

研究报告

卵泡刺激素受体 FSHR234 纳米抗体的分离纯化及多克隆抗体的制备

李玲霞¹ 吴锦艳¹ 曹小安¹ 冯倩¹ 杜国玉¹ 尹双辉¹ 李江伟^{2*} 尚佑军^{1*}

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽

病毒学重点开放实验室 甘肃 兰州 730046)

(2. 新疆大学 生物资源基因工程重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:【背景】卵泡刺激素受体(Follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)在人体成熟破骨细胞及单核细胞表面表达,成为阻断卵泡刺激素(FSH)作用的潜在靶点,制备亲和力较高的 FSHR 抗体已成为靶向治疗 FSH 相关疾病的切入点。【目的】构建 FSHR 重组载体获得表达量较高的可溶性蛋白,进一步制备骆驼多克隆抗体及其纳米抗体。【方法】利用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切重组质粒 pET30a-FSHR234,将目的基因 *fshr* 构建于 pGEX-4T-1 载体并进行原核表达,利用 Western blot 及 ELISA 检测目的蛋白的配体结合能力。免疫新疆双峰驼制备骆驼多克隆抗体,并利用噬菌体展示技术筛选获得 FSHR 纳米抗体。细胞免疫化学法检测 FSHR 抗体在 coav-3 的表达情况。【结果】构建了 pGEX-4T-1-FSHR234 重组质粒,获得了表达量较高的 FSHR234 可溶性蛋白;并构建了 5 株 FSHR 纳米抗体,鉴定出一株结合能力较强的纳米抗体,命名为 VHH-3F9。【结论】制备的骆驼 FSHR 多克隆抗体效价达 1:128 000,筛选获得的 VHH-3F9 纳米抗体能与 FSHR234 具有较高的结合性,且两者均能表达于 coav-3 细胞表面。

关键词: 卵泡刺激素受体, pGEX-4T-1, 胞外区, 纳米抗体

Isolation and identification of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR234) nanobody and polyclonal antibody

LI Ling-Xia¹ WU Jin-Yan¹ CAO Xiao-An¹ FENG Qian¹ DU Guo-Yu¹
YIN Shuang-Hui¹ LI Jiang-Wei^{2*} SHANG You-Jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Pathogen Biology of Veterinary Diseases & Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences & Key Laboratory of Animal Virology, Ministry of Agriculture, Lanzhou, Gansu 730046, China)

(2. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China)

Abstract: [Background] Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) is secreted by the anterior pituitary cells which expressed in the cell surface of human mature osteoclasts and mononuclear, was

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500903)

*Corresponding authors: E-mail: LI Jiang-Wei: jwli67@sina.com; SHANG You-Jun: shangyoujun@caas.cn

Received: April 17, 2018; Accepted: August 06, 2018; Published online (www.cnki.net): August 10, 2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0500903)

*通信作者: E-mail: 李江伟: jwli67@sina.com; 尚佑军: shangyoujun@caas.cn

收稿日期: 2018-04-17; 接受日期: 2018-08-06; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-08-10

regarded as potential targets for blocking FSH. **[Objective]** For the purpose of obtaining soluble FSHR protein in order to acquire FSHR nanobody with high affinity for the treatment of related diseases caused by FSH and bone loss. **[Methods]** Recombinant plasmid pET30a-FSHR234 was double enzyme cut by *Xho* I and *Bam*H I, *fshr* gene was constructed to the pGEX-4T-1 vector and expressed in the prokaryotic cell. Its' binding capacity was determined by Western blot and ELISA. Immunized Xinjiang camels were used to prepare polyclonal antibody. Phage display technology was used to obtain FSHR nanobodies of high affinity. The expression of coav-3 was detected by cellular immunocytochemistry. **[Results]** Recombinant pGEX-4T-1-FSHR was constructed successfully, and the soluble FSHR234 protein expressed with high concentration. Five FSHR nanobodies were obtained successfully by mean of subclone. **[Conclusion]** The titer of camel FSHR polyclonal antibody prepared in the experiment was 1:128 000. VHH-3F9 nanobody could combine FSHR234 at a low concentration and its binding capacity enhanced with increasing FSHR234 concentration. In addition, both FSHR polyclonal antibody and VHH-3F9 nanobody could expressed on the surface of coav-3.

