

网络出版时间: 2021-8-19 16:11 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1122.009.html>

不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌对阴道上皮细胞表达 NLRP3 炎性小体的影响

侯梦瑶¹ 邵明琨² 罗丹丹³ 祁文瑾¹

摘要 目的 研究不同分泌型天冬氨酸蛋白酶(Sap) 酶活性的白假丝酵母菌对人和小鼠阴道上皮细胞表达核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体的影响。方法 收集外阴阴道假丝酵母菌病(VVC) 患者阴道分泌物后纯化、鉴定菌株、检测 Sap 酶活性; 酶步分消化法培养人和小鼠阴道上皮细胞并与不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌共培养; 用免疫荧光法检测阴道上皮细胞中 NLRP3 炎性小体的表达; 用 ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 的水平; 用 HE 染色观察细胞形态。人和小鼠阴道上皮细胞培养方式基本一致。结果 Sap 酶活性强组 NLRP3 炎性小体、IL-1 β 和 IL-18 水平均高于 Sap 酶活性弱组, 并且在感染早期即达高峰。随着感染时间增加可看到细胞破裂、死亡, NLRP3 炎性小体也随之下降, 这在小鼠和人的阴道上皮细胞中呈现出相同趋势。结论 白假丝酵母菌可以刺激阴道上皮细胞表达更多的 NLRP3 炎性小体、IL-1 β 和 IL-18, Sap 酶活性强的白假丝酵母菌作用更强; 小鼠和人阴道上皮细胞感染后的炎症反应一致, 因此小鼠可代替人作为 VVC 体内研究的模式动物。

关键词 外阴阴道假丝酵母菌病; 白假丝酵母菌; 细胞培养; Sap 酶活性; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性小体

中图分类号 R 711.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1555-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.009

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC) 是由假丝酵母菌引起的女性下生殖道最常见的感染性疾病之一, 居女性生殖道炎症第二位病因, 白假丝酵母菌是最常见的致病菌种^[1-2], 属于机会致病菌, 健康状态下, 在阴道的微环境中与宿主和其他局部微生物群处于共生状态, 其中某个因素改变都容易导致平衡被打破, 假丝酵母菌由酵母相

2021-07-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81660248)

作者单位: ¹ 昆明医科大学第一附属医院产科, 昆明 650000

² 昆明医科大学第二附属医院产科, 昆明 650000

³ 昆明市妇幼保健院产科, 昆明 650000

作者简介: 侯梦瑶, 女, 住院医师;

祁文瑾, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wenjinckie@163.com

变为菌丝相而致病, 对阴道黏膜造成损伤。阴道局部免疫系统被激活, 发动先天性和适应性免疫保护机体^[3-4]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 [nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3] 炎性小体就是其中关键的因子, 可以被白假丝酵母菌的主要毒力因子之一分泌型天冬氨酸蛋白酶(secreted of aspartic proteases, Sap) 所激活^[5]。它是一种蛋白复合体, 属于机体先天免疫的一部分。当受到损伤因子刺激后, NLRP3 蛋白与衔接子凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain, ASC) 相互作用启动炎性小体形成, ASC 同时募集并激活效应子半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific protease-1, caspase-1) 前体以产生活性的 caspase-1, caspase-1 剪切白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 前体和 IL-18 前体形成具有生物学活性的 IL-1 β 和 IL-18, 从而触发一系列的炎症反应^[6]。该研究主要探索不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌对人和小鼠阴道上皮细胞表达 NLRP3 炎性小体、IL-1 β 和 IL-18 的影响, 期望能为进一步明确 VVC 的发病机制提供新的研究理论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 生物材料 白假丝酵母菌来源于昆明医科大学第一附属医院妇产科门诊的 VVC 患者; 人阴道上皮组织来自同一医院的妇科子宫肌瘤或子宫腺肌症行全子宫切除患者, 患者未绝经且既往身体健康, 以上均取得患者知情同意, 通过本院伦理委员会批准。小鼠购自昆明医科大学 SPF 动物房, 雌性昆明小鼠 6~8 周龄, 体质量 22~28 g。

