·实验研究·

基于人卵巢颗粒细胞 KGN 建立的卵泡刺激素体外生物活性效价测定法

吴彦霖[1],张铭露[1],张　媛[1],万龙岩[2],汪佩华[2],蔡　彤[1],高　华[1]
(1 中国食品药品检定研究院,北京 102629;2 上海丽珠制药有限公司,上海 201206)

[摘要] **目的**:基于哺乳动物体内激素具有刺激卵巢颗粒细胞产生黄体酮(孕酮)的机理,建立尿促性素(human menopausal gonadotropin,HMG)刺激人卵巢颗粒细胞 KGN 分泌孕酮(progesterone,PG)法,用于评价 HMG 中活性成分卵泡刺激素(follicle stimulating hormone,FSH)的效价。**方法**:用不同浓度的 HMG 溶液刺激 KGN 细胞,检测分泌上清中的 PG 含量,建立 FSH 的体外生物学活性效价测定方法;参照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 9101 分析方法验证和 9401 生物制品生物活性/效价测定方法,验证指导原则对所建立的方法进行专属性、精密度、耐用性等方法学研究;以 HMG 国家标准品作为基准,检测 HMG 国际标准品和制剂(合格和不合格)的效价。**结果**:不同浓度的 HMG 作用 KGN 细胞后具有时间和剂量依赖性。**结论**:本方法的专属性、精密度和耐用性符合《中华人民共和国药典》四部通则的要求;以 HMG 国家标准品为基准,能有效检测 HMG 国际标准品和注射用 HMG 的效价,与药典方法一致。

[关键词] 人卵巢颗粒细胞;尿促性素;卵泡刺激素;孕酮;方法验证
[中图分类号] R963　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2021)14－1316－07

Establishment of a bioassay for follicle stimulating hormone titer *in vitro* based on human ovarian granulosa cells KGN

WU Yan-lin[1], ZHANG Ming-lu[1], ZHANG Yuan[1], WAN Long-yan[2], WANG Pei-hua[2], CAI Tong[1], GAO Hua[1]
(1 *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*; 2 *Shanghai Li Zhu Pharmacy Ltd.*, *Shanghai* 201206, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a method of stimulating human ovarian granulosa cells KGN to secrete progesterone (PG) by human menopausal gonadotropin (HMG), based on the mechanism of estrogen stimulating the production of progesterone in ovarian granulosa cells in mammalian, to evaluate the titer of follicle-stimulating hormone (FSH), the active component of HMG. **Methods**: KGN cells were stimulated with different concentrations of HMG solution, the content of PG in the secreted supernatant was detected, and the biological activity assay of FSH *in vitro* was established. According to the 9101 analysis method verification and 9401 biological products bioactivity/potency determination method verification guiding principles in the General Rules of the fourth part of Chinese Pharmacopoeia, the established method was validated in terms of specificity, precision and durability. The national standard of HMG was used as the benchmark to detect the potency of HMG international standard and preparation (qualified and unqualified). **Results**: Different concentrations of HMG displayed effect on KGN cells in a time- and dose-dependent manner. **Conclusion**: The specificity, precision and durability of the method meet the requirements of the General Principles of the fourth part of Chinese Pharmacopoeia. Based on HMG national

[基金项目] 国家药典委员会药品标准提高研究课题资助项目(2020Y06)
[作者简介] 吴彦霖,女,博士,副研究员,主要从事药检药理研究。联系电话:(010)53851590,E-mail:wyljoe@126.com。张铭露,女,硕士研究生,主要从事药检药理研究。E-mail:zhangminglu9@163.com。
[通讯作者] 高华,女,博士,研究员,主要从事药检药理研究。联系电话:(010)53851589,E-mail:huag55@163.com。蔡彤,女,硕士,主任药师,主要从事药检药理研究。联系电话:(010)53851592,E-mail:teddyct@163.com。

standard, the titers of HMG international standard and HMG for injection can be effectively determined, with consistent results with the pharmacopoeia method.

