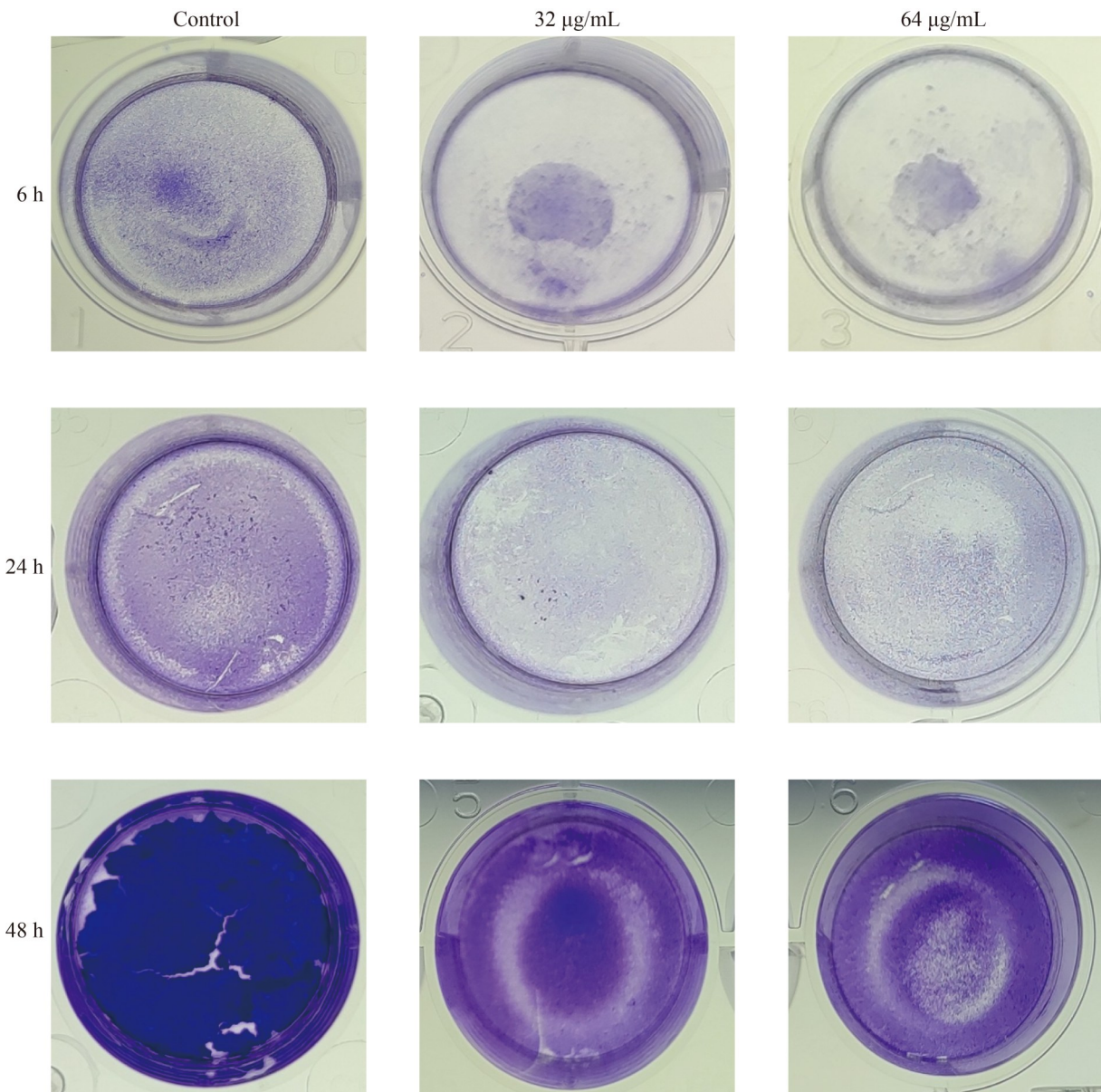


图3 槲皮素对不同阶段生物被膜的抑制作用。结晶紫染色显示, 在6、24、48 h时药物处理组的生物被膜生物量显著减少。

Figure 3 Inhibitory effect of quercetin on biofilm formation at different stages. Crystal violet staining revealed a significant reduction in biofilm biomass in drug-treated groups at 6, 24, and 48 h.

2.7 槲皮素诱导的 Caspase-3 样蛋白酶活性可被 Z-VAD-FMK 抑制

上述结果表明, 槲皮素处理引发了 *T. asahii* 严重的氧化应激与线粒体功能障碍。这些事件通常是启动真菌细胞程序性死亡(apoptosis-like

cell death)的关键上游信号。为进一步探究槲皮素是否最终启动了凋亡样程序, 本研究检测了细胞中 Caspase-3 样蛋白酶的活性, 同时使用广谱 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 进行共处理。结果如图 5 所示, 经 32 µg/mL 槲皮素处理 24 h

