

# 普氏原羚粪便样品中皮质醇激素保存时效研究

刘若爽<sup>①</sup> 董世魁<sup>①</sup> 刘定震<sup>②</sup> 吴永林<sup>③</sup> 石建斌<sup>①\*</sup>

① 北京师范大学环境学院 北京 100875; ② 北京师范大学生命科学学院, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室 北京 100875;

③ 青海湖国家级自然保护区管理局 西宁 810001

**摘要:** 由于采集粪便样品无需对目标动物进行捕捉、限制或影响其行为, 检测粪便样品中类固醇激素的方法近几十年来在野生动物保护、行为生态学、生理生态学等诸多领域得到广泛应用。普氏原羚 (*Procapra przewalskii*) 由于其种群和行为等方面的特殊性, 较难进行直接的生理监测, 因此采用间接手段监测其粪便类固醇激素就显得很有必要。为探讨不同保存方法对普氏原羚粪便中皮质醇的影响, 我们将采集到的新鲜粪便样品充分混合后分为 30 份, 各取 10 份分别保存于 -20 °C、4 °C 和 20 °C, 在保存 2、5、7、10、15、20、25、30 d 和 50 d 时, 使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测样品中的皮质醇含量。单因素方差分析 (One-way ANOVA) 结果显示, 保存于 -20 °C 的粪便样品中皮质醇含量在保存 50 d 内没有显著变化, 含量为  $(11.747 \pm 2.951)$  ng/g (平均值  $\pm$  标准差), ( $F = 1.966$ ,  $n = 81$ ,  $P > 0.05$ ), 而保存于 4 °C 和 20 °C 的样品则出现明显波动 (4 °C:  $F = 23.643$ ,  $P < 0.05$ ; 20 °C:  $F = 35.126$ ,  $P < 0.05$ ), 含量分别为  $(15.951 \pm 6.766)$  ng/g 和  $(11.042 \pm 6.094)$  ng/g。保存于 4 °C 和 20 °C 的样品中皮质醇含量在 24 h 内均有上升, 在随后的几天逐渐下降。结果表明, -20 °C 冷冻可以简便有效地保存普氏原羚粪便样品中的皮质醇激素。同时, 在野外暴露超过 24 h 的粪便样品会造成测定结果产生误差, 在采集样品时要考虑到潜在的影响。

**关键词:** 粪便样品; 普氏原羚; 皮质醇; 低温保存

**中图分类号:** Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 01-131-07

## Storage Duration of Cortisol in Feces of Przewalski's Gazelle (*Procapra przewalskii*)

LIU Ruo-Shuang<sup>①</sup> DONG Shi-Kui<sup>①</sup> LIU Ding-Zhen<sup>②</sup> WU Yong-Lin<sup>③</sup> SHI Jian-Bin<sup>①\*</sup>

① *School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875;* ② *Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875;* ③ *Qinghai Lake National Nature Reserve, Xining 810001, China*

**Abstract:** Because fecal samples can be collected without capturing and restraining animals, or disturbing animal behaviors, measurement of metabolites of steroid hormones by using feces has become very popular

**基金项目** 国家自然科学基金面上项目 (No. 31572281), 国家重大研发计划项目 (No. 2016YFC0501906);

\* 通讯作者, E-mail: jbsbi@bnu.edu.cn;

**第一作者简介** 刘若爽, 女, 博士研究生; 研究方向: 种群生态学; E-mail: budthefox@escience.cn.

收稿日期: 2017-05-09, 修回日期: 2017-07-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201801017

