

健康妇女及 3 例细菌性阴道病患者阴道菌群 的非培养分析

张彦¹ 黄英^{2*} 宋磊¹

(1. 中国人民解放军总医院妇产科 北京 100853)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 根据 Amsel 标准及 Nugent 标准, 确诊筛选健康妇女及细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)患者各 3 例。提取其阴道分泌物样本的总 DNA, 构建 16S rRNA 基因克隆文库, 并对阳性克隆进行 ARDRA 和测序分析。结果表明, 健康妇女样本的基因文库中, 分别以卷曲乳酸杆菌(*L. crispatus*)和惰性乳酸杆菌(*L. iners*)的克隆子占较大比例, 另外存在少量的阴道乳酸杆菌(*L. vaginalis*)或詹氏乳酸杆菌(*L. jensenii*)的克隆子。BV 患者样本的基因文库中, 克隆子所代表的菌种类型明显增多, 但均以阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*)和阴道阿托波氏菌(*Atopobium vaginae*)的克隆子占较大比例, 且无乳酸杆菌克隆子。说明健康妇女阴道菌群的种类单一, 以乳酸杆菌占优势, *L. iners* 为优势菌种之一; BV 患者阴道菌群的种类复杂多样, 但均以 *Gardnerella vaginalis* 及 *Atopobium vaginae* 共同占优势。

关键词: 细菌性阴道病, 16S rRNA 基因, 克隆文库, 菌群

Culture-independent Analysis of Vaginal Microbial Communities in Healthy Women and Three Patients with Bacterial Vaginosis

ZHANG Yan¹ HUANG Ying^{2*} SONG Lei¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of PLA, Beijing 100853)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

Abstract: Three healthy women and three patients with BV were selected and diagnosed respectively according to the Amsel and Nugent criteria. Total microbial community DNA was extracted from their vaginal discharges, and 16S rRNA gene clone libraries were constructed. ARDAR fingerprinting patterns and sequences analysis of positive clones from each library showed that clones representing *Lactobacillus crispatus* and *L. iners* accounted for a major proportion respectively in the libraries for healthy women, where *L. vaginalis* and *L. jensenii* clones were present in a small amount. In the libraries for patients with BV, the microbial varieties increased remarkably, but both *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* clones con-

stituted a greater portion, while *Lactobacillus* clones were not detected. It is therefore concluded that the vaginal microflora of healthy women is simple, predominated by single *Lactobacillus* species, and *L. iners* is one of the dominant species. The vaginal microflora of BV patients is complicated and various, but predominated by both *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*.

Keywords: Bacterial vaginosis, 16S rRNA gene, Clone library, Community

细菌性阴道病是女性生殖道感染的最常见疾病,它可引起严重的并发症,包括盆腔炎、绒毛膜羊膜炎、早产、低出生体重儿,也使患者增加了感染HIV病毒的风险^[1]。尽管甲硝唑治疗对大多数的患者来说是有效的,但复发率非常高,仍然是当今我们所面临的严重挑战。细菌性阴道病的主要特征是阴道内产生过氧化氢的乳酸杆菌减少或缺失,而阴道加德纳菌、动弯杆菌、普雷沃菌、类杆菌等厌氧菌增加^[2]。可见,复杂的阴道微生物的变化在细菌性阴道病的发病中起到了重要的作用。

我们目前对阴道菌群的认识多是基于传统的培养方法和生化鉴定方法。然而,阴道内许多细菌是厌氧菌,营养要求苛刻,很难进行纯培养和分离鉴定,因而对阴道菌群的认识存在一定的偏差和不完整性。国内关于应用非培养方法对阴道菌群的研究尚未见报道。16S rRNA基因克隆文库分析技术不依赖于微生物的分离培养,能够快速鉴定出样本中尚不能人工培养的细菌^[3],对阴道的菌群构成可获得更准确、全面的认识。本文通过构建16S rRNA基因克隆文库,分别对健康妇女及BV患者的阴道菌群进行了分析。

1 材料与方法

1.1 样本采集

应用Amsel临床诊断标准^[4]及Nugent评分标准^[5],从就诊的50例育龄期妇女中,遵循以下筛选指标确诊健康妇女及BV患者各3例:患者一月内无全身应用抗生素及阴道局部用药史,3天内无性生活史,非妊娠期、哺乳期或月经期,没有同时患有滴虫性、霉菌性或其它阴道炎症。用无菌阴道棉拭子于阴道中部侧壁取分泌物,避免接触到阴道口和外阴部以防污染。将其放入无菌试管中,用于提取DNA。健康妇女阴道分泌物样本编号为N1、N2、N3;BV患者样本编号为BV1、BV2、BV3。

