

Dat System Rev, 2013, 10(7): 7545.

(6): 579-585.

[30] Dooley KE, Nuermberger EL, Diacon AH. Pipeline of drugs for related diseases: tuberculosis[J]. Curr Opin HIV AIDS, 2013, 8

(收稿日期: 2015-08-11)

• 综 述 •

阴道正常菌群构成及其影响因素的研究进展

马立艳 综述, 孙 伟 审校

(首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心, 北京 100050)

关键词: 阴道菌群; 菌群构成; 激素水平; 避孕方式

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 24. 038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)24-3599-03

人体的体表与开放腔道内分布着大量与人体共生的正常菌群, 它们与宿主、环境之间构成了相互制约、相互协调、动态的微生物生态平衡, 不仅有助于人体消化、吸收营养物质、能量供应、脂肪代谢、免疫调节和生物拮抗, 而且在人体抵御致病菌或条件致病菌等方面也发挥着重要的作用。19 世纪晚期, “微生物之父” 安东· 范· 列文虎克在观察牙齿上的生物膜时首次发现了口腔菌群的存在, 从此展开了以细菌培养为基础的传统微生物生态学研究。但是, 由于宿主微生态环境中存在着众多的不可培养细菌, 限制了人们对微生物生态菌群构成与疾病发生发展关系的认识。始于 2007 年的人类基因组计划将现代分子生物学技术引入人体微生物生态菌群研究中, 使微生物生态菌群构成及其功能的研究得到了前所未有的突破性进展, 阴道微生物生态研究即为其中之一^[1-3]。本文拟就女性阴道正常菌群构成及其影响因素进行综述, 以期明确阴道菌群在女性生殖道健康中的作用。

1 阴道正常菌群构成

在传统微生物生态研究中, 研究人员通过对阴道分泌物进行细菌培养发现阴道内以乳酸杆菌, 尤其是产过氧化氢的乳酸杆菌, 为优势菌群在阴道黏膜表面形成一道天然屏障, 维持阴道微生物生态环境的稳定。乳酸杆菌占健康妇女阴道全部微生物数量的 75%~95%, 通过定植抗力、生物拮抗、产酸、产过氧化氢(H₂O₂)、刺激机体免疫防御等作用在维持女性阴道“自净”功能方面发挥着重要的作用。雌激素刺激阴道上皮细胞增殖, 产生大量糖原, 乳酸杆菌分解糖原生成乳酸和其他有机酸, 使阴道 pH 降至 3.7~4.5, 维持阴道内特征性酸性环境。过氧化氢的产生可抑制厌氧菌和阴道加德纳菌等潜在致病菌的生长, 有效避免阴道菌群失调。研究表明, 乳酸杆菌在预防细菌性阴道病(BV)、获得性免疫缺陷病毒(HIV)感染中发挥着重要的作用。但是, 单纯依赖传统培养方法一方面高估了乳酸杆菌在阴道菌群中的地位, 另一方面却低估了苛养菌在阴道菌群中的分布。随着分子生物学技术在微生物研究中的广泛应用, 研究人员意识到并非所有的乳酸杆菌都是阴道微生物屏障的有益成分, 不同种类的乳酸杆菌在妇女生殖健康中发挥着不同的作用。

1892 年, Albert Doderlein 从健康妊娠妇女阴道内首次培养分离到一种产生乳酸的革兰阳性菌, 在体内和体外均可抑制致病菌的生长。直到 1928 年, Stanley Thomas 才通过生化反应将其命名为嗜酸乳杆菌。但是, 研究人员在之后的工作中发

现收集的嗜酸乳杆菌存在高度异质性, 不能用生化反应进行区分。直到 1980 年, 借助于分子技术才将该嗜酸乳杆菌复合体按照核酸序列不同分为不同的种类, 包括卷曲乳酸杆菌、詹氏乳酸杆菌、加氏乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌等。2002 年, 嗜性乳酸杆菌首次从一位健康育龄期妇女的阴道分泌物中分离, 该菌不能在常规使用的 MRS 和 Rogosa 培养基上生长, 只能用哥伦比亚血平板培养或应用分子技术从分泌物中直接检测。与卷曲乳酸杆菌不同, 嗜性乳酸杆菌在健康人和 BV 患者中均可检出, 尤其是在 BV 患者中可大量存在^[4-5]。因此, 推测嗜性乳酸杆菌可能更适于在 pH 升高、多微生物的厌氧环境中生长, 当阴道菌群以嗜性乳酸杆菌为优势菌群时, 更易发生 BV。