[**Key words**] human ovarian granulosa cell; human menopausal gonadotropin; follicle stimulating hormone; progesterone; method validation

卵巢(ovarian)由卵泡组成,卵泡是由卵母细胞、颗粒细胞和卵泡膜细胞组成。其中颗粒细胞协助卵母细胞摄取多种小分子代谢物质(如能量底物、核苷酸和氨基酸等),在卵泡的发育过程中起着重要的作用[1]。雌激素是雌性动物生殖过程必不可少的类固醇激素,主要由卵巢分泌,在卵巢颗粒细胞内合成[2]。尿促性素(menotrophin)2000 年收载于《中华人民共和国药典》并沿用至今,又称人绝经期促性腺激素(human menopausal gonadotropin, HMG),为绝经期妇女尿液中提取物,是人体内垂体前叶分泌的天然促性腺激素,具有促卵泡生成和黄体生成 2 种作用,主要含 2 种活性成分:卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(luteinzing hormone, LH)[3]。FSH 和 LH 都是由垂体前叶分泌的糖蛋白,其中 FSH 具有调节脊椎动物性腺发育、促进雌激素生成和分泌的激素类物质的功能[4]。LH 在性腺功能中也起重要作用,刺激黄体酮转化为雄激素,雄激素再进一步芳香化为雌激素。FSH 与 LH 协同作用,刺激卵巢或睾丸中生殖细胞的发育及性腺激素的生成和分泌,促进性成熟[5-6]。

有研究表明,人卵巢颗粒细胞 KGN 具有表达 FSH 受体的功能,即在 FSH 的刺激下 KGN 细胞可增殖、分化以及分泌类固醇激素[7]。卵巢颗粒细胞也是合成雌二醇(estrodiol)和孕酮(progesterone, PG)激素的重要场所,为生殖器官发育完全奠定基础[8]。PG 是机体产生的天然孕激素,它主要由卵巢分泌,与雌二醇激素协同维持雌性动物的生殖周期。在合成雌二醇激素时,卵巢颗粒细胞需要与相邻卵泡膜细胞共同合作完成,不依赖其他细胞[9]。PG 含量高低是反映卵巢功能是否正常的一个指标[10]。体外卵巢颗粒细胞分泌 PG 含量可以模拟体内实际反应,因此,建立体外 FSH 刺激卵巢颗粒细胞分泌 PG 的方法可进行 FSH 生物效价测定。

材料与方法

1 药物与试剂

DMEM/F12 培养基(批号:11330-032)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号:10099-141C)、0.25% Trypsin-EDTA(批号:25200-056)均购自 Gibco 公司;5th-人绝经尿促性腺素(human menopausal gonadotropin, HMG)国家标准品(national standard, NS, 批号:150524-201805)、FSH(规格:220 IU·支$^{-1}$)、LH(规格:203 IU·支$^{-1}$)、人绒毛促性腺激素(human choionic gonadotophin, HCG)国家标准品(批号:150513-200409,规格:60 IU·支$^{-1}$)购自中国食品药品检定研究院;5th-HMG(follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, human, urinary, for bioassay)国际标准品(international standard, IS, 批号:10/286)、FSH(规格:183 IU·支$^{-1}$)、LH(规格:177 IU·支$^{-1}$)、1st-LH(luteinizing hormone, human, recombinant)国际标准品(批号:96/602,规格:189 IU·支$^{-1}$)购自英国国家生物制品检定所(NIBSC);赋形剂(甘露醇和右旋糖酐冻干品,批号:1,丽珠医药集团股份有限公司);PG 检测 ELISA 试剂盒(批号:K7414-100, Bio-Vision 公司);氯化钠注射液(批号:1906043102,石家庄四药有限公司);人绒促性素(human chorionic gonadotrophin, HCG)原料药(批号:C018-201140923,规格:5 946 IU·mg^{-1},宁波人健药业集团股份有限公司);牛血清白蛋白(批号:SLBJ9162V, Sigma 公司);注射用尿促性素(厂家 A,批号:1;厂家 B,批号:1;厂家 C,批号:1)。

