

外阴阴道假丝酵母菌病患者阴道乳杆菌的功能变化

周 丹 邓文慧 李 叶 吕秋波 孟庆伟

摘 要 **目的** 分离、纯化、鉴定外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)患者阴道乳杆菌菌种;绘制 VVC 患者阴道内分离的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的生长曲线,检测其产酸能力、产 H_2O_2 能力,分析 VVC 患者阴道乳杆菌的功能变化及临床意义,为 VVC 的病因及治疗提供理论基础。**方法** 体外培养 VVC 患者阴道分泌物中的乳杆菌,分离、纯化,并用分子生物学技术鉴定;测定 24h 菌液浊度法绘制 VVC 患者及健康女性阴道内分离的 4 种乳杆菌的生长曲线;检测 24h 菌液 pH 值对比 VVC 患者与健康女性阴道内分离的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的产酸能力;绘制 H_2O_2 浓度标准曲线,定量检测摇菌 3h 菌液的产 H_2O_2 的量,对比 VVC 患者与健康女性阴道内分离的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的产 H_2O_2 能力。**结果** 共分离培养了 34 株 VVC 患者阴道乳杆菌,经鉴定,分属于乳杆菌的 4 个种。VVC 患者与健康妇女相比,阴道内卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的增殖速度差异无统计学意义($P < 0.05$)。健康女性加氏乳杆菌与卷曲乳杆菌的产酸能力比 VVC 患者强($P < 0.05$);詹氏乳杆菌的产酸能力两组差异无统计学意义($P > 0.05$);而 VVC 患者发酵乳杆菌的产酸能力比健康女性强($P < 0.05$)。VVC 患者阴道内分离的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的产 H_2O_2 量均明显少于健康妇女($P < 0.05$)。**结论** 本研究为进一步构建中国女性阴道来源的乳杆菌菌种库、进行阴道来源的乳杆菌的相关研究提供菌种。VVC 状态下,念珠菌的增多,阴道微环境的改变,并未影响阴道内定植的乳杆菌的生长速度。阴道内乳杆菌的产酸功能并不是抑制 VVC 的关键。阴道内乳杆菌产 H_2O_2 能力可能为抑制 VVC 的关键。

关键词 阴道乳杆菌 H_2O_2

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.010

Function of Lactobacillus in the Vagina of Vulvovaginal Candidiasis. Zhou Dan, Deng Wenghui, Li Ye, et al. Department of Gynaecology and Obstetrics, Beijing Hospital, Beijing 100034, China

Abstract Objective To isolate, purificate, identificate lactobacillus strains in the vagina of vulvovaginal candidiasis(VVC), and to draw the growth curve of lactobacillus casei, lactobacillus gasseri, lactobacillus jensenii, lactobacillus fermentum isolated from the vaginas of vulvovaginal candidiasis and to detection acid production and H_2O_2 production of them;and then to analysis the functional changes of vaginal lactobacillus in VVC and to provide a theoretical basis for the pathogeny and treatment of VVC. **Methods** Lactobacillus isolated from the vaginas of vulvovaginal candidiasis were separated, purified, and identified by molecular biology technology. Growth curve was drawn to evaluate the growth of four lactobacillus isolated from the vaginas of vulvovaginal candidiasis. The acid producing capacity was evaluated by testing pH of four Lactobacillus bacteria liquids for 24hours. Standard curve of H_2O_2 concentration was drew, and then the four bacteria liquid producing amount of H_2O_2 per half hour was quantitatively detected. **Results** A total of 34 strains belonging to 4 species lactobacillus were isolated from patients with VVC. There was no significant difference between patients with VVC and healthy women in the growth rate of *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* and *L. fermentum* ($P > 0.05$). The acid producing capacity of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus plantarum* isolated from healthy women was stronger than that of VVC patients($P < 0.05$). There was no significant difference between the two groups in *Lactobacillus jensenii*($P > 0.05$). But the acid producing capacity of *Lactobacillus fermentum* isolated from VVC patients was stronger than that of healthy women($P < 0.05$). The H_2O_2 producing capacity of VVC patients was significantly less than that of the healthy women($P < 0.05$). **Conclusion** The growth rate of lactobacillus in vaginal is stable although in the vaginal of women with VVC. The acid producing function of vaginal lactobacillus is not the key for inhibiting VVC. The H_2O_2 producing function of vaginal lactobacillus is a key for inhibiting VVC.

