

王晋, 王春涛, 王月, 等. 输精后注射 hCG、GnRH 对奶牛受胎率的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 33-36.

WANG J, WANG C T, WANG Y, et al. Effects of injection of hCG and GnRH after insemination on the first service conception in cows [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 33-36.

输精后注射 hCG、GnRH 对奶牛受胎率的影响

王晋, 王春涛, 王月, 刘鑫, 李万超, 张海博*

(北京首农畜牧发展有限公司, 北京 100171)

摘要: 为提高人工授精后荷斯坦奶牛头胎受胎率, 研究肌注绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和促性腺激素释放激素 (GnRH) 的最佳时间和浓度, 持续跟踪 8 头奶牛在输精后 30 d 内血清中的孕酮浓度变化, 每 2 d 检测 1 次, 分析峰值出现时间; 在每个峰值出现前 1 d, 分别对奶牛肌注 1 000 IU hCG 或 100 μ g GnRH ($n=30$), 并设置相应空白对照 ($n=30$), 分析各组受胎率; 选择受胎率高的处理组奶牛, 在授精后 13 d 分别注射 1 000、2 000 和 3 000 IU 的 hCG ($n=30$), 分析对应受胎率。结果显示: 孕酮在授精后 2、6 和 14 d 出现 3 个峰值, 分别是 1 479、1 472 和 1 431 pmol/L。在授精后 1、5、13 d, 肌注 GnRH 组的受胎率分别是 34.5% (10/29)、46.7% (14/30)、40.0% (12/30), 对照组为 39.3% (11/28), 组间无显著性差异 ($P=0.836$); 肌注 hCG 组受胎率分别是 21.4% (6/28)、37.9% (11/29)、58.6% (17/29), 对照组为 30% (9/30), 其中授精后 1 d 与授精后 13 d 存在显著性差异 ($P<0.05$)。授精后 13 d, 肌注 hCG 的 1 000、2 000 和 3 000 IU 梯度试验受胎率分别为 50.0% (15/30)、56.7% (17/30)、80.0% (24/30), 其中肌注 1 000 IU 与 3 000 IU 组存在显著性差异 ($P<0.05$)。综上, 授精后 13 d 肌注 3 000 IU hCG 能显著提高头胎奶牛受胎率。

关键词: 奶牛受胎率; 孕酮; 绒毛膜促性腺激素; 促性腺激素释放激素

中图分类号: S823 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)11-0033-04

Effects of injection of hCG and GnRH after insemination on the first service conception in cows

WANG Jin, WANG Chuntao, WANG Yue, LIU Xin, LI Wanchao, ZHANG Haibo*

(Beijing SUNLON Livestock Development Co., Ltd., Beijing 100171, China)

Abstract: In order to increase the first-service conception rate in Holstein cows after artificial insemination, the optimal time and concentration of intramuscular injection of hCG and GnRH were studied here. Progesterone concentration in the serum of 8 cows was checked every two days within 30 days after insemination so as to analyze the peak value. 1 000 IU hCG or 100 μ g GnRH were injected one day before the peak, respectively ($n=30$), and the corresponding control group ($n=30$) was established to analyze the conception rates. Finally, on the 13th day after insemination, the cows were injected with different doses of hCG (1 000, 2 000, and 3 000 IU) to analyze the corresponding conception rates ($n=30$). The results were as follows: Progesterone exhibited three peaks at 2, 6, and 14 days after insemination, which were 1 479, 1 472, and 1 431 pmol/L, respectively. Following this, one group of cows were injected with 1 000 IU hCG on the first, fifth, and thirteenth day after insemination, while another group of cows were injected with 100 μ g GnRH at the same time. The conception rates of the GnRH group were 34.5% (10/29) on day 1, 46.7% (14/30) on day 5, and 40.0% (12/30) on day 13; which were of no significant difference with those of the control group (39.3% (11/28), $P=0.836$). The conception rates of the hCG group were 21.4% (6/28) on day 1, 37.9% (11/29) on day 5, and 58.6% (17/29) on day 13; that of the control group was 30% (9/30), and there was a significant difference ($P<0.05$) between day 1 and day 13 after pregnancy. The pregnancy rates of hCG injection on the 13-day after insemination were 50.0% (15/30) for 1 000 IU, 56.7% (17/30) for 2 000 IU, and 80.0% (24/30) for 3 000 IU. There was a significant difference between 1 000 and 3 000 IU ($P<0.05$). In summary, intramuscular injection of 3 000 IU hCG on day 13 after artificial insemination significantly raised the first-serve conception rate in cows.

