

中性粒细胞胞外陷阱在念珠菌性阴道炎患者中的表达及意义

林珍云, 费小阳, 陈豪, 陈临节, 杨扬

杭州市妇产医院生殖中心, 浙江 杭州 310009

摘要:目的 研究单纯性外阴阴道念珠菌病(VVC)和复杂性外阴阴道念珠菌病(RVVC)阴道内中性粒细胞胞外陷阱(NETs)量的差异以及NETs含量对阴道炎病程的影响。方法 收集2016年1月1日—10月30日期间在杭州市妇产医院就诊的患外阴阴道念珠菌病的已婚妇女193例进行研究,其中单纯性VVC患者120例,RVVC患者73例。结果 所有研究对象阴道涂片中均找到NETs,单纯性VVC患者治疗前NETs+级41例,++级60例,+++级19例,RVVC患者治疗前NETs+级50例,++级20例,+++级3例,2组比较,单纯性VVC组患者NETs平均含量高于RVVC组,差异有统计学意义($Z = -9.732, P < 0.05$)。单纯性VVC组患者治疗后第7天复查,NETs+级41例,念珠菌转阴患者30例,转阴率为73.17%,NETs++级患者60例,念珠菌转阴患者56例,转阴率为93.33%,NETs+++级患者19例,念珠菌转阴患者18例,转阴率为94.73%,NETs++级、+++级患者治疗后7d念珠菌转阴率高于NETs+级患者,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.317, 6.774$, 均 $P < 0.05$)。结论 NETs参与念珠菌阴道炎的免疫反应,念珠菌阴道炎的治愈时间及复发和NETs形成的程度密切相关。

关键词:中性粒细胞胞外陷阱;白色念珠菌;阴道炎;阴道涂片

中图分类号: R711.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2018)05-0792-03

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000216

Expression and significance of neutrophil extracellular traps in patients with Candida vaginitis

LIN Zhen-yun, FEI Xiao-yang, CHEN Hao, et al

Reproductive Center of Hangzhou Women's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310009, China

Abstract: Objective To study the difference of extracellular traps (NETs) between VVC and RVVC and whether the amount of NETs would have influence on the cure time of VVC. **Methods** This study was conducted between January, 2016 and October, 2016 on women suffering from Candida vaginitis at Hangzhou Maternity Hospital. Total 193 patients were recruited, including 120 VVC and 73 RVVC. **Results** NETs were found in all samples. The grade of NETs were rated as +, ++ and +++. In the group of VVC, 41 samples were rated as +, 60 samples were rated as ++ and 19 were rated as +++ before treatment. In the group of RVVC, 50 samples were rated as +, 20 samples were rated as ++ and 3 were rated as +++. The NETs formation in VVC group was stronger than that in RVVC group, the difference was statistically significant ($Z = -9.732, P < 0.05$). The VVC group patients came back to hospital 7 days after treatment, 30 cases of Candida turned negative among NETs + patients, negative rate is 73.17% (30/41), 56 cases of Candida turned negative among NETs ++ patients, negative rate is 93.33% (56/60), 18 cases of Candida turned negative among NETs +++ patients, negative rate is 94.73% (18/19), the negative rate in NETs ++, +++ patients was higher than that in NETs + patients, the difference was statistically significant ($\chi^2 = 6.317$ and $6.774, P < 0.05$). **Conclusion** Our results indicated that NETs were involved in the immune response in Candida vaginitis. The responses to antifungal therapy showed a close correlation between the cure time and the degree of NETs formation in Candida vaginitis.

Key words: Neutrophil extracellular traps; Candida albicans; Vaginitis; Vaginal Smears

据文献报道,75%的妇女一生中至少会感染一次念珠菌性阴道炎^[1],白色念珠菌是念珠菌性阴道炎最常见的致病菌^[2]。近几年来,念珠菌性阴道炎发病率在世界各地呈明显上升趋势,虽然目前的治疗方法能有效地杀灭病原菌和减轻相关症状,但由于念珠菌性阴道炎容易复发的特点经常困扰患者^[3]。复发性念珠菌性阴道炎的发生机制目前尚不明了,推测可能与局部免疫功能异常有关。中性粒细胞是抵御病原微生物入侵的第一道防线,在宿主防御真菌感染中发挥重要

