

抑制阴道加德纳菌的乳杆菌的筛选及其抑菌机制的研究

张 瑞¹,马爱昕¹,王君竹²,李 昶¹,尹海旭¹,白会会³,刘朝晖³

摘要 目的 筛选对阴道加德纳菌增殖有抑制功能的阴道乳杆菌菌株,探讨阴道乳杆菌菌株抑制加德纳菌的可能机制,为开发用于细菌性阴道病(BV)治疗的益生菌菌株提供先决条件。方法 分别从BV患者和健康女性阴道分泌物中分离阴道加德纳菌菌株和乳杆菌菌株,通过 spot on lawn 法筛选有抑制阴道加德纳菌增殖的乳杆菌菌株,用双层牛津杯法对比乳杆菌菌液、上清液、菌体对阴道加德纳菌菌株抑制作用的差别。结果 从20例健康女性阴道分泌物中获得62株阴道乳杆菌菌株,分属于6个菌种,其中18株有抑制阴道加德纳菌的作用。通过对18株有抑菌效应的乳杆菌菌株的不同成份(菌液、菌体、上清液)研究表明,其菌液、菌体和上清液均有抑菌效应,菌液的抑菌效应明显大于上清液组。上清液经过蛋白酶K处理之后,8份标本的抑菌效果消失,10份标本的抑菌效果明显减弱。结论 该研究共纯化和鉴定阴道乳杆菌菌株62株,其中18株具有抑制阴道加德纳菌增殖的功能。产生蛋白类抑菌物质可能参与了阴道乳杆菌抑制阴道加德纳菌增殖的机制。

关键词 抑菌功能;抑菌蛋白;阴道乳杆菌;阴道加德纳菌;细菌性阴道病

中图分类号 R 711.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1962-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.027

细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)是最常见的女性下生殖道感染之一^[1],主要表现为阴道微环境中的乳杆菌大幅减少、以阴道加德纳菌为代表的厌氧菌大量增殖^[2]。研究^[3]表明:BV与盆腔炎、不孕、不育、流产、早产、新生儿感染和宫颈HPV感染等多种疾病的发生有关。关于BV的发病机制研究持续了很多年,但究竟是乳杆菌减少导致厌氧菌

增殖,还是厌氧菌的增殖导致乳杆菌的减少,一直没有明确的结论。有些研究认为是乳杆菌减少,厌氧菌伺机获得增殖机会,占据主导地位;研究^[4-5]表明不同的阴道微环境类型,会导致阴道上皮细胞的基因表达产物的种类和数量有所不同,产生和释放的生物活性物质的种类和数量不同,对微环境的保护能力存在差别。目前尚不清楚健康女性乳杆菌的各个菌种是否均对阴道加德纳菌增殖有抑制作用。以往研究对筛选具有抑制阴道加德纳菌的乳杆菌的研究较少。该研究将从人体分离乳杆菌菌株、阴道加德纳菌菌株,通过体外实验探讨中国健康女性阴道乳杆菌菌株对阴道加德纳菌的增殖的抑制效果,并对可能的机制做初步探讨。

1 材料与方法

1.1 病例资料 BV人群:2021年11月—2022年6月在北京大学第一医院门诊就诊的18~45(28.0±2.1)岁、阴道微生态 Nugent 评分大于6分的育龄期女性。排除标准:①处于月经期;②1个月内使用抗生素或者抗真菌药物者;③1个月内口服或者外用避孕药者;④48h内曾经阴道用药或者阴道冲洗者;⑤半年内曾经被诊断过阴道其他感染性疾病,如外阴阴道假丝酵母菌病、滴虫性阴道炎。

健康女性人群:同期在北京大学第一医院体检中心体检的无自觉症状和疾病的健康女性。排除标准:①近1周内阴道用药者;②1月内用过抗生素或抗真菌药者;③2周内有任何不适;④半年内被诊断过下列任何一种疾病者:盆腔炎,宫颈炎,阴道炎,其他妇科炎症性疾病(支原体、衣原体、淋病、梅毒等);⑤性伴侣近期被诊断过患性传播疾病者(支原体、衣原体、淋病、梅毒);⑥妇科检查发现阳性体征者。

