

# 半散养雌性东北虎繁殖期粪样中雌二醇和孕酮含量的变化<sup>1)</sup>

王晓明

(东北林业大学, 哈尔滨, 150040)

张洪海

(曲阜师范大学)

乔征磊

(牡丹江师范学院)

朱磊

(曲阜师范大学)

许振禄

(泰山东北虎园)

**摘要** 2006 年 6 月—2007 年 11 月, 在泰山东北虎园收集了 3 只半散养 (园区占地面积 2 万 m<sup>2</sup>) 雌性东北虎 (*Panthera tigris altaica*) 发情交配期和育幼期的粪样, 利用放射免疫分析法对粪便中的雌二醇和孕酮质量分数进行了测定。结果表明, 雌虎粪样中雌二醇质量分数在发情交配期一直维持高水平, 基本都在 4.0 × 10<sup>-10</sup> 以上, 峰值达 1.2 × 10<sup>-9</sup> 以上; 育幼期水平较低, 基本都在 4.0 × 10<sup>-10</sup> 以下, 两时期质量分数差异极显著 (P < 0.01)。孕酮质量分数在发情交配期和育幼期基本都在 1.0 × 10<sup>-7</sup> 以内, 育幼期稍高, 峰值达 4.0 × 10<sup>-7</sup> 以上, 两时期质量分数差异不显著 (P > 0.05)。

**关键词** 东北虎; 繁殖期; 雌二醇; 孕酮

**分类号** Q959.833

**Concentrations of Fecal Estradiol and Progesterone in Semi-free-ranging Amur Tigers during Reproductive Period** Wang Xiaoming (Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China); Zhang Honghai (College of Life Sciences, Qufu Normal University); Qiao Zhenglei (Mudanjiang Teachers College); Zhu Lei (Qufu Normal University); Xu Zhenlu (Taishan Amur Tiger Park) // Journal of Northeast Forestry University - 2009, 37(5), - 95~97

Three semi-free-ranging female Amur tigers (*Panthera tigris altaica*) were chosen to collect dejecta during rutting and nursing periods from June 2006 to November 2007 at Taishan Amur Tiger Park. Concentrations of fecal estradiol (E<sub>2</sub>) and progesterone (P) were measured during the two periods by radioimmunoassay method. Results showed that fecal E<sub>2</sub> concentration of the female tigers kept a higher level during the rutting period, which was usually more than 4.0 × 10<sup>-10</sup> and its peak value reached over 1.2 × 10<sup>-9</sup>. Fecal E<sub>2</sub> concentration was usually less than 4.0 × 10<sup>-10</sup> during the nursing period. There was an obvious difference in E<sub>2</sub> concentration of female tiger between rutting and nursing periods. Fecal P concentration was usually less than 1.0 × 10<sup>-7</sup> during the two periods, and the concentration kept a higher level during the nursing period compared with that during the rutting period. The peak of P concentration was more than 4.0 × 10<sup>-7</sup> during the nursing period. No obvious difference in P concentration was found between the two periods.

**Keywords** *Panthera tigris altaica*; Reproductive period; Estradiol; Progesterone

动物的行为不仅受到神经系统的调节, 还要受到内分泌激素的调节。通过对激素变化的分析来监测动物的生殖生理状态对有效进行动物管理是非常重要的。影响雌性动物性行为的激素有雌激素和孕激素, 主要是雌二醇和孕酮, 一般这两类激素会同时对雌性动物起作用, 以便雌性表现出性行为。因此, 对雌性动物性激素的研究常常将雌二醇和孕酮放在一起<sup>[1-7]</sup>。自从放射免疫测定法 (Radioimmunoassay, RIA) 问世以来, 雌二醇、孕酮测定法在发情鉴定、动物生殖力鉴定、胚胎死亡的判断、早孕诊断等方面显示了非常重要的作用<sup>[8-15]</sup>。

测定尿和粪样中类固醇质量分数已被用于监测野生动物繁殖周期和妊娠诊断<sup>[16]</sup>。由于半散养东北虎室外的尿液无法采集, 导致尿液的连续性不高, 而根据动物的粪便和尿液中性激素质量分数与血液中性激素质量分数的相关性, 利用粪便中激素代谢产物的化学分析代替血样分析, 可以检测动物的繁殖和肾上腺皮质激素状态的各种指数<sup>[17-21]</sup>。因此, 粪便样本中的激素含量可以很精确地反映出动物激素的状态。

