

雄性小熊猫粪便中睾酮水平的变化与繁殖周期的关系

李 春^{1,2,3} 魏辅文^{1*} 李 明¹ 刘雪卿² 杨 智⁴ 胡锦矗²

(1 中国科学院动物研究所, 北京, 100080) (2 四川师范学院珍稀动植物研究所, 南充, 637002)

(3 重庆邮电学院生物信息学院, 重庆, 400065) (4 成都大熊猫繁育研究基地, 成都, 610000)

摘要: 1999 年 12 月至 2000 年 9 月, 使用放射免疫分析法, 测定了成都动物园和成都大熊猫繁育研究基地的 4 只雄性小熊猫粪便中睾酮水平变化情况, 同时对其行为进行了观察。研究表明, 雄性粪便中睾酮水平在繁殖期(12 月~3 月)显著高于非繁殖期(4 月~9 月)($P < 0.01$), 且睾酮水平变化与繁殖行为密切相关。在非繁殖期, 雄性小熊猫的睾酮水平处于基础的较低水平时, 其繁殖行为如蹭阴、舔阴、舔标记物和咩叫等几乎没有发生或很少发生; 而在繁殖期, 雄性小熊猫的睾酮水平明显升高, 这些繁殖行为频繁发生。以上结果说明, 睾酮是调节雄性小熊猫繁殖行为季节性变化的生理因子。

关键词: 雄性小熊猫; 粪便; 睾酮; 繁殖行为

中图分类号: Q958; Q579.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2003)

Fecal Testosterone Levels and Reproduction Cycle in Male Red Panda (*Ailurus fulgens*)

LI Chun^{1,2,3} WEI Fuwen¹ LI Ming¹ LIU Xueqing² YANG Zhi⁴ HU Jinchu²

(1 Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

(2 Institute of Rare Animals and Plants, Sichuan Teachers College, Nanchong, Sichuan, 637002)

(3 College of Biology Information, Chongqing University of Post and Telecommunication, Chongqing, 400065)

(4 Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu, 630000)

Abstract: Fecal testosterone were analysed from four male red pandas (*Ailurus fulgens*) in Chengdu Zoo and Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding by radioimmunoassays from December 1999 to September 2000, to investigate the hormonal correlations to reproduction and reproductive behaviors. The results indicated that fecal testosterone concentration was obviously higher ($P < 0.01$) in reproductive season (from December 1999 to March 2000) than in non-reproductive season (from April to September 2000), and the fecal testosterone levels were closely correlated with reproductive aggression. In non-reproductive season, the reproductive behaviors such as scent marking, licking anogenital, licking marking, and bleating seldom happened when fecal testosterone concentration stayed in a relatively low at basal level. However, in reproductive season, these reproductive behaviors happened frequently when fecal testosterone level rose obviously. These imply that testosterone is the main physiological factor, which regulates seasonal changes of male red pandas' reproductive activities.

Key words: Male red panda (*Ailurus fulgens*); Feces; Testosterone; Reproductive behavior

雄性动物的生殖状况、发情周期与雄激素水平的变化有密切关系。雄激素中最为重要的是由睾丸分泌的睾酮 (Testosterone), 它除了促进雄性生殖道、副性腺体和第二性征的正常发育外, 还对维持雄性动物的性行为有重要作用。家短尾负鼠

(*Monodelphis domestica*) 的雌性个体在睾酮的刺激下, 胸部香腺和交配器明显增大; 经过睾酮处理后的雄性会引起雌性更强烈进攻^[1,2]。雄性麋鹿的睾酮水平在繁殖季节与非繁殖季节有显著差异, 许多繁殖行为如嗅尿、尿喷洒、驱赶、约束雌、下颌压

基金项目: 中国科学院知识创新重要方向项目 (KSCX2-2-03); 国家杰出青年基金资助项目 (30125006)

