

## 论著·临床研究

## 运用实时定量 PCR 和 16S rDNA 测序法分析女性阴道菌群的结果比较

张 宁<sup>1,2</sup>, 韩 阳<sup>1,2</sup>, 骆 菲<sup>3</sup>, 朱丽红<sup>4</sup>, 秦金红<sup>2</sup>, 江 滢<sup>1</sup>

1. 贵州医科大学贵州省普通高校病原生物学特色重点实验室, 贵阳 550025; 2. 上海交通大学 基础医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025; 3. 上海交通大学 医学院附属国际和平妇幼保健院, 上海 200030; 4. 复旦大学附属华东医院妇科, 上海 200040

**[摘要]** **目的**·比较实时定量 PCR (qPCR) 法与 16S rDNA 测序法分析女性阴道菌群类型的结果。**方法**·选取 45 岁以下育龄期健康女性 49 名, 采集阴道上 1/3 处分泌物, 经提取阴道标本全基因组 DNA 后, 分别运用 16S rDNA V1V2 域测序和基于 22 种常见阴道细菌设计的引物进行 qPCR 分析各样本菌群类型, 比较 2 种检测结果的异同。**结果**·参考依据优势菌类型的阴道菌群分类标准, 基于 qPCR 方法分析结果为 I 型 (卷曲乳杆菌为优势菌) 9 例, III 型 (嗜性乳杆菌为优势菌) 24 例, IV 型 (无乳杆菌为优势菌) 12 例, V 型 (詹氏乳杆菌为优势菌) 为 2 例。基于 16S rDNA V1V2 域进行测序分析的结果为 I 型 13 例, II 型 (格氏乳杆菌为优势菌) 1 例, III 型 23 例, IV 型 8 例, V 型 2 例。2 种方法对阴道菌群分型一致的为 38 例, 一致率为 77.6%。**结论**·2 种方法分析得到的阴道菌群分类结果有差异; 若采用 qPCR 对阴道菌群进行分类, 还需考虑相关的技术因素对结果的影响。

**[关键词]** 阴道菌群; 实时定量 PCR; 16S rDNA 高通量测序

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.01.013 **[中图分类号]** R446.5 **[文献标志码]** A

## Comparison of real-time quantitative PCR and 16S rDNA sequencing for detection of female vaginal microbiome

ZHANG Ning<sup>1,2</sup>, HAN Yang<sup>1,2</sup>, LUO Fei<sup>3</sup>, ZHU Li-hong<sup>4</sup>, QIN Jin-hong<sup>2</sup>, JIANG Yan<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Medical Microbiology and Parasitology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Department of Microbiology and Immunology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 3. International Peace Maternity &amp; Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; 4. Department of Gynecology, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

**[Abstract]** **Objective**·To compare the differences in the composition of female vaginal flora by real-time quantitative PCR and 16S rDNA sequencing. **Methods**·Forty-nine healthy reproductive women less than 45 years old were selected. Specimens were collected from posterior fornix. DNA were extracted and the microbiome were analyzed by both 16S rDNA V1V2 region sequencing and qPCR of 22 selected genes. The results detected by two methods were compared. **Results**·According to the classification standard of vaginal community state type (CSTs), qPCR analysis showed that 35 out of 49 samples were dominated by *Lactobacillus* species, among them, type I (*Lactobacillus crispatus*, 9), type III (*Lactobacillus iners*, 24), type IV (no *Lactobacillus* as the dominant bacteria, 12), type V (*Lactobacillus jensenii*, 2). 16S rDNA V1V2 region sequence analysis showed that of the 49 samples, 13 belonged to type I, type II (1), type III (23), type IV (8), type V (2). Two methods of vaginal flora classification were consistent for 38 cases, consistent rate was 77.6%. **Conclusion**·Two methods analysis of vaginal flora showed the different results. If qPCR was used to classify the vaginal microbiome, it was necessary to consider the influence of relevant technical factors on the results.