东北虎 (*Panthera tigris altaica*) 也叫西伯利亚虎, 是国家 I 级重点保护动物, 属食肉目、猫科、豹属。建国以来由于生

境的破坏、人为捕杀和生物链的破坏, 东北虎的数量锐减, 已处于濒危状态, 现已被国际自然及自然资源保护联盟 (IUCN) 列为濒危级 (EN) 动物, 被濒危动植物种国际贸易公约组织 (CITES) 列入附录 I<sup>[22]</sup>。近十几年来, 有关东北虎的研究, 国内外学者相继做了大量的工作, 包括分布与数量、活动节律、饲养与繁殖、解剖与遗传等, 但对东北虎性激素分泌水平的研究尚未见报道。

## 1 材料与方法

**研究对象** 2006 年 6 月—2007 年 11 月, 对泰山东北虎园的 3 只繁殖经历的成年雌性东北虎进行了研究。虎园共有成年东北虎 12 只 (6 ♂ 6 ♀), 白天放到活动场和展笼里供参观, 夜晚收回笼舍中。本研究中的 3 只雌虎均于 2002 年引自中国横道河子猫科动物饲养繁育中心, 具体信息见表 1。

表 1 研究对象概况

呼名	性别	年龄 / a	发情交配期	育幼期
216 号	♀	5	20060925—20061006	20070117—20070426
247 号	♀	5	20060912—20060923	20070111—20070420
226 号	♀	6	20061231—20070110	20070425—20070802

注: 呼名为出生地所起。

**粪样的采集和处理** 分别对 3 只雌虎 2 个不同繁殖期的粪样进行 6 个时期的收集 (表 1)。其中发情交配期前后和育幼期的室外阶段收集地点是室外活动场, 发情交配期雌虎排便即收集, 育幼期每 10 d 收集一次, 直到育幼 100 d (本园东北虎的育幼期一般为 100 d 或稍多) 为止, 由于当时收集不方

1) 国家自然科学基金 (30370218)、新世纪优秀人才支持计划 (NCET-07-0507)、山东省优秀中青年科学家奖励基金 (2005BS02005) 资助。

第一作者简介: 王晓明, 男, 1975 年 8 月生, 东北林业大学野生动物资源学院, 博士研究生。

收稿日期: 2008 年 12 月 18 日。

责任编辑: 程红。

便,因此记录好排粪地点和时间,待收虎回笼舍后收集。育幼期的室内阶段粪样的收集从母虎产仔到母虎开始进入室外活动场为止,每 10 d 收集一次;收集时将母虎从排粪的内舍赶入其他内舍,然后脚上套上塑料袋进入排粪的圈内收集,避免留下过多气味影响母虎育幼。收集好的粪样放在  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰柜中保存。因本研究中的虎习惯定点排粪,因此要特别注意新旧粪便的区分,防止出错,尽可能地及时收集。

**溶液配制与激素的提取** 甲醇、石油醚 ( $30\sim 60^{\circ}\text{C}$ ) 均为分析纯;磷酸缓冲液 ( $\text{pH} = 7.0\sim 7.2$ ):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.12 g 100 mL;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 35.82 g 500 mL;  $\text{NaCl}$  9 g 重蒸水, 400 mL。激素提取参考李春等<sup>[4]</sup>改进后的方法,具体操作如下:将湿粪便粉碎混匀,去除砂粒和粗纤维等,取 1 份 (0.5~1.0 g) 称质量,  $120^{\circ}\text{C}$  烘干后再称质量,测含水量。取研磨混匀的湿粪样 0.5 g 加入  $V(\text{甲醇}):V(\text{蒸馏水}) = 8:1$  的混合液 4 mL 振荡 1.5 min,再加入 2.5 mL 石油醚,振荡 0.5 min 以除去脂质,然后 1500 r/min 离心 10 min,取甲醇层 2 mL 于小试管中,室温放置干燥或  $37^{\circ}\text{C}$  水浴蒸干。测试时加 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 ( $\text{pH} = 7.0\sim 7.2$ ) 2 mL,振荡 5 min 制成待测样品。

