

外阴阴道假丝酵母菌病的基础研究进展

马洋洋,蔡淑嫣,许瑞雪 综述 蒋学风* 审校

作者单位:510630 广东 广州,暨南大学附属第一医院妇产科
作者简介:马洋洋,毕业于新乡医学院,本科,现为暨南大学全日制研究生在读,主要研究方向为妇科炎症及妇科肿瘤
* 通信作者,E-mail:xuefengjiang@126.com

【关键词】 外阴阴道假丝酵母菌病;发病机制;NLRP 3 炎性体;细胞焦亡;形态转换
【中图分类号】R 711.31 【文献标志码】A 【文章编号】1674-4020(2021)06-031-04
doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.06.08

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是一种机会性黏膜感染疾病,主要由假丝酵母菌感染诱导所致,以外阴阴道瘙痒、灼热痛、豆腐渣样白带为主要临床表现。1 年内有症状并经真菌学证实的 VVC 发作 4 次或以上,称为复发性外阴阴道假丝酵母菌病(recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC)^[1]。VVC 易复发,尽管针对 VVC/RVVC 研发了多种新药和有效的 RVVC 维持疗法,但在过去 30 多年里,VVC 的年患病率及复发率并没有大幅下降,Denning 等^[2]预测到 2030 年 RVVC 病例将有上升趋势。

VVC 的发病机制较为复杂,被认为是一种多因素疾病,其中阴道微生物失衡、雌激素水平、宿主易感因素、遗传易感因素和念珠菌的形态都与疾病的发生相关^[3]。现就核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)相关细胞焦亡、形态转换、细菌与真菌的相互作用在 VVC 发病机制中的进展做一综述。

1 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性体相关细胞焦亡

目前越来越多的研究将先天的黏膜防御机制与疾病免疫病理学联系起来,包括多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)募集和促炎性细胞因子在阴道黏膜的表达,并认为 RVVC 和 VVC 的症状是由于 PMN 募集介导的,而这与假丝酵母菌激活的 NLRP3 炎性体密切相关。

1.1 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性体及细胞焦亡经典途径

NLRP3 是核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白家

族的成员,与接头蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)和半胱天冬酶-1(caspase-1)共同组成多蛋白复合体(NLRP3 炎性体),通过激活 caspase-1 将白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-18(IL-18)的非活性前体裂解成具有生物活性的细胞因子;而 caspase-1 通过切割 GSDMD(Gsdmermin D)蛋白形成的 N 端结构域,可以在细胞膜上聚集形成孔洞破坏巨噬细胞的完整性,释放 IL-1 β 和 IL-18 到细胞外,最终导致巨噬细胞死亡即细胞焦亡^[4]。这种依赖 NLRP3 炎性体激活触发细胞焦亡的途径称为经典途径的细胞焦亡。

1.2 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性体在外阴阴道假丝酵母菌病中的作用

在 1 项研究中发现,NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-}、caspase-1^{-/-}和 IL-1R^{-/-}的假丝酵母菌感染小鼠中,假丝酵母菌负荷量增加,生存率下降,这表明 NLRP3 炎性体在假丝酵母菌模型中具有保护性作用^[5]。Roselletti 等^[6]发现有症状的 VVC 患者阴道液中存在大量 PMN 募集,且均检测到 NLRP3 炎性体和 caspase-1 的表达以及 IL-1 β 和 IL-8 两种炎性细胞因子,而无症状携带者及健康女性这些因子几乎不表达。1 项动物实验发现 NLRP3^{-/-}的 VVC 小鼠模型中,阴道 PMN 的募集、警报蛋白 S100A8 和炎性因子明显减少,并认为在感染过程中,NLRP3 可能是通过警报蛋白和一些炎性因子(如 IL-1 β)来控制 PMN 的募集。以上这些研究表明,VVC 患者阴道中存在活跃的炎症反应,NLRP3 炎性体的表达促使 VVC 患者阴道中的 PMN 募集、IL-1 β 和 IL-8 的产生,促进 VVC 的症状学表现。

