

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.001

RVVC 致病白假丝酵母菌对小鼠阴道上皮侵袭性及局部免疫的研究*

姚福强, 卢伟, 祁文瑾[△]

(昆明医科大学第一附属医院产科, 昆明 650032)

[摘要] **目的** 检测外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)、RVVC 致病白假丝酵母菌感染的体外培养小鼠阴道上皮细胞的局部免疫及细胞形态学变化,并比较致病白假丝酵母菌的侵袭性差异。**方法** 采用 Dispase II、胰酶分步消化法,EpiLife 培养基体外培养原代小鼠阴道上皮细胞,细胞传代后分别与 VVC、RVVC 致病菌共培养,ELISA 法检测 IL-8、TNF- α 、IL-4 水平,以扫描电镜观察比较细胞形态学变化。**结果** RVVC 致病白假丝酵母菌表现出比 VVC 致病菌更强的黏附性、穿透性、破坏性。RVVC 组在 12、24、48 h 的培养液中,IL-8 水平均高于 VVC 组($P < 0.05$);TNF- α 水平在 24、48 h 高于 VVC 组($P < 0.05$),而 IL-4 水平与 VVC 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。随培养时间的增加,VVC、RVVC 组中 IL-8、TNF- α 水平逐渐升高($P < 0.05$)。**结论** RVVC 致病白假丝酵母菌表现出了比 VVC 致病白假丝酵母菌更强的侵袭性,引起了更剧烈的阴道局部免疫功能变化,同时激发了上皮细胞对致病菌更明显的抗性。

[关键词] 复发性外阴阴道假丝酵母菌病;白假丝酵母菌;免疫因子类;阴道局部免疫

[中图分类号] R711.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0901-04

Invasiveness and local immunity of RVVC pathogenic *Candida albicans* on mouse vaginal epithelium*YAO Fuqiang, LU Wei, QI Wenjin[△]

(Department of Obstetrics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To detect the changes of local immunity and cell morphology of vaginal epithelial cells in in vitro cultured mice infected by vulvovaginal candidiasis (VVC) and recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) pathogenic *Candida albicans*, and to compare the difference in the invasiveness of pathogenic *Candida albicans*. **Methods** The primary mouse vaginal epithelial cells were cultured in vitro by adopting the Dispase II trypsin digestion and EpiLife medium. After subculture, the cells were co-cultured with VVC and RVVC pathogens respectively. The levels of IL-8, TNF- α and IL-4 were detected by ELISA and the scanning electron microscopy was used to compare the cell morphological changes. **Results** RVVC pathogenic *Candida albicans* showed stronger adhesion, penetration and destructiveness than VVC pathogens. The expression of IL-8 in the co-culture liquid at 12, 24, 48 h in RVVC group was higher than that in the VVC group ($P < 0.05$). The expression of TNF- α at 24, 48 h in the RVVC group was higher than that in the VVC group ($P < 0.05$), however, the IL-4 level had no statistically significant difference between the PVVC group and VVC group ($P > 0.05$). With the increase of culture time, the levels of IL-8 and TNF- α in the VVC and RVVC groups were increased gradually ($P < 0.05$). **Conclusion** RVVC pathogenic *Candida albicans* shows stronger invasiveness than VVC pathogenic *Candida albicans*, cause more severe changes in vaginal local immune function, meanwhile stimulates the obvious resistance of epithelial cells to pathogenic bacteria.

[Key words] recurrent vulvovaginal candidiasis; *Candida albicans*; immunologic factors; vaginal local immunity

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是由假丝酵母菌引起的阴道黏膜和(或)外阴真菌感染,是妇产科常见的感染性疾病。研究显示,VVC 的发生与宿主防御机制及阴道上皮局部免

疫功能变化相关^[1-2]。上皮细胞在假丝酵母菌刺激下释放多种免疫因子组成复杂的信号网络,在局部免疫应答中起着调控作用^[3-4]。细胞介导免疫(cell-mediated immunity, CMI)是阴道局部免疫抵抗假丝酵母菌

* 基金项目:国家自然科学基金(81660248)。 作者简介:姚福强(1989-),在读硕士,主要从事外阴阴道假丝酵母菌研究。 [△] 通信作者, E-mail: wenjincookie@163.com。