**激素质量分数的测定** 用北京原子高科公司生产的性激素放射免疫分析试剂盒对上述待测样品进行双管平行样测

表 2 雌性东北虎发情交配期和育幼期粪便中雌二醇的质量分数

 $10^{-12}$ 

东北虎 呼名	发情交配期 (粪便收集)					育幼期 (粪便收集)									
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d	80 d	90 d	100 d
216 号	621.5	681.4	700.3	1274.3	519.7	519.0	418.5	502.1	197.1	323.8	102.2	556.3	205.4	345.2	484.7
247 号	440.0	547.8	1475.7	620.3	430.1	76.4	119.8	282.0	422.1	300.2	197.2	326.3	205.2	102.1	457.3
226 号	460.1	700.2	693.2	1286.3	248.2	48.4	135.2	108.1	56.3	88.3	45.2	145.2	76.3	338.8	330.7

表 3 雌性东北虎发情交配期和育幼期粪便中孕酮的质量分数

 $10^{-9}$ 

东北虎 呼名	发情交配期 (粪便收集)					育幼期 (粪便收集)									
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d	80 d	90 d	100 d
216 号	34.1	15.0	7.0	44.9	95.2	283.1	72.1	408.2	28.1	32.0	221.1	162.8	48.8	87.9	26.3
247 号	58.1	57.2	7.0	2.2	7.3	25.1	132.2	48.0	25.1	12.9	7.0	10.1	53.2	89.1	16.3
226 号	32.1	20.2	63.8	8.1	43.1	129.1	435.5	28.3	14.0	27.8	10.2	105.3	38.1	46.2	26.9

孕酮质量分数在发情交配期和育幼期基本都在  $1.0 \times 10^{-7}$  以内,育幼期稍高,3 只雌虎中有 2 只的峰值达  $4.0 \times 10^{-7}$  以上 (表 3)。雌虎发情交配期和育幼期孕酮平均质量分数分别为  $(32.93 \pm 7.02) \times 10^{-9}$ 、 $(88.30 \pm 20.40) \times 10^{-9}$ , 独立样本  $t$  检验显示,二个时期孕酮质量分数差异不显著 ( $t = 1.881 P > 0.05$ )。

### 3 结论与讨论

在以往的动物性激素研究中,人们主要通过血液、毛发、尿液和粪便来提取激素样品<sup>[9 23-25]</sup>,而激素样品的采集方式取决于研究内容和取样条件。捕捉动物尤其是大型动物或野生动物是非常困难的,而且“持续捕捉和静脉穿刺对动物来说就是一种应激反应,会影响它们的生理状态进而影响其繁殖机能”<sup>[16]</sup>,而采集尿液和粪便进行类固醇激素的测定则不必侵扰目标动物。近年来,人们建立了以粪样和尿样代替血样,以非侵害性的类固醇激素测定来监测野生动物繁殖机能的新方法<sup>[16]</sup>,但尿样和粪样的选择又常受样品收集条件,主要是研究对象的生活环境的限制<sup>[2]</sup>。生殖类固醇代谢物的排泄情况反映了性腺活动规律<sup>[26]</sup>。“在哺乳动物中,雌二醇和孕酮调控雌性的生殖行为”<sup>[27]</sup>，“一般认为雌二醇峰值的

出现即为雌性哺乳动物发情的高潮期”<sup>[28]</sup>。东北虎粪样中雌二醇在发情交配期保持较高的质量分数,育幼期水平较低,仅为发情交配期的 1/3 (表 2),此结论不仅对前人的理论进行了验证,同时也从生理的角度定量地证明了东北虎育幼期基本不存在再发情现象,如果出现再发情行为,也很可能属于“假发情”。雌性哺乳动物体内的孕激素对动物正常生殖机能的维持具有决定性作用,孕酮是孕激素生理上最重要的代表,在妊娠期间它能抑制丘脑下部中枢发出促进卵泡成熟和排卵的冲动,并有维持妊娠和保胎的作用<sup>[25]</sup>。孕酮在发情交配期较低,其中交配末期比发情交配期明显要稍高一些,这可能与“大量的孕酮对雌性性行为有抑制作用”<sup>[29]</sup>有关,因为观察发现交配末期雌虎的发情交配行为明显减弱。孕酮在育幼期保持较高的水平,尤其是育幼前期分泌水平很高,说明哺乳动物育幼期孕酮的多少可能与动物母性的强弱有关。育幼前期,刚产仔不久,往往孕酮分泌较多,以维持较强的母性,随着幼仔的长大,孕酮分泌下降,母性减弱。粪便类固醇代谢监测法有早孕诊断、预测产期的作用<sup>[30]</sup>。本研究由于妊娠期粪样收集不全导致无法对东北虎的妊娠情况作出判断,笔者将对此进行进一步研究,以期找到能够对东北虎早孕作出判断的激素水平。

