

双拷贝抑制素基因免疫对大鼠卵泡发育、产仔及生殖激素的影响

王水莲^{1*}, 薛立群¹, 邢朝芳², 陈小军¹, 杨利国^{3*}

(1. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128; 2. 南京农业大学动物繁育研究所, 南京 210095;
3. 华中农业大学动物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 将 90 只大鼠随机分为 5 组, 分别注射 $10 \mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ pcISI (T_1)、 $50 \mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ pcISI (T_2)、 $100 \mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ (T_3) pcISI、 $100 \mu\text{g}$ 空载体 pcMV-S (V) 和 $100 \mu\text{L}$ 生理盐水 (S), 以探讨在不使用免疫佐剂的情况下, 不同剂量的双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫对大鼠卵泡发育、产仔和生殖激素的影响。结果表明, 加强免疫能提高抗体 P/N 值, 加强免疫后各剂量组平均抗体 P/N 值大于 2, T_3 组抗体 P/N 值显著高于 T_1 和 T_2 组 ($P < 0.05$)。 T_3 组成熟卵泡数显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且抗体阳性鼠成熟卵泡数比阴性鼠多 12.45 个 ($P < 0.05$)。除了 T_1 组外, 其他 2 个剂量组产仔数和胎盘数均高于对照组 ($P < 0.05$)。抗体阳性鼠胎盘数比阴性鼠多 5.09 个 ($P < 0.05$), 产仔数比阴性鼠多 5.39 个 ($P < 0.05$)。抑制素 pcISI 基因免疫大鼠后促卵泡素 (FSH)、雌二醇 (E_2) 和孕酮 (P_4) 含量均高于对照组, T_3 组的 FSH 含量与对照组差异显著 ($P < 0.05$), T_3 组的 E_2 含量与对照组差异极显著 ($P < 0.01$), 各剂量组 P_4 含量与对照组差异均不显著 ($P > 0.05$)。这些结果说明, 在没有免疫佐剂的前提下, 双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫可产生抗体, 促进 FSH 分泌和卵泡发育, 增加产仔数。本试验条件下 $100 \mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ 是最佳免疫剂量。

关键词: 抑制素基因; 卵泡; 产仔数; 生殖激素; 大鼠

中图分类号: Q955

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0057-08

Effect of Inhibin DNA Vaccine Harboring Two Copies of Inhibin Gene on Follicle Development, Production and Reproductive Hormones in Rats

WANG Shui-lian^{1*}, XUE Li-qun¹, XING Zhao-fang², CHEN Xiao-jun¹, YANG Li-guo^{3*}

(1. Collge of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. Institute of Animal Reproduction, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
3. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China)

Abstract: Ninety rats were randomly assigned to five dosage groups of 18 each (T_1 , T_2 , T_3 , V, S, which was immunized with 10 , 50 , $100 \mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ of pcISI, $100 \mu\text{g}$ pcMV-S and $100 \mu\text{L}$ physiological saline per rat, respectively) to investigate the effect of double copies inhibin pcISI gene immunization on follicle development, production and reproductive hormones without any immune adjuvant. The results showed that the booster immunization could improve P/N value of antibody against inhibin, the average P/N value of antibody against inhibin of different dosages groups was higher than 2 after booster immunization, and the antibody level against inhibin in T_3 group was higher than that in T_1 and T_2 ($P < 0.05$) groups. Number of the mature follicles in the

收稿日期: 2011-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972099); 现代农业产业技术体系项目; 湖南省科技计划项目 (2009FJ4053); 湖南农业大学人才稳定基金 (2007WD03)

作者简介: 王水莲 (1973-), 女, 湖南湘阴人, 副教授, 博士, 主要从事动物生殖调控与生殖免疫研究

* 通讯作者: 杨利国, E-mail: yangliguo@yahoo.com.cn; 王水莲, E-mail: wangshuilian1234@yahoo.com.cn

T_3 group was higher than that in the control groups ($P < 0.05$). The rats with positive antibodies had more 12.45 in number of mature follicles than that of rats with negative antibodies ($P < 0.05$). In contrast to the control groups, litter sizes and number of the placentas were increased significantly in the pcISI immunization groups except for T_1 group ($P < 0.05$). 5.09 more placentas and 5.39 more litter sizes on average were also found in the positive-antibody rats than those in the negative-antibody rats ($P < 0.05$). The levels of follicle stimulating hormone (FSH) and estradiol (E_2) in the plasma of rats immunized with different dosages of pcISI plasmids were higher than that of the control animals, FSH and E_2 levels in T_3 group was higher than that in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), there was no significant difference in P_4 levels between different dosages groups and control group was observed ($P > 0.05$). These findings demonstrate that double copies inhibin *pcISI* gene can enhance the immune response, stimulate FSH secretion and follicle development, improve the litter size without any immune adjuvant. The immune dosage of $100 \mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ is the optimum dosage in the study.

