

Sneathia sanguinegens 在女性不明原因复发性流产不良妊娠结局中的价值初探

赵付菊^{1,3} 胡贤洋² 刘璐² 黄茜茜² 王菲菲³ 高晶³ 杜美蓉² 应春妹^{3Δ}

¹复旦大学附属华东医院检验科 上海 200040; ²复旦大学附属妇产科医院研究所 上海 200090;

³复旦大学附属妇产科医院检验科 上海 200011)

【摘要】 目的 本研究探讨 *Sneathia sanguinegens* (*S. sanguinegens*) 在女性不明原因复发性流产 (unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA) 不良妊娠结局中的价值。方法 利用 16S rRNA 测序技术分析比较 65 例 URSA 患者与 18 例健康对照女性的阴道菌群特征; 细胞水平分析 *S. sanguinegens* 对人子宫颈表皮癌细胞 ME-180、人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 及人胎盘绒毛膜癌细胞 JEG-3 的毒性特征, 以评估其在不良妊娠结局中的作用机制; 在动物水平分析 *S. sanguinegens* 感染 C57BL/6J 小鼠后对机体的毒性反应。结果 与健康对照组相比, URSA 患者阴道的 *Sneathia* 相对丰度显著升高, 与流产次数呈正相关, 种水平发现组间差异是由 *S. sanguinegens* 引起。在细胞水平发现 *S. sanguinegens* 可破坏 ME-180、JEG-3 和 HUVEC 细胞, 细胞损伤程度与细胞中的菌浓度呈正相关。在动物水平发现, 静脉感染 *S. sanguinegens* 后可引发小鼠多个脏器炎症性损伤, 脾脏出现髓外造血现象。结论 *S. sanguinegens* 与 URSA 密切相关, 当患者阴道该菌高载量时应引起重视。

【关键词】 *Sneathia sanguinegens* (*S. sanguinegens*); 不明原因复发性流产 (URSA); 不良妊娠; 致病机制

【中图分类号】 R446.5 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2025.01.013

Preliminary investigation into the role of *Sneathia Sanguinegens* in unexplained recurrent spontaneous abortion

ZHAO Fu-ju^{1,3}, HU Xian-yang², LIU Lu², HUANG Xi-xi², WANG Fei-fei³,
GAO Jing³, DU Mei-rong², YING Chun-mei^{3Δ}

¹Department of Clinical Laboratory, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ²Research Institution, Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200090, China; ³Department of Clinical Laboratory, Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200011, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of *Sneathia sanguinegens* (*S. sanguinegens*) in the development of unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA). **Methods** A case-control study was conducted to analyze the vaginal flora characteristics of 65 patients with URSA and 18 healthy controls through 16S rRNA gene sequencing. Toxicity profile of *S. sanguinegens* on human cervical cancer cells (ME-180), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human placental choriocarcinoma cells (JEG-3) was analyzed at the cellular level to assess the mechanism of it in adverse pregnancy outcomes. And *S. sanguinegens* was used to infect C57BL/6J mice to explore the toxic effect on living organisms. **Results** The relative abundance of *Sneathia* was increased in patients with URSA compared with healthy controls. It was positively correlated with the number of miscarriages, and was attributed to

上海市卫健委科研项目(202340223); 复旦大学附属华东医院国自然培育项目(GZRPY008Y)

^ΔCorresponding author E-mail: ycmzh2012@163.com

网络首发时间: 2024-12-23 17:18:46 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/31.1885.r.20241222.1907.016>

S. sanguinegens. We also found that *S. sanguinegens* damaged ME-180, JEG-3 and HUVEC cells. The degree of cellular damage was related to the level of *S. sanguinegens* added. Intravenous infection with *S. sanguinegens* caused inflammatory damage in several organs and extramedullary hematopoiesis in the spleen. **Conclusion** *S. sanguinegens* is closely related to URSA and should be emphasized in patients with high vaginal bacterial load.

【Key words】 *Sneathia sanguinegens* (*S. sanguinegens*); unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA); adverse pregnancy; pathogenic mechanisms

* This work was supported by the Scientific Research Project of Shanghai Municipal Health Commission (202340223) and the Cultivation Program of National Natural Science Foundation of Huadong Hospital, Fudan University (GZRPY008Y).

我国将连续发生3次或3次以上的自然流产定义为复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA),流产时可表现为停经后阴道出血和腹痛,部分患者没有任何症状^[1]。近些年鉴于我国的国情和临床实践,自然流产诊治中国专家共识(2020年版)^[2]建议将连续发生2次及2次以上在妊娠28周之前的胎儿丢失定义为RSA,包括连续发生的生化妊娠。RSA与产科并发症密切相关,早产风险随着流产次数而逐步增加,RSA女性发生早产的风险最高,此外胎儿生长受限、胎盘早剥和妊娠死胎的风险也会增加^[3-4]。RSA也是心血管疾病和血栓栓塞以及心理健康状况异常等的预测因素^[1-4]。RSA病因复杂,包括染色体异常(胚胎和/或夫妻双方染色体异常)、生殖道感染、母体生殖道异常、血栓形成、内分泌异常和免疫功能异常等^[3,5-7],然而RSA患者中仍有50%~70%的不明原因复发性流产人群(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)^[1-4]。