2 仪器

1389 A2 生物安全柜(Thermo 公司);3141 二氧化碳培养箱(Thermo 公司);6R 高速离心机(Beckman Coulter 公司);Z2 细胞计数仪(Beckman Coulter 公司);SYNERGY HT 多功能微板检测仪酶标仪(Biotek 公司);BT224S 电子天平(德国赛多利斯);SHHD1619AL 大负载圆周式摇床(OHAUS 公司)。

3 细胞株

人卵巢颗粒细胞系 KGN 为解放军总医院母义明教授赠送。

4 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雌性,体重 40 ~ 60 g,日龄 19 ~ 23 d,104 只,每组 8 只,共 13 组。一次实验所用的幼龄大鼠的出生日期相差不得超过 3 d,体质量相差不得超过 10 g。购自中国食品药品检定研究院实验

动物资源中心,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2017-0005。

5 KGN-PG 方法学建立

5.1 细胞悬液的制备

KGN 细胞为单层贴壁生长细胞,生长培养基为含 10% FBS 的 DMEM/F12,于 37 ℃,5% CO_2 条件下培养,取对数生长期细胞将细胞密度调整为 1×10^5 个·mL^{-1},100 μL·孔$^{-1}$,接种于 96 孔细胞培养板,即 1×10^4 个·孔$^{-1}$。24 h 细胞贴壁后换液,更换为含 1% FBS 的 DMEM/F12 培养基,100 μL·孔$^{-1}$。

5.2 样品制备

用含 1% FBS 的 DMEM/F12 培养基对 HMG(NS)样品按 3,1,0.333 3,0.111 1,0.037 0,0.012 3,0.004 1 和 0.001 3 IU·mL^{-1}浓度进行稀释,共 8 个稀释度,将稀释好的样品加入上述 96 孔细胞培养板中,100 μL·孔$^{-1}$。

5.3 作用体系及 PG 含量测定

体系终浓度为 1.5,0.5,0.166 7,0.055 6,0.018 5,0.006 2,0.002 1 和 0.000 7 IU·mL^{-1},每个样品 4 个复孔,于 37 ℃,5% CO_2 条件下分别培养 24,48,72 和 96 h 后,吸取细胞培养上清,按照 BioVison 公司生产的 PG 含量检测 ELISA 试剂盒说明书在 405 nm 检测各孔细胞分泌上清中的孕酮含量,孕酮含量的高低用吸光值 A_{405nm} 表示。因为本实验所用试剂盒吸光值 A_{405nm} 与 PG 的分泌量成负相关,即 A_{405nm} 值越大,PG 含量越低。

5.4 药物时间依赖性和剂量依赖性的考察

将不同浓度的 HMG(NS)标准品分别作用于 KGN 细胞 24,48,72 和 96 h 后,按照方法“**5.1**”,“**5.2**”和“**5.3**”检测细胞分泌上清的 PG 含量,考察药物对 PG 释放影响的时间依赖性和剂量依赖性。

5.5 细胞铺板密度的确定

调整细胞浓度分别为:2×10^5,1×10^5,5×10^4 个·mL^{-1},接种于 96 孔板中,按照方法“**5.1**”,“**5.2**”和“**5.3**”进行 PG 检测。

6 KGN-PG 方法学验证

参照《中华人民共和国药典》2020 版四部通则 9101 分析方法验证指导原则和 9401 生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则对所建立的方法进行专属性、精密度、耐用性等方法学研究[11-12]。

6.1 线性和范围

方法见“**5.1**”,“**5.2**”和“**5.3**”。试验重复 3 次,取均值。以样品浓度为 x 轴,对应的 A_{405nm} 值为 y 轴,采用四参数方程进行拟合。