Key words Vaginal Lactobacillus species; H_2O_2

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170535)

作者单位:100730 北京医院妇产科

通讯作者:孟庆伟,主任医师,电子信箱:mengqinwei2015@126.com

外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)是各年龄段妇女的一种常见疾病,约75%女性一生中会罹患1次该疾病,其中40%~50%会复发。乳杆菌是阴道微生态系统中的优势菌群。目前的研究表明,乳杆菌在健康妇女阴道中的分离率最高,达50%~80%,其数量占阴道微生物的95%以上。乳杆菌通过替代、竞争排斥机制阻止致病微生物黏附于阴道上皮细胞,同时,还可分泌过氧化氢、细菌素、类细菌素和生物表面活性剂等抑制致病微生物生长,对维持阴道微生态平衡具有重要作用。临床研究发现在2/3的VVC患者阴道内乳杆菌仍然是优势菌群。有研究结果显示,VVC患者阴道微生态菌群乳杆菌密集度和多样性正常者占88.7%,而菌群抑制者仅占11.3%。而VVC患者阴道内可以检测出多种乳杆菌,其卷曲乳杆菌检出率与健康妇女差异无统计学意义,詹氏乳杆菌、约氏乳杆菌检出率明显多于育龄健康组($P < 0.05$)^[1]。可见VVC患者阴道内乳杆菌并不一定减少。但对于VVC患者阴道分泌物中的乳杆菌功能是否下降,国内外研究较少。本研究分离VVC患者阴道内的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌几种常见乳杆菌,监测其24h生长曲线,并定量检测其产酸量及产 H_2O_2 的量,与健康育龄妇女阴道内分离的此4种乳杆菌对比,初步探讨VVC患者阴道内乳杆菌的功能变化。

材料与方法

1. 材料:收集2014年3月份北京医院妇科门诊就诊的确诊为VVC的非妊娠期女性阴道分泌物共50份。VVC的诊断标准:有典型临床症状和体征,经妇科取阴道分泌物检查,真菌培养或革兰染色镜检可见菌丝者诊断为VVC。对照组:选择北京大学第一医院妇科实验室同时期分离并经过鉴定的健康女性阴道的4株乳杆菌。

2. 方法:(1)取材:用2个无菌棉拭子在阴道侧壁中1/3段取阴道侧壁分泌物,一个在载玻片上涂一薄层做成阴道分泌物涂片,室温晾干后,酒精灯热固定,室温保存,用于阅片、诊断。另一个迅速放入1ml肉汤培养基(MRS)液中旋转,将棉签上的细菌涮入MRS液,摇菌过夜,与等体积的60%甘油混合,-80℃保存。(2)乳杆菌分离、纯化:从-80℃吸取20μl菌液加入MRS液体培养基中,37℃、150r/min摇菌过夜;将过夜的菌液稀释,用麦氏比浊仪调整菌液浓度至0.5麦氏(MCF);取0.5MCF的菌液100μl,均匀涂在MRS固体培养板,37℃厌氧培养

