

373 例妇女下生殖道微生物宏基因组鸟枪法测序分析

陈宁¹, 陈晨², 王小雨³, 陆瑞科³, 高红琴¹, 李少华⁴, 郝梨岚², 叶志强², 赵倩², 张韵红^{3*}

基金项目: 苏州市重大疾病、传染病预防和控制关键技术项目编号(项目编号: Gwzx201805)

作者单位: 1. 215000 江苏 苏州, 苏州高新区狮山街道社区卫生服务中心; 2. 518120 广东 深圳, 深圳华大生命科学研究院; 3. 215000 江苏 苏州, 苏州高新区妇幼保健计划生育服务中心; 4. 215000 江苏 苏州, 苏州高新区社区卫生服务管理中心

作者简介: 陈宁, 毕业于南京中医药大学, 助理研究员(公共卫生), 主管护师, 主要研究方向为公共卫生管理

* 通信作者, E-mail: zhang. yunh@ snd. gov. cn

【摘要】目的 探索苏州高新区妇女下生殖道菌群的分布情况, 并分析绝经、避孕方式对下生殖道菌群的影响。**方法** 采集苏州高新区 2018 年 6~7 月参与“两癌”筛查的 373 例女性的宫颈分泌物样本, 并收集对应的表型数据。对分泌物样本进行宏基因组鸟枪法测序检测微生物菌群, 并通过统计学方法分析宫颈微生物与表型的相关性。**结果** 373 名女性的微生物在种水平的研究提示嗜性乳杆菌、卷曲乳杆菌和加德纳菌在人群中占前三位, 分别占人群的 20%, 15% 和 13%, 另有 38% 混合类型(Diverse 类型), 即没有明显主导菌; 育龄期妇女和绝经期女性菌群类型有明显差异; 采用不同避孕方式的女性阴道菌群有明显差异。**结论** 本研究通过宏基因组鸟枪法探索中国苏州高新区女性下生殖道菌群谱图, 发现阴道微生物与年龄、避孕方式的选择有关联。建立全面客观了解女性生殖道微生物的生物组学将为疾病诊断、治疗、评估预后提供充分的依据。

【关键词】 下生殖道; 微生物; 宏基因组鸟枪法; 高通量测序; 女性健康

【中图分类号】R 378; R 51 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-4020(2021)07-088-04

doi:10. 3969/j. issn. 1674-4020. 2021. 07. 25

Analysis of the lower genital tract microbiome of 373 women using metagenomic shotgun sequencing

Chen Ning¹, Chen Chen², Wang Xiaoyu³, Lu Ruike³, Gao Hongqin¹, Li Shaohua⁴, Hao Lilan², Ye Zhiqiang², Zhao Qian², Zhang Yunhong^{3*}

1. the Healthcare Center for Shishan Street Community of Suzhou New District, Suzhou Jiangsu 215000; 2. BGI-Shenzhen, Shenzhen Guangdong 518120; 3. the Maternal and Child Health and Family Planning Service Center of Suzhou New District, Suzhou Jiangsu 215000; 4. the Community Health Service Management Center of Suzhou New District, Suzhou Jiangsu 215000, P. R. China.

* Corresponding author, E-mail: zhang. yunh@ snd. gov. cn

【Abstract】Objective To explore the distribution of the lower reproductive tract flora of women in *Suzhou New District*, and analyze the influence of menopause and contraceptive methods on the lower reproductive tract flora. **Methods** Collected the cervical secretion samples of 373 women who participated in the "two cancer" screening in *Suzhou New District* from June to July 2018 and collected the corresponding phenotypic data. The secretion samples were analyzed by metagenomic shotgun sequencing to detect microbial flora, and the correlation between cervical microbes and phenotype was analyzed by statistical methods. **Results** *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Gardnerella vaginalis* were the most three dominated types in our cohort, with 20%, 15% and 13% of women belonged to the three types, respectively. Another 38% belonged to Diverse type (there was no obvious dominant bacteria).

There were significant differences in the types of flora between women of childbearing age and menopausal women ($P < 0.05$); there were significant differences in the vaginal flora of women who use different contraceptive methods ($P < 0.05$). **Conclusion** In this study, we used the metagenomic shotgun method to explore the spectrum of female lower genital tract flora in Suzhou New District, China, and found that vaginal microbes are related to age and choice of contraception methods. The establishment of a comprehensive and objective bioomics understanding of the female reproductive tract microorganisms will provide sufficient basis for disease diagnosis, treatment, and prognosis assessment.

