

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.20.005
文章编号: 1005-8982(2020)20-0022-04

宫颈病变患者阴道菌群种类构成分布及意义*

陈欣, 于雪梅

(绵阳市人民医院 妇科, 四川 绵阳 621000)

摘要:目的 探讨宫颈病变患者阴道菌群种类构成的分布及意义。**方法** 选取2017年1月—2019年1月在绵阳市人民医院妇科就诊的180例宫颈病变患者,分为宫颈上皮内瘤变I级88例(CIN I组)和宫颈上皮内瘤变II/III级92例(CIN II/III组);同时选取同期该院体检的健康女性75例作为对照组。采集全部纳入对象阴道分泌物提取细菌基因组DNA,采取PCR扩增基因片段,且应用Illumina Miseq测序平台检测PCR扩增后产物,观察各组Alpha多样性指数评估(菌种丰度指数Chao、ACE)、菌种多样性指数(Simpson指数与Shannon指数)、微生物群菌落门及微菌群分布情况。**结果** 对照组、CIN I组和CIN II/III组Chao、ACE比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),CIN I组较对照组、CIN II/III组高($P < 0.05$),且CIN II/III组高于对照组($P < 0.05$)。对照组、CIN I组和CIN II/III组厚壁菌门、放线菌门及其他21个菌门构成比比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、CIN I组和CIN II/III组阴道乳酸杆菌属、加德纳菌属、奇异菌属及其他菌属构成比比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 不同宫颈上皮内瘤变患者阴道菌群丰度变化与宫颈病变存在一定的关联。

关键词: 宫颈肿瘤;子宫疾病;乳杆菌属

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Distribution and significance of vaginal flora in patients with cervical intraepithelial neoplasia*

Xin Chen, Xue-mei Yu

(Department of Gynaecology, Mianyang People's Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution and significance of vaginal flora in patients with cervical lesions. **Methods** A total of 180 patients with cervical intraepithelial neoplasia seeking medical care in our hospital from January 2017 to January 2019 were enrolled, with 88 cases of cervical intraepithelial neoplasia grade I (CIN I group) and 92 cases of cervical intraepithelial neoplasia grade II/III (CIN II/III group). At the same time, 75 healthy women who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. The bacterial genomic DNA were extracted from vaginal secretions of all selected candidates. PCR method was used to amplify gene fragments, and the Illumina Miseq sequencing platform was applied to detect the amplified products. The alpha diversity (Chao and ACE index), species diversity (Simpson and Shannon index), and distribution of the microflora were assessed. **Results** There were significant differences in Chao and ACE value among control group, CIN I group and CIN II/III group ($P < 0.05$), where Chao and ACE value of CIN I group were higher than those of control group and CIN II/III group ($P < 0.05$), and those in CIN II/III group were greater

收稿日期: 2020-04-21

* 基金项目: 川北医学院院校合作项目 (No: 2016xy09)

than those of control group ($P < 0.05$). In addition, the constitution ratio of Firmicutes, Actinobacteria and other 21 phyla ($\chi^2 = 40\ 176.180, P = 0.000$) as well as that of Lactobacillus, Gardnerella, Atopobium and others in the patients' vagina was significantly different among the groups ($\chi^2 = 79\ 286.753, P = 0.000$). **Conclusions** Vaginal flora abundance in patients with cervical intraepithelial neoplasia has a certain correlation with the severity of cervical lesions.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia; vagina; bacterial flora

宫颈癌是威胁全球女性健康的最大疾病之一, 宫颈癌患者的发病率与病死率居高不下^[1]。宫颈上皮内瘤变是在临床中并未确诊为原位癌的宫颈异常增殖性病变, 其长期存在可能发展为宫颈癌^[2-3]。宫颈上皮内瘤变暴露在阴道微环境内, 而阴道微环境中的菌群具有保护阴道微环境的作用。目前对阴道菌群在宫颈上皮内瘤变发生、发展中具有一定作用仍有争论。本研究重点探讨宫颈上皮内瘤变患者阴道菌群分布情况, 对指导临床宫颈病变筛查与治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2017 年 1 月—2019 年 1 月在绵阳市人民医院妇科就诊的 180 例宫颈病变患者, 分为宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I 级 88 例 (CIN I 组) 和 CIN II / III 级 92 例 (CIN II / III 组)。纳入标准: ①经宫颈液基细胞学与宫颈活检病理确诊为 CIN I 级和 / 或 II / III 级; ②年龄 22 ~ 60 岁; ③性生活 ≥ 3 年, 但近 3 d 内无性生活史; ④自愿参与本研究, 并签署知情同意书。排除标准: ①合并免疫缺陷、全身系统性疾病; ②糖尿病、激素治疗性疾病; ③月经不规律; ④近 1 周内见异常阴道分泌物及阴道流血; ⑤妇科检查患有细菌性阴道病、毛滴虫阴道炎及外阴阴道假丝酵母菌病。选取同期本院体检的健康女性 75 例作为对照组。本研究通过医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器

