DOI:10.12441/spyswjs.20250315001 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0162-11

口服副干酪乳酪杆菌CCFM1433可提升宿主免疫预防白色念珠菌感染

张鑫雅 张秋香* 唐 鑫 毛丙永 赵建新 崔树茂

(江南大学食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】探究乳杆菌在增强宿主免疫、预防阴道白色念珠菌感染中的作用。**【方法】**采用人阴道上皮细胞(VK2/E6E7细胞)模型,从10株阴道源乳杆菌中筛选抗菌肽LL-37诱导活性最强的菌株。构建小鼠阴道白色念珠菌感染模型,并采用苏木精-伊红(HE)染色、ELISA、qPCR、16S rRNA测序等技术,系统评估口服目标乳杆菌菌株对小鼠阴道黏膜免疫、系统性炎症平衡及阴道菌群稳态的调控效应。**【结果】**副干酪乳酪杆菌CCFM1433的菌体裂解物和发酵上清液均可上调VK2/E6E7细胞抗菌肽LL-37的分泌水平,较空白组分别提高22.5%和12.3%,优于其他菌株。副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌组小鼠阴道组织抗菌肽CRAMP水平是模型组的1.82倍,分泌型免疫球蛋白A(sIgA)的水平较模型组提高52.9%,血清中免疫球蛋白G(IgG)的水平较模型组提高16.9%,脾脏中IL-10的水平较模型组增加23.9%,TNF-α的水平较模型组降低20.3%。此外,副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌及其后生元均可抑制TLR4/MyD88信号通路,防止炎症通路的过度活化。16S rRNA测序结果表明,该菌株的活菌能有效维持阴道乳杆菌属菌群的稳态,且其干预效果与小鼠阴道菌群的功能基因在信号分子及其受体通路上显著富集密切相关。**【结论】**副干酪乳酪杆菌CCFM1433可通过直接激活宿主黏膜免疫、调节炎症反应并恢复以乳杆菌为主导的阴道微生物群落,从而发挥抗感染作用,有效预防白色念珠菌感染,为益生菌在预防阴道感染中的应用提供理论依据。

关键词:副干酪乳酪杆菌;白色念珠菌;免疫调节;抗菌肽;宿主防御

Oral Administration of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 Boosts Host Immunity to Prevent *Candida albicans* Infections

ZHANG Xinya ZHANG Qiuxiang TANG Xin MAO Bingyong ZHAO Jianxin CUI Shumao*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to explore the role of *Lactobacillus* in enhancing host immunocompetence and preventing vaginal infections with *Candida albicans*. [**Method**] A human vaginal epithelial cell (VK2/E6E7 cell) model was employed to screen the most potent strain among ten vaginal *Lactobacillus* isolates in inducing the antimicrobial peptide LL-37. A mouse model of vaginal infection with *Candida albicans* was established. The effects of oral administration of the selected *Lactobacillus* strain on vaginal mucosal immunity, systemic inflammatory balance, and vaginal microbiota homeostasis were systematically evaluated using hematoxylin-eosin (HE) staining, ELISA, qPCR, and 16S rRNA sequencing. [**Result**] Both the cell lysate and fermentation supernatant of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 upregulated antimicrobial peptide LL-37 secretion in VK2/E6E7 cells by 22.5% and 12.3%, respectively, compared with the control group, exhibiting superior activity over those of other strains. Live *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 increased the level of cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) in the vaginal tissue to 1.82 times that of the model group,

通信作者:张秋香(1979—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事益生菌理论与技术、特殊生境益生菌功能发掘、口腔微生态与健康研究。E-mail:zhangqx@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2025-03-15 **修回日期:**2025-04-24

increased the level of secretory immunoglobulin A (sIgA) by 52.9%, and the level of immunoglobulin G (IgG) in the serum by 16.9% compared with the model group. It also increased the level of IL-10 in the spleen by 23.9%, while reducing the TNF-α level by 20.3%. In addition, both live *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 and its postbiotics inhibited the TLR4/MyD88 signaling pathway, preventing overactivation of inflammatory pathways. The 16S rRNA sequencing results indicated that the live bacteria of this strain effectively maintained the vaginal homeostasis of *Lactobacillus* communities and its intervention effect was closely associated with a significant enrichment of functional genes in the signaling molecules and interaction pathway in the mouse vaginal microbiome. [**Conclusion**] *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 exerts an anti-infection effect and effectively prevents *Candida albicans* infections by directly activating host mucosal immunity, modulating inflammatory responses, and restoring the *Lactobacillus*-dominant vaginal microbiota. These findings provide theoretical support for the application of probiotics in preventing vaginal infections.

Keywords: *Lacticaseibacillus paracasei*; *Candida albicans*; immunomodulation; antimicrobial peptide; host defense

阴道微生态指阴道内各种微生物构成的群落及其与宿主环境之间形成的相互依存、相互制约的动态平衡关系[1]。乳杆菌是健康女性阴道微生态的主导菌群[2-3]，Lebeer等[4]发现阴道内乳杆菌种类包括卷曲乳杆菌（*Lactobacillus crispatus*）、格氏乳杆菌（*Lactobacillus gasseri*）、詹氏乳杆菌（*Lactobacillus jensenii*）、约氏乳杆菌（*Lactobacillus johnsonii*）以及黏液乳杆菌（*Limosilactobacillus*）等。这些乳杆菌[5-6]不仅通过代谢糖原生成乳酸来维持阴道酸性环境[7]（pH≤4.5），还能分泌过氧化氢[8]、细菌素[9]和其他抗菌物质，抑制病原体的生长，保护女性健康。然而，生活习惯、免疫状态及药物使用等因素可能引起阴道微生态失衡，进而引发阴道感染。白色念珠菌引起的阴道感染是常见的女性生殖道感染之一。现有的抗真菌药物虽然能够有效清除致病菌，但也可能破坏阴道内有益的乳杆菌群，延缓阴道微生态的恢复进程，从而增加疾病复发的风险。阴道感染不仅会引发局部炎症反应，更可能通过改变阴道pH导致致病菌上行感染，进而诱发生殖系统并发症[10-11]。因此，提高女性自身免疫力对维持阴道微生态、降低病原微生物引发的健康风险至关重要。

阴道黏膜免疫系统也是阴道微生态的组成部分，通过多层级防御机制来抗感染[12]，其中局部免疫应答的精准调控尤为关键。抗菌肽和免疫球蛋白是黏膜免疫的重要组成部分，在宿主防御机制中发挥协同作用。抗菌肽Cathelicidin家族（Cathelicidins）是一类具有广谱抗菌活性的多功能抗菌肽，在哺乳动物中包括人源抗菌肽LL-37和小鼠源抗菌肽CRAMP等。作为宿主防御的第一道屏障，Cathelicidins能直接杀灭病原体，还能促进伤口愈合并调节免疫反应，维持黏膜屏障的完整性[13-15]。sIgA是黏膜免疫中关键的效应分子，能够中和病原体及其产生的毒素，有效限制致病菌的定植和生长，防止感染扩散[16]。IgG通过识别循环病原体抗原，激活补体途径，形成针对深部感染的全身性防护网络[17]。上述局部-系统的免疫协同效应表明，通过靶向调控黏膜免疫关键分子（如抗菌肽、sIgA）与系统性效应因子（如IgG）的联动，可多维度提升宿主防御效能，从而降低感染性疾病的发生风险。