24~48h;从培养板上,挑取单菌落,涂在新的MRS固体培养板上,37℃厌氧培养24~48h;每个培养板上为一个纯的菌株,培养板可放置在4℃保存,同时从培养板的菌落上挑取少量细菌,加入MRS液体培养基中,37℃、150r/min摇菌过夜。(3)乳杆菌鉴定:用27F/1492R[上游引物(27F):5'-AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3';下游引物(1493R):5'-TAC-GYTACCTTGTTACGACT-3']扩增上一步所有菌株的16S rRNA基因全长,采用25μl体系,PCR Master Mix(2×)12.5μl,上游引物1μl,下游引物1μl,细菌1μl,水9.5μl。反应条件,95℃预变性10min;95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,共35个循环;72℃延伸10min。PCR产物用1.5%浓度的琼脂糖凝胶,恒压95V,电泳40~60min,将凝胶在紫外线成像仪下成像,比较DNA带型。将PCR产物送上海生工生物有限公司测序。选择具有不同带型的菌株做下一步的16S rRNA基因序列分析。将测得序列与GenBank数据库上的乳杆菌16S rRNA基因序列进行比对,确认乳杆菌菌种。(4)乳杆菌增值曲线绘制:取-80℃保存的菌液少许,加入MRS液体培养基中,37℃、150r/min摇菌8h;吸取适量菌液,放入事先准备好的盛有MRS液体的离心管中,将菌液浓度调整为0.5MCF。将离心管,盖紧盖子,密封管口,37℃、150r/min摇菌;每3h将每个离心管摇匀后,测其中菌液浊度1次,记录。用菌液浊度,绘制细菌增殖曲线。(5)乳杆菌产 H_2O_2 及产酸的功能:产 H_2O_2 功能。 H_2O_2 标准曲线制作:首先用MRS液将30% H_2O_2 (相当于9.128mol/L)储存液稀释成1mol/L,再将1mol/L H_2O_2 分别稀释成0、20、40、60、80、100μmol/L工作液;然后分别取100μl上述 H_2O_2 工作液与100μl 20mmol/L四甲基联苯胺(TMB)、2μl辣根过氧化物酶(1mg/ml)混合,16℃孵育10min,测量A630值。得到 H_2O_2 浓度标准曲线: $y = 0.0135x + 0.2626$, $R^2 = 0.9298$ 。乳杆菌液体培养 H_2O_2 浓度检测:挑取乳杆菌单菌落,接种1ml培养48h的菌液于10ml MRS液体培养基中,37℃静置培养21h,转换为振荡培养3h,振速为220r/min,每0.5h取少量菌液然后12000r/min离心2min,取100μl菌液上清检测 H_2O_2 ,根据标准曲线,计算 H_2O_2 浓度;产酸功能。麦氏比浊仪测量各种乳杆菌的菌液浊度,用MRS培养液将3株菌液均调制0.5MCF,置于37℃、150r/min摇菌,每隔3h取出少量菌液。用精密pH仪测量其pH值,共测量24h。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 菌株分离及鉴定: 从 50 份 VVC 患者阴道分泌物标本中共分离出 34 株乳杆菌, 分属于乳杆菌的 4 个菌种。其中卷曲乳杆菌 14 株, 加氏乳杆菌 8 株, 詹氏乳杆菌 8 株, 发酵乳杆菌 4 株。每个菌种选择 4 株, 用于功能研究。同时, 选择北京大学第一医院妇科实验室同时期分离的健康女性阴道的 4 株乳杆菌: 卷曲、加氏、詹氏、发酵乳杆菌作为对照。每组实验同种条件下重复 5 次, 所得均值绘制曲线。

2. VVC 阴道内乳杆菌的增殖曲线: 绘制所得的生长曲线图显示乳杆菌 3~9h 呈对数生长期, 12h 后均达平台期。24h 的菌液浊度: VVC 组加氏、卷曲、詹氏、发酵乳杆菌分别为 35.0 ± 2.1 、 32.2 ± 3.2 、 33.4 ± 1.2 、 38.8 ± 1.5 MCF; 健康对照组 4 种乳杆菌分别为 35.2 ± 1.0 、 32.5 ± 2.2 、 34.2 ± 1.8 、 41.5 ± 2.5 MCF。两组加氏、卷曲、詹氏、发酵乳杆菌比较 t 值分别为 0.315、0.519、2.312、2.700, P 均 > 0.05 , 4 组乳杆菌增殖速度无明显差异。描绘增殖曲线见图 1。

