

短尾猴粪便雌二醇和孕酮处理与提取方法比较

李静宇^{①②} 张启信^{①②} 黄明竟^{①②} 夏东坡^{②④} 李进华^{①②③*}

① 安徽大学资源与环境工程学院 合肥 230601; ② 黄山生物多样性与短尾猴行为生态学国际联合研究中心 合肥 230601;

③ 合肥师范学院生命科学学院 合肥 230601; ④ 安徽大学生命科学学院 合肥 230601

摘要: 非损伤性的粪便样本已在监测动物性激素水平中得到广泛应用, 但粪便处理和激素的提取方法在不同物种中因其食性与代谢不同具有明显的物种特异性。本研究以野生和笼养两种环境下的短尾猴 (*Macaca thibetana*) 为研究对象, 采集粪便样品, 利用放射免疫法 (RIA) 检测激素含量, 比较不同粪便处理方式 (湿便法、冷冻干燥粉碎法、冷冻干燥研筛法) 和激素提取方法 (乙醇加热法、甲醇乙醚法、乙醇丙酮法、甲醇乙醇法) 的效果, 探讨不同取食条件下短尾猴雌二醇 (E₂) 和孕酮 (P₄) 水平的最佳测定方法。粪便不同处理方法的比较中, 冷冻干燥研筛法测得雌二醇和孕酮含量最高, 冷冻干燥研筛法与冷冻干燥粉碎法在野生短尾猴中具有显著差异 ($P < 0.01$), 但在笼养短尾猴中无显著差异 ($P > 0.05$)。湿便法测得含量最低, 与另两种处理方法均具有显著差异性 ($P < 0.01$)。激素提取方法的比较中, 乙醇加热法提取雌二醇和孕酮含量最高, 与甲醇乙醚法 ($P < 0.01$)、乙醇丙酮法 ($P < 0.01$)、甲醇乙醇法 ($P < 0.01$) 之间均具有显著性差异。综合考虑激素平均含量、处理过程的简便性、抽提步骤的可行性, 野生短尾猴粪便处理建议选用冷冻干燥研筛法, 笼养短尾猴粪便由于冷冻干燥粉碎法操作简便且与冷冻干燥研筛法无显著差异, 因此笼养短尾猴建议选用冷冻干燥粉碎法。野生与笼养短尾猴粪便激素的提取均建议采用乙醇加热法。

关键词: 短尾猴; 粪便; 雌二醇; 孕酮; 乙醇加热法

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 02-247-08

Fecal Treatment and Extraction of Estradiol and Progesterone in Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*): Comparison among Different Approaches

LI Jing-Yu^{①②} ZHANG Qi-Xin^{①②} HUANG Ming-Jing^{①②} XIA Dong-Po^{②④} LI Jin-Hua^{①②③*}

① School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601;

② International Collaborative Research Center for Huangshan Biodiversity and Tibetan Macaque Behavioral Ecology, Hefei 230601;

③ School of Life Sciences, Hefei Normal University, Hefei 230601; ④ School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31672307, 31971404), 安徽省中央引导地方科技发展专项 (No. 2019b11030018);

* 通讯作者, E-mail: jhli@ahu.edu.cn;

第一作者介绍 李静宇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 行为生态学; E-mail: jyl7991@163.com。

