

粪便类固醇激素检测准确性的影响因素

张肖 丁长青*

北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

摘要:近年来,采用非损伤性取样方法监测野生动物的生理状况越来越受到重视。本文对检测过程中影响动物粪便类固醇激素检测准确性的因素进行了分析总结,包括样品的新鲜程度、样品量和保存方法;激素代谢的日节律和季节性变化;动物的年龄、性别和繁殖状态等,以期为粪便类固醇激素检测技术在野生动物中的准确应用提供借鉴。

关键词:粪便;类固醇激素;非损伤性检测

中图分类号:Q958 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)05-143-09

Factors Affect the Accuracy of Fecal Steroid Hormone Detection

ZHANG Xiao DING Chang-Qing*

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: In recent years, more attention has been put on non-invasive sampling method for monitoring physiological status of wildlife. In this article, we reviewed factors of animal fecal steroid hormone detection accuracy during the detection, hoping to provide a reference for the accurate application of fecal steroid hormone detection technology in wildlife. The factors include the freshness, volume and storage of the sample, daily rhythm and seasonal variation of hormone metabolism, age, sex and reproductive state of animals, etc.

Key words: Feces; Steroid hormone; Noninvasive monitoring

类固醇激素(steroid hormone)是具有环戊烷多氢菲母核的一类物质,主要包括肾上腺皮质和性腺分泌的激素。当动物受到某种刺激时,其机体通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的系列反应释放糖皮质激素,来增加机体抗伤害的能力。因此,肾上腺皮质分泌的糖皮质激素对动物的应激性具有指示作用,其含量常用于动物应激能力的监测;性腺分泌的性激素对动物生殖器官的发育和生殖行为的表达等起着重要的调控作用,动物体内雄激素和雌激素含量的变化可用于监测动物的生殖生理状况。类固醇激素含量的检测在野生动物生理学研究中得到广泛应用。

动物生理学研究多应用采血的方法检测动物的类固醇激素水平^[1],但对于濒危珍稀野生

动物,采集血液存在诸多限制,难以实现,有必要采用非损伤性取样的方法检测其类固醇激素水平。非损伤性取样(noninvasive sampling)是在不捕捉、低干扰动物正常活动的情况下,收集毛发、粪便、尿液、脱落羽毛、含口腔脱落细胞的食物残渣、鳞片以及卵壳等样品^[2]。粪便可作为野生动物非损伤性检测的样品,适用于类固醇激素的检测。相对于血液采集,收集动物的粪便无须对其进行捕捉绑定,大大降低了对动

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2008BAC39B05)和国家自然科学基金项目(No. 30870314);

* 通讯作者, E-mail: cqding@bjfu.edu.cn;

第一作者简介 张肖,女,硕士研究生;研究方向:保护生物学; E-mail: zxabc686@163.com。

收稿日期:2012-03-28,修回日期:2012-07-20

物的干扰,避免了刺激对其激素水平的影响,使检测结果更加准确^[3];此外,血液中类固醇激素含量具瞬时性,粪便中类固醇激素含量反映的是一段时间内的平均水平,在应激性检测中,对于持续的刺激源,粪样中类固醇激素的含量能更准确地反映动物的应激状况^[4];而且,在未追踪到动物个体时,通过采集其粪便也能够测定其激素水平。同时,粪样便于长期、连续采集,有利于对动物生理状况进行长期监测。

正是由于这些优越性,粪便类固醇激素检测在哺乳动物^[4-5]、鸟类^[6-10]、爬行动物^[11]、两栖动物^[12]和鱼类^[13-14]等研究中得到了广泛应用,涉及生殖生理检测^[15-16]、激素与行为的相关性^[17]、应激性^[18]和性别鉴定^[12]等方面的研究。研究表明,粪便量^[19-20]、提取试剂浓度^[8,21]以及动物类固醇激素的日节律性^[22-23]等,都会对结果的准确性造成影响。本文综述了动物粪样采集、保存以及粪样中类固醇激素的提取和检测等过程中影响检测准确性的主要因素,以期对粪便类固醇激素检测技术在野生动物中的准确应用提供借鉴。

