

不同 Sap 活性白假丝酵母菌对阴道上皮局部免疫的影响

邵明琨¹, 侯梦瑶², 罗丹丹³, 祁文瑾²

摘要 **目的** 探讨不同 Sap 分泌型天冬氨酸蛋白酶(Sap)活性菌株对阴道局部免疫的影响。**方法** 收集门诊外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)及复发性外阴阴道假丝酵母菌病(RVVC)患者阴道分泌物进行菌株鉴定,取白假丝酵母菌行药敏性分析、25S rDNA 基因分型、Sap 及磷脂酶(Plb)活性检测;用不同 Sap 活性的白假丝酵母菌与阴道上皮细胞共培养,用 ELISA 方法检测细胞上清液中白细胞介素(IL)-4、IL-8、IL-17 的水平。**结果** VVC 白假丝酵母菌株的 Sap 活性强于 RVVC 菌株;白假丝酵母菌感染后,阴道上皮细胞分泌的 IL-4、IL-8、IL-17 更多,且 IL-8 和 IL-17 出现的时间早、持续时间长;Sap 强的白假丝酵母菌能刺激阴道上皮分泌更多的细胞因子。**结论** 除外 Sap 活性,VVC 与 RVVC 菌株之间侵袭力无明显差异;白假丝酵母菌能在短时间内激活阴道宿主免疫反应,且 Sap 活性强的菌株诱发的宿主免疫也强;RVVC 致病白假丝酵母菌 Sap 活性弱的原因可能与阴道上皮分泌的保护性因子有关。

关键词 外阴阴道假丝酵母菌病;白假丝酵母菌;分泌型天冬氨酸蛋白酶活性;IL-4;IL-8;IL-17

中图分类号 R 711.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0791-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.022

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是一种常见的下生殖道感染性疾病。复发性外阴阴道假丝酵母菌病(recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC)是指1年内有症状并经实验室检查证实的VVC发作4次或以上^[1]。据全球调查,75%妇女一生中至少患过1次VVC,40%~50%的女性会反复感染,5%~8%的女性会患RVVC^[2]。其中,致病菌的菌种、基因型、耐药性、分泌型天冬氨酸蛋白酶(secreted aspartate protease, Sap)和磷脂酶(phospholipase, Plb)在侵袭机制中起着重要作

用^[3]。阴道局部的Th细胞及其炎症免疫因子也参与了疾病的发生发展^[4]。

目前尚无研究对VVC和RVVC致病菌株侵袭力进行分析。该研究比较了VVC和RVVC致病菌株侵袭力的差异性;选取Sap活性有差异的白假丝酵母菌和人阴道上皮细胞共培养,分析阴道上皮分泌细胞因子的情况;为VVC和RVVC的发病机制研究及临床防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 所有致病白假丝酵母菌均来自昆明医科大学第一附属医院妇产科门诊VVC、RVVC患者,收集时间为2018年9月—2019年3月。VVC、RVVC诊断标准以《妇产科学》(人民卫生出版社,第九版)为依据。排除:妊娠期、哺乳期、患糖尿病、口服避孕药、3个月内接受过全身抗真菌治疗或1个月内接受过外用抗真菌药物治疗、患免疫性疾病或正在服用免疫抑制剂、混合阴道感染者。人阴道上皮组织取自在昆明医科大学第一附属医院因“子宫肌瘤或子宫腺肌症”行子宫全切术的患者,取切下的阴道组织约1 cm × 1 cm进行实验。实验取得患者知情同意、通过医院伦理委员会批准。

沙堡罗氯霉素培养基(法国梅里埃公司);念珠菌显色平板(上海安图生物公司);角化细胞无血清培养基(K-SFM,美国Gibco公司);中性蛋白酶(Dispase II,美国Sigma公司);无菌脱脂奶粉(上海生工公司);50%卵黄乳液(青岛海博生物公司);人白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-8、IL-17 ELISA试剂盒(深圳欣博盛生物科技公司);酵母基因组DNA提取试剂盒(Yeast DNA Kit,离心柱型,北京天根科技公司);PCR Mix(北京天根科技公司);氟康唑(fluconazole, FLU)标准粉、两性霉素(amphotericin, AMB)标准粉、伊曲康唑(itraconazole, ITR)标准粉(北京中国食品药品检定研究所);Alamar Blue(英国Bio-rad有限公司)

