



人生殖道源乳酸杆菌的筛选及在小鼠阴道假丝酵母病模型中的应用评价

刘胡林¹, 徐兴然¹, 凌开建^{2*}, 邹祥^{1*}

1 西南大学药学院, 重庆 400715

2 陆军军医大学第一附属医院妇产科, 重庆 400038

刘胡林, 徐兴然, 凌开建, 邹祥. 人生殖道源乳酸杆菌的筛选及在小鼠阴道假丝酵母病模型中的应用评价. 微生物学报, 2022, 62(11): 4141–4154.

Liu Hulin, Xu Xingran, Ling Kaijian, Zou Xiang. *Lactobacillus*: screening from human reproductive tract and therapeutic effect on a mouse model of vulvovaginal candidiasis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4141–4154.

摘要: 【目的】分离筛选人阴道环境中具有益生特性的乳酸杆菌, 探索外阴阴道假丝酵母病的益生菌疗法。【方法】利用含 1% 碳酸钙的 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培养基从无症状育龄女性阴道分泌物中分离乳酸杆菌, 采用共培养方法评价其对白色念珠菌(*Candida albicans*)的抑制作用, 通过对乳酸杆菌的耐酸性能、体外聚集特性和黏附能力测试考察其益生特性, 并进行乳酸杆菌株功能化组合。通过构建小鼠外阴阴道假丝酵母病模型, 初步探索乳酸杆菌株组合对 *C. albicans* 的抑制作用。【结果】从 53 个样品中分离得到 19 株乳酸杆菌, 筛选获得 4 株乳酸杆菌(*Lactobacillus crispatus* ZH08、*L. fermentum* ZH09、*L. fermentum* ZH11 和 *L. crispatus* ZH17) 具有较强抑制 *C. albicans* 生长的能力。4 株乳酸杆菌均能耐受低 pH 环境, 能快速降低培养液 pH。其中 2 株 *L. fermentum* 具有更强的抑制活性, 能在 24 h 内快速抑制 *C. albicans* 生长, 抑制率可达到 95% 以上; 另 2 株 *L. crispatus* 具有更强的聚集特性和对上皮细胞有较强黏附性。乳酸杆菌 ZH17 和 ZH11 组合应用小鼠阴道假丝酵母病模型治疗, 能显著抑制 *C. albicans* 生长和菌丝相转化, 促进粘膜修复和缓解炎症。【结论】本研究筛选的乳酸杆菌具有生殖道益生菌的特性, 乳酸杆菌组合应用具有潜在的临床前景。

关键词: 乳酸杆菌; 菌群干预; 益生菌; 白色念珠菌; 阴道炎

*Corresponding authors. ZOU Xiang, Tel/Fax: +86-23-68251225, E-mail: zhx1030@swu.edu.cn; LING Kaijian, Tel/Fax: +86-23-68765401, E-mail: lingkaijian@163.com

Received: 1 May 2022; Revised: 14 September 2022; Published online: 10 October 2022

Lactobacillus: screening from human reproductive tract and therapeutic effect on a mouse model of vulvovaginal candidiasis

LIU Hulin¹, XU Xingran¹, LING Kaijian^{2*}, ZOU Xiang^{1*}

¹ College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: [Objective] To isolate probiotic *Lactobacillus* strains from the human reproductive tract and explore the therapeutic effect of the strains on vulvovaginal candidiasis. [Methods] We used the de Man, Rogosa and Sharpe agar containing 1% calcium carbonate to isolate the *Lactobacillus* strains from the vaginal secretions of asymptomatic women in the childbearing age, screened the strains by using the co-culture method with *Candida albicans*, and then examined their physiological properties. The inhibitory effect of *Lactobacillus* was further evaluated in a mouse model of vulvovaginal candidiasis. [Results] Nineteen strains of *Lactobacillus* sp. were isolated from 53 samples. Among of them, 4 strains, i.e., *L. crispatus* ZH08, *L. fermentum* ZH09, *L. fermentum* ZH11, and *L. crispatus* ZH17, showed strong inhibitory effect against *C. albicans*, and grew well in a low-pH environment. *L. fermentum* ZH09 and ZH11 inhibited the growth of *C. albicans*, with the inhibition effect over 95% within 24 h. *L. crispatus* ZH08 and ZH17 had strong aggregation property and demonstrated strong adhesion to epithelial cells. Furthermore, the combination of *L. fermentum* ZH11 and *L. crispatus* ZH17 significantly inhibited the growth and the switch from budding to hyphal growth of *C. albicans*, promoted mucosal repair, and relieved inflammation in a mouse model of vulvovaginal candidiasis. [Conclusion] The screened *Lactobacillus* strains have probiotic properties and the potential in clinical application.

Keywords: *Lactobacillus*; flora intervention; probiotics; *Candida albicans*; vaginitis

人和动物阴道内存在复杂的微生物群落，与宿主存在共生关系，被称为阴道微生物群^[1]。大多数健康女性的阴道微生物群以乳酸杆菌(*Lactobacillus*)为优势菌，乳酸杆菌的缺失或减少常常表现为阴道微生态失衡，导致阴道炎症，增加不孕、流产、病毒感染、妇科肿瘤的风险。外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)在育龄女性一生中的发病率高达 70%以上，80%的 VVC 病例由白色念珠菌(*Candida albicans*)过度繁殖引起。目前主要使用抗真菌疗法，但复发率高达 50%^[2]。长期阴道用药或口服抗生素以控制复发而导致的耐药性问题日益严重，而目前缺少可替代药物^[3]。此外，抗

菌药物的局部高浓度可能抑制乳酸菌的生长，引起新的菌群失调状态。因此，临床研究逐渐认识到以乳酸杆菌为主导的阴道菌群恢复性治疗不能被忽略。

乳酸杆菌作为阴道内重要益生菌，通过黏附在阴道上皮产生乳酸维持阴道内低 pH 环境，并通过多种方式(竞争排斥、产生抑菌物质和调节免疫等)限制其他病原菌的生长，促进阴道微生态平衡^[4]。已有研究者将乳酸杆菌用作阴道益生菌疗法，益生菌疗法能改善患者的不适症状，尤其是细菌性阴道病，可提高治愈率、降低复发率，少有不良反应报道^[5-6]。Ling 等^[7]分析了使用抗生素疗法和益生菌疗法后的阴道

菌群差异, 益生菌通过抑制病原菌过度生长并逐渐稳定地重建阴道稳态, 表现出明显的疗效和较低的复发率; Macklaim 等^[8]也证明口服乳酸杆菌可通过非阴道定殖的方式诱导阴道内乳杆菌的相对丰度以促进患者恢复健康, 但尚需大样本临床验证。在国内, 目前临床上仅批准了一种阴道乳酸杆菌活菌制剂——定君生(国药准字 S20030005), 为德氏乳杆菌 DM8909, 可见临床可用的乳酸杆菌资源仍然有限。