大量研究表明共生菌可以直接刺激机体，诱导宿主产生抗菌物质，进而抵抗致病菌感染。Liu等[18]的研究表明，表皮葡萄球菌能够刺激鼻上皮细胞产生抗菌肽，从而杀死竞争性病原体。Si等[19]发现鼠李糖乳酪杆菌能够促进树突状细胞激活并增强$CD8^+$细胞向肿瘤的募集，从而增强小鼠抗肿瘤作用。基于上述背景，作者拟通过体外试验筛选具备提升宿主防御能力的乳杆菌，并建立白色念珠菌感染小鼠阴道的模型，评估口服乳杆菌在提高小鼠免疫力中的作用，重点考察其提升宿主抗菌肽和免疫球蛋白水平的效果，为开发新的免疫调节策略和有效的阴道感染预防方案提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

7周龄无特定病原体级（specific pathogen free，SPF）雌性BALB/c小鼠：北京维通利华实验动物技术有限公司。人阴道上皮细胞（VK2/E6E7细胞）：无锡市人民医院妇产科。

所用菌株均来自江南大学食品微生物菌种保藏中心，德氏乳杆菌DM8909是国内获批上市的乳杆菌活菌制剂，在本试验中作为阳性对照。具体菌株信息见表1。

表 1 菌株信息表

Table 1 Information of strains

菌株种属名称	拉丁文名称	菌株编号	来源
卷曲乳杆菌	*Lactobacillus crispatus*	VJSWX112M3	健康妇女阴道分泌物
卷曲乳杆菌	*Lactobacillus crispatus*	VJSWX158L2	健康妇女阴道分泌物
卷曲乳杆菌	*Lactobacillus crispatus*	VJSWX160L1	健康妇女阴道分泌物
格氏乳杆菌	*Lactobacillus gasseri*	VJSWX206M1	健康妇女阴道分泌物
格氏乳杆菌	*Lactobacillus gasseri*	VJSWX243B1	健康妇女阴道分泌物
詹氏乳杆菌	*Lactobacillus jensenii*	VJSWX162L3	健康妇女阴道分泌物
约氏乳杆菌	*Lactobacillus johnsonii*	VJSWXJo1	健康妇女阴道分泌物
约氏乳杆菌	*Lactobacillus johnsonii*	VJSWX124M2	健康妇女阴道分泌物
副干酪乳酪杆菌	*Lacticaseibacillus paracasei*	CCFM1433	健康妇女阴道分泌物
副干酪乳酪杆菌	*Lacticaseibacillus paracasei*	VJSWX151L1	健康妇女阴道分泌物
德氏乳杆菌	*Lactobacillus delbrueckii*	DM8909	定君生阴道用乳杆菌活菌胶囊
白色念珠菌	*Candida albicans*	SC5314	宁波明舟科技有限公司

1.1.2 试剂

沙氏葡萄糖培养基（SDB 培养基）：青岛高科技工业园海博生物技术有限公司；DMEM 细胞培养液：美国 Thermo Fisher Scientific 公司；RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、2 倍浓度的通用型 SYBR Green 预混液：南京诺维赞生物科技股份有限公司；雌二醇、芝麻油：上海泰坦科技股份有限公司；抗菌肽 LL-37、抗菌肽 CRAMP、sIgA、IgG 等 ELISA 试剂盒和迪夫快速染色液：南京森贝伽生物科技有限公司；多聚甲醛、苏木精染色液、伊红染色液：武汉赛维尔生物科技有限公司；FastDNA 土壤基因组 DNA 纯化试剂盒：美国 MP Biomedicals 公司；DNAGel/PCR 胶回收试剂盒：德国 QIAGEN 公司。

1.2 仪器与设备

高压均质机：XStream Lab Homogenizer 2000 型，意大利 GEA 机械设备公司；酶标仪：3020 型，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；实时定量 PCR 仪：CFX96 型，美国 Bio-Rad 公司；实时定量基因扩增仪：S1000 Touch™型，美国 Bio-Rad 公司；高通量组织研磨机：SCIENTZ-48 型，宁波新芝生物科技股份有限公司；切片电子扫描仪：Pannoramic MIDI 型，匈牙利 3DHISTECH 公司；测序仪：MiSeq Reagent Kit v2 型，美国 Illumina 公司；超微量分光光度计：Nanophtometer 型，德国 Implen 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化及样品制备

挑取乳杆菌单菌落，接种于 MRS 液体培养基中，于 37 ℃过夜培养后，调节菌悬液的浓度至 5×10^9 CFU/mL。细胞试验样品的制备：为获得菌体裂解物[20]，将上述菌悬液离心（8 000 *g*，4 ℃，15 min）后取菌泥，用等体积的无菌水重悬，在高压均质机中均质（1 000 MPa，10 次）和巴氏杀菌（65 ℃，30 min）后，冻干，保存于−80 ℃冰箱中，试验前用无菌生理盐水重悬至原体积。为获得发酵上清液，将上述菌悬液离心（8 000 *g*，4 ℃，15 min）后取发酵上清液，冻干后保存于−80 ℃冰箱中，试验前用无菌生理盐水重悬至原体积。

动物试验样品的制备：为了获得乳杆菌活菌，将 5×10^9 CFU/mL 的副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 离心后去掉上清液，用等体积的无菌生理盐水重悬，记为副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌；德氏乳杆菌 DM8909 活菌的获取方式相同。为了获得副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 的后生元样品，将 5×10^9 CFU/mL 的副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 菌悬液均质（1 000 MPa，10 次）并巴氏杀菌（65 ℃，30 min）后冻干，保存于−80 ℃冰箱中，试验前用无菌生理盐水重悬至原体积，通过涂布平板检测到无活菌长出则证明菌体已破碎完全。

白色念珠菌的制备：将白色念珠菌 SC5314 接入 SDB 培养基，在 28 ℃培养箱中摇床培养 48 h，最后用无菌生理盐水调节浓度至 5×10^8 CFU/mL。

1.3.2 细胞试验

将 VK2/E6E7 细胞以 1×10^5 个/mL 接种至 6 孔细胞培养板，培养 24 h 至细胞贴壁，弃去旧培养基，使用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍，按照如下步骤加样[21]：试验组（以菌株编号作为各试验组的名称）加入含体积分数为 5% 的乳杆菌菌体裂解物或发酵