收稿日期: 2020-06-08, 修回日期: 2020-12-17 DOI: 10.13859/j.cjz.202102010

Abstract: Non-invasive fecal samples have been widely used in monitoring animal sex hormone levels, but fecal treatment and hormone extraction need obvious species-specific manipulations in different species due to their different feeding habits and metabolism. In this study, we used wild and captive macaque (*Macaca thibetana*) to collect feces samples, and the contents of hormones were detected by using radiation immunoassay (RIA) after feces had been treated differently (wet feces, freeze-dried crushed feces, freeze-dried sifted feces) and the hormones had been extracted by various approaches (ethanol-heating method, methanol-ether method, ethanol-acetone method, methanol-ethanol method), in order to find optimal methods for detecting estradiol (E_2) and progesterone (P_4) levels in macaques under different feeding conditions. The data were analyzed using Two-Simple-Wilcoxon test. The results showed that the contents of estradiol and progesterone were the highest in feces treated by freeze-drying sifting method (Fig.1). There was significant difference in results between freeze-drying sifting method and freeze-drying crushing method in wild macaques ($P < 0.01$, Fig. 2), but there was no significant difference in captive macaques ($P > 0.05$, Fig. 2). The content of hormone in wet feces treatment was the lowest, which was significantly different from the other two treatment methods ($P < 0.01$, Fig. 1); the content of E_2 and P_4 extracted by ethanol-heating method was the highest (Table 1), which was significantly different from that of methanol-ether method ($P < 0.01$, Table 3), ethanol-acetone method ($P < 0.01$, Table 1) or methanol-ethanol method ($P < 0.01$, Table 1); Considering the average content of hormones, the simplicity of treatment process and the feasibility of extraction steps, it is recommended to use freeze-drying sifting method for the treatment of wild macaque feces. As the freeze-drying crushing method is easy to operate and there is no significant difference between the two methods, the freeze-drying crushing method is recommended for captive macaque feces. Ethanol-heating method is recommended for the extraction of fecal hormones from wild and captive macaque.

Key words: Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*); Feces; Estradiol; Progesterone; Ethanol-heating method

动物行为的发生与内分泌的调控紧密相关,近年来,非损伤性样本已取代血液成为监测野生动物激素分泌水平的重要且有效的实验材料(Cross et al. 2004, Weingrill et al. 2011),其中粪便因运输方便、保存时效、获取难度等优于尿液与唾液而被广泛使用(Beehner et al. 2004, Xia et al. 2015)。然而,粪便中激素的代谢具有一定的滞后性(Wasser 1988),其测得激素分泌高峰常呈现与血液不一致的现象(Wasser et al. 1993),加之不同的粪便处理方式与激素提取方法,往往导致测得的激素含量产生较大差异。如何选取合适的实验方法,在开展野生动物行为生理研究中起着至关重要的作用。

动物的繁殖行为一般受雌性发情周期的影响(阎彩娥等 2003, Blanco et al. 2010),了解

雌性动物排卵周期、孕期等基础资料能够进一步研究其繁殖策略及行为机制。尤其对无明显性皮肿胀且倾向于隐蔽排卵的物种,借助粪便监测雌性性激素分泌水平,可以为评估其繁殖状态提供更多可靠证据。但粪便的处理方式以及最佳的激素提取方法在饮食代谢不同、胃肠道微生物组成不同的物种中并不通用,存在着较强的物种特异性(Heistermann et al. 1995, 王慧平等 2005),甚至同一种属不同物种间也具有较大差异(黎嘉欣等 2018)。在应用激素监测野生动物的生理状况时,任何保存提取方法都需要在所研究的物种中进行验证(Nugraha et al. 2017)。

短尾猴(*Macaca thibetana*)是我国II级保护野生动物,隶属灵长目(Priamtes)猴科

(Cercopithecidae) 猕猴属, 以往对黄山的短尾猴种群家域大小 (Li et al. 2005)、社会行为 (Jiang et al. 2019)、食性 (尤硕愚等 2013)、肠道微生物 (Sun et al. 2016) 组成等展开了一系列的研究。在应用粪便监测其雌性性激素水平的研究中缺乏可靠的方法支撑。因此, 本研究对短尾猴粪便样品进行了 3 种方式处理, 并选取了 4 种常用抽提方法, 分别提取黄山野生短尾猴和铜陵笼养短尾猴粪便样品中雌二醇 (estradiol, E_2) 与孕酮 (progesterone, P_4), 使用放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 检测含量。通过比较, 寻找简便快捷有效的实验方法, 以适用于大批量样品的处理, 用于短尾猴粪便样品中雌二醇与孕酮水平的监测, 以期为该物种行为内分泌的研究提供技术保障和方法支撑, 同时为进一步对野生短尾猴种群行为机制的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 研究对象及研究地点

本研究于 2019 年 8 至 10 月, 选取安徽省黄山风景区南麓浮溪野生猴谷 (30°29' N, 118°10' E) 5 只成年雌性野生短尾猴个体及铜陵市十里长冲动物园 5 只成年雌性笼养短尾猴个体为研究对象, 所有个体均能依据其自然特征准确识别 (李进华 1999)。实验期间野生猴群主要采食野外自然生长植物的茎、叶、花与果实等, 粪便呈深绿色, 含较多纤维物质; 笼养猴群主要食物为玉米, 粪便呈黄色。

