

DOI:10.13350/j.cjpb.240504

• 论著 •

# 基于 ADP-heptose/ALPK1 通路探讨阴道微生态 对 HPV 感染的影响\*

章昉<sup>1\*\*</sup>, 寿坚<sup>2</sup>, 周建英<sup>3</sup>, 繆飞龙<sup>1</sup>, 施婷婷<sup>1</sup>

(1. 浙江省杭州市萧山区第二人民医院, 浙江杭州 311241; 2. 浙江萧山医院; 3. 浙江省绍兴市上虞妇幼保健院)

**【摘要】** 目的 基于 ADP-heptose/ALPK1 探讨阴道微生态对 HPV 感染的作用机制。方法 收集 2020 年 1 月至 2023 年 10 月 84 例 HPV 阳性宫颈癌患者(观察组), 107 例无宫颈癌的 HPV 阳性患者(阳性组), 191 名健康女性(对照组)。收集患者阴道分泌物, 赖特-吉姆萨染色检测乳酸菌水平和微生物群多样性和密度; 将另一支拭子置于 0.9% 氯化钠溶液中, 用于测量分泌物的清洁度和念珠菌、滴虫和乳酸杆菌的水平; 第三拭子用于检测阴道分泌物的 pH 值。生物信息学分析阴道菌群情况, qRT-PCR 检测 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 水平。结果 3 组间菌群 Alpha 多样性指标: Chao1 指数( $F=32.780, P<0.05$ )、Ace 指数( $F=6.270, P<0.05$ )、Shannon 指数( $F=17.240, P<0.01$ )、Simpson 指数( $F=9.710, P<0.05$ ) 差异均有统计学意义。3 组间伯克霍尔德菌及乳杆菌属相对丰度差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 观察组与阳性组伯克霍尔德菌属相对丰度高于对照组( $\chi^2=2.18, P=0.03$ ), 而乳杆菌属相对丰度低于对照组( $\chi^2=3.13, P<0.01$ )。LefSe 分析显示, 观察组、阳性组和对照组之间 4 个特征菌属的丰度有差异(LDA 值 $>2.0$ )。观察组与阳性组菌群中伯克霍尔德菌和杆杆菌属杆菌目富集, 对照组菌群中乳酸杆菌科及乳酸杆菌属富集。在原分组情况下, 与对照组比较, 观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P<0.05$ ); 与阳性组比较, 观察组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P<0.05$ )。根据乳酸杆菌缺乏阳性分组, 与对照组比较, 观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P<0.05$ ); 与阳性组比较, 观察组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P<0.05$ )。根据乳酸杆菌缺乏和微生物群密度阳性分组, 与对照组比较, 观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P<0.05$ ); 与阳性组比较, 观察组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P<0.05$ )。根据乳酸杆菌缺乏阳性分组, 观察组和阳性组 ADP-heptose mRNA 在 HPV 阳性宫颈癌诊断中的曲线下面积(AUC)值为 0.920(0.820~1.000), ALPK1 mRNA 为 0.833(0.701~0.965), 均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 HPV 阳性或 HPV 阳性宫颈癌的患者缺乏乳酸杆菌, 并且微生物群密度和多样性要更高, ADP-heptose/ALPK1 在乳酸杆菌缺乏的 HPV 感染宫颈癌诊断中一定的临床意义。

**【关键词】** ADP-heptose/ALPK1; 阴道微生态; HPV; 宫颈癌

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0514-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 May;19(5):514-519,523.]

## Exploring the impact of vaginal microbiota on HPV infection based on the ADP heptose/ALPK1 pathway

ZHANG Fang<sup>1</sup>, SHOU Jian<sup>2</sup>, ZHOU Jianying<sup>3</sup>, MIAO Feilong<sup>1</sup>, SHI Tingting<sup>1</sup> (1. The Second People's Hospital of Xiaoshan District, Hangzhou, 311241, China; 2. Zhejiang Xiaoshan Hospital; 3. Shangyu Maternal and Child Health Hospital)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To explore the mechanism of vaginal microbiota on HPV infection based on ADP heptose/ALPK1. **Methods** Collect 84 HPV positive cervical cancer patients (observation group), 107 HPV positive patients without cervical cancer (positive group), and 191 healthy women (control group) from January 2020 to October 2023. Collect vaginal secretions from patients, and use Wright Giemsa staining to detect levels of lactic acid bacteria and microbial diversity and density; Place another swab in a 0.9% sodium chloride solution to measure the cleanliness of secretions and the levels of Candida, Trichomonas, and Lactobacillus; The third swab is used to detect the pH value of vaginal secretions. Bioinformatics analysis of vaginal microbiota, qRT PCR detection of ADP heptose/ALPK1 mRNA levels. **Results** There were statistically significant differences in the alpha diversity indicators of microbial communities among the three groups; Chao1 index ( $F=32.780, P<0.05$ ), Ace index ( $F=6.270, P<0.05$ ), Shannon index ( $F=17.240, P<0.01$ ), and Simpson index ( $F=9.710, P<0.05$ ). There was a statistically significant difference in the