作者简介: 李春 (1975-), 女, 讲师, 主要从事珍稀濒危哺乳动物生态学的研究。

收稿日期: 2002-04-08; 修回日期: 2002-08-26

*通讯作者, E-mail: weifw@panda-iz.ac.cn

雌、爬跨和交配等的发生频次与粪样中睾酮水平呈显著的正相关^[3]。在牧群中,公马有保护母马和马驹的天性;雄性动物还具有领地占有性、好斗性和竞争性,这些特性均与雄激素有关,去势雄性则失去这些特征^[4]。此外,环境因素(如季节)的变化会引起动物的性激素波动^[5],社会因素(如同性和异性个体的存在)也会影响有些动物的性激素分泌水平。例如,在一年中的大部分时间内,松鼠猴在形成新群后,异性个体的存在和活动刺激了性腺的活动,从而导致性激素的含量达到了使雌雄猴进入繁殖状态的水平^[6,7]。

小熊猫(*Ailurus fulgens*)仅分布于喜马拉雅——横断山脉,为我国一类重点保护动物,被列入世界濒危物种贸易公约(CITES)的附录 I 中。到目前为止,有关小熊猫繁殖生物学的研究报道十分少见,并且大多局限于 Roberts 等^[8]对小熊猫的行为观察上。而有关小熊猫性激素代谢规律的探索,国内外仅见 Spanner 等^[9]一篇报道。该研究由于观察时间短,收集到的数据十分有限,未能发现雄性小熊猫性激素水平的变化规律。

小熊猫是季节性繁殖动物,雌雄在 18~20 月龄时性成熟,每年 1 月中旬至 3 月中旬为其发情期^[8,10,11]。一般认为,生殖类固醇代谢物的排泄情况可以反映性腺活动情况^[12]。为探索雄性小熊猫季节性发情的生理基础和了解社会刺激和环境刺激对雄性小熊猫睾酮水平的变化是否会产生影响,我们于 1999 年 12 月至 2000 年 9 月,对成都动物园和成都大熊猫繁育研究基地的 4 只雄性小熊猫的睾酮水平变化和繁殖行为进行了研究。

1 研究方法

1.1 实验动物

选取成都动物园和成都大熊猫繁育研究基地健康成体雄性小熊猫 4 只(取名为 1, 2, 3, 4)。其中, 3 单独饲养,以排除社会刺激,其余实验动物分别与其配偶饲养在一起。

1.2 样品的采集和保存

样品采集时间为 1999 年 12 月至 2000 年 9 月,其中繁殖期(2000 年 1~3 月)每天取早晨新鲜粪便 1 次,其余非繁殖期每 1~2 个星期取样 1 次。在确定粪样未被污染后,马上装入塑料袋密封,做好记录,放入 -20℃ 冰箱保存。

1.3 激素提取

以 Wasser 等^[14]、陈玉燕等^[15]和李春旺等^[3]的方法,改进后用来提取粪样中的激素,具体操作如下:

将湿粪便粉碎混匀,去除砂粒和粗纤维等,取一份(0.5~1.0 g)称重,120℃ 烘干后再称重,测含水量。取研磨混匀的湿粪样 0.5 g,加入甲醇蒸馏水(v/v = 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),然后离心 10 min(1 500 r/min),取甲醇层 2 ml 于小试管中,室温放置干或水浴蒸干(37℃),测试时加 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液(pH = 7.0~7.2) 2 ml,震荡 5 min,制成待测样品。

1.4 激素含量的测定

用北京福瑞生物工程公司生产的睾酮放射免疫分析测定试剂盒,对上述各待测样品进行双管平行样测定。以国营二六二厂生产的 H-2008 型自动免疫计数器记数。试剂盒主要技术参数:测定范围:0.4~20 ng/ml;灵敏度 0.4 ng/ml;变异系数:批内变异 < 6.3% (n = 4);批间变异 < 10.3% (n = 4);平均回收率:100.1%。

最后,将各个湿样本的激素含量换算成干粪样中的含量。

1.5 数据统计和分析

用 Curve Expert 1.3 和 Microsoft Excel 软件进行数据处理和作图,利用 SPSS 统计软件包^[16]中的 Mann-Whitney test 检验繁殖期与非繁殖期的睾酮水平差异,总样本数为 177 个。

