

· 论著 ·

16S rDNA测序分析妊娠期细菌性阴道病患者的阴道菌群结构组成*

孙秀丽 张 宁* 张新丽 王艳玲
濮阳市妇幼保健院妇产科 (河南 濮阳 457000)

【摘要】目的 本研究主要通过通过对健康孕妇与妊娠期细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)患者的阴道分泌物进行检测, 试图阐述不同孕期BV患者的阴道菌群组成。**方法** 选取在濮阳市妇幼保健院产科门诊诊断为妊娠期BV的孕早期患者15例、孕晚期患者24例及孕早期、孕晚期健康孕妇各30例。所有样本选择16S rDNA V3V4 可变区进行测序分析, 比较各组之间阴道微生物构成的差异。**结果** 孕早期健康孕妇组与孕早期BV组之间的 Alpha 多样性比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 孕晚期健康孕妇组与孕晚期BV组之间的 Alpha 多样性比较, 无显著统计学差异。共发现26个门, 各组均以厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门占主要比例。在属水平上, 共发现51个属,孕早期健康孕妇组相对丰度最高的是乳杆菌属(约占87%)。孕晚期健康孕妇组相对丰度最高的是乳杆菌属(约占97%)。BV患者乳杆菌明显减少, 阿托波菌属, 巨球形菌属, 普氏菌属, 需氧球菌属, 纤毛菌属明显增多。**结论** 健康孕妇阴道菌群以乳杆菌占绝对优势, 大部分以瑞士乳杆菌或惰性乳杆菌为主, 还存在普氏菌属, 双歧杆菌属, 链球菌属等差异菌属; 大部分BV患者阴道菌群表现为乳杆菌显著减少甚至缺失。

【关键词】 细菌性阴道病; 阴道菌群; 16S rDNA高通量测序; 妊娠
【中图分类号】 R714.15
【文献标识码】 A
【基金项目】 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20200815)
DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.10.025

16S rDNA Sequencing Analyzed the Structural Composition of the Vaginal Flora of Patients with Bacterial Vaginosis During Pregnancy*

SUN Xiu-li, ZHANG Ning*, ZHANG Xin-li, WANG Yan-ling.
Puyang Maternal and child health care Hospital obstetrics and gynecology, Puyang 457000, Henan Province, China

Abstract: Objective This study mainly examines the vaginal secretions of healthy pregnant women and patients with bacterial vaginosis (bacterial vaginosis, BV) in pregnancy, and tries to explain the vaginal flora composition of different pregnant BV patients. **Methods** 15 patients in early pregnancy, 24 patients in late pregnancy and 30 healthy pregnant women in early pregnancy were selected in the obstetric clinic of Puyang Maternal and Child Health Hospital. For all samples, the 16S rDNA V3V4 variable region was selected for sequencing analysis to compare the differences in vaginal microbial composition between the groups. **Results** The Alpha diversity comparison between healthy pregnant women and BV group was statistically significant ($P<0.05$), and there was no significant statistical difference in Alpha diversity comparison between healthy pregnant women and BV group. A total of 26 phyla were found, including Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes. At the genus level, 51 genera were found, and the highest relative abundance of the early pregnancy healthy pregnant women group was Lactobacillus (about 87%). The highest relative abundance in late trimester healthy pregnant women was Lactobacillus (about 97%). BV patients significantly decreased lactobacillus, atorbol genus, macrococcus, Prevotella, oxycoccus, and ciliella. **Conclusion** The vaginal flora of healthy pregnant women is absolutely dominant, most of them are L. suiss or Lactobacillus inert, including Prevotella, Bifidobacterium and Streptococcus; most BV patients' vaginal flora is significantly reduced or even absent.

