Effect of cinnamon extract on immunological and intestinal histology of tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*

Nguyen Thi Truc Quyen, Doan Van Cuong, Ma Tu Lan,
Tu Thanh Dung, Nguyen Thi Ngoc Tinh

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of cinamon (*C. verum*) extract added to feed on growth parameters, and the ability to protect tilapia (*Oreochromis* spp.) against *Streptococcus agalactiae* causing hemorrhage, pop-eye. Cinnamon bark extract was added to feed with the doses of 10; 20 and 40 g/kg feed. Healthy tilapia fingerlings with the weight 3.8 ± 0.1 g were injected intraperitoneally with a dose of 0.1 mL of 1.8×10^4 CFU/mL of *S. agalactiae*. The results showed that, after 14 follow-up days, the cumulative mortality rate recorded in the trial of continuing to supplement with cinnamon bark extract dose of 20 g/kg was the lowest (37.8). The addition of cinnamon bark extract at concentrations of 20 and 40 g/kg to the feed for 28 days improved some immune parameters and enhanced disease resistance caused by *S. agalactiae*. at the same time did not affect the intestinal histology of fish. These results proved that cinnamon bark extract can be considered as a potential herbal extract for enhancing the immune health of tilapia by pathogenic bacteria *S. agalactiae*.

Keywords: Tilapia (*Oreochromis* spp.), cinnamon bark extract, *Streptococcus agalactiae*, immunological, intestinal histology

Ngày nhận bài: 08/5/2023
Ngày phản biện: 19/5/2023
Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Anh
Ngày duyệt đăng: 28/6/2023

GONADOTROPIN MÀNG ĐỆM NGỰA TRONG CÔNG NGHỆ HỖ TRỢ SINH SẢN ĐỘNG VẬT

Nguyễn Thị Tho[1,2], Hoàng Nữ Thùy Liên[1],
Nguyễn Văn Lượng[1], Nguyễn Thị Mộng Điệp[1,*]

TÓM TẮT

Gonadotropin màng đệm ngựa hay eCG là một hormone quan trọng được chiết xuất từ máu của những con ngựa cái mang thai trong khoảng từ ngày thứ 40 đến ngày thứ 120 của thai kỳ. Hormone này thường được sử dụng trong công nghệ hỗ trợ sinh sản của động vật có vú như lợn, bò sữa, cừu, bò, dê... Tuy nhiên, có nhiều vấn đề liên quan đến bảo vệ quyền lợi động vật nếu quá nhiều máu của ngựa cái mang thai được thu thập cùng một lúc hoặc trong quá trình thu thập lặp đi lặp lại hoặc nếu ngựa cái không được quản lý tốt. Điều này có thể dẫn đến thương tích nghiêm trọng và thậm chí tử vong khi ngựa cái được đưa đến để lấy máu. Mặc dù các giải pháp thay thế đã được tìm kiếm, nhưng hiện nay không có sự thay thế hiệu quả nào, tự nhiên hoặc tổng hợp cho eCG. Bài báo này sẽ tóm tắt những kiến thức cơ bản về cấu trúc và hoạt tính sinh học của eCG, nghiên cứu về sản xuất eCG tái tổ hợp trong những năm gần đây và ứng dụng của eCG trong hỗ trợ sinh sản ở động vật.

Từ khóa: Gonadotropin màng đệm ngựa, công nghệ hỗ trợ sinh sản, động vật có vú

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cải thiện và kiểm soát khả năng sinh sản là vấn đề quan trọng đối với con người (điều trị vô sinh và tránh thai) và các loài động vật trang trại (cải thiện hiệu quả sinh sản). Hormone gonadotropins kích thích các hoạt động nội tiết và phát sinh giao tử của

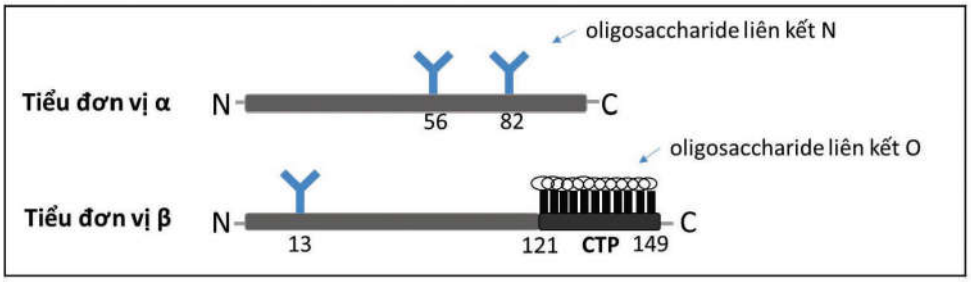
[1] Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
[2] Trường Đại học Quy Nhơn
* Tác giả liên hệ, e-mail: nguyenthimongdiep@qnu.edu.vn