【Key words】 lower reproductive tract; microorganism; metagenomic shotgun method; high-throughput sequencing; female health

女性生殖道中栖息着庞大的菌群,对女性生殖道健康起着极重要的作用。国内外研究提示,菌群失衡与不孕、早产、宫颈癌等妇科疾病有密切关系。目前基于女性生殖道微生态系统研究多局限于 16S rRNA 基因高通量测序方法研究,使用 16S rRNA 基因扩增子测序的研究在分类学上存在对微生物种水平的分辨率较低和缺乏物种特异性功能推断能力的局限性^[1]。宏基因组鸟枪法测序通过对微生物的全组 DNA 进行测序分析,可以充分发现宏基因组序列和功能差异信息,不但能了解微生物群体的多样性和丰度,还能发掘和研究具有特定功能的新基因^[2]。本研究采用宏基因组鸟枪法测序,旨在探索女性生殖道微生物组和生殖道健康相关疾病的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

招募苏州高新区 2018 年 6~7 月参与“两癌”筛查项目的女性,年龄 35~65 周岁,现场充分知情告知并签订知情同意书者入组,然后进行个人信息和样本采集,个人信息进行匿名处理。涉及临床诊断相关资料来自“两癌”筛查项目。资料和样本齐全纳入分析。

1.2 研究方法

1.2.1 样本采集和处理 医生在为入组志愿者进行妇科检查时,用无菌棉拭子在宫颈外口旋转 10~20 圈,蘸取足量分泌物,置于专用微生物保存液常温保存。两周之内寄往实验室 -80℃ 冰箱保存待 DNA 提取。

1.2.2 微生物基因组总 DNA 提取及测序 采用美基生物通用型 DNA 抽提试剂盒 (MagPure Universal DNA KF Kit) 对样本的 DNA 进行提取,将提取好的 DNA 产物用赛默飞 Qubit™ 双链 DNA 高灵敏度荧光定量试剂盒 (Qubit dsDNA HS assay kit) 进行定量。选取提取质量合格的 DNA 样本进行测序文库构建,使用 Covaris E220 非接触式超声波破碎仪进行核酸打断,Axyge 公司 AxyPrep 核酸分离试剂盒核酸纯化,赛默飞 ABI PCR 仪进行接头连接等实验操作。测序文库应用 DNBSEQ™ 测序技术在国产测序平台 DIPSEQ (华大生命科学院,深圳) 进行宏基因组鸟枪法测序 (双端测序,100bp)。

1.2.3 物种注释及菌群类型 对测序数据进行去除低质量序列、去除人源序列以及利用 MetaPhlAn2 软件进行物种注释。注释结果选取种水平进行分析,定义在一个样本中相对丰度 $\geq 50\%$ 的物种为该样本的优势种,并以此为该样本的菌群类型,没有物种的相对丰度 $\geq 50\%$ 的类型定义为混合类型 (Diverse 类型)。

1.3 统计学处理

采用 R 统计软件对检测数据进行统计学处理,计数资料以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人群分布特点

本研究通过苏州高新区“两癌”筛查项目,招募了年龄在 35~65 岁之间的 373 例女性,平均 (46 ± 7.6) 岁,年龄分布如图 1A 所示。其中绝经期女性有 96 例,占整个人群的 25.74% (图 1B)。该人群孕产史如图 1C、D 所示,几乎所有女性都有过孕产经历 ($\geq 99\%$)。对于育龄期女性,统计其半年内使用的避孕方式,依次为:避孕套 (63.10%),宫内节育器 (29.52%),结扎 (1.48%),还有 5.90% 的人群没有进行避孕 (图 1E),图 1 见彩插 2。

2.2 下生殖道菌群分布特点

373 例女性的微生物在种水平的分布情况如图 2 所示 (见彩插 2),惰性乳杆菌、卷曲乳杆菌和加德纳菌是在人群中占比最高的三种菌,以它们为主导菌 (相对丰度在样本中 $\geq 50\%$) 的,分别占人群的 20%,15% 和 13%。其中惰性乳杆菌和卷曲乳杆菌属于益生菌,它们为女性的阴道环境提供酸性环境,抑制有害菌的生长。而加德纳菌是细菌性阴道病发病密切相关的重要种属之一。人群中有 38% 的女性为 Diverse 类型,即在她们阴道内没有明显的主导菌,是由多种微生物共存的状态。此外,在人群中还检测出了有疱疹病毒 (human herpesvirus) 和 HPV 病毒 (human papillomavirus) 感染的个体。