1.2 菌株与试剂

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 为本实验室保存;细菌基因组DNA提取试剂盒及PCR产物纯化试剂盒,购自天为时代公司; pGEM-T Easy Vector Systems,

购自Promega公司; Taq DNA polymerase及限制性内切酶 *Hae*III 和 *Hinf* I, 购自宝生物工程有限公司。

1.3 总DNA的提取与检测

采用试剂盒提取样本总DNA,具体操作步骤参照说明书。提取的总DNA经紫外分光光度计测定纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测后于4℃保存备用。

1.4 16S rRNA 基因片段的扩增与克隆文库构建

以样本总DNA为模板,采用细菌通用引物27F和1492R扩增其中的16S rRNA基因。扩增反应体系:10×PCR缓冲液5 μ L, dNTP (10mmol/L)1 μ L, Taq DNA polymerase (5U/ μ L) 0.5 μ L, 引物27F和1492R(25 μ mol/L)各1 μ L, 模板DNA 1.5 μ L (经Beckman DU 800分光光度计定量相当于200ng), 补双蒸水至50 μ L。PCR扩增条件:94℃预变性5 min, 然后94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共30个循环,72℃最终延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用PCR产物纯化试剂盒纯化。

使用pGEM-T Easy vector System试剂盒进行PCR产物与克隆载体的连接反应,连接产物通过电转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,复苏培养后涂布于含氨苄青霉素(Amp)、X-gal和IPTG的LB平板上,37℃培养14~16 h。通过蓝白斑筛选挑取其中的阳性克隆子,构建16S rRNA基因克隆文库。

1.5 阳性克隆的检测、ARDRA与序列分析

用pGEM-T载体通用引物SP6F和T7R对克隆子DNA进行PCR扩增,检测阳性克隆。用 *Hinf* I和 *Hae*III两种限制性内切酶对阳性克隆的PCR产物进行ARDRA分析,酶切反应体系为20 μ L, 其中10×Buffer 2.0 μ L, 限制性内切酶(10U/ μ L) 1.0 μ L, PCR产物6 μ L, 双蒸水补足体积,混匀后置于37℃酶切3 h以上。酶切产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。选择不同ARDRA图谱类型的克隆子测序,测序工作由北京诺赛基因公司完成。测序结果通过GenBank数据库中的BLASTN程序进行序列比对,确定所克隆子序列所代表的细菌种类。

2 结果

构建健康妇女样本N1、N2、N3和BV患者样

本 BV1、BV2、BV3 的阴道菌群 16S rRNA 基因文库共 6 个。从每个文库中随机挑取 50 个克隆子, 总共 300 个克隆子经 PCR 检测后, 获得 275 个阳性克隆子。经 ARDRA 分析(图 1), 挑选不同图谱类型的代表克隆子测序, 得到 20 条有差异的 16S rRNA 基因序列。通过在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 均与其中的已知序列具有高度同源性(>97%)。各文库克隆子所代表细菌种类的分布情况见表 1。

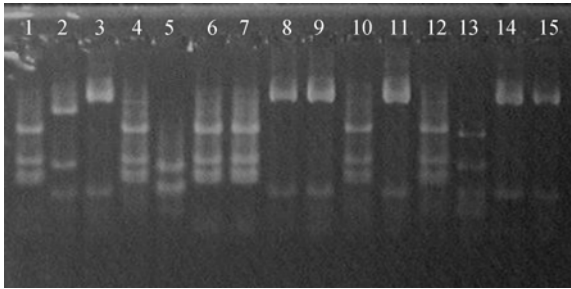


图 1 部分克隆子的 ARDRA 电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of ARDRA fingerprinting profiles.
1~15 泳道: BV3 样品的 15 个克隆子。具有相同 ARDRA 图谱类型的克隆子归为同一菌种(泳道 1、4、6、7、10、12 为一种, 泳道 3、8、9、11、14、15 为一种, 泳道 2、5、13 各为一种), 选择其代表克隆子进行测序。
Lanes 1~15: 15 clones in clone library of sample BV3. Clones with the same fingerprinting pattern were defined as the same clone. The representative clones were selected for subsequent sequencing.