Key words: inhibin gene; follicle; litter size; reproductive hormone; rat

抑制素的主要作用是抑制促卵泡素 (Follicle stimulating hormone, FSH) 分泌。抑制素免疫能通过中和内源性抑制素增加单胎动物^[1-4]和多胎动物^[5-7]分泌 FSH 的能力, 促进卵泡发育。研究表明, 抑制素基因疫苗制备简单, 构建成本低, 纯度高, 用抑制素基因免疫动物可引起宿主产生相应的特异性免疫应答^[8]。因此, 抑制素基因免疫技术在提高动物繁殖功能上具有一定的优越性。用已构建的抑制素原核表达质粒 pcINH 免疫大鼠能产生抗抑制素抗体^[9]。在免疫佐剂辅佐下, 单拷贝抑制素基因 pcIS 免疫可诱导大鼠^[10-13]、绵羊^[13-14]、黄牛^[15]等产生抗抑制素抗体, 促进卵泡发育。随后, 曹少先等扩增了 pcIS 质粒的抑制素基因片段, 将带有 *Bam*H I 酶切位点的目的片段插入 HBsAg-S (Hepatitis B surface antigen gene) 区第 112~113 氨基酸密码子之间, 构建了含 2 个拷贝抑制素 (Inhibin, INH) 片段的基因疫苗 pcISI, 并证实了双拷贝抑制素 pcISI 质粒的免疫源性比单拷贝抑制素 pcIS 更强^[16]。相关研究表明, 在免疫佐剂协助下, 双拷贝抑制素 pcISI 能促进小鼠^[17]、黄牛^[18-19]产生抗体, 增强动物的繁殖性能。前期研究也表明, 在不使用佐剂的情况下, 双拷贝抑制素基因 pcISI 免疫不仅可以增加黄牛成熟卵泡大小, 还能促进妊娠黄体发育^[20]。那么, 在不使用免疫佐剂时双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫是否可影响大鼠成熟卵泡数、产仔和生殖激素分泌呢? 目前尚无这方面的报道。

在不使用免疫佐剂的情况下, 本研究分别用 10、50、100 $\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ 双拷贝抑制素 pcISI 基因

免疫大鼠, 探讨了 pcISI 对大鼠卵泡发育、产仔和生殖激素的影响, 分析了抑制素基因免疫大鼠的抗体水平与卵巢发育和产仔的关系, 以深入了解卵泡抑制素基因免疫的作用机制, 为建立提高动物繁殖力的新技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

双拷贝抑制素与乙肝表面抗原基因融合表达质粒 pcISI 为曹少先等^[16]构建; 抑制素抗原肽 a(1-26 Tyr·Gly) 由崔大敷等合成; HRP 兔抗鼠 IgG 二抗为 Sigma 公司产品; 酶标板为 GibcoBRL 公司产品。FSH 检测试剂盒为天津九鼎医学生物工程有限公司产品 (KFSD1), 测定灵敏度为 $0.5 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$, 批内变异系数小于 8.7%; E_2 检测试剂盒为天津德普生物技术和医学产品有限公司产品 (KE2D1), 测定灵敏度为 $0.005 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 变异系数小于 7.6%; P_4 检测试剂盒为北京市福瑞生物工程公司产品 (ER-FJ-037), 测定灵敏度为 $0.064 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 变异系数小于 11.9%。

1.2 质粒的大量制备及纯化

按文献^[21]抽提纯化质粒, 按文献^[22]对质粒进行浓缩后, 用生理盐水稀释至终浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 试验动物分组及免疫

动物分组: 90 只 2 月龄 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别肌肉注射 10 $\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ pcISI (T_1)、50 $\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ pcISI (T_2)、100 $\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ pcISI (T_3)、100 μg 空载体 pcMV-S (V) 和 100 μL 生理

盐水(S)。

免疫程序:分别给 3 个剂量组大鼠肌肉注射 10、50 和 100 $\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ pcISI 质粒,初次免疫 4 周后再分别在相同部位进行同剂量加强免疫,每次免疫前 24 h 于相同部位注射 0.5% 盐酸普鲁卡因。在 2 次免疫的同时用空质粒和生理盐水分别对空白质粒对照组(V)和生理盐水对照组(S)实施相应处理。

