

生殖系疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002246

复发性流产患者阴道微生物宏基因组分析

范涛¹, 吴巧珠¹, 何春容¹, 郭晓丹¹, 骆斯莹¹, 秦爽², 胡晓榕¹, 肖青¹

(1. 中山大学第八附属医院妇产科, 深圳 518033; 2. 广州市妇女儿童医疗中心妇产科, 广州 510623)

【摘要】目的: 研究和分析复发性流产患者阴道菌群微生物多样性差异、种类差异及功能分析, 初步阐释阴道微生态在复发性流产发生发展过程中起到的作用。**方法:** 选取 2010 年 1 月至 2016 年 12 月纳入中山大学第八附属医院妇产科的复发性流产患者 21 例, 正常妊娠人工流产 20 例作为本课题的研究对象, 2 组在怀孕时间上不存在统计学差异 ($P>0.05$); 同时收集整理各种临床诊疗数据。术前常规进行病史采集并取阴道分泌物, 利用宏基因组测序分析微生物类型及微生物基因组数据, 明确差异性及其功能性。**结果:** 临床数据显示复发性流产患者阴道炎症发生率高于正常妊娠人群; 复发性流产患者阴道微生物多样性明显高于正常妊娠人群, 微生物基因丰度低于正常妊娠人群。通过差异性物种鉴定分析, 挑选得到上百种差异性微生物, 结合样本实际情况及统计学要求, 选取 16 种差异性微生物, 其中 5 种菌株在正常妊娠人群阴道中没有发现, 而在复发性流产患者阴道中明显存在且丰度较高; 8 种菌株在正常妊娠人群中存在且丰度较高, 但在复发性流产患者阴道中没有检测到; 3 种菌株丰度差异较大。这些差异性微生物的功能富集分析显示差异性菌群在分子功能、生物过程、细胞组成存在统计学差异, 具体体现在氨基酸代谢、糖代谢、能量代谢、核苷酸代谢、脂代谢等代谢过程, 尤其是各种氨基酸代谢与能量代谢。此外, 本研究还发现代谢功能异常的影响还会引起阴道内部细胞信号转导异常, 引起内分泌与代谢疾病心血管疾病的风险。**结论:** 复发性流产患者免疫低下可能与阴道微生态紊乱引起的阴道炎症有关, 除不同种的乳酸菌互换外, 加德纳菌、普氏菌等新菌种可能也在复发性流产的发生发展过程中起到了重要作用。

【关键词】 复发性流产; 阴道微生物; 微生物宏基因组; 炎症**【中图分类号】** R711.73**【文献标志码】** A**【收稿日期】** 2019-01-09

Metagenomic analysis of vaginal flora in patients with recurrent spontaneous abortion

Fan Tao¹, Wu Qiaozhu¹, He Chunrong¹, Guo Xiaodan¹, Luo Siying¹, Qin Shuang², Hu Xiaorong¹, Xiao Qing¹

(1. Department of Obstetrics, The Eighth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University; 2. Department of Obstetrics, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University)

【Abstract】Objective: To study and analyze the differences in microbial diversity and species differences of vaginal flora caused by recurrent spontaneous abortion, and to preliminarily explain the role of vaginal microecology in the development of recurrent spontaneous abortion. **Methods:** 21 patients with recurrent spontaneous abortion admitted to our hospital from January 2010 to December 2016 and 20 cases of induced abortion to normal pregnancy were selected as subjects in this study. There was no significant difference in pregnancy time between the two groups ($P>0.05$), and various data for clinical diagnosis and treatment were collected at the same time. After the routine collection of medical history, vaginal secretions were collected. Metagenomic sequencing was used to analyze microbial types and microbial genomic data of the secretions, so as to clarify differences and functionality. **Results:** Clinical data showed that the incidence of vaginal inflammation in patients with recurrent spontaneous abortion was higher than that in normal pregnancy. The vaginal microbial diversity of patients with recurrent spontaneous abortion was significantly higher than that of normal pregnancy, and the microbial gene abundance was lower than that of normal pregnancy. Through differential species identification analysis, hundreds of different differential microorganisms were selected, and 16 different micro-organisms were selected according to

statistical requirements and the actual conditions of the samples. Five of the strains were not found in the vagina of normal pregnant people, but clearly present in the vagina of patients with recurrent spontaneous abortion and had a high abundance; 8 strains were present in the vagina of normal pregnant people and had a high abundance, but were not detected in the

作者介绍: 范涛, Email: tao136tao@163.com,

研究方向: 复发性流产机制的研究和治疗探讨。

通信作者: 肖青, Email: 18922382088@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (编号: 2015A030313689)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190903.1438.002.html>

