

## 生物技术与方法

## 长效人促卵泡激素 CHO 细胞株的构建及其体内活性

黄晓平<sup>1,2</sup>, 王晓<sup>1,2</sup>, 杨春雪<sup>1,2</sup>, 贾东方<sup>1,2</sup>, 林俊生<sup>1,2</sup>, 刁勇<sup>1,2</sup>

1 华侨大学分子药物研究院, 福建 泉州 362021

2 华侨大学生物医学学院, 福建 泉州 362021

黄晓平, 王晓, 杨春雪, 等. 长效人促卵泡激素 CHO 细胞株的构建及其体内活性. 生物工程学报, 2014, 30(6): 954-961.  
Huang XP, Wang X, Yang CX, et al. Expression of human long-acting FSH in CHO cell and its bioactivity *in vivo*. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 954-961.

**摘要:** 促卵泡激素 (FSH) 是具有促进卵泡与睾丸发育作用的一种垂体糖蛋白激素。因其体内半衰期较短, 临床上需要连续 10 d 以上每天注射, 病人使用非常不方便。本文旨在通过提高糖基化程度, 研制一种长效 FSH。通过一段含有两个 N-糖基化位点的连接序列, 将人 FSH  $\alpha$  链与  $\beta$  链 cDNA 融合, 并插入 pcDNA3.1(+) 表达载体。表达载体转染 CHO-K1 细胞后, 通过 G418 筛选得到阳性单克隆细胞, 并经 PCR 和 Western blotting 证实。该重组 FSH 为单链蛋白, 分子量约为 49 kDa。经无血清培养, 工程细胞株培养上清液中重组 FSH 的表达量可达 3 mg/L。单次注射该重组 FSH 能够促进大鼠卵巢发育与卵泡成熟, 且药效与连续 8 次注射 Folltropin-V 的相近。实验结果显示, 本研究已成功获得一种长效重组 FSH。

**关键词:** 促卵泡激素, CHO-K1 细胞, 长效, 无血清培养

**Received:** September 12, 2013; **Accepted:** November 15, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81271691), Program for International S&T Cooperation Projects of China (No. 2011DFG33320), Key Science & Technology Project of the Fujian Province, China (No. 2013N5007), Project of Huaqiao University (No. 11HZR19).

**Corresponding author:** Yong Diao. Tel/Fax: +86-595-22692516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81271691), 国际科技合作项目 (No. 2011DFG33320), 福建省科技重大项目 (No. 2013N5007), 华侨大学校级基金 (No. 11HZR19) 资助。

网络出版时间: 2013-12-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131217.1059.002.html>

# Expression of human long-acting FSH in CHO cell and its bioactivity *in vivo*

Xiaoping Huang<sup>1,2</sup>, Xiao Wang<sup>1,2</sup>, Chunxue Yang<sup>1,2</sup>, Dongfang Jia<sup>1,2</sup>, Junsheng Lin<sup>1,2</sup>, and Yong Diao<sup>1,2</sup>

1 Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China

2 School of Biomedical Sciences Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China

**Abstract:** Follicle-stimulating hormone (FSH) is a pituitary glycoprotein hormone that is essential for the development of ovarian follicles and testicular seminiferous tubules. The relatively short half-life of FSH *in vivo* requires daily injections for more than 10 days that is inconvenient and possibly contribute to the stress perceived by the patients. The goal of the present study was to increase FSH glycosylation, in order to develop a long-acting recombinant FSH. The cDNA of native  $\alpha$  and  $\beta$  subunit of human FSH was linked by a sequence with two N-linked glycosylation sites, and the resulted DNA was inserted into pcDNA3.1 vector to generate a recombinant vector of pcDNA3.1-FSH. The pcDNA3.1-FSH was linearized and transfected into CHO-K1, positive transformants were selected by G418 and confirmed by PCR and Western blotting. A single chain recombinant FSH was expressed, with molecular weight of about 49 kDa. The recombinant FSH expression level in CHO-K1 cell strain in serum-free culture was 3 mg/L. Single injection of this recombinant FSH could induce folliculogenesis and ovulation in rats, the efficacy was similar with the commercially available FSH preparation (Folltropin-V) administrated 8 times consecutively. The results suggested a long-acting FSH was produced successfully.

