

# GnRH 主动免疫对雄性大鼠垂体-睾丸轴功能的影响

韩兴发 曹晓涵 杜小刚 曾宪垠

(四川农业大学生命科学学院原子能农业应用研究室,四川雅安 625014)

**摘要:**本研究用 GnRH 并列体二聚物 (GnRH-TDK) 主动免疫 SD 雄性大鼠观察其对大鼠垂体-睾丸轴功能的影响,以探讨 GnRH 主动免疫去势的分子机理。24 只性成熟 SD 雄鼠随机分为免疫组和对照组,免疫组雄鼠于 12 周龄时初免,8 周后加免,对照组雄鼠不做任何注射。每两周采集血液放免法检测血清抗体滴度及激素含量变化。加免后 4 周脱颈处死所有雄鼠,收集垂体、睾丸实时荧光定量 PCR 分析相关生殖基因 mRNA 的变化。结果显示,GnRH 主动免疫后 12 只免疫雄鼠中 11 只血清 GnRH 抗体滴度显著上升,血清 LH、FSH 及睾酮 (T) 均极显著下降到检测限附近或以下 ( $p < 0.01$ ),同时睾丸严重萎缩,其重量及体积下降到对照组睾丸的 20% ( $p < 0.01$ ),组织切片显示,曲细精管上皮组织严重受损,管内仅有少数退化的精原细胞。与对照组相比,GnRH 主动免疫极显著下调雄鼠垂体 GnRH 受体、LH- $\beta$ 、FSH- $\beta$  和睾丸 LH 受体及 FSH 受体 mRNA 表达水平 ( $p < 0.01$ )。由此可见,GnRH 主动免疫可通过下调垂体 GnRH 受体、促性腺激素亚基及睾丸 LH、FSH 受体基因表达,影响垂体-睾丸轴的功能。

**关键词:**GnRH;主动免疫;垂体睾丸轴;大鼠

## Effects of Active Immunization against GnRH on Functions of the Pituitary-Testicular Axis in Adult Male Rats

HAN Xing-fa CAO Xiao-han DUN Xiao-gang ZENG Xian-yin

(Isotope research Lab, College of life science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

**Abstract:** The present study was designed to investigate effect of active immunization against GnRH-Tandem-Dimer (TDK) on functions of pituitary-testicular axis in adult male rats. Twenty-four adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly allocated to two groups of 12 each. One group was immunized at age of 12 weeks with a booster vaccination 8 weeks later. Another group were not administrated and served as intact controls. All rats were decapitated at 4 weeks after booster vaccination, blood samples for antibody titer and hormone assays were collected once of every 2 weeks to determine serum anti-GnRH antibody titers and reproductive hormone levels by radioimmunoassay (RIA). At autopsy, pituitary and testes were collected to detect the mRNA expressions of reproduction-related genes using real-time fluorescence quantitative PCR technique. The results showed that eleven immunized rats responded well to the immunization (immunocastrates). In immunocastrates, serum gonadotropins (LH and FSH) and testosterone (T) levels were declined following vaccination, and were significantly decreased to low or non-detectable levels as compared with controls ( $p < 0.01$ ). Testes in immunocastrates were decreased to 20% of both the average weight and volume of intact controls at autopsy ( $p < 0.01$ ), and testicular histological evaluation displayed severe damage of interstitial tissue and

收稿日期:2012-09-26 接受日期 2013-01-16

基金项目:四川省科技厅国际合作项目(2012HH0013),四川农业大学双支计划(00770107)

作者简介:韩兴发(1986-),男,四川凉山州人,硕士研究生,研究方向为动物生殖免疫调控。E-mail: xfhan2012@163.com;共同第一作者,曹晓涵(1984-),女,四川成都人,博士研究生,研究方向为动物繁殖免疫调控。E-mail: caoxiaohan007@hotmail.com

通讯作者:曾宪垠(1966-),男,江西瑞金人,博士生导师,主要研究方向为动物生理与生殖免疫调控。Tel:0835-2886138;E-mail: xyzeng1966@163.com

arrest of spermatogenesis. In contrast to intact controls, mRNA expression levels in pituitary GnRH receptor (GnRH-R), LH- $\beta$ , FSH- $\beta$ , testicular LH receptor and FSH receptor in immunocastrated animals were significantly down-regulated after immunization ( $p < 0.01$ ). Together, the functions of pituitary-testicular axis were disrupted by active immunization against GnRH through down-regulating gene expressions of pituitary GnRH-R, LH- $\beta$  and FSH- $\beta$ , and LH-R and FSH-R in testes.

**Key words:** GnRH; Active immunization; Pituitary-testicular axis; Rat

GnRH 主动免疫克服了传统外科阉割劳动量大、伤口易感染甚至导致动物疾病和死亡等诸多不足,且操作简便,安全可靠,满足动物福利要求。该方法已成为目前最有望替代传统外科阉割的新方法,可用于控制动物行为和繁殖性能及改善肉质<sup>[1-2]</sup>。自 1970 年该方法产生以来,研究者在通过构建新型 GnRH 抗原<sup>[3-4]</sup>及选取合适佐剂<sup>[5]</sup>以提高免疫效果和降低注射位点的炎症反应等方面取得了较大的进展,然而关于 GnRH 主动免疫去势的机理却一直不清楚。