上清液的DMEM培养基；空白组加入含体积分数为5%的生理盐水或MRS液体培养基的DMEM培养基。将细胞在37 ℃、含5%体积分数CO_2的细胞培养箱中孵育24 h，吸取细胞上清液，按照试剂盒说明书检测抗菌肽LL-37的表达水平。

1.3.3　动物试验设计

将25只小鼠饲养于20~22 ℃、湿度（50±10）%、光照/黑暗交替循环周期为12 h/12 h的环境中。

动物试验方案遵循江苏省寄生虫病防治研究所的伦理学标准（批准编号：IACUC-JIPD-2024-107）。动物试验设计方案见图1。

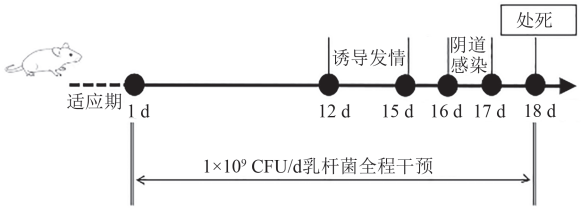


图1　动物试验设计方案

Fig. 1　Design of animal experiments

经过7 d的适应期后，小鼠被随机分成5组，分别为空白组、模型组、德氏乳杆菌DM8909活菌组（DM8909活菌组）、副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌组（CCFM1433活菌组）、副干酪乳酪杆菌CCFM1433后生元组（CCFM1433后生元组）。动物试验采用预防模型。试验组连续17 d分别灌胃200 μL德氏乳杆菌DM8909活菌、副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌以及副干酪乳酪杆菌CCFM1433后生元（浓度均为5×10^9 CFU/mL），空白组和模型组灌胃等体积的生理盐水。

参照Zhang等[22]的方法，建立白色念珠菌感染小鼠模型。除空白组外，模型组和试验组均于第12天和第15天皮下注射雌二醇（0.1 mg雌二醇溶于0.05 mL芝麻油）以诱导小鼠发情。于第16~17天进行小鼠阴道感染试验，使用移液器吸取20 μL白色念珠菌菌悬液，缓慢注入小鼠阴道内，随后将小鼠倒置1~2 min以防止菌液流出；空白组小鼠以相同方式接种等体积的无菌生理盐水，均每日进行1次操作。在第18天，对小鼠麻醉后进行眼眶取血，静置2 h后以4 ℃、3 500 *g*离心15 min，参照试剂盒说明书检测血清中IgG。处死小鼠后，采集阴道组织和脾脏组织，将其在液氮中迅速冷冻，置于−80 ℃保存。

1.3.4　小鼠阴道灌洗液上皮细胞脱落数测定

在试验结束前1 d，即第17天，用300 μL无菌生理盐水冲洗阴道，收集阴道灌洗液。根据迪夫快速染色液说明书在显微镜下对阴道灌洗液中的脱落上皮细胞进行计数。

1.3.5　小鼠阴道组织病理切片观察及分析

HE染色参照Li等[23]的方法。将小鼠阴道组织固定在体积分数为4%的多聚甲醛中，经乙醇脱水，用二甲苯透明化后，将组织浸入熔化的石蜡中，确保石蜡渗透组织。将石蜡切片脱蜡至水化后，在苏木精染色液中染色5~10 min，随后用流水冲洗并进行返蓝处理。再用伊红染色液染色1~3 min，最后用流水冲洗并进行脱水处理，并通过不同体积分数的乙醇再脱水。最后，用二甲苯将切片透明化，并用封片胶封片。将染色后的切片用切片电子扫描仪扫描成片，观察阴道切片的病理学特征。

1.3.6　小鼠阴道抗感染指标测定

取阴道、脾脏组织各30 mg，加入270 μL预冷至4 ℃的无菌生理盐水，分别制备组织匀浆，以4 ℃、3 000 *g*离心20 min，收集上清液，用ELISA试剂盒测定小鼠阴道组织中抗菌肽CRAMP、sIgA以及脾脏组织中IL-10、TNF-α的水平。

取阴道组织10 mg，加入190 μL组织裂解液，按照逆转录试剂盒的说明书将提取组织的RNA反转录，得到cDNA。用qPCR确定阴道组织中聚合免疫蛋白受体（polymeric immunoglobulin receptor，pIgR）的mRNA的表达。使用*Gapdh*作为内参基因。对应引物序列见表2。

表2　引物序列

Table 2　Primer sequences

基因名称	上游引物序列（5′—3′）	下游引物序列（5′—3′）
Gapdh	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
Pigr	AGTCCCATATTTGGTCCCGAG	AGGTGGGTGGGTAGTAGCAC
Tlr4	ATGGCATGGCTTACACCACC	GAGGCCAATTTTGTCTCCACA
Myd88	CCGCCTATCGCTGTTCTTGA	GCCAGGCATCCAACAAACTG

1.3.7 小鼠阴道灌洗液菌群测定

用 FastDNA 土壤基因组 DNA 纯化试剂盒提取小鼠阴道灌洗液中微生物的 DNA。然后使用 341F（5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′）以及 806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）引物针对 16S rRNA 的 V3—V4 区域进行 PCR 扩增。设置体积为 50 μL 的 PCR 体系，其中加入 1 μL 正向引物（10 μmol/L）、1 μL 反向引物（10 μmol/L）、25 μL 2 倍浓度的通用型 SYBR Green 预混液、2 μL 模版 DNA、21 μL 双蒸水。PCR 条件为：95 ℃，5 min；30 个循环（95 ℃，30 s；52 ℃，30 s；72 ℃，30 s）；72 ℃，7 min；12 ℃，10 min。反应结束后，将 PCR 扩增产物在 1.5 g/dL 的琼脂糖凝胶中进行跑胶，收集 500 bp 左右的扩增条带。使用 DNAGel/PCR 胶回收试剂盒将扩增条带进行纯化回收。使用超微量分光光度计测定胶回收后 DNA 的浓度，并根据测定结果制备文库，使用 Illumina MiSeq 平台进行双末端测序。使用 QIIME 对原始序列进行质量控制、去重复以及拼接处理筛选得到高质量序列，然后对高质量序列进行操作分类单元（operational taxonomic unit，OTU）分类和数据库比对，在属水平上进行分析，并结合 PICRUSt2 进行扩增子功能预测，随后对 KEGG 通路进行分析。

1.3.8 数据统计与分析

所有结果以各组的平均值±标准差呈现，采用 SPSS 26.0 进行数据的统计分析，并使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行可视化绘图，单因素方差分析采用 LSD 事后检验。

