

溴隐亭与孕激素配合促性腺激素诱导泌乳 绵羊发情机理的研究

李运生^a,于秋丽^a,赵晓娥^a,王岚峰^a,
胡林勇^a,陈玉林^b,马保华^a

(西北农林科技大学 a 动物医学院,b 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】比较不同方法诱导泌乳期母羊发情的效果,同时通过测定血清中激素变化规律研究诱导发情机理。【方法】将35只泌乳60d的小尾寒羊随机分为5组($n=7$),第Ⅰ和第Ⅱ组分别放置含有5mg和2.5mg溴隐亭的炔诺酮阴道缓慢释放装置(NRID),第Ⅲ组放置NRID后的第3,4天各口服溴隐亭2.5mg,第Ⅳ组仅放置NRID,以上4组在去除NRID时配合促性腺激素处理,第Ⅴ组为对照组。在处理的0,3,6,9,13,15,17d早晨8:00采血,分离血清,放射免疫分析法测定血清中促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、促乳素(PRL)、孕激素(P_4)、雌激素(E_2)的浓度。【结果】第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组诱导泌乳母羊发情率分别为100%,71.4%,57.1%和57.1%。第Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组发情羊血清中FSH浓度有缓慢升高的趋势,15d时FSH浓度高于对照组;第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组发情羊血清中PRL浓度迅速下降;第15天时,第Ⅰ组和第Ⅱ组发情羊血清中 E_2 浓度迅速升高到95.34和117.55 pg/mL,显著高于同组13d以前的 E_2 浓度,其余3组发情羊血清中 E_2 浓度在发情期间无明显变化;第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组发情羊血清中 P_4 浓度在发情时显著降低,达到基础水平;各组发情羊血清中LH浓度在试验期间无规律变化。【结论】使用溴隐亭和孕激素并配合注射促性腺激素能有效诱导泌乳期小尾寒羊发情,溴隐亭以阴道缓释给药的方式较好。

[关键词] 泌乳期;生殖激素;溴隐亭;绵羊

[中图分类号] S826.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)04-0037-05

Studies on the oestrous introduction mechanism with bromocryptine, progestogen and gonadotrophic hormone in lactating ewes

LI Yun-sheng^a, YU Qiu-li^a, ZHAO Xiao-e^a, WANG Lan-feng^a,
HU Lin-yong^a, CHEN Yu-lin^b, MA Bao-hua^a

(a College of Veterinary Medicine, b College of Animal Science and Technology,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this research was to compare the effects of different oestrus induction methods in lactating ewes and demonstrate the mechanism of oestrus induction by determination of the serum.【Method】35 lactating ewes of 60 days were divided into 5 groups(I, II, III, IV, V) randomly. The sheep in group I were treated with NRID (the main component was 18-Norgestrel) containing 5 mg bromocryptine. The similar component except the content of bromocryptine declined into 2.5 mg were used in group II. In group III, NRID was used and 2.5 mg bromocryptine was perosed on the 3rd and 4th day respectively. The sheep in group IV were treated with NRID only. After it, Group I, II, III, IV were treated

* [收稿日期] 2007-05-08

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划项目(2005K02-G4-1);农业部农业结构调整项目(05-07-03B)

[作者简介] 李运生(1980—),男,安徽淮南人,硕士,主要从事动物胚胎生物技术研究。

[通讯作者] 马保华(1965—),男,陕西城固人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物胚胎生物技术研究。

with FSH and Group V was control group. Blood samples were collected at 8:00 AM on 0, 3rd, 6th, 9th, 13th, 15th, 17th day of the research, and the serum was separated and stored in -20 °C respectively. The concentrations of FSH, LH, PRL, P₄ and E₂ in the serum were measured by radioimmunoassay, and the oestrus induction mechanism was analyzed. 【Results】 The estrus rate of Group I, II, III, IV were 100%, 71.4%, 57.1%, 57.1% respectively. The concentration of serum FSH increased slowly and it was higher than that in group V on the 15th day of the research. In group I, group II, group III, the concentration of serum PRL declined significantly. On the 15th day the treatment, the serum concentration of E₂ of the estrous sheep in group I and II increased to 95.34 pg/mL and 117.55 pg/mL rapidly, which was higher than that 13 days before, and there weren't significant changes in the sheep of the other 3 group. In group I, group II, group III and group IV, the concentration of serum P₄ declined suddenly to the basal level in oestrus ($P < 0.05$), but the concentration of serum LH changed irregularly during the test. 【Conclusion】 The conclusion was that oestrus induction with bromocryptine, progestogen and gonadotropin is effective in lactating ewes and administration of bromocryptine via vagina is a better way.