2.3 育龄期妇女和绝经期妇女的阴道菌群比较

对育龄期妇女和绝经期女性的菌群类型进行对比,发现有明显差异。惰性乳杆菌型、卷曲乳杆菌型在绝经期女性中锐减,仅占 11.46% 和 5.21%,远低于育龄女性,而 Diverse 型绝经期明显高于育龄期,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),加德纳菌型占比与育龄期妇女占比比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),详见下页表 1。

2.4 育龄期女性不同避孕方式对阴道菌群影响

本项目研究人群中,育龄期女性主要采用避孕套和宫内节育器的避孕方式 (图 1E)。研究发现采用不同避孕方式的女性阴道菌群有明显的差异,使用宫内节育器避孕的女性 Diverse 型比例高于采用避孕套避孕的女性,加德纳菌型的占比低于采用避孕套避孕的女性,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见下页表 2。

表1 育龄期与绝经期妇女阴道菌群类型差异比较 [例(%)]

	绝经 (96 例)	育龄 (277 例)	χ^2 值	P 值
Diverse 型	48 (50.00)	96 (34.66)	6.448	0.011
惰性乳杆菌型	11 (11.46)	64 (23.10)	5.316	0.021
卷曲乳杆菌型	5 (5.21)	51 (18.41)	8.733	0.003
加德纳菌型	11 (11.46)	37 (13.36)	0.091	0.762

表2 避孕套和宫内节育器对育龄女性阴道菌群类型差异比较[例(%)]

	避孕套 (171 例)	宫内节育器 (80 例)	χ^2 值	P 值
Diverse 型	48 (28.07)	39 (48.75)	9.398	0.002
惰性乳杆菌型	40 (23.39)	18 (22.50)	2.22E-30	1
卷曲乳杆菌型	37 (21.64)	11 (13.75)	1.712	0.190
加德纳菌型	28 (16.37)	5 (6.25)	4.045	0.044

3 讨论

阴道环境是复杂的各种因素相互作用的结果。微生物与上皮细胞之间的相互作用形成黏膜免疫,微生物的组成对于维持健康的阴道环境起着独特的作用^[3]。乳杆菌被认为是最重要的阴道微生物,乳杆菌产生的乳酸维持阴道较低的 pH 值,抑制有害菌的繁殖。而目前公认的“不健康”的菌群环境,是以少乳杆菌、多厌氧菌共存的环境,微生物的物种多样性较高^[4]。“不健康”的菌群环境会导致生殖道感染及增加一些妇科疾病的发生概率,如细菌性阴道病、性传播疾病、早产等^[5-7]。目前对下生殖道的研究大多采用 16S rRNA 基因测序,同时主要集中于对育龄期女性的菌群分析。Ravel 等^[8]对 396 例来自 5 个种族的育龄女性的阴道菌群进行 16S rRNA 基因测序,发现阴道菌群主要分为5 种类型,四种以乳杆菌为主,分别是卷曲乳杆菌、惰性乳杆菌、詹氏乳杆菌、加氏乳杆菌,以及第 5 种是以低乳杆菌,高比例的厌氧菌为主,包括加德纳菌、阴道阿托波氏菌、二路普雷沃尔菌等多种菌并存(Diverse 型)。其中 Diverse 型被认为是“不健康”的菌群环境,更容易导致阴道炎症的发生。他们的研究结果同时也显示,不同的种族,在阴道菌群上也呈现差异。对于 96 例亚洲女性来说,惰性乳杆菌型比例最高,占人群的 42.7%。卷曲乳杆菌型和 Diverse 型分别占 25% 和 19.8%。Chen 等^[9]对 110 例育龄期女性上下生殖道多个部位进行采样,并分析不同部位之间菌群的差异,结果显示,同一个体阴道 1/3 处、阴道后穹隆以及宫颈管的菌群相似度非常高,而宫颈管作为一个连接上下生殖道的关键部位,其菌群具有更大的预测子宫类疾病的潜能,如对子宫内膜异位症导致的不孕、子宫肌瘤病等患病可能性的预测。因此,本研究主要以宫颈菌群为代表来研究下生殖道菌群。