目前通常认为抗体免疫“中和”作用是导致 GnRH 免疫去势的原因,即给动物注射 GnRH 疫苗后,疫苗通过刺激动物免疫系统产生抗 GnRH 抗体,该抗体通过外周血液循环到达垂体门脉系统与下丘脑分泌的内源性 GnRH 发生抗原-抗体特异性结合,当垂体门脉系统中 GnRH 抗体滴度达到一定阈值时,下丘脑流向垂体前叶的 GnRH 信号将被“门控”关闭,抑制 LH 和 FSH 的合成和释放,终止性腺激素的合成,从而影响配子的发生,达到免疫去势的目的。而一旦动物机体 GnRH 抗体滴度下降到阈值以下时,下丘脑流向垂体前叶的 GnRH 信号将“门控”打开,动物的生殖功能也将逐渐恢复。目前,大部分试验结果支持这一理论<sup>[6-7]</sup>。然而,部分关于羊的研究结果却显示当外周循环的 GnRH 抗体滴度下降到低水平<sup>[8-9]</sup>或是检测不出水平时<sup>[10]</sup>,免疫动物的生殖功能依然没有恢复,此时即便给予这些绵羊注射外源性 GnRH 类似物也未能恢复其垂体的促性腺激素的分泌功能,GnRH 免疫去势的作用超出了血液 GnRH 抗体滴度的控制范畴,表现为长期性甚至永久性。此外,也有研究发现当外周循环的 GnRH 抗体滴度还处于高水平时,在孕激素处理后给 GnRH 免疫绵羊单次注射 GnRH 类似物和多次注射促性腺激素 eCG,均未能恢复其垂体及性腺的生殖功能<sup>[11]</sup>。Levy 等<sup>[12]</sup>以 GnRH-KLH 单剂量主动免疫猫,免疫 5 年后当外周循环抗 GnRH 抗体下降到极低水平时仍有 27% 猫不育,免疫去势结果表现为长期性。上述研究结果表明,GnRH 主动免疫“中和”掉内源性 GnRH 后,很有可能进一步影响到了垂体-性腺轴的功能。因此,本研究以 SD 大鼠为模型,从分子水

平上研究 GnRH 主动免疫对 SD 大鼠垂体-睾丸轴功能的影响,以探讨 GnRH 主动免疫去势的分子机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

选取 10~11 周龄体重 275~311g 的健康性成熟 SD 雄鼠 24 只,随机分为免疫组和对照组,每组各 12 只。各组试验鼠分笼饲养,每笼 4 只,试验期间自由采食和饮水。

### 1.2 动物免疫

疫苗配置参照 Oonk 等<sup>[3]</sup>方法进行。将以 D 型赖氨酸(D-lysine)取代 6 位甘氨酸(Glycine)的 GnRH 并列二聚体卵清蛋白复合物(TDK-OVA)溶于 PBS (pH = 7.4)中,用等体积 Specol 佐剂充分乳化。12 周龄时每只免疫雄鼠于腿部肌肉注射 1mL 乳化抗原(含 TDK 50ug),8 周后加免,注射剂量及方法同初始免疫,对照组雄鼠不做任何注射。免疫注射当天记为 0wpv。

### 1.3 样品采集、睾丸测量及组织切片观察

试验鼠于初免当天及初免后第 2、4、6、8、10wpv (即每 2 周 1 次,直至处死前 2 周)采集尾部动脉血样 1.5~2mL,为方便血液采集,采血前先将大鼠尾巴浸入温水(50℃)中 20~30s。加免后 4 周,所有试验鼠眼球采血后断颈处死。所有血样于 4℃,3000r·min<sup>-1</sup>离心 15min,分离血清,-20℃保存以测定血清抗体滴度及激素含量。

试验鼠处死后,迅速分离垂体和两侧睾丸,分别用电子天平称重,用游标卡尺测量每侧睾丸长度和宽度。睾丸体积采用公式: $v = [4\pi(\text{宽度}/2)^2(\text{长度}/2)]/4$ 进行计算,记录为每对睾丸的平均体积。然后将垂体、一侧的睾丸组织液氮速冻,随后转入-70℃保存,用于测定相关基因 mRNA 表达水平。另一侧睾丸用 10% 甲醛固定,常规石蜡切片,厚度为 5um,苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察。

### 1.4 血清 GnRH 抗体及激素含量测定

血清 GnRH 抗体滴度测定参照 Ladd 等<sup>[13]</sup>所描述的方法进行。抗体滴度以稀释度为 1:3200 时血清

的<sup>125</sup>I-GnRH 百分结合率表示。以免疫前血清测得血清抗体非特异性结合率 <1%。

血清 LH、FSH 及 T 均采用同源性 RIA 法测定, 相关人用 LH、FSH 及 T RIA 试剂盒均购于北京北方生物技术研究所, 相关操作严格按试剂盒说明书进行。

### 1.5 基因的检测

基因检测通过实时荧光定量 PCR 方法进行, 通过苯酚-氯仿法提取总 RNA, 然后电泳检测 5sRNA、18sRNA、28sRNA 以检测其完整性以及是否污染。所提取出来的 RNA 采用反转录试剂盒 Prime Script® RT

reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (宝生物, 大连) 将其反转录成 cDNA, 相关操作严格按照操作说明书进行。然后以 cDNA 为模板在特定引物下进行定量检测, 所采用的仪器为 CFX96 (BIO-RAD, Inc.), 每个样品 3 次重复, PCR 程序为: 95°C 10s, 然后进行 40 循环的 PCR: 95°C 变性 5s, 58~61°C 退火 + 延伸 25s, 最后进行溶解曲线以监测 PCR 扩增产物的特异性。目的基因 mRNA 相对表达水平采用标准曲线法进行计算。基因检测所采用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences of body tissue genes