3. VVC 阴道乳杆菌产酸能力检测结果: 比较其 24h 的产酸量, VVC 组加氏、卷曲乳杆菌分别为 $(7.9 \pm 1.2) \times 10^{-5}$ 、 $(7.8 \pm 1.3) \times 10^{-5}$, 而健康对照组为 $(11.1 \pm 1.4) \times 10^{-5}$ 、 $(9.8 \pm 1.2) \times 10^{-5}$, 两组比较 t 值分别为 26.957、34.483, $P < 0.05$, 可见随时间增长 VVC 组加氏乳杆菌、卷曲乳杆菌产酸能力与健康女性组相比产酸能力下降。VVC 组发酵乳杆菌产酸量为 $(8.0 \pm 1.3) \times 10^{-5}$, 健康人组为 $(6.1 \pm 1.5) \times 10^{-5}$ ($t = 16.522$, $P < 0.05$), 可见 VVC 组发酵乳杆菌产酸能力增强。VVC 组詹氏乳杆菌产酸量为 $(1.6 \pm 0.7) \times 10^{-4}$, 与健康人组的 $(1.5 \pm 1.7) \times 10^{-4}$ 相比, 产酸能力差异无统计学意义 ($t = 0.100$, $P > 0.05$)。详见图 2。

4. VVC 阴道乳杆菌产 H_2O_2 能力检测结果: VVC 组加氏乳杆菌、卷曲乳杆菌、发酵乳杆菌及詹氏乳杆菌 24h 产 H_2O_2 量通过测量的 A 值计算分别为 1.7 ± 0.2 、 2.1 ± 0.3 、 1.5 ± 0.3 、 1.6 ± 0.2 , 健康女性组 4 种乳杆菌产 H_2O_2 量 2.2 ± 0.1 、 2.4 ± 0.2 、 1.9 ± 0.1 、 2.4 ± 0.3 , 两组相比较的 t 值分别为 8.666、5.199、3.478、12.800, P 均 < 0.05 , 可见 VVC 患者阴道内乳杆菌产 H_2O_2 能力下降, 详见图 3。