DNA 试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 细菌培养基 (广州市珠海迪尔生物工程有限公司)。ABI-2720 PCR 仪 (美国 ABI 公司), Illumina Miseq 测序平台 (美国 MiSeq 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采用无菌棉拭子深入阴道后选取后穹隆位置缓慢转动 10 ~ 15 s 后, 待棉拭子充分吸

收分泌物后取出, 置入干燥无菌试管中。标本采集后存放于 -80°C 冰箱, 用于细菌基因组 DNA 的提取。

1.3.2 细菌基因总 DNA 提取 参考文献 [4] 采用 DNA 试剂盒提取样本中总 DNA, 按照说明书进行操作, 成功提取 DNA 后存放于 -20°C 冰箱中。

1.3.3 16S rRNA V3、V4 区的 PCR 扩增与 IlluminaMiseq 测序 参考文献 [5] 引物对照, 采用 PCR 扩增法 (北京线上生物科技有限公司) 将基因组 DNA 稀释并进行提取后, 进一步使 16S rRNA 的 V3、V4 区基因片段系数放大, 同时采用双末端展开序列测试。具体采用的引物片段参考文献 [6]。正向引物: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 长度 338 bp; 反向引物: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3', 长度 806 bp。经 PCR 反应后, 取得缓冲液 $5 \times \text{FastPfu } 4 \mu\text{l}$, 构成成分包含 dNTPs $2.0 \mu\text{l}$, FastPfu 聚合酶 $0.4 \mu\text{l}$, 正反向引物各 $0.8 \mu\text{l}$, 模板 $0.5 \mu\text{l}$, 无菌去离子水 $11.5 \mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C 预变性 3 min, 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共计 27 个循环, 72°C 继续延伸 10 min, 储存于 4°C 环境中, 将 PCR 产物等量混合后检测样本标签序列, 由上海派森诺医学检验所完成。革兰染色检测乳酸杆菌属、加德纳菌属、奇异菌属及其他菌属。采用培养法进行厚壁菌门、放线菌门及其他 21 个菌门鉴定。

1.4 观察指标

观察各组 Alpha 多样性指数评估 (菌种丰度指数 Chao、ACE)、菌种多样性指数 (Simpson 指数与 Shannon 指数)、微生物群菌落门及微菌群分布情况。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK- q 法; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验, 进一步两两比较用 χ^2 分割法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Alpha 多样性变化

对照组、CIN I 组和 CIN II / III 组 Simpson 指数、Shannon 指数比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 Chao、ACE 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CIN I 组较对照组、CIN II / III 组高 ($P < 0.05$), 且 CIN II / III 组高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组菌门结构

本研究总共测出 23 个菌门, 对照组、CIN I 组和 CIN II / III 组厚壁菌门、放线菌门及其他 21 个菌门构成比比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 40\ 176.180$, $P = 0.000$)。对照组与 CIN I 组厚壁菌门、放线菌门及其他 21 个菌门构成比比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 15\ 894.568$, $P = 0.000$); 对照组与 CIN II / III 组厚壁菌门、放线菌门及其他 21 个菌

门构成比比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 28\ 239.622$, $P = 0.000$); CIN I 组与 CIN II / III 组厚壁菌门、放线菌门及其他 21 个菌门构成比比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25\ 889.547$, $P = 0.000$)。见表 2。

2.3 各组菌群类型

对照组、CIN I 组和 CIN II / III 组阴道乳酸杆菌属、加德纳菌属、奇异菌属及其他菌属构成比比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 79\ 286.753$, $P = 0.000$)。对照组与 CIN I 组阴道乳酸杆菌属、加德纳菌属、奇异菌属及其他菌属构成比比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 188\ 665.755$, $P = 0.000$); 对照组与 CIN II / III 组阴道乳酸杆菌属、加德纳菌属、奇异菌属及其他菌属构成比比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14\ 952.312$, $P = 0.000$); CIN I 组与 CIN II / III 组阴道乳酸杆菌属、加德纳菌属、奇异菌属及其他菌属构成比比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 28\ 097.984$, $P = 0.000$)。见表 3。