tuyến sinh dục (buồng trứng hoặc tinh hoàn). Hai loại được tiết ra bởi tuyến yên ở động vật có xương sống là hormone kích thích nang trứng (Follicle-stimulating hormone, FSH) và hormone tạo hoàng thể (Luteinizing hormone, LH). Ở động vật linh trưởng và ngựa, một loại gonadotropin khác được tiết ra bởi nhau thai là gonadotropin màng đệm (Chorionic gonadotropin, CG). Các gonadotropins ngoại sinh được sử dụng trong điều trị vô sinh theo Anderson *et al.* (2018) và Lunenfeld *et al.* (2019), và gonadotropins nội sinh là mục tiêu để tránh thai (Talwar *et al.*, 2015). Gonadotropin cũng có tầm quan trọng hàng đầu trong việc kiểm soát hiệu quả sinh sản (khả năng sinh sản) ở vật nuôi (Sousa *et al.*, 2016). Do đó, những phân tử này là dược phẩm quan trọng để quản lý quá trình sinh sản ở người và động vật.

Gonadotropin màng đệm ngựa (Equine chorionic gonadotropin, eCG) thuộc nhóm hormone glycoprotein, và đã được phát hiện cách đây 95 năm. Hormone này được sản xuất bởi các hợp bào nuôi (syncytiotrophoblast) của các cốc nội mạc tử cung ở ngựa cái đang mang thai trong thời kỳ đầu tiên của thai kỳ (khoảng ngày thứ 36 đến 100) (Murphy and Martinuk, 1991). Đầu tiên, các tế bào nguyên bào nuôi ngựa, ở màng đệm của phôi, kết nối và xâm nhập vào biểu mô tử cung vào khoảng ngày thứ 36 của thai kỳ để tạo hình các cốc nội mạc tử cung (Moor *et al.*, 1975). Tiếp theo, những cốc nội mạc tử cung này có cấu trúc hoàn chỉnh vào khoảng ngày thứ 50 đến 60 của thai kỳ. Cuối cùng, vào khoảng ngày thứ 70 đến 80 của thai kỳ, các cấu trúc này bị thoái hóa (Murphy & Martinuk, 1991).

II. CẤU TRÚC CỦA ECG

eCG có cấu trúc dị hợp tử gồm một tiểu đơn vị α bao gồm 96 axit amin và một tiểu đơn vị β bao gồm 149 axit amin và được glycosyl hóa. Ở mỗi loài, các tiểu đơn vị α giống nhau giữa CG và các hormone LH, FSH. Trong khi đó, tiểu đơn vị β ở các hormone này khác nhau và điều này quyết định đến sự khác biệt trong đặc tính sinh học của chúng. eCG chứa hai loại oligosaccharide, liên kết N và liên kết O. Các oligosaccharide liên kết O được liên kết cộng hóa trị với nhóm OH của serine (Ser) hoặc threonine (Thr), trong khi liên kết N được liên kết cộng hóa trị với nhóm amide của Asparagine (Asn). eCG có hai vị trí glycosyl hóa liên kết N tại Asn^{56} và Asn^{82} trên tiểu đơn vị α, nhưng chỉ có một vị trí glycosyl hóa liên kết N tại Asn^{13} trên tiểu đơn vị β. Ngoài N-glycans, tiểu đơn vị β còn có một peptide mở rộng tại đầu C-terminal (Carboxyl-terminal peptide, CTP) với 28 axit amin, do đó, chiều dài của tiểu đơn vị β được kéo dài từ 121 đến 149 axit amin, có từ 10 đến 12 vị trí được glycosyl hóa liên kết O trên phần mở rộng CTP của tiểu đơn vị β của eCG (Matsui *et al.*, 1994; Matsui *et al.*, 1991) (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc hormone gonadotropin màng đệm ngựa eCG

Chuỗi polysaccharide đóng một vai trò quan trọng trong hoạt động sinh học của gonadotropin vì những chuỗi này có ảnh hưởng đến cấu trúc của các tiểu đơn vị, sự bài tiết và thời gian bán hủy của chúng (Matsui *et al.*, 1994; Legardinier *et al.*, 2005). Tuy nhiên, oligosaccharide liên kết O không trực tiếp đóng vai trò kết nối hormone với thụ thể của nó, chỉ có oligosaccharide liên kết N là cần thiết cho quá trình truyền tín hiệu eCG. eCG có hàm lượng carbohydrate cao nhất (hơn 40%) trong số tất cả các hormone glycoprotein đã biết, mang lại cho nó thời gian bán hủy vượt trội so với các hormone khác.

