

子宫腔微生物组检测分析专家共识

李艳辉 王志启 薛凤霞 李小毛 马晓欣 王秀霞 李明清 吴皓萌
袁明 颜桂军 刘西茹 杨胜兰 邹央云 王建六 汪宏波

【摘要】近年来的研究已证实人类宫腔并非“无菌”状态，而是定植着多种微生物菌群。子宫腔内微生物的多样性及其代谢产物可以通过调节局部免疫环境影响生殖健康稳态，与复发性流产、反复种植失败、子宫内膜炎、子宫内膜异位症以及子宫内膜癌变等密切相关。然而，由于宫腔内的微生物群落丰度较低，属于典型的低生物量样本，其研究结果易受研究对象的选择、微生物取样、测序分析及污染控制等因素的影响，并可能导致无效或错误的分析结果。因此，本共识通过组织国内相关专家，系统整合国内外最新研究成果与实践证据，围绕子宫腔微生物组学研究的关键环节——包括研究设计、样本量计算、标准化采样流程、测序分析方法及污染控制等方面——形成系列推荐意见，旨在为相关领域研究提供兼具科学性与实操性的技术规范。

【关键词】微生物组；生殖内分泌疾病；子宫腔；低生物量；共识

近年来，微生物组研究证实人体多数组织器官与共生微生物形成动态互作系统，影响生理病理进程。微生物群（microbiota）指特定环境中的微生物群落，其基因组集合称为微生物组（microbiome）。女性生殖道微生物组与生殖健康密切相关^[1]。

传统观点认为，上生殖道（子宫腔、输卵管、卵巢）为无菌环境，但下一代测序技术（NGS）揭示了其存在独特微生物群落^[2-4]，挑战了“无菌子宫”假说。早期研究认为宫腔仅在妊娠^[5-6]或疾病状态下存在微生物定植。2015年，Mitchell等^[7]通过qPCR发现95%（55/58）子宫切除标本存在宫腔细菌定植；Moreno等^[8]及Verstraelen等^[9]分别通过宫腔液和子宫内膜标本的16S rRNA测序证实宫腔微生物普遍存在。然而，宫腔微生物属低生物量样本（细菌负荷较阴道低 $10^2 \sim 10^4$ 倍^[10-11]），导致该领域的研究一直面临挑战：①经阴道取样与子宫切除标本菌群分析结果存在矛盾^[8, 12-13]；②40%的腹式子宫切除标本中微生物组丰度未显著高于阴性对照，引发真实性争议^[14-15]；③核心微生物组难以界定，导致结果可比性差。因此，本共识通过组织国内相关专家，并查阅国内外最新的子宫腔微生物组学研究进展，提出了关于子宫腔微生物组学研究在研究设计、样本量计算、样本采集、测序分析方法和污染控制等方面的推荐意见（推荐级别及代表的意义见表1）。其目的是为子宫腔内微生物组学研究提供切实可行的实践规范。

表1 推荐级别及意义

推荐级别	代表意义
1类	基于高级别研究证据，专家意见高度一致
2A类	基于高级别临床研究证据，专家意见基本一致；或基于低级别临床研究证据，专家意见高度一致
2B类	基于低级别临床研究证据，专家意见一致或基本一致
3类	不论基于何种级别临床证据，专家意见不一致或有较大分歧

一、研究设计

1. 研究方案：子宫内膜微生物组研究需结合队列设计（病例对照/横断面）与纵向动态监测，分析微生物群落结构、功能及其遗传特征差异。前瞻性设计需同步采集同一时间点样本及个体跨时间点的连续样本（如月经周期不同阶段）。类似肠道微生物研究提示，微生物组成动态变化可能更具预测价值。通过跨时间点追踪，可解析微生物波动与临床结局的关联，挖掘早期诊断标志物，并为个体化干预提供依据。

