

[20] Seghatchian J, Krailadsiri P. Platelet storage lesion and apoptosis; are they related? [J]. Transfus Apher Sci, 2001, 24(1):103-105.

[21] Glenister KM, Payne KA, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage[J]. Transfusion, 2007, 48(1):99-107.

[22] Thon JN, Schubert P, Duguay M, et al. Comprehensive proteomic analysis of protein changes during platelet storage requires complementary proteomic approaches [J]. Transfusion, 2008, 48(3):425-435.

[23] Thon JN, Devine DV. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets[J]. Transfusion, 2007, 47(12):2260-2270.

[24] Dale GL. Coated-platelets; an emerging component of the procoagulant response[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(10):2185-2192.

[25] Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, et al. Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly[J]. J Biol Chem, 2004, 279(47):48983-48992.

[26] Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(1):13-19.

[27] Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, et al. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(4):1419-1432.

[28] Schubert P, Thon JN, Walsh GM, et al. A signaling pathway contributing to platelet storage lesion development; targeting PI3-kinase-dependent Rap1 activation slows storage-induced platelet deterioration [J]. Transfusion, 2009, 49(9):1944-1955.

[29] Canault M, Duerschmied D, Brill A, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation during platelet storage; consequences for platelet recovery and hemostatic function in vivo[J]. Blood, 2010, 115(9):1835-1842.

(收稿日期:2017-04-02 修回日期:2017-06-02)

• 综 述 •

高通量测序时代的阴道微生物菌群的组成与维护*

李 晴¹, 汪艳珠¹, 刘宸好², 李 华³ 综述, 黄卓敏^{1△} 审校

(1. 深圳市妇幼保健院福强妇科子宫颈疾病诊治中心, 广东深圳 518048; 2. 爱默里大学, 美国乔治亚亚特兰大 30322; 3. 华谱蛋白质系统科技(深圳)有限责任公司, 广东深圳 518000)

关键词: 阴道微生物群; 乳杆菌; 细菌性阴道病; 性传播感染; 益生菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)18-2584-05

大量的微生物定居人体,称为人类微生物群;人类微生物群组是指寄居在人体内的微生物种类及其基因与基因组的总和。这个具有丰富生态信息的概念,描述了人类与微生物之间相互影响的关系。随着检测手段的变化和技术设备的发展,过去鉴定细菌需要培养、分离、染色后显微镜观察,现在则是利用高通量测序技术,建立人类微生物群组数据库^[1-2]。过去科学家们只能独立看待微生物的存在,而现在懂得宿主遗传、环境、饮食、免疫等许多因素与人体微生物相互作用,从而影响人体健康和疾病^[3-6]。

阴道内广泛定植的微生物称阴道微生物群(VMB)。阴道是女性生殖系统的门户,结构化微生物群落发展的重要栖息地;阴道是结构化微生物群落发展的重要栖息地,作为能抵抗导致泌尿生殖和性传播疾病(STD)病原体进入的门户,VMB已被认为参与保护宿主免受各种细菌、真菌和病毒感染的重要屏障。VMB是参与保护宿主免受各种细菌、真菌和病毒感染的重要屏障。母亲 VMB 的种类,在新生儿的皮肤、肠道、尿道、阴道等菌群初始定植中起着至关重要的作用,直接建立和发展新生儿健康的肠道和皮肤的微生物群。健康的 VMB 主要由乳杆菌属物种支配,可作为评估人体健康和疾病的重要生物标志物。因此,研究阴道微生物种类和功能,对女性疾病特别是肿瘤的影响意义重大。