III. HOẠT ĐỘNG SINH HỌC VÀ CHỨC NĂNG CỦA ECG

eCG là một biến thể của hormone hoàng thể ngựa (eLH), được glycosyl hóa một cách khác biệt bởi các tế bào nguyên bào nuôi ngựa. Điểm đặc biệt của eCG là nó thể hiện hoạt động kép FSH

và LH ở các loài không phải ngựa (Combarnous *et al.*, 1978). Vì vậy đây là một mô hình rất thú vị để nghiên cứu các mối quan hệ cấu trúc và chức năng của gonadotropin và các thụ thể của chúng (Combarnous *et al.*, 1978; Combarnous *et al.*, 1981; Combarnous *et al.*, 1983).

Mặc dù eCG và eLH có cấu trúc protein giống nhau nhưng hoạt tính sinh học của eCG mạnh hơn eLH do trọng lượng phân tử cao hơn và do đó thời gian bán hủy trong tuần hoàn máu dài hơn. Theo trọng lượng, eCG chứa 40% carbohydrate, trong khi con số đó chỉ là 30% ở eLH (Legardinier *et al.* 2005). Một trong những đặc điểm của eCG là thời gian bán hủy dài: 5 giờ ở chuột, 21 giờ ở cừu, 45,6 giờ ở bò (Murphy, 2012). Vai trò quan trọng nhất của eCG ở ngựa cái là liên kết với các thụ thể LH trong thể vàng để duy trì thai kỳ trong thời kỳ đầu của thai kỳ (Saint-Dizier *et al.*, 2004). Vào khoảng tuần thứ 5 của thai kỳ, các tiểu thể phụ xuất hiện trong buồng trứng ngựa cái. Lúc này, eCG được tiết ra bởi các cốc nội mạc tử cung nhau thai để kích thích các thụ thể LH này.

Trong công nghệ hỗ trợ sinh sản ở động vật, eCG (PMSG) được sử dụng nhiều để phát triển của nang trứng. Nhóm nghiên cứu của Son *et al.*, 2022 đã điều tra tác động kích thích tối ưu để cải thiện quá trình sản xuất phôi Bò Holstein trong ống nghiệm bằng một mũi tiêm eCG (2500 IU) vào ngày 14 của chu kỳ động dục tại các Tiểu vương quốc Ả rập Thống Nhất, nơi có nhiệt độ cao. Kết quả thu được số lượng nang trứng có đường kính trên 6 mm và số lượng phức hợp cumulus-noãn bào thu được ở nhóm siêu kích thích cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng. Hơn nữa, tốc độ trưởng thành ở nhóm siêu kích thích cao hơn so với nhóm đối chứng. Tỷ lệ phân cắt và hình thành phôi nang từ phôi nhân bản vô tính được tạo ra bằng cách chuyển nhân tế bào soma sử dụng tế bào trứng trưởng thành ở nhóm siêu kích thích cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng (Son *et al.*, 2022). Một nghiên cứu khác trên dê Angora cho thấy liều tiêm eCG từ 400 đến 500 IU làm thay đổi thời điểm rụng trứng, rút ngắn thời gian của các hành vi động dục để thụ tinh nhân tạo (Tirpan *et al.*, 2019). Điều trị eCG và kháng huyết thanh eCG trên bò Hereford tại Canada tạo ra phản ứng siêu rụng trứng cao hơn và sẽ dẫn đến số lượng nang hoàng thể cao hơn (Gonzalez *et al.*, 1994). Tại Việt Nam cũng đã có những nghiên cứu sử dụng kích dục tố PMSG và hCG để gây động dục đồng loạt trên thỏ (Phan Ngọc Minh *và cs.*, 2018), trên cầy hương (Nguyễn Thị Thu Hiền *và cs.*, 2021)

IV. GONADOTROPIN CHORIONIC NGỰA TÁI TỔ HỢP

Vì lý do vệ sinh và đạo đức, việc sử dụng gonadotropins tự nhiên để điều trị vô sinh ở người hoặc kiểm soát sinh sản ở động vật ngày càng trở nên khó khăn hơn. Do đó, bắt buộc phải nắm vững việc sản xuất và sử dụng các gonadotropin tái tổ hợp cho những mục đích sử dụng này. Ở động vật trang trại (gia súc, lợn, cừu, dê, v.v.), hormone có hoạt tính FSH được sử dụng để tăng số lượng tế bào trứng rụng và có thể tăng số lượng phôi được thu thập. Do đó, sự có mặt của các chế phẩm eCG hoặc FSH có tác dụng kéo dài là rất quan trọng để thúc đẩy quá trình hình thành nang trứng một cách hiệu quả.

