

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.09.003

❖ 基础研究 ❖

阴道卷曲乳杆菌 S 层蛋白多样性研究

李娜¹, 刘好静², 张婷¹, 张茜¹, 李娇¹

(1. 西安交通大学第一附属医院妇产科, 陕西 西安 710061; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 咸阳 712100)

【摘要】目的: 分析比较西安市女性阴道卷曲乳杆菌 S 层蛋白的多样性及 NCBI 数据库中阴道来源卷曲乳杆菌 S 层蛋白的多样性。**方法:** 选取 100 例妇科患者的阴道分泌物标本作为研究对象, 从其中 10 例标本中分离得到 480 株卷曲乳杆菌, 其中两株卷曲乳杆菌 S 层蛋白有明显差异, 对其进行全基因组测序; 并从 NCBI 数据库中下载人阴道源的卷曲乳杆菌全基因组数据, 分析并比较西安市来源与数据库来源的卷曲乳杆菌 S 层蛋白的多样性。**结果:** S 层蛋白注释基因具有菌株内和菌株间的多样性, 同一套基因组中有多个 S 层蛋白注释基因, 菌株间的相似性偏差较大, 通过系统发育分析发现, 中国人阴道卷曲乳杆菌的 S 层蛋白基因与其他人种的具有系统发育相似性。**结论:** 阴道卷曲乳杆菌 S 层蛋白具有菌种间和菌株间多样性的特征, 不同人种的卷曲乳杆菌具有相似性。

【关键词】 阴道; 卷曲乳杆菌; S 层蛋白; 多样性

【中图分类号】 R711.3 **【文献标志码】** A

Diversity of S-layer proteins in vaginal lactobacillus crispatus

LI Na¹, LIU Hao-jing², ZHANG Ting¹, ZHANG Qian¹, LI Jiao¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Xianyang 712100, Shaanxi, China)

【Abstract】Objective: To analyze and compare the diversity of S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* from women's vaginas in Xi'an and the diversity of S-layer proteins of *L. crispatus* from vaginal sources in the NCBI database. **Methods:** 100 specimens of vaginal secretions from patients seen in obstetrics and gynecology were selected, 480 strains of curly lactobacilli were isolated from 10 specimens, among which two strains showed significant differences in the S layer protein. Whole genome sequencing was performed on them. And download the whole genome data of human vaginal derived *Lactobacillus crispus* from NCBI database, the diversity of S-layer proteins of *Lactobacillus*. **Results:** The S-layer protein annotation genes had intra- and inter-strain diversity, with multiple S-layer protein annotation genes in the same set of genomes and large similarity bias between strains. Phylogenetic analysis revealed that the S-layer protein genes of *Lactobacillus crispus vaginalis* of Chinese origin had phylogenetic similarity with those of other human species. **Conclusion:** The S-layer proteins of *Lactobacillus crispus* are characterized by interspecies and interstrain diversity, and *Lactobacillus crispus* from different human species have similarities.

【Key words】 Vagina; *Lactobacillus crispatus*; S-layer protein; Diversity

卷曲乳杆菌与女性阴道健康息息相关, 以卷曲乳杆菌为主的阴道罹患细菌性阴道疾病的风险相比于以其他乳酸菌为主的女性低 5 倍^[1]。共生器官(微生态系统)中共生菌的生理功能具有菌株的特异性, 同一菌种的不同菌株在与宿主及与其他共生菌的互动中发挥的功能及扮演的角色具有迥异的差异^[2]。因此, 剖析和认识共生器官中共生菌的种内差异菌株或菌株群是阐明共生菌的益生效应及作用机制的重要前提。卷曲乳杆菌是一类具有 S 层蛋白的乳杆菌, S 层是由 S 层蛋白通过非共价自组装在

一些微生物细胞壁表面的一层蛋白类晶体结构, S 层蛋白在微生物的粘附、抑菌以及免疫调节等方面具有重要功能^[3]。同时, S 层蛋白具有菌种和种内菌株间的多样性。利用 S 层蛋白具有菌株间多样性的特异性的特征, 将 S 层蛋白作为一个有潜力的菌株分类的标记去厘清种内差异菌株, 是探究种内差异菌株群的有效方法和新角度。因此, 本研究以 S 层蛋白为切入点, 分析并比较西安市来源的与数据库来源的卷曲乳杆菌 S 层蛋白的多样性, 确定卷曲乳杆菌 S 层蛋白菌种间和菌株间多样性的特征。