Keywords: Bacterial Vaginosis; Vaginal Flora; 16S rDNA High-throughput Sequencing; Pregnancy

妊娠期女性, 由于其处在特殊的生理时期, 机体抵御微生物的能力下降及体内激素水平波动幅度较大, 阴道微环境容易发生菌群比例失调, 导致生殖道炎症改变, 增加不良妊娠结局的发生, 严重影响母婴健康^[1-3]。妊娠期细菌性阴道病对妊娠结局的影响较大, 且大多属于无症状感染, 增加了孕期管理的难度。阴道微环境中寄居着大量的厌氧菌, 且培养困难, 通过传统的培养学方法很难准确呈现妊娠期女性的阴道微生态及(或)生殖道感染等病理状态。随着现代分子生物学技术的不断升级, 尤其是高通量测序技术的广泛应用, 使微生物组学的研究更加全面、更加清晰^[4]。本研究基于 16S rDNA 测序技术, 试图对妊娠期细菌性阴道病患者与健康孕妇阴道菌群结构进行描述和分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象及入组标准 本实验由濮阳市妇幼保健院伦理委员会审核并批准同意开展。所有入选病例均按照首次确诊为妊娠期细菌性阴道病时的孕周划分为早孕、晚孕组。其中早孕组为孕 5-13周, 晚孕组为大于28周。

1.2 妊娠期BV组 选取在濮阳市妇幼保健院产科门诊诊断为妊娠

期细菌性阴道病的孕早期(BE)患者15例、孕晚期(BL)患者24例, 年龄在20-40岁之间。临床症状主要表现为白带增多伴腥臭味, 根据临床诊断(Amsel 标准)在以下 4 项临床特征中至少三项阳性诊断为 BV, 其中第一项必备: ① 线索细胞阳性, ② 氨试验阳性, ③ 阴道 pH>4.5, ④ 阴道均质稀薄的分泌物^[5]。

1.3 健康孕妇组 选取同时期在本院产科门诊进行孕期检查的健康孕妇, 孕早期组(CE)、孕晚期组(CL)各30例, 年龄在20-40岁之间。详细询问病史及用药史、阴道分泌物Nugent评分等。入组标准需要同时满足: ①无临床症状; ②阴道清洁度分级为I~II级; ③Nugent 评分 0~3分。两组均选取我国汉族人, 并同时满足以下条件: 孕妇1月内未使用抗菌素及阴道局部用药, 3d内无性生活史, 无糖尿病, 无同时患有滴虫性、霉菌性阴道炎或其它阴道炎^[5]。

2 方 法

2.1 样本采集 为了避免标本污染, 可先排尽尿液。检查并记录外阴、阴道壁、宫颈黏膜有无充血、水肿、斑点等, 阴道分泌物的颜色、性状、量及有无异味。用3根无菌棉签于阴道上1/3及后穹隆采集分泌物, 迅速放入无菌棉式子管内, 置于冰盒后转运至实

【第一作者】孙秀丽, 女, 妇产科主任医师, 主要研究方向: 不良妊娠结局的相关因素研究。E-mail: yxpyfy@163.com
【通讯作者】张 宁, 女, 主管技师, 主要研究方向: 妊娠期阴道病对妊娠结局的影响。E-mail: 605576458@qq.com

实验室，立即放在冰上进行标记。1根加滴生理盐水行涂片染色检查；2根放入-80℃冰箱冷冻暂存，用来抽提基因组DNA并测序。孕早期健康对照组女性阴道分泌物样本编号为CE-01、CE-02、……CE-30；孕晚期健康对照组女性阴道分泌物样本编号为CL-01、CL-02、……CL-30。共采集39例妊娠期BV患者的阴道分泌物：其中，孕早期(孕12周以前)BV为15例，标记为BE，阴道分泌物样本编号为BE-01、BE-02、……BE-15。孕晚期(孕28周以上)BV为24例，标记为BL。阴道分泌物样本编号为BL-1、BL-2……BL-24。

2.2 样本总DNA的提取 取上述所有样本，使用 The PowerSoil® DNAsoilition kit(美国 MOBIO)进行 DNA 抽提，操作步骤严格按照试剂说明书进行。提取后的基因组DNA 用 Nanodrop 2000 进行浓度及纯度的测定，各样本基因组 DNA 浓度 $\geq 20.0\text{ng}/\mu\text{L}$ ，OD260/OD280=1.8~2.0。经1%琼脂糖凝胶电泳检测后于一20℃冷冻保存备用。