基因 Gene	GenBank 收录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size (bp)
GnRH-R	nm_031038	F: TCTGCAATGCCAAAATCATC R: GTAGGGACTCCAGCAGATGAC	164
αGSU	BC063160	F: TATGGATTGCTACAGAAGATA R: CAGGAAGAGGATGAAGAAT	80
LH-β	NM_012858	F: CTTCTCCTCTTCTGATGC R: TTTATGGGAGGGATGCT	80
FSH-β	NM_001007597	F: CATCCTACTCTGGTGCTT R: CACTCTTCCTTCTACTGA	84
LH-R	NM_012978	F: TTACACATAACCACCATAACC R: TCCAGCGAGATTAGAGTC	134
FSH-R	NM_199237	F: GAATGATGCTTGGAACTAATAG R: CTTAATGCCTGTGTGGA	163
β-actin	NM_031144	F: CAC AGC TGA GAG GGA AAT R: TCA GCA ATG CCT GGG TAC	155

注: GnRH-R, 促性腺激素释放激素受体; LH-β, 黄体生成素 β 亚基; FSH-β, 促卵泡生产素 β 亚基; αGSU, 促性腺激素 α 亚基; LH-R, 黄体生成素受体; FSH-R, 促卵泡生产素受体; β-actin, β-肌动蛋白

Note: GnRH-R, gonadotropin-releasing hormone receptor; LH-β, luteinizing hormone β subunit; FSH-β, follicle stimulating hormone β subunit; αGSU, gonadotropin α subunit; LH-R, luteinizing hormone receptor; FSH-R, follicle stimulating releasing hormone receptor

### 1.6 数据处理

利用 SAS9.0 统计学软件中 GLM 过程对所测数据进行单因子方差分析, 采用 Duncan 法进行数据间多重比较, 结果以平均值 ± 标准误表示。P < 0.05 表示数据差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 “逃逸”鼠

本研究中, 将处死时血清睾酮浓度和睾丸重量及体积与对照组雄鼠相应指标均无显著差异 (p > 0.05) 的免疫鼠定义为“逃逸”鼠 (Non-responders), 反之则定义为“免

疫去势”鼠 (Immunocastrates)。本试验中, 有一只“逃逸”鼠, 本文基因表达的数据分析中不包括该雄鼠的基因表达数据。

### 2.2 血清抗 GnRH 抗体滴度

如图 1 所示, GnRH 主动免疫后 12 只免疫雄鼠中, 11 只产生了较好的抗体反应 (免疫去势鼠), 1 只反应较弱 (逃逸鼠)。免疫去势鼠初免及加免后血清抗 GnRH 抗体滴度均显著升高, 处死时 (即加免后 4 周) 抗体滴度上升到 67% (血清稀释度为: 1: 3200)。而逃逸鼠血清抗体滴度从 4wpv 到处死时均显著低于免疫去势鼠 (p < 0.01), 处死时抗体滴度仅达 32% 的相对高值。

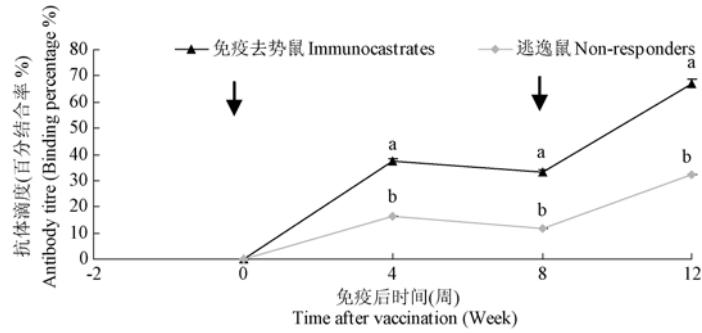


图1 血清抗 GnRH 抗体滴度

Fig. 1 Serum anti-GnRH antibody titers

同天相同字母表示差异不显著( $p < 0.05$ ),不同字母表示差异极显著( $p < 0.01$ )。箭头表示免疫时间点,图2,3,4同

The same lowercase letter within day donates no significant difference ( $p > 0.05$ ), a different lowercase letter within day donates an extremely significant difference ( $p < 0.01$ ). Arrows indicate time-points of vaccination, the same as Fig. 2, 3 and 4

表2 雄鼠睾丸重量及体积

Table 2 Testicular weight and volume of male rats

分组 Groups	n	睾丸重量 Testicular weight (g)	睾丸体积 Testicular volume ( $\text{mm}^3$ )
对照鼠 Intact controls	12	3.1185 $\pm$ 0.1306 <sup>Aa</sup>	1.078 $\pm$ 0.0339 <sup>Aa</sup>
免疫去势鼠 Immunocastrates	11	0.6219 $\pm$ 0.0525 <sup>B</sup>	0.2109 $\pm$ 0.0222 <sup>B</sup>
逃逸鼠 Non-responders	1	3.2383 <sup>a</sup>	0.9175 <sup>a</sup>

注:同列相同字母表示差异不显著, $p > 0.05$ ;不同小写字母表示差异显著, $p < 0.05$ ;不同大写字母表示差异极显著, $p < 0.01$

Note: The same superscript letter within column donates no significant difference ( $p > 0.05$ ); different lower-case superscript letter within column donates a significant difference ( $p < 0.05$ ); different capital superscript letter within column donates an extremely significant difference ( $p < 0.01$ )

