

# 促卵泡生长素相关细胞信号通路的研究进展

胡建文, 华荣茂, 张 仙, 刘兰兰, 陈 飞, 曾 斌\*

江西科技师范大学 江西省生物加工过程重点实验室, 南昌 330013

**摘要:** 促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 是哺乳动物体内一种具有促进雌性动物子宫内膜生长, 卵泡颗粒细胞的增殖与分化, 刺激多卵泡发育, 合成雌激素等多种生物学功能的糖基化蛋白质激素。我们主要从 FSH、促卵泡激素受体 (FSHR) 分子结构和生物学功能出发综述 FSH 依赖于 G 蛋白介导的细胞信号通路和独立于 G 蛋白有关的细胞信号通路。

**关键词:** 促卵泡激素; 促卵泡激素受体; 生物学功能; 细胞信号通路

中图分类号: Q571

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.036

## The Research Progress of Follicle-stimulating Hormone Involved in Cell Signaling Pathway

HU JIAN-wen, HUA RONG-mao, ZHANG Xian, LIU Lan-lan, CHEN Fei, ZENG Bin\*

*Jiangxi Province Key Laboratory of Bioprocess Engineering, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China*

**Abstract:** Follicle-stimulating hormone (FSH) is a kind of important glycoprotein hormones in mammals. It can promote the growth of female animals endometrial and cell proliferation and differentiation of ovarian follicles granulosa, stimulate multiple follicle development, synthetic estrogen, and other biological functions. In this article, we mainly focus on the molecular structure and biological function of FSH and follicle stimulating hormone receptor (FSHR), to review cell signaling pathways involved in G protein-dependent and G protein-independent.

**Key words:** follicle-stimulating hormone; follicle-stimulating hormone receptor; biological function; cell signaling pathway

促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 是垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌的一种由两个亚基通过非共价结合形成的异源二聚体糖蛋白类促性腺激素。它与黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、促甲状腺激素 (thyrotropin, thyroid stimulating hormone, TSH) 及人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, HCG) 共同组成了糖蛋白激素家族。FSH 具有促进雌性动物子宫内膜生长, 卵泡颗粒细胞的增殖与分化, 刺激多卵泡发育, 合成雌激素, 诱导优势卵泡中黄体生成素受体生成, 以及促进雄性动物睾丸支持细胞增殖和精子形成等多种生物学功能。在哺乳动物体内 FSH 通过激活 PKA 信号通路、PKB 信号通路、PKC 信号通路等多条依赖于 G 蛋白介导的细胞信号通路和独立于 G 蛋白介导的

细胞信号通路。我们主要从 FSH、FSHR 分子结构和生物学功能出发, 追踪 FSH 所涉及的相关细胞信号通路和其引发的生物学效应, 并尝试初步建立 FSH 参与的细胞信号通路机制模型, 这对促进畜牧业、水产业的发展有着重要的社会经济价值, 以及对解决人类相关疾病方面提供重要的理论依据。

## 1 促卵泡激素 (FSH) 的分子结构和生物学功能

### 1.1 FSH 的分子结构

FSH 由普通的  $\alpha$  亚基和特异的  $\beta$  亚基通过非共价结合形成的异源二聚体糖蛋白类促性腺激素。其中  $\alpha$  亚基的序列高度保守, 由 92 个氨基酸残基组成, 含 2 个 N-糖链、10 个半胱氨酸连接成 5 个二硫键, 与受体结合和细胞信号转导有关;  $\beta$  亚基的序列保守性也较高, 是功能亚基, 由 111 个氨基酸残基组成, 含 2 个 N-糖链、12 个半胱氨酸连接成 6 个二硫键, 也参与受体的结合和细胞信号转导<sup>[1-4]</sup>。单独的  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基都不具有生物学活性, 只有当二

收稿日期: 2016-05-15 接受日期: 2016-06-08

基金项目: 江西省赣鄱 555 英才工程, 江西省生物加工重点实验室和体外诊断试剂及仪器协同创新中心 (31171731, 31460447, 20142BDH80003, 2013-CXTD002, 3000035402, 00001384, 30000411, 300098020110, 300098030105)

\* 通讯作者 Tel: 86-013755679856; E-mail: Zengtx001@aliyun.com

者结合使空间结构发生改变形成特异的构象后才具有生物学活性<sup>[5]</sup>,进而激活一系列细胞信号通路。

## 1.2 FSH 的生物学功能

激素是机体内的某一细胞、腺体或者器官所产生的可以影响机体内其他细胞活动的一类具有生物学活性的化学物质,大多数肽类激素信号分子不能直接透过靶细胞质膜,只能通过与靶细胞表面相应的受体相互作用,然后通过细胞信号转导机制,在细胞内产生第二信使(如 cAMP, cGMP,  $Ca^{2+}$ , DAG, IP3 等)或激活蛋白激酶或蛋白磷酸酶活性,从而引起细胞内一系列生理生化变化,最终表现为细胞整体的生物学效应。

