

## 人绒毛膜促性腺激素信号转导和生物学活性测定研究进展

黄盈<sup>1</sup>, 梁成罡<sup>2\*</sup>

(1. 国家药品监督管理局药品审评检查大湾区分中心, 深圳 518045;

2. 中国食品药品检定研究院 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629)

**摘要:** 人绒毛膜促性腺激素(hCG)是人体生殖和代谢过程的重要调节因子。hCG可以用于辅助生殖和治疗不孕不育症,还能用于治疗性功能障碍,如阳痿、隐睾以及侏儒症等,作为内分泌系统药物发挥着不可替代的作用。本文简述了hCG的应用、分子结构、受体结构、信号通路和生物活性检测方法等内容。此外,对hCG药物的发展和生物活性检测方法提出了展望。

**关键词:** 人绒毛膜促性腺激素; 糖蛋白激素; 结构; 受体; 信号通路; 生物活性; 报告基因

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)01-51-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0197

## Research progress on human chorionic gonadotropin

HUANG Ying<sup>1</sup>, LIANG Cheng-gang<sup>2\*</sup>

(1. GBA Center for Medical Device Evaluation and Inspection, NMPA, Shenzhen 518045, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing 102629, China)

**Abstract:** Human chorionic gonadotropin (hCG) is an important regulator of reproductive and metabolic processes in the human body. hCG can be used for assisted reproduction and treatment of infertility. It is also used to treat sexual dysfunctions such as impotence, cryptorchidism, and dwarfism. hCG plays an irreplaceable role as an endocrine system drug. This article briefly describes the applications, molecular structure, receptor structure, signaling pathways and bioactivity assays of hCG. In addition, an outlook on the development of hCG drugs and bioactivity detection methods is presented.

**Keywords:** human chorionic gonadotropin; glycoprotein; structure; receptor; signal pathway; biological activity; report gene

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)属于糖蛋白激素家族(glycoprotein hormones, GPHs)中的一员, GPHs是分子结构复杂, 结构和功能高度相关的一类蛋白激素, 包括hCG、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、促卵泡激素

(follicle-stimulating hormone, FSH)和促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)4种。在20世纪初, Aschern和Zondek进行了第1次妊娠实验, 在这个实验中证实了孕妇血清中含有促性腺激素<sup>[1-4]</sup>。Wislocki等<sup>[5]</sup>在胎盘组织中发现hCG, 并指出hCG

\* 通信作者 Tel: (010) 67095380; E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (0755) 33249888-6661; E-mail: huangying@gbacdei.org.cn

来源于胎盘绒毛膜组织中的 Langhans 细胞。研究发现,将 hCG 注射到未成熟的雌性大鼠体内,会引起卵巢充血、卵巢肥大、卵泡发育、黄体化、刺激类固醇分泌、子宫和阴道上皮增重等变化<sup>[6-7]</sup>。研究者们注意到这种变化,开始分离纯化 hCG 作为药物以用于疾病治疗之中。

一开始主要是从动物尸体的组织中制备得到 hCG,这种来源导致许多缺点,包括制备源尸体的短缺,还有成品的不良免疫反应等<sup>[8]</sup>。在 20 世纪 60 年代初, Gemzell 和 Bettendorf 等报告了第 1 例使用从人类尸体中提取得到的人类垂体促性腺激素成功诱导促性腺功能不足的女性排卵<sup>[9-11]</sup>,从此人垂体促性腺激素在 1958 年至 1988 年间被广泛使用。但是人类垂体糖蛋白激素具有供应原料有限和克雅氏病的风险等问题<sup>[12-13]</sup>,最终也慢慢退出了市场。于是通过有机溶剂沉淀或盐析法从孕妇尿液中分离 hCG,从尿液中提取的比生物活性范围为  $100\sim 3\ 000\text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ <sup>[14-16]</sup>。因为治疗的需求,人们对纯度更高的 hCG 产品需求也上升了,随着基因工程技术的发展,重组人绒毛膜促性腺激素(recombinant human chorionic gonadotropin, rhCG)药物的开发能够克服来源于尿液供应原料有限的问题。有研究表明重组技术生产的 rhCG 产品与尿源提取的 hCG 有效性并无明显差异<sup>[17]</sup>,但是 rhCG 与尿源提取的 hCG 相比更具优势<sup>[18]</sup>。rhCG 通过哺乳动物细胞工程化表达获得,相对来说原料来源稳定,产量有保证,并避免了尿源潜在的感染因子风险。目前国内已上市的 rhCG 产品包括进口国外制造商的 rhCG 产品和国内药企研发生产的 rhCG 产品。rhCG 药物的临床使用日益受到关注。

## 1 hCG 作用与结构

hCG 是由胎盘合体滋养层细胞分泌的,与 LH 结合于同一受体,一般认为作用与 LH 相似。能在早期妊娠的时候,维持黄体不衰退,刺激黄体细胞产生黄体酮,从而使子宫内膜不破裂,保证受精卵着床<sup>[19]</sup>,可以用于治疗习惯性流产和不孕症。此外,还能用于治疗性功能障碍,如阳痿、隐睾以及侏儒症等。hCG 在临床上的另一重要用途,是制备妊娠试剂或免疫试剂,用以测定血、尿中的 hCG 含量,诊断早期妊娠或绒毛膜上皮细胞癌<sup>[20]</sup>。

在 1971 年,人们就发现 GPHs 家族都是由 1 个共同的  $\alpha$  亚基和 1 个激素特异性  $\beta$  亚基通过非共价结合形成的异二聚体<sup>[21-23]</sup>(如图 1)。其中 hCG 和