### 2.3 睾丸重量及体积

如表2所示,GnRH主动免疫雄鼠后,免疫去势雄鼠睾丸严重萎缩,其重量及体积均下降到对照组睾丸的20% ( $p < 0.01$ )。而逃逸鼠睾丸无萎缩迹象,其重量及体积与对照组雄鼠睾丸均无显著差异( $p > 0.05$ )。

### 2.4 血清激素含量

血清睾酮浓度如图2所示,整个试验期间对照组雄鼠血清睾酮浓度维持平稳,在3.44~3.57 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内小幅波动,平均浓度为3.50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。免疫当天,免疫去势鼠及逃逸鼠的血清睾酮浓度与对照组雄鼠血清睾酮浓度相比均无显著差异( $p > 0.05$ )。GnRH主动免疫后,免疫去势雄鼠血清睾酮浓度缓慢下降,由初免当天的3.38 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下降到初免后4周的0.6 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

加免后2周及处死时血清睾酮浓度进一步下降到检测限(0.02 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )以下,从初免后2周至处死时其血清睾酮浓度均极显著低于对照组雄鼠及逃逸雄鼠血清睾酮浓度( $p < 0.01$ )。而逃逸鼠,初免后血清睾酮浓度略低于对照组血清睾酮浓度,但在整个试验期间与对照组雄鼠血清睾酮浓度无显著差异( $p > 0.05$ )。

如图3所示,对照组雄鼠血清LH浓度整个试验期间维持相对稳定,在3.30~4.49 $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内上下波动,平均值为3.46 $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。初免当天,免疫去势鼠及逃逸鼠与对照鼠血清LH浓度无显著差异( $p > 0.05$ )。GnRH主动免疫后,免疫去势鼠血清LH浓度缓慢下降,加免后2周及处死鼠时降至检测限(1 $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )附近,从初免后2周至处死时血清LH浓度均极显著低于对照组雄鼠血清LH浓度( $p < 0.01$ )。而逃逸鼠,GnRH主动免疫后,血清LH浓度略微下降,但从初免后4周至处死时血清LH浓度均极显著高于免疫去势鼠血清LH浓度( $p < 0.01$ )。且整个试验期间与对照组雄鼠血清LH浓度无显著差异( $p > 0.05$ )。

如图4所示,对照组雄鼠血清FSH浓度整个试验期间维持在3.38~4.48 $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,平均值为3.81 $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。GnRH主动免疫后,免疫去势雄鼠血清FSH均缓慢下降,初免后2周及处死时下降到检测限(1 $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )附近,从初免后2周至处死时血清FSH浓度均极显著低于对照组雄鼠血清FSH浓度( $p < 0.01$ )。而逃逸鼠,血清FSH浓度GnRH主动免疫后略微下降,整个试验期间与对照组雄鼠血清FSH浓度无显著差异( $p > 0.05$ ),但从初免后4周至处死时均极显著高于免疫去势鼠血清FSH浓度( $p < 0.01$ )。