1.1.2 主要试剂 沙堡罗氯霉素培养基(法国生物梅里埃公司); 念珠菌显色平板(上海安图生物公司); 无菌脱脂奶粉(上海生物工程股份有限公司); 角化细胞无血清培养基(K-SFM, 美国 Gibco 公司); DMEM/F12 完全培养基(美国 Gibco 公司); 中性蛋

白酶(Dispase II 美国 Sigma 公司); 胰酶(美国 Gibco 公司); NLRP3 炎性小体抗体(anti-NLRP3 antibody, 杭州华安生物技术有限公司); 牛血清白蛋白 V(美国 Solarbio 公司); 免疫荧光二抗、DAPI(美国 Invitrogen 公司); 人 IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒及小鼠 IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒(深圳欣博盛科技有限公司); 改良 HE 染色试剂盒(美国 Solarbio 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 假丝酵母菌纯化、菌种鉴定及 Sap 酶活性检测 纯化: 用无菌棉拭子将 VVC 患者阴道分泌物接种到沙堡罗培养皿上, 培养 48 h 后分离单菌落扩增保存。菌种鉴定: 严格按照安图念珠菌显色平板说明书进行鉴定。Sap 酶活性测定: 将配成 5×10^6 CFU/ml 浓度的菌液滴到牛奶培养皿固定位置, 长出菌落圈和沉淀圈后用游标卡尺测量直径并计算出比值, 以 PA 值(菌落圈直径/菌落圈直径 + 沉淀圈直径) 表示, 每个菌以 3 个结果的平均值来计算 Sap 酶活性。

1.2.2 阴道上皮细胞培养 取人和小鼠新鲜阴道组织后采用 Dispase II 和胰酶分步消化法^[7], Dispase II 浸泡 4 ℃ 冰箱过夜。分离阴道黏膜层并剪碎, 0.25% 胰酶 37 ℃ 消化、DMEM/F12 完全培养基终止消化, 离心后 K-SFM 培养液重悬细胞并计数, 按 1×10^6 个/ml 的浓度将细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。48 h 后观察细胞生长情况并首次换液, 每隔 2~3 d 换液并观察细胞。当贴壁细胞数达 70%~80% 时进行传代, 按 1×10^6 个/ml 的浓度将细胞接种于 24 孔板内培养, 贴壁细胞数达 70%~80% 时进行下一步。

1.2.3 阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养 白假丝酵母菌菌液配置: K-SFM 培养液配置菌液, 浓度为 1×10^6 CFU/ml。细胞与菌共培养: 实验分为 3 组进行, 分别为空白对照组(只加 K-SFM 培养液)、Sap 酶活性强组和 Sap 酶活性弱组。分别于 6、12、24、48 h 将配好的菌液加入到相应孔内, 空白对照孔由 K-SFM 培养液代替, 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。48 h 后同时收取上清液, -80 ℃ 冰箱避光保存, 24 孔板内的细胞用 PBS 清洗后加入 4% 多聚甲醛固定, 4 ℃ 冰箱保存。

1.2.4 免疫荧光法检测阴道上皮细胞 NLRP3 炎性小体的表达 取已用 4% 多聚甲醛固定的细胞, 柠檬酸盐修复液修复后加通透液, PBS 清洗, 5% 牛血清白蛋白 37 ℃ 封闭, 再加 NLRP3 炎性小体抗体(1:100 稀释) 4 ℃ 冰箱过夜, 复温后 PBS 清洗, 按

说明加入稀释荧光二抗(1:500 稀释) 37 ℃ 孵育, 加入 DAPI 染色 9 min, PBS 清洗后荧光显微镜下观察并拍照。每个组选 7~8 张图用 Image Pro Plus 软件做荧光定量, 并根据细胞核的数量进行荧光均一化处理后再做统计学分析。