\* **【基金项目】** 浙江省医药卫生科技计划项目(No. 2023KY1013); 上虞市科技局课题(No. 2020001)。

\*\* **【通讯作者(简介)】** 章昉(1972-), 女, 浙江杭州人, 本科, 副主任医师, 主要研究方向: 宫颈疾病预防诊治现状及进展。  
E-mail: gly030508@163.com

abundance of Burkholderia and Lactobacillus genera between the three groups ( $P < 0.05$ ). The abundance of Burkholderia genera in the observation group and the positive group was higher than that in the control group ( $\chi^2 = 2.18, P = 0.03$ ), while the relative abundance of Lactobacillus species was lower than that of the control group ( $\chi^2 = 3.13, P < 0.01$ ). LefSe analysis showed that there were differences in the abundance of four characteristic bacterial genera among the observation group, positive group, and control group (LDA value  $> 2.0$ ). Burkholderia and Arthrobacter are enriched in the observation group and positive group, while Lactobacillus and Lactobacillus are enriched in the control group. In the original group, compared with the control group, the expression of ADP heptose/ALPK1 mRNA increased in the observation group and positive group ( $P < 0.05$ ); Compared with the positive group, the observation group showed an increase in ADP heptose/ALPK1 mRNA expression ( $P < 0.05$ ). According to the lack of positive grouping for lactobacilli, compared with the control group, the observation group and positive group showed an increase in ADP heptose/ALPK1 mRNA expression ( $P < 0.05$ ); Compared with the positive group, the observation group showed an increase in ADP heptose/ALPK1 mRNA expression ( $P < 0.05$ ). According to the lack of lactobacilli and positive microbial density, the observation group and positive group showed an increase in ADP heptose/ALPK1 mRNA expression compared to the control group ( $P < 0.05$ ); Compared with the positive group, the observation group showed an increase in ADP heptose/ALPK1 mRNA expression ( $P < 0.05$ ). According to the lack of positive lactobacilli, the area under the curve (AUC) values of ADP heptose mRNA in the diagnosis of HPV positive cervical cancer in the observation group and positive group were 0.920 (0.820-1.00), and ALPK1 mRNA was 0.833 (0.701-0.965), both of which were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Patients with HPV positive or HPV positive cervical cancer lack lactobacilli, and their microbial community density and diversity are higher. ADP heptose/ALPK1 has certain clinical significance in the diagnosis of HPV infection cervical cancer with lactobacilli deficiency.

**【Key words】** ADP heptose/ALPK1; Vaginal microbiota; HPV; cervical carcinoma

宫颈癌是妇科恶性肿瘤死亡的主要原因之一,全世界每年估计有 53 万例新发病例,其中 27 万例死亡,在中国,每年诊断出约 10 万例宫颈癌新发病例,其中 4.7 万例死亡<sup>[1,2]</sup>。宫颈癌是我国女性癌症的第六大病因和女性癌症死亡的第八大原因,大多数宫颈上皮内瘤变和宫颈癌病例由致癌性 HPV 感染引起,约 95% 的浸润性宫颈癌发现 HPV 感染<sup>[3]</sup>。对于大多数女性来说,HPV 感染是短暂的,并且被宿主自发清除,没有干预或临床后果,但 5%~10% 的 HPV 感染无法清除,会持续感染,可导致宫颈癌和其他类型的癌症<sup>[4]</sup>,很难预测 HPV 感染是否会自发消失或导致恶性转化,各种因素被认为会增加持续感染和随后肿瘤形成的可能性,包括年龄、高产次、口服避孕药、吸烟、病变分级、HPV 基因型、病毒载量以及与人类免疫缺陷病毒合并感染<sup>[5-6]</sup>。研究表明,阴道感染可能会破坏平衡阴道生态系统的先天防御,并影响清除 HPV 感染的免疫能力,细菌性阴道病(BV)、阴道滴虫病(TV)和外阴阴道念珠菌病(VVC)是最常见的阴道感染,与高水平的厌氧菌有关,厌氧菌及其代谢物可能降解宫颈粘液,破坏阴道上皮细胞,并破坏阴道环境的先天防御<sup>[7]</sup>。尽管阴道感染的影响类似,但它们作为 HPV 感染风险标志物的作用仍然存在争议。此外,研究显示 ADP- $\beta$ -d-甘露糖-庚糖(ADP-heptose)/ALPK1 在微生物免疫反应中起重要作用<sup>[8]</sup>。本研究基于 ADP-heptose/ALPK1 通路,评估阴道感染与妇科门诊患者中 HPV 的类型和病毒载量之间的关联,探讨阴道微

生态对 HPV 感染的作用机制。

## 对象与方法

### 1 研究对象

收集 2020 年 1 月至 2023 年 10 月杭州市萧山区第二人民医院治疗的患者,84 例 HPV 阳性宫颈癌患者设为观察组,107 例无宫颈癌的 HPV 阳性患者设为阳性组,191 名健康体检女性设为对照组。

本研究获得参与者及其家属的知情同意。

### 2 纳入标准

(1)对照组:①月经周期正常的女性;②有性伴侣或性史的女性;③在过去 3 个月内未接受任何抗菌药物的女性。(2)阳性组:①月 HPV-DNA 检测结果呈阳性的女性,HPV 类型为 HPV16 或 18;②在过去 3 个月内未接受任何抗菌药物的女性;③月经周期正常的女性;④有性伴侣或性史的女性。(3)观察组:①经病理检查确诊为宫颈癌,HPV 类型为 HPV-16 或 HPV-18 的女性;②未接受任何放疗、化疗或免疫治疗的女性;③没有其他恶性肿瘤或其他传染病的女性;④有性伴侣或性史的女性。

