

第二代高通量测序技术对孕晚期阴道菌群研究的应用前景

郭珊珊 综述 刘继红, 郑倩文 审校

昆明医科大学第二附属医院产科, 云南 昆明 650101

【摘要】 近几年来,孕晚期阴道菌群变化对母婴的影响方面一直是各临床工作者关注的重点问题。通过传统培养方法和非培养方法,现已证实妊娠晚期阴道菌群变化与母婴不良妊娠结局存在相关性,但对于妊娠晚期阴道菌群结构变化的认识尚存在局限性。本文主要根据近年阴道菌群方面的研究进展,探讨第二代高通量测序技术对妊娠晚期阴道菌群变化研究的应用前景,以期对孕妇孕期阴道微生态异常的早期识别、治疗等提供新的理论依据和方法。

【关键词】 第二代高通量测序;妊娠晚期;阴道菌群;妊娠结局;细菌性阴道病

【中图分类号】 R714.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)09-1191-04

Application prospects of the second generation high-throughput sequencing technology in the study of vaginal flora in the third trimester. GUO Shan-shan, LIU Ji-hong, ZHENG Qian-wen. Department of Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan, CHINA

【Abstract】 In recent years, the impact of vaginal flora changes on mothers and infants in the third trimester of pregnancy has been a major concern of clinicians. Through traditional culture methods and non-culture methods, it has been confirmed that there is a correlation between changes in vaginal flora in late pregnancy and adverse pregnancy outcomes in mothers and infants, but there are still limitations to understanding the changes in vaginal flora structure in late pregnancy. Based on the research progress of vaginal flora in recent years, this article explores the application prospects of the second-generation high-throughput sequencing technology for the study of changes in vaginal flora in late pregnancy, with a view to providing theoretical basis and methods for the early identification and treatment of vaginal microecological abnormalities during pregnancy.

【Key words】 Second generation high-throughput sequencing; Late pregnancy; Vaginal flora; Pregnancy outcomes; Bacterial vaginosis

在正常情况下,阴道微生态中的主要优势菌是乳杆菌,其占阴道菌群总量的95%^[1-2],乳杆菌与其他微生物共同维持阴道微环境的平衡,正常情况下不会致病^[3]。然而孕晚期孕妇由于雌激素增多、免疫降低等原因导致阴道菌群紊乱,从而引发生殖道炎症感染,甚至引起一系列早产、胎膜早破、新生儿感染等不良妊娠结局^[4],严重影响母婴的存活质量。因此,研究孕期阴道微生态对母婴的影响是目前临床关注的重点问题。研究阴道微生态关键在于对阴道菌群进行分析,但现阶段临床对阴道菌群的认识大多基于传统的白带涂片、培养、生化鉴定等方法^[5]。据相关文献报道,人体内的细菌仅有约10%能在实验室中培养,且大多数细菌是厌氧菌,其培养的营养条件也十分苛刻^[6-7]。近几年来,妇产科学者已通过传统培养方法证实妊娠晚期阴道菌群变化与母婴感染具有相关性,但对于妊娠晚期阴道感染所致不良妊娠结局的菌群结构认识尚存在局限性和不完整性^[8-9]。随着分子生物学技术的飞速发展,非培养方法在阴道微生态的研究中取得显著效果,第二代高通量测序技术越来越多在临床得以应用,该技术的应用将对了解妊娠晚期阴道菌群结构及其变化对母婴的影响提供新的方向^[10]。

1 研究阴道微生态的非培养方法

近年来随着微生物技术的不断发展,各种非培养方法越来越多的运用于检测阴道微环境,且各有优缺点。PCR与变性梯度凝胶电泳分析相结合的技术(polymerase chain reaction--denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)^[11]是比较微生物菌群多样性以及微生态环境变化的一种高效可靠的方法。该方法最大的优点是可以检测出不能培养的微生物,且检出率高,不需要培养微生物,可通过特殊的超声波及不断研磨的方法直接提取DNA,然后对16S rDNA基因的可变区序列利用PCR扩增、梯度凝胶电泳的方法,最后检测出难以培养或者不能被培养的微生物,进而反映出阴道微生态的多样性。但是它需借助相关仪器进行操作,受影响的因素较多,重复性差,劳动强度和技术要求相对较高。