(2019-09-04)

vagina of patients with recurrent spontaneous abortion; the other three strains had large differences in abundance. The functional enrichment analysis of these differential microorganisms showed that there are statistical differences in molecular function, biological processes and cell composition among them, which were reflected in metabolic processes such as amino acid metabolism, glucose metabolism, energy metabolism, nucleotide metabolism and lipid metabolism, and various amino acid metabolism and energy metabolism in particular. In addition, we also found that the influence of metabolic dysfunction can also cause abnormal vaginal internal cell signal transduction, endocrine and metabolic disease, causing cardiovascular disease in endocrine and metabolic diseases in return. **Conclusion:** The low immunity of patients with recurrent spontaneous abortion may be associated with vaginal inflammation caused by vaginal microecological disorders. In addition to the exchange of different types of lactic acid bacteria, new strains such as *Gardnerella* and *Plasmodium* may also play an important role in the occurrence and development of recurrent spontaneous abortion.

[Key words] recurrent spontaneous abortion; vaginal flora; metagenomics; inflammation

与同一性伴侣自然流产连续发生 2 次或 2 次以上,且妊娠时间在 28 周内停止的现象称为复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)。复发性流产产生的病因非常复杂,与遗传素、人为及外界环境等因素均有关系,给家庭和社会带来了极大的影响^[1-3]。近年来,在中山大学附属第八医院、广州市妇女儿童医疗中心妇产科每年复发性流产患者统计中,发现复发性流产的患者人数不断增加。在长期临床工作统计,也发现复发性流产患者在流产后出现反复阴道感染(检测阴道炎)的比例达 3.03% (对 4 188 例复发性流产阴道炎检测指标的阳性率进行统计)。阴道微生态是一个非常灵敏的系统,在受到内源性和外源性因素影响时,很容易发生改变,继而导致疾病发生^[4-5]。子宫内部的感染通常被认为与下行生殖道微生物进入子宫内部有关,感染后诱发局部炎症反应导致过度的免疫应答对滋养层细胞进行入侵,引发反复流产^[6]。近年来研究表明,检测阴道微生态有助于妇科疾病的诊断^[7-8],但是阴道微生态菌群紊乱与复发性流产的临床诊断和治疗之间的相关性鲜有报道。为此,本研究通过宏基因组检测分析探究了复发性流产患者与正常妊娠人群对比阴道微生物的差异,结合临床诊断与检测数据进行了分析,以期复发性流产的诊治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象及样本采集

选取 2010 年 1 月至 2016 年 12 月纳入中山大学第八附属医院妇产科的不明原因复发性流产患者 21 例,正常妊娠人工流产 20 例作为本课题的研究对象。复发性流产组纳入标准:①乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HbsAg)、

丙肝病毒(hepatitis C surface antigen, HCV)、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)、人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)等检测无异常;②无内科合并症、血型抗体滴度正常、抗精子抗体、抗心磷脂抗体、抗子宫内膜抗体阴性;③既往夫妻双方染色体数目及结构检查正常,流产绒毛染色体检查正常;④既往 2 次及 2 次以上自然流产,现妊娠、停经时间 < 3 个月,保胎治疗中;⑤自愿加入“广州市妇女儿童医疗中心阴道菌群样本库和患者临床资料库”并签署知情同意书者。正常妊娠人流对照组纳入标准:①HbsAg、HCV、HIV、HPV、HCMV 等检测无异常;②无内科合并症、血型抗体滴度正常、抗精子抗体、抗心磷脂抗体、抗子宫内膜抗体阴性;③既往无自然流产史,现妊娠、停经时间 < 3 个月,无保胎治疗中;④自愿放弃妊娠;⑤自愿加入“广州市妇女儿童医疗中心阴道菌群样本库和患者临床资料库”并签署知情同意书者。用窥阴器张开阴道,用无菌棉拭子从阴道后穹隆处取分泌物,取材后立刻将无菌棉拭子置于保护液中,并保持密闭状态,4~8℃保存。

1.2 研究方法

复发性流产患者术前均进行详细的病史采集,包括基本信息(性别、年龄、职业、学历)、月经情况(规律、周期、痛经)、生育史(自然流产、人工流产、药物流产、引产、异位妊娠、宫内节育器置入)、性生活史(初次性生活年龄、性伴侣个数、性生活频率、性交痛)、宫腔操作史(包括宫腔息肉切除、黏膜下肌瘤切除、诊断性刮宫、子宫内膜活检)、输卵管通液和碘油造影次数、流产时间、流产次数。所有信息录入 ACCESS 数据库,并进行校对处理。将取样的棉拭子于保护液中涮洗,取 1 mL 含有样本的保护液,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清。按照《痕量菌群 DNA 提取试剂盒-I》(LS-R-N-007H-50, 广东南芯医疗科技有限公司,广州,中国)操作说明提取阴道菌群 DNA。提取好的核酸直接交付宏基因组检测公司(北京诺禾致源生物信息科技有限公司,北京,中国)进行检测,检测流程按照其 SOP 流程执行。

