

GnRH A 主动免疫家兔的去势效果

魏锁成^{①②} 张 剑^②

(①甘肃农业大学动物医学院 兰州 730070; ②西北民族大学动物医学研究所 兰州 730030)

摘要: 为了探讨促性腺激素释放激素类似物 (gonadotropin releasing hormone analogue, GnRH A) 对动物免疫去势的效果及作用机理。在 30 只日本大耳白兔 (*Oryctolagus cuniculus*) (EG I 与 EG II 组) 的颈背部皮下分 2~ 3 点注射 1.0 ml (100 µg/ml) 自制的 GnRH A 抗原乳剂, EG II 组 3 周后加强免疫一次; 测定睾丸长度与重量、体重、血清 GnRH 抗体效价及睾酮浓度。结果表明, EG II 组睾丸长度与 EG I 组差异极显著 ($P < 0.01$); EG II 组的 GnRH 抗体水平明显高于 EG I 组; EG II 组、EG I 组与对照组的血清睾酮浓度差异逐渐增加, 102 d 时 EG II 组睾酮浓度极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 且第 28 d 后 EG II 组睾酮浓度显著低于 EG I 组 ($P < 0.05$); EG II 组体重和日增重最大, 显著高于 EG I 组及对照组 ($P < 0.05$)。GnRH A 主动免疫家兔对睾丸发育、血清 GnRH 抗体效价和睾酮浓度具有显著的影响, 加强免疫效果更理想。

关键词: 促性腺激素释放激素类似物 (GnRH A); 抗原; 睾酮; 免疫去势; 家兔

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2009)01- 139 06

Castration by GnRH A Active Immunization in Rabbits

WEI Suo Cheng^{①②} ZHANG Jian^②

(① *Animal Medicine College, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070;*

② *Animal Medicine Institute, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China*)

Abstract: To investigate the efficiency of immunocastration by using gonadotropin releasing hormone analogue (GnRH A) in rabbits, GnRH A was combined with bovine serum albumin (BSA) as well as incomplete Freund's adjuvant to make antigen emulsion. A total of 30 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were injected with 1.0 ml (100 µg/ml) GnRH A antigen emulsion at 2 to 3 spots in two groups, EG I and EG II groups. The EG II group was reinjected with the same dosage after 3 weeks. The testis length and weight as well as body weight of the immunized rabbits were measured, and GnRH antibody titer and testosterone concentration were detected by ELISA. There was a significant difference in the testis length between EG I and EG II groups ($P < 0.01$); antibody level of EG II group was obviously higher than that of EG I group; serum testosterone concentration in both EG I group and EG II groups differed remarkably from 7 to 16 weeks when compared with the control ($P < 0.05$); testosterone concentration in EG II group was lower than that in control group (CG) at 102 d ($P < 0.01$), and testosterone concentration in EG I group was also lower at 28 d ($P < 0.05$) after the injecting GnRH A antigen. Body weight and average daily body weight gain in EG II group were significantly higher than in EG I and CG groups ($P < 0.05$). In summary, the testis development, serum GnRH antibody titer and testosterone level in experimental rabbits change obviously after active immunization with GnRH A and an additional injection strengthens castration effects.

Key words: Gonadotropin releasing hormone analogue (GnRH A); Antigen; Testosterone; Immunocastration; Rabbit

基金项目 国家民委 2002 年度重点资助项目 (No. MW2002-ZD-010);

第一作者介绍 魏锁成, 男, 教授; 研究方向: 动物医学和生物生殖生物技术; E-mail: wsc@xhmu.edu.cn.