**Keywords:** follicle-stimulating hormone, Chinese hamster ovary cells, long acting, serum-free culture

促卵泡激素 (FSH) 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成的一种糖蛋白, 两个亚基通过非共价结合形成二聚体。FSH 的  $\alpha$ -亚基与其他糖蛋白激素, 如绒毛膜促性腺激素 (CG)、黄体素 (LH) 和促甲状腺激素 (TSH) 的  $\alpha$ -亚基完全相同, 而各糖蛋白激素的  $\beta$ -亚基则在结构上稍有差异, 从而赋予每种激素不同的生物功能<sup>[1-3]</sup>。研究表明 FSH 的  $\alpha$  亚基羧基端与其受体结合紧密, 因此进行融合表达时都采用  $\beta$  亚基在后,  $\alpha$  亚基在前提供游离的  $\alpha$  亚羧基的连接方式<sup>[4-7]</sup>。

目前市售的 FSH 制剂大部分是从尿液或者动物垂体中提取而来, 但这些产品仍存在一定的局限性, 例如半衰期短、产品纯度低、活性差, 或因含有他激素和潜在的传染性病原而影响药物的疗效<sup>[8-9]</sup>, 已经不能满足如今市场的需

求, 而采用基因工程的方法可以获得纯度高、活性优的重组 FSH<sup>[10]</sup>。

中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 是广泛用于生产复杂蛋白质的表达系统, 能对复杂糖蛋白进行很好地折叠、组装和翻译后修饰, 在分子结构和生物学功能等方面更接近天然蛋白。目前已经上市的重组糖蛋白类药物基本上由 CHO 细胞表达系统获得<sup>[11-13]</sup>。FSH  $\beta$  链中含有 N7 和 N24 两个 N-连接糖基化位点, 而  $\alpha$  链也含有两个糖基化位点, 故本课题选择 CHO 表达系统。

FSH 是正常妇女卵泡生长、成熟和男子精子生成所必不可少的一种糖蛋白<sup>[14-17]</sup>。在当前辅助生殖周期的 10-12 d 中, 普通 FSH 的制剂需要每天皮下注射 1 次或者 2 次, 这种反复注射给患者带来了诸多不便<sup>[18-21]</sup>。目前已有诸多

方法来延长蛋白药物的半衰期,如化学修饰法、单链融合 CTP、增加 N-连接糖基化等<sup>[7,19,22-24]</sup>。Klein 等<sup>[25]</sup>研究表明,重组 FSH 在体内的半衰期为 3.7 h,而增加 2 个 N-糖基化位点的重组长效 FSH 在体内的半衰期为 7.3 h,是普通 FSH 半衰期的 2 倍。

本课题采用含有 2 个 N-连糖基化的连接序列,将 FSH  $\alpha$  链与  $\beta$  链融合成单链。 $\alpha$  链位于融合蛋白的羧基端,提供游离的羧基,有利于重组 FSH 与其受体更为紧密的结合, $\beta$  链位于融合蛋白的氨基端。重组质粒转染至 CHO-K1 细胞、G418 筛选得到单克隆,进行无血清培养基培养。培养上清进行 Western blotting 分析和大鼠体内活性分析,为长效 FSH 制剂的研制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*E. coli* DH5 $\alpha$ 、pcDNA3.1 (+) 由本实验室保存。CHO-K1 细胞株购自 ATCC 细胞库。T4 DNA 连接酶、*Hind* III、*Eco*R I、*Psp*1406 I 等限制性内切酶购自大连宝生物公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自碧云天公司。胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司。F-12K 营养混合培养基购自 Thermo scientific 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。G418 购自 Amersco 公司。Folltropin-V (Belleville, Canada), 兔抗人 FSH 一抗,山羊抗兔二抗均购自 Abcam 公司。ELISA 购自 Abnova 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达载体 pcDNA3.1(+)-FSH 的构建