1.3 生信分析复发性流产患者阴道菌群微生物宏基因组

16S RNA-宏基因组测序检测全部 41 例患者阴道菌群方法及分析过程。使用 338F、806R 引物并添加样本特异性

Barcode 序列扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 高度可变区约 480 bp, 338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R:5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3' (Barcode 序列未显示)。PCR 试剂盒采用 Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491, NEB) 扩增。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并对目标片段进行切胶回收, 回收采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AP-GX-50G, Axygen)。参照电泳初步定量结果, 将 PCR 扩增回收产物进行荧光定量, 荧光试剂为 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (P11496, Invitrogen™), 定量仪器采用 Microplate reader (BioTek, FLx800)。根据荧光定量结果, 按照每个样本的测序量需求, 对各样本按相应比例进行混合。采用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit (FC-121-4001, Illumina) 制备测序文库。上机测序前, 采用 Agilent High Sensitivity DNA Kit (5067-4626, Agilent) 对文库在 Agilent Bioanalyzer 上进行质检。合格的文库有且只有单一的峰, 且无接头。之后采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (P11496, Invitrogen™) 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统上对文库进行定量, 合格的文库浓度应在 2 nmol/L 以上。将合格的各上机测序文库 (Index 序列不可重复) 梯度稀释后, 根据所需测序量按相应比例混合, 并经 NaOH 变性为单链进行上机测序; 测序试剂采用 MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles) (MS-102-3003, Illumina), 使用 MiSeq 测序仪进行 2 × 300 bp 的双端测序。

全基因组测序—宏基因组测序检测全部 6 例代表性患者样本 (依据 PCoA 分析聚类结果) 阴道菌群方法及分析过程。首先对高通量测序的原始数据根据序列质量进行初步筛查。每个样品的测序数据经过过滤后, 利用软件 SPAdes (v3.11.1)^[3] 的 metaSPAdes 模式进行序列拼接, 拼接结果去除长度小于 500 bp 的 contig 序列。然后对拼接序列进行常规

统计评估, 并利用软件 bowtie2 重新将 reads 与拼接后的序列进行匹配。通过 Prokka (metagenome 模式 version 1.14-dev, 默认参数)^[4] 对拼接结果进行基因预测, 得到各个样品的氨基酸序列及 CDS 序列。在同一环境中的很多微生物可能具有同源性非常高的基因, 为了从更加宏观的角度探讨微生物群体的基因功能, 通过 cd-hit (cd-hit-est 模式 version 4.7)^[5] (90% length with 95% identity) 对预测的基因进行聚类, 选取每个分类集中最长的作为代表序列构建非冗余基因集, 同时统计不同样品间的非冗余基因集的多样性。将非冗余基因集作为参考序列, 通过 Salmon (version 0.10.2)^[6] 计算每个样本基因的相对丰度信息。利用 MetaPhlAn (version 2.6.0)^[7] 计算工具进行微生物群落的物种丰度分析。通过对过滤后的 reads 与已知的约 17 000 个微生物参考基因组 (约 13 500 种细菌和古生菌, 3 500 种病毒, 110 种真核生物) 的特征标记基因进行比对, 进行物种丰度分析。

2 结果

2.1 研究对象临床信息

对纳入该研究的不明原因复发性流产患者、正常妊娠人工流产者的临床信息进行了统计 (表 1)。2 组研究对象在年龄、体质指数 (body mass index, BMI)、月经周期、妊娠周期、孕次上均无统计学差异, 在产次和流产次数上差异明显, 且正常妊娠人工流产者阴道分泌物常规检测正常、未使用抗菌药和保胎药, 不明原因复发性流产阴道分泌物常规检测出现异常, 有服用抗菌药和保胎药。此外, 纳入的 2 组研究对象均无子宫内炎症、羊膜炎、宫颈炎、尿路感染和其他药物使用情况。

表 1 纳入研究样本的临床信息汇总

	正常妊娠人工流产组 (n=20)	复发性流产组 (n=21)	P 值
年龄 (岁)	31 (23~37)	32 (27~45)	0.50
BMI (kg/m ²)	20.73 (19~22)	20.53 (18.5~22)	0.50
月经周期 (d)	29 (28~31)	29 (28~35)	0.50
妊娠周期 (周)	7 (5~7)	6 (4~14)	0.70
孕次 (次)	3 (1~6)	4 (2~8)	0.10
产次 (次)	1 (0~3)	0 (0~1)	<0.01
流产次数 (次)	2 (1~4)	3 (1~7)	<0.01
避孕方法 (%)	避孕套 (70.37) 安全期 (29.63)	避孕套 (0.0) 安全期 (0.0)	1.00
抗菌药使用 (%)	硝呋太尔 (0.0) 凯妮汀 (0.0) 阿奇霉素 (0.0)	硝呋太尔 (83.87) 凯妮汀 (9.68) 阿奇霉素 (6.45)	<0.01
保胎药使用 (%)	黄体酮 (0.0) 低分子肝素 (0.0) 免疫球蛋白 (0.0)	黄体酮 (100.0) 低分子肝素 (100.0) 免疫球蛋白 (100.0)	<0.01
阴道分泌物常规 (%)	菌群失调 (0.0) 细菌性阴道炎 (0.0) 真菌性阴道炎 (0.0) 支原体阳性 (0.0)	菌群失调 (35.48) 细菌性阴道炎 (48.39) 真菌性阴道炎 (9.68) 支原体阳性 (6.45)	<0.01