1.2.5 ELISA 法检测上清液中细胞因子 IL-1 β 、IL-18 的表达 复溶已收取的细胞上清液, 分别取 100 μ l 并严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 作出标准曲线并根据其最后计算出 IL-1 β 、IL-18 的实际浓度。

1.2.6 HE 染色观察细胞形态 取已用 4% 多聚甲醛固定的细胞, PBS 清洗后用苏木精染色 2 min, 蒸馏水清洗, 分化液分化后加反蓝液, 自来水清洗, 伊红染色 20 s 后 95% 乙醇溶液 2~3 s, 无水乙醇 3 min(重复 2 次), 镜下观察细胞并拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析及两两比较的 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 假丝酵母菌鉴定情况及 Sap 酶活性检测结果

在念珠菌显色平板上长出的菌落显色为绿色或翠绿色则为白假丝酵母菌。牛奶培养基平皿上可看到菌落圈和沉淀圈即为 Sap 阳性菌株, PA 值越低, 表明菌株 Sap 酶活性越强, 反之则越弱。挑选 Sap 酶活性弱(PA = 0.634 ± 0.019) 与 Sap 酶活性强(PA = 0.254 ± 0.003) 的白假丝酵母菌各 8 株, 测定的 Sap 酶活性强弱差异有统计学意义($F = 380.44$, $P < 0.05$)。见图 1。

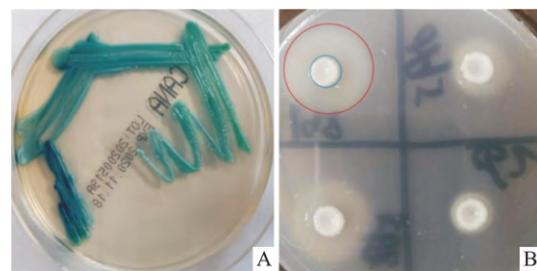
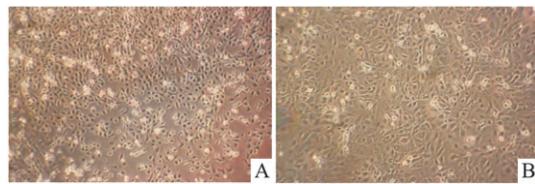


图 1 纯化鉴定及 Sap 酶活性测定

A: 用安图念珠菌显色培养板进行菌种鉴定; B: 牛奶培养基进行 Sap 酶活性测定; 蓝色圈: 菌落圈; 红色圈: 沉淀圈

2.2 阴道上皮细胞培养情况 人阴道上皮细胞消化后传到培养瓶中 6~7 d 时贴壁细胞数可达 70%~80%, 而小鼠阴道上皮细胞只需 4~5 d; 细胞呈铺路石样生长, 形态为多角形, 轮廓清晰, 折光线好, 确认为阴道上皮细胞。见图 2。

