

## 线粒体的功能及其在生殖中的作用

王雪莹 谢聪聪 姚冠峰 郭晓丽 综述 刘效群\* 审校

河北省计划生育科学技术研究院(石家庄,050071)

**摘 要** 线粒体是卵母细胞的质量标志之一,其数量和功能异常将降低卵母细胞及胚胎的质量。本文就线粒体在卵母细胞中的生物学作用及线粒体功能在生殖中的作用,探讨线粒体移植对改善卵巢储备功能减退患者的临床价值。

**关键词** 生殖;线粒体;卵母细胞;线粒体移植

### The function of mitochondrial and its role in reproduction

WANG Xueying, XIE Congcong, YAO Guanfeng, GUO Xiaoli, LIU Xiaoqun

Research Institute of Family Planning of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei Province, 050071

**Abstract** Mitochondrion is a critical indicator of oocyte quality. The abnormal quantity and function of mitochondrial will lead to the low quality of oocytes or embryos. In this review, we will discuss the biological role of mitochondria of oocyte and its function in reproduction, and will study the clinical value of mitochondrial transplantation for improving ovarian reserve function.

**Key words** Reproduction; Mitochondria; Oocyte; Mitochondrial transplantation

线粒体位于真核生物细胞胞质内,是有氧呼吸及产生 ATP 的主要场所,被称为细胞的核电站,同时会产生一定数量的活性氧(ROS)。线粒体受损时,释放大量的 ROS 和细胞凋亡因子,从而导致细胞凋亡。因此,线粒体损伤是细胞凋亡和坏死的重要途径<sup>[1]</sup>。线粒体是一种半自助性的细胞器,具有自己的遗传物质线粒体 DNA(mtDNA),能独立复制、转录和翻译 13 种线粒体蛋白,其余必要的蛋白质需要细胞核 DNA 编码。线粒体是母系遗传,子代的 mtDNA 大部分来源于母亲,因此,可利用母亲的线粒体方法追踪家族谱系。对于 mtDNA 基因突变的患者,可用捐赠者正常的 mtDNA 替换有缺陷的 mtDNA,此技术已应用在辅助生殖技术中<sup>[2]</sup>。

### 1 线粒体的功能

#### 1.1 氧化磷酸化

线粒体是细胞进行氧化磷酸化和合成 ATP 的主要场所,也是糖类、脂质和氨基酸等物质最终氧化

释能的场所。糖类和脂肪等营养物质在细胞质中通过降解产生丙酮酸和脂肪酸,在氧化磷酸过程中这些物质进入线粒体基质,经过一系列分解代谢形成乙酰辅酶 A,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和黄素腺嘌呤二核苷酸递氢体(FADH<sub>2</sub>)脱氢,经线粒体内膜的呼吸链逐级传递,最终传递给氧。在氧化磷酸化过程中,会生成少量 ROS,但在线粒体内源性抗氧化机制下可以抵消<sup>[3]</sup>。

#### 1.2 内源性抗氧化系统

在氧化磷酸化过程中,电子传递链会产生少量以超氧化物自由基形式存在的 ROS。在电子传递链中,电子流动可以减少超氧离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)。线粒体中的锰超氧化物歧化酶(MnSOD),可以将过氧化氢氧化成低活性过氧化氢。过氧化氢可以发生芬顿反应,产生的羟基自由基(OH<sup>-</sup>)损伤脂质、蛋白质和核酸。存在于线粒体膜间隙的谷胱甘肽(GSH)过氧化物酶可以将过氧化氢转化为水。损伤的线粒体可以增加内源性抗氧化系统的活性。例如,NADH 缺乏会增加 MnSOD 的表达,从而将超氧化物转化为成纤维细胞中的过氧化氢<sup>[4]</sup>。