1 VMB 素描

利用细菌菌落的 16S rRNA 的 Sanger 测序,16S rRNA 的末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)法,荧光定量 qPCR 法和新一代高通量测序(NGS)等技术方法研究阴道微生物的当代统称为高通量测序时代。Verhelst 等^[7]通过革兰染色,鉴定许多不同等级的菌群类型,并进行了 VMB 组的分类,同时进行了 16S rRNA 基因 DNA 测序,开创了测序方法研究阴道微生物的新时代。Hummelen 等^[8]报道,使用基于 Illumina 的 16S rRNA 基因的 V6 区的扩增子测序,在坦桑尼亚妇女中测定存在 8 个主要微生物簇,2 个与正常微生物群相关。Ravel 等^[9]使用 16S rRNA 基因的 V1~V2 高变区的焦磷酸测序方法,在白人、黑人、西班牙裔和北美亚裔妇女中分离出 5 个主要微生物群落。Smith 等^[10]从宫颈部观测到 6 个不同的微生物菌群类型,其中群集 I~IV 类与 Ravel 等^[9]的提出的阴道群落类型相似。Srinivasan 等^[11]利用 16S rRNA 基因 PCR 和焦磷酸测序观察到,没有细菌性阴道病(BV)的妇女,VMB 群落主要由卷曲乳杆菌或惰性乳杆菌主导。由于所用的技术、测序深度、每种类型的样本数目所做的计算选择以及基础数据结构驱动,VMB 群落类型的实际数目仍未确定,未来研究的挑战依然巨大。

以上多个研究初步勾勒出 VMB 群落及其功能的轮廓,而

* 基金项目:深圳市 2015 年度科技创新计划基础研究项目[深科技创新(2015)170 号]。

△ 通信作者, E-mail: pyamyhuang@163.com。

与临床密切相关的分类是将 VMB 分类为促进阴道健康的微生物群组和有害阴道健康的微生物群组,两者相互转化、难以截然分开。

1.1 促进阴道健康的 VMB

1.1.1 乳杆菌菌目 健康的女性生殖道微生物由乳杆菌属主导,约占总量的 70%;按照丰度排列:卷曲乳杆菌、嗜性乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌 4 种为主要乳杆菌菌种。其中卷曲乳杆菌占阴道菌群 80%~100%,是绝对的健康阴道菌群,其他乳杆菌的作用因环境而异。卷曲乳杆菌具有平均最大基因组和最高数量的蛋白质,具有独特的 DNA 聚合酶、细菌素和毒素/抗毒素系统,具有编码移动遗传元件的基因,特别是大基因组的转座酶,显示了独特的维护阴道健康的功能^[12-14]。在大多数阴道分离株的卷曲乳杆菌中可以观察到噬菌体颗粒的溶菌作用^[15]。卷曲乳杆菌在孕妇的阴道中具有独特的优势,因而维护了妊娠健康与分娩的过程^[16]。据 Wijgert 等^[17]纵向研究表明,卷曲乳杆菌占多数的女性,不易罹患 BV。同时 Borgdorff 等^[18]认为,以卷曲乳杆菌为主的女性,人类免疫缺陷病毒(HIV)、Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)和人乳头瘤病毒(HPV)的患病率最低,因为卷曲乳杆菌与 HIV-1 RNA 脱落的风险降低相关^[19]。卷曲乳杆菌通过调节 Toll 样受体(TLR)2/4、白细胞介素 8(IL-8)和人 β 防御素 2/3 在上皮细胞中的表达,可在体外抑制白色念珠菌。卷曲乳杆菌通过免疫调节促进阴道健康。故卷曲乳杆菌的普遍存在是健康的阴道微生物生态系统重要指标,是阴道健康的生物标志物。

1.1.2 阴道内长期及暂时定植菌与健康乳杆菌形成平衡阴道内其他菌种按照其丰度及泛滥程度排列如下:长期定植菌双歧杆菌目(加德纳杆菌)、梭菌目(链球菌属、肠球菌属、气球菌属)、厚壁菌目(葡萄球菌);及暂时定植菌如普雷沃菌、嗜酸菌、厌氧球菌、韦荣氏球菌等。长期菌或过路菌在卷曲乳杆菌为主的乳杆菌目占 70%、pH $\leq$ 4.5 的阴道微生态环境中,未有其他病原微生物侵入,阴道就暂时处于健康状态。

