

邓 敏,梁光华,徐 雷,等.促孕散治疗持久黄体不孕奶牛的血清微量元素与激素相关性分析[J].江苏农业科学,2014,42(2):173-175.

促孕散治疗持久黄体不孕奶牛的血清微量元素与激素相关性分析

邓 敏,梁光华,徐 雷,刘贤侠,高 树,罗 燕,赛务加甫,谷新利

(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003)

摘要:为探讨促孕散治疗持久黄体不孕奶牛的血液生殖激素与微量元素含量的关系,即分析其相关性与回归方程,用 ELISA 法测定了促孕散治疗持久黄体不孕奶牛前后血清中促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)、孕激素(P)和雌二醇(E_2)的浓度,以原子吸收光谱法同时测定了血清 Cu、Fe、Mn 和 Zn 含量,统计分析了 4 种激素和 4 种微量元素间的相关关系与回归方程。结果表明,Cu、Mn 与孕激素正相关,Fe、Zn 与孕激素负相关;Cu 与雌二醇负相关,Mn、Fe、Zn 与雌二醇正相关;Cu、Fe 与促卵泡激素为负相关,Mn、Zn 与促卵泡激素正相关;Cu、Mn 与促黄体激素负相关,Fe、Zn 与促黄体激素为正相关。因此持久黄体不孕奶牛血清中微量元素含量对激素的分泌有影响。

关键词:促孕散;持久黄体不孕;奶牛;激素;微量元素;相关性

中图分类号: S823.9⁺13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0173-03

众所周知,生殖激素与动物繁育能力有极为密切的关系,奶牛生殖功能均是通过激素调控而实现的,掌握生殖激素的变化有助于了解奶牛各种生殖活动、泌乳、健康与疾病状态^[1-2]。微量元素不仅是动物体内重要的组成部分,而且参与机体新陈代谢、繁殖机能和免疫机能^[3-4]。微量元素是奶牛体内许多酶、激素、维生素的组成成分或活性因子,在奶牛的繁殖生理中起着重要作用,机体缺乏有关微量元素会引起性功能障碍^[5]。奶牛不孕症是当今世界严重危害奶牛生产的 4 大疾病(蹄病、乳房炎、代谢病和不孕症)之一,给畜牧业造成重大经济损失,而在奶牛不孕症中持久黄体占了卵巢疾病相当大的比例^[6]。用激素治疗由持久黄体疾病引起的久不发情母畜的效果不太理想,并且有药物残留和毒副作用,严重影响奶制品安全^[7]。目前中药治疗奶牛不孕症越来越受到国内外学者们的青睐^[8]。如罗瑞卿等用谷新利教授多年研制的中药复方促孕散,经大量临床试验证明治疗持久黄体奶牛不孕症,具有良好疗效^[9];国内其他学者采用中药治疗奶牛繁殖疾病,在奶牛不孕症的治疗效果中显著^[10]。本试验分别测定了促孕散治疗持久黄体不孕奶牛前后奶牛血清中的 4 种微量元素和 4 种生殖激素的含量,统计分析了生殖激素和微量元素的相关性和回归方程,为研究与探讨微量元素治疗持久黄体不孕奶牛的生殖调控机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2013-06-20

基金项目:国家“973”计划前期研究专项(编号:2011CB512012);国家自然科学基金(编号:31160517);国家科技支撑计划(编号:2012BAD43B01)。

作者简介:邓 敏(1986—),女,重庆人,硕士,研究方向为中草药的开发与利用。E-mail: dengmin0447@163.com。

通信作者:谷新利,教授,博士生导师,从事中草药的开发与利用研究。E-mail: xlg@shzu.edu.cn。

仪器:AAS-AA7003 型原子吸收光谱仪及 Cu、Fe、Mn、Zn 空心阴极灯(北京市东西分析仪器有限公司);Power Wave XS2 BioTek® 酶标仪(Made in USA)。所有玻璃与塑料离心管等仪器均酸化处理。试剂:浓硝酸(分析纯),由北京化工厂生产;高氯酸(分析纯),北京化工厂生产;Cu、Fe、Mn、Zn 标准溶液,含量均为 1 000 $\mu\text{g/mL}$,由中国计量科学研究院提供;空白溶液:为用去离子水与浓硝酸配制成的 1% 硝酸溶液;标准溶液的配制:用标准储备液与 1% 的硝酸配制系列标准溶液;试验用水均为去离子水;4 种激素 P、 E_2 、FSH、LH 的 ELISA 试剂盒,购于上海 Blue Gene 生物技术有限公司;中药促孕散由石河子大学动物科技学院中兽医课题组研制,药材购于石河子市中药公司。