2.3 16S rDNA V3V4区基因扩增及Illumina测序 将上述样本的基因组总DNA进行16S rDNA基因测序分析。选择细菌 16SrDNA V3V4 可变区进行PCR扩增，所用引物 F:ACTCTACGGGAGGCAGCA R:GGACTACHVGGGTWCTAAT。送上海派森诺生物技术股份有限公司，采用Illumina MiSeq的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit测序平台进行测序分析。上机测序前，样本逐一质检，只有单一的峰无接头且浓度在2nM以上视为达标。测序原始数据经过滤低质量数据、剪接引物和载体序列，获得分析序列与16S rDNA数据库中的序列配对。20 μL PCR反应液体系(包括DNA模板2 μL ，上、下游引物定量为2 pmol/ μL ，2 $\times$ pfu PCR MasterMix 5 μL ，6 $\times$ DNA Loading buffer 5 μL ，灭菌ddH₂O补足体积，每个样品设2个重复)，扩增反应在ABI GeneAmp@9700型PCR仪上进行，程序步骤如下：①95℃预变性3 min，循环1次；②95℃反应30 s，55℃退火30 S，72℃延伸45 S，共27个循环；③保持72℃延伸10 min结束。利用天根琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京)对PCR产物进行切胶回收，回收后的PCR产物利用ABI StepOne(ABI, USA)荧光定量分析平台进行定量检测，根据每个样品的测序量要求，按照合适的比例进行混合。

2.4 MiSeq文库构建与16S rDNA V3V4可变区高通量测序 根据Illumina MiSeq平台标准操作流程将纯化后的PCR扩增片段进行文库构建。采用 Illumina MiSeq 的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 测序平台进行测序分析。测序原始数据经过滤低质量数据、剪接引物和载体序列，去除嵌合体等疑问序列，获得分析序列与16S rDNA 数据库中的序列配对。

2.5 数据分析 优化去除含N碱基的reads、无法拼接的序列及存在模糊碱基的序列，即为clean reads。对获得的序列进行可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)归并划分，每个OTU的代表序列用于微生物的物种鉴定及分类地位鉴定分析；根据OTU在各个样本中的丰度差异，评估每个样本的微生物多样性分布特征；通过Alpha多样性、Beta多样性以及物种差异等多种多变量统计学分析方法，进一步比较不同样本(组)间的菌群分布特征。

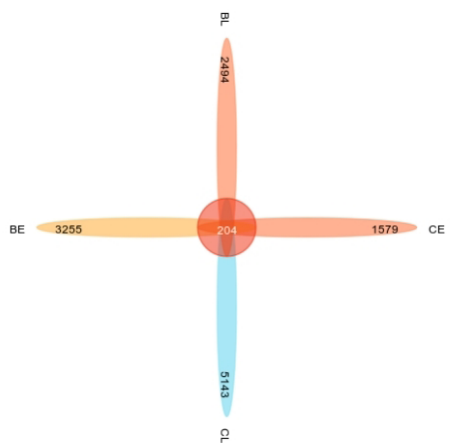
2.6 统计分析 采用R软件进行统计学分析；计数资料采用(%)表示； α 多样性采用Kruskal-Wallis检验进行比较分析，使用LEfSe (linear discriminant analysis effect size)^[6]分析组间具有显著差异的标志物种。

3 结果

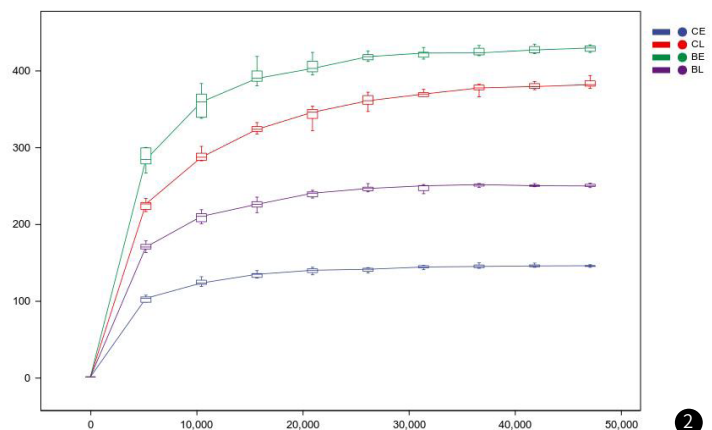
3.1 测序结果 共完成99个样品测序，获得8 927 795条Reads，平均每个样品为90 179条Reads，最少的样本为49 555条Reads。QIIME2软件注释结果显示，在CE组、CL组、BE组、BL组分别鉴定出独有的OTUs 1579条、5143条、3255条、2494条OTUs，其中共有的OTUs为204条。见图1。