**数据的统计与分析** 利用 Excel 对雌虎发情交配前后和育幼期的雌二醇和孕酮质量分数进行统计,并利用 SPSS11.0 统计软件包中的独立样本  $t$  检验对雌虎发情交配期和育幼期 2 种性激素的水平分别进行时期差异分析。如果没有特别标注,则为双尾检验,显著性水平  $\alpha = 0.05$ 。数据记录为平均值  $\pm$  标准误。

### 2 结果与分析

雌虎发情交配期雌二醇质量分数迅速上升,并一直保持在较高区域,一般在  $(4\sim 7) \times 10^{-10}$ 。3 只雌虎的最大峰值分别达到  $12.74 \times 10^{-10}$ 、 $14.76 \times 10^{-10}$  和  $12.86 \times 10^{-10}$ ,交配后迅速下降。育幼期质量分数较低,与交配后水平相当,一般在  $(0.40\sim 5.00) \times 10^{-10}$  (表 2)。雌虎发情交配期和育幼期雌二醇平均质量分数分别为  $(713.13 \pm 91.12) \times 10^{-12}$ 、 $(250.47 \pm 29.30) \times 10^{-12}$ ,独立样本  $t$  检验显示,二个时期雌二醇质量分数差异极显著 ( $t = 6.080 P < 0.01$ )。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 李复东, 彭世媛, 叶志勇, 等. 雌性大熊猫发情期尿中  $17\beta$ -雌二醇与孕酮水平的变化及其与配种的关系 [ J ]. 兽类学报, 1993, 13(3): 166-171
- [ 2 ] 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
- [ 3 ] 李春, 魏辅文, 胡锦涛. 小熊猫妊娠期粪便中孕酮、雌二醇的水平变化 [ J ]. 兽类学报, 2005, 25(4): 385-389
- [ 4 ] 李春, 魏辅文, 胡锦涛. 雌性小熊猫粪样中雌二醇与孕酮水平的变化与繁殖启动的关系 [ J ]. 动物学研究, 2005, 26(2): 147-151
- [ 5 ] 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
- [ 6 ] 杨帆, 王丽红, 贺倩, 等. 圈养亚洲象尿液中雌二醇和孕酮含量的周期性变化 [ J ]. 兽类学报, 2007, 27(1): 74-79
- [ 7 ] 修云芳, 邵良平, 王德春, 等. 小熊猫繁殖周期血清雌二醇和孕酮含量变化 [ J ]. 兽类学报, 2007, 27(2): 153-157
- [ 8 ] Wasser S K, Thomas R, Nair P P, et al. Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*) [ J ]. Journal of Reproduction and Fertility, 1993, 97(2): 569-574
- [ 9 ] Wasser S K, Rislér L, Steiner R A. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy [ J ]. Biology of Reproduction, 1988, 39(4): 862-872
- [ 10 ] Wasser S K, Monfort S L, White D E. Rapid extraction of faecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*) [ J ]. Journal of Reproduction and Fertility, 1991, 92: 415-423
- [ 11 ] Wasser S K, Monfort S L, Southern J, et al. Excretion rates and metabolites of estradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces [ J ]. Journal of Reproduction and Fertility, 1994, 101(1): 213-220
- [ 12 ] Wasser S K. Reproductive control in wild baboons measured by faecal steroids [ J ]. Biology of Reproduction, 1996, 55(2): 393-399
- [ 13 ] Whitten P L, Brochman D K, Stavisky R C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interaction [ J ]. Am J Phys Anthropol, 1998, 107(S27): 1-23
- [ 14 ] Casati M, Heistermann M, Visalberghi E. Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progesterone levels over the ovarian cycle in female tuffed capuchin monkeys [ J ]. Horm Behav, 1999, 36(3): 252-265
- [ 15 ] Bardim K, Shimizu S, Fujita, et al. Hormonal correlates of maternal style in captive macaques (*Macaca usata* and *M. mulatta*) [ J ]. Am J Primatol, 2001, 22: 647-662
- [ 16 ] 郑喜邦. 野生动物尿和粪中类固醇激素的研究进展 [ J ]. 青海畜牧兽医杂志, 1998, 28(3): 31-34
- [ 17 ] Gansvandt A, Palme R, Heistermann M, et al. Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 134(2): 156-166
- [ 18 ] Good T, Khan M Z, Lynch J W. Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in old field mice (*Peromyscus polionotus*) [ J ]. Physiology and Behavior, 2003, 80: 405-411
- [ 19 ] Goymann W, Muls E, Van't Hof, et al. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*) [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 114(3): 340-348
- [ 20 ] Goymann W, Muls E, Gwinner E. Corticosteroid metabolites can be measured noninvasively in excreta of European stonechats (*Saxicola torquata rubicola*) [ J ]. The Auk, 2002, 119(4): 1167-1173
- [ 21 ] Hunt K E, Trites A W, Wasser S K. Validation of a fecal glucocorticoid assay for stellar sea lions (*Eumetopias jubatus*) [ J ]. Physiology & Behavior, 2004, 80(5): 595-601
- [ 22 ] 盛和林, 大泰司, 陆厚基. 中国野生哺乳动物 [ M ]. 北京: 中国林业出版社, 1999, 132-133
- [ 23 ] Li Chunwang, Jiang Zhigang, Jiang Guohua, et al. Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Père David's deer [ J ]. Hormones and Behavior, 2001, 40(4): 518-525
- [ 24 ] Rislér L, Wasser S K, Sackett G P. Measurement of excreted steroids in *Macaca nemestrina* [ J ]. American Journal of Primatology, 1987, 12(1): 91-100
- [ 25 ] 郭大智, 刘显义, 陈发菊, 等. 大熊猫被毛中孕酮、睾酮含量的季节性变化 [ C ]. 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集. 成都: 科学技术出版社, 1994, 256-259
- [ 26 ] Lasley B L, Kirkpatrick J F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wild life by means of urinary and fecal steroids [ J ]. Journal of Zoology and Wildlife Medicine, 1991, 22: 23-31
- [ 27 ] Young W C. The hormones and mating behavior [ C ]. Young W C. Sex and Internal Secretions, 1st Vol. Baltimore: Williams & Wilkins, 1961, 1173-1239
- [ 28 ] 王建辰, 章孝荣. 动物生殖调控 [ M ]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998
- [ 29 ] Wang J L, Maestriperi D, Wallen K. Estradiol increases female sexual initiation independent of male responsiveness in rhesus monkeys [ J ]. Hormones and Behavior, 1998, 33(2): 95-103
- [ 30 ] 李春, 魏辅文, 李明, 等. 粪便类固醇激素研究简史及其在野生动物研究中的应用 [ J ]. 四川动物, 2003, 22(4): 272-276