LH 的  $\beta$  亚基具有高度的序列同源性,二者的  $\beta$  亚基中 82% 的氨基酸相同<sup>[24]</sup>,结合于同一个受体<sup>[25]</sup>。GPHs 中的糖类部分占其总质量的 20%~45%<sup>[26]</sup>,且被证明这部分对其体内生物活性是不可或缺的,因此主要对它们多肽和多糖部分结构进行研究。hCG 是一种高糖基化的蛋白,由妊娠期胎盘产生,也由某些癌细胞表达。hCG 的  $\alpha$  亚基由 92 个氨基酸残基组成,包含 2 个 N 糖基化位点(Asn-52 和 Asn-78),而  $\beta$  亚基由 145 个氨基酸残基组成,分别包含 2 个 N 糖基化位点(Asn-13 和 Asn-30)和 4 个 O 糖基化位点(Ser-121、Ser-127、Ser-132 和 Ser-138)<sup>[27]</sup>。有研究表明,hCG 与受体结合后,hCG 的  $\beta$  亚基分子中 Arg-X-Thr 序列能刺激环磷酸腺苷(cAMP)信号通路,从而使 cAMP 依赖性蛋白激酶磷酸化<sup>[25]</sup>。

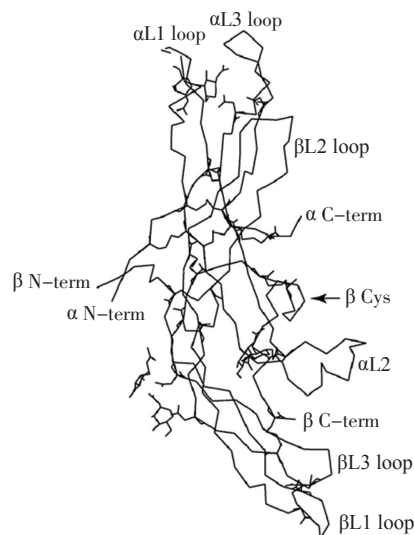


图 1 hCG 的三维结构图<sup>[27]</sup>

Fig. 1 3D structure of hCG

## 2 促黄体生成素 / 绒促性素受体结构

由于 hCG 和 LH 具有相似的  $\beta$  亚基序列,它们与同一受体促黄体生成素 / 绒促性素受体(luteinizing hormone and chorionic gonadotropin receptor, LHCGR)结合。LHCGR 是 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)七跨膜结构域受体超家族中糖蛋白激素受体亚家族中的 A 类 GPCRs<sup>[28]</sup>。LHCGR 主要由 LH 和 FSH 诱导表达<sup>[29-31]</sup>。LHCGR 的 cDNA 编码 1 个 75 kDa 的糖蛋白,包含 674 个氨基酸<sup>[32-33]</sup>,在其 N 端,含有 1 个可裂解的信号序列,负责引导 LHCGR 插入内质网加工蛋白<sup>[34-35]</sup>。成熟的受体由 2 个功能单元组成,细胞外激素结合域和七跨膜结构域。七跨

膜结构域负责传递在胞外结构域收到的信号,并与 G 蛋白结合。N 端胞外结构域的特点是与富集亮氨酸的重复序列 (leucine rich repeat, LRR) 相似,有研究表明这个区域可能对激素的特异性识别起到关键作用<sup>[36]</sup>。受体胞内的 C 端部分由 69 个氨基酸组成,负责蛋白激酶 C 磷酸化和酪氨酸激酶的磷酸化。

有研究对 hCG 晶体结构进行解析,尽管还不能准确地确定 hCG 与 LHCGR 结合的位置,但发现 hCG 的某一特定的区域与受体结合,包含  $\alpha$  亚基长环的螺旋区 ( $\alpha$  40–50) 内高度保守的残基,毗邻 Asn-52 糖侧链和  $\alpha$  亚基的 C 端 ( $\alpha$  88–92),以及  $\beta$  决定性环 ( $\beta$  94–99) 的残基<sup>[37–38]</sup>。有研究通过使用被放射性标记  $\alpha$  或  $\beta$  亚基的 hCG 进行实验,发现  $\alpha$  亚基对结合的影响比  $\beta$  亚基的影响更大,提出了是  $\beta$  亚基通过诱导  $\alpha$  亚基的构象变化来使激素产生特异性的假设<sup>[39]</sup>。在 hCG 与受体结合后,hCG 与跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 相互作用或启动信号转移的胞外结构域构象变化,从而产生激素特异性<sup>[40]</sup>。

hCG 和受体结合后,GPCR 激活效应蛋白使得膜侧细胞质的大规模螺旋运动,包括 TMD 螺旋 5 进行重排,并导致 TMD 螺旋 6 的大规模移位<sup>[41–43]</sup>。此外,对受体-Gi 蛋白复合物的研究表明,TMD 螺旋 6 的较小位移可能会干扰受体与 Gs 蛋白的结合,选择性地与 Gi 蛋白结合<sup>[44]</sup>。TMD 的  $\alpha$  螺旋可能在不同活性构象间切换,最终决定了不同的下游信号通路的激活。激动剂与 GPCR 结合引发受体分子的构象变化,并通过 TMD 传递到细胞内区域,与效应子偶联,与适配器蛋白相互作用,并触发下游的细胞内信号传导。因此,TMD 螺旋的构象变化导致 G 蛋白和其他参与受体信号传导的激活,蛋白的相互作用。当 LHCGR 被 LH 和 hCG 激活时,具有 70 个氨基酸的细胞内 C 端区域和细胞内环与 G 蛋白相互作用,启动下游信号<sup>[22,45]</sup>。Duan 等<sup>[28]</sup>报道了 LHCGR 的 4 种低温电子显微镜结构,揭示了 1 种独特的受体激活的“推拉 (push and pull)”机制,其中胞外的结构域被结合的激素推动,并被跨膜结构域附近的扩展铰链环拉动 (见图 2、3)。TMD 可以调节受体从内质网到质膜的运输以及受体的内化。