作用^[4]。中性粒细胞通过吞噬、脱颗粒、产生活性氧(ROS)、抗菌肽的产生和中性粒细胞胞外陷阱(NETs)来防止微生物入侵^[5-7]。NETs是新近发现的细胞外结构,主要由组蛋白和许多颗粒状抗菌蛋白组成,它们诱捕、控制和杀灭病原体包括细菌和真菌^[8]。然而目前NETs与念珠菌阴道炎发病和病程之间的关系尚不清楚。本研究拟研究念珠菌阴道炎中NETs的存在情况,并进一步探讨NETs的数量与疾病预后的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集2016年1月1日—10月30日期间在杭州市妇产医院就诊的患外阴阴道念珠菌病的妇女进行本研究,所有患者知情同意。诊断标准:①外

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2013KYA154, 2014KYA265)

通信作者:林珍云, E-mail: medicinen@163.com

阴阴道念珠菌病(VVC):由于念珠菌在无症状的阴道寄居时往往仅见到芽孢而很少见到菌丝,故在有症状患者的分泌物中找到芽孢和菌丝即可作出外阴阴道念珠菌病的诊断。②单纯性VVC:是指发生于正常非孕宿主的、散发的、由白色念珠菌引起的轻度单纯性VVC。③RVVC是指妇女患单纯性VVC后,经过治疗,临床症状和体征消失,真菌学检查阴性后,又出现症状,且真菌学检查阳性或1年内发作4次或以上者。参与研究对象共193例,其中:单纯性VVC 120例;RVVC 73例。年龄18~48岁,平均年龄为(34.92±8.75)岁。入选标准:①临床确诊的单纯性VVC或RVVC患者;②生育年龄,在18岁以上有性生活,未绝经;③在治疗及随访期间不进行房事。排除标准:妊娠、糖尿病及其他影响阴道微环境的疾病。

1.2 检查方法 ①对所有研究对象进行阴道分泌物真菌学检查。②记录所有研究对象的一般情况,包括末次月经、单纯性VVC、RVVC发病情况等。③所有研究对象在治疗前阴道涂片免疫荧光染色NETs分析。④单纯性VVC患者给予克霉唑500mg单次给药,用药后第7天再次行阴道分泌物镜检和阴道涂片检查NETs。RVVC治疗包括强化治疗和巩固治疗。强化治疗:克霉唑500mg,3d后重复一次;巩固治疗:克霉唑500mg,每月1次,连续6个月。在强化治疗第2次用药后第7天再次行阴道分泌物镜检和阴道涂片检查NETs。若随访时来月经,在月经后3d再检查。⑤阴道涂片镜检找白色念珠菌芽孢或菌丝。镜检方法:常用的方法为生理盐水或10%KOH悬滴法。取一滴生理盐水放于玻片上,然后取少许分泌物与生理盐水混合,直接在显微镜下寻找芽孢及菌丝。⑥阴道涂片免疫荧光染色NETs分析:根据既往的研究和描述确定NETs^[9]。阴道涂片用生理盐水冲洗,随后立即用4%多聚甲醛固定,用PBST洗3次,每次10min,0.5% Triton透膜10min,用PBST洗3次,每次10min,10%驴血清封闭,室温放置1h,加适量一抗,4℃过夜(羊抗鼠Histone H2A.X,抗体稀释浓度1:100,兔抗人NE,抗体稀释浓度1:200),用PBST洗3次,每次10min,加入适量二抗,避光,室温放置2h(驴抗羊555,二抗1:1000稀释,驴抗兔488,二抗1:400稀释),加入适量含DAPI的Vectorlabs防荧光淬灭封片剂,盖上盖玻片,荧光显微镜下观察。阳性细胞进行计数,10个视野(×400)。

1.3 观察指标 ①微生物学指标,根据随访的真菌学检查结果,按两级标准评定,阴性:念珠菌直接镜检为阴性;阳性:念珠菌直接镜检为阳性。②NETs的分级,根究既往的研究进行NETs的分级^[10],+:10%;++:

10%~30%;+++ :31%~50%。

1.4 统计学方法 所有数据均采用SPSS 17.0统计软件包进行统计学处理,采用非参数检验中Mann-Whitney U检验进行统计学分析,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