1 粪样的采集

1.1 样品中类固醇激素的滞后性 从粪便中检测到的一般都是类固醇激素的代谢物,而不是源激素^[24]。血液中的类固醇激素在肝与蛋白相结合,以代谢物的形式经肾进入尿液排出或经胆汁进入肠道通过粪便排出,在肠道阶段激素又可被重吸收进入肝肠循环^[24],整个过程使得粪便中的类固醇激素水平滞后于血液中的类固醇激素水平。不同物种的滞后时间不同,鸟类粪便中类固醇激素的滞后时间一般是1~2 h^[8],哺乳动物中相对较长,大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)粪便中类固醇激素的滞后时间是10 h左右^[25],而斑鬣狗(*Crocuta crocuta*)可达50 h^[26]。因此,在进行实验设计时要将滞后时间考虑在内,尤其是在动物行为与粪便中激素含量的相关性研究中,考虑到滞后时间的样品才会使结果更有意义。常规验证滞后性的实验为促肾上腺皮质激素刺激实验

(ACTH challenge test)和地塞米松抑制实验(Dex suppression test)。

1.2 类固醇激素含量的个体差异性 同一物种不同个体之间激素含量不同,年龄和性别等均会造成类固醇激素含量的差异。研究表明,繁殖期紫翅椋鸟(*Sturnus vulgaris*)雄性个体对捕捉会产生比雌性个体更强烈的应激反应^[27]。西美角鸮(*Otus kennicottii*)的幼体与成体在面对捕捉时,糖皮质激素水平也有显著差异^[28]。因此,在进行样品采集时要尽量识别到个体,并记录个体的性别和年龄阶段。

区别粪样属于哪个个体,对于单独笼养的动物容易,对于野生种群要困难一些。笼养个体如由于场地限制或者实验需要,不能将动物单独关放,则需对采样动物进行持续观察(或利用摄像机记录),确定粪便位置,待动物远离后进行收集并记录个体信息。对于野生动物,在能够观察到采样个体的情况下,需跟踪观察;对于观察不到个体的野生动物,发现粪便后要仔细辨认,并单独存放,避免不同个体的粪样混合在一起。

1.3 样品的新鲜程度 粪便中的微生物会降解类固醇激素,在野外环境中,降雨和暴晒等都会加快降解反应,使粪便中的类固醇激素含量发生变化,影响检测结果的准确性。Washburn等^[29]通过控制条件,比较了白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)粪便中糖皮质激素在降雨前后的变化,结果表明降雨环境促进了胃肠微生物的生长,在其作用下粪便糖皮质激素分解为与检测试剂盒中抗体具有亲和性的代谢物,导致降雨后粪便样品的检测结果显著高于原有含量。而Terio等^[30]发现猎豹(*Acinonyx jubatus*)粪便中的糖皮质激素经过太阳能炉烘干后,含量显著下降。因此,为了保证实验的准确性,要尽量采集新鲜的粪便。

1.4 粪样中类固醇激素的节律性 粪便中的类固醇激素具有日节律性,这在很多物种中都得到了证明。在灵长类等昼行性动物中,类固醇激素分泌的高峰期多在清晨^[22],而对于啮齿类等夜行性动物,类固醇激素分泌的高峰期多

在傍晚^[23]。因此,在对粪便中的类固醇激素进行检测时应当考虑到激素含量的日变化。尤其是在鸟类、爬行类这些排便比较频繁的物种中,较短的肠道滞留时间使得粪便中类固醇激素的滞后性较哺乳动物短很多,为了保证实验的准确性,应在固定时间采集粪样,以消除日节律对实验结果的影响。