表 1 各组 Alpha 多样性变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Chao	ACE	Simpson 指数	Shannon 指数
对照组	75	47.54 ± 23.14	53.02 ± 24.17	0.69 ± 0.18	0.70 ± 0.58
CIN I 组	88	65.02 ± 24.51 [†]	84.14 ± 27.01 [†]	0.55 ± 0.22	1.02 ± 0.71
CIN II / III 组	92	60.02 ± 29.27 [†]	71.02 ± 28.02 [†]	0.78 ± 0.21	0.69 ± 0.68
F 值		10.290	27.790	1.630	0.101
P 值		0.001	0.001	0.105	0.920

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组菌门结构比较

组别	n	阴道菌门总数	厚壁菌门例 (%)	放线菌门例 (%)	其他 21 个菌门例 (%)
对照组	75	421 410	326 972 (77.59)	65 147 (15.46)	29 291 (6.95)
CIN I 组	88	354 119	239 745 (67.70) [†]	95 741 (27.04) [†]	18 633 (5.26) [†]
CIN II / III 组	92	397 145	274 517 (69.12) [†]	64 917 (16.36) [†]	57 711 (14.53) [†]

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 各组菌群类型比较

组别	n	阴道菌门总数	乳酸杆菌属例 (%)	加德纳菌属例 (%)	奇异菌属例 (%)	其他菌属例 (%)
对照组	75	421 410	264 471 (62.76)	59 478 (14.11)	8 974 (2.13)	88 487 (21.00)
CIN I 组	88	354 119	189 471 (53.50)	67 845 (19.16)	27 184 (7.68)	69 619 (19.66)
CIN II / III 组	92	397 145	285 971 (72.01)	48 697 (12.26)	14 876 (3.75)	47 601 (11.99)

3 讨论

宫颈癌是现阶段病因明确的恶性妇科肿瘤, 与高危型人乳头瘤病毒持续感染有一定关系, 但其进展为

宫颈癌的潜伏期长, 所以在潜伏期临床及早发现可以逆转。目前, 临床对宫颈病变进展的因素尚未统一, 但有研究发现, 阴道菌群结构改变与宫颈病变相关^[7]。

国内外相关报道发现, 女性阴道微环境菌群构成具有一定的规律性, 但其不稳定的变化发展与宫颈病变表现出相关性^[8-9]。临床研究发现, 健康女性的阴道菌群绝大多数为厚壁菌门, 乳酸杆菌属同样占比较高, 而加德纳菌、奇异菌属等丰度不高^[10]。阴道微环境处于平衡状态时为菌群提供寄居, 常见为革兰阳性需氧菌、兼性厌氧菌及革兰阴性需氧菌等, 该类菌群主要聚集于阴道侧壁黏膜皱褶与穹隆中, 极少部分在宫颈位置聚集。既往研究在女性阴道分泌物中分离出 50 多种不同的菌群, 而健康女性阴道中以乳酸杆菌为主^[11]。女性阴道微环境菌群构成处于平衡状态时, 具有预防病原体侵袭的功能, 而确保阴道菌群环境平衡的 pH 值是由乳酸杆菌、雌激素来调节^[12]。乳酸杆菌可调控阴道微环境的平衡, 同时还可以分泌大量乳酸杆菌预防致病菌群侵袭, 提高阴道局部抵御感染、肿瘤等疾病。研究还发现, 乳酸杆菌可活化为细胞外糖类包裹病原菌侵袭宫颈上皮细胞形成生物膜, 避免病原菌进一步发展^[13]。本研究结果发现, CIN I 组乳酸杆菌属 (53.50%) 低于对照组 (62.76%) 和 CIN II / III 组 (72.01%), 从而反映阴道微生物菌群环境均衡性发生变化, 可能会造成 CIN 进展, 而 CIN II / III 组乳酸杆菌高于对照组 (72.01% VS 62.76%)。本研究中, CIN I 组乳酸杆菌属含量下降, 通常阴道菌群中的乳酸杆菌具有维持阴道微环境平衡、抑制病原菌生长, 提高阴道局部抵御感染的作用。乳酸杆菌可形成空间性占位从而保护宫颈上皮细胞, 避免病原菌黏附, 减少病原菌黏附与感染。CIN I 组乳酸杆菌属含量降低提示阴道菌群平衡紊乱导致阴道微环境发生变化, 宫颈上皮感染高危型人乳头瘤病毒的易感性风险较高^[14]。本研究结果与既往研究结果趋于一致, CIN I 组加德纳菌属 (19.16%) 高于对照组 (14.11%) 和 CIN II / III 组 (12.16%); 同时 CIN I 组奇异菌属丰度同样高于对照组和 CIN II / III 组。加德纳菌属可作用于 CD59 调节分子活化炎症信号通路, 大量释放细胞溶解素, 造成阴道上皮细胞凋亡从而减少乳酸杆菌定植, 阴道微环境失衡的风险升高。本研究说明宫颈病变与奇异菌丰度关系密切。COOREVITS 等^[15]研究基于 3D 培养条件, 分析阴道上皮细胞模型同样证实了奇异菌可增强炎症反应, 改变阴道微环境; 同时还发现奇异菌的丰度升高可能预示着其影响宫颈上皮内细胞。