### 3 排除标准

对照组:①患有免疫或内分泌系统疾病等其他严重疾病的妇女;②经期或阴道不规则出血的妇女;③怀孕或哺乳期妇女;④依从性差的女性;⑤过去接受过子宫或宫颈手术的女性;⑥患有阴道炎或其他可能影响研究结果的炎症性疾病的女性。阳性组:①宫颈癌女

性;②患有免疫或内分泌系统疾病等其他严重疾病的妇女;③经期或阴道不规则出血的妇女;④怀孕或哺乳期妇女;⑤依从性差的女性;⑥过去接受过子宫或宫颈手术的女性;⑦患有阴道炎或其他可能影响研究结果的炎症性疾病的女性。观察组:①接受放疗、化疗或免疫治疗的女性;②患有免疫或内分泌系统疾病等其他严重疾病的妇女;③经期或阴道不规则出血的妇女;④怀孕或哺乳期妇女;⑤依从性差的女性;⑥过去接受过子宫或宫颈手术的女性;⑦患有阴道炎或其他可能影响研究结果的炎症性疾病的女性。

#### 4 阴道微生态检查

患者入院后的第2 d,使用3支一次性拭子收集每个参与者的阴道分泌物,使用一种拭子制作赖特-吉姆萨染色的干涂片,用于检测油浸透镜下的乳酸菌水平和微生物群多样性和密度;将另一支拭子置于0.9%氯化钠溶液中,用于测量分泌物的清洁度和念珠菌、滴虫和乳酸杆菌的水平;第三拭子用于检测阴道分泌物的pH值,微生物群的等级为II或更高,则认为其多样性或密度为正,见表1。

表1 阴道微生态检查  
Table 1 Vaginal microecological examination

项目 Project	分级 Grade	标准 Standard
清洁标准	I	大多数细菌是阴道芽孢杆菌,并且有大量的上皮细胞
	II	部分细菌是阴道芽孢杆菌,还有一些上皮细胞、化脓细胞和其他细菌
	III	少量阴道芽孢杆菌和上皮细胞以及大量脓皮细胞等细菌
	IV	无阴道芽孢杆菌,有大量化脓细胞等细菌
假丝酵母属	阳性	孢子和菌丝可以在显微镜下观察到
	阴性	孢子和菌丝在显微镜下无法观察到
滴虫	阳性	阴道滴虫可以在显微镜下观察到
	阴性	阴道滴虫在显微镜下无法观察到
乳酸杆菌缺少	阳性	≤30/HPF
	阴性	>30/HPF
微生物群多样性	I	鉴定出1~3种细菌
	II	鉴定出4~6种细菌
	III	鉴定出7~10种细菌
	IV	鉴定出不少于11种细菌
微生物群密度	I	一个领域平均有1~9个细菌
	II	一个领域平均有10~99个细菌
	III	一个领域不少于100个细菌
	IV	细菌聚集

#### 5 生物信息学分析与 qRT-PCR 分析

使用 Quick DNA Fecal Microbe Kit 试剂盒 (Zymo Research) 提取菌群 DNA, 16S rDNA V3-V4 区通过 PCR 扩增, 加接头, MiSeq 测序不少于 6 万 tag, 高通量测序使用 QIIME1.91 标准化流程, 采用 usearch61 去除嵌合体, 选用 uclustref 算法, 与 Green Gene 数据库进行比对, 按照 97% 相似度进行操作分

类单元(OTU)聚类, 最终生成 biom 数据。获得分类学信息和群落组成。使用 QIIME 软件计算物种 Alpha 多样性指数, 包括 Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、Simpson 指数。应用 LEfSe 软件中线性判别分析方法 (linear discriminant analysis, LDA) 分析组间相对丰度差异具有统计学意义的菌群, LDA 判别界值取 2.0。

根据试剂盒说明书, 使用 Direct-zol RNA MiniPrep Plus 试剂盒 (Zymo Research) 从血清中提取总 RNA, 并通过 PrimeScript 逆转反应试剂盒从 1 μg 总 RNA 合成 cDNA, 在 StepOne Plus PCR 系统中检测检测 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 水平。以 β-肌动蛋白为内参, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法。

#### 6 统计学方法

采用 SPSS21.0 统计软件进行分析, 计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行表示, 两两比较采用 *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA); 计数资料用例 (%) 进行表示, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结果

#### 1 一般资料比较

对照组、观察组和阳性组受试者间年龄、体重指数、婚姻状态及更年期比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表2 3组一般资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 例)  
Table 2 Comparison of general information of the 3 groups

项目 project	观察组 (n=84) Observation group	阳性组 (n=107) Positive group	对照组 (n=191) control group	<i>F</i> / $\chi^2$	<i>P</i>	
年龄(年)	41.20±3.84	40.87±3.95	40.92±3.69	0.199	0.819	
体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	23.58±4.06	24.23±3.81	23.86±3.59	0.723	0.482	
婚姻状况	已婚	69(82.14)	85(79.44)	155(81.15)	1.040	0.999
	离婚	12(14.29)	17(15.89)	27(14.14)		
	丧偶	3(3.57)	5(4.67)	7(3.66)		
	未婚	0(0.00)	0(0.00)	2(1.05)		
更年期	是	3(3.57)	3(2.80)	5(2.62)	0.192	0.995
	否	81(96.43)	104(97.20)	186(97.38)		