Tiểu đơn vị α của eCG có 2 oligosaccharide liên kết N, trong khi tiểu đơn vị β chỉ có 1 oligosaccharide liên kết N và một peptit mở rộng tại đầu C-terminal (Carboxyl-terminal peptide, CTP) chứa 12 vị trí liên kết O trong đó 10 đến 12 vị trí được glycosyl hóa hiệu quả (Matsui *et al.*, 1994; Matsui *et al.*, 1991). Vì vậy, để thay đổi hoạt tính sinh học của eCG trong cấu trúc tái tổ hợp, hai cách tiếp cận có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc đồng thời: 1) Điều chỉnh một hoặc nhiều axit amin liên kết với chuỗi cacbohydrat hoặc sửa đổi trực tiếp CTP; 2) Sử dụng CTP làm trình liên kết để tạo eCG chuỗi đơn hoặc để kết nối với các phân tử gonadotropin khác như FSH (Garcia-Campayo & Boime, 2001).

Một số nghiên cứu đã xây dựng một cấu trúc eCG βα chuỗi đơn (sc-eCG) bằng cách sử dụng trực tiếp β-CTP làm trình liên kết với tiểu đơn vị α. Do đó, không làm thay đổi trình tự axit amin eCG tự nhiên, ngoại trừ liên kết mới giữa đầu C-terminal β-CTP và đầu cuối N-terminal α. Do đó, phân tử này họ gọi là eCG chuỗi đơn kiểu hoang dã (sc-eCG wild-type) (Park *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2017), (Byambaragchaa *et al.*, 2018; Min *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2020). Bởi vì cấu trúc của eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã này không bị thay đổi so với cấu trúc eCG tự nhiên nên nó đã giữ lại hầu hết các hoạt động sinh học của PMSG. Ví dụ, sc-eCG có các đặc tính hoàn chỉnh của LH và FSH ở các loài không phải ngựa, và chỉ có các đặc tính của

LH ở ngựa cái trong xét nghiệm sinh học *in vitro* (Park *et al.*, 2009). Trong dòng tế bào PathHunter Parental, khả năng liên kết của sc-eCG với các thụ thể được bảo toàn theo Lee *et al.* (2017), và hoạt động giống LH của nó tương tự như của PMSG (Byambaragchaa *et al.*, 2018; Min *et al.*, 2004). sc-eCG cũng có thời gian bán hủy và hoạt tính kích thích rụng trứng giống như PMSG (Park *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2017; Byambaragchaa *et al.*, 2018; Min *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2020). Tuy nhiên, việc thay thế axit amin Asn^{56} và loại bỏ dư lượng oligosaccharide của CTP dẫn đến tỷ lệ rụng trứng thấp hơn, mặc dù có nhiều hơn 18% tế bào trứng ở nhóm chuột được điều trị bằng sc-eCG so với nhóm chuột được điều trị bằng PMSG (Min *et al.*, 2019).

Về hoạt động giống LH của eCG, cần chỉ ra rằng chuỗi polypeptit α và β được mã hóa bởi các gen α và β giống như eLH. eCG và eLH tự nhiên chia sẻ cấu trúc protein giống hệt nhau, nhưng phần lớn khác nhau về cấu trúc glycan của chúng. Sự khác biệt này là do các tế bào sản xuất tương ứng của chúng: tế bào tuyến sinh dục của tuyến yên sản xuất eLH và nguyên bào hợp bào nhau thai sản xuất eCG/PMSG. Do đó, các hormone tái tổ hợp, được sản xuất bởi các tế bào Eukaryote như CHO, HEK, Sf9 hoặc các loại khác, giống với các hormone tự nhiên về cấu trúc protein nhưng khác biệt đáng kể so với cả eLH hoặc eCG về cấu trúc glycan của chúng.