#### 1.3 钙缓冲

电子跨线粒体内膜转运产生一个负跨膜电势,

为阳离子进入基质提供强大的驱动力,促使内膜上的钙转运蛋白将  $\text{Ca}^{2+}$  移至线粒体内,从而改变胞液  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,这对于  $\text{Ca}^{2+}$  参与细胞内各种信号通路极其重要。研究发现线粒体内膜具有选择性屏障作用,线粒体外膜具有调节  $\text{Ca}^{2+}$  的屏障作用。在正常情况下,细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度为  $0.1\mu\text{M}$ ,细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $1\text{mM}$ ,这种浓度差有利于  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞质<sup>[5]</sup>。线粒体内膜潜在  $-180\text{mV}$  电压,有利于  $\text{Ca}^{2+}$  流入到胞质,直到线粒体基质内的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度比细胞质高  $10^6$  才达到平衡。一旦  $\text{Ca}^{2+}$  进入胞质,就克服了阳离子强大的驱动力。重要的是,  $\text{Ca}^{2+}$  需要不同的新陈代谢酶来激活,例如丙酮酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶。钙离子流入线粒体基质促进新陈代谢,通过与这些代谢酶相互作用加速新陈代谢,增加细胞内 ATP 的产生<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 线粒体功能障碍及其机制

线粒体功能障碍多指因线粒体膜受到破坏,呼吸链受抑制,酶活性降低,mtRNA 的损伤等引起的能量代谢障碍,进而导致一系列相互作用的损伤过程。线粒体功能障碍可使呼吸链酶活性下降,线粒体膜电位降低,ATP 合成减少,细胞内钙稳态破坏,线粒体离子通透性改变,脂肪酸的  $\beta$ -氧化受阻,细胞内脂肪酸蓄积,氧化应激增加,mtDNA 氧化损伤导致线粒体生物合成降低,进一步加重线粒体功能障碍,最终导致细胞凋亡或死亡<sup>[7]</sup>。

线粒体功能障碍与许多疾病相关,例如卵巢储备功能减退、糖尿病、帕金森病、阿尔茨海默症、肿瘤、脂肪肝、肌肉萎缩症、黄斑变性和神经退化及其并发症等。在某些疾病中,mtRNA 基因缺陷会导致线粒体功能紊乱,引起正常的线粒体电子传递链损伤。线粒体功能障碍也涉及许多创伤性的病变,包括心肌梗死、中风、脑外伤和脊椎损伤<sup>[8]</sup>。

## 2 线粒体与生殖

线粒体是母系遗传,因为精子线粒体蛋白泛素化并在进入卵母细胞后通过蛋白酶体和自噬进行降解,但造成这种现象的机制尚不清楚。有学者认为精子线粒体的程序性凋亡是为了保护胚胎免受其携带的异常突变的影响,因为精子发生过程是暴露在高活性氧中。也有可能是精子线粒体的自行退化保护子代免受精子线粒体在进入卵母细胞形成较高水平的异质性<sup>[9]</sup>。

线粒体的数量和活性在哺乳动物胚胎发育过程中与细胞周期不同步,而是随胚胎发育进程而改变,其异常将导致卵子和胚胎质量低下。线粒体在生殖嵴的原始生殖细胞中只有不到 10 个,卵原细胞中达到 200 个,初级卵母细胞约有 6000 个,而在成熟的卵细胞中则增加到 10 万个以上。在胚胎发育过程中,每个胚胎细胞的线粒体数量随着胚胎分裂而减少,但胚胎的线粒体总量保持稳定,直至囊胚期开始增多。排卵前卵母细胞线粒体处于静息状态,形态呈圆形或梨形,几乎没有嵴,基质浓密且内外膜并置;排卵后、卵子受精至囊胚阶段,线粒体伸长,嵴逐渐出现并增多。在多数哺乳动物胚胎着床前线粒体处于静息状态,发育至囊胚阶段其结构完整,功能活跃,并重启复制,为后续胚胎发育提供能量<sup>[10]</sup>。