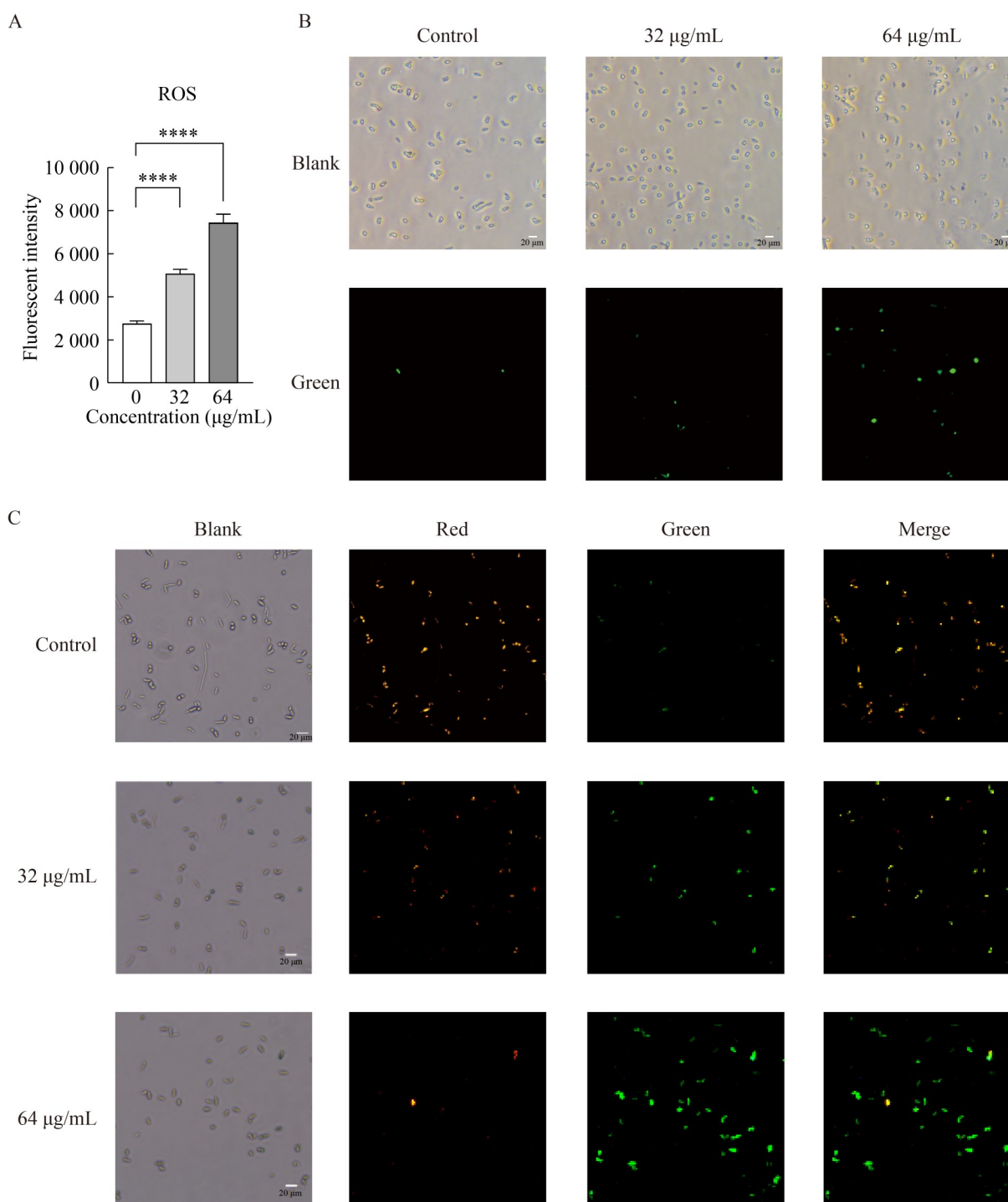


图4 槲皮素诱导阿萨希毛孢子菌胞内活性氧积累并降低线粒体膜电位

Figure 4 Quercetin induces intracellular ROS accumulation and reduces mitochondrial membrane potential in *Trichosporon asahii*. A, B: Intracellular ROS levels assessed by fluorescence microscopy (A) and quantitative analysis (B); C: Visualization of mitochondrial membrane potential (MMP). ****: $P < 0.0001$.

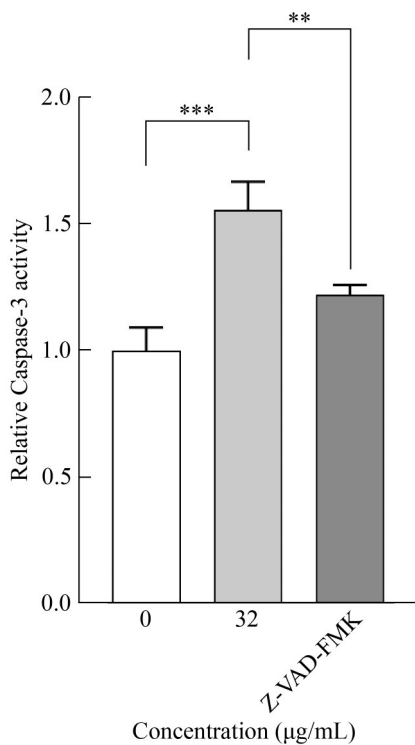


图5 槲皮素对阿萨希毛孢子菌metacaspase酶活的影响

Figure 5 Effect of quercetin on metacaspase activity in *Trichosporon asahii*. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

后, *T. asahii* 细胞中 Caspase-3 样蛋白酶活性显著升高, 为对照组的 1.55 倍。在加入广谱 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 后, 该酶活性被抑制约 33% ($P < 0.01$)。这一结果证实, 槲皮素诱导的 *T. asahii* 死亡过程伴随着 Caspase 依赖性蛋白酶的特异性激活。

2.8 槲皮素引起的细胞活力下降可被 Z-VAD-FMK 部分逆转

为确认 Caspase 抑制剂能否逆转槲皮素的细胞毒性, 本研究平行检测了 Z-VAD-FMK 对槲皮素所致细胞活力下降的影响。如图 6 所示, 单独使用槲皮素可使细胞活力下降至约 36%, 而在 Z-VAD-FMK 存在条件下, 细胞活力可恢复至约 62%, 与对照组相比差异显著。这一结果证实, 阻断 Caspase 样蛋白酶的活性可以有效逆转药物造成的细胞死亡。