基于 16S rDNA 的变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳(PCR-TGGE/DGGE)、基因克隆文库、末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)、实时定量 PCR、基因芯片和荧光原位杂交(FISH)等分子生物学技术为阴道菌群的研究展开了新篇章^[6-9]。目前, 应用分子技术已从阴道分泌物中鉴定出 20 多种乳酸杆菌。研究证实, 正常阴道菌群并非由多种乳酸杆菌共同构成, 而是以卷曲乳酸杆菌、嗜性乳酸杆菌、詹氏乳酸杆菌和加氏乳酸杆菌中的 1~2 种为主^[10-12]。在一项对瑞典健康育龄期妇女阴道乳酸杆菌的研究中, 18/23 妇女阴道菌群以 1 种乳酸杆菌(包括卷曲乳酸杆菌、嗜性乳酸杆菌、詹氏乳酸杆菌或加氏乳酸杆菌)为优势菌, 5/23 妇女阴道内定植 2 种乳酸杆菌。研究表明, 阴道卷曲乳酸杆菌可以竞争性排斥其他细菌在阴道内的定植^[13]。

不同种乳酸杆菌产过氧化氢的能力也不相同, 产过氧化氢乳酸杆菌数量减少与细菌性阴道病和阴道感染性疾病的发生密切相关。在日本健康妇女阴道中, 卷曲乳酸杆菌和加氏乳酸杆菌的检出率分别为 52.7% 和 20.8%, 未检测到詹氏乳酸杆菌。该研究中, 100% 卷曲乳酸杆菌产过氧化氢, 是产过氧化氢能力最强的乳酸杆菌, 而 41% 加氏乳酸杆菌产过氧化氢试验强阳性, 59% 加氏乳酸杆菌产过氧化氢试验弱阳性。有研究者检测卷曲乳酸杆菌的检出率为 32%, 加氏乳酸杆菌的检出率为 23%, 其中, 95% 的卷曲乳酸杆菌和 94% 的加氏乳酸杆菌产过氧化氢。与之相比, 詹氏乳酸杆菌检出率为 5%, 嗜性乳酸杆菌的检出率为 15%, 其中只有 71% 的詹氏乳酸杆菌和 9% 的嗜性乳酸杆菌产过氧化氢。与之相应, 以卷曲乳酸杆菌和加氏乳酸杆菌为优势菌的妇女中细菌性阴道病的发生率分别为

9%和7%,以詹氏乳酸杆菌和惰性乳酸杆菌为优势菌的妇女中细菌性阴道病的发生率则分别高达43%和36%。而在健康人中,16%未检测到乳酸杆菌,以卷曲乳酸杆菌和加氏乳酸杆菌为优势菌的妇女无一发生细菌性阴道病。有研究者应用培养法发现100%的詹氏乳酸杆菌产过氧化氢,而某研究中仅有46%的詹氏乳酸杆菌产过氧化氢,研究结果的不同可能与上述研究仅用生化试验对乳酸杆菌属进行种的鉴定有关^[14]。多个流行病学研究发现,阴道内产过氧化氢乳酸杆菌的定植与生殖道感染性疾病,包括细菌性阴道病和HIV感染的发生率降低密切相关^[14]。然而,近期两项研究表明,乳酸杆菌在体内产生过氧化氢的浓度并不能有效抑制潜在致病菌的生长^[14-15]。尽管可以在体外检测到乳酸杆菌产生过氧化氢,但在阴道内微需氧或厌氧环境下乳酸杆菌能够产生多少过氧化氢尚未可知。因此,在体内阴道环境中过氧化氢的抗菌效应目前尚存在争议。

在健康妇女阴道菌群分析中,约7%~33%的妇女缺失阴道乳酸杆菌,而是由其他可产生乳酸的细菌如阴道阿托波菌、巨球菌属或纤毛菌属替代^[15]。因此,笔者推测即使阴道微生态菌群结构发生变化,但是只要菌群功能未变,机体仍维持健康状态。需要注意的是,上述研究并未注明健康人群中是否有症状BV、阴道菌群是否处于过渡状态等。