2.2 阴道微生物宏基因组物种鉴定

每个样品的测序数据进行过滤后,利用软件 SPAdes (v3.11.1)的 metaSPAdes 模式进行序列拼接,拼接结果去除长度小于 500 bp 的 contig 序列。然后对拼接序列进行常规统计评估,并利用软件 bowtie2 重新将 reads 与拼接后的序列进行匹配。通过 Prokka (metagenome 模式 version 1.14-dev, 默认参数)对拼接结果进行基因预测,得到各个样品的氨基酸序列及 CDS 序列。将非冗余基因集作为参考序列,通过 Salmon (version 0.10.2)计算每个样本基因的相对丰度信息,正常妊娠人群及复发性流产患者阴道微生物基因多样性结构如图 1A、B 所示。

利用 MetaPhlAn (version 2.6.0)计算工具进行微生物群落的物种丰度分析。通过对过滤后的 reads 与已知的约 17 000 个微生物参考基因组 (约 13 500 种细菌和古生菌, 3 500 种病毒, 110 种真核生物) 的特征标记基因进行比对,进行物种丰度分析,正常妊娠人群及复发性流产患者阴道微生物多样性结构如图 1C、D 所示。整体来看,复发性流产患者阴道微生物基因多样性低于正常妊娠人群,但微生物多样性有一定的升高,这可能与感染和炎症有关。为明确微生物差异性基因及菌群表达,从对照组与实验组的 PCoA 分析结果中将聚类最好的各自 3 个样本进一步进行宏基因组分析,结果如图 2 所示。

通过曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U test)对 2 组样本平均秩的分析来实现判断两总体的分布是否存在差异,该分析可以对 2 组样品基因、基因对应的物种进行明显性差异分析,结果如图 2 所示。通过差异性物种鉴定分析,挑选得到上百种差异性的微生物,结合样本实际情况及统计学要求,选取 16 种差异性菌株,结果见表 2。其中 5 种菌株 (全部为乳酸菌,包括 *Lactobacillus_crispatus*、*Lactobacillus_sp_7_1_*

47FAA、*Lactobacillus_vaginalis*、*Lactobacillus_jensenii*、*Lactobacillus_phage_Lv_1*)在正常妊娠人群阴道中是没有发现的,而在复发性流产患者阴道中明显存在且丰度较高;8 种菌株 (乳酸菌、普雷沃菌、魏斯菌、链球菌、杆菌等,具体包括 *Lactobacillus_johnsonii*、*Prevotella_bivia*、*Lactobacillus_mucosae*、*Weissella_cibaria*、*Streptococcus_anginosus*、*Streptococcus_pasteurianus*、*Dialister_microaerophilus*、*Ureaplasma_urealyticum*)在正常妊娠人群中存在且丰度较高,但在复发性流产患者阴道中没有检测到;1 株乳酸菌、1 株加德纳菌属在复发性流产患者阴道内丰度明显下降;1 株乳酸菌在复发性流产患者阴道内丰度明显升高。