2 结果

1 小熊猫在 1999 年 12 月睾酮水平较低,从 2000 年 1 月 4 日至 3 月 18 日睾酮维持在较高水平,多数在 20 ng/g 以上。3 月下旬下降到基础水平,并一直保持到 8 月。8 月上、中旬睾酮有一个波浪变化,9 月又降低了(图 1)。

2 从 1999 年 12 月底至 2000 年 3 月 20 日睾酮较高,均在 20 ng/g 以上。3 月下旬以后睾酮一直维持在基础水平,8 月下旬睾酮水平出现波浪变化,但很快又回到基础水平(图 2)。

3 从 1999 年 12 月底至 2000 年 3 月中旬睾酮值均在 20 ng/g 以上,水平较高。3 月 18 日睾酮开始下降到基础水平,在 8 月下旬略有上升(图 3)。

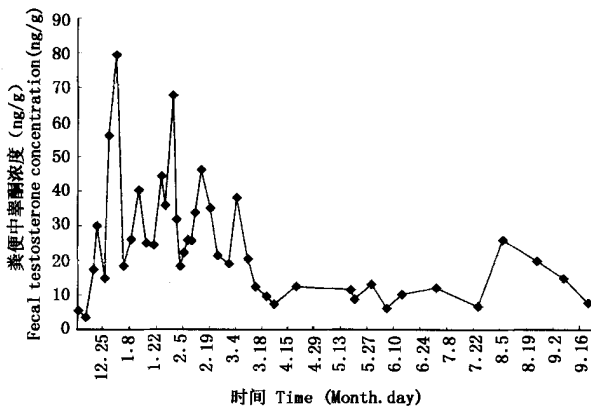


图1 1 小熊猫粪便中睾酮水平变化

Fig. 1 Changes of fecal testosterone concentration in male red panda No. 1

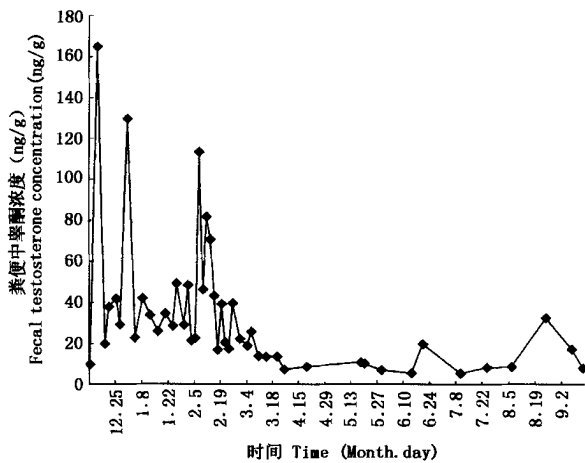


图2 2 小熊猫粪便中睾酮水平变化

Fig. 2 Changes of fecal testosterone concentration in male red panda No. 2

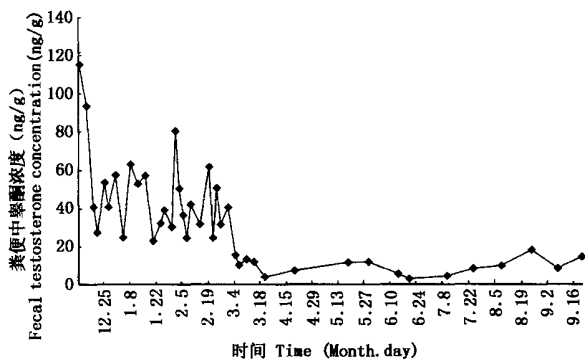


图3 3 小熊猫粪便中睾酮水平变化

Fig. 3 Changes of fecal testosterone concentration in male red panda No. 3

较高, 维持在 20 ng/g 以上, 而后渐渐降至基础水平, 8 月下旬出现一波值 (图 4)。

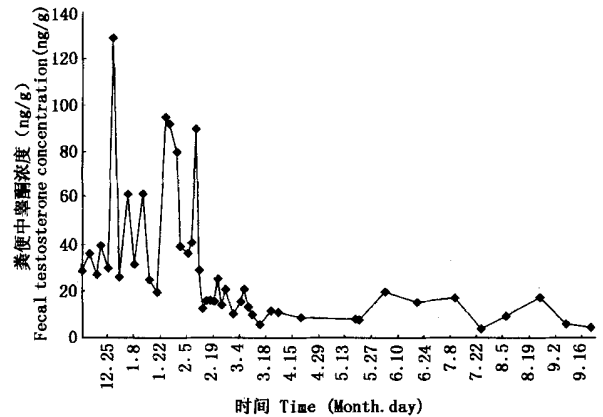


图4 4 小熊猫粪便中睾酮水平变化

Fig. 4 Changes of fecal testosterone concentration in male red panda No. 4

除 3 小熊猫外, 其余 3 只小熊猫在 1 月中旬到 3 月上旬, 出现多次追赶其配偶并发生交配等性行为。

统计分析结果表明, 3 小熊猫的睾酮水平变化与其它雄性小熊猫的睾酮水平变化无显著差异 ($P > 0.05$)。雄性小熊猫的睾酮水平在繁殖期与非繁殖期有显著差异 ($P < 0.05$)。2000 年 1~2 月睾酮水平最高, 平均为 43.55 ng/g, 1999 年 12 月和 2000 年 3 月次之, 2000 年 4~7 月最低, 8 月睾酮水平有所升高, 9 月又下降 (图 5)。

