

粪尿类固醇物质监测野生动物 繁殖状态研究进展

张 家 骅

(西北农业大学家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室 陕西 杨陵 712100)

关键词 野生动物, 繁殖状态, 粪尿类固醇

了解野生动物在自然状态下的生活习性, 尤其是了解其繁殖习性, 是有效地控制其群体数量的先决条件。在现有的 4000 余种哺乳动物中, 目前仅对不到 50 种动物生殖内分泌特点有所了解, 而其中主要是实验动物和家畜。对某些捕猎野生动物的研究, 由于环境、营养、情绪、心理等因素的变化, 其结果并不能完全代表在自然环境条件下群体密度、世代更替等因素对野生动物繁殖性能的影响。

近年来, 由于对粪和尿的采样方法及其其中类固醇激素及其代谢物测定方法的改进, 已经对自然生活条件下麝 (*Ovibus moschatus*)^[1]、野马 (*Equus caballus*)^[2]、美洲野牛 (*Bison bison*)^[3]、北美驯鹿 (*Rangifer tarandus*)^[4]、鸡貂 (*Mustela eversmanni*)^[5]、黑足雪貂 (*Mustela nigripes*)^[6]、羊驼 (*Llama*)^[7] 等野生动物的繁殖周期或妊娠诊断进行了大量研究。现将通过测定粪尿类固醇物质监测野生动物繁殖生理的研究情况介绍如下。

1 采样

粪尿样品可以从被研究群体中足够数量个体采集, 也可以反复从同一可识别个体采集。

对于没有多大危险的野生动物如野马, 可以在发现其排尿后, 迅速将其驱赶开, 趁尿尚未完全渗入地下之前直接采集尿液。如果尿液已经渗入土壤中, 可将尿浸的土壤采入纱网口袋, 外面再套上一个塑料袋, 用手用力甩圈, 一般

可以离心出数毫升尿液。生活在沼泽地的野马常将尿液排入浅水坑中, 由于尿液与水比重不同, 如能迅速赶到现场, 仍可采集到尚未充分混合的尿样。浸泡过尿液的雪也可用于测定^[8]。对人可能造成损害的凶猛动物如美洲野牛等, 只能耐心等待动物离开后再去采样, 通常只能采得一些潮湿的土壤。可将尿浸的土壤装入注射器圆筒, 通过离心, 一般也能得到足够量的尿样^[9]。

为避免尿液中混入的其它物质和尿液浓度差异的影响, 在测定其中激素或其代谢物含量时, 需同时测定样品中肌酸酐 (Cr) 含量, 然后将尿液中激素或其代谢物浓度表示为相应每 mg 肌酸酐含 Xng 被测物^[9]。

粪尿中类固醇物质都很稳定, 样品可保存在 -5℃ 下, 反复冻融对测值无明显影响。

2 测值可靠性判定

测定粪尿中类固醇物质浓度以监测野生动物繁殖活动需注意以下几个问题:

2.1 确定需要测定的物质 如有可能, 可使用一头捕获的野生动物, 注射某种标记激素, 然后在 36—48 小时内采集粪尿样。首先测定排泄物中的总放射性, 确定粪或(和)尿是否是主要的排泄途径; 然后进行高效液相色谱或质谱分析, 确定标记物的结构, 明确需要测定的激素或其代谢物。对于有的不能按上述方法处理的动物, 可以参照已被人们了解的类似动物资料确

定被测物质。一般说来,类固醇代谢物主要经尿液排出,并多以结合物的形式出现;但大鼠和狗雌激素代谢物主要由粪便排出。存在于粪中的代谢物多以游离形式出现,其浓度变化常较血中相应激素浓度变化晚2—3天^[10]。雌酮、雄酮及其硫酸盐、葡萄糖酸的结合物分别是反刍动物雌、雄激素在尿中的主要代谢产物。然而,马属动物睾丸能产生大量雌激素,因此尿中含有大量雌激素代谢物。反刍动物如奶牛和美洲野牛尿中孕酮的主要代谢产物都是孕二烯-3 β -葡糖苷酸(PdG)^[11];但马属动物尿中孕酮的主要代谢产物是否是PdG仍有争议^[10]。

2.2 确定土壤或粪中杂质对测定的干扰 将粪尿样品提取物递次稀释,制作剂量稀释曲线,然后与标准曲线比较平行性。随着样品稀释度的增加,平行性降低,说明样品中污染物对测定有干扰。使用浓度较高的样品进行测定,可以减少这种非特异性干扰的程度^[10]。

2.3 正确分析测定结果 在使用测定结果对动物生殖生理状态进行分析时,除了参考动物繁殖习性观察资料外,在有条件时,可与猎获野生动物血样或排泄物测定结果比较。还可使用超声波和腹腔镜等设备观察生殖器官的变化。一般说来,尿液经肾脏过滤和在膀胱中滞留后,其中激素或其代谢物浓度均较血中高。

3 粪尿类固醇物质测定的实际应用

测定粪中类固醇激素代谢物最早用于确定鸟的性别^[12]。之后,采用类似的方法研究了石油污染对海鸟生殖活动的影响^[13]。近年来,测定粪尿类固醇物质已被用于监测野生动物生殖周期和判定是否妊娠。

3.1 卵巢功能检查 对间隔2—3天采集的野马尿样分析表明,在出现发情行为的同时,出现排卵前雌酮结合物(E₁C)峰和PdG低谷;排卵时,在E₁C峰后PdG迅速增加;排卵后,未孕复发情者PdG下降,妊娠发情者PdG维持较高水平;大约在妊娠后第35天出现妊娠排卵周期时,E₁C再次迅速增加^[13]。