此外,粪便中的雌二醇、睾酮和孕酮会随着季节(主要是生理周期)的不同而发生变化^[15],这也是我们通过测定性激素水平来监测动物生理状况的依据。不仅性激素如此,糖皮质激素在血液和粪便中的含量也具有季节性变化。Goymann 等^[31]对黑喉石鸱(*Saxicola torquata*)冬季、早春、夏季和秋季换羽期四个季节的粪样进行检测,结果表明,粪便中的睾酮和皮质酮含量都显示了季节性变化,睾酮每小时的代谢率在早春最高,秋季换羽期最低;皮质酮则是在早春和冬季达到最高,夏季和换羽期较低。糖皮质激素主要用于对动物应激性的监测,在研究时必须考虑糖皮质激素的季节性变化,分清楚糖皮质激素的升高是因为刺激原因还是自身生理原因引起的。因此,对应激性进行监测时,最好对同一时间段内的激素变化进行比较。

1.5 样品中类固醇激素分布的不均匀性 对于大型哺乳动物来说,有些粪便比较大,为了取样方便,节省样品存放空间,常常只收集部分粪样。但是,粪样中类固醇激素的分布是不均匀的。于小杰等^[25]对大熊猫粪团表层和内部的类固醇激素含量进行比较后发现,大熊猫粪团表层的睾酮、雌二醇和皮质醇含量均显著高于粪团内部。因此,为了实验的准确性,可以将粪样搅拌均匀后取部分样品进行分析。

在鸟类和爬行动物中,排出物是粪便和尿酸混合在一起的,两种物质很难分开,而关于粪尿中类固醇激素含量的分配尚缺少深入研究。一些研究只收集粪便部分^[18],而有些研究认为粪尿排出之前在泄殖腔中已经混合,无法将粪尿真正分离,更倾向于收集全部粪便^[7,19]。Wasser 等^[8]对一只横斑林鸱(*Strix varia*)和一

只美洲雕鸮(*Bubo virginianus*)分别进行了放射性激素注射,对注射之后 45 h 内的所有粪便和尿酸分别进行了收集检测,结果显示,粪便和尿酸中含有激素的绝对量相差不多。所以,在更深入的研究之前,我们建议采集鸟类和爬行动物全部的粪便(含尿酸部分)作为研究样品。

1.6 样品量 采集的样品量也需要注意。很多鸟类,尤其是鸣禽,每份单独粪样的量很少,过少的粪样会对类固醇激素含量的检测产生影响,使测得的结果不够准确。对横斑林鸱的研究表明,非常少的样品(<0.02 g)会导致粪样中糖皮质激素代谢物的检测含量偏高^[20],Goymann 等^[19]在黑喉石鸱的研究中也得到了同样的结果。造成这种偏差的原因之一可能是粪量少的样品每单位干粪中激素的提取率更高,因此建议实验时粪样干重至少要大于 0.02 g^[20]。

Hayward 等^[32]对样品量大小造成影响了几种可能因素进行了测试,并制定了一些方案以消除样品量大小的影响。即当用于激素提取的粪样量比较少时,需要做以下处理:(1)尽可能地除去粪样中的尿酸,减少其对粪便中类固醇激素含量的影响;(2)提取激素前对样品进行冻干处理或进行含水量的测定,防止保存过程中不同程度的水分损失的影响;(3)粪样的称量尽量采用高精度的天平以减少测量误差(0.01 g 与 0.015 g 的差别是很大的);(4)提取过程中适当增加乙醇的含量,每 0.05 ~ 0.10 g 干粪加入约 15 ml 的乙醇,保证激素提取的充分;(5)乙醇提取液要蒸干,激素用缓冲液进行溶解,避免乙醇与抗体结合对检测产生干扰。经过这样的处理,干重 0.001 ~ 0.100 g 的粪便也可用于激素的提取和检测。