*Sneathia*是一种引起女性多种生殖系统疾病与不良围产期结局的新兴病原体^[8],尚无中文命名。*Sneathia*为无芽孢革兰阴性厌氧不动杆菌,归螺旋体科,包括*Sneathia sanguinegens*(*S. sanguinegens*)及*Sneathia amnii*(*S. amnii*)两种^[8-10]。该菌体外培养条件要求苛刻,生长缓慢,一般实验室借助传统方法很难分离鉴定,因此它在人类健康和疾病中的价值并未得到充分认识。直至测序技术发展和广泛应用,才逐步认识其在生殖及围产医学中的地位和作用^[8]。基于测序技术发现*Sneathia*与早产和流产密切相关,是羊水中最常见的分离菌之一,能引起绒毛膜羊膜炎或其他羊膜炎^[11-12]。前期临床流行病学研究发现RSA患者阴道*Sneathia*相对丰度高于健康对照人群,这种差异可能是由*S. sanguinegens*引起

的^[13],*S. sanguinegens*是否参与URSA发生发展不得而知,尚无*S. sanguinegens*致病机制报道^[8,14-16]。本研究通过测序技术绘制URSA患者阴道菌群特征,探讨*S. sanguinegens*在URSA中的价值,于细胞及动物水平初步研究*S. sanguinegens*参与URSA的发生发展机制。

资料和方法

研究对象 回顾性分析2019年7月至2020年2月期间就诊于复旦大学附属妇产科医院生殖免疫专科门诊的65例URSA患者,并按照流产次数分为自然流产2次、3次、4次及以上者,分别纳入URSA1、URSA2、URSA3组。对照组为我院体检中心已成功妊娠2次或以上的健康育龄期女性,共18例。本研究已通过复旦大学附属妇产科医院伦理委员会审查(批准号:2020-162),所有受试者自愿参加研究并签署知情同意书。

纳入标准:近2日无阴道冲洗及盆浴;近3日无性生活;近2周内未使用抗菌药物或阴道栓剂。排除标准:参加其他研究项目者;未签署知情同意书者;患有基础疾病者;正在接受药物治疗者;其他已知菌种感染者;年龄<18岁或≥43岁;有吸烟史或素食者。

样本采集 受试者取截石位,由专科医师使用经无菌生理盐水浸湿的一次性无菌窥阴器暴露阴道,使用无菌棉拭子于阴道壁旋转采集分泌物。取样过程迅速以避免污染,取样后做好标记,迅速转运至-80℃冰箱保存。

扩增测序 使用基因组DNA快速抽提试剂盒(美国MP Biomedicals公司)同批次抽提所有受试者阴道分泌物样本DNA。针对细菌16S rRNA的

可变区 V3-V4 区合成引物,上游引物 338F:5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCAG-3',下游引物 806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3',由上海生工生物技术有限公司合成。运用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit 进行建库由 Illumina 平台 (Miseq PE300)完成测序。

细胞及菌株 人子宫颈表皮癌细胞 ME-180、人胎盘绒毛膜癌细胞 JEG-3 和人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 由中国科学院细胞库提供。试验菌株 *S.sanguinegens* CCUG 42621 由上海烜雅生物科技有限公司提供,大肠埃希菌 ATCC25922 由上海市临床检验中心提供。

细胞毒性试验 参考 Harwich 等^[9]的方法并加以改进,重悬 *S.sanguinegens* CCUG 42621,调整 D_{600} 为 0.1 (*S.sanguinegens*-L) 及 0.15 (*S.sanguinegens*-H)。分别吸取 10 μ L 菌悬液加入含有细胞株的孔位及仅含有同体积细胞培养基的孔位中,以不添加任何液体的细胞孔位为阴性对照,以添加 10 μ L PBS 含有细胞株的孔位为未加细菌的对照组,以含培养基和 CCK-8 (上海翌圣生物科技有限公司) 但无细胞的孔位为空白对照。37 $^{\circ}$ C 厌氧培养,光学显微镜下观察单层细胞的变化,如细胞变圆、黏附力丧失和单层破坏后取出,倒置显微镜下初步观察,使用锥虫蓝染色观察细胞形态变化,使用细胞活力检测试剂盒进行细胞活力检测。试验重复 3 次,每次 5 个复孔。

小鼠感染模型 6 周龄 C57BL/6J 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。分为感染组与对照组。*S.sanguinegens* 培养后配制成 1×10^5 cfu 菌悬液,取 100 mL 以眼底静脉注射方式感染小鼠,14 天后取小鼠肝脏、脾脏、肺及淋巴结分别进行组织包埋、切片及 HE 染色,以同体积 PBS 溶液作为阴性对照。本研究符合复旦大学附属妇产科医院动物实验伦理要求(批准号:2022JS 妇产科医院-090)。

