

166-171

兽类学报1993, 13(3):166—171

Acta Theriologica Sinica

雌性大熊猫发情期尿中 17β -雌二醇与孕酮水平的变化及其与配种的关系

李复东

(四川大学生物系, 成都, 610024)

彭世媛

(西南财经大学农经室)

叶志勇 何光昕 黄祥明

(成都动物园)

Q959-838

摘 要

本文用放射免疫法测定了3头雌性大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)发情期尿中 17β -雌二醇与孕酮水平的变化。大熊猫的发情行为与尿中 17β -雌二醇浓度的变化密切相关。发情期中, 随着孕酮水平下降的同时雌二醇水平却迅速上升并达峰值(28.2—65.5毫微克/毫克肌酐), 然后再下降到基础水平。性活动最强烈的日期发生在 17β -雌二醇最高峰值的当天或峰后一天。在雌二醇峰后, 尿中孕酮水平逐步升高, 发情后期的孕酮平均值显著高于发情前期($P<0.01$)。

本实验中, 3头大熊猫均妊娠, 说明自然交配或人工授精的适宜时间可根据雌性大熊猫尿中 17β -雌二醇的监测予以确定。

关键词 大熊猫; 发情期; 17β -雌二醇; 孕酮

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国特产珍稀动物, 其繁殖力很低, 成年兽常不能正常进行自然交配, 雌兽发情征状也常不明显。因此, 研究其发情和排卵规律, 掌握人工授精的适宜时间已特别令人关注。

1982年 Bonney 等首次报道了1对雌雄大熊猫在发情期中雌激素和雄激素的含量变化与发情行为的关系; 相继曾国庆等(1984)、Hodges 等(1984)对雌性大熊猫在发情、配种时尿中的雌激素水平作过研究; 近年施少清等(1988)、曾国庆等(1990)报道了雌性大熊猫发情期尿中的性激素与黄体生成素水平。以上作者都意在通过性激素含量变化规律的研究, 以揭示大熊猫的排卵期与配种的适宜时间, 但结果不尽相同。对最适配种时间的建议各有差异。本文于1988—1989年连续两年对3头自然交配和人工授精成功的雌性大熊猫, 用放射免疫法测定发情期尿中 17β -雌二醇与孕酮的含量变化, 对其自然交配行为与激素的关系及适宜配种时间作了探讨。

材料与方 法

1. 实验动物

成都动物园饲养的雌性成年大熊猫3头。大熊猫I号, 15岁, 曾正常产仔7胎。大

本文于1990年8月1日收到, 1992年10月30日收到修改稿。

8311

熊猫Ⅱ号, 7岁, 1986年和1987年配种, 均未孕。大熊猫Ⅲ号, 5岁, 1988年初次配种, 未孕。3头大熊猫在实验期中经自然交配和人工授精后均正常妊娠产仔。

划分大熊猫发情前期, 发情高潮期和发情后期的标准与曾国庆(1984)同, 发情期所显示的发情征状与行为特点与已有的报道相似(刘维新, 1981; 曾国庆等, 1984; 叶志勇, 1984; Hodges等, 1984)。

2. 尿液收集

发情期中每日收集每头动物的新鲜晨尿, 加万分之一的叠氮钠(NaN_3)防腐, 离心后置 -20°C 水箱保存待测。

3. 尿液肌酐测定

根据Folin法(Bernard, 1965), 肌酐在强碱中与苦味酸作用产生橙黄色产物的原理, 用721分光光度计比色测定, 波长520毫微米。肌酐标准曲线范围0.02—0.5毫克/毫升, 标准曲线的批内及批间变异系数分别为2.9%($n=5$)和3.5%($n=6$)。

4. 激素测定

供激素测定的尿样均经 β -葡萄糖苷酸酶水解, 每份尿液加入等体积的 β -葡萄糖苷酸酶液(10国际单位/毫升), 37°C 孵育2小时。尿液中17 β -雌二醇与孕酮含量用放射免疫法测定, 测定药盒由上海市内分泌研究所提供。尿激素均用重蒸纯化后的二氯甲烷提取。17 β -雌二醇与孕酮的批内变异系数分别为5.99%($n=6$)和6.41%($n=6$), 批间变异系数分别为10.83%($n=6$)和13.76%($n=7$)。两种激素的回收率均为95%—108%。雌二醇抗体的交叉反应值: 17 β -雌二醇100%, 雌酮2.5%, 雌二醇1.0%, 皮质醇、皮质酮、孕酮、孕二醇、17-羟孕酮、睾酮、雄酮、雄烷二醇等均小于0.01%。孕酮抗体的交叉反应值: 孕酮100%, 17-羟孕酮2.5%, 皮质酮0.05%, 睾酮0.02%, 皮质醇、醛固酮、雌酮、雌二醇和雌三醇均小于0.01%。