但 VVC 期间观察到强烈的炎症反应和 PMN 募集并不影响真菌负荷,Junko Yano 等^[7]发现小鼠阴道环境中存在的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)作为 PMN 上

巨噬细胞抗原-1 (macrophage associated antigen-1, Mac-1) 的竞争配体,使中性粒细胞不能与念珠菌结合发挥杀菌作用而处于功能性“无能”状态。免疫病理的诱因持续存在,激活 NLRP3 炎性体募集 PMN,从而形成正反馈,导致阴道黏膜高度炎症状态。因此有人提出 VVC/RVVC 可能是由于 PMN 过度侵略性的先天反应,而不是受损的适应性免疫反应^[1]。Jaeger 等^[8]的研究加强了 NLRP3 炎性体在促进 VVC 持续的高炎症状态中的中心作用,并提供了有力的证据证明 RVVC 患者中存在炎性小体和 IL-1 β 产生类似的过度活化。有研究发现在 PMN 耗竭的 VVC 小鼠模型中检测到的一种已知的细胞损伤标记物乳酸脱氢酶水平与对照组相似,这表明即使在缺乏强有力的免疫病理刺激下,黏膜依然会发生损伤,这种损伤可能是真菌菌丝导致的^[9]。因此,我们推测由 NLRP3 炎性体介导的阴道高度炎症状态及 PMN 的无能会造成慢性阴道黏膜损伤,影响黏膜修复进而有利于 VVC 发展为 RVVC。

1.3 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 介导的细胞焦亡对外阴阴道假丝酵母菌病的影响

有研究发现在巨噬细胞吞噬假丝酵母菌后的早期,假丝酵母菌是通过激活 NLRP3 诱导焦亡杀死巨噬细胞,在吞噬后的晚期一方面假丝酵母菌仍然可以通过转换为菌丝,对巨噬细胞膜造成物理性损害,最终穿透细胞膜导致巨噬细胞死亡,另一方面假丝酵母菌通过与巨噬细胞竞争性消耗葡萄糖引发巨噬细胞的快速死亡,从而逃避先天免疫^[10]。焦亡通过巨噬细胞自身裂解发生的炎症反应一定程度上有利于组织的修复及病原菌的清除,但炎症反应过度激活或持续存在会对组织造成伤害,使原有疾病加重,进一步导致 VVC 的复发。

2 形态转换

假丝酵母菌是人体常见的一种机会性致病菌,通常无症状定植在阴道、口腔、消化道、皮肤上,在不同的宿主环境因素刺激下可呈现不同的形式,较为常见的有呈球形或椭圆球形的出芽酵母形式和细长的菌丝(假菌丝/真菌丝)形式。酵母相-菌丝相的转换及菌丝相关基因和毒力因子的表达,如菌丝细胞壁蛋白 1 (hyphal wall protein-1, HWPI)、细胞延伸程度基因 ECEL (extent of cell elongation) 编码的念珠菌溶素酶、分泌型天冬氨酸蛋白酶 (secretory aspartyl proteinases, SAPs) 或凝集素样序列 3 (agglutinin-like sequence 3, ALS3) 基因,促进假丝酵母菌的粘附、侵袭、营养获取、宿主细胞损伤和免疫逃避等^[11]。

2.1 信号传导通路与转录调控和生物合成途径相关的机制

假丝酵母菌的形态转换受多种转录因子 (transcription factor, TF) 的严格调控,当宿主环境因素变化或营养缺乏时(包括血清、温度、中性/碱性 pH、氮缺