1.4 卵巢发育和产仔观察

按文献[23]观察大鼠的发情周期,加强免疫后第 4 周对每组随机选取 12 只大鼠,于动情期用颈椎脱臼法处死大鼠,取其卵巢,剔除脂肪组织,用游标卡尺测量卵巢长度(OL)与宽度(OW),并统计卵巢上成熟卵泡($d \geq 0.8 \text{ mm}$)的个数。对每组中另外 6 只大鼠与 1 只公鼠合笼,待自然生产后处死,剖腹记录子宫内胎盘数和窝产仔数。

1.5 血样检测

分别在初次免疫当天(PM0)、初次免疫后 2 周(PM2)、初次免疫后 4 周(PM4)、加强免疫后 2 周(BM2)、加强免疫后 4 周(BM4)对所有大鼠尾部采血,肝素钠抗凝,制备血浆, -20°C 保存。采用酶联免疫吸附测定方法(ELISA)检测血浆中抗抑制素抗体效价(用 P/N 值表示)^[24],即以人工合成的抑制素亚基 a (1~26) 作为标准包被抗原,鼠血浆稀释 100 倍,以 P/N 值 > 2 判为阳性,其中 P 为待测血样

的吸光值,N 为阴性对照血样吸光值。应用放射免疫双抗法测定加强免疫后第 4 周(BM4)各组大鼠血浆中 FSH、 E_2 及 P_4 含量。

1.6 统计分析

采用 SAS 8.2 软件包进行统计学分析。各级抗体 P/N 值、卵巢参数、成熟卵泡数、窝产仔数、胎盘数和生殖激素含量均以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,其组间差异采用方差分析法;百分率用卡方分析。

2 结 果

2.1 双拷贝抑制素基因免疫对大鼠免疫反应性的影响

不同剂量抑制素 pcISI 基因免疫大鼠,各剂量组抗体平均 P/N 值均高于 2 个对照组,整个免疫期均与对照组差异显著($P < 0.05$,表 1)。加强免疫后各剂量组抗体水平明显上升,抗体 P/N 平均值均大于 2,且在第 2 周(BM2)均达最大; T_1 组抗体平均 P/N 值最低, T_3 组最高, T_3 组与 T_1 和 T_2 组差异均显著($P < 0.05$,表 1)。加强免疫后各剂量组抗体阳性率上升明显, T_3 与 T_1 和 T_2 组差异均显著($P < 0.05$),其中加强免疫第 2 周(BM2) T_3 组抗体阳性率达 83.33%(表 2)。研究结果表明,在本试验条件下,双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫大鼠可诱导产生抗体,100 $\mu\text{g} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ 的免疫效果最佳。

表 1 双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫对大鼠抗抑制素抗体 P/N 值的影响

Table 1 Effect of inhibin pcISI gene immunization on the P/N value of antibodies against inhibin of the rats

组别 Group	初次免疫 Primary immunization		加强免疫 Booster immunization	
	PM2	PM4	BM2	BM4
T_1 (n=18)	1.91 ± 1.15^a	1.94 ± 1.22^a	2.59 ± 0.58^b	2.35 ± 0.89^b
T_2 (n=18)	1.79 ± 0.9^a	1.89 ± 1.04^a	2.86 ± 0.75^b	2.51 ± 0.66^b
T_3 (n=18)	1.72 ± 0.67^a	2.18 ± 0.60^a	3.92 ± 1.06^a	3.41 ± 0.58^a
V(n=18)	1.18 ± 0.42^b	1.06 ± 0.37^b	1.26 ± 0.36^c	1.00 ± 0.20^c
S(n=18)	1.09 ± 0.35^b	0.91 ± 0.23^b	1.14 ± 0.43^c	0.97 ± 0.27^c

同一列中小写字母有相同者为差异不显著($P > 0.05$),完全不同者为差异显著($P < 0.05$)。下同

In the vertical row, significant level is $P > 0.05$ between values scripted with the same small letter, and $P < 0.05$ with completely different small letters, the same as below

2.2 双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫对生殖激素的影响

不同剂量抑制素 pcISI 加强免疫 4 周后,各剂量组 FSH 含量均高于对照组,除了 T_1 组外,其它 2

个剂量组均与对照组差异显著($P < 0.05$);各剂量组比较, T_1 组 FSH 含量最低, T_3 组最高,且 T_3 组与 T_1 及 T_2 组差异均显著($P < 0.05$,图 1)。各剂量组 E_2 含量均高于对照组, T_3 组与对照组差异极