1.2 粪便样品采集及处理

野外每天跟踪野生猴群, 当发现目标动物排便后, 迅速用一次性无菌手套收集未沾取尿液、雨水的完整新鲜粪便样品, 去除石块、泥土、草屑等杂物后放入 50 ml 样品瓶中, 标记日期、时间、个体名称并用冰盒暂时保存。在 3 h 内带到实验基地进行分组处理, 将每个样品充分混匀后分 3 部分, 分别编组为湿便法处理组、冷冻干燥粉碎法处理组和冷冻干燥研筛法处理组。3 组分别称取湿重数据后不添加任何

试剂立即放入 -20 °C 冰箱冷冻保存, 以保证粪样激素含量的稳定。笼养猴群每日 6:00 时待工作人员清理地面后进行采集, 采集要求与处理方法同野生猴群。野生和笼养个体各 5 只, 每只采集 2 份粪便样本, 共 20 份。湿便法处理组直接提取检测, 冷冻干燥粉碎法处理组和冷冻干燥研筛法处理组使用冷冻干燥机 -50 °C 冷冻干燥 24 h, 记录干重后, 冷冻干燥粉碎法处理组使用小型粉碎机充分粉碎, 粉碎后粉末放入 10 ml 离心管保存; 冷冻干燥研筛法处理组用 0.03 mm 筛网研磨筛除未消化的种子草屑等杂质, 研磨后样品放入 10 ml 离心管中保存。

1.3 粪便雌二醇与孕酮抽提

参照其他非人灵长类动物粪便激素提取与改良的相关研究 (Heistermann et al. 1995, 范鹏来等 2013, 王慧平等 2005, Wasser et al. 1994), 选取了 4 种常用的抽提方法, 分别对 3 组粪便样本进行抽提。

1.3.1 甲醇乙醚法 湿便法处理组称取 0.5 g (精确到 0.01 g, 下同) 粪便, 均质化处理后加入 90% 甲醇 5 ml, 涡旋涡振 15 min, 4 °C 下 4 000 r/min 离心 15 min, 离心后取上清液, 蒸发至 0.5 ml 后加入 5 ml 乙醚, 60 °C 水浴直至蒸干, 加入 1 ml 甲醇, 涡振复溶 3 min, 制成待测液于 -20 °C 冷冻保存待测。冷冻干燥粉碎法处理组与冷冻干燥研筛法处理组称取 0.1 g 干燥粪便粉末, 其余步骤相同。

1.3.2 甲醇乙醇法 湿便法处理组称取 0.5 g 粪便进行均质化处理后, 加入 1 ml 双蒸水, 加入 1 ml 无水乙醇, 涡振 2 min 后静置 2 h, 再次涡振 10 min, 4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min, 取出上清液 1 ml, 加入 2 ml 甲醇至原沉淀离心管中, 涡振 2 min 后静置 2 h, 涡振 10 min, 同法离心后取上清液 2 ml, 合并两次的上清液, 水浴锅 60 °C 水浴直至蒸干, 加入 1 ml 甲醇, 涡振复溶 3 min, 制成待测液于 -20 °C 冷冻保存待测。冷冻干燥粉碎法处理组与冷冻干燥研筛法处理组称取 0.1 g 干燥粪便粉末, 其余步骤相同。

1.3.3 乙醇丙酮法 湿便法处理组称取 0.5 g 粪便进行均质化处理后, 加入比例 4 ml 乙醇和 1 ml 丙酮, 涡振 15 min, 4 °C 下 4 600 r/min 离心 15 min, 取 3 ml 上清液, 原沉淀管中再加入 80%乙醇 2.5 ml, 涡振 5 min, 同法离心后取上清液 2 ml, 合并两次上清液 60 °C 水浴蒸干至 1.5 ml, 加入 0.5 ml 蒸馏水, 继续蒸至 0.5 ml, 加入 2.5 ml 乙醚, 涡振 1 min, 静置 20 min, 取 2 ml 乙醚继续蒸干, 加入 1 ml 甲醇, 涡振复溶 3 min, 制成待测液于 -20 °C 冷冻保存待测。冷冻干燥粉碎法处理组与冷冻干燥研筛法处理组称取 0.1 g 干燥粪便粉末, 其余步骤相同。