6.2 专属性

HMG(NS)标准品及制剂均为冻干品,该品含有一定浓度的赋形剂,HMG 中除了含有 FSH 以外还含有另一种活性成分 LH。HCG 是 FSH 生物效价测定方法(大鼠卵巢增重实验)的增敏剂。因此可考察 LH、赋形剂(右旋糖酐、甘露醇混合物)及 HCG 对方法的干扰作用。

6.3 精密度

以重复性作为考核指标,即同一实验室同一实验人员对所建立的方法进行 6 次独立实验,用于考察方法的重复性。

6.4 耐用性

通过对体系中测定条件有微小的变动时,对实验结果的影响程度,本实验为细胞测定法,因此本实验室对细胞铺板密度、板间效应环节进行方法耐用性的考察,变异系数在 ±15% 内。

6.4.1 细胞铺板密度　取同一代次细胞,将细胞密度细微调整为 1.2×10^5,1×10^5,8×10^4 个·mL^{-1},按照方法“**5.1**”,“**5.2**”和“**5.3**”进行检测。

6.4.2 板间效应　用同一批样品去刺激接种于不同 96 孔板的同一代次细胞,按照方法“**5.1**”,“**5.2**”和“**5.3**”进行检测。

6.5 准确度

指所建立的方法测定的结果与理论添加值接近的程度,一般用回收率表示。用含 1% FBS 的 DMEM/F12 培养基将样品稀释至每 1 mL 中分别含有 0.32 IU 的标准品溶液和 0.204 8,0.25,0.32,0.4 和 0.5 IU 待测溶液,即 5 个待测溶液的相对效价水平分别为 64%,80%,100%,125% 和 156%,在对数尺度上呈均匀间隔。按照方法“**5.1**”,“**5.2**”和“**5.3**”进行检测,结果用回收率表示:

回收率 = 实际测定值/理论添加值 ×100%　　式(1)

7 KGN-PG 方法应用

为了评价所建立方法的适用性,分别以 HMG(NS)作为标准,对 HMG(IS)和制剂进行了效价测定。对 HMG(IS)的检测,样品配制见方法“**5.2**”;对 3 个厂家 3 批样品,将其置于 80 ℃高温水浴 6 h,制备破坏活性样品,样品配制同方法“**5.2**”。将配置好的样品分别使用《中华人民共和国药典》2015 年版四部 1216 卵泡刺激素生物活性测定法[13],KGN-PG 法进行效价测定,用于评价体内外结论的

一致性。结果用相对百分含量表示：

相对百分含量 = 实际测定值/标示值 ×100%　　式(2)

8　FSH 药典生物测定法

参照《中华人民共和国药典》2015 版二部注射用尿促性素品种项下效价测定[14]和四部通则 1216 卵泡刺激素生物活性测定法[13]及 1431 生物统计法中的量反应平行线测定法[15]，采用 BS 2000 软件计算生物效价及实验误差(采用完全随机设计)。可靠性测验应通过 FSH 生物测定法的可信限率 FL%(fiducial limit, FL)不得大于 45%，测定值应为标示值的 76% ~135%。

9　统计方法

使用 Gen5 软件进行四参数计算，使用 Graphpad prism 8.0.2 进行绘图，使用 Excel 进行数据计算，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结　果

1　方法建立

1.1　孕酮浓度与 A_{405nm} 值的关系

将试剂盒自带 PG 标准品按照 1:2稀释至 10 个稀释度，按照方法“**5.1**”，“**5.2**”和“**5.3**”在 405 nm 下检测吸光度值，二者关系见图 1。即 PG 含量越高，A_{405nm} 值越小。

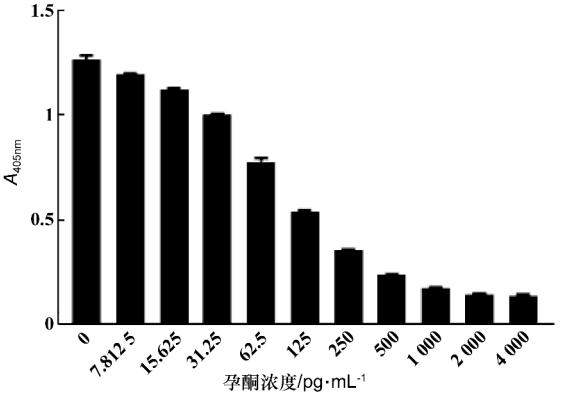


图 1　孕酮浓度与 A_{405nm} 值的关系(n =4)