由于不易收集到大熊猫每天24小时的尿总量, 尿液中激素浓度用激素毫微克/毫克肌酐(ng/mgCr)表示, 即每毫升尿样中所含激素量与毫克肌酐量的比值。此法可避免不同收集期的尿液中水分增减变化所造成的误差。

结 果

大熊猫Ⅰ号1989年4月11日开始发情, 22—24日为发情高潮期, 28日发情结束, 共计18天。整个发情期内尿液中17 β -雌二醇与孕酮含量的变化见图1。

由图1可知, 大熊猫Ⅰ号进入发情期后, 随着蹭阴、咩叫, 活动增加、外阴变红等一系列发情行为与发情征状的增强, 17 β -雌二醇水平逐渐上升。未发情时, 17 β -雌二醇含量为0.97毫微克/毫克肌酐。发情前期(4月11—21日)为4.11—14.96毫微克/毫克肌酐, 平均值为7.66毫微克/毫克肌酐。发情高潮期(4月23日)其峰值高达28.24毫微克/毫克肌酐。此时雌兽出现抬尾求偶行为, 咩叫剧增, 但不接受雄兽交配。我们在此日对其做了人工授精。次日(24日), 其发情行为及征状仍十分强烈, 出现咩叫高潮, 接受了雄兽交配, 而17 β -雌二醇则已从峰值下降。4月25日, 进入发情后期, 17 β -雌二醇下降至发情期的最低水平, 发情行为和咩叫显著减少, 雌兽拒绝与雄兽接近。

从图1看出, 进入发情期后, 即4月16—21日的孕酮平均含量为14.10毫微克/毫克肌

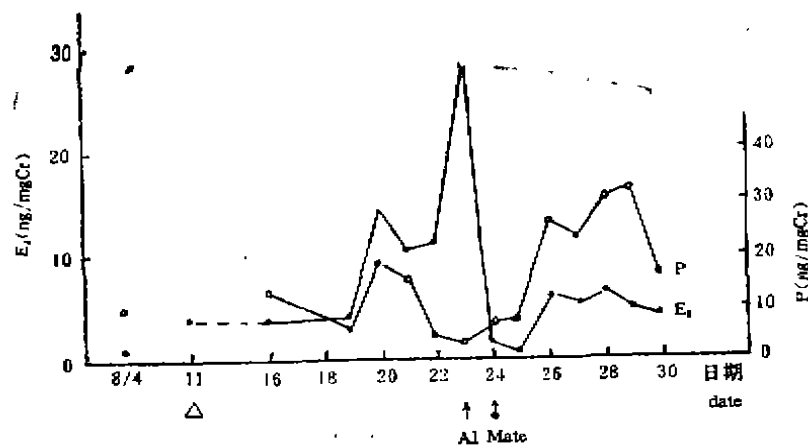


图 1 大熊猫Ⅰ号发情期尿中17β-雌二醇与孕酮的含量变化(1989)

△发情开始; ↑人工授精; ↕自然交配

Fig. 1 The changes to content of urinary 17β-estradiol and progesterone during the estrous cycle of the female panda No. I (1989)

△Beginning of estrus; ↑Artificial fertilization; ↕Natural mating

酮, 较发情前略有增加。发情高潮期(22—24日)孕酮含量下降, 平均值为5.37毫微克/毫克肌酐。26日以后直到发情期结束, 孕酮量明显升高, 平均值为27.80毫微克/毫克肌酐, 显著高于发情期中交配前的水平($P < 0.01$)。