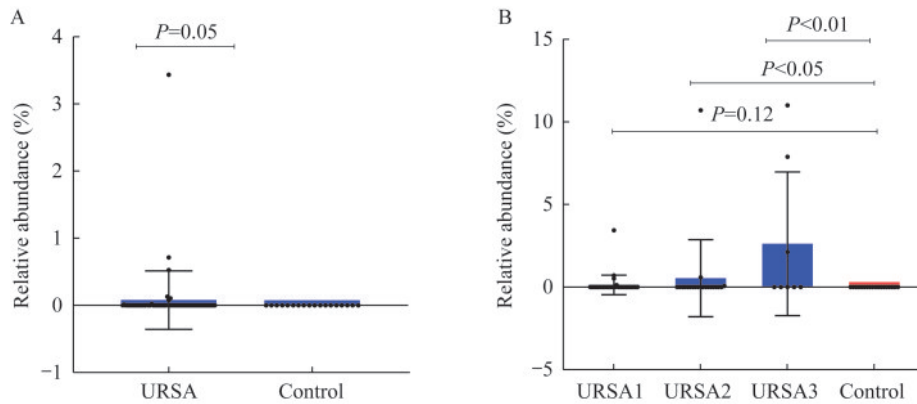
统计学方法 借助 RDP classifier 软件运用贝叶斯算法 (version 2.11) 对 97% 相似水平的操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 代表序列进行物种注释。OTU 是在系统发生学研究或群体遗传学研究中,为了便于分析,人为给某一个分类单元 (品系、种或属分组等) 设置的同一标志,是一个假定的运算分类单元。因 16S rRNA 的保守性,在测序中得到的一条序列就可代表一个物种。要了解群体样本的物种构成就需要对序列进行聚类,

将彼此相似度高的序列分成同一类,一类就是一个 OTU。运用 Wilcoxon 秩和检验分析两组样品的物种是否存在差异。运用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。非配对 *t* 检验用于比较两组独立样本的均值差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Pearson 相关性分析被用于评估流产次数与 URSA 患者阴道 *Sneathia* 相对丰度之间的关联。

结 果

***S.sanguinegens* 与 RSA 密切相关** 本研究共纳入 65 例 URSA 患者,其中 URSA1 组 36 例,URSA2 组 21 例,URSA3 组 8 例,3 组患者中共发现 12 例患者阴道 *Sneathia* 相对丰度明显富集,18 例健康对照中均未发现该菌属 ($P=0.05$)。进一步比较不同流产次数组 *Sneathia* 相对丰度与对照组之间差异发现,流产次数超过 2 次以上组 (URSA2 和 URSA3) 与对照组相比,组间 *Sneathia* 相对丰度的差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。相关性分析显示,阴道的 *Sneathia* 相对丰度与流产次数之间存在显著的正相关 ($r=0.9016$, $P=0.0135$, 图 2)。种水平分析发现,12 例 *Sneathia* 阳性患者全部携带 *S.sanguinegens*,其中 6 例 (50%) 合并携带 *S.amnii*,分布在 URSA2 和 URSA3 组中。流产次数超过 2 次的病例组 (URSA2 和 URSA3) 的阴道 *S.sanguinegens* 相对丰度为 1.098 ± 0.5653 ,*S.amnii* 相对丰度为 0.0197 ± 0.0125 ,与对照组相比,阴道 *S.amnii* 相对丰度的差异无统计学意义 ($P=0.0691$),阴道 *S.sanguinegens* 相对丰度的差异有统计学意义 ($P=0.0339$)。

***S.sanguinegens* 损伤人子宫颈表皮癌细胞 ME-180** *S.sanguinegens* 与 ME-180 共培养后,ME-180 形态发生改变,由梭形或椭圆形变为圆形,细胞黏附力显著下降,细胞间隙增加,菌液浓度越高,细胞形状改变越显著;锥虫蓝染色证实添加 *S.sanguinegens* 后部分细胞出现死亡,添加细菌浓度越高,死亡细胞数目越多。CCK-8 检测细胞活力发现,添加 *S.sanguinegens* 后 ME-180 活力显著下降,添加菌量越多,细胞活力下降越显著。细胞活力检测结果及锥虫蓝染色镜下细胞形态变化提示,*S.sanguinegens* 对 ME-180 具有细胞毒性作用,共培养细菌载量越大,对细胞的损伤越显著 (图 3)。



A: URSA compared with healthy controls; B: URSA with different numbers of abortions compared with healthy controls, URSA 1: 2 miscarriages, URSA 2: 3 miscarriages, URSA 3: ≥ 4 miscarriages.