2 结果与讨论

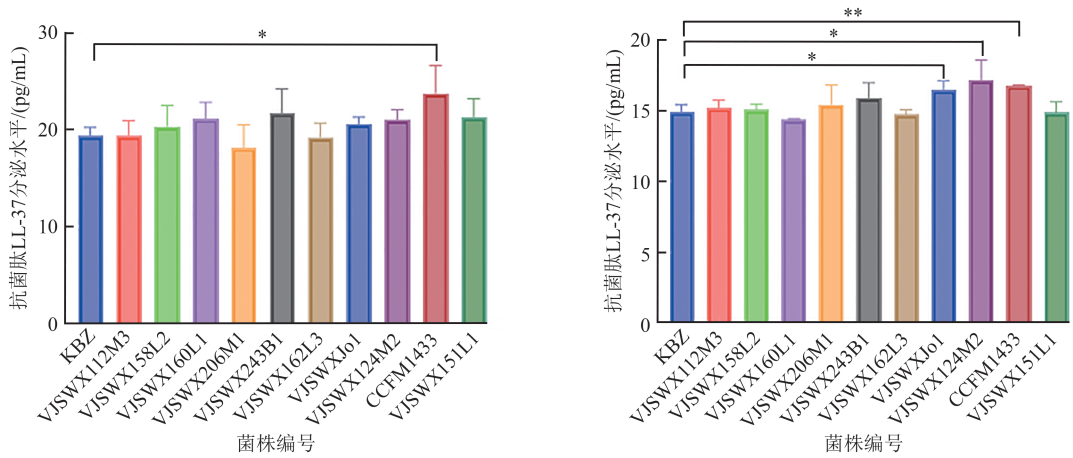
2.1 不同乳杆菌的菌体裂解物和发酵上清液对 VK2/E6E7 细胞抗菌肽 LL-37 水平的调控

为挖掘可提升宿主防御能力的潜在菌株，使用表 1 中的 10 株阴道来源的乳杆菌的菌体裂解物和发酵上清液刺激 VK2/E6E7 细胞，检测其分泌抗菌肽 LL-37 的水平。基于双重筛选标准，选取菌体裂解物和发酵上清液均能显著上调抗菌肽 LL-37 分泌水平的菌株作为目标菌株，开展后续动物体内试验。

由图 2 可知，副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 的菌体裂解物和发酵上清液刺激细胞后，抗菌肽 LL-37 的分泌水平与空白组相比分别升高 22.5%（P<0.05）和 12.3%（P<0.01），而约氏乳杆菌 VJSWXJo1 和 VJSWX124M2 的发酵上清液能促进 VK2/E6E7 细胞分泌抗菌肽 LL-37（P<0.05），但其菌体裂解物与空白组相比没有显著性差异。基于此，选取副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 作为目标菌株，进一步研究其在预防小鼠阴道感染中的作用。

2.2 副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 对小鼠阴道上皮细胞脱落数的影响

阴道上皮细胞的周期性脱落是维持黏膜屏障动态平衡的重要生理过程，其通过清除老化细胞及潜在病原体实现上皮层稳态更新。然而，在白色念珠菌感染状态下，病原体可通过酵母相到菌丝相的形态转换激活侵袭性表型，菌丝体分泌天冬氨酸蛋白酶（SAPs）和磷脂酶 B（PLBs）破坏上皮



(a) 菌体裂解物干预结果　(b) 发酵上清液干预结果

*—P<0.05；**—P<0.01；KBZ—空白组。

图 2 抗菌肽 LL-37 的分泌水平

Fig. 2 Secretion level of the antimicrobial peptide LL-37

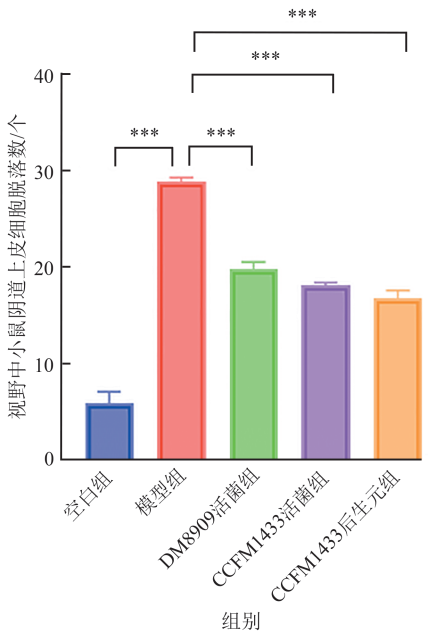
细胞间连接复合体，进而诱导细胞程序性坏死并导致异常脱落[24]。为了评估副干酪乳酪杆菌CCFM1433对小鼠阴道上皮的保护作用，测定感染后阴道上皮细胞脱落数。由图3可知，与空白组相比，视野中模型组小鼠阴道上皮细胞脱落数从6个增至29个，说明感染导致阴道上皮结构受损，进而引发阴道上皮细胞异常脱落。与模型组相比，CCFM1433活菌组和CCFM1433后生元组小鼠的阴道上皮细胞脱落数各减少37.3%和41.9%（P<0.001）。表明副干酪乳酪杆菌CCFM1433的活菌及其后生元在维持阴道上皮完整性、减轻病原菌引起的损伤方面均有积极作用。

2.3　副干酪乳酪杆菌CCFM1433对小鼠阴道组织损伤修复的影响

通过HE染色评估小鼠阴道组织损伤和炎症反应。由图4可知，空白组小鼠的阴道上皮层完整，细胞排列整齐，基底层细胞排列紧密有序，无炎症细胞浸润。模型组上皮层缺失，暴露出黏膜下层，组织表面可见大量炎症细胞浸润，基质出现水肿。CCFM1433活菌组小鼠的阴道上皮层较为连续，炎症细胞与模型组相比明显减少，角化层存在于黏膜表面。CCFM1433后生元组小鼠的阴道上皮层仍有保留，组织损坏程度较小，表面无明显的炎症细胞浸润。DM8909活菌组小鼠的阴道上皮层破损，暴露出副基底层。综上，副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌和后生元对预防小鼠阴道感染有更好的效果。

2.4　副干酪乳酪杆菌CCFM1433对小鼠中免疫相关因子水平的影响

小鼠源抗菌肽CRAMP与人源抗菌肽LL-37为同源物，两者在结构和功能上高度相似[15,25]。



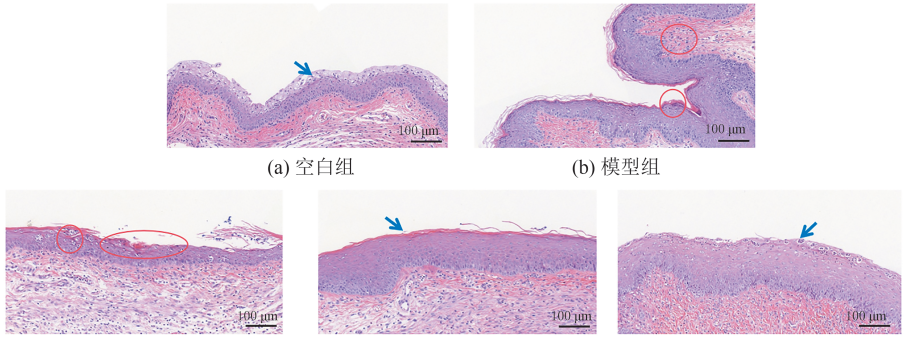
***—P<0.001。

图3　副干酪乳酪杆菌CCFM1433对小鼠阴道灌洗液中上皮细胞脱落数的影响

Fig. 3　Effect of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 on the number of epithelial cell detachments in mouse vaginal lavage fluid