1.2　时间依赖性与剂量依赖性

不同浓度的 HMG(NS)标准品作用于 KGN 细胞 24,48,72 和 96 h 后，检测细胞分泌 PG 的 A_{405nm} 值，检测结果见图 2：在不同浓度的样品刺激下，KGN 细胞可分泌出不同含量的 PG，且分泌的 PG 含量与样品浓度呈剂量依赖性；随着作用时间的延长，KGN 细胞分泌的 PG 含量与作用时间也呈时间依赖性。

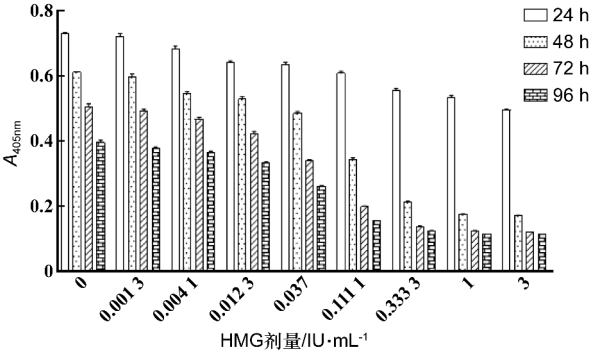


图 2　HMG(NS)作用于不同时间的 A_{405nm} 值比较(n =4)

1.3　最佳作用时间的确定

以 HMG(NS)标准品浓度作为横坐标，A_{405nm} 值为纵坐标作图(见图 3)，结果显示作用 24 h 时不同浓度的 A_{405nm} 值较为相近，作用 48 h 后高浓度样品的 A_{405nm} 值明显下降，作用 72 和 96 h 后，A_{405nm} 值与样品浓度形成良好的 S 型作用曲线，且在高浓度的样品作用下，96 与 72 h 的 A_{405nm} 值相比不再变化，FSH 高剂量组反应几近一致。为缩短作用时间，确定该方法的最佳作用时间为 72 h。

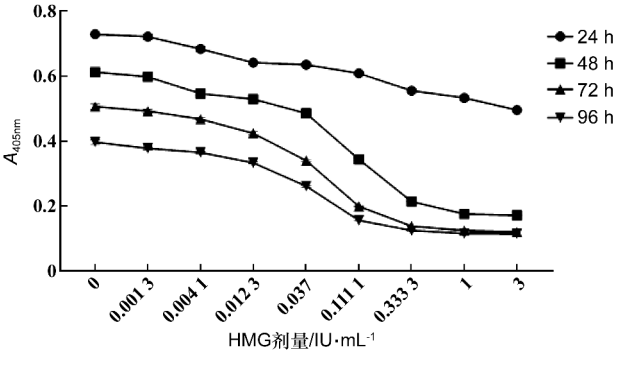


图 3　HMG(NS)作用于不同时间的作用曲线比较

1.4　最佳细胞铺板密度的确定

在 HMG(NS)标准品作用于不同密度的 KGN 细胞后，检测细胞所分泌 PG 量的 A_{405nm} 值，结果(见图 4)表明：样品作用于细胞密度为 5×10^4 个·mL^{-1} 时，与另外 2 个细胞密度组相比，在高剂量样品的刺激下，PG 的分泌量并未达到平台期。作用于细胞密度为 1×10^5 和 2×10^5 个·mL^{-1} 时，都呈现较好的 S 型曲线，且在高剂量组样品刺激下 PG 的分泌量均达到平台期。为减少细胞的使用量，应选择细胞密度为 1×10^5 个·mL^{-1} 作为最佳铺板密度。