图1 不同流产次数阴道 *Sneathia* 相对丰度比较

Fig 1 The comparison of the relative abundance of *Sneathia* in different abortion groups

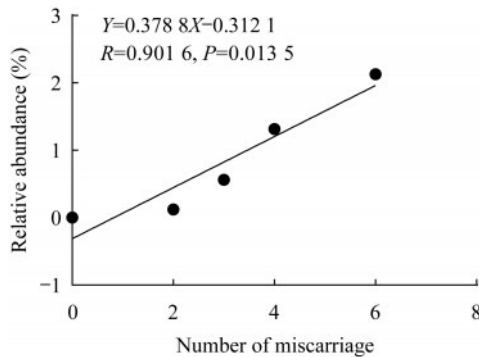


图2 流产次数与患者阴道 *Sneathia* 相对丰度的相关性分析

Fig 2 Correlation analysis between the number of miscarriages and the relative abundance of *Sneathia* in the vaginal flora

S. sanguinegens 损伤 HUVEC 与 *S. sanguinegens* 共培养后 HUVEC 形态发生改变, 细胞间隙变大, 黏附能力下, 部分细胞出现死亡; 随着 *S. sanguinegens* 浓度增加, 死亡细胞数量随之增加。CCK-8 分析结果显示, 添加 *S. sanguinegens* 后, HUVEC 细胞活力显著下降, 菌液浓度越高, 细胞活力下降越显著 (图 4A), 结合图 4B 镜下细胞形态共同提示 *S. sanguinegens* 可损伤 HUVEC, 共培养的细菌载量越大, 细胞损伤越显著 (图 4)。

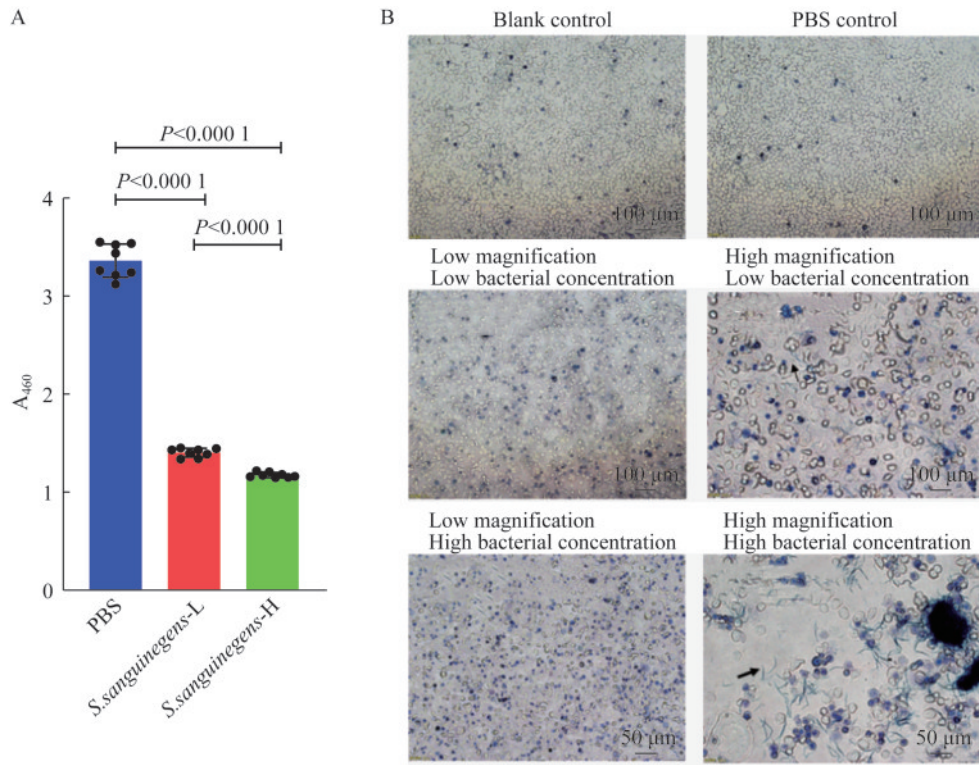
S. sanguinegens 损伤人绒毛膜癌细胞 JEG-3 与 *S. sanguinegens* 共培养后 JEG-3 细胞形态变圆, 细胞间隙变大, 黏附能力下降, 部分细胞出现死亡, 细胞活力显著下降。添加高浓度细菌的 JEG-3 组, 细胞死亡更多, 细胞损伤更显著。结合镜下细胞形态变化结果均提示 *S. sanguinegens* 对 JEG-3 具有细胞毒性作用, 且细胞损伤的严重程度随着共培养菌株浓

度升高而加重 (图 5)。

S. sanguinegens 引发小鼠炎症反应 *S. sanguinegens* 静脉感染小鼠 14 天后, HE 染色发现小鼠脾脏出现髓外造血, 肝、脾、肺及淋巴结均有明显炎症损伤 (图 6)。与对照组小鼠相比, 感染 *S. sanguinegens* 小鼠的肝脏血管充血、淤血, 胞质多呈空泡状 (图 6A 和 6B); 脾脏淋巴细胞数量大面积减少, 可见大量粒细胞呈弥漫性浸润, 红髓内髓外造血细胞大量增多 (图 6C 和 6D); 肺组织支气管腔内多见嗜酸性物, 血管腔内及肺泡腔内均多见纤维蛋白团, 疑似浆液, 呈肺炎急性期表现, 多处肺泡壁明显增厚, 肺泡间距增宽, 伴少量粒细胞浸润 (图 6E 和 6F); 淋巴结皮质与髓质分界不清晰, 淋巴小结体积增大, 淋巴细胞数量增多, 出现炎症反应性增生 (图 6G 和 6H)。