Key words: ewes; oestrus; bromocryptine; sheep

为了提高规模化、工厂化养羊的经济效益,高频繁殖已经成为我国肉羊产业发展需要解决的核心技术。高频繁殖技术的关键是繁殖季节与非繁殖季节母羊的同期发情或诱导发情,以打破母羊季节性繁殖特性的制约,使青年母羊适时或提早配种,产后母羊尽早发情、配种,最大限度缩短产羔间隔,发挥母羊的生产性能,提高经济效益。目前,国内运用孕激素和促性腺激素的方法进行泌乳期诱导发情,虽然发情率较高,但妊娠率较低^[1-2],这主要是由于产后母羊哺乳引起体内促乳素(PRL)的升高,而高水平的PRL浓度会抑制卵巢活动,导致哺乳不孕症^[3-6]。溴隐亭可以有效抑制动物体内PRL的分泌,但仅用溴隐亭对处于乏情期母羊进行诱导发情,虽能降低母羊体内的PRL浓度,但是不能有效提高母羊发情率^[7-8]。张一玲等^[9]运用溴隐亭配合孕激素和促性腺激素,对处在乏情期的泌乳奶山羊进行诱导发情,有效提高了发情率和妊娠率(分别为100%和80%)。但对溴隐亭协同孕激素和促性腺激素诱导泌乳期羊发情的机理尚不清楚。

本研究以泌乳期(泌乳60 d)小尾寒羊为研究对象,用溴隐亭和孕激素制成的复合阴道缓慢释放装置配合促性腺激素,对泌乳期母羊进行诱导发情,同时对处理的0, 3, 6, 9, 13, 15, 17 d小尾寒羊血清中促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、PRL、孕激素(P₄)、雌激素(E₂)浓度进行了测定,研究应用该技术进行泌乳母羊诱导发情时母羊体内生殖激素的变化规律,以期为进一步开展母羊泌乳期诱导发情提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验羊的选择

在宁夏农垦宁澳肉羊繁育中心选用泌乳期小尾寒羊35只,正常饲喂,泌乳60 d时用于试验。

1.2 主要试验药品

溴隐亭片剂(上海诺华制药公司生产,2.5 mg/片),炔诺酮阴道缓慢释放装置(NRID,由西北农林科技大学家畜生殖内分泌与胚胎工程重点实验室提供,主成分为18-甲基炔诺酮),FSH(宁波第二激素厂生产),FSH、LH、PRL、P₄和E₂放射免疫试剂盒(天津九鼎医学生物有限公司产品)。

1.3 试验羊分组与处理

将试验羊随机分为I、II、III、IV和V5组,每组7只。各组处理如下:I组羊阴道放置含5 mg溴隐亭的NRID;II组羊阴道放置含2.5 mg溴隐亭的NRID;III组羊阴道放置NRID,并于放置后第3天和第4天各口服溴隐亭2.5 mg;IV组羊阴道只放置NRID;V组为对照组,未进行处理。各组放置阴道缓慢释放装置当天为试验的第0天,处理时间为13天,去除阴道缓慢释放装置前12 h和去除装置的同时分别注射FSH 33 U/只。24 h后开始进行发情鉴定,母羊接受公羊爬跨视为发情。

1.4 绵羊血样采集与样品分析

在试验的0, 3, 6, 9, 13, 15和17 d早晨8:00,颈静脉采集各试验羊全血10 mL,3 000 r/min离心10 min。血清分装到dorff管中,-20 °C保存待测。在陕西杨凌示范区医院用放射免疫分析法(RIA)测定血清FSH、LH、PRL、P₄、E₂浓度。