### 2.5 睾丸组织结构

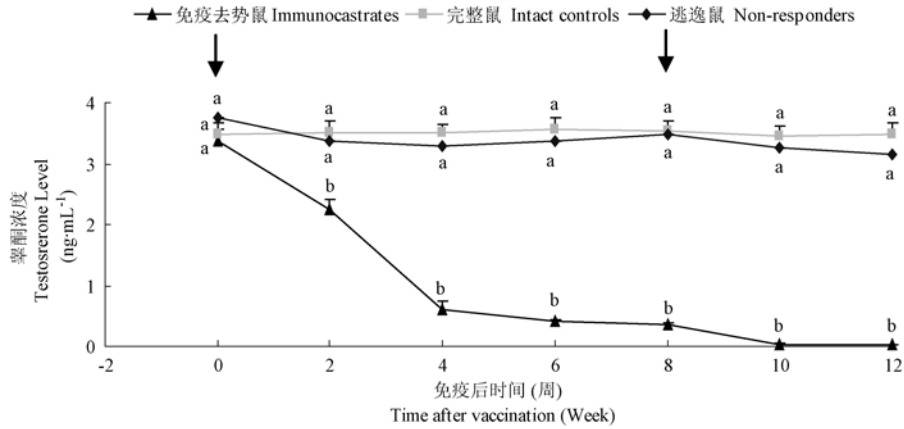


图 2 血清睾酮浓度

Fig.2 Serum testosterone levels

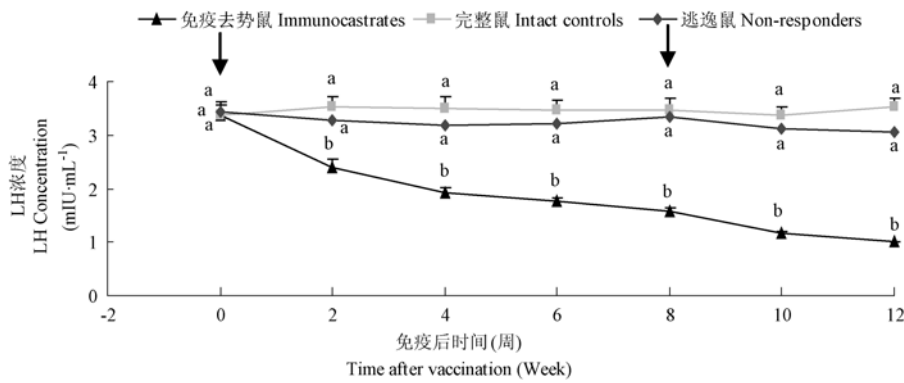


图 3 血清 LH 浓度

Fig.3 Serum LH concentrations levels

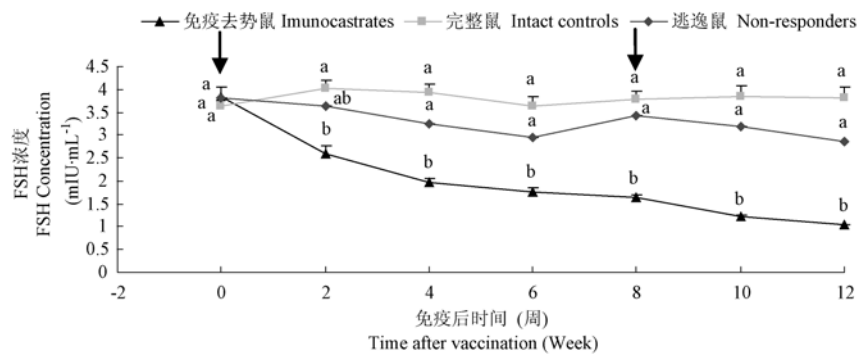


图 4 血清 FSH 浓度

Fig.4 Serum FSH levels

如图 5 所示,免疫去势雄鼠睾丸曲细精管明显萎缩,曲精细管上皮严重破坏,间质细胞萎缩且数量明显减少,精子发生停止,官腔空荡,仅见少量退化的精原细

胞;而逃逸鼠睾丸与正常对照鼠睾丸组织结构相似,曲精细管内各级生精细胞层次清晰,排列紧密,分化明显,上皮组织完整,间质细胞分布均匀。

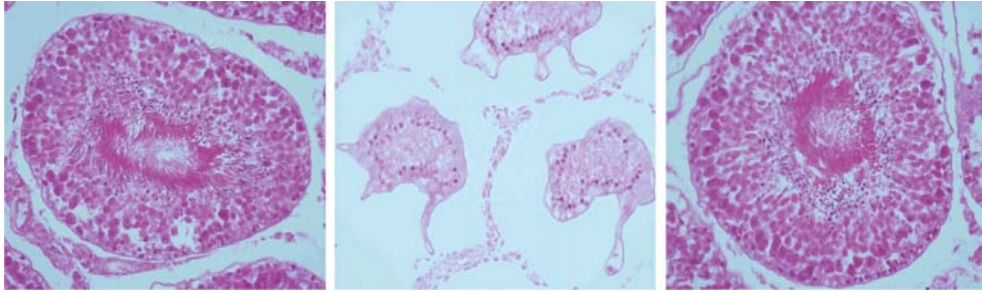


图 5 正常对照鼠(左)、免疫去势鼠(中)与逃逸鼠(右)睾丸组织切片图(10×40)

Fig.5 Histological analysis of the testes among intact rats (left), immunocastrates (middle) and non-responders (right)

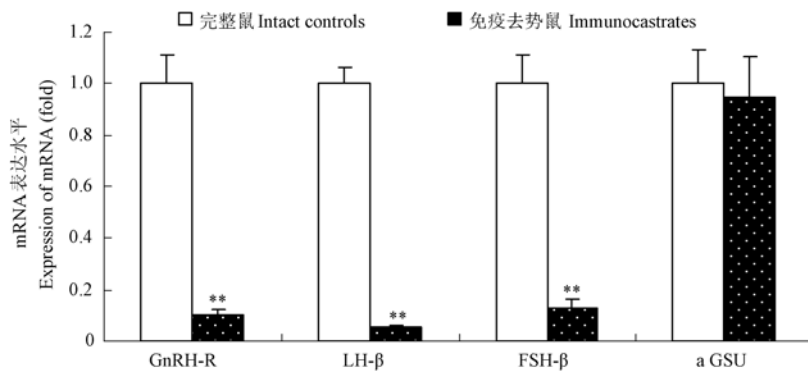


图 6 GnRH 主动免疫对垂体 GnRH 受体、 $\alpha$  GSU、LH- $\beta$  及 FSH- $\beta$  mRNA 表达水平的影响

Fig.6 Effects of active immunization against GnRH on the mRNA expression levels of pituitary GnRH-R,  $\alpha$  GSU, LH- $\beta$  and FSH- $\beta$

与对照组相比, \* 表示差异显著 ( $p < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $p < 0.01$ ), 图 7 同  
Compared to intact controls, \* donates a significant difference ( $p < 0.05$ ),  
\*\* donates an extremely significant difference ( $p < 0.01$ ), the same as Fig. 7

## 2.6 垂体-睾丸轴生殖基因 mRNA 表达变化

GnRH 主动免疫对垂体 GnRH 受体及促性腺激素亚基 mRNA 表达水平的影响如图 6 所示。与对照组相比, GnRH 主动免疫极显著下调 GnRH 受体、LH- $\beta$  及 FSH- $\beta$  mRNA 表达水平 ( $p < 0.01$ ), 而对促性腺激素  $\alpha$  亚基 ( $\alpha$  GSU) mRNA 的表达没有显著影响 ( $p > 0.05$ )。

GnRH 主动免疫对睾丸黄体生成素受体 (LH-R) 及促卵泡激素受体 (FSH-R) mRNA 表达水平的影响如图 7 所示。与对照组相比, GnRH 主动免疫极显著下调睾丸 LH-R 及 FSH-R mRNA 表达水平 ( $p < 0.01$ )。