按照文献<sup>[22]</sup>中的方法,使用 N-连接糖基化的连接序列 (氨基酸序列 GSGSNATGSG SNATSGSTS),融合人 FSH  $\alpha$  链与  $\beta$  链。全基

因序列由南京金斯瑞公司合成,目的基因经 *Hind* III 与 *Eco*R I 酶切、回收,目的基因克隆至 pcDNA3.1(+)载体的 *Hind* III/*Eco*R I 位点之间,转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  中,挑取单克隆进行 PCR 鉴定与质粒酶切鉴定。

#### 1.2.2 CHO-K1 细胞的转染

CHO-K1 细胞用含 10% FBS 的 F-12K 营养混合培养基培养,培养温度为 37  $^{\circ}$ C,CO<sub>2</sub> 浓度为 5%。待细胞汇合度至 85%时,胰蛋白酶消化细胞,制备成悬液,接种至 24 孔板中。待细胞汇合度至 80%时进行转染,2  $\mu$ L Lipofectamine 2000 与 0.8  $\mu$ g 经过 *Psp*1406 I 线性化的 pcDNA3.1(+)-FSH 质粒混合后,均匀加至含 10% FBS 的 F-12K 营养混合培养液中,培养 6 h 后换液。转染 24 h,胰蛋白酶消化制备细胞悬液,按照 1 : 10 比例进行继续培养,加入终浓度为 800  $\mu$ g/mL G418 进行筛选,每 3 d 换一次液,直至多克隆细胞形成。

#### 1.2.3 稳定表达 FSH 细胞系的筛选与鉴定

将多克隆细胞制备成细胞悬液,倍比稀释的方法筛选单克隆细胞,取单克隆细胞培养上清进行 ELISA 检测,将表达量较大的单克隆细胞进行多次单克隆筛选得到稳定表达 FSH 的细胞系,并命名为 CHO-FSH。培养上清进行 SDS-PAGE 分离,转印至 PVDF 上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,兔抗人 FSH 一抗室温孵育 2 h, PBST (PBS+0.1% Twen-20) 漂洗 3 次,羊抗兔二抗室温孵育 2 h,漂洗 3 次,ECL 显色成像。

分别以筛选得到的 4 株单克隆细胞系基因组和 CHO-K1 细胞的基因组为模板,以 Forward (5'-TTAAGCTTATGAAGACACTCC AGTTTTCTTCC-3') 和 Reverse (5'-TTGAATC TTAAGATTTGTGATAATAACAAGTA-3') 为引

物,进行 PCR 扩增。PCR 条件为:95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,扩增 30 个循环。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定 FSH 基因是否已整合至 CHO-K1 细胞基因组中。

#### 1.2.4 重组 FSH 体内活性分析

大鼠卵巢、子宫增重是测定促卵泡激素生物学活性最经典、最可靠的方法<sup>[26]</sup>。子宫内含有大量的雌激素受体(ERS),雌激素通过与该受体结合,诱发细胞内反应,进而表现为子宫组织增生。选取 20–23 日龄 SD 雌性大鼠,随机分成重组 FSH 高剂量组(62.5 μg/kg)、中剂量组(12.5 μg/kg)、低剂量组(2.5 μg/kg)、Folltropin-V 0.5 g/kg 8 次注射组(每天 2 次,连续注射 4 d)、Folltropin-V 0.5 g/kg 组(单次注射)和生理盐水阴性对照组。腹腔皮下注射重组 FSH、阳性药物(Folltropin-V)或生理盐水。给药 4 d 后,处死大鼠,剥离出卵巢与子宫称重。多聚甲醛固定卵巢,切片、HE 染色、镜检分析,实验结果进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pcDNA3.1(+)-FSH 的构建

转化后提取质粒进行酶切鉴定,结果双酶切所得的片段大小与设计的相符,约 750 bp (图 1),测序结果与设计的基因序列比对结果一致,证实重组质粒构建成功。

### 2.2 稳定表达 FSH 细胞系的 PCR 鉴定

以筛选得到的 4 株单克隆细胞系和 CHO-K1 细胞基因组 DNA 为模板,利用 FSH 特异引物进行 PCR 反应,结果以 4 株单克隆细胞系基因组为模板的 PCR 产物,得到约 750 bp 目的片段(图 2),与设计的 FSH 基因大小相符,