during the past decades, and it is currently being used in many areas of zoological research including wildlife conservation, behavioral ecology and physiological ecology. It is difficult to carry out direct physiological monitoring of Przewalski's Gazelle (*Procapra przewalskii*) due to its particularity of population and behavior, so it is necessary to use the non-invasive sampling method to monitor the fecal steroids. We thus conducted this research to determine the effects of different storage temperatures on fecal cortisol in Przewalski's gazelle. Fresh fecal samples were collected, thoroughly mixed and separated into 30 aliquots. Ten aliquots of mixed fecal samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. The cortisol concentrations in the samples were measured using ELISA on day 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 and 50, respectively. The results of One-way ANOVA indicated no significant changes in the cortisol concentrations of the fecal samples stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  within 50 days (Mean  $\pm$  SD =  $11.747 \pm 2.951$  ng/g,  $F = 1.966$ ,  $n = 81$ ,  $P > 0.05$ ). However, the cortisol concentrations of the fecal samples stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  showed a significant fluctuation ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ : Mean  $\pm$  SD =  $15.951 \pm 6.766$  ng/g,  $F = 23.643$ ,  $P < 0.05$ ;  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ : Mean  $\pm$  SD =  $11.042 \pm 6.094$  ng/g,  $F = 35.126$ ,  $P < 0.05$ ). The cortisol concentration of the samples stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  rose substantially after the first 24 h, and then declined after several days (Fig. 1). The results indicate that freezing at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  is a simple and reliable storage method for fecal cortisol in Przewalski's gazelle. Meanwhile, because non-fresh fecal samples exposed in the field over 24 h may cause erroneous results, researchers should consider such potential effects when collecting fecal samples.

**Key words:** Fecal sample; Przewalski's Gazelle (*Procapra przewalskii*); Cortisol; Low temperature storage

采集动物排泄物或分泌物的非损伤取样法 (non-invasive sampling methods) 由于不需要对实验动物个体进行捕捉、控制或麻醉, 对动物的正常生理行为影响较小, 近年来在野生动物生理生态和保护生物学研究中得到了广泛应用 (Goymann 2012)。由于野生动物粪便样品相对容易进行连续采集, 因此作为最常用的样品为监测野生动物生理状态、评估野生动物受到的胁迫程度提供了有效的手段 (Ashley et al. 2011, Kalbitzer et al. 2013, de Clercq et al. 2014, Nugraha et al. 2017)。然而受野外实验条件所限, 采集到的粪便样品无法立即检测, 需要经过一段时间的保存和运输, 这就需要验证样品保存的有效性。当前常用的保存方法有干燥保存法、冷冻保存法、有机溶剂保存法等 (Hunt et al. 2003, Galama et al. 2004, Palme 2005), 这几种保存方法对于有效保存动物粪便样品各有优缺点 (马凯等 2014)。

综合考虑野外研究基地的条件、保存环境和运输等因素, 本研究探讨低温冷冻法保存粪

便样品的有效性和时效性。普氏原羚 (*Procapra przewalskii*) 是我国特有种, I 级保护野生动物, 被 IUCN 红色名录列为濒危物种 (EN) (IUCN SSC Antelope Specialist Group 2016), 仅分布于青海省青海湖周边的小范围区域 (Hu et al. 2013, Zhang et al. 2013)。对普氏原羚的研究主要集中在警戒行为、繁殖行为和保护状况等方面 (蒋志刚等 2003, 游章强等 2005, Li et al. 2012a, b, You et al. 2013), 生理生态方面的研究较为匮乏。普氏原羚数量稀少, 行为警惕, 采集血液、尿液、毛发等样品有很大困难, 而粪便样品较为容易获得, 且保存方法相对简便, 因此可作为监测普氏原羚生理状态的理想材料。普氏原羚的分布区域虽然与人类活动范围有较大重叠, 但当地社会经济水平不高, 且所处位置偏僻, 无法对粪便样品进行即时检测, 因此必须对样品进行保存和运输, 需要对其粪便样品保存的时效性进行研究。

为了探讨保存温度对粪便样品中皮质醇激素含量的影响, 比较了不同保存温度下粪便样

品中皮质醇激素含量的变化，确定普氏原羚粪便皮质醇激素的保存时效，为后续的研究提供科学、简便、经济的粪便样品保存方法。由于低温下激素的稳定性较高（Mostl et al. 1999，黄英等 2010a, b, de Clercq et al. 2014），因此我们预测保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的粪便样品中皮质醇含量有较高的稳定性，冷冻保存法适用于普氏原羚的粪便样品保存。