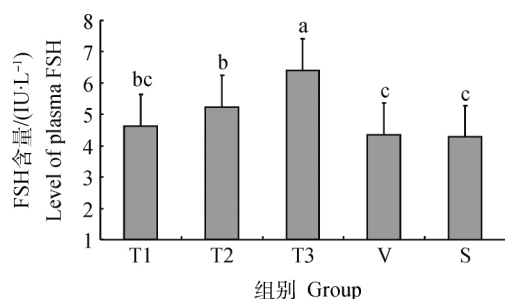
显著($P < 0.01$), T_1 和 T_2 组与对照组差异均显著($P < 0.05$); 各剂量组比较, T_1 组 E_2 含量最低, T_3 组最高, T_3 与 T_1 和 T_2 组差异均显著($P < 0.05$, 图

2)。各剂量组孕酮(P_4)含量均高于对照组, 但统计差异不显著($P > 0.05$, 图 3)。

表 2 双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫对大鼠抗体阳性率的影响

Table 2 Percentage of rats with positive antibody against inhibin at different weeks after immunization of pcISI %

组别 Group	初次免疫 Primary immunization		加强免疫 Booster immunization	
	PM2	PM4	BM2	BM4
T_1 (n=18)	22.22 ^a (4/18)	27.78 ^b (5/18)	44.44 ^b (8/18)	33.33 ^b (6/18)
T_2 (n=18)	16.67 ^a (3/18)	22.22 ^b (4/18)	55.56 ^b (10/18)	38.89 ^b (7/18)
T_3 (n=18)	22.22 ^a (4/18)	44.44 ^a (8/18)	83.33 ^a (15/18)	61.11 ^a (11/18)



字母相同者表示差异不显著($P > 0.05$), 小写字母不同者为差异显著($P < 0.05$), 大写字母不同者为差异极显著($P < 0.01$)。图 2 和图 3 同

Significant level is $P > 0.05$ between values scripted with the same letter, $P < 0.05$ with completely different small letters, and $P < 0.01$ with completely different capital letters. The same as Figure 2 and Figure 3

图 1 加强免疫后第 4 周各组促卵泡素 (FSH) 含量

Fig. 1 The level of FSH at BM4 after twice immunizations of pcISI

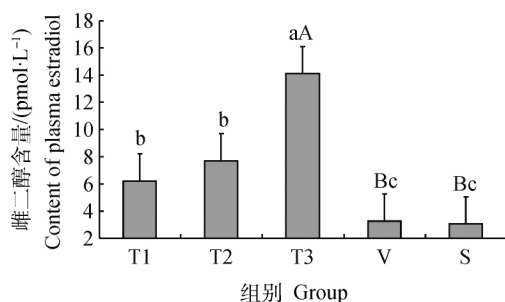


图 2 加强免疫后第 4 周各组雌二醇含量

Fig. 2 The level of estradiol at BM4 after twice immunizations of pcISI

2.3 双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫对卵泡发育的影响

各剂量组卵巢大小(含长径和短径)均高于 2 个

对照组, 除 T_1 组外, 其它 2 个剂量组均与对照组差异显著($P < 0.05$); 各剂量组卵巢质量均高于对照组, 但差异不显著($P > 0.05$, 表 3)。 T_3 组成熟卵泡数高于对照组, 且差异显著($P < 0.05$); 各剂量组相比较, T_3 组成熟卵泡数高于 T_1 和 T_2 组, 但差异不显著($P > 0.05$, 表 3)。抗体阳性鼠成熟卵泡比抗体阴性鼠多 12.45 个 (48.32 ± 6.77 vs 35.87 ± 5.62 , $P < 0.05$, 表 4)。抗体阳性鼠抗体水平与卵巢成熟卵泡数相关 ($P < 0.05$), 但与卵巢大小不相关 ($P > 0.05$, 表 5)。

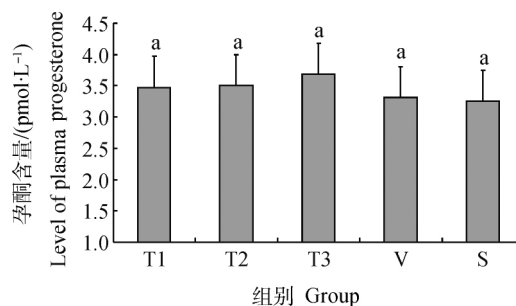


图 3 加强免疫后第 4 周各组孕酮含量

Fig. 3 The level of progesterone at BM4 after twice immunizations of pcISI

2.4 双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫对产仔的影响

各剂量组产仔数和胎盘数均高于 2 个对照组, 除 T_1 组外, 其它 2 个剂量组均与对照组差异显著($P < 0.05$); 对 3 个剂量组来说, T_3 组产仔数最高, T_1 组最低, 且 T_3 与 T_1 组差异显著($P < 0.05$), 与 T_2 组差异不显著($P > 0.05$, 表 6)。抗体阳性鼠的窝产仔数和胎盘数分别比阴性鼠多 5.39 和 5.09 个 ($P < 0.05$, 表 7)。分析阳性鼠抗体水平与产仔数等的相关性, 发现抑制素抗体水平与大鼠窝产仔数