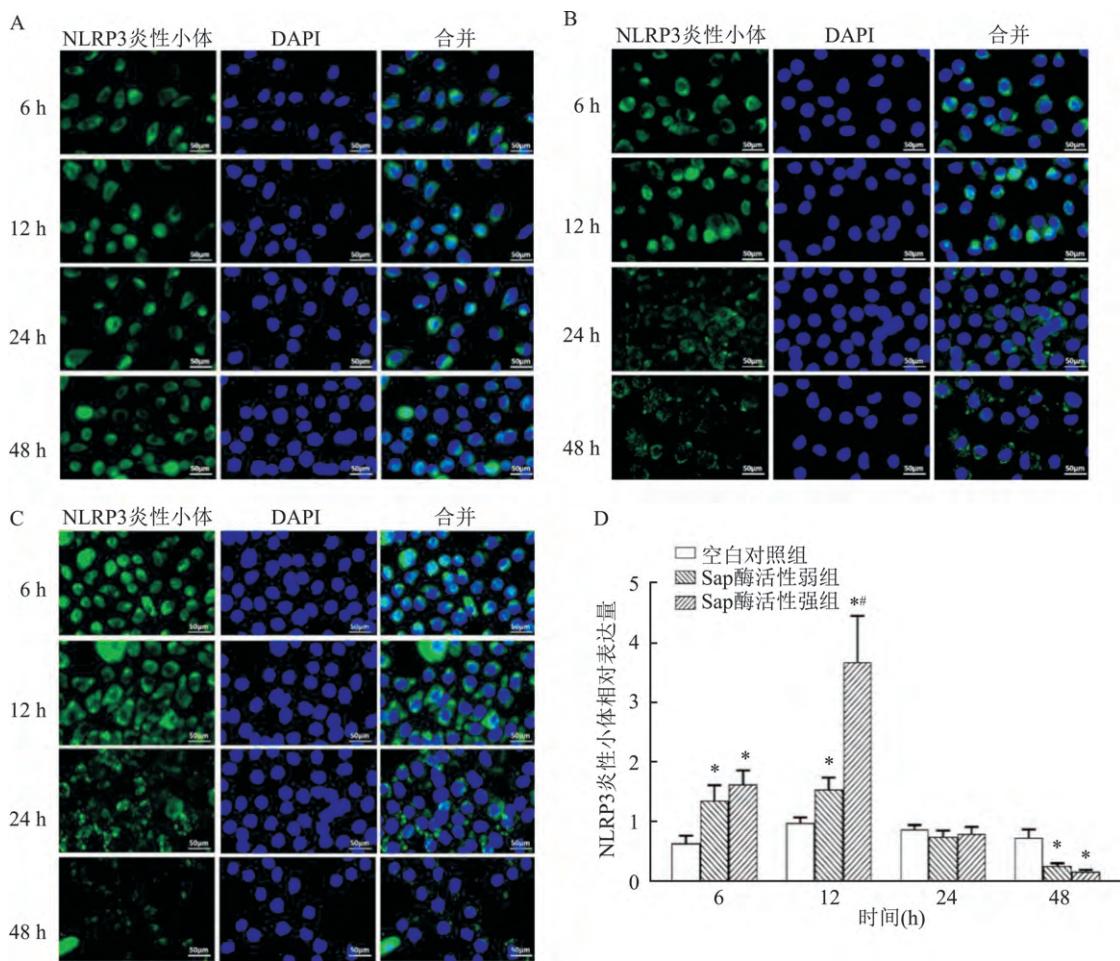
图 2 光学显微镜观察细胞培养第 6 天的形态 $\times 100$

A: 人阴道上皮细胞; B: 小鼠阴道上皮细胞

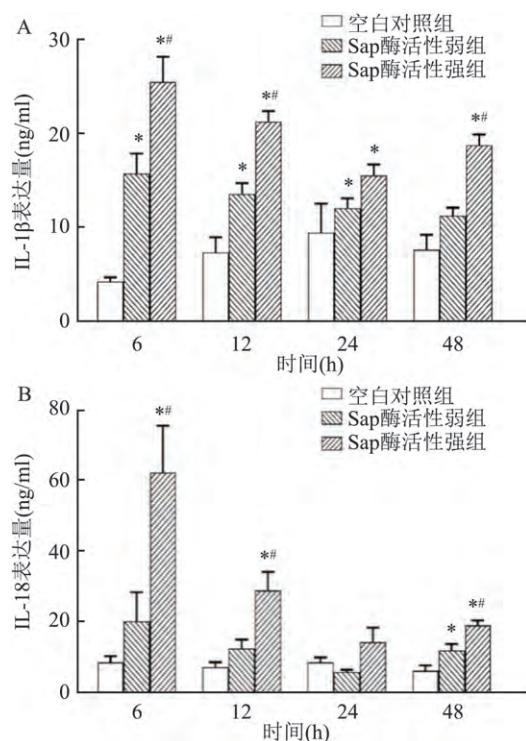
2.3 NLRP3 炎性小体检测结果 人阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养后, 阴道上皮细胞表达的 NLRP3 炎性小体水平从 6 h 开始升高, 12 h 达高峰后逐渐下降; 同时荧光图片显示共培养 24 h 后, 阴道上皮细胞开始裂解, 至 48 h 时可看到细胞破裂死亡, 荧光随之减弱, 而空白对照组的细胞形态从始至终都是完整的, 荧光量保持相对稳定。Sap 酶活性强组 NLRP3 炎性小体水平下降趋势更明显。此外, 人阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养 6、12、48 h, Sap 酶活性弱组和 Sap 酶活性强组与空白对照组的