**[Key words]** vaginal flora; real-time quantitative PCR; 16S rDNA high throughput sequencing

女性阴道菌群组成与女性的生殖及健康密切相关。通常认为女性健康的阴道菌群应以乳杆菌为优势菌, 同时阴道局部 pH 值维持在较低水平 (pH<4.5)<sup>[1-3]</sup>, 而病理状态下的阴道菌群多以乳杆菌数量减少及菌群多样性增加为特征<sup>[4]</sup>。基于 16S rDNA 测序分析对女性健康阴道菌群进行研究, 较多研究结果认为健康的阴道菌群可分为 5 种类型: I 型以卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*) 为优势菌, II 型以格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) 为优势菌,

III 型以嗜性乳杆菌 (*Lactobacillus iners*) 为优势菌, IV 型无优势菌, V 型以詹氏乳杆菌 (*Lactobacillus jensenii*) 为优势菌<sup>[5-6]</sup>。其中 IV 型又可分为 IV -A 型及 IV -B 型, 其中 IV -A 型可以检测到乳杆菌, 但比例低, 为乳杆菌及其他厌氧菌的混合型, IV -B 型为不含乳杆菌的无优势菌混合型。因此, 基于分子生物学技术对女性健康的阴道菌群分析结果表明, 健康的阴道菌群组成受地域、种族、生理周期及生活方式等因素的影响而呈高度的多样化<sup>[5-6]</sup>, 一些

**[基金项目]** 上海交通大学医工交叉研究基金 (YG2016MS83); 上海市自然科学基金 (17ZR1415900) (Shanghai Jiao Tong University Biomedicine-Engineering Research Foundation, YG2016MS83; Natural Science Foundation of Shanghai, 17ZR1415900)。

**[作者简介]** 张 宁 (1985—), 女, 硕士生; 电子邮箱: zhangn\_gy@163.com。

**[通信作者]** 江 滢, 电子邮箱: 624057523@qq.com。



健康女性的阴道菌群亦不以乳杆菌为优势菌。目前,临床检测多以传统方法从菌群的密集度、菌群的多样性、优势菌及机体炎症反应等方面评价阴道微生态。随着分子生物学技术的发展,有研究者基于对阴道菌群的分析,针对阴道中常见的 22 种细菌设计种特异性引物,通过实时定量 PCR (qPCR) 方法定量分析阴道菌群的组成,从而为临床阴道微生物菌群分析及其失调引起的阴道炎提供辅助诊断<sup>[7-8]</sup>。随着测序技术的发展及成本的降低,目前 16S rDNA 用于阴道微生物菌群的分析显示了更大的优势。本研究用 2 种分子生物学方法对临床 49 名健康女性阴道菌群进行分析,比较 2 种方法用于阴道菌群分析的异同。

## 1 对象与方法

### 1.1 入选标准

①受试者为 <45 岁女性,平素月经规律,3 个月内无泌尿生殖道炎症或身体其他部位感染史。②1 个月内无全身及阴道局部应用抗生素史。③3 个月内无应用口服避孕药等性激素或糖皮质激素史。④3 d 内无性生活、阴道操作及冲洗史,非妊娠期、哺乳期或月经期。⑤排除同时患有滴虫性、阴道假丝酵母菌病等其他阴道炎症。⑥阴道无出血。⑦无糖尿病、自身免疫性疾病等系统性疾病。

### 1.2 样本采集

选取 2016 年 9 月—10 月于上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院体检中心体检的育龄期健康女性阴道标本 49 例。年龄为 28 ~ 44 岁,中位年龄 35 岁。阴道分泌物常规检查清洁度 I ~ II 度, pH 值 <4.5, 未检测出脓细胞,真菌、滴虫、支原体检查均为阴性,同时排除细菌性阴道炎。用无菌阴道棉拭子于阴道上 1/3 侧壁拭取分泌物,采样过程中避免接触非采样区以外的部位以防标本污染,将其迅速放入无菌试管内, -20 °C 冰箱内保存,用于提取基因组总 DNA。