综上所述, 从女性阴道菌群的构成发现不同宫颈

上皮内瘤变患者阴道菌群丰度变化与宫颈病变具有一定的关联。

参 考 文 献:

- [1] 陈雨莲, 邱丽华, 高华, 等. 阴道微生物与人乳头瘤病毒感染及宫颈上皮内肿瘤相关性研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2018, 45(3): 301-305.
- [2] MARTINGANO D, RENSON A, MARTINGANO A, et al. Variations in progression and regression of precancerous lesions of the uterine cervix on cytology testing among women of different races[J]. J Am Osteopath Assoc, 2018, 118(1): 8-18.
- [3] 刘莹, 慕庆玲, 李婧. 伴高危型 HPV 感染的 LSIL 患者 HPV 清除与阴道微生态间的关系 [J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(3): 344-346.
- [4] TRONNOLONE H, TAM A, SZENCZI Z, et al. Diffusion-limited growth of microbial colonies[J]. Scien Rep, 2018, 8(1): 5992-5995.
- [5] 俞亚媛, 周梦妮, 谭布珍. 阴道微生物群与子宫颈癌关系的研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(4): 320-324.
- [6] PONISCH W, WEBER CA, JUCKELAND G, et al. Multiscale modeling of bacterial colonies: how pili mediate the dynamics of single cells and cellular aggregates[J]. New J Phys, 2017, 19(1): 15003-15007.
- [7] 崔云霞, 王玉东. 宫颈癌与阴道微生物关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(10): 12-15.
- [8] 王美藏, 高建宏, 杨雅琴, 等. 子宫颈 HPV 感染与 MCM2 表达及阴道环境因素的相关性分析 [J]. 现代医学, 2017, 21(1): 29-33.
- [9] 赵静, 李芹, 曹雪芳, 等. 云南新平县女性阴道微生态异常与 HR-HPV 的相关性研究 [J]. 中国热带医学, 2018, 18(12): 52-59.
- [10] 陆宏, 周桂华. 阴道微生物菌群失调及 pH 值变化与宫颈上皮内瘤变的关系 [J]. 海南医学, 2017, 28(20): 3401-3402.
- [11] 宋小琳. LEEP 术联合干扰素治疗 HR-HPV 持续感染的围绝经期 CIN 的临床分析 [J]. 中国生育健康杂志, 2017, 28(1): 64-66.
- [12] 马啸, 蔡慧华, 何彦, 等. 复发性外阴阴道假丝酵母菌病患者阴道微生物的物种组成及其动态变化 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(2): 192-198.
- [13] GOMES G, ELEUTERIO R, SILVEIR A, et al. Atypical squamous cells in liquid-based cervical cytology: microbiology, inflammatory infiltrate, and human papillomavirus-dna testing[J]. Acta Cytologica, 2017, 62(1): 42-47.
- [14] 王新宇, 梁圆, 邓燕杰. 阴道菌群改变与宫颈癌前病相关性的初步研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(5): 98-103.
- [15] COOREVITS, TRAEN A, BINGA L, et al. Are vaginal swabs comparable to cervical smears for human papillomavirus DNA testing[J]. J Gynecol Oncol, 2018, DOI: 10.3802/jgo.2018.29.e8.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 陈欣, 于雪梅. 宫颈病变患者阴道菌群种类构成分布及意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(20): 22-25.