1.5 数据分析

数据统计后均以“平均值(\bar{X})±标准差(SD)”表示,用t检验法对数据进行分析检验。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对绵羊诱导发情的影响

各组试验羊在炔诺酮阴道缓慢释放装置撤出后,不同时间的发情结果见表1。由表1可见,各组试验羊发情率分别为I组100%(7/7),II组71.4%(5/7),III组57.1%(4/7),IV组57.1%(4/7),V组无发情羊;发情时间多集中在处理结束后的36~60 h。

2.2 不同激素处理对绵羊血清中生殖激素的影响

2.2.1 对绵羊血清中FSH浓度的影响 试验羊进行诱导发情处理后,对各组发情羊血清中的FSH浓度进行分析,结果见表2。由表2可见,I、II和III组发情羊在阴道缓慢释放装置处理期间(0~13 d),血清FSH浓度波动不大;去除NRID后,FSH浓度开始上升,第15天时达到峰值。IV组发情羊试验第0天FSH浓度为7.84 mU/mL,在试验的第9天上升到11.10 mU/mL,发情时下降为10.53 mU/mL。V组FSH浓度在整个处理期间无规则波动,但波动基础值均低于前4组。

表1 不同激素处理诱导绵羊发情的结果

Table 1 Oestrus results of ewes treated with different protocols

处理 Treatment	发情率/% Oestrus ratio							平均间隔时间/h Average interval time	发情率/% Oestrus ratio
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h		
I	0	28.6 (2/7)	42.9 (3/7)	14.3 (1/7)	14.3 (1/7)	0	0	37±12.8	100.0(7/7)
II	0	20.0 (1/5)	60.0 (3/5)	20.0 (1/5)	0	0	0	36±8.5	71.4(5/7)
III	0	25.0 (1/4)	50.0 (2/4)	0	25.0 (1/4)	0	0	39±15.1	57.1(4/7)
IV	0	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)	25.0 (1/4)	0	0	42±15.5	57.1(4/7)
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表2 不同激素处理对绵羊血清中FSH浓度的影响

Table 2 Effects of different treating protocols on the concentration of FSH in oestrous ewes mU/mL

处理 Treatment	0 d	3 d	6 d	9 d	13 d	15 d	17 d
I (n=7)	9.73±2.50	10.88±0.88	11.51±2.58	11.59±2.45	11.61±1.82	12.62±5.73	11.21±1.93
II (n=5)	11.76±2.03	11.78±1.19	11.18±0.84	11.14±1.39	12.71±1.43	13.26±6.09	12.25±0.96
III (n=4)	12.61±1.16	10.95±2.70	12.31±0.94	12.30±0.43	12.47±0.56	13.48±4.18	12.44±0.77
IV (n=4)	7.84±3.29	9.94±1.00	10.70±1.07	11.10±1.14	9.49±3.34	10.53±4.07	9.59±0.42
V (n=7)	10.82±5.48	9.20±1.82	7.60±1.18	10.40±8.42	8.05±1.13	8.64±3.19	9.48±4.37

2.2.2 对绵羊血清中LH浓度的影响 试验羊进行诱导发情处理后,对各组发情羊血清中LH浓度进行分析,结果见表3。由表3可知,在发情前即孕激素处理期间,试验组和对照组母羊血清中LH浓度在12.60 mU/mL至25.37 mU/mL之间不规则

波动。处理的前15 d,前3组试验羊无明显变化,但第IV组在取栓当天和取栓后第2天有一个波峰存在,第15天即排卵时达到最高峰,为26.91 mU/mL,与其他组差异显著($P<0.05$)。

表3 不同激素处理对绵羊血清中LH浓度的影响

Table 3 Effects of different treating protocols on the concentration of LH in oestrous ewes mU/mL