和子宫内胎盘数均相关 ($P < 0.05$, 表 8)。

表 3 抑制素 pcISI 基因免疫对卵巢参数的影响

Table 3 Ovary index in different dosage groups after immunization of pcISI

组别 Group	卵巢长径/mm Length of ovary	卵巢短径/mm Width of ovary	卵巢质量/mg Weight of ovary	成熟卵泡数 Number of mature follicles	成熟卵泡数范围 Range of number of mature follicles
T ₁ (n=6)	6.22±0.60 ^{ab}	4.02±0.58 ^{ab}	38.7±2.58 ^a	37.26±5.17 ^{ab}	27~49
T ₂ (n=6)	6.34±0.70 ^a	4.32±0.76 ^a	46.6±1.94 ^a	37.80±6.28 ^{ab}	32~54
T ₃ (n=6)	6.56±0.51 ^a	4.35±0.59 ^a	44.7±4.15 ^a	46.00±5.50 ^a	38~54
V (n=6)	6.04±0.89 ^b	3.77±0.65 ^b	39.0±3.29 ^a	29.25±4.69 ^b	22~38
S (n=6)	5.98±1.00 ^b	3.78±0.65 ^b	37.5±3.22 ^a	27.90±4.26 ^b	21~35

表 4 阳性鼠与阴性鼠成熟卵泡数比较

Table 4 Comparison of mature follicles between rats with positive and negative antibody

抗抑制素抗体 Antibody against inhibin	样本数 Number	成熟卵泡数 Number of mature follicles	范围 Range of mature follicles
阳性组 Positive group	16	48.32±6.77 ^a	38~62
阴性组 Negative group	20	35.87±5.62 ^b	28~47

表 5 抑制素抗体水平与卵巢参数的相关 (n=16)

Table 5 Correlation coefficients between inhibin antibody and ovary indexes (n=16)

	卵巢长径/mm Length of ovary	卵巢短径/mm Width of ovary	成熟卵泡数 Number of mature follicles
PM2	0.347	0.249	0.35
PM4	0.395	0.282	0.53
BM2	0.426	0.32	0.72 [*]
BM4	0.52	0.49	0.70 [*]
OL		0.182	0.40
OW			0.495

* 表示相关显著 ($P < 0.05$); ** 表示相关极显著 ($P < 0.01$)。表 8 同

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. The same as Table 8

表 6 各组产仔情况比较

Table 6 Comparison of production in different dosage groups after immunization of pcISI

组别 Group	产仔数 Litter size	胎盘数 Number of placenta
T ₁ (n=6)	12±2.57 ^b	13.69±1.81 ^b
T ₂ (n=6)	15.25±1.67 ^a	16.57±2.11 ^a
T ₃ (n=6)	16.2±2.16 ^a	17.16±6.12 ^a
V (n=6)	10.8±1.88 ^b	11.2±2.08 ^b
S (n=6)	10.82±2.45 ^b	12.8±2.45 ^b

表 7 阳性鼠与阴性鼠产仔情况比较

Table 7 Comparison of production between rats with positive and negative antibody

抗抑制素抗体 Antibody against inhibin	样本数 N	产仔数 Litter size	胎盘数 Number of placenta
阳性组 Positive group	8	15.00±0.27 ^a	15.90±0.30 ^a
阴性组 Negative group	10	9.61±0.54 ^b	10.81±0.71 ^b

表 8 抑制素抗体水平与产仔的相关

Table 8 Correlation coefficients between inhibin antibodies and production (n=8)

	胎盘数 Number of placenta	产仔数 Litter size
PM2	0.62	0.39
PM4	0.74 [*]	0.52
BM2	0.84 [*]	0.77 [*]
BM4	0.81 [*]	0.64 [*]
Placenta		0.95 ^{**}