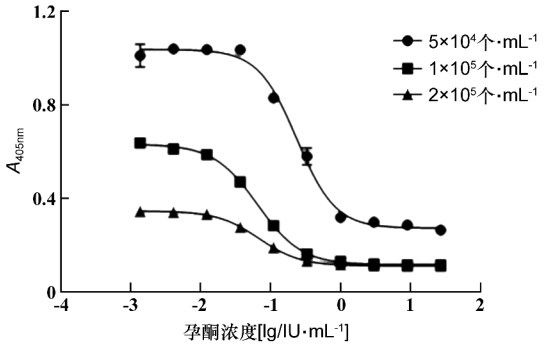


图 4 HMG(NS)作用于不同细胞密度的 A_{405nm} 值比较

通过以上结果,最终我们确定 KGN-PG 法的实验方案为:细胞铺板密度为 1×10^5 个·mL^{-1},样品作用时间为 72 h。

2 方法学验证

2.1 线性和范围

在浓度 0.001 3 ~ 3 IU·mL^{-1} 范围内,以 HMG(NS)样品浓度为横坐标,A_{405nm} 值为纵坐标作图,通过四参数拟合呈现出良好的 S 型作用曲线,R^2 值均在 0.95 以上。

2.2 专属性

将 HCG,LH 及赋形剂按照方法"**5.1**"和"**5.2**"作用于 KGN 细胞 72 h 后,以 HMG 样品溶液浓度为 x 轴,对应的 A_{405nm} 值为 y 轴作图,结果显示(见图 5),与空白样品相比,HCG,LH 及赋形剂作用于细胞后的 A_{405nm} 值都不小于空白 A_{405nm} 值,即 HCG,LH 及赋形剂均不能刺激 KGN 细胞分泌 PG,说明该方法具有良好的专属性,能有效反映 FSH 的生物活性。

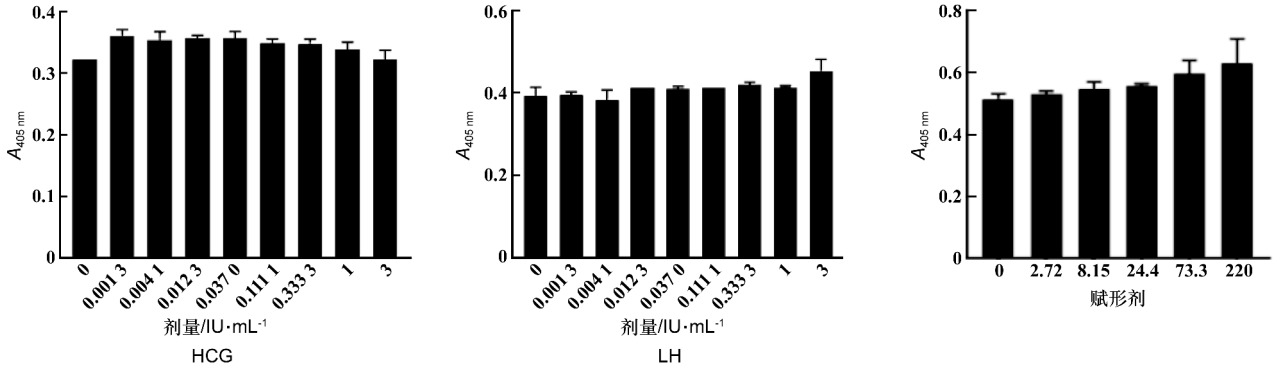


图 5 HCG,LH 及赋形剂对 KGN 细胞的干扰性考察(n =4)

2.3 耐用性

2.3.1 不同细胞铺板密度 四参数拟合方程中 A 值代表曲线上渐近线估值、B 值代表曲线的斜率、C 值代表半抑制浓度 IC_{50}(最大结合一半时对应的剂量)、D 值代表曲线下渐近线估值。在不同铺板密度下四参数方程的 A,B,C 和 D 值对应的变异系数分别为 6%,8%,11% 和 3%,结果见表 1,细胞密度的微小变化不影响实验结果。