每一个健康妇女样本的基因文库中, 克隆子类型都比较单一, 而且均为乳酸杆菌。与惰性乳酸杆菌(*L. iners*)序列具有高度同源性的克隆子在 N2 和 N3 样本的文库中均占优势, 分别占克隆子总数的 91.7%和 95.3%, 而阴道乳酸杆菌(*L. vaginalis*)和卷曲乳酸杆菌(*L. crispatus*)的克隆子则分别以较少比例存在于 N2 和 N3 样本的文库中(8.3%和 4.7%)。在 N1 样本的文库中, 与 *L. crispatus* 序列具有高度同源性的克隆子占克隆总数的 97.9%, 另外还存在少量的詹氏乳酸杆菌(*L. jensenii*), 其克隆子占克隆总数的 2.1%。

在每一个 BV 患者样本的基因文库中, 克隆子所代表的菌种类型明显增多, 但乳酸杆菌均缺如, 而被其它的菌种代替。3 个 BV 患者样本均以阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalise*)和阴道阿托波氏菌(*Atopobium vaginae*)占优势, 还分别存在不同比例的二路普雷沃氏菌(*Prevotella bivia*)和羞怯动弯杆菌(*Mobiluncus mulieris*)。在 BV1 样本中还发现有较低比例的 *Leptotrichia amnionii*、*Sneathia sanguinegens* 和 *Megasphaera elsdenii*, 其克隆子分别占克隆总数

的 2.3%、4.5%和 2.3%。在 BV1 和 BV3 样本中发现有 *Peptostreptococcus anaerobius*, 其克隆子分别占克隆总数的 2.3%和 2.2%。*Bacteroides ureolyticus*、*Peptoniphilus* sp.、*Dialister* sp.、*Bifidobacterium biavatii* 和 *Aerococcus christensenii* 则分别以较低的比例仅在某一个样本的基因文库中出现。另外, 在这 3 个 BV 患者样本的基因文库中均存在一定比例的 Uncultured clone, 即以非培养方法研究发现的克隆子, 是目前的培养方法还未能鉴定的菌种。

表 1 各文库克隆子所代表细菌种类的分布情况 Table 1 Microbial diversity and proportion of each individual 16S rRNA gene clone library						
Species (sequence similarity)	N1	N2	N3	BV1	BV2	BV3
<i>L. crispatus</i> (99%)	97.9*		47			
<i>L. jensenii</i> (98%)	2.1					
<i>L. iners</i> (99%)		91.7	95.3			
<i>L. vaginalis</i> (99%)		8.3				
<i>Gardnerella vaginalis</i> (99%)				40.9	53.2	28.3
<i>Atopobium vaginae</i> (99%)				25.0	19.1	43.5
<i>Prevotella bivia</i> (98%)				6.8	8.5	2.2
<i>Mobiluncus mulieris</i> (98%)				9.1	6.4	13.0
<i>Leptotrichia amnionii</i> (99%)				2.3	0.0	0.0
<i>Sneathia sanguinegens</i> (99%)				4.5	0.0	0.0
<i>Megasphaera elsdenii</i> (98%)				2.3	0.0	0.0
<i>Bacteroides ureolyticus</i> (99%)				0.0	6.4	0.0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (99%)				2.3	0.0	2.2
<i>Peptoniphilus</i> sp. (98%)				0.0	0.0	4.3
<i>Dialister</i> sp. (99%)				0.0	4.3	0.0
<i>Bifidobacterium biavatii</i> (98%)				0.0	0.0	2.2
<i>Aerococcus vaginalis</i> (99%)				4.5	0.0	0.0
Uncultured clone rRNA 025 (98%)				0.0	2.1	0.0
Uncultured clone rRNA 115 (98%)				2.3	0.0	0.0
Uncultured clone rRNA 362 (99%)				0.0	0.0	4.3

注: 表中数字为代表不同菌种的克隆子占该文库中总克隆子数目的百分比(%)
Note: Numbers denoted as the percentage of different clones in each individual 16S rRNA gene clone library

3 讨论

本研究非培养分析的结果表明健康妇女阴道内菌种单一,而且均以乳酸杆菌占优势,每个样本的基因文库都仅包含了2种乳酸杆菌,且以一个菌种占绝对优势。Antonio等^[6]的研究也证实健康妇女阴道中通常仅1~2种乳酸杆菌占优势,最常见的乳酸杆菌是 *L. crispatus*、加氏乳酸杆菌(*L. gasseri*)和 *L. jensenii*。我们除在一例健康妇女的样本中鉴定出了传统培养方法已证实的健康妇女阴道优势菌种 *L. crispatus* 外,还于两例健康妇女的样本中均鉴定出另一优势菌种 *L. iners*。*L. iners* 在通常用于分离乳酸杆菌的 MRS 和 Rogosa 培养基上不能生长,这可能是传统培养方法没能从阴道样本中发现这一菌种的原因。Falsen等^[7]于1999年首次分离鉴定了该菌种,并命名为 *L. iners*。后继研究证实 *L. iners* 作为优势菌种之一在瑞典、加拿大、美国 and 尼日利亚的健康妇女阴道中均有存在^[8-11],而本研究发现中国健康妇女阴道中也存在这一优势菌。有关 *L. iners* 在维持阴道健康状态方面的作用机制还有待于进一步研究。