基金项目: 中国杨凌本真基金会项目(HX202232); 陕西省重点研发计划一般项目—社会发展领域(2022SF-071)

作者简介: 李娜(1985-), 女, 硕士, 主管技师。E-mail: ln1227202404@163.com

通讯作者: 李娇。E-mail: lj@xjtu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2023 年 5 月至 2023 年 8 月西安交通大学第一附属医院采集的 100 例阴道分泌物标本作为研究对象。纳入标准:(1)受检者 48 h 内无阴道冲洗、无性生活、无阴道放药行为;(2)显微镜观察全部为杆菌,无球菌。排除标准:月经期及阴道异常出血患者。

1.2 研究方法

1.2.1 阴道卷曲乳杆菌的分离与鉴定 患者取膀胱截石位,以窥器打开阴道后,用无菌棉签于阴道上 1/3 处取阴道分泌物后置于试管内,稀释适宜倍数后涂布于 MRS 培养基,37 °C 厌氧培养 24 ~ 36 h 后,挑取单菌落接种于 MRS 液体培养基,过夜培养后基于分子生物学方法鉴定出两株 *L. crispatus* 菌株。方法如下:采用 EasyPure Genomic DNA Kit 商业试剂盒提取基因组 DNA;采用通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rDNA 序列;经电泳检测 PCR 产物符合序列

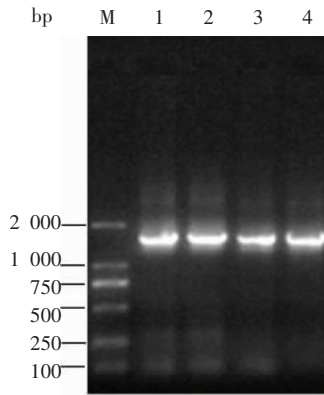


图 1 16S rDNA 扩增产物电泳图

大小和质量要求后,进行测序,测序所得序列在 NCBI 进行 BLAST 比对分析。

1.2.2 阴道卷曲乳杆菌的全基因组测序 由上海派森诺生物科技有限公司提供服务。

1.2.3 多样性分析 其他人种卷曲乳杆菌基因组信息由 NCBI 数据库中获取。

2 结果

2.1 阴道卷曲乳杆菌的分离鉴定

经初步鉴定 100 例阴道分泌物标本中有 10 例标本含卷曲乳杆菌,以 S 层蛋白为指标,从 10 例标本中共分离得到 480 株卷曲乳杆菌,其中两株卷曲乳杆菌 S 层蛋白有明显差异,将这两株卷曲乳杆菌定为后续研究对象,其 16S rDNA 扩增结果可见,产物大小均为 1.5 kb 左右,符合细菌 16s rDNA 的大小,测序所得序列经 NCBI 比对后,两株菌均为卷曲乳杆菌。见图 1。革兰氏阳性染色可见,卷曲乳杆菌形态为细长杆状、弯曲,链状排列。见图 2。