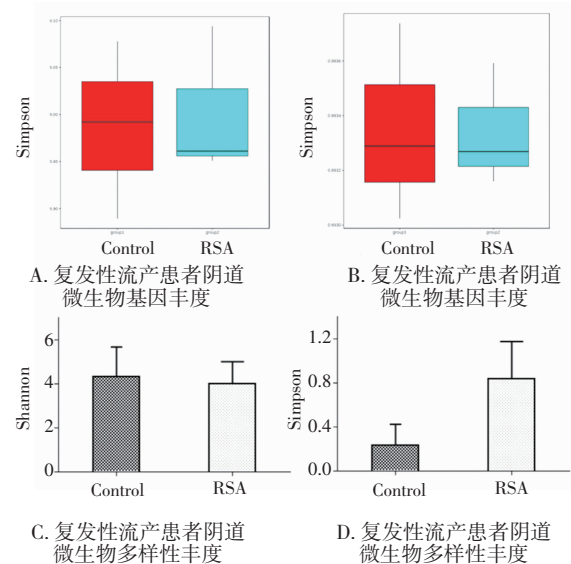
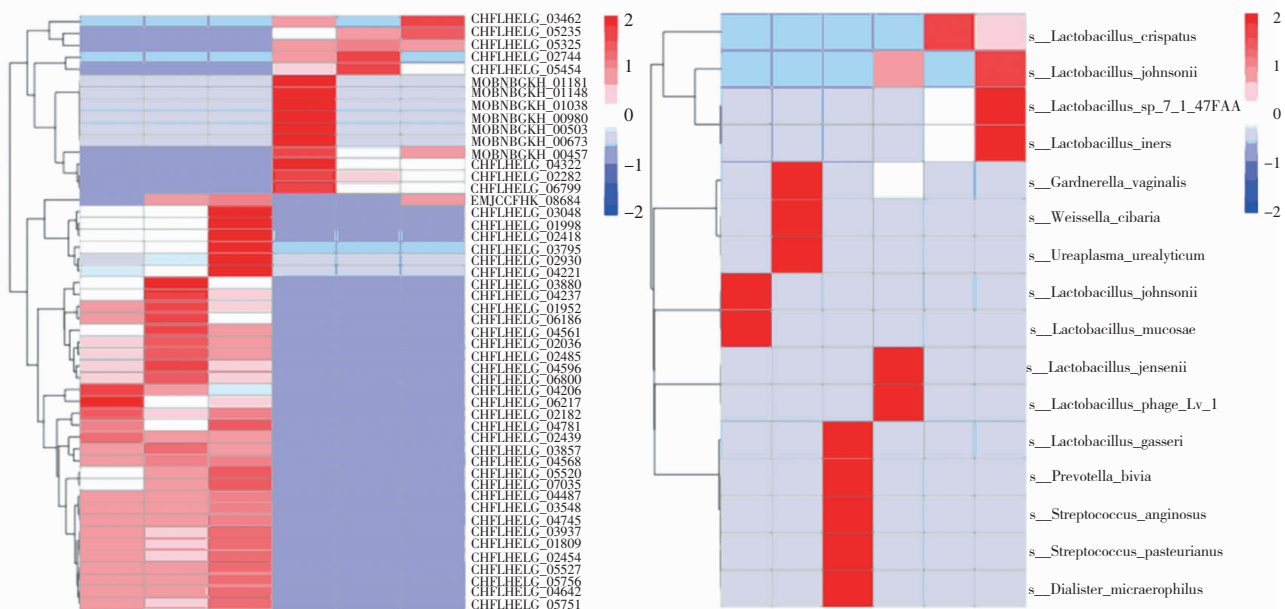


图 1 复发性流产患者阴道微生物基因丰度及种类多样性分析



A. 代表性样本复发性流产患者阴道微生物差异性基因分析

A. 代表性样本复发性流产患者阴道微生物差异性菌群分析

图 2 代表性样本复发性流产患者阴道微生物差异性基因与差异性菌群分析

表 2 复发性流产患者阴道微生物差异性物种统计

差异性菌株名称	对照组占比	复发性流产组 占比
s__Lactobacillus_crispatus	0.000	42.747
s__Lactobacillus_johnsonii	33.249	0.000
s__Lactobacillus_sp_7_1_47FAA	0.000	12.682
s__Lactobacillus_vaginalis	0.000	0.216
s__Lactobacillus_iners	0.041	11.096
s__Prevotella_bivia	0.008	0.000
s__Lactobacillus_jensenii	0.000	2.418
s__Lactobacillus_mucosae	0.112	0.000
s__Weissella_cibaria	0.095	0.000
s__Streptococcus_anginosus	0.170	0.000
s__Streptococcus_pasteurianus	24.079	0.000
s__Dialister_microaerophilus	0.078	0.000
s__Ureaplasma_urealyticum	0.137	0.000
s__Lactobacillus_phage_Lv_1	0.000	27.150
s__Gardnerella_vaginalis	33.192	3.332
s__Lactobacillus_gasseri	8.840	0.359

2.3 差异物种 GO 分析及 Pathway 分析

对复发性流产相对于正常妊娠人群中全部阴道差异性微生物($P<0.05$)进行 GO 分析及 Pathway 分析。分析结果显示,与正常妊娠人群相比,复发性流产患者阴道差异性菌群在分子功能、生物过程、细胞组成存在明显差异,具体体现在小分子代谢功能、分子功能调节、信号转导过程、核酸与转录因子结合等,具体对机体影响较大的功能富集结果如图 3 所示。

选取富集分析系数最高的 30 个 GO term 进行展示,横坐标为富集倍数 $[(m/M)/(n/N)]$;纵坐标为 GO term 具体功能,点的形状对应 GO term 的分类(分子功能、生物过程和细胞组成 3 个部分);颜色对应超几何分布检验的 P 值;大小对应 GO term 包含的差异明显的 NOG 个数。

此外,通过 KEGG 注释(包括 KOs、Enzymes、Modules 及 Pathways 4 个层面对蛋白分子的生物学功能进行标注),本研究对差异性菌群进行了代谢功能分析,结果如图 4 所示。