实时荧光定量PCR技术(real-time quantitative PCR, qPCR)^[12]是在PCR整个反应过程中加入荧光信号,再探测PCR全过程,之后再用标准曲线对未知样本模板分析,再通过检测该未知模板的荧光量,进而确定样本的核酸量,这样说来它也算是一种核酸定量技术。它的优点是简单、快速、高效,而且特异性与灵

敏性特别高,但是该技术也有一定缺点,如不能检测未知菌属,也不能分析未知菌属的动态变化。

基因芯片技术(gene-chip)基因芯片又称 DNA 芯片,它是根据细菌共有的 16S rRNA 基因的高度保守性来检测病原菌的。基因芯片技术具有高效、高速,且能定量,重复测序的优点。但同样该技术不能测定未知物种,而且在定量方面较局限,成本也相对较高,限制了临床应用^[13]。

Sanger 法测序在过去几十年一直占主导地位,该技术与后来在此基础上发展而来的其他 DNA 测序统为一代 DNA 测序^[14]。该方法测序长,结果准确,但成本高昂,操作过程繁琐,重复性差,不能自动化,更主要的是不能进行大规模的测序。

高通量测序技术又称“下一代”测序技术,顾名思义,它是在传统 Sanger 测序的基础上变革而来。它能一次对数百万条核酸分子进行序列测定,也可以对某一微生物的转录组和基因组进行全面彻底的分析。最近几年涌现的研究人体微生物的高通量测序技术平台主要是 Roche 454 焦磷酸测序、Illumina Solexa 测序平台等。要想全面分析微生物群的多样性,首先在于获取 16S rRNA 基因序列^[15]。16S rRNA 是现在用作细菌分类和鉴定的最常用的基因。学者张瑞芬等^[16]指出,16S rRNA 基因是各细菌所共有的,其基因序列有保守区和可变区两种类型,几乎所有细菌保守区序列都是恒定的,而可变区在不同菌种、属间存在一定程度的差异。由于可变区具的差异性,从而可对各菌种、属的细菌进行分类和鉴定。传统的测序技术获取 16S rRNA 基因序列有限,而第二代高通量测序技术能快速大量获取该基因,且测序更长。XU 等^[17]提出对细菌 16S rRNA 基因进行高通量测序可以获得更准确的微生物组定性和定量信息,而且读起来很短,性价比高。高通量测序技术可全面深入了解阴道菌群环境,而且还可以发现未知的细菌,据此可进一步探讨孕晚期阴道菌群结构及其与不良妊娠结局的相关性。

2 第二代高通量测序技术在阴道微生态方面的研究进展

当人体处于健康状态时,阴道内的微生物主要是厌氧菌与需氧菌,其中厌氧菌数量是需氧菌的 5 倍,这些正常阴道微生物与宿主、环境之间处于相互制约的动态平衡状态。当女性处于妊娠期时,由于菌群紊乱,易引起生殖道感染。邓玉娟等^[18]指出,怀孕期间阴道菌群紊乱的发生率远比非孕期高,而且通过对比在孕早期、中期和晚期菌群失调情况,未发现统计学意义。张仕茜等^[19]提出,女性孕期由于微生态失衡,易引起生殖道炎症感染,且最常见的阴道炎有阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)、细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)、滴虫性阴道炎(trichomonal vaginitis, TV)等。学者黄璐^[20],马菁雯等^[21]基于传统的培养方法提出在妊娠晚期菌群失调中所占比例最多

的是假丝酵母菌,这导致产褥感染、新生儿感染、胎膜早破的发生率增加,但对于 VVC、BV、TV 等阴道菌群变化的多样性及结构并未进一步说明。这些学者利用传统培养方法研究妊娠期晚期阴道微生态的变化始终存在局限性,因此,利用当前更为高效、高速的第二代高通量测序技术研究孕晚期阴道菌群结构显得尤为必要。