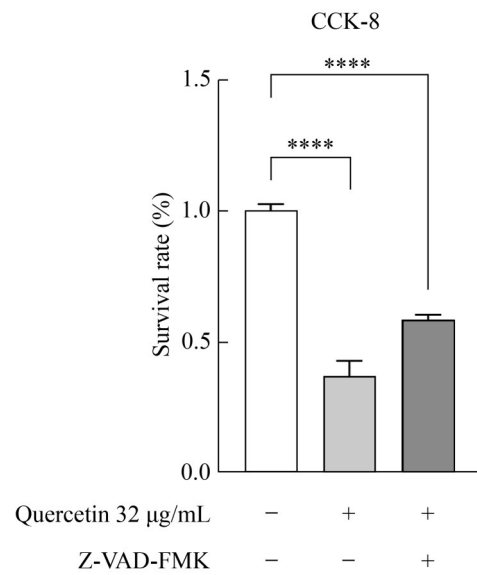


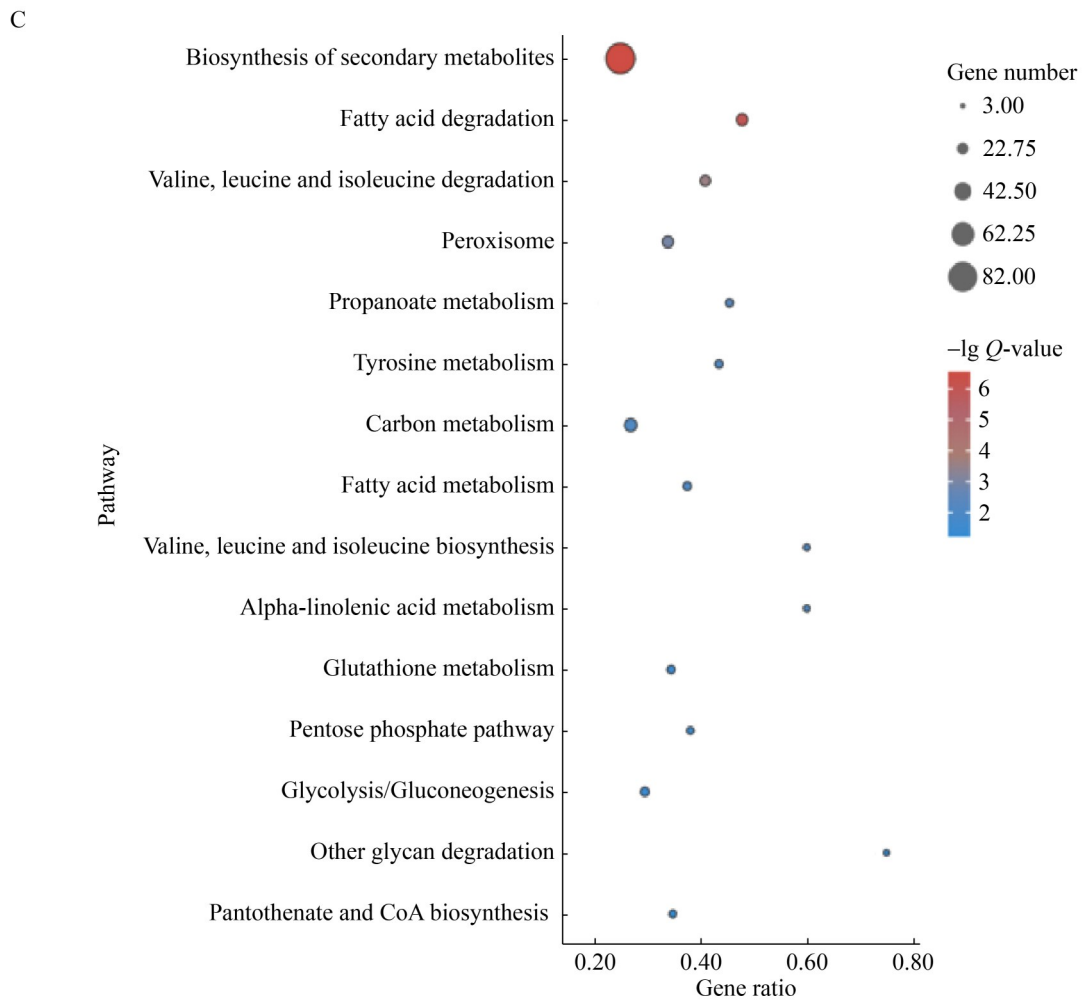
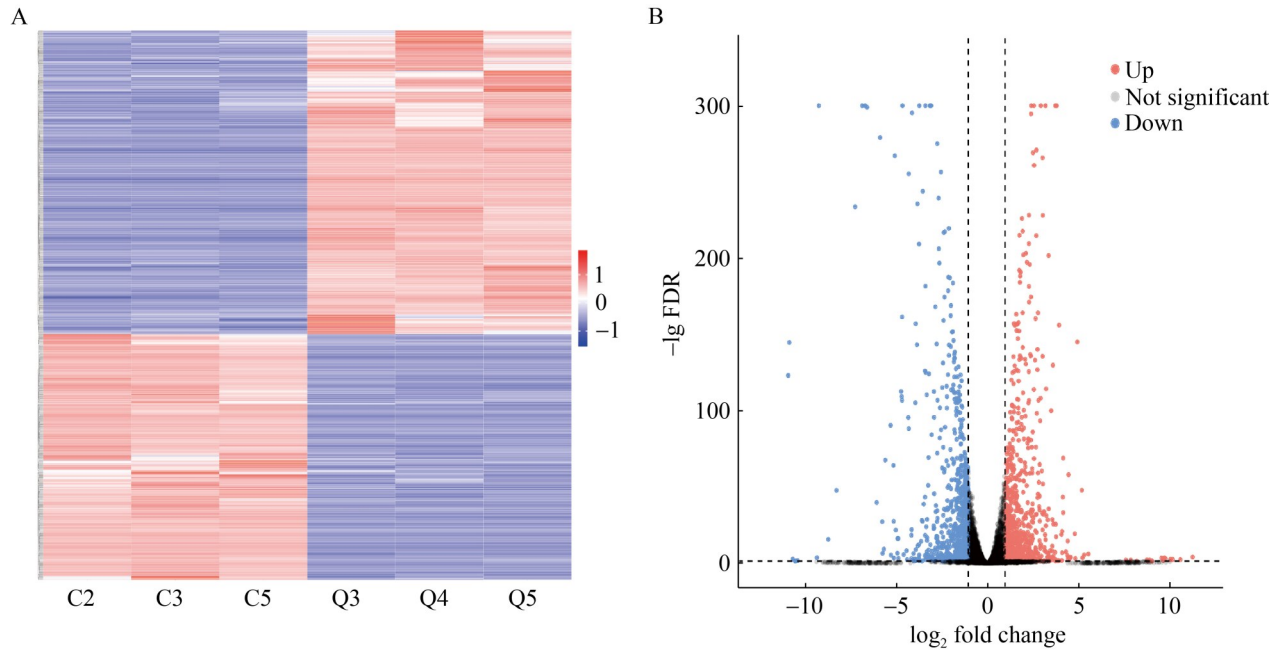
图6 Z-VAD-FMK对槲皮素抑制阿萨希毛孢子菌增殖的影响

Figure 6 Evaluation of the effect of Z-VAD-FMK on quercetin-induced inhibition of *Trichosporon asahii* proliferation by the CCK-8 method. ****: $P < 0.0001$.