基于上述现状, 本研究从中国女性阴道分泌物中分离筛选有良好益生作用的内源性乳酸杆菌, 并评价益生特性, 进一步丰富临床可用的乳酸杆菌资源, 为临床治疗阴道炎症提供替代方案。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采自 53 名 19–50 岁中国育龄女性的阴道分泌物。*C. albicans* CMCC (F) 98001 购自中国食品药品检定研究院。CaSki 细胞由陆军军医大学第一附属医院凌开建医生惠赠。

1.2 培养基

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培养基参照文献[9], 生物胺测试培养基参照文献[10]。

YPD 培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0, 葡萄糖 20.0。

5% 羊血-哥伦比亚培养基(g/L): 胰酪蛋白胨 12.0, 牛肉浸粉 3.0, 蛋白胨 5.0, 可溶性淀粉 1.0, 酵母浸粉 3.0, 氯化钠 5.0, 调节 pH 至 7.3 ± 0.2 , $115\text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min, 待冷却至 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时加入 5% 脱纤维羊血, 轻摇混匀后倒板。

1.3 乳酸杆菌的分离和鉴定

将样品用无菌 PBS 稀释后, 接种在补充有 1% 碳酸钙的 MRS 琼脂上, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下厌氧培养 48 h 分离乳酸杆菌。通过观察菌落溶钙圈、革兰氏染色、触酶反应测试和 16S rRNA 基因

测序进行鉴定。

1.4 乳酸杆菌对白色念珠菌拮抗作用测定

1.4.1 乳酸杆菌对白色念珠菌的生长抑制作用

同时共培养: 收集活化后的 *C. albicans*, 调整菌浓度为 1×10^7 CFU/mL, 以 1% (V/V) 接种于新鲜 MRS 培养基中, 收集活化后的乳酸杆菌, 调整菌浓度为 1×10^9 CFU/mL, 10 倍梯度稀释至浓度 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL, 以 1% 接种于新鲜 MRS 培养基中, 使初始接种量为 10^7 、 10^6 和 10^5 CFU/mL。37 °C 静置培养 24 h, 用 PBS 稀释培养液至适宜的梯度, 取 100 μ L 培养液涂布于 YPD 固体培养基, 37 °C 培养, 对平板中 *C. albicans* 菌落计数, 结果表示为 3 个平行的平均值。

差时共培养: 收集活化后 *C. albicans* 菌液, 调整菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL, 以 1% (V/V) 接种于新鲜 MRS 培养基中, 静置培养 8 h, 加入等量新鲜 MRS 培养基重悬的乳杆菌菌液 (1×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL)。继续 37 °C 静置培养 16 h。同前所述的方法对 *C. albicans* 培养液计数。

乳酸杆菌无细胞上清液 (cell-free excretory supernatants, CFS) 对白色念珠菌的生长抑制作用: 乳酸杆菌培养 48 h, 测定 pH 后用 0.22 μ m 滤膜过滤得到 CFS。为探究其 pH 的影响, 用氢氧化钠溶液调节上清液 pH 到 7.0, 利用 0.22 μ m 滤膜过滤得 pH 7.0 的 CFS。用牛津杯法和微孔板法测定样品对白色念珠菌的抑菌活性。

1.4.2 乳酸杆菌菌悬液和 CFS 对白色念珠菌表型转化的抑制作用

收集活化后 *C. albicans* 菌液, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 FBS 稀释调整菌浓度为 10^6 CFU/mL, 同理将乳杆菌用 FBS 稀释调整菌浓度为 10^8 CFU/mL。无细胞上清液 (CFS) 制备同前。参照文献[11]诱导 *C. albicans* 菌丝相转化, 并测定菌丝转化抑

抑制率。抑制率(%)=($OD_{\text{对照}}-OD_{\text{测试}}$)/ $OD_{\text{对照}}\times 100$ 。结果表示为 3 个平行实验的平均值。

1.4.3 CFS 中抑菌物质初步探索

测定方法参照文献[12],以核糖醇为内标,通过三甲基硅烷化法得到硅烷化的 CFS 衍生物,经 GC-MS 上机分析,结果保留峰面积 0.1%以上自动积峰,用内置标准质谱数据库鉴定代谢物,根据保留时间和质谱相似度(超过 80%)匹配确定了潜在代谢物。

1.5 乳酸杆菌的生物学功能和益生特性

1.5.1 不同 pH 下生长情况和降低 pH 能力

收集活化后菌株调节菌浓度为 1×10^8 CFU/mL,按 1%的接种量转接于 pH 为 6.0、4.5 和 4.0 的 MRS 培养基中,37 °C 厌氧培养,于 0、6、12、24、36 和 48 h 取样用酶标仪测定 OD_{600} 。

收集活化后菌株调节菌浓度为 1×10^8 CFU/mL,按 1%的接种量转接于 pH 为 6.0 的 MRS 培养基中,37 °C 厌氧培养,于 0、6、12、24、36 和 48 h 取样测定其 pH 值。

1.5.2 自聚集和共聚集特性

测定方法参考文献[13]。以 10 000 r/min 离心 5 min,收集在 MRS 肉汤中 37 °C 厌氧生长至指数期的乳杆菌。用 PBS 洗涤 2 次后调节 OD_{600} 为 0.5。取 1.4 mL 菌悬液均匀混合 10 s,37 °C 孵育 3 h 后,取 0.2 mL 上层悬浮液,并在 600 nm 处测量吸光度。按公式(1)计算自动聚集百分比。

$$\text{自动聚集}(\%)=(OD_{0h}-OD_{3h})/OD_{0h}\times 100 \quad (1)$$

共聚集菌悬液的制备方法与自聚集试验相同。将等体积(0.7 mL)的每种乳杆菌悬液分别与 *C. albicans* 菌悬液混合,涡旋 10 s。在 37 °C 孵育 3 h 前后测定上层悬浮液的 OD_{600} 。共聚集率按照公式(2)计算。

$$\text{共聚集}(\%)=\frac{OD_A+OD_B-2\times OD_{\text{mix}}}{OD_A+OD_B}\times 100 \quad (2)$$

式中： OD_A 和 OD_B 分别代表培养前 *Lactobacillus* 和 *C. albicans* 的 OD_{600} ； OD_{mix} 表示共聚集混合物孵育后的 OD_{600} 。

1.5.3 上皮细胞黏附性

平板菌落计数法测定黏附指数,测定方法参考文献[14]。在 12 孔细胞培养板中, CaSki 细胞在 10%胎牛血清 DMEM 培养基中生长至 80% 融合(37 °C, 5% CO_2)。收集活化乳杆菌,用 PBS 洗涤 3 次,用新鲜 DMEM 培养基调整菌浓度(约 10^7 CFU/mL)加入 12 孔板中,在 37 °C 下共培养 3 h,之后弃去培养液,用 PBS 洗涤细胞 3 次去除未结合的细菌。使用 0.1% Triton X-100 分离细胞和结合的细菌,连续稀释并涂布 MRS 琼脂板,37 °C 下厌氧培养 48 h,对乳酸杆菌菌落计数。黏附指数的计算为最初添加的细菌总数与结合细胞的细菌数的比值,结果表示为 3 组平行的平均值。