该研究获得北京大学第一医院伦理委员会批准(批准号:2017研92),所有志愿者均自愿签署知情同意书。

1.2 菌株分离、纯化和鉴定

1.2.1 阴道乳杆菌的分离和纯化 ①无菌棉拭子取健康女性阴道侧壁中1/3分泌物,涂MRS琼脂平

2023-05-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81471420);教育部博士点新教师基金(编号:20130001120051)

作者单位:¹北京大学第一医院妇产科,北京 100034

²北京大学政府管理学院大数据与公共政策实验室,北京 100091

³北京妇产医院妇产科,北京 100006

作者简介:张 瑞,男,博士研究生;

刘朝晖,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:23662161@qq.com

板,37℃厌氧培养48h。挑菌落,涂片,革兰染色,镜检确认为革兰阳性大杆菌后,再以MRS液体培养基增菌后冻存;②冻存的革兰阳性大杆菌复苏后涂MRS培养板,37℃厌氧培养。

1.2.2 阴道加德纳菌的分离和纯化 ①无菌棉拭子取BV患者阴道侧壁中1/3分泌物,涂于改良BHI琼脂板上。②将涂有阴道分泌物标本的改良BHI琼脂板装进厌氧袋,放置37℃、5% CO₂培养48h。③挑取圆形、针尖样、半透明单菌落,涂在新的改良BHI琼脂培养板上,37℃、厌氧培养24~48h。④从培养板上挑取单菌落,将获得的菌落冻存。

1.2.3 菌株鉴定 通过菌落PCR,使用引物27F/1492R (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGYTACCTTGTACGACT-3')扩增临床分离菌株的16s rRNA基因全长,PCR产物送测序由上海生工生物技术公司完成,将拼接结果的序列与GenBank数据库上的细菌16s rRNA基因序列进行比对,完成菌株鉴定。

1.3 Spot on lawn 法筛选具有抑菌功能的乳杆菌

将乳杆菌菌液浓度调整为0.5麦氏浊度标准(McFarland, MCF),100 μl点种在MRS琼脂平板上,37℃厌氧培养24h,再将含阴道加德纳菌菌株的软琼脂培养基覆盖其上,厌氧培养48h,观察有无抑菌环形成。

1.4 双层牛津杯法检测菌体、菌液和上清液对加德纳菌的作用 选出在spot on lawn实验中对阴道加德纳菌增殖有抑制作用的乳杆菌菌株,进行双层牛津杯法实验。在培养皿底层的MRS琼脂平板上放置牛津杯,上层为含有阴道加德纳菌菌株的软琼脂。取培养18h的乳杆菌菌液200 μl共4份,2份离心获得上清液,1份无菌PBS清洗3遍获得菌体,另1份为菌体菌液混合物。

每个乳杆菌菌株做4个孔,分别加入:上清液、菌体、菌液以及上清液+蛋白酶K。用MRS液体培养基为阴性对照,37℃厌氧培养48h,分别测量各自的抑菌环直径。所有菌株的检测分别做3次。

1.5 统计学处理 数据全部录入Excel 2019,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用独立样本t检验,用SPSS 13.0软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本收集情况 共纳入志愿者30例,其中健康女性20例,BV患者10例,各组临床资料如表1

所示,基线资料在健康组与BV两组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

通过体外培养、分离、纯化和鉴定,健康组每份标本中均能分离出乳杆菌,从20例标本中共获得乳杆菌菌株62株,分别属于6个菌种(表2)。BV组10份标本中,2份标本中分离出3个阴道加德纳菌菌株,另外8份未分离出阴道加德纳菌。

表1 基线资料

基线资料	健康组 (n=20)	BV组 (n=10)	t值	P值
年龄(岁)	25.3 ± 1.8	28.0 ± 2.1	1.103	0.653
身高(cm)	158.0 ± 3.2	161.0 ± 1.8	1.432	0.870
体质量(kg)	49.8 ± 2.9	55.2 ± 1.0	0.027	0.553
BMI(kg/m ²)	23.4 ± 3.4	22.3 ± 1.4	1.521	0.591
Nugent评分	4.4 ± 0.8	7.2 ± 1.1	0.892	0.079

表2 分离的乳杆菌及其抑菌情况

菌种	乳杆菌数	具有抑菌功能的乳杆菌数[n(%)]
卷曲乳杆菌	18	7(38.9)
加氏乳杆菌	16	4(25.0)
詹氏乳杆菌	10	3(30.0)
阴道乳杆菌	6	1(16.6)
发酵乳杆菌	6	2(33.3)
德氏乳杆菌	6	1(16.6)
合计	62	18(29.0)