NLRP3 炎性小体水平相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Sap 酶活性强组在 12 h 时与 Sap 酶活性弱组的 NLRP3 炎性小体水平差异有统计学意义 ($F = 8.05, P < 0.05$), 但 6、24、48 h 两组间的 NLRP3 炎性小体表达差异无统计学意义。见图 3。

2.4 IL-1 β 、IL-18 的测定结果 白假丝酵母菌与人阴道上皮细胞共培养 6、12、24、48 h, IL-1 β 和 IL-18 水平均在 6 h 达峰值后逐渐下降趋势, 至 48 h 时随着细胞膜的破裂, 细胞内 IL-1 β 和 IL-18 全部被释放出来, 又出现了小幅度的回升。Sap 酶活性强组 IL-1 β 和 IL-18 水平在 6、12、48 h 与空白对照组相比差异有统计学意义 ($F = 24.40, 8.38, P < 0.05$), 两因子 3 组间 F 值分别为 24.40、8.38; 而 Sap 酶活性弱组仅有 IL-1 β 水平在 6、12、24 h 与空白对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Sap 酶活性强组 IL-1 β 和 IL-18 水平在 6、12、48 h 与 Sap 酶活性弱组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

图 3 人阴道上皮细胞 NLRP3 炎性小体表达量 $\times 400$

A: 空白对照组; B: Sap 酶活性弱组; C: Sap 酶活性强组; D: 三组荧光表达; 绿色荧光: NLRP3 炎性小体; 蓝色荧光: DAPI 核染色; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Sap 酶活性弱组比较: # $P < 0.05$

图4 人阴道上皮细胞 IL-1 β 和 IL-18 的表达量

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Sap 酶活性弱组比较: ** $P < 0.05$

2.5 HE 染色结果 空白对照组的细胞边界清晰, 饱满, 折光性好; 而阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养 48 h 后可看到大部分细胞边界模糊, 部分已裂解, 活力较差。见图 5。

2.6 小鼠阴道上皮细胞 3 种因子表达情况 小鼠阴道上皮细胞与不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌共培养 12 h, NLRP3 炎性小体、IL-1 β 、IL-18 3 种因子水平均高于空白对照组 ($F = 32.3, 10.39, 11.13, P < 0.05$), 各个因子 3 组间 F 值分别为 32.03、10.39、11.13, Sap 酶活性强组的表达水平均高于 Sap 酶活性弱组 ($P < 0.05$)。趋势与人阴道上皮细胞一致。见图 6。

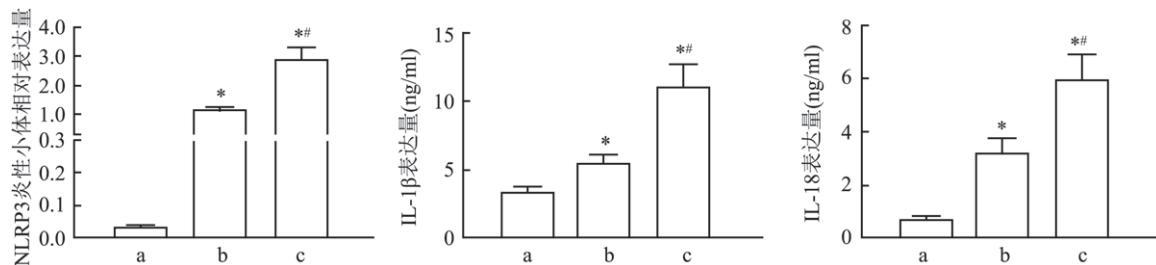
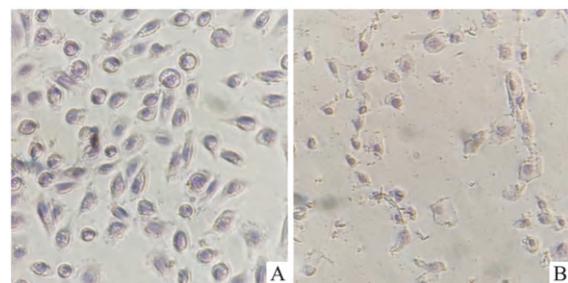