### 1.3 基因组 DNA 抽提

取上述 49 例样本,使用 The PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation kit (美国 MOBIO) 进行 DNA 抽提,提取的 DNA 经 Nanodrop 2000 测定浓度, -20 °C 保存,用于进一步实验。

### 1.4 qPCR 检测

参照相关文献<sup>[7-9]</sup>设计 22 种常见阴道细菌 (包含 4 种常见阴道乳杆菌及 18 种非优势阴道常见菌) 特异性引物,分别为卷曲乳杆菌、嗜性乳杆菌、格氏乳杆菌、詹

氏乳杆菌、奇异菌属 (*Atopobium vaginae*)、阴道加德纳菌 (*Gardnerella vaginalis*)、细菌性阴道炎相关性细菌 (BVAB1a、BVAB2a、BVAB3a)、巨球形菌属 I 型 (*Megasphaera* sp. type 1)、巨球形菌属 II 型 (*Megasphaera* sp. type 2)、*Leptotrichia amnionii*、*Sneathia sanguinegens*、*Eggerthella* sp.、*Mobiluncus mulieris*、*Mobiluncus curtisii*、人型支原体 (*Mycoplasma hominis*)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus* sp.)、*Prevotella buccalis*-like、普氏菌属 (*Prevotella* spp.)、真细菌 (通用引物) [*Eubacterial* (universal)]、核梭菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 共 22 种,由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。qPCR 反应总体积为 20  $\mu$ L,取上述抽提 DNA 为模板,每例模板 DNA 定量为 10 ng,上下游引物定量为 2.5 pmol,荧光染料 SYBR Green 10  $\mu$ L,灭菌 ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L 补足体积。内参基因选择细菌 16S rDNA 真细菌通用引物。荧光染料选取 SYBR Green (Roche),经 ABI 7500 FAST 进行 qPCR 扩增;每个样品设 2 个重复。各种细菌特异引物扩增得到的 Ct 值设定为 Ct1,内参引物扩增得到的 Ct 值设定为 Ct2,以  $2^{-\Delta(Ct1-Ct2)}$  计算出单个样品中各种细菌所占比例。

### 1.5 16S rDNA V1V2 域高通量测序

将上述 49 例样本 DNA 进行 16S rDNA 基因测序分析。采用 16S rDNA V1V2 区域进行测序,所用正向引物序列为 5'-AGRGTGTTGATYMTGGCTCAG-3',反向引物序列为 5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'。送上海派森诺生物技术股份有限公司,采用 Illumina MiSeq 的测序平台进行测序分析,对群落 DNA 片段进行双端测序。使用 QIIME 软件,调用 UCLUST 序列比对工具 (Edgar, 2010),对前述获得的序列按 97% 相似度进行归并和可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 划分,并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。根据 OTU 划分和分类鉴定结果,获得每个样本在界、门、纲、目、科、属、种水平的具体组成。

### 1.6 数据分析

qPCR 及 16S rDNA 检测结果,采用 GraphPad Prism 软件分析并作图。

## 2 结果

### 2.1 qPCR 分析结果

对 22 种阴道常见细菌,进行定量分析的结果见图 1。结果显示,49 例健康女性的阴道菌群中,42 例样本中检测

到乳杆菌, 乳杆菌为优势菌 (含量 >20%) 的有 37 例; 7 例样本没有检测到乳杆菌, 其中 3 例样本的优势菌为阴道加德纳菌 (含量 >20%)。参照阴道菌群分类, 49 例样本中, 9 例为 I 型 (卷曲乳杆菌为优势菌), 24 例为 III 型 (惰

