

川金丝猴粪样内皮质醇激素保存时效的研究

黄英¹ 胡德夫^{1,2} 金学林³ 张志翔^{1,2}

(1 北京林业大学生物科学与技术学院 2 国家林业局自然保护区研究中心

3 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心)

摘要:野生动物新鲜粪便内激素的测定是探查动物生理状态的非损伤性方法,但新鲜粪便的保存时效因物种等而异。因此,掌握目标物种的新鲜粪便内激素的保存时效是应用该方法的前提。采取 95% 乙醇(以下简称乙醇)、低温(4 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ (以下简称低温)方法保存川金丝猴的新鲜粪样,设保存 0(标准参照)、5、6、7、8、10、20、30 d 8 个处理。在各处理的保存时间段到期时,运用 RIA 法测定粪样内皮质醇激素的含量。结果显示:低温条件下,雌性川金丝猴粪样内皮质醇含量在保存 6 d 时的平均值显著低于标准参照值($P < 0.05$),因此可以稳定保存 5 d;雄性川金丝猴粪样内皮质醇含量在保存 6 d 时的平均值显著高于标准参照值($P < 0.05$),因此可以稳定保存 5 d。针对川金丝猴生存环境的特点,并据此设定该物种新鲜粪便保存方法和低温条件,所获得的测定结果是该物种野外粪样采集及保存的重要依据,可应用于该物种的野外相关研究。

关键词:川金丝猴;新鲜粪便;皮质醇;保存时效

中图分类号:Q484 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)04-0196-05

HUANG Ying¹; HU De-fu^{1,2}; JIN Xue-lin³; ZHANG Zhi-xiang^{1,2}. **Effective storage period of cortisol in fresh feces of the Sichuan snub-nosed monkey.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32 (4) 196-200 [Ch, 36 ref.]

1 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 Research Center of Nature Reserve, State Forestry Administration, Beijing, 100083, P. R. China;

3 Shaanxi Wild Animal Rescue and Research Center, Zhouzhi, 710402, P. R. China.

The determination of hormones in fresh feces is a non-destructive method to detect the physiological status of wildlife; however, the effective storage period of fresh feces varies among different animal species. Therefore, understanding the effective storage period of physiological hormones in fresh feces for targeted species is a precondition to use this method. To determine the effective storage period of cortisol in fresh feces of the Sichuan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellanae*), we analyzed the content of cortisol with a RIA method under storage conditions of 95% ethanol at low temperature (4 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ after eight storage periods, i. e. 0 (control), 5, 6, 7, 8, 10, 20 and 30 days. The results showed that after a storage period of six days, the content of female fecal cortisol was significantly lower than that of control ($P < 0.05$), while those of male fecal cortisol was significantly larger than control ($P < 0.05$), indicating that the safe storage period for cortisol is 5 days or less. The experimental conditions were established according to the habitat of species, so the results can be an important reference for the collection and storage of fresh feces and a basis for related researches.

Key words Sichuan snub-nosed monkey; fresh feces; cortisol; effective storage period

收稿日期:2009-06-29

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2008BADB0B04)、国家林业局自然保护区研究中心资助项目(4608101)。

第一作者:黄英,博士。主要研究方向:动物生理学、生态学。电话:010-62338104 Email: hying-ff@163.com 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:胡德夫,教授,博士生导师。主要研究方向:保护生物学。电话:010-62338104 Email: hudf@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellanae*) 是我国特有的灵长类物种,仅分布于湖北、四川、陕西及甘肃省亚热带山地森林环境,列为国家 I 级重点保护物种。迄今有关该物种营养^[1]、繁殖^[2]及疾病^[3]等生理学研究多来自圈养个体^[4-9],野生个体的生理学研究报道较少^[10-14]。究其原因,研究者难以获取自由生活的川金丝猴的组织样本是制约该物种生理研究的主要因素。正因为采集自由生活野生动物的血液等研究样本非常困难,加之野生动物的应激水平一般较高,捕捉、保定等方法本身就会导致其生理指标的异常,阻碍了深入开展自由生活野生动物的生理学研究。近年来,通过收集野生动物的粪便、尿液、唾液等排泄物,即非损伤的 (non-invasive) 取样方法,拓展了野生动物生理学的研究途径^[15]。其中,采集动物的新鲜粪便并测定各种生理激素含量成为野生动物生理状态研究的重要途径^[16-20]。