线粒体在生殖中起着非常重要的作用,大量研究表明,mtDNA 异质性与机体机能减退或衰老以及许多疾病相关。研究表明,小鼠高 mtDNA 异质性水平能够降低雌性个体繁殖水平,导致雌性不育,降低小鼠寿命以及影响其大脑发育,表明高水平 mtDNA 异质性能够减弱机体机能<sup>[11]</sup>。mtDNA 异质性水平随年龄增大而增加,但 mtDNA 突变累积与衰老之间的因果关系尚不明确。诱导 mtDNA 突变的转基因小鼠生育能力严重下降。线粒体异质体会影响人类卵母细胞的生育能力<sup>[12]</sup>。并且线粒体对调节受精过程中的钙振荡起着关键的作用,钙振荡对于胚胎的发育是至关重要的。当线粒体功能受到抑制时,钙振荡模式就会发生改变<sup>[13]</sup>。此外,线粒体功能和 DNA 含量决定了受精的结果。线粒体 DNA 含量也与人类卵母细胞受精有关。在哺乳动物中未受精的卵母细胞具有较低的 mtDNA 拷贝数,而退化的卵母细胞的拷贝数更少。在哺乳动物受精失败的卵母细胞中,mtDNA 的数目较少,这可能提示细胞质成熟障碍<sup>[14]</sup>。

猪卵母细胞中,mtDNA 拷贝数和线粒体活性对孤雌激活起着重要作用;然而,mtDNA 拷贝数似乎对猪卵母细胞成熟并不重要,但线粒体膜缺失会造成卵母细胞成熟障碍<sup>[15]</sup>。在体外受精过程中,mtDNA 拷贝数发生改变会影响胚胎发育,但似乎不影响卵母细胞的成熟。在小鼠中,线粒体活性对于卵母细胞的成熟和后期的胚胎发育非常重要。另一研究表明,小鼠卵母细胞中抑制线粒体氧化磷酸化会严重降低其发育为囊胚的几率<sup>[16]</sup>,也有研究表

明,虽然小鼠的 mtDNA 拷贝数较低,足以支持受精和植入前发育,但胚胎植入后发育潜能不佳<sup>[17]</sup>。在植入后,小鼠胚胎发育所需的线粒体 mtDNA 拷贝数阈值为 40 000~50 000。在人类中,卵母细胞具有高水平的 ATP 与优质胚胎率和种植率有关<sup>[18]</sup>。基于这些研究,可认为卵母细胞成熟需要较多的线粒体,卵母细胞中一定数量的线粒体对于支持胚胎的早期发育是必不可少的。

随着年龄的增加,卵母细胞的质量下降,胚胎非整倍体数量明显增加。研究表明,随着小鼠年龄的增加,卵母细胞产生的 ATP 数量下降,衰老的小鼠和仓鼠的卵母细胞 ATP 和 mtDNA 拷贝数均减少,线粒体的超微结构异常<sup>[19]</sup>。Burgestaller<sup>[20]</sup>检测了 39 个健康母亲的多种线粒体等位基因,发现子代线粒体异质性与母亲妊娠的年龄成正相关,表明随着年龄的增加,卵母细胞 mtDNA 累计的突变量会遗传给子代。

### 3 线粒体移植

线粒体功能障碍与各种生育障碍相关。卵胞质移植技术已应用于胚胎发育不良和胚胎反复种植失败的患者中。1997—2001 年,约有 30 个孩子因此技术出生。因涉及伦理问题,有些国家(美国)禁止此项技术应用于临床,只有印度、新加坡、德国等一些国家允许开展此项技术<sup>[21]</sup>。

#### 3.1 线粒体替代法

随着显微操作技术的不断发展和胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术的广泛应用,线粒体替代法(MRT)为阻断线粒体疾病的子代遗传和改善卵母细胞质量提供了新的手段。

3.1.1 原核移植 原核移植(PNT)是指在患者和供者的 MII 期卵子同时行 ICSI,并在患者和供者同时形成原核时,将患者的双原核取出,转移至去核的供体受精卵中。1980 年初,McGrath 等<sup>[22]</sup>将在小鼠受精卵中应用 PNT 技术,并成功产生后代。1990 年 Ato 等<sup>[23]</sup>首次提出运用 PNT 技术预防 mtDNA 疾病。用异常受精的卵子探索人类受精卵中 PNT 的潜力。此技术上是可行的并且在体外可发育到囊胚。最近研究表明运用 PNT 技术可增加有活力的受精卵数量,受精卵在核转移后线粒体突变残留不到 2%,可有效降低缺陷性线粒体的数量,这远远低于迄今研究疾病的突变阈值<sup>[24]</sup>。因此,PNT 有减

