

抑制素主动免疫后波尔山羊的排卵反应

王杏龙¹, Holtz Wolfgang²

(1. 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009; 2. Institute of Animal Husbandry and Genetics, University of Goettingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, D-37075 Goettingen, Germany)

摘要: 在不发情季节(6月), 用重组绵羊抑制素 α 亚单位(r. oIHN- α)主动免疫40只经产波尔山羊, 每只试验羊的用量为100 μ g r. oIHN- α , 4周后用相同剂量进行强化免疫。每周采取血样, 用放射免疫法测定血浆中抑制素抗体滴度。试验羊发情后每天配种1~2次至发情结束。每天1次从发情开始至发情结束后48 h, 用超声波检查卵泡发育和排卵情况。最后1次配种后6或7 d用非手术法回收胚胎。免疫6个月后让试验羊配种、妊娠和产羔。抑制素免疫1周后抗体滴度开始上升。强化免疫2周后, 抗体滴度达到最大值。抑制素抗体滴度与直径大于4 mm的卵泡数($r = 0.70, P < 0.001$)、排卵数($r = 0.55, P < 0.001$)和获取卵子或胚胎数($r = 0.50, P < 0.001$)存在显著的正相关。而抑制素抗体滴度与排卵率存在明显的负相关($r = -0.37, P < 0.001$)。抑制素免疫山羊的排卵率为46%~70%。从8月至11月排卵数超过4枚。40只母羊抑制素免疫6个月后, 第一情期配种, 有34(85%)只母羊怀孕, 29只正常分娩, 平均产羔羊2.2(1~4)只。试验结果表明, 抑制素主动免疫能引起山羊超数排卵。抑制素免疫6个月后卵巢机能恢复正常, 母羊仍能正常繁殖。

关键词: 抑制素; 主动免疫; 山羊; 排卵

中图分类号: S826.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)02-0157-04

抑制素是母畜卵泡颗粒细胞分泌的一种糖蛋白质激素。它通过内分泌途径对垂体前叶FSH(卵泡刺激素)的分泌有特异性抑制作用^[1], 同时通过旁侧作用抑制FSH与其受体的结合^[2]。抑制素主动免疫后能引起山羊的超数排卵反应^[3]。本试验拟探讨山羊抑制素主动免疫后, 超数排卵现象能维持多久? 以及抑制素免疫对山羊繁殖的影响。

1 材料与方法

1.1 试验羊 试验以波尔山羊为材料。选用健康、体况良好的经产母羊40只, 平均体重66(53~83) kg, 平均年龄3.5(2~6)岁。试验羊在半敞式栏内散放饲养, 每只每天给予0.5 kg颗粒料(Club-Schafkraft, Bel&Muehle GmbH & Co. KG, Langfoerden: 17%粗蛋白, 3%粗脂肪, 14%粗纤维, 10%粗灰分, 1%钙, 0.4%磷, 0.2%钠。每千克混合料添加10 000 IU维生素A, 1 000 IU维生素D₃, 0.2 mg硒)。另外自由采食麦秆、舔食舔块和饮水。

1.2 抑制素免疫 在不发情季节(6月), 试验羊用重组绵羊抑制素 α 亚单位(Biotech Australia, Ro-

seville, Australia)进行主动免疫。首次免疫剂量为100 μ g r. oIHN- α (重组绵羊抑制素 α 亚单位), 肩部皮下注射。4周后进行强化免疫, 注射方法和剂量同前。

1.3 发情鉴定和配种 试验羊抑制素免疫后每天用试情公羊试情2次, 间隔12 h。母羊发情后每天与公羊配种或人工授精1~2次至发情结束。

1.4 卵巢检查 在发情季节, 母羊发情后至结束后2 d, 每天1次, 间隔24 h, 用超声波(Aloka SSD-500, 7.5 Mhz, PPG Hellige, Freiburg, Germany)检查卵巢卵泡发育情况。统计直径大于4 mm的卵泡数, 计算排卵数。排卵率为排卵数除以发情开始时直径大于4 mm的卵泡数乘以100。

1.5 胚胎回收 试验羊于最后1次配种后6~7 d, 用非手术法(Pereira等, 1998)^[4]回收胚胎。在体视显微镜下检胚, 并观察其形态结构、评定质量。胚胎回收至强化免疫后6个月, 然后母羊发情配种后, 让其妊娠。配种4周后用超声波进行妊娠诊断, 最后统计产羔数。

1.6 采血及血浆制备 试验羊免疫前2周至免疫后38周, 每周在同一时间进行颈静脉穿刺采集血样, 每次采血4 ml, 置于含4滴(120 μ l) 38%柠檬酸钠溶液的试管内混匀。再以1 000 g在室温离心10 min, 吸取血浆低温(-20 $^{\circ}$ C)保存, 用于抑制素抗体