2.2 乳杆菌抑菌试验 在62株乳杆菌菌株中有18株对阴道加德纳菌的增殖有抑制作用,44株对阴道加德纳菌完全没有抑制作用(表2),在卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌和发酵乳杆菌中,有抑菌功能的菌株所占比例较高。

2.3 菌液、菌体、上清液和蛋白酶K处理组抑菌效果的区别 如表3所示,筛选出的18个乳杆菌菌株中,所有菌株的菌液、菌体和上清液均有抑菌效应。菌液的抑菌效应明显大于上清液组,其中14株差异有统计学意义($P < 0.05$)。上清液经过蛋白酶K处理之后,8份标本的抑菌效果消失,10份标本的抑菌效果不同程度减弱。

3 讨论

健康女性阴道是一个复杂的微生态系统,定植多种细菌,其中乳杆菌为优势菌,通过竞争排斥、产生乳酸、过氧化氢、细菌素等抗菌物质来抑制病原菌的生长,维护阴道微生态平衡^[6-7]。某些因素作用下,如雌激素水平的降低,性行为及抗生素的使用等使阴道内一些条件致病菌如阴道加德纳菌过度生

表3 菌液、菌体、上清液对阴道加德纳菌的抑制情况($\bar{x} \pm s$)

编号	菌种	抑菌环直径(mm)			
		菌液	菌体	上清液	蛋白酶 k + 上清液
1	卷曲乳杆菌(Cris-04)	30.3 ± 0.6	28.2 ± 1.1	14.3 ± 2.3 ^{*#}	9.3 ± 0.6
2	卷曲乳杆菌(Cris-05)	15.4 ± 0.1	17.9 ± 3.2	10.3 ± 1.8 ^{*#}	-
3	卷曲乳杆菌(Cris-07)	23.7 ± 0.3	22.3 ± 1.7	15.6 ± 0.9	-
4	卷曲乳杆菌(Cris-08)	19.4 ± 0.9	16.6 ± 2.1	0.9 ± 0.1 ^{*#}	-
5	卷曲乳杆菌(Cris-09)	19.8 ± 2.4	23.5 ± 0.5	17.6 ± 1.1	8.2 ± 0.4 ^{&}
6	卷曲乳杆菌(Cris-13)	16.7 ± 0.7	14.3 ± 1.8	10.2 ± 2.1 ^{*#}	-
7	卷曲乳杆菌(Cris-16)	22.4 ± 0.4	20.1 ± 0.9	14.5 ± 1.2 ^{*#}	6.1 ± 0.1 ^{&}
8	加氏乳杆菌(Gass-02)	24.0 ± 1.3	22.8 ± 2.2	15.6 ± 1.5 ^{*#}	-
9	加氏乳杆菌(Gass-07)	23.6 ± 0.8	18.4 ± 1.9	11.5 ± 2.2 ^{*#}	8.5 ± 0.2
10	加氏乳杆菌(Gass-12)	25.0 ± 1.9	22.0 ± 2.3	15.3 ± 0.9 ^{*#}	-
11	加氏乳杆菌(Gass-14)	30.1 ± 2.4	31.3 ± 3.0	14.4 ± 2.3 ^{*#}	9.4 ± 0.3
12	詹氏乳杆菌(Jen-01)	28.9 ± 0.9	32.0 ± 2.2	17.3 ± 1.8	16.8 ± 0.2
13	詹氏乳杆菌(Jen-07)	26.0 ± 1.0	30.6 ± 2.0	15.2 ± 1.3 ^{*#}	-
14	詹氏乳杆菌(Jen-08)	15.3 ± 1.1	16.6 ± 0.3	15.0 ± 0.9 ^{*#}	3.2 ± 0.8 ^{&}
15	阴道乳杆菌(Vag-04)	17.0 ± 0.3	13.7 ± 0.6	13.6 ± 1.4 ^{*#}	-
16	发酵乳杆菌(Ferm-03)	27.6 ± 0.5	19.1 ± 0.5	14.3 ± 0.3 ^{*#}	11.7 ± 1.6
17	发酵乳杆菌(Ferm-06)	20.9 ± 0.5	17.5 ± 1.4	16.3 ± 1.1	10.2 ± 0.8 ^{&}
18	德氏乳杆菌(Delb-05)	26.0 ± 1.2	24.3 ± 1.8	15.2 ± 3.8 ^{*#}	9.9 ± 0.6 ^{&}