## 3 讨论

生殖轴通过轴内多重正负反馈调控来维持生殖生

理的稳态。GnRH 主动免疫后, 动物机体产生大量抗 GnRH 抗体以特异性地“中和”内源性的 GnRH, 这势必打破生殖轴功能的稳态。值得提出的是, 生殖轴结构和功能的完整性不但是动物正常生殖功能发挥的基础, 也是动物实现生殖生理调控的前提。因此本研究结合生殖内分泌变化, 从分子水平上研究 GnRH 主动免疫对垂体-睾丸轴生理功能的影响, 以探讨 GnRH 免疫去势的分子机理。

本研究中, GnRH 主动免疫后 12 只免疫雄鼠中 11 只产生良好的抗体反应 (免疫去势鼠), 与相同疫苗在免疫去势猪上引起强烈抗体反应结果一致<sup>[14]</sup>。免疫去势鼠伴随着免疫后抗体滴度上升, 血清促性腺激素 LH 及 FSH 显著下降 ( $p < 0.01$ ), 睾丸严重萎缩 (图 5), 其重量和体积均下降到对照组睾丸的 20%, 同时血清 T 也

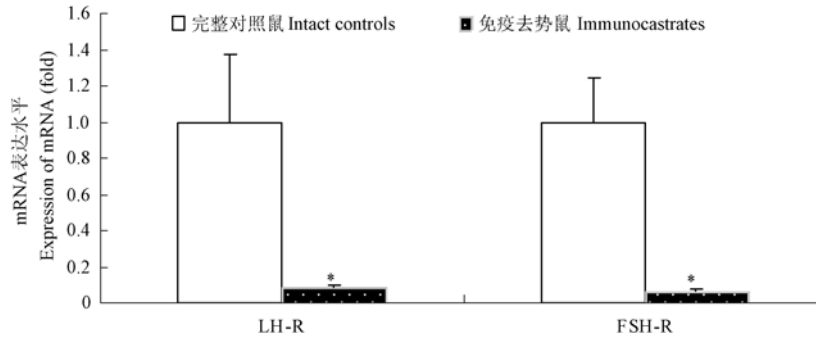


图7 GnRH 主动免疫对睾丸 LH-R 及 FSH-R mRNA 表达水平的影响

Fig.7 Effects of active immunization against GnRH on the mRNA expression levels of testis LH-R and FSH-R

下降到检测限以下( $p < 0.01$ )。这与 GnRH 主动免疫大鼠<sup>[15-16]</sup>、猪<sup>[4,17,18]</sup>及牛<sup>[19]</sup>等动物的研究结果一致。然而,本研究中也存在 1 只“逃逸”鼠,GnRH 主动免疫后抗体反应显著低于免疫去势鼠( $p < 0.01$ ),与较弱的抗体反应一致,逃逸鼠 GnRH 主动免疫后血清促性腺激素 LH 及 FSH,性腺激素 T 只是轻微下降,同时睾丸无萎缩迹象(图 5),其重量、体积及组织结构均与对照组雄鼠睾丸相似。GnRH 主动免疫后,也在大鼠<sup>[16]</sup>、猪<sup>[14]</sup>及猫<sup>[20]</sup>等动物上观察到部分动物个体存在免疫“逃逸”现象。分析上述研究及本研究中的免疫“逃逸”个体,均发现 GnRH 免疫后较弱的抗体反应是导致动物出现免疫“逃逸”现象的直接原因,而真实原因不清楚,可能跟动物个体的遗传差异有关。因此,GnRH 主动免疫后有效的抗体反应,是保证动物成功免疫去势的关键。此外,本研究中免疫去势鼠血清的 GnRH 抗体滴度与生殖激素间呈现出负相关关系,即随着血清抗体滴度的持续上升,血清 LH、FSH 及 T 缓慢下降直至下降到检测限附近或以下。而“逃逸”鼠中随着血清 GnRH 抗体滴度在低水平范围内上升,其血清 LH、FSH 及 T 几乎无变化,表明血清 GnRH 抗体需到达一定值(阈值)时,才能有效地抑制动物的生殖内分泌。GnRH 抗体阈值在控制动物生殖功能中的重要生物学作用也见于 GnRH 主动免疫后的猪<sup>[14]</sup>、猫<sup>[20]</sup>及鹿<sup>[21]</sup>等动物上。

GnRH 主动免疫显著下调免疫去势雄鼠垂体 GnRH 受体 mRNA 表达水平( $p < 0.01$ ),与 GnRH 主动免疫兔子<sup>[22]</sup>和猪<sup>[4]</sup>及 GnRH 被动免疫手术去势的公羊<sup>[23]</sup>上的研究结果一致。通过手术切断下丘脑垂体间联系<sup>[24]</sup>或是注射 GnRH 拮抗剂<sup>[25]</sup>阻断 GnRH 向垂体输入,研究证实垂体 GnRH 受体数量的稳态需要 GnRH 激素的维持。因此,GnRH 主动免疫不但阻止了内源性 GnRH

激素向垂体的输入,同时也下调了垂体 GnRH 受体的数量,降低了垂体对 GnRH 激素的反应性。这很可能是导致 GnRH 主动免疫绵羊后,当血清 GnRH 抗体滴度下降到低水平/检测不到水平时或抗体滴度仍处于高水平时注射 GnRH 类似物后绵羊仍未能恢复生殖功能的原因。此外,本研究中也发现 GnRH 主动免疫后促性腺激素 LH- $\beta$  及 FSH- $\beta$  mRNA 亚基表达水平显著下调,与前人研究结果一致<sup>[4,22-23]</sup>,进一步从分子水平上证实了 GnRH 主动免疫通过阻止内源性 GnRH 达到垂体及下调垂体 GnRH 受体数量来抑制促性腺激素的合成。