感染的主要防御机制,其中辅助性 T(helper T, Th) 细胞及其细胞因子等在抗假丝酵母菌感染中发挥了重要作用^[5]。但其确切机制尚不明确,本研究在小鼠阴道上皮细胞体外培养的基础上检测阴道局部免疫因子表达与真菌侵袭力的关系,以期为 RVVC 的发病机制提供新理论。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 致病白假丝酵母菌 所有致病白假丝酵母菌均来自本院妇产科门诊 VVC、RVVC 患者。患者均知情同意,研究通过医院伦理委员会批准。VVC、RVVC 诊断标准以第 8 版妇产科学为依据。排除妊娠期、哺乳期、患糖尿病,口服避孕药,3 个月内接受过全身抗真菌治疗或 1 个月内接受过外用抗真菌药物治疗,患免疫性疾病或正在服用免疫抑制剂、混合阴道感染者。

1.1.2 实验动物 小鼠购自昆明医科大学 SPF 动物房,雌性,体质量 23~27 g,动物合格证编号:SCXK(滇)K2015-0002。

1.1.3 主要试剂 沙堡罗氏培养基(250 g,法国生物梅里埃公司);EpiLife cf kit(500 mL,美国 Gibico 公司);胎牛血清(500 mL,美国 Gibico 公司);0.25%胰酶+0.02%EDTA(100 mL,美国 HyClone 公司);中性蛋白酶 II(1 g,德国 Sigma 公司);小鼠 IL-8、TNF- α 、IL-4 ELISA 试剂盒(4 pack,美国 Ebioscience 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠阴道上皮细胞的原代培养 断颈法处死小鼠,消毒铺巾解剖取出新鲜阴道上皮,用含双抗的 PBS 清洗后放入含 2 U/mL Dispase II 中并置于 4℃ 冰箱过夜。分离上皮层分割成碎片,用 2 mL 0.25%胰酶 37℃ 消化 15 min,含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 终止消化,轻轻吹打 2 min 吸出细胞悬液过滤,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加 EpiLife 重悬计数,按每毫升 1×10^6 个细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养;48 h 首次换液,以后隔天换液,倒置相差显微镜观察细胞生长情况。

1.2.2 小鼠阴道上皮细胞传代与铺板、爬片制作 取生长汇合度 90%的上皮细胞,1 mL 0.25%胰酶消化,等量含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加 EpiLife 重悬并计数,按每毫升 1×10^5 个细胞接种于明胶处理的 24 孔板,继续培养;将明胶处理的爬片置于 24 孔板中,爬片中点上方加 2 滴细胞悬液,置于培养箱 30 min,沿孔边加入 1 mL EpiLife,继续培养。

1.2.3 致病白假丝酵母菌菌液配置 选取 VVC、

RVVC 致病菌株各 6 株,复温后挑取单菌落在沙堡罗氏培养基上转种纯化 2 次,挑取约 1 mm 单菌落加入 1 mL EpiLife 中,吹打混匀,计数调整密度为 1×10^6 CFU/mL。

1.2.4 ELISA 检测 IL-4、IL-8、TNF- α 水平 铺板 24 h,换液。实验组加 1 mL EpiLife 及致病菌悬液各 1 mL 与上皮细胞继续培养 6、12、24、48 h;对照组则以 1 mL EpiLife 代替菌液。实验组及对照组培养 6、12、24、48 h 取上清液以 ELISA 法检测 IL-4、IL-8、TNF- α 水平。

1.2.5 电镜观察致病菌对上皮细胞的侵袭过程 细胞爬片 24 h,换液加 1 mL EpiLife 及 100 μ L 上述 VVC(VVC 组)、RVVC(RVVC 组)致病菌各 1 株菌液继续培养 6、12、24、48 h;对照组则以等量 EpiLife 代替菌液。扫描电镜下观察细胞形态学变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养小鼠阴道上皮细胞形态学特征 小鼠阴道上皮细胞体外培养传代后,电镜下可见所培养上皮细胞表面布满皱褶微绒毛,呈不规则疏网状,细胞触角细长,细胞边缘连接处,形成清楚的细胞分界线,细胞紧密相连、呈铺石状排列,见图 1。