而以 CHO-K1 细胞基因组为模板的 PCR 产物,没有检测到 FSH 特异性的 750 bp 条带,证明 FSH 基因已整合到 CHO-K1 细胞基因组中。

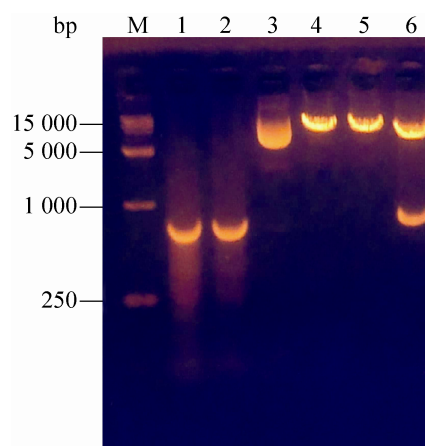


图 1 重组表达质粒 pcDNA3.1-FSH 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant expression vector pcDNA3.1(+)-FSH by PCR and enzyme digestion. M: DNA molecular weight marker DL15 000; 1–2: PCR products of pcDNA3.1(+)-FSH and *E. coli* DH5α/ pcDNA3.1(+)-FSH; 3: pcDNA3.1(+)-FSH; 4: pcDNA3.1(+)-FSH digested with *EcoR* I; 5: pcDNA3.1(+)-FSH digested with *Hind* III; 6: pcDNA3.1(+)-FSH digested with *EcoR* I and *Hind* III.

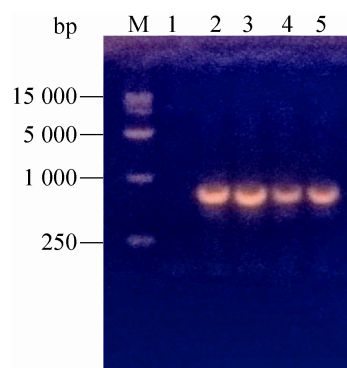


图 2 PCR 法鉴定 CHO-FSH 阳性细胞株

Fig. 2 Identification of CHO-FSH positive transformants by PCR. M: DNA molecular weight marker DL15 000; 1: PCR products of CHO-K1; 2–5: PCR product of CHO-FSH.

### 2.3 培养上清液的 Western blotting 分析

培养上清的 Western blotting 结果显示, 在 49 kDa 左右有明显的印记 (图 3)。证实筛选得到的细胞系能表达 FSH, 进一步用 ELISA 进行定量分析, 结果显示培养上清液中重组 FSH 表达量为 3 mg/L。

### 2.4 重组 FSH 对大鼠卵巢的影响

大鼠卵巢重量分析 (图 4) 结果显示注射重组 FSH 组, 卵巢重量与药物剂量之间呈现剂量依赖关系。重组 FSH 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组与阴性对照组相比具有显著性差异 ( $P<0.01$ ); 重组 FSH 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组与连续 8 次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组相比没有显著性差异 ( $P>0.05$ ); 连续 8 次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组与阴性对照组相比具有显著性差异 ( $P<0.01$ ); 而单次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组与阴性对照组相比没有显著性差异 ( $P>0.05$ )。重组 FSH 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组和连续 8 次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组, 大卵泡的数目 (直径 $>275\ \mu\text{m}$ ) 与阴性对照组相比具有显著性的差异 ( $P<0.05$ ); 重组 FSH 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组与连续 8 次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组相比没有显著性差异 ( $P>0.05$ ); 而单次注射 Folltropin-V 0.5g/kg 组和重组 FSH 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组, 与阴性对照组相比, 没有显著性的差异 ( $P>0.05$ ) (图 5)。结果表明在卵巢、子宫增重和促进卵泡成熟的药效上, 我们得到的重组长效 FSH 单次注射的药效与连续 8 次注射阳性药物 Folltropin-V 的药效相近。