1.3.4 乙醇加热法 湿便法处理组称取 0.5 g 粪便进行均质化处理后, 加入 80%乙醇 5 ml, 涡振 10 min, 70 °C 水浴 20 min, 4 °C 下 4 600 r/min 离心 15 min, 取 3 ml 上清液。原沉淀管中再加入 80%乙醇 2.5 ml, 振荡 10 min, 同法离心后取 2 ml 上清液。合并两次上清液, 60 °C 水浴蒸发干燥后加入 1 ml 甲醇, 涡振复溶 3 min, 制成待测液于 -20 °C 冷冻保存待测。冷冻干燥粉碎法处理组与冷冻干燥研筛法处理组称取 0.1 g 干燥粪便粉末, 其余步骤相同。

1.4 粪便中雌二醇与孕酮含量测定

采用放射免疫分析法 (RIA) 测定雌二醇 (E_2) 与孕酮 (P_4) 含量, 每个样品重复测定 2 次, 两次数值相差较大时, 则进行第 3 次测定, 保留相近的两组。试剂盒购于北京福瑞生物技术公司, 使用西安核仪器厂所产 XH-6080 γ 放射免疫分析仪测定含量。

雌二醇 (E_2) 试剂盒具体参数如下。标准范围: 5 ~ 1 000 ng/L; 灵敏度: 用零校准品稀释高浓度雌二醇的敏感度为 0.5 ng/L; 精密密度: 批内变异系数小于 10%, 批间变异系数小于 15%; 特异性: 抗体与下列类似物的交叉反应率分别为雌三醇 0.016%、孕酮小于 0.01%、睾酮 0.01%。

孕酮 (P_4) 试剂盒具体参数如下。标准范围 0 ~ 100) μ g/L; 灵敏度小于 0.05 μ g/L; 精

密度: 批内变异系数小于 7%, 批间变异系数小于 10%; 特异性: 抗体与下列类似物的交叉反应率分别为孕烯醇酮小于 0.03%、雄稀二酮小于 0.01%、雌二醇 0.01%。

1.5 数据统计与分析

最终激素含量根据每份样品去除水分前后的重量计算含水率, 统一转换为干重 0.1 g 所含含量。利用 Excel 和 SPSS 22.0 软件统计和分析数据, 借助 Origin Pro 8.0 绘图。One sample Kolmogorov-Smirnov test 检验数据是否符合正态分布, 正态分布数据进行 Paired-Samples T Test 检验, 非正态分布数据采用 Two-Simple-Wilcoxon 检验。显著性水平设为 $\alpha = 0.05$, 极显著性水平设为 $\alpha = 0.01$ 。

2 结果

2.1 粪便雌二醇与孕酮处理方法的比较

粪便雌二醇与孕酮均使用冷冻干燥研筛法处理所测得含量最高。雌二醇含量使用冷冻干燥研筛法与湿便法直接处理具有极显著差异 ($P < 0.01$), 与冷冻干燥粉碎法具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 1a); 孕酮含量使用冷冻干燥研筛法与湿便法和冷冻干燥粉碎法均具有极显著差异 ($P < 0.01$) (图 1b)。

不同取食环境下粪便中高纤维杂质含量明显不同, 笼养短尾猴粪便纤维成分较野生短尾猴偏少, 可能会使粪便处理结果产生差异。因此, 对笼养与野生个体粪便数据分开进行分析。结果表明, 笼养状态下, 冷冻干燥研筛法处理雌二醇与孕酮激素含量与冷冻干燥粉碎法无显著差异 ($P > 0.05$, 图 2a, b), 两种粪便处理保存方式均可选择; 野生状态下短尾猴粪便使用冷冻干燥研筛法与冷冻干燥粉碎法处理具有显著差异性 ($P < 0.01$), 冷冻干燥粉碎法两种激素含量均明显偏低 (图 2c, d), 野生短尾猴粪便在选取处理方法时需要考虑到粪便中高纤维杂质在处理过程中对激素含量的影响, 针对野生短尾猴更适用选取冷冻干燥研筛法处理粪便样品。