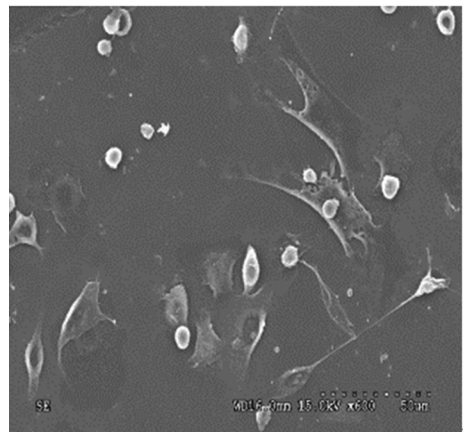
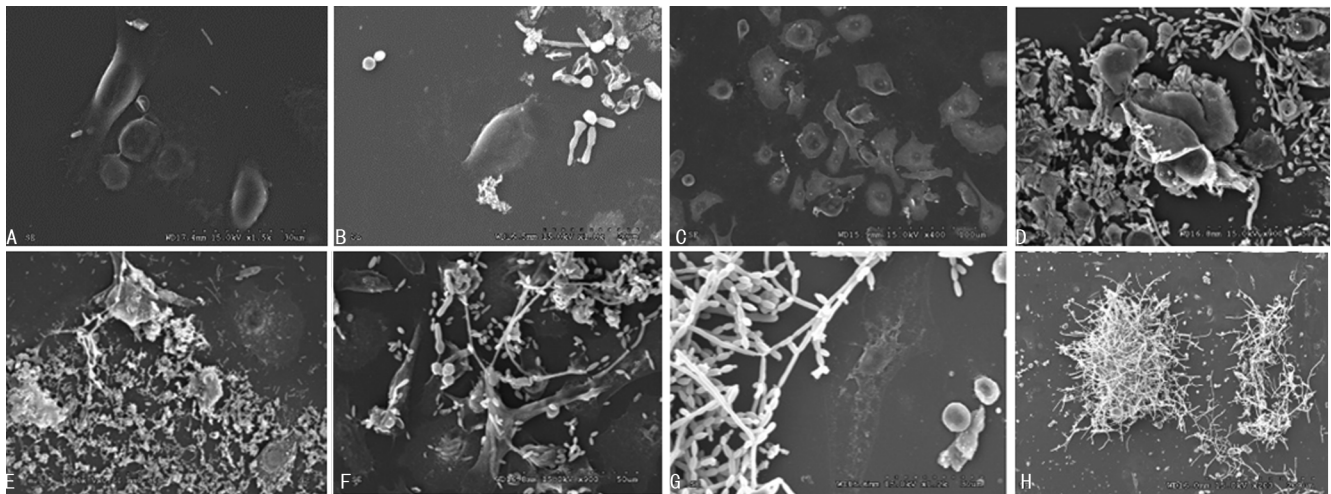


图 1 小鼠阴道上皮细胞形态学(扫描电镜 $\times 600$)

2.2 小鼠阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养后的形态学变化 培养 6 h 后,VVC、RVVC 组细胞微绒毛较对照组减少,部分细胞缩小,胞体变圆凸起呈滴状,少量孢子附着。培养 12 h 后,VVC 组少量孢子附着在细胞周围,细胞间隙增大;RVVC 组大量孢子聚集,细胞表面微绒毛减少、消失,部分孢子转化为菌丝。培养至 24 h,VVC 组细胞被菌丝侵蚀,表面形成孔洞,部分细胞塌陷,胞质外溢,偶见残缺的细胞轮廓和菌丝;RVVC 组菌丝穿透细胞膜在细胞内生长,微绒毛消失,细胞萎缩,部分细胞残缺不全,大量菌丝缠



A: VVC 组 6 h(扫描电镜×1 200); B: RVVC 组 6 h(扫描电镜×1 000); C: VVC 组 12 h(扫描电镜×400); D: RVVC 组 12 h(扫描电镜×900); E: VVC 组 24 h(扫描电镜×900); F: RVVC 组 24 h(扫描电镜×900); G: VVC 组 48 h(扫描电镜×1 200); H: RVVC 组 48 h(扫描电镜×200)

图 2 两组电镜扫描形态学分析

绕。培养至 48 h, VVC、RVVC 组均见大量残缺不全的细胞残骸并缠绕附着成团的菌丝, 核中央形成空洞。RVVC 致病白假丝酵母菌表现出比 VVC 致病菌更强的黏附性、穿透性、破坏性, 见图 2。