1.2 有害阴道健康的 VMB

1.2.1 阴道微生物菌群失调致定植菌转化致病菌 BV 的微生物特征是阴道乳杆菌的减少、厌氧或兼性厌氧菌的过度生长所导致的菌群失调性阴道病症,亦称为“多细菌性失调”。临床主诉:腥臭稀薄白带,月经、性生活后臭味加重。临床诊断 BV 有 Amsel 标准和 Nugent 评分系统。Amsel 标准使用广泛,实验室诊断:(1)乳杆菌减少并功能下降及多量杂菌的出现;(2)阴道 pH $\geq$ 4.5;(3)加入 10% KOH 后“鱼腥臭”味(胺试验阳性);(4)分泌物的盐水湿片显微镜下可见线索细胞。

BV 状态下有害阴道健康的阴道微生物是由阴道定植菌转化而来,环境变化及外来因素的影响成为主要因素。基于免细菌培养技术的 16S rRNA 基因序列分析,已经鉴定出与过去认知完全不同、无法归类、具有不同 DNA 序列的 3 个菌群,称“潜在 BV 相关细菌(BVAB)”,分为 BVAB 1、BVAB 2 和 BVAB 3。Fredricks 等^[20]就指出:BVAB 2 连同巨型球菌属、纤毛菌属和迟缓埃格特菌样细菌,是比加德纳菌属和奇异菌属更具代表性的 BV 的种类。

1.2.2 BV 形成致密微生物膜损害阴道微生态 Swidsinski 等^[21]进行的荧光原位杂交发现,这种生物膜由阴道加德纳杆菌菌株引发,形成致密生物膜,成为其他菌种黏附的支架;目前尚未确定这些菌种是否病原体?参与 BV 的形成?或者只是适应于阴道环境变化的机会性微生物?临床上表现为 BV 患者易感各种阴道病原微生物,成为生殖道菌群失调及进一步感染的标志。

1.2.3 保护性乳杆菌种类和数量的损失引发 BV 保护性乳杆菌数量在各种因素作用下急剧下降,导致乳酸浓度降低和阴道 pH 升高,促进阴道微生物的转化和病原微生物的存活。BV 相关微生物在阴道液(唾液酸酶)中产生黏蛋白降解酶,降解了覆盖在阴道和宫颈黏膜上皮抗感染的屏障黏液;BV 富集了加德纳菌产生的酶,酶降解了糖原,导致琥珀酸和短链脂肪酸的产生;黏液和糖原降解引起阴道上皮微磨损或细胞的变化,促进了病原体与上皮底层细胞受体的结合;因此,BV 状态导致阴道内免疫平衡的改变,促炎因子的水平增加,使女性生殖道更易感染 STD。

综上所述,对 BV 的研究显示不同的结果,实际上 BV 远比想象的要复杂的多。因此,急需培养免培养和新一代高通量测序 NGS 方法,更好地研究 BV 及真实描述 VMB 的特征。

2 影响 VMB 的因素

2.1 生理因素 VMB 的变化受到月经、年龄、性生活、妊娠以及外来药物的影响,复杂而多变。

2.1.1 阴道乳杆菌属直接或间接抑制病原微生物感染,维护阴道健康 阴道乳杆菌在黏膜表面形成密集的菌落,通过编码各种黏附素、纤维蛋白原结合和甘露糖结合蛋白组织成黏膜表面的物理屏障,有效的阻挡其他微生物直接与阴道黏膜接触;同时乳杆菌代谢产生高浓度的乳酸,维持阴道较低的 pH 值,成功抑制或灭活大部分生殖道病原体如致病性大肠杆菌、淋病奈瑟菌和沙眼衣原体;细菌素是乳杆菌代谢产生的另一种抗微生物肽和蛋白质,对革兰阴性和阳性菌、念珠菌、加德纳氏菌、葡萄球菌和链球菌均有广泛的抑制活性;乳杆菌代谢产物乳糖醇具有抗金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、阴道加德纳菌和金棒状杆菌的活性;乳杆菌通过特定细胞因子和免疫因子的表达,启动免疫系统进行免疫调节,促进阴道生态系统的健康^[22]。因此,乳杆菌主导的微生物群是阴道生态系统健康的良好生物标志物。这种平衡在月经、性行为、妊娠以及女性各年龄阶段有着明显的改变。