1.2 方法

1.2.1 试验动物与分组 选择新疆西部牧业股份有限公司、新疆建设兵团农八师 143 团保林牛场、新疆澳大利亚牧业有限公司等牧场的临床病例,在排除传染病、寄生虫病及没有肉眼可见的生殖道疾病以及先天性因素的基础上,对产后 60~75 d,年龄、胎次和体况相近并确认子宫没有炎症的不发情奶牛,经直检和 B 超检 2 次以上,共诊断出持久黄体症奶牛 18 头。

1.2.2 投药及采血时间 试验牛每天早晨 9:00—10:00 灌服促孕散 400 g,每天 1 次,连续 1 个疗程(5 d),观察 10 d 仍不见发情者再灌服 1 个疗程。灌服促孕散前采血 1 次,灌服促孕散结束后第 1、4、7、11、15、20 d 各采血 1 次,共采血 7 次。采血时间为当天 09:00—10:00。

1.2.3 样品的采集和方法 清晨空腹尾静脉采取血液 10 mL,室温静置自然析出血清,装于 1.5 mL 离心管中,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待检。

1.2.4 疗效判定 用药 1~3 个疗程后,在 45 d 内临床出现黄体消失、发情症状并排卵者记为有效;若灌服 3 个疗程,在 45 d 内不发情也不排卵者记为无效^[11]。

1.3 统计分析

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行相关性分析和回归分析。

2 结果

2.1 促孕散治疗持久黄体症奶牛血清中微量元素与激素的含量

促孕散治疗前后,跟踪奶牛 1 个情期所测得的奶牛血清

中微量元素与激素的含量见表 1。从表 1 可以看出,治疗前后微量元素的变化很慢,而激素水平变化很快。

2.2 促孕散治疗持久黄体症奶牛血清中微量元素与激素的相关分析

4 种激素与 4 种微量元素的相关分析结果见表 2 至表 5。

表 1 促孕散治疗持久黄体奶牛血清中微量元素与激素的含量

时间	微量元素含量(μg/mL)				E ₂ (pg/mL)	FSH (ng/mL)	LH (ng/mL)	P (ng/mL)
	Cu	Fe	Mn	Zn				
用药前	2.44±1.15	3.29±1.24	0.18±0.15	4.61±2.31	228.3±23.4	2.98±1.56	4.35±1.05	7.37±1.53
停药后 1 d	1.56±1.10	3.95±2.34	0.17±0.15	2.99±1.63 *	296.3±46.3	2.76±1.34	6.82±0.92 *	6.25±1.74 *
停药后 4 d	1.50±1.09	2.80±1.13	0.17±0.14	3.55±1.53	363.8±47.4	9.041±2.71 **	9.07±1.91 **	5.37±1.74 **
停药后 7 d	1.70±1.12	2.67±1.11	0.17±0.16	4.20±1.44	361.9±17.8	12.02±2.63 **	8.17±1.44 **	4.29±1.4 **
停药后 11 d	1.66±1.16	3.60±1.54	0.19±0.14	4.57±2.64	537.1±51.5 **	7.52±1.83 *	24.20±3.92 **	0.87±0.22 **
停药后 15 d	1.53±1.21	3.07±1.57	0.20±0.10	4.16±2.51	385.7±61.3	2.95±2.12	5.24±1.16	4.84±1.53 **
停药后 20 d	1.27±1.18	2.66±1.10	0.22±0.09	3.31±2.62	344.8±10.2	3.50±1.78	5.12±1.26	5.44±1.83 **