### 2.5 长效 FSH 对大鼠子宫的影响

大鼠注射重组 FSH 和 Folltropin-V 结果显示: 重组 FSH 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组子宫增重非常明显, 与正常组相比具有显著性差异 ( $P<0.01$ ); 重组

FSH 12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组与阴性对照组相比具有显著性差异 ( $P<0.05$ ); 连续 8 次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组与阴性对照组相比具有显著性差异 ( $P<0.05$ ); 而单次注射 Folltropin-V 0.5 g/kg 组与阴性对照组相比没有显著性差异 ( $P>0.05$ ) (图 6)。

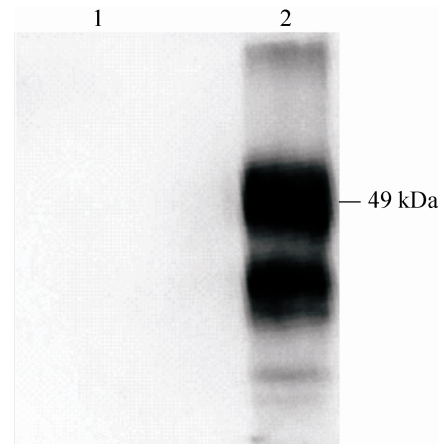


图 3 重组 FSH Western blotting 鉴定

Fig. 3 Characterization of the recombinant FSH by Western blotting. 1: CHO culture supernatant; 2: CHO-FSH culture supernatant.

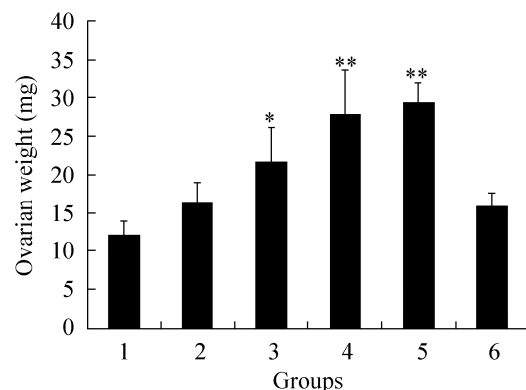


图 4 重组 FSH、Folltropin-V 对大鼠卵巢增重的影响

Fig. 4 Effect of recombinant FSH and Folltropin-V on ovarian weight. Results are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . Group 1: saline; Group 2: FSH (2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); Group 3: FSH (12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); Group 4: FSH (62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); Group 5: Folltropin-V (multiple doses, 0.5 g/kg/dose); Group 6: Folltropin-V (single dose, 0.5 g/kg). \* $P<0.05$  vs Group 1; \*\* $P<0.01$  vs Group 1.

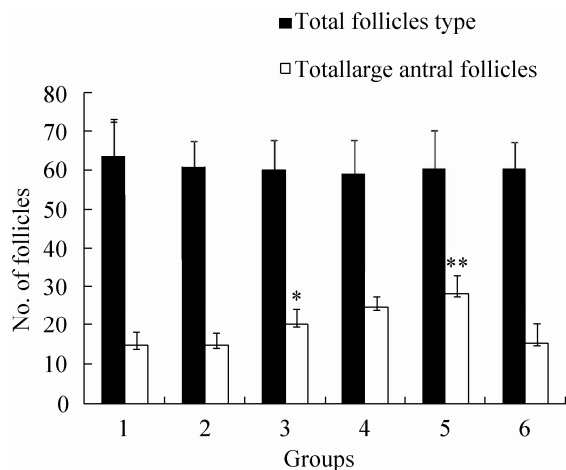


图5 重组 FSH、Folltropin-V 对大鼠卵泡成熟的影响  
Fig. 5 Effect of recombinant FSH and Folltropin-V on total and large (>275 µm) antral follicle counts per rats after treatment. Results are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . Group 1: saline; Group 2: FSH (2.5 µg/kg); Group 3: FSH (12.5 µg/kg); Group 4: FSH (62.5 µg/kg); Group 5: Folltropin-V (multiple doses, 0.5g/kg/dose); Group 6: Folltropin-V (single dose, 0.5g/kg). \* $P < 0.05$  vs Group 1; \*\* $P < 0.01$  vs Group 1.