1.6 乳酸杆菌对小鼠外阴阴道假丝酵母病模型干预作用的初步探索

1.6.1 小鼠分组和模型建立

小鼠外阴阴道假丝酵母病模型建立方法参考文献[15],KM 雌性 8 周龄 SPF 级小鼠饲养在温度 25 °C,湿度 60%,光照/黑暗 12 h 周期交替的环境中,可以自由饮水和获取食物。试验动物分组及处理见表 1。小鼠经适应性喂养后,随机分为 4 组,每组 5 只,分别为空白对照组(control)、模型对照组(model)、预防组(Pre-LFC)、治疗组(LFC)。除空白组外,雌性小鼠每 5 天皮下注射 0.1 mL 戊酸雌二醇油剂(1 mg/mL)以维持假发情状态。试验从皮下接种戊酸雌二醇后第 2 天开始,进行预防性接种 7 d,后以 *C. albicans* 阴道内注射创建小鼠外阴阴道假丝酵母菌病模型。造模第 2 天开始进行治疗性接种 7 d。

表 1 试验动物分组

Table 1 Group of experimental animals

Group	N	Administration					
		Estradiol valerate	Preventive inoculum	Dose	<i>C. albicans</i>	Therapeutic inoculum	Dose
Control	5	–	Saline	–	–	Saline	–
Model	5	0.1 mg	Saline	–	10 ⁶ CFU	Saline	–
Pre-LFC	5	0.1 mg	LFC	10 ⁸ CFU	10 ⁶ CFU	Saline	–
LFC	5	0.1 mg	Saline	–	10 ⁶ CFU	LFC	10 ⁸ CFU

1.6.2 冲洗液真菌载量变化、菌丝形成检测

造模后每天对小鼠进行称重, 观察其阴道口红肿和异常分泌物。处理 7 d 后, 用 100 μ L 生理盐水反复冲洗阴道, 收集灌洗液, 充分混匀后, 取 10 μ L 涂布于 YPD 培养基(氯霉素抗性), 37 $^{\circ}$ C 培养, 计算 *C. albicans* 数目。另取 10 μ L 充分混匀灌洗液, 涂片, 自然干燥, 用结晶紫染色观察菌丝形成情况和数量。

1.6.3 苏木素-伊红染色检测阴道组织病理改变

最后一次阴道内注射 24 h 后, 将小鼠深度麻醉后处死, 收集阴道组织, 将其固定在 4% 多聚甲醛中 24 h 后, 使用梯度乙醇脱去组织水分, 并使用石蜡进行包埋, 用石蜡切片机切 4 μ m 切片, 使用 H&E 染色试剂盒染色, 在显微镜下观察并采集图片。

2 结果与分析

2.1 生殖道乳酸杆菌的分离和鉴定

从 53 个样本中共分离得到 19 株乳酸杆菌, 16S rRNA 基因扩增测序, 经 NCBI 比对, 通过 MAGE7.0 建树分析(图 1)。初步确定 11 株为 *Lactobacillus crispatus*, 3 株为 *L. fermentum*, 2 株 *L. gasseri*, 1 株 *L. johnsonii*, 1 株 *L. jensenii*, 1 株 *L. salivarius*。根据前期筛选和白色念珠菌抑制活性测试结果, *L. crispatus* ZH08 (Lc-8)、*L. fermentum* ZH09 (Lf-9)、*L. fermentum* ZH11 (Lf-11) 和 *L. crispatus* ZH17 (Lc-17) 4 株菌对白色念珠菌具有显著拮抗效果, 针对 4 株菌开展

进一步研究。

2.2 乳酸杆菌对白色念珠菌的抑制作用

2.2.1 共培养体系下乳酸杆菌对白色念珠菌生长的抑制作用

当 2 种微生物一起培养时, 共培养技术能够评估一种微生物对另一种微生物生长的影响。我们测试了不同比例白色念珠菌与乳酸杆菌共培养时白色念珠菌的生长情况, 如图 2A 所示。当 *C. albicans* 初始接种量为 10⁵ CFU/mL, 乳酸杆菌初始接种量为 10⁷ CFU/mL, 在 24 h 共培养后, 乳杆菌对 *C. albicans* 的生长抑制率分别为 98.57% (Lc-8)、99.74% (Lf-9)、99.82% (Lf-11)、93.36% (Lc-17)。结果表明, 4 株乳酸杆菌都能显著抑制 *C. albicans* 的生长。

我们模拟了在 *C. albicans* 大量生长的患者体内的病理状态, 即预先接种 *C. albicans*, 使其单独生长到对数期(约 1 \times 10⁷ CFU/mL), 以乳酸杆菌作为治疗剂攻击活力及数量都占优势的 *C. albicans*。1 \times 10⁸ CFU/mL 乳酸杆菌加入后, 白色念珠菌的生长受到抑制, 后期活菌数减少。培养 24 h 后(即加入乳酸杆菌 16 h), 抑制率可达到 71.3%–99.9% (图 2B)。结果表明, 即使在 *C. albicans* 优势生长的培养环境中, 本研究中共培养体系的外源补充也能显著地降低白色念珠菌的生长。并且 2 株发酵乳杆菌的抑制作用显著优于 2 株卷曲乳杆菌, 而且能在生长后期杀灭 *C. albicans*。分析原因可能与发酵乳杆菌更快的生长速度和抑菌产物积累有关。