注:“*”表示各组组内与用药前比较差异显著($P<0.05$);“**”表示各组组内与用药前比较差异极显著($P<0.01$)。

表 2 持久黄体奶牛血清激素孕激素 P 与微量元素的相关性分析结果

元素	与 P 的相关性													
	药前		停药后 1 d		停药后 4 d		停药后 7 d		停药后 11 d		停药后 15 d		停药后 20 d	
	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性
Cu	0.911	0.089	0.826	0.174	0.437	0.563	-0.027	0.973	0.981 *	0.019	0.602	0.398	0.303	0.697
Fe	-0.597	0.403	-0.836	0.164	0.202	0.798	0.196	0.804	-0.955 *	0.045	-0.882	0.118	0.926	0.074
Mn	0.467	0.533	0.627	0.373	-0.276	0.724	-0.388	0.612	0.616	0.384	0.703	0.297	0.847	0.153
Zn	0.900	0.100	0.042	0.958	-0.357	0.643	-0.330	0.670	0.563	0.437	-0.618	0.382	-0.895	0.105

表 3 持久黄体奶牛血清激素雌二酮 E₂ 与微量元素的相关性分析结果

元素	与 E ₂ 的相关性													
	药前		停药后 1 d		停药后 4 d		停药后 7 d		停药后 11 d		停药后 15 d		停药后 20 d	
	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性
Cu	-0.066	0.934	0.324	0.676	-0.028	0.972	-0.847	0.153	0.360	0.640	0.862	0.138	-0.181	0.819
Fe	0.589	0.411	0.422	0.578	-0.707	0.293	-0.708	0.292	-0.194	0.806	-0.985 *	0.015	-0.127	0.873
Mn	0.661	0.339	0.648	0.352	0.408	0.592	0.756	0.244	0.407	0.593	0.960 *	0.040	0.164	0.836
Zn	0.672	0.328	0.759	0.241	0.194	0.806	0.417	0.583	-0.037	0.963	-0.454	0.546	0.065	0.935

表 4 持久黄体奶牛血清激素促卵泡激素 FSH 与微量元素的相关性分析结果

元素	与 FSH 的相关性													
	药前		停药后 1 d		停药后 4 d		停药后 7 d		停药后 11 d		停药后 15 d		停药后 20 d	
	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性
Cu	-0.739	0.261	0.955 *	0.045	0.183	0.817	-0.129	0.871	-0.212	0.788	0.315	0.685	-0.023	0.977
Fe	0.723	0.277	-0.812	0.188	-0.121	0.879	-0.927	0.073	0.033	0.967	-0.559	0.441	0.434	0.566
Mn	-0.377	0.623	-0.831	0.169	0.774	0.226	0.797	0.203	-0.083	0.917	0.559	0.441	0.700	0.300
Zn	-0.073	0.927	0.607	0.393	0.967 *	0.033	-0.105	0.895	0.406	0.594	0.311	0.689	-0.495	0.505

表 5 持久黄体奶牛血清激素促黄体激素 LH 与微量元素的相关性分析结果

元素	与 LH 的相关性													
	药前		停药后 1 d		停药后 4 d		停药后 7 d		停药后 11 d		停药后 15 d		停药后 20 d	
	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性	相关性	显著性
Cu	-0.138	0.862	0.075	0.925	-0.223	0.777	0.955 *	0.045	0.033	0.967	0.955 *	0.045	-0.776	0.224
Fe	0.092	0.908	-0.540	0.460	0.757	0.243	0.310	0.690	0.276	0.724	-0.798	0.202	-0.893	0.107
Mn	0.308	0.691	-0.209	0.791	-0.732	0.268	-0.525	0.475	-0.167	0.833	0.939	0.061	-0.537	0.463
Zn	-0.555	0.445	-0.756	0.244	0.565	0.435	-0.707	0.293	-0.493	0.507	-0.387	0.613	0.508	0.492

2.3 促孕散治疗持久黄体症奶牛血清中微量元素与激素含量的回归方程

综合表 2 至表 5 可见,Cu、Mn 与 P 呈正相关,Fe、Zn 与 P 为负相关;Cu 与 E₂ 为负相关,Mn、Fe、Zn 与 E₂ 呈正相关;Cu、Fe 与 FSH 为负相关,Mn、Zn 与 FSH 为正相关;Cu、Mn 与 LH 呈负相关,Fe、Zn 与 LH 为正相关。由表 6 可以得出同一种激