Keywords: FSHR, pGEX-4T-1, Extracellular domain, Nanobodies

卵泡刺激素受体(Follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)是垂体前叶细胞分泌的,属于G蛋白偶联受体超家族中的糖蛋白亚家族成员,是一个7次跨膜糖蛋白,在睾丸和卵巢血管内皮细胞低表达。相关研究证明,FSHR与成年女性绝经后雌激素降低有密切联系,因此对于骨质疏松症的治疗也有一定效果,抗FSHR纳米抗体在血管形成中具有一定作用。FSH是由垂体分泌的一种糖蛋白激素,主要作用是促进和维持正常的性腺发育和生殖功能。FSH与其受体FSHR特异性结合,在女性卵泡发生和男性精子发生的启动和维持中分别起着至关重要的作用^[1-2]。在女性绝经前后骨代谢调节方面也发挥着重要作用。FSH的生理作用是通过其靶细胞——颗粒细胞上特异性受体FSHR介导而完成的。因此,FSH水平作为雌激素变化引起骨质疏松的重要因子,在动物实验中用于骨质疏松症治疗效果的研究^[3-7]。

FSHR的激素结合位点局限在细胞外域,存在多个参与激素受体相互作用的区域^[8-9],通过X-ray可以从FSH和FSHR结合的晶体结构研究中推测出许多重要的结合位点,包括胞外区、胞内区和富含亮氨酸重复(Leucine-rich repeats, LRR)区等。FSHR特异性表达于男性睾丸支持细胞(Sertoli cell)表面,在男性青春期生精的启动和成年期生精过程的维持中发挥重要作用^[10]。由于FSHR含有较多二硫键,使其空间结构较为复杂,因而FSHR蛋白较多

以包涵体的形式存在,其变性-复性过程复杂耗时,不便于快速表达和纯化。因此,本试验通过构建重组质粒以获得表达较高的原核蛋白,为后期制备高纯度的FSHR纳米抗体奠定基础。

纳米抗体是骆驼及骆驼科动物体内自然产生的具有完整功能的最小抗原结合片段^[11],软骨鱼如鲨鱼等动物体内也产生纳米抗体^[12],与传统抗体相比,具有分子量小、特异性强、亲和力高、溶解性及热稳定性高等优点,适合于原核表达和各种真核表达系统,正是这些特征使得该抗体成为新一代治疗性抗体,具有很大的开发应用价值^[13]。FSHR是卵巢癌靶向T细胞治疗癌症患者的潜在靶点,在免疫缺陷小鼠中,FSHR定向T细胞过继转移能够显著抑制人类卵巢癌异种移植瘤的生长,表明FSHR是一种很有前景的卵巢癌免疫治疗靶点,因而可以进一步探索FSHR针对癌症患者的免疫治疗方法^[14]。也有研究表明,FSHR异位表达于许多性腺外肿瘤(尤其是内分泌肿瘤)的瘤内血管内皮细胞,在肿瘤细胞中也有发现,包括垂体腺瘤、神经内分泌瘤等,通过人T细胞转导表达抗FSHR免疫受体已在卵巢癌细胞上得到证实^[15]。目前研究领域还缺少针对FSHR靶点的检测抗体,本试验采用噬菌体展示技术从骆驼免疫文库中筛选制备靶向FSHR纳米抗体,以期今后卵巢癌及肿瘤诊断和骨质疏松症等的治疗提供新的研究方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司; pGEX-4T-1 载体为新疆大学生物资源基因工程重点实验室保存; 限制性内切酶、还原型谷胱甘肽等, 宝生物工程(大连)有限公司; 抗 His 标签鼠单克隆抗体、Anti-FSHR IgG 单克隆抗体、山羊抗鼠 IgG(H&L)-HRP 抗体、山羊抗骆驼 IgG(H&L)-HRP 抗体, 北京义翘神州生物技术有限公司。凝胶成像仪、核酸电泳仪、SDS-PAGE 电泳仪, Bio-Rad 公司; 隔水式电热恒温培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pGEX-4T-1-FSHR234 的构建

选择限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 将 pET30a-FSHR 于 37 °C 进行双酶切 8 h, 得到 FSHR 胞外区片段, 切胶回收目的基因片段。利用相同的限制性内切酶对 pGEX-4T-1 进行双酶切, 16 °C 连接 pGEX-4T-1 与 FSHR 过夜, 并将重组质粒 pGEX-4T-1-FSHR 转化 DH5 α , 挑取单克隆进行 PCR 和酶切鉴定, 将鉴定的阳性克隆进行测序以确定是否构建成功。