分析结果显示,复发性流产患者阴道菌群环境对氨基酸代谢、糖代谢、能量代谢、核苷酸代谢、脂代谢、多糖的生物合成与代谢等代谢过程会引起较大影响,尤其是各种氨基酸代谢与能量代谢。此外,本研究还发现代谢功能异常的影响还会引起阴道内部细胞信号转导异常,引起内分泌与代谢疾病、心血管疾病的风险。

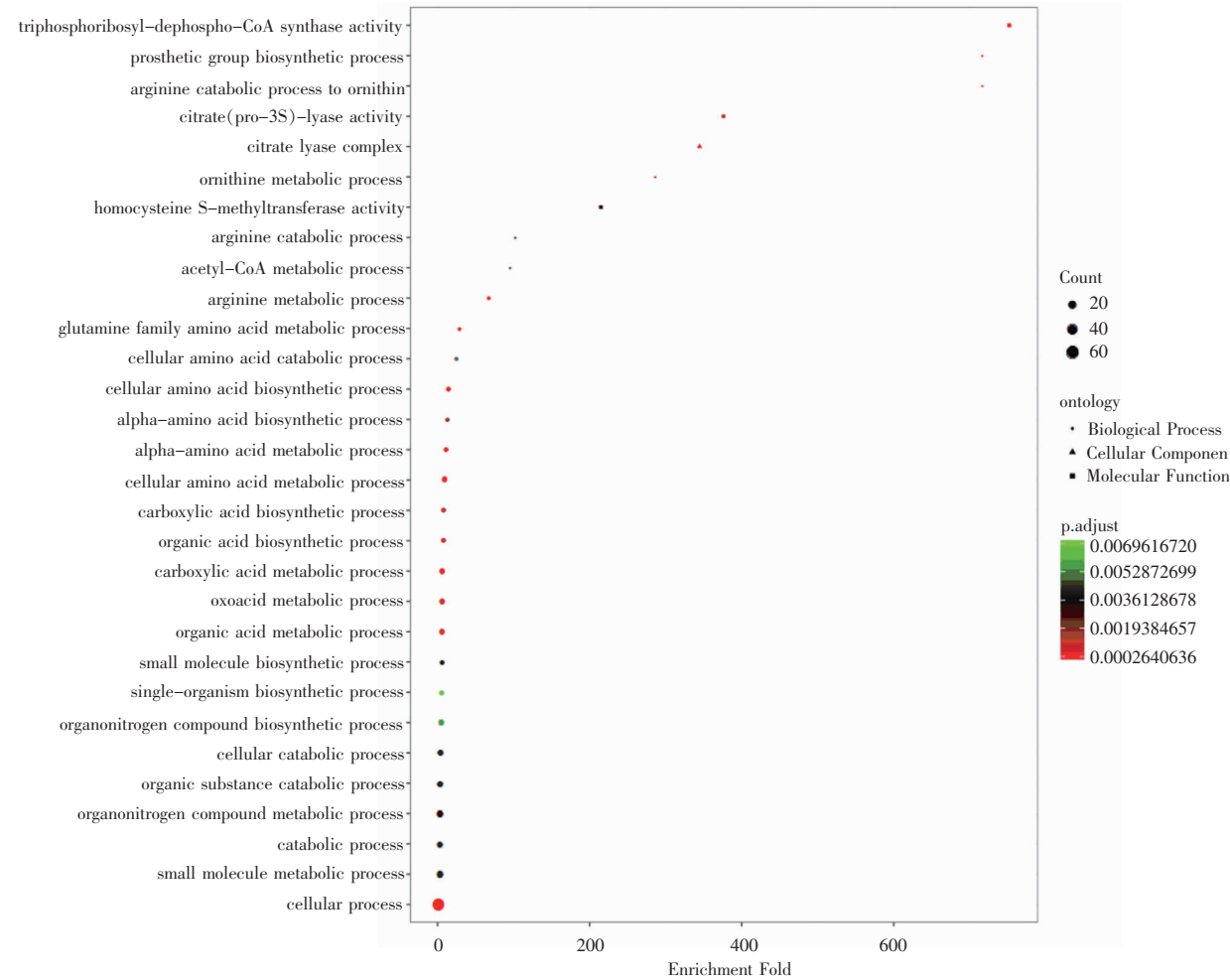
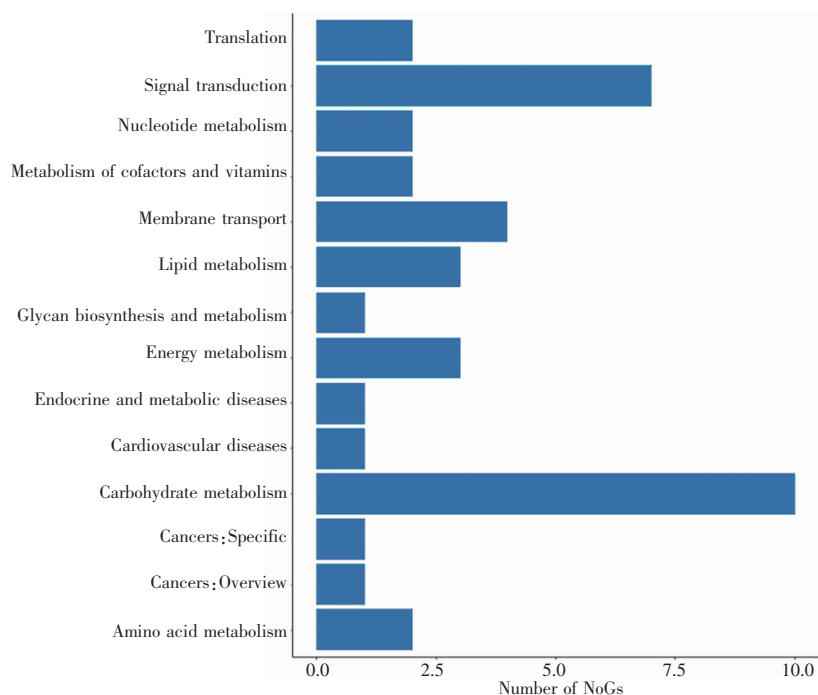