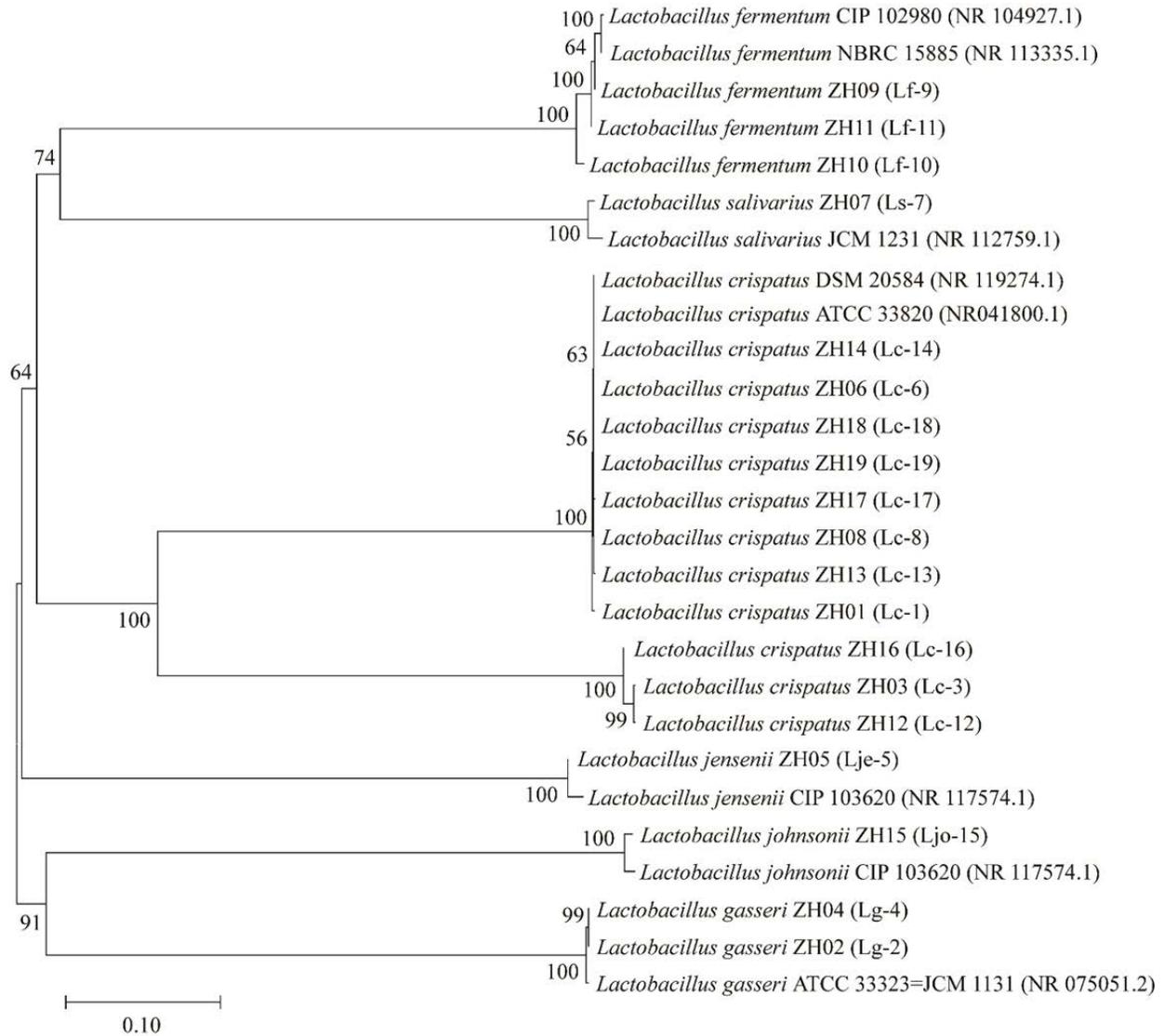


图 1 基于 16S rRNA 基因的发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene. Numbers in brackets represent the sequences accession number in GenBank, and numbers at the nodes indicate the bootstrap values on NJ analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.10 represent sequence divergence.

在共培养体系中,乳酸杆菌可能通过营养竞争和产生抑菌物质抑制 *C. albicans* 的生长,为探索乳酸杆菌代谢物的作用,我们进一步评估了 4 株乳酸杆菌 CFS 对 *C. albicans* 的体外抑制作用。根据所应用的 2 种方法获得了不同的结果。当使用微孔板法测定时(图 2C),4 株乳杆菌的 CFS 都观察到显著的抑制作用($P < 0.05$),抑制率

可达到 50.6%、42.4%、38.7%和 56.3%。相反,使用琼脂扩散法,没有观察到抗菌作用。在 Presti 等的研究中也发现了同样的现象^[16],这可能是由于微量稀释法比琼脂扩散法更敏感^[17]。同时,我们观察到 CFS 对 *C. albicans* 的抑制作用在 pH 调整到 7.0 后出现了大幅的下降(图 2D),说明 CFS 中的抑菌物质受到 pH 变化的影响。

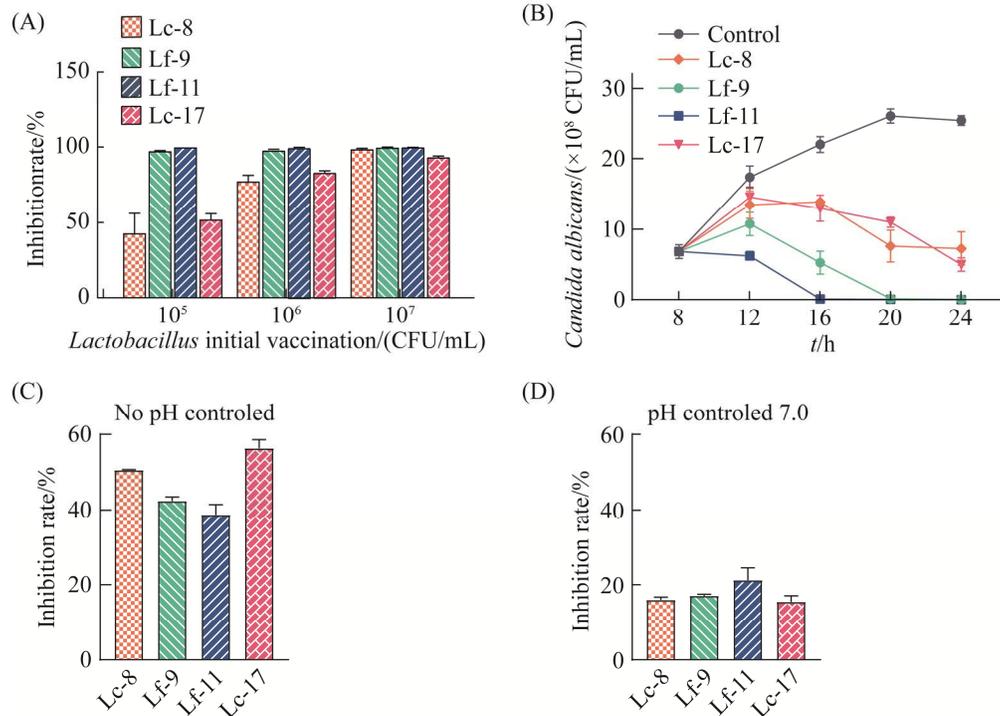


图 2 乳酸杆菌和无细胞培养液对白色念珠菌的抑制作用

Figure 2 Inhibitory effect of *Lactobacillus* and cell-free culture medium on *C. albicans*. A: inhibitory effect in co-culture system; B: inhibition curve of time difference co-culture; C: growth inhibitory effect of CFS on *C. albicans*; D: inhibitory effect of CFS with pH adjusted to 7.0 on the growth of *C. albicans*. Error bars in figure represent standard deviation.