激素在哺乳动物体内作为一种化学信号,通过血液循环运送到体内各个部位,作用于靶细胞。FSH 这种化学信号分子在体内生物学活性和半衰期的长短与 FSH 骨架上 N-糖基化位点数目、糖链长度、分子亚型以及机体所处生理阶段有关<sup>[6,7]</sup>。FSH 的  $\alpha$ -亚基和  $\beta$ -亚基上各有 2 个 N 端糖基位点,  $\alpha$ -亚基的 N-糖基位点位于第 52 位和第 78 位天冬酰胺残基上,  $\beta$ -亚基的糖基位点位于第 7 位和第 24 位天冬酰胺残基上<sup>[14,8]</sup>,正是由于糖基化位点上糖链的组成,直接影响着 FSH 的生物学活性和半衰期。FSH 的糖基侧链主要包含甘露糖、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖及唾液酸等小分子,糖链与肽链间以共价方式相连接,通常连接在天冬酰胺上,称 N-糖苷键。其中唾液酸的含量和 N-乙酰半乳糖胺的磺化程度,与 FSH 的体内生物学活性及半衰期密切相关<sup>[9]</sup>。同时,FSH 分子结构中糖链的长度与唾液酸的含量是造成其不均一性的主要原因(即存在多种亚型),唾液酸含量升高,FSH 的等电点(PI)会降低,分子量增大,体内活性升高,半衰期延长,但激素与受体的结合能力减弱,体外生物学活性降低<sup>[10]</sup>。此外,糖链末端成分中 N-乙酰半乳糖胺的磺化也调节着 FSH 在体内的生物学活性和半衰期,有研究表明磺化使 FSH 在体内的清除率加快<sup>[11]</sup>。由此,可以推测 FSH 自垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌后,在没有与靶细胞上表面受体结合前一直处于唾液酸化状态,当其通过血液循环与靶细胞表面 G 蛋白偶联受体结合的瞬间,FSH 分子糖链末端迅速磺化,FSH 构象发生改变,进而磺化的 FSH 诱导 FSHR 构象发生改变并与之结合,形成 FSH-FSHR 二聚体复合物,最终通过靶细胞表面受体将 FSH 这种化学信号带入靶细胞内并引起整个细胞生物学效应。这仅仅只是

一个推理,FSH 在体内的生物学活性和半衰期与细胞信号通路的联系还需进一步通过实验验证。

FSH 从垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌后,经血液循环运输到机体各部分,作用于作用于卵巢颗粒细胞或睾丸支持细胞等靶细胞。在雌性哺乳动物中,FSH 具有诱导多卵泡发育,刺激卵巢颗粒细胞增殖与分化,合成雌激素,以及诱导优势卵泡中黄体生成素受体生成和促进排卵<sup>[12-14]</sup>;在雄性哺乳动物中,促进睾丸支持细胞增殖和精子的形成等<sup>[15,16]</sup>。这与 FSH 参与的细胞信号通路是密切相关的,FSH 对哺乳动物细胞间功能的协调、控制细胞的生长和发育、细胞的增殖与分化、细胞的衰老和凋亡等方面有着多种生物学功能。有研究表明,FSH 参与的细胞信号通路某一环节改变、受阻或遭到破坏,则引发激素调节系统发生紊乱,最终表现出相应的临床症状,如半乳糖血症、绝经后乳腺癌、子宫内膜异位、卵巢癌、不育不孕、脂肪代谢相关性疾病等多种疾病<sup>[17-20]</sup>。

## 2 FSH 的受体(FSHR)理化性质

受体是一类能够特异性识别和选择性结合某种信号分子的大分子。受体的主要特征体现在与配体结合的特异性、饱和性和高度的亲和性。基于这些特征,受体主要的功能是识别和结合特异的信号分子,并把识别和接受的配体信号分子通过跨膜转导系统从胞外带入胞内,从而实现了细胞之间的信号通讯。