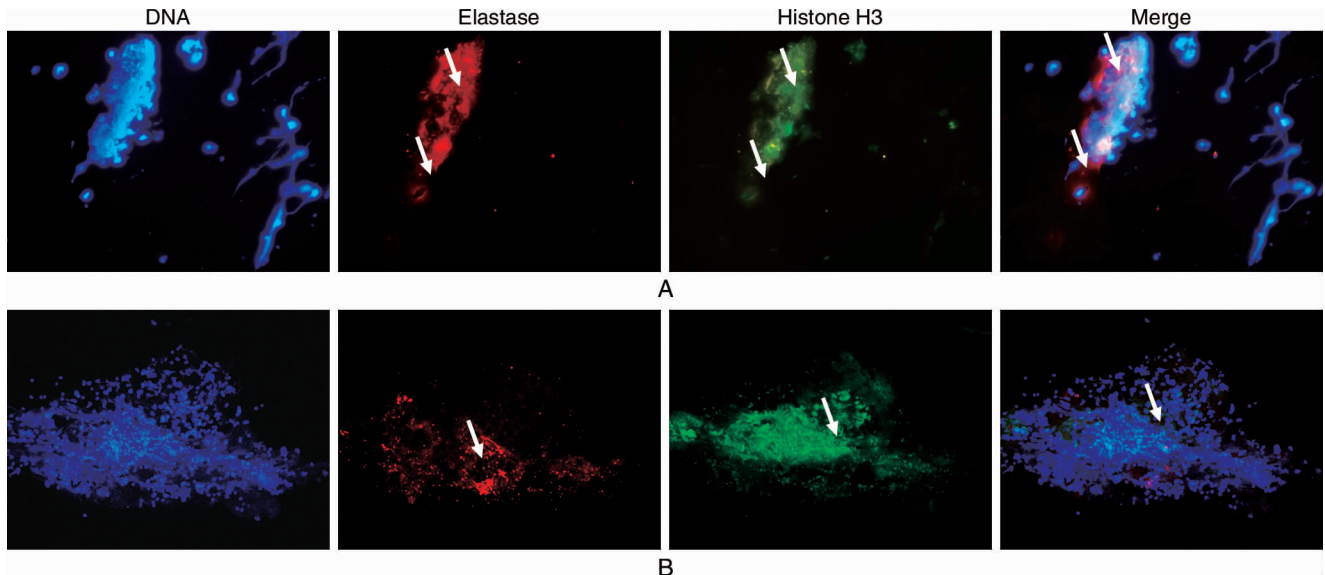
免疫荧光染色显示念珠菌阴道炎涂片中有NETs,单纯性VVC患者治疗前NETs+级41例,++级60例,+++级19例,RVVC患者治疗前NETs+级50例,++级20例,+++级3例,2组比较,单纯性VVC组患者NETs平均含量高于RVVC组,差异有统计学意义($Z = -9.732, P = 0.006$)。单纯性VVC组患者治疗后第7天复查,NETs+级41例,念珠菌转阴患者30例,转阴率为73.17%,NETs++级患者60例,念珠菌转阴患者56例,转阴率为93.33%,NETs+++级患者19例,念珠菌转阴患者18例,转阴率为94.73%,NETs++级、+++级患者治疗后7d念珠菌转阴率高于NETs+级患者,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.317, 6.774$,均 $P < 0.05$)。RVVC患者NETs+级、NETs++级、NETs+++级患者分别是50例、20例、3例,治疗后第7天复查,念珠菌转阴患者分别是30例、15例、2例,转阴率分别为60%(30/50)、75%(15/20)、66.67%(2/3),差异无统计学意义($\chi^2 = 1.409, P = 0.494$)。单纯性VVC患者NETs+++级、NETs+级治疗后免疫荧光染色复查见图1。

3 讨论

既往对念珠菌性阴道炎的免疫研究大都集中细胞免疫(CMI)和抗体(ABS)介导的体液免疫^[11],但作为抵御感染微生物的第一道防线中的中性粒细胞的作用受到越来越多的重视。本研究表明念珠菌性阴道炎时中性粒细胞能产生NETs并和预后相关,提示NETs在念珠菌性阴道炎中可能发挥作用。

感染时中性粒细胞释放到胞外形成网状结构的NETs,NETs由DNA、组蛋白和中性粒细胞弹性蛋白酶等共同组成^[5-6]。NETs的形成已被证明在其他部位抗真菌感染中起着重要作用。有别于细菌,真菌的存在形态在孢子和菌丝之间切换,孢子可以通过中性粒细胞的吞噬和细胞内脱颗粒而消除,而菌丝太大往往不能被中性粒细胞这种经典抗菌机制吞噬并消除,此时中性粒细胞释放的NETs为机体提供了有效的细胞外抗真菌防御。来自中性粒细胞的NETs可以阻止微生物的传播并增加抗菌物质的局部浓度^[8]。研究结果表明念珠菌阴道炎患者阴道涂片中存在NETs,表明它们可能在阴道抗念珠菌感染中发挥重要作用。在比较单纯性VVC和RVVC患者的NETs形成中,我们发现单纯性VVC患者的NETs等级显著高于RVVC患者,提