1.2 假丝酵母菌纯化、菌种鉴定 假丝酵母菌纯化:用无菌棉拭子将VVC/RVVC患者阴道分泌物接种到沙堡罗培养基上,再用四区划线法分离单菌落。

2022-02-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660248)

作者单位:¹昆明医科大学第二附属医院妇产科,昆明 650101

²昆明医科大学第一附属医院妇产科,昆明 650032

³昆明市妇女儿童保健中心,昆明 650000

作者简介:邵明琨,女,博士研究生,主治医师;

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

菌种鉴定:严格按照安图念珠菌显色平板说明书进行鉴定。选取白假丝酵母菌进行下列实验。

1.3 白假丝酵母菌的基因分型、药敏实验及 Sap、Plb 活性检测 使用 25S rDNA-PCR 法对白假丝酵母菌进行基因分型^[5]。标准株为白假丝酵母菌 ATCC90028,购自美国细胞典藏中心。

参照 CLSI 推荐的 M27-A3 方案中适用于酵母菌的微量稀释法,对白假丝酵母菌进行 FLU、ITR、AMB 的体外药敏实验。使用 Alamar Blue 显色剂来帮助判读结果。Alamar Blue 保持蓝色表示真菌生长受抑制,变为红色表示真菌生长无抑制。根据 CLSI 建立的 M27-A3 中的 MIC 折点值,将所有菌株分为敏感、非敏感菌株。

用牛奶培养基和蛋黄培养基对鉴定出的白假丝酵母菌行 Sap、Plb 活性测定。以 PA 值表示 Sap 活性,PA = 菌落直径/总直径(菌落直径 + 透明圈)。用 PZ 值表示 Plb 活性,PZ = 菌落直径/总直径(菌落直径 + 沉淀圈)。PA 或 PZ 值愈低,菌株的天冬氨酸蛋白酶或 Plb 的活性愈强^[6]。

1.4 人阴道上皮细胞分离培养及鉴定 人阴道上皮组织来自昆明医科大学第一附属医院妇产科,置于 40 ml HANK'S 液(3% 双抗),低温转运。组织用含 3% 双抗的 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次(每次 10 ml,1 000 r/min 离心 3 min),无菌条件下在 10 cm 皿中剔除坏死组织,于 Dispase II 中 4 °C 过夜消化,第 2 天将分离出的阴道上皮组织在含 15% FBS 的 DMEM 高糖培养基中剪碎,PBS 洗涤 2 次。加入两倍体积的胰酶,37 °C 消化 3 min,吸取消化液,用等体积的含血清的培养基中和,混匀消化后的细胞用 70 μm 的滤膜过滤,PBS 洗涤 2 次。细胞用 K-SFM 培养基培养。

人阴道上皮细胞培养至第 2 代,将细胞培养于 6 孔板中待细胞培养至 70%,PBS 洗涤 3 次。4% 多聚甲醛固定细胞,按照角蛋白质(广谱)抗体试剂说明书进行细胞鉴定:采用免疫化学染色 SP 法,一抗为角蛋白质(广谱)抗体,按照 1:100 稀释,二抗采用通用二抗进行孵育,采用 DAB 进行显色,苏木精复染后封片,显微镜 200 倍下观察并计数阳性细胞数。

1.5 阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养后细胞因子测定 按 1×10^6 个/ml 浓度将细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养。当贴壁细胞数达 70% ~ 80% 时进行传代,第 3 代细胞贴壁数目达 70% ~ 80% 时进行共培养实验。从

VVC 致病白假丝酵母菌中选取 Sap 活性最弱(Sap 弱组)和最强(Sap 强组)的菌株各 4 株,Sap 强组 Sap 活性(PA 值)分别为 0.247 9、0.242 2、0.272 9 和 0.278 7,Sap 弱组 Sap 活性(PA 值)分别为 0.731 4、0.688 3、0.665 5 和 0.597 4,分别用 K-SFM 培养液配置菌液浓度为 1×10^6 CFU/ml。实验以不加白假丝酵母菌的人阴道上皮细胞为对照组。分别在共培养后 6、12、24、48 h 收取上清液,使用 ELISA 方法测定 IL-4、IL-8、IL-17 表达量。