2.2.2 乳酸杆菌和CFS对白色念珠菌菌丝相转化的抑制作用

白色念珠菌具有酵母样和菌丝样 2 种形态, 在生理条件下可向菌丝相转化, 是一种重要的毒力特征。FBS 可诱导 *C. albicans* 的菌丝相转化, 采用结晶紫对黏附性菌丝体染色, 通过测定溶液在 590 nm 处的吸光度评估菌丝形成情况。如图 3A 所示, 所有乳酸杆菌菌悬液皆能显著抑制 FBS 诱导的白色念珠菌的菌丝形成, 其中 Lf-11 具有显著高于其他菌株的抑制效果, 抑制率为 70.3%。在 CFS 处理组(图 3B), Lc-8 和 Lc-17 的 CFS 具有较高的菌丝形成抑制活性, 其抑制率分别为 89.6%、88.4%。Lf-9 和 Lf-11 的抑制率分别为 39.7%、44.8%。所有培养上清均能显著抑制白色念珠菌的菌丝形成, 2 株卷曲

乳酸杆菌的 CFS 显著高于 2 株发酵乳酸杆菌 CFS 的作用, 而在同物种之间没有显著性差异。2 株发酵乳酸杆菌菌悬液的抑制作用高于其 CFS 的抑制作用, 说明更依赖于菌体直接发挥作用; 相反, 卷曲乳酸杆菌的 CFS 对 *C. albicans* 菌丝相转化的抑制效果强于菌悬液, 说明卷曲乳酸杆菌的抑制作用更依赖于胞外的可溶性成分。

2.2.3 CFS 中抑菌物质初步探索

如表 2 所示, 这些酸在不同菌株中分布并不统一, 提示 4 株乳酸杆菌具有不同的代谢谱。其中, 乳酸仍然是乳酸杆菌相对含量最高的酸, 且 LC-17>LC-8>LF-11>LF-9。值得注意的是, 4 株乳酸杆菌中皆发现了 3-苯乳酸, 3-苯乳酸已经被证明能抑制真菌生长和孢子形成^[18]。此外, 在 LF-11 中检出了丁酸、在 LC-17 中检出了

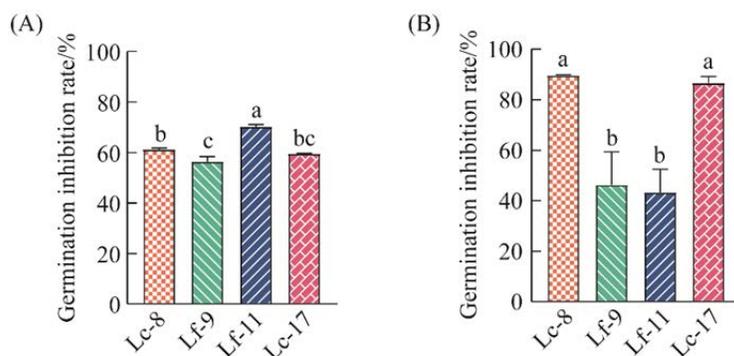


图3 乳酸杆菌(A)及 CFS (B)对白色念珠菌的表型转化抑制作用

Figure 3 Phenotypic transformation inhibition of *Lactobacillus* (A) and CFS (B) on *Candida albicans*. Error bars in figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表2 在 CFS 中检测到的酸和平均保留时间

Table 2 Acids detected in CFS and mean retention time

Compound name	Retention time/min	$(A_s/A_i)/\%$			
		Lc-8	Lf-9	Lf-11	Lc-17
Propanoic acid	5.266	—	—	—	9.131
Lactic acid	5.626	1 462.846	1 025.802	1 191.576	2 043.281
Oxalic acid	9.267	17.558	11.771	—	12.500
Butanedioic acid	17.394	156.413	9.793	19.051	210.237
Butanoic acid	20.746	—	—	5.495	—
Malic acid	22.889	—	6.627	—	10.777
4-aminobutanoic acid	23.674	61.664	49.687	17.535	68.130
3-phenyllactic acid	25.064	16.925	13.703	16.299	16.983
Phosphoric acid	29.515	16.107	18.058	15.139	17.023
Hexonic acid	29.615	10.069	11.867	7.772	8.938
Citric acid	30.643	—	535.077	440.614	12.450
Pentanedioic acid	31.626	58.836	68.053	—	60.134
Palmitic acid	34.542	71.987	45.274	46.028	47.362
Stearic acid	38.039	39.314	30.541	31.445	29.168

—: not detected; A_s : sample peak area; A_i : internal standard peak area.

丙酸的存在。有关研究表明, 乙酸和丙酸对真菌的抑制作用高于乳酸^[19], 而这些短链脂肪酸被报道可以抑制 *C. albicans* 的菌丝形成^[20]。这提示我们 CFS 的抑菌作用可能是数种酸性物质协同的结果, 而不是单一的乳酸形成的。

2.3 乳酸杆菌的生物学功能和益生特性

2.3.1 在不同 pH 下生长情况和降低培养液 pH 能力

女性阴道内是一个低 pH 环境, 补充的外

源阴道乳酸杆菌应能在阴道的低 pH 环境中生长。4 株乳酸杆菌在初始 pH 为 6.0 的 MRS 培养基和在用盐酸酸化至 pH 为 4.5 和 4.0 的 MRS 培养基中生长情况如图 4A–4C。随着 MRS 培养基的 pH 值降低, 乳酸杆菌显示出不同程度的 pH 依赖性生长抑制, 测试乳杆菌在 pH 为 4.0–4.5 范围内均能正常生长。研究表明, 正常女性中阴道 pH 在 4.0–4.5 之间, 在乳酸杆菌缺失或减少的阴道炎患者体内 pH 高于 4.5。总的

来说, 4 株乳酸杆菌能耐受阴道低 pH 环境, 并能正常生长。

乳酸杆菌是维持阴道内的低 pH 环境的重要因素, 但不同菌株之间降低 pH 能力不同。4 株乳酸杆菌在厌氧条件下降低 pH 值的能力趋于相似, 皆能在 24 h 内将 pH 降低到阴道生殖道正常生理 pH 内(图 4D)。2 株卷曲乳杆菌的培养物最低 pH 值达到 3.7, 2 株发酵乳杆菌培养物的最低 pH 达到 4.2, 商业菌株培养物的最低 pH 达到 3.8。同种的乳杆菌具有相似的降低培养液 pH 的趋势和能力。并且, 分离菌株的 pH 降低速度与其生长速度相关, 更快生长的发酵乳杆菌在更短的时间(12 h)内将培养液 pH 值降低到稳定值, 其酸化 MRS 培养液的速率达到 0.15 pH/h。提示了更快恢复阴道内 pH 的能力。但是单个分离株在 pH 为 6.0 的生长并不能预测其在 48 h 降低培养物 pH 值的能力, 生长相对迟缓的卷

曲乳杆菌降低 pH 的终点值小于 2 株生长更快的发酵乳杆菌, 而更低的 pH 是有效地抑制其他细菌的生长繁殖重要因素。

2.3.2 聚集与黏附特性

黏附有利于乳酸杆菌在阴道上皮定殖。自聚集能力与黏附性有关, 是乳酸杆菌在人类和动物粘膜中的重要特征。自动聚集可以显著增加乳酸杆菌在停留时间短的环境中的定殖潜力。自动聚集(形成絮状物)的能力是在生殖道存在的不利条件下维持益生菌数量的关键因素。结果表明, 4 株筛选乳杆菌的自聚集能力具有显著性差异($P < 0.05$), 如图 5A 所示, Lc-17 的自聚集性最高, 为 80.1%, 其次是 Lc-8, 为 58.0%, 而 Lf-9 和 Lf-11 自聚集能力相对较低, 分别为 28.45% 和 27.49%。具有共聚集特性的乳酸杆菌在病原体周围形成具有高浓度抑制物质的微环境, 可防止病原体黏附到阴道上皮。我们