性乳杆菌为优势菌), 12 例为 IV 型 (无乳杆菌为优势菌, 其中 3 例为阴道加德纳菌为优势菌), 2 例为 V 型 (詹氏乳杆菌为优势菌), 其余 2 例根据此标准很难划入任何一种类型, 为卷曲乳杆菌、惰性乳杆菌、詹氏乳杆菌混合型。

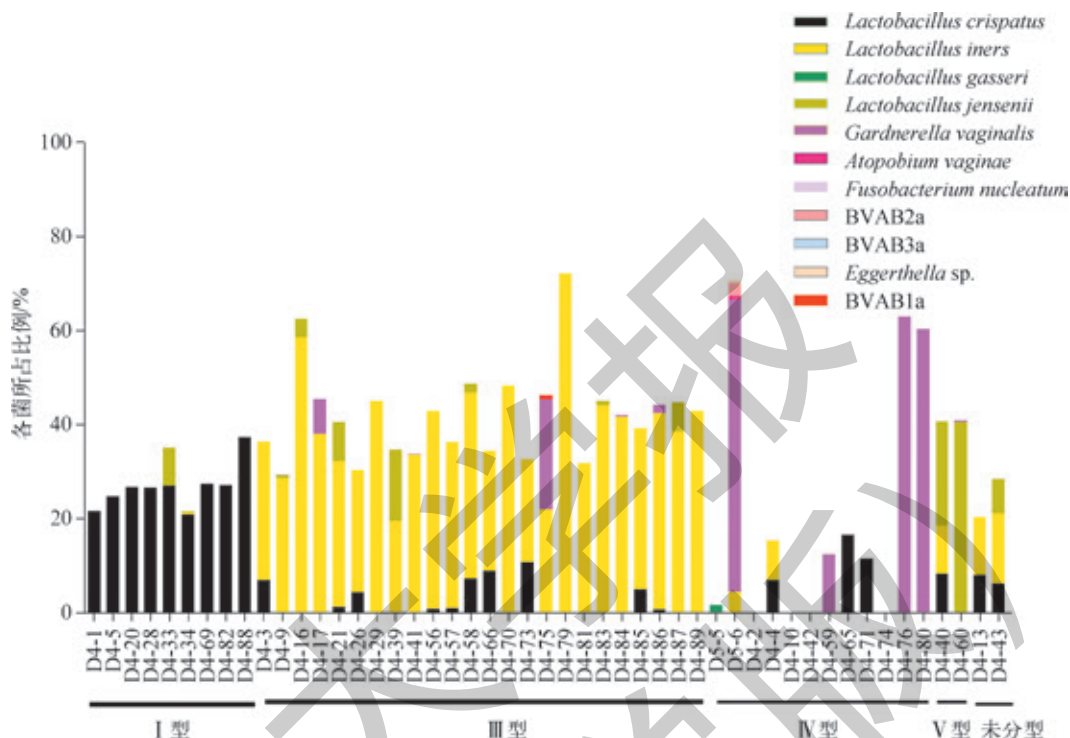


图 1 qPCR 法检测 49 例样品中细菌组成  
Fig 1 Composition of bacterial species in 49 samples by qPCR

## 2.2 基于 16S rDNA V1V2 域测序检测结果

对 49 例样本进行 16S rDNA V1V2 域测序, 以 97% 的序列相似度作为 OTU 阈值进行 OTU 聚类, 弃掉序列数量 <30 条的 OTU。由于对阴道菌群的分析, 特别是乳杆菌的分析, 必须在种的水平上进行区分; 因此, 对样本中 >100 条的 OTU, 在 NCBI 的 GenBank 数据库中进一步进行 Blast N 分析, 以在种的水平上进行分类。分析结果显示, 49 例样本中, 乳杆菌为优势菌群的有 41 例; 不以乳杆菌为优势菌的有 8 例, 其中 3 例以阴道加德纳菌为优势菌, 5 例分别以齿双歧杆菌 (*Bifidobacterium dentium*)、*Alloscardovia omnicolens*、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 为优势菌。