2.9 转录组分析揭示槲皮素抗 *T. asahii* 作用机制

为从分子源头阐释上述表型, 本研究对槲皮素处理的 *T. asahii* 细胞进行了转录组测序与分析。本研究对两组样本进行 RNA 测序, 质控后比对至 *T. asahii* 参考基因组。主成分分析显示对照组与处理组转录谱差异显著[原始数据存储在 国家微生物科学数据中心(<http://nmcdc.cn>), 编号为 NMDCX0002206]。经 DESeq2 进行差异表达分析(筛选阈值: fold change > 2, FDR < 0.05), 共鉴定到 1 652 个差异表达基因(differential expressed genes, DEGs), 其中 912 个基因上调(\log_2 fold change > 1), 740 个基因下调(编号为 NMDCX0002206)。火山图呈现其表达量变化与统计显著性分布, 层次聚类热图显示同组生物学重复表达模式高度一致(图 7A、7B)。

基于差异倍数(\log_2 fold change 表示), 将表



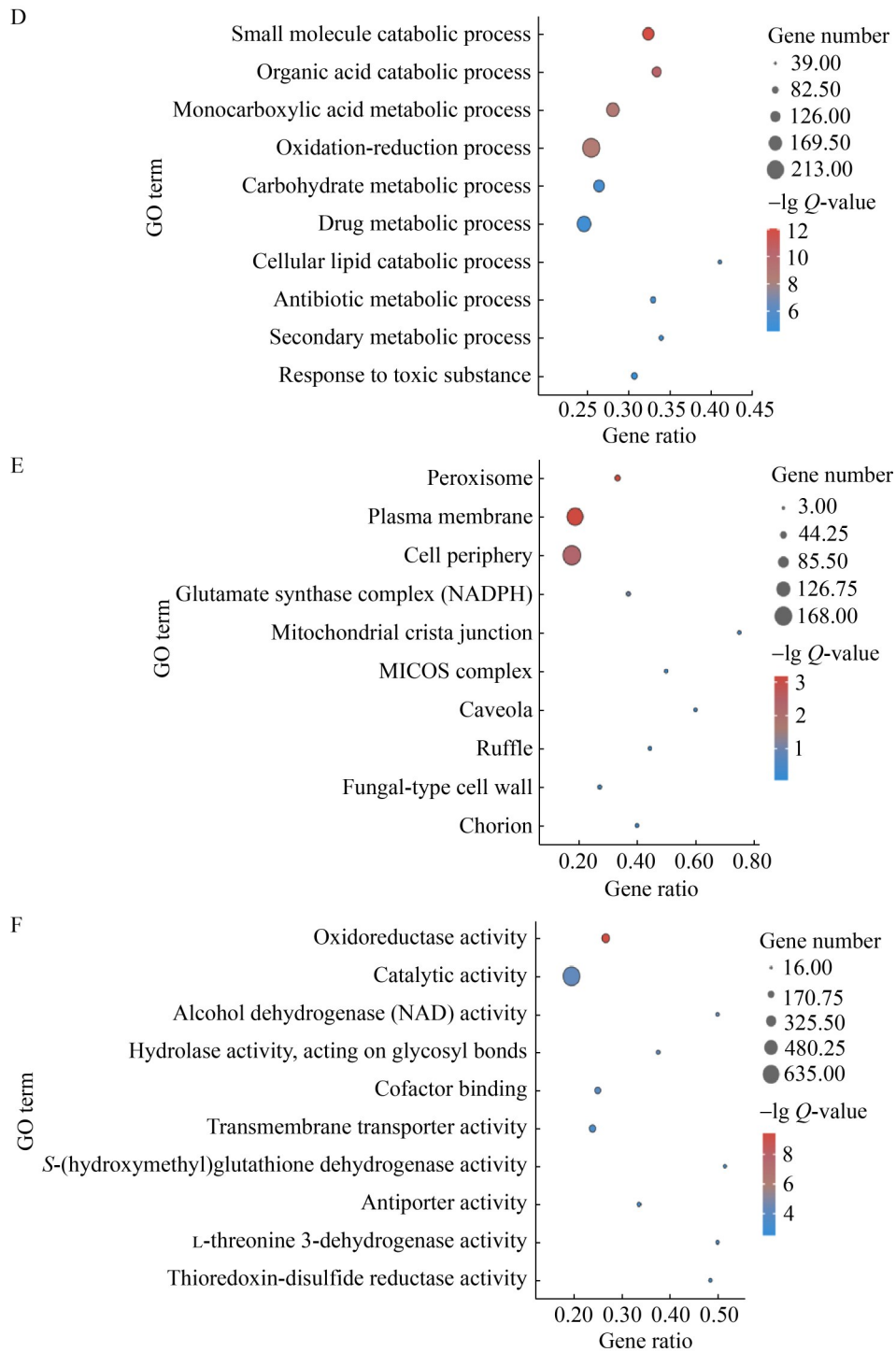


图7 槲皮素诱导阿萨希毛孢子菌CBS 2479的转录组差异

Figure 7 Transcriptome differences induced by quercetin in *Trichosporon asahii* CBS 2479. A: Heatmap of DEGs; B: Volcano plot of DEGs (Red represents upregulated DEGs, and blue represents downregulated DEGs); C: Top 15 KEGG pathways; D–F: Top 10 biological processes/cellular component/molecular function terms in GO categories.