收稿日期: 2002-01-18

作者简介: 王杏龙(1958-), 男, 教授, 博士, 从事动物遗传育种与繁殖教学及研究工作。

滴度测定。

1.7 抑制素抗体滴度测定 血浆样品稀释 1 000 倍,采用 Wrathall 等(1992)^[5]描述的方法,用放射免疫法测定抑制素抗体与¹²⁵I 标记的牛抑制素(Mr 32 000)的结合率来表示抑制素抗体滴度。

1.8 统计分析 用 SAS 统计分析软件在计算机上计算各参数的平均数和标准误,并用 Schffé 检验各均数差异显著性。计算卵巢反应与抗体滴度的相关,用 Pearson 检验其显著性。

2 结果与分析

2.1 抑制素抗体滴度 由图 1 可看出,40 只试验山羊抑制素免疫前抗体没有滴度。抑制素免疫 1 周后抗体滴度开始上升。强化免疫 2 周后,抗体滴度达到最大值,然后抗体滴度逐渐下降。不同个体抑制素抗体最大滴度变化范围为 1.3% ~ 28.2% (血

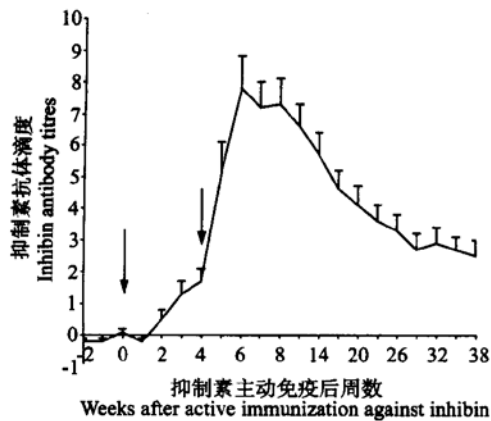


图 抑制素免疫山羊血浆中抗体滴度

Fig. Plasma anti-inhibin titres in inhibin-immunized goats. Values are mean ± SEM.

浆样品 1: 1 000 稀释)。8(20%) 只羊抗体滴度最大值超过 15%; 20(50%) 只羊位于 5% ~ 15%; 12(30%) 只试验山羊低于 5%。由表 1 可看出,8 月份发情山羊平均抑制素抗体滴度为 7.8%,而后逐渐下降。

2.2 抑制素免疫后山羊卵巢反应 8 月中旬试验山羊开始陆续出现发情。8 月份山羊发情时直径 > 4 mm 的卵泡数为 14.7,然后逐渐下降,但分别显著高于 12 月(5.3)和 1 月(5.2)的卵泡数($P < 0.05$)。排卵数、获取的卵子或胚胎数以及可移胚胎数从 8 月至 1 月亦呈下降趋势,与直径 > 4 mm 的卵泡数下降趋势基本一致。9 月份的排卵数为 5.6,显著高于 12 月(2.4)的排卵数($P < 0.05$)。8 月份获取的卵子或胚胎数为 4.4,分别显著高于 12 月(1.2)和 1 月(1.2)获取的卵子或胚胎数($P < 0.05$)。抑制素免疫的山羊从 8 月至 11 月发情排卵数超过 4 枚。试验山羊的排卵率位于 46% ~ 70%。

2.3 抑制素抗体滴度与卵巢和胚胎参数的相关 血浆中抑制素抗体滴度与直径 > 4 mm 的卵泡数以及排卵数均存在极显著的正相关($r = 0.70$ 和 $r = 0.55, P < 0.001$)。抗体滴度与获取卵子或胚胎数以及可移胚胎数同样存在极显著的正相关($r = 0.50$ 和 $r = 0.42, P < 0.001$)。但抑制素抗体滴度与排卵率存在着明显的负相关($r = -0.37, P < 0.001$)。

2.4 抑制素免疫对山羊繁殖的影响 抑制素强化免疫 6 个月后,40 只母羊第一次发情配种后,有 34 只母羊怀孕,第一授精情期受胎率为 85%。34 只怀孕母羊中,其中 3 只母羊可能因寄生虫免疫而发生流产,2 只母羊胎儿被吸收,29 只母羊正常分娩,平均产羔 2.2(1~ 4)只。

表 山羊抑制素主动免疫后的抗体滴度,排卵反应和卵子/胚胎产量

Table Mean (±SEM) anti-inhibin titres, ovulatory response and ova/embryo yield following active immunization against inhibin in goats