1.2.2 谷胱甘肽 S 转移酶标签 FSHR234 蛋白的表达及条件优化

将 pGEX-4T-1-FSHR 表达菌按 1% 接种到氨苄抗性(100 mg/L)的 LB 培养基, 在 37 °C、220 r/min 培养 4 h 至 OD_{600} 达 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 37 °C 诱导 4 h, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 分离上清和沉淀, 用 12% SDS-PAGE 分别检测上清和沉淀蛋白表达。进一步改变温度为 18、20、25、30 °C, IPTG 终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5 及 1 mmol/L, 每个温度分别对应以上 5 个不同 IPTG 浓度以确定最佳诱导条件。转速 120–220 r/min 诱导 4–6 h。离心分离上清和沉淀, 沉淀用含有 6 mol/L 尿素的 Tris-HCl 溶液溶解变性, 经过透析液 I、II、III 分别复性 24 h。经 GST 柱料分别纯化上清与包涵体 FSHR234 蛋白, Bradford 法检测蛋白浓度。

1.2.3 ELISA 及 Western blot 试验

FSHR234 蛋白定量浓度为 300 μ g/mL, ELISA 检测 FSHR234 蛋白表达试验中 FSHR 蛋白包被浓度为 2、5、10 μ g/mL, 阴性对照为 3% 牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA), 一抗为抗 FSHR 鼠单克隆抗体(1:500), 二抗为羊抗鼠 IgG-HRP (1:5 000)。Western blot 实验中蛋白上样量 12 μ g, 采用辣根过氧化物酶 DAB 显色试剂盒显色。ELISA 检测纳米抗体的结合能力时 FSHR234 包被浓度为 2 μ g/mL, 一抗为 VHH-3F9, 稀释浓度分别为 0.25、0.5、2.0 以及 10.0 μ g/mL, 阳性对照为抗 FSHR 单克隆抗体(1:1 000), 二抗为羊抗鼠 IgG-HRP (1:5 000)。

1.2.4 FSHR234 抗原筛选获得的 VHH-X 基因序列分析

FSHR 免疫骆驼制得 VHH 噬菌体展示文库, 抗原 FSHR234 包被浓度分别为 5、2.5、1.25 μ g/ μ L, 每孔 100 μ L, 经过 3 轮淘洗筛选, 获得了 63 个阳性克隆。其中选择丰度最高的 2 个序列 VHH-3F9 与 VHH-3F19, 丰度较低的 1 个序列 VHH-3F20 以及单独序列中随机 2 个序列 VHH-3F8 与 VHH-3F10 共 5 个 VHH 基因序列, 将它们分别构建至 pET22b 载体, 于 0.1 mmol/L IPTG 条件下 37 °C 诱导 4 h, 共表达 5 株抗 FSHR 纳米抗体, Ni 柱纯化抗体蛋白。

1.2.5 细胞免疫化学检测抗 FSHR 抗体在 coav-3 表面的结合

将对数期生长的 coav-3 细胞按 2×10^5 个/mL 铺于 24 孔板, 37 °C 培养过夜。次日 4% 多聚甲醛固定细胞, 加入 3% 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 2 h, 然后加入一抗即抗 FSHR 骆驼多抗 IgG (1:500) 在 37 °C 放置 2 h, 再加入二抗即抗 FSHR 纳米抗体 VHH-3F9 (1:50), 37 °C 放置 1.5 h, 期间用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 对照组为未免骆驼纯化血清(1:500), 二抗为羊抗鼠-HRP (1:2 000), 室温避光 DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pGEX-4T-1-FSHR234 的构建

FSHR234 胞外区全长为 702 bp, 提取质粒 pGEX-4T-1 与 pET30a-FSHR 并分别进行双酶切, 从图 1 可以看出, 重组质粒酶切后目的基因大小正确。

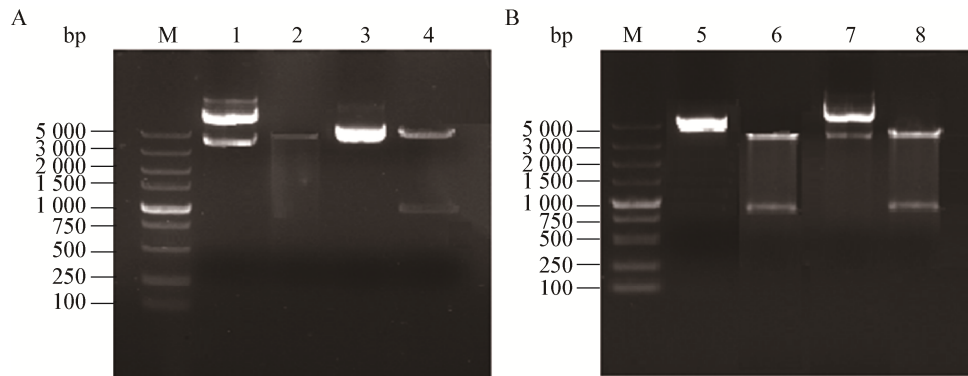


图1 pGEX-4T-1 与 pET30a-FSHR 双酶切以及重组质粒 pGEX-4T-1-FSHR 的酶切鉴定

Figure 1 Double enzyme digestion of pGEX-4T-1 and pET30a-FSHR and enzyme identification of pGEX-4T-1-FSHR