欧阳才颜^[22]通过利用第二代高通量测序技术研究阴道菌群结构,结果提出正常育龄期妇女阴道菌群结构以卷曲乳杆菌为优势菌,而惰性乳杆菌比例极低。传统的观点认为 VVC 阴道内大部分为乳杆菌,其结构类似于健康育龄妇女,但他通过 Illumina 测序发现有别于传统的新观点,VVC 患者的阴道菌群结构更为复杂,且个体差异较大,其阴道内乳杆菌下降,加德纳菌、普氏菌属、双歧杆菌等厌氧菌大量增加,抑制了乳酸杆菌的增长,从而降低了乳酸含量,引起阴道内 PH 增加,阴道自净作用减弱,使得假丝酵母菌得以大量繁殖,从而加剧阴道菌群失调。此外,他也指出经过治疗后,VVC 患者临床症状虽消失,但大部分阴道菌群没有恢复到以乳酸杆菌为主导的正常状态;除此,他也提出惰性乳杆菌易增加女性患 BV 的风险,并且惰性乳杆菌在 BV 患者中处于优势地位。

郭双双^[23]利用高通量测序技术发现,在 TV 女性阴道内乳酸菌属较正常对照组的减少,而纤毛菌属、普雷沃菌属等厌氧菌比正常对照组的增多。此外,她提出较之传统方法,高通量测序技术能更全面、准确地反应阴道微生态结构及变化。VIRTANEN 等^[24]调查了 50 例无症状女性中巴氏涂片的显微镜检查结果与通过下一代测序确定的阴道微生物群组成之间的对应关系,结果显示巴氏涂片镜检对细菌性阴道病的诊断灵敏度为 43.1~59.4%,特异性为 83.3~93.6%,但是无法区分乳杆菌种或鉴定混合菌中的细菌,利用第二代高通量测序技术分析的细菌群落更能确定阴道菌群的多样化,能达到 99% 的覆盖率,几乎能检测到阴道内的所有细菌种类。

PETROVA 等^[25]通过 Illumina 测序发现,惰性乳杆菌经常出现在阴道生物群,该物种在阴道健康中的作用尚不清楚,因为在正常情况以及在阴道功能异常都能发现,他提出惰性乳杆菌的存在可能与维持阴道内正常的 pH 值环境有关。这一观点与欧阳才颜的观点不同,欧阳认为正常阴道菌群结构确实以卷曲乳酸杆菌为主,但惰性乳杆菌的含量极低,且惰性乳杆菌与阴道菌群异常相关,到底结论如何,这有待进一步研究证实。除此,SOUZA 等^[26]也发现阴道炎症感染者用甲硝唑治疗后,阴道菌群的多样性显著下降,但是很少能恢复到以乳杆菌为主导的平衡状态。

通过以上论述可知,由于阴道内大多数为厌氧菌,通过传统的培养方法和普通的非培养方法很难明确阴道微生态结构,更难以个体化的分析在妊娠不同

时期阴道菌群的差异性^[27]。第二代高通量测序技术可深入了解到正常阴道菌群结构及VVC、BV、TV患者等的菌群变化,发现新观点、新认识,因此,利用该技术也可深入了解孕期阴道菌群结构。

3 第二代高通量测序技术对妊娠晚期菌群变化研究的前景

基于第二代高通量测序技术具备的优良条件及上述各学者利用该技术对非孕期VVC、BV、TV等患者的菌群结构的研究进展,目前同样可对妊娠晚期阴道菌群结构进行高通量测序分析。在妊娠晚期因各种因素影响下,是否会导致阴道内正常存在的卷曲乳杆菌降低及阴道内其他的加氏乳杆菌、加德纳菌、普氏菌属等厌氧菌的增加,从而导致阴道菌群多样性增加及菌群结构改变,这些目前尚没明确的报道。就如YERUVA等^[28]学者提出,不同的乳杆菌与正常的阴道微菌群的存在是决定阴道微生物菌群稳定性的主要因素,其中卷曲乳杆菌促进了正常阴道菌群的稳定性,而加氏乳杆菌或惰性乳杆菌则在一定程度上导致了异常的阴道微生物群落的出现,在孕期这些菌群如何变化有待于进一步研究。另外,在通过使用抗生素治疗后患者虽症状消失,但阴道菌群一定时间内并未恢复到正常状态,所以无症状感染组与不良妊娠结局可能存在相关性,这也有待于证实。