多数哺乳动物糖皮质激素 (glucocorticoid) 的主要生理活性成分是皮质醇 (cortisol)。研究表明,动物对运输^[21]、保定^[22]、麻醉^[23]、捕捉^[24]和过热^[25]等外界刺激均表现出血液中糖皮质激素的急剧升高,因此,糖皮质激素成为探查动物生理应激强度的重要指标^[26-27]。显然,通过采集川金丝猴新鲜粪便并开展其糖皮质激素动态的研究,可以探查野生川金丝猴的应激生理状态,发现各种可能的不利环境因子,为实施该物种的有效保护提供生理学依据。然而限于野外条件的制约,野生动物的新鲜粪便不可能立即得到处理,必须进行一段时间的保存并运输至实验室。已有的研究表明,因物种及保存方法的不同,其粪便内类固醇激素的有效保存时间存在很大差异^[28-29]。因此,针对目标物种开展新鲜粪便内类固醇激素保存时效的研究,无疑是安全、可靠地运用该方法的前提条件。川金丝猴生存于山势陡峭、交通不便的偏僻山地森林环境,如何有效保存新鲜粪便内糖皮质激素,成为研究工作必须首先解决的问题。鉴于此,本研究探讨川金丝猴新鲜粪便内皮质醇的保存方式及保存时效,以期为研究野生环境下该物种的繁殖生理学以及生理生态学提供科学有效的技术保障。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验对象为陕西省珍稀野生动物饲养繁育中心 (以下简称中心) 的笼养川金丝猴。该中心位于陕西省西安市周至县楼观台。本研究共选取 3 雄 2 雌共 5 只成年川金丝猴个体,其基本情况见表 1。

表 1 川金丝猴实验个体的基本信息
Tab. 1 Basic information of the Sichuan snub-nosed monkey individuals in the experiment

姓名	性别	年龄	产地	入中心时间	产仔
小春	♀	10	中心自繁	1998 年 5 月	2
红红	♀	8	太白	2006 年 10 月	0
亮亮	♂	13	太白	1996 年 2 月	2
美美	♂	14	太白	1996 年 4 月	3
岭岭	♂	9	中心自繁	1999 年 4 月	3

1.2 样品采集与保存

粪便样品采集时间为 2008 年 1 月 6—16 日,每日 08:00—18:00,采集新鲜粪样 3~4 次。每次获取新鲜粪便后立即装入塑料密封袋内,作标记并送至该中心实验室,置于冰箱内保存 (-26℃)。

1.3 样品处理

将所采样品按性别分开处理,分别把所有雌、雄个体 10 d 的粪样充分混匀,以消除采样时间及个体间的差异,雌雄各分为 48 小份,每份 5 g。每种性别取其中 6 份样立即冷冻干燥 24 h,抽提皮质醇激素并测定,作为标准参照样。其余 42 份使用 20 mL 95% 的乙醇 (以下简称乙醇) (1 g 粪样:4 mL 乙醇)、低温 ((4±1)℃,以下简称低温) 保存。低温保存设定 5、6、7、8、10、20、30 d 7 个时间段;在每个保存时间段到期时,各取出 6 份进行激素测定。测定前,要先将粪样放置于通风橱内将乙醇充分挥发干净后,再进行冷冻干燥。

1.4 激素提取与测定

激素提取参照 Terio 等^[28]、Khan 等^[29]、王慧平等^[30]方法,采用乙醇加热法进行抽提。具体步骤如下:将 1 g 干粪样及 80% 的乙醇 10 mL 加入离心管中,70℃ 振荡水浴 20 min,冷却至 4℃,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,再将 5 mL 同浓度的乙醇加入离心管,旋涡震荡 1 min,4 000 r/min 再次离心 15 min;合并 2 次上清液,60℃ 水浴蒸干,加入 1.5 mL 甲醇振荡回收,并置于 -26℃ 冰箱中冷冻待测。激素测定使用北京科美东雅有限公司的碘 (¹²⁵I) 类固醇激素放射性免疫分析试剂盒,以 DFM-96 型多管放射免疫计数器计数。