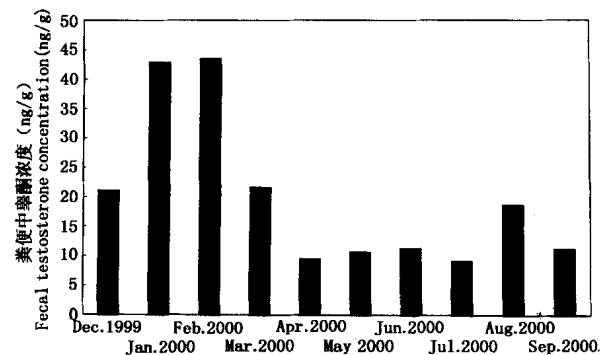


图5 雄性小熊猫周年睾酮水平变化

Fig. 5 Changes of fecal testosterone concentration in male red pandas

3 讨论

研究结果表明, 雄性小熊猫的睾酮水平的变化

4 从 1999 年 12 月至 2000 年 2 月 23 日睾酮值

与其繁殖季节明显相关, 睾酮水平在繁殖期明显高于非繁殖期。而未与雌性接触的 3 只小熊猫的睾酮水平与其它雄性小熊猫的睾酮水平变化基本相同, 并且也出现了繁殖期与非繁殖期的变化, 在繁殖期达到了顶峰, 这可能说明异性刺激对雄性小熊猫睾酮水平的变化影响不大, 单独的环境刺激可以引起其生殖巢的反应。类似的情况还见于 Herndon 等^[17]对猕猴 (*Macaca mulatta*) 的研究, 即使雄性猕猴不与雌性猕猴接触, 其雄性睾酮水平亦会随季节而波动。环境因子中光照是控制生殖的主要因素, 其一, 24 h 内光照和黑暗的交替产生不同的昼夜节律, 因此雄激素水平会产生昼夜变化, 一般在下半夜含量增加, 天亮以后达到峰值, 例如鸡; 其二, 每天光照期的长度调节季节性促性腺激素 (Gonadotropic hormone, GTH) 释放的诱导。日照增长可以刺激马和少数哺乳动物 GTH 分泌, 而对另一些哺乳动物如羊、鹿等则需要减少日照才能出现上述效果。因此, 有人提出一种“短日照理论”, 认为光照期的变化使控制 GTH 分泌的负反馈机制的敏感性发生了变化, 从长日照向短日照的转变, 可刺激腺垂体 GTH 的合成和释放, 进而刺激睾丸的分泌活动和性行为^[4]。本次实验结果表明, 雄性小熊猫在短日照期间 (12 月~3 月) 粪样睾酮含量显著高于长日照时期 (4~8 月) ($P < 0.05$), 说明光照对雄性小熊猫睾酮水平变化有重要的影响, 小熊猫可能属于典型的“短日照繁殖动物”。同样, 雄性大熊猫的毛样睾酮含量在 1~4 月短日照期间也高于 5~12 月长日照时期^[18], 这说明大熊猫与小熊猫一样, 可能也属于“短日照繁殖动物”。据报道, 公羊在配种季节到来时 (白昼变短, 即短日照时期) 睾酮量也逐渐增加, 从而引起在配种季节公羊性欲旺盛, 而其他月份低落^[19]。小鼠狐猴 (*Microcebus murinus*)^[20]、松鼠猴 (*Saimiri sciureus*)^[21,22]、长尾叶猴 (*Presbytis entellus*)^[23] 和好几种猕猴 (如 *Macaca fuscata*; *M. radiata*)^[24,25] 的睾酮水平也随光周期相应的变化而显现出上升和下降。