Keywords: conception rate of dairy cow; progesterone; hCG; GnRH

收稿日期: 2023-11-21; 修回日期: 2024-09-05

基金项目: 现代农业产业技术体系项目 (CARS-36); 北京三元种业科技有限公司自立科研课题 (SYZY20210013)

第一作者: 王晋, 男, 硕士

* 通信作者: 张海博, 硕士, 主要从事奶牛繁殖管理相关工作, E-mail: 1224290899@qq.com。

奶牛养殖技术的不断提高促进高产牧场的发展,而高产奶牛在产后不可避免地出现长时间的能量负平衡,血液中激素浓度降低,尤其是雌激素(estrogen, E)和孕激素(progesterin, P),表现为发情不明显或不发情,从而导致受胎率下降^[1]。人工合成的促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)有促进垂体分泌促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体素(luteinizing hormone, LH)的作用,可有效提升机体的孕酮含量,从而提高奶牛受胎率^[2-3]。生产上主要应用的是绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)和GnRH。hCG是一种糖蛋白激素,结构上具有与FSH、LH等激素相似的 α 亚基,促进孕酮合成分泌,因此也在妊娠的维持中发挥重要作用^[4-6]。GnRH是下丘脑分泌的神经激素,作用垂体分泌释放促性腺激素,普遍应用于同期发情和生殖调控^[7-9]。在配种前,多种激素配合的同期发情方案已经成熟应用于生产一线。然而,授精后牛的激素调控还停留在同期发情的第一针GnRH上。研究表明,在奶牛授精后1周内,孕酮含量直接影响胚胎着床和胚胎发育^[10-13]。此外,授精后5 d肌注hCG有助于提高头胎牛的受胎率,而对经产牛的受胎率影响不大^[14-15]。夏季高温会加剧对高产奶牛繁殖性能的负面影响^[16]。因此,研究授精后头胎奶牛的外源激素处理方案对提高奶牛繁殖率和生产效益具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2021年9月3日—2023年3月9日,在北京首农畜牧发展有限公司河北分公司(定州)进行,随机选择健康状况良好、体况相近、两个情期内配种次数在3次及3次以内的头胎荷斯坦奶牛。GnRH(批号:211011)和hCG(批号:211012),均购于浙江宁波第二激素厂。孕酮ELISA试剂盒(检测范围:0.938~30 ng/mL),购于北京华悦昌生物科技有限公司。

1.2 试验设计和分组

试验分3个阶段。第一阶段:选择8头头胎牛,在授精后2~30 d,每隔1 d检测血液孕酮含量,确定孕酮分泌峰值和对应时间。第二阶段:根据峰值时间和数量设置试验组数量,分别选择不同圈舍的头胎牛进行,在孕酮达到不同峰值的前1 d肌注1 000 IU hCG或100 μ g GnRH($n=30$),不同处理组均设置对照($n=30$)。授精后30 d孕检并统计各组受胎情况。

第三阶段:选择第二阶段受胎率最高的激素处理组,在对应时间点进行1 000、2 000和3 000 IU浓度梯度试验($n=30$)。最终试验结果按非淘汰牛头数统计。

1.3 激素检测方法

试验牛于晨饲前尾静脉采血,采集全血,37 $^{\circ}$ C水浴10 min,3 000 r/min离心15 min,收集血清分装于0.5 mL的离心管中,-20 $^{\circ}$ C保存待测。使用多项式二次回归分析制作标准曲线检测灵敏度。

1.4 孕检及受胎率统计

输精后30 d统一对未返情的牛进行B超(大连汉德公司,HD-9310A)回声探测。受胎率=参配并怀孕牛/参配牛 $\times 100\%$ 。参配牛已去除孕检前淘汰牛。