如图 2 所示, 以含量 >50% 为优势菌, 参考阴道菌群分类, 49 例健康女性的阴道菌群中, 13 例为 I 型 (卷曲乳杆菌为优势菌), 1 例为 II 型 (格氏乳杆菌为优势菌), 23 例为 III 型 (惰性乳杆菌为优势菌), 8 例为 IV 型 (无乳杆菌为优势菌), 2 例为 V 型 (詹氏乳杆菌为优势菌), 2 例为卷曲乳杆菌、惰性乳杆菌、詹氏乳杆菌混合型。

## 2.3 qPCR 与 16S rDNA V1V2 域测序结果的比较

为了比较 qPCR 与 16S rDNA V1V2 域测序结果对女性阴道菌群分析的差异, 统计了各个样本中含量 >0.1% 的细菌种, 而对含量 <0.1% 合并统计为 “others”。在 49 例样本中, 经 2 种方法检测, 样本菌群分型一致的为 38 例, 一致率为 77.6%; 其中 I 型 9 例, III 型 23 例, IV 型 3 例, V 型 1 例, 2 例不能归类。其中 I 型中, 不一致的 4 例 (D4-4、D4-13、D4-69、D4-71), 16S rDNA V1V2 域分析结果为卷曲乳杆菌占优势; qPCR 检测结果显示, D4-4 无优势菌群, D4-13 为卷曲乳杆菌、惰性乳杆菌和詹氏乳杆菌混合型。II 型中, 有 1 例 (D5-5) 不一致, 16S rDNA V1V2 域分析的优势菌为格氏乳杆菌, qPCR 未检测到格氏乳杆菌为优势菌群。III 型中, 有 1 例 (D4-39) 不一致, 16S rDNA V1V2 域分析结果为詹氏乳杆菌占优势, qPCR 检测结果为惰性乳杆菌占优势。IV 型中有 9 例 (D4-2、D4-10、D4-42、D4-59、D5-6、D4-4、D4-65、D4-71、D5-5) 不一致, 其中, D4-2、D4-10、D4-42、D4-59 的 qPCR 检测结果为无优势菌群, 而 16S rDNA V1V2 域分析