1.6 统计学处理 用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,临床计量数据采用四方格 χ^2 检验进行组间率的比较,组内比较采用配对样本 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,方差齐选用 LSD 法;方差不齐选用 Dunnett's T3 法。统计图用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 假丝酵母菌纯化、菌种鉴定结果 收集 VVC 菌株 100 株,RVVC 菌株 92 株。VVC 菌株中,白假丝酵母菌有 95 株,非白假丝酵母菌 5 株。RVVC 菌株中,白假丝酵母菌有 86 株,非白假丝酵母菌有 6 株。无论 VVC 还是 RVVC 组,白假丝酵母菌所占比例均最高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 白假丝酵母菌基因分型、药敏实验及 Sap、Plb 活性结果 基因分型:实验对 95 株 VVC 白假丝酵母菌株及 86 株 RVVC 白假丝酵母菌株进行基因分型,根据条带位置及数量可将致病白假丝酵母菌分为 A、B、C 3 型:仅有 450 bp 片段者为 A 型,仅有 840 bp 片段者为 B 型,两条片段均有为 C 型(图 1A)。研究提示,A 基因型在 VVC 和 RVVC 菌株中所占比例都最高,且 VVC 致病菌株及 RVVC 致病菌株的基因型分布无统计学差异(表 1)。

药敏实验:比较 VVC 和 RVVC 两组白假丝酵母菌的 48 h FLU、AMB 及 ITB 药敏性,分析敏感、非敏感菌株比例后显示:FLU、AMB 及 ITB 敏感菌株在 VVC 组和 RVVC 组中所占比例无统计学差异(图 1D 和表 1)。

Sap 活性及 Plb 活性检测:对 VVC 及 RVVC 白假丝酵母菌株进行 Sap、Plb 活性测定(图 1B、C)。VVC 组菌株的 Sap 活性高于 RVVC 组(*P* < 0.05),但两组菌株的 Plb 酶活性无显著差异(*P* > 0.05)。见表 1。

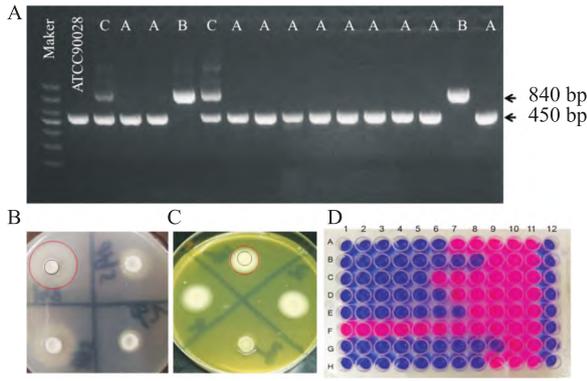


图1 白假丝酵母菌基因分型、药敏实验及 Sap、Plb 活性

A: 白假丝酵母菌基因分型结果; B: 牛奶培养基中检测 Sap 活性; 黑圈: 真菌生长区域; 红色外圈: Sap 酶活性阳性区域; C: 蛋黄培养基中检测 Plb 活性; 黑圈: 真菌生长区域; 红色外圈: Plb 活性阳性区域; D: 体外药敏实验结果; 阴性对照: 全部保持蓝色不变; 阳性对照: 全部变为红色

表1 VVC 与 RVVC 菌株基因型、药敏及 Sap、Plb 活性差异(株, n)

毒力因素	VVC	RVVC	Z/t 值	P 值
总数	95	86		
基因型			3.963	0.1378
A	72	75		
B	16	7		
C	7	4		
药敏结果				
FLU 敏感	89	83	0.8739	0.3822
FLU 非敏感	6	3		
AMB 敏感	77	74	0.9023	0.3669
AMB 非敏感	18	12		
ITR 非敏感	70	70	1.3970	0.1625
ITR 敏感	25	15		
酶活性测定				
Sap	0.3576 ± 0.0102	0.4021 ± 0.0108	2.986	0.0032
Plb	0.7817 ± 0.0189	0.7947 ± 0.0205	0.422	0.8331

2.3 阴道上皮细胞培养 人阴道上皮细胞在分离后的第 0~3 代都呈铺路石样生长, 形态为多角形, 轮廓清晰, 折光性好。使用细胞角蛋白(广谱)抗体(免疫组化)试剂盒检测第 2 代阴道上皮细胞, 阴道上皮细胞阳性比率为 100%。见图 2。