G 蛋白偶联受体是一种膜结合受体超家族,也是多种药物分子的靶标,因分子中含有 7 个疏水残基肽段形成连续的跨膜  $\alpha$  螺旋结构,所以又称为七次跨膜受体。卵泡刺激素受体(FSHR)是一种 G 蛋白偶联受体,与其它糖蛋白激素 G 蛋白偶联受体类似,FSHR 大致可分为三个主要部分:N 端胞外区域,7 个疏水残基肽段形成连续的跨膜  $\alpha$  螺旋结构区域,C 端胞内区域。受体 N 端胞外区域含有大量富含亮氨酸的重复序列和糖基化位点,这与高度亲和性配体(信号分子)识别和特异性结合有关<sup>[4,21-23]</sup>;7 个疏水残基肽段形成连续的跨膜  $\alpha$  螺旋结构区域中,分别由 3 个胞外环和胞内环交替连接,其中螺旋 5 和 6 之间形成的胞内环状结构域(C3)对于受体与 G 蛋白之间的相互作用具有重要作用,与 G 蛋白活化以及信号跨膜转导有关<sup>[24-29]</sup>;C 端胞内区域,含有铰链子域以及大量的磷酸化位点和碱

性氨基酸,这与受体蛋白磷酸化、棕榈酰化以及与 $\beta$ -抑制蛋白相互作用等有关<sup>[30]</sup>,进而调解胞内相关蛋白质的活性、胞内转运和介导蛋白质-蛋白质(或脂质、其他信号分子)相互作用,以及参与调解多种细胞信号通路。其结果改变细胞代谢活性或通过基因表达调控蛋白影响细胞基因表达。

促卵泡激素受体(FSHR)也是下丘脑-垂体-腺体这条轴线的重要组成部分,在生殖方面有着重要作用。FSHR主要是参与调节FSH的生物学活性和体内半衰期,以及介导FSH这种分泌信号跨膜转导,并参与调解靶细胞内多条信号通路。有研究表明FSHR基因突变会影响配子的发育和导致不育等相关疾病<sup>[31-33]</sup>。

### 3 FSH参与的相关细胞信号通路

FSH从垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌后,由于FSH糖链末端处于唾液酸化状态,避免了在血液运输过程中的降解,维持了体内较高的生物学活性和较长的半衰期。当FSH到达靶细胞后,募集在靶细胞表面FSHR胞外域特定的铰链区,然后通过铰链区中磺化的酪氨酸识别和磺化作用使其构象发生改变,进而与受体结合,形成FSH-FSHR二聚体复合物,在G蛋白的参与下,完成FSH从胞外到胞内的信号跨膜转导,从而激发靶细胞内多条信号通路<sup>[9,10,23,34]</sup>。也有研究发现FSH可激活独立于G蛋白介导的细胞信号通路对细胞的生长、发育、增殖、分化以及凋亡进行调控<sup>[35-37]</sup>。

#### 3.1 FSH依赖于G蛋白介导的细胞信号通路

##### 3.1.1 促卵泡激素/环腺苷酸/蛋白激酶A信号通路(FSH/cAMP/PKA signaling pathway)

cAMP/PKA信号通路是哺乳动物细胞内的主要细胞信号通路之一,许多激素、神经递质、生长因子等都以cAMP作为细胞内第二信使,在G蛋白的参与下,通过腺苷酸环化酶(AC)活性调节靶细胞内cAMP的水平。绝大多数糖蛋白激素受体是G蛋白偶联受体,这些受体被激活后介导激素分子信号跨膜转导,进而诱导细胞内产生cAMP。cAMP进一步激活cAMP依赖性的蛋白激酶A(PKA是一种四聚体含2个调节亚基和2个催化亚基)使下游靶蛋白磷酸化,并引发细胞内级联反应,从而影响细胞新陈代谢、基因表达,以及细胞的生长、发育、增殖或分化等。

FSH与靶细胞表面FSHR受体识别和结合后,

通过G $\alpha$ 活化的腺苷酸环化酶催化ATP生成cAMP,随后4分子cAMP结合到蛋白激酶A上2个亚基(R)导致PKA释放出2催化亚基(C)并快速活化激酶<sup>[38]</sup>。活化的PKA使下游cAMP应答元件结合蛋白(CREB)和组蛋白H3磷酸化,以及激活ERKs、p38MAPK等下游信号通路<sup>[39]</sup>。CREB是真核生物细胞核内选择性结合环腺苷酸反应元件(CREs)的核蛋白,与环磷酸腺苷反应元件调节因子(CREM)、转录活化因子1(ATF2)同属于含碱性亮氨酸拉链结构(bZIPs)的转录因子家族,主要对cAMP等信号发生应答反应。CREB被PKA磷酸化后其转录活性会增强,特别是CREB的133位丝氨酸残基(Ser133)对CREB的转录活性起着重要作用<sup>[40,41]</sup>。随后磷酸化的CREB与CBP(CREB结合蛋白)蛋白识别和结合,启动涉及细胞增殖、分化、生存等相关靶基因转录<sup>[42]</sup>。FSH也能促使组蛋白H3在S3、S10、S28上磷酸化和K9、K14上乙酰化,这与早期FSH靶基因inhibin- $\alpha$ 、SGK、c-Fos的转录活化,以及染色质重塑有着密切的联系<sup>[39,43-45]</sup>。此外,PKA还参与激活ERK1/2、p38MAPK等信号通路,通过活化的PAK诱导表皮生长因子类似因子(如细胞素、上皮调节蛋白等)表达并激活表皮生长因子受体(EGFR),进而活化ERK1/2信号通路<sup>[46,47]</sup>;也有研究发现ERK1/2和p38MAPK信号通路的激活可能与PAK磷酸化蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)或神经胶质成熟因子(GMF)相关<sup>[48]</sup>。FSH/cAMP/PKA信号通路与下游靶蛋白的磷酸化,如何启动相关基因的表达,以及对细胞增殖、分化、生存的影响还需要进一步研究。