1.7 食性 食性与食物的季节性变化是影响粪样中类固醇激素水平的重要因素,特别是食物中的纤维素含量。对于植食性动物来说,所食植物中纤维素的含量随着季节物候的变化而变化,可能是除生理因素外影响其粪便中类固醇激素产生季节性变化的重要原因,对于以其他动物为食的动物来讲,可以通过直接食入类

固醇激素而使粪便中的激素含量发生改变^[33]。

对人类(*Homo sapiens*)的研究表明,食物纤维可以缩短食物残渣在肠道中的停留时间,并且增加排粪量^[34-35]。Goymann^[6]对黑喉石鸱的研究发现,在食物中增加 20% 的纤维素,喂食一周后,其摄食量减少,但是粪便排出量增加了,检测得到粪便中皮质酮和雄激素代谢物的含量显著低于对照组。但是 Dantzer 等^[36]通过控制实验,比较喂食云杉种子(纤维素含量 19.8%)和花生酱(纤维素含量 6.6%)的两组红松鼠(*Tamiasciurus hudsonicus*)粪便中的皮质醇及雄激素的含量发现,喂食云杉种子后粪便中两类固醇激素含量均有显著提高,而喂食花生酱组粪便中的类固醇激素含量显著降低,雄激素含量也有所下降。前文提到血液中的类固醇激素经肝代谢后进入肠道通过粪便排出,有研究推测可能是高纤维素食物缩短了食物残渣在肠道中停留的时间,也使部分未来得及重吸收的激素通过粪便排泄了出来,因此摄入高纤维食物使得粪便中类固醇激素的含量有所升高^[35]。此外,纤维素或其他营养成分也有可能通过影响与类固醇激素代谢有关的胃肠微生物的活性而使粪便类固醇激素代谢物的浓度发生变化^[37]。还有研究表明,摄入高纤维素含量的食物对粪便中的类固醇激素含量没有影响^[38]。因此,在实验过程中要尽量避免研究对象食物的不同。

2 粪样的保存

动物粪便中含有大量微生物,在常温环境下会对粪便中的类固醇激素进行分解,导致检测结果出现偏差^[39]。很多情况下,因为野外条件的限制,不能及时处理粪样,需要采用适当的保存方法使样品中的类固醇激素含量能够在较长时间内维持稳定状态,以保证测定结果的准确性。

2.1 有机溶剂保存 有机溶剂保存是一种传统的保存方法。有机溶剂一般以乙醇为主,但由于动物粪便内及周围环境中的微生物种属构成不同,研究者使用的溶剂以及溶剂的浓度和

用量也不同,黑犀牛(*Diceros bicornis*)粪样采用 80% 的甲醇保存^[40]; Cavigelli^[41]使用 80% 的甲醇或 90% ~ 95% 的乙醇与叠氮化钠(NaN_3)的混合物对动物的粪便进行了长达 5 个月的保存。同种有机溶剂对不同类固醇激素的保存时效也不同,草原狒狒(*Papio cynocephalus*)的粪样使用 95% 乙醇常温保存时,粪样内的雄性激素及孕激素不宜超过 16 d,而皮质醇激素的保存可以达到 30 d^[42]。但是,有机溶剂会改变一些类固醇激素的结构,保存时间比较短。此外,有机溶剂保存需要一定的容器,保存占用的空间比较大,而且有机溶剂在运输中受到一定的限制。因此,在条件允许的情况下,这种保存方法正逐渐被冷冻保存法代替。

2.2 冷冻保存 冷冻保存是指样品采集后立即放入 -20°C 冰箱冷冻,运输到实验室的过程中采用液氮、干冰或者移动冰箱进行保存,到达实验室后再立即放入 -20°C 保存。但是有些情况下,野外不具备冷冻保存的条件,对于较长距离的运输,液氮和冰盒可能也无法维持样品一直处于冷冻状态。草原狒狒的粪样在室温放置 6 h 后,雌二醇含量显著下降,孕酮则明显上升^[16]。Yamauchi 等^[39]的研究也表明常温下梅花鹿(*Cervus nippon*)粪样只能有效保存 24 h。