此外,有研究表明糖蛋白激素受体的激活可能有 2 种机制。第 1 种是顺式激活机制,配体与参与信号传导的受体胞外结构域高亲和力结合,改变受体胞外结

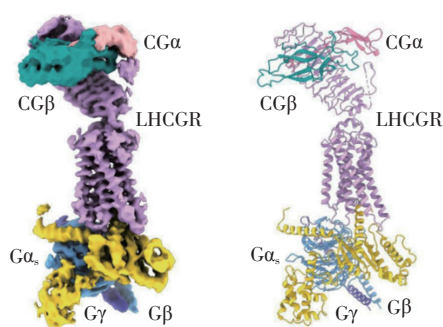


图 2 LHCGR 与 G 蛋白偶联复合物电子密度图与模型图<sup>[28]</sup>

Fig. 2 Electron density map and model map of LHCGR and G-protein coupled complex

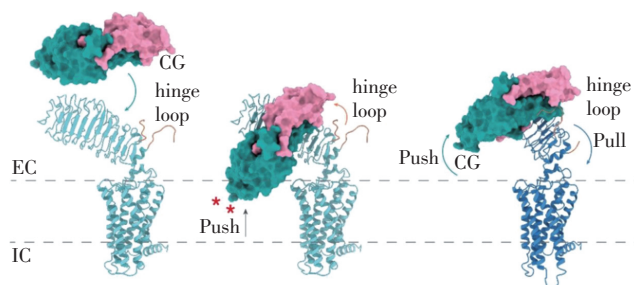


图 3 “推拉 (push and pull)” 机制模式图<sup>[28]</sup>

Fig. 3 “push and pull” mechanism model diagram

构域和胞内结构域之间相互作用,受体的 C 端被激活与 Gs 相互作用。第 2 种是反式激活机制,结合在 1 个受体的胞外结构域的激素与相邻的受体相互作用启动信号传导<sup>[46–47]</sup>。G 蛋白偶联受体是否被顺式或反式激活,可能会影响信号通路的选择。

### 3 hCG 调控信号通路

LHCGR 作为 G 蛋白偶联受体,信号传导途径包括腺苷酸环化酶 / 环磷酸腺苷和磷脂酶 C/InsPs 通路等其他通路的激活,从而将细胞外信号转化为各种细胞内生理反应。

**3.1 Gas/ 环磷酸腺苷 / 蛋白激酶 A 通路** hCG 与 LHCGR 结合后,激活 Gas 蛋白,导致腺苷酸环化酶激活,产生 cAMP 和下游 cAMP 依赖靶点激活<sup>[48]</sup>。cAMP 在细胞内能与 3 类效应物结合,包括鸟嘌呤核苷酸交换因子 (cAMP-GEF)、环核苷酸门控通道 (CNGC) 和蛋白激酶 A (PKA)。cAMP 与 PKA 调控亚基结合,从而促进 C 亚基的解离和激活<sup>[49–51]</sup>。活化后的 C 亚基可以作为磷酸化细胞质底物,也可以从调节亚基锚点释放易位到细胞核,从而控制基因表达。cAMP 应答元件蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 是 PKA 激活的原型转录因子<sup>[52–53]</sup>。有研究

表明, LHCGR 的 cAMP 信号传导在排卵中发挥重要的作用, 控制多种卵泡功能, 包括类固醇生成, 刺激环氧化酶/脂肪氧化酶的表达, 增加前列腺素/白三烯的合成; 以及刺激纤溶酶原激活剂、催化血浆蛋白原转化为血浆蛋白<sup>[54]</sup>。G $\alpha$ s 蛋白在这些环节中起到重要作用。LHCGR 通路的激活, 同时也被认为是 G $\alpha$ s-Ras 的激活<sup>[55-56]</sup>。研究发现, 在原代大鼠间质细胞培养中, 模拟 cAMP 的 8-溴 -cAMP 分子可以通过激活 PKA, 激活 Ras/促分裂原活化蛋白激酶 (MEK) 和细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 1/2 磷酸化<sup>[57-59]</sup>。

LH 或 hCG 与 LHCGR 结合后, 激活的信号通路有差异。对此, 可能是 LHCGR 与其他信号通路耦合, 膜上的信号分支导致了不同的结果。此外, 当 LH 或 hCG 刺激颗粒细胞时, cAMP 信号本身的特性与传递会产生不同的效应, 包括不同的激酶 [如蛋白激酶 B (AKT) 和 ERK] 级联和转录因子, 并最终使不同的基因表达<sup>[60-61]</sup>。有研究发现, hCG 更能刺激产生 cAMP, 而 LH 则更能激活 ERK 和 AKT 磷酸化, 二者对类固醇生成、凋亡和增殖有不同的下游作用<sup>[62-64]</sup>。在雌性体内, LHCGR 与 hCG 结合后, 诱导芳香化酶表达, 通过 G $\alpha$ s/cAMP/PKA 通路刺激颗粒细胞中雌激素的产生。在雄性体内, hCG 通过刺激 G $\alpha$ s/cAMP/PKA 通路产生精子和类固醇, 从而上调类固醇生成急性调节蛋白 (StAR) 的表达<sup>[65-67]</sup>。