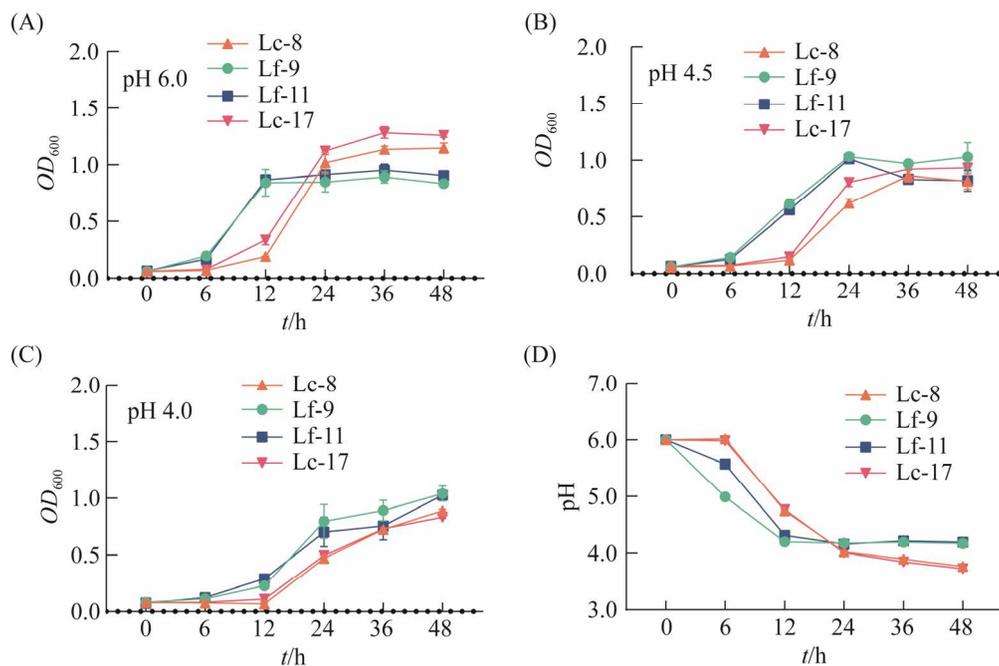


图 4 4 株乳酸杆菌在不同 pH 下生长情况(A-C)和降低培养液 pH 能力(D)

Figure 4 Growth at different pH (A-C) and ability to reduce pH of culture medium (D) of four *Lactobacillus*. Error bars in figure represent standard deviation.

接着测试了 4 株筛选乳杆菌对白色念珠菌的共聚集能力, 如图 5B 所示。其中, Lc-17 表现出最高的共聚集能力, 其共聚集百分比可达到 77.5%, 其次为 Lc-8, 其共聚集百分比可达到 74.2%。2 株发酵乳杆菌表现出中等共聚集能力, Lf-9 对白色念珠菌的共聚集百分比为 57.2%, Lf-11 对白色念珠菌的共聚集百分比为 44.1%。

乳酸杆菌分别与 CaSki 细胞共培养 3 h, 通过平板菌落计数法, 计算乳酸杆菌的黏附百分比。结果表明, 4 株乳酸杆菌不同程度地黏附在 CaSki 细胞上, 如图 5C 所示, Lc-17 黏附指数为 2.48, 其次是 Lc-8, 为 1.76, Lf-9 和 Lf-11 的黏附指数相对较低, 分别为 0.52 和 0.27。在显微计数法测定乳杆菌黏附指数时, 由于卷曲乳杆菌呈丝状黏附, 增加了计数的困难, 我们采集了显微镜下图像, 如图 5D 所示, Lc-17、Lc-8 菌株大量地黏附于上皮细胞周围, 而 Lf-9、

Lf-11 黏附个数相对较少, 其结果与平板菌落计数相当。结果表明, 2 株卷曲乳杆菌拥有极强的黏附能力, 这与已报道的该物种的特性相符, 提示其通过竞争黏附阴道上皮以排斥病原菌的潜力。

2.4 乳酸杆菌对小鼠外阴阴道假丝酵母病模型干预作用的初步探索

前期筛选得到的 4 株乳酸杆菌具有不同的益生特性, 提示它们通过不同的拮抗机制发挥益生作用, 发酵乳杆菌具有更快的生长速度和更高的酸化培养液效率, 并更多地通过菌体本身抑制 *C. albicans* 生长和菌丝相分化, 而卷曲乳杆菌可通过强黏附特性以及产生丰富的酸性成分发挥作用。由于很难有一个菌株囊括所有功能特性, 为实现优势最大化, 我们进一步探究乳酸杆菌组合的抑制作用。如图 6A 所示, Lf-11 与 Lc-17 的搭配效果最优, 其对 *C. albicans*

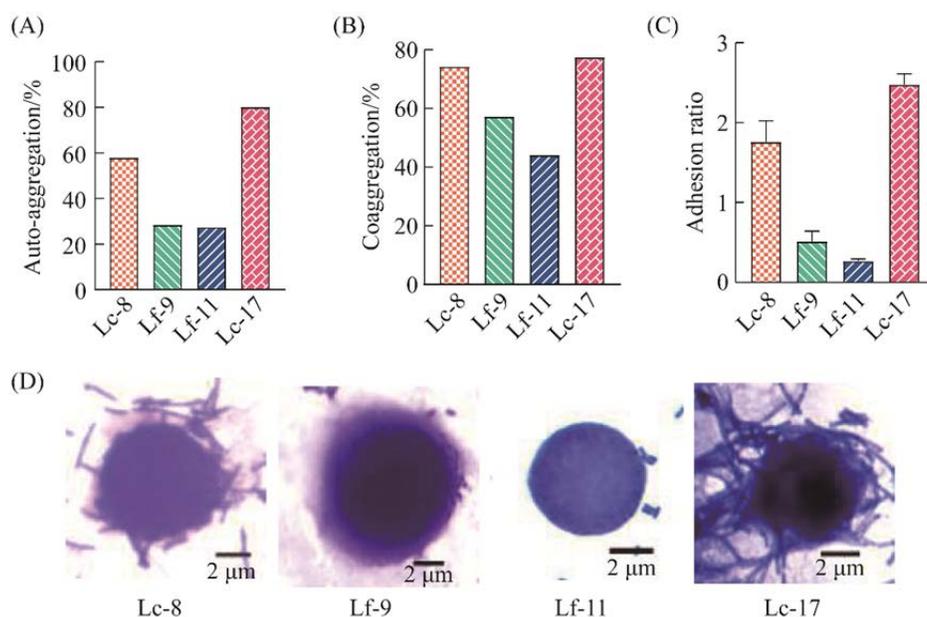


图 5 聚集性和黏附性测试结果

Figure 5 Agglomeration and adhesion test results. A: the test results of automatic aggregation ability; B: the co-aggregation test results of *Lactobacillus* and *C. albicans*; C, D: the adhesion test results of *Lactobacillus* to Casaki cells. Error bars in figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