注: M: DL5000 marker; 1: 质粒 pGEX-4T-1; 2: 双酶切 pGEX-4T-1; 3: 质粒 pET30a-FSHR; 4: 双酶切 pET30a-FSHR; 5: 质粒 pET30a; 6: 双酶切 pGEX-4T-1-FSHR; 7: 质粒 pGEX-4T-1; 8: 双酶切 pGEX-4T-1-FSHR.

Note: M: DL5000 marker; 1: pGEX-4T-1 plasmid; 2: Double enzyme digestion of pGEX-4T-1; 3: pET30a-FSHR plasmid; 4: Double enzyme digestion of pET30a-FSHR; 5: pET30a plasmid; 6: Double enzyme digestion of pGEX-4T-1-FSHR; 7: pGEX-4T-1 plasmid; 8: Double digestion of pGEX-4T-1-FSHR.

进一步双酶切鉴定重组质粒 pGEX-4T-1-FSHR234, 核酸电泳结果表明目的片段大小与预计值一致, 说明构建成功。

2.2 FSHR234 蛋白表达及其条件优化

FSHR 基因胞外区全长为 702 bp, 蛋白大小约为 52 kD, IPTG 诱导之后有明显的蛋白表达且大小正确(图 2)。由图 3 可以看出, 在不同温度及 IPTG 条件下, 蛋白表达量不同, 最终在 18 °C、0.1 mmol/L IPTG、转速 120 r/min 条件下诱导 16 h 得到可溶性表达较高的 FSHR234, 浓度测定为 0.3 mg/mL。

2.3 FSHR234 结合性检测及其多克隆抗体的鉴定

ELISA 及 Western blot 结果表明, FSHR234 蛋白能与抗 FSHR 单克隆抗体特异性结合。FSHR234 按

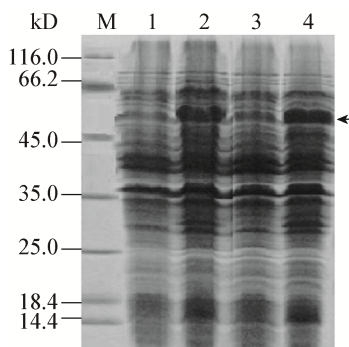


图2 FSHR234 蛋白的诱导表达

Figure 2 Protein expression of FSHR234

注: M: 蛋白 Marker; 1, 3: 未诱导蛋白; 2, 4: 诱导后蛋白。

Note: M: Protein marker; 1, 3: Uninduced proteins; 2, 4: Induced proteins.

300 μg 免疫骆驼, 每 2 周一次, 共免疫 5 次, 得到抗 FSHR 多克隆抗体, 经 ELISA 检测抗体效价达 1:128 000。Planeix 等通过 RT-PCR 已发现在 coav-3 细胞表面具有 FSHR 表达^[10], 本试验利用细胞免疫化学法进一步直观地发现抗 FSHR 抗体在 coav-3 细胞表面的表达。DAB 显色结果表明, 与阴性血清相比, 抗 FSHR234 骆驼多克隆抗体 IgG 在 coav-3 细胞表面具有大量表达(图 4D)。

2.4 利用噬菌体展示技术从骆驼免疫抗体文库中筛选抗 FSHR 纳米抗体

作者前期于新疆大学生物资源基因工程重点实验室建立了骆驼免疫抗体文库, 库容为 8.3×10^6 PFU。本试验采用亲和淘洗法进行了 3 轮筛选, 获得 5 个 VHH 基因序列构建于 pET22b 载体, 并利用 IPTG 诱导表达原核蛋白即为纳米抗体。诱导蛋白分离上清和沉淀, 发现 VHH-3F9 可以在上清和胞间质均表达, 且浓度及纯度较高(图 5A、B), 其余纳米抗体上清表达量较低。经 ELISA 验证纳米抗体结合性表明, 5 个表达的纳米抗体中只有 VHH-3F9 和 VHH-3F19 能与 FSHR234 结合, 且 VHH-3F9 结合能力较高(图 5C), 经测定其温度稳定性得知 VHH-3F9 在 37 °C 处理 12 h 仍保留 70% 的活性。细胞免疫化学实验结果表明 VHH-3F9 纳米抗体和