2.4 细胞因子检测结果 阴道上皮细胞与白假丝酵母菌共培养后细胞上清液采用 ELISA 方法检测 IL-4、IL-8、IL-17。人阴道上皮细胞能分泌 IL-4、IL-8、IL-17。感染白假丝酵母菌后, 阴道上皮细胞能分泌更多的 IL-4, 且在感染第 12 小时达到峰值, 而后逐渐降低。相比 Sap 弱组, Sap 强组阴道上皮细胞 IL-4 的表达量在感染 6、12 h 更高 ($P < 0.05$) (表 2)。感染白假丝酵母菌后, 阴道上皮细胞能分泌更高的 IL-8, 且在感染第 6 小时就达到峰值, 而后保持相同水平。相比 Sap 弱组, Sap 强组的分泌量更多 ($P < 0.05$) (表 3)。阴道上皮细胞在感染白假丝酵母菌后分泌的 IL-17 也更高。两个实验组的 IL-17 在感染第 6 小时就达峰值, 而后逐渐降低。相比 Sap 弱组, Sap 强组 IL-17 的分泌量更高 ($P < 0.05$) (表 4)。

3 讨论

VVC 和 RVVC 的发病机制包括菌株的侵袭性和局部宿主免疫两个方面。白假丝酵母菌是 VVC 或者 RVVC 中主要的致病菌^[7], 通过表达多种毒力因子帮助其入侵以及在宿主体内定植, 包括形态变化(酵母相-菌丝相的转变)、表型转换(白菌-灰菌的转换)、耐药性、基因型及分泌型毒力因子等^[8]。本研究比较了 VVC 和 RVVC 致病菌株侵袭力的差异性, 结果显示, 除外 Sap 活性, VVC 和 RVVC 致病菌的菌种、25S rDNA-PCR 基因分型、Plb

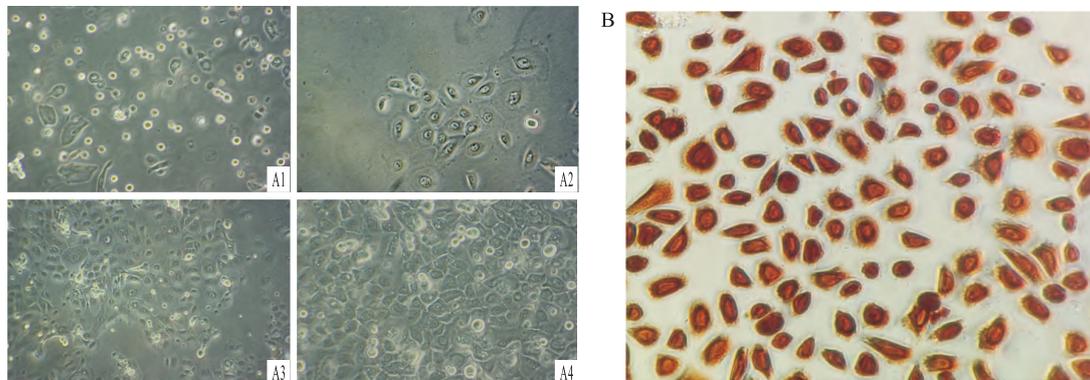


图2 光学显微镜观察细胞形态及免疫组化染色 ×200

A1~A4: 人阴道上皮细胞分离后第 0~3 代; B: 人阴道上皮细胞免疫组化鉴定

表2 ELISA 检测细胞上清液中 IL-4 分泌的情况 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	Sap 强组	Sap 弱组	F 值	P 值
6	0.955 ± 0.543	2.146 ± 0.445 *	1.472 ± 0.248 *#	15.430	<0.000 1
12	1.121 ± 0.641	2.226 ± 0.511 *	1.631 ± 0.298 *#	9.631	0.001 1
24	0.935 ± 0.452	1.601 ± 0.306 *	1.419 ± 0.349 *	6.752	0.005 4
48	1.218 ± 0.523	1.749 ± 0.271 *	1.397 ± 0.223#	4.400	0.025 4
F 值	0.495	4.682	1.110		
P 值	0.688	0.009	0.361		

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Sap 强组比较: # $P < 0.05$

表3 ELISA 检测细胞上清液中 IL-8 分泌的情况 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	SAP 强组	SAP 弱组	F 值	P 值
6	35.137 ± 16.043	123.013 ± 78.281 *	81.897 ± 50.67 *#	5.182	0.014 8
12	35.035 ± 13.662	113.232 ± 29.801 *	74.769 ± 38.022 *#	14.560	0.000 1
24	55.205 ± 21.656	122.953 ± 29.235 *	69.522 ± 30.076 *#	7.684	0.003 1
48	41.972 ± 12.432	132.462 ± 44.327 *	75.461 ± 43.147 *#	4.596	0.022 1
F 值	2.317	0.200	0.121		
P 值	0.102	0.895	0.946		