素与 4 种元素回归方程的截距 A 和回归系数(即斜率 B)均明显不同。

3 分析与讨论

研究表明,微量元素(TE)含量与下丘脑-垂体-性腺轴的激素分泌、性腺摄取激素前体、腺内激素的合成、靶组织内

表 6 微量元素与激素含量的回归方程

激素	元素与激素的回归方程($y = A + Bx$)			
	Cu	Fe	Mn	Zn
P	$y = 1.847 + 1.828x$	$y = 6.037 - 1.828x$	$y = 4.363 + 1.633x$	$y = 9.637 - 1.201x$
E ₂	$y = 551.361 - 115.397x$	$y = 328.397 + 9.765x$	$y = 385.019 + 76.106x$	$y = 193.174 + 42.247x$
FSH	$y = 7.662 - 1.104x$	$y = 16.202 - 3.296x$	$y = 7.229 + 4.132x$	$y = -0.25 + 1.546x$
LH	$y = 11.964 - 1.782x$	$y = -6.13 + 4.804x$	$y = 10.642 - 3.078x$	$y = -7.656 + 4.239x$

激素受体的结合利用均有关。必需的微量元素增高或缺乏,会导致内分泌系统的功能紊乱^[11]。可见,生殖激素水平高低受微量元素的影响,从而影响动物的繁殖功能^[12]。

目前关于不孕时血清中微量元素的变化,较肯定的是 Zn 缺乏、Cu 过高。Cu 能干扰卵巢孕激素(P)受体部位 SH 基和线粒体膜的通透性影响排卵^[13],甾体激素的受体本身就是含 Zn 金属蛋白质,Zn 参与其中形成一种环状结构,调节多种蛋白质的基因表达^[14]。Habib 等研究证实体内存在 TE-激素交联的形式,指出 Zn 能调节孕激素 P 活性,P 在动员贮存 Zn 方面也有重要作用^[15];Fe 在体内分为功能 Fe 和贮存 Fe,铁蛋白是应激被动用的贮存 Fe,卵泡期血清 Fe 升高,以补充损耗。有研究报道,Fe 与 LH 和 FSH 呈负相关,说明随着血清元素含量增加,与之呈负相关的激素浓度逐渐降低^[4]。Mn 为性激素合成所必需,黄体期血清 Mn 增加可促进 E₂、P 合成,有助于黄体的形成与维持^[16]。本研究表明,持久黄体不孕奶牛 Cu、Zn、Mn 与孕激素(P)呈正相关,Fe 与 P 呈负相关,由此可见微量元素与机体内 P 含量存在相关性。持久黄体奶牛治疗前测得的 E₂ 含量较治疗后低,经分析 Cu 与 E₂ 呈负相关,Mn、Fe、Zn 与 E₂ 呈正相关,这些元素的高低与 E₂ 恢复正常水平具有相关性,持久黄体不孕奶牛发生的原因之一为持久黄体奶牛的 P 含量较高,机体激素水平紊乱,免疫力与营养水平均受到影响,包括导致微量元素紊乱,经过促孕散治疗后,黄体消失,P 含量下降,E₂ 水平逐渐升高,且逐渐恢复正常^[17]。本试验测得的 FSH、LH 与韦敏等^[4]报道不一致,其差异在于韦敏等测得的数据均是正常奶牛的水平,本研究对象为持久黄体不孕奶牛,测得的 Cu、Fe 与 FSH 为负相关,Mn、Zn 与 FSH 为正相关,Cu、Mn 与 LH 负相关,Fe、Zn 与 LH 为正相关,因此可以得出持久黄体不孕奶牛的微量元素与 FSH、LH 不一样的相关性,即 Cu、Fe、Mn、Zn 在血清中分布的不均一性,是引起奶牛繁殖生殖激素变化的重要原因之一。众所周知,微量元素的变化与地区差异有关,不同地区、不同品种的奶牛激素和微量元素的含量也是不尽相同的。本研究测得治疗前在持久黄体患牛血清中呈现高 Cu、高 Zn、高 Fe、低 Mn 含量现象,经促孕散治疗后逐渐恢复正常。同时,此次研究初步了解了持久黄体奶牛血清中微量元素的含量,为今后进一步研究促孕散治疗奶牛持久黄体提供基础数据。本研究对新疆农八师石河子市周边 10 余个奶牛场的持久黄体奶牛做了血清激素和元素含量的相关性分析,为探讨促孕散治疗奶牛繁殖疾病的机理提供基础。奶牛血清部分微量元素和激素间存在明显的相关性,同一种激素与不同微量元素回归方程的截距和回归系数均明显不同,表明微量元素含量对激素的分泌有影响。