2.3 烘干保存 烘干保存需要的设备比较简单,太阳能烘箱或传统烘箱均可。样品采集后去除杂质(大型动物粪便适当研碎),放入烘箱烘干,直到水分全部蒸发掉,这个过程一般会持续几个小时。粪样中的水分含量一般在 30% ~ 75% 之间,不同物种以及不同个体间均不相同^[8]。烘干减轻了样品的重量,缩小了样品的体积,更便于携带,但是样品干燥的最适温度和最佳时间尚不确定,不同的烘干条件可能会导致测定的最终结果产生很大偏差。用太阳能炉烘干猎豹的粪便后发现,猎豹粪便中的类固醇激素除睾酮外,皮质醇、雌二醇及孕酮的含量均发生了显著下降,下降幅度达到了 50% ~ 60%^[30]。

总之,以上 3 种保存方法各有利弊。有机溶剂可以很好地抑制粪便中微生物的活性,但是不利于长期保存;冷冻保存的效果最好,但对

仪器设备的要求比较高,在野外常常受到供电、运输等因素的限制^[40,42];经干燥处理的样品更容易转运,但是干燥的最佳温度和时间尚有待深入研究。综合几种保存方法的优缺点,有些研究者采用有机溶剂和冷冻保存相结合的方式,即在常温下利用有机溶剂对样品进行短期保存,待运输后将样品进行冷冻长期保存。此方法的应用使草原狒狒粪样中的糖皮质激素和雌激素的保存时间从 30 d 延长到了 90 ~ 120 d^[42]。

3 类固醇激素的提取

3.1 提取剂 类固醇激素是一种脂溶性激素,具有在非极性溶剂(如苯、乙醚、石油醚等)中溶解的性能。早期粪便中类固醇激素提取很多采用的是乙醚、石油醚提取法^[43]。但粪便中的类固醇激素是以结合体的形式排出体外的,高效液相色谱分析显示激素代谢物都是极性的。极性越大越容易溶于水,因此,非极性的乙醚、石油醚等对类固醇激素代谢物的提取效果并不是很好,需要采用具有一定极性的有机溶剂作为提取液。随着提取技术的不断改进,越来越多的研究人员采用一定浓度的甲醇或乙醇提取类固醇激素^[21]。

不同动物类群,甚至同一类群的不同种群粪便中激素代谢物的种类均可能不同^[24],因此最适宜的激素提取液浓度不同。Brown 等^[44]在家猫(*Felis catus*)的研究中表明,乙醇浓度为 90% 时,粪便中雌二醇和孕酮的提取率最高。鸟类粪便的极性比较大,使用的乙醇提取液浓度相对较低。Wasser 等^[8]分别用 100%、90% 和 80% 的乙醇提取横斑林鸮和美洲雕鸮粪便中的雌二醇、睾酮、孕酮和皮质酮,发现在乙醇浓度为 80% 时,各种激素的回收率都是最高的。美洲白鸮(*Eudocimus albus*)粪便中类固醇激素的提取实验也得出同样结果^[21]。

3.2 样品准备 采集的粪便中常有砂粒和纤维等杂质,为了结果的准确性,需尽量将这些物质除去^[6,10]。豚尾猴(*Macaca nemestrina*)的研究表明,在进行激素提取前对样品进行冻干处

理,会增大提取率而且会排除高纤维食物引起的含水量及干物质增加等对激素提取物造成的影响^[41],但对鸟类的冻干粪样和未经处理的粪便进行激素检测发现,冻干处理和未干燥处理粪样的提取检测结果具有很好的相关性^[8],且用未处理的粪样进行提取得到的结果更稳定一些。此外,对于鸟类和爬行类等粪便比较少的物种来说,冻干处理会使粪样量变得更小,影响测量结果的准确性。为了实验的准确性,建议对采集的粪便不做处理,直接提取类固醇激素,另取一份粪样,用于含水量的测定,最后类固醇激素的浓度仍以每克干粪所含的量为单位。