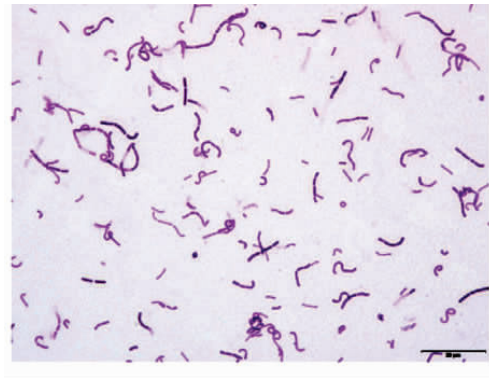


图 2 革兰氏染色

2.2 全基因组数据比较分析

两株卷曲乳杆菌的全基因组测序结果与 NCBI 数据库中的结果一致,阴道来源的卷曲乳杆菌中包

含多个 SLAP 结构域的蛋白, S 层蛋白注释基因具有菌株内和菌株间的多样性。见表 1 及图 3-图 4。

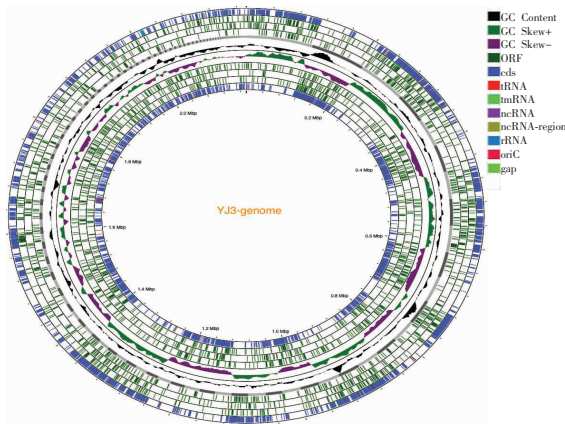


图 3 YJ3 基因组圈图

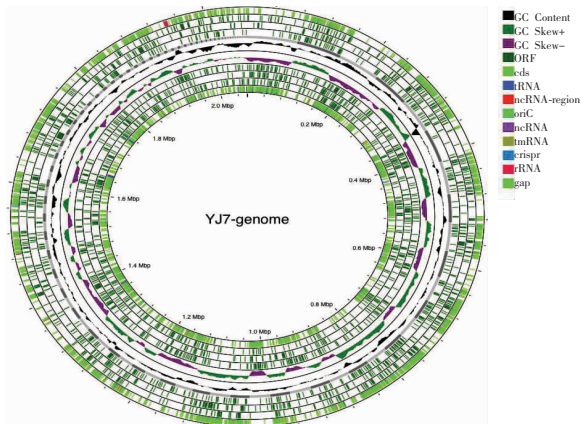


图 4 YJ7 基因组圈图

表 1 全基因组数据比较分析

菌株名称	测序水平	来源	国家	SLAP 的数量
YJ-3	完成图	阴道	中国	21
YJ-7	完成图	阴道	中国	23
VSI04	完成图	阴道	美国	18
VSI08	完成图	阴道	美国	19
VSI17	完成图	阴道	美国	20
VSI21	完成图	阴道	美国	21
VSI24	完成图	阴道	美国	22
Lcr-MH175	完成图	阴道	中国	20
2029	完成图	阴道	俄罗斯	22
PMC201	完成图	阴道	韩国	21
lc31	完成图	阴道	中国	21
lc83	完成图	阴道	中国	23
PRL2021	完成图	阴道	意大利	19
FDAARGOS-743	完成图	阴道	美国	23
CO3MRSII	完成图	阴道	美国	20
AB70	完成图	阴道	韩国	20

2.3 菌株间 S 层蛋白多样性分析

每个基因组中有两个注释的 S 层蛋白序列除 N 端结构域保守外,其 C 端的信号肽也是高度保守的。见图 5。且部分蛋白在不同的卷曲乳杆菌菌株中同时出现,菌株内和菌株间 S 层蛋白注释基因既有相似性也有差异性。见图 6。