#### 2 阴道微生态情况比较

与对照组比较, 假丝酵母属和滴虫差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对照组患者阴道微生态清洁度、酸碱度、乳酸菌水平、微生物菌群多样性和密度均优于观察组和阳性组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同时, 观察组与阳性组在微生物学方面差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

#### 3 菌群 Alpha 多样性

3组间菌群 Alpha 多样性指标: Chao1 指数 ( $F =$

32.780,  $P < 0.05$ )、Ace 指数 ( $F = 6.270, P < 0.05$ )、Shannon 指数 ( $F = 17.240, P < 0.01$ )、Simpson 指数 ( $F = 9.710, P < 0.05$ ) 差异均有统计学意义, 观察组与阳性组的菌群 Alpha 多样性指标数均高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 并且观察组的 Ace 指数高于阳性组 ( $P < 0.05$ ), 但两组间其他指数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。

表 3 阴道微生态情况比较 (例)  
Table 3 Comparison of vaginal microecological conditions

项目 project		观察组 (n=84) Observation group	阳性组 Positive group (n=107)	对照组 control group (n=191)	$\chi^2$	P
清洁标准	I、II	41	56	161	49.175	0.000
	III、IV	43*	51*	30		
酸碱度	pH≤4.5	46	61	159	33.588	0.000
	pH>4.5	38*	46*	32		
假丝酵母属	阴性	75	95	177	1.555	0.669
	阳性	9	12	14		
滴虫	阴性	81	104	186	0.192	0.908
	阳性	3	3	5		
乳酸杆菌缺乏	阴性	12	23	168	186.941	0.000
	阳性	72*	84*	23		
微生物多样性	阴性	61	73	23	133.613	0.000
	阳性	23*	34*	168		
微生物群密度	阴性	69	85	27	169.482	0.000
	阳性	15*	22*	164		

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

表 4 3组间阴道微生态 Alpha 多样性比较  
Table 4 Comparison of vaginal microecological Alpha diversity among the 3 groups

组别 Group	Chao1 指数 Chao1 index	Ace 指数 Ace index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
观察组	241.11±591.11*	25.12±3.67*#	5.02±0.83*	0.95±0.17*
阳性组	246.04±54.41*	21.42±5.13*	4.71±0.62*	0.93±0.04*
对照组	201.55±69.54	19.02±54.73	3.72±0.91	0.82±0.18

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与阳性组比较, #  $P < 0.05$ 。

#### 4 菌群相对丰度

在门水平上, 3组间厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门相对丰度差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。较之对照组, 观察组与阳性组厚壁菌门 ( $\chi^2 = 2.450, P = 0.010$ ) 及变形菌门 ( $\chi^2 = 2.170, P = 0.030$ ) 相对丰度上调, 而放线菌门 ( $\chi^2 = 1.980, P = 0.040$ ) 和拟杆菌门 ( $\chi^2 = 2.530, P = 0.010$ ) 相对丰度下调; 但观察组与阳性组间菌群的相对丰度差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 1)。

在属水平上, 观察组、阳性组与对照组三组间拟杆菌属相对丰度 ( $\chi^2 = 1.03, P = 0.08$ )、节杆菌属相对丰度 ( $\chi^2 = 0.98, P = 0.24$ )、埃希-志贺菌属相对丰度 ( $\chi^2 = 0.87, P = 0.33$ ) 差异无统计学意义; 但 3组间伯克霍尔德菌及乳杆菌属相对丰度差异有统计学意义

( $P < 0.05$ ), 观察组与阳性组伯克霍尔德菌属相对丰度高于对照组 ( $\chi^2 = 2.18, P < 0.05$ ), 而乳杆菌属相对丰度低于对照组 ( $\chi^2 = 3.13, P < 0.01$ ), 而观察组与阳性组组间上述两个菌属的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 5)。

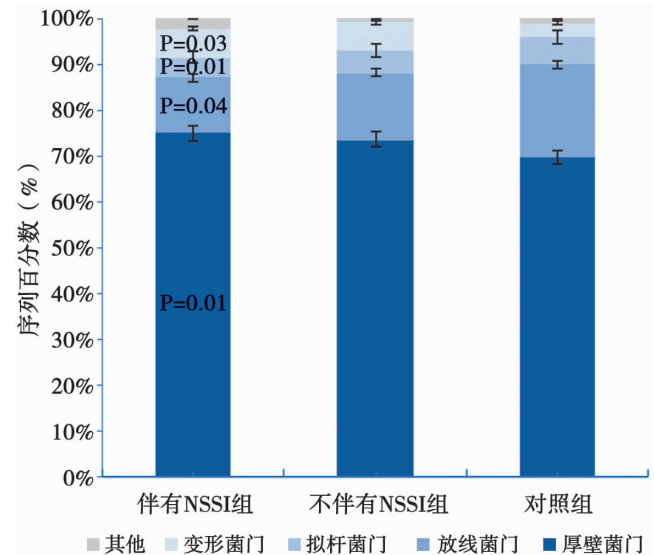


图 1 3组阴道微生态在门水平上的相对分布情况  
Fig. 1 Relative distribution of vaginal microecology at the gate level in the 3 groups

