

外阴阴道假丝酵母菌病患者阴道乳杆菌黏附性及免疫功能调节的研究

陈施张瑞

摘要 目的 研究外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)患者阴道乳杆菌黏附功能及其调节局部免疫功能的特点。方法 从VVC患者和健康对照女性阴道分泌物中分离乳杆菌并鉴定。测定两组获得不同乳杆菌菌种(株)与阴道鳞状上皮细胞株VK2/E6E7的黏附功能,并检测在不同乳杆菌存在时,阴道鳞状上皮细胞株VK2/E6E7分泌白介素(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6和IL-8的水平。结果 VVC组的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和发酵乳杆菌的黏附能力明显低于对照组。与对照组比较,VVC组的卷曲乳杆菌、发酵乳杆菌能上调IL-6和IL-8的水平,阴道乳杆菌能上调IL-6水平,而加氏乳杆菌、德氏乳杆菌能上调IL-1 α 和IL-1 β 的水平。结论 VVC组患者乳杆菌黏附性减低,调节阴道局部免疫功能存在异常。

关键词 乳杆菌功能; 外阴阴道假丝酵母菌病; 黏附功能; 阴道局部免疫; 细胞因子

中图分类号 R 711

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1789-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.021

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal *Candidiasis*, VVC)是女性最常见的生殖道感染性疾病之一,与多种不良结局密切相关。既往研究^[1]显示,VVC患者阴道微环境中乳杆菌数量未改变,抑制白假丝酵母菌增殖能力减退。黏附性和免疫调节是乳杆菌生物学功能的重要方面,既往研究尚未明确VVC患者阴道中的这些乳杆菌菌种的生物学功能是否较健康女性低下。本研究通过体外实验,评价阴道中乳杆菌的黏附性在VVC患者与健康女性之间的区别,分析VVC患者阴道中乳杆菌对阴道鳞状上皮细胞产生细胞因子的影响与健康女性的差别,从而为阐明VVC的发病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集与标准菌株 选取2018年2—6月在北京大学第一医院门诊诊断为VVC的患者作为研究组。纳入标准:18~45岁、有性生活史、临床诊断为有症状性VVC患者。排除标准:①微生物学诊断与临床诊断不符者;②存在混合性阴道炎者;③无症状性VVC;④本次阴道炎发病以来曾用任何药物治疗者;⑤同时伴发下列任何一种疾病者:盆腔炎、宫颈炎、阴道炎,其他妇科炎症性疾病(支原体、衣原体、淋病、梅毒)。

选取同期在北京大学第一医院体检中心体检的18~45岁健康女性作为对照组,存在下列任何一项者从对照组排除:①近1个月内使用抗生素或抗真菌药者;②近1个月口服或外用避孕药者;③48h内阴道用药、阴道冲洗者;④半年内被诊断过妇科炎症性疾病或泌尿系统炎症性疾病者;⑤妇科检查发现阳性体征或阴道微生态检测异常者。

该研究经北京大学第一医院医院伦理委员会批准后执行,所有志愿者均在自愿签署知情同意后入选本研究。人阴道上皮细胞VK2/E6E7(ATC-CCRL2616)细胞株购自美国微生物保藏中心。人细胞因子检测试剂盒(ELISA)购自美国R&D System公司。

1.2 阴道乳杆菌的分离、纯化和鉴定^[2] 用无菌棉拭子取每位女性阴道侧壁上1/3分泌物,涂在MRS琼脂平板上,37℃厌氧培养48h。挑取单菌落、涂片、革兰染色、镜检确认为乳杆菌后,MRS液体培养基37℃、150 r/min培养后与60%甘油(1:1)混匀,-80℃保存。

冻存的乳杆菌复苏后均匀涂于MRS培养板,37℃厌氧培养48h。菌落PCR:用27F/1492R扩增菌株的16S rRNA基因全长。采用25 μ l体系:PCR mix(2 \times)12.5 μ l,上下游引物各1 μ l,细菌1 μ l,加双蒸水至25 μ l。95℃10 min,95℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,72℃10 min,35个循环。上游引物(27F):5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3';下游引

2021-07-23 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81471420);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20130001120051)

作者单位:北京大学第一医院妇产科,北京 100034

作者简介:陈施,女,主治医师;