讨 论

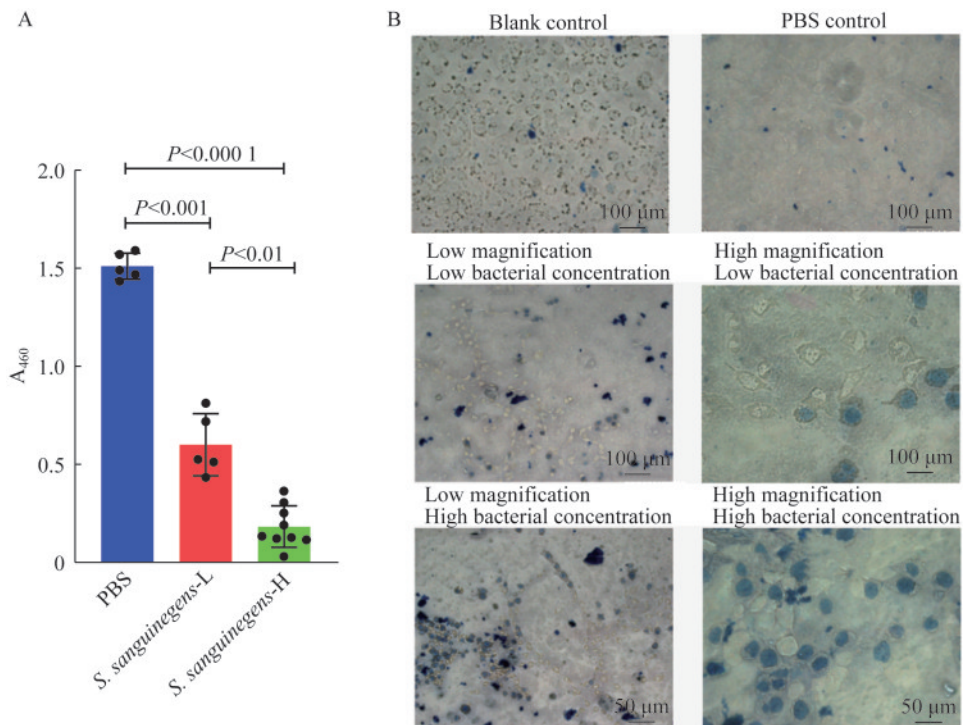
Sneathia 是一种与多种生殖系统疾病及严重产科并发症有关却长期被低估的新兴病原体^[8]。限于苛刻的营养要求及培养条件, 直至分子技术发展和应用才逐步认识其在生殖及围产医学中的地位和作用。两项关于羊膜腔细菌入侵率的研究^[17-18]发现先兆子痫患者中 *Sneathia* 检出率为 50%, 早产患者中检出率为 25%, 提示 *Sneathia* 具有入侵子宫腔和羊膜囊, 从而引起不良妊娠结局的特性。在本研究中, 65 例 URSA 患者中阴道内 *Sneathia* 的检出率达 18.46%, 健康对照组中未检出该菌属。尽管两组间差异 ($P=0.05$) 未达到统计学意义, 仍具有潜在的临床提示意义。随后我们分别比较了不同流产次数



A: Cell viability assessed using the CCK8 assay. B: Trypan blue staining analysis of co-culture outcomes.

图3 *S.sanguinegens*对ME-180的细胞毒性

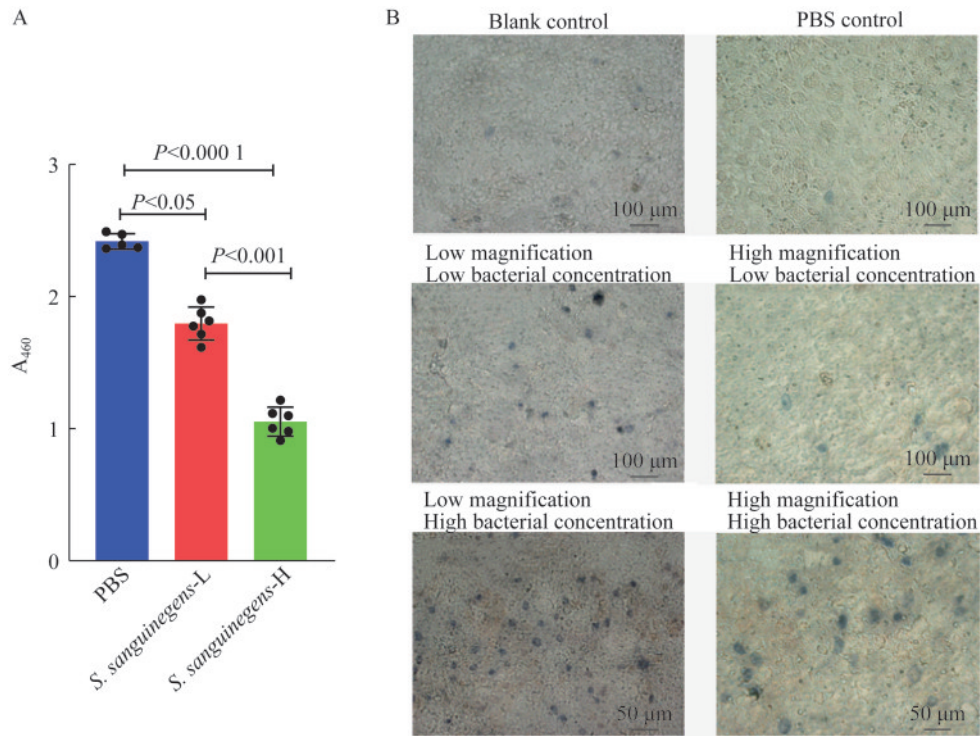
Fig 3 Cytotoxicity of *S.sanguinegens* on ME-180