**3.2 G $\alpha$ q/11/Ca<sup>2+</sup>/IP3/PKC 通路** 除了传统的 G $\alpha$ s/cAMP/PKA 通路以外, 在不同类型的细胞中, LHCGR 与配体结合后, 也会与 G $\alpha$ q/11 偶联并触发下游通路<sup>[68]</sup>, 该通路仅在排卵前 LH 激增和妊娠期间被激活。在激活该通路后, 磷脂酶 C 作为促进末端颗粒细胞分化的中介物<sup>[69]</sup>。Gudermann 等<sup>[70]</sup>使用克隆的小鼠 LHCGR 受体在 L 细胞中表达, 发现 hCG 与 LHCGR 结合后细胞内 Ca<sup>2+</sup> 增加, 这种变化并不依赖于胞内 cAMP 的水平, 与 hCG 调动 IP3 水平呈正相关。在大鼠 Sertoli 细胞中, 抑制 PKC 可以减少 hCG 诱导的 Ca<sup>2+</sup> 流入<sup>[71]</sup>。不仅如此, 研究发现 G $\alpha$ q 的抑制剂并不能抑制 hCG 对 G $\alpha$ q/11/Ca<sup>2+</sup>/IP3/PKC 通路的调控, 而是 hCG 使 Ca<sup>2+</sup> 内流对该通路进行直接调控<sup>[72-73]</sup>。有研究使用特异性缺失 G $\alpha$ q/11 的颗粒细胞进行实验, 结果表明, 在排卵前的卵泡和黄体中, 卵泡破裂是由于 LHCGR 在敲除 G $\alpha$ q/11 基因的动物中未能完全诱导孕激素受体的表达, 导致动物排卵减少约 50%, 生育能力降低约 85%<sup>[74]</sup>。

虽然 hCG 能够激活 G $\alpha$ q/11/Ca<sup>2+</sup>/IP3/PKC 通路, 但是 LH 对该通路的影响更大, LH 激活该通路后导致一种原始卵泡活化的抑制剂 FOXO3 的磷酸化和失活。磷酸肌醇 -3 激酶 (PI3K) 催化膜磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (PIP2) 转化为第二信使磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 (PIP3), IP3 激活蛋白激酶 B (PKB)<sup>[69]</sup>。

## 4 体外活性测定方法

**4.1 免疫学检测法** 免疫学检测法的原理是抗原抗体的特异性可逆结合反应, 抗体被标记物所标记, 从而能放大检测的信号, 进行物质定性或定量。免疫分析的关键是抗原和抗体的特异性结合, hCG 的  $\beta$  链特异性决定了它的生物学活性和免疫学特性, 所以获取具有对 hCG 的  $\beta$  亚基高特异性的抗体是免疫检测方法的前提。虽然免疫分析法具有灵敏、简便的优点, 但是由于其不能反映受体与配体结合后激发下游细胞效应的特点, 目前多用于临床检测病人血清中的 hCG 或是检测产品中的杂质<sup>[75]</sup>, 不能用于检测药物的生物活性。免疫分析法根据标记物和检测体系可以分为放射免疫分析 (RIA)、酶联免疫吸附分析 (ELISA)、荧光免疫分析 (FIA) 和化学发光免疫分析 (CLIA) 等。

最初对 hCG 使用免疫学检测方法使用 hCG 二聚体抗体, 二聚体抗体同时检测 hCG 和 LH。1973 年, Vaitukaitis 等<sup>[76]</sup>引入检测 hCG 的  $\beta$  亚基概念, 开发出使用 hCG  $\beta$  亚基抗血清的 RIA 法检测 hCG。20 世纪 90 年代开始, 我国有学者研制了 hCG 的放射免疫分析试剂盒并颁布了放射免疫分析试剂盒使用的行业标准<sup>[77]</sup>。但是, 由于 RIA 要使用放射性核素进行实验, 具有对环境和操作人员有危害的缺点, 近年来已较少使用该方法。相对于体内生物活性测定来说, 免疫分析的高灵敏度, 很大程度是因为抗体对 hCG 特异性的  $\beta$  亚基表位具有高度特异性。而且免疫分析使用的抗体标签的多样化, 可以是 125I (RIA), 和其他非放射性分子, 如荧光剂 (FIA)、酶 (ELISA) 或化学发光分子 (CLIA)。Oed 等<sup>[78]</sup>开发了一种利用化学发光和顺磁性颗粒的免疫分析方法检测 hCG, 对 hCG 进行快速定量测定。随着这些技术的发展, 不同的免疫分析方法被开发, 用来测定 hCG 的体外生物学活性。然而, 这些方法用于测定生物活性的对象从垂体提取物、血清的样本、纯化标准制剂到现在使用重组技术生产的制剂, 会出现不同的样本来源或者不同的方法之间存在较大差异的问题。原

因可能是 hCG 结构的复杂,如分子异构体与天然激素竞争受体结合;也可能与样本中不同的糖蛋白激素的  $\beta$  亚基单位间的交叉作用有关<sup>[79]</sup>。Dattatreya<sup>[80]</sup> 开发出一种“<sup>125</sup>I-hLH+ 抗 oLH 血清”异源放射免疫分析法,特异性和选择性地测定同时含有 hLH 和 hCG 的血清样本,解决 hCG 和 LH  $\beta$  亚基交叉反应的问题。目前有学者在研究中对 hCG 纯化,再通过 SDS-PAGE 表征,用尿素处理方法将 hCG 分为  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基,将 hCG  $\beta$  亚基注射到家兔体内,生产高特异性的多克隆抗 hCG  $\beta$  亚基血清,以便免疫分析方法的使用<sup>[81]</sup>。