的 24 h 生长抑制率达到 97.5%, 后期选用 Lf-11 与 Lc-17 的组合进行下一步研究, 并将该组合命名为 LFC。2 种乳酸杆菌组合抑制, 并非 2 个个体功能的和, 可能受 2 个菌株相互作用的影响和干扰, 而低于单个菌株使用的效果。结果显示, LFC 的组合抑制效果并未受到较大干扰。研究表明, 与单个菌株相比, 益生菌组合具有协同黏附作用、协同抗菌作用^[21-22]。我们接着构建了小鼠阴道假丝酵母病模型以评价益生菌组合在生理环境的作用。与空白组比较, 模型组小鼠都表现出异常的阴道分泌物和组织

肿胀, 可见白色黏性的阴道分泌物, 分泌物镜下可见大量菌丝, 说明造模是成功的。造模后第 7 天, Pre-LFC、LFC 组的真菌载量与模型组相比显著减少(图 6B)。灌洗液的革兰氏染色结果表明, Pre-LFC 和 LFC 组灌洗液中菌丝阳性的小鼠比例分别为 2/5 和 1/5, 镜下少见菌丝分布(图 6C)。H&E 染色显示(图 6D), 在感染白色念珠菌后, 阴道黏膜受到严重损伤, 细胞排列紊乱和炎性细胞浸润(图中箭头所示)。与模型组相比, Pre-LFC、LFC 组小鼠阴道炎症和上皮黏膜损伤的显著缓解。

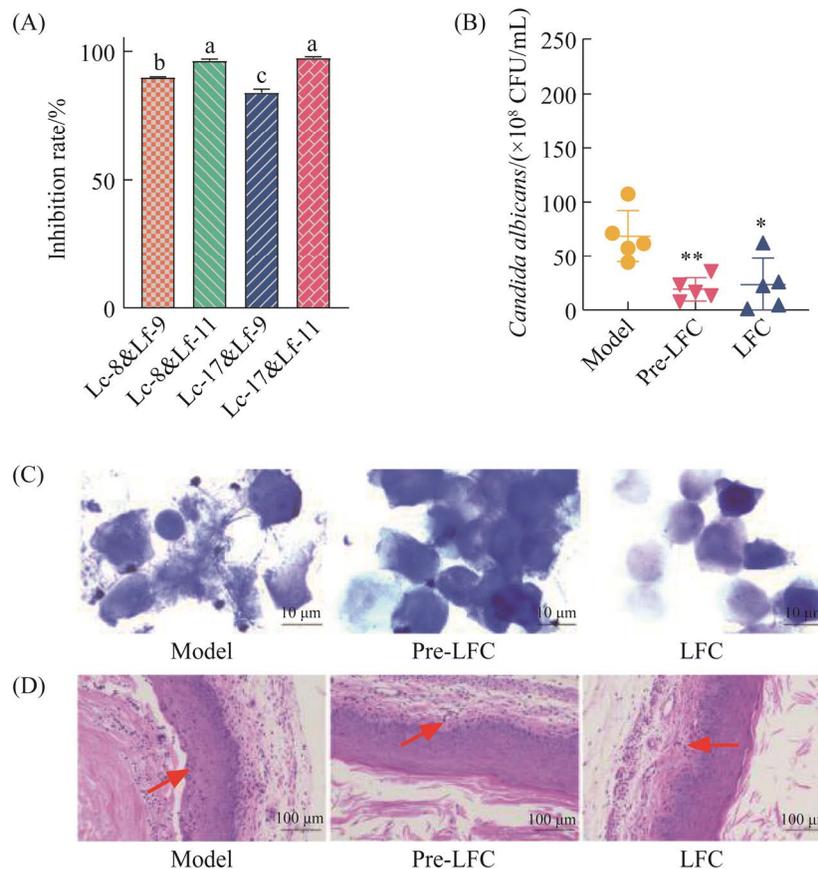


图 6 乳酸杆菌组合对 *C. albicans* 生长的抑制作用(A)及对小鼠假丝酵母病中白色念珠菌的载量(B)、菌丝形成(C)和组织学变化(D)的影响

Figure 6 Inhibitory effect of *Lactobacillus* combination on *C. albicans* growth (A) and its effect on candida disease in mice; effects of *Lactobacillus* on vaginal *C. albicans* load (B), mycelium formation (C) and tissue morphology (D) in mice with vaginal candidiasis. Error bars in figure represent standard deviation, * $P < 0.05$ according to one-way ANOVA analysis.

3 讨论与结论

以往研究证实, 共培养体系可以模拟 VVC 患者中 *C. albicans* 与乳酸杆菌共存的生理环境, 评估乳酸杆菌与 *C. albicans* 的直接作用。本研究中筛选分离的乳酸杆菌可在共培养 24 h 测定到对白色念珠菌的抑制作用, 在 Kang 等^[23]的研究中也观察到在共培养后期的抑制活性, 说明乳酸杆菌发挥作用需要形成更高浓度抑制物质的环境。结合在无细胞上清液中观察到的相对较弱的抑制能力, 说明除了酸性物质, 在共培养体系中可能还存在诱导型抑菌物质的积累, 如受共培养细菌诱导产生的细菌素 gassericin E^[24]。此外, 我们通过差时共培养模拟了 *C. albicans* 优势生长时外源乳酸杆菌加入对其生长的影响, 结果在一定程度上反应了乳酸杆菌逆转 *C. albicans* 优势地位的潜力。另一方面, 菌丝样的 *C. albicans* 被认为是致病的关键, 而不能菌丝生长的突变菌株在白色念珠菌阴道炎的小鼠模型中, 对阴道上皮细胞的黏附性降低, 定植和感染减少^[25]。本研究中的乳酸杆菌菌液和产生的可溶性代谢物可以减少 *C. albicans* 的菌丝转化, 推测是由于细胞相互作用以及酸性代谢物对白色念珠菌菌丝特异性基因的调节^[26], 该益生特性有望减轻由于 *C. albicans* 相转化导致的细胞损伤和炎症。

我们观察到 CFS 对 *C. albicans* 生长抑制作用与 pH 相关, 对其中可能存在的酸性物质进行了非靶向代谢组学分析。结果表明, 4 株乳酸杆菌 CFS 中除了存在大量的乳酸外, 还存在种类丰富的其他有机酸, 如丙酸、丁酸等。此外, 筛选得到 4 株乳酸杆菌中都检测出 3-苯乳酸, 据报道 3-苯乳酸有抗真菌活性, 目前报道产生 3-苯乳酸的主要是环境来源的植物乳杆菌, 在生殖道乳酸杆菌中较少被报道。

我们初步在小鼠的外阴阴道假丝酵母病模

型中进行了验证, 7 d 的阴道内补充乳酸杆菌表现出相当的抑制 *C. albicans* 增殖和菌丝相转化作用。在阴道黏膜组织切片中, 乳酸杆菌处理各组观察到阴道组织炎症的缓解和黏膜恢复。本研究结果突出了筛选乳酸杆菌在临床实践中的应用潜力。