达上调和下调的前 10 位差异基因(各 10 个, 共 20 个)汇总在表 2。上调差异基因主要涉及应激感知(A1Q1_07006、A1Q1_05528)、代谢调节(A1Q1_04258, 涉及氮代谢、糖代谢、氨基酸代谢)、解毒(A1Q1_04538)和膜修复(A1Q1_04655、A1Q1_05323)。下调差异基因主要集中在氧化磷酸化(A1Q1_06712、A1Q1_03257)、蛋白质翻译(A1Q1_01058、A1Q1_02155)、氨基酸与硫代谢(A1Q1_01057、A1Q1_03623)和自噬(A1Q1_07275)。

对差异基因进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析(涵盖生物过程、分子功能与细胞组分)。在生物过程类中(编号为 NMDCX0002206), 显著富集的条目主要与小分子分解代谢(GO:

0044282)、羧酸分解代谢(GO: 004639)、氧化还原过程(GO: 0055114)和有机酸代谢(GO: 0006082)显著富集(图 7D), 表明槲皮素处理迫使细胞进入了分解代谢状态, 这种状态通常意味着细胞在应激下加速分解自身物质(如脂类、氨基酸)以获取能量和前体, 这不仅是一种代偿反应, 更可能预示着能量稳态的崩溃, 与程序性细胞死亡的代谢特征相符。同时, 氧化还原过程的富集直接印证了本研究观察到的 ROS 水平急剧升高, 而药物代谢过程的激活则反映了细胞对外源毒性物质的识别与抵抗。

在分子功能类中(编号为 NMDCX0002206), 氧化还原酶活性(GO: 0016491)、辅酶结合(GO: 0050662)和催化活性(GO: 0003824)也被广泛富

表2 槲皮素干预阿萨希毛孢子菌后表达前20的差异基因

Table 2 Top 20 DEGs in *Trichosporon asahii* responding to quercetin

ID	Symbol	log ₂ FC	Description	Regulation
ncbi_25989881	A1Q1_06369	11.234 817 430	NmrA-like domain-containing protein	Up
ncbi_25988470	A1Q1_04958	10.563 514 080	Large ribosomal subunit protein eL34	Up
ncbi_25990518	A1Q1_07006	10.141 681 420	EF-hand domain-containing protein	Up
ncbi_25989040	A1Q1_05528	10.031 586 340	G-protein alpha subunit Cga2	Up
ncbi_25990741	A1Q1_07229	9.757 667 798	ATPase	Up
ncbi_25989086	A1Q1_05574	9.698 704 667	Glycosyl hydrolase family 13 catalytic domain-containing protein	Up
ncbi_25987771	A1Q1_04258	9.667 111 542	Tryptophan synthase beta chain-like PALP domain-containing protein	Up
ncbi_25988167	A1Q1_04655	9.635 415 827	FYVE-type domain-containing protein	Up
ncbi_25988051	A1Q1_04538	9.534 627 120	Aldehyde dehydrogenase domain-containing protein	Up
ncbi_25988835	A1Q1_05323	9.017 736 364	Membrane organization and biogenesis-related protein	Up
ncbi_25984572	A1Q1_01058	-10.835 341 700	Transcription factor domain-containing protein	Down
ncbi_25984571	A1Q1_01057	-10.772 125 900	SnoaL-like domain-containing protein	Down
ncbi_25990224	A1Q1_06712	-10.584 649 380	Cytochrome c oxidase subunit	Down
ncbi_25987136	A1Q1_03623	-10.460 455 900	Cystathionine gamma-lyase (EC 4.4.1.1) (gamma-cystathionase)	Down
ncbi_25985669	A1Q1_02155	-10.399 811 960	Structural constituent of ribosome	Down
ncbi_25990385	A1Q1_06873	-10.327 178 360	Uncharacterized protein	Down
ncbi_25990787	A1Q1_07275	-9.260 527 550	Autophagy-related protein 11	Down
ncbi_25986821	A1Q1_03308	-9.168 655 733	Transferase family protein	Down
ncbi_25991388	A1Q1_07876	-8.645 415 018	Hypothetical protein	Down
ncbi_25986770	A1Q1_03257	-8.201 912 314	D-lactate dehydrogenase (cytochrome) (EC 1.1.2.4)	Down

集(图 7F), 表明 *T. asahii* 为对抗槲皮素引发的剧烈氧化应激而启动了全方位抗氧化转录响应。然而, 这种大规模的酶系统动员恰恰从基因表达层面证实了氧化损伤的严重性。本研究观察到的 ROS 积累表明, 这种防御反应不足以恢复稳态, 持续的氧化还原失衡是导致后续线粒体损伤和触发 Caspase 级联反应的关键事件。

在细胞组分类中(编号为 NMDCX0002206), 质膜成分(GO: 0005887、GO: 0031226 和 GO: 0044459)和过氧化物酶体(GO: 0005782、GO: 0044439 和 GO: 0005777)显著富集(图 7E), 这为本研究扫描电镜(图 1C, SEM)观察到的细胞表面形态皱缩和破损提供了分子层面的证据, 表明膜结构的完整性在转录水平即已受到干扰。此外, 与在 KEGG 中看到的脂肪酸降解通路形成了紧密呼应, 表明细胞正在应对脂代谢危机。这些转录变化表明, 膜系统的破坏并非偶然结果, 而是槲皮素作用早期启动的核心细胞事件。

KEGG 通路分析(编号为 NMDCX0002206)进一步揭示受影响的生物网络(图 7C)。脂肪酸降解和缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸降解通路的富集, 证实了分解代谢的偏向和氨基酸分解代谢的活跃。这些过程在为细胞提供应急能量的同时, 也会增加线粒体呼吸链的电子流, 可能成为 ROS 产生的额外来源, 从而放大初级的氧化应激。与此同时, 过氧化物酶体和谷胱甘肽代谢通路的激活是细胞试图增强抗氧化能力的直接体现。代谢通路的整体扰动和次级代谢物生物合成的变化表明, 细胞的初级代谢网络已被广泛破坏。这种全面的代谢失衡是诱导线粒体功能障碍(MMP 崩溃)和激活 Caspase 等凋亡执行分子的经典上游信号, 这与本研究观察到的结果一致。因此, 转录组数据揭示的代谢危机与氧化风暴为本研究观察到的线粒体介导的凋亡样死亡提供了分子背景。