**4.2 体外细胞检测法** hCG 的体外生物学测定法自 20 世纪 70 年代开始就有研究报道,这些方法是在 hCG 对性腺细胞作用的基础上,对细胞受到 hCG 刺激后产生的产物进行检测。有学者基于胶原酶分散的大鼠睾丸间质细胞对 hCG 刺激反应产生睾酮的原理,对睾酮进行平行剂量-反应曲线分析得出 hCG 的生物活性,建立了一种 hCG 的体外生物测定方法<sup>[82]</sup>。并对该方法与 hCG 放射免疫法的结果进行比较,结果的检测灵敏度、RSD 和回收率均优于免疫法<sup>[83]</sup>。Selvaraj 等<sup>[84]</sup> 利用永生化的类固醇生成颗粒细胞,该细胞表达的 LHCGR 是原代细胞的 5~10 倍,受 hCG 刺激能产生 cAMP 和孕酮,通过检测 cAMP 和孕酮的 ED<sub>50</sub> 值从而测定 hCG 的生物活性。

Hsueh 等<sup>[85]</sup> 在切除垂体且未发育的雌性大鼠的颗粒细胞中,研究了 6 种哺乳动物的促性腺激素刺激雌激素和孕酮产生的能力。他们发现大鼠、羊、牛和猪的 LH 和来源于人的 hCG、LH 都可以刺激颗粒细胞产生雌激素和孕酮,于是培养大鼠颗粒细胞系统作为检测 hCG 活性的平台。这些体外生物活性测定方法都主要是通过检测细胞受到 hCG 刺激后的下游效应物以检测其生物学活性,但是此类方法也存在缺点,如无法比较 hCG 的生物学半衰期,且仅有 1 个生化测定终点,并且其变异度高和灵敏度低,对不同的糖蛋白激素专属性不强。分子生物学以及基因工程技术的发展,hCG 与受体结合后,在细胞内激活的信号通路的相关研究,为使用体外细胞检测 hCG 的方法提供了新的思路。

通过对 hCG 作用机制的深入研究,包括受体的激活、信号通路和最终的效应,可以构建 1 个与 hCG 特异性反应的转基因细胞系,其中报告基因法 (RGAs) 是目前比较常见的转基因细胞系活性测定

方法<sup>[86]</sup>。报告基因法是利用基因工程技术将报告基因元件转入到宿主细胞中,通过信号通路的调控,使报告基因随着目的基因序列的调控而表达,表达的产物可以直接释放信号或者催化特定的酶促反应间接释放信号,使用特定的方法检测。该方法可以直观表达出细胞内与目的基因有关的信号级联<sup>[87]</sup>,通过目的基因表达的变化测定生物学活性。报告基因法相对于体内法而言,在专属性、灵敏度、精密度和线性等方面都更具优势,整个实验所需时间短,符合 3R 原则,是动物体内实验的 1 种可行的替代实验方案。

同属于 GPHs 的 FSH 和 TSH 现均已有的建立的报告基因法,原理是根据 GPHs 经典的 G 蛋白激活 cAMP 的信号通路,构建有特异的 GPHRs 细胞系和 cAMP 应答元件 (CRE) 的荧光素酶报告基因载体。例如基于转染了 TSHR 和 CRE 荧光素酶报告基因的 CHO 细胞系,可以检测 TSH 的生物活性,且 RSD 约为 25%,比传统的 RIA 方法具有所需时间少和高通量的优点<sup>[88]</sup>。还有在 CHO 细胞系中转染 FSHR 和 CRE 荧光素酶报告基因的质粒,经过筛选和功能验证后,建立了可以检测 rhFSH<sup>[89]</sup> 和 rhFSH-Fc<sup>[90]</sup> 的生物活性的方法。在现有的其他 GPHs 建立的报告基因法的基础上,根据 hCG 与受体结合后调控的信号通路建立特异性的报告基因法具有可行性。

## 5 总结与展望

hCG 作为一种治疗药物,在生殖疾病治疗中发挥着关键的作用。随着对该药物需求量的增加和生物技术的发展,更多的厂家生产和上市 hCG 药物,在这过程中,对 hCG 药物的生物活性测定是对该药物质量控制至关重要的一步。现有的生物活性测定方法主要依赖于动物体内实验,2020 年版《中华人民共和国药典》中收录的 hCG 的生物测定法是小鼠子宫增重法,但是动物实验存在着动物个体间差异大,定量难,实验周期长,花费多等问题。由于报告基因法具有更简便,准确定量,高通量等优点,近年来已应用到许多生物制品的生物活性检测中。报告基因法在药物诱导信号通路的活化后,通过对报告基因信号的检测,能够快速表征相关信号的激活,从而利用该优势直观表达药物的生物活性。基于此,本文通过对 hCG 的结构、信号通路和 LHCGR 结构以及国内外 hCG 的生物活性测定方法进行总结,以期更高效检测手段替代原有的 hCG 生物活性测定方法的研究提供参考。