由图5(a)可知，与空白组相比，模型组小鼠阴道组织中抗菌肽CRAMP的水平由32.63 pg/mL下降至17.25 pg/mL（P<0.001）。副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌及其后生元干预后，抗菌肽CRAMP的水平分别是模型组的1.82倍和2.09倍（P<0.001），德氏乳杆菌DM8909活菌干预后，抗菌肽CRAMP的水平是模型组的1.35倍（P<0.05）。

sIgA是一种在黏膜免疫中发挥关键作用的抗体，可以防止病原体黏附，发挥免疫清除作用[10]。



(a) 空白组　(b) 模型组

(c) DM8909活菌组　(d) CCFM1433活菌组　(e) CCFM1433后生元组

箭头—光滑的阴道上皮；圆圈—浅表糜烂；有孔洞，或阴道黏膜层局部炎性细胞浸润。

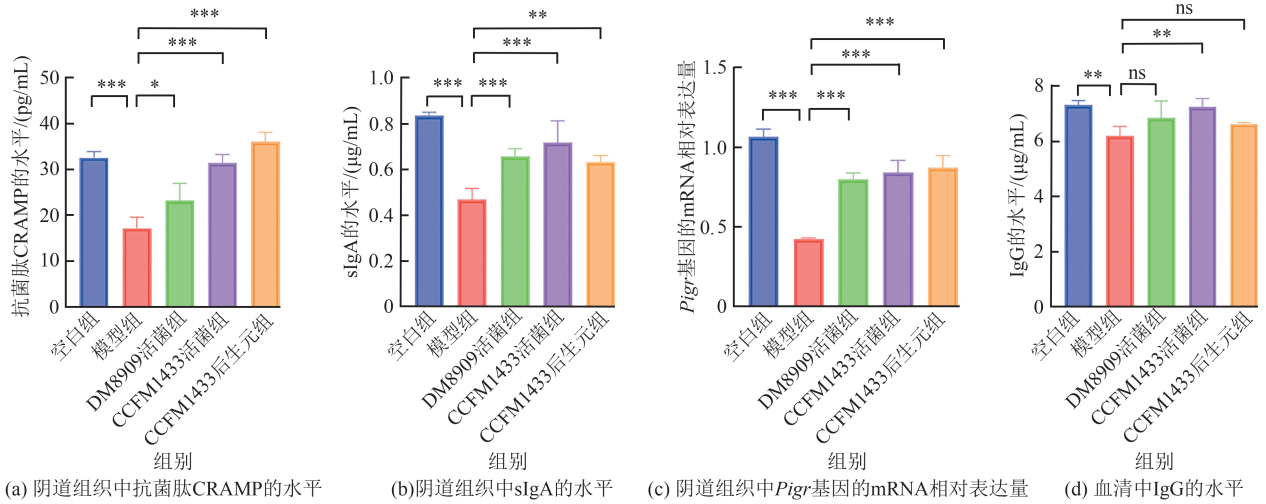
图4　阴道组织的HE染色

Fig. 4　HE staining of vaginal tissue

通过检测小鼠阴道组织中 sIgA 的水平可探究乳杆菌对宿主局部免疫的调控能力。由图 5(b)可知，与空白组相比，模型组小鼠阴道组织中 sIgA 的水平下降了 43.8%。副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌及其后生元干预后，小鼠阴道组织中 sIgA 的水平上升，与模型组相比分别提高了 52.9%（P<0.001）和 35.1%（P<0.01）。

pIgR 是关键跨膜转运蛋白，其核心功能是通过特异性结合多聚免疫球蛋白 A（IgA）并介导其跨细胞转运，最终在黏膜表面形成 sIgA[26-27]。为了阐明 sIgA 的水平是否与 *Pigr* 基因的转录水平相关，通过 qPCR 检测 *Pigr* 基因的转录水平。由图 5(c)可知，与空白组相比，模型组小鼠阴道组织中 *Pigr* 基因的 mRNA 相对表达量下降了 59.8%。与模型组相比，副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌及其后生元干预后，*Pigr* 基因的 mRNA 相对表达量分别提高了 97.5%（P<0.001）和 104.7%（P<0.001）。结果表明，副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌及其后生元可能通过增强黏膜 IgA 转运通路来提升 sIgA 的水平。

为评估副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 对系统性免疫力的调控作用，检测小鼠血清中 IgG 的水平。由图 5(d)可知，模型组小鼠血清中 IgG 的水平（6.23 μg/mL）低于空白组（7.33 μg/mL）。与模型组相比，CCFM1433 活菌组的 IgG 水平提高了 16.9%（P<0.01），而 DM8909 活菌组 IgG 的水平与模型组相比无显著性差异。综上所述，副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌及其后生元可增强小鼠的局部免疫水平，且其活菌可通过提升小鼠血清中 IgG 的水平增强系统性免疫力。德氏乳杆菌 DM8909 活菌虽能通过提高阴道组织中抗菌肽 CRAMP 和 sIgA 的水平来增强局部防御能力，但未显著提升血清中 IgG 的水平。因此，副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌在系统免疫调节和菌群调控方面表现优越，能够有效弥补德氏乳杆菌 DM8909 活菌的不足。



(a) 阴道组织中抗菌肽CRAMP的水平　(b)阴道组织中sIgA的水平　(c) 阴道组织中*Pigr*基因的mRNA相对表达量　(d) 血清中IgG的水平

*—P<0.05；**—P<0.01；***—P<0.001；ns—无显著性差异。

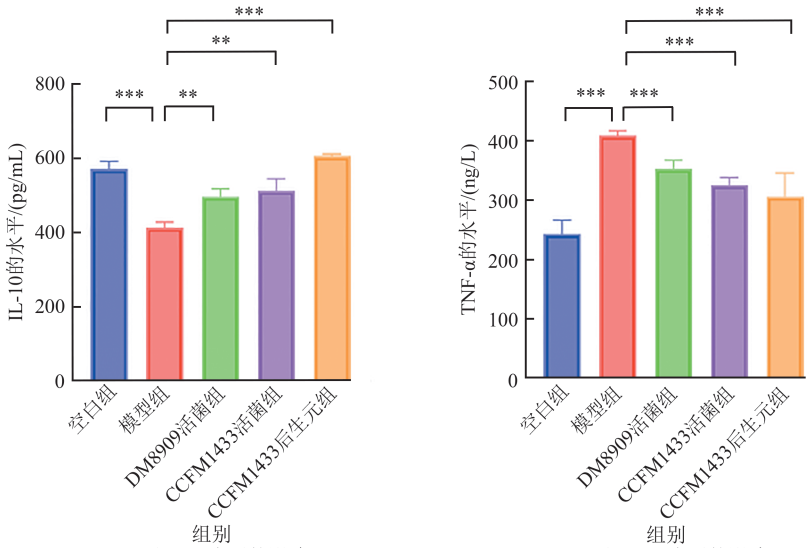
图 5　副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 对小鼠免疫活性的影响