##### 3.1.2 促卵泡激素/环腺苷酸/蛋白激酶B信号通路(FSH/cAMP/PKB signaling pathway)

FSH与靶细胞表面FSHR结合后,诱导胞内产生cAMP。研究发现PKA并不是cAMP唯一激活的激酶,通过进一步追踪发现,FSH刺激靶细胞后,可快速促使PKB磷酸化,进而活化PI3K或P38MAPK相关信号通路<sup>[49,50]</sup>。PKB是PI3K信号通路的下游底物,我们寻找了FSH、PI3K、PKB三者之间的联系以及PKB下游蛋白的磷酸化和相关基因的表达,当FSH激活G蛋白偶联跨膜信号转导系统后,诱导胞内产生cAMP,游离的cAMP通过Epac(鸟苷酸交换因子,GEF)介导进而激活PI3K信号通路和P38MAPK信号通路<sup>[38,49]</sup>。活化的PI3K激活PDK1或PIP3从而使PKB磷酸化,磷酸化的PKB进一步

活化下游 mTOR, 合成 HIF-1 $\alpha$ , 进而启动 FSH 靶基因转录, 表达 cyclin D1, 刺激细胞增殖、分化等<sup>[39,51,52]</sup>。此外, 有研究报告 FSH 作用靶细胞后, 通过激活 MAPK14 促使表皮生长因子类似因子双调蛋白 (AREG) 活化, 进而激活下游 PI3K/PKB 信号通路<sup>[53]</sup>。

### 3.1.3 促卵泡激素/磷脂酶 C/蛋白激酶 C 信号通路 (FSH/PLC/PKC signaling pathway)

FSH 通过 FSHR 介导的另一条信号通路是磷脂酰肌醇信号通路, 其信号转导是通过磷脂酶 C (PLC) 完成的。FSH 通过 G 蛋白开关使 PLC 的  $\beta$  异构体活化, 致使质膜上磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸水解成三磷酸肌醇 (PI3) 和二酰甘油 (DAG), 随后 DAG 直接活化蛋白激酶 C (PKC) 或通过 PI3 引发内质网中的 Ca<sup>2+</sup> 释放到细胞基质中间接激活 PKC<sup>[54,55]</sup>, 活化的蛋白激酶 C 进一步诱导 Src 磷酸化, 通过 EGFR 介导激活 ERK1/2 信号通路或 MAPK 信号通路<sup>[39,56,57]</sup>。

## 3.2 FSH 独立于 G 蛋白介导的细胞信号通路

除了通过 G 蛋白介导把 FSH 这种胞外信号经信号跨膜系统带入胞内外, 可能还存在独立于 G 蛋白介导的信号通路。根据 FSH 这种分子的药物代谢动力学, 我们通过文献追踪发现 FSH 与靶细胞表面 FSHR 结合形成 FSH-FSHR 二聚复合物后, 在  $\beta$ -抑制蛋白的参与下, 大部分碘化的 FSH 与 FSHR 分离而返回到血液循环中, 在细胞外进行降解。少量结合 FSHR 碘化的 FSH 以内吞的方式带入胞内, 进而激活溶酶体信号通路和 ERK1/2 或 MAPK 信号通路<sup>[22,58]</sup>。基于上述研究报告, 我们推测了以下几条独立于 G 蛋白介导的细胞信号通路。

### 3.2.1 FSH/ $\beta$ -抑制蛋白/FSH 返回胞外信号通路

$\beta$ -抑制蛋白是 G 蛋白偶联受体中一种重要的调节因子, 这种因子能抑制 G 蛋白介导的细胞信号通路而启动独立于 G 蛋白有关的细胞信号通路。FSH 与靶细胞表面 FSHR 识别和结合后发生碘化, 胞内的 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 快速激活  $\beta$ -抑制蛋白, 随后活化的  $\beta$ -抑制蛋白结合到受体 FSHR 上促使 FSH-FSHR 二聚复合物分离, 导致大部分碘化的 FSH 返回到细胞外<sup>[22,58,59]</sup>。我们推测这种碘化的 FSH 可能在血液循环过程被降解, 这与先前 Wide L 等人的报告中碘化能加快 FSH 在体内的清除率是一致的<sup>[11]</sup>。