2. 样本量：现有研究样本量普遍偏小（30~60例），限制了统计功效及效应量分析。扩大样本量可提升小效应差异的检测灵敏度。在子宫腔微生物组研究中尤其需关注妊娠史、月经周期等分层亚组的独立分析。

3. 合适的元数据的设计及采集：研究可重复性依赖标准化元数据记录，包括人群特征（生育史、激素状态）、样本采集流程（时间点、存储条件）、生信分析参数等。需系统性评估并公开共享样本异质性（如周期阶段、分娩次数）对微生物组成的影响，避免结论偏倚。原始数据与元数据同步开放将促进跨研究验证及机制解析。

推荐意见：子宫腔微生物组研究应优先采用前瞻性队列联合纵向动态追踪设计，整合月经周期等多阶段样

doi:10.13390/j.issn.1672-1861.2025.04.021

基金项目：国家重点研发计划（2023YFC2705400）

通信作者：王建六 Email: wangjianliu1203@163.com;

汪宏波 Email: drwanghb69@hust.edu.cn

本采集,系统解析菌群动态变化与临床结局的关联(推荐级别:2A类);同时需扩大样本量并依据妊娠史、月经周期等关键变量进行分层分析,结合 PERMANOVA 等统计模型区分技术干扰与生物学信号,提升小效应差异的检测效能(推荐级别:2A类)。建立标准化元数据框架(涵盖生育史、样本采集流程及分析参数),评估异质性来源,并开放共享原始数据与分析流程,以增强结果可重复性及跨平台验证能力,推动机制研究与临床转化(推荐级别:2A类)。

二、研究对象

患者和对照组的选择是研究子宫腔微生物组学的关键步骤,尤其在探讨其与子宫环境互作时^[16]。目前子宫腔微生物组在月经周期中的稳定性仍存争议,部分研究提示其高度稳定^[8],另一些则发现宫腔微生物组在增殖期、分泌期与经期存在显著差异^[17],需进一步明确月经周期中子宫“基线”微生物的动态变化。

研究设计需根据科学问题细化分组,建议系统收集参与者元数据以控制混杂因素。需区分未生育、已生育及多次生育女性,因妊娠史可显著改变生殖道菌群结构^[18]。

推荐意见:建议在研究设计中需考虑到月经周期、妊娠及分娩史对子宫腔微生物组的潜在影响(推荐级别:1类)。应系统采集参与者元数据,重点涵盖月经周期阶段(增殖期/分泌期/经期)、生育次数及子宫环境相关变量,以阐明微生物组与生理状态的互作关系(推荐级别:1类)。建议设置严格对照组,并区分未生育、已生育及多次生育女性,以控制混杂因素。针对月经周期争议,可增设跨周期纵向采样队列,同步分析“基线”微生物动态与周期激素波动关联,提升子宫腔微生物组基线动态解析的可靠性(推荐级别:2A类)。

三、子宫腔微生物菌群标本的采集

目前,子宫腔微生物菌群研究中,标本采集方法各异。标本采集方法的设计均旨在尽量减少宫颈、阴道污染。主要取样方式包括:经宫颈进入子宫腔采样,选择性剖宫产术中采样以及手术切除的子宫标本无菌采集。经宫颈取样方式包括 IVF 胚胎移植后导管尖端取样、宫腔液抽吸、子宫内膜拭子采样,以及子宫内膜活检或刮宫组织采样。部分研究通过无菌剖开切除的子宫采集子宫内膜拭子或组织样本;另有研究在剖宫产术中采集子宫内膜组织。手术切除标本的无菌采样理论上最优,但仅适用于特定患者。临床实践中,健康绝经前女性极少接受子宫切除,而多数剖开或切除子宫的患者为异常子宫出血或肿瘤患者,其子宫腔环境可能已受影响,从而改变子宫腔微生物菌群的定植。

