

# 不孕母牛血清抗精子抗体反应与孕酮含量之间的关系

王根林 谢成侠

(南京农业大学畜牧系)

## 摘 要

微量滴定板酶免疫法和固相酶染色法分别检测试验组不孕母牛( $n=119$ )和对照组母牛( $n=26$ )包括处女牛、正常空怀母牛和妊娠母牛的血清孕酮水平和抗精子抗体反应,以研究不孕母牛血清抗精子抗体反应与卵巢功能之间的关系。结果表明:各种原因不孕母牛的血清孕酮含量显著高于处女牛( $P>0.05$ ),但与正常空怀母牛和妊娠母牛比较无显著差异( $P>0.05$ )。不孕母牛血清抗精子抗体阳性检出率显著高于对照组( $P<0.01$ ),但其抗精子抗体阳性反应血清( $n=43$ )孕酮含量显著低于抗精子抗体阴性反应血清( $n=76$ ,  $P<0.05$ ),而且孕酮含量与抗精子抗体阳性率呈负相关趋势。

**关键词** 抗精子抗体, 孕酮, 相互关系, 母牛

## 前 言

母牛不孕症的发病率达到30%左右<sup>[1]</sup>,更是严重制约乳牛业发展的重要因素之一。导致母牛不孕的病因很复杂,由于卵巢及子宫机能障碍引起的不孕占有很高的比例<sup>[2]</sup>,近年国内外的研究证明,免疫学因素如血清抗精子抗体(AsAb)可能与免疫性不孕有关<sup>[3, 4]</sup>。但迄今关于AsAb与子宫卵巢机能状态间的关系及其作用机理知道不多。本试验应用酶联免疫技术,检测不孕母牛外周血清AsAb反应和孕酮水平,以研究母牛子宫卵巢功能与AsAb间的关系,并探索AsAb引起母牛不孕的可能作用机理。

## 材 料 和 方 法

**一、实验动物及处理** 黑白花母牛,分为两组:1.试验组不孕母牛119例(包括子宫内膜炎不孕19例,隐性发情11例,卵巢囊肿9例,习惯性流产5例,不明原因屡配不孕75例),年龄3~12岁,胎次1~8胎,不孕时间 $375\pm 210$ 天。屡配不孕母牛平均配种次数为 $4.61\pm 1.70$ 次,其他类型不孕母牛为 $2.9\pm 1.9$ 次。2.对照组,包括正常处女牛9例,平均年龄为16.5个月,妊娠母牛11例,妊娠日期(系根据45天直肠检查及分娩结果推断)为 $24.18\pm 6.85$ 天,正常空怀母牛6例,空怀时间 $62.33\pm 5.22$ 天。根据个体繁殖记录及直肠检查结果判断生殖状态。颈静脉穿刺采血,2500转/分离心制备血清, -20℃冰箱保存待测。

●南京军区总医院黄宇烽和本系杨利国同志为本试验提供了部分试剂,并对试验提出了有益的建议,在此表示衷心感谢!

●●本文于1988年10月21日收稿。

**二、主要试剂及仪器** 孕酮EIA药盒（其中孕酮抗血清滴度1:6000）及PVC微量滴定软板、PG-3021型酶免疫检测仪等由本系家畜繁殖研究室提供。家兔抗牛精子抗体阳性血清（滴度1:2048）、兔抗牛免疫球蛋白酶标记抗体（IgG—HRP）为1987年本试验时制备。DAB（底物，二氨基联苯胺）、HRP等药品由南京军区总医院临床免疫科提供。

**三、血清孕酮测定法** 待测血清经1/60倍稀释后按微量滴定板酶免疫法〔5〕测定。每块板设置一个标准曲线，其浓度范围为0~800pg/ml，分成8个梯度。本试验标准曲线直线化的相关系数>0.9933，板内及板间变异系数分别为8.3%（n=10）和14.6%（n=8）。