收稿日期: 2008 08 25, 修回日期: 2008 11-05

免疫去势技术是以激素抗体主动或被动地中和动物机体的内源性激素,使其生物活性部分或完全丧失,引起内分泌系统的平衡失调,从而改变下丘脑-垂体-性腺轴之间的正常反馈调节关系,减少性腺激素的合成与释放,使动物完全或大部分地丧失生育能力而达到去势目的。这种方法克服了传统手术去势的诸多缺点,方法简便,安全性高,可替代传统手术去势,控制动物性行为 and 繁殖能力,促进动物生长,改善肉质^[1,2]。近年来,国内外学者已在多种动物中开展了促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)主动免疫去势的研究。但是,天然 GnRH 很难提纯得到,因此许多学者提出可用合成的促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A)来替代, GnRH-A 是在天然的 GnRH 分子结构上替换了第 6、10 位上的氨基酸所得,这种结构类似物具有与天然的 GnRH 十分相似的生理和生物学作用,并与 GnRH 受体(GnRHR)的结合力增强 100~200 倍^[3-5]。但是,从国内外的研究来看,多以 GnRH 制备的抗原免疫动物,而在利用 GnRH-A 免疫去势方面的研究却鲜有报道^[6-8]。为此,笔者在前期研究的基础上,用自制的 GnRH-A 抗原乳剂对日本大耳白兔(*Oryctolagus cuniculus*)进行了免疫去势效果的实验,效果良好,可为动物生产中广泛应用提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A), Zillion 公司生产,纯度(HPLC) \geq 98.99%。碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl),上海延长生化科技发展有限公司生产,纯度(HPLC) \geq 99.23%。牛血清白蛋白(BSA)和弗氏不完全佐剂,美国 SIGMA 公司生产。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔血清,博大泰克生产。

1.2 主要仪器 TQ16-W 型高速离心机(长沙湘仪),透析带(SOLAR BIO 公司,截留分子量 14 000),96 孔酶标板(博大泰克),Multiskan MK3 型酶标仪(Thermo 公司),分析天平等。

1.3 实验动物 3 月龄健康日本大耳白兔 46

只,雄性,购自兰州生物制品研究所实验动物中心。其中 16 只随机分为 3 个实验组和空白对照组,每组 4 只,用于抗原注射量的确定;另 30 只均分为实验 I 组(EG-I)、实验 II 组(EG-II)和对照组(CG),用于免疫去势效果观测。所用兔均分笼饲养,自由饮食。预饲 10 d 后进行正式实验。

1.4 抗原制备 以碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)为偶合剂,将 GnRH-A 与牛血清白蛋白(BSA)连接为复合物,再加入弗氏不完全佐剂制成抗原乳剂。具体方法为:用适量的双蒸水分别溶解 10 mg GnRH-A 和 10 mg 牛血清白蛋白(BSA),然后将两者混合,形成 BSA-GnRH-A 混合物。再把 250 mg EDC.HCl 溶解于适量双蒸水中,缓慢地加入上述混合物中,用磁力搅拌器不断搅拌 6 h 以上;然后将反应液装入透析袋中,用蒸馏水透析 48 h。利用紫外吸收法求出 GnRH-A 的结合率为 85%,由此可计算出与 BSA 结合的 GnRH-A 的量为 8.5 mg。将透析后的反应液置于一小玻璃瓶中,加入双蒸水至 GnRH-A 浓度为 200 μ g/ml。最后取 200 μ g/ml 的反应液 40 ml,加入等量的弗氏不完全佐剂充分乳化,制成浓度为 100 μ g/ml 的抗原乳剂备用。整个实验过程在无菌操作间中完成^[9]。按参考文献^[10]进行无菌性、安全性和物理性状检验。

1.5 免疫注射方法

1.5.1 确定抗原剂量实验 对 16 只兔子中的 3 个实验组兔分别注射 50 μ g/ml、100 μ g/ml 和 150 μ g/ml GnRH-A 抗原各 1.0 ml,对照组注射生理盐水。实验期 6 周。

1.5.2 免疫去势实验 在 EG-I 与 EG-II 组每只兔子的颈背部皮下分 2~3 点注射 1.0 ml (100 μ g/ml) GnRH-A 抗原,剂量相同。EG-II 组于 3 周后用相同剂量与方法加强免疫一次。空白对照组不做任何处理。免疫注射当天记为 0 d。

1.6 血样采集 16 只兔用于确定抗原剂量,注射后每周(即第 7、14、21、28、35、42 d)采集后肢外侧股静脉血,共 6 次。另 30 只兔用于免疫

去势实验,注射后分别在第 7、28、49、70、91、102 d 采血 5 ml(即每 3 周一次),共 6 次。采集的血液立即于 37℃ 水浴 30 min, 2 000~ 2 500 r/min 离心 10~ 15 min,分离血清, - 20℃ 保存。采血前禁食 12 h。