1.5 数据统计与分析

使用 Excel 软件对数据预处理,SPSS13.0 对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及 Dunnet 多重比较。显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$,测定值换算为平均每克干粪所含激素量 (ng/g),表示为平均值 ± 标准误,同时计算皮质醇在各个放置时间的组内变异系数。

2 结果与分析

2.1 雌性粪样皮质醇含量

RIA 法测定结果显示:在 4℃ 低温保存条件下,雌性粪样皮质醇含量在保存 5 d 时同标准参照样 (255.34 ± 14.69) ng/g 相比降至 (221.26 ± 11.39) ng/g;6 d 时皮质醇含量 (124.21 ± 2.74) ng/g,显著低于标准参照样,出现显著性差异 ($F = 76.96$, $df_1 = 1$, $df_2 = 10$, $P < 0.05$);之后皮质醇含量有所上升,10 d 时含量上升至 (240.32 ± 9.08) ng/g,20 d 时含量为 (260.03 ± 9.80) ng/g;30 d 时又降至 (218.8 ± 10.41) ng/g (图 1)。

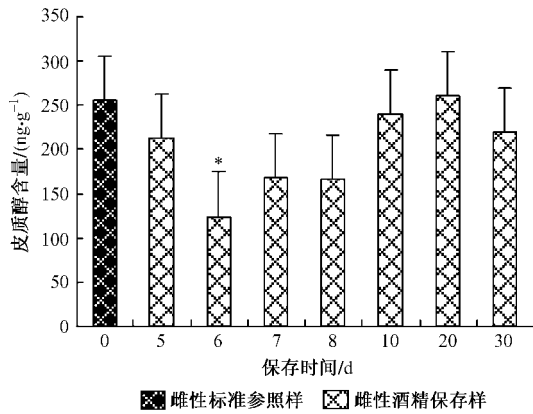


图 1 95% 乙醇低温条件下 ($(4 \pm 1)^\circ\text{C}$) 雌性川金丝猴粪样内皮质醇含量变化

Fig. 1 Content of fecal cortisol stored by ethanol (95%) at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ in female snub-nosed monkey

注: * 表示显著水平 ($\alpha = 0.05$), 图 2 同此。

2.2 雄性粪样皮质醇含量

低温保存雄性粪样皮质醇含量也在 6 d 时出现显著性差异 ($F = 41.05$, $df_1 = 1$, $df_2 = 10$, $P < 0.05$) (图 2), 皮质醇测定值由标准参照的 (119.91 ± 6.28) ng/g 上升至 (198.28 ± 10.49) ng/g; 之后皮

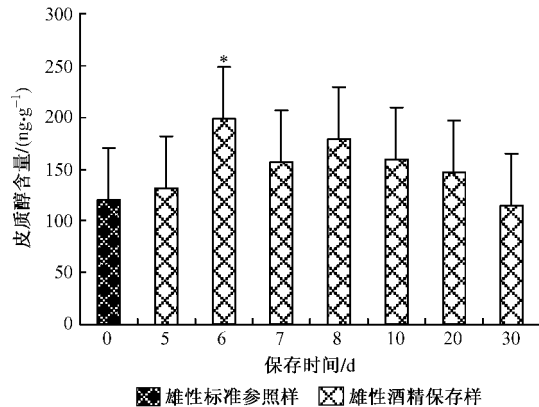


图 2 95% 乙醇低温条件下 ($(4 \pm 1)^\circ\text{C}$) 雄性川金丝猴粪样内皮质醇含量变化

Fig. 2 Content of fecal cortisol stored by ethanol (95%) at $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ in male snub-nosed monkey