**四、血清AsAb测定法** 按固相酶染色法（SESA）测定〔3, 6〕。公牛新鲜精液，PBS（0.01M，pH7.4）洗3次后，用含5%FCS的PBS校正精子密度为 $50 \times 10^6$ /ml，涂于载玻片上，自然干燥，甲醇固定10分钟。加灭活被检母牛血清，37℃，30分钟，PBS洗3次。加兔抗牛IgG—HRP（1:400稀释），37℃，30分钟，洗3次。再加底物溶液，37℃，30分钟后，同法洗3次，自然干燥。在油镜下观察精子头部着色，棕黄色者为AsAb反应阳性，不着色者为AsAb反应阴性。每批样本以兔抗牛精子抗体阳性血清作阳性对照，以未与血清作用的精子作阴性对照。

## 结 果

### 一、母牛血清孕酮含量

用微量滴定板酶免疫法测定试验组各种类型不孕母牛119例，对照组母牛26例，其血清孕酮含量如表1。结果表明，妊娠母牛血清孕酮含量显著高于处女牛（ $P < 0.001$ ）。

表1 微量滴定板酶免疫法测定的母牛血清孕酮含量

组 别	母 牛 类 型	测 定 例 数	孕 酮 含 量 ( $\bar{x} \pm S, \text{ng/ml}$ )	孕酮含量变化幅度 (ng/ml)	
试 验 组	合 计	119	1.97 ± 2.71	0.00~10.49	
	其 中	不明原因屡配不孕	75	2.15 ± 2.98	0.00~10.49
		隐性发情	11	2.98 ± 3.02	0.04~7.72
		子宫内膜炎	19	1.52 ± 0.86	0.01~2.50
		习惯性流产	5	0.23 ± 0.20	0.04~0.58
		卵巢囊肿	9	1.18 ± 1.60	0.00~4.70
对 照 组	处 女 牛	9	0.11 ± 0.24	0.01~0.27	
	空 怀 母 牛	6	0.07 ± 0.06	0.01~0.18	
	妊 娠 母 牛	11	3.26 ± 1.89	0.88~6.39	

及空怀母牛（ $P < 0.01$ ）。所有不孕母牛血清孕酮平均含量显著高于处女牛（ $P < 0.05$ ），但与空怀母牛及妊娠母牛比较无显著差异（ $P > 0.05$ ）。各种原因不孕母牛血清孕酮含量与试验组合计平均值比较均无显著差异（ $P > 0.05$ ），但子宫内膜炎、屡配不孕和隐性发情母牛血清孕酮水平显著高于处女牛及空怀母牛（ $P < 0.05$ ）。

### 二、母牛血清AsAb反应（SESA）

对相同血清样本测定AsAb反应，结果见表2。

表2 母牛血清AsAb反应 (SESA)

组别	母牛类型		测定例数	AsAb测定结果	
				阳性反应例数	阳性反应率 (%)
试验组	合计		119	43	36.1
	其中	不明原因屡配不孕	75	28	37.3
		隐性发情	11	4	36.4
		子宫内膜炎	19	4	21.1
		习惯性流产	5	2	40.0
		卵巢囊肿	9	5	55.6
对照组	合计		26	1	3.8
	其中	处女牛	9	0	0.0
		空怀	6	0	0.0
		妊娠	11	1	9.1

由表2可见, 试验组母牛血清AsAb阳性反应率显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 但各种类型不孕母牛AsAb阳性率与试验组合计平均值比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

### 三、母牛血清孕酮含量与AsAb反应之关系

统计分析表明, 虽然AsAb阳性反应血清孕酮含量 ( $n = 43$ ,  $\bar{x} = 1.25 \pm 2.28 \text{ ng/ml}$ ) 与试验组合计平均值 ( $n = 119$ ,  $\bar{x} = 1.97 \pm 2.71 \text{ ng/ml}$ ) 比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但却显著低于AsAb反应阴性血清 ( $n = 76$ ,  $\bar{x} = 2.39 \pm 2.75 \text{ ng/ml}$ ,  $P < 0.05$ )。进一步分析试验组屡配不孕母牛、隐性发情和习惯性流产母牛 ( $n = 91$ ) 的血清孕酮水平, 发现随着孕酮含量变化, AsAb阳性率呈相应变化 (表3), 当不孕母牛血清孕酮含量  $< 1 \text{ ng/ml}$  时, AsAb阳性反应率显著高于含量  $\geq 4 \text{ ng/ml}$  的AsAb阳性率 ( $P < 0.05$ ) 孕酮含量与AsAb阳性率之间呈负相关趋势 (见图)。