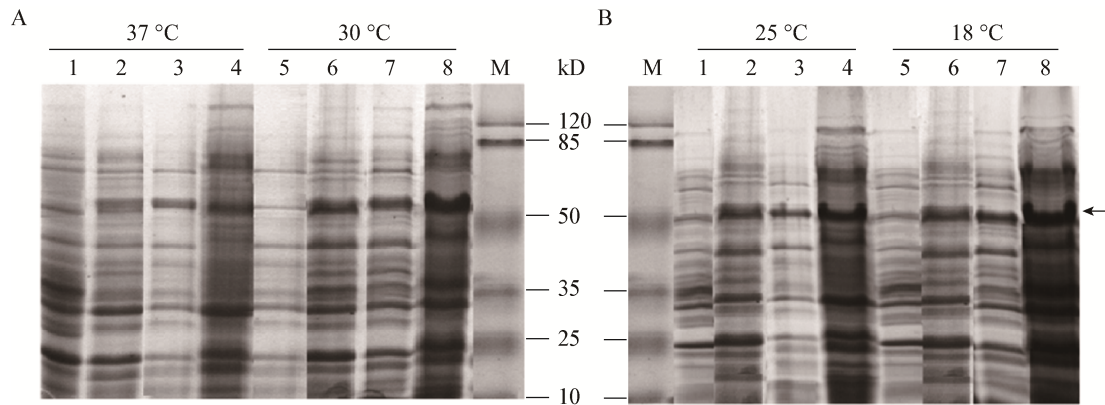


图 3 12% SDS-PAGE 检测条件优化后 FSHR 蛋白表达

Figure 3 Expression of FSHR protein under optimum condition detected by 12% SDS-PAGE

注: A: 1、2、3、4 和 5、6、7、8 分别为 37 °C 和 30 °C 条件下未诱导、诱导、上清、沉淀所表达的蛋白; B: 1、2、3、4 和 5、6、7、8 分别为 25 °C 和 18 °C 条件下的未诱导、诱导、上清、沉淀所表达的蛋白; M: 蛋白 Marker.

Note: A: 1, 2, 3, 4 and 5, 6, 7, 8 are uninduced, induced, supernatant and inclusion-body protein under 37 °C and 30 °C; B: 1, 2, 3, 4 and 5, 6, 7, 8 are uninduced, induced, supernatant and inclusion body protein under 25 °C and 18 °C; M: Protein marker.