## 参考文献

- [ 1 ] ZONDEK B, ASCHEIM S. Das hormon des hypophysenvorderlappens: testobjekt zum nachweis des hormons [ J ]. *Klin Wochenschr*, 1927, 6(6): 248
- [ 2 ] ZONDEK B. The formation of the corpus luteum is dependent on the anterior pituitary lobe, and not on the maturing ovum. The fertilized ovum and hormones [ J ]. *J Physiol*, 1934, 81(4): 472
- [ 3 ] ZONDEK B. The effect of prolonged application of large doses of follicular hormone on the uterus of rabbits [ J ]. *J Exp Med*, 1936, 63(6): 789
- [ 4 ] ZONDEK B. Hypophyseal tumors induced by estrogenic hormone [ J ]. *Am J Cancer*, 1938, 33: 555
- [ 5 ] LUNENFELD B, ESHKOL A. Immunology of human chorionic gonadotropin (HCG) [ J ]. *Vitam Horm*, 1967, 25: 137
- [ 6 ] DICZFALUSY E, HEINRICHS HD. Determination of gonadotropins [ J ]. *Arch Gynakol*, 1956, 187: 556
- [ 7 ] BORELL U, DICZFALUSY E, WESTMAN A. Failure of human chorionic gonadotrophins to increase the uterine weight in spayed mice. [ J ]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1953, 12: 323
- [ 8 ] LUNENFELD B. Development of gonadotrophins for clinical use [ J ]. *Reprod Biomed Online*, 2002, 4(1): 11
- [ 9 ] GEMZELL CA, DICZFALUSY E, TILLINGER G. Clinical effect of human pituitary follicle stimulating hormone [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1958, 18(12): 138
- [ 10 ] BETTENDORF G. Human hypophyseal gonadotropin in hypophysectomized women [ J ]. *Int J Fertil*, 1963, 8: 799
- [ 11 ] BETTENDORF G, APOSTOLAKIS M, VOIGT KD. Darstellung von gonadotropin aus menschlichen hypophysen [ J ]. *Eur J Endocrinol*, 1962, 41(1): 1
- [ 12 ] COCHIUS JI, MACK K, BURNS RJ. Creuzfeld-Jakob disease in a recipient human pituitary derived gonadotrophin [ J ]. *Aust N Z J Med*, 1990, 20(4): 592
- [ 13 ] DEVROEY P, VAN SA, MANNAERTS B, *et al.* Successful *in-vitro* fertilization and embryo transfer after treatment with recombinant human FSH [ J ]. *Lancet*, 1992, 339(8802): 1170
- [ 14 ] GOT R, LEVY G, BOURRILLON R. Immunoelectrophoretic analysis of human chorionic gonadotropins [ J ]. *Experientia*, 1959, 15: 480
- [ 15 ] LUNENFELD B. The problems of immunological quantitative determination for gonadotropins [ J ]. *Immunol Propert Protein Hormon*, 1966: 81
- [ 16 ] LUNENFELD B, ESHKOL A. Immunology of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone [ J ]. *Vitam Horm*, 1970, 27: 131
- [ 17 ] BAGCHUS W, WOLNA P, WOLFGANG U. Single-dose pharmacokinetic study comparing the pharmacokinetics of recombinant human chorionic gonadotropin in healthy Japanese and Caucasian women and recombinant human chorionic gonadotropin and urinary human chorionic gonadotropin in healthy Japanese women [ J ]. *Reprod Med Biol*, 2018, 17(1): 52
- [ 18 ] EFTEKHAR M, KHALILI MA, RAHMANI E. The efficacy of recombinant versus urinary HCG in ART outcome [ J ]. *Iran J Reprod Med*, 2012, 10(6): 543
- [ 19 ] 北京医学院生理教研组生殖研究组. 关于人类绒毛膜促性腺激素 [ J ]. *北京大学学报 (医学版)*, 1974(2): 132  
Beijing Medical College Physiology Teaching and Research Group Reproductive Research Group. About human chorionic gonadotropin [ J ]. *J Peking Univ (Health Sci)*, 1974(2): 132
- [ 20 ] 胡晋桂. 人绒毛膜促性腺激素的研究和应用概况 [ J ]. *右江民族医学院学报*, 1990, 12(4): 43  
HU JG. Research and application of human chorionic gonadotropin [ J ]. *J Youjiang Med Univ Nat*, 1990, 12(4): 43
- [ 21 ] CAHOREAU C, KLETT D, COMBARNOUS Y. Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors [ J ]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 26
- [ 22 ] ULLOA-AGUIRRE A, ZARIÑÁN T, JARDÓN-VALADEZ E, *et al.* Structure-function relationships of the follicle-stimulating hormone receptor [ J ]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 707
- [ 23 ] SZKUDLINSKI MW, FREMONT V, RONIN C, *et al.* Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships [ J ]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 473
- [ 24 ] HERKERT D, MELJEN V, MUASHER L, *et al.* Human chorionic gonadotropin—a review of the literature [ J ]. *Obstet Gynecol Surv*, 2022, 77(9): 539
- [ 25 ] RYAN RJ, CHARLESWORTH MC, MCCORMICK DJ, *et al.* The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships [ J ]. *FASEB J*, 1988, 2(11): 2661
- [ 26 ] BOUSFIELD GR, BUTNEV VY, GOTSCHALL RR, *et al.* Structural features of mammalian gonadotropins [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 125(1-2): 3
- [ 27 ] LI DY, ZHANG P, LI F, *et al.* Recognition of *N*-glycoforms in human chorionic gonadotropin by monoclonal antibodies and their interaction motifs [ J ]. *J Biol Chem*, 2015, 290(37): 22715
- [ 28 ] DUAN J, XU PY, CHENG X, *et al.* Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes [ J ]. *Nature*, 2021, 598(7882): 688
- [ 29 ] HALVORSON LM, CHIN WW. Gonadotropic hormones: biosynthesis secretion, receptors and actions [ J ]. *Reproduct Endocrinol*, 1999, 81
- [ 30 ] DUFAU ML. Endocrine regulation and communicating function of the Leydig cell [ J ]. *Annu Rev Physiol*, 1988, 50: 483
- [ 31 ] SAEZ JM. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation [ J ]. *Endocr Rev*, 1994, 15(5): 574
- [ 32 ] MCFARLAND KC, SPRENGEL R, PHILLIPS HS, *et al.* Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G-coupled receptor family [ J ]. *Science*, 1989, 245(4917): 494
- [ 33 ] MAC-MAHON B, COLE P, LIU M, *et al.* Age at birth and breast cancer risk [ J ]. *Bull World Health Organ*, 1970, 43(2): 209
- [ 34 ] TSAI-MORRIS CH, WEI W, BUCZKO E. Promoter and regulatory regions of the rat luteinizing hormone receptor gene [ J ]. *J Biol Chem*, 1993, 268(6): 18267