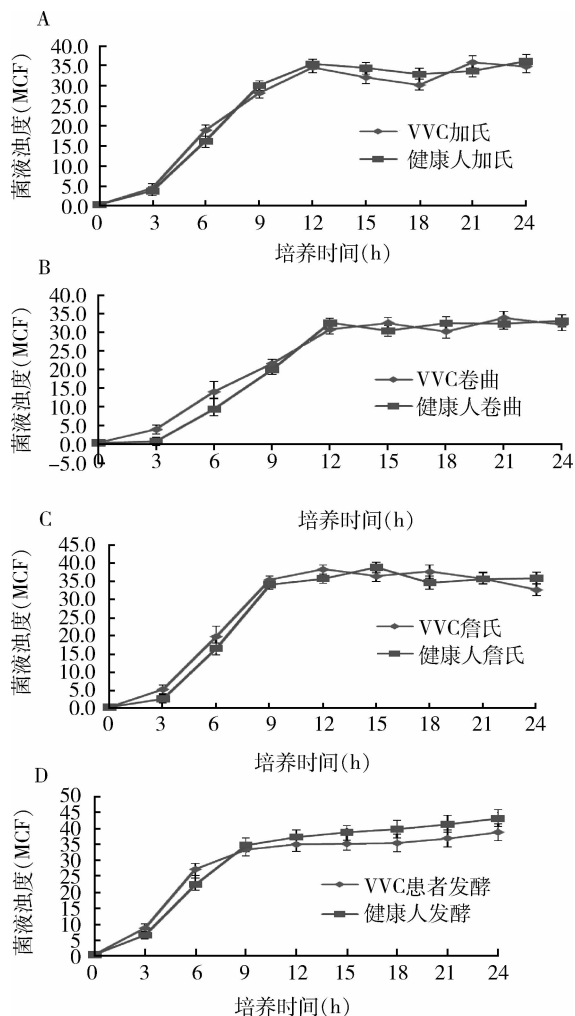


图1 VVC组与健康女性阴道内分离的乳杆菌增殖曲线对比

A. 两组加氏乳杆菌对比; B. 两组卷曲乳杆菌对比; C. 两组詹氏乳杆菌对比; D. 两组发酵乳杆菌对比; P 均 > 0.05

讨 论

外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)的高发及治疗后易复发是一直以来困扰临床的棘手问题。每年美国用于VVC的诊断治疗费用高达10亿美元^[2]。VVC诊断治疗的高费用,使得致病机制和宿主防御机制的研究更加重要,以达到控制和预防VVC的作用。尽管VVC复发的致病机制和免疫机制存在争议,但是存在于阴道的微生态平衡被打破时,酵母菌属就会过度生长。研究结果显示,VVC患者阴道微生态菌群乳杆菌密集度和多样性正常者占88.7%,而菌群抑制者仅占11.3%。而VVC患者阴道内可以检测出多种乳杆菌,其卷曲乳杆菌检出率与健康妇女差异无统计学意义,詹氏乳杆菌、约氏乳杆菌检出率明显多于育龄健康组($P < 0.05$)^[1]。可见VVC患者阴道内

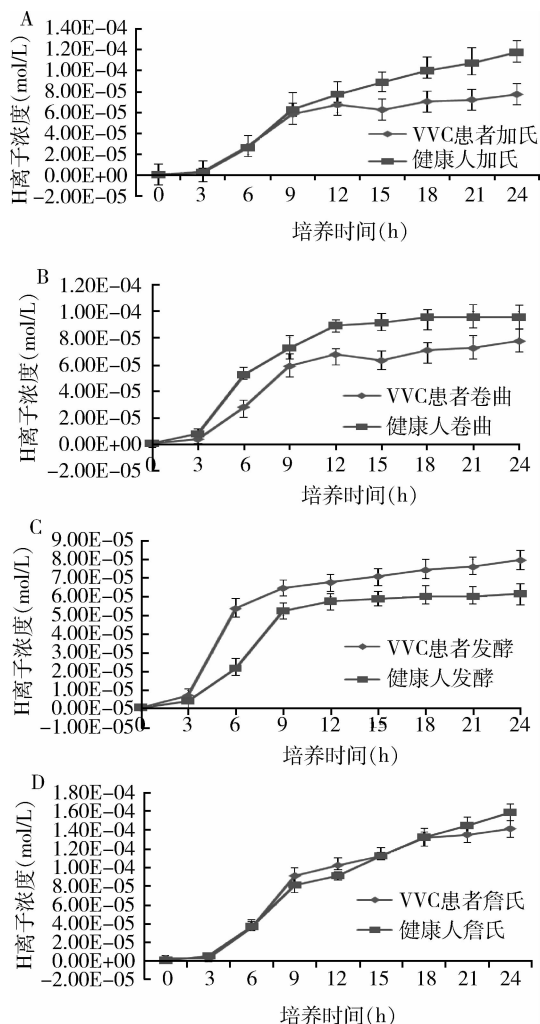


图2 VVC组与健康女性阴道内分离的
乳杆菌产酸能力曲线对比

A. 两组加氏乳杆菌对比; B. 两组卷曲乳杆菌对比;
C. 两组詹氏乳杆菌对比; D. 两组发酵乳杆菌对比; P 均 < 0.05

乳杆菌并不一定减少,但功能是否下降,有待进一步研究比较。

乳杆菌的抑菌功能主要有以下几方面:①乳杆菌消化糖元,产生乳酸,使阴道 pH 值下降,可以抑制病原菌侵蚀;②占位性保护,干扰黏附,妨碍致病菌定植;③细菌素的参与;嗜酸乳杆菌可以产生嗜酸乳菌素和萜苣苦素,此种细菌素可以起保护作用;④营养竞争,减少可用能源;⑤乳杆菌代谢产物 H_2O_2 ,通过介导细菌 DNA 的破坏,来抑制其他细菌的生长。其主要的抑菌作用是产酸和产 H_2O_2 ^[3]。

本研究发现,VVC 患者与健康妇女相比,阴道内分离的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的增殖速度差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。可见 VVC 状态下,念珠菌的增多,阴道微环境的改变,