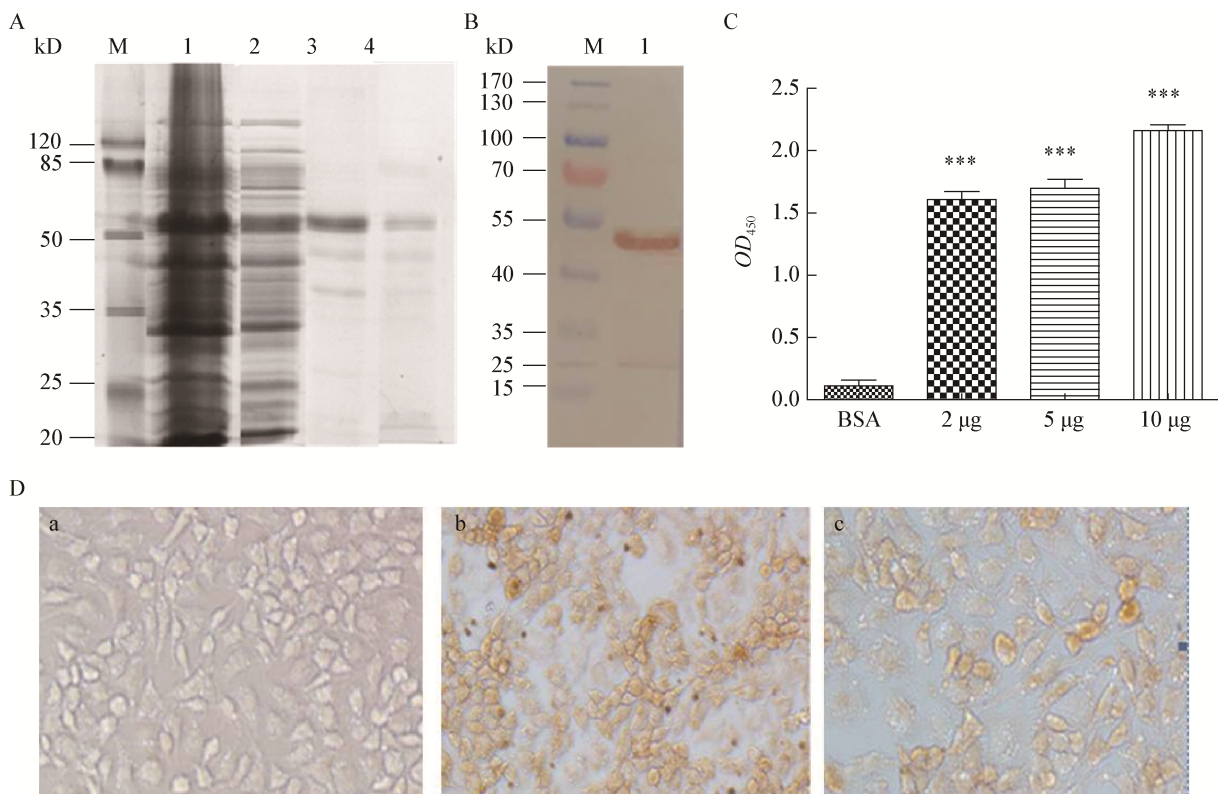


图 4 抗 FSHR 多克隆抗体结合能力的鉴定

Figure 4 Identification of the binding ability of anti-FSHR polyclonal antibody

注: M: 蛋白 Marker. A: FSHR234 纯化结果, 1、2、3、4 分别为粗蛋白、流穿液、洗脱 1、洗脱 2; B: Western blot 结果; C: ELISA 结果, ***: $P < 0.001$; D: 细胞免疫组化结果, a 为阴性对照, b 为抗 FSHR 骆驼多抗, c 为 VHH-3F9 纳米抗体(200×).

Note: M: Protein marker. A: Purification of FSHR234, 1, 2, 3, 4 are crude protein, impure liquid, elution 1 and elution 2; B: Results of Western blot; C: Results of ELISA, ***: $P < 0.001$; D: Cell immunohistochemistry, a is control, b is FSHR polyclonal antibody, c is VHH-3F9 nanobody (200×).

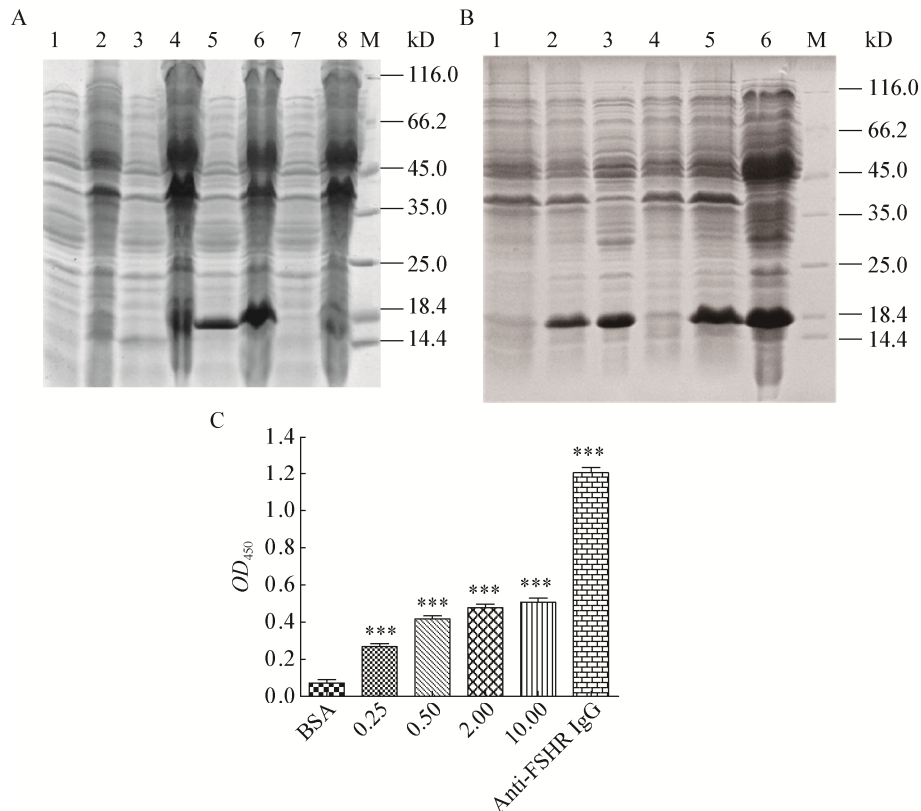


图5 VHH-3F8、VHH-3F10、VHH-3F19、VHH-3F20 以及 VHH-3F9 蛋白表达及抗原结合力检测

Figure 5 The expression of VHH-3F8, VHH-3F10, VHH-3F19, VHH-3F20 and VHH-3F9 proteins and identification of binding capacity