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Sap 强组比较: # $P < 0.05$

表4 ELISA 检测细胞上清液中 IL-17 分泌的情况 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	Sap 强组	Sap 弱组	F 值	P 值
6	5.969 ± 7.531	26.667 ± 5.267 *	22.266 ± 6.465 *#	22.600	<0.000 1
12	5.110 ± 4.082	23.546 ± 6.991 *	17.582 ± 7.068 *#	18.390	<0.000 1
24	5.3754 ± 4.519	23.256 ± 3.370 *	15.000 ± 10.049 *#	14.480	0.000 1
48	3.921 ± 2.229	15.866 ± 5.776 *	10.837 ± 3.582 *#	16.870	<0.000 1
F 值	0.239	5.530	3.565		
P 值	0.867	0.004	0.026		

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Sap 强组比较: # $P < 0.05$

活性、药物敏感性均无差异。症状重、难治疗的 RV-VC 致病菌株的 Sap 活性反而比 VVC 致病菌株的更低。这些结果提示,相较于白假丝酵母菌的侵袭力,阴道宿主的免疫反应可能才是 VVC、RVVC 发生的主要因素。这与 Jabra-Rizk et al^[9] 的研究近似:白假丝酵母菌侵袭宿主后,疾病的传播主要由宿主免疫系统介导。本研究中 RVVC 致病菌株 Sap 弱的原因估计也跟宿主免疫反应有关。

Sap 具有较高的蛋白水解酶活性,能降解黏膜表面的各种保护分子,为白假丝酵母菌的生长提供营养,增强黏附和侵袭能力;它还可以切断宿主的天然免疫应答因子,在白假丝酵母菌的免疫逃逸中发挥重要作用^[10]。此外,Sap 还能在体内诱导宿主产生相应的细胞因子,如 IL-1 β 和 IL-18,而 IL-1 β 激活的 CD4T 细胞能在 VVC 和 RVVC 发病机制中起重要作用^[11]。本实验探讨了人阴道上皮细胞分泌 IL-4、IL-8、IL-17 的情况。IL-4 是 Th2 细胞的代表性细胞因子,其主要作用是诱发过敏反应,增加对感染的易感性^[12]。Th1 细胞能激活巨噬细胞和中性粒细胞,增强吞噬和杀菌,起到免疫保护作用。近年来,

Th1 的保护作用逐步被 Th17 取代^[13]。IL-17 作为 Th17 细胞的主要效应因子,能动员感染部位的中性粒细胞,维持黏膜上皮的完整性,促进抗菌肽 β -防御素的释放,预防白念珠菌感染^[14]。中性粒细胞对于宿主抵御侵袭性真菌疾病至关重要。IL-8 是中性粒细胞趋化因子,本研究中以 IL-8 反映中性粒细胞的募集情况。

本研究显示,人阴道上皮细胞具有分泌 IL-4、IL-8、IL-17 的能力,在受到白假丝酵母菌感染后,阴道上皮分泌的 IL-4、IL-8、IL-17 明显升高。无论 Sap 强组还是 Sap 弱组,3 种细胞因子的含量在感染早期就达到高峰,保护性因子 IL-8 和 IL-17 分泌的时间则更早,在感染后第 6 小时就达到高峰。随着感染时间延长,IL-4 和 IL-17 出现了逐渐降低趋势,而 IL-8 维持在相同水平。表明阴道上皮细胞在受到白假丝酵母菌侵袭时,宿主免疫能在短时间内被激活,而且保护性因子出现的时间更早、维持时间更长。课题组推测,阴道内的免疫因子可能会影响白假丝酵母菌的 Sap 活性,而且也是临床中只有部分 VVC 患者发展为 RVVC 的原因之一。但是,体外实验存

在各种限制,如细胞死亡等,今后可以使用动物模型进行深入研究。

本研究还显示 Sap 活性高的白假丝酵母菌刺激阴道上皮产生的细胞因子更高,证实了 Sap 有诱发宿主免疫的作用,而且这种作用与 Sap 的高低呈正比。实验引起一个假想:Sap 高的白假丝酵母菌虽然侵袭力强,但是诱发的宿主免疫也强,因此更容易被宿主杀灭,从而不易复发。这个假想需要进一步实验来确定。