1.7 检测项目

1.7.1 睾丸长度和重量的测量 于实验第 110 d 解剖实验兔,摘取两侧睾丸,除去附睾及周围脂肪,用游标卡尺(精度 0.1 mm)测量其长度,用电子天平(精度 0.01 g)称重。

1.7.2 体重变化 在第 0、30、60、90 和 110 d 分别称重,计算平均日增重。

1.7.3 GnRH 抗体效价 用间接 ELISA 法测定 GnRH 抗体效价。

1.7.4 血清睾酮浓度测定 用血清睾酮诊断试

剂盒测定(ELISA 法),最小检出量为 0.03 ng/ml。

1.8 数据统计学分析 用 SPSS 13.0 统计学软件处理数据,用 *t* 检验进行显著性检验。

2 结果

2.1 抗原检验 抗原乳剂接种大耳白兔 14 d 后,全部健康,精神良好,无不良反应。抗原乳剂呈乳白色的均匀悬液,3 000 r/min 离心 15 min 不分层,37℃ 放置 21 d 不破坏,说明安全可靠^[9]。

2.2 抗原包被浓度及血清最佳浓度的确定 由表 1 得出当抗原稀释 800 倍和血清稀释 100 倍时,其 OD₄₉₀ 为 0.987,最接近 1,所以抗原最佳浓度为 1:800 倍稀释,血清的最佳浓度为 1:100 倍稀释。

表 1 抗原包被浓度及血清最佳工作浓度(OD₄₉₀)

Table 1 The optimum concentration of serum and GnRH A antigen

血清稀释度 Serum dilution	抗原稀释度 Antigen dilution						
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
1:50	1.431	1.315	1.225	1.143	1.106	0.965	0.651
1:100	1.283	1.211	1.179	1.108	0.987	0.742	0.585
1:200	1.093	0.921	0.875	0.760	0.685	0.579	0.441

2.3 不同浓度抗原注射后血清 GnRH 抗体效价 结果表明,实验组在免疫后 14 d 内均能检测到 GnRH 抗体,抗体水平在第 28 d 达到高峰,其中 50 μg/ml 剂量组效价为 1:800,而 100 μg/ml、150 μg/ml 剂量组效价同为 1:1600,说明两组剂量效价相同,故免疫去势时以 100 μg/ml 为使用浓度(表 2)。抗体水平达到高峰后持续时间短,很快下降,为了更好的维持抗体高峰水平,需加强免疫注射一次。

2.4 免疫去势兔血清 GnRH 抗体水平 表 3 中 EG-I 和 EG-II 血清 GnRH 抗体水平在免疫注射后一直高于对照组,并分别在第 28 d 和 49 d 达到高峰,但 EG-I 抗体水平从 28 d 的 1 600 急剧下降到 49 d 的 800,抗体水平的高峰期持续时间很短,下降很快;而 EG-II 抗体水平在 70 d 时仍与 EG-I 相同,为 1 600。表明加强免疫可以使血清抗体浓度维持较长时间,达到更

表 2 注射不同浓度抗原兔的血清 GnRH 抗体效价

Table 2 Serum GnRH antibody titer of rabbits immunized with different antigen concentrations

剂量组 (n=4) Dosage group (μg/ml)	免疫时间 Immunization time (d)					
	7	14	21	28	35	42
50	0 ^a	100 ^a	200 ^b	800 ^d	400 ^c	200 ^b
100	0 ^a	200 ^b	400 ^c	1 600 ^e	800 ^d	800 ^d
150	0 ^a	400 ^c	800 ^d	1 600 ^e	800 ^d	800 ^d
对照组 Control group	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

同一行或同一列中,上标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$);上标不同表示差异显著($P < 0.05$),其中上标字母相邻(如 ab、bc 等)表示差异显著($P < 0.05$),上标字母间有间隔(如 ac、bd 等)表示差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

The same superscript letter in the same row and column mean that there was no significant difference ($P > 0.05$), The different superscripts mean that there was significant difference between groups, of which adjacent superscripts (such as ab) indicate the difference was significant ($P < 0.05$), while interval superscripts (such as ac, bd) show the difference was highly significant ($P < 0.01$). The same was applied in the following tables.