A: Cell viability assessed using the CCK8 assay. B: Trypan blue staining analysis of co-culture outcomes.

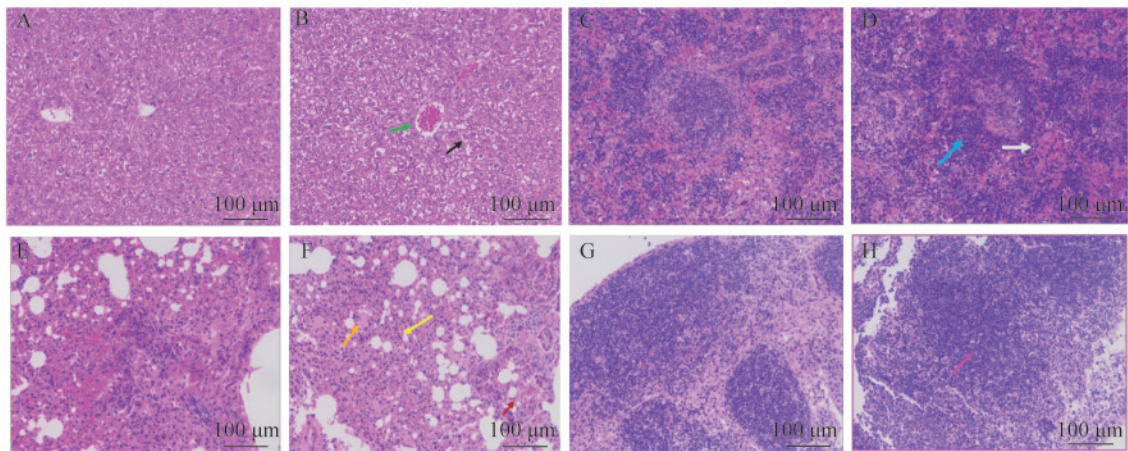
图4 *S.sanguinegens*对和人脐静脉内皮细胞的细胞毒性

Fig 4 Cytotoxicity of *S.sanguinegens* on human umbilical vein endothelial cells



A: Cell viability assessed using the CCK8 assay. B: Trypan blue staining analysis of co-culture outcomes.

图5 *S.sanguineus* 对人绒毛膜滋养细胞 JEG-3 细胞毒性分析
Fig 5 Toxicity of *S.sanguineus* on human placental choriocarcinoma cells (JEG-3)



A: Normal control (liver); B: Infection group (liver). It showed congested blood vessels, and stasis (green arrow), coupled with several instances of cytoplasm presenting as vacuolar (black arrow). C: Normal control (spleen); D: Infection group (spleen). There is a massive reduction in lymphocyte count, with plenty of granular cells diffusely infiltrating, hinting at a strong likelihood of bacterial infection (blue arrow). Both intra- and extra-medullary haematopoietic cell count drastically increase (white arrow). E: Normal control (lung); F: Infection group (lung). Substantial eosinophilic content inside bronchial lumens (orange arrow), fibrin clumps inside vascular and alveolar spaces, reflecting an acute phase of pneumonia (red arrow). Thickened alveolar walls in multiple places and widened alveolar spaces accompany scant infiltration by granular cells (yellow arrow). G: Normal control (lymph node); H: Infection group (lymph node). The border between cortex and medulla blurs, coupled with enlarged lymph nodes and more lymphocytes indicate reactive inflammatory hyperplasia (pink arrow).