本实验中的 4 只雄性小熊猫的许多繁殖行为在繁殖期和非繁殖期有显著差异。如蹭阴、舔阴、舔标记物和咩叫等行为在繁殖期的发生频次显著高于非繁殖期。在发情高峰期, 蹭阴和咩叫的发生频次均显著高于发情前期和后期 (详细结果另文发表), 并且出现了交配行为。以上繁殖行为的变化与其睾

酮水平的高低变化一致。在非繁殖期, 雄性小熊猫的睾酮水平处于基础的较低水平时, 其繁殖行为如蹭阴、舔阴、舔标记物和咩叫等几乎没有发生或很少发生; 而在繁殖期, 雄性小熊猫的睾酮水平明显升高, 这些繁殖行为频繁发生。这些结果均表明, 雄性小熊猫的睾酮水平变化与繁殖行为的发生密切相关, 说明睾酮对启动和维持雄性小熊猫的性行为起着重要作用。睾酮对其它许多雄性脊椎动物的性行为也有影响, 如随着睾酮水平升高, 灰蓝灯草 (*Junco hyemalis*) 开始出现求偶鸣叫^[26]; 在一些鸟类中, 会出现占巢行为^[27]; 雄鼠的交配行为开始出现^[28]。

参考文献:

- [1] Fadem B H, Erianne G S, Karen L M. The Hormonal control of scent marking and precopulatory behavior in male gray short-tailed opossums (*Monodelphis domestica*) [J]. *Hormones and Behavior*, 1989, 23:381 - 392.
- [2] Fadem B H. The effects of gonadal hormones on scent marking and related behavior and morphology in female gray short-tailed opossums (*Monodelphis domestica*) [J]. *Hormones and Behavior*, 1990, 24:459 - 469.
- [3] 李春旺, 蒋志刚, 房继明, 姜国华, 丁玉华, 沈华, 徐安红. 麋鹿繁殖行为和粪样激素水平变化的关系[J]. 兽类学报, 2000, 20 (2): 88 - 99.
- [4] 郑亦辉主编. 动物激素及其应用[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1996.
- [5] Strier KB, Ziegler T E, Wittwer D J. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male Muriquis (*Brachyteles arachnoids*) [J]. *Hormones and Behavior*, 1999, 35:125 - 134.
- [6] Mendoza S P, Mason W. Behavioral and endocrine consequences of heterosexual pair formation in squirrel monkeys [J]. *Physiology and Behavior*, 1989, 46: 597 - 603.
- [7] Mendoza S P, Mason W. Breeding readiness in squirrel monkeys: Female-primed females are triggered by males [J]. *Physiology and Behavior*, 1991, 49: 471 - 179.
- [8] Roberts M S, Kessler D S. Reproduction in red pandas (*Ailurus fulgens*) (Carnivora: Ailuropodidae) [J]. *Journal of Zoology, London*, 1979, 188: 235 - 249.
- [9] Spanner A, Stone G M, Schultz D. Excretion profiles of some reproductive steroids in the faeces of captive Nepalese red panda (*Ailurus fulgens fulgens*) [J]. *Reproduction and Fertility Development*, 1997, 9: 565 - 570.
- [10] Muller P. Keeping and breeding red panda at Leipzig zoo [A]. In: Galtston A R ed. Red panda Biology [C]. The Hague: SPB Academic Press, 1989. 95 - 102.
- [11] Stevenson M, Anness L, Hanning J, Smith N. Red pandas at Edin-