Để kiểm tra vai trò của chuỗi oligosaccharide trong eCG, các oligosaccharide liên kết N đã được loại bỏ ở vị trí Asn^{56} và Asn^{82} trên tiểu đơn vị α, và Asn^{13} trên tiểu đơn vị β. Khi Asn^{56} được thay thế, hoạt tính giống LH của eCG đột biến giảm đáng kể (Min *et al.*, 1996). Kết quả tương tự cũng thu được khi oligosaccharide liên kết N của eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã bị loại bỏ ở Asn^{56} (Min *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2021). Do đó, oligosaccharide liên kết N ở Asn^{56} đóng một vai trò quan trọng trong hoạt động giống LH của eCG. Ngược lại, khi CTP của tiểu đơn vị β bị xóa trong eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã, hoạt tính giống LH của eCG không thay đổi (Min *et al.*, 1996). Trong một nghiên cứu khác, oligosaccharide liên kết O ở CTP của tiểu đơn vị β của eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã đã bị xóa, cho thấy hoạt động giống LH của thể đột biến chỉ bị giảm nhẹ (Min *et al.,* 2004). Điều này chỉ ra rằng oligosaccharide liên kết O ở CTP của tiểu đơn vị β không ảnh hưởng đến hoạt động LH của eCG.

Trong một thử nghiệm khác, polyhistidine được gắn vào đầu cuối C- hoặc N- ở các tiểu đơn vị β và α của eCG kiểu hoang dã để tạo ra các đột biến dị số His-α × β, α-His × β, α × β-His và α × His-β. Khi so sánh với eCG kiểu hoang dã, His-α × β và α × β-His cho thấy hoạt tính LH *in vitro* đầy đủ, trong khi hoạt tính của α-His × β và α × His-β giảm từ 30 đến 50% (Legardinier *et al.*, 2008). Để xác định sự truyền tín hiệu nội bào tới cAMP thông qua các thụ thể LH, các gốc axit amin 102 - 104 của tiểu đơn vị β của eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã đã được thay thế. Giá trị Rmax của eCG đột biến ở axit amin 104 là thấp nhất, vì vậy axit amin này đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình truyền tín hiệu nội bào thành cAMP thông qua các thụ thể LH (Byambaragchaa *et al.*, 2021).

Hoạt động giống FSH của eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã bị gián đoạn khi các axit amin 94 - 96 của tiểu đơn vị β bị sửa đổi theo Park *et al.* (2010) phù hợp với mô hình "tính đặc hiệu âm" (Combarnous *et al.*, 1981; Combarnous, 1992). Những nghiên cứu này cho thấy rằng các axit amin 102 - 104 và 94 - 96 trên tiểu đơn vị β đóng một vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu đến các thụ thể FSH. Để kiểm tra khả năng truyền tín hiệu nội bào của T-eCG thành cAMP thông qua thụ thể FSH, một nghiên cứu thay thế các axit amin 102 - 104 đã được thực hiện. Kết quả cho thấy giá trị EC_{50} của các đột biến eCG được đo trong các tế bào biểu hiện thụ thể FSH chỉ bằng 2,5 - 20% so với eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã (Galet *et al.*, 2009). Kết quả tương tự cũng thu được khi thay đổi axit amin 104 - 109 trên tiểu đơn vị β. Tỷ lệ của các hoạt động giống FSH và LH tương ứng là khoảng 25% và 100% so với tỷ lệ của các hoạt động giống eCG k eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã (Byambaragchaa *et al.*, 2021). Những kết quả này cho thấy rằng các axit amin 102-104 và 104-109 của tiểu đơn vị β ảnh hưởng gián tiếp đến hoạt động giống FSH của eCG nhiều hơn hoạt động giống LH.

Các đột biến eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã ở axit amin Asn^{56} được thay thế bằng Gln và polyoligosaccharid liên kết O bị xóa ở CTP trên tiểu đơn vị β dẫn đến giảm nhanh chóng, hoặc thậm chí không có sự truyền tín hiệu đến các thụ thể LH- và FSH- (Byambaragchaa *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2017). Do đó, các vị trí liên kết N và O tại Asn^{56} và CTP là cần thiết cho việc truyền tín hiệu đến các

thụ thể. Để kiểm tra chức năng sinh học của các axit amin đầu tận cùng COOH trong tiểu đơn vị α liên quan đến quá trình truyền tín hiệu, một số axit amin như Lys^{95} hoặc His^{93} đã bị xóa. Các phát hiện chỉ ra rằng những đột biến này không có hoạt động giống LH hoặc FSH. Điều này chứng tỏ rằng các axit amin Lys^{95} và His^{93} nói riêng và các axit amin đầu tận cùng COOH trong tiểu đơn vị α nói chung là cực kỳ quan trọng trong tương tác với các thụ thể LH- và FSH- (Jeoung *et al.*, 2010).