注: M: 蛋白 Marker. A: 1: VHH-3F8 上清蛋白; 2: VHH-3F8 胞间质蛋白; 3: VHH-3F10 上清蛋白; 4: VHH-3F10 胞间质蛋白; 5: VHH-3F19 上清蛋白; 6: VHH-3F19 胞间质蛋白; 7: VHH-3F20 上清蛋白; 8: VHH-3F20 胞间质蛋白. B: 1、4 为未诱导 VHH-3F9 蛋白; 2、5 为 VHH-3F9 上清蛋白; 3、6 为 VHH-3F9 胞间质蛋白. C: ELISA 鉴定 VHH-3F9 与 FSHR234 结合能力, ***: $P < 0.001$.
Note: M: Protein marker. A: 1: Supernatant of VHH-3F8; 2: Intercellular protein of VHH-3F8; 3: Supernatant of VHH-3F10; 4: Intercellular protein of VHH-3F10; 5: Supernatant of VHH-3F19; 6: Intercellular protein of VHH-3F19; 7: Supernatant of VHH-3F20; 8: Intercellular protein of VHH-3F20. B: 1, 4 are uninduced VHH-3F9; 2, 5 are supernatant of VHH-3F9; 3, 6 are intercellular protein of VHH-3F9. C: The combining capacity of VHH-3F9 with FSHR234 by ELISA, ***: $P < 0.001$.

抗 FSHR 骆驼多克隆抗体 IgG 与 coav-3 细胞表面的 FSHR 结合, 且多抗 IgG 结合能力高于 VHH-3F9。

3 讨论与结论

噬菌体展示技术(Phage display technology)可以靶向亲和筛选特异性抗体, 通过抗体的富集可以获得 cDNA 或开放阅读框精确的序列, 在生物医学领域占据重要地位, 是一种经典的制备特异性抗体的方法。通过高度多样化的噬菌体肽库可以获得具有阻断功能及高亲和力的多肽, 目前该技术已用于抗原表位的分析、应用疫苗的制备、新型生物催化剂的选择和研究、酶抑制剂的筛选以及蛋白之间相

互作用的研究。大肠杆菌同样也应用于噬菌体展示技术产生抗体, 通过对噬菌体展示文库的筛选, 可以获得大量与抗原决定簇结合的抗体, 是一种很有效的选择靶抗体的方法。

本试验通过将目的基因构建于不同载体进行蛋白表达, 再经过条件优化获得了可溶性表达的 FSHR234 蛋白。pET22b 载体 N 端携带有 pel-B 信号肽序列, 能够将表达的目的蛋白定位于外周质腔, 也称为胞间质; 同时载体含有 C 端 His 标签, 以便于蛋白的制备和纯化, 避免了大量包涵体的形成, 因此我们将 FSHR 纳米抗体基因构建于 pET22b

载体以提高可溶性表达率。本文经过亚克隆诱导表达了5个抗FSHR纳米抗体VHH-3F8、VHH-3F9、VHH-3F10、VHH-3F19以及VHH-3F20,它们均可在上清和胞间质得到表达,其中VHH-3F9和VHH-3F19表达量较高。本文获得的纳米抗体结合能力不同,可能原因是真核表达的骆驼VHH基因在原核系统中存在机制差异,导致蛋白表达情况各异且在淘洗筛选过程中不免有非特异结合抗体产生。VHH-3F9结合能力较高,主要是因其序列为重复次数最多的克隆序列,很有可能是高度富集的特异结合FSHR的纳米抗体。然而,产生亲和力更高的抗FSHR单抗有待进一步探究。