少线粒体疾病发生的潜力,具有临床应用前景。

3.1.2 胞质移植 胞质移植是指行 ICSI 的同时将少量年轻女性卵子的胞质注入高龄不孕女性卵子内,能有效提高其妊娠率。胞质移植技术能提高卵母细胞质量和早期胚胎发育能力,改善反复体外受精失败患者的临床结局。1997 年,胞质移植技术首次应用于大龄不孕患者并获得成功<sup>[25]</sup>。2015 年 Cree 随访 17 例患者中,出现了 2 例特纳综合征和 1 例广泛性发育障碍,认为线粒体的异质性或或许通过表观遗传影响子代性状,或许由操作本身影响染色体的稳定性,给子代带来即时或长期的健康隐患<sup>[24]</sup>。2015 年世界第一例线粒体捐赠的婴儿在英国诞生。

3.1.3 纺锤体移植 目前最有前景的策略是在 MII 阻滞的卵母细胞之间转移核基因组。MII 期卵母细胞染色体不封闭在核膜内,而是在 MII 纺锤体轴上对齐,等待精子穿越透明带,启动 MII 后期。普通显微镜看不到纺锤体或染色体,标准做法是使用液晶双折射观察纺锤体轴。然而,这方法可能导致染色体排列不整齐或分散。尽管这项技术具有挑战性,但已有实验证实恒河猴卵母细胞进行 MII 纺锤体移植(MST)后出生的恒河猴未检测到携带 mtDNA 的突变。后续人类卵母细胞实验表明 MST 会携带少量的 mtDNA 突变,但是 MST 卵母细胞受精会有原核数目异常的高发生率(48%)<sup>[26]</sup>。

#### 3.2 自体生殖细胞线粒体移植

自体生殖细胞线粒体移植(AUGMENT)以自体细胞为材料,减轻了伦理问题且操作简单而备受关注<sup>[27]</sup>。这个替代方法增加了卵母细胞线粒体数量,也可通过去线粒体自溶注入来提高卵母细胞的性能。Tzeng 等<sup>[28]</sup>在 2001 年首次报道,使用患者自体颗粒细胞线粒体移植至卵细胞进行辅助生殖并获得妊娠。孔令红等<sup>[29]</sup>也报道,通过 AUGMENT 已使多例患者获得了临床妊娠并分娩。加拿大 OvaScience 公司分离患者卵巢干细胞并从中提取线粒体进行自体卵细胞移植,成功诞下第一位“干细胞婴儿”。通过行自体线粒体移植,给卵母细胞提供补充了受精和继续发育所需的能量,明显改善胚胎的质量,并提高了妊娠率,是治疗线粒体异常导致的卵巢储备功能减退引起不孕或多次胚胎移植失败患者的有效方法<sup>[15]</sup>。

#### 4 伦理问题

英国已成为世界上第一个正式加入欧盟线粒体捐献的国家。2015年10月在英国人类受精和胚胎学管理局的许可下成立线粒体捐赠机构,这对于有严重线粒体缺陷的家庭生育健康的宝宝提供了极大的帮助。2016年美国专家小组提出要遵守接受线粒体捐赠者只能生育男婴这一准则,从而避免了捐赠的线粒体遗传其后代<sup>[30]</sup>。

捐赠者与接受者的关系存在伦理困境。线粒体携带自身DNA,因此,接受捐赠的孩子,会与三方有基因联系:孩子的父母和捐赠者。目前,已有几例利用卵胞质移植技术的孩子出生。这些人和他们的捐赠者并未试图相互联系。但这些案例的数量较少,不具有完全的说服力。已有接受者表示不会把捐赠者视为第二位母亲。事实上,线粒体捐赠者的DNA占比仅为0.1%,不考虑捐赠者为第二位母亲是合理的。参考器官捐献的经验,孩子和捐赠者可能会在未来产生联系对方的想法。因此需要在法律层面规范线粒体捐赠技术,以保证相关信息的保密性和联系方式的可及性。