参考文献

- [1] Ilkit M, Guzel A B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis; a mycological perspective[J]. Crit Rev Microbiol, 2011, 37(3): 250–61.
- [2] Denning D W, Kneale M, Sobel J D, et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(11): e339–47.
- [3] Mayer F L, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms[J]. Virulence, 2013, 4(2): 119–28.
- [4] De Bernardis F, Graziani S, Tirelli F, et al. *Candida vaginitis*: virulence, host response and vaccine prospects[J]. Med Mycol, 2018, 56(suppl_1): 26–31.
- [5] 祁文瑾, 李白鸾, 钱源. 假丝酵母菌性外阴阴道病不同基因型致病菌株药物敏感性比较[J]. 中国全科医学, 2016, 19(2): 233–7.
- [6] 张旭, 刘魏, 宋琦, 等. 不同基因型阴道白假丝酵母菌细胞外蛋白水解酶和磷脂酶活性的研究[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(6): 425–8.
- [7] Lopez J E M. Candidiasis (vulvovaginal) [J]. BMJ Clin Evid, 2015, 2015: 0815.
- [8] Peters B M, Yano J, Noverr M C, et al. *Candida vaginitis*: when opportunism knocks, the host responds[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(4): e1003965.
- [9] Jabra-Rizk M A, Kong E F, Tsui C, et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework[J]. Infect Immun, 2016, 84(10): 2724–39.
- [10] 王园园, 陈昌斌. 分泌型蛋白介导白念珠菌与宿主相互作用分子机制的研究进展[J]. 菌物学报, 2018, 37(10): 1364–77.
- [11] Gabrielli E, Sabbatini S, Roselletti E, et al. *In vivo* induction of neutrophil chemotaxis by secretory aspartyl proteinases of *Candida albicans*[J]. Virulence, 2016, 7(7): 819–25.
- [12] Richardson J P, Moyes D L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection[J]. Virulence, 2015, 6(4): 327–37.
- [13] Bacher P, Hohnstein T, Beerbaum E, et al. Human anti-fungal Th17 immunity and pathology rely on cross-reactivity against *Candida albicans*[J]. Cell, 2019, 176(6): 1340–55.
- [14] Zhang X, Li T, Chen X, et al. Nystatin enhances the immune response against *Candida albicans* and protects the ultrastructure of the vaginal epithelium in a rat model of vulvovaginal candidiasis [J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 166.

Effects of *Candida albicans* with different Sap on host immunity of vaginal epithelial cells

Shao Mingkun¹, Hou Mengyao², Luo Dandan³, Qi Wenjin²

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101; ²Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032; ³Dept of Obstetrics and Gynecology, Kunming Women and Children's Health Center, Kunming 650000)

Abstract Objective To investigate the difference in invasiveness between vulvovaginal candidiasis (VVC) and recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) strains, and to explore the effect of strains with different secreted aspartate protease (Sap) on vaginal local immunity. **Methods** Vaginal secretions of VVC and RVVC patients were collected for fungus identification. *Candida albicans* (*C. albicans*) were taken for drug sensitivity analysis, 25S rDNA genotyping, and detection of secreted aspartate protease (Sap) and phospholipase (Plb) activity. *C. albicans* with different Sap activity were cultured with vaginal epithelial cells, and the levels of Interleukin (IL)-4, IL-8, IL-17 in cell supernatant were measured by ELISA. **Results** Sap activity of VVC *C. albicans* was stronger than that of RVVC. After infection with *C. albicans*, the secretion of IL-4, IL-8 and IL-17 by vaginal epithelial cells was higher, and IL-8 and IL-17 appeared earlier and lasted longer. *C. albicans* with strong Sap enzyme activity could stimulate vaginal epithelial cells to secrete more cytokines. **Conclusion** Except for the Sap activity, there was no significant difference in the invasiveness between VVC and RVVC strains. *C. albicans* could activate the vaginal host immune response in a short time. The lower Sap activity of *C. albicans* in RVVC patients may be related to the protective factors secreted by the vaginal epithelium.

Key words vulvovaginal candidiasis; *Candida albicans*; secreted aspartate protease activity; IL-4; IL-8; IL-17