3 讨 论

3.1 抑制素基因免疫对大鼠抗体水平的影响

研究表明,在脂质体等免疫佐剂协助下,抑制素重组质粒 pcINH^[9]和单拷贝抑制素 pcIS^[25]基因免疫均可诱导大鼠产生抗抑制素抗体。茆达干等^[17]应用细菌 DNA 和 gm-csf 编码载体协同抑制素 pcISI 基因免疫小鼠,发现这 2 种佐剂均可促进小鼠产生体液免疫应答。先前的研究结果也表明,添加脂质体等佐剂时,单拷贝抑制素融合表达质粒 pcIS^[15,26]和双拷贝抑制素融合质粒 pcISI^[18-19]均能促进黄牛产生抗体。因此,免疫佐剂能增强 pcIS 和 pcISI 2 种质粒的免疫反应性。此外,茆达干等^[11]用单拷贝抑制素 pcIS 质粒经脂质体介导免疫大鼠后发现,高剂量组抗体 P/N 值高于中、低剂量组,这表明高剂量免疫并未导致大鼠产生明显的自身免疫反应,抗体水平与免疫剂量具有一定的依赖关系。本试验结果表明,在不使用佐剂的情况下,用不同剂量双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫大鼠时,各处理组抗体 P/N 值和抗体阳性率均较高,加强免疫后 T₁组最低, T₃组最高。因此,随着免疫剂量的增加大鼠免疫应答效果增强,呈现剂量依赖关系。这一点与周永兴等^[27]的报道相同。但是, Liang 等^[28]用生长抑制素 pcS/2SS 基因免疫大鼠后发现抗体水平并非随免疫剂量增加而上升。这可能是由于核酸疫

苗的免疫剂量不仅受质粒大小、免疫途径和方法影响,还受质粒转染效率、局部细胞摄取 DNA 能力和抗原提呈效率等因素的影响^[12]。

3.2 抑制素基因免疫对大鼠卵泡发育的影响

抑制素能抑制卵母细胞 DNA 合成,从而抑制卵母细胞的分裂与成熟^[29]。抑制素免疫能促进卵泡发育,提高排卵率^[30-31]。在免疫佐剂作用下,用单拷贝抑制素 pcIS 基因二次免疫大鼠,100 μg 组成熟卵泡数高于对照组,但差异不显著^[12]。但在本研究中,尽管笔者没有使用免疫佐剂,100 μg·100 μL⁻¹剂量组成熟卵泡数明显高于对照组($P<0.05$)。这样,在同等条件下,pcISI 促进大鼠卵泡发育能力要比 pcIS 质粒更强。本试验中,pcISI 免疫后大鼠卵巢明显大于对照组(用卵巢长径和短径表示),其原因可能是免疫后每个成熟卵泡直径均增大,从而使整个卵巢增大。因此,卵泡发育能力的增强要以高水平抗体作为基础,即使没有使用免疫佐剂,双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫可通过产生更多特异性抗体促进大鼠卵泡发育。

3.3 抑制素抗体水平与卵泡发育的关系

Morris 等^[32]比较了人工合成的牛卵泡抑制素 α 亚基的 3 种片段(F₁、F₂、F₃),发现牛血清与抑制素的平均结合率分别为 27.5%、5.5%、21.5%;F₂组排卵率与抗体效价呈正相关,而 F₃组与抗体效价呈负相关。Scanlon 等^[33]用牛抑制素 α(1~26)主动免疫青年母牛,结果发现免疫后不同时期排卵率与抑制素抗体效价的相关系数最高发生于 3 次加强免疫后第 36 天,最低发生于 2 次加强免疫后第 69 天,总体上 3 次加强免疫后的相关系数高于 2 次加强免疫。茆达干等^[12]用 pcIS 3 次免疫大鼠后的抗体水平与成熟卵泡数的相关性不显著。王水莲等^[20]用 pcISI 免疫黄牛后发现,加强免疫后第 10 天抗体水平与成熟卵泡大小相关显著($r=0.629, P<0.05$)。在没有使用免疫佐剂的情况下,本研究用 pcISI 2 次免疫大鼠的结果表明,整个加强免疫期抗体 P/N 值与成熟卵泡发育数均显著相关($P<0.05$)。因此,

关于抑制素抗体水平与卵泡发育的关系,迄今为止的报道不一致,抑制素抗体影响卵泡发育的机制也有待进一步研究。

3.4 抑制素基因免疫对产仔的影响

姜勋平等^[8]用抑制素 $\alpha(1\sim 32)$ 质粒免疫小鼠,抑制素抗体阳性鼠与阴性鼠的产仔数无显著差异。茆达干等^[12]用单拷贝抑制素 pcIS 基因 3 次免疫大鼠后,阳性鼠胎盘数和窝产仔数分别比阴性鼠多 6.9 和 7 个($P<0.05$)。本研究中,随着免疫剂量的增加,胎盘数和窝产仔数均增加,这可能是由于 pcISI 免疫后,大鼠卵泡发育能力增强,排卵率上升,从而使胚胎数增加,最终导致产仔数和子宫内胎盘数增多,这一点与 Mei 等^[34]的报道类似。因此,抑制素基因免疫技术可为研究如何提高胚胎产量提供一定依据。