表 1 KGN 细胞铺板密度的检测结果分析

细胞铺板密度/个·mL^{-1}	四参数方程	A	B	C	D	R^2
8×10^4	$Y=(A-D)/[1+(X/C)^B]+D$	0.568	1.85	0.061	0.127	0.998
1×10^5		0.519	1.74	0.055	0.122	0.999
1.2×10^5		0.513	1.57	0.049	0.121	0.998
几何均值	—	0.533	1.716	0.055	0.123	0.998
CV/%	—	6	8	10	3	0

2.3.2 板间效应 结果如表 2 所示,四参数方程中 A,B,C,D 值对应的变异系数分别为 1%,13%,13% 和 1%,实验的板间效应符合实验要求。

表 2 HMG(NS)作用于同代次 KGN 细胞不同 96 孔板的检测结果分析

板	四参数方程	*A*	*B*	*C*	*D*	R^2
板 1	$Y=(A-D)/[1+(X/C)^B]+D$	0.392	1.33	0.047	0.116	0.998
板 2		0.386	1.59	0.057	0.118	0.999
几何均值	—	0.389	1.454	0.052	0.117	0.998
CV/%	—	1	13	13	1	0

2.4 相对准确度

5 个待测浓度的相对准确率在 96% ~111%,结果见表 3,方法的准确度符合《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 9401[12]。

表 3 HMG(NS)相对效价测定值的准确度结果

理论加入值	0.32 IU·mL^{-1}				
	64%	80%	100%	125%	156%
实际测量值/IU·mL^{-1}	0.197 ±0.024	0.254 ±0.017	0.308 ±0.086	0.431 ±0.010	0.555 ±0.037
相对准确度/%	96	99	96	108	111

2.5 重复性

1 名检验人员独立对 HMG(NS)样品按照所建立方法进行 6 次实验,对 6 次实验四参数方程的 *A*,*B*,*C* 和 *D* 值进行分析,对应的 RSD 值分别为 4%,12%,9% 和 2%,表明此方法的重复性良好,结果见表 4。

表 4 1 名实验人员独立 6 次实验结果的统计学分析

参数	次数						RSD/%	$\bar{x}\pm s$
	1	2	3	4	5	6		
A	0.483	0.475	0.491	0.483	0.511	0.519	4	0.494 ±0.017
B	1.34	1.6	1.34	1.57	1.74	1.74	12	1.555 ±0.181
C	0.046 3	0.056 5	0.046 6	0.056 7	0.055 1	0.054 8	9	0.053 ±0.005
D	0.117	0.121	0.117	0.121	0.121	0.122	2	0.120 ±0.002

3 方法应用

对国际标准品、市售冻干剂注射用 HMG 及活性不合格样品进行细胞法及药典法的效价测定比对。HMG(IS)及市售注射用 HMG 的效价测定结果(见表 5)表明:细胞法与药典法的测定结果一致,均可检测合格样品的生物效价;活性不合格样品的效价测定结果(见表 6)表明:细胞法与药典法的测定结果一致,均可检测出不合格样品。

表 5 HMG(IS)及市售注射用尿促性素 HMG 的效价测定结果

样品	生产厂家	批号	细胞法/%	药典法/%
HMG(IS)	NIBSC	10/286	90	101
注射用 HMG	A	批号 1	92	86
	B	批号 1	91	89
	C	批号 1	124	104

表 6 活性不合格样品的效价测定结果

样品	生产厂家	批号	高温失活样品			
			细胞法/%		药典法/%	
			结果	结论	结果	结论
注射用 HMG	A	批号 1	37%	不合格	46%	不合格
	B	批号 1	28%		32%	
	C	批号 1	10%		13%	