4 激素的检测

4.1 检测方法 类固醇激素检测主要使用的方法有放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)^[18]和酶免疫分析法(enzyme immunoassay, EIA)^[15,40]。在众多物种粪便类固醇激素的研究中 RIA 和 EIA 应用的频次差不多。RIA 具有精度高、稳定性强的优点,作为一种传统的分析方法,已有比较成熟的商业化标记抗体,应用方便。但是,这些商业化标记的抗体主要是针对血液中的类固醇激素的,其与粪便中类固醇激素代谢物的交互作用尚不十分清楚^[45],不同物种粪便中类固醇激素代谢物的种类也多种多样,专门合成特定的放射性标记抗体非常昂贵。相比较来说,EIA 的主要优点是其抗体能与具有同种结构的多种粪便类固醇激素代谢物反应,具有群体特异性。加之酶免分析法不需要使用放射性物质^[6],对仪器设备和人员防护的要求低,近年来主要使用 EIA 对粪便中的类固醇激素代谢物进行检测。

4.2 抗体选择 血液中类固醇激素检测使用的抗体具有高度特异性,但大多数用于粪便中类固醇激素检测的抗体具有群体特异性,有相同结合部位的所有激素代谢物都可以被检测到^[33]。虽然如此,在抗体选择时需尽量选择实验物种的特异性抗体,如果没有,可以考虑近缘物种的抗体。因为不同类群,甚至同一物种的不同种群,类固醇激素的产物也可能不同,如在

鸟类和小型哺乳动物中最主要的糖皮质激素是皮质酮,而中大型哺乳动物及鱼类中,主要的糖皮质激素是皮质醇^[24]。

4.3 提取液的浓度 粪样中的类固醇激素一般是用甲醇或乙醇提取的,这些试剂均为有机溶剂,而检测所用的抗体是蛋白质,李春等^[46]认为如果甲醇提取液直接与抗体进行反应,可能会影响抗原与抗体特异性结合。作者对同浓度,甲醇含量分别为0%、2%、5%、10%、15%、20%、50%的样品进行了检测,当甲醇含量超过10%时,测得浓度较甲醇含量为0%时降低了27.9%~60.6%。因此,我们建议在样品提取的最后一步蒸干提取液,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)溶解激素或在检测前用缓冲液对样品进行一定比例稀释,以降低提取液浓度。此外,通过稀释还可以控制样品浓度,使检测的光密度(optical density, OD)值落在可靠的范围内,提高检测结果的准确性。

5 总结与展望

类固醇激素在动物生理机制调节及维持生理平衡方面具有重要作用。对粪便中的类固醇激素进行检测作为一种非损伤性方法在野生动物的研究中得到了广泛应用。由于采集粪便的过程中,动物的行为、内分泌状态和生理机能不会受到捕捉、绑定及采血刺激等因素的干扰,因此,可以进行连续采样,便于野生动物的长期监测。

但是,粪便中类固醇激素的应用受很多因素制约,考虑不周会影响实验结果的可靠性,并且浪费大量的人力和物力。所以,如何改进方法,提高准确性尤为关键。粪便中的类固醇激素与血液中的类固醇激素不同,为类固醇激素代谢物。不同种类的动物合成激素代谢物的形式不同,粪便中激素代谢物所占的比例也不同。粪便中类固醇激素检测技术的应用包括采样、样品保存、提取及检测几大流程,因为物种本身生理变化,粪便类固醇激素会受性别的影响,并具有日节律和季节性变化。其次,来自于