3 讨论与结论

新型抗真菌药物的研发面临诸多挑战, 而药用植物已成为发现抗菌活性成分的重要资源。槲皮素作为一种广泛存在于自然界的黄酮类化合物, 已被多项研究证实对细菌、真菌及病毒具有广谱抗微生物活性^[12]。随着多重耐药阿萨希毛孢子菌菌株的不断出现^[13], 寻找合成简便、毒副作用低的新型抗真菌药物显得尤为迫切。Yang 等^[14]研究发现, 大蒜素可通过诱导真菌氧化应激反应抑制 *T. asahii* 浮游细胞与生物膜生长, 并在系统性感染小鼠模型中展现出保护效应, 这进一步增强了本研究从天然产物中发掘抗真菌化合物的信心。

本研究系统评估了槲皮素对 *T. asahii* 的体外抗真菌活性及潜在机制, 结果显示其对受试菌株具有显著抑制作用, MICs 为 8–32 $\mu\text{g/mL}$, 该抑菌效果经琼脂点板法与 CCK-8 法验证, 且扫描电镜观察发现槲皮素处理后 *T. asahii* 孢子与菌丝表面出现粗糙、凹陷甚至萎缩等超微结构改变。此外, 生物膜形成是 *T. asahii* 致病性的关键因素^[14], 尤其与医用导管相关感染密切相关^[15-16]。Kim 等^[17]的一项回顾性研究显示, 侵袭性感染与留置中心静脉导管有关, 且死亡率高于非侵袭性感染的患者。对于生物膜的成熟阶段, 传统抗真菌药物氟康唑对 *T. asahii* 生物膜的抑制作用甚微, 氟康唑 MIC_{XTT}>1 024 $\mu\text{g/mL}$ ^[18]。已有多篇文献报道了槲皮素抗各种微生物生物膜的活性, 如白色念珠菌、鼠伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌等革兰阴性菌^[19-21]。本研究通过结晶紫染色与 XTT 法证实, 槲皮素可有效抑制 *T. asahii* 生物膜的黏附与形成阶段, 但槲皮素抗 *T. asahii* 生物膜的具体分子机制仍有待深入探讨。

差异基因功能富集分析结果显示, 差异基因显著富集于质膜组分和脂质代谢相关通路(编号为 NMDCX0002206)。深入分析基因表达特征

发现,一方面关键的膜脂合成与修饰酶相关基因普遍下调(如 ncbi_25987243、ncbi_25983937、ncbi_25989797 等),其表达抑制可能直接影响膜脂的合成效率与结构修饰,导致膜脂关键成分(不饱和脂肪酸、甾醇等)供给不足,从而增强对氧化损伤等胁迫的敏感性,这是细胞走向死亡的早期脆弱化基础。此外,药物诱导真菌氧化应激的损伤可通过谷胱甘肽氧化导致真菌凋亡^[22]。然而,从最终膜损伤(图 1C)的表型来看,此类代偿性改变不足以恢复膜正常功能,且磷脂酶及部分膜微域支架蛋白相关基因(如 ncbi_25986639、ncbi_25983690 等)的下调可能进一步限制膜翻新能力,降低细胞快速修复膜损伤的效率。这种合成抑制-修复不足的转录特征,与本研究观察到的不可逆膜损伤(扫描电镜)的现象完全吻合。

真菌细胞壁是维持细胞形态、渗透压平衡及抗逆的关键屏障^[23]。本研究对 *T. asahii* 细胞壁相关差异基因进行了深入分析,转录组结果显示关键的细胞壁合成与糖链装配相关酶基因普遍下调(如 ncbi_25990292、ncbi_25988065 等),直接导致细胞壁构成单元(β -葡聚糖等)的供给不足,削弱细胞壁的机械强度致使细胞结构崩溃(编号为 NMDCX0002206)。

线粒体是真菌能量代谢核心,参与氧化还原平衡、代谢及凋亡调控,其功能稳态决定细胞存活^[24]。转录组显示呼吸链核心组分及装配相关基因(如 ncbi_25983524 等)普遍下调,预示着电子传递链受损。这一损伤直接导致电子与 ROS 水平显著升高、ATP 合成不足(能量危机)以及线粒体膜电位下降,本研究在表型层面均观察到了这些关键变化(ROS \uparrow , MMP \downarrow)。少量替代电子供给及修复相关基因(如 ncbi_25990099 等)出现上调表达,但无法恢复线粒体功能,最终导致膜电位下降和 ROS 水平升高,从而促成能量危机与氧化损伤(编号为 NMDCX0002206)。Caspase-3 是细胞凋亡执行阶段的关键酶,可使

细胞的遗传物质稳定性受到破坏^[25]。实验表明,经槲皮素处理后,作为凋亡执行关键酶的 Caspase-3 样蛋白酶活性显著升高,而泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 的加入,有效逆转了该酶活性的升高及槲皮素对细胞活力的抑制(图 5、图 6)。这表明槲皮素诱导的线粒体损伤最终通过激活 Caspase 级联反应执行了细胞死亡程序,证实 *T. asahii* 的凋亡具有 Caspase 依赖性。