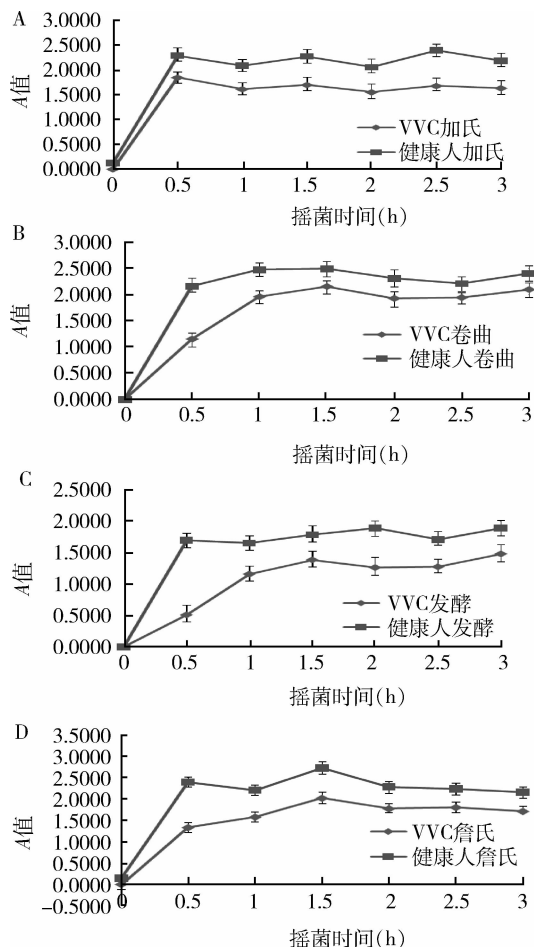


图3 VVC组与健康女性阴道内分离的
乳杆菌产 H_2O_2 能力曲线对比

A. 两组加氏乳杆菌对比; B. 两组卷曲乳杆菌对比;
C. 两组詹氏乳杆菌对比; D. 两组发酵乳杆菌对比; P 均 < 0.05

并未直接影响阴道内定植的乳杆菌的生长。但此结果检测的是 VVC 患者阴道内分离的乳杆菌,培养过程已脱离了与念珠菌共存的环境,不能完全代表 VVC 患者阴道内与念珠菌共存的乳杆菌生长状态。

乳杆菌可以消化阴道壁细胞糖元,产生乳酸以及其他一些有机酸,使阴道 pH 值下降,可以抑制病原菌侵蚀。本研究通过检测乳杆菌菌液 24h 的 pH 值变化来判断不同菌种的产酸能力。检测 VVC 患者及健康妇女阴道内 4 种乳杆菌的 pH 值,每 3h 检测 1 次,共检测 24h。可见健康女性加氏乳杆菌与卷曲乳杆菌的产酸能力比 VVC 患者强 ($P < 0.05$),其结果与文献报道相似,正常妇女嗜酸乳酸杆菌和卷曲乳酸杆菌产酸能力较 VVC 患者强^[4]。詹氏乳杆菌的产酸能力两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 VVC 患者发酵乳杆菌的产酸能力比健康女性强 ($P < 0.05$)。Zhou 等^[5]认为反复发作 VVC 妇女的阴道内含有大

量产酸乳杆菌,低阴道 pH 值可能不足以抑制 VVC 的复发。可见乳杆菌的产酸功能并不是抑制 VVC 的关键。

乳杆菌代谢产物 H_2O_2 可抑制阴道内嗜酸菌及厌氧菌的生长。有研究结果显示,白念菌的感染更容易发生于阴道内只有非产 H_2O_2 的乳杆菌的妇女,提示乳杆菌产生的 H_2O_2 在抑制体内白念菌的生长方面起重要作用^[4]。体外实验显示高浓度的 H_2O_2 可以杀灭白念菌^[6]。也有研究结果显示,VVC 患者阴道乳杆菌与健康女性相比,产 H_2O_2 无明显差别。但采用的是定性的方法,存在片面性。本实验检测其产生 H_2O_2 的量,比较两组 H_2O_2 的量的差别,更加准确的代表了各种乳杆菌在 VVC 患者阴道中的功能变化。本研究结果显示,VVC 患者阴道内分离的卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、发酵乳杆菌的产 H_2O_2 量均明显少于健康妇女 ($P < 0.05$)。提示健康女性阴道内乳杆菌产 H_2O_2 能力强于 VVC 患者,可能阴道内乳杆菌产 H_2O_2 能力下降后对白念菌的抑制作用减弱,更加易感 VVC。 H_2O_2 的杀菌作用通过其氧化代谢产物产生,如 OH^- ,可以进入细胞,打断细胞的 DNA,从而杀掉细胞。此作用可以在酸性阴道环境,以及过氧化物酶、卤化物存在时明显增强。偏酸性的环境更加适于乳杆菌产 H_2O_2 。念珠菌生长最适宜的 pH 值为 5.5,VVC 患者阴道 pH 值约为 4.5,而健康女性阴道为偏酸性环境 pH 值为 3.7~4.5,pH 值的升高可能导致阴道内乳杆菌产 H_2O_2 能力偏弱,从而对致病菌的抑制减弱,并最终导致阴道感染。