### 3.2.2 FSH/ $\beta$ -抑制蛋白/溶酶体信号通路和 ERK1/2、MAPK 信号通路

$\beta$ -抑制蛋白不仅具有促使 FSH-FSHR 二聚复合物分离, 而且具有介导这种二聚复合物以内吞的方式带入胞内。FSH 与靶细胞表面 FSHR 结合形成 FSH-FSHR 复合物后, 除了大部分碘化的 FSH 与 FSHR 分离后返回到了胞外, 还有少量结合 FSHR 碘化的 FSH 在  $\beta$ -抑制蛋白的参与下, 以内吞的方式带入胞内, 从而完成细胞信号的跨膜转导, 并激活溶酶体信号通路和引 ERK1/2 或 MAPK 信号通路<sup>[58-60]</sup>。我们推测 FSH 从垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌后, 在血液运输过程中一直处于唾液酸化, 当与靶细胞表面 FSHR 结合后由于受体铰链区中的酪氨酸碘化作用使之碘化, 随后构象发生改变, 与 FSHR 形成 FSH-FSHR 复合物。当完成细胞信号的跨膜转导后, 在 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 的作用下, 活化的  $\beta$ -抑制蛋白结合到 FSH-FSHR 复合物, 通过网格蛋白有被小窝 (CCP) 介导以内吞的方式将碘化的 FSH 运输到溶酶体中进行降解, 在内吞的过程中激活了 ERK1/2 和 MAPK 等相关细胞信号通路, 而分离的 FSHR 经循环利用途径返回细胞膜中重新参与识别和结合下一个的 FSH 信号分子。此外, 我们根据这种推测进一步假设出 FSH 在胞外具有较长的半衰期和较高的生物学活性是由于其处于唾液酸化状态, 当受体铰链区中的酪氨酸碘化作用后使 FSH 半衰期变短、体内生物活性降低、与受体的结合能力减弱<sup>[9,10,22]</sup>, 随后碘化的 FSH 与 FSHR 形成的复合物通过  $\beta$ -抑制蛋白/溶酶体信号通路使碘化的 FSH 发生降解, 而 FSHR 通过受体循环利用途径重新返回质膜中参与下一个唾液酸化态的 FSH 分子的信号跨膜转导<sup>[61-63]</sup>。

根据上述研究报告, 我们拟定了 FSH 依赖于 G 蛋白介导的主要细胞信号通路和独立于 G 蛋白介导的细胞信号通路 (Fig. 1)。对于 FSH 涉及细胞生长、发育、增殖、分化、生存、凋亡和新陈代谢等复杂的信号通路还需要进一步研究。

## 4 结论与展望

促卵泡激素 (FSH) 是哺乳动物体内一种重要的糖蛋白激素, 通过与 G 蛋白偶联受体作用调控多条细胞信号通路, 在细胞的生长与发育、增殖与分化、生存与凋亡和新陈代谢等方面起着重要作用。FSH 临床上常用于不育不孕症治疗及辅助生殖技术, 但

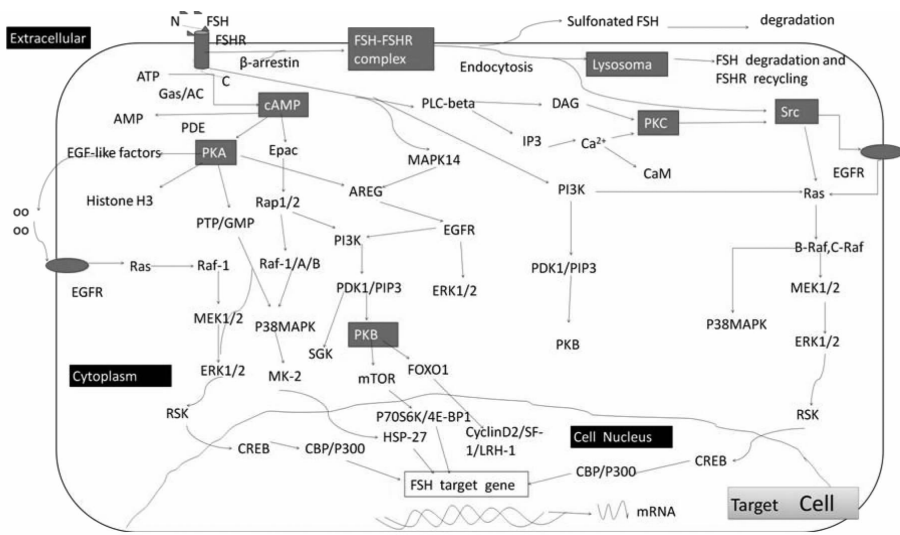


图 1 FSH 参与的相关细胞信号通路

Fig. 1 Follicle-stimulating hormone involved in cell signaling pathway

注:三角形:促卵泡激素 (FSH);圆柱:促卵泡激素受体 (FSHR);Epac:鸟苷酸交换因子;椭圆:表皮生长因子受体 (EGFR);圆:表皮类似生长因子 (EGF-like factors)