2.1.2 月经及性行为影响 VMB,失衡导致炎症 阴道菌落的变化受月经周期的影响,月经期间卷曲乳杆菌呈百倍下降,而嗜性乳杆菌、阴道毛滴虫、普雷沃菌的数量急剧增加^[23]。由卷曲乳杆菌主导的阴道微生物菌群的女性,月经期间却可以保持稳定。

性行为对阴道微生态的影响显而易见,精液导致阴道 pH 升高,使 BV 相关的菌群大量繁殖,产生腥臭的分泌物,带来大量的临床主诉人群。Chaban 等^[24]使用基于 cpn60 方法,分析 26 例特定月经阶段期间的女性,并没有观察到 VMB 的显著变化。

平衡健康的阴道乳杆菌微生态对顺利妊娠和分娩十分重要,当孕妇阴道内单独存在嗜性乳杆菌时,40.7% 妇女会出现早产^[17]。

2.1.3 女性激素通过对上皮细胞糖原作用影响阴道菌群 VMB 落根据激素水平,抗菌药物治疗,性行为(或)卫生习惯的变化而急剧变化,雌、孕激素通过促进阴道黏膜上皮内糖原的产生,在乳杆菌的代谢活动中影响阴道微生物。Petricevic 等^[25]进行了前瞻性纵向研究了 VMB 的动态变化过程,发现一些女性的阴道细菌群体随时间和年龄进行着显著的变化,从一类转变为另一类,而另一些则保持相对稳定。因此,Santiago 等^[26]提出:(1)阴道微生态有显著的个体差异;(2)卷曲乳杆菌在月经期的大幅减少,被嗜性乳杆菌或革兰氏阳性球菌替代;(3)卷曲乳杆菌是优势菌种时,增加了 VMB 的稳定性。

2.2 病理因素 阴道是女性生殖道的门户,细菌、病毒和寄生

虫病原体通过性行为首先进入阴道,引起 STD,如沙眼衣原体、淋病奈瑟菌和病毒病原体,包括 HIV、HSV-2 和 HPV。这些感染对生殖和健康影响巨大,STD 成为成年人寻求医疗关注的前五类疾病。

2.2.1 细菌性传播感染与 VMB (1)沙眼衣原体感染:2008 年全年约有 1.057 亿次新感染。衣原体可导致盆腔炎性疾病、输卵管不育和异位妊娠。通过对 101 名沙眼衣原体感染女性(92%都是非裔美国人)的阴道样品的 16S rRNA 测序和宏基因组学分析显示:低比例的乳杆菌、或特异性乳杆菌基因组类型的减少可以作为衣原体感染状态的标志。阴道微生态失衡处于 BV 状态,是沙眼衣原体和淋病奈瑟菌、滴虫等感染的最佳时机。BV 阳性妇女经过 1 年的甲硝唑治疗,会显著降低衣原体的发生率。(2)淋病奈瑟菌感染 2008 年统计位于第二常见的性传播感染性疾病,全世界范围内每年约 3640 万成年人感染,主要部位是女性子宫颈、阴道、咽和直肠。多项研究定性了 BV 和淋病奈瑟菌感染之间的关系。詹氏乳杆菌 ATCC25258 释放表面组分(RSC),在体外通过阻断纤连蛋白结合位点抑制淋病奈瑟菌与子宫内上皮细胞的相互作用,减少淋病奈瑟菌对黏膜的黏附和侵袭;加氏乳杆菌 ATCC33323 则可以代替黏附的淋病奈瑟菌。研究的结果表明:由于失去了乳杆菌直接的抗菌机制,VMB 失衡紊乱,给细菌性传播感染带来机会。