Fig. 5　Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 on immunocompetence in mice

2.5　副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 对小鼠脾脏组织中 IL-10 和 TNF-α 水平的影响

白色念珠菌感染阴道后，阴道上皮细胞通过模式识别受体（PRRs）识别白色念珠菌的病原体相关分子模式（PAMPs），激活宿主的固有免疫系统，诱导炎症反应，导致 TNF-α 等多种促炎因子水平显著上升[28-29]。为了从整体上了解机体在应对阴道感染威胁时免疫系统的激活程度，及评估副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 干预后的效果，对小鼠脾脏组织中的 IL-10 和 TNF-α 水平进行检测分析。由图 6(a)可知，模型组 IL-10 的水平为 413.82 pg/mL，与模型组相比，副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 活菌及其后生元干预后 IL-10 的水平分别提升了 23.9%（P<0.01）和 46.7%（P<0.001），而德氏乳杆菌 DM8909 活菌干预后 IL-10 的水平仅提升 20.3%（P<0.01）。

由图 6(b)可知，模型组 TNF-α 的水平高于空白组，为 408.91 ng/L。副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 的活菌及其后生元干预后，TNF-α 的水平分别为 325.76 ng/L 和 306.20 ng/L，较模型组分别降低了 20.3%（P<0.001）和 25.1%（P<0.001）。



(a) 对IL-10水平的影响　(b) 对TNF-α水平的影响

—P<0.01；*—P<0.001。

图6　副干酪乳酪杆菌CCFM1433对小鼠脾脏组织中IL-10和TNF-α水平的影响

Fig. 6　Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 on IL-10 and TNF-α levels in spleen tissue of mice

综上所述，副干酪乳酪杆菌CCFM1433能够提高IL-10水平，降低TNF-α水平，从而有效抑制炎症反应的进一步发展，促进机体免疫平衡。值得注意的是，副干酪乳酪杆菌CCFM1433后生元在调节炎症方面的效果优于其活菌。

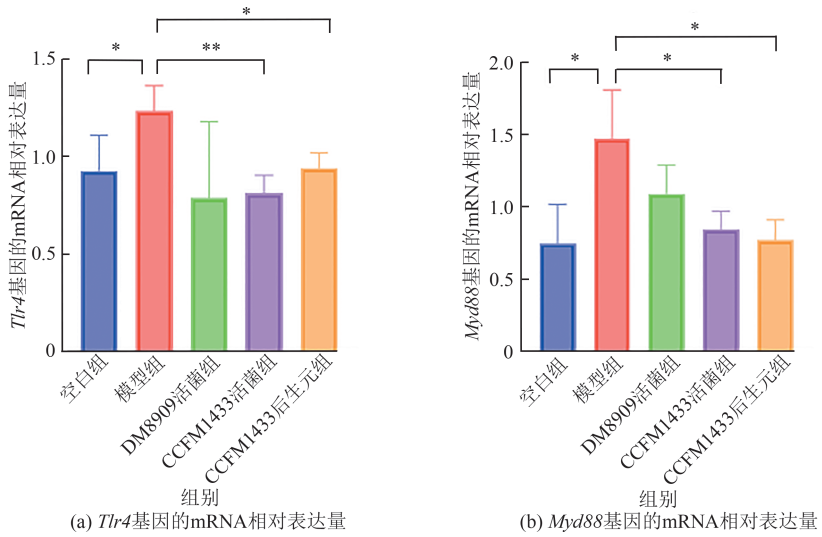
2.6　副干酪乳酪杆菌CCFM1433对TLR4/MyD88信号通路的影响

阴道上皮细胞表达的Toll样受体能够迅速响应病原体的刺激，启动先天免疫防御机制。白色念珠菌感染能够激活TLR4/MyD88信号通路，进而激活下游的NF-κB信号通路，诱导炎症反应[30]。Wu等[31]证实，TLR4/MyD88通路的表达水平能够显著影响白色念珠菌感染后炎症细胞的活化和炎症因子的释放。为深入探究口服乳杆菌对小鼠阴道炎症及系统性炎症反应的调控作用，作者分析了小鼠阴道组织中*Tlr4*和*Myd88*基因的mRNA相对表达量。由图7可知，相较于空白组，模型组小鼠阴道组织中*Tlr4*和*Myd88*基因的mRNA相对表达量上调，分别为空白组的1.33倍和1.97倍。与模型组相比，CCFM1433活菌组和CCFM1433后生元组的*Tlr4*基因的mRNA相对表达量分别降低34.2%和23.7%，*Myd88*基因的mRNA相对表达量分别降低42.7%和47.6%，表明副干酪乳酪杆菌CCFM1433的活菌及其后生元均能有效抑制TLR4/MyD88信号通路。相比之下，DM8909活菌组在调控*Tlr4*和*Myd88*基因的mRNA相对表达量上未呈现出显著效果。

2.7　副干酪乳酪杆菌CCFM1433对小鼠阴道菌群组成和功能的影响

为了评估副干酪乳酪杆菌CCFM1433对阴道菌群的影响，基于16S rRNA测序的属水平分析见图8(a)。乳杆菌属是阴道微生态的核心功能菌属[23]，其丰度动态与黏膜屏障完整性密切相关。模型组小鼠阴道菌群中乳杆菌属相对丰度极低，表明病原体定植导致以乳杆菌为主导的共生网络严重失调。在CCFM1433活菌组中乳杆菌属的相对丰度较高，表明其能够有效提升乳杆菌属的相对丰度。而DM8909活菌组和CCFM1433后生元组的小鼠阴道菌群中乳杆菌属的相对丰度处于较低水平。

为探讨乳杆菌属干预对阴道微生物菌群潜在功能的影响，利用PICRUSt2进行功能预测，并采用LEfSe分析差异特征。通过线性判别分析(LDA)计算得分，得分大于4的特征认定为在组间具有显著性差异，进而对KEGG二级代谢通路进行分析。由图8(b)可知，空白组微生物群落的功能基因主要富集于代谢相关通路，如物质转运与分解代谢(Transport and catabolism)及氨基酸代谢(Amino acid metabolism)，表明小鼠处于正常的代谢稳态。然而，白色念珠菌感染显著改变了菌群功能，使其从代谢稳态转变为应激响应模式。此时，细胞运动(Cell motility)和膜转运(Membrane transport)成为