于慧君等^[29]学者发现,在妊娠晚期孕妇由于阴道菌群紊乱引发的阴道感染中,有炎症感染症状组发生胎膜早破、早产、新生儿感染等方面的疾病显著高于无症状组,而无症状组与正常对照组的妊娠结局无明显差别。国外的SUBTIL等^[30]学者指出在孕期患有阴道炎的孕妇,其有临床感染症状者比起正常对照组更容易发生不良妊娠结局,其对84 530名孕妇进行了筛查,其中5 630例患有细菌性阴道病,发现感染者更易出现流产或自然早产。黄镇华等^[31]也提出与上述作者相同的观点,除此,他还指出无症状感染组较之正常对照组易发生产褥感染,这也有待进一步研究。

由于目前尚未明确证实无症状感染组与母婴不良妊娠结局的相关性,因此,可利用第二代高通量测序技术检测有症状感染者和无症状感染者的阴道菌群结构变化,同时无症状组与妊娠晚期母婴不良妊娠结局的关系也可能得以证实。

4 结语

第二代高通量测序技术因为成本较高,现在还仅仅局限在科学研究,尚不能广泛运用于临床研究,而且现阶段国内外在妊娠晚期利用该技术研究阴道微生物生态的相关文献也相对较少。随着第二代高通量测序技术的不断发展与完善,相信未来能更广泛的应用于临床研究,为妊娠晚期阴道微生态的研究提供新的方法和依据,进而评估孕晚期母婴感染的风险、评价疗效、预测复发等,以此减少母婴感染发生率,提高母婴生命质量。