与菌液组比较: * $P < 0.05$; 与菌体组比较: # $P < 0.05$; 与上清液组比较: & $P < 0.05$

长,引起菌群失衡,导致BV的发生^[8]。以往认为BV的致病菌是阴道加德纳菌,但是越来越多的研究^[1-2]表明,除了阴道加德纳菌之外,普雷沃菌、阿托波菌等多个厌氧菌可能也是BV的致病菌,但阴道加德纳菌比其他致病菌具有更高的毒力潜能,具有更强的黏附能力和细胞毒性,更容易形成生物膜^[9],在BV的发病机制中起着更加关键的作用^[10-11]。因此,健康女性阴道乳杆菌对阴道加德纳菌的抑制情况及其机制,对阐明BV的发病机制以及如何诊治BV有重要作用。然而,既往关于乳杆菌抑制阴道加德纳菌的研究很少,其中仅有王友芳等^[12]研究中分离的德氏乳杆菌已研制成新型的益生菌制剂。

在该研究中,健康组分离出的乳杆菌包含6个菌种,其中95%以上的标本中含有两个以上菌种,这与之前的研究^[13]结果一致。每份标本中均能分离出乳杆菌,从20例标本中共获得乳杆菌菌株62株。BV组的10份标本中,2份标本中分离出3个阴道加德纳菌菌株,另外8份未分离出阴道加德纳菌。通过体外实验对阴道乳杆菌菌株的抑菌能力分析显示,29.03%(18/62)的乳杆菌菌株具有抑制加德纳菌增殖的功能,并不是所有的乳杆菌菌株都具有抑制病原菌的能力^[3],这提示不同人群对BV的易感性可能存在差异^[4]。发酵乳杆菌的分离率很低,但是分离出的菌株中有抑菌功能的菌株比例很高。加氏乳杆菌和詹氏乳杆菌的分离率很高,但是

有抑菌功能的菌株比例相对很低。

阴道乳杆菌对病原菌的抑制和清理机制分为间接途径和直接途径,间接途径主要是影响人体阴道免疫功能,而直接途径包括产生过氧化氢、乳酸、细菌素、细菌素样物质和表面活性物质^[14-16]。在该研究中表明,大部分乳杆菌体外培养的菌液有明显的抑菌效果,上清液的抑菌效果明显弱于菌液,这说明乳杆菌抑制加德纳菌的机制是多途径^[14-16],各种途径在不同的菌株的抑菌过程中发挥作用的比重可能不同。然而菌体的抑菌作用和菌液大致相同这一现象不好解释,可能是由于经过PBS清洗之后的菌体加入MRS培养基之后,再加入牛津杯,经过48h的培养时间,相当于新形成的菌液作用于底层的加德纳菌平板。

经过蛋白酶K处理过的上清液的抑菌作用出现两种变化:消失和减弱。这一现象说明乳杆菌培养上清液中含有的物质种类可能并不单一,不同的阴道乳杆菌菌株培养上清液抑制阴道加德纳菌的机制也存在不同,抑菌作用消失的一类,可能主要通过蛋白类物质发挥抑菌作用,而抑菌作用减弱的一类,可能存在除了蛋白类物质之外的机制发挥抑菌作用,比如乳酸或过氧化氢。

参考文献

- [1] Peebles K, Velloza J, Balkus J E, et al. High global burden and costs of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis

- [J]. *Sex Transm Dis*, 2019,46(5):304–11.
- [2] Morrill S, Gilbert N M, Lewis A L. *Gardnerella vaginalis* as a cause of bacterial vaginosis: appraisal of the evidence from *in vivo* models[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020,10:168.
- [3] Muzny C A, aniewski P, Schwebke J R, et al. Host - vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2020,33(1):59–65.
- [4] Linhares I M, Sisti G, Minis E, et al. Contribution of epithelial cells to defense mechanisms in the human vagina[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2019,21(9):30.
- [5] Kelly R D, Cowley S M. The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013,41(3):741–9.
- [6] Wang L, Chen J, He L, et al. Association between the vaginal and uterine microbiota and the risk of early embryonic arrest[J]. *Front Microbiol*, 2023,14:1137869.
- [7] Xiang N, Yin T, Chen T. *Gardnerella vaginalis* induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophages and THP-1 monocytes[J]. *Exp Ther Med*, 2021,22(4):1174.
- [8] Pino A, Mazza T, Matthews M H, et al. Antimicrobial activity of bovine lactoferrin against *Gardnerella* species clinical isolates[J]. *Front Microbiol*, 2022,13:1000822.
- [9] Zhang K, Lu M, Zhu X, et al. Antibiotic resistance and pathogenicity assessment of various *Gardnerella* sp. strains in local China [J]. *Front Microbiol*, 2022,13:1009798.
- [10] Chen X, Lu Y, Chen T, et al. The female vaginal microbiome in health and bacterial vaginosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021,11:631972.
- [11] Castro J, Martins A P, Rodrigues M E, et al. *Lactobacillus crispatus* represses vaginolysin expression by BV associated *Gardnerella vaginalis* and reduces cell cytotoxicity [J]. *Anaerobe*, 2018,50:60–3.
- [12] 王友芳, 郎景和, 袁杰利, 等. 德氏乳杆菌 DM8909 菌株对细菌性阴道病治疗的 II 期临床试验研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2001,13(4):198–200.
- [13] Zhang R, Daroczy K, Xiao B, et al. Qualitative and semiquantitative analysis of *Lactobacillus* species in the vaginas of healthy fertile and postmenopausal Chinese women [J]. *J Med Microbiol*, 2012,61(Pt 5):729–39.
- [14] 曾晶, 卢芳国. 阴道乳酸杆菌的研究进展 [J]. *岳阳职业技术学院学报*, 2009,24(5):96–8.
- [15] Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, et al. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains [J]. *Archives of Microbiology*, 2014,196(9):645–53.
- [16] Cotter P D, Hill C, Ross R P. Bacteriocins: developing innate immunity for food [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005,3(10):777–88.

Screening of *Lactobacillus* that inhibit *Gardnerella vaginalis* and preliminary study on its bacteriostatic mechanism

Zhang Rui¹, Ma Aixin¹, Wang Junzhu², Li Chang¹, Yin Haixu¹, Bai Huihui¹, Liu Zhaohui³

(¹*Dept of Obstetrics and Gynecology, Peking University First Hospital, Beijing 100034;*

²*School of Government Management, Big Data and Public Policy Laboratory, Peking University, Beijing*

100091; ³*Dept of Obstetrics and Gynecology, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Beijing 100006)*

Abstract Objective To select and obtain *vaginal Lactobacillus* strains with inhibitory effect on *Gardnerella vaginalis*, and to explore the possible mechanism of inhibition of *Gardnerella vaginalis* by *Lactobacillus vaginalis* strains, so as to provide a prerequisite for the development of dominant strains for human disease treatment. **Methods** *Gardnerella vaginalis* and *vaginal Lactobacillus* strains were isolated from vaginal secretions of patients with bacterial vaginosis (BV) and healthy women, respectively. The *Lactobacillus* strains with the ability to inhibit the proliferation of *Gardnerella vaginalis* were screened by spot on lawn. Double agar diffusion method was used to compare the inhibitory effects of *Lactobacillus* solutions, cell-free culture supernatants (CFCs) and bacteria on *Gardnerella vaginalis*. **Results** Sixty-two strains of *vaginal Lactobacillus* strains were isolated and purified from vaginal secretions of 20 healthy women, belonging to six species. Three strains of *Gardnerella vaginalis* were isolated from vaginal secretions of 10 patients with bacterial vaginosis. Among the 62 strains of *vaginal Lactobacillus*, 18 strains could inhibit the proliferation of *Gardnerella vaginalis*. The *vaginal Lactobacillus* solutions, the CFCs, and bacteria all had inhibitory effect on *Gardnerella vaginalis*. The inhibitory effects of *vaginal Lactobacillus* solutions were higher than those of the CFCs. After the CFCs were treated with proteinase K, the inhibitory effect of eight samples disappeared, and that of 10 samples weakened obviously. **Conclusion** In this paper, 62 *vaginal Lactobacillus* strains are purified and identified, of which 18 strains can inhibit the proliferation of *Gardnerella vaginalis*. The production of antimicrobial protein may be involved in the mechanism that *vaginal Lactobacillus* inhibits the proliferation of *Gardnerella vaginalis*.

Key words bacteriostatic function; bacteriostatic protein; *vaginal Lactobacillus*; *Gardnerella vaginalis*; bacterial vaginosis