讨 论

各国药典中 FSH 的体内活性检测方法是在 1953 年建立的大鼠卵巢增重法(HCG 增敏)。该方法存在局限性:使用大量动物,方法的准确度低、精密度差、结果计算复杂[3,16];且 De Leeuw 等[17]研究表明,FSH 在大鼠体内与其他哺乳动物相比,其药动学存在种属差异。面临 3R 原则[减少(reduction)、

替代(replacement)、优化(refinement)]的倡导与实施,寻找卵泡刺激素效价测定法的替代方法尤为重要。人源卵巢颗粒细胞 KGN-PG 法既能符合 3R 原则,又能消除种属差异,且该法经过《中华人民共和国药典》9401 和 9101 方法学验证,其准确性、精密度、耐用性均符合要求。

KGN-PG 方法能有效区分高温失活样品,该方法结果和结论均与药典法定方法保持一致。PG 试剂盒的原理是竞争性定量免疫分析方法,该试剂盒使用 PG 多克隆抗体与试剂盒自带 PG(共价结合碱性磷酸酶分子)结合,产生不同的吸光值进行定量分析,当待测溶液中含细胞分泌的 PG 时,竞争了 PG 多克隆抗体的结合位点,进而影响了后续试剂盒自带 PG(共价结合碱性磷酸酶分子)结合,反向对细胞分泌的 PG 进行定量,即 *A* 值越小,细胞分泌的 PG 浓度越高。因此,卵巢颗粒细胞经 FSH 刺激后分泌 PG 定量法可用于卵泡刺激素效价测定,可作为药典法替代和补充的有效方法。

[参 考 文 献]

[1] TAJIMA K, ORISAKA M, MORI T, *et al*. Ovarian theca cells in follicular function[J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(5): 591 – 609.

[2] SOSA ASA, IBRAHIM S, MAHMOUD KGM, *et al*. Expression profiling of primary cultured buffalo granulosa cells from different follicular size in comparison with their *in vivo* counterpart[J]. *Zygote*, 2020, 28(3): 233 – 240.

[3] 吴彦霖, 张媛, 唐黎明, 等. 第 4 批人绝经尿促性腺素(HMG)国家标准品的协作标定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1487 – 1494.

[4] KUMAR TR, WANG Y, LU N, *et al*. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(2): 201 – 204.

[5] PALERMO R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis[J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(3): 326 – 337.

[6] RAMA RAJU G, CHAVAN R, DEENADAYAL M, *et al*. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: a review of role in controlled ovarian hyper-stimulation[J]. *J Hum Reprod Sci*, 2013, 6(4): 227.

[7] NISHI Y, YANASE T, MU YM, *et al*. Establishment and characterization of a steroidogenic HumanGranulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses FunctionalFollicle-stimulating hormone receptor[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 437 – 445.

[8] ROBKER RL, RUSSELL DL, YOSHIOKA S, *et al*. Ovulation: a multi-gene, multi-step process[J]. *Steroids*, 2000, 65(10 – 11): 559 – 570.

[9] HAVELOCK JC, RAINEY WE, CARR BR. Ovarian granulosa cell lines[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 228(1 – 2): 67 – 78.

[10] HO SM. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 73.

[11] 国家药典委. 中国人民共和国药典[S]. 2020 年版,四部. 北京:中国医药科技出版社,2020:480 – 483.

[12] 国家药典委. 中国人民共和国药典[S]. 2020 年版,四部. 北京:中国医药科技出版社,2020:530 – 535.

[13] 国家药典委. 中国人民共和国药典[S]. 2015 年版,四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:171.

[14] 国家药典委. 中国人民共和国药典[S]. 2015 年版,二部. 北京:中国医药科技出版社,2015:530 – 531.

[15] 国家药典委. 中国人民共和国药典[S]. 2015 年版,四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:182 – 200.

[16] 吴彦霖, 张媛, 万龙岩, 等. 第 1 批尿促卵泡素国家标准品的标定[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(20): 2376 – 2379.

[17] DE LEEUW R, MULDERS J, VOORTMAN G, *et al*. Recombinat hormones: Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®)[J]. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(5): 361 – 369.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 11 – 06