相比于目前国内外在下生殖道菌群的研究情况,本研究选取的研究对象具有更大的年龄跨度(35 ~ 65 岁),包含育龄期女性和绝经期女性。此外,国内外对于

生殖道菌群的研究多采用 16S rRNA 基因的高通量测序,而 16S rRNA 基因扩增测序法在技术上具有很多的局限性,其一,依赖于 PCR 扩增存在一定的偏向性;其二,读长只覆盖该基因的部分高变区,短序列很难从种或亚种水平进行区分;其三,检测的对象均为细菌,无法达到细菌、真菌、古生菌、病毒等所有微生物全覆盖。由于生殖道样本具有极高的宿主率(约 99%),使获得足够有效宏基因组数据量的研究成本大幅度提高,大规模宏基因组研究难以开展。目前已公开发表的数据中女性下生殖道的宏基因组数据总和不足千例,而对中国女性的下生殖道宏基因组数据仅有一篇 2018 年 Li 等^[10]发表在自然通讯(Nature Communications)上。本研究采用宏基因组鸟枪法测序技术,从细菌、真菌、病毒等多维度系统描绘苏州地区的女性下生殖道菌群结构,目前国内使用此法研究基本空白,因此采用此技术是本研究项目的一个创新点和突破点。

本研究结果发现苏州高新区女性生殖道菌群主要为 4 种类型,惰性乳杆菌型、卷曲乳杆菌型、加德纳菌型和 Diverse 类型,分别占人群的 20%、15%、13% 和 38%。与 Ravel 只针对育龄期女性下生殖道菌群结果相比,本人群中乳杆菌型比例大大降低,这与其中包含约 1/4 比例的绝经期女性有关。此外,本研究在检测中还发现在以前研究中罕有报道的一些非细菌的信息,如病毒(pepper vein yellows virus),疱疹病毒(human herpesvirus),HPV 病毒(alpha papillomavirus)等,这些非细菌信息的检测丰富了女性生殖道微生态图谱。本研究人群中,有 39 例女性在两癌筛查中 HPV 呈现阳性,而基于宏基因组鸟枪法测序结果对 HPV 病毒也能直接检出,这提示后续可通过该方法将 HPV 与其他微生物相组合,寻找某种能提高宫颈癌发生发展预测准确性的标志物组合,从而提高宫颈癌的筛查效率。

此外,本研究中还收集了孕产史、绝经情况、避孕方式等表型信息,研究结果发现阴道微生物与年龄、避孕方式的选择有密切的关联。绝经期女性生殖道菌群中的乳杆菌型即惰性乳杆菌型和卷曲乳杆菌型比育龄期女性中的占比明显减少,而多为 Diverse 型。说明绝经期女性乳杆菌含量降低,阴道的酸性环境减弱,开始出现多种菌并存的现象,不同于育龄期女性的菌群结构比较健康,多以乳杆菌为主。这也与目前相关研究显示未绝经期的女性比绝经期的女性的微生物更单一,乳酸菌含量比绝经期女性更高的结果一致,未绝经期妇女的雌激素水平较高,较高的雌激素和糖原水平会促进阴道分层鳞状上皮和保护性黏液层的厚度增加,而充足的糖原为乳杆菌提供营养,从而维持乳酸菌在较高水平,乳杆菌分泌乳酸,维持阴道较低的 pH,从而抑制各种有害菌的生长。绝经后,雌激素水平下降,糖原和阴道上皮减少,乳酸杆菌含量开始减少,pH 相对增高,导致各种杂菌在种类和含量都有所增加^[11],从微生物菌群角度描绘绝经期女性生殖道健康状态,并降低其他(下转第 93 页)

于 QT 间期延长的患者,其围术期 QT 间期的监测以及尽可能避免使用延长 QT 间期的药物是十分重要的。

对于妊娠合并心力衰竭的危重患者,该病例围术期监测不够精确,这可能导致麻醉医生无法对患者情况进行准确的判断并及时采取相应的处理。容量监测,可行中心静脉穿刺置管,一方面可用于中心静脉压的监测,指导围术期液体的管理,另一方面可用于血管活性药物的泵注,同时应密切关注术中尿量;心排量监测,可使用 PICCO 监测仪或无创心排量监测仪来监测每搏量、心指数、外周血管阻力等,更好地了解患者循环状态;麻醉深度监测,如脑电图双频指数等;体温监测;此外,还可以行抗伤害刺激监测。术中应及时行血气分析,了解患者电解质及酸碱平衡,适时进行纠正补充。这些监测不仅在麻醉和手术过程中需要,在术后同样重要。

因此,对于妊娠合并心力衰竭的危重产妇,围术期应加强监测,尽量避免任何应激反应的刺激,维持心肌氧供需平衡,同时避免使用延长 QT 间期的药物,注意 QT 间期的监测,适当补充镁离子及钾离子,维持循环的稳定。

【参考文献】

- [1] Nagele P, Pal S, Brown F, et al. Postoperative QT interval prolongation in patients undergoing noncardiac surgery under general anesthesia [J]. *Anesthesiology*, 2012, 117(2): 321-328.
- [2] Uvelin A, Pejaković J, Mijatović V. Acquired prolongation of QT interval as a risk factor for torsade de pointes ventricular

tachycardia: a narrative review for the anesthesiologist and intensivist [J]. *Journal of Anesthesia*, 2017, 31(3): 413-423.