乏、碳缺乏、低氧、N-乙酰氨基葡萄糖),这些转录因子会通过多种途径发出信号激活或抑制菌丝转换通路^[12]。研究较多的有环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cAMP-protein kinase A, cAMP/PKA) 通路、丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、转录因子 Rim101 (regulator of IME2) 介导的 PH 信号通路、转录阻遏物 Tup1 (dTMP-UTake) 介导的负调控信号通路,它们通过调节其下游的转录因子抑制菌丝的生长发育。除此之外, Kadosh^[13] 发现白色念珠菌 TLO 基因家族的基因组扩张导致更大的“游离”TLO 蛋白库,通过与 DNA 结合的转录激活因子竞争与共激活因子的结合,导致负向丝状生长调节基因 (negative filamentous growth regulator gene, NFG) 不被激活,细胞以丝状生长;组蛋白调节基因 HIR1 (Histone regulation-1) 是复制非依赖性组蛋白伴侣复合体的关键成分,HIR 缺失导致菌丝特异基因 (hyphal-specific gene, HSG) 表达的幅度降低,丝状减少;热休克转录因子 (heat shock factor-1, HSF1) 是假丝酵母菌对热休克反应的关键转录调控因子,通过增加正向丝状生长调控因子 [如 UME6 (unscheduled meiotic gene expression 6)] 和减少负向调控因子 NRG1 (negative regulator of glucose-controlled genes 1) 的表达促进高水平的丝状化,还可通过依赖表皮生长因子 (epidermal growth factors-1, Efg1) 的途径和通过抑制热休克蛋白 (heat shock protein-90, Hsp90) 伴侣的功能促进细丝形成;除了许多已知的丝状化调节因子的研究,有报道抑制麦角甾醇和 N-连接的糖基化两条生物合成途径也可以抑制酵母-菌丝的转换。

2.2 菌丝相关基因和毒力因子在外阴阴道假丝酵母菌病发病机制中的作用

菌丝相关基因和毒力因子的表达在 VVC 的发病机制中扮演重要角色,尤其是 ECEL 编码的念珠菌溶素是驱动损伤和外阴阴道免疫发病的关键,一方面激活 NLRP3 炎性体激活先天免疫,另一方面直接破坏阴道黏膜,释放损伤相关分子模式 (damage associated molecular pattern, DAMP) 进一步放大阴道黏膜的先天免疫病理信号^[14]。有研究发现 ECEL 在检测的所有 VVC 患者中表达上调,而在无症状携带者中不表达;敲除 ECEL 可显著降低小鼠阴道内感染 (中性粒细胞、促炎细胞因子、警报蛋白) 和组织损伤的免疫病理标记物^[9]。此外有研究发现念珠菌溶素与宿主细胞膜的直接相互作用是导致单核巨噬细胞死亡的另一途径,与炎性小体和焦亡无关。SAP 的表达使真菌能够粘附或入侵和破坏宿主组织,有研究发现天冬氨酸蛋白酶家族尤其是 SAP2, SAP6 可以通过激活 NLRP3 炎性体和 caspase-1 引起 IL-1 β 和 IL-18 产生,且 SAP 可以通过多种途径介导细胞因子的产生,这可能促进假丝酵母菌炎症过度反应^[15]。但有研究发现, SAP2 和 SAP5 在大部分菌丝缺陷的 Efg1 Δ/Δ 、假丝酵母菌假菌丝调控因子 cph1 (candida pseudo hyphal

regulator 1) Δ/Δ 背景中的过表达不会引起黏膜损伤或炎症,认为菌丝似乎是增强这种活性所必需的^[16]。由此可见,了解环境信号如何调节白色念珠菌形态的发生,以及菌丝相关基因和毒力因子的表达对理解 VVC 发病机制和开发新的治疗策略具有重要意义。

3 细菌与白色念珠菌相互作用

正常人阴道中寄居有各种各样的微生物群(如细菌、真菌、支原体等),它们间的相互作用共同维持阴道微生态的平衡,一旦打破就会出现各种阴道的感染性疾病,如细菌性阴道炎、念珠菌性阴道炎等^[17]。其中细菌为代表的乳杆菌属作为阴道的优势杆菌,可以通过分解阴道上皮的糖原维持阴道的酸性环境、分泌过氧化氢或细菌素、减少真菌与阴道黏膜的粘附等抑制或杀灭其他病原微生物,因此,被视为治疗或预防 VVC 有前途的益生菌^[18]。有研究证实阴道乳杆菌可以抑制假丝酵母菌的生长、形态转换,尤其是卷曲乳杆菌^[19]。这可能是通过上调转录阻遏基因 NRG1 的表达,下调菌丝特异性基因 ALS3、HWPI 和 ECE1 的表达抑制菌丝形成。这与 Jang SJ 等^[20]研究结果一致,即乳杆菌上清液处理组中菌丝相关基因 ALS3、ECE1、SAP5 和 HWPI 的表达显著下调,且中性 pH 条件下的抗真菌活性不受热灭活和蛋白水解酶处理的影响。