张瑞,男,主治医师,责任作者,E-mail: zuniverse@163.com

物(1492R): 5'-TACGYTACCTTGTTACGACT-3'。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,测序由上海生工生物技术公司完成,序列信息与NCBI(GENBANK)序列进行比对分析。

1.3 阴道上皮细胞株及乳杆菌菌株培养 复苏的阴道鳞状上皮细胞株VK2/E6E7(ATCC CRL2616)接种至含K-SFM培养基的细胞培养瓶中,放至37℃、5% CO₂恒温培养箱中,细胞长到融合度达90%时进行传代。传代细胞继续在37℃、5% CO₂、K-SFM培养基的细胞培养瓶中培养,待细胞融合度达90%备用。鉴定完毕的乳杆菌在MRS乳杆菌专用培养基中37℃、150 r/min培养18 h后,菌液调至0.5 MCF备用。

1.4 黏附试验 传代细胞在37℃、5% CO₂、K-SFM培养基的细胞培养瓶中培养至细胞融合度达90%时转移至细胞培养板中,细胞浓度1×10⁵个/ml,待细胞生长至单层细胞。

乳杆菌菌液调至0.5 MCF,37℃、150 r/min培养18 h后,离心收集菌体,无菌PBS洗2次,将菌体重悬于K-SFM培养液中至细菌浓度1×10⁸ cfu/ml。

用无菌PBS洗涤48孔细胞培养板2次,加入100 μl乳杆菌菌液,培养4 h,用无菌PBS洗涤4次,洗去未黏附的菌体,加入1%(V/V) Triton X-100 600 μl,使黏附的菌体同细胞分离,混匀后,用稀释平板计数法计算黏附细菌数^[3]。

1.5 乳杆菌刺激阴道上皮细胞产生免疫因子^[4] 待48孔板中阴道上皮细胞生长至单层细胞,吸出培养孔中的培养液,每孔重新加入K-SFM培养液。按照预实验结果,每孔分别加入浓度0.5 MCF的乳杆菌600 μl,刺激上皮细胞12 h后,收集培养液,ELISA试剂盒检测其细胞因子浓度,所有实验均重复3次。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,黏附指数、细胞因子的量采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验,所有数据均来自3次以上独立实验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本收集情况 共纳入志愿者40例,其中健康对照组女性和VVC组患者各20例,各组临床资料见表1。

2.2 两组乳杆菌黏附指数 共分离纯化获得乳杆菌37株,分属于6个乳杆菌属,其中卷曲乳杆菌和

加氏乳杆菌最多,德氏乳杆菌最少。如表2所示,与对照组比较,VVC组中卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和发酵乳杆菌的黏附指数明显减弱,差异有统计学意义。

表1 两组基线资料($\bar{x} \pm s$)

基线资料	对照组	VVC组	F值	P值
年龄(岁)	25.3 ± 1.8	26.0 ± 1.1	3.066	0.823
身高(cm)	158.0 ± 3.2	149.0 ± 2.3	0.009	0.927
体质量(kg)	49.8 ± 2.9	51.6 ± 4.1	1.324	0.552
体质指数(kg/m ²)	23.4 ± 3.4	24.8 ± 2.1	5.902	0.607
阴道pH值	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.5	55.923	0.064

表2 两组乳杆菌黏附性能比较(黏附指数 cfu/cell $\bar{x} \pm s$)

菌种名称	对照组	VVC组	F值	P值
卷曲乳杆菌	34 ± 2.30	28 ± 1.20	7.263	0.009
加氏乳杆菌	46 ± 1.80	36 ± 1.00	5.114	0.003
詹氏乳杆菌	32 ± 0.35	24 ± 0.30	0.593	0.453
阴道乳杆菌	27 ± 1.20	25 ± 0.76	1.259	0.270
发酵乳杆菌	41 ± 0.98	33 ± 0.88	5.716	0.002
德氏乳杆菌	22 ± 0.34	21 ± 1.50	3.531	0.069

2.3 阴道上皮细胞产生细胞因子 如表3~6所示,与对照组比较,卷曲乳杆菌、发酵乳杆菌作用组上皮细胞产生IL-6和IL-8的水平明显高于对照组,阴道乳杆菌作用组上皮细胞产生IL-6水平升高,但IL-8的水平与对照组相当。在这三种乳杆菌作用组,上皮细胞产生的IL-1α和IL-1β的水平与对照组无明显差别。加氏乳杆菌、德氏乳杆菌作用组,上皮细胞产生的IL-1α和IL-1β的水平明显高于对照组,而IL-6和IL-8的水平大致与对照组类似。