为了最大限度地降低污染风险,一些新型的子宫取样方法已被应用于宫腔微生物组研究,包括双腔胚胎移植导管^[19]、宫内人工授精导管^[12]和经宫颈护套刷装置^[9]。与研究方案中的每一步一样,整个研究过程中应努力以标准化的方式收集样本,以尽量减少无意的变异。最近的一

项研究对比了子宫内液与组织样本发现:宫腔液微生物组无法完全反映组织菌群组成,提示取样部位选择需结合研究目标^[20]。

推荐意见:研究者应选择适当的宫腔微生物采样方法,尽量减少宫颈和阴道污染的风险。在使用经宫颈取样方式时,优先选择防污染取样装置,经宫颈取样时,推荐使用双套导管或带保护鞘的子宫内刷,并同步采集宫颈阴道对照样本;手术场景优先采用子宫切除后无菌剖开子宫取样。采样流程中强制设置阴性对照(灭菌拭子全程伴随采样)(推荐级别:2A类)。

四、子宫腔微生物菌群标本的储存

样本储存与运输的标准化是保障微生物组数据可靠性的关键环节。-80℃直接冷冻被视为金标准,但一项肠道菌群研究显示:新鲜样本、-80℃直接冷冻及置于干冰上快速冷冻(snap-frozen)然后在-80℃保存三组的16S测序结果无显著差异,而速冻可减少冰晶形成以维持细胞完整性^[21]。

临床场景中常缺乏超低温设备,可选用保存缓冲液(如RNAlater、PSP、Allprotect)在4℃/室温维持核酸稳定。不过,从存储在RNAlater中的样本分析发现,与新鲜样本和-80℃存储样本相比,其细菌群落的相似性较低^[22]。另一项研究对比了六种保存缓冲液,结果显示不同缓冲液保存的样本,分析结果上细菌群落组成缺乏一致性^[23]。总的来说,使用不同采样和存储方法的子宫腔微生物组研究缺乏可比性,因此该领域亟需设计严谨的大型队列研究,特别是针对低生物量微生物的生态研究。

推荐意见:在子宫腔内微生物菌群标本采集后,需在抑菌条件下储存。推荐在采集后立即使用干冰或液氮进行快速冷冻,随后转移至-80℃长期保存(推荐级别:1类)。样本需分装为单次使用量,避免反复冻融。若需运输,全程保持-80℃冷链或干冰环境。但在缺乏此设备的情况下,可使用有效的存储缓冲液(推荐级别:2A类)。在元数据中记录采样和存储方法。同一研究中需统一保存方法,设立内参样本(如添加标准菌株)以评估保存偏差(推荐级别:2A类)。

五、微生物组检测

微生物组研究需择合适分析方法。传统培养技术因严重低估菌群多样性而被非培养技术取代。人体微生物组计划采用了基于16S rRNA高通量测序(聚焦基因超可变区作为菌属/种特异性标志),现为生殖道微生物组研究主流方法。该技术通过“群体基因组学”策略解析菌群特征:样本经DNA提取后,采用标记基因分析、宏基因组/宏转录组等技术进行深度解析。标记基因分析成本低、适用于物种注释,而宏基因组学可挖掘功能基因,但需更高测序深度与计算资源^[24]。

1. 标记基因分析:16S rRNA 基因(细菌/古菌),及18S rRNA、28S rRNA 和 ITS 区(真菌)为常用标记基因。16S 扩增测序快速经济,尤其适合子宫内液等低生物量

样本。子宫内膜研究常选择 V4 高变区,而阴道研究显示 V3~4 区比 V1~2 区识别更多分类群及更高多样性^[25]。尽管存在局限性(如无法解析菌株水平功能),标记基因分析仍是宫腔微生物组研究主流(>80% 文献采用)。

2. 宏基因组分析:全基因组测序可检测细菌、真菌及病毒,擅长解析低生物量样本复杂群落。当前注释精度受限于数据库完整性,但技术进步正突破瓶颈:研究已揭示宫腔多界微生物共存现象。目前仍需提升测序深度、优化数据库并扩大样本量,以增强物种鉴定准确性,阐明代谢通路等宿主-菌群互作机制。