长时间的良好免疫去势效果。

2.5 血清睾酮浓度检测 从表 4 得出, 对照组睾酮浓度呈持续上升趋势, 在第 91 d 达到峰值; EG-I 和 EG-II 睾酮浓度则逐渐下降, 到第 28 d 降到最低, 后又逐渐增加。28 d 后, EG-I 和 EG-II 血清睾酮水平与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 且第 49、70、91 d 差异极显著 ($P < 0.01$); 28 d 以后 EG-I 与 EG-II 差异也显著 ($P < 0.05$), 至 102 d 差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.6 睾丸长度、睾丸重量、体重和平均日增重测定值 由表 5 得出 EG-I 与 EG-II 组睾丸长度和平均重均显著小于对照组动物 ($P < 0.01$), 而 EG-II 组又显著小于 EG-I 组 ($P < 0.05$)。说明 GnRH-A 主动免疫能减缓睾丸的生长, 而且加强免疫时效果更明显。

实验结束时, EG-I 和 EG-II 组体重显著高于对照组 ($P < 0.05$), EG-II 组又高于 EG-I 组。三组的平均日增重以 EG-II 为最大 ($P < 0.05$), 而 EG-I 与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3 免疫去势兔血清 GnRH 抗体水平

Table 3 Detection of serum GnRH antibody in 30 immunized rabbits

组别 Group	免疫时间 Immunization time (d)					
	7	28	49	70	91	102
EG-I	0 ^a	1 600 ^d	800 ^{cd}	400 ^b	200 ^b	0 ^a
EG-II	0 ^a	1 600 ^d	3 200 ^e	1 600 ^d	800 ^c	400 ^b
CG	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

表 4 实验组和对照组兔血清睾酮浓度 (ng/ml)

Table 4 Serum testosterone concentrations in three group of rabbits

免疫时间 (d) Immunization time	EG-I	EG-II	对照组 Control group
1	6.327 ± 0.212 ^a	6.285 ± 0.138 ^a	6.381 ± 0.107 ^a
28	3.383 ± 0.327 ^b	3.125 ± 0.234 ^b	6.951 ± 0.231 ^a
49	3.926 ± 0.548 ^b	1.927 ± 0.147 ^c	7.589 ± 0.471 ^a
70	4.813 ± 0.443 ^b	2.787 ± 0.070 ^c	8.921 ± 0.457 ^a
91	6.125 ± 1.127 ^b	3.621 ± 0.113 ^c	10.759 ± 1.312 ^a
102	9.256 ± 1.872 ^a	3.853 ± 0.679 ^c	10.391 ± 1.198 ^a

表 5 睾丸长度、睾丸重量、体重和平均日增重

Table 5 Data of testis length, testis weight, body weight and mean daily gain

组别 Group	睾丸长度 (mm) Testis length	睾丸重量 (g) Testis weight	体重 Body weight (kg)				日增重 Daily gain (g/d)
			0 d	60 d	90 d	110 d	
对照组 Control group	33.7 ± 1.1 ^a	2.71 ± 0.07 ^a	1.53 ± 0.07 ^a	2.45 ± 0.17 ^a	2.87 ± 0.21 ^b	3.12 ± 0.35 ^b	14.45 ± 1.36 ^a
EG-I	25.3 ± 0.8 ^c	2.06 ± 0.10 ^c	1.55 ± 0.05 ^a	2.48 ± 0.28 ^a	2.97 ± 0.37 ^{ab}	3.25 ± 0.28 ^a	15.45 ± 1.72 ^c
EG-II	18.7 ± 0.7 ^e	1.66 ± 0.04 ^e	1.49 ± 0.10 ^a	2.52 ± 0.29 ^a	3.05 ± 0.33 ^a	3.38 ± 0.51 ^a	17.18 ± 1.18 ^e

3 讨论

GnRH 由丘脑下部合成, 并以脉冲方式分泌进入垂体门脉系统, 到达垂体前叶发挥诱导促性腺激素释放的作用, 调节垂体 LH/FSH 的合成与释放^[11]。关于 GnRH 和 GnRH-A 免疫去势的作用机理目前有几种不同的看法, Sakurai 等认为 GnRH 抗体与 GnRH 受体 (GnRHR) 结合, 使垂体中 GnRHR 明显减少, 影响了内源性 GnRH 与 GnRHR 的结合, 改变了激素的作用, 由于 GnRH-A 是在天然 GnRH 分子结构上替换了第 6、10 位上的氨基酸, 故可使 GnRH 与