表3 不孕母牛血清孕酮含量与AsAb反应之关系

血清孕酮含量 变化范围 (ng/ml)	测定 例数	AsAb 反应		孕酮平均含量 ( $\bar{x} \pm S$ , ng/ml)
		阳性例数	阳性率 (%)	
$< 1.00$	52	25	48.1	$0.17 \pm 0.19$
$1.00 \sim 1.99$	8	3	37.5	$1.49 \pm 0.28$
$2.00 \sim 2.99$	6	2	33.3	$2.38 \pm 0.25$
$3.00 \sim 3.99$	6	1	16.7	$3.43 \pm 0.37$
$> 4.00$	19	4	21.1	$7.35 \pm 1.74$

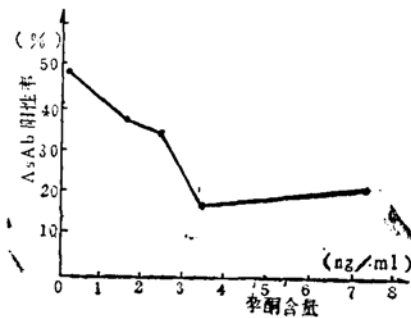


图 不孕母牛血清孕酮含量与AsAb阳性率之间呈负相关趋势

## 讨 论

酶联免疫技术在家畜繁殖上的应用是最近十多年内发展起来的新方法。众多实验已经报道此法用于测定母牛血清孕酮含量, 并藉以判断母牛的繁殖状态的可靠性和准确性[5, 7]。固相酶染色法 (SESA) 检测血清抗精子抗体反应, 在人和牛已有成功的应用报道[6, 8]。本试验对乳牛血清孕酮分析的结果, 表明了不同繁殖状态的母牛血清孕

酮水平的差异，与以往报道相似。对母牛血清AsAb的检测结果，亦进一步证明母牛不孕与AsAb的存在显著相关，它也是导致其不孕的重要原因之一。

AsAb引起母牛不孕的作用机理十分复杂。虽有从各个角度研究的报道<sup>[8]</sup>，但有关与卵巢功能的相互关系，则缺少深入详尽的研究。Flore等<sup>[9]</sup>报道，小白鼠血清及生殖道IgG、IgA等抗体水平与性激素存在相关，且认为子宫IgG量与雌二醇水平存在正相关。曾有提出，母畜生殖道内精子抗体合成与性周期有关，雌激素可诱导这种抗体的合成<sup>[10]</sup>。本试验结果表明，各种不孕母牛血清孕酮平均含量和AsAb阳性率均显著高于处女牛（ $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ ），AsAb阳性率亦高于空怀和妊娠母牛（ $P < 0.01$ ），证明血清AsAb存在与孕酮水平可能存在相关。但不孕母牛血清孕酮含量个体差异很大（ $\bar{x} = 1.97 \pm 2.71 \text{ ng/ml}$ ，变异系数138%），分析表明，AsAb阳性反应血清的孕酮含量显著低于阴性血清，孕酮水平与AsAb阳性率间呈负相关（见图）。由此可见，需要对大样本的不孕母牛激素水平进行分析，以了解与AsAb反应间的真正联系，同时也可说明母牛免疫性不孕还与AsAb对卵巢功能活动的影响有关。

子宫内膜炎母牛血清孕酮含量高于对照组空怀母牛（ $P < 0.05$ ）和处女牛（ $P < 0.01$ ），且AsAb阳性率显著高于对照组（ $P < 0.01$ ），这些可说明此类母牛血清孕酮水平与AsAb反应间的作用有别于其他类型不孕母牛，而子宫炎症是主要影响因素。同时进一步证明，给子宫炎症患牛反复配种（或输精）能诱导或增强机体对精子的免疫反应而产生AsAb<sup>[11]</sup>，但它的发生率却不高于其他类型不孕母牛。因此，子宫炎症更易导致母牛对精子的免疫反应的观点尚待证实。隐性发情母牛的不孕，可能主要与血清高浓度孕酮含量有关（ $2.98 \pm 3.02 \text{ ng/ml}$ ），或是与AsAb的相互作用有关。