1.5 统计分析

数据采用SPSS 22.0软件分析整理,孕酮含量使用单因素方差分析(One-way ANOVA)。奶牛受胎率用卡方(χ^2)和Fisher法检验,采用Bonferroni法进行多重比较。激素含量结果用“平均值 \pm 标准差”表示。 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 输精后奶牛血液孕酮含量分析

由图1和表1可知,经ELISA检测,多项式二次回归分析得到标准曲线: $y=11.632x^2+602.47x-28.751$ ($R^2=0.9994$),变异系数是11.04%~26.89%。输精后奶牛血液中的孕酮水平呈现不规则波动,具有3个较高的峰值,分别是在输精后2、6和14 d,其中授精后2 d与授精后8、10、16、20、22、24 d的孕酮含量存在显著差异($P<0.05$),授精后6 d与授精后8、10、16、22、24 d存在显著差异($P<0.05$),授精后14 d与授精后8、10、22、24 d存在显著差异($P<0.05$)。

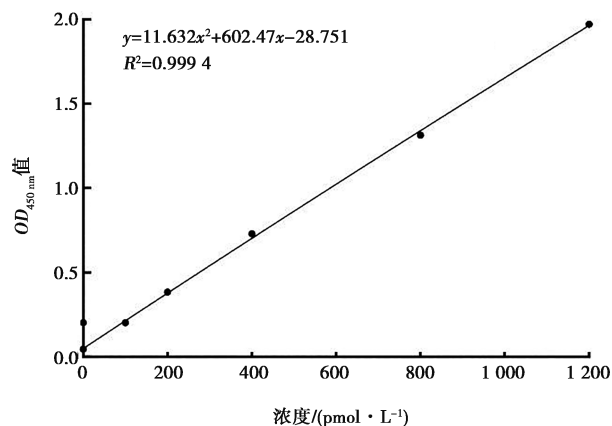


图1 孕酮ELISA试剂盒标准曲线

表1 输精后奶牛血液孕酮含量测定及变异系数分析 (n=8)

授精后天数/d	孕酮含量/ (pmol · L ⁻¹)	变异系数/%
2	1 479.36±216.32 ^a	14.62
4	1 265.22±192.04 ^{abcdefg}	15.18
6	1 471.72±276.42 ^{ab}	18.78
8	1 086.39±292.13 ^e	26.89
10	1 159.15±242.63 ^{defg}	20.93
12	1 394.34±263.30 ^{abc}	18.88
14	1 431.39±158.04 ^{abc}	11.04
16	1 251.88±171.00 ^{cdefg}	13.66
18	1 272.64±172.87 ^{abcdefg}	13.58
20	1 255.66±154.62 ^{bcdefg}	12.31
22	1 139.46±173.95 ^{efg}	15.27
24	1 136.09±201.28 ^{fg}	17.72
26	1 368.64±275.56 ^{abcd}	20.13
28	1 352.71±259.69 ^{abcdef}	19.20
30	1 355.18±186.21 ^{abcde}	13.74

注：同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.2 输精后注射 hCG 与 GnRH 对奶牛受胎率的影响

试验第一阶段奶牛血液中孕酮含量存在3个较高的峰值，分别在授精后2、6和14 d。第二阶段选择在这3个时间点前1 d进行肌注试验。由表2可知，hCG处理试验牛受胎率在授精后13 d最高为58.6% (17/29)，授精后1 d最低为21.4% (6/28)。授精后13 d的受胎率较对照组、授精后1 d、授精后5 d分别提高28.6%、37.2%、20.7%，授精后13 d与授精后1 d组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

由表3可知，GnRH处理试验牛的受胎率授精后5 d最高为46.7% (14/30)，授精后1 d最低为34.5% (10/29)，组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表2 输精后不同时间点注射 hCG 对奶牛受胎率的影响

项目	对照	授精后时间/d			χ^2 值	P值
		1	5	13		
参配数/头	30	28	29	29		
怀孕数/头	9	6	11	17	9.362	0.025
受胎率/%	30.0 ^{ab}	21.4 ^b	37.9 ^{ab}	58.6 ^a		