由于半衰期短、生物活性不高,在治疗患者需要反复注射,因此推动了 FSH 类似药物的开发和利用。目前,通过对 FSH 结构和理化性质分析,利用基因工程技术开发了高效性、长效性、安全性的重组人促卵泡激素 (rhFSH) 等糖蛋白激素药物,如 Serono 公司开发的 Gonal-F、Organon 公司开发的 Puregon 和 Elonva、Ferring 公司开发的 REPRONEX 和 BRAVELLE、Finox AG 公司开发的 Bemfola,以及国内丽珠集团开发的丽申宝等都已上市并在临床上取得一定治疗效果<sup>[64-67]</sup>,这仅仅只是一个开端,LAPS-FSH、KN015 等新一代重组人促卵泡激素生物制品有望获得<sup>[68,69]</sup>。FSH 的受体是 G 蛋白偶联受体 (FSHR),也是多种药物的靶标,能够识别和结合不同的配体分子,因此推动了 FSH 类似药物的开发和利用,在畜牧业 (如牛羊等)、水产业 (如鱼) 发展方面具有较高的社会经济价值<sup>[70-72]</sup>,同时在人类相关疾病的如肿瘤诊断、药物靶向治疗和靶向药物开发等具有广阔的前景<sup>[73-75]</sup>。我们试图从 FSH、FSHR 结构和生物学活性出发追踪其参与的相关细胞信号通路,并尝试初步建立信号通路机制模型,通过研究 FSH 涉及的相关细胞信号通路,从分子水平更加深入地了解细胞生长与发育、增殖与分化、生存与凋亡和新陈代谢以及基因的选择性表达等相关的一系列生理过程,为人类相关疾病如半乳糖血症、绝经后乳腺癌、子宫内膜异位、卵巢癌、不育不孕、肿瘤、脂

肪代谢相关性疾病等疾病的发病机制提供新的研究方向<sup>[17-20,73]</sup>。

参考文献

- 1 Rathnam P, et al. Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit. *J Biol Chem*, 1975, 250: 6735-6746.
- 2 Saxena BB, et al. Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *J Biol Chem*, 1976, 251: 993-1005.
- 3 Fox KM, et al. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecul Endocrinol*, 2001, 15: 378-389.
- 4 Fan QR, et al. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 2005, 433: 269-277.
- 5 Sugahara T, et al. Expression of biologically active fusion genes encoding the common subunit and the Follicle-stimulating Hormone Subunit ROLE OF A LINKER SEQUENCE. *J Biol Chem*, 1996, 271: 10445-10448.
- 6 Su D, et al. Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity. *Int J Hematol*, 2010, 91: 238-244.
- 7 Moore LG, et al. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J Endocrinol*, 2000, 165: 185-192.
- 8 Perlman S, et al. Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2003,