参考文献

- [1] 蒋楠, 吕时铭. 重视阴道微生态平衡失调的另一种形式[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4): 254-255.
- [2] 张展, 张岱, 肖冰冰, 等. 高危型HPV感染与阴道菌群及子宫颈菌群关系的初步研究[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(7): 471-480.
- [3] 张瑞, 吴文湘, 桑佳特. 甲硝唑对阴道乳杆菌增殖影响的体外研究[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(4): 361-364.
- [4] 蒋建峰, 吴芬英, 倪惠娟, 等. 不同治疗方案对细菌性阴道感染妇女妊娠结局的影响研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(14): 2162-2164.
- [5] WITKIN SS. Vaginal microbiome studies in pregnancy must also analyse host factors [J]. BJOG, 2018, 126(3): 359.
- [6] JIMENEZ A, SANCHEZ A, REY A, et al. Recovery of aerobic and anaerobic bacteria from patients with acute appendicitis using blood culture bottles [J]. Biomedica, 2019, 39(4): 699-706.
- [7] GUINDO CO, TERRER E, CHABRIERE E, et al. Culture of salivary methanogens assisted by chemically produced hydrogen [J]. Anaerobe, 2019, 61: 102128.
- [8] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组. 阴道微生态评价的临床应用专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(10): 721-723.
- [9] 杨晓帆, 黄美霞, 闵凌慧. 妊娠中晚期阴道菌群紊乱对妊娠结局的影响[J]. 海南医学, 2018, 29(5): 641-642.
- [10] SIDDIQUE A, SUCKOW G, BAHENA J, et al. RipTide ultra high-throughput rapid DNA library preparation for next generation sequencing [J]. J Biomol Tech, 2019, 30(Suppl): S36.
- [11] 曹文婷, 罗雯, 刘鑫, 等. 稳定过表达/下调表达miR-125b-5p Jurkat T细胞株的建立及验证[J]. 中华全科医学, 2019, 17(10): 1631-1633.
- [12] 夏菁, 徐丽艳, 刘雪兰, 等. 5-氮胞苷对大鼠脂肪间充质干细胞的诱导分化作用及相关蛋白的表达[J]. 中华全科医学, 2019, 17(4): 557-560.
- [13] MUHAMMAD II, KONG SL, AKMAR AS, et al. RNA-seq and ChIP-seq as complementary approaches for comprehension of plant transcriptional regulatory mechanism [J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): E167.
- [14] 皮亚雷, 张亚男, 崇禾萌, 等. 先天性脂质质性肾上腺增生症临床及StAR基因突变分析[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(6): 684-687.
- [15] 郑慧娟, 白晓晖, 高旭, 等. 双歧杆菌属特异性测序引物筛选及优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1736-1747.
- [16] 张瑞芬, 朱宝利. 阴道菌群与细菌性阴道病研究进展[J]. 传染病信息, 2015, 28(4): 203-206.
- [17] XU H, ZHANG X, YAO W, et al. Characterization of the vaginal microbiome during cytolytic vaginosis using high-throughput sequencing [J]. J Clin Lab Anal, 2019, 33(1): e22653.
- [18] 邓玉娟, 谢汉彬. 妊娠中晚期阴道菌群与妊娠结局的相关性研究[J]. 河北医学, 2014, 20(6): 897-900.
- [19] 张仕茜, 杨旭. 妊娠期外阴阴道假丝酵母菌病发病机制的研究概述[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(5): 617-620.
- [20] 黄璐. 妊娠晚期患者阴道菌群与妊娠结局的关系[J]. 当代医学, 2016, 22(7): 85-86.
- [21] 马菁雯, 赵艳. 妊娠晚期阴道菌群与妊娠结局的关系[J]. 中国社区医师, 2016, 32(34): 126-127.
- [22] 欧阳才颜. 第二代高通量测序分析VVC及RVVC患者阴道菌群结构[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [23] 郭双双. 16S rDNA高通量测序分析滴虫性阴道炎患者阴道菌群多样性[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [24] VIRTANEN S, RANTSI T, VIRTANEN A, et al. Vaginal microbiota composition correlates between pap smear microscopy and next generation sequencing and associates to socioeconomic status [J]. Sci

乙酰唑胺治疗慢性高原病的疗效与安全性的 Meta 分析

郝玉姣, 高飞燕, 孙琳, 张元元

大理大学临床医学院内科, 云南 大理 671000

【摘要】 目的 系统评价乙酰唑胺(ACZ)治疗慢性高原病的疗效与安全性。方法 计算机检索 PubMed、EMbase、CoChrane Library、中国知网(CNKI)、万方数据库、维普等数据库,检索时限为建库至 2019 年 12 月。收集相关 ACZ 治疗慢性高原病的随机对照试验(RCTs)文献,根据 Cocharane 偏倚风险评价工具对纳入文献进行质量评价,设计数据提取表,数据提取、转化、核查、修改。采用 Review Manager 5.3 软件对数据进行 Meta 分析。结果 初步检索获得文献 301 篇(英文 294 篇,中文 7 篇),经过 EndNote 软件去除重复文献 113 篇,通过阅读文题和摘要排除不符合纳入标准的文献 161 篇,经过阅读全文、剔除数据不全文献,最终纳入 4 篇文献(英文 4 篇,中文 0 篇),纳入的总样本数 147 例,其中实验组 82 例,对照组 65 例。Meta 分析结果显示:ACZ 250 mg 治疗慢性高原病,可以降低 HCT (mean difference=-2.91; 95%CI: -4.55~-1.28; $P<0.001$)、降低 PCO_2 (mean difference=-4.60; 95%CI: -5.88~-3.33; $P<0.001$)、升高 PO_2 (mean difference=2.39; 95%CI: 0.99~3.80; $P<0.001$),与安慰剂组比较差异有统计学意义;降低 CMS 评分,但与安慰剂组比较差异无统计学意义(mean difference=-0.27; 95%CI: -2.52~1.99; $P>0.05$)。ACZ 250 mg 与 ACZ 500 mg 治疗慢性高原病均可提升 PO_2 、降低 PCO_2 ,但两者比较差异无统计学意义(mean difference=-0.41; 95%CI: -2.75~1.94; $P>0.05$)。ACZ 治疗慢性高原病过程中不良反应轻微。结论 ACZ 250 mg 治疗慢性高原病能降低红细胞数量,提高氧合,疗效明显;ACZ 250 mg 与 ACZ 500 mg 治疗慢性高原病,疗效无差异;ACZ 治疗慢性高原病不良反应少,安全可靠。