质醇含量有所下降,10 d 时降至 (159.04 ± 10.69) ng/g,20 d 时皮质醇含量为 (146.19 ± 16.43) ng/g,30 d 时含量继续下降至 (114.09 ± 5.78) ng/g,接近标准参照值。

2.3 皮质醇的组内变异

表 2 显示,随着川金丝猴粪样保存时间的延续,各时间段皮质醇激素含量的组内变异系数变化不大,样本间的激素含量较为稳定。值得注意的是,即使是平均值出现统计差异的第 6 天,组内变异系数仍然未见较大的波动。第 6 天之后的各时间段内,雄性的皮质醇在第 10 天和第 20 天出现一定的波动,其他数值仍保持稳定。由此说明,导致川金丝猴新鲜粪便内皮质醇激素含量变动的因素可能是相同的且效果趋向一致。

表 2 川金丝猴粪样内皮质醇激素保存各时间段的组内变异系数

Tab. 2 Coefficient of variation of content of fecal cortisol after different storage periods

保存时间/d	皮质醇	
	雄性	雌性
5	0.110	0.115
6	0.130	0.054
7	0.062	0.063
8	0.117	0.115
10	0.165	0.093
20	0.275	0.092
30	0.124	0.117

3 结论与讨论

3.1 川金丝猴新鲜粪便皮质醇激素的保存方法

采用新鲜粪便内糖皮质激素等类固醇激素的非损伤性取样方法拓展了野生动物生理学研究的途径,已得到越来越广泛的应用。迄今,野生动物新鲜粪便的保存方法可归纳为 3 类,即冷冻保存法、有机溶剂保存法和干燥保存法。显然,对于新鲜粪便等生物材料,冷冻保存法是最为理想的粪便保存方法,即将新鲜粪便快速放入液氮罐或冰箱中,可实现较为长久的保存;干燥保存法最大的优点是干燥后样品便于携带,但干燥的最佳时间及温度值尚不确定,因此会导致最终的测定结果出现很大的偏差^[28];限于野外条件,现今使用最多的是以乙醇为主的有机溶剂保存法。

川金丝猴分布于我国湖北、四川、陕西及甘肃省亚热带山地,栖息于海拔 1 400 ~ 3 300 m 的山地森林环境,是除人类以外分布地区海拔最高的灵长类之一。因该物种地处偏僻,道路难行,一般难以短时间内将新鲜粪便样本运输至实验室,加之亚热带森林空气潮湿,新鲜粪便不易保存。显然,冷冻保存法和干燥保存法均不适用于川金丝猴的野外样本保

存,有机溶剂保存法是较好的选择。在野外尽可能获得低温条件是延长新鲜粪便样本保存时间的关键,且温度越低样本越稳定^[31-32],由此获得野外工作时间的便利。我们在神农架和白水江自然保护区实地验证,最热的7月份在海拔1500 m的山地土层30 cm深度,土壤温度均在4℃以下,已明显低于常温。因此,依据川金丝猴栖息地环境的物理特征,将装有该物种新鲜粪便的容器浅埋于30 cm的土层中,以获得不高于4℃低温的保存条件是完全可行的。这也是本研究设置95%乙醇溶剂和(4±1)℃实验条件的立足点。

3.2 川金丝猴粪便在95%乙醇和(4±1)℃条件下的保存时效

研究灵长类时发现,95%的乙醇可以杀死粪便中的细菌并能抑制分解酶,能辅助稳定皮质醇激素^[19,29,31,33-34]。此外,也有研究者使用90%~95%乙醇^[26]或乙醇与叠氮化钠(NaN₃)的混合物保存动物的新鲜粪便,其目的都是有效抑制微生物的活动、酶的活性,以期延长粪便内激素的保存时效。总体而言,现有的研究结果显示,因物种和保存方法的不同,动物新鲜粪便内类固醇激素的保存时间存在很大差异,不能简单地加以采用。鉴于此,针对目标物种开展新鲜粪便内生理激素保存时效的研究,无疑是安全运用粪便这种非损伤性方法的前提条件。