月份 Month	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan
取胚羊数 No. of flushes	15	17	20	20	12	11
抗体滴度(%) Anti-inhibin titres	7.8 ± 1.3	7.6 ± 1.2	4.6 ± 0.6	3.7 ± 0.7	1.9 ± 0.4	2.8 ± 0.8
卵泡数 > 4 mm No. of follicles > 4 mm	14.7 ± 2.3 ^a	13.5 ± 1.5	9.4 ± 2.1	7.8 ± 1.2	5.3 ± 1.1 ^b	5.2 ± 0.6 ^b
排卵数 Ovulations	5.3 ± 0.7	5.6 ± 0.7 ^a	5.1 ± 0.6	4.1 ± 0.5	2.4 ± 0.2 ^b	3.1 ± 0.6
排卵率(%) Ovulatory rate	52 ± 12	46 ± 5	70 ± 7	68 ± 10	66 ± 10	62 ± 10
卵子或胚胎数 Ova or viable embryos	4.4 ± 1.0 ^a	4.2 ± 0.6	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.4	1.2 ± 0.2 ^b	1.2 ± 0.4 ^b
可移胚胎数 No. of transferable embryos	2.1 ± 0.5	2.3 ± 0.5	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.4

Note: a, b within rows values with different superscripts differ ($P < 0.05$).

3 讨 论

在本试验中, 抑制素抗体最大滴度不同个体间变化范围为 1.3%~28.2%。抗体滴度低于 5% 约占 1/3, 说明不是所有的动物免疫后有相同的反应。这一结果与文献报道一致^[3,6]。在发情季节, 抗体滴度和卵巢反应持续下降, 但发情山羊的排卵数从 8 月至 11 月超过 4 枚。说明这些动物必须进行胚胎回收, 否则有可能造成胚胎死亡、难产或产弱羔。

抑制素抗体滴度与直径 > 4 mm 的卵泡数、排卵数、卵子或胚胎数和可移胚胎数有明显的正相关。这与文献报道的一致^[3,6]。血液中抑制素抗体滴度高, 中和了优势卵泡颗粒细胞分泌的抑制素, 从而减弱或消除了抑制素对垂体 FSH 分泌的抑制作用和对 FSH 与其受体结合的干扰^[1,2]。促进了卵泡的发育, 增加了排卵数和获取的胚胎数。但由于不同个体抑制素免疫后抗体滴度不同而造成卵巢反应不一。因此, 很难通过抑制素免疫来达到理想的产羔数。

抑制素免疫山羊的排卵率为 46%~70%, 特别是 8、9 两月, 排卵率低于 60%。说明相当一部分大卵泡没有排卵。这与 Dietrich 等(1995)^[3]报道的基本一致。在本试验中, 抗体滴度与排卵率呈明显的负相关, 也就是说抗体滴度愈高, 排卵率愈低。众所周知, LH(黄体生成素)在促卵泡素的作用基础上引起卵泡排卵。对抑制素免疫后, 动物体内 LH 的浓度目前有不同的报道。有的作者认为抑制素免疫后, 血浆中 LH 浓度增加^[7]。而 Stollmann 等(1993)^[8]在山羊、Henderson 等(1984)^[9]、Mann 等(1992)^[10]、Wheaton 等(1992)^[11]和 O'Shea(1993)^[12]在绵羊和 Kaneko 等(1993)^[13]在牛发现抑制素免疫对 LH 的分泌没有影响。有的作者甚至发现, 抑制素免疫后血浆中 LH 的浓度反而低于对照组^[14,15]。这些作者认为, 抑制素免疫后有较多的卵泡发育成熟, 在卵泡发育的同时产生了较多的雌激素而抑制了 LH 的分泌。本试验中, 低的排卵率有可能与抑制素免疫后没有足够的 LH 来引起卵泡排卵有关。至于抑制素免疫山羊注射一定量的外源性 LH 是否能提高排卵率尚待进一步研究。

在本试验中, 共回收胚胎 95 次, 平均每只母羊回收胚胎 2.4 次, 获取卵子或胚胎 6 枚。平均从每只试验羊获取胚胎较少的原因是: 有相当一部分试验羊在 11 月份, 有的甚至 12 月份才开始发情, 此时

抑制素抗体滴度和卵巢反应均较低。从本试验可看出, 要提高山羊的卵巢反应, 增加获胚数, 抑制素主动免疫, 特别是强化免疫应在发情季节前两周左右进行。

抑制素免疫 6 个月后, 试验羊的第一授精情期受胎率(85%)和平均产羔数(2.2)均属于正常范围。这一结果与文献报道的基本一致^[5,6]。说明抑制素抗体水平下降后, 免疫山羊仍能正常繁殖。

参考文献:

- [1] Martin G B, Wallace J M, Taylor P L, et al. The roles of inhibin and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin secretion in the ewe[J]. *J Endocrinology*, 1986, 111: 287~296.
- [2] Schneyer A L, Sluss P M, Whitcomb R W, et al. Precursors of alpha-inhibin modulate follicle-stimulating hormone receptor binding and biological activity[J]. *Endocrinology*, 1991, 129(4): 1987~1999.
- [3] Dietrich E, Hennies M, Holtz W, et al. Immunization of goats against recombinant human inhibin α -subunit: Effects on inhibin binding, mating behaviour, ovarian activity and embryo yield[J]. *Anim Reprod Sci*, 1995, 39: 119~128.
- [4] Pereira R J T A, Schneyer B, Holtz W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F_{2a} and oxytocin[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76: 360~363.
- [5] Wrathall J H M, McLeod B J, Glencross R G, et al. Effects of active immunization against a synthetic peptide sequence of the inhibin α -subunit on plasma gonadotrophin concentrations, ovulation rate and lambing rate in ewes[J]. *J Reprod Fertil*, 1992, 95: 175~182.
- [6] Boland M P, Sunderland S J, Williams D H, et al. Effect of immunization of ewes against α 1-26 inhibin fragment on antibody titres, ovulation and lambing rate[J]. *Anim Reprod Sci*, 1994, 34: 241~251.
- [7] Schanbacher B D, Schemm S R, Rhind S M. Gonadotrophin concentrations and ovulation rates in Suffolk ewes actively or passively immunized against inhibin alpha[J]. *J Reprod Fertil*, 1991, 93: 133~139.
- [8] Stollmann M, Hennies M, Moeller R, et al. FSH and LH secretion in goats actively immunized against inhibin in the non-breeding season[J]. *Exp Clin Endocrinol Suppl*, 1993, 101(1): 177 abstr.
- [9] Henderson K M, Franchimont P, Lecomte-Yerna M J, et al. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid[J]. *J Endocrinol*, 1984, 102: 305~309.
- [10] Mann G E, Campbell B K, McNeilly A S, et al. The role

- of inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep[J]. *J Endocrinol*, 1992, 133: 381~ 391.
- [11] Wheaton J E, Carlson K M, Kusina N T. Active and passive immunoneutralization of inhibin increases follicle stimulating hormone levels and ovulation rate in ewes [J]. *Biol Reprod*, 1992, 47: 361~ 367.
- [12] O' Shea T, Bindon B M, Forage R G, et al. Active immunization of Merino ewe lambs with recombinant bovine alpha inhibin advances puberty and increases ovulation rate[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1993, 5: 173~ 180.
- [13] Kaneko H, Nakanishi Y, Tays K, et al. Evidence that inhibin is an important factor in the regulation of FSH secretion during the mid-luteal phase in cows[J]. *J Endocrinol*, 1993, 136(1) : 35~ 41.
- [14] Hennies M, Voglmayr J K, Dietrich E, et al. Hormonal response of female goats to active immunization against a recombinant human inhibin α -subunit, and establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine follicle stimulating hormone[J]. *Reprod Domest Anim*, 2001, 36(2) : 65~ 71.
- [15] Mizumachi M, Voglmayr J K, Washington D W, et al. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin α -subunit associated with increased pre and postovulatory follicle stimulating hormone levels [J]. *Endocrinology*, 1990, 126: 1058~ 1063.

Ovulatory Response Following Active Immunization against Inhibin in Boer Goats

WANG Xing-long¹, Holtz Wolfgang²

(1. College of Animal Science and Veterinary, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Genetics, University of Goettingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, D-37075 Goettingen, Germany)

Abstract: In the anestrus season (June), 40 pluriparous Boer goat does received 100 μ g of a recombinant ovine inhibin α -subunit, followed by a booster injection 4 weeks later. Weekly blood samples were collected to determine antibody titres by radioimmunoassay. Animals showing signs of estrus were mated daily as long as they were receptive. Follicular development and ovulation rate were monitored by transrectal ultrasonography at 24h intervals from the onset of estrus until 48h after the last signs of estrus. Embryos were collected transcervically 6 or 7 days after the last mating. Subsequently, all animals were mated and permitted to carry to term 6 months after immunization. One week after the first immunization, antibody titres rose steadily. The antibody titres were highest two weeks after the booster injection. The antibody titre was positive significantly correlated with the number of follicles > 4 mm diameter ($r = 0.70, P < 0.001$), ovulations ($r = 0.55, P < 0.001$) and the number of ova or embryos ($r = 0.50, P < 0.001$). To the contrary, there was a significant negative relationship between antibody titre and ovulation rate ($r = -0.37, P < 0.001$). The ovulation rate immunized goats had 46% ~ 70%. Ovulation numbers more than 4 were observed from August to November. Of the 40 does mated 6 months after the end of the inhibin treatment, 34 (85%) conceived on first estrus. In the 29 does kidding, litter size was 2.2 (range 1 to 4). These results indicate: Immunization against inhibin brings about a superovulatory response in goats. Ovarian functions of immunized does will return to normal ovulatory levels 6 months after the end of the inhibin treatment such that these animals may be returned to the breeding flock.

Key words: Inhibin; Active immunization; Goat; Ovulation