群体感应是一种以响应周围微生物群落的细胞密度和物种组成的变化,是微生物间能够集体改变行为的细胞间交流过程^[21]。法尼醇是第一个从真菌中分离出来的群体感应分子,是真菌麦角固醇生物合成过程中的中间产物,它可以通过抑制假丝酵母菌向菌丝的转换、诱导菌丝向酵母的转换、抑制假丝酵母菌生物膜形成、以及诱导假丝酵母菌的凋亡来降低假丝酵母菌的毒力^[22]。但有研究证明法尼醇在高浓度情况下不会影响阴道乳酸杆菌的生长,但是可能会影响对阴道上皮的粘附性^[23],法尼醇的这一特性提示作为 VVC 治疗的辅助抗菌剂以及阴道环境维持的安全性仍然需要进一步探索。

Swidsinski 等^[24]针对 VVC 妇女的阴道组织活检研究发现,真菌不均匀地侵袭在活检的阴道上皮表面,且真菌的浸润常伴有细菌(乳杆菌、加德纳氏菌和阿托波氏菌最常见)成分的共同侵入,细菌可均匀地分布在真菌侵袭的深度(加德纳菌和乳杆菌较为典型),也可集中在真菌侵袭的前沿(乳杆菌多见),真菌与细菌的相互作用可能有助于真菌从腐生型向侵袭型的转变(见图 1、图 2,见彩插 1)。

以上介绍了 VVC 与 NLRP3 相关的免疫学机制、形态转换、以及细菌与真菌的相互作用,并提出 NLRP3 炎性体相关焦亡在 VVC 患者阴道炎症过度激活中的重要性、白色念珠菌的形态控制机制可能是重要的抗真菌靶标以及假丝酵母菌感染过程中伴有细菌的移位对阴道

上皮的作用可能成为 VVC 易复发的另一机制,值得进一步研究。明确这些机制可能会为 VVC 的治疗提供新的思路,从而提高患者的生活质量。

【参考文献】

- [1] Rosati D, Bruno M, Jaeger M, et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis: an immunological perspective [J]. *Microorganisms*, 2020,8(2):144.
- [2] Denning DW, Kneale M, Sobel JD, et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2018,18(11):e339-e347.
- [3] Willems H, Ahmed S S, LIU J, et al. Vulvovaginal candidiasis: a current understanding and burning questions [J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2020,6(1):27.
- [4] Christgen S, Place D E, Kanneganti T D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation [J]. *Cell Research*, 2020,30(4):315-327.
- [5] Hise A G, Tomalka J, Ganesan S, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. *Cell Host & Microbe*, 2009,5(5):487-497.
- [6] Roselletti E, Perito S, Gabrielli E, et al. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans* [J]. *Scientific Reports*, 2017,7(1):17877.
- [7] Yano J, Peters B M, Noverr M C, et al. Novel mechanism behind the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis: "neutrophil anergy" [J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86 (3): e00617-e00684.
- [8] Jaeger M, Carvalho A, Cunha C, et al. Association of a variable number tandem repeat in the NLRP3 gene in women with susceptibility to RVVC [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2016,35(5):797-801.
- [9] Richardson J P, Willems H, Moyes D L, et al. Candidalysin drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa [J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86 (2): e00617-e00645.
- [10] Westman J, Hube B, Fair G D. Integrity under stress: Host membrane remodelling and damage by fungal pathogens [J]. *Cellular Microbiology*, 2019,21(4):e13016.
- [11] Kornitzer D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals [J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2019,5(1):21.
- [12] Villa S, Hamideh M, Weinstock A, et al. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2020,20(1):foaa005.
- [13] Kadosh D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans* [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2019,52:27-34.
- [14] Rogiers O, Frising U C, Kuchariková S, et al. Candidalysin crucially contributes to Nlrp3 inflammasome activation by *Candida albicans* hyphae [J]. *mBio*, 2019,10(1):e02218-e02221.
- [15] Pietrella D, Pandey N, Gabrielli E, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome [J].