大熊猫Ⅱ号, 1989年4月16日进入发情期, 4月25—27日为发情高潮期, 5月5日发情结束。整个发情期尿液中17β-雌二醇与孕酮含量的变化见图2。

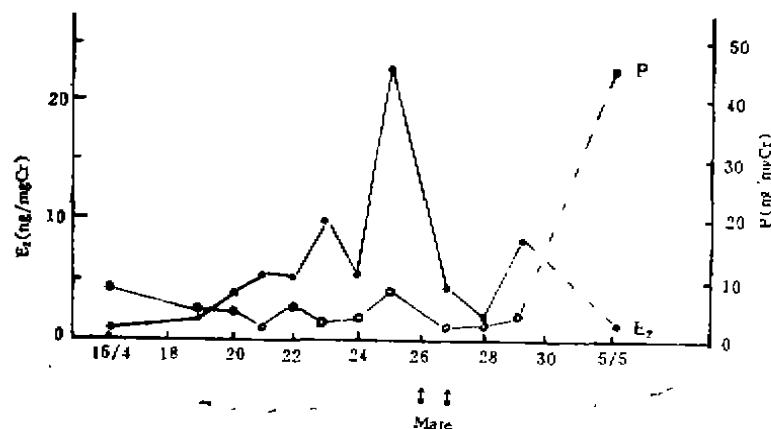


图 2 大熊猫Ⅱ号发情期尿中17β-雌二醇与孕酮的含量变化(1989年)

Fig. 2 The changes of content of urinary 17β-estradiol and progesterone during the estrous cycle of the female panda No. II (1989)

大熊猫Ⅱ号在发情前期(4月16—19日), 尿中17β-雌二醇含量仅略有增高, 除有蹭擦外阴, 活动增加等行为外, 发情特征尚不显著。4月20—24日, 17β-雌二醇含量比前期有显著增加($P < 0.01$), 咩叫、走动、外阴红润等发情行为与征状较强烈。4月25日进入发情高潮期, 发情强烈, 咩叫大增, 17β-雌二醇含量上升到22.63毫微克/毫克肌酐, 但不接受雄兽交配。26日发情行为达最高潮, 雌兽与雄兽完成交配。27日发情

行为仍持续处于高潮,仅咩叫次数稍减,雌兽与雄兽再次发生交配。此时,17 β -雌二醇已从高峰下降至低值4.38毫微克/毫克肌酐。发情高潮期后,28日17 β -雌二醇含量进一步下降,以后又略有回升波动,至发情后期末才接近发情前的水平。

从图2看出,大熊猫Ⅱ号在1989年4月19—29日中的孕酮水平甚低,平均值为4.98毫微克/毫克肌酐,发情后期末则显著升高,达46.34毫微克/毫克肌酐,与发情前期和发情高潮期的孕酮平均值7.30毫微克/毫克肌酐比较,超过6倍。

大熊猫Ⅱ号曾在1988年首次配种,其发情期时间与1989年很接近,从4月15日到5月4日,共计20天,在1988年发情高潮期中出现17 β -雌二醇高峰值(65.5毫微克/毫克肌酐)的同一天(4月27日)发生自然交配,配后正常产仔。在自然交配前3日,曾做过一次人工授精,此时尿中17 β -雌二醇含量仅为10.4毫微克/毫克肌酐,显然并非适宜授精时间。

大熊猫Ⅲ号1989年的发情期为5月10—24日,共15天。发情高潮期是5月15—17日。发情期尿中17 β -雌二醇与孕酮含量的变化见图3。

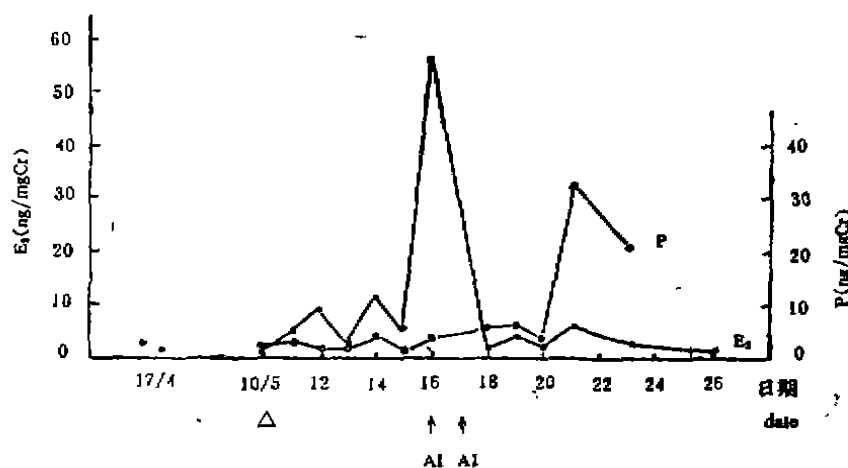


图3 大熊猫Ⅲ号发情期尿中17 β -雌二醇与孕酮含量的变化(1989)