图 3 复发性流产患者阴道菌群差异性物种的富集分析



注: 每个 Pathway 对应图中的每一个 bar, 横坐标表示每个功能分类包含的 KO 个数

图 4 复发性流产患者阴道菌群差异性物种的 KEGG 功能注释及 KEGG 代谢通路富集分析

3 讨论

迄今为止,复发性流产的防治依旧是临床上的一大挑战^[1],潜在对生殖健康的影响,对患者家庭和社会带来了巨大的不稳定性。目前虽然国内外研究对其发病机制的认识已较深入,但因其病因众多、多因素混杂且相互关系较为复杂^[9],临床对此类疾病的诊治仍没有明显改善。严重的是,近年复发性流产发病率有明显增高的趋势(图 5),不明原因的复发性流产病例报告比例越来越高^[3]。因此,明确复发性流产的发病机制、寻找潜在治疗靶点与新型诊断标志物,提出早期诊断、干预的新型治疗方法,对于复发性流产发病率的控制显得尤为重要。因此,明确复发性流产的发病机制、寻找潜在的临床诊断和治疗的新方法,是当前科研工作者的重中之重。

本研究通过对 21 例复发性流产患者及 20 例正常妊娠人群的阴道菌群微生物宏基因组进行检测,分析复发性流产患者阴道菌群微生物多样性差异、种类差异及功能分析,初步阐释阴道微生态在复发性流产发生发展过程中的作用。复发性流产与阴道微生物菌群失衡存在明显的相关性,阴道内的乳酸菌、普雷沃菌、魏斯菌、链球菌、杆菌等均为潜

在的新型复发性流产诊断标记物。研究结果也证实,复发性流产的发病机制可能是患者阴道菌群紊乱导致的,菌群紊乱引起的感染会通过阴道移位到宫内,从而引发感染导致复发性流产。从阴道微生物基因及物种多样性结果中(图 1),发现复发性流产的阴道菌群 Alpha 多样性高于自然妊娠人工流产,而复发性流产的妇女经常都会带有阴道感染性疾病(细菌性阴道病、真菌性阴道病或支原体感染)可能与此结果有关。正如文献对细菌性阴道病的报道,发生此类感染疾病之后,其阴道菌群多样性都会相应上调^[10]。PCoA 分析结果显示,复发性流产患者的阴道菌群和正常妊娠人工流产的阴道菌群明显分开,这就能够说明两者的菌群结构存在明显的区别。

本研究选取了 16 种差异性菌株。其中 5 种菌株(全部为乳酸菌,包括卷 Lactobacillus_crispatus、Lactobacillus_sp_7_1_47FAA、Lactobacillus_vaginalis、Lactobacillus_jensenii、Lactobacillus_phage_Lv_1)在正常妊娠人群阴道中没有发现,而在复发性流产患者阴道中明显存在且丰度较高。白晓燕等^[11]研究发现,乳酸菌对阴道炎患者阴道微环境具有调节作用,具有减轻阴道炎症的作用。乳酸菌是阴道微生态的主要构成类型,可发酵碳水化合物提供各