LefSe 分析显示, 观察组、阳性组和对照组之间 4 个特征菌属的丰度有差异 (LDA 值  $> 2.0$ )。观察组与阳性组菌群中伯克霍尔德菌和节杆菌属杆菌目富集, 对照组菌群中乳酸杆菌科及乳酸杆菌属富集 (图 2)。

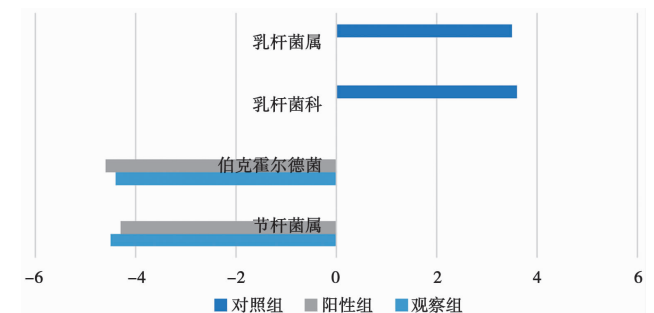


图 2 LefSe 分析 LDA 条形图  
Fig. 2 LDA bar graph for LefSe analysis

#### 5 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达比较

在原分组情况下, 与对照组比较, 观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ ); 与阳性组比较, 观察组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ )。根据乳酸杆菌缺乏阳性分组, 与对照组比较, 观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ ); 与阳性组比较, 观察组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ )。根据乳酸杆菌缺乏和微生物群密度阳性分组,

与对照组比较, 观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P < 0.05$ ); 与阳性组比较,

观察组 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达增加( $P < 0.05$ ), 见表 6。

表 5 3 组肠道菌群在属水平上相对丰度 [ $M(Q_L, Q_U)$ ]  
Table 5 Relative abundance of 3 groups of intestinal flora at the genus level

组别 Group	链球菌 <i>Streptococcus</i>	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	埃希-志贺菌属 <i>Escherichia Shigella</i>	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia</i>	乳杆菌属 <i>Lactobacillus genus</i>
观察组	23.87%(11.47%, 37.34%)	16.41%(8.23%, 19.37%)	2.24%(1.46%, 4.29%)	1.05%(0.45%, 1.56%)*	0.03%(0.02%, 0.05%)*
阳性组	22.56%(10.32%, 35.48%)	15.98%(8.78%, 19.21%)	2.21%(1.50%, 3.94%)	1.03%(0.52%, 1.47%)*	0.04%(0.02%, 0.06%)*
对照组	22.96%(13.59%, 34.71%)	16.07%(9.25%, 18.99%)	2.33%(1.61%, 4.02%)	0.73%(0.32%, 0.94%)	0.07%(0.04%, 0.08%)

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

表 6 ADP-heptose/ALPK1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 6 Comparison of ADP-heptose/ALPK1 mRNA expression

项目 Project	组别 Group	ADP-heptose	F	P	ALPK1	F	P
原分组	观察组 (n=84)	1.89±0.35*#			2.39±0.28*#		
	阳性组 (n=107)	1.60±0.35*	482.530	0.000	2.01±0.37*	1110.800	0.000
	对照组 (n=191)	0.67±0.31			0.78±0.24		
乳酸杆菌 缺乏(阳性)	观察组 (n=72)	1.74±0.30*#			2.21±0.27*#		
	阳性组 (n=84)	1.40±0.27*	106.160	0.000	1.64±0.39*	155.980	0.000
	对照组 (n=23)	0.80±0.19			0.87±0.25		
微生物群 密度(阳性)	观察组 (n=15)	1.68±0.33*#			1.81±0.25*#		
	阳性组 (n=22)	1.39±0.23*	262.460	0.000	1.63±0.33*	237.080	0.000
	对照组 (n=164)	0.72±0.17			0.71±0.24		

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与阳性组比较, #  $P < 0.05$ 。

## 6 ROC 曲线结果

根据乳酸杆菌缺乏阳性分组, 观察组和阳性组 ADP-heptose mRNA 在 HPV 阳性宫颈癌诊断中的曲线下面积(AUC)值为 0.920(0.820~1.000), ALPK1 mRNA 为 0.833(0.701~0.965), 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 7、图 3。

表 7 患者 ROC 曲线结果  
Table 7 Results of Patient ROC Curve

项目 Project	AUC	标准误 standard error	P	95%CI(下限) 95%CI (lower limit)	95%CI(上限) 95%CI (upper limit)
ALPK1	0.920	0.051	<0.01	0.820	1.000
ADP-heptose	0.833	0.067	<0.05	0.701	0.965

## 讨论

研究表明, 阴道微生物生态失调与 HPV 感染密切相关, 微生物引起的阴道感染可导致生殖道粘膜损伤, 从而增加 HPV 侵袭的风险<sup>[9]</sup>。HPV 感染会对粘膜代谢和免疫系统产生负面影响, 进一步破坏阴道微