图6 *S.sanguineus* 对小鼠不同脏器的毒性
Fig 6 Toxicity of *S.sanguineus* on different organs in mice

组与对照组阴道内 *Sneathia* 相对丰度差异发现,与对照组相比,流产次数超过2次以上的患者在其丰度上的差异有统计学意义($P < 0.05$),相关性分析发现患者阴道 *Sneathia* 相对丰度与流产次数呈正相关($r = 0.9016, P = 0.0135$)。种水平分析显示,12例阳性病例中发现 *S.sanguinegens* 阳性的患者比例为100%,*S.amnii* 为50%。流产次数大于2次的疾病组与对照组相比,组间 *S.sanguinegens* 相对丰度有显著差异($P = 0.0339$),而组间 *S.amnii* 无统计学差异。相较于对照组,我们在URSA患者的样本中发现巨球藻菌属(*Megasphaera*)的相对丰度显著上升,这一发现与我们之前利用16S rRNA测序技术探究RSA人群阴道菌群特征所获得的结果相一致^[13]。巨球藻菌属是否参与RSA病因,目前尚缺乏实验依据,本研究检测到的巨球藻属在现有数据库信息无法对其定位至种水平,该菌属与RSA的关系有待日后数据库扩充后将其定位至种水平再加以深入研究。

Harwich等^[9]对因体检、怀孕、性传播疾病筛查及阴道分泌物检查等原因来门诊的736名女性的阴道分泌物标本进行16S rRNA基因测序发现,*Sneathia* 阳性率为43.3%,其中 *S.amnii* 占76.3%,*S.sanguinegens* 占17.8%,其余为未分类 *Sneathia*。本研究RSA患者中 *S.sanguinegens* 及 *S.amnii* 的阳性率不同于Harwich等^[9]的研究,本研究发现RSA患者中阴道 *S.sanguinegens* 检出率更高^[9],推测可能是因两者研究对象及地区存在差异^[9]。Seo等^[19]运用测序技术在韩国女性中比较了36例从未发生流产者、23例发生自然流产者及88例人工流产者的宫颈菌群发现,自然流产组中 *S.sanguinegens* 阳性率显著高于非流产组,与本研究结果相近。本研究首次发现,随着流产次数增多,RSA病例中 *Sneathia* 阳性检出率随之增加,*Sneathia* 相对丰度不断升高,与健康对照之间的差异也逐步上升至有统计学意义的水平。由此推测,*S.sanguinegens* 可能是引起URSA重要的病原菌之一,尤其是细菌载量高的备孕女性更值得关注。

迄今经培养方法成功分离 *Sneathia* 的报道很少,对其致病机制知之甚少^[8]。近年来已有学者对 *S.amnii* 致病机制展开研究^[14-16],但至今未见 *S.sanguinegens* 致病机制相关报道。我们对 *S.sanguinegens* 致病机制做初步探讨:在细胞水平发

现,*S.sanguinegens* 与ME-180共培养后ME-180细胞形态发生变化,细胞间连接消失,黏附能力下降,细胞活性明显受抑制,与Harwich等^[9]有关 *S.amnii* 的研究结果一致;我们的研究结果还发现,随着细菌浓度的增加细胞损伤更加明显,对细胞活性的抑制作用更加显著。*S.amnii* 可附着在ME-180中,Harwich等^[9]对 *S.amnii* 全基因组注释分析发现其具有与宿主组织和细胞黏附有关的Hia家族细胞表面蛋白同源物和一些含有YadA结构域的蛋白,另外还编码一种假定的纤维连接素结合蛋白,这些蛋白可能在菌株黏附宿主组织中发挥作用^[9]。*S.sanguinegens* 发挥黏附作用的具体机制还需要后续深入研究加以阐述。

既往研究证实 *Sneathia* 是羊水最常见的菌属之一^[11-12],提示其具有入侵孕妇羊膜腔的能力,基于此假设Gentile等^[15]对 *S.amnii* 的致病机制进行了更为深入的研究,发现 *S.amnii* 对人原代羊膜上皮细胞及JEG-3均有毒性作用,*S.amnii* 能穿透绒毛膜组织对母体侧和胎儿侧绒毛膜滋养层造成损伤。进一步研究发现 *S.amnii* 表达一种新型细胞毒性蛋白CptA,该蛋白相对分子质量约226000,由2130个氨基酸组成,属Vb型双伴侣分泌系统效应分子,而双伴侣分泌系统是革兰氏阴性菌分泌溶血素及其他毒力因子的分泌系统^[20],该蛋白是目前 *S.amnii* 唯一被鉴定的毒力因子^[16]。它具有成孔特性可渗透绒毛膜滋养层细胞,破坏胎膜细胞,而抗CptA血清可阻断该菌的细胞毒性作用^[16],该项研究是全球首次有关 *S.amnii* 致病机制的报道。*S.amnii* 可能借助上述分子机制通过对局部组织的黏附,突破组织和细胞屏障由下生殖道进入胎膜、羊水和胎盘而引发不良妊娠结局。本研究发现,*S.sanguinegens* 同样可以损伤JEG-3,其对细胞的损伤程度随着细菌浓度增高而增加。此外,我们还发现 *S.sanguinegens* 对HUVEC也产生细胞毒性,细胞损伤的程度与共培养的 *S.sanguinegens* 浓度呈正相关。进一步比较 *S.sanguinegens* 与 *S.amnii* 全基因组及氨基酸序列,*S.sanguinegens* 基因组中未发现CptA同源序列,因此我们推测,*S.sanguinegens* 可能表达一种不同于CptA的新型毒性蛋白来发挥细胞毒性作用。在动物水平的研究中发现,*S.sanguinegens* 感染小鼠后可引起小鼠多个脏器出现炎症反应,提示该菌可造成小鼠机体出现感染症状,脾脏出现髓外造血现象,