3.2 细菌Alpha多样性分析 随着测序深度的增加，各分组中的菌群OTU曲线趋于平稳，反映该测序深度较合理，可以反映当前样本所包含的菌群组成多样性。见图2。CE组与BE组之间的Alpha多样性比较，差异有统计学意义($p < 0.05$)，CL组与BL组之间的Alpha多样性比较，无显著统计学差异。见图3~图4。

3.3 物种注释结果 在门水平上，共发现26个门，CE组、BE组、CL组、BL组均以厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)占主要比例，分别位列前三位，见图5。在属水平上，共发现51个属，见图6。CE组占比超过0.5%的主要属，依次为乳杆菌属(Lactobacillus) 87.34%，加德纳菌属(Gardnerella) 4.8%，阿托波菌属(Atopobium) 4.06%，链球菌属(Streptococcus) 1.64%，双歧杆菌属(Bifidobacterium) 0.64%，普氏菌属(Prevotella) 0.52%。CL组依次为乳杆菌属88.44%，加德纳菌属4.46%，双歧杆菌属1.73%，普氏菌属0.42%，阿托波菌属0.69%。BE组依次为乳杆菌属44.13%，加德纳菌属29.18%，阿托波菌属10.1%，普氏菌属6.3%，梭氏菌属(Shuttleworthia) 3.33%，巨球形菌属(Megasphaera) 2.27%，需氧球菌属(Aerococcus) 0.82%，梭状芽孢杆菌属0.52%。BL组依次为乳杆菌属60.23%，加德纳菌属25.62%，阿托波菌属8.29%，巨球形菌属1.54%，普氏菌属1.46%，需氧球菌属0.52%。

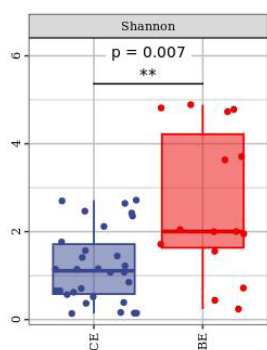


①

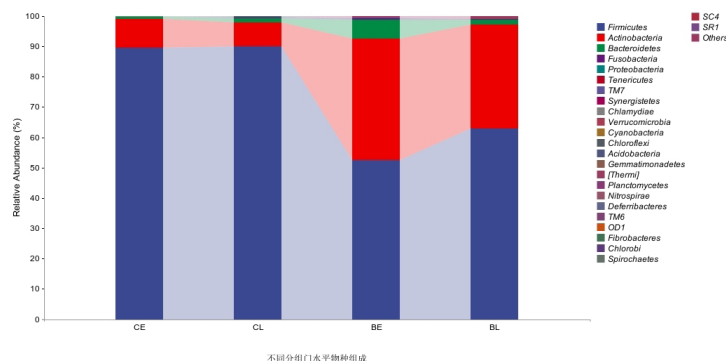


②

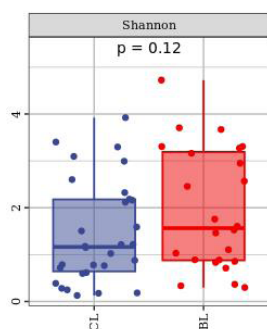
图1 不同组间 OTUs 的韦恩图。图2 不同分组的稀释曲线图。



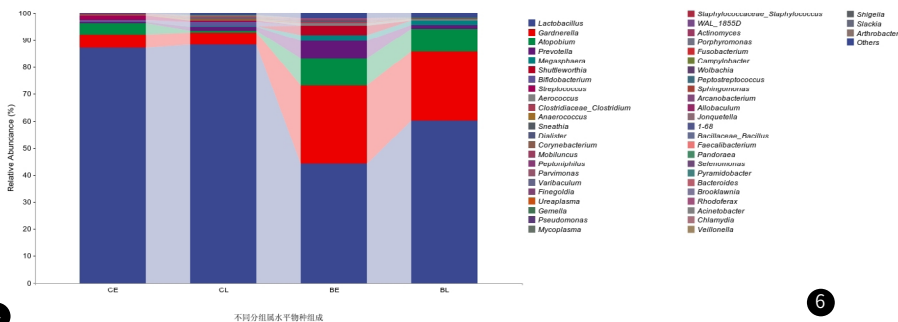
3



5



4



6

图3 CE、BE组的Alpha多样性(Shannon指数)分布。图4 CL、BL组的Alpha多样性(Shannon指数)分布。图5不同分组的细菌门水平物种组成。图6 不同分组的细菌属水平物种组成。