生态, 从而形成恶性循环, 据报道阴道微生物生态失调是影响 HPV 清除率的主要因素之一<sup>[10-11]</sup>。乳酸杆菌是有助于维持正常阴道微生态的主要细菌, 研究表明阴道微生态失调与细菌性阴道病密切相关<sup>[12]</sup>。缺乏乳酸杆菌会削弱机体抑制病原微生物的能力, 从而增加 HPV 感染和生殖道炎症的风险, 在一些严重的情况下甚至引起宫颈病变<sup>[13]</sup>。有研究诊断了上千例细菌性阴道病患者后, 发现细菌性阴道病与高危 HPV 感染密切相关<sup>[14-16]</sup>。本研究发现与健康女性相比, 单独 HPV 阳性或 HPV 阳性宫颈癌的患者缺乏乳酸杆菌, 并且微生物群密度和多样性要高。阴道毛滴虫和念珠菌与 HPV 感染的相关性尚未阐明。

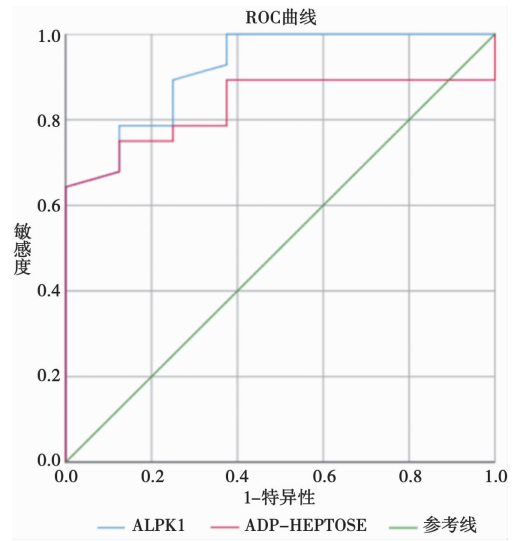


图 3 ROC 曲线结果  
Fig. 3 ROC curve results

本研究还发现, 观察组与阳性组的菌群 Alpha 多样性指标均高于对照组, 同时伴有观察组的 Ace 指数高于阳性组, 提示 HPV 患者无论伴有或不伴有宫颈癌均出现阴道菌群 Alpha 多样性增加, 尤以伴有宫颈癌者紊乱更为明显。较之对照组, 观察组与阳性组的阴道菌群厚壁菌门、变形菌门相对丰度上调, 而放线菌门、拟杆菌门相对丰度下调, 但两组间菌群相对丰度没有统计学差异。提示伴有与不伴有宫颈癌的 HPV 患

者阴道菌群在不同分类水平上均发生改变。在进一步通过 LEfSe 分析中发现观察组与阳性组的伯克霍尔德菌和节杆菌属富集,而对照组则为乳酸杆菌科及乳酸杆菌属富集。伯克霍尔德菌和节杆菌属多为有害性细菌,而乳酸杆菌科及乳酸杆菌属多为有益菌,因此,可推测 HPV 及宫颈癌患者阴道菌群的紊乱可能与有害菌群的增多有关。

在富含微生物的环境中<sup>[19-20]</sup>,宿主通过协调的免疫反应感知并做出反应,免疫反应对入侵的病原体具有防御能力,先天免疫系统通过识别致病相关分子模式(PAMPs),如脂多糖(LPS)等,感知致病性和非致病性外来分子,激活启动信号级联反应,最终导致转录因子核因子(NF)- $\kappa$ B 的激活,这是消除入侵病原体所必需的<sup>[21-22]</sup>。而 ALPK1 可介导 ADP-LD-Hep 诱导 NF- $\kappa$ B 激活,ALPK1 的缺失消除了 ADP-LD-Hep 诱导的 NF- $\kappa$ B 活化和细胞因子表达<sup>[23-24]</sup>。研究表明 ALPK1 参与早期信号级联反应,控制革兰阴性细菌病原体侵袭细胞后的炎症,此外,ALPK1 也与 N 刺激后的炎症控制有关<sup>[25]</sup>。有研究显示,在脑膜炎裂解中,该激酶作为对侵袭性和细胞外革兰阴性细菌的先天免疫的主要调节剂<sup>[26-27]</sup>。此外,研究显示 ALPK1 是革兰阴性细菌触发 NF- $\kappa$ B 活化的模式识别受体,并确定细菌糖 ADP-Hep 作为其配体<sup>[28-30]</sup>。本研究结果发现,与对照组比较,观察组和阳性组 ADP-heptose/ALPK1 增加。根据乳酸杆菌缺乏分组,表明 ADP-heptose/ALPK1 在乳酸杆菌缺乏的 HPV 感染宫颈癌诊断中具有临床意义。该研究有以下局限性。此外,本研究为单中心、小样本研究,其结论需要在多中心、大样本研究中得到证实。

综上所述,本结果表明示独 HPV 阳性或 HPV 阳性宫颈癌的患者缺乏乳酸杆菌,并且微生物群密度和多样性较高,ADP-heptose/ALPK1 在乳酸杆菌缺乏的 HPV 感染宫颈癌诊断中具有临床意义。

#### 【参考文献】

[1] Revathidevi S, Murugan AK, Nakaoka H, et al. APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis[J]. Cancer Lett, 2021,496:104-116.