Khi sản xuất protein tái tổ hợp từ dòng tế bào CHO-K1 chứa gen đột biến eCG, axit amin Asn^{56} của N-eCG bị thay đổi làm thay đổi không đáng kể quá trình sản xuất protein tái tổ hợp (Min *et al.*, 1996). Kết quả tương tự cũng được tiết lộ trong các nghiên cứu khác đã xóa các chuỗi oligosaccharide ở Asn^{56} và CTP của eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã. Tuy nhiên, sự thay thế Asn^{82} trên tiểu đơn vị α và Asn^{13} trên tiểu đơn vị β dẫn đến giảm đáng kể sự bài tiết hormone này vào môi trường nuôi cấy. Những kết quả này cho thấy rằng oligosaccharide liên kết N ở Asn^{13} và Asn^{82} có chức năng quan trọng trong việc tiết protein của dòng tế bào CHO-K1 (Min *et al.*, 2019). Trong một nghiên cứu khác, các vị trí glycosyl hóa liên kết O tại CTP trong sc-eCG đã bị loại bỏ, khiến quá trình sản xuất protein bị chậm trong vài ngày sau khi chuyển giao dòng tế bào CHO-S. Do đó, oligosaccharide liên kết O của CTP là cần thiết để tạo ra eCG glyprotein (Lee *et al.*, 2021; Byambaragchaa *et al.*, 2021). Khi các axit amin 94 - 96 của tiểu đơn vị β trong eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã bị thay đổi, lượng protein tái tổ hợp được tạo ra và chu kỳ bán hủy của các eCG đột biến này tương tự như eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã (Park *et al.*, 2010). Tuy nhiên, sự thay đổi các axit amin 102 - 104 dẫn đến giảm đáng kể số lượng sc-eCG được tiết ra (Byambaragchaa *et al.*, 2021). Trong một nghiên cứu khác, khi polyhistidine được thêm vào đầu cuối C- hoặc N- của tiểu đơn vị α hoặc β trong eCG tái tổ hợp, hàm lượng eCG đột biến được tạo ra trong hệ thống baculovirus-Sf9 đã tăng gấp ba lần so với eCG tái tổ hợp chuỗi đơn kiểu hoang dã (Legardinier *et al.*, 2008).

IV. KẾT LUẬN

Bài báo đã tổng hợp những kiến thức cơ bản liên quan đến cấu trúc, hoạt tính sinh học của eCG (PMSG), vai trò của eCG trong công nghệ hỗ trợ sinh sản động vật, và nghiên cứu về sản xuất eCG tái tổ hợp trong những năm gần đây. Bài báo đã cho thấy, mặc dù có nhiều nghiên cứu về sản xuất eCG tái tổ hợp để giải quyết tình trạng thiếu eCG tự nhiên sẵn có trên thị trường, nhưng vẫn chưa có sản phẩm tái tổ hợp thương mại nào có thể đạt hiệu quả tối ưu ở động vật có vú. Do đó, cần có những nghiên cứu sâu hơn để mở rộng kiến thức trong lĩnh vực này nhằm phát triển một eCG tái tổ hợp mới hiệu quả là rất cần thiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Phương Thảo, Võ Lê Ngọc Trâm, Nguyễn Thanh Bình, 2021. Ảnh hưởng của pmsg và hcg lên sự thay đổi estradiol và progesterone của cầy vòi hương (*Paradoxurus hermaphroditus*). Tạp chí Công nghệ Sinh học, 19(1): 85-94.

Phan Ngọc Minh, 2018. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm PMSG, HCG và công nghệ thụ tinh nhân tạo để nâng cao hiệu quả chăn nuôi thỏ sinh sản trên địa bàn Hà Nội. Đề tài KHCN cấp Thành phố, Mã số 01C-05/04-2016-3.

Anderson, R.C., Newton, C.L., Anderson, R.A., Millar, R.P., 2018. Gonadotropins and Their Analogs: Current and Potential Clinical Applications. *Endocrine Reviews*. 39 (6): 911-937.

Byambaragchaa, M., Choi, S.H., Joo, H.E., Kim, S.G., Kim, Y.J., Park, G.E., Kang, M.H., Min, K.S., 2021. Specific Biological Activity of Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Glycosylation Sites in Cells Expressing Equine Luteinizing Hormone/CG (eLH/CG) Receptor. *Development and Reproduction*, 25 (4): 199-211.