2.3 小鼠阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养后免疫细胞因子的表达情况 共培养 12、24、48 h 后, RVVC 组 IL-4、IL-8、TNF- α 水平高于对照组 ($P < 0.05$); VVC 组 IL-4、IL-8 水平在共培养 12、24、48 h 后高于对照组, 而 TNF- α 水平在 6、12、24、48 h 均高于对照组 ($P < 0.05$)。RVVC 组 IL-8 水平在 6、12、24、48 h 均明显高于 VVC 组, TNF- α 水平在 24、48 h 高于 VVC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IL-4 水平在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 6、12、24 h 后, VVC、RVVC 组的 IL-8、TNF- α 水平均逐渐升高 ($P < 0.05$), IL-4 水平在共培养 6、12、24 h 逐渐升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠阴道上皮免疫细胞因子浓度 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

项目	6 h	12 h	24 h	48 h
IL-8				
VVC 组	2.92±1.16	9.08±1.15 ^a	11.89±2.46 ^a	17.53±5.59 ^a
RVVC 组	3.43±3.11 ^b	11.61±2.43 ^{ab}	18.07±5.10 ^{ab}	25.36±13.23 ^{ab}
对照组	3.26±3.62	6.67±2.36	10.17±2.79	12.62±2.37
TNF-α				
VVC 组	2.28±2.19 ^a	13.86±4.59 ^a	16.67±4.09 ^a	15.87±3.30 ^a
RVVC 组	5.50±3.23	18.05±3.79 ^a	27.16±8.81 ^{ab}	23.44±7.48 ^{ab}
对照组	5.54±2.61	7.34±1.05	9.18±0.77	10.14±1.18
IL-4				
VVC 组	2.62±0.66	2.95±0.47 ^a	3.88±0.38 ^a	4.10±0.44 ^a
RVVC 组	2.34±0.35	3.12±0.85 ^a	4.66±1.64 ^a	5.50±1.78 ^a
对照组	2.09±0.55	2.23±0.49	2.79±0.33	3.23±0.62

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 VVC 组比较

3 讨论

成熟的鼠类阴道上皮细胞的培养方法主要有组织块法和酶消化法。本研究采用酶分步消化法^[6-7]。Dispase II 酶可成功分离上皮组织, 具有细胞纯度高、培养周期短的特点, 可以快速获得大量活性高的上皮细胞, 能够有效排除非上皮细胞的干扰^[8-9]。扫描电镜下细胞表面见许多微绒毛和脊样胞质皱褶, 符合典型的鳞状上皮细胞特点, 体外培养上皮细胞成功。

本研究选取 VVC 和 RVVC 的主要致病菌株白假丝酵母菌(占 60%~80%^[10])为研究对象。作为条件致病菌, 假丝酵母菌以酵母相少量存在于阴道中不引起临床症状, 当阴道微环境的免疫低下时, 酵母相转变为菌丝相并大量繁殖, 从而致病^[11]。假丝酵母菌对上皮细胞的黏附、穿透、破坏导致了对细胞的侵袭作用, 是 VVC 发生的关键事件^[12-13]。结果显示, 白假丝酵母菌发芽形成菌丝并黏附于上皮细胞单层, 然后上皮细胞吞噬部分菌丝, 导致白假丝酵母菌介导的上皮细胞裂解。酵母相发展为菌丝相伴随着对细胞的黏附、穿透, 同时细胞被破坏逐渐加重、脱落死亡; RVVC 致病菌的转变时间更短、破坏性更强。表明 RVVC 致病菌的侵袭性强于 VVC。

Th 细胞包括 Th1、Th2 等不同的亚型, 各自亚型通过表达细胞因子实现免疫应答作用。Th1 表达 IL-8、TNF- α 等, IL-8 通过正反馈调节中性粒细胞等活化、聚集, 释放出系列活性物质, 介导阴道局部的抵抗性免疫反应, 以杀菌和抑制细胞损伤^[5]; 同样 TNF- α 增强中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬活性, 介导炎症相关免疫应答, 增强机体对假丝酵母菌的抗性, 清除病原体^[14]。Th2 分泌 IL-4 等, 作为致病性细胞因子, IL-4 响应于假丝酵母菌抑制 Th1 介导的噬菌作用, 增加对假丝酵母菌的易感性^[15]。