[2] Cheng Z, Wang H, Yang Z, et al. LMP2 and TAP2 impair tumor growth and metastasis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and EMT in cervical cancer[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1):1128.

[3] 祝江红,黄蕾,韦妹艳. 基于 16SrDNA 高通量测序探究 HPV52 感染对女性阴道微生态的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(9):1005-1011.

[4] Tian Y, Luo H. Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound examination for local staging of cervical cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Med Ultrason, 2022, 24(3): 348-355.

[5] Castanheira CP, Sallas ML, Nunes RAL, et al. Microbiome and cervical cancer [J]. Pathobiology, 2021, 88(2):187-197.

[6] Laniewski P, Ilhan ZE, Herbst-Kralovetz MM. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy [J]. Nat Rev Urol, 2020, 17(4):232-250.

[7] Chen Y, Qiu X, Wang W, et al. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort [J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1):629.

[8] Cong Y. ALPK1: a pattern recognition receptor for bacterial ADP-heptose [J]. Precis Clin Med, 2018, 1(2):57-59.

[9] Zhai Q, Zhang W, Zhang Z, et al. Characteristics of the cervicovaginal microenvironment in childbearing-age women with different degrees of cervical lesions and HR-HPV positivity [J]. Pol J Microbiol, 2021, 70(4):489-500.

[10] So KA, Yang EJ, Kim NR, et al. Changes of vaginal microbiota during cervical carcinogenesis in women with human papillomavirus infection [J]. PLoS One, 2020, 15(9):e0238705.

[11] Squillario M, Bonaretti C, La Valle A, et al. Gut-microbiota in children and adolescents with obesity: inferred functional analysis and machine-learning algorithms to classify microorganisms [J]. Sci Rep, 2023, 13(1):11294.

[12] Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health [J]. Microb Cell Fact, 2020, 19(1):203.

[13] Riganelli L, Iebba V, Piccioni M, et al. Structural variations of vaginal and endometrial microbiota: Hints on female infertility [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:350.

[14] 宗晓楠,冯晰子,白会会,等. 23 181 例初诊的妇科门诊妇女阴道微生态分析[J]. 中华妇产科杂志, 2023, 58(3):191-197.

[15] Zang L, Feng R, Huang Y, et al. Relationship between vaginal microecology and human papillomavirus infection as well as cervical intraepithelial neoplasia in 2 147 women from Wenzhou, the southeast of China[J]. Front Oncol, 2024, 13:1306376.

[16] 黄丽容,刘婷婷,聂波,等. 4 664 例门诊患者阴道微生态特征分析[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(10):1212-1217.

[17] Garcia-Weber D, Arriemerlou C. ADP-heptose: a bacterial PAMP detected by the host sensor ALPK1 [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(1):17-29.

[18] Sidor K, Skirecki T. A bittersweet kiss of gram-negative bacteria: The role of ADP-heptose in the pathogenesis of infection [J]. Microorganisms, 2023, 11(5):1316.

[19] Zhou P, She Y, Dong N, et al. Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose [J]. Nature, 2018, 561(7721):122-126.

[20] Coletta S, Battaglia G, Della BC, et al. ADP-heptose enables *Helicobacter pylori* to exploit macrophages as a survival niche by suppressing antigen-presenting HLA-II expression [J]. FEBS Lett, 2021, 595(16):2160-2168.

[21] Chiu SF, Teng KW, Wang PC, et al. *Helicobacter pylori* GmhB enzyme involved in ADP-heptose biosynthesis pathway is essential for lipopolysaccharide biosynthesis and bacterial virulence [J]. Virulence, 2021, 12(1):1610-1628.

[22] Fischer W, Tegtmeyer N, Stingl K, et al. Four chromosomal type IV secretion systems in *Helicobacter pylori*: Composition, structure and function [J]. Front Microbiol, 2020, 11(1592):1592.

[23] Xiang DF, Xu M, Ghosh MK, et al. Metabolic pathways for the biosynthesis of heptoses used in the construction of capsular polysaccharides in the human pathogen *Campylobacter jejuni* [J]. Biochemistry, 2023, 62(21):3145-3158.

易感性,导致更严重的临床症状<sup>[11]</sup>。根据流行病学调查结果显示,我国大部分地区的牛及其他易感动物均可感染 BPIV3<sup>[12]</sup>,表明 BPIV3 在我国流行形势较为严峻。尽管当前国内不乏 BPIV3 感染的相关报道,但是 BPIV3 流行毒株的基因序列信息还相对较少。分离鉴定国内的 BPIV3 流行毒株并对其进行全基因组序列分析对相关疫苗研发和制定有针对性的免疫防控策略具有重要意义。

本研究通过 PCR 从一头患呼吸道疾病牛的鼻拭子核酸样本中扩增获得 BPIV3 特异性条带,经测序分析证实该病牛感染了 BPIV3。将该鼻拭子样品接种 MDBK 细胞,盲传 5 代后出现明显细胞病变。通过 PCR 证实成功分离一株病毒株,并命名为 BPIV3 NMTL-21。经测定,该毒株基因组全长为 15 454 bp。