表3 两组乳杆菌刺激阴道上皮细胞产生IL-1α的比较(ng/L $\bar{x} \pm s$)

菌种名称	对照组	VVC组	F值	P值
卷曲乳杆菌	122.08 ± 1.15	45.45 ± 1.43	3.167	0.081
加氏乳杆菌	120.16 ± 0.94	436.33 ± 0.78	0.974	0.003
詹氏乳杆菌	118.54 ± 0.14	16.25 ± 1.03	0.377	0.338
阴道乳杆菌	108.17 ± 1.06	19.20 ± 1.19	3.066	0.159
发酵乳杆菌	85.09 ± 0.45	4.09 ± 0.45	0.009	0.065
德氏乳杆菌	76.33 ± 1.42	119.12 ± 0.25	4.263	0.003

表4 两组乳杆菌刺激阴道上皮细胞产生IL-1β的比较(ng/L $\bar{x} \pm s$)

菌种名称	对照组	VVC组	F值	P值
卷曲乳杆菌	130.90 ± 2.85	38.12 ± 1.22	6.241	0.209
加氏乳杆菌	36.02 ± 1.33	142.54 ± 0.97	1.433	0.008
詹氏乳杆菌	27.43 ± 0.23	23.52 ± 0.46	0.932	0.090
阴道乳杆菌	28.45 ± 0.17	27.38 ± 0.29	0.121	0.132
发酵乳杆菌	31.00 ± 2.06	9.44 ± 2.17	4.430	0.105
德氏乳杆菌	36.48 ± 0.31	117.43 ± 0.53	3.078	0.002

表5 两组乳杆菌刺激阴道上皮细胞产生 IL-6 的比较 (ng/L $\bar{x} \pm s$)

菌种名称	对照组	VVC 组	F 值	P 值
卷曲乳杆菌	5.56 ± 1.09	24.62 ± 0.12	12.065	0.004
加氏乳杆菌	7.43 ± 0.92	6.04 ± 0.17	4.032	0.870
詹氏乳杆菌	16.08 ± 0.34	19.12 ± 0.93	1.166	0.566
阴道乳杆菌	5.00 ± 0.32	12.11 ± 0.71	0.443	0.006
发酵乳杆菌	18.90 ± 1.46	29.34 ± 1.93	7.098	0.003
德氏乳杆菌	19.02 ± 0.13	19.78 ± 0.85	0.675	0.334

表6 两组乳杆菌刺激阴道上皮细胞产生 IL-8 的比较 (ng/L $\bar{x} \pm s$)

菌种名称	对照组	VVC 组	F 值	P 值
卷曲乳杆菌	8.76 ± 1.06	19.13 ± 0.73	5.438	0.001
加氏乳杆菌	12.42 ± 2.15	8.09 ± 0.26	6.667	0.450
詹氏乳杆菌	19.12 ± 0.17	18.10 ± 0.56	9.032	0.229
阴道乳杆菌	11.80 ± 0.22	11.78 ± 0.59	5.987	0.097
发酵乳杆菌	16.44 ± 2.10	39.78 ± 1.02	4.223	0.004
德氏乳杆菌	25.65 ± 0.27	22.35 ± 0.36	8.430	0.489

3 讨论

VVC 的既往研究主要集中于致病源假丝酵母菌,关注阴道微环境中乳杆菌的研究极少。本课题组前期研究^[5]提示:阴道乳杆菌对阴道鳞状上皮细胞的黏附以及其刺激鳞状上皮细胞产生的多种细胞因子可能与 VVC 的发病发展相关。乳杆菌的黏附能力受到细胞表面电荷与疏水性的影响^[6],并且在黏附过程中还受环境因素的影响^[7]。不同乳杆菌菌种黏附能力不同,内源性乳杆菌的黏附能力相对较强^[8]。研究^[9-10]显示乳杆菌能通过多种方式抑制真菌与鳞状上皮细胞的黏附与定植,这可能是乳杆菌保护患者免得 VVC 的机制之一,然而在 VVC 患者中,乳杆菌本身与阴道黏膜上皮细胞的黏附功能是否存在异常,既往研究很少。