## 1 研究方法

### 1.1 研究地点与对象

研究地点位于青海省刚察县青海湖国家级自然保护区鸟岛保护站（ $36^{\circ}59'06.8''\text{N}$ ， $99^{\circ}53'08.7''\text{E}$ ，海拔  $3\ 195\ \text{m}$ ）。保护站圈养一群普氏原羚，包含雄羚 21 只，雌羚及 1 龄幼羚 35 只。围栏面积约  $0.81\ \text{km}^2$ 。围栏内同时放牧藏系绵羊（*Ovis aries*）。冬季食物匮乏期进行一定量的人工补饲，除管理员日常巡护外没有其他人为干扰。

### 1.2 样品采集与检测

本实验的粪便样品采集于 2016 年 3 月 28 日至 4 月 11 日，期间定期于上午 9:00 ~ 11:00 时采集当天排出的新鲜粪便样品，装入自封袋内并标注采集时间、地点等信息，于 2 h 内转移至  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰柜内保存。藏系绵羊粪便颗粒较大较圆，普氏原羚粪便颗粒相对较小且细长，两者在形状上有明显差别。新鲜粪便表面光滑，颜色黑亮，贴近地面的部分湿润呈深绿色，可用拇指和食指轻松捏碎；排出时间较长的粪便颜色暗淡无光泽，表面或有裂纹，质地坚硬无法捏碎。为排除个体差异对实验的影响，在实验开始前从每份普氏原羚粪便样品中选取 5 ~ 10 粒磨碎后充分混合。将处理好的粪便样品分为 30 份，编号后分别保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ （ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  为青海湖地区年平均温度， $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  为青海湖地区夏季平均最高温度，数据来源：中国气象数据网）三种保存温度下各 10 份，将第 0 天的样品设为参照组，在第 2、5、7、10、

15、20、25、30 和 50 天，从不同保存温度下的样品中各取出 1 份样品分成 3 小份，放入  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥机内冻干 10 h，随后将粪便样品研磨成粉末。精确称量  $0.1\ \text{g}$ ，加入 80% 甲醇溶液  $1\ \text{ml}$ ，涡振 30 min， $5\ 000\ \text{r/min}$  离心 5 min 后取上清液，氮吹仪  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  吹干后加入  $1\ \text{ml}$  PBS 缓冲液（ $\text{pH} = 7.2$ ）复溶待测，每小份样品提取液重复检测 3 次。使用 R&D 公司生产的 Parameter Cortisol Assay 试剂盒（组内变异系数 6.7%，组间变异系数 13.6%，与泼尼松龙交叉反应系数 4.4%，与孕酮交叉反应系数 1.7%，与皮质酮交叉反应系数 0.2%，与 4-雄烯二酮交叉反应系数  $< 0.1\%$ ，与皮质脂酮交叉反应系数  $< 0.1\%$ ，与去氧皮质酮交叉反应系数  $< 0.1\%$ ，与雌二醇交叉反应系数  $< 0.1\%$ ，与强的松交叉反应系数  $< 0.1\%$ ），通过酶联免疫吸附测定法（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）检测样品中的皮质醇含量。使用 BioTek 公司的 SynergyH1 多功能微孔板检测仪，检测了按照试剂盒说明书配制的不同浓度梯度的标准品溶液、粪便样品提取液和空白对照的吸光度值，通过标准品的皮质醇浓度和吸光度值绘制标准曲线，将样品的吸光度值代入标准曲线计算样品中的皮质醇含量。

### 1.3 数据处理与分析

首先用 K-S 检验分别验证在不同保存温度下粪便样品中皮质醇含量的正态性。检验结果全部数据符合正态分布（ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ： $P > 0.05$ ； $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ： $P > 0.05$ ； $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ： $P > 0.05$ ），因此采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）和 LSD 多重比较，对比在不同保存温度下不同保存时间粪便样品中皮质醇含量差异，显著性水平设置为  $\alpha = 0.05$ 。随后对第 50 天测得的 3 个保存温度下粪便样本中皮质醇含量数据进行独立样本  $T$  检验，分别比较其均值的差异，显著性水平设为  $\alpha = 0.05$ 。使用 SPSS 19.0 软件处理数据。结果数据用平均值  $\pm$  标准差（Mean  $\pm$  SD）表示。