图6 小鼠阴道上皮细胞 12 h 时间点各因子表达量

a: 空白对照组; b: Sap 酶活性弱组; c: Sap 酶活性强组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Sap 酶活性弱组比较: ** $P < 0.05$

图5 光学显微镜观察 HE 染色人阴道上皮细胞形态 $\times 400$

A: 空白对照组 B: 白假丝酵母菌与阴道上皮细胞共培养 48 h

3 讨论

Sap 是由白假丝酵母菌分泌的一种胞外水解酶, 有助于致病菌黏附、侵入宿主黏膜屏障和逃逸宿主免疫的攻击^[8]。有研究^[9]表明, Sap 基因缺失的突变菌造成的上皮损伤较轻且产生的细胞因子也会下降。因此 Sap 酶活性长期以来都被认为是致病白假丝酵母菌的重要毒力特征, 且对激活 NLRP3 炎性小体至关重要^[9-11]。本研究选取白假丝酵母菌与体外阴道上皮细胞共培养, 结果显示 NLRP3 炎性小体水平早期即达高峰, 之后随着细胞的破坏、死亡, 表达量逐渐下降。由此活化的 IL-1 β 和 IL-18 可分别驱动 Th17 和 Th1 细胞的早期分化, Th1 主要通过分泌 IFN- γ 募集巨噬细胞等发挥抗感染作用, Th17 分泌 IL-17 和 IL-23 等细胞因子抵御假丝酵母菌感染, NLRP3 炎性小体缺陷的小鼠对白假丝酵母菌的播散性和易感性都增加了^[12-14]。所以, NLRP3 炎性小体作为先天免疫系统的重要成员, 在感染早期可立即启动保护性适应性免疫反应抵御病菌。

然而, NLRP3 炎性小体若被过度激活, 一方面, 引发的炎症细胞因子和趋化因子不仅不能充分杀灭真菌降低阴道上皮细胞的损伤, 反而使阴道上皮处于高炎症状态, 导致免疫病理性炎症^[4-5]。另一方

面, NLRP3 炎性小体可裂解并激活成孔蛋白 gasdermin D, 从而在质膜上形成孔导致细胞焦亡, 该机制可能造成细胞大量死亡^[15]。本研究选取不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌与阴道上皮细胞共培养, 发现 NLRP3 炎性小体、IL-1 β 和 IL-18 的水平均高于空白对照组, 说明白假丝酵母菌能刺激阴道上皮细胞表达更多的 NLRP3 炎性小体及相关因子, 且这个表达量与白假丝酵母菌的 Sap 酶活性成正比。推测 Sap 酶活性强的菌可能诱导 NLRP3 炎性小体的过度表达, 引发高炎症反应及细胞死亡, 从而导致阴道的局部病理损伤更严重。最后, 本研究还发现不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌感染小鼠阴道上皮细胞后, 与人阴道上皮细胞免疫因子表达的趋势基本一致, 因此可以用小鼠代替人进行 VVC 体内实验。