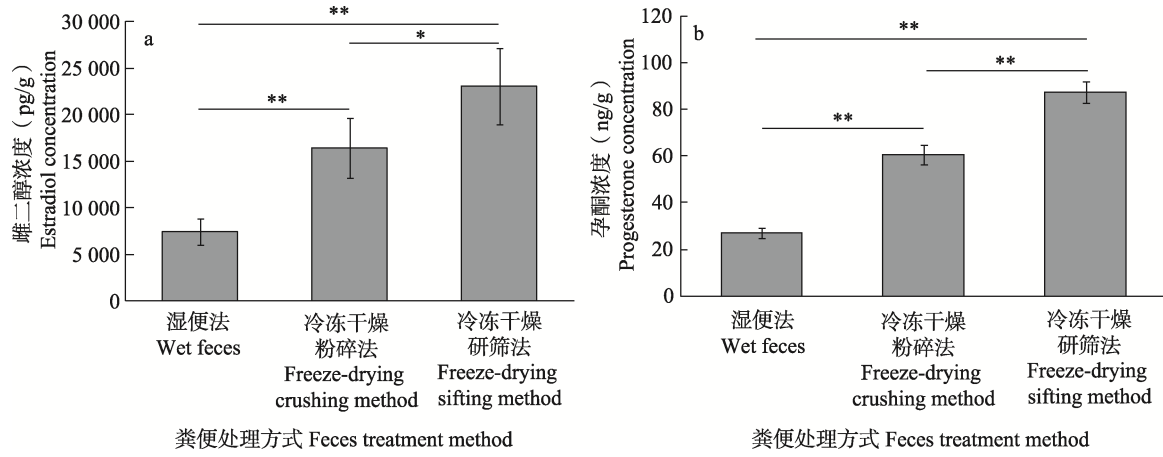


图 1 不同粪便处理方式激素含量比较

Fig. 1 Comparison of hormone contents among different fecal treatment methods

a. 雌二醇; b. 孕酮; $n = 20$, 平均值 \pm 标准误。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

a. Estradiol; b. Progesterone; $n = 20$, Mean \pm SE.

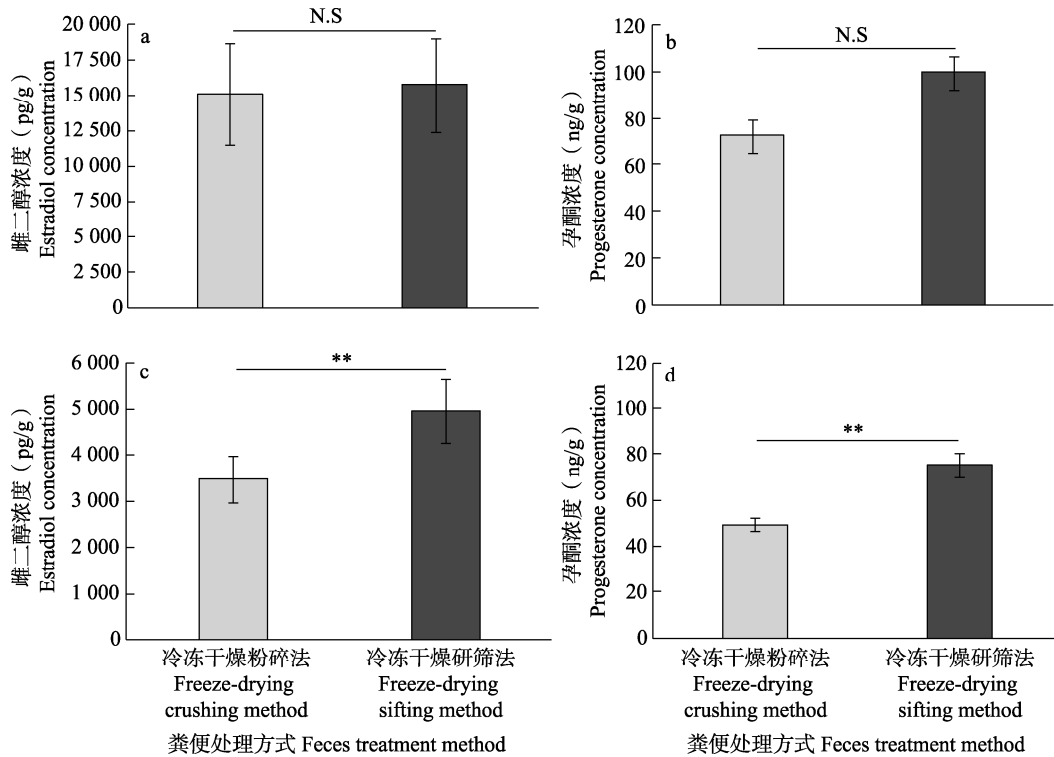


图 2 不同取食环境下的短尾猴粪便处理方式比较

Fig. 2 Comparison of fecal treatment methods between wild macaques and captive macaques