3.5 抑制素基因免疫对生殖激素的影响

研究表明,抑制素免疫可中和内源性抑制素,对绵羊^[1-2]、山羊^[3]、母牛^[4]、大鼠^[5]、豚鼠^[6]和母猪^[7]等分泌 FSH 有重要的调节作用。本研究也表明 FSH 分泌量在 T_3 组最高,且与对照组有显著差异,这可能是由于 T_3 组抗体水平最高导致。因此,在不使用免疫佐剂时双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫能促进 FSH 分泌,且存在剂量依赖关系。

用 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot 100\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 单拷贝抑制素 pcIS 免疫大鼠,经过 2 次加强免疫后,免疫组雌二醇(E_2)与对照组有显著性差异^[9]。但本研究中,仅经过 1 次加强免疫, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot 100\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 剂量组(T_3)的 E_2 水平与对照组有极显著差异($P<0.01$), $50\text{ }\mu\text{g}\cdot 100\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 剂量组(T_2)与对照组有显著差异($P<0.05$),这可能是由于双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫后,这 2 组 FSH 含量高,加快了卵泡发育的进程,从而使 E_2 含量明显增多^[35]。

茆达干等^[9]用单拷贝抑制素 pcIS 结合免疫佐剂免疫大鼠,随着免疫次数的增加,发情期及母鼠产后血浆 P_4 浓度均逐渐上升,但各组之间 P_4 水平无显著差异。张德坤等^[13]发现用抑制素融合基因 pcIS 免疫绵羊后, P_4 含量上升,但与对照组无显著性差异。王水莲等^[26]用 pcIS 免疫黄牛后发现各免疫组黄牛血清 P_4 含量在加强免疫前差异均不显著,加强免疫后免疫组和对照组差异显著。所有这些结果表明,抑制素基因免疫对动物 P_4 分泌有影响,与免疫次数密切相关。本研究中,孕酮含量在各免疫组和对照组之间没有显著差异,这很可能是由于此

时大部分成熟卵泡没有排卵,或者是由于排卵后没有形成黄体引起^[3]。因此,抑制素基因免疫对孕酮分泌的影响除了与免疫剂量、免疫次数等因素有关外,还与动物卵巢所处的发育阶段有关。本试验分析的是加强免疫后第 2 周大鼠的生殖激素,尽管研究结果表明抑制素基因免疫能明显调节内分泌激素含量,但整个免疫期生殖激素的动态变化情况如何,还有待进一步研究。

4 结 论

在本试验条件下,双拷贝抑制素 pcISI 基因免疫大鼠可产生抗抑制素抗体, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot 100\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 的免疫效果最好。 T_3 组成熟卵泡数最多,产仔数和胎盘数也最多;阳性鼠抗抑制素抗体水平与成熟卵泡数、窝产仔数和子宫内胚胎数均显著相关;本试验条件下, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot 100\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 是最佳免疫剂量。

参考文献:

- [1] ANDERSON S T, BINDON B M, HILLARDD M A, et al. Increased ovulation rate in Merino ewes immunized against small synthetic peptide fragments of the inhibin α -subunit [J]. *Reprod Fertil Dev-el*, 1998,10: 421-431.
- [2] FORAGE R G, BROWN R W, OLIVER K J, et al. Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep [J]. *J Endocrinol*, 1987, 114:R1-R4.
- [3] MEDAN M S, WATANABE G, SASAKI K, et al. Ovarian and hormonal response of female goats to active immunization against inhibin [J]. *J Endocrinol*, 2003,177:287-294.
- [4] MEDAN M S, AKAGI S, KANEKO H, et al. Effects of re-immunization of heifers against inhibin on hormonal profiles and ovulation rate [J]. *Reproduction*, 2004,128: 475-482.
- [5] ISHIGAME H, MEDAN M S, WATANABE G, et al. A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats [J]. *Biol Reprod*, 2004,71:236-243.
- [6] SHI F, OZAWA M, KOMURA H, et al. Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs [J]. *J Reprod Fertil*, 2000,118:1-7.
- [7] ZENG X Y, TURKSTRA J A, TSIGOS A, et al. Effects of active immunization against GnRH on ser-