2.2.2 病毒性传播感染和 VMB 病毒性传播感染如 HIV 病毒其获得的易感性与 BV、乳杆菌属缺乏的 VMB 菌群失衡有着显著关联 (1)HIV 感染与微生物群失调相关:HIV 感染仍然是各国最主要的公共卫生问题,截至 2013 年底,全球约有 3500 万人感染艾滋病毒,还在以每年约 210 万新感染的速度增加。在尝试预防和治疗 HIV 中,更好地了解 VMB 和 HIV 感染之间的关系至关重要。HIV 感染的机制:①在 BV 期间激活免疫应答和炎症;②破坏阴道上皮,HIV 可以通过上皮破口进入血液到达靶细胞;③减少的乳杆菌属导致 pH 升高和 H₂O₂ 浓度降低。在 HIV 血清阳性妇女中经常检测到 BV,并具有更高的细菌多样性。值得注意的是,阴道加德纳菌、人形支原体和普雷沃菌的存在与 HIV 表达有关,与受感染的妇女向其男性伴侣传播 HIV 的比率增加有关,表明 BV 可能对非洲新的 HIV-1 感染起到促进作用^[27]。(2)HSV-2 和 BV 之间的关系是潜在双向的 2008 年统计数据显示:全世界 20%年龄在 15~49 岁的女性人口受 HSV-2 的影响。在非洲女性人群中,HSV-2 感染导致 BV 发作的几率增加 30%;阳性 HSV-2 血清学是 BV 的获得或随后 BV 发作的风险因素。HSV-2 感染也与阴道滴虫和淋球菌的发病率增加有关;BV 和缺乏乳杆菌主导的微生物群是 HSV-2 获得感染的非依赖性危险因素;HSV-2 复制和生殖道脱落的风险,增强 HSV-2 的扩散。HIV 和 HSV-2 的细胞共同感染可以作为潜在的直接机制;HSV-2 对上皮屏障的破坏和进一步的炎症,导致 T 淋巴细胞的聚集,增加 HIV 的发作是间接机制。HSV-2 通过角质形成细胞来诱导抗微生物肽 LL-37 的表达;LL-37 通过提高 HIV 共受体 CD4 和 CCR5 的表达水平来增加朗汉斯细胞对 HIV-1 的易感性。因此,抑制 HSV-2 感染的策略也可以有利于间接预防 HIV-1 感染。(3)HPV 感染与持续和 BV 出现呈正相关已经发现存在超过 100 种型别的 HPV,其中 14 种为高危型。多项研究已经确定宫颈 HPV 感染和 BV 呈正相关。HPV 病毒在诊断为 BV 的女性中清除率下降缓慢;分子研究表明,HPV 感染与 VMB 的组成变化相关,即与乳杆菌的减少和微生物群多样性的增加呈正相关。来自哥斯达黎加的绝经前妇女的研究

证明,阴道 pH≥5 导致 HPV 感染的风险增加 10%~20%,且与低级别鳞状上皮内瘤变相关;HPV 感染期间,阴道卷曲乳杆菌更少,加氏乳杆菌和加德纳菌增多。纤毛菌属是 HPV 感染的潜在微生物标志物。Gajer 等^[23]认为,微生物群落类型与 HPV 感染之间存在显著关联,由惰性乳杆菌主导或缺乏足够数量的乳杆菌支配的 VMB 代表着一种具有更高的 HPV 获得/持续感染的风险的微环境^[28]。对 HPV 风险具有潜在影响的乳杆菌益生菌的合理选择和应用,代表了一种能降低 HPV 发生率/持续性的有价值的新策略。在第一次纵向临床研究中,54 名 HPV 阳性和 LSIL 妇女每天服用含有干酪乳杆菌的益生菌饮料长达 6 个月。益生菌用户显示出了两倍的宫颈病变清除速率,尽管 HPV 的检测并没有发生变化。

3 VMB 的建立和维护

阴道乳杆菌属的有益作用,证明了乳杆菌作为阴道健康的生物标志物的潜力。这种生物标记的进一步验证将会指引人们设计更好的靶向益生菌策略。H₂O₂ 已经被研究用于 BV 的临床治疗。在阴道环境中持续 1 周添加 3% H₂O₂,可以消除 BV 的症状并促进恢复正常的乳杆菌主导的微生物群^[20]。卷曲乳杆菌支配的微生物环境具有更低的阴道 pH,表明此菌是乳酸的最高生产者之一,而乳酸又是乳杆菌的关键抗菌产品。因此,更好地理解阴道微生物组和性传播感染的风险与健康 VMB 的精细生物标志物之间的关系,可以开发新的产品,维持和/或恢复更多保护性阴道细菌群落。