(上接 78 页)

表 6 加热时间对红松仁分离蛋白溶解性的影响 (100℃条件下)

时间 /h	溶解度 /g·L <sup>-1</sup>	时间 /h	溶解度 /g·L <sup>-1</sup>
0	3.1	2.0	2.7
0.5	3.3	2.5	2.2
1.0	3.0	3.0	2.0
1.5	2.8	3.5	1.2

## 4 结 论

以红松籽为原料, 用“碱提酸沉”法提取红松仁分离蛋白, 并对红松仁分离蛋白的乳化性和溶解性进行的研究表明: 当 pH = 10 时, 乳化度和溶解度最大, 分别为 60%, 7.6 g/L; 当加热温度为 60℃ 时, 乳化度最大, 为 66%; 当蛋白的质量分数达到 10% 时, 乳化度最高, 达到 62%; 50℃ 时, 溶解度最大, 为 4.5 g/L; 当加热时间为 0.5 h 时, 溶解度最大, 为 3.3 g/L。

红松仁蛋白的乳化性和溶解性具有一定的相关性, 红松仁蛋白溶解性的改善将有利于其乳化性能的提高。

对红松仁分离蛋白的乳化度和溶解性功能特性进行研究, 发现, 红松仁分离蛋白在一定条件下具有有良好的乳化度和溶解度, 可在肉制品、面包、蛋糕和色拉调味品上得到广泛应用。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 刘天一, 迟玉杰. 大豆分离蛋白的磷酸化改性及功能性质的研究 [ J ]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 118-124
- [ 2 ] Yasumatsu K, Sawada I, Moritaka S, et al. Whipping and emulsifying properties of soybean products [ J ]. Biological Chemistry, 1972, 36: 719
- [ 3 ] 刘景顺, 黄纪念, 谭本刚. 大豆分离蛋白的改性研究 (一) [ J ]. 现代食品科技, 2005(1): 13-16
- [ 4 ] Malhotra A, Coupland J N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential and viscosity of soy protein isolates [ J ]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(1): 101-108