## 2 结果

在 -20 °C 下保存的粪便样品中皮质醇含量 50 d 内每一次的测量值均没有显著差异 [(11.747 ± 2.951) ng/g,  $F = 1.966$ ,  $n = 81$ ,  $P > 0.05$ ], 而保存在 4 °C 和 20 °C 的粪便样品中皮质醇含量随着保存时间的延长产生了显著的变化 [4 °C: (15.951 ± 6.766) ng/g,  $F = 23.643$ ,  $n = 81$ ,  $P < 0.05$ ; 20 °C: (11.042 ± 6.094) ng/g,  $F = 35.126$ ,  $n = 81$ ,  $P < 0.05$ ] (图 1)。LSD 多重比较显示, 保存于 4 °C 的粪便样品中皮质醇含量在第 2 天便有明显上升 [(16.724 ± 3.671) ng/g,  $F_{1,16} = 29.421$ ,  $P < 0.05$ ], 第 5 天出现峰值 [(25.701 ± 5.289) ng/g,  $F_{1,16} = 38.398$ ,  $P < 0.05$ ], 随后逐渐下降。保存于 20 °C 的粪便样品中皮质醇含量在第 2 天即出现峰值 [(21.789 ± 0.555) ng/g,  $F_{1,16} = 45.97$ ,  $P < 0.05$ ], 随后逐渐下降。对第 50 天 3 种保存温度下粪便样品皮质醇含量进行独立样本  $T$  检验, 保存于 -20 °C 的粪便样品与 4 °C 和 20 °C 下的样品均有显著差异 [-20 °C: (11.499 ± 1.725) ng/g,

$n = 9$ ; 4 °C: (7.009 ± 3.751) ng/g,  $n = 9$ ; 20 °C: (2.811 ± 1.157) ng/g,  $n = 9$ 。-20 °C vs 4 °C:  $P < 0.05$ ; -20 °C vs 20 °C:  $P < 0.05$ ], 同时, 保存于 4 °C 的样品和保存于 20 °C 的样品也存在显著差异 (4 °C vs 20 °C:  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究表明, 普氏原羚粪便样品中皮质醇激素在 -20 °C 的保存温度下稳定性可以达到至少 50 d。然而在 4 °C 和 20 °C 的保存环境下, 皮质醇的含量在保存的第 2 天就会出现明显的上升趋势。粪便中的类固醇激素在排出体外之后, 仍会在粪便中的酶、微生物等的影响下改变化学结构, 降解或由其他物质转化成新的共轭物 (Matkovics 1972, Woods 1975, Charney et al. 2014)。因此, 需要在第一时间采取有效的手段保存粪便样品。