本研究非培养分析还发现 BV 患者阴道内菌种复杂多样,鉴定出了以前依赖传统培养方法未能在 BV 患者阴道内发现的菌种及一定比例的 Uncultured clone。同时发现在所有 BV 患者样本中均以 *Gardnerella vaginalis* 和 *Atopobium vaginae* 占优势,这与 Verhelst等^[12]的报道一致。*Gardnerella vaginalis* 和 *Atopobium vaginae* 在阴道内同时存在高度预示着 BV 的发生,同时检出这两种菌的妇女比仅检出 *Gardnerella vaginalis* 的妇女有更高的复发性 BV 发生率^[13]。*Atopobium vaginae* 是以前依赖传统培养方法未能发现的菌种,为严格厌氧的革兰氏阳性球菌,或呈短链的棒状杆菌,营养要求苛刻。Ferris等^[14]于2004年第一次报道了 *Atopobium vaginae* 与非正常阴道菌群的关系,该菌对甲硝唑高度耐药。Verstraelen等^[15]亦报道 *Atopobium vaginae* 在治疗无效或疗效不佳的患者阴道内浓度很高,而在治愈的患者阴道内浓度最低。因此, *Atopobium vaginae* 很可能造成了部分 BV 患者应用甲硝唑治疗无效的情况,很有必要对这一菌种的特性及其抗生素敏感性做进一步研究,为甲硝唑治疗无效的患者以及复发性 BV 的治疗提供帮助。

阴道内乳酸杆菌的减少或缺失是导致 BV 发生的主要原因。其复发也与没能重新建立乳酸杆菌占优势的阴道菌群状态相关。因此应用乳酸杆菌益生

菌治疗恢复阴道内乳酸杆菌的优势地位,已成为当今治疗 BV 以及预防 BV 复发的新策略。本研究发现 *L. iners* 是健康妇女阴道内的优势菌种之一,说明它在维护阴道健康状态方面发挥了重要作用。Reid等^[16]报道 *L. iners* 可以降低生殖道感染的风险,恢复或维持阴道的健康菌群状态。Ferris等^[17]运用非培养的方法分析甲硝唑治疗后 BV 患者阴道菌群的变化,发现在治疗有效的患者阴道内以 *L. iners* 为优势菌种。因此,可以考虑将 *L. iners* 作为益生菌的筛选菌株,有待于进一步临床试验来证实其益生菌的特性。

参考文献

- [1] Cohn JA, Hashemi FB, Camarca M, et al. HIV-inducing factor in cervicovaginal secretions is associated with bacterial vaginosis in HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, **39**: 340-346.
- [2] Koumans EH, Kendrick JS. Preventing adverse sequelae of bacterial vaginosis: a public health program and research agenda. *Sex Transm Dis*, 2001, **28**: 292-297.
- [3] Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4799-4807.
- [4] Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*. 1983, **74**: 14-22.
- [5] Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol*. 1983, **18**: 170-177.
- [6] Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*, 1999, **180**: 1950-1956.
- [7] Falsen E, Pascual C, Sjoden B, et al. Phenotypic and phylogenetic characterisation of a novel Lactobacillus species from human sources: description of Lactobacillus iners sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 217-221.
- [8] Vasquez A, Jakobsson T, Ahrne S. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**: 2746-2749.
- [9] Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 97-101.
- [10] Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, et al. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- using cultivation-independent methods. *Microbiology*, 2004, **150**: 2565–2573.
- [11] Kingsley C, Anukam KC, Osazuwa EO, *et al.* Lactobacillus vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sex Transm Dis*, 2006, **33**: 59–624.
- [12] Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, *et al.* Cloning of 16s rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol*, 2004, **21**: 4–16.
- [13] Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, *et al.* Detection of Atopobium vaginae in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**: 1829–1831.
- [14] Ferris MJ, Masztal A, Martin DH. Use of Species-Directed 16S rRNA Gene PCR Primers for Detection of Atopobium vaginae in Patients with Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**: 5892–5894.
- [15] Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G. Culture-independent analysis of vaginal microflora. The unrecognized association of Atopobium vaginae with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, **191**: 1130–1132.
- [16] Reid G, Burton J. Use of lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect*, 2002, **4**: 319–324.
- [17] Ferris MJ, Norori J, Zozaya-Hinchliffe M, *et al.* Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. *J Clin Microbiol*, 2007, **45**: 1016–1018.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依据提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,突出重点。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内,研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p. 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 璐等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp. 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008- - ; 接受日期: 2008- -

(下转 p. 102)