目前 BPIV3 流行毒株在世界范围内主要存在 3 种基因型,即 A 型、B 型和 C 型<sup>[13]</sup>。我国国内有基因 A 型和 C 型的报道,但鲜有 B 型毒株报道。基于全长核苷酸序列同源性分析结果显示,NMTL-21 株与 NCBI 登录的 BPIV3 毒株同源性为 81.0%~99.6%,其中与 2015 年分离自黑龙江大庆的 NX49 株同源性最高,达 99.6%,与 2013 年分离自北京的 XJA13 株同源性为 99.5%。遗传进化分析显示该毒株为基因 C 型。

牛感染 BPIV3 后,在如饲养密度大等情况下会导致牛继发细菌感染或支原体感染并引起严重的肺炎,还会引起组织病理损伤和免疫抑制<sup>[14]</sup>。病牛会出现体温升高,食欲不振,精神沉郁,咳嗽,鼻眼分泌物增多,流泪,呼吸困难等多种症状,死亡率高达 35%,严重危害全世界养牛业的经济<sup>[15]</sup>。

本研究成功分离到一株 BPIV3-C 型毒株,并对其进行了基因组全长序列分析,该研究有助于揭示内蒙古通辽地区 BPIV3 毒株流行特点,并可为抗 BPIV3 药物和疫苗的研发提供理论基础和实验材料。

#### 【参考文献】

(上接 519 页)

[24] Kyrgiou M, Arbyn M, Bergeron C, et al. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC) [J]. Br J Cancer, 2020, 123(4): 510-517.

[25] Santella B, Schettino MT, Franci G, et al. Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota [J]. J Med Virol, 2022, 94(9): 4478-4484.

[26] 李莉, 马莹, 付玉荣, 等. 阴道微生态改变与高危型人乳头瘤病毒感染的相关性研究[J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(3): 225-229.

[27] Tao H, Zeng D, Chen W, et al. Focused ultrasound: a novel therapy for improving vaginal microecology in patients with

[1] Mayo MA. Developments in plant virus taxonomy since the publication of the 6th ictv report international committee on taxonomy of viruses[J]. Arch Virol, 1999, 144(8): 1659-1666.

[2] Juozapaitis M, Zvirbliene A, Kucinskaite I, et al. Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3 nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Virus Res, 2008, 133(2): 178-186.

[3] Reisinger RC, Heddleston KL, Manthei CA. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle [J]. J Am Vet Med Assoc, 1959, 135(3): 147-152.

[4] Battles MB, McLellan JS. Respiratory syncytial virus entry and how to block it [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(4): 233-245.

[5] Zhu YM, Shi HF, Gao YR, et al. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China [J]. Vet Microbiol, 2011, 149(3-4): 446-451.

[6] Sattar SA, Bohl EH, Senturk M. Viral causes of bovine abortion in Ohio [J]. J Am Vet Med Assoc, 1965, 147(11): 1207-1210.

[7] Horwood PF, Mahony TJ. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex [J]. J Virol Method, 2011, 171(2): 360-363.

[8] Srikumaran S, Kelling CL, Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex [J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8(2): 215-229.

[9] 毕玉斌, 宋丽丽, 薛原, 等. 我国北方 4 省部分规模奶牛场牛呼吸道疾病综合征主要病原血清抗体检测 [J]. 中国动物检疫, 2020, 37(12): 9-13.

[10] Leal E, Liu C, Zhao Z, et al. Isolation of a divergent strain of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) infecting cattle in China [J]. Viruses, 2019, 11(6): 489.

[11] Miles DG. Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD) [J]. Anim Health Res Rev, 2009, 10(2): 101-103.

[12] Ren Y, Tang C, Yue H. Prevalence and molecular characterization of bovine parainfluenza virus type 3 in cattle herds in China [J]. Animals (Basel), 2023, 13(5): 793.

[13] Newcomer BW, Neill JD, Galik PK, et al. Serologic survey for antibodies against three genotypes of bovine parainfluenza 3 virus in unvaccinated ungulates in Alabama [J]. Am J Vet Res, 2017, 78(2): 239-243.

[14] Wen YJ, Shi XC, Wang FX, et al. Phylogenetic analysis of the bovine parainfluenza virus type 3 from cattle herds revealing the existence of a genotype A strain in China [J]. Virus Genes, 2012, 45(3): 542-547.

[15] Leal E, Liu C, Zhao Z, et al. Isolation of a divergent strain of bovine parainfluenza virus type 3 (bpiv3) infecting cattle in China [J]. Viruses, 2019, 11(6): 489.

【收稿日期】 2023-11-30 【修回日期】 2024-02-16

high-risk HPV infection [J]. Int J Hyperthermia, 2023, 40(1): 2211276.

[28] 钱玉. 宫颈人乳头瘤病毒感染与阴道微生态失衡的相关性研究及中医证型分布 [D]. 新疆: 新疆医科大学, 2023.

[29] 王和舒琦, 白会会, 刘朝晖. 妇科门诊患者阴道微生态特征及其与人乳头瘤病毒感染的相关性分析 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2023, 39(2): 226-230.

[30] Sharifian K, Shoja Z, Jalilvand S. The interplay between human papillomavirus and vaginal microbiota in cervical cancer development [J]. Virol J, 2023, 20(1): 73.

【收稿日期】 2023-11-15 【修回日期】 2024-02-05