综上所述, 在 VVC 的发病机制中, NLRP3 炎性小体可能是一把双刃剑, 激活后既能通过活化 IL-1 β 和 IL-18 启动机体的保护性免疫应答, 又可能因过度激活而造成机体的免疫病理状态。不同 Sap 酶活性的白假丝酵母菌与阴道上皮细胞共培养后, 对 NLRP3 炎性小体的激活程度不完全一致, 所以 Sap 酶活性强的菌可能更容易造成免疫病理损伤, 引起的临床症状可能更严重, 这也许是临幊上不同 VVC 患者临床症状和体征存在差异的原因。但体外实验并不能完全反映体内阴道黏膜局部的免疫状态, 还需进一步的体内实验来论证这一观点, 从本研究结果来看, 小鼠可以代替人进行这一部分的体内实验。

参考文献

- [1] Hashemi S E, Shokohi T, Abastabar M, et al. Species distribution and susceptibility profiles of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of *C. lusitaniae* [J]. *Curr Med Mycol*, 2019, 5(4): 26–34.
- [2] 祁文瑾, 陈 阜, 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): 555–7.
- [3] Pellan A, Sadeghi Nasab S D, Moyes D L. New insights in *Candida albicans* innate immunity at the mucosa: toxins, epithelium, metabolism, and beyond [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 81.
- [4] d'Enfert C, Kaune A K, Alaban L R, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2020, 45(3): fuaa060.
- [5] Willems H M E, Ahmed S S, Liu J, et al. Vulvovaginal candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions [J]. *J Fungi (Basel)*, 2020, 6(1): 27.
- [6] Richardson J P, Moyes D L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection [J]. *Virulence*, 2015, 6(4): 327–37.
- [7] 刘燕燕, 祁文瑾. 正常小鼠阴道上皮细胞体外原代培养探索 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 1806–9.
- [8] Rapala-Kozik M, Bochenksa O, Zajac D, et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2018, 33(2): 113–24.
- [9] Bruno V M, Shetty A C, Yano J, et al. Transcriptomic analysis of vulvovaginal candidiasis identifies a role for the NLRP3 inflammasome [J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00182–15.
- [10] Cassone A, Vecchiarelli A, Hube B. Aspartyl proteinases of eukaryotic microbial pathogens: from eating to heating [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(12): e1005992.
- [11] Roselletti E, Perito S, Gabrielli E, et al. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17877.
- [12] van de Veerdonk F L, Joosten L A, Shaw P J, et al. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(8): 2260–8.
- [13] Deng J, Yu X Q, Wang P H. Inflammasome activation and Th17 responses [J]. *Mol Immunol*, 2019, 107: 142–64.
- [14] 梁铁玲, 刘小平, 樊尚荣, 等. 白细胞介素 17A 等细胞因子在复发性外阴阴道假丝酵母菌病发病中的作用 [J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(6): 430–3 438.
- [15] Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao E A. Programmed cell death as a defence against infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(3): 151–64.

Effect of *Candida albicans* with different Sap enzyme activities on NLRP3 inflammasome expression in vaginal epithelial cells

Hou Mengyao¹, Shao Mingkun², Luo Dandan³, et al

(¹Dept of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000;

²Dept of Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000;

³Dept of Obstetrics, Kunming City Maternal and Child Health Hospital, Kunming 650000)

Abstract **Objective** To study the effect of *Candida albicans* with different Sap enzyme activities on the expression of NLRP3 inflammasome in humans and mice vaginal epithelial cells. **Methods** *Candida* collected from the

网络出版时间: 2021-8-19 14:10 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1122.010.html>