2 阴道菌群影响因素分析

阴道菌群并非一个静态的微生物系统,而是一个受体内激素水平、避孕方式、性行为、种族、个人卫生习惯和饮食习惯等影响,而时时刻刻发生着变化的动态系统。

2.1 避孕方式不同对阴道菌群的影响 在过去的二十年间,国外一些横断面研究和前瞻性研究发现,药物避孕能够维持阴道内乳酸杆菌为优势菌的正常菌群结构,可以很好地预防细菌性阴道病的发生^[16-19]。Sate等^[16]在对激素避孕与阴道菌群关系的一项前瞻性比较研究中提出,与使用阴道环同时口服避孕药(COC)相比,使用释放雌激素和孕激素的阴道避孕环(CCVR)更能促进乳酸杆菌在阴道内的定植,有利于维持阴道内微生态环境稳态。然而,在一项前瞻性队列研究中,Heffron等^[20]认为药物避孕增加了妇女感染HIV的风险。安全套是一种方便、有效、可逆的避孕方式,坚持正确使用安全套,可有效减少革兰阴性厌氧杆菌在阴道内的定植,降低细菌性阴道病的发生。此外,安全套还可防止性生活时pH值7.0~8.0的精子进入阴道,避免阴道内酸性缓冲体系遭到破坏。与安全期法相比,使用安全套可减少育龄期妇女非意愿妊娠的发生,继而减少流产等侵入性操作对阴道内微生态环境的破坏。有研究人员认为细菌性阴道病的发生与安全套使用呈负相关,与宫内节育器使用呈正相关。宫内节育器是一种长效、可逆的避孕方式,研究表明,留置含药或不含药宫内节育器的妇女盆腔炎、宫颈糜烂、细菌性阴道病的罹患率明显增加,阴道分泌物涂片Nugent评分增高^[21-22],提示此方法使阴道内环境稳态更脆弱、更易失衡。

2.2 激素水平对阴道菌群的影响 育龄期妇女雌激素水平正常,阴道壁上皮富含糖元,易于乳酸杆菌的定植和繁殖。通常情况下,育龄期妇女阴道乳酸杆菌随着月经周期变化存在着生理性的周期效应。有研究者应用荧光实时定量PCR方法动态研究了卷曲乳酸杆菌、惰性乳酸杆菌、阴道阿托波菌、阴道加德纳菌和普雷沃菌在月经周期中的变化,结果发现在Nugent评

分0~3分的健康组中,卷曲乳酸杆菌在整个月经周期持续存在,但与排卵前期、排卵后期相比,其数量在行经期下降约100倍。与之相反,惰性乳酸杆菌、阴道阿托波菌、阴道加德纳菌和普雷沃菌的数量在行经期却有所增加^[23]。也有研究同样提示,与排卵前期和排卵后期相比,行经期的阴道菌群处于不稳定状态,更易发生菌群失调。妊娠期由于激素水平改变导致阴道菌群也随之发生改变,与非妊娠人群相比,妊娠妇女中乳酸杆菌的相对丰度有所降低,而阴道加德纳菌和厌氧菌数量增多,孕妇易发生阴道感染性疾病,尤其是妊娠期细菌性阴道病发生率逐年上升,复发率高,可导致多种不良妊娠结局。

绝经期妇女由于卵巢功能衰退,雌激素水平降低,使得阴道上皮变薄,糖原水平降低,利用糖原生成乳酸的量亦减少,使乳酸杆菌的定植和繁殖受到限制,阴道pH上升,抵抗力显著减弱,易导致菌群失调的发生。乳酸杆菌的检出率和数量在绝经期极度下降,甚至在绝经后期消失。虽然对于绝经期妇女来说,这是一种正常的非致病状态,但该阶段的阴道菌群是极其脆弱的,容易受到体内外因素的影响而引起疾病的发生。

2.3 地区、种族差异对阴道菌群的影响 不同地区、不同种族人群的阴道菌群构成存在明显差异,这可能与遗传因素、生产方式、个人卫生习惯、性生活频次、环境因素等有关。在大多数人群中,卷曲乳酸杆菌是最常见的阴道优势菌群,其中,白种人以卷曲乳酸杆菌和/或加氏乳酸杆菌为主。有研究者对来自美国北部的396例无症状育龄期女性(白种人98例,黑种人104例,亚裔97例,西班牙裔97例)应用PCR扩增16S rDNA的V1-V3区后采用焦磷酸测序的方法进行阴道菌群分析,结果显示,所有受试者中阴道菌群明显分为5群:其中1~4群以卷曲乳酸杆菌、惰性乳酸杆菌、加氏乳酸杆菌和詹氏乳酸杆菌为优势菌群,而第5群中乳酸杆菌比例降低、厌氧菌所占比例大幅上升。1~4群在白种人、亚裔、黑种人和西班牙裔的检出率分别为89.7%、80.2%、61.9%和59.6%,第5群在上述人群中的检出率则分别为9.3%、17.6%、38.9%和34%。因此,对于不同种族的人群而言,如何定义正常阴道菌群尚有待探讨。