示 NETs 在念珠菌性阴道炎发病中可能起关键作用, 并可能决定其病程和发展。



注:图 1A 示单纯性 VVC 患者 NETs+++ 级治疗后第 7 天复查,图 1B 示单纯性 VVC 患者 NETs+ 级治疗后第 7 天复查。

图 1 单纯性 VVC 患者(NETs+++ 级、NETs+ 级)治疗后免疫荧光染色复查情况

本研究发现所有念珠菌阴道炎患者阴道涂片中均找到 NETs,表明 NETs 的敏感性可能比其他常规微生物学检查更高。NETs 的检测可能是判断阴道微生物感染的一种很有效的方法。既往的研究认为,吞噬作用是感染后 60 ~ 120 min 内清除微生物的主要机制,此后中性粒细胞的吞噬能力会受到限制^[12]。随后,激活的中性粒细胞的卷取率与常规吞噬作用的比率很高^[13-14],导致细胞核和颗粒成分在细胞质中混合,最后中性粒细胞死亡时迅速释放出 NETs^[15]。NETs 通过提供高浓度的抗菌肽来结合、诱捕和杀死微生物^[16]。本研究发现念珠菌阴道炎患者 NETs 的形成量与预后有密切关系。较高的 NETs 形成患者治疗反应更好,病程较短。这些数据表明,测量宿主体内 NETs 形成的免疫标记物对于监测体内治疗反应是有用的。

总之,本研究提供了感染念珠菌阴道炎时中性粒细胞 NETs 形成的数据。本研究结果表明 NETs 参与念珠菌阴道炎的免疫反应,念珠菌阴道炎的治愈时间及复发和 NETs 形成的程度密切相关。念珠菌阴道炎 NETs 形成的量可作为判断念珠菌性阴道炎治疗效果和预后的一个工具。另外尚需进一步研究分析 NETs 在念珠菌性阴道炎中的其他功能和作用。

参考文献

[1] 张丽娟. 妊娠期外阴阴道假丝酵母菌病的研究进展[J]. 中国计划生育学杂志, 2014, 22(8): 566-569.
 [2] 张思思, 夏维婷, 周志阳, 等. 念珠菌性阴道炎发病机制及耐药机制的研究进展[J]. 中华全科医学, 2017, 15(11): 1952-1955.
 [3] 赵运转, 史从宁, 张国军, 等. 镜检法和核酸杂交法检测念珠菌性阴道炎的差异及评价[J]. 检验医学与临床, 2014, 21(23): 3275-3276.
 [4] 杨春艳, 李亚军. 中性粒细胞胞外诱捕网在炎症相关疾病中的研

究进展[J]. 微生物与感染, 2017, 12(4): 248-253.

[5] Amulic B, Knackstedt SL, Abu Abed U, et al. Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps[J]. Dev Cell, 2017, 43(4): 449-462.
 [6] 关云艳, 徐小东. 中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(5): 461-464.
 [7] 念学武, 孙二琳, 韩瑞发. 中性粒细胞免疫调节作用的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(5): 394-397.
 [8] Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing[J]. Nat Med, 2015, 21(7): 815-819.
 [9] Shan Q, Dwyer M, Rahman S, et al. Distinct susceptibilities of corneal Pseudomonas aeruginosa clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity[J]. Infect Immun, 2014, 82(10): 4135-4143.
 [10] Jin X, Zhao Y, Zhang F, et al. Neutrophil extracellular traps involvement in corneal fungal infection[J]. Mol Vis, 2016, 22(8): 944-952.
 [11] De Bernardis F, Arancia S, Sandini S, et al. Studies of Immune Responses in Candida vaginitis[J]. Pathogens, 2015, 4(4): 697-707.
 [12] 刘义庆, 卢冰如, 张炳昌, 等. 中性粒细胞的功能及其与自身免疫性疾病关联性研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(5): 712-716.
 [13] Sollberger G, Amulic B, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Independent of De Novo Gene Expression[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157454.
 [14] Tohme S, Yazadani HO, Alkhafaji AB, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress[J]. Cancer Res, 2016, 76(6): 1367-1380.
 [15] 宋向楠, 刘彦虹. 中性粒细胞胞外诱捕网与相关疾病的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40(1): 57-60.
 [16] 朱丽, 高飞, 刘彦虹, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网及其与疾病关系的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2015, 38(5): 479-483.

(本文编辑: 谢飞凤)

收稿日期: 2017-11-20