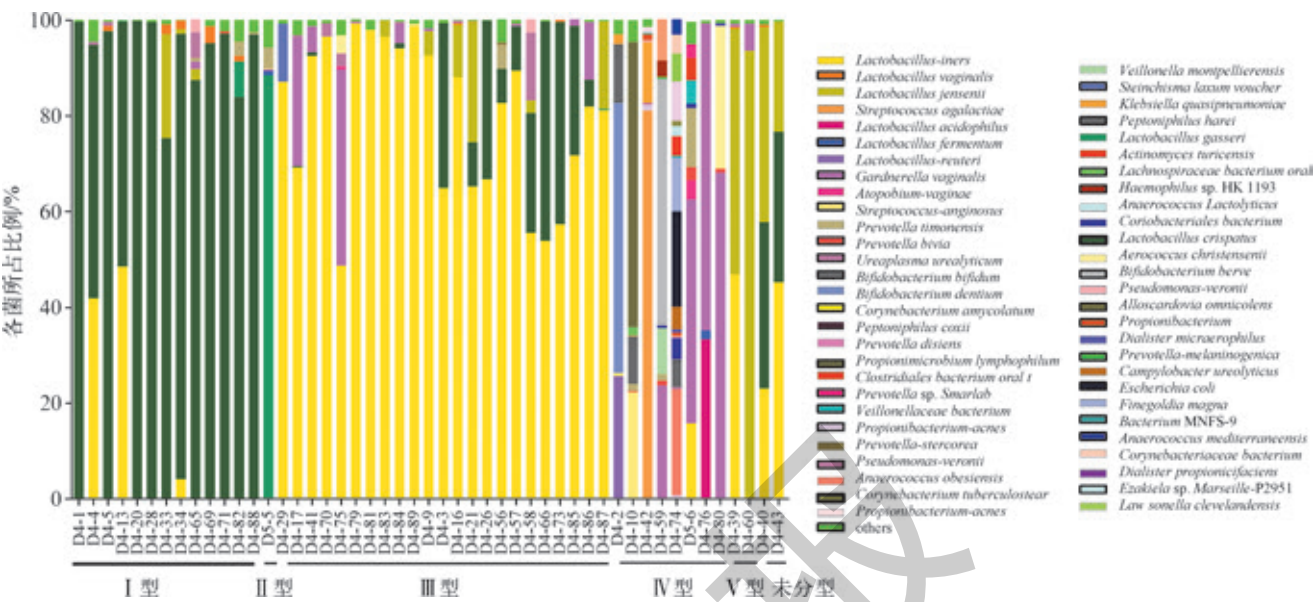


图 2 16S rDNA V1V2 域测序法检测检测 49 例样品中细菌组成  
Fig 2 Composition of bacterial species in 49 samples by sequencing based on 16S rDNA V1V2 region

显示 D4-2 以齿双歧杆菌为优势菌, D4-10 以 *Alloscardovia omnicolens* 为优势菌, D4-42 以无乳链球菌为优势菌, D4-59 以短双歧杆菌为优势菌; D5-6 的 16S rDNA V1V2 域分析结果为无优势菌群, qPCR 检测结果为加德纳菌占优势; D4-65、D4-71 的 16S rDNA V1V2 域分析结果为卷曲乳杆菌占优势, qPCR 检测结果为无优势菌群; D5-5 的 16S rDNA V1V2 域分析的优势菌为格氏乳杆菌, qPCR 未检测到格氏乳杆菌, 为无优势菌群。不能归类中有 2 例 (表 1)。

表 1 qPCR 和 16S rDNA V1V2 域测序对女性阴道菌群分型结果的比较 (n)  
Tab 1 Comparison of female vaginal flora typing results based on qPCR and 16S rDNA V1V2 sequence analysis (n)

阴道菌群类型	16S rDNA V1V2 域测序	qPCR	共同例数
I 型	13	9	9
II 型	1	0	0
III 型	23	24	23
IV 型	8	12	3
V 型	2	2	1
不能归类	2	2	2
总例数	49	49	38

3 讨论

目前的研究表明, 女性阴道菌群组成受种族、生活习惯、性行为及生理周期等多种因素影响而呈动态变化<sup>[5, 10]</sup>。在本研究中, 分析了 49 例育龄期健康女性阴道标本, 基

于 16S rDNA V1V2 域的测序分析结果与之前研究报道的亚洲女性阴道菌群各型所占比例有一定的差异<sup>[11-13]</sup>, 这可能与女性的生活习惯及地域差异有关。虽然传统认为乳杆菌在维持女性阴道环境健康中起重要作用, 特别是在维持阴道酸性环境中发挥重要作用, 但本实验结果表明, 无乳杆菌为优势菌的 8 例样本 (IV 型) 亦可以维持正常的酸性 pH 值环境, 这些优势菌分别是阴道加德纳菌、齿双歧杆菌、*Alloscardovia omnicolens*、短双歧杆菌、无乳链球菌。同时, 在本实验中, 还发现约有 4.1% 的女性阴道乳杆菌的优势菌为 3 种混合, 而曾有研究<sup>[11-12]</sup>显示女性阴道乳杆菌不同种间具有互相抑制作用, 一般只出现 1 种类型的乳杆菌为优势菌。本研究结果与相关报道有差异, 具体机制及原因有待进一步研究。