线粒体自体移植则可降低组织mtDNA突变的风险,并且技术不涉及伦理问题,但这对于生物技术是一项巨大的挑战,需要进一步的复杂实验和使用动物模型来慢慢地建立发展起来<sup>[31]</sup>。

综上所述,线粒体作为重要的能量代谢细胞器,对卵细胞成熟、受精及胚胎着床前发育都具有重要作用。应用现有的细胞生物学及分子遗传学手段,找出合适的线粒体来源供体,结合卵胞质内单精子注射,对低质量卵细胞进行有效线粒体移植,可以明显改善卵细胞的质量和胚胎发育潜能,从而开启因卵巢储备功能减退而难以生育的治疗新篇章。

#### 参考文献

[1] Cano Sanchez M, Lancel S, Boulanger E, et al. Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review[J]. Antioxidants (Basel), 2018,7(8):98-112.

[2] Gollihue JL, Rabchevsky AG. Prospects for therapeutic mitochondrial transplantation[J]. Mitochondrion, 2017,35(5):70-79.

[3] Zhao T, Hao Y, Kaplan JM, Axonal Mitochondria Modulate Neuropeptide Secretion Through the Hypoxic Stress Response

in *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 2018, 210(1):275-285.

- [4] Korge P, Calmettes G, Weiss JN. Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases[J]. Biochim Biophys Acta, 2015,1847(6-7):514-525.
- [5] Bianchi K, Rimessi A, Prandini A, et al. Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship [J]. Biochim Biophys Acta, 2004,1742(1-3):119-131.
- [6] Pathak T, Trebak M. Mitochondrial  $Ca^{2+}$  signaling[J]. Pharmacol Ther, 2018, 192(18):112-123.
- [7] Keshavan N, Rahman S. Natural history of mitochondrial disorders: a systematic review[J]. Essays Biochem, 2018,62(3):423-442.
- [8] Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 20(2)16080.
- [9] Song WH, Ballard JW, Yi YJ, et al. Regulation of mitochondrial genome inheritance by autophagy and ubiquitin-proteasome system: implications for health, fitness, and fertility[J]. 2014, 981867, doi:10.1155.
- [10] Cecchino GN, Seli E, Alves da Motta EL, et al. The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights[J]. Reprod Biomed Online, 2018,36(6):686-697.
- [11] Neupane J, Ghimire S, Vandewoestyne M, et al. Cellular Heterogeneity in the Level of mtDNA heteroplasmy in mouse Embryonic Stem Cell[J]. Cell Rep, 2015,13(7):1304-1309.
- [12] Woods DC, Khrapko K, Tilly JL. Influence of Maternal Ageing on Mitochondrial Heterogeneity, Inheritance, and Function in Oocytes and Preimplantation Embryos[J]. Genes (Basel), 2018,9(5), 265-284.
- [13] Ferrer-Buitrago M, Bonte D, De Sutter P, et al. Single  $Ca^{2+}$  transients vs oscillatory  $Ca^{2+}$  signaling for assisted oocyte activation: limitations and benefits[J]. Reproduction, 2018, 155(2):105-119.
- [14] Seli E. Mitochondrial DNA as a biomarker for in-vitro fertilization outcome[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2016,28(3):158-163.
- [15] 周金萍,曾桥,朱献民,等. 卵母细胞线粒体移植疗法的基础研究及临床应用进展[J].中华生殖与避孕杂志,2017,37(1):61-66.
- [16] Pasquariello R, Ermisch AF, Sliva E, et al. Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans [J]. Biol Reprod, 2018, doi:10.1093.
- [17] Jing Y, Li L, Li YY, et al. Embryo quality, and not chromosome nondiploidy, affects mitochondrial DNA content in