提示该菌感染后可能导致小鼠贫血症状,具体机制有待后续研究。

本研究结果提示流产次数越多的患者阴道检出 *S.sanguinegens* 相对丰度越高,尤其是流产4次及以上的患者阴道 *S.sanguinegens* 相对丰度显著富集,可能由于 *S.sanguinegens* 丰度增加有助于生物膜的形成和/或进一步扩散至宫颈管,而其携带的毒力因子破坏宫颈上皮辅助菌体上行,通过不同于 CptA 的新型毒性蛋白促进 JEG-3 及 HUVEC 突破胎盘屏障,并在羊膜腔内扩散,亦或类似单核李斯特菌通过细菌表面蛋白 InlA 及滋养细胞配体钙黏蛋白 E-cadherin 在绒毛滋养层屏障中的相互作用,使菌体靶向穿过胎盘绒毛滋养层屏障,引发羊膜内感染,从而造成 RSA 等不良妊娠结局^[8,21],这一假设有待后续研究证实。未来我们将对阴道内携带高载量 *S.sanguinegens* 的 RSA 患者的妊娠期羊水中菌群进行追踪分析,另一方面对 *S.sanguinegens* 的生物学特性及毒力进行深度分析,在绒毛膜组织、细胞及分子水平筛选出新型毒力蛋白进行深度研究^[15-16],进一步解析 *S.sanguinegens* 介导 RSA 的分子机制。

作者贡献声明 赵付菊 实验设计和实施,数据整理和分析,论文撰写和修订。胡贤洋 实验实施,数据统计和分析。刘璐,黄茜茜 动物实验实施。王菲菲 实验实施。高晶 实验指导。杜美蓉 实验设计,标本收集。应春妹 实验设计和指导,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 谢幸,孔北华,段涛,等.妇产科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018.
- [2] 自然流产诊治中国专家共识编写组.自然流产诊治中国专家共识(2020年版)[J].中国实用妇产科与产科杂志,2020,36(11):1082-1090.
- [3] DIMITRIADIS E, MENKHORST E, SAITO S, et al. Recurrent pregnancy loss[J].*Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1):98.
- [4] QUENBY S, GALLOS ID, DHILLON-SMITH RK, et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss[J].*Lancet*, 2021, 397(10285):1658-67.
- [5] BENDER ATIK R, CHRISTIANSEN OB, ELSON J, et al.ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss[J].*Hum Reprod Open*, 2018, 2018(2):hoy004.
- [6] PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion[J].*Fertil Steril*, 2012, 98(5):1103-1111.
- [7] COOMARASAMY A, DHILLON-SMITH RK, PAPADOPOULOU A, et al. Recurrent miscarriage: evidence to accelerate action[J].*Lancet*, 2021, 397(10285):1675-1682.
- [8] THEIS KR, FLOROVA V, ROMERO R, et al.*Sneathia*: an emerging pathogen in female reproductive disease and adverse perinatal outcomes[J].*Crit Rev Microbiol*, 2021, 47(4):517-542.
- [9] HARWICH MD JR, SERRANO MG, FETTWEIS JM, et al. Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp.nov[J].*BMC Genomics*, 2012, 13Suppl 8 (Suppl 8):S4.
- [10] COLLINS MD, HOYLES L, TORNQVIST E, et al. Characterization of some strains from human clinical sources which resemble "*Leptotrichia sanguinegens*": description of *Sneathia sanguinegens* sp.nov., gen.nov[J].*Syst Appl Microbiol*, 2001, 24(3):358-361.
- [11] FETTWEIS JM, SERRANO MG, BROOKS JP, et al. The vaginal microbiome and preterm birth[J].*Nat Med*, 2019, 25(6):1012-1021.
- [12] HAN YW, SHEN T, CHUNG P, et al. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth[J].*J Clin Microbiol*, 2009, 47(1):38-47.
- [13] ZHAO F, CHEN Y, GAO J, et al. Characterization of vaginal microbiota in women with recurrent spontaneous abortion that can be modified by drug treatment[J].*Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:680643.
- [14] MCCOY ZT, SERRANO MG, EDUPUGANTI L, et al. Antibody response to the *Sneathia vaginalis* cytopathogenic toxin A during pregnancy[J].*Immunohorizons*, 2024, 8(1):114-121.
- [15] GENTILE GL, RUPERT AS, CARRASCO LI, et al. Identification of a cytopathogenic toxin from *Sneathia amnii* [J].*J Bacteriol*, 2020, 202(13), e00162-20.
- [16] O'BRIEN CK, RASKIN JR, AMANKWA ASARE I, et al. Identification of the pore-forming and binding domains of the *Sneathia vaginalis* cytopathogenic toxin A [J].*PLoS One*, 2023, 18(5):e0284349.