3. 宏转录组分析:通过 RNA 测序解析微生物功能活性,弥补 DNA 测序无法反映代谢活性的局限。核心挑战是去除宿主 rRNA 干扰(>95% 为非编码 RNA)。最新研究通过子宫内膜宏转录组构建了 5 300+ 微生物全群落图谱,发现分泌期与增殖期菌群丰度差异及前列腺素代谢通路变化,提示菌群可能调控内膜功能^[26]。

推荐意见:在微生物菌群研究中,应根据研究目标及资源条件综合选择分析方法。建议采用针对 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行靶向分析,以增强对更广泛类群的识别(推荐级别:2A 类)。为扩展分析范围,还可纳入宏基因组或宏转录组测序,以检测非细菌生物(推荐级别:2A 类)。

六、生信分析方面

近年来,扩增子序列变异(amplicon sequence variants, ASVs)逐渐取代操作性分类单元(operational taxonomic units, OTUs)成为差异丰度分析的主流方法。ASV 方法可在扩增和测序错误发生前推断样本中的真实生物序列,并能区分仅相差一个核苷酸的序列变体,因而具有更高的分辨率和重现性。

在 16S rRNA 基因测序中,使用不当的引物组合、过时的参考数据库或错误的分析流程可能导致某些细菌属被低估或遗漏。目前,常用的 16S rRNA 数据处理工具包括 QIIME、QIIME 2、UPARSE、USEARCH、VSEARCH 和 Mothur。数据库的选择也会影响分类精度,主流数据库包括 Greengenes、SILVA、NCBI 和 RDP 分类器。其中, Greengenes 专注于细菌和古细菌, SILVA 则是最新且规模最大的数据库,广泛用于 16S rRNA 基因研究,可支持更精确的物种鉴定。在定向 16S rRNA 测序或宏基因组测序研究中,建议考虑使用 NCBI 数据库以获得更全面的分类信息。

推荐意见:建议在生物信息分析中采用 ASVs 进行差异丰度测试,以提高微生物组分析的分辨率和准确性(推荐级别:2A 类)。同时,应根据具体研究需求选择适当的分析工具和数据库,确保结果的可靠性。采用最新、最全面的数据库的数据分析技术,以确保精确的物种水平识别。同时还应及时关注生物信息学的进展,使用最新版本的软件工具,以确保最准确的分析(推荐级别:1 类)。

七、污染的控制

在低生物量微生物环境(如子宫腔)中,污染物

DNA 和交叉污染会显著干扰微生物组研究结果。污染物 DNA 主要源于实验室试剂(如分子生物学级试剂、DNA 提取试剂盒、PCR 试剂)和环境因素(耗材、操作人员)。这些试剂因含有细菌源性 DNA 成分,其携带的“细菌源性 DNA”污染在不同品牌或批次间存在差异,故建议全程使用同批次试剂。如果使用多个试剂盒,应将试剂盒批次作为统计分析中的一个因素;此时记录每个样本使用的试剂盒以及批次是至关重要的。研究显示,空白对照和无模板对照中检测到超过 100 种常见的污染类群,证实试剂污染难以避免。交叉污染则发生于样本间或测序过程,尤其在低生物量条件下,痕量污染物即可覆盖真实微生物信号。

为降低低生物量微生物组测序分析中的污染风险,建议:

1. 在不同样本组或处理步骤中应实施随机化。研究人员需佩戴一次性手套、口罩,并避免裸露皮肤,以降低 DNA 污染。实验操作(样本转移、DNA 提取、文库制备和测序)应在清洁、隔离环境中进行,并使用经过适当处理的设备和耗材。