Fig. 3 The changes of content of urinary 17 β -estradiol and progesterone during the estrous cycle of the female panda No. III (1989)

如图3所示,大熊猫Ⅲ号尿中17 β -雌二醇含量在发情开始后逐渐升高。发情开始时为0.95毫微克/毫克肌酐,发情前期末(5月14日)上升到10.62毫微克/毫克肌酐,此时外阴部红润肿大,咩叫增加,发情征状明显。发情高潮期的第2天(5月16日)咩叫骤增,出现快速升高的雌二醇峰,峰值为55.47毫微克/毫克肌酐。在出现雌二醇峰的当日和次日(16—17日)进行了人工授精。18日进入发情后期,咩叫骤减,17 β -雌二醇下降至1.03毫微克/毫克肌酐。以后,除21日有小的上升波动外,随着发情行为与征状的不退,17 β -雌二醇也不断下降,到发情结束时,已降至发情前水平。

大熊猫Ⅲ号尿中孕酮含量在发情前期和发情高潮期都低,平均值为1.93毫微克/毫克肌酐;发情后期显著升高,5月21—23日的孕酮平均值为26.36毫微克/毫克肌酐,与发情前期和发情高潮期比较,差异显著($P < 0.01$)。

讨 论

本实验的3头雌性大熊猫在整个发情期中,尿中17 β -雌二醇含量的变化与发情征

状的出现、发展、消退是一致的。在发情高潮中, 17 β -雌二醇含量迅速升高, 在发情后期, 又逐渐下降到发情前水平。这与Bonney等(1982)、曾国庆等(1984)、Hodges等(1984)和施少清等(1988)的报道相似。

关于雌性大熊猫自然交配时间与其尿中 17 β -雌二醇水平的关系过去曾有报道。如Bonney(1982)与Hodges(1984)先后对华盛顿动物园饲养的 1 头雌性大熊猫的研究, 认为其自然交配的日期是在尿中出现雌激素高峰后的第 2 天, 据此可作为人工授精准确时间的激素监测。曾国庆(1984)报道 1 头雌性大熊猫连续两年的自然交配期是发生在尿中出现雌激素高峰后 1 天; 1990 年再次报道人工授精后产仔的 3 头大熊猫发情期尿中黄体生成素(LH)的峰值是出现在尿中 17 β -雌二醇高峰后的第 1 天, 血中出现 LH 峰值比尿中出现 LH 峰值早一天或同一天, 提出“雌兽血清和尿液中 LH 出现峰值和雌兽接受雄兽交配之日是大熊猫配种的最佳时间”。施少清等(1988)报道福州动物园饲养的雌性大熊猫“青青”1984 年与雄兽交配的日期在尿中出现雌二醇及黄体生成素高峰的同一天, 并不是在雌二醇高峰出现后的第 1—2 天, 他认为黄体生成素高峰值出现时即有成熟卵子排出, 此时“青青”主动接受交配, 可以为人工授精选择最佳时机提供科学根据。

以上作者对大熊猫发情及自然交配时间与尿中雌激素或雌二醇高峰的关系分别报道了三种情况: 自然交配与雌二醇高峰出现在同一天; 在雌二醇高峰后一天; 在雌激素高峰后第二天。但其中只有曾国庆(1984)报道其自然交配后的大熊猫配种成功。本文所报道的 3 头雌性大熊猫中, 2 头自然交配, 1 头连续 2 天人工授精, 皆正常产仔, 说明其发情正常, 配种适时。证实自然交配的时间系发生在发情高潮期尿中出现 17 β -雌二醇高峰的同一天或后一天, 在其高峰后的第 2 天, 雌兽一般即拒绝与雄兽接近。Hodges等(1984)曾报道马德里动物园 1 头大熊猫, 在出现雌激素高峰的当天和雌激素峰后的 1—2 天, 连续 3 天人工授精, 获得成功, 他将人工授精时间视为妊娠开始日期。