3.1 阴道乳杆菌发挥健康促进作用

3.1.1 乳酸和细菌素的生产 乳酸的产生是 VMB 的标志性有益活动,一定浓度的乳酸可以排除病原体。细菌素是另一种直接抑制病原体的活性物质。由发酵乳杆菌 L23 产生的 L23 细菌素(7×10³)对革兰阴性和阳性致病菌株和念珠菌属显示出广泛的抑制活性。乳糖醇具有抗金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、阴道加德纳菌和金黄棒状杆菌的活性^[29-30]。

3.1.2 阴道乳杆菌的黏附作用 阴道乳杆菌对宿主细胞的黏附已在体外和体内都显示能阻止病原微生物的定居的作用。乳杆菌的黏附模式比厚生物膜中存在的 BV 病原体更加松散。几种阴道乳杆菌分离物通过置换和竞争的方式,在体外阻断阴道病原体黏附到阴道上皮细胞;研究观察到乳杆菌属对金黄色葡萄球菌、B 族链球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和大肠杆菌、致病性大肠杆菌、阴道加德纳氏菌和普雷沃菌、阴道毛滴虫的排斥和竞争;显示阴道短乳杆菌,植物乳杆菌和唾液乳杆菌分离物的体外抗 HSV-2 活性,直接依赖每种细菌菌株对上皮细胞的黏附作用^[31-32]。

3.2 刺激宿主防御机制 乳杆菌通过各种免疫调节机制促进阴道生态系统的健康。当阴道上皮细胞经受 TLR 激动剂时,卷曲乳杆菌 ATCC38820 和詹氏乳杆菌 ATCC25258 调节免疫应答^[30]。此外,阴道上皮细胞的细胞因子分布在这些共生阴道菌株中。乳杆菌的抗炎作用在激动剂和菌株之间显示不同,表明共生菌株的免疫调节作用取决于特定的分子相互作用。VMB 对宿主的免疫应答是一种物种特异性的调节应答。因此,惰性乳杆菌是否有助于阴道健康仍然有争议^[31]。Wagner 等^[32]研究了鼠李糖乳杆菌和罗伊氏乳杆菌在 VK2/E6E7 对白色念珠菌的炎症反应中的影响,观察到益生菌菌株通过抑制诱导的 NF-κB 抑制刺激酶 α(Iκκα)、TLR2、TLR6、IL-8 和 TNF 的表达来调节 VK2/E6E7 对白色念珠菌的炎症免疫应答,表明抑制了 NF-κB 信号传导。

3.3 益生菌-外源性施用乳杆菌恢复阴道健康 健康的 VMB 主要由乳杆菌属物种控制,使用外源的乳杆菌来恢复和/或维

持阴道健康的观点变得可行。益生菌是“活的微生物,当以足够的量施用,赋予宿主健康益处”。科学家们已经进行了各种研究:单一或组合的益生菌在治疗 BV 中的作用产生 H₂O₂ 的嗜乳杆菌经过 4 周的治疗后,出现高达 88% BV 治愈率。

4 小 结

在过去 10 年中,新一代高通量测序 NGS 技术,提供了阴道环境中总细菌多样性的更加完整的图像。因此,健康和正常的 VMB 被重新定义。研究报告了非乳杆菌主导的 VMB 的存在,对应了由“BV 相关细菌”主导的无症状 BV。这些无症状 BV 可以解释为什么反复发作,治疗不成功。值得怀疑是,“BV 相关细菌”是否真正是有致病性,或者是宿主触发了环境变化,而这些变化能激活不同细菌反应,进而发展成感染反应。当引入疾病阶段的性传播感染时,健康和正常的 VMB 的定义更加复杂。许多性传播感染倾向与不健康和异常微生物群直接相关,表明不同类型的微生物群可能导致 STD 不同程度的易感性。因此强烈需要后续研究,以了解宿主及其微生物群在 STD 发展过程中的真正作用。

益生菌对 BV 患者显示出有益的作用。与抗菌药物不同,使用益生菌的优点之一,是可以长时间使用而不干扰正常的 VMB。因此,益生菌不仅可用于 BV 的单一治疗,而且可用于预防有着 BV 复发病史的健康女性。