- mouse blastocysts[J]. *J Cell Physiol*, 2018, doi:10.1002.
- [18] Wai T, Ao A, Zhang X, et al. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility[J]. *Biol Reprod*, 2010,83(1):52-62.
- [19] Cree LM, Hammond ER, Shelling AN, et al. Maternal age and ovarian stimulation independently affect oocyte mtDNA copy number and cumulus cell gene expression in bovine clones[J]. *Hum Reprod*, 2015,30(6):1410-1420.
- [20] Burgstaller JP, Kolbe T, Havlicek V, et al. Large-scale genetic analysis reveals mammalian mtDNA heteroplasmy dynamics and variance increase through lifetimes and generations[J]. *Nat Commun*, 2018,9(1):2488-2500.
- [21] Caicedo A, Aponte PM, Cabrera F. Artificial Mitochondria Transfer: Current Challenges, Advances, and Future Applications[J]. *Stem Cells Int*, 2017,7610414, doi:10.1155.
- [22] McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion[J]. *Science*, 1983,220(4603):1300-1302.
- [23] Ato A, Kono T, Nakada K, et al. Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(46): 16765-16770.
- [24] Hyslop L. Pronuclear Transfer in Human Oocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2018,1818:31-36.
- [25] Rai PK, Craven L, Hoogewijs K, et al. Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome[J]. *Essays Biochem*, 2018,62(3):455-465.
- [26] Jessica R, Laura I, Louise AH, et al. Concise Reviews: Assisted Reproductive Technologies to Prevent Transmission of Mitochondrial DNA Disease[J]. *Stem Cells*,2015,33(3):639-645.
- [27] Kristensen SG, Pors SE, Andersen CY. Improving oocyte quality by transfer of autologous mitochondria from fully grown oocytes[J]. *Hum Reprod*, 2017,32(4):725-732.
- [28] Tzeng CR, Hsieh S, Chang N, et al. Pregnancy derived from mitochondrial transfer (MIT) into oocyte from patients own cumulus cell (cGcs)[J]. *Fertil Steril*,2001,76(suppl):1-180.
- [29] 孔令红,刘忠,李红,等. 首例经自体颗粒细胞线粒体移植的双胞胎儿出生[J]. *第一军医大学学报*,2003,23(9):990-991.
- [30] Falk MJ, Decherney A, Kahn JP. Mitochondrial Replacement Techniques-Implications for the Clinical Community[J]. *N Engl J Med*, 2016,374(12):1103-1106.
- [31] Claiborne AB, English RA, Kahn JP. Ethics of new technologies[J]. *Science*, 2016,351(6274):668-670.

[责任编辑:张璐]

(上接 403 页)

- [26] Tavakoli M, Salek-Moghaddam A, Jeddi-Tehrani M, et al. Comparable vitamin D<sub>3</sub> metabolism in the endometrium of patients with recurrent spontaneous abortion and fertile controls[J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(5):356-364.
- [27] Yan X, Wang L, Yan C, et al. Decreased expression of the vitamin D receptor in women with recurrent pregnancy loss[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 606(Epub): 128-133.
- [28] Wang L, Yan X, Yan C, et al. Women with recurrent miscarriage have decreased expression of 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -Hydroxylase by the Fetal-Maternal Interface[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): 0165589.
- [29] Li N, Wu HM, Hang F, et al. Women with recurrent spontaneous abortion have decreased 25(OH) vitamin D and VDR at the fetal-maternal interface[J]. *Brazilian J Med Biol Res*, 2017, 50(11): e6527.
- [30] Ota K, Dambaeva S, Kim MW-I, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates NK-cell cytotoxicity, cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(11): 3188-3199.
- [31] Ibrahim ZM, Madany EH, Abdel Aal RM, et al. Role of 1, 25-dihydroxyvitamin D (vitamin D<sub>3</sub>) as immunomodulator in recurrent missed miscarriage[J]. *Middle East Fertil Soc J*, 2013, 18(3):171-176.
- [32] Samimi M, Foroozanfar F, Amini F, et al. Effect of vitamin D supplementation on unexplained recurrent spontaneous abortion: a double-blind randomized controlled trial[J]. *Glob J Health Sci*, 2016, 9(3):95.
- [33] 徐士儒,王云霞,连若纯,等. 维生素 D 对复发性流产患者外周血自然杀伤细胞的调节作用[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(4): 316-341.

[责任编辑:张璐]