Byambaragchaa, M., Lee, S.Y., Kim, D.J., Kang, M.H., Min, K.S., 2018. Signal Transduction of Eel Luteinizing Hormone Receptor (eelLHR) and Follicle Stimulating Hormone Receptor (eelFSHR) by Recombinant Equine Chorionic Gonadotropin (rec-eCG) and Native eCG. *Development and Reproduction*, 22 (1): 55-64.

Byambaragchaa, M., Park, A., Gil, S.J., Lee, H.W., Ko, Y.J., Choi, S.H., Kang, M.H., Min, K.S., 2021. Luteinizing hormone-like and follicle-stimulating hormone-like activities of equine chorionic gonadotropin beta-subunit mutants in cells expressing rat luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor and rat follicle-stimulating hormone receptor. *Animal Cells and Systems (Seoul),* 25 (3): 171-181.

Combarnous, Y., 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews*, 13 (4): 670-691.

Combarnous, Y., Guillou, F., 1983. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 755 (2): 229-236.

Combarnous, Y., Hennen, G., Ketelslegers, J.M., 1978. Pregnant mare serum gonadotropin exhibits higher affinity for lutropin than for follitropin receptors of porcine testis. *FEBS Letters*, 90 (1): 65-68.

Combarnous, Y., Salesse, R., Garnier, J., 1981. Physico-chemical properties of pregnant mare serum gonadotropin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 667 (2): 267-276.

Galet, C., Guillou, F., Foulon-Gauze, F., Combarnous, Y., Chopineau, M., 2009. The beta 104-109 sequence is essential for the secretion of correctly folded single-chain beta alpha horse LH/CG and for its FSH activity. *Journal of Endocrinology*, 203 (1): 167-174.

Garcia-Campayo, V., Boime, I., 2001. Novel recombinant gonadotropins", *Trends Endocrinol Metab*, 12 (2): 72-77.

Gonzalez, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., 1994. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *The Canadian Veterinary Journal*, 35 (3): 158-162.

Jeoung, Y.H., Yoon, J.T., Min, K.S., 2010. Biological Functions of the COOH-Terminal Amino Acids of the α-Subunit of Tethered Equine Chorionic Gonadotropin. *Reproductive and Developmental Biology*, 34 (1): 47-53.

Lee, S.Y., Byambaragchaa, M., Choi, S.H., Kang, H.J., Kang, M.H., Min, K.S., 2021. Roles of N-linked and O-linked glycosylation sites in the activity of equine chorionic gonadotropin in cells expressing rat luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor and follicle-stimulating hormone receptor. *BMC Biotechnology*, 21 (1): 52.

Lee, S.Y., Byambaragchaa, M., Kim, J.S., Seong, H.K., Kang, M.H., Min, K.S., 2017. Biochemical characterization of recombinant equine chorionic gonadotropin (rec-eCG), using CHO cells and pathHunter parental cells expressing equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors (eLH/CGR). *Journal of Life Science*, 27 (8): 864-872.

Legardinier, S., Cahoreau, C., Klett, D., Combarnous, Y., 2005. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. *Reproduction Nutrition Development*, 45 (3): 255-259.

Legardinier, S., Poirier, J.C., Klett, D., Combarnous, Y., Cahoreau, C., 2008. Stability and biological activities of heterodimeric and single-chain equine LH/chorionic gonadotropin variants. *The Journal of Molecular Endocrinology*, 40 (4): 185-198.

Lunenfeld, B., Bilger, W., Longobardi, S., Alam, V., D'Hooghe, T., Sunkara, S.K., 2019. The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 429.

Matsui, T., Mizuochi, T., Titani, K., Okinaga, T., Hoshi, M., Bousfield, G.R., Sugino, H., Ward, D.N., 1994. Structural analysis of N-linked oligosaccharides of equine chorionic gonadotropin and lutropin beta-subunits. *Biochemistry*, 33 (47): 14039-14048.

Matsui, T., Sugino, H., Miura, M., Bousfield, G.R., Ward, D.N., Titani, K., Mizuochi, T., 1991. Beta-subunits of equine chorionic gonadotropin and lutenizing hormone with an identical amino acid sequence have different asparagine-linked oligosaccharide chains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174 (2): 940-945.

Min, K.S., Hattori, N., Aikawa, J., Shiota, K., Ogawa, T., 1996. Site-directed mutagenesis of recombinant equine chorionic gonadotropin/luteinizing hormone: differential role of oligosaccharides in luteinizing hormone- and follicle-stimulating hormone-like activities. *Endocrine Journal*, 43 (5): 585-593.