2.4 个人卫生习惯与饮食习惯对阴道菌群的影响 在美国,约1/3的妇女常规进行阴道冲洗。但是,研究人员发现,阴道冲洗会减少产过氧化氢乳酸杆菌在阴道内的定植,使阴道正常菌群被厌氧菌所替代。与不进行阴道冲洗的妇女相比,阴道冲洗后BV发生率上升1.2~5.1倍。此外,饮食习惯也可能对阴道菌群产生影响。在Marie等^[24]的研究中,天然营养丰富的食品和含糖量高的食品均可改变妇女阴道菌群构成,前者与BV的发生呈负相关,后者与BV的发生呈正相关。

3 小结

总之,过去的10年间随着分子技术的应用,阴道菌群的构成逐渐清晰、完整。但是,进一步的工作不仅限于此,重点应转移至阴道菌群的功能研究上。基因组学、转录组学、蛋白组学以及与传统培养方法的有机结合,将有助于对阴道微生态结构和功能、与宿主相互作用等方面的研究,从而推动感染微生物学的发展。

参考文献

- [1] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology - Human gut microbes associated with obesity [J]. *Nature*, 2006, 444 (7122): 1022-1023.

- [2] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [3] Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH human microbiome project[J]. *Genome Res*, 2009, 19(12): 2317-2323.
- [4] Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(18): 1899-1911.
- [5] Thies FL, König W, König B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting[J]. *J Med Microbiol*, 2007(56): 755-761.
- [6] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [7] Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(5): 1812-1819.
- [8] Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12078.
- [9] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [10] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.
- [11] Shi Y, Chen LQ, Tong JQ, et al. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods[J]. *J Obstet and Gyna Res*, 2009, 35(3): 525-532.
- [12] Vitali B, Pugliese C, Biagi E, et al. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(18): 5731-5741.
- [13] Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, et al. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women[J]. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2009, 22(1): 11-18.
- [14] O'Hanlon DE, Lanier BR, Moench TR, et al. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli [J]. *BMC infectious diseases*, 2010, 10(3): 120.
- [15] O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide[J]. *BMC infectious diseases*, 2011, 11(1): 200.
- [16] Seta DF, Restaino S, De Santo DA, et al. Effects of hormonal contraception on vaginal flora[J]. *Contraception*, 2012, 86(5): 526-529.
- [17] Bradshaw CS, Walker J, Fairley CK, et al. Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young Australian women[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57688.
- [18] Rifkin SB, Smith MR, Brotman RM, et al. Hormonal contraception and risk of bacterial vaginosis diagnosis in an observational study of women attending STD clinics in Baltimore, MD[J]. *Contraception*, 2009, 80(1): 63-67.
- [19] Guedou FA, Van Damme L, Deese J, et al. Intermediate vaginal flora and bacterial vaginosis are associated with the same factors: findings from an exploratory analysis among female sex workers in Africa and India[J]. *Sex Transm Infect*, 2014, 90(2): 161-164.
- [20] Heffron R, Donnell D, Rees H, et al. Use of hormonal contraceptives and risk of HIV-1 transmission: a prospective cohort study [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2012, 12(1): 19-26.
- [21] Madden T, Grentzer JM, Secura GM, et al. Risk of bacterial vaginosis in users of the intrauterine device: a longitudinal study[J]. *Sex Transm Dis*, 2012, 39(3): 217-222.
- [22] Donders GG, Berger J, Heuninckx HA, et al. Vaginal flora changes on Pap smears after insertion of levonorgestrel-releasing intrauterine device[J]. *Contraception*, 2011, 83(4): 352-356.
- [23] Santiago GL, Tency I, Verstraelen H, et al. Longitudinal qPCR study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina[J]. *PLoS one* 2012, 7(9): e45281.
- [24] Marie ET, Klebanoff MA, Alisha JR, et al. Bacterial vaginosis is associated with variation in dietary indices [J]. *J Nutr*, 2011(141): 1698-1704.

(收稿日期: 2015-08-21)

• 综 述 •

MicroRNA 在肝纤维化中的研究进展*

张春燕 综述, 田亚平 审校

(中国人民解放军总医院生化科/转化医学中心, 北京 100039)

关键词: 肝纤维化; 肝星状细胞; microRNA; 转化生长因子-β

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 24. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)24-3601-04

肝纤维化是肝内弥漫性细胞外基质(ECM) 过度沉积的病理过程, 是多数慢性肝病发展至最后的共同通路, 又是肝病进

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81501821)。 作者简介: 张春燕, 女, 检验技师, 主要从事分子诊断学工作。