样品本身一些特性,如样品的新鲜程度,样品的质量以及样品的采集部位等也会对研究结果的准确性产生影响。再者,实验操作过程中的保存方法、样品处理方法和抗体选择等都会导致粪便中类固醇激素检测结果的变化。此外动物的食性也是粪便类固醇激素含量的影响因素之一,但其对粪便中类固醇激素水平的影响作用,目前研究还不够透彻,大部分研究表明食性会造成粪便中的类固醇激素含量发生变化,但是升高还是降低,具体机理又是如何,还有待进一步研究。伐木^[18]、烧荒^[47]、交通^[48]、噪音^[49]、农事活动^[50]及生态旅游^[51]等人为干扰活动会造成动物的应激行为,对动物的生存和生殖产生一定影响,研究中多以糖皮质激素作为动物对干扰应激性的检测激素。近年来, Taylor等^[52]研究发现,人为干扰等会导致睾酮含量升高,这表明性激素含量的变化不仅受生理机能的调控,还可能与外界影响有关。因此外界干扰作为一个因素,其对性激素含量的影响是否具有普遍性以及针对不同物种中同种激素的影响作用是否一致,还需深入探讨,以保证粪便中性激素含量变化用于野生动物生理状况的监测更加准确。

总之,粪便中类固醇激素检测的准确性受多种因素影响,这些因素在设计实验时都需要考虑,同时包括各个因素间的交叉作用。一种因素对实验的影响可能不大,但是多种因素重叠在一起就可能使实验结果产生较大的偏差。本文对这些因素进行了总结和讨论,并提出相关建议。在实际应用中,还是需要根据研究对象和实验目的等情况进行针对性分析,以求实验的精炼与准确。

参 考 文 献

- [1] Goerlich V C, Dijkstra C, Groothuis T G. Effects of *in vivo* testosterone manipulation on ovarian morphology, follicular development, and follicle yolk testosterone in the homing pigeon. *Ecological Genetics and Physiology*, 2010, 313(6): 328-338.
- [2] 陈璐, 岳曦. 非损伤性取样研究进展. *四川动物*, 2007, 26(1): 224-226.