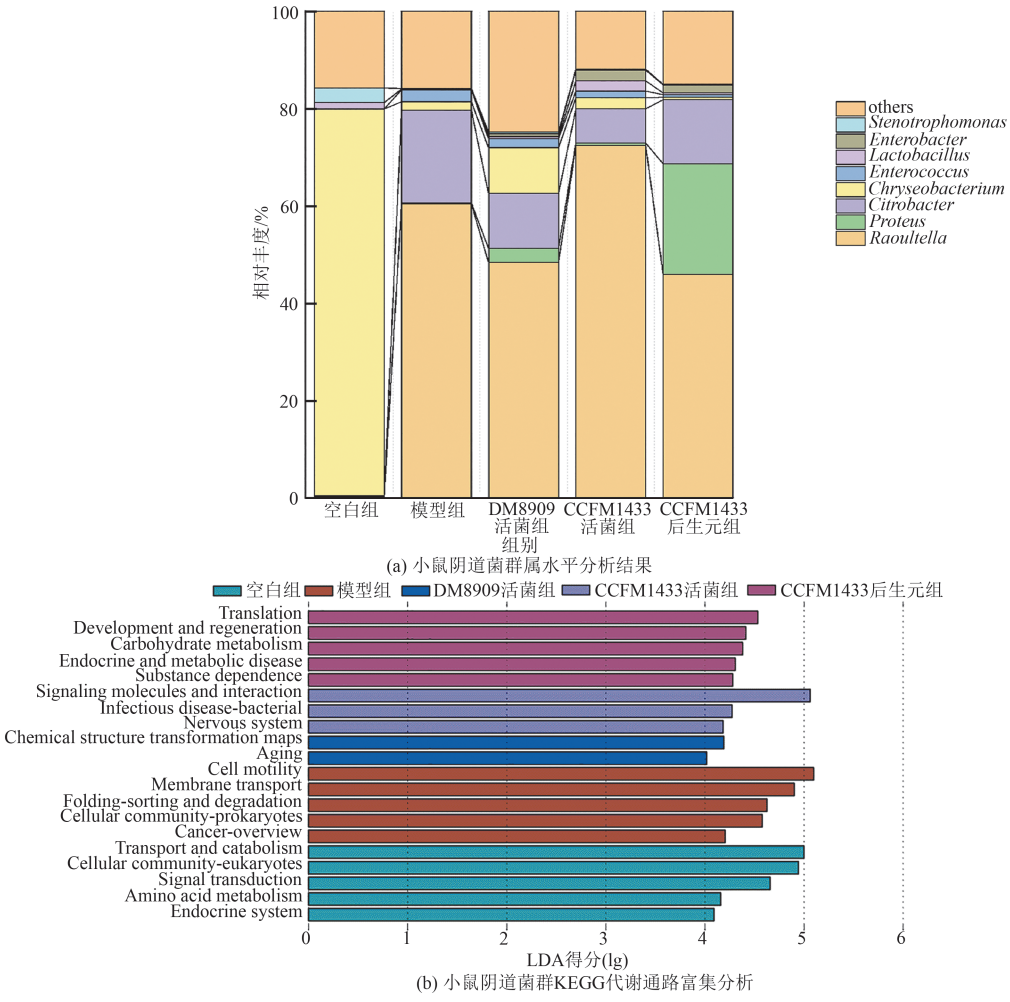


(a) *Tlr4*基因的mRNA相对表达量　(b) *Myd88*基因的mRNA相对表达量

*—P<0.05；**—P<0.01。

图 7　副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 对小鼠阴道组织信号通路基因表达的影响

Fig. 7　Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 on gene expression of signaling pathways in vaginal tissues of mice



(a) 小鼠阴道菌群属水平分析结果

(b) 小鼠阴道菌群KEGG代谢通路富集分析

*—P<0.05；**—P<0.01。

图 8　副干酪乳酪杆菌 CCFM1433 对小鼠阴道菌群属水平组成和 KEGG 代谢通路的影响

Fig. 8　Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1433 on the vaginal microbiota composition at the genus level and KEGG metabolism pathways in mice

主导功能，提示菌群可能通过增强自身迁移能力和跨膜物质交换以适应感染带来的环境压力。经德氏乳杆菌DM8909活菌干预后，菌群功能与化学结构转化（Chemical structure transformation maps）相关，表明该干预可能与特定生物活性物质的合成有关。在副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌干预后，小鼠阴道菌群的功能基因在信号分子及其受体（Signaling molecules and interaction）通路上显著富集，说明其可能通过调控信号转导网络，影响宿主免疫应答或菌群间的相互作用。此外，在副干酪乳酪杆菌CCFM1433后生元干预后，小鼠阴道菌群的功能基因在碳水化合物代谢（Carbohydrate metabolism）通路上显著富集，说明其可能通过增强乳杆菌的糖原代谢，为维持阴道乳杆菌属菌群的稳态提供支持。

综上所述，口服副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌可有效维持小鼠阴道乳杆菌属的相对丰度，从而有助于抵御病原体的入侵。功能预测分析进一步揭示，口服副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌及其后生元分别与小鼠阴道菌群的功能基因在信号分子及其受体通路和碳水化合物代谢通路上显著富集密切相关。口服副干酪乳酪杆菌CCFM1433为促进阴道内乳杆菌的定植和增殖提供有利条件，进而维持阴道菌群的稳态。

3 结论

综上所述，细胞试验筛选出了副干酪乳酪杆菌CCFM1433，且其可促进VK2/E6E7细胞分泌抗菌肽LL-37，展现出良好的免疫调节潜力。在小鼠白色念珠菌感染模型中，副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌可提升阴道组织中抗菌肽CRAMP、sIgA及血清中IgG的水平，从而增强机体免疫防御能力。副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌及其后生元均能通过抑制TLR4/MyD88信号通路调控炎症反应，上调IL-10水平，同时降低TNF-α的水平，从而有效缓解阴道炎症并减少黏膜损伤。菌群分析进一步表明，副干酪乳酪杆菌CCFM1433活菌可维持阴道乳杆菌菌群的稳态，且其干预效果与小鼠阴道菌群的功能基因在信号分子及其受体通路上显著富集密切相关。副干酪乳酪杆菌CCFM1433后生元的干预效果与小鼠阴道菌群的功能基因在碳水化合物代谢通路上显著富集密切相关，说明其可能通过增强乳杆菌的糖原代谢来维持阴道健康。未来，副干酪乳酪杆菌CCFM1433有潜力发展为用于免疫调节与感染防控的微生态制剂。然而，小鼠模型难以完全模拟人类阴道微生态环境，该菌株的长期安全性及其免疫调节效应仍需进一步的临床研究。因此，未来需深入研究副干酪乳酪杆菌CCFM1433在人体内的免疫调节机制，并全面评估其安全有效性，以推动其临床转化。

参考文献

[1] 廖秦平. 女性阴道微生态及阴道微生态评价[J]. 实用妇产科杂志，2010，26（2）：81-83.
LIAO Q P. Female vaginal microecology and evaluation of vaginal microecology [J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2010, 26 (2): 81-83. (in Chinese)

[2] QIN L, SUN T Y, LI X, et al. Population-level analyses identify host and environmental variables influencing the vaginal microbiome[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2025, 10: 64.