参考文献

- [1] Gergova RT, Strateva TV, Mitov IG. Gardnerella vaginalis-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women[J]. Braz J Infect Dis, 2013, 17(3): 313-318.
- [2] Togni G, Battini V, Bulgheroni A, et al. In vitro activity of nifuratel on vaginal bacteria; could it be a good candidate for the treatment of bacterial vaginosis? [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(5): 2490-2492.
- [3] van de Wijgert JH, Borgdorff H, Verhelst R, et al. The vaginal microbiota; what have we learned after a decade of molecular characterization? [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105998.
- [4] Wang J, Sun C, Liu C, et al. Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and Real-time PCR. [J]. Anaerobe, 2016, 38(20): 1-10.
- [5] Leblanc SJ. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle[J]. Reprod Domest Anim, 2012, 47(s5): 18-30.
- [6] Jeon SJ, Vieiraneto A, Gobikrushanth M, et al. Uterine Microbiota Progression from Calving until Establishment of Metritis in Dairy Cows[J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(18): 6324-6332.
- [7] 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 [J]. BMC Microbiol, 2004, 4(1): 16.
- [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] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women [J]. Proc Natl Acad Sci USA,

- 2011, 108(1): 4680-4687.
- [10] Smith BC, Mcandrew T, Chen ZG, et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40425.
- [11] Srinivasan S, Liu CZ, Mitchell CM, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10197.
- [12] Mendes-Soares H, Suzuki H, Hickey RJ, et al. Comparative functional genomics of lactobacillus spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment[J]. J Bacteriol, 2014, 196(7): 1458.
- [13] Smidt I, Kiiker R, Oopkaup H, et al. Comparison of detection methods for vaginal lactobacilli. [J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(5): 1-5.
- [14] Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, et al. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(4): 321-327.
- [15] Damelin LH, Paximadis M, Mavri-Damelin DA, et al. Identification of predominant culturable vaginal Lactobacillus species and associated bacteriophages from women with and without vaginal discharge syndrome in South Africa[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(2): 180-183.
- [16] Kiss H, Koegler B, Petricevic L, et al. Vaginal lactobacillus microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy[J]. BJOG, 2007, 114(11): 1402-1407.
- [17] Wijgert VD, HJ, Borgdorff B, et al. The vaginal microbiota; what have we learned after a decade of molecular characterization? [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105998.
- [18] Borgdorff H, Tsivtsivadze E, Verhelst RA, et al. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women[J]. ISME J, 2014, 8(9): 1781-1793.
- [19] Mitchell C, Balkus JE, Fredricks D, et al. Interaction between lactobacilli, bacterial Vaginosis-Associated bacteria, and HIV type 1 RNA and DNA genital shedding in U. S. and kenyan women[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2013, 29(1): 13-19.
- [20] Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis [J]. N Engl J Med, 2005, 353(18): 1899-1911.
- [21] Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke VA, et al. Gardnerella biofilm involves females and males and is transmitted sexually[J]. Gynecol Obstet Invest, 2010, 70(4): 256-263.
- [22] Martín R, Soberón N, Vaneechoutte M, et al. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. [J]. Int Microbiol, 2008, 11(4): 261-266.
- [23] Gajer P, Brotman RM, Bai GY, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(132): 132ra52.
- [24] Chaban B, Links MG, Jayaprakash TP, et al. Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women

through the menstrual cycle[J]. Microbiome, 2014, 2(1): 23.

[25] Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, et al. Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery[J]. Sci Rep, 2014, 4(6187): 5136.

[26] 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.

[27] Cohen RC, Lingappa JR, Baeten JM, et al. Bacterial vaginosis associated with increased risk of female-to-male HIV-1 transmission: a prospective cohort analysis among African couples[J]. PLoS Med, 2012, 9(6): e1001251.

[28] Cardone AA, Tartaglia E. Utilisation of Hydrogen peroxide in the treatment of recurrent bacterial vaginosis[J]. Minerva Ginecol, 2003, 55(6): 483.

[29] Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, et al. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by lactobacillus fermentum L23[J]. Curr Microbiol, 2008, 56(4): 397-402.

[30] Maqueda M, Gálvez A, Bueno MM, et al. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins[J]. Curr

Protein Pept Sci, 2004, 5(5): 399-416.