- [3] Harper J M, Austad S N. Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2000, 7(1): 12 – 22.
- [4] Harper J M, Austad S N. Effect of capture and season on fecal glucocorticoid levels in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 123(3): 337 – 344.
- [5] 李春旺, 蒋志刚. 麋鹿繁殖行为和粪样激素水平变化的关系. *兽类学报*, 2000, 20(2): 88 – 100.
- [6] Goymann W. 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*, 2005, 1046(1): 35 – 53.
- [7] Goymann W, Möstl E, Gwinner E. Non-invasive methods to measure androgen metabolites in excrements of European stonechats, *Saxicola torquata rubicola*. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 129(2): 80 – 87.
- [8] Wasser S K, Hunt K E. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1046(1): 109 – 137.
- [9] Ninnes C E, Waas J R, Ling N, et al. Comparing plasma and faecal measures of steroid hormones in Adelie penguins *Pygoscelis adeliae*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2010, 180(1): 83 – 94.
- [10] 张雁云, 郑光美. 笼养下黄腹角雉 (*Tragopan caboti*) 粪便中性激素的变化研究. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 2001, 37(5): 685 – 689.
- [11] Kummrow M S, Gilman C, Mackie P, et al. Noninvasive analysis of fecal reproductive hormone metabolites in female veiled chameleons (*Chamaeleo calytratus*) by enzyme immunoassay. *Zoo Biology*, 2011, 30(1): 95 – 115.
- [12] Szymanski D, Gist D, Roth T. Anuran gender identification by fecal steroid analysis. *Zoo Biology*, 2006, 25(1): 35 – 46.
- [13] Kidd C E, Kidd M R, Hofmann H A. Measuring multiple hormones from a single water sample using enzyme immunoassays. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(2): 277 – 285.
- [14] Wysocki L E, Dittami J P, Ladich F. Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes. *Biological Conservation*, 2006, 128(4): 501 – 508.
- [15] Hirschenhauser K, Möstl E, Kotrschal K. Seasonal patterns of sex steroids determined from feces in different social categories of Greylag Geese (*Anser anser*). *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 114(1): 67 – 79.
- [16] Wasser S, Risler L, Steiner R. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 1988, 39(4): 862.
- [17] Buchanan K, Goldsmith A, Hinde C, et al. Does testosterone mediate the trade-off between nestling begging and growth in the canary (*Serinus canaria*)? *Hormones and Behavior*, 2007, 52(5): 664 – 671.
- [18] Wasser S K, Bevis K, King G, et al. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. *Conservation Biology*, 1997, 11(4): 1019 – 1022.
- [19] Goymann W, Möstl E, Gwinner E, et al. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). *The Auk*, 2002, 119(4): 1167 – 1173.
- [20] Tempel D J, Gutiérrez R. Factors related to fecal corticosterone levels in California spotted owls: implications for assessing chronic stress. *Conservation Biology*, 2004, 18(2): 538 – 547.
- [21] Adams E M, Frederick P C, Larkin I L V, et al. Sublethal effects of methylmercury on fecal metabolites of testosterone, estradiol, and corticosterone in captive juvenile white ibises (*Eudocimus albus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(5): 982 – 989.
- [22] Paramastri Y, Royo F, Eberova J, et al. Urinary and fecal immunoglobulin A, cortisol and 11-17 dioxandrostanes, and serum cortisol in metabolic cage housed female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Medical Primatology*, 2007, 36: 355 – 364.
- [23] Cavigelli S, Monfort S, Whitney T, et al. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *Journal of Endocrinology*, 2005, 184(1): 153.
- [24] Palme R, Rettenbacher S, Touma C, et al. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1040(1): 162 – 171.
- [25] 于小杰, 胡德夫, 唐勇清, 等. 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*, 2010, 14(4): 187 – 189.
- [26] Goymann W, Möstl E, Van't Hof T, et al. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in Spotted Hyenas

- (*Crocota crocuta*). General and Comparative Endocrinology, 1999, 114(3): 340–348.
- [27] Romero L M, Remage-Healey L. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): corticosterone. General and Comparative Endocrinology, 2000, 119(1): 52–59.
- [28] Dufty Jr A M, Belthoff J R. Corticosterone and the stress response in young western screech-owls: effects of captivity, gender, and activity period. Physiological Zoology, 1997, 70(2): 143–149.
- [29] Washburn B E, Millsbaugh J J. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. General and Comparative Endocrinology, 2002, 127(3): 217–222.
- [30] Terio K A, Brown J L, Moreland R, et al. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. Zoo Biology, 2002, 21(3): 215–222.
- [31] Goymann W, Trappschuh M. Seasonal and diel variation of hormone metabolites in european stonechats: On the importance of high signal-to-noise ratios in noninvasive hormone studies. Journal of Biological Rhythms, 2011, 26(1): 44.
- [32] Hayward L S, Booth R K, Wasser S K. Eliminating the artificial effect of sample mass on avian fecal hormone metabolite concentration. General and Comparative Endocrinology, 2010, 169(1): 117–122.
- [33] Christina G, Servheen C. Measuring stress in mammals using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. Wildlife Society Bulletin, 2002, 30(4): 1215–1225.
- [34] Goldin B R, Adlercreutz H, Dwyer J T, et al. Effect of diet on excretion of estrogens in pre-and postmenopausal women. Cancer Research, 1981, 41(6): 3771.
- [35] Goldin B R, Adlercreutz H, Gorbach S L, et al. Estrogen excretion patterns and plasma levels in vegetarian and omnivorous women. New England Journal of Medicine, 1982, 307(23): 1542–1547.
- [36] Dantzer B, McAdam A G, Palme R, et al. How does diet affect fecal steroid hormone metabolite concentrations? An experimental examination in red squirrels. General and Comparative Endocrinology, 2011, 174(