2.4 菌株间 S 层蛋白系统发育分析

采用 MEGA11 对这些 S 层蛋白注释基因进行比对并构建进化树,结果发现中国人阴道卷曲乳杆菌的 S 层蛋白基因与欧美非人种的具有系统发育相似性。见图 7。

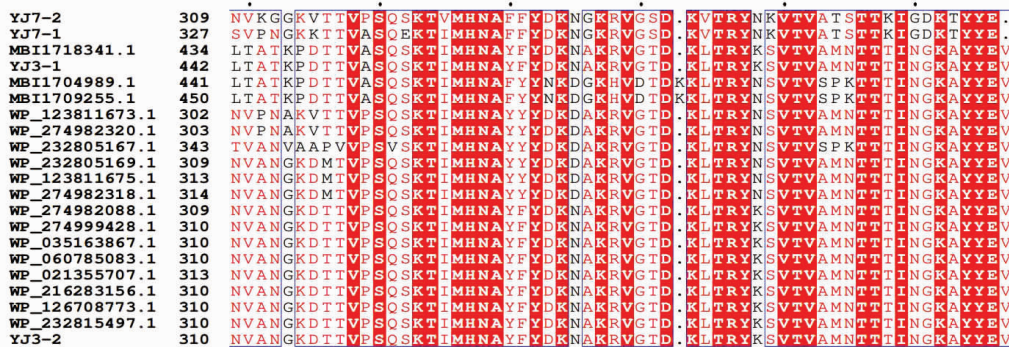


图 5 S 层蛋白序列比对结果

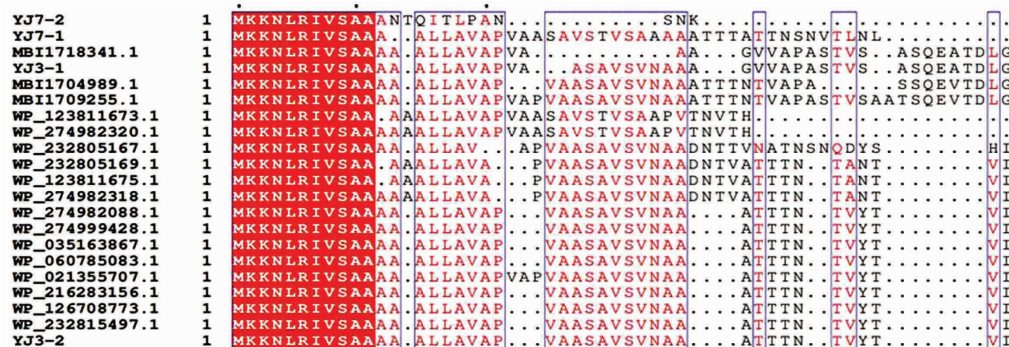


图 6 S 层蛋白序列比对结果

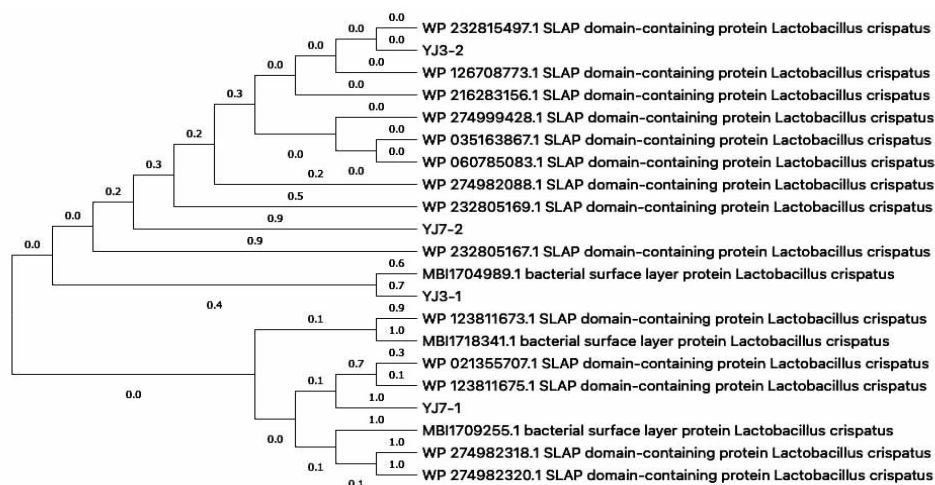


图 7 S 层蛋白系统发育分析

3 讨论

细菌性阴道病是一种常见的妇科感染疾病,主要由阴道内菌群失衡引起。正常情况下,阴道内存在多种微生物,它们之间处于动态平衡,共同维护阴道的健康^[4]。当各种原因,如妊娠及分娩、滥用抗生素、阴道冲洗等引起阴道微生态失调,导致阴道炎发生^[5]。卷曲乳杆菌是阴道内的一种有益菌,对于维持阴道的微生态平衡具有重要作用。它可以通过产生乳酸等物质,降低阴道内 pH 值,从而抑制其他病原微生物的生长。此外,卷曲乳杆菌还可以通过与其他微生物的相互作用,共同维护阴道的健康状态^[6]。因此,卷曲乳杆菌的数量和活性与细菌性阴道病的发生密切相关。当卷曲乳杆菌数量减少或活性降低时,阴道内的菌群平衡可能受到破坏,从而增加细菌性阴道病的风险。保持阴道内菌群平衡、增加卷曲乳杆菌的数量和活性,有助于预防和治疗阴道炎症^[7]。