2. 适当的对照对微生物组研究至关重要,特别是在子宫腔微生物研究中。采样过程需包含对照以识别污染物并区分真实微生物。建议使用三类阴性对照:① 采样空白对照;② DNA 提取空白对照;③ 无模板扩增对照。此外,建议使用两类阳性对照:① DNA 提取阳性对照;② 扩增阳性对照^[27],以评估检测限及交叉污染影响。可使用单一微生物分离物或已知微生物混合物作为阳性对照。

3. 结果分析时需考虑污染物的影响,生物量越低,污染影响越显著。污染是子宫腔微生物研究的主要挑战之一,完全控制污染虽难实现,但研究需保持透明,提供完整数据和对照信息,并充分讨论局限性。

推荐意见:在低生物量微生物环境(如子宫腔)中,污染风险极高,因此建议在微生物组研究中采取一系列措施以降低污染影响,并建议使用同一批次的试剂处理所有样本(推荐级别:2A 类)。采样过程必须包含充分的阴性和阳性对照,以识别交叉污染和确认检测限(推荐级别:1 类)。在分析和解释结果时,应考虑污染物的影响,使用对照样本进行比较,必要时应用去除污染物的工具和预测模型(推荐级别:1 类)。

执笔专家:李艳辉(华中科技大学同济医学院附属协和医院)、王建六(北京大学人民医院妇产科)

专家组成员:李艳辉(华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科)、王志启(首都医科大学附属北京友谊医院妇产科)、薛凤霞(天津医科大学总医院妇产科)、李小毛(中山大学附属第三医院妇科)、马晓欣(中国医科大学附属盛京医院妇科)、王秀霞(中国医科大学附属盛京医院生殖医学中心)、李明清(复旦大学附属妇产科医院生殖免疫科)、吴皓萌(广东省中医院脾胃病科)、袁明(山东第一医科大学附属省立医院妇科)、颜桂军(南京大学医学院

附属鼓楼医院生殖中心)、刘西茹(重庆医科大学附属第一医院生殖中心)、杨胜兰(华中科技大学同济医学院附属协和医院临床营养科)、邹央云(上海亿康医学检验有限公司)、王建六(北京大学人民医院妇产科)、汪宏波(华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科)