- um LH, inhibin A, sexual development and growth rate in Chinese female pigs [J]. *Theriogenology*, 2002, 58: 1315-1326.
- [8] 姜勋平, 杨利国, 刘桂琼, 等. 抑制素基因免疫对小鼠生殖的影响[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(4): 368-370.
- [9] 茆达干, 杨利国, 叶 荣, 等. 抑制素 $\alpha(1\sim 32)$ 基因免疫对大鼠卵泡发育和生殖激素的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1554-1559.
- [10] 茆达干, 杨利国, 张志杰, 等. 抑制素基因免疫的免疫反应性[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 292-295.
- [11] 茆达干, 张志杰, 杨利国, 等. 抑制素基因免疫大鼠的免疫应答与基因表达[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(7): 713-717.
- [12] 茆达干, 杨利国, 何晓红, 等. 抑制素与乙肝表面抗原融合基因免疫对大鼠生殖能力的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1160-1166.
- [13] 张德坤, 杨利国, 曹少先, 等. 抑制素基因免疫对母羊生殖内分泌的影响[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 76-79.
- [14] 张德坤, 杨利国, 张红琳, 等. 抑制素基因免疫诱导单胎绵羊孪生的研究[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 40-45.
- [15] 王水莲, 薛立群, 陈小军, 等. 抑制素 pcIS 基因免疫对黄牛卵泡发育和生殖激素的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6): 830-835.
- [16] 曹少先, 邢朝芳, 张德坤, 等. 双拷贝抑制素基因疫苗 pcISI 的构建和表达及免疫[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(5): 672-676.
- [17] 茆达干, 吴结革, 舒邓群, 等. 细菌 DNA 和 gm-csf 基因对抑制素基因免疫的作用[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(4): 139-142.
- [18] 王水莲, 杨利国, 薛立群, 等. 不同因素对抑制素基因免疫肉牛反应性的影响[J]. 湖南农业大学学报, 2006, 32(6): 644-647.
- [19] 崔先利, 杨利国, 茆达干. 黄牛对抑制素 pCISI 基因免疫的反应性[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(2): 197-200.
- [20] 王水莲, 薛立群, 邓立新, 等. 双拷贝抑制素基因免疫对肉牛卵泡和黄体的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 404-410.
- [21] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [22] 孙树汉, 戴建新, 张平武, 等. 核酸疫苗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000.
- [23] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医出版社, 1997: 165.
- [24] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 385-390.
- [25] LI H, MAO D G, ZHANG D K, et al. Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin $\alpha(1-32)$ fragment for improving the fertility in rats and sheep [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 109: 251-265.
- [26] 王水莲, 薛立群, 陈小军, 等. 抑制素基因免疫对南阳黄牛生殖激素的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1): 61-64.
- [27] 周永兴, 冯志华, 贾战生. 丙型肝炎病毒核心基因免疫研究 [J]. 华人消化杂志, 1998, 6(11): 966-968.
- [28] LIANG A X, CAO S X, HAN L, et al. Construction and evaluation of an eukaryotic expression plasmid encoding two copies of somatostatin gene fused with hepatitis B surface antigen gene S [J]. *Vaccine*, 2008, 26: 2935-2941.
- [29] FINDLAY J K. An update on the role of inhibin, activin and follistatin as local regulator of folliculogenesis [J]. *Biol Reprod*, 1994, 48: 15-23.
- [30] PADILLA G, KNIGHT P G, HOLTZ W. Superovulation and embryo collection in nulliparous Boer goat does immunized against a recombinant ovine α subunit inhibin [J]. *Small Rum Res*, 2008, 74: 159-164.
- [31] MEDAN M S, ARAI K Y, WATANABE G, et al. Regulation of reproductive function and practical use in females [J]. *Anim Sci J*, 2007, 78: 16-27.
- [32] MORRIS D G, MCDERMOTT M G, GREALLY M, et al. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin α -subunit on ovulation rate and twin carving rate in heifers [J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 97: 255-261.
- [33] SCANLON A R, SUNDERLAND S J, MARTIN T L, et al. Active immunization of heifers against a synthetic fragment of bovine inhibin [J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 97: 213-222.
- [34] MEI C, LI M Y, ZHONG S Q, et al. Enhancing embryo yield in superovulated holstein heifers by immunization against Inhibin [J]. *Reprod Dom Anim*, 2009, 44: 735-739.
- [35] SASAKI K, MEDAN M S, WATANABE G, et al. Immunization of goats against inhibin increased follicular development and ovulation [J]. *J Reprod Dev*, 2006, 52: 543-550.

(编辑 郭云雁)