- [3] Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, et al. Risk stratification in the long-QT syndrome [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348(19): 1866-1874.
- [4] 中华医学会心血管病学分会心律失常学组, 中华心血管病杂志编辑委员会, 中国心脏起搏与电生理杂志编辑委员会. 获得性长 QT 间期综合征的防治建议 [J]. *中国心脏起搏与电生理杂志*, 2010, 38(11): 961-1004.
- [5] Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, et al. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine [J]. *JAMA*, 1993, 269(12): 1532-1536.
- [6] 刘金永, 葛卫红, 周长江. 抗菌药物心脏毒性研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(19): 1696-1699.
- [7] Heesen M, Kloehr S, Hofmann T, et al. Maternal and foetal effects of remifentanyl for general anaesthesia in parturients undergoing caesarean section: a systematic review and meta-analysis [J]. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 2013, 57(1): 29-36.
- [8] Kumakura M, Hara K, Sata T. Sevoflurane-associated torsade de pointes in a patient with congenital long QT syndrome genotype 2 [J]. *Journal of Clinical Anesthesia*, 2016, 33(9): 81-85.
- [9] Saarnivaara L, Lindgren L. Prolongation of QT interval during induction of anaesthesia [J]. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 1983, 27(2): 126-130.
- [10] Blair JR, Pruett JK, Crumrine RS, et al. Prolongation of QT interval in association with the administration of large doses of opiates [J]. *Anesthesiology*, 1987, 67(3): 442-443.

(收稿日期: 2021-01-11 编辑: 杨叶)

(上接第 90 页)

感染疾病的风险或为临床关注和研究提供新的理论和证据。另外本研究结果显示, 不同的避孕方式(如男用避孕套和宫内节育器)也会引起生殖道微生物的变化。相对于使用宫内节育器女性, 使用避孕套的女性卷曲乳杆菌型占比增多, 同时多种杂菌减少, 即 Diverse 型降低, 这与之前的研究保持一致^[12], 这种避孕方式对于女性的阴道菌群健康更加有利, 能更好地维持阴道菌群健康。本研究从下生殖道菌群的角度出发, 为女性在避孕方式的选择上提供指导。

越来越多证据表明, 生殖道微生物群在妇女健康和生殖功能的重要性。本研究通过宏基因组鸟枪法对中国苏州高新区女性的下生殖道菌群进行了分析, 构建了比较完整的阴道微生物图谱。同时发现一些影响菌群变化的因素, 如绝经、避孕方式, 为后续女性生殖道与妇科疾病的关联分析提供了重要的参考依据。

【参考文献】

- [1] Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing [J]. *PLoS biology*, 2008, 6(11): e280.
- [2] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.

- [3] Younes JA, Lievens E, Hummelen R, et al. Women and their microbes: The unexpected friendship [J]. *Trends in microbiology*, 2018, 26(1): 16-32.
- [4] Gopinath S, Iwasaki A. Cervicovaginal microbiota: simple is better [J]. *Immunity*, 2015, 42(5): 790-791.
- [5] Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66(1): 371-389.
- [6] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(20): 1500-1507.
- [7] Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, et al. Diversity of the Vaginal Microbiome Correlates With Preterm Birth [J]. *Reproductive Sciences*, 2014, 21: 32-40.
- [8] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(Supplement 1): 4680-4687.
- [9] Chen C, Song X, Wei W, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 875.
- [10] Li F, Chen C, Wei WX, et al. The metagenome of the female upper reproductive tract [J]. *Gigascience*, 2018, 7(10): giy107.
- [11] Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM. Menopause and the vaginal microbiome [J]. *Maturitas*, 2016, 91(9): 42-50.
- [12] Ma L, Lv Z, Su J, et al. Consistent condom use increases the colonization of *Lactobacillus crispatus* in the vagina [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70716.

(收稿日期: 2020-05-29 编辑: 杨叶)