不同种类的动物从其发情开始到排卵的时间以及雌激素峰和黄体生成素峰与排卵的时距都各有差异, 雌激素峰与黄体生成素峰可与交配行为为发生在同一天或不在同一天。排卵时间, 啮齿动物在 LH 峰后 12—15 小时。人工授精的受孕率, 因授精时间不同, 差别很大(Hugh, 1980; Short, 1978; William, 1977)。目前关于大熊猫确切的排卵规律及精子在雌性生殖道内的运行时间、存活时间等尚缺乏足够的了解, 因此大熊猫的最适配种时间还需要继续深入研究。根据现有的实验结果, 我们认为采取激素监测, 在发情高潮期出现雌二醇高峰的当日和次日连续进行人工授精的措施是值得推荐的。

大熊猫在正常发情期中, 尿中孕酮含量总是在发情后期升高, 显著超过发情开始以来的水平, 显示出排卵后黄体形成的特点, 可作为已发生排卵的一项激素指标。对大熊猫生殖规律的了解, 目前特别需要向生殖生理方面拓展, 积累数据, 深入研究。

参 考 文 献

- 刘维新. 1981. 大熊猫人工授精的几个问题. 畜牧兽医学报, 12(2):73—76.
叶志勇. 1984. 大熊猫的性行为的初步观察. 动物学杂志, (1):11—12.
施少清, 董琳, 陈玉村, 冯丹丹. 1988. 大熊猫雌性个体发情期生殖内分泌变化的研究. 兽类学报, 8(1): 1—6.
曾国庆, 孟智斌, 蒋广泰, 何光昕, 徐启明. 1984. 大熊猫雌兽发情期尿中雌激素含量变化和发情行为的关系. 动物学报, 30(4):324—329.
曾国庆, 蒋广泰, 杨克勤, 刘维新, 谢钟, 刘农林. 1990. 大熊猫生殖生物学研究. I 大熊猫发情期血清和尿液中促黄体素、孕酮和 17 β -雌二醇含量的变化. 动物学报, 36(1):63—69.

- 袁其晓, 孙耘田译(Hafez 主编). 1985. 人类生殖—受孕与避孕. 北京: 人民卫生出版社, 203—205.
- Bonney R C, Wood D J, Kleiman DG. 1982. Endocrine correlates of behavioural oestrus in the female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and associated hormonal changes in the male. *J Reprod Fert*, 64:208—216.
- Bernard L O (ed). 1965. Hawk's physiological chemistry. McGraw-Hill Inc. New York, 1233—1237.
- Hodges J K, Bevan D J, Celma M C, Hearn J P, Jones D M, Kleiman, D G, Knight J A, Moore H D M. 1984. Aspects of the reproductive endocrinology female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in captivity with special reference to the detection of ovulation and pregnancy. *J Zool Lond*, 203:253—267.
- Hugh D. 1980. Introduction to physiology. London: Academic Press, 5:56—88.
- Short R V. 1978. Role of hormones in sex cycles. In: Austin C R, Sort R V, editors. Hormones in reproduction. London: Cambridge University press, 42—71.
- William H, Montes K. 1977. Female reproductive processes. In: Melvin J, Swenson, editors. Physiology of domestic animals (9th ed) London, Vail-Ballou press, 781—784.

CHANGES OF URINARY 17β -ESTRADIOL AND PROG- ESTERONE LEVELS IN FEMALE GIANT PANDAS DURING OESTRUS AND ITS RELATION WITH BREEDING

LI Fudong

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu, 610024)

PENG Shiyuan

(Department of Agricultural Technique, Southwestern University
of Finance and Economics)

YE Zhiyong HE Guangxin HUANG Xiangming

(Chengdu Zoo)

Abstract

The changes of urinary 17β -estradiol and progesterone levels of 3 female giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) during oestrus were determined by using radioimmunoassay

It is clear that the variation of their estrus behaviours is closely associated with the content of 17β -estradiol. During oestrus, the decline in the level of urinary progesterone is accompanied by rapid rise of the 17β -estradiol levels up to the peak value (28.2—65.5 mu/mg creatinine), and then fall to the baseline level. The date of the maximum sexual activity or natural mating occurs one day after that of the urinary estradiol peak or on that same day.

After estradiol peak, the urinary progesterone level apparently increases, the mean value of progesterone of metestrus is significantly higher ($p < 0.01$) than that of proestrus.

The successfully fertile mating of the 3 giant pandas in this experiment indicates that the suitable time of natural mating or artificial insemination can be achieved by monitoring urinary estradiol in females.

The relationship between the hormone and the mating behavior of giant pandas has been discussed.

Key words Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) 17β -estradiol; Progesterone, Oestrus