参考文献

- [1] Gao H, Liu Q, Wang X, et al. Deciphering the role of female reproductive tract microbiome in reproductive health: A review[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1351540. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1351540.
- [2] Yuan C, Xie K, Feng L, et al. The role and challenges of regulating endometrial microbiome in uterine health and diseases[J]. Crit Rev Microbiol, 2024, 50(5): 937-954. DOI: 10.1080/1040841x.2024.2320247.
- [3] Ying X, Xu G, Wang H, et al. An altered uterine microbiota with endometrial hyperplasia[J]. BMC Microbiol, 2024, 24(1): 258. DOI: 10.1186/s12866-024-03379-1.
- [4] Bensouda S, Cromack SC, Komorowski AS, et al. Uterine pathology and microbiome among patients with endometrial polyps and fibroids[J]. F S Sci, 2025, 6(1): 107-116. DOI: 10.1016/j.xfss.2024.12.002.
- [5] Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(237): 237ra65. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- [6] 孟晓, 钟世林, 邓玉清. 胎盘微生物的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(6): 667-669. DOI: 10.13390/j.issn.1672-1861.2020.06.040.
- [7] Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women[J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(5): 611. e1-e9. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.11.043.
- [8] Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure[J]. Am J Obstet Gynecol, 2016, 215(6): 684-703. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.09.075.
- [9] Verstraeten H, Vilchez-Vargas 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]. PeerJ, 2016, 4: e1602. DOI: 10.7717/peerj.1602.
- [10] Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders?[J]. Front Immunol, 2018, 9: 208. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00208.
- [11] 秦晶晶, 唐振利, 孙鸿博, 等. PCOS 孕妇孕晚期阴道微生物分布特点与妊娠结局的关系分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2023, 24(3): 274-277. DOI: 10.13390/j.issn.1672-1861.2023.03.016.
- [12] Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, et al. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: A single-center pilot study[J]. Reprod Med Biol, 2018, 17(3): 297-306. DOI: 10.1002/rmb2.12105.
- [13] Hashimoto T, Kyono K. Does dysbiotic endometrium affect blastocyst implantation in IVF patients?[J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36: 2471-2479. DOI: 10.1007/s10815-019-01630-7.
- [14] Molina NM, Sola-Leyva A, Haahr T, et al. Analysing endometrial microbiome: Methodological considerations and recommendations for good practice[J]. Hum Reprod, 2021, 36(4): 859-879. DOI: 10.1093/humrep/deab009.
- [15] Banchi P, Colitti B, Opsomer G, et al. The dogma of the sterile uterus revisited: does microbial seeding occur during fetal life in humans and animals?[J]. Reproduction, 2024, 167(1): e230078. DOI: 10.1530/rep-23-0078.
- [16] de Medeiros Garcia Torres M, Lanza DCF. A standard pipeline for analyzing the endometrial microbiome[J]. Reprod Sci, 2024, 31(8): 2163-2173. DOI: 10.1007/s43032-024-01557-0.
- [17] Grobeisen-Duque O, Mora-Vargas CD, Aguilera-Arreola MG, et al. Cycle biodynamics of women's microbiome in the urinary and reproductive systems[J]. J Clin Med, 2023, 12(12): 4003. DOI: 10.3390/jcm12124003.
- [18] Koedooder R, Mackens S, Budding A, et al. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts[J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(3): 298-325. DOI: 10.1093/humupd/dmy048.
- [19] Su W, Gong C, Zhong H, et al. Vaginal and endometrial microbiome dysbiosis associated with adverse embryo transfer outcomes[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2024, 22(1): 111. DOI: 10.1186/s12958-024-01274-y.
- [20] Liu Y, Wong KK, Ko EY, et al. Systematic comparison of bacterial colonization of endometrial tissue and fluid samples in recurrent miscarriage patients: Implications for future endometrial microbiome studies[J]. Clin Chem, 2018, 64(12): 1743-1752. DOI: 10.1373/clinchem.2018.289306.
- [21] Li XM, Shi X, Yao Y, et al. Effects of stool sample preservation methods on gut microbiota biodiversity: New original data and systematic review with meta-analysis[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(3): e04297-22. DOI: 10.1128/spectrum.04297-22.
- [22] Karstens L, Asquith M, Caruso V, et al. Community profiling of the urinary microbiota: Considerations for low-biomass samples[J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(12): 735-749. DOI: 10.1038/s41585-018-0104-z.
- [23] Chen Z, Hui PC, Hui M, et al. Impact of preservation method and 16S rRNA hypervariable region on gut microbiota profiling[J]. mSystems, 2019, 4(1): e00271-18. DOI: 10.1128/mSystems.00271-18.
- [24] Davidson I, Nikbakht E, Haupt LM, et al. Methodological approaches in 16S sequencing of female reproductive tract in fertility patients: A review[J]. J Assist Reprod Genet, 2025, 42(1): 15-37. DOI: 10.1007/s10815-024-03292-6.
- [25] Graspeuntner S, Loeper N, Künzel S, et al. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9678. DOI: 10.1038/s41598-018-27757-8.
- [26] Sola-Leyva A, Andrés-León E, Molina NM, et al. Mapping the entire functionally active endometrial microbiota[J]. Hum Reprod, 2021, 36(4): 1021-1031. DOI: 10.1093/humrep/deaa372.
- [27] Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, et al. Contamination in low microbial biomass microbiome studies: Issues and recommendations[J]. Trends Microbiol, 2019, 27(2): 105-117. DOI: 10.1016/j.tim.2018.11.003.

(收稿日期: 2024-11-01)