本研究采用女性阴道来源的乳杆菌,与阴道上皮细胞标准菌株进行实验,在对照组和 VVC 组比较来看,卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和发酵乳杆菌的黏附性在两组之间的差异有统计学意义,而其他三种乳杆菌黏附性在两组之间的差异并无统计学意义。这一结果提示:在 VVC 患者中,阴道微环境中部分乳杆菌菌种的黏附性减低。然而,乳杆菌黏附性减低导致 VVC 发病,还是发病后乳杆菌黏附性减低,没有明确结论。本研究同时发现不同乳杆菌菌种的黏附性不同,其中德氏乳杆菌黏附性最低,而加氏乳杆菌黏附性最高。这与之前的研究结果一致。

在女性生殖系统的防御系统中,黏膜免疫是第一道防线。阴道局部的黏膜免疫系统包括迁移至子宫、宫颈和阴道的免疫细胞,还有局部的鳞状上皮细

胞和基质细胞^[11]。激素能通过影响这些细胞黏附分子和趋化因子的表达从而影响巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞和 B 细胞的迁移,最终调控局部免疫。由于阴道鳞状上皮细胞具有屏障作用、运送免疫球蛋白、抗菌和抗病毒物质,还可以通过产生趋化因子和细胞因子,调动其他细胞的固有免疫和适应性免疫,因此阴道鳞状上皮细胞是阴道局部免疫系统的核心^[12]。

阴道鳞状上皮细胞能够产生多种细胞因子。比如,白色念珠菌能使阴道鳞状上皮细胞系 A431 产生大量的 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、巨噬细胞-粒细胞集落刺激因子、 γ 干扰素 (IFN- γ) 和 α 干扰素 (TNF- α)^[13],还能使细胞系 VK2 (E6/E7) 产生大量的 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-13 和 TNF- α ,而 IL-10 和 IFN- γ 并未明显增加^[14]。乳杆菌作为阴道微生态平衡的主导因素之一,对阴道鳞状上皮细胞免疫功能影响的研究甚少。乳杆菌 Reuteri RC-14 和乳杆菌 rhamnosus GR-1 同时作用下,可以刺激 VK2,从而使 IL-8 和 γ 干扰素诱导蛋白 10 (interferon- γ -inducible protein-10, IP-10) 的产生增加。乳杆菌 Reuteri 单独存在时上调 IL-8 的水平,而乳杆菌 rhamnosus 单独存在时能刺激 IP-10 的分泌^[15-16]。

为了比较 VVC 患者和健康女性乳杆菌刺激鳞状上皮细胞产生细胞因子作用的差别,本研究比较了 6 种乳杆菌对上皮细胞系 VK2 (E6/E7) 产生 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 的能力。与既往研究不同,本研究发现多个乳杆菌均能增强细胞系 VK2 产生细胞因子的作用,而且这种促进作用有菌种/菌株特异性。卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和发酵乳杆菌能促使 VK2 细胞系产生更多的 IL-6 和 IL-8,而对 IL-1 α 和 IL-1 β 的影响不大,而詹氏乳杆菌、阴道乳杆菌和德氏乳杆菌对四种细胞因子的影响正好相反。这一结果提示:在 VVC 患者中,卷曲乳杆菌、阴道乳杆菌和发酵乳杆菌功能存在缺陷,不能有效抑制白色念珠菌通过核因子- κ B 通路所导致的 IL-6 和 IL-8 大幅升高,从而导致阴道局部免疫炎症反应加重^[12,14]。而加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌和发酵乳杆菌作用组阴道上皮细胞产生 IL-6 和 IL-8 的水平与对照组无明显差别。在加氏乳杆菌和德氏乳杆菌作用组,IL-6 和 IL-8 的水平并未改变,但 IL-1 α 和 IL-1 β 的水平明显高于对照组,提示这两种菌可能通过 MAPK 信号通路激活了鳞状上皮细胞对 IL-1 α 和 IL-1 β 的上调^[12]。