本研究通过对 Th1 免疫因子 IL-8、TNF- α 及 Th2 免疫因子 IL-4 的研究发现,随着时间的增加对照组上清液中 Th1 免疫因子 IL-8、TNF- α 、IL-4 水平呈上升趋势,提示阴道上皮细胞可能是 Th 细胞免疫因子的重要来源,说明正常阴道上皮细胞在没有外界刺激的情况下也分泌少量免疫因子,发挥防御作用。表明在无法顺利获取人类阴道上皮细胞的情况下,可采用小鼠阴道上皮细胞进行相关研究。在实验组,感染后 12 h 的 IL-8、TNF- α 、IL-4 水平上升,RVVC 组中 IL-8 在感染中期(12 h)、TNF- α 在感染后期(24 h)水平比 VVC 组升高,表明感染后上皮细胞出现了随时间增强的抵抗性免疫反应,并且 RVVC 组的抵抗力更强;而 Th2 代表因子 IL-4 水平在感染 6~24 h 随时间上升,但后期(24 h 以后)则没有变化,RVVC 与 VVC 组之间 IL-4 亦无差异,推测 IL-4 可能仅在感染早期的致病菌易感性中起了一定的作用,但是在 RVVC 与 VVC 的致病均易感性中并没有明显区别。

在感染后期,Th1/Th2 比值增大,局部 Th1 占优势,阴道局部表现出对致病菌的抗性,对 RVVC 致病菌的抗性更强,表明 Th1/Th2 平衡在阴道局部免疫中具有重要作用;致病菌对上皮细胞的侵袭逐渐加重,RVVC 菌株侵袭性更强。由此可见,致病菌侵袭性与阴道局部抵抗性免疫之间相互拮抗的结果和 RVVC 的演进(即病情好转或加重)息息相关,本研究在小鼠阴道上皮细胞体外培养的基础上,体外构建阴道模型,结合致病菌侵袭力和免疫功能变化,希望为 RVVC 的发病机制提供新理论,有助于设计更有效的 RVVC 治疗方式。

参考文献

- [1] 凌开建,祁文瑾. 外阴阴道假丝酵母菌病与阴道上皮细胞先天免疫的研究进展[J]. 医学综述,2015,21(24):4420-4423.
- [2] SOBEL J D. Recurrent vulvovaginal candidiasis[J]. Am J Obstet Gynecol,2016,214(1):15.
- [3] STEELE C, FIDEL PL JR. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans* [J]. Infect Immun, 2002, 70(2):577-583.
- [4] WEINDL G, WAGENER J, SCHALLER M, et al. Epithelial cells and innate antifungal defense[J]. J Dent Res, 2010,89(7):666-675.
- [5] 闵洁,王敏,赵健洁,等. 念珠菌性阴道炎病理变化与机体免疫反应的关系[J]. 中国妇幼保健,2009,24(28):4016-4018.
- [6] NOMANBHOY F, STEELE C, YANO J, et al. Vaginal and oral epithelial cell anti-candida activity[J]. Infect Immun, 2002,70(12):7081-7088.
- [7] 刘方方,李亚楠,张明乐,等. 大鼠阴道黏膜上皮细胞原代分离及培养方法的改进[J]. 现代妇产科进展,2013,22(6):465-468.
- [8] 张明乐. 小鼠阴道上皮细胞与猪脱细胞真皮基质-纤维蛋白凝胶构建组织工程阴道动物模型的初步研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2012.
- [9] 黎佩莹,王沂峰. 中性蛋白酶和胰酶分离阴道黏膜上皮细胞的对比研究[J]. 国际妇产科学杂志,2009,36(1):79-81.
- [10] 祁文瑾,陈卓,许妙玲. 复发性假丝酵母菌外阴阴道病致病菌种分析[J]. 安徽医科大学学报,2016,51(4):555-557.
- [11] 凌秀凤. 外阴阴道念珠菌感染研究进展[J]. 中国妇幼保健研究,2003,14(3):152-155.
- [12] TANG S X, MOYES D L, RICHARDSON J P, et al. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans* [J]. Oral Diseases, 2016, 22 Suppl 1:114.
- [13] BROWN G D, NETEA M G. Exciting developments in the immunology of fungal infections [J]. Cell Host Microbe, 2012, 11(5):422.
- [14] SHROFF A, SEQUEIRA R, REDDY K V R. Human vaginal epithelial cells augment autophagy marker genes in response to *Candida albicans* infection [J]. Am J Repr Immun, 2017, 77(4):e12639.
- [15] LI T, NIU X, ZHANG X, et al. Recombinant human IFN α -2b response promotes vaginal epithelial cells defense against *Candida albicans* [J]. Front Microbiol, 2017, 8:697.

(收稿日期:2018-10-23 修回日期:2018-12-16)