作为常见的益生菌,乳酸菌有 25 个属 261 个种^[8],包含大量的种间和种内差异菌株,而乳酸菌的益生效应机制、益生效应组分及其与宿主的作用途径具有高度的种属和种内菌株特异性^[9],导致乳酸菌种属间以及种内差异菌株间的益生效应迥异。鸟枪法宏基因组学是一种广泛使用的,研究微生物组成及其群落功能的技术,然而,宏基因组学通常不能有效地分配单个样本中多个分类群共有的 DNA 序列,例如当一个物种具有多个菌株或多个分类群的基因组中出现同源序列时^[10]。因此,鸟枪法宏基因组学通常不能通过菌株分辨率来解析基因组。另外,单细胞基因组学或微宏基因组学可能产生菌株分解基因组,并已用于探测噬菌体和细菌之间的关联^[11]。然而,对于所有这些宏基因组、培养和孔板方法,现有资源严重限制了来自同一菌种不同菌株的分解基因组的数量^[12],从而限制了对特定人群的人类微生物组的基因组结构和动力学的了解。相比之下,来自人类肠道微生物组的高质量菌株分辨基因组已经从单个微生物培养的菌落中组装出来^[13];然而,培养菌落劳动强度大,耗时长,并且偏向于容易培养的微生物。肠道乳酸菌的种间和种内差异菌株的丰度以及生长强度悬殊,以现有的低效率和低通量的筛选体系根本无法触探到大量的低丰度和低生长强度的乳酸菌^[14],导致这些菌株从未进入筛选视野,造成大量潜在的乳酸菌优良菌株的漏筛。有效的筛选指标是高通量筛选挖掘差异菌株的关键,而 S 层蛋白在健康效应和结构组成等方面的特性使

其具有成为高效筛选指标的潜力。

S 层蛋白是广泛存在于所有古生菌和大多数细菌的表面蛋白类晶体结构^[15-16]。S 层蛋白是乳酸菌肠道黏附的关键结构,在肠道微生物的黏附定植^[17]、肠道免疫调节^[18]、抗菌和抗病毒^[19]等方面均有独特作用,是重要的健康效应组分。S 层蛋白在同一微生物基因组中有多个不同的编码基因,并且在数量、编码基因水平和蛋白水平等均具有种属间以及种内差异菌株间的多样性和特异性^[5]。目前已报道^[20]的嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌和约氏乳杆菌等 13 株乳酸菌的 S 层蛋白在大小、序列以及结构功能上具有明显的差异。综上,S 层蛋白具有明确的益生效应结构,在乳酸菌的益生效应中具有重要功能,更为重要的是 S 层蛋白的基因、蛋白和结构在种属间和种内菌株间均具有多样性和特异性,符合乳酸菌通量筛选指标的要求。因此,以 S 层蛋白为指标进行卷曲乳杆菌差异菌株的分类是一个最佳策略。基于此,本研究以 S 层蛋白为切入点,分析并比较西安市数据库来源的卷曲乳杆菌 S 层蛋白的多样性,确定卷曲乳杆菌 S 层蛋白菌种间和菌株间多样性的特征,为探究阴道卷曲乳杆菌种内差异菌株群奠定基础。通过分析发现,不同国家地区来源的卷曲乳杆菌,其基因组上都具有多个 S 层蛋白的编码基因,且有些 S 层蛋白的编码基因为不同菌株所共有,此外,每一个菌株内及不同菌株间其基因组上都有两个 S 层蛋白其信号肽高度保守,说明 S 层蛋白既有保守性又有多样性。

综上,阴道源卷曲乳杆菌的 S 层蛋白具有菌种间和菌株间多样性的特征,不同人种的卷曲乳杆菌具有相似性,以 S 层蛋白为标记对卷曲乳杆菌进行分类是可行的。

参考文献

- [1] 李晴,汪艳珠,刘宸好,等.高通量测序时代的阴道微生物菌群的组成与维护[J].国际检验医学杂志,2017,38(18):2584-2588.
- [2] McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Frontiers in Medicine*, 2018, 5: 124.
- [3] Malamud M, Carasi P, Bronsoms S, et al. *Lactobacillus kefir* shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(4): 515-530.
- [4] 戚燕妮,吴丹梅.阴道用乳杆菌活菌胶囊治疗妊娠期细菌性阴道病的临床疗效及对妊娠结局的影响[J].保健医学研究与实践,2020,6(2):61-63,68.

(下转第 1175 页)