[31] Grande MJ, Abriouel H, Lucas LR, et al. Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. [J]. J Food Prot, 2007, 70(10): 2339-2445.

[32] Viedma PM, Abriouel H, Omar NB, et al. Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48 [J]. Food Control, 2011, 22(5): 756-761.

[33] Rose WA, McGowin CL, Spagndo RA, et al. Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32728.

[34] Doeringer SY, Herbst-Kralovetz M. M. bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner[J]. J Infect Dis, 2014, 209(12): 1989-1999.

[35] Wagner RD, Johnson SJ. Correction: probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to candida albicans[J]. J Biomed Sci, 2012, 19(1): 1.

(收稿日期: 2017-03-06 修回日期: 2017-05-11)

• 综 述 •

D-二聚体在肿瘤中的研究进展

李佳乐 综述, 刘 旭[△]审校

(天津中医药大学第一附属医院检验科, 天津 300192)

关键词: 肿瘤; D-二聚体; 血栓
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 18. 031

文献标识码: A **文章编号:** 1673-4130(2017)18-2588-03

D-二聚体是纤维蛋白的降解产物, 凝血酶激活的 FXⅢ 作用于纤维蛋白单体使其交联形成不可溶的凝块, 再经纤溶酶作用而生成。升高的 D-二聚体与机体血栓形成及继发性纤溶亢进关系密切。D-二聚体作为一种凝血指标, 已独立或与其他指标联合应用于多种疾病的诊断和预后。多项研究发现血浆中 D-二聚体水平动态变化与肿瘤的鉴别、分期、转移、化疗疗效、生存时间等有一定的相关性。现就 D-二聚体的检测方法及其与肿瘤的相关性作一综述。

1 D-二聚体的检测方法

D-二聚体的检测方法主要包括乳胶凝集法、酶联免疫吸附法、胶体金免疫渗滤法和免疫比浊法, 都是基于抗原抗体特异性结合的原理而设计。

乳胶凝集法是将特异性单克隆抗体包被于乳胶颗粒表面, 与标本中的 D-二聚体结合后乳胶发生凝集, 测定乳胶凝集后标本稀释倍数来判断 D-二聚体水平。此方法是一种半定量检测方法, 结果需要通过肉眼观察, 容易出现主观误差, 敏感性较低, 只可作为筛选方法。

酶联免疫吸附法运用的是双抗体夹心原理, 将抗 D-二聚体抗体包被于固相载体表面, 当抗凝血标本中的 D-二聚体与抗体结合后, 再加入酶标记的抗 D-二聚体抗体, 形成抗体-

抗原-酶标抗体结合物, 再加入酶作用底物显色。此方法是一种定量方法, 优点是可以避免多种因素干扰, 如胆红素、纤维蛋白原等, 敏感性高, 检测结果较准确。缺点是操作复杂, 时间较长, 且不同厂家提供的试剂盒检测结果之间存在差异, 检测前需标准曲线, 适用于批量标本检测^[1]。

胶体金免疫渗滤试验是通过抗 D-二聚体抗体捕获 D-二聚体的方法来检测, 将单克隆抗体包被于有多孔膜的测试卡上, 加样后, D-二聚体被捕获, 洗涤后再加入金标抗 D-二聚体抗体, 反应后显红色, 显色深浅程度与标本 D-二聚体水平呈正相关, 比色测量可测得 D-二聚体水平。此方法是定量检测方法, 操作简便快速, 少量标本或大批量标本都适用, 尤其适用于急诊检测。

免疫比浊法现在应用较广泛, 可实现自动化。原理是抗原、抗体反应后可使溶液的浊度增加, 通过检测透过光强度得出被测 D-二聚体水平。该方法操作简便、精准、快速, 有效克服了人工误差。

除此之外, 还有几种检测方法, 如自身红细胞凝集法、荧光抗体法等, 这些方法也都基于抗原抗体特异性反应的原理^[2]。

2 D-二聚体与血栓

D-二聚体主要反映血液纤溶功能, 机体一旦有血栓形成及

[△] 通信作者, E-mail: 18622165200@163. com。