综上所述, 本研究筛选出 4 株乳酸杆菌具有较强的益生特性, 体外及体内小鼠模型实验均显示其具有明显的抑制白色念珠菌的作用。功能复配的益生菌组合 LFC 尚需进一步挖掘其内在机制及作用。功能复配的益生菌组合具有良好的应用前景, 具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] Abou Chacra L, Fenollar F. Exploring the global vaginal microbiome and its impact on human health. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 160: 105172.
- [2] Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*, 2007, 369(9577): 1961–1971.
- [3] Sobel JD, Sobel R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2018, 19(9): 971–977.
- [4] 刘胡林, 徐兴然, 凌开建, 邹祥. 阴道微生物组: 种群特征与疾病干预治疗. *生物工程学报*, 2021, 37(11): 3801–3811.
Liu HL, Xu XR, Ling KJ, Zou X. Vaginal microbiome: community characteristics and disease intervention. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(11): 3801–3811. (in Chinese)
- [5] Cohen CR, Wierzbicki MR, French AL, Morris S, Newmann S, Reno H, Green L, Miller S, Powell J, Parks T, Hemmerling A. Randomized trial of lactin-V to prevent recurrence of bacterial vaginosis. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 382(20): 1906–1915.
- [6] Oerlemans EFM, Bellen G, Claes I, Henkens T, Allonsius CN, Wittouck S, van den Broek MFL, Wuyts S, Kiekens F, Donders GGG, Lebeer S. Impact of a lactobacilli-containing gel on vulvovaginal candidosis and the vaginal microbiome. *Scientific Reports*, 2020, 10: 7976.

- [7] Ling ZX, Liu X, Chen WG, Luo YQ, Yuan L, Xia YX, Nelson KE, Huang SL, Zhang SE, Wang YZ, Yuan JL, Li LJ, Xiang C. The restoration of the vaginal microbiota after treatment for bacterial vaginosis with metronidazole or probiotics. *Microbial Ecology*, 2013, 65(3): 773–780.
- [8] Macklaim JM, Clemente JC, Knight R, Gloor GB, Reid G. Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2015, 26(1): 27799.
- [9] De MAN JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, 23(1): 130–135.
- [10] Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53(1): 33–41.
- [11] Ren JO, Yuan J, Zeng BH, Wei H. An *in vitro* assessment of inhibitory effect of 16 strains of probiotics on the germination of *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(12): 1251–1256.
- [12] Qiao NZ, Yu LL, Zhang CC, Wei CZ, Zhao JX, Zhang H, Tian FW, Zhai QX, Chen W. A comparison of the inhibitory activities of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* against *Penicillium expansum* and an analysis of potential antifungal metabolites. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(18): fnaa130.
- [13] Wang S, Wang QY, Xiao BB, Zhang R, Wang B, Liao QP, Zhuang H, Li T. Characterization of vaginal *Lactobacillus* strains and their potential antagonistic effects on *Candida albicans*. *British Microbiology Research Journal*, 2015, 6(4): 185–195.
- [14] Happel AU, Kullin B, Gamielien H, Wentzel N, Zauchenberger CZ, Jaspan HB, Dabee S, Barnabas SL, Jaumdally SZ, Dietrich J, Gray G, Bekker LG, Froissart R, Passmore JAS. Exploring potential of vaginal *Lactobacillus* isolates from South African women for enhancing treatment for bacterial vaginosis. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(6): e1008559.
- [15] De Gregorio PR, Silva JA, Marchesi A, Nader-Macías MEF. Anti-*Candida* activity of beneficial vaginal lactobacilli in *in vitro* assays and in a murine experimental model. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(2): foz008.
- [16] Presti I, D’Orazio G, Labra M, La Ferla B, Mezzasalma V, Bizzaro G, Giardina S, Michelotti A, Tursi F, Vassallo M, Di Gennaro P. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their *in vitro* effect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(13): 5613–5626.
- [17] Scorzoni L, Sangalli-Leite F, De Lacorte Singulani J, De Paula ESilva ACA, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Searching new antifungals: the use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 123: 68–78.
- [18] Svanström Å, Boveri S, Boström E, Melin P. The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. *BMC Research Notes*, 2013, 6: 464.
- [19] Dagnas S, Gauvry E, Onno B, Membré JM. Quantifying effect of lactic, acetic, and propionic acids on growth of molds isolated from spoiled bakery products. *Journal of Food Protection*, 2015, 78(9): 1689–1698.
- [20] Guinan J, Wang SH, Hazbun TR, Yadav H, Thangamani S. Antibiotic-induced decreases in the levels of microbial-derived short-chain fatty acids correlate with increased gastrointestinal colonization of *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 2019(1), 9: 8872.
- [21] Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera GF, Mangano K, Cianci A, Stefani S, Santagati M. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *MicrobiologyOpen*, 2021, 10(2): e1173.
- [22] Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*, 2011, 50(1): 1–17.
- [23] Kang CH, Han SH, Kim Y, Paek NS, So JS. *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* MG242 isolated from human vagina. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(2): 343–349.
- [24] Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Martín V, Ruiz-Barba JL, Rodríguez JM. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy

woman. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 37.

[25] Kornitzer D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. *Journal of Fungi: Basel, Switzerland*, 2019, 5(1): 21.

[26] Matsubara VH, Wang Y, Bandara HMHN, Mayer MPA,

Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(14): 6415–6426.



邹祥，西南大学药学院教授，博士生导师，入选重庆市巴渝学者特聘教授，主要从事微生物代谢调控与人体合成微生物组学方向研究，建成覆盖 BV、VVC、AV、妇科肿瘤等预防及治疗的生殖道益生菌资源库。主持国家自然科学基金面上基金、“863”计划和新药创制课题等国家和省部级项目 10 余项，在应用微生物及制药领域的 *Green Chemistry*、*Journal of Controlled Release*、*Environmental Microbiology*、*Biotechnology And Bioengineering* 等期刊发表论文 80 余篇，申请国家发明专利 50 项，获得授权 24 项。主编教材及专著 2 部，担任全国发酵工程技术工作委员会委员、中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会委员、中国菌物学会药用真菌专业委员会委员等，研究成果获上海市科技进步一等奖、重庆市技术发明二等奖等奖励。



凌开建，医学博士，主任医师，陆军军医大学第一附属医院妇产科。主攻妇科肿瘤、宫颈病变诊疗及生殖道微生态等。第一作者发表 SCI 论文 3 篇(累计 IF>20)及中文核心期刊 10 余篇。担任全国卫生产业企业管理协会女性生殖道微生态检验与临床专家委员会委员；中国人体健康科技促进会智慧医疗专家委员会委员；国家卫生健康委百姓健康电视频道妇幼健康分频道专家委员会委员；重庆中西医结合学会妇产科分会常委；中国医药教育协会妇科肿瘤专业委员会委员等。