处理 Treatment	0 d	3 d	6 d	9 d	13 d	15 d	17 d
I (n=7)	12.77±2.66	13.71±1.07	16.96±7.59	14.34±2.10	15.78±3.06 a	14.52±3.13 a	13.84±0.81
II (n=5)	17.18±9.01	23.46±8.94	14.38±0.94	17.86±7.96	16.05±3.86 a	17.80±2.09 a	14.38±1.39
III (n=4)	14.05±0.54	14.00±9.91	13.36±0.19	17.45±2.32	17.65±4.46 a	15.01±0.41 a	12.80±2.20
IV (n=4)	15.35±11.51	15.72±1.47	15.27±2.03	14.44±0.97	25.37±16.18 b	26.91±1.43 b	18.30±4.43
V (n=7)	17.01±7.13	13.03±4.32	15.24±6.60	12.60±4.06	12.79±5.68 a	13.22±5.46 a	14.32±9.23

注:同列标注不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values within columns with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

2.2.3 对绵羊血清中PRL浓度的影响 试验羊进行诱导发情处理后,对各组发情羊血清中的PRL浓度进行分析,结果见表4。由表4可见,I组发情羊

血清中PRL浓度在处理开始后显著下降,由第0天的17.92 ng/mL降到第3天的8.15 ng/mL,之后维持在低水平,直到试验结束;II组发情羊在试验的

前6d血清中PRL浓度由14.82 ng/mL下降到6.65 ng/mL,之后出现小幅波动;Ⅲ组发情羊在口服溴隐亭后PRL浓度显著降低,第15天时达到最低,17d时有所上升;Ⅳ组发情羊在整个试验期间PRL浓度缓慢下降;Ⅴ组母羊试验期间PRL浓度呈缓慢下降趋势,到试验结束时高于其他各组发情

羊。如果仅从降低PRL浓度方面考虑,Ⅰ组和Ⅲ组的效果较好,特别是通过阴道缓释作用缓慢给药且剂量较高的Ⅰ组,给药方法方便而且效果也理想;口服给药的Ⅲ组效果也可以,但要经过几次给药,且不能长时间维持。Ⅱ组阴道缓释装置中的溴隐亭浓度偏低。

表4 不同激素处理对绵羊血清中PRL浓度的影响

Table 4 Effects of different treating protocols on the concentration of PRL in oestrous ewes ng/mL

处理 Treatment	0 d	3 d	6 d	9 d	13 d	15 d	17 d
I (n=7)	17.92±4.03	8.15±4.33	8.24±6.59	7.33±3.90	4.75±2.61	5.71±4.27	5.07±4.46
II (n=5)	14.82±4.66	10.11±8.42	6.65±4.98	13.60±11.28	9.87±9.56	12.30±12.10	12.60±9.74
III (n=4)	23.17±14.17	18.13±3.97	6.24±3.59	9.71±5.07	8.94±7.37	5.65±4.85	13.05±3.31
IV (n=4)	24.42±5.04	22.94±11.20	24.37±6.55	20.79±7.32	15.55±7.51	13.29±3.71	11.51±4.74
V (n=7)	26.20±7.49	21.12±5.22	22.52±6.92	19.35±4.28	19.72±3.54	20.26±5.69	17.18±6.26

2.2.4 对绵羊血清中E₂浓度的影响 试验羊进行诱导发情处理后,对各组发情羊血清中的E₂浓度进行分析,结果见表5。由表5可知,各试验组发情羊在缓慢释放装置处理期间血清E₂浓度有所波动,但波动范围不大。第15天时,Ⅰ组和Ⅱ组发情羊血清中E₂浓度迅速升高到95.34和117.55 pg/mL,显著高于本组13d以前的E₂浓度,表明卵巢上有大卵泡的发育并排卵,可以视为有效发情。Ⅲ组和Ⅳ

组发情羊及对照组母羊在撤栓后血清中E₂浓度在本组13d以前的范围内波动,说明Ⅲ组和Ⅳ组发情羊经诱导发情处理后,母羊尽管表现发情,但从E₂浓度可以视为无效发情,也说明Ⅲ组和Ⅳ组诱导母羊发情的方法不理想。对照组母羊在整个处理期间E₂浓度处于无规则波动,反映出处于泌乳期绵羊血清中E₂的变化规律。

表5 不同激素处理对绵羊血清中E₂浓度的影响Table 5 Effects of different treating protocols on the concentration of E₂ in oestrous ewes pg/mL