a. 笼养短尾猴雌二醇; b. 笼养短尾猴孕酮含量; c. 野生短尾猴雌二醇含量; d. 野生短尾猴孕酮含量; $n = 20$, 平均值 \pm 标准误。N.S 无显著差异, ** $P < 0.01$

a. Estradiol content in captive macaques; b. Progesterone content in captive macaques; c. Estradiol content in wild macaques; d. Progesterone content in wild macaques; $n = 20$, Mean \pm SE. N.S means no significant difference, ** $P < 0.01$

2.2 粪便雌二醇与孕酮抽提方法的比较

雌二醇抽提结果显示, 乙醇加热法提取 E_2 平均含量最高(表 1), 与甲醇乙醚法($Z = -5.986$, $n = 20$, $P < 0.01$)、乙醇丙酮法($Z = -6.162$, $n = 20$, $P < 0.01$) 和甲醇乙醇法($Z = -5.433$, $n = 20$, $P < 0.01$) 均具有极显著差异性。甲醇乙醇法与甲醇乙醚法($Z = -1.082$, $n = 20$, $P > 0.05$) 无显著差异性, 与乙醇丙酮法($Z = -3.725$, $n = 20$, $P < 0.01$) 具有极显著差异性; 甲醇乙醚法与乙醇丙酮法($Z = -1.524$, $n = 20$, $P > 0.05$) 无显著差异性。

孕酮抽提结果显示, 仍为乙醇加热法提取 P_4 平均含量最高(表 1), 与甲醇乙醚法($Z = -6.173$, $n = 20$, $P < 0.01$)、乙醇丙酮法($Z = -5.621$, $n = 20$, $P < 0.01$) 和甲醇乙醇法($Z = -4.303$, $n = 20$, $P < 0.01$) 具有极显著差异性; 甲醇乙醇法与甲醇乙醚法($Z = -4.204$, $n = 20$, $P < 0.01$) 及乙醇丙酮法($Z = -2.923$, $n = 20$, $P < 0.05$) 具有显著差异性; 甲醇乙醚法与乙醇丙酮法($Z = -0.133$, $n = 20$, $P > 0.05$) 无明显差异性。综合比较, 短尾猴粪便中孕酮抽提选取乙醇加热法较其他三种方法提取含量更高、效果更好。

3 讨论

3.1 粪便处理方式对雌二醇与孕酮激素含量的影响

本研究对短尾猴粪便处理的实验结果显示, 粪便中雌二醇与孕酮均采用冷冻干燥研筛法处理含量最高。但野生与笼养个体粪便处理方法的比较略有差别, 野生短尾猴粪便冷冻干

燥研筛法处理与冷冻干燥粉碎法具有显著差异, 而笼养短尾猴粪便两种处理方法无明显差别。两种处理方式是否具有显著差异可能与动物取食食物的纤维含量相关, 冷冻干燥粉碎法是全部粪样进入激素抽提的过程, 而冷冻干燥研筛法则去除了激素含量少的粗糙成分, 相当于含激素少的杂质被去除, 样本量减少了。在本研究中, 笼养短尾猴与野生短尾猴相比, 食物含粗糙纤维成分少, 因而粪便去除粗糙杂质后, 两种处理方法样本质量无明显差别, 因此激素含量也不存在显著差异。而野生短尾猴由于所食食物粗糙纤维较多, 采用冷冻干燥粉碎法处理的粪便中含激素较少的杂质成分占比则较大, 与冷冻干燥研筛法所测得的激素含量就会产生较大差异。不同灵长类物种取食食物的纤维含量与其生存环境相关(韦华 2007, 赵卫东等 2009, 黄中豪等 2010), 无论是野生还是笼养, 测定物种激素水平的粪便处理方法应根据物种所取食食物的特点进行选择。