种营养成分、提高机体免疫力^[12]。然而本研究发现的复发性流产患者阴道中丰度较高的 2 种菌株 (*Lactobacillus_sp_7_1_47FAA*及*Lactobacillus_phage_Lv_1*)未见报道,其存在的作用是对抗复发性流产患者的免疫炎症还是具有致病感染促进炎症的作用,目前还不得而知;而其他 3 种乳酸菌主要为益生菌,可以调节机体免疫。还有 8 种菌株(包括*Lactobacillus_johnsonii*、*Prevotella_bivia*、*Lactobacillus_mucosae*、*Weissella_cibaria*、*Streptococcus_anginosus*、*Streptococcus_pasteurianus*、*Dialister_micraerophilus*、*Ureaplasma_urealyticum*)在正常妊娠人群中存在且丰度较高,但在复发性流产患者阴道中没有检测到,这些菌株分别归属在乳酸菌、普雷沃菌、魏斯菌、链球菌、杆菌等,既有感染性致病作用也有抑制炎症的作用。此外,还有 1 株乳酸菌(*Lactobacillus_gasseri*)、1 株加德纳菌属(*Gardnerella_vaginalis*)在复发性流产患者阴道内丰度明显下降;1 株乳酸菌(*Lactobacillus_iners*)在复发性流产患者阴道内丰度明显升高。其中 *Lactobacillus_gasseri* 是一种已见报道的益生菌,可平衡免疫、抑制过敏的发生^[13]; *Lactobacillus_iners* 为一种嗜性乳酸菌, *Gardnerella_vaginalis* 与乳酸菌的比例异常往往会成为引起阴道炎症的罪魁祸首^[14]。

进一步分析复发性流产与正常妊娠人群差异性微生物潜在的功能及其对机体代谢通路的影响。结果显示差异性菌群在分子功能、生物过程、细胞组成上存在明显差异,具体体现在氨基酸代谢、糖代谢、能量代谢、核苷酸代谢、脂代谢、多糖的生物合成与代谢等代谢过程,尤其是各种氨基酸代谢与能量代谢。这些结果不仅为复发性流产的诊治提供了新的研究方向和思路,更为此类疾病新的辅助治疗与预防提供了一定借鉴意义,尤其是氨基酸^[15]与糖代谢^[16]的发现。

阴道菌群的异常表达可能成为各种妇产科疾病的一个新靶点,对进一步推进复发性流产的早期诊断和治疗提供重要的理论指导意义。诚然,本研究也有一些不足和限制,需要进一步完善。例如本文发现的 16 种差异性阴道菌群究竟如何导致阴道与宫内感染;又是如何影响、调控相关免疫因子的;菌群是否移位到宫内发生感染或者免疫调节的等,这些问题均待进一步研究与解答。总之,本研究结果为不明原因的复发性流产的诊断、预防及治疗提

供了一个新的研究视角,有望为疾病的预防和治疗提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion[J]. Arch Gynecol Obstet, 2005, 272: 95–108.
- [2] Baek KH, Lee EJ, Kim YS. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms[J]. Trends Mol Med, 2007, 13: 310–317.
- [3] Daher S, Mattar R, Gueuvoghlianian-Silva BY, et al. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67(4): 341–347.
- [4] 秦 勤, 常淑芳, 孙江川, 等. 宫颈上皮内瘤变患者 HPV 感染与阴道微生态关系研究[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(5): 587–590.
- [5] 龙 馨, 周德平, 王 彬, 等. 下生殖道多中心上皮内瘤变 53 例阴道镜诊断分析[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(12): 1662–1665.
- [6] Makrigiannakis A, Karamouti M, Drakakis P, et al. Feto maternal immunotolerance[J]. Am J Reprod Immunol, 2008, 60(6): 482–496.
- [7] 张雪芳, 何 鑫, 黄文阳, 等. 中国女性宫颈高危型 HPV 感染与阴道微生态关系的 Meta 分析[J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(6): 841–848.
- [8] 段文冰, 王子娥, 鞠 瑛, 等. 不同生理阶段女性阴道微生态状况分析[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(10): 1211–1216.
- [9] Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage[J]. N Engl J Med, 2010, 363(18): 1740–1747.
- [10] Ling ZX, Kong JM, Liu F. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis[J]. BMC Genomics 2010(11): 488.
- [11] 白晓燕, 张志坚, 尹倩倩. 乳酸菌对阴道炎症患者阴道微环境的调节作用[J]. 中外女性健康研究, 2018, 26(22): 103–104.
- [12] 王亚琴. 不同给药方案对阴道炎症患者阴道乳酸菌恢复及复发率的影响[J]. 北方药学, 2018, 15(5): 71.
- [13] Bagad M, Pande R, Dubey V, et al. Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2017, 7(10): 921–929.
- [14] 刁玉涛. 菌群构成与细菌性阴道病的相关性研究[D]. 青岛: 山东大学, 2011.
- [15] 许 红, 韩彦洁, 张 瑶, 等. LC-MS/MS 法在不明原因复发性流产患者血清 10 种氨基酸水平检测中的应用[J]. 山东医药, 2017, 57(44): 18–21.
- [16] 谢秋娟, 洪 宇, 陈婵玉, 等. 糖代谢正常的复发性流产患者妊娠早期的胰岛素抵抗水平[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(11): 1093–1096.

(责任编辑: 张辉洁)