参考文献

- [1] Yano J, Peters B M, Noverr M C, et al. Novel mechanism behind the immunopathogenesis of vulvovaginal *Candidiasis* “Neutrophil anergy” [J]. *Infect Immun* 2018, 86(3): 1–12.
- [2] 张瑞, 吴文湘, 桑佳特. 甲硝唑对阴道乳杆菌增殖影响的体外研究[J]. *山西医科大学学报* 2018, 49(4): 361–4.
- [3] Yu P, Ke C, Guo J, et al. *Lactobacillus plantarum* L15 alleviates colitis by inhibiting LPS-mediated NF- κ B activation and ameliorates DSS-induced gut microbiota dysbiosis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575173.
- [4] 许啸声, 沈健, 刘延, 等. 雌激素调节阴道常驻菌诱导的阴道上皮细胞免疫应答实验研究[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38(6): 497–503.
- [5] 张瑞, 种魏芳, 吴文湘, 等. 乳杆菌功能改变与外阴阴道假丝酵母菌病[J]. *中国妇产科临床杂志* 2019, 20(3): 224–6.
- [6] Pinto A, Barbosa J, Albano H, et al. Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their characterization as potential probiotics [J]. *Microorganisms* 2020, 8(3): 393–406.
- [7] 张明辉, 王光强, 夏永军, 等. 植物乳杆菌粘附性与其表面特征关系的探究[J]. *工业微生物* 2017, 47(1): 37–42.
- [8] Yadav A K, Tyagi A, Kumar A, et al. Adhesion of *Lactobacilli* and their anti-infectivity potential [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(10): 2042–56.
- [9] Parolin C, Marangoni A, Laghi L, et al. Isolation of vaginal *Lactobacilli* and characterization of anti-candida activity [J]. *PLoS One* 2015, 10(6): e0131220.
- [10] Wang H, Chen T, Chen Y, et al. Evaluation of the inhibitory effects of vaginal microorganisms on sperm motility *in vitro* [J]. *Exp Ther Med* 2020, 19(1): 535–44.
- [11] Ajdary M, Zandieh Z, Amjadi F S, et al. Interaction of sperm with endometrium can regulate genes involved in endometrial receptivity pathway in mice: An experimental study [J]. *Int J Reprod Biomed* 2020, 18(10): 815–24.
- [12] Zhan L, Liu X, Zhang J, et al. Immune disorder in endometrial cancer: Immunosuppressive microenvironment, mechanisms of immune evasion and immunotherapy [J]. *Oncol Lett* 2020, 20(3): 2075–90.
- [13] Cassone A, Sobel J D. Experimental models of vaginal *Candidiasis* and their relevance to human *Candidiasis* [J]. *Infect Immun*, 2016, 84(5): 1255–61.
- [14] Superti F, De Seta F. Warding off recurrent yeast and bacterial vaginal infections: *Lactoferrin* and *Lactobacilli* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 130–46.
- [15] Jang S J, Lee K, Kwon B, et al. Vaginal *Lactobacilli* inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8121–30.
- [16] Martinez R C, Seney S L, Summers K L, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation [J]. *Microbiol Immunol* 2009, 53(9): 487–95.

The ability of adhesion and the function of regulating immune factors of vaginal *Lactobacillus* in VVC patients

Chen Shi Zhang Rui

(Dept of Obstetrics and Gynecology, Peking University First Hospital, Beijing 100034)

Abstract *Objective* To investigate the ability of adhesion and the function of regulating local immune factors in vulvovaginal *Candidiasis* (VVC) patients. *Methods* *Lactobacillus* strains were isolated and identified from vaginal secretions of VVC patients and healthy control women. The adhesion ability of different vaginal *Lactobacillus* strains with vaginal squamous cell line VK2 / E6E7 was measured. The levels of interleukin (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 secreted by vaginal squamous cell line VK2/E6E7 in the presence of different *Lactobacillus* were measured. *Results* The adhesion abilities of *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus fermentum* in VVC group was significantly lower than those in control group. Compared with the control group, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus fermentum* in VVC group could upregulate the level of IL-6 and IL-8, *Lactobacillus vaginalis* could upregulate the level of IL-6, while *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* could upregulate the level of IL-1 α and IL-1 β . *Conclusion* In VVC group, the adherence of *Lactobacilli* is decreased and the local immune function of vagina is abnormal.

Key words function of *Lactobacillus*; vulvovaginal *Candidiasis*; adhesion ability; local immunity in vagina; cytokines