垂体分泌的 LH 及 FSH 分别通过与性腺相应受体特异性结合,来促进性激素的合成及配子的发生。本研究中,GnRH 主动免疫极显著降低了睾丸 LH 受体(LH-R)及 FSH 受体(FSH-R)mRNA 表达水平( $p < 0.01$ ),与 GnRH 主动免疫后猪上研究结果一致<sup>[26]</sup>,提示 GnRH 主动免疫可能通过下调 LH-R 及 FSH-R 基因的转录来下调性腺 LH-R 及 FSH-R 受体的数量。性腺促性腺激素 LH 及 FSH 受体 mRNA 表达水平的下调可能是由于 GnRH 主动免疫后血清 LH 及 FSH 激素的降低引起的。因此,性腺促性腺激素受体的稳态也可能需要促性腺激素的维持。有研究发现给 GnRH 主动免疫后的母猪注射孕马血清促性腺激素(PMSG)或是含 LH 和 FSH 的垂体提取液,均不能诱导卵巢雌二醇合成和维持卵泡发育<sup>[27]</sup>,给 GnRH 主动免疫后的公猪注射外源性 LH 或其取睾丸组织添加外源性 LH 进行体外培养,体内体外试验均表明 GnRH 主动免疫后公猪的睾丸酮生成反应性较完整对照公猪显著降低<sup>[26]</sup>。此外,在孕激素处理后,给 GnRH 主动免疫的绵羊多次注射 eCG 也未能诱导其排卵<sup>[11]</sup>。以上实验结果均说明 GnRH 主动免疫降低性腺对促性腺激素的反应性。这很可能是由于 GnRH

主动免疫降低性腺促性腺激素 LH 及 FSH 受体数量所致。

## 4 结论

综上所述,GnRH 主动免疫通过抗原-抗体特异性结合抑制生殖内分泌,同时生殖内分泌的下降又进一步下调垂体 GnRH 受体和性腺促性腺激素 LH 和 FSH 受体的表达,从而影响垂体-睾丸轴生理功能。

### 参考文献:

- [ 1 ] Schang A L, Counis R, Magre S, Bleux C, Granger A, Ngô - Muller V, Chenut M C, Ishaq M, Cohen-Tannoudji J, Laverrière J N. Reporter transgenic mouse models highlight the dualendocrine and neural facet of GnRH receptor function [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1220(1):16 - 22
- [ 2 ] Morales J I, Cámara L, Berrocoso J D, López J P, Mateos G G, Serrano M P. Influence of sex and castration on growth performance and carcass quality of crossbred pigs from 2 Large White sire lines [J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(11):3481 - 3489
- [ 3 ] Oonk H B, Turkstra J A, Schaaper W M, Erkens J H, Schuitemaker-de Weerd M H, van Nes A, Verheijden J H, Melen R H. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH [J]. *Vaccine*, 1998, 16(11 - 12):1074 - 1082
- [ 4 ] Fang F, Li H, Liu Y, Zhang Y, Tao Y, Li Y, Cao H, Wang S, Wang L, Zhang X. Active immunization with recombinant GnRH fusion protein in boars reduces both testicular development and mRNA expression levels of GRH receptor in pituitary [J]. *Animal Reproduction Science*, 2010, 119(3 - 4):275 - 281
- [ 5 ] Prendiville D J, Enright W J, Crowe M A, Vaughan L, Roche J F. Immunization of prepubertal beef heifers against gonadotropin-releasing hormone: immune, estrus, ovarian, and growth responses [J]. *Journal of Animal Science*, 1995, 73(10):3030 - 3037
- [ 6 ] Thompson D L. Immunization against GnRH in male species (comparative aspects) [J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 60 - 61:459 - 469
- [ 7 ] Herbert C A, Trigg T E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals [J]. *Animal Reproduction Science*, 2005, 88(1 - 2):141 - 153
- [ 8 ] Brown B W, Mattner P E, Carroll P A, Holland E J, Paull D R, Hoskinson R M, Rigby R D. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1994, 101(1):15 - 21
- [ 9 ] Brown B W, Mattner P E, Carroll P A, Hoskinson R M, Rigby R D. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects of reproduction functions and hormones in ewes [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, 103(1):131 - 135
- [ 10 ] Clarke I J, Brown B W, Tran V V, Scott C J, Fry R, Millar R P, Rao A. Neonatal immunization against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) results in diminished GnRH secretion in adulthood [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(4):2007 - 2014
- [ 11 ] Gökdal O, Atay O, Ulker H, Yarali E, Helva I B, Deavila D M, Reeves J J. GnRH or eCG treatment fails to restore reproductive function in GnRH immunized ewes [J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 112(3 - 4):251 - 260
- [ 12 ] Levy J K, Friary J A, Miller L A, Tucker S J, Fagerstone K A. Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive [J]. *Theriogenology*, 2011, 76(8):1517 - 1525
- [ 13 ] Ladd A, Prabhu G, Tsong Y Y, Probst T, Chung W, Thau R B. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone combined with androgen supplementation is a promising antifertility vaccine for males [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1988, 17(4):121 - 127
- [ 14 ] Zeng X Y, Turkstra J A, Melen R H, Liu X Y, Chen F Q, Schaaper W M, Oonk H B, Guo D Z, van de Wiel D F. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer, hormone levels and sexual development [J]. *Animal Reproduction Science*, 2002, 70(3 - 4):223 - 233
- [ 15 ] Awoniyi C A, Chandrashekar V, Arthur R D, Schanbacher B D, Falvo R E. Changes in testicular morphology in boars actively immunized against gonadotropin hormone-releasing hormone [J]. *Journal of Andrology*, 1988, 9(3):160 - 171
- [ 16 ] Fraser H M, Gunn A, Jeffcoate S L, Holland D T. Effect of active immunization to luteinizing hormone releasing hormone on serum and pituitary gonadotrophins, testes and accessory sex organs in the male rat [J]. *Journal of Endocrinology*, 1974, 63(2):399 - 406
- [ 17 ] Einarsson S, Brunius C, Wallgren M, Lundström K, Andersson K, Zamaratskaia G, Rodriguez-Martinez H. Effects of early vaccination with Improvac(®) on the development and function of reproductive organs of male pigs [J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 127(1 - 2):50 - 55
- [ 18 ] Turkstra J A, Van der staay F J, Stockhofe-zurwieden N, Woelders H, Melen R H, Schuurman T. Pharmacological and toxicological assessment of a potential GnRH vaccine in young-adult male pigs [J]. *Vaccine*, 2011, 29(21):3791 - 3801
- [ 19 ] Janett F, Gerig T, Tschuur A C, Amatayakul-Chantler S, Walker J, Howard R, Bollwein H, Thun R. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls [J]. *Theriogenology*, 2012, 78(1):182 - 188
- [ 20 ] Levy J K, Miller LA, Cynda Crawford P, Ritchey J W, Ross M K, Fagerstone K A. GnRH immunocontraception of male cats [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(6):1116 - 1130
- [ 21 ] Powers J G, Baker D L, Davis T L, Conner M M, Lothridge A H, Nett T M. Effects of gonadotropin-releasing hormone Immunization on reproductive function and behavior in captive female rocky mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) [J]. *Biology of Reproduction*, 2011, 85(6):1152 - 1160
- [ 22 ] Wei S, Bai J, Gong Z, Ma W, Wei M. GnRH agonist active immunization influences ovarian development and GnRH receptor