GnRHR 结合力增强 100~200 倍^[3-5]; 另有人认为可能是由于动物体内的活性物质与抗体结合变为非活性物质, 从而减少了对靶细胞作用的程度, 干扰代谢系统^[12]。第三种观点认为由于 GnRH-A 免疫反应破坏了产生 GnRH 的细胞^[13]。Brown 等对羊 (*Ovis aries*) 进行 GnRH 主动免疫后, 当 GnRH 抗体已测不到时, 羊体内促性腺激素水平依然很低, 表明 GnRH 的早期主动免疫可能对动物的繁殖功能造成永久的改变^[14, 15]。

疫苗的效力测定通常以生物体对待检品的生物活性反应为基础, 以生物统计为工具, 运用

特定的实验设计,通过比较待检品与标准品在一定条件下所产生的特定动物反应剂量的差异来测得待检品的效价。现在效价测定大都采用检测抗体的方法,其中最常见的是间接 ELISA 法,可准确快速地检测出抗体水平的变化,间接法是检测抗体常用的方法。本实验对免疫效力进行了测定,结果表明,各实验组动物均在免疫后两周内检测到 GnRH 抗体, GnRH 抗体一般在第 4 周左右达到高峰,其中 50 $\mu\text{g/ml}$ 剂量组 ELISA 效价为 1:800,而 100 $\mu\text{g/ml}$ 、150 $\mu\text{g/ml}$ 剂量组 ELISA 效价同为 1:1600,说明两组剂量效价基本相同。但抗体达到高峰后持续时间短,下降很快。为了更好地延续抗体高峰水平,有必要加强免疫。

GnRH 主动免疫作为一种使哺乳动物的生殖系统关闭的可能方法,在 20 世纪 70 年代得到了认识。传统的手术去势可能会给家畜造成应激,以及在手术操作时会感染伤口等。化学去势药物浓度的选择也是一个问题,浓度高会使睾丸的炎症加剧,导致溃烂,加重全身反应,浓度低了起不到去势效果^[6,7]。免疫去势则可克服上述缺点以达到去势的目的。GnRH-A 是在天然的 GnRH 分子结构上替换了第 6、10 位上的氨基酸所得,这种结构可减慢肽的降解,延长半衰期,增强其受体结合力。但 GnRH-A 是一种半抗原,抗原性很弱,增加其免疫原性的基本思路就是将 GnRH-A 与大分子载体蛋白结合,作为载体分子量应大且能结合更多的 GnRH-A 而不影响其生物活性^[4,5]。

本实验进行了 BSA-GnRH-A 抗原主动免疫对雄兔免疫去势效果的研究,结果表明,用 BSA-GnRH-A 主动免疫 3 月龄雄兔,无论是经过一次免疫的 EG-I 还是二次免疫的 EG-II,雄兔睾丸长度与重量都明显降低,血清中睾酮含量也降低,尤其是经过二次免疫的 EG-II,雄兔血清睾酮含量显著降低。这一结果与用 GnRH 单体免疫公猪(*Sus scrofa*)、公绵羊、公牛(*Bos taurus*)等其他雄性动物的报道一致^[12,14]。至于 GnRH-A 与 GnRH 免疫去势的效果究竟如何,尚需进行进一步的深入探讨。

睾酮主要由睾丸间质细胞合成与分泌,它是雄性动物体内最主要的雄性激素,其生物活性最强,刺激并维持附睾、副性腺等生殖器官的生长发育。正常睾酮的分泌主要是受腺垂体激素 LH 控制^[10]。当用 BSA-GnRH-A 免疫动物后,机体产生大量抗 GnRH 的特异性抗体,与内源性的 GnRH 结合使其失去生物活性,导致下丘脑-垂体-性腺轴功能的破坏,抑制了 LH 和 FSH 的释放,从而导致被免疫动物睾丸萎缩、睾酮浓度下降。在本实验过程中,与对照组雄兔血清睾酮水平相比,EG-I 雄兔血清睾酮水平在 1~4 周呈下降趋势,而后逐渐回复,到第 16 周时已基本达到对照组水平;EG-II 雄兔血清睾酮水平在 1~7 周呈下降趋势,虽然其后有上升趋势,但与 EG-I 相比幅度无显著差异,这可能与两组的 GnRH 抗体效价水平有关。