- 88;3227-3235.
- 9 Wide L, *et al.* Sulfonation and sialylation of gonadotropins in women during the menstrual cycle, after menopause, and with polycystic ovarian syndrome and in men. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2007, 92; 4410-4417.
- 10 Barrios-De-Tomasi J, *et al.* Assessment of the *in vitro* and *in vivo* biological activities of the human follicle-stimulating iso-hormones. *Molecul Cell Endocrinol*, 2002, 186; 189-198.
- 11 Wide L, *et al.* Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2009, 94; 958-964.
- 12 Thomas FH, *et al.* Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, 2005, 146; 941-949.
- 13 Kayampilly PP, *et al.* Follicle-stimulating hormone inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture through an Akt-dependent pathway. *Endocrinology*, 2009, 150; 929-935.
- 14 Zhang C, *et al.* Effect of different culture systems and 3,5,3'-triiodothyronine/follicle-stimulating hormone on preantral follicle development in mice. *PloS one*, 2013, 8; e61947.
- 15 Kilgour RJ, *et al.* Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli cell numbers and onset of spermatogenesis. *Reproduct Nutr Dev*, 1998, 38; 539-550.
- 16 Allan CM, *et al.* Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity; evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology*, 2004, 145; 1587-1593.
- 17 Gubbels CS, *et al.* Primary ovarian insufficiency in classic galactosemia; role of FSH dysfunction and timing of the lesion. *J Inheri Metabo Dis*, 2013, 36(1); 29-34.
- 18 Zhang D, *et al.* Follicle-stimulating hormone promotes age-related endometrial atrophy through cross-talk with transforming growth factor beta signal transduction pathway. *Aging Cell*, 2015, 14; 284-287.
- 19 Liu L, *et al.* OCT4 mediates FSH-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion through the ERK1/2 signaling pathway in epithelial ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461; 525-532.
- 20 Liu XM, *et al.* FSH regulates fat accumulation and redistribution in aging through the G $\alpha$ i/Ca $^{2+}$ /CREB pathway. *Aging Cell*, 2015, 14; 409-420.
- 21 Kreuchwig A, *et al.* Research resource; novel structural insights bridge gaps in glycoprotein hormone receptor analyses. *Molecular Endocrinol*, 2013, 27; 1357-1363.
- 22 Jiang X, *et al.* Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109; 12491-12496.
- 23 Zhang R, *et al.* Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in Chinese alligator, *Alligator sinensis*; Molecular characterization, tissue distribution and mRNA expression changes during the female reproductive cycle. *Animal Reproduct Sci*, 2015, 156; 40-50.
- 24 Hlavackova V, *et al.* Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. *EMBO J*, 2005, 24; 499-509.
- 25 Rasmussen SGF, *et al.* Crystal structure of the [bgr] 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011, 477; 549-555.
- 26 Jaakola VP, *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*, 2008, 322; 1211-1217.
- 27 Liu JJ, *et al.* Biased signaling pathways in  $\beta$ 2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science*, 2012, 335; 1106-1110.
- 28 Palczewski K, *et al.* Crystal structure of rhodopsin; AG protein-coupled receptor. *Science*, 2000, 289; 739-745.
- 29 Claus M, *et al.* Structural determinants for G-protein activation and specificity in the third intracellular loop of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Molecul Med*, 2006, 84; 943-954.
- 30 Banerjee AA, *et al.* Role of the extracellular and Intracellular Loops of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Its Function. *Frontiers in Endocrinology*, 2015, 6.
- 31 Gromoll J, *et al.* Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 1996, 125; 177-182.
- 32 Bramble MS, *et al.* A novel follicle-stimulating hormone receptor mutation causing primary ovarian failure; a fertility application of whole exome sequencing. *Human Reproduction*, 2016, 31; 905-914.
- 33 Stoy H, *et al.* How genetic errors in GPCRs affect their function; Possible therapeutic strategies. *Genes Diseases*, 2015, 2; 108-132.
- 34 Meher BR, *et al.* Glycosylation effects on FSH-FSHR interaction dynamics; a case study of different FSH glycoforms by molecular dynamics simulations. *PloS one*, 2015, 10(9); e0137897.
- 35 Landomiel F, *et al.* Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Molecular and cellular endocrinology*, 2014, 382; 452-459.
- 36 Luttrell LM, *et al.* The role of  $\beta$ -arrestins in the termination