[3] WITKIN S S, LINHARES I M. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? [J]. BJOG, 2017, 124(4): 606-611.

[4] LEBEER S, AHANNACH S, GEHRMANN T, et al. A citizen-science-enabled catalogue of the vaginal microbiome and associated factors [J]. Nature Microbiology, 2023, 8 (11): 2183-2195.

[5] CHEE W J Y, CHEW S Y, Than L T L. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19: 203.

[6] SELLE K, KLAENHAMMER T R. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(6): 915-935.

[7] O'HANLON D E, MOENCH T R, CONE R A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80074.

[8] MIKO E, BARAKONYI A. The role of hydrogen-peroxide (H_2O_2) produced by vaginal microbiota in female reproductive health[J]. Antioxidants, 2023, 12(5): 1055.

[9] STOYANCHEVA G, MARZOTTO M, DELLAGLIO F, et al. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains [J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(9): 645-653.

[10] 纪凌云，吴晶，周旸，等. 阴道微生物组与HPV感染和宫颈病变的相关性研究进展[J]. 微生物与感染，2023，18(4)：251-256.
JI L Y, WU J, ZHOU Y, et al. Research progress on vaginal microbiome and its relationship with human papillomavirus infection and cervical disease[J]. Journal of Microbes and Infections, 2023, 18(4): 251-256. (in Chinese)

[11] 何一宁，熊海燕，郑英杰．阴道乳杆菌与早产关系的研究进展[J]．中华流行病学杂志，2017，38(3)：406-410．
HE Y N，XIONG H Y，ZHENG Y J．Progress in research of relationship between vaginal *Lactobacillus* and preterm delivery[J]．Chinese Journal of Epidemiology，2017，38(3)：406-410．(in Chinese)

[12] KAUSHIC C．The role of the local microenvironment in regulating susceptibility and immune responses to sexually transmitted viruses in the female genital tract[J]．Journal of Reproductive Immunology，2009，83(1/2)：168-172．

[13] KESHRI A K，RAWAT S S，CHAUDHARY A，et al．LL-37，the master antimicrobial peptide，its multifaceted role from combating infections to cancer immunity[J]．International Journal of Antimicrobial Agents，2025，65(1)：107398．

[14] KHURSHID Z，NASEEM M，ASIRI F Y I，et al．Significance and diagnostic role of antimicrobial cathelicidins (LL-37) peptides in oral health[J]．Biomolecules，2017，7(4)：80．

[15] VANDAMME D，LANDUYT B，LUYTEN W，et al．A comprehensive summary of LL-37，the factotum human cathelicidin peptide[J]．Cellular Immunology，2012，280(1)：22-35．

[16] 杨利林，罗颂平，朱玲．生殖道局部sIgA的作用及研究进展[J]．中国中医药现代远程教育，2014，12(2)：160-162．
YANG L L，LUO S P，ZHU L．The role and research progress of sIgA in local reproductive tract[J]．Chinese Medicine Modern Distance Education of China，2014，12(2)：160-162．(in Chinese)

[17] HEMATIANLARKI M，NIMMERJAHN F．Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of immunoglobulin G antibodies[J]．Immunological Reviews，2024，328(1)：372-386．

[18] LIU Q，LIU Q Y，MENG H W，et al．*Staphylococcus epidermidis* contributes to healthy maturation of the nasal microbiome by stimulating antimicrobial peptide production[J]．Cell Host & Microbe，2020，27(1)：68-78．

[19] SI W，LIANG H，BUGNO J，et al．*Lactobacillus rhamnosus* GG induces cGAS/STING-dependent type I interferon and improves response to immune checkpoint blockade[J]．Gut，2022，71(3)：521-533．

[20] 林如梦，黄小艳，崔树茂，等．副干酪乳酪杆菌CCFM1317激活Keap1/Nrf2通路缓解小鼠阴道加德纳菌感染[J]．食品与发酵工业，2025，51(3)：21-27．
LIN R M，HUANG X Y，CUI S M，et al．*Lacticaseibacillus paracasei* CCFM1317 alleviates *Gardnerella vaginalis* infection in mice by activating expression of Keap1/Nrf2 pathway[J]．Food and Fermentation Industries，2025，51(3)：21-27．(in Chinese)

[21] HUANG X Y，LIN R M，MAO B Y，et al．*Lactobacillus crispatus* CCFM1339 inhibits vaginal epithelial barrier injury induced by *Gardnerella vaginalis* in mice[J]．Biomolecules，2024，14(2)：240．

[22] ZHANG J Y，PENG J W，LI D M，et al．Divergent EGFR/MAPK-mediated immune responses to clinical *Candida* pathogens in vulvovaginal candidiasis[J]．Frontiers in Immunology，2022，13：894069．

[23] LI S，HERRERA G G，TAM K K，et al．Estrogen action in the epithelial cells of the mouse vagina regulates neutrophil infiltration and vaginal tissue integrity[J]．Scientific Reports，2018，8：11247．

[24] PEKMEZOVIC M，HOVHANNISYAN H，GRESNIGT M S，et al．*Candida* pathogens induce protective mitochondria-associated type I interferon signalling and a damage-driven response in vaginal epithelial cells[J]．Nature Microbiology，2021，6(5)：643-657．

[25] PIRCHER J，CZERMAK T，EHRLICH A，et al．Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation[J]．Nature Communications，2018，9：1523．

[26] ZHANG C，DING Y，LIU Y F，et al．The role of TLR4-mediated MyD88/TRAF6/NF-κB signaling and pIgR intestinal expression in chicks during *Salmonella enteritidis* infection[J]．Veterinary Immunology and Immunopathology，2023，258：110563．

[27] KAUSHIC C，FRAUENDORF E，WIRA C R．Polymeric immunoglobulin a receptor in the rodent female reproductive tract：influence of estradiol in the vagina and differential expression of messenger ribonucleic acid during estrous cycle[J]．Biology of Reproduction，1997，57(5)：958-966．

[28] KALIA N，SINGH J，KAUR M．Immunopathology of recurrent vulvovaginal infections：new aspects and research directions[J]．Frontiers in Immunology，2019，10：2034．

[29] TSAI W C，LIU F L，HUANG M H，et al．Enhancing immunity and modulating vaginal microflora against candidal vaginitis through nanoemulsion supplemented with *Porphyra* oligosaccharide as an intravaginal vaccine adjuvant[J]．International Journal of Nanomedicine，2023，18：6333-6346．

[30] WEINDL G，NAGLIK J R，KAESLER S，et al．Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling[J]．The Journal of Clinical Investigation，2007，117(12)：3664-3672．

[31] WU H，LI C，WANG Y M，et al．Transcriptomics reveals effect of *Pulsatilla* decoction butanol extract in alleviating vulvovaginal candidiasis by inhibiting neutrophil chemotaxis and activation *via* TLR4 signaling[J]．Pharmaceuticals，2024，17(5)：594．

（责任编辑：金文苑）