2.3 输精后注射不同浓度 hCG 对奶牛受胎率的影响

上述试验结果表明，1 000 IU的hCG在授精后13 d的受胎率最高。因此，第三阶段试验选择授精后13 d进行hCG浓度梯度试验，分别设3个浓度梯

度，1 000、2 000和3 000 IU。由表4可知，受胎率3 000 IU组显著高于1 000 IU组 ($P < 0.05$)。

表3 输精后不同时间点注射 GnRH 对奶牛受胎率的影响

项目	对照	授精后时间/d			χ^2 值	P值
		1	5	13		
参配数/头	28	29	30	30		
怀孕数/头	11	10	14	12	0.927	0.836
受胎率/%	39.3	34.5	46.7	40.0		

表4 输精后13 d注射不同浓度 hCG 对奶牛受胎率的影响

项目	注射浓度/IU			χ^2 值	P值
	1 000	2 000	3 000		
参配数/头	30	30	30		
怀孕数/头	15	17	24	6.334	0.048
受胎率/%	50.0 ^a	56.7 ^{ab}	80.0 ^b		

3 讨论

孕酮在妊娠的建立和维持过程中发挥重要作用，通过降低子宫的收缩反应，促进胚胎着床，进而提高奶牛繁殖率^[17]。因此，人工授精后奶牛体内孕酮含量和受胎率的高低密切相关。本试验通过检测头胎牛授精后30 d内的孕酮含量发现，出现3个比较接近的峰值，分别是授精后2、6和14 d。孕酮含量在3个时间点之间无显著性差异，均高于1 400 pmol/L。张萌^[18]研究表明授精后5和17 d的妊娠奶牛孕酮含量较高，但是仅选择了4个时间点，包括另外的授精后1和28 d。然而本试验首次较完整的2 d/次检测了授精后30 d内奶牛体内的孕酮含量变化，为授精后奶牛激素处理提供了宝贵的参考经验。

根据上述研究结果，后续试验在3个峰值的基础上设置了3个处理组和1个对照组来检测肌注2种外源激素对受胎率的影响。本试验研究发现，授精后1 d肌注hCG的受胎率较对照组下降了8.6%，另外Sanchez等^[19]的研究发现授精后2 d肌注hCG反而降低了受胎率。李启业等^[20]研究发现对16头发情奶牛分2组注射GnRH类似物，受胎率比对照组分别提高了43.1%和30.6%。同样Shephard等^[21]研究发现肌注GnRH与对照组相比受胎率由41.2%提升至53.4%。本试验结果表明，授精后5 d注射GnRH的受胎率较对照组提升明显，组内最高46.7%，但无显著性差异。而hCG组在13 d注射时受胎率最高，为58.6%。GnRH组的受胎率低于hCG组，故不再进行GnRH的浓度梯度试验。

hCG 在促进家畜卵泡发育、成熟排卵和黄体形成、孕酮分泌等方面发挥重要作用。在奶牛临床上研究发现, hCG 的生理作用和注射浓度密切相关, 低浓度的 hCG 可以促进卵泡成熟, 加速排卵; 高浓度的 hCG 可以治疗奶牛卵泡囊肿、卵巢静止和黄体功能不全, 进而提高受胎率。马建霞等^[22]在人工授精前分别肌注 500、1 000 和 1 500 IU hCG, 受胎率分别为 45%、65%、70%, 对照组为 35%。Alnimer 等^[23]研究发现头胎牛在授精后 4 d 和 6 d 注射 1 500 IU hCG 后, 45 d 孕检受胎率分别为 46.4% 和 31.6%, 较对照组提升 15.8%。然而, Hanlon 等^[24]研究发现授精后 5 d 注射 1 500 IU hCG 不影响母牛的受胎率。因此, 为确定 13 d 注射 hCG 的最佳浓度, 本文进行了较大比例浓度梯度试验, 结果表明 3 000 IU 的 hCG 受胎率最高, 较对照组提高 30%, 具有显著性差异。故授精后 13 d 肌注 3 000 IU hCG 能显著提高头胎奶牛受胎率。

参考文献:

- [1] SAKAGUCHI M. Practical aspects of the fertility of dairy cattle [J]. *Development*, 2011, 57 (1): 17-33.
- [2] NASCIMENTO A B, BENDER R W, SOUZA A H, et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96 (5): 2873-2882.
- [3] YAN L, ROBINSON R, SHI Z, et al. Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: a meta-analysis [J]. *Theriogenology*, 2016, 85 (8): 1390-1398.
- [4] 王燕平, 宋丽杰, 曹慧艳, 等. 试管婴儿 14 d 不同区间血清 β -hCG 妊娠结局的研究 [J]. *全科护理*, 2020, 18 (27): 3650-3652.
- [5] 林巧樱, 蔡嘉力, 张俊辉, 等. 冷冻单囊胚移植术后 14 天血清 β -hCG 浓度与妊娠结局的关系 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27 (5): 617-618.
- [6] 牛萃, 田菁燕, 李佳琛, 等. 卵泡液中 hCG、AMH 浓度与 IVF-ET 结局的关系 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40 (6): 703-706.
- [7] DE RENSIS F, BOTTARELLI E, BATTIONI F, et al. Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after synchronizing ovulation using GnRH or hCG during the warm or cool period of the year [J]. *Theriogenology*, 2008, 69 (4): 481-484.
- [8] LÓPEZ-GATIUS F, GARCIA-ISPIERTO I J T. Treatment with an elevated dose of the GnRH analogue dephereline in the early luteal phase improves pregnancy rates in repeat-breeder dairy cows [J]. *Theriogenology*, 2020, 155: 12-16.
- [9] 张贺. 不同脉冲频率 GnRH 刺激对大鼠垂体细胞中 FSH β mRNA 和 LH β mRNA 表达水平的影响 [D]. 吉林: 吉林大学, 2007.
- [10] THATCHER W W, MOREIRA F, SANTOS J E P, et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production [J]. *Theriogenology*, 2001, 55 (1): 75-89.
- [11] STARBUCK G R, DARWASH A O, MANN G E, et al. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows [J]. *Theriogenology*, 2001, 26 (2): 447-450.
- [12] 张萌, 王俊奎, 杨玉东, 等. 人工授精后不同阶段葡萄糖、孕酮和雌二醇含量对奶牛妊娠预测的研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56 (10): 108-111.
- [13] 张萌, 高俊国, 罗芳, 等. 奶牛定时人工授精后第 5 天注射 hCG 对妊娠率的影响 [J]. *中国草食动物科学*, 2020, 40 (6): 87-89.
- [14] 王军, 渡边宏. HCG 对黄体发育不全奶牛受胎率的影响试验 [J]. *新疆农垦科技*, 2009, 32 (2): 40-41.
- [15] NASCIMENTO A B, BENDER R W, SOUZA A H, et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96 (5): 2873-2882.
- [16] GARCIA-ISPIERTO I, DE RENSIS F, CASAS X, et al. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrus dairy cows under heat stress conditions [J]. *Theriogenology*, 2019, 124: 65-68.
- [17] LONERGAN P, FORDE N, SPENCER T J R, FERTILITY, et al. Role of progesterone in embryo development in cattle [J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2016, 28 (2): 66-74.
- [18] 张萌. 人工授精后奶牛血浆代谢物的变化 [D]. 银川: 宁夏大学, 2020.
- [19] SANCHEZ J M, RANDI F, PASSARO C, et al. Effect of human chorionic gonadotrophin administration 2 days after insemination on progesterone concentration and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101 (7): 6556-6567.
- [20] 李启业, 马占海, 阿增仁. 用 GnRH 类似物提高大通奶牛情期受胎率试验 [J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2007, 187 (1): 26-27.
- [21] SHEPHARD R W, MORTON J M, NORMAN S T. Effects of administration of gonadotropin-releasing hormone at artificial insemination on conception rates in dairy cows [J]. *Animal Reproduction Science*, 2014, 144 (1): 14-21.
- [22] 马建霞, 王应安, 张寿, 等. 不同剂量 HCG 对奶牛情期受胎率的影响 [J]. *青海畜牧兽医杂志*, 1998 (1): 8-9.
- [23] ALNIMER M A, SHAMOUN A I. Treatment with hCG 4 or 6 days after TAI to improve pregnancy outcomes in repeat-breeding dairy cows [J]. *Animal Reproduction Science*, 2015, 157: 63-70.
- [24] HANLON D, JARRATT G, DAVIDSON P, et al. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrus dairy cows [J]. *Theriogenology*, 2005, 63 (7): 1938-1945.