合成锂皂土-海藻酸钠复合屏障膜的制备及研究

程东东¹ 周 璞¹ 邢 新¹ 邹多宏^{1,2}

摘要 目的 通过制备合成锂皂土(LAP)–海藻酸钠(SA)复合膜,测试其力学性能及生物相容性,研究其应用于组织工程屏障膜的可能性。方法 将 LAP 溶液与 SA 溶液按比例混合,搅拌均匀,通过热喷涂组装方法成膜,制备 LAP 与 SA 的质量分数比分别为 1:10、3:10、5:10、7:10、9:10 的复合膜和纯 SA 膜。采用力学万能实验机测试各组膜样品($n=6$)抗拉强度。取纯 SA 膜组和抗拉强度最大的复合膜组样品,用扫描电镜和透射电镜观察微观结构,X 射线衍射仪和傅立叶变换红外光谱仪分析各成分。同时取抗拉强度最大的复合膜组,重新制备膜样品浸泡于 0.5 mol/L 氯化钙溶液中 5 s,待其自然干燥后测试抗拉强度。空白对照组、纯 SA 膜组和抗拉强度最大的复合膜组($n=5$)与 NIH/3T3 共培养 24、48 h 后用 CCK-8 检测各组细胞存活率。结果加入 LAP 后复合膜的截面呈有序的层状结构,X 射线衍射及傅立叶变换红外光谱分析显示复合膜中存在 LAP。复合

2021-07-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31870969)

作者单位: ¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

²上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院口腔外科,上海市口腔医学重点实验室,上海 200001

作者简介: 程东东 男,硕士研究生; 邹多宏 男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zdhy@ahmu.edu.cn

膜抗拉强度随 LAP 比例增加而先增加后降低,LAP 与 SA 的质量分数比为 5:10 时抗拉强度最大,达(166.9 ± 11.5) MPa,此组复合膜用 Ca^{2+} 聚合后抗拉强度为(178.0 ± 14.8) MPa。培养细胞 24、48 h 时,纯 SA 膜组、复合膜组 NIH/3T3 数量与空白对照组差异均无统计学意义。结论 LAP 与 SA 的质量分数比为 5:10 时复合膜抗拉强度最大,且细胞相容性良好。

关键词 合成锂皂土; 海藻酸钠; 复合膜; 仿生结构材料

中图分类号 R 782

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)10-1560-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.010

目前临幊上应用的可吸收引导骨再生(guided bone regeneration, GBR)膜通常受到机械强度弱、力学性能不足的限制,易发生穿孔和破裂^[1]。海藻酸钠(sodium alginate, SA)是组织工程支架的常用材料,能促进实验性骨缺损的骨再生,是 GBR 的合适材料^[2]。合成锂皂土(Laponite[®], LAP)除了作为粘土材料应用于传统医药和化妆品,还可作为开发新的纳米医学功能材料,成为骨组织工程应用的理想选择^[3]。有序的“砖-泥”微观结构赋予了贝类优异的抗拉强度、刚度和韧性,受此启发,引入无机纳米填料制备类似特殊的层状微结构,成为近十年

vagina of vulvovaginal candidiasis (VVC) patients was purified and identified, and the Sap enzyme activity was detected; Humans and mice vaginal epithelial cells were cultured by enzyme stepwise digestion and co-cultured with *Candida albicans* with different Sap enzyme activities; The expression of NLRP3 inflammasome was detected in vaginal epithelial cells by immunofluorescence method; The levels of interleukin(IL)-1 β and IL-18 in cell supernatant was detected by ELISA method; Cell morphology was observed by HE staining. The culture methods of humans and mice vaginal epithelial cells were in the same way. **Results** The levels of NLRP3 inflammasome, IL-1 β and IL-18 in the group with strong Sap activity were all higher than those in the group with weak Sap activity, and reached their peaks in the early stage of infection. As the infection time increases, cells could be seen to rupture and die, and NLRP3 inflammasomes also declined, this presented the same tendency in humans and mice vaginal epithelial cells. **Conclusion** *Candida albicans* could stimulate the expression of NLRP3 inflammasome, IL-1 β and IL-18 in vaginal epithelial cells, and *Candida albicans* with strong Sap activity was more effective. Humans and mice vaginal epithelial cells had the same inflammatory response after infection, so mice could replace humans as the model animal for VVC *in vivo* research.

Key words vulvovaginal candidiasis; *Candida albicans*; cell culture; Sap enzyme activities; NLRP3 inflammasome