ROS 过量生成是凋亡信号转导的关键事件^[26]。真菌中存在“类凋亡性程序性细胞死亡”(apoptosis-like programmed cell death)^[27]。该类现象最早在酿酒酵母中被发现,随后在念珠菌^[28]、*Alternaria alternata*^[29]和曲霉^[30]等多种真菌中得到证实。真菌类凋亡具有 ROS 积累、线粒体膜电位下降等与哺乳动物凋亡相似的特征^[31]。真菌无典型 Caspase 同源物,但其 metacaspase 蛋白功能与其相似^[32]。真菌类凋亡可分为 Metacaspase (或类 Caspase)依赖性和非依赖性两类,多由线粒体途径介导^[33]。此外,研究显示槲皮素可干扰白色念珠菌的镁稳态、线粒体功能与抗氧化系统,进而诱导其凋亡^[34]。另有研究表明槲皮素与氟康唑联用可协同增强对真菌类凋亡的诱导作用^[35]。在氧化应激条件下,胞质钙离子浓度升高可诱导线粒体释放细胞色素 c 等促凋亡因子,进一步激活 Caspase 样蛋白酶、加剧钙超载并引起线粒体功能障碍,最终促进细胞凋亡^[36-37]。

转录组结果显示,氧化还原过程(GO: 0055114)、过氧化物酶体组织(GO: 0007031)和谷胱甘肽代谢(ko00480)等抗氧化核心生物过程被差异基因显著富集,提示槲皮素处理可能导致 *T. asahii* 的细胞抗氧化防御遭到显著失衡。从基因表达层面看,多种关键的抗氧化酶与还原当量维持相关基因呈现显著下调,如负责 GSH 再生的谷胱甘肽还原酶(ncbi_25985065)、参与 ROS 解毒与外源物代谢的多种谷胱甘肽 S-转移酶(ncbi_25988406、ncbi_25988912)等。这意味

着槲皮素的系统性处理关闭了这一关键防御网络, 氧化还原防御系统的崩溃可导致细胞内的 ROS 过量积累^[38], 进而破坏膜的完整性, 更为关键的是, 这种剧烈的氧化还原失衡与膜损伤共同构成了强烈的促凋亡信号, 从而启动下游的 Caspase 蛋白酶(如本研究检测到的 Caspase-3)级联反应, 最终执行 DNA 片段化等凋亡程序。

在转录组层面, 槲皮素触发了倾向于死亡的全局重编程, 体现在关键的上游诱导信号通路均被系统性激活: (1) 能量与代谢危机(呼吸链、糖酵解、脂肪酸降解基因下调); (2) 氧化还原防御崩溃(抗氧化酶与谷胱甘肽代谢基因下调); (3) 膜系统稳态失衡(膜脂合成与修复基因失调), 为细胞的不可逆崩溃埋下了伏笔。

本研究不仅观察到槲皮素处理后 Caspase-3 样蛋白酶活性显著升高, 更重要的是, 广谱 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 能够显著逆转槲皮素引起的细胞活力下降, 并直接抑制 Caspase-3 样蛋白酶的激活。这一实验提供了直接的因果证据, 证明槲皮素诱导的细胞死亡在很大程度上依赖于 Caspase 蛋白酶的激活。结合观察到的 MMP 崩溃事件, 我们可以推断出: 槲皮素→氧化/代谢/膜损伤→线粒体功能障碍→Caspase 样蛋白酶激活→细胞凋亡得以确证。

综上所述, 本研究通过整合转录组学、细胞功能学及药理学抑制实验系统阐明了槲皮素抗 *T. asahii* 的分子机制。转录组分析表明, 槲皮素干预了真菌能量代谢、氧化还原防御及膜系统稳态相关基因, 进而引发 ROS 积累和线粒体功能障碍(MMP 崩溃)。这些应激信号最终汇聚并激活了 Caspase-3 依赖性凋亡样通路最终抑制真菌生长。本研究揭示了槲皮素通过诱导细胞凋亡发挥抗阿萨希毛孢子菌活性的具体机制, 为开发抗 *T. asahii* 新型药剂提供了充分的实验依据与理论支撑。

作者贡献声明

郭昊宸: 实验设计、实验操作、数据分析和论文撰写; 徐龄智: 实验设计和论文修改; 杨鑫: 研究构思; 夏志宽: 论文修改; 杨蓉娅: 资金支持和论文修改。

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] COLOMBO AL, PADOVAN ACB, CHAVES GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 24(4): 682-700.
- [2] YANG R, AO J, WANG W, SONG K, LI R, WANG D. Disseminated trichosporonosis in China[J]. *Mycoses*, 2003, 46(11/12): 519-523.
- [3] BUTTS A, PALMER GE, ROGERS PD. Antifungal adjuvants: preserving and extending the antifungal arsenal[J]. *Virulence*, 2017, 8(2): 198-210.
- [4] OLIVEIRA dos SANTOS C, ZIJLSTRA JG, PORTE RJ, KAMPINGA GA, van DIEPENINGEN AD, SINHA B, BATHOORN E. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2016, 16(1): 148.
- [5] RODRIGUEZ-TUDELA JL, DIAZ-GUERRA TM, MELLADO E, CANO V, TAPIA C, PERKINS A, GOMEZ-LOPEZ A, RODERO L, CUENCA-ESTRELLA M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(10): 4026-4034.
- [6] CHAGAS-NETO TC, CHAVES GM, MELO ASA, COLOMBO AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp. species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(4): 1074-1081.
- [7] TAJ-ALDEEN SJ, AL-ANSARI N, EL SHAFEI S, MEIS JF, CURFS-BREUKER I, THEELEN B, BOEKHOUT T. Molecular identification and susceptibility of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Qatar: isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov.[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(6): 1791-1799.
- [8] BATIHA GE, BESHBIHY AM, IKRAM M, MULLA ZS, EL-HACK MEA, TAHA AE, ALGAMMAL AM, ALI ELEWA YH. The pharmacological activity,

- biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: quercetin[J]. *Foods*, 2020, 9(3): 374.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3[S]. 3rd edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [10] De AGUIAR CORDEIRO R, SERPA R, FLÁVIA UCHOA ALEXANDRE C, de FARIAS MARQUES FJ, VLADIA SILVA de MELO C, da SILVA FRANCO J, JOSÉ de JESUS EVANGELISTA A, PIRES de CAMARGO Z, SAMIA NOGUEIRA BRILHANTE R, FABIO GADELHA ROCHA M, LUCIANO BEZERRA MOREIRA J, de JESUS PINHEIRO GOMES BANDEIRA T, JÚLIO COSTA SIDRIM J. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(11): 1277-1286.
- [11] ITURRIETA-GONZÁLEZ IA, PADOVAN ACB, BIZERRA FC, HAHN RC, COLOMBO AL. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109553.
- [12] YIN J, PENG XD, LIN J, ZHANG YX, ZHANG J, GAO H, TIAN X, ZHANG RR, ZHAO GQ. Quercetin ameliorates *Aspergillus fumigatus* keratitis by inhibiting fungal growth, toll-like receptors and inflammatory cytokines[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 93: 107435.
- [13] HAZIROLAN G, CANTON E, SAHIN S, ARIKAN-AKDAGLI S. Head-to-head comparison of inhibitory and fungicidal activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(10): 4841-4847.
- [14] YANG X, BAI S, WU JM, FAN YL, ZOU YK, XIA ZK, AO JH, CHEN T, ZHANG MW, YANG RY. Antifungal activity and potential action mechanism of allicin against *Trichosporon asahii*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e00907-23.
- [15] MARINÉ M, BROWN NA, RIAÑO-PACHÓN DM, GOLDMAN GH. On and under the skin: emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* species[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1004982.
- [16] LIAO Y, LU XL, YANG ST, LUO Y, CHEN Q, YANG RY. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* Fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 to 2014[J]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2015, 2(4): ofv141.
- [17] KIM J, KIM MJ, CHONG YP, KIM SH, CHOI SH, LEE SO, WOO JH, KIM YS, JUNG J. Comparison of the characteristics of patients with invasive infections and noninvasive infections caused by *Trichosporon asahii*[J]. *Medical Mycology*, 2021, 59(3): 296-300.
- [18] Di BONAVENTURA G, POMPILIO A, PICCIANI C, IEZZI M, D'ANTONIO D, PICCOLOMINI R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(10): 3269-3276.
- [19] Da FONSECA STD, TEIXEIRA TR, FERREIRA JMS, dos SANTOS LIMA LAR, LUYTEN W, CASTRO AHF. Flavonoid-rich fractions of *Bauhinia holophylla* leaves inhibit *Candida albicans* biofilm formation and hyphae growth[J]. *Plants*, 2022, 11(14): 1796.
- [20] ROY PK, SONG M, PARK SY. Impact of quercetin against *Salmonella Typhimurium* biofilm formation on food-contact surfaces and molecular mechanism pattern[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 977.
- [21] FYDRYCH D, JEZIURSKA J, WELNA J, KWIECIŃSKA-PIRÓG J. Potential use of selected natural compounds with anti-biofilm activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(2): 607.
- [22] ZHOU YB, XIAO YY, CHAO JJ, MA L. *In vitro* activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs against *Microsporum canis* isolated from patients with tinea capitis[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 783086.
- [23] LIU XY, GENG SH, YE DY, XU WH, ZHENG YD, WANG FJ, LEI JP, WU Y, JIANG HB, HU Y, CHEN DF, YAN TZ, GUO R, QIU JF. Global discovery, expression pattern, and regulatory role of miRNA-like RNAs in *Ascosphaera apis* infecting the Asian honeybee larvae[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2025, 16: 1551625.
- [24] RICH PR, MARÉCHAL A. The mitochondrial respiratory chain[J]. *Essays in Biochemistry*, 2010, 47: 1-23.
- [25] KAVAKÇIOĞLU B, TARHAN L. Yeast Caspase-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 induced by antifungal and potential antitumor agent clotrimazole[J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(1): 97-106.
- [26] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, DAWSON TM, DAWSON VL, EL-DEIRY WS, FULDA S, GOTTLIEB E, GREEN DR, HENGARTNER MO, KEPP O, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, LU X, MADEO F, MALORNI W, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2012, 19(1): 107-120.
- [27] SHLEZINGER N, GOLDFINGER N, SHARON A. Apoptotic-like programmed cell death in fungi: the benefits in filamentous species[J]. *Frontiers in Oncology*, 2012, 2: 97.
- [28] PHILLIPS AJ, CROWE JD, RAMSDALE M. Ras

- pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 726-731.
- [29] SUN YY, WANG B, CHEN W, WANG YB, ZHOU DD, ZHANG MY, ZHANG CQ, LI RY, HE J. The role of potato glycoside alkaloids mediated oxidative stress in inducing apoptosis of wolfberry root rot pathogen fungi[J]. Antioxidants, 2024, 13(12): 1537.
- [30] OLIVEIRA M, PEREIRA C, BESSA C, ARAUJO R, SARAIVA L. Chronological aging in conidia of pathogenic *Aspergillus*: comparison between species[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 118: 57-63.
- [31] SHARON A, FINKELSTEIN A, SHLEZINGER N, HATAM I. Fungal apoptosis: function, genes and gene function[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 833-854.
- [32] MUZAFFAR S, BOSE C, BANERJI A, NAIR BG, CHATTOO BB. Anacardic acid induces apoptosis-like cell death in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(1): 323-335.
- [33] LI LJ, DU CM. Fungal apoptosis-related proteins[J]. Microorganisms, 2024, 12(11): 2289.
- [34] KWUN MS, LEE DG. Quercetin-induced yeast apoptosis through mitochondrial dysfunction under the accumulation of magnesium in *Candida albicans*[J]. Fungal Biology, 2020, 124(2): 83-90.
- [35] SINGH BN, UPRETI DK, SINGH BR, PANDEY G, VERMA S, ROY S, NAQVI AH, RAWAT AKS. Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(4): 2153-2168.
- [36] CARRARO M, BERNARDI P. Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast[J]. Cell Calcium, 2016, 60(2): 102-107.
- [37] YUN DG, LEE DG. Antibacterial activity of curcumin via apoptosis-like response in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5505-5514.
- [38] RIANE K, OULED-HADDAR H, ALYANE M, SIFOUR M, ESPINOSA C, ANGELES ESTEBAN M. Assessment of *Streptococcus salivarius* sp. thermophiles antioxidant efficiency and its role in reducing paracetamol hepatotoxicity[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2019, 17(4): e2061.