European Journal of Immunology,2013,43(3):679-692.

- [16] Willems H, Bruner W S, Barker K S, et al. Overexpression of candida albicans secreted aspartyl proteinase 2 or 5 is not sufficient for exacerbation of immunopathology in a murine model of vaginitis [J]. Infection and Immunity, 2017, 85 (10): e00217-e00248.
- [17] Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, De Salazar A, et al. Reviewing the composition of vaginal microbiota; inclusion of nutrition and probiotic factors in the maintenance of eubiosis [J]. Nutrients,2020,12(2):419.
- [18] Zangl I, Pap I J, Aspöck C, et al. The role of Lactobacillus species in the control of Candida via biotrophic interactions [J]. Microbial Cell (Graz, Austria), 2019, 7(1):1-14.
- [19] Wang S, Wang Q, Yang E, et al. Antimicrobial compounds produced by vaginal lactobacillus crispatus are able to strongly inhibit candida albicans growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:564.

- [20] Jang S J, Lee K, Kwon B, et al. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of Candida albicans [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):8121.
- [21] Abisado R G, Benomar S, Klaus J R, et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions [J]. mBio, 2018, 9(3):e02317-e02331.
- [22] Wang F-j, Liu Z-h. Systematic analysis of protein expression in Candida albicans exposed to farnesol [J]. Chinese Medical Journal, 2019, 132(19):2348-2353.
- [23] Wang Fengjuan, Liu Zhaohui, Zhang Dai, et al. In vitro activity of farnesol against vaginal Lactobacillus spp [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2017, 212: 25-29.
- [24] Swidsinski A, Guschin A, Tang Q, et al. Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2019, 220(1):91. e1-91. e8.

(收稿日期:2020-10-11 编辑:向晓莉)

(上接第30页)

- [29] Siravegna G, Bardelli A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients [J]. Molecular Oncology, 2016, 10(3):475-480.
- [30] Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, et al. Personalized circulating tumor DNA biomarkers dynamically predict treatment response and survival in gynecologic cancers [J]. PLOS One, 2015, 10(12):e0145754.
- [31] Martignetti J A, Camacho-Vanegas O, Friedigkeit N, et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA [J]. Neoplasia (New York, N. Y.), 2014, 16(1):97-103.
- [32] Moss E L, Gorsia D N, Collins A, et al. Utility of circulating tumor DNA for detection and monitoring of endometrial cancer recurrence and progression [J]. Cancers, 2020, 12(8):2231.
- [33] Margolin G, Petrykowska H M, Jameel N, et al. Robust detection of DNA hypermethylation of ZNF154 as a pan-cancer locus with in silico modeling for Blood-Based diagnostic development [J]. The Journal of Molecular Diagnostics:JMD, 2016, 18(2):283-298.
- [34] Walboomers J M, Jacobs M V, Manos M M, et al. Human

papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. The Journal of Pathology, 1999, 189(1):12-19.

- [35] Gu Y, Wan C, Qiu J, et al. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis [J]. PLOS One, 2020, 15(2):e0224001.
- [36] Campitelli M, Jeannot E, Peter M, et al. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients [J]. PLOS One, 2012, 7(8):e43393.
- [37] Tranberg M, Bech B H, Blaakær J, et al. Preventing cervical cancer using HPV self-sampling: direct mailing of test-kits increases screening participation more than timely opt-in procedures-a randomized controlled trial [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):273.
- [38] Sankaranarayanan R, Nene B M, Shastri S S, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India [J]. The New England Journal of Medicine, 2009, 360(14):1385-1394.
- [39] Georg G, Marion Z, Matthias Z, et al. Circulating nucleic acids in plasma or serum(CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias [J]. Disease Markers, 2014, 21(3): 105-120.

(收稿日期:2020-07-22 编辑:舒砚)