粪便样品的保存方法会对实验结果产生影响。例如, 有机溶剂保存法能有效抑制微生物的活性, 降低目标激素的降解率。而粪便样品

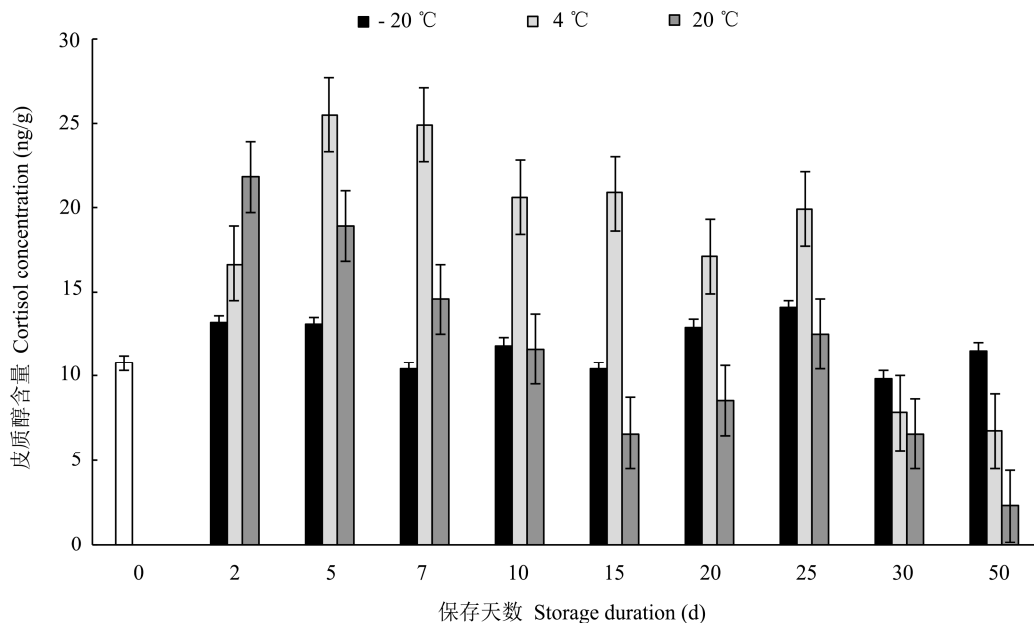


图 1 不同温度下保存的普氏原羚粪便样品中皮质醇含量随保存时间变化

Fig. 1 The cortisol concentrations in feces of Przewalski's Gazelle preserved at different temperatures vary with storage durations

一旦浸入有机溶剂, 即可有少量激素不断析出 (Palme 2005), 也可能破坏某些类固醇激素的共轭结构 (Khan et al. 2002, Millspaugh et al. 2003), 对激素的抽提造成影响。干燥保存法使得样品便于携带和运输, 但干燥温度和时长的设定会影响粪便样品内微生物的活动, 从而对样品内的激素造成影响, 针对特定物种和特定激素的最佳温度和时长难以确定, 使干燥保存法存在较大不确定性 (Terio et al. 2002, Hunt et al. 2003, Galama et al. 2004, 马凯等 2014)。冷冻保存法的保存效果相对较好, 然而受野外条件所限, 样品可能无法持续稳定地保存在设定的低温状态, 反复冻融对样品中的激素含量会产生较大影响 (Washburn et al. 2002, Millspaugh et al. 2003, Kalbitzer et al. 2013)。

在本研究中, 我们选择了冷冻保存法保存和运输粪便样品。粪便样品的保存时效则决定了采样-运输-检测的周期, 以使检测结果真实可靠。本结果表明, 在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存 50 d 的样品中皮质醇含量没有显著变化, 而保存在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的样品中皮质醇含量均出现较大波动。从外观上看, 保存于  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的样品在保存第 15 天时出现小白点, 颜色逐渐由墨绿色转为枯黄色, 提取并离心后的溶液由清澈的黄色变为不透光的草绿色, 并且复溶后仍有较多沉淀物; 至 30 天时白点增多变大, 推测为微生物群落。de Clercq 等 (2014) 将荷斯坦奶牛粪便冻干后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存 20 周, 检测到的皮质醇含量与初始值差异不到 20%, 而保存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的粪便样品在第 10 周即检测不到任何糖皮质激素。对灰熊 (*Ursus arctos horribilis*) 和非洲象 (*Loxodonta africana*) (Hunt et al. 2003) 的实验表明, 未经处理冻存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的粪便样品, 皮质醇含量在 2 年内均与对照组 (冻干后保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 无显著差异, 而保存于室温的非洲象粪便样品皮质醇含量在最初的几个月内即产生 20%~40% 的升高, 保存于室温的灰熊粪便样品皮质醇含量则出现了不同程度的降低。已有研究中,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存的样品通常作为

对照组, 被认为是一种可靠的样品保存方法 (Pappano et al. 2010, Morden et al. 2011, Nugraha et al. 2017)。

本研究中保存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  的样品中皮质醇含量在 24 h 后有明显上升, 保存于  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的样品中皮质醇含量在 24 h 即达到峰值。对不同物种的研究均表明, 未经处理保存的样品在最初的 48 h 内, 类固醇激素的含量会产生显著变化, 如草原狒狒 (*Papio cynocephalus*) 孕酮、雌二醇 (Khan et al. 2002), 梅花鹿 (*Cervus nippon*) 孕酮 (Yamauchi et al. 1999), 林麝 (*Moschus berezovskii*) 雌二醇、睾酮、皮质醇 (郎冬梅等 2011), 均与本文的研究结果相似。这些变化可能是由于粪便内微生物的活动, 使目标激素代谢物的结构改变或降解, 在测定时改变了代谢物与抗体间的结合能力; 或将其他物质转化生成新的共轭物, 与抗体发生了交叉反应 (Khan et al. 2002, 陈浩春等 2015)。与其他物种相比, 普氏原羚的粪便样品在高于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存条件下, 皮质醇含量发生变化的时间相对较短, 与林麝 (郎冬梅等 2011)、大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) (马凯等 2014)、川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellanae*) (黄英等 2010a) 的研究结果表现出较大的种间差异。由于食性、激素在消化道的代谢过程、肠道微生物类群、外界环境等的不同, 粪便中的类固醇激素在不同物种中的保存时效存在较大差异 (Hunt et al. 2003, Millspaugh et al. 2004)。普氏原羚是前肠消化的中型反刍动物, 消化道内有大量共生微生物以发酵分解植物纤维 (Hofmann 1989, Vaughan et al. 2000, 蒋志刚等 2003), 可能是导致粪便中的皮质醇含量在短期内即发生改变的原因之一。