Min, K.S., Hiyama, T., Seong, H.H., Hattori, N., Tanaka, S., Shiota, K., 2004. Biological activities of tethered equine chorionic gonadotropin (eCG) and its deglycosylated mutants. *Journal of Development and Reproduction*, 50 (3): 297-304.

Min, K.S., Park, J.J., Byambaragchaa, M., Kang, M.H., 2019. Characterization of tethered equine chorionic gonadotropin and its deglycosylated mutants by ovulation stimulation in mice. *BMC Biotechnology*, 19 (1): 60.

Min, K.S., Park, J.J., Lee, S.Y., Byambaragchaa, M., Kang, M.H., 2020. Comparative gene expression profiling of mouse ovaries upon stimulation with natural equine chorionic gonadotropin (N-eCG) and tethered recombinant-eCG (R-eCG). *BMC Biotechnology*, 20 (1): 59.

Moor, R.M., Allen, W.R., Hamilton, D.W., 1975. Origin and histogenesis of equine endometrial cups. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 23: 391-395.

Murphy, B.D., 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9 (3): 223-230.

Murphy, B.D., Martinuk, S.D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12 (1): 27-44.

Park, J.J., JarGal, N., Yoon, J.T., Min, K.S., 2009. Function of the tethered rec-eCG in rat and equine

receptors. *Reproductive and Developmental Biology*, 33 (4): 229-236.

Park, J.J., JarGal, N., Yoon, J-T., Min, K.S., 2010. β-Subunit 94~96 Residues of Tethered Recombinant Equine Chorionic Gonadotropin are Important Sites for Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone like Activities. *Reproductive and Developmental Biology*, 34 (1): 33-40.

Park, J.J., Seong, H.K., Kim, J.S., Munkhzaya, B., Kang, M.H., Min, K.S., 2017. Internalization of Rat FSH and LH/CG Receptors by rec-eCG in CHO-K1 Cells. *Development and Reproduction*, 21 (2): 111-120.

Saint-Dizier, M., Chopineau, M., Dupont, J., Combarnous, Y., 2004. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. *Reproduction*, 128 (2): 219-228.

Son, Y.B., Jeong, Y.I., Hossein, M.S., Yu, X., Olsson, P.O., Kang, M., Kim, H., Bae, Y., Tinson, A., Singh, K.K., Rajesh, S., Noura, A.S., Hwang, W.S., 2022. Influence of PMSG on superstimulation and embryo development following somatic cell nuclear transfer in Holstein cows in the United Arab Emirates, *Frontiers in veterinary science*, 9: 895325.

Sousa, L.M., Mendes, G.P., Campos, D.B., Baruselli, P.S., Papa, P.C., 2016. *Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum.* PLoS One, In Press. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5053489/.

Talwar, G.P., Gupta, J.C., Rulli, S.B., Sharma, R.S., Nand, K.N., Bandivdekar, A.H., Atrey, N., Singh, P., 2015. Advances in development of a contraceptive vaccine against human chorionic gonadotropin. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15 (8): 1183-1190.

Tirpan, M.B., Tekin, K., Cil, B., Alemdar, H., Inanc, M.E., Olgac, K.T., Stelletta, C., Daskin, A., 2019. The effects of different PMSG doses on estrus behavior and pregnancy rate in Angora goats. *Animal*, 13 (3): 564-569.

Equine chorionic gonadotropins in animal reproductive technology

Nguyen Thi Tho, Hoang Nu Thuy Lien,
Nguyen Van Luong, Nguyen Thi Mong Diep

Abstract

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is an important hormone extracted from the blood of brood mares between the 40th and 120th day of pregnancy. This hormone is often used as part of reproductive techniques for mammals such as pigs, cows, sheep, goats, etc. However, many ethical and animal welfare issues surround blood collection, as it can lead to serious injury, or even death, if carried out very incorrectly. They relate to how much blood can be collected from mares, how often it can be done, and how the animals should be managed throughout this process. Although alternatives have been researched, there are currently no effective substitutes, natural or synthetic for eCG. This paper summarizes the basic knowledge of the structure and biology of eCG, the progress made regarding the production of recombinant eCG in recent years and the application of eCG in assisted reproduction in animals.

Keywords: Equine chorionic gonadotropin, reproductive techniques, mammals

Ngày nhận bài: 26/5/2023
Ngày phản biện: 06/6/2023
Người phản biện: TS. Nguyễn Khánh Vân
Ngày duyệt đăng: 28/6/2023