VVC 患者阴道内乳杆菌数量并不一定减少,但其产 H_2O_2 能力是明显下降的。临床工作中对 VVC 患者进行的微生态涂片检测,多于 2/3 患者阴道内乳

杆菌菌群无异常,可能存在片面性。乳杆菌密集度,多样性等形态学观察并不一定完全代表阴道内乳杆菌的状态。虽然乳杆菌的密集度正常,但其功能有可能已经下降,从而导致对致病菌抵抗力下降。那么可以考虑应用微生态益生菌制剂添加入阴道,增加阴道抵抗力,预防阴道感染性疾病。目前临床上的微生态制剂较少,定菌生是常见的益生菌制剂。定菌生是单一的德氏乳杆菌制剂。本研究结果显示中国女性阴道内鲜有德氏乳杆菌定值,因此定菌生并不一定适合中国女性。今后可利用不同种、型间的优势并结合其产酸、产 H_2O_2 能力开发出一种含不同乳杆菌的混合菌剂来调节阴道微生态,辅助治疗阴道感染。

参考文献

- 1 周丹,崔颖,张瑞,等. 妊娠期外阴阴道假丝酵母菌病阴道乳杆菌的变化[J]. 中国生育健康杂志,2013,24(3):179-184
- 2 Ward A, Alvarez P, Vo L, et al. Direct medical costs of complications of diabetes in the United States: estimates for event-year and annual state costs (USD 2012)[J]. J Med Econ, 2014,17(3):176-183
- 3 Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health[J]. Arch Gynecol Obstet,2014, 289(3):479-489
- 4 杨常敏,骆志成,周晓黎,等. 外阴阴道念珠菌病阴道乳酸杆菌的分布及作用[J]. 中国艾滋病性病,2007, 13(3):246-247
- 5 Zhou X, Westman R, Hickey R, et al. Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis[J]. Infection and Immunity, 2009,77(9):4130-4135
- 6 Abramov V, Khlebnikov V, Kosarev I, et al. Probiotic properties of lactobacillus crispatus 2029: homeostatic interaction with cervicovaginal epithelial cells and antagonistic activity to genitourinary pathogens[J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2014,6(34):165-176

(收稿日期:2015-06-23)

(修回日期:2015-08-13)

火器-冻复合伤后早期血流动力学变化研究

肖 熙 孟 辉 杨臣礼 李乃斌 李庆新 高 炜 张宏伟 晁 栋

摘 要 目的 观察火器-冻、冻-火器复合伤后早期血流动力学变化规律为复合伤后早期救治提供依据。**方法** 将 30 只日本大耳白兔随机分为 A 组火器-冻,B 组冻-火器,C 组火器伤,D 组冻伤,E 组空白对照组。构建各组模型后连续监测心率

基金项目:全军“十一五”基金资助项目(面上项目)(06MB103);兰州军区“十一五”医学科研计划基金资助项目(LXH-2006027);2015 年度兰州军区基金资助项目(面上项目)A 类(CLZ15JA04)

作者单位:730000 兰州,甘肃中医药大学临床医学院(肖熙);730050 中国人民解放军兰州军区兰州总医院胸外科(孟辉、杨臣礼、李乃斌、李庆新、高炜、张宏伟、晁栋)

通讯作者:孟辉,硕士生导师,电子邮箱:mhgl2008@163.com