另一方面, 食物纤维会增加排粪量, 粗糙的纤维会从肠道表层带走更多含激素的黏液, 对激素含量也具有显著影响(Goymann 2005, Busso et al. 2007)。比如, Dantzer 等(2011)对两组红松鼠(*Tamiasciurus hudsonicus*)的控制实验显示, 喂食云杉种子组(纤维素含量 19.8%)其粪便中的皮质醇激素及雄激素含量均有显著提高, 而喂食花生酱组(纤维素含量 6.6%)其粪便中的皮质醇含量显著降低, 雄激素含量也有所下降。此外, 在大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)粪便表层与内部类固醇激素的含量比较中, 发现粪便表层的雌二醇含量偏高,

表 1 不同提取方法粪样激素含量测定结果(平均值 ± 标准误)

Table 1 Results of fecal hormone content determination by different extraction methods (Mean ± SE)

激素 Hormone	样本量 Samples	乙醇加热法 Ethanol-heating method	甲醇乙醚法 Methanol-ether method	乙醇丙酮法 Ethanol-acetone method	甲醇乙醇法 Methanol-ethanol method
雌二醇 Estradiol (pg/g)	20	18 254.33 ± 3 776.60 ^a	12 668.72 ± 2 535.69 ^{bc}	11 579.32 ± 2 577.14 ^c	14 583.71 ± 3 174.90 ^b
孕酮 Progesterone (ng/g)	20	76.78 ± 6.25 ^a	48.10 ± 4.17 ^c	49.51 ± 4.35 ^c	59.70 ± 5.56 ^b

每列中含有不同上标的数据间存在显著差异性 ($P < 0.05$)。

There are significant differences between the data with different superscripts in each column, $P < 0.05$.

与粪便内部的雌二醇含量具有显著差异性（于小杰等 2010）。而雌性东北虎（*Panthera tigris altaica*）和华南虎（*P. t. amoyensis*）的粪便表层与粪便的内部雌激素含量却无显著差异（傅文源 2018）。其原因在于，大熊猫主要取食竹子，而东北虎与华南虎的主要食物为高蛋白肉类，竹子消化后产生的高纤维物质使得大熊猫粪便表层经过肠道时能够带走更多含激素较多的黏液，从而造成粪便表层激素含量与粪便内部激素含量具有较大差异性（于小杰等 2010）。这也进一步说明，在研究粪便类固醇激素处理方式时，所研究物种的取食环境和粪便状态不可忽视。

3.2 粪便雌二醇与孕酮的抽提

物种的特异性使粪便中类固醇激素的抽提方法不具有统一适用性，甚至同种属不同物种之间提取方法也具有差异。乙醇丙酮法对川金丝猴（*Rhinopithecus roxellana*）粪便激素的提取效果较好（王慧平等 2005），但对滇金丝猴（*R. bieti*）粪便中激素提取效果却极不理想（黎家欣等 2018）。甲醇乙醚法在长尾叶猴（*Semnopithecus entellus*）粪便中抽提雌二醇与孕酮，回收率可达到 83%~89%（Heistermann et al. 1995），但甲醇乙醚法在本研究中对短尾猴雌二醇与孕酮的抽提结果含量却明显偏低。这也表明在选择实验方法检测不同物种粪便中的激素含量时，应考虑物种特异性所带来的影响，保证检测结果的准确性，避免资源和精力的浪费。

致谢 本研究得到了黄山风景区园林局的大力支持，野外工作得到黄山野生猴谷管理中心和野外研究基地房东程海滨全家的帮助。野外采样得到李标标、王通同学的协助，在此一并表示由衷的感谢。

参 考 文 献

Beehner J C, Whitten P L. 2004. Modifications of a field method for fecal steroid analysis in baboons. *Physiology & Behavior*, 82(2/3): 269–277.