另外, 对比保存第 50 天时 3 种保存温度下普氏原羚粪便样品中皮质醇含量, 相比于较为稳定的保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的粪便样品, 保存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的样品中皮质醇含量均有下降, 且  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的样品下降更为显著。由于低温可以抑制微生物的活性, 随着保存温度的升高, 粪

便样品中微生物的活动逐渐加剧,对粪便中类固醇激素的代谢和分解作用更加强烈 (de Clercq et al. 2014)。因此在经过 50 d 的保存后,保存于 20 °C 的普氏原羚粪便样品中皮质醇含量最少,而 4 °C 保存的粪便样品皮质醇含量也有明显下降。

本研究结果表明,普氏原羚粪便样品可在 -20 °C 下保存至少 50 d 而不致引起皮质醇含量的显著变化;同时,采集普氏原羚样品时尽量选择新鲜排出的粪便,隔夜的粪便检测出的激素含量可能无法反映动物真实的生理状态。本文为后续的普氏原羚粪便类固醇激素研究提供新鲜粪便样品的保存依据,同时也为其他相近物种粪便固醇激素研究提供参考,但在实际运用中仍需结合研究目的,综合目标物种和目标激素的特性来设计实验。

**致谢** 感谢青海湖国家级自然保护区管理局何玉邦、青海省林业厅野生动植物和自然保护区管理局张毓、保护站工作人员黄卓么杰、王永顺等在野外工作中提供的帮助。

## 参 考 文 献

- Ashley N T, Barboza P S, Macbeth B J, et al. 2011. Glucocorticosteroid concentrations in feces and hair of captive caribou and reindeer following adrenocorticotrophic hormone challenge. *General and Comparative Endocrinology*, 172(3): 382–391.
- Charney W, Herzog H L. 2014. *Microbial Transformations of Steroids: a Handbook*. New York, London: Academic Press.
- de Clercq N, Bussche J V, Croubels S, et al. 2014. Development and validation of a high-resolution mass-spectrometry-based method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in faeces. *Journal of Chromatography A*, 1336(7): 76–86.
- Galama W T, Graham L H, Savage A. 2004. Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Zoo Biology*, 23(4): 291–300.
- Goymann W. 2012. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4):757–765.
- Hofmann R R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*, 78(4): 443–457.
- Hu J H, Jiang Z G, Mallon D P. 2013. Metapopulation viability of a globally endangered gazelle on the Northeast Qinghai-Tibetan Plateau. *Biological Conservation*, 166(2013): 23–32.
- Hunt K E, Wasser S K. 2003. Effect of long-term preservation methods on fecal glucocorticoid concentrations of grizzly bear and African elephant. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(6): 918–928.
- IUCN SSC Antelope Specialist Group. 2016. *Procapra przewalskii*//IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 3.1. [BD/OL] [2017-03-15]. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T18230A50192807.en>.
- Kalbitzer U, Heistermann M. 2013. Long-term storage effects in steroid metabolite extracts from baboon (*Papio* sp.) faeces: a comparison of three commonly applied storage methods. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(5): 493–500.
- Khan M Z, Altmann J, Isani S S, et al. 2002. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *General and Comparative Endocrinology*, 128(1): 57–64.
- Li C L, Jiang Z G, Li L L, et al. 2012a. Effects of reproductive status, social rank, sex and group size on vigilance patterns in Przewalski's gazelle. *PLoS One*, 7(2): e32607.
- Li C L, Jiang Z G, Ping X G, et al. 2012b. Current status and conservation of the Endangered Przewalski's gazelle *Procapra przewalskii*, endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Oryx*, 46(1): 145–153.
- Matkovics B. 1972. *In vitro* transformation of steroids as a substitute of microbial transformation. *Steroids and Lipids Research*, 3(1): 1–7.
- Millsaugh J J, Washburn B E, Milanick M A, et al. 2003. Effects of heat and chemical treatments on fecal glucocorticoid measurements: implications for sample transport. *Wildlife Society Bulletin*, 31(2): 399–406.
- Millsaugh J J, Washburn B E. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research:

- considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology*, 138(3):189–199.
- Morden C J C, Weladji R B, Ropstad E, et al. 2011. Fecal hormones as a non-invasive population monitoring method for reindeer. *Journal of Wildlife Management*, 75(6): 1426–1435.
- Mostl E, Messmann S, Bagu E, et al. 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 46(10): 621–631.
- 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): 285–294.
- Palme R. 2005. Measuring fecal steroids—Guidelines for practical application//Bauchinger U, Goymann W, Eiermann J S. *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*. New York: New York Acad Sciences, 75–80.
- Pappano D J, Roberts E K, Beehner J C. 2010. Testing extraction and storage parameters for a fecal hormone method. *American Journal of Primatology*, 72(11): 934–941.
- Terio K A, Brown J L, Moreland R, et al. 2002. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. *Zoo Biology*, 21(3): 215–222.
- Vaughan T A, Ryan J M, Czaplewski N J. 2000. *Mammalogy*. 4th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Washburn B E, Millspaugh J J. 2002. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *General and Comparative Endocrinology*, 127(3): 217–222.
- Woods G. 1975. *Chemical and microbiological transformation of steroids*. Cardiff, Wales: Alpha Omega Publishing.
- Yamauchi K, Hamasaki S I, Takeuchi Y, et al. 1999. Application of enzyme immunoassay to fecal steroid analysis in sika deer (*Cervus nippon*). *Journal of Reproduction and Development*, 45(6): 429–434.
- You Z Q, Jiang Z G, Li C W, et al. 2013. Impacts of grassland fence on the behavior and habitat area of the critically endangered Przewalski's gazelle around the Qinghai Lake. *Chinese Science Bulletin*, 58(18): 2262–2268.
- Zhang L, Liu J Z, Wang D J, et al. 2013. Distribution and population status of Przewalski's gazelle, *Procapra przewalskii* (Cetartiodactyla, Bovidae). *Mammalia*, 77(1): 31–40.
- 陈浩春, 范鹏来, 姚辉, 等. 2015. 川金丝猴尿液类固醇激素的保存时效性. *兽类学报*, 35(3): 321–327.
- 黄英, 胡德夫, 金学林, 等. 2010a. 川金丝猴粪样内皮质醇激素保存时效的研究. *北京林业大学学报*, 32(4): 196–200.
- 黄英, 胡德夫, 刘树强, 等. 2010b. 川金丝猴粪样内 3 种类固醇激素保存时效分析. *动物学杂志*, 45(6): 64–70.
- 蒋志刚, 雷润华, 刘丙万, 等. 2003. 普氏原羚研究概述. *动物学杂志*, 38(6): 129–132.
- 郎冬梅, 刘文华, 胡德夫, 等. 2011. 圈养林麝粪便类固醇激素保存时效性研究. *四川动物*, 30(3): 357–361.
- 马凯, 吴存哲, 尹峰, 等. 2014. 贮存温度和时间对大熊猫粪便样品皮质醇浓度的影响. *兽类学报*, 34(2): 188–192.
- 游章强, 蒋志刚. 2005. 普氏原羚的求偶交配行为. *动物学报*, 51(2): 187–194.
- 中国气象局气象数据中心. 2012. 中国地面气候标准值月值数据集 (1981 ~ 2010 年). [DB/OL] [2017-2-24]. [http://data.cma.cn/data/cdcdetail/dataCode/SURF\\_CLI\\_CHN\\_MUL\\_MMON\\_19812010.html](http://data.cma.cn/data/cdcdetail/dataCode/SURF_CLI_CHN_MUL_MMON_19812010.html).