- [ 35 ] WANG Z, WANG H, ASCOLI M. Mutation of highly conserved acidic residue present in the second intracellular loop of G-protein-coupled receptors does not impair hormone binding or signal transduction of the luteinizing hormone chorionic gonadotropin receptor [ J ]. *Mol Endocrinol*, 1993, 7(1): 85
- [ 36 ] BAXTER RC, MARTIN JL, BENIAC VA. High molecular weight insulin like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum [ J ]. *J Biol Chem*, 1989, 264(20): 11843
- [ 37 ] LATRONICO AC, ANASTI J, ARNHOLD IVP, *et al.* Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene [ J ]. *N Engl J Med*, 1996, 334(8): 507
- [ 38 ] WU H, LUSTBADER JW, LIU Y, *et al.* Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein [ J ]. *Structure*, 1994, 2(6): 545
- [ 39 ] KUSUDA S, DUFAU ML. Purification and characterization of the rat ovarian receptor for luteinizing hormone: structural studies and subunit interaction [ J ]. *J Biol Chem*, 1986, 261(34): 16161
- [ 40 ] MOYLE WR, CAMPBELL RK, VENKATESWARA R, *et al.* Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of glycoprotein hormones [ J ]. *J Biol Chem*, 1995, 270(34): 20020
- [ 41 ] DEUPI X, STANDFUSS J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors [ J ]. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(4): 541
- [ 42 ] SANSUK K, DEUPI X, TORRECILLAS IR, *et al.* A structural insight into the reorientation of transmembrane domains 3 and 5 during family A G protein-coupled receptor activation [ J ]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(2): 262
- [ 43 ] STANDFUSS J, EDWARDS PC, D'ANTONA A, *et al.* The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin [ J ]. *Nature*, 2011, 471(7340): 656
- [ 44 ] DRAPER-JOYCE CJ, KHOSHOUEI M, THAL DM, *et al.* Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor-Gi complex [ J ]. *Nature*, 2018, 558(7711): 559
- [ 45 ] BORGBO T, CHRUDIMSKA J, MACEK M, *et al.* The polymorphic insertion of the luteinizing hormone receptor “insLQ” show a negative association to LHR gene expression and to the follicular fluid hormonal profile in human small antral follicles [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 460: 57
- [ 46 ] CLAYTON RN. Gonadotrophin receptors [ J ]. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab*, 1996, 10(1): 1
- [ 47 ] JI I, LEE C, SONG Y, *et al.* Cis- and trans-activation of hormone receptors: the LH receptor [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(6): 1299
- [ 48 ] ULLOA-AGUIRRE A, URIBE A, ZARINAN T, *et al.* Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in G (alpha S) protein coupling and receptor expression [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 260-262: 153
- [ 49 ] SUNAHARA RK, DESSAUER CW, GILMAN AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases [ J ]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996, 36: 461
- [ 50 ] KAWASAKI H, SPRINGETT GM, TOKI S, *et al.* A rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(22): 13278
- [ 51 ] DE ROOIJ J, ZWARTKRUIS FJ, VERHEIJEN MH, *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP [ J ]. *Nature*, 1998, 396(6710): 474
- [ 52 ] BROILLET MC, FIRESTEIN S. Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation [ J ]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 868: 730
- [ 53 ] FRANCIS SH, CORBIN JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action [ J ]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1999, 36(4): 275
- [ 54 ] ULLOA-AGUIRRE A, REITER E, CREPIEUX P. FSH receptor signaling: complexity of interactions and signal diversity [ J ]. *Endocrinology*, 2018, 159(8): 3020
- [ 55 ] CONTI M, HSIEH M, ZAMAH AM, *et al.* Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 356(1-2): 65
- [ 56 ] LEMAIRE WJ. Mechanism of mammalian ovulation [ J ]. *Steroids*, 1989, 54(5): 455
- [ 57 ] GILCHRIST RL, RYU KS, JI I, *et al.* The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals [ J ]. *J Biol Chem*, 1996, 271(32): 19283
- [ 58 ] MEJIA R, WAITE C, ASCOLI M. Activation of Gq/11 in the mouse corpus luteum is required for parturition [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(2): 238
- [ 59 ] BREEN SM, ANDRIC N, PING T, *et al.* Ovulation involves the luteinizing hormone-dependent activation of G (q/11) in granulosa cells [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(9): 1483
- [ 60 ] RICHARDS JS. Perspective: the ovarian follicle—a perspective in 2001 [ J ]. *Endocrinology*, 2001, 142(6): 2184
- [ 61 ] RICHARDS JS, FITZPATRICK SL, CLEMENS JW, *et al.* Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones signals and regulated genes [ J ]. *Recent Prog Horm Res*, 1995, 50: 223
- [ 62 ] FENG XY, ZHANG ML, GUAN RB, *et al.* Heterodimerization between the lutropin and follitropin receptors is associated with an attenuation of hormone-dependent signaling [ J ]. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3925
- [ 63 ] JONAS KC, CHEN S, VIRTA M, *et al.* Temporal reprogramming of calcium signalling via crosstalk of gonadotrophin receptors that associate as functionally asymmetric heteromers [ J ]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2239
- [ 64 ] CASARINI L, RICCETTI L, DE PASCALI F, *et al.* Folliclestimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human