- burgh Zoo[A]. In: Galtston A R ed. Red panda Biology[C]. The Hague: SPB Academic Press, 1989. 103 - 114.
- [12] Lasley B L, Kirkpatrick J F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids[J]. *Journal of Zoology Wildlife Medicine*, 1991, **22**: 23 - 31.
- [13] 蒋志刚. 动物行为的实时记录[A]. 中国动物学会主编: 中国动物学研究[C], 北京: 中国林业出版社, 1999. 702 - 707.
- [14] Wasser S K, Monfort S L, Wildt 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.
- [15] 陈玉燕, 张希贤, 赵明杰, 吴丙新. 圈养食蟹 π -之行为模式与繁殖生理研究[J]. 台北动物园学报, 1996, **8**: 1 - 16.
- [16] 袁淑君, 孟庆茂等. 数据统计分析—SPSS/PC+ 原理及其应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1995.
- [17] Herndon J G, Mindi L B, Nordmeyer D L, Turner J J. Seasonal testicular function in male rhesus monkeys[J]. *Hormones and Behavior*, 1996, **30**: 266 - 271.
- [18] 郭大智, 刘显义, 陈发菊, 宋雪华, 王开荣, 邱贤猛, 汤纯香, 张和民, 何廷美, 陈猛, 张贵权. 大熊猫被毛中孕酮、睾酮含量的季节性变化[A]. 成都国际大熊猫保护学术研讨会论文集[C]. 1993. 256 - 259.
- [19] Henricks D M, Mayer D T. Genadal hormone and ulerine factors [A]. In: Cole H H, Cupps P T eds. Reproduction in Domestic Animals[C]. Third edition, Academic Press, 1977.
- [20] Perret M. Environmental and social determinants of sexual function in the male lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*) [J]. *Folia Primatology*, 1992, **59**: 1 - 25.
- [21] Wiebe R H, Williams L E, Abee C R, Yeoman R R, Diamond E J. Seasonal changes in serum dehydroepiandrosterone, androstenedione, and testosterone levels in the squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*) [J]. *American Journal of Primatology*, 1988, **14**: 285 - 291.
- [22] Schiml P A, Mendoza S P, Saltzman W, Lyons D M, Mason W A. Seasonality in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) [J]. *Physiology Behavior*, 1996, **60**: 1105 - 1113.
- [23] Lohiya N K, Scharma R S, Manivannan B, Anand Kumar T C. Reproductive exocrine and endocrine profiles and their seasonality in male langur monkeys (*Presbytis entellus entellus*) [J]. *Journal of Medicine Primatology*, 1998, **27**: 15 - 20.
- [24] Torii R, Nigi H. Hypothalamo-pituitary-testicular function in male Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) in non-mating season [J]. *Jikken Dobutsu*, 1994, **43**: 381 - 387.
- [25] Kinger S, Pal P C, Rajalakshmi M, Kumar P K, Sharma D N, Bajaj J S. Effects of testosterone buciclate on testicular and epididymal spermfunctions in bonnet monkeys[J]. *Contraception*, 1995, **52**: 121 - 127.
- [26] Ketterson E D, Nolan V Jr, Wolf L, Ziegenfus C, Dufty A M Jr, Ball G F, Johnson T S. Testosterone and avian life histories: The effect of experimentally elevated testosterone on corticosterone and body mass in dark-eyed juncos[J]. *Hormone and Behavior*, 1991, **25**: 489 - 503.
- [27] Wingfield J C, Ramenofsky M. Hormonal and environmental control of aggression in birds[A]. In: Gilles R, Balthazart J eds. Neurobiology[C]. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 92 - 104.
- [28] Meisel R L, Sachs B D. The physiology of male sexual behavior [A]. In: Knobil E, Neill J D eds. The Physiology of Reproduction, 2nd ed [C]. New york: Raven Press, 1994. 3 - 105.