据对28头美洲野牛尿样分析,发现其中20头在8月时已处于妊娠状态,8头相继出现发情周期,长度为 23.12 ± 0.766 天,其中7头以后又怀孕并产犊^[1]。

3.2 妊娠诊断 通常通过测定尿E₁C和PdG浓度或粪总雌激素浓度对野生动物进行妊娠诊断。驯化的马,E₁C持续维持高水平说明胎儿一胎盘单位功能正常,胎儿存活^[14,15]。15匹野马中有12匹E₁C浓度超过1.0 $\mu\text{g}/\text{mg Cr}$ 者,6—8个月后均产驹;另3匹E₁C浓度低于1.0 $\mu\text{g}/\text{mg Cr}$,均未产驹^[10]。根据美洲野牛怀孕后尿中E₁C和PdG维持高水平这一特点,在秋季可对其进行早期妊娠诊断,并可能发现因布氏杆菌感染引起的流产^[10]。羊驼分娩前20天至产前12小时,尿中E₁C浓度升高,分娩时降低。PdG变化与之相似,只是在分娩前5天已开始降低。产后1天内E₁C和PdG均维持在基础水平,大约在产后5天,卵泡重新开始活动时,E₁C显著升高;产后大约2周交配引起排卵后,PdG升高;如果交配后受孕,PdG在妊娠后15天内持续升高^[7]。

哺乳动物粪中常含有17 β -E₂的非活性代谢物17 α -E₂。马属动物粪中17 α -E₂含量低,但却含有大量其它雌激素代谢物。如果使用对多种雌激素均有交叉反应性的抗体对粪中总雌激素进行测量,也可对野马进行妊娠诊断。据测定,妊娠野马粪中总雌激素为 $3.18 \pm 0.70\text{ng}/\text{g}$,而非孕母马仅 $0.552 \pm 0.08\text{ng}/\text{g}$ 。野马粪水提取物中E₁C和PdG浓度也可作为判定妊娠的依据,7匹妊娠野马粪中E₁C和PdG平均浓度分别为 $4.2 \pm 0.8\text{ng}/\text{g}$ 和 $1411 \pm 569.6\text{ng}/\text{g}$;而33匹非孕野马平均浓度仅分别为 $0.5 \pm 0.1\text{ng}/\text{g}$ 和 $32.8 \pm 4.9\text{ng}/\text{g}$ ^[16]。

通过测定粪尿类固醇物质浓度监测自然状态下野生动物生殖内分泌状态是目前最简单和准确的研究野生动物繁殖活动的方法。我国野生动物资源丰富,采用上述方法有助于进一步了解其在自然条件下的繁殖性能,为制订野生动物的管理和保护措施提供依据。

参 考 文 献

- 1 Kirkpatrick JF, Liu IMK, Turner JW. Remotely-delivered immunocontraception in the feral horses. *Wildl Soc Bull.* 1990a, 18:326-330.
- 2 Kincy V, Bancroft K, Kirkpatrick JF et al. Monitoring the estrous cycle of uncaptured bison by enzyme immunoassay of urinary pregnanediol-3-glucuronide. *Biol Reprod.* 1990, 42(Suppl 1):17.
- 3 Messier F, Desaulniers DM, Goff AK et al., Caribou pregnancy diagnosis from immunoreactive progestins and estrogens excreted in feces. *J Wildl Manage.* 1990, 54:279-283.
- 4 Desaulniers DM, Goff AK, Betteridge KJ et al., Reproductive hormone concentrations in feces during the estrous cycle and pregnancy in cattle (*Bos taurus*) and muskoxen (*Ovibus moschatus*). *Can J Zool.* 1989, 67: 1148-1154.
- 5 Mead RA, Neirackx S, Czekala NM. Reproductive cycle of the steppe polecat (*Mustela eversmanni*). *J Reprod Fert.* 1990, 88: 353-360.
- 6 Gross TS, Wiesner CM, Armstrong DL et al., Analysis of the ovarian cycle in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) by vaginal cytology and fecal hormone measurement. *Biol Reprod* 1990, 42(Suppl 1): 17.
- 7 Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME et al., Urinary steroids in the periparturient and postpartum periods through early pregnancy in llamas. *Theriogenology.* 1991, 36(2): 267-278.
- 8 Taussky HH, 1954. A microcolorimetric determination of creatinine in urine by the Jaffe reaction. *J Biol Chem.* 208:853-861.
- 9 Kirkpatrick JF, Shideler SE, Turner JW. Pregnancy determination in uncaptured feral horses based on steroid metabolites in urine-soaked snow and free steroids in feces. *Can J Zool.* 1990b, 68: 2576-2579.
- 10 Kirkpatrick JF, and Lasley BL. Monitoring reproductive function in uncaptured free-roaming wildlife by analysis of urinary and fecal steroid metabolites. *Society for Theriogenology 1991 Conference.* 1991, 314-329.
- 11 Bercovitz AP, Czekala NM, Lasley BL. A new method of sex determination in monomorphic birds. *J Zoo Anim Med.* 1978, 9: 114-124.
- 12 Fry DM, Lowenstine LJ, Pathology of common murre and Cassin's auklets exposed to oil. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1985, 14: 725-737.
- 13 Kirkpatrick JF, Liu IMK, Turner JW et al. Long-term effects of immunocontraception of feral horses on behavior and ovarian function. *Proc Fert Control in Wildl Conf.* University of Melbourne, Melbourne, Australia, Nov. 1990c, 21-24.
- 14 Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH et al., Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Am J Vet Res.* 1988, 49: 184-187.
- 15 Evans KL, Hughes JP, Couto M et al., Pregnancy diagnosis in the domestic horse through direct urinary estrone conjugate analysis. *Theriogenology* 1984, 22: 615-620