- granulosa-lutein cells *in vitro* [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 422: 103
- [ 65 ] BUSCA R, ABBE P, MANTOUX F, *et al.* Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes [ J ]. *EMBO J*, 2000, 19(12): 2900
- [ 66 ] TSYGANKOVA OM, KUPPERMAN E, WEN W, *et al.* Cyclic AMP activates Ras [ J ]. *Oncogene*, 2000, 19(32): 3609
- [ 67 ] SCHMITT JM, STORK PJS. G alpha and G beta gamma require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and ras [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277(45): 43024
- [ 68 ] LIN YF, TSENG MJ, HSU HL, *et al.* A novel follicle-stimulating hormone-induced G alpha h/phospholipase C-delta1 signaling pathway mediating rat sertoli cell Ca<sup>2+</sup>-influx [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(10): 2514
- [ 69 ] CHOI J, SMITZ J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 383: 203
- [ 70 ] GUDERMANN T, BIRNBAUMER M, BIRNBAUMER L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells [ J ]. *J Biol Chem*, 1992, 267(7): 4479
- [ 71 ] CREPIEUX P, MARION S, MARTINAT N, *et al.* The ERKdependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation [ J ]. *Oncogene*, 2001, 20: 4696
- [ 72 ] YAMASHITA Y, OKAMOTO M, IKEDA M, *et al.* Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation [ J ]. *Endocrinology*, 2014, 155(3): 1080
- [ 73 ] CASARINI L, CREPIEUX P. Molecular mechanisms of action of FSH [ J ]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 305
- [ 74 ] BREEN SM, ANDRIC N, PING T, *et al.* Ovulation involves the luteinizing hormone-dependent activation of G (q/11) in Granulosa cells [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(9): 1483
- [ 75 ] 李湛军, 梁成罡, 杨化新. 重组人促卵泡激素质量控制中理化测定代替生物测定简介 [ J ]. *药物分析杂志*, 2014, 34(9): 1524
- LI ZJ, LIANG CG, YANG HX. Physicochemical methods alternative for bioassays for recombinant human follicle-stimulating hormone in quality control [ J ]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(9): 1524
- [ 76 ] VAITUKAITIS JL, BRAUNSTEIN GD, ROSS GT. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone [ J ]. *Am J Obstet Gynecol*, 1972, 113(6): 751
- [ 77 ] EJ/T 950-1995 人绒毛膜促性腺激素放射免疫分析试剂盒 [ S ]. 1995: 1
- EJ/T 950-1995 Human Chorionic Gonadotropin Radioimmunoassay Kit [ S ]. 1995: 1
- [ 78 ] OED M, AMTMANN R, LÖWER Y, *et al.* LIAISON hCG—an automated chemiluminescent immunoassay for the determination of human chorionic gonadotropin (hCG) [ J ]. *Anticancer Res*, 1999, 19(4A): 273
- [ 79 ] SIMONI M, NIESCHLAG E. *In vitro* bioassays of follicle-stimulating hormone: methods and clinical applications [ J ]. *J Endocrinol Invest*, 1991, 14(11): 983
- [ 80 ] DATTATREYAMURTY B, SHETH AR, PURANDARE TV, *et al.* Nature of cross-reaction between hCG and anti-oLH serum and development of a radioimmunoassay to measure hLH specifically in the presence of hCG [ J ]. *Endocrinology*, 1976, 99(66): 1554
- [ 81 ] ELSHEIKH HM, HAMDY GM, EBEID NH, *et al.* Effective purification of human chorionic gonadotropin and production of highly specific polyclonal anti-βHCG as a component of radioimmunoassay kit [ J ]. *J Immunoassay Immunochem*, 2022, 43: 233
- [ 82 ] DUFAU ML, POCK R, NEUBAUER A, *et al.* *In vitro* bioassay of LH in human serum: the rat interstitial cell testosterone (RICT) assay [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1976, 42(5): 958
- [ 83 ] MADANES AE, FENCL MD, TULCHINSKY D. Comparison of human chorionic gonadotropin measurements by radioimmunoassay and *in vitro* bioassay [ J ]. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1985, 9(2): 52
- [ 84 ] SELVARAJ N, DANTES A, LIMOR R, *et al.* Establishment of an *in vitro* bioassay and radio receptor assay for LH/CG in human sera using immortalized granulosa cells transfected with LH/CG receptor [ J ]. *Endocrine*, 1996, 5(3): 275
- [ 85 ] HSUEH AJ, ERICKSON GF, PAPKOFF H. Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by cultured rat granulosa cells [ J ]. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 225(2): 505
- [ 86 ] 于雷, 饶春明. 生物技术药物生物学活性测定方法研究进展 [ J ]. *生物技术通讯*, 2017, 28(3): 392
- YU L, RAO CM. Research progress in bioassay of biotech drugs [ J ]. *Lett Biotechnol*, 2017, 28(3): 392
- [ 87 ] WANG L, YU CF, WANG JZ. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals [ J ]. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107466
- [ 88 ] SENDAK RA, WANG F, GEAGAN LB, *et al.* Comparison of two *in vitro* methods for the measurement of recombinant human TSH bioactivity [ J ]. *Biologicals*, 2002, 30(3): 245
- [ 89 ] WANG LY, LIANG CG, YANG HM, *et al.* Development of a robust reporter gene-based assay for the bioactivity determination of recombinant human follicle stimulating hormone (rhFSH) pharmaceutical products [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177: 112855
- [ 90 ] 孙爽, 王绿音, 李晶, 等. 基于报告基因的重组人促卵泡激素 Fc 融合蛋白生物学活性测定方法研究 [ J ]. *药物分析杂志*, 2022, 42(1): 60
- SUN S, WANG LY, LI J, *et al.* Study on biological activity assay of fusion protein of rhFSH-Fc based on the reporter gene [ J ]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(1): 60

(本文于 2024 年 3 月 26 日收到)