- and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Science*, 2002, 115:455-465.
- 37 Tranchant T, *et al.* Preferential  $\beta$ -arrestin signalling at low receptor density revealed by functional characterization of the human FSH receptor A189 V mutation. *Molecular and cellular endocrinology*, 2011, 331:109-118.
  - 38 Skalhegg BS, *et al.* Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, 2000, 5: 678-693.
  - 39 Hunzicker-Dunn M, *et al.* FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular Signalling*, 2006, 18:1351-1359.
  - 40 Gonzalez GA, *et al.* Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 1989, 59:675-680.
  - 41 Walker WH, *et al.* An isoform of transcription factor CREM expressed during spermatogenesis lacks the phosphorylation domain and represses cAMP-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91: 12423-12427.
  - 42 van der Sligte NE, *et al.* Essential role for cyclic-AMP responsive element binding protein 1 ( CREB) in the survival of acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, 2015, 6:14970.
  - 43 Johansen KM, *et al.* Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Research*, 2006, 14:393-404.
  - 44 Deng H, *et al.* Ectopic histone H3S10 phosphorylation causes chromatin structure remodeling in *Drosophila*. *Development*, 2008, 135:699-705.
  - 45 Sawicka A, *et al.* Histone H3 phosphorylation-a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, 2012, 94:2193-2201.
  - 46 Yamashita Y, *et al.* The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. *J Reproduction and Development*, 2012, 58:510-514.
  - 47 Yang L, *et al.* NPR2 is involved in FSH-mediated mouse oocyte meiotic resumption. *Journal of ovarian research*, 2016, 9 (1):1.
  - 48 Gerits N, *et al.* Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cellular signalling*, 2008, 20:1592-1607.
  - 49 Gonzalez-Robayna IJ, *et al.* Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 2000, 14:1283-1300.
  - 50 Meroni SB, *et al.* Regulation of rat Sertoli cell function by FSH; possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *Journal of Endocrinology*, 2002, 174: 195-204.
  - 51 Liu K, *et al.* Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Developmental biology*, 2006, 299(1): 1-11.
  - 52 Chen J, *et al.* Gankyrin facilitates follicle-stimulating hormone-driven ovarian cancer cell proliferation through the PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$ /cyclin D1 pathway. *Oncogene*, 2015.
  - 53 Prochazka R, *et al.* Signaling pathways regulating FSH-and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction*, 2012, 144:535-546.
  - 54 Tepekoy F, *et al.* Protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  are differentially expressed in mouse ovaries at different stages of postnatal development. *Journal of ovarian research*, 2014, 7 (1):1.
  - 55 Chen X, *et al.* Epidermal growth factor receptor activation by protein kinase C is necessary for FSH-induced meiotic resumption in porcine cumulus-oocyte complexes. *Journal of Endocrinology*, 2008, 197:409-419.
  - 56 Prochazka R, *et al.* Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. *J reproduction and development*, 2015, 61:495.
  - 57 Katz S, *et al.* Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, 38:2082-2091.
  - 58 Krishnamurthy H, *et al.* Postendocytotic trafficking of the follicle-stimulating hormone (FSH)-FSH receptor complex. *Molecular Endocrinology*, 2003, 17:2162-2176.
  - 59 Violin JD, *et al.*  $\beta$ -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 2007, 28:416-422.
  - 60 Lefkowitz RJ, *et al.* Transduction of receptor signals by  $\beta$ -arrestins. *Science*, 2005, 308:512-517.
  - 61 Marion S, *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 and  $\beta$ -arrestins are recruited to FSH receptor in stimulated rat primary Sertoli cells. *Journal of endocrinology*, 2006, 190: 341-350.

- 62 Segretain D, *et al.* Differential time course of FSH/FSH receptor complex endocytosis within sertoli and germ cells during rat testis development. *Developmental Dynamics*, 2010, 239:1113-1123.
- 63 Jean-Alphonse F, *et al.* Spatially restricted G protein-coupled receptor activity via divergent endocytic compartments. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289:3960-3977.
- 64 Tarlatzis BC, *et al.* Comparative incidence of ovarian hyperstimulation syndrome following ovarian stimulation with corifollitropin alfa or recombinant FSH. *Reproductive biomedicine online*, 2012, 24:410-419.
- 65 Keye WR, *et al.* Evaluation of mixed protocols with bravele® (human-derived FSH) and repronex® (hMG) to assess clinical efficacy (EMBRACE) in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertility and sterility*, 2004, 82:348-357.
- 66 Rettenbacher M, *et al.* A multi-centre phase 3 study comparing efficacy and safety of Bemfola® versus Gonal-r® in women undergoing ovarian stimulation for IVF. *Reproductive biomedicine online*, 2015, 30:504-513.
- 67 Zhang ZQ, *et al.* Different outcomes after intracytoplasmic sperm injection without oocyte activation in two patients with different types of globozoospermia. *Andrologia*, 2016, 48:116-120.
- 68 Jung S, *et al.* LAPS-FSH: a new and effective long-acting follicle-stimulating hormone analogue for the treatment of infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, 2014, 26:1142-1153.
- 69 Zhang YL, *et al.* Development and characterization of a novel long-acting recombinant follicle stimulating hormone agonist by fusing Fc to an FSH- $\beta$  subunit. *Human Reproduction*, 2016, 31:169-182.
- 70 Szkudlinski MW, *et al.* Novel high affinity and long-acting recombinant bovine FSH analogs for veterinary superovulation. *Program & Abstracts, Abstract*, 2013, 16.
- 71 Rutigliano HM, *et al.* Effect of time and dose of recombinant follicle stimulating hormone agonist on the superovulatory response of sheep. *Theriogenology*, 2014, 82:455-460.
- 72 Kucharczyk D, *et al.* Application of Ovaprim in artificial reproduction of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. under controlled conditions. *Iranian Journal of Ichthyology*, 2015, 1(1):7-11.
- 73 Gartrell BA, *et al.* The follicle-stimulating hormone receptor: a novel target in genitourinary malignancies [C]//Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. Elsevier, 2013, 31:1403-1407.
- 74 Zhang X, *et al.* Targeted paclitaxel nanoparticles modified with follicle-stimulating hormone  $\beta$  81-95 peptide show effective antitumor activity against ovarian carcinoma. *International journal of pharmaceutics*, 2013, 453:498-505.
- 75 Lagerström MC, *et al.* Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 2008, 7:339-357.