本研究表明:川金丝猴的新鲜粪便在95%乙醇和(4±1)℃条件下,雌性皮质醇含量在保存6 d时显著低于标准参照值($P < 0.05$),因此可以稳定保存5 d;雄性皮质醇在保存6 d时的平均值显著高于标准参照值($P < 0.05$),因此也可以稳定保存5 d。Khan等^[29]和Lynch等^[35]的研究表明,95%乙醇及常温保存条件下,黄狒狒(*Papio cynocephalus cynocephalus*)粪样内的皮质醇激素的稳定保存时间不宜多于30 d;Terio等^[28]在同样保存处理下得出,猎豹(*Acinonyx jubatus*)粪样内皮质醇激素的稳定保存时间可达14 d;Hunt等^[36]则使用90%的乙醇稳定保存灰熊(*Ursus arctos*)粪样中的皮质醇激素达65 d。综上所述,对于不同的物种,无论粪便的保存方法是否相同,皮质醇激素的保存效果都不尽相同;对于川金丝猴而言,雌雄粪样内皮质醇激素的保存时效也不完全一致。但可以肯定的是,在本实验的保存条件下,川金丝猴新鲜粪便内皮质醇激素可以稳定保存至少5 d。我们认为,这个时间范畴可以为野外研究赢得宝贵的时间。还需指出的是,超过5 d后,川金丝猴粪便内皮质醇激素含量与对照组比较出现了统计上的显著差异,但各时间段内的组内变异系数较小,说明导致皮质醇激素变化的因子类似

且作用效果趋同。因此,可以考虑设置对照组并测定激素值的变化,采用系统误差校正的方法使用5 d以后的粪便激素值,这样可延长粪便的保存时间,为外业工作提供更充裕的时间。

参 考 文 献

- [1] 王晓卫,吕九全,李保国,等. 秦岭金丝猴的觅食生物学[J]. 生物学通报,2006,41(3):13-15.
- [2] 戚汉君,梁冰,鲍文永,等. 雌性川金丝猴尿中生殖激素变化的研究[J]. 兽类学报,1995,15(2):106-112.
- [3] 姜传坤. 金丝猴急性实质肝炎的诊治[J]. 中国兽医科技,2001,31(1):36.
- [4] 刘诗峰,高云芳,孙步洲,等. 川金丝猴不同季节雌二醇分泌水平的初步研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),1995,25(增刊):718-721.
- [5] 高云芳,刘诗峰. 川金丝猴不同季节孕酮分泌水平的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),1996,26(增刊):1036-1038.
- [6] 阎彩娥,蒋志刚,李春旺,等. 利用尿液中的雌二醇、孕酮含量监测雌性川金丝猴的月经周期和妊娠[J]. 动物学报,2003,49(5):693-697.
- [7] 阎彩娥,蒋志刚,李春旺,等. 雌性川金丝猴的邀配行为与尿液雌二醇水平的关系[J]. 动物学报,2003,49(6):736-741.
- [8] 高云芳,陈超,李保国,等. 川金丝猴尿液中睾酮水平的季节性变化[J]. 动物学报,2003,49(3):393-398.
- [9] 高云芳,高更更,白绪祥,等. 雌性川金丝猴尿液中雌二醇与孕酮水平的季节性变化[J]. 西北大学学报(自然科学版),2005,35(5):592-596.
- [10] GUO S T, LI B G, WATANABE K. Diet and activity budget of *Rhinopithecus roxellana* in the Qinling Mountains, China [J]. *Primates* 2007, 48(4):268-276.
- [11] LI Y M, STANDFORD C B, YANG Y H. Winter feeding tree choice in Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellanae*) in Shennongjia Nature Reserve, China [J]. *International Journal of Primatology*, 2002, 23(3):657-675.
- [12] 高云芳. 秦岭川金丝猴对高海拔栖息地的某些生理适应[J]. 应用生态学报,2004,15(2):331-334.
- [13] 高云芳,王慧平,李保国. 秦岭野生雌性川金丝猴粪便睾酮水平与邀配频次的季节性变化[J]. 动物学报,2007,53(5):783-790.
- [14] QI X G, LI B G, JI W H. Reproductive parameters of wild female *Rhinopithecus roxellanae* [J]. *American Journal of Primatology*, 2008, 70(4):311-319.
- [15] SHIMIZU K. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: Application of non-invasive methods [J]. *Journal of Reproduction and Development* 2005, 51(1):1-13.
- [16] SCHOENECKER K A, LYDA R O, KIRKPATRICK J. Comparison of three fecal steroid metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2004, 40(2):273-281.

