

家兔超数排卵的初步试验

石德顺*

(广西农学院牧医系)

摘 要

本研究对家兔超排各种处理方法的超排效果进行了比较,并对处理过程中外周血浆P及 $17\beta-E_2$ 的变化情况进行了放射免疫测定。当FSH用于兔的超排时,持续处理三天对于保证FSH的超排效果是必需的。FSH的超排效果显著优于PMSG ($P < 0.05$),但在注射PMSG的同时注射10—12单位FSH则可使PMSG的超排效果有所提高。受试兔重复处理后,排卵数降低不明显 ($P > 0.05$),仅胚胎收集数明显下降 ($P < 0.05$),这说明重复处理对受试兔的超排反应的影响不明显,胚胎收集数下降可能是由于手术后的粘连所致。胚胎收集数与处理前及输精前的P浓度成负相关 ($r = -0.3616, -0.4334, P < 0.05$),与 $17\beta-E_2$ 浓度成正相关 ($r = 0.5036, 0.5055, P < 0.01$);且受试兔经PMSG处理后的P升高幅度远较FSH处理后为大 ($P < 0.01$)。由此说明:PMSG超排效果较差的原因可能是其LH的活性较高,引起卵泡的黄体化及带血卵泡的形成所致。

前 言

超数排卵(以下简称超排)是胚胎移植技术中重要的一环。通过超排,结合胚胎移植,就可使优良母畜繁殖更多的后代,以加速品种改良。近年来,我区毛兔业发展很快,西德长毛兔种供不应求,为缓和这一局面,利用胚胎移植加速西德长毛兔的繁殖,先进行家兔超排的研究很有必要。

目前,兔的超排主要采用多次注射促卵泡素(FSH)或一次注射孕马血清促性腺激素(PMSG)两种方法,在输精前再结合注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)或促黄体素(LH)。据以往的许多研究,虽然FSH的超排效果较好,但不经济,且须多次注射,比较麻烦;PMSG虽经济,处理方法也简单,但超排效果则较差(1)。因此,如何提高PMSG的超排效果,找出一种既经济简单又有效的超排方法是当前推广应用家兔胚胎移植技术首先需要解决的问题。本研究将根据PMSG与FSH的作用特点,采取不同的处理方法,同时结合测定处理

本文于1988年1月19日收到

*现在工作单位:广西科学院生物研究所

过程中外周血浆孕酮(P)及 17β 雌二醇($17\beta E_2$)的变化情况,以便找出一种既简单经济而又有效的家兔超排方法,以供推广应用。

试验材料与方方法

一、试验动物

超排所用的动物为5月龄以上的青紫兰及西德杂种长毛兔。采精用的公兔为西德长毛兔所有动物饲养在广西农学院牧场,日喂混合料及青料各两次,自由饮水。混合料的配方为:麦麸40%,玉米粉20%,花生饼10%,米糠30%,淡鱼粉5%,矿物质5%,另加1%的食盐,日喂量100~150克。试验兔在处理前单笼饲养20天。

二、超排处理方法

因试验目的而异,(一)FSH持续处理时间比较试验,每次以10~12单位FSH(宁波激素制品厂生产)作皮下注射;(二)超排方法比较试验,FSH组为连续皮下注射三天六次,每次10~12单位,PMSG组为一次静脉注射50~60IU PMSG(卫生部长春生物制品研究所生产),PMSG+FSH组为在静脉注射PMSG的同时,皮下注射FSH10~12单位。各组均在开始处理后的第三或第四天上午九时,静脉注射HCG(上海生物化学制药厂生产),并按照王丕建等(1982)(2)介绍的方法进行人工授精,输入新鲜精液0.6~1ml(含活动精子数 $1.4\sim 2.4\times 10^8$ 个)。

三、胚胎收集

受试兔在输精后48~50小时,按每公斤体重以40~50mg的剂量,静脉注射异戊巴比妥钠作全身麻醉。然后于腹中线作3~5cm的切口,拉出生殖道,记录卵巢上面的排卵点。再将一条乳胶管插入输卵管的伞部,并导致表皿中,并用注射器从官管连接部注入含10%犊牛血清的改良Dulbecco氏磷酸盐缓冲液5毫升(以下简称PBI)(5)冲洗输卵管。冲洗完毕后,立即缝合切口,并注射20万单位青霉素以防止感染。

四、脉胎检查

将表皿内的胚胎置显微镜下镜检(64×7),分别记录正常胚胎数(卵裂球完整界限清楚),异常胚胎数(发育延迟,卵裂球界限不清及形状不规则)及未受精卵数。将形态正常的胚胎用于冷冻保存试验。

五、血样采集

受试兔在开始处理瞬间及输精瞬间分别从耳中动脉采血2~3ml。采集的血样收集在含60单位肝素的离心管内,离心(3500转/分,10分钟)分离血浆,并加万分之五的叠氮钠防腐,置4℃冰箱保存至测定。

六、孕酮及 17β 雌二醇的放射免疫测定

P及 $17\beta E_2$ 的测定采用放射免疫测定法。H的计数仪为KB1215-C、S、C、(wallac产),标准抗原及抗体均为泰国朱拉隆功大学M. Kamonpatana教授所赠,标记抗原系上海原子能研究所生产。标准曲线的工作范围为5~500pg,经直线化后的相关系数为0.99以上,灵敏度:P为0.1218ng/ml, $17\beta E_2$ 为10.35pg/ml。 $17\beta E_2$ 的抗体稀释度为1:70000,最大结合率为59.1%,非特异性结合率为1.2%,抽提率为93.7%。P的抗体稀释度为1:1000,最大结合率为44.94%,非特异性结合率为1.1%,抽提率为100%,组内变异系数为3.7%,

组间变异系数为13.6%。

七、数据处理与统计分析

放射免疫测定的标准曲线按照公式 $1. \frac{B}{B_0 - B} = A + D \log x$ 直线化,并代入测定的计数算出结果。超排所得的计数数据采用方差分析,百分数采用t检验进行统计学上的显著性检验。

试验结果

本研究开始于一九八六年九月,结束于一九八七年五月,结果分述如下。

一、FSH持续处理时间对超排效果的影响

受试兔为五月龄以上健康的青紫兰处女兔。试验分为三组,第一组连续注射三天六次,第二组两天半五次,第三组两天四次。处理方法见前,结果见表I。I组的排卵数及胚胎收集均高于后两组,由于试验头数少,差异不显著, ($P > 0.05$)。从胚胎收集率来看, I组高于II组和III组,其差异分别为极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$)。I组的胚胎正常率也高于II组和III组,且差异显著($P < 0.05$)。

二、超排方法的比较试验

试验分为FSH、PMSG及PMSG + FSH等三组,处理方法见前。为探讨母兔重复处理的可行性,各组在第一次处理1.5个月后,再按照同样方法重复处理一次。结果见表二。第一,二次处理的排卵数及胚胎收集数均以FSH组最高,PMSG组最低,经方差分析,差异显著($P < 0.05$),但经多重比较(S法),FSH组与PMSG + FSH组差异不显著($P > 0.05$),仅与PMSG组差异显著($P < 0.05$)。第一次处理各组间的胚胎收集率及胚胎正常率差异均不显著($P > 0.05$);第二次处理则差异显著($P < 0.05$)。

第一次处理的排卵数及胚胎收集数均较第二次处理为高,但排卵数相差不明显($P > 0.05$),仅胚胎收集数差异显著($P < 0.05$),同时第一次处理的胚胎收集率及正常率均高于第二次,且差异极显著($P < 0.001$)。

三、母兔超排处理前及输精前P及 17β - E_2 浓度

如表三所示,开始处理前各组的P及 17β - E_2 浓度均无显著差异($P > 0.05$)。输精前P的浓度,PMSG + FSH组及PMSG组明显增加,且极显著高于两个FSH组($P < 0.01$),而两个FSH组略有升高,但不显著($P > 0.05$); 17β - E_2 的浓度以PMSG + FSH组最高,FSH $\times 2 \times 2$ 组最低,差异不显著($P > 0.05$),各组的 17β - E_2 也都有不同程度的升高,均

表一 FSH持续处理时间对超排效果的影响

组别	试验动物数	排卵数	胚胎收集数	胚胎收集率%	胚胎正常率%
I	11	32.66 ± 12.27 (17-54)	21.8 ± 11.53 (6-44)	64.9(233/359)	90.1(210/233)
II	6	25.0 ± 5.65 (18-32)	11.83 ± 5.21 (7-22)	47.33(71/150)	83.1(59/71)
III	5	21.6 ± 6.56 (14-33)	11.6 ± 2.15 (9-15)	53.7(58/108)	77.8(45/58)

表二 不同处理方法对于超排效果影响的比较

处理 方法	处理 品种	I						II					
		试验 动物数	排卵数	胎 收集数	胚胎 集率%	胚胎正 常率%	试验 动物数	排卵数	胎 收集数	胚胎收 集率%	胚胎正 常率%		
FSH	青紫兰	11	32.7±12.27 (17-54)	21.2±11.53 (6-44)	64.9 (233/359)	90.1 (210/233)	10	24.1±13.8 (8-49)	15.4±9.56 (5-35)	63.9 (154/241)	74.7 (115/154)		
	西杂种	10	32.8±10.26 (17-50)	18.6±8.25 (9-35)	56.7 (186/328)	81.72 (152/186)	7	26.9±8.86 (9-35)	13.3±8.26 (3-25)	49.5 (93/188)	55.9 (53/93)		
	合计	21	32.7	20.0	61.0	86.4	17	25.2	14.5	57.6	67.6		
PMSG	青紫兰	3	18.6±4.73 (15-24)	9.33±7.6 (1-16)	50.0 (28/56)	85.7 (24/28)	3	17.6±4.51 (13-22)	9.3±0.58 (9-10)	52.8 (28/53)	96.4 (27/28)		
	西杂种	4	25.3±5.65 (17-32)	17±8.16 (11-29)	67.3 (68/101)	92.6 (63/68)	7	21.4±9.64 (6-30)	8.9±8.5 (1-21)	41.3 (62/150)	93.5 (58/62)		
	合计	7	22.4	13.7	61.1	90.6	10	20.3	9.0	44.3	94.4		
PMSG + FSH	青紫兰	11	28.7±11.3 (15-51)	17.0±11.8 (3-35)	59.2 (187/316)	87.7 (164/187)	9	26.2±9.02 (14-39)	13.9±7.03 (3-24)	53.0 (125/236)	96.0 (120/125)		
	西杂种	10	22.5±9.3 (11-35)	14.7±9.1 (2-26)	65.3 (147/225)	93.2 (137/147)	2	25±1.41 (24-26)	14.0±5.0 (9-19)	56.0 (28/50)	89.3 (25/28)		
	合计	21	25.76	15.9	61.7	90.1	11	26.0	13.9	53.5	94.7		
总计		49	28.3	17.3	61.3	88.3	38	24.2	12.7	53.4	81.0		

表三 母兔处理前后的P及 17β -E₂浓度变化

处 理 方 法	测 定 头 数	排 卵 数	胚 胎 收 集 数	处 理 瞬 前		输 精 瞬 前	
				P (ng/ml)	17β -E ₂ (pg/ml)	P (ng/ml)	17β -E ₂ (pg/ml)
FSH×2×2	7	11.3±5.7	20.85±5.41	1.069±0.367	30.3±9.8	1.440±0.370	32.0±24.3
FSH×2×3	8	24.3±11.5	38.6±12.7	0.760±0.364	59.9±96.5	1.281±0.583	89.7±121.9
PMSG+ FSH	13	15.2±9.9	25.5±9.5	0.757±0.350	30.1±29.6	3.290±1.240	104.8±277.9
PMSG	7	10.4±10.1	19.9±8.59	1.250±0.990	42.5±26.6	2.981±1.258	57.37±16.6
与排卵数的相关系数				-0.2683	0.2478	-0.2746	0.3352
与胚胎收集数的相关系数				-0.3616*	0.5036**	-0.4334**	0.5055**

* 相关显著(P<0.05)

** 相关极显著(P<0.01)

不明显(P>0.05)。两次测定的P及 17β -E₂分别与排卵数及胚胎收集数成负相关和正相关, 不过与排卵数的相关程度均不显著(P>0.05)。

讨 论

本研究对FSH注射持续时间的比较试验表明: 连续注射三天的超排效果要优于注射两天及两天半, 这可能是由于FSH的作用时间过短, 能发育成熟的卵泡数量有限及输卵管的伞部尚未作好接纳卵子的准备所致。卵泡的发育与成熟需要一个过程, 外源促性腺激素作用的时间过短, 不足以使一定数量的卵泡发育成熟及伞部发生排卵前的相应变化。由于FSH在循环血液中的半衰期很短, 仅110分钟^①, 故需多次注射才能维持一定的水平。研究表明: FSH连续处理三天是必需的。

FSH及PMSG是目前用于家兔超排, 促进卵泡发育的主要促性腺激素。由于其特性不同, 处理效果也不同。研究表明: PMSG的超排效果明显低于FSH, 与范必勤等^②的试验结果一致。这可能是由于PMSG会引起卵泡的黄体化及带血卵泡的形成所致^③。PMSG含有FSH与CH双重活性^④, 而CH活性会使卵巢上面的成熟卵泡排卵并黄体化, 分泌较多的孕酮, 影响其他卵泡的发育, 从而影响超排效果。据激素测定的结果, 输精瞬前PMSG组的P急剧升高, 且与超排效果成极显著的负相关($r = -0.4334$), 便证实了这一点。

当在注射PMSG的同时, 注射一次FSH, 可使超排效果有所提高, 并与FSH组接近。PMSG在血液循环中的衰变分为两个时相, 开始下降较快, 半衰期仅30小时, 而后则变化缓慢, 半衰期为370小时^⑤。因而, PMSG经一次注射后, 便可维持较为恒定的水平。开

始在PMSG与FSH的共同作用下,可刺激较多的卵泡发育,而后在PMSG的单独作用下,加上已发育卵泡产生的雌激素的自身加强作用,这些发育的卵泡就可成熟排卵。从激素测定的情况来看,PMSG+FSH组输精前的 $17\beta-E_2$ 增加幅度远较PMSG组为大,亦说明PMSG+FSH组发育的卵泡数较多。在牛羊中已经证实,高浓度的FSH仅在开始发动卵泡生长时必需,而后则可维持较低水平^⑤,持续高水平的FSH反而刺激雌激素的过多分泌,而影响卵子的排放与运行⁽⁴⁾。在牛羊的超排实践中,FSH逐次降低剂量注射法的超排效果显著优于固定剂量注射法^{④⑥}。这些都说明PMSG结合FSH处理是可行的。不过从输精前激素测定的情况来看:P的浓度增加幅度很大,说明PMSG的用量还太大,有必要对PMSG及FSH的用量作进一步试验,以进一步提高其效果。

本研究两次处理间的排卵数无显著差异,仅胚胎收集数有显著差异,这说明卵巢反应并无明显差异,胚胎收集数降低可能是由于输卵管及伞部的粘连所致。对于重复超排处理的效果报导不一,Adams及角田幸生的试验结果都表明:重复超排处理会显著影响卵巢反应;但范必勤的试验则表明:第一次与第二次超排处理的胚胎收集数无显著差异⁽¹⁾。Han等⁽¹²⁾对新西兰白兔间隔17或30天用PMSG连续处理三次的试验表明:尽管第二、三次处理的排卵数明显下降,但试验兔均有超排反应,也不象Adams试验的那样95%的试验兔无明显反应。采用非手术法收集胚胎的牛超排试验表明:重复处理4—7次都对超排反应无明显影响⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾。由此看来:重复超排处理是可行的,只要提高手术技能,减少粘连,是有可能提高重复超排处理效果的。不过合理的间隔时间一定要控制好,作者发现:如间隔时间在30天内,则受试兔的卵巢上面布满白体,排卵数很少。因此,两次处理的间隔时间应该控制在40天以上。

本研究表明:排卵数及胚胎收集数与处理前及输精前的P成负相关,与 $17\beta-E_2$ 成正相关,且胚胎收集数与之的相关程度要大于排卵数。这说明受试兔的P及 $17\beta-E_2$ 的变化水平不仅可以反映出超排反应的好坏,而且还通过影响伞部对卵子接纳及卵子的运输而影响胚胎的收集。

致 谢

本研究是在王丕建教授的指导下完成;并得到黄凤玲,蒋如明,谭世俭,韦英明及陆增康等老师的协助和指导;蒙泰国朱拉隆功大学M·Kamonpatana教授赠送RIA的标准抗原及抗体,特此一并致谢。

参 考 文 献

- (1) 范必勤,熊慧卿(1987):家兔超数排卵。中国养兔杂志,1987, No1: 17—19。
- (2) 王丕建等(1982):兔的人工授精总结。广西农学院学报,1982, No2: 14—20。
- (3) 范必勤等(1986):家兔超数排卵的研究。中国养兔杂志, No1: 25—30
- (4) Cognie, Y.(1986)两种FSH超排母羊的方法。畜牧学文摘:遗传繁育,1986, No1: 68(414)。

- ⑤ Whittingham, D.G. (1974) Embryos banks in the future of development genetics. *Genetics*, 78, 395-402.
- ⑥ Adams, C.E. (1982) Egg transfer in the rabbits. In: *Mammalian Egg Transfer*. CRC Pnc, 1982, 31.
- ⑦ Yadav, M.C., et al (1986) Plasma concentration of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating. *Theriogenology*, 26(4), 523-540.
- ⑧ Bindon, B.M., et al (1986) Genetic and hormone factors affecting superovulation. *Theriogenology*, 25(1), 53-70.
- ⑨ Moor, R.M., et al (1984) Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology*, 21(1), 103-106.
- ⑩ Warfield, S.J., et al (1986) A comparison of two FSH regiment for superovulation cows and heifers. *Theriogenology*, 25(1), 213.
- ⑪ Han, K.Y., et al (1985) Studies on the ovulation responses of rabbits superovulation repeatedly, *ABA*, 53(10), 6611.
- ⑫ Sergeev, N.I., et al (1986) The technology of embryos transfer in cattle. *ABA*, 54(5), 2873.
- ⑬ Schilling, E. (1985) Repeated superovulation in cattle: yield of ova and fertility. *ABA*, 54(6), 3733.

A PRELIMINARY STUDY ON THE SUPEROVULATION OF RABBITS

Shi De-shun

(*Department of Animal Science and Veterinary, Guangxi Agricultural College, Nanning*)

ABSTRACT

The efficiency of the different treatmental methods for superovulation of rabbits was compared and the concentrations of P and 17β -E₂ in peripheral plasma during treatment were measured by RIA in present study. When FSH was employed in the superovulation of rabbits injection of FSH with a duration of at least 3 days was necessary to ensure its efficiency in superovulation. The efficiency of FSH in superovulating was significantly superior to that of PMSG, but the efficiency of PMSG could be improved by injection of 10-12 unit FSH at the time PMSG was administered. After the rabbits were repeatedly treated, the average number of embryos recovered per danor decreased significantly ($P < 0.05$) but the average ovulation rate did not decreased significantly ($P > 0.05$). It indicates that repeated treatment does not affect the responses of rabbits to superovulating, the decrease of the number of embryos recovered may be due to the adhesion after surgical. The number of embryos recovered per danor was negatively correlated with the levels of P ($r = -0.3616, -0.4334, P < 0.05$) and positively correlated with the levels of 17β -E₂ ($r = 0.5036, 0.5055, P < 0.01$) both at beginning treatment and insemination. The magnitude increased of P was significantly higher in rabbits treated with PMSG than in rabbits treated with FSH after treatment. It shows that the poor efficiency of PMSG for superovulation of rabbits may be due to its high activity of LH which can result in luteinization of follicle and formation of blood follicle.