- mRNA expression levels of pituitary in Japanese white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. *Livestock Science*, 2011, 139(3):222-229
- [23] Sakurai H, Adams B M, Adams T E. Concentration of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of passive immunization against gonadotropin-releasing hormone [J]. *Journal of Animal Science*, 1997, 75(1):189-194
- [24] Gregg D W, Nett T M. Direct effects of estradiol-17 beta on the number of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovine pituitary [J]. *Biology of Reproduction*, 1989, 40(2):288-293
- [25] Murase M, Uemura T, Gao M, Inada M, Funabashi T, Hirahara F. GnRH antagonist-induced down-regulation of the mRNA expression of pituitary receptors: comparisons with GnRH agonist effects [J]. *Journal of Endocrinology*, 2005, 52(1):131-137
- [26] Awoniyi C A, Santulli R, Chandrashekar V, Schanbacher B D, Zirkin B R. Quantitative restoration of advanced spermatogenic cells in adult male rats made azoospermic by active immunization against luteinizing hormone or gonadotropin-releasing hormone [J]. *Endocrinology*, 1989, 125(3):1303-1309
- [27] Esbenshade K L. Ovarian response to pregnant mare serum gonadotropin and porcine pituitary extract in gilts actively immunized against gonadotropin releasing hormone [J]. *Journal of Animal Science*, 1987, 65(6):1768-1774
- \*\*\*\*\*
- (上接第 522 页)
- [23] Banks J N, Chaudhry M Q, Matthews W A. Production and characterisation of polyclonal antibodies to the common moiety of some organophosphorous pesticides and development of a generic type ELISA [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 1998, 10(4):349-361
- [24] Jang M S, Lee S J, Xue X P. Production and characterisation of monoclonal antibodies to a generic hapten for class specific determination of organophosphorus pesticides [J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2002, 23(8):1116-1121
- [25] 刘贤进, 严春荣, 刘媛, 余向阳, 张存政. 有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计及广谱特异性抗体的制备 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(3):727-733
- [26] Liang Y, Liu X J, Liu Y. Synthesis of three haptens for the class specific immunoassay of O, O dimethyl organophosphorous pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 615(2):174-183
- [27] 魏东, 杨正涛, 李颖, 郭昌明, 刘辉, 张乃生. 氟啶酮类药物残留免疫学检测方法的研究 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(12):1593-1598
- [28] Wang Z H, Zhu Y, Ding S Y, He F, Beler R C, Li J, Jiang H, Feng C, Wan Y, Zhang S, Kai Z, Yang X, Shen N J. Development of a Monoclonal Antibody Based Broad Specificity ELISA for Fluoroquinolone Antibiotics in Foods and Molecular Modeling Studies of Cross Reactive Compounds [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(12):4471-4483
- [29] Zhang H Y, Duan Z J, Wang L, Zhang Y, Wang S. Hapten synthesis and development of polyclonal antibody based multi-sulfonamide immunoassays [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54:4499-4505
- [30] Spinks C A, Wyatt G M, Lee H A, Morgan M R. Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassay of sulfonamide antibodies [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, 10:583-588
- [31] Cao Y, Suresh M R. Bispecific Antibodies as Novel Bioconjugates [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1998, 9(6):635-644