免疫骆驼产生的多克隆抗体靶点多、效价强,本试验制备了效价较高的抗FSHR多克隆抗体,通过噬菌体展示技术筛选获得了结合能力较高的抗FSHR纳米抗体VHH-3F9,并且在coav-3细胞表面高表达。已有动物实验证实,FSH对骨的吸收产生直接影响,亮丙瑞林(Leuprorelin, LE)是一种常用的激素类抗肿瘤药物,作用于垂体前叶也具有促使FSH、LH释放的功能,LE对OVX大鼠实验性根尖周损伤后牙槽骨丢失有保护作用,FSHR阳性细胞数与牙槽骨丢失面积具有显著相关性^[16]。阻断FSH与其受体FSHR的结合能够抑制骨质流失,不管是临床还是科研领域,力求寻找靶向针对FSHR的单克隆抗体势在必得。本文制备的纳米抗体属于一种单抗,来自骆驼血清的纳米抗体是完全没有轻链的最小功能抗原结合片段,它可以呈现独特的表位并结合到靶抗体的空腔^[17],为今后基于该靶点的临床研究提供有价值的技术参考^[18]。

REFERENCES

- [1] Zhu LL, Blair H, Cao J, et al. Blocking antibody to the β -subunit of FSH prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stimulating bone synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(36): 14574-14579
- [2] Sun L, Peng YZ, Sharrow AC, et al. FSH directly regulates bone mass[J]. Cell, 2006, 125(2): 247-260
- [3] Sun L, Zhang ZY, Zhu LL, et al. Further evidence for direct pro-resorptive actions of FSH[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 394(1): 6-11
- [4] Qin RP, Li LX, Li JW, et al. Inhibition of osteoporosis in ovariectomized rats using follicle-stimulating hormone receptor specific polyclonal antibody[J]. China Biotechnology, 2017, 37(6): 9-16 (in Chinese)
秦瑞坪, 李玲霞, 李江伟, 等. 抗人卵泡刺激素受体多克隆抗体的制备及其对实验大鼠骨质疏松的抑制作用[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(6): 9-16
- [5] Gracia CR, Sammel MD, Freeman EW, et al. Defining menopause status: creation of a new definition to identify the early changes of the menopausal transition[J]. Menopause, 2005, 12(2): 128-135
- [6] Sowers MR, Jannausch M, McConnell D, et al. Hormone predictors of bone mineral density changes during the menopausal transition[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006, 91(4): 1261-1267
- [7] Sowers MR, Zheng HY, Jannausch ML, et al. Amount of bone loss in relation to time around the final menstrual period and follicle-stimulating hormone staging of the transmenopause[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010, 95(5): 2155-2162
- [8] Zhang XY, Hong SS, Kang Y, et al. Expression and purification of the extracellular domain of the human follicle-stimulating hormone receptor using *Escherichia coli*[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2014, 40(2): 501-508
- [9] Wang J, Zhang WW, Yu CX, et al. Follicle-stimulating hormone increases the risk of postmenopausal osteoporosis by stimulating osteoclast differentiation[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134986
- [10] Planeix F, Siraj MA, Bidard FC, et al. Endothelial follicle-stimulating hormone receptor expression in invasive breast cancer and vascular remodeling at tumor periphery[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2015, 34: 12
- [11] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies[J]. Annual Review of Biochemistry, 2013, 82(1): 775-797
- [12] Zhu L, Zhang DP. Advances in the study of natural small molecular antibody[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(10): 1281-1286
- [13] Ghannam A, Kumari S, Muyldermans S, et al. Camelid nanobodies with high affinity for broad bean mottle virus: a possible promising tool to immunomodulate plant resistance against viruses[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(4/5): 355-369
- [14] Urbanska K, Stashwick C, Poussin M, et al. Follicle-stimulating hormone receptor as a target in the redirected T-cell therapy for cancer[J]. Cancer Immunology Research, 2015, 3(10): 1130-1137
- [15] Pawlikowski M. Expression of follicle stimulating hormone receptors in intra-tumoral vasculature and in tumoral cells—the involvement in tumour progression and the perspectives of application in cancer diagnosis and therapy[J]. Endokrynologia Polska, 2018, 69(2): 192-198
- [16] Liu SB, Yong C, Xu WM, et al. Protective effects of follicle-stimulating hormone inhibitor on alveolar bone loss resulting from experimental periapical lesions in ovariectomized rats[J]. Journal of Endodontics, 2010, 36(4): 658-663
- [17] Qiu YL, Li P, Dong S, et al. Phage-mediated competitive chemiluminescent immunoassay for detecting Cry1Ab toxin by using an anti-idiotypic camel nanobody[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(4): 950-956
- [18] Chung HH, Lee JC, Minn I. Follicle-stimulating hormone receptor in gynecological cancers[J]. Molecular & Cellular Toxicology, 2018, 14(1): 1-7