处理 Treatment	0 d	3 d	6 d	9 d	13 d	15 d	17 d
I (n=7)	60.97±23.36	57.98±14.20	55.07±4.50	54.42±7.35	53.16±6.74	95.34±45.39	45.65±7.44
II (n=5)	61.42±8.59	58.44±9.13	70.27±33.47	73.36±13.72	55.10±7.05	117.55±60.44	57.05±13.79
III (n=4)	53.20±10.56	73.38±26.83	82.46±12.45	50.91±3.58	54.55±14.77	46.08±20.01	47.83±4.4
IV (n=4)	51.22±42.72	41.59±26.42	52.05±29.64	44.10±18.72	44.48±31.22	55.95±22.1	40.80±14.72
V (n=7)	65.00±30.65	50.00±25.11	45.00±26.69	47.00±29.21	69.00±35.72	46.00±21.16	48.38±19.05

2.2.5 对绵羊血清中P₄浓度的影响 试验羊进行诱导发情处理后,对各组发情羊血清中的P₄浓度进行分析,结果见表6。由表6可知,各组母羊在试验的前6d,血清P₄浓度缓慢升高,第6天后血清P₄浓度缓慢下降,9d后各组母羊血清中P₄浓度均降低。15~17d时,各试验组发情羊血清中P₄浓度继续降低,而对照组母羊血清中P₄浓度反而上升。一

般情况下,在孕激素诱导母畜发情时,撤除孕激素处理后,母畜血清中P₄浓度降低到最低水平时,解除P₄对促性腺激素的抑制作用使其分泌增加,从而促进卵巢上卵泡的发育成熟并排卵。从P₄水平变化看,各试验组发情羊P₄的变化规律基本符合母畜发情周期中激素的消长规律。

表6 不同激素处理对绵羊血清中P₄浓度的影响Table 6 Effects of different treating protocols on the concentration of P₄ in oestrous ewes ng/mL

处理 Treatment	0 d	3 d	6 d	9 d	13 d	15 d	17 d
I (n=7)	0.27±0.33	0.74±0.23	0.72±0.25	0.64±0.16	0.44±0.24	0.09±0.02	0.32±0.30
II (n=5)	0.57±0.45	0.93±0.36	1.01±0.45	0.72±0.17	0.69±0.29	0.21±0.18	0.21±0.24
III (n=4)	0.29±0.31	0.54±0.01	0.67±0.15	0.49±0.11	0.51±0.02	0.18±0.06	0.10±0.02
IV (n=4)	0.76±0.74	0.67±0.78	0.63±0.37	0.59±0.28	0.39±0.36	0.21±0.16	0.19±0.06
V (n=7)	0.35±0.26	0.44±0.28	0.62±0.41	0.33±0.26	0.27±0.30	0.47±0.27	0.40±0.26

3 结论与讨论

大多数哺乳动物在泌乳阶段总是伴有一段较长的乏情期,而为了提高母畜的繁殖效率,保证2年3胎,又必须在其泌乳期进行诱导发情处理,但是正常的孕激素联合促性腺激素诱导母畜发情的方法,对于泌乳期母畜效果不佳。这是由于产后母羊哺乳引起体内PRL的升高,而高水平的PRL会使下丘脑多巴胺(DA)更新加快,DA释出增多,直接抑制促性腺激素释放激素(GnRH)自神经终末的释放,导致垂体促性腺激素分泌降低;同时卵巢对促性腺激素的反应性降低^[10],从而使诱导发情失败。溴隐亭可以有效抑制动物体内PRL的分泌,再结合孕激素+促性腺激素诱导母畜发情,会取得比较理想的效果^[9]。本研究中,通过不同的溴隐亭给药方式,配合孕激素和促性腺激素诱导泌乳期绵羊发情,同时对处理的小尾寒羊血清中生殖激素浓度进行测定,研究应用该技术进行泌乳母羊诱导发情时母羊体内生殖激素变化的规律。结果表明,I、II和III组发情羊在阴道缓慢释放装置处理期间(0~13 d),血清FSH浓度波动不大;去除阴道缓慢释放装置后FSH浓度开始上升,第15天时达到峰值。IV组发情羊在试验的第9天上升到11.10 mU/mL,发情时下降为10.53 mU/mL。V组FSH浓度在整个处理期间无规则波动,但波动基础值均低于前4组。I、II组和III组发情羊血清中FSH浓度高于IV、V组,这可能与溴隐亭在使促乳素水平下降的同时促进FSH和雌二醇合成分泌增加有关^[11]。