4 讨论

妊娠期女性由于雌激素水平的改变,阴道上皮细胞内糖原含量增加明显,阴道微生物以乳杆菌为主,乳杆菌分解糖原后乳酸大量积聚,菌群多样性下降、代谢能力简化,维持着阴道的低pH和低多样性的菌群稳态,对感染更具抵抗力,有利于母体及婴儿健康,但菌群结构特征具有种族差异性^[7-8]。本研究通过 16S rDNA 测序分析发现,在妊娠期 BV患者的阴道微生物构成中,细菌门水平以厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门为主要优势菌门,属水平占比最大的是乳杆菌属。乳杆菌属在生物分类中归类于厚壁菌门乳杆菌科,研究发现,多个乳杆菌种均在维持阴道微生态方面发挥了重要的作用^[9],乳杆菌属有很好的抑制生长能力,在阴道内与阴道上皮细胞的粘附可阻止病原菌在阴道内的定植^[10]。近年来研究表明,惰性乳杆菌不仅是主要阴道乳杆菌,而且可能是优势菌^[6]。它能够持续生存于阴道中,包括在健康女性和 BV 的微环境下。多数研究人员认为,惰性乳杆菌作为阴道微生态紊乱后定植在阴道内的过渡物种,不仅无法维持阴道微生态的平衡,可能会导致阴道菌群失衡的持续存在,甚至是引起不良妊娠结局的相关危险因素之一^[11]。

虽然多数学者认为,乳杆菌可以调节酸碱度,使阴道局部呈弱酸环境而抑制或杀灭其他致病微生物,同时通过竞争定植空间,阻止致病微生物的大量繁殖,保持阴道微生境的健康状态。但本实验结果表明,以加德纳菌、阴道阿托波菌、短双歧杆菌等为优势菌的10例孕妇的阴道pH水平亦可以稳定在正常范围。

BV患者由于妊娠引起免疫力降低,阴道内优势乳杆菌数量显著减少,易发生致病微生物的侵犯。本研究发现,BV患者阴道菌群组成及比例发生了明显变化,大部分患者的乳杆菌明显减少,加德纳菌属,阿托波菌属,巨球型菌属,普氏菌属,需氧球菌属,纤毛菌属的比例明显增多。这些细菌丰度的改变可能与妊娠细菌

性阴道病的发生、发展以及预后相关。本研究结果与相关报道存在一定差异,具体的影响因素有待进一步探究。

参考文献

- [1] Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, et al. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reprod Sci*, 2014; 21(1): 32-40.
- [2] 李凌. 胎膜早破相关性因素以及对妊娠结局的影响研究[J]. 罕少疾病杂志, 2018, 25(2): 3.
- [3] 陈俊玲. 孕晚期孕妇B群无乳链球菌感染情况及耐药性分析[J]. 罕少疾病杂志, 2019, 26(6): 3.
- [4] Zhou HW, Li DF, Tam NF, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. *ISME J*, 2011; 5(4): 741-749.
- [5] 张宁, 韩阳, 骆菲, 等. 运用实时定量PCR和16SrDNA测序法分析女性阴道菌群的结果比较[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2018, 38(1): 5.
- [6] Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-rna-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome*. 2013; 1(1): 12. Published 2013 Apr 12.
- [7] Witkin SS, Linhares IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota?. *BJOG*. 2017; 124(4): 606-611.
- [8] Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertil Steril*. 2015; 104(6): 1351-1357.
- [9] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 Suppl 1(Suppl 1): 4680-4687.
- [10] 陈佳宁, 吕志, 苏建荣, 等. 乳酸杆菌与细菌性阴道病相关致病菌之间的关系[J]. 首都医科大学学报, 2013, 34(4): 535-539.
- [11] Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, et al. Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. *Sci Rep*. 2014; 4: 5136. Published 2014 May 30.

(收稿日期: 2023-04-25)
(校对编辑: 姚丽娜)