根据检测的 GnRH 抗体效价可知,EG-II 的抗体水平始终远高于 EG-I;EG-I 抗体水平在第 4 周达到峰值,EG-II 抗体水平峰值在第 7 周出现,其峰值数值是 EG-I 的 2 倍,到第 10 周时仍然与 EG-I 相同;但 EG-I 和 EG-II 抗体水平高峰期持续时间短,在峰值后很快下降。这充分说明, GnRH-A 主动免疫对雄兔的去势效果是有限、暂时的,有时效性,加强免疫可以取得更为理想的效果,其原因是 GnRH-A 与 GnRH 结合力更强。

实验结束时,EG-I 与 EG-II 雄兔的体重都明显比对照组高($P < 0.05$);EG-II 雄兔的平均日增重高于 EG-I 和对照组,这说明经过 BSA-GnRH-A 主动免疫可以促进动物生长发育,而且间隔一定时间强化免疫有利于免疫效果的维持和作用的充分发挥。

4 结 论

GnRH-A 主动免疫雄兔对睾丸长度、睾丸重量,以及实验兔的体重及日增重、血清 GnRH 抗体效价和血清睾酮浓度具有显著的影响,可以使睾酮的生物活性部分或完全丧失,发挥免疫去势作用,加强免疫的效果更佳。

参 考 文 献

- [1] Price E O, Adams T E, Huxsoll C C, *et al.* Aggressive behavior is reduced in bulls actively immunized against gonadotropin releasing hormone. *J Anim Sci*, 2003, **81**(2): 411~ 415.
- [2] Dunshea F R, Colantoni C, Howard H, *et al.* Vaccination of boars with a GnRH (Improve) Eliminates boar taint and increase growth performance. *J Anim Sci*, 2001, **79**(10): 2 524 ~ 2 535.
- [3] Guo G. GnRH analogues of progress. *Practical Obstetric and Gynecological Journals of China*, 2005, **21**(11): 6~ 12.
- [4] Chabbert Buffet N. GnRH antagonists. *Clin Obstet Gynecol*, 2003, **46**(2): 254~ 264.
- [5] 郭红宇, 高云荷. GnRH 类似物的研究进展. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, **21**(11): 694~ 696.
- [6] 赵焕, 章孝荣. GnRH 免疫去势研究进展. 动物医学进展, 2004, **25**(6): 16~ 18.
- [7] 魏锁成. 动物 GnRH 免疫去势技术及其应用. 西北民族大学学报, 2006, **27**(2): 75~ 89.
- [8] Bonneau M, Dufour R, Chouvet C, *et al.* The effect of immunization against luteinizing hormone releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint related compounds in intact male pigs. *J Anim Sci*, 1994, **72**: 14~ 28.
- [9] 魏锁成, 张剑. GnRH-A 抗原的制备及不同剂量免疫的效果研究. 西北民族大学学报, 2008, **29**(1): 49~ 53.
- [10] 王君伟. 兽医生物制品的质量管理和控制. 北京: 中国农业出版社, 2002, 207~ 246.
- [11] 赵兴绪主编. 兽医产科学(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2002, 66~ 90.
- [12] Xian Y Z, Turksra J A, Meloen R B, *et al.* Active immunization against gonadotropin releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer hormone levels and sexual development. *Anim Reprod Sci*, 2002, **70**(3 - 4): 223~ 233.
- [13] 吴结革, 茹达干. GnRH 及其类似物在动物繁殖中的应用. 南京农专学报, 2000, **16**(3): 48~ 51.
- [14] 杨仕群. GnRH 免疫及其在畜牧业上的应用. 四川畜牧兽医, 2004, **31**(1): 35~ 38.
- [15] Brown B W, Mattner P E. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, **103**: 131~ 135.
- [16] Zamaratskaia G, Rydhmer L, Andersson H K, *et al.* Long term effect of vaccination against gonadotropin releasing hormone, using ImprovacTM, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Anim Reprod Sci*, 2007, **81**(10): 662~ 665.