在整个诱导发情处理期间,各组发情羊血清LH浓度均呈不规则波动,而有的组未能在羊发情时捕捉到LH峰值。正常情况下,LH峰值一般出现在排卵时,排卵后迅速下降,因此要获得LH峰值必须准确把握发情羊的排卵时间,本次试验尽管在排卵的当天采血,但不一定是在排卵的时间段采的血样,因此,未能捕捉到发情羊LH峰值的出现,这需要在以后的试验中弥补。

从I组发情羊的血清PRL浓度变化可以看出,溴隐亭阴道缓释装置处理后,血清中PRL浓度显著下降,一直处于低水平上并维持到发情后。这与黄舒娥等^[12]和杨莉萍等^[13]在人上的研究结果相一致。Murray等^[14]发现高水平的PRL可以抑制卵巢排卵。I组母羊发情率较对照组有显著提高,可能是由于在试验期间,溴隐亭通过阴道缓释装置持续作用于机体,使PRL处于较低水平,解除PRL对卵巢

的抑制功能,恢复卵巢的周期活动,同时配合生殖激素的启动作用,共同作用于卵泡,从而诱导母畜发情排卵。II组发情羊,在试验的前6d血清中PRL浓度由14.82 ng/mL下降到6.65 ng/mL,之后出现上升和下降的小幅波动,说明II组发情羊阴道缓释装置中的溴隐亭浓度偏低。从诱导发情结果看,I、II组采用了不同的溴隐亭浓度,都能有效诱导泌乳期小尾寒羊发情,但由于处理羊数量较少,并无统计学上的差异,具体用药量有待进一步研究。III组发情羊在口服溴隐亭后PRL浓度显著降低,15d时达到最低,17d时有所上升。从诱导发情结果看,III组母羊发情率(57.1%)低于I、II组,说明口服溴隐亭药效不能长时间维持,即不能有效解除PRL对卵巢的抑制作用,这可能是该组羊发情率较低的原因。

血清中E₂浓度水平反映了卵泡的分泌功能,I、II组发情羊E₂浓度水平在发情时(第15天),显著高于本组13d以前的E₂浓度,表明卵巢上有大卵泡发育,处于发情排卵期。III组和IV组发情羊及对照组母羊撤栓后,血清中E₂浓度在本组13d以前的范围波动,说明III组和IV组发情羊经诱导发情处理后,母羊尽管表现发情,但从E₂浓度可以视为无效发情,也说明III组和IV组诱导母羊发情的方法不理想。对照组母羊在整个处理期间E₂浓度处于无规则波动,反映了处于泌乳期绵羊血清中E₂的变化规律。

各组试验羊血清P₄浓度在试验前12d变化趋势大致相同,说明溴隐亭和孕激素处理效果相同。在放置炔诺酮阴道缓慢释放装置后期P₄浓度有下降的趋势,这可能与阴道栓放置时间较长,阴道内产生分泌物,使炔诺酮阴道缓慢释放装置内部药物不能正常释放有关。去除缓慢释放装置后,发情羊血清P₄浓度迅速下降,达到基础值浓度,这与正常母羊发情时血清P₄浓度相同^[15],说明此时母羊已经发情。

以上研究表明,应用溴隐亭和孕激素并配合注射促性腺激素能有效诱导泌乳期小尾寒羊发情,溴隐亭以阴道缓释方式给药的效果好于口服。

[参考文献]

- [1] 何其宏,魏荣安,李强,等.绵羊产后诱发发情试验[J].草食家畜,2002(1):36-37.
He Q H, Wei R A, Li Q, et al. Estrus induction experimentation in the post-parturient of sheep [J]. Grass-Feeding Livestock, 2002(1):36-37. (in Chinese)

(下转第46页)