虽然运用 16S rDNA 测序对菌群进行分析显示了高度的准确性, 并且随着测序成本的降低, 其优越性越来越明显, 但由于高通量及数据处理的复杂性, 使其在实际应用中也受到了一些限制。相对于人体其他部位, 阴道菌群的数量及种类相对单一, 以 qPCR 作为阴道菌群的鉴定具有快速、简便及易于进行数据分析等特点<sup>[4, 7-8]</sup>。本实验基于以往报道, 选取了 22 种常见阴道细菌进行了分析, 比较 16S rDNA 测序及 qPCR 的分析结果。虽然 qPCR 的检测结果显示灵敏度相对较低, 但本实验中 qPCR 检测到的类型与 16S rDNA 测序分析得到的类型一致率为 77.6% (38/49)。因此, 随着对阴道菌群认识的深入及 qPCR 条件的优化, qPCR 用于女性阴道菌群的分析及鉴定将会显示出其巨大的潜能及优势。

## 参·考·文·献

- [1] Dumonceaux TJ, Hill JE, Briggs SA, et al. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin -60 target[J]. J Microbiol Methods, 2006, 64(1): 46-62.
- [2] Verstraelen H, Vilchezvargas R, Desimpel F, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene[J]. Peer J, 2016, 4: e1602.
- [3] Vinturache AE, Gyamfi-Bannerman C, Hwang J, et al. Maternal microbiome: a pathway to preterm birth[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2016, 21(2): 94-99.
- [4] Gopinath S, Iwasaki A. Cervicovaginal microbiota: simple is better[J]. Immunity, 2015, 42(5): 790-791.
- [5] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108 (Suppl 1): 4680-4687.
- [6] Digulio DB, Callahan BJ, Mcmurdie PJ, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(35): 11060-11065.
- [7] Zozaya HM, Lillis R, Martin DH, et al. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1812-1819.
- [8] Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, et al. Development and validation of a highly accurate quantitative real-time PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(4): 1017-1024.
- [9] Barroso E, Martín V, Martínezcuesta MC, et al. Stability of saliva microbiota during moderate consumption of red wine[J]. Arch Oral Biol, 2015, 60(12): 1763-1768.
- [10] Huang YE, Wang Y, He Y, et al. Homogeneity of the vaginal microbiome at the cervix, posterior fornix, and vaginal canal in pregnant Chinese women[J]. Microb Ecol, 2015, 69(2): 407-414.
- [11] Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(132): 132ra52.
- [12] Witkin S, Linhares I. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota[J]. BJOG, 2017, 124(4): 606-611.
- [13] Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract[J]. Fertil Steril, 2015, 104(6): 1351-1357.

[收稿日期] 2017-08-17

[本文编辑] 吴 洋

## 学术快讯

## 《医学前沿——中国卓越国际论文精粹》

上海交通大学医学院学报编辑部汇编的《医学前沿——中国卓越国际论文精粹》(以下简称《医学前沿》)顺利出版。《医学前沿》为上海交通大学医学院 65 周年校庆专辑,集中收录了《上海交通大学学报(医学版)》2014—2017 年发表的“学术前沿”专栏文章。专辑汇编了上海交通大学医学院及附属医院的 40 余个研究组,包括陈赛娟研究组、陈国强研究组、宁光研究组、黄荷凤研究组、范先群研究组、贾伟研究组、高小玲研究组、狄文研究组、王宏林研究组、丁健青和陈生弟研究组、张健研究组、周斌兵研究组、系统医学协同创新中心、刘炳亚研究组、陆舜研究组、张长青研究组等发表在 *Science*、*Cancer Cell*、*ACS Nano*、*Biomaterials*、*J Clin Invest*、*Blood*、*Cardiovasc Res*、*Nat Med*、*Cell Metab*、*Adv Funct Mter*、*J Clin Invest*、*Cancer Discov*、*PNAS*、*Theranostics*、*Nat Genet*、*Oncogene* 等国际著名学术期刊上的科研论文的述评,以及原英文论文的摘要。

交医学报 4 年来以纸刊、网刊、微信公众号等形式推送中国卓越国际论文的专栏述评。该专栏述评对研究组的工作内容及科研成果起到了很好的推广作用。