【关键词】 乙酰唑胺;慢性高原病;疗效;安全性;Meta 分析**【中图分类号】** R594.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)09-1194-07

Efficacy and safety of acetazolamide in the treatment of chronic mountain sickness: a meta-analysis. HAO Yu-jiao, GAO Fei-yan, SUN Ling, ZHANG Yuan-yuan. Department of Internal Medicine, School of Clinical Medicine, Dali University, Dali 671000, Yunnan, CHINA

【Abstract】 Objective To evaluate the efficacy and safety of acetazolamine in the treatment of chronic hyperplasia. **Methods** Articles published before Dec., 2019 were searched from PubMed, EMbase, CoChrane Library, China Knowledge Network (CNKI), Wanfang database, VIP, and other databases, and the randomized controlled trials (RCTs) related to acetazolamine in the treatment of chronic hyperplasia were collected. Review Manager 5.3 software was used to perform meta-analysis. **Results** A total of 301 literatures (294 English literatures and 7 Chinese literatures) were obtained, of which 113 duplicate literatures were removed by EndNote software, 161 articles that did not meet the inclusion criteria were excluded by reading questions and abstracts, and 4 literatures (4 English literatures, 0 Chinese literatures) were finally included by reading the full text and eliminating incomplete data. The 4 literatures involved 147 cases, including 82 cases in the experimental group and 65 cases in the control group. Meta-analysis showed that acetazolamide 250 mg in the treatment of chronic high altitude disease can reduce HCT (mean difference=-2.91; 95%CI: -4.55 to -1.28; $P<0.001$), decrease PCO_2 (mean difference=-4.60; 95%CI: -5.88 to -3.33; $P<0.001$), increase PO_2 (mean difference=2.39; 95%CI: 0.99 to 3.80; $P<0.001$), and slightly decrease CMS score (mean difference=-0.27; 95%CI: -2.52 to

基金项目:云南省科技厅高校联合面上项目基金(编号:2017FH001-079)

通讯作者:张元元, E-mail: 752048860@qq.com

- Rep, 2019, 9(1): 7750.
- [25] PETROVA MI, REID G, VANECHOUTTE M, et al. Lactobacillus iners: friend or foe? [J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(3): 182-191.
- [26] SOUZA RO, HENRIQUE DLT, OREFICE RL, et al. Amphotericin B-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibers: an alternative therapy scheme for local treatment of vulvovaginal candidiasis [J]. J Pharm Sci, 2018, 107(10): 2674-2685.
- [27] 董梦婷, 李星烁, 王辰, 等. 乳酸维持正常阴道微生态的研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(4): 311-315.
- [28] YERUVA T, RAJKUMAR H, DONUGAMA V. Vaginal lactobacilli profile in pregnant women with normal & abnormal vaginal flora [J]. Indian J Med Res, 2017, 146(4): 534-540.
- [29] 于慧君, 袁巧娜, 韩聪慧, 等. 妊娠晚期生殖道感染与妊娠结局的相关性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(1): 98-101.
- [30] SUBTIL D, BRABANT G, TILLOY E, et al. Early clindamycin for bacterial vaginosis in pregnancy (PREMEVA): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2018, 392(10160): 2171-2179.
- [31] 黄镇华, 梁绮华, 高坎坎, 等. 妊娠晚期阴道菌群与妊娠结局的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(15): 2111-2112.

(收稿日期:2019-11-11)