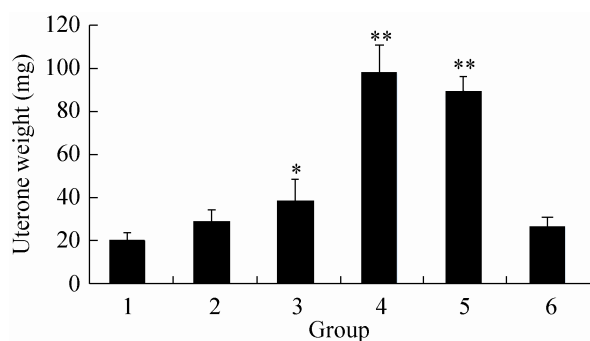


图6 重组 FSH、Folltropin-V 对大鼠子宫增重的影响  
Fig. 6 Effect of recombinant FSH and Folltropin-V on uterine weight. Results are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . Group 1: saline; Group 2: FSH (2.5 µg/kg); Group 3: FSH (12.5 µg/kg); Group 4: FSH (62.5 µg/kg); Group 5: Folltropin-V (multiple doses, 0.5g/kg/dose); Group 6: Folltropin-V (single dose, 0.5g/kg). \* $P < 0.05$  vs Group 1; \*\* $P < 0.01$  vs Group 1.

### 3 讨论

随着生物技术的飞速发展,蛋白质药物已经在临床治疗中发挥重要的作用,然而大多数蛋白质药物在体内的生物半衰期普遍较短,一方面是蛋白药物被体内大量存在的蛋白酶所分解,另一方面是分子质量小的蛋白分子容易被肾小球滤过而经肾脏排泄清除。为了维持疗效,往往需要频繁用药,长期的反复注射不仅增加了患者的痛苦,而且易引发一系列副反应。因此迫切需要延长蛋白药物的半衰期来避免反复注射带来的诸多不便,目前第一个长效 FSH 制剂 corifollitropin  $\alpha$  已经上市<sup>[25,27]</sup>。

本文使用含 N-糖基化位点的连接序列,将 FSH $\alpha$  与  $\beta$  亚基融合成单链,表达的长效 FSH 为单亚基结构,而不是二亚基结构,融合 FSH 蛋白  $\alpha$  羧基端是处于游离状态,能与其受体结合,且  $\beta$  亚基位于融合蛋白的 N 端,而并没有影响 FSH 的生物活性。重组长效 FSH 蛋白能够促进大鼠卵巢的增重、卵泡的成熟和子宫的增重。单次注射 62.5 µg/kg 重组 FSH 与连续 8 次注射 0.5 g/kg Folltropin-V 在卵巢、子宫增重和促进卵泡成熟的药效相当。以上的结果表明我们得到的重组 FSH 蛋白能延长在体内的半衰期。

本研究获得的工程细胞株经过无血清培养基驯化,悬浮生长,有利于培养规模的扩大。摇瓶中表达量达 3 mg/L,比文献中报道的表达量要高<sup>[25]</sup>。此稳定表达长效 FSH 细胞株的获得,为下一步研制开发长效 FSH 蛋白药物奠定了坚实的临床基础。