- [17] FUJITA S, MITSUNAGA F, SUGIURA H, *et al.* Measurement of urinary and fecal steroid metabolites during the ovarian cycle in captive and wild Japanese macaques *Macaca fuscata* [J]. *American Journal of Primatology* 2001, 53(4):167-176.
- [18] GORDON M B, KEIKO S, MASSIMO B, *et al.* Fecal testosterone immunoreactivity as a non-invasive index of functional testosterone dynamics in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*) [J]. *Primates*, 2002, 43(1):29-39.
- [19] WASSER S K. Reproductive control in wild baboons measured by fecal steroids [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 55(2):393-399.
- [20] WASSER S K, HUNT K E, BROWN J L, *et al.* A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of non-domestic mammalian and avian species [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 120(3):260-275.
- [21] CROOKSHANK H R, ELISSALDE M H, WHITE R G, *et al.* Effect of transportation and handling of calves upon blood serum composition [J]. *Journal of Animal Science*, 1979, 48(3):430-435.
- [22] 黄种彬. 采血应激对蛋鸭产蛋性能影响的研究 [J]. *福建畜牧兽医*, 2005, 27(6):19-20.
- [23] SMITH J D, ALLEN S W, QUANDT J E. Changes in cortisol concentration in response to stress and postoperative pain in client-owned cats and correlation with objective clinical variables [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1999, 60:432-436.
- [24] MOE R O, BAKKEN M. Effects of handling and physical restraint on rectal temperature, cortisol, glucose and leucocyte counts in the silver fox (*Vulpes vulpes*) [J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1997, 38:29-39.
- [25] MCDONALD L E. *Veterinary endocrinology and reproduction* [M]. 3rd ed. London: Bailliere Tindall, 1980.
- [26] CLARK J D, RAGER D R, CALPIN J P. Animal well-being: II. Stress and distress [J]. *Laboratory Animal Science*, 1997, 47(6):571-579.
- [27] HIEBERT S M, RAMENOFKY M, SALVANTE K, *et al.* Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 120(2):235-247.
- [28] TERIO K A, BROWN J L, MORELAND R, *et al.* Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah [J]. *Zoo Biology*, 2002, 21(3):215-222.
- [29] KHAN M Z, ALTMAN J, ISANI S S, *et al.* A matter of time: Evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis [J]. *General and Comparative Endocrinology* 2002, 128(1):57-64.
- [30] 王慧平, 高云芳, 张新利, 等. 川金丝猴粪尿中类固醇性激素抽提方法比较 [J]. *兽类学报* 2005, 25(3):297-301.
- [31] STRIER K B, ZIEGLER T E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides* [J]. *American Journal of Primatology*, 1997, 42(4):299-310.
- [32] WASSER S K, BEVIS K, KING G, *et al.* Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl [J]. *Conservation Biology*, 1997, 11(4):1019-1022.
- [33] MONFORT S L, MASHBURN K L, BREWER B A, *et al.* Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis [J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1998, 29:129-133.
- [34] GALAMA W T, GRAHAM L H, SAVAGE A. Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*Diceros bicornis*) [J]. *Zoo Biology* 2004, 23(4):291-300.
- [35] LYNCH J W, KHAN M Z, ALTMANN J, *et al.* Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: Short-term storage conditions and consequences for data interpretation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(2):264-271.
- [36] HUNT K E, WASSER S K. Effect of long-term preservation methods on fecal glucocorticoid concentrations of gizzly bear and African elephant [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2003, 76(6):918-928.

(责任编辑 董晓燕)