- Blanco M B, Meyer J S. 2010. Assessing reproductive profiles in female brown mouse lemurs (*Microcebus rufus*) from Ranomafana National Park, southeast Madagascar, using fecal hormone analysis. *American Journal of Primatology*, 71(6): 439–446.
- Busso J M, Ponzio M F, Cuneo M F D, et al. 2007. Noninvasive monitoring of ovarian endocrine activity in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *General & Comparative Endocrinology*, 150(2): 288–297.
- Cross N, Pines M K, Rogers L J. 2004. Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and effect of behavioural stress. *American Journal of Primatology*, 62(2): 107–114.
- Dantzer B, Mcadam A G, Palme R. 2011. How does diet affect fecal steroid hormone metabolite concentrations? An experimental examination in red squirrels. *General and Comparative Endocrinology*, 174(2): 124–131.
- Goymann W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046: 35–53.
- Heistermann M, Finke M, Hodges J K. 1995. Assessment of female reproductive status in captive-housed hanuman langurs (*Presbytis entellus*) by measurement of urinary and fecal steroid excretion patterns. *American Journal of Primatology*, 37(4): 275–284.
- Jiang Q, Xia D P, Wang X. 2019. Interchange between grooming and infant handling in female Tibetan macaques (*Macaca thibetana*). *Zoological Research*, 41(2): 139–145.
- Li J H, Yin H B, Wang Q S. 2005. Seasonality of reproduction and sexual activity in female Tibetan macaques (*Macaca thibetana*) at Huangshan, China. *Acta Zoologica Sinica*, 51(3): 365–375.
- Nugraha T P, Heistermann M, Agil M, et al. 2017. Validation of a field-friendly extraction and storage method to monitor fecal steroid metabolites in wild orangutans. *Primates*, 58(2): 1–10.
- Sun B H, Wang X, Bernstein S F. 2016. Marked variation between winter and spring gut microbiota in free-ranging Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*). *Scientific Reports*, 37(6): 26–35.
- Wasser S K. 1988. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 39(4): 862–872.

- Wasser S K, Monfort S L, Southers J. 1994. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *Reproduction*, 101(1): 213–220.
- Wasser S K, Thomas R, Nair P P, et al. 1993. Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *Reproduction*, 97(2): 569–574.
- Weingrill T, Willems E P, Zimmermann N, et al. 2011. Species-specific patterns in fecal glucocorticoid and androgen levels in zoo-living orangutans (*Pongo* spp.). *General and Comparative Endocrinology*, 172(3): 446–457.
- Xia D P, Li J H, Sun B H. 2015. Evaluation of fecal testosterone, rank and copulatory behavior in wild male *Macaca thibetana* at Huangshan, China. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(5): 1445–1454.
- 范鹏来, 陈浩春, 姚辉, 等. 2013. 神农架川金丝猴粪便和尿液中类固醇激素的检测. *兽类学报*, 33(3): 286–292.
- 傅文源. 2018. 虎粪便类固醇激素检测及影响因素的评估. *野生动物学报*, 39(2): 271–276.
- 黄中豪, 黄乘明, 周岐海, 等. 2010. 黑叶猴食物组成及其季节性变化. *生态学报*, 30(20): 5501–5508.
- 黎嘉欣, 杨秋立, 普天春. 2018. 滇金丝猴粪便类固醇激素抽提及检测方法评估. *野生动物学报*, 39(3): 507–512.
- 李进华. 1999. 野生短尾猴的社会. 安徽: 安徽大学出版社, 49–52.
- 王慧平, 高云芳, 张新利. 2005. 川金丝猴粪尿中类固醇性激素抽提方法比较. *兽类学报*, 25(3): 297–301.
- 韦华. 2007. 弄岗熊猴 (*Macaca assamensis*) 的食性、活动节律和活动时间分配. 广西: 广西师范大学硕士学位论文, 28–30.
- 阎彩娥, 蒋志刚, 李春旺, 等. 2003. 雌性川金丝猴的邀配行为与尿液雌二醇水平的关系. *动物学报*, 49(6): 736–741.
- 尤硕愚, 尹华宝, 张士振. 2013. 黄山短尾猴 (*Macaca thibetana*) 的主要食性分析. *生物学杂志*, 30(5): 64–67.
- 于小杰, 胡德夫, 唐勇清. 2010. 大熊猫粪团表层和内部类固醇激素含量比较. *经济动物学报*, 14(4): 187–189.
- 赵卫东, 杨佩芳, 沈永生, 等. 2009. 白马雪山自然保护区南部塔城地区滇金丝猴食性及食物资源调查. *动物学杂志*, 44(3): 49–56.