### REFERENCES

- [1] Kim DJ, Seok SH, Baek MW, et al. Highly

- expressed recombinant human follicle-stimulating hormone from Chinese hamster ovary cells grown in serum-free medium and its effect on induction of folliculogenesis and ovulation. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2652–2660.
- [2] Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(3): 260–283.
- [3] Kumar TR, Wang Y, Lu N, et al. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*, 1997, 15(2): 201–204.
- [4] Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 2005, 433: 269–277.
- [5] Fan QR, Hendrickson WA. Comparative structural analysis of the binding domain of follicle stimulating hormone receptor. *Proteins*, 2008, 72(1): 393–401.
- [6] Ruman JI, Pollak S, Trousdale RK, et al. Effects of long-acting recombinant human follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation on murine folliculogenesis. *Fertil Steril*, 2005, 83(4): 1303–1309.
- [7] Weenen C, Pena J, Pollak S, et al. Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with O-linked analogs in female rats. *J Clin Endocr Metab*, 2004, 89(10): 5204–5212.
- [8] Hugues JN. Recombinant human follicle-stimulating hormone: a scientific step to clinical improvement. *Reprod Biomed Online*, 2001, 2(1): 54–64.
- [9] Yang HL, Zhao XB, Song XJ, et al. Expression of goat follicle-stimulating hormone analogous gene in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(3): 409–414 (in Chinese).  
杨欢利, 赵西彪, 宋晓娟, 等. 山羊重组促卵泡素长效类似物基因在毕赤酵母中表达. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 409–414.
- [10] Kumar TR, Schuff KG, Nusser KD, et al. Gonadotroph-specific expression of the human follicle stimulating hormone beta gene in transgenic mice. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 247(1/2): 103–115.
- [11] Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod Update*, 1996, 2(2): 172–191.
- [12] De Leo V, Musacchio MC, Di Sabatino A, et al. Present and future of recombinant gonadotropins in reproductive medicine. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(3): 379–391.
- [13] Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol*, 2012, 93(3): 917–930.
- [14] Gibreel A, Bhattacharya S. Recombinant follitropin alfa/lutropin alfa in fertility treatment. *Biologics*, 2010, 4: 5–17.
- [15] Demeestere I, Streiff AK, Suzuki J, et al. Follicle-stimulating hormone accelerates mouse oocyte development *in vivo*. *Biol Reprod*, 2012, 87(1): 1–11.
- [16] Sterrenburg M, Veltman-Verhulst S, Eijkemans M, et al. Clinical outcomes in relation to the daily dose of recombinant follicle-stimulating hormone for ovarian stimulation in *in vitro* fertilization in presumed normal responders younger than 39 years: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2011, 17(2): 184–196.
- [17] Allan CM, Couse JF, Simanainen U, et al. Estradiol induction of spermatogenesis is mediated via an estrogen receptor- $\alpha$  mechanism involving neuroendocrine activation of follicle-stimulating hormone secretion. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 800–810.
- [18] Olivius C, Friden B, Borg G, et al. Why do couples discontinue *in vitro* fertilization treatment? A cohort study. *Fertil Steril*, 2004, 81(2): 258–261.
- [19] Klein J, Lobel L, Pollak S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotropin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey.

- Fertil Steril, 2002, 77(6): 1248–1255.
- [20] Devroey P, Fauser B, Platteau P, et al. Induction of multiple follicular development by a single dose of long-acting recombinant follicle-stimulating hormone (FSH-CTP, corifollitropin alfa) for controlled ovarian stimulation before *in vitro* fertilization. J Clin Endocr Metab, 2004, 89(5): 2062–2070.
- [21] Pouver AW, Farquhar C, Kremer J. Long-acting FSH versus daily FSH for women undergoing assisted reproduction. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 6: CD009577.
- [22] Diao Y, Lin JS. The molecular design and drug development of recombinant long-acting follicle stimulating hormone. Acta Pharm Sin, 2012, 47(4): 421–426 (in Chinese).  
刁勇, 林俊生. 长效卵泡刺激素的分子设计与新药开发. 药学学报, 2012, 47(4): 421–426.
- [23] Fares F, Ganem S, Hajouj T, et al. Development of a long-acting erythropoietin by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit to the coding sequence of human erythropoietin. Endocrinology, 2007, 148(10): 5081–5087.
- [24] Weenen C, Pena JE, Pollak SV, et al. Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with O-linked analogs in female rats. J Clin Endocr Metab, 2004, 89(10): 5204–5212.
- [25] Klein J, Lobel L, Pollak S, et al. Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist. Hum Reprod, 2003, 18(1): 50–56.
- [26] Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, et al. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. Environm Health Perspect, 1996, 104(12): 1296.
- [27] Seyhan A, Ata B. The role of corifollitropin alfa in controlled ovarian stimulation for IVF in combination with GnRH antagonist. Int J Womens Health, 2011, 3: 243–255.

(本文责编 郝丽芳)