目前人们对健康奶牛生殖激素的调节及机理做了大量的研究,也对奶牛体内微量元素分析做了许多工作。然而,关于

繁殖疾病奶牛微量元素与生殖激素的定量关系研究甚为鲜见,尚未见有关两者相关性定量研究的报道。本研究在国内首先报道了持久黄体不孕奶牛生殖激素和微量元素的相关性,提供了微量元素和动物生殖机理的基础资料,为深入探讨促孕散治疗持久黄体奶牛机理奠定了基础。

参考文献:

[1] 杨利国,熊家军. 奶牛生殖内分泌调节研究进展[J]. 中国奶牛, 2005(4):25-27.

[2] 孙晓萍,杨博辉,程胜利,等. 家畜生殖激素研究[J]. 甘肃畜牧兽医,2007,37(5):39-42.

[3] 龙启萍. 奶牛绵羊牦牛血清中 7 种微量元素的分析[J]. 微量元素与健康研究,2007,24(3):29-30.

[4] 韦敏,魏锁成. 奶牛血清中 Zn、Fe 与 LH、FSH 浓度的相关性分析[J]. 中国奶牛,2010(9):30-32.

[5] 吴长明,王志. 几种微量元素缺乏引起的母牛营养代谢及繁殖障碍[J]. 黑龙江动物繁殖,2009,17(3):34.

[6] 王芳. 奶牛不孕症的诊治[J]. 中国动物保健,2004(2):25-27.

[7] 袁斌,安志兴. 苯甲酸雌二醇联合前列腺素治疗奶牛持久黄体[J]. 畜牧与兽医,2006,38(6):61-62.

[8] 蒋兆春. 中药治疗母畜不孕症研究若干进展[J]. 中兽医医药杂志,1984(3):26-29.

[9] 罗瑞卿,谷新利. 促孕散治疗奶牛卵巢疾病引起不孕症的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2009,27(4):455-457.

[10] 刘让,李洪涛,孙延鸣,等. “复方益孕液”治疗奶牛不孕症疗效及作用机理[J]. 西北农业学报,2009,18(4):25-28.

[11] Bhattacharya S, Banerjee J, Sen S, et al. Human chorionic gonadotropin binding sites in the human endometrium[J]. Acta Endocrinologica,1993,129(1):15-19.

[12] 魏锁成,仝伟建,田凤林. 奶牛血清元素和生殖激素测定及其相关性分析[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2009,18(4):5-9.

[13] 郭宏昌,高琦,褚小宗. 微量元素与不孕症[J]. 河南预防医学杂志,2001,12(5):310-311.

[14] Sunderman F W. Regulation of gene expression by metal ions: zinc finger-loop domains in hormone receptors, transcription factors, and proteins encoded oncogenes[J]. Trace Elem Med,1990,7(4):47.

[15] Habib F K, Maddy S Q, Stitch S R. Zinc induced changes in the progesterone binding properties of the human endometrium[J]. Acta Endocrinologica,1980,94(1):99-106.

[16] 徐仙,曹纘孙,陈晓燕,等. 月经周期血清微量元素与生殖激素关系的探讨[J]. 西安医科大学学报:中文版,1997,18(4):455-458.

[17] 梁光华,谷新利,刘贤侠,等. 促孕散治疗持久黄体不孕奶牛血清生殖激素影响的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2012,30(2):177-180.