已有研究证明，卵泡囊肿的母牛血浆孕酮含量通常较低，而黄体囊肿母牛其水平较高<sup>[12]</sup>。本试验在直肠检查及繁殖记录诊断为黄体囊肿的7例母牛中，血清孕酮含量有4例在 $0.00 \sim 0.70 \text{ ng/ml}$ 之间，说明卵巢并无黄体或无功能性黄体存在，而可能是实质上的卵泡囊肿或其他卵巢炎症。此结果亦反映了直肠检查诊断卵巢囊肿类型有其困难。另外，卵巢囊肿母牛血清AsAb阳性率（55.6%）高于不孕母牛的合计平均值（36.1%），虽然差异不显著，但也可能反映AsAb对卵巢炎症有某种影响，需扩大样本研究。

### 参 考 文 献

- [1] Bulman, D.C., 1980. Abnormal patterns of ovarian activity in dairy cows and their relationships with reproductive performance, *Animal Prod.*, 30: 177~188.
- [2] Geoffrey, H.A., 1982. Infertility in the cow. In *Veterinary Reproduction & Obstetrics*, 5th Ed. 293~327, Bailliere Tindall, London.
- [3] 王根林、谢成伙, 1988, 母牛循环血抗精子抗体的固相酶染色法检测与不孕症关系的研究。中国奶牛, 第2期, 6~11。
- [4] Tung, K.S.K., 1983. Models of autoimmunity to spermatozoa and testis. In *Immunology of Reproduction*, 404~417, New York Oxford Univ. Press.
- [5] 杨利国, 1986. 孕酮EIA技术基础理论与实践。南京农业大学首届孕酮EIA技术讲习班资料, 10~14。
- [6] 赵绪中等, 1987. 固相酶染色法检测抗精子抗体及其临床应用。临床检验杂志, 5: 192。
- [7] 谢成伙、杨利国, 1987, 黄牛与水牛卵巢机能疾病的诊疗及血浆激素水平的测定。畜牧兽医学报, 18(2): 93~98。

- [8] Hans, L.K. et al., 1976. Infertility and embryonic mortality in female rabbits immunized with different sperm preparation. *Biol. Reprod.*, 14: 300~305.
- [9] Flore, R. et al., 1983. Immunoglobulins in the mouse uterus during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 17~21.
- [10] 康顺之, 1985, 家畜繁殖与免疫学的关系. 国外畜牧学-草食家畜, 第5期, 18~20.
- [11] Jones, W.R., 1980. Immunological factors in male and female infertility. In *Immunological Aspects of Reproduction and Fertility Control*, 108~111.
- [12] Kesler, D.J. et al., 1982. Ovarian cysts in dairy cattle: A review. *J. Anim. Sci.*, 55: 1147~1159.

THE RELATIONSHIP BETWEEN ANTISPERM ANTIBODIES  
AND PROGESTERONE IN THE SERUM OF  
INFERTILE DAIRY COWS

Wang Genlin , Xie Chengxia

(*Nanjing Agricultural University, China*)

Abstract

By the means of EIA and Solid Enzyme Staining Assay (SESA), the level of progesterone (P) and reaction of antisperm antibodies (AsAb) in the serum of infertile dairy cows (experimental group,  $n=119$ ) and heifers, normal barren and pregnant cows (control group,  $n=26$ ) were detected to study the relationship between AsAb of the serum and ovarian function of infertile cows. The results showed that the content of P in the serum of all patterns of infertile cows was significantly higher than that of heifers ( $P<0.05$ ), although there was no significant difference as compared with barren and pregnant cows ( $P>0.05$ ). The positive reaction rate of AsAb in the serum of infertile cows was obviously higher than that of the control group ( $P<0.01$ ), but the P level of serum reacted positive in AsAb ( $n=43$ ) was lower than that of serum reacted negative in AsAb ( $n=76$ ,  $P<0.05$ ), and there was a tendency to negative correlation between the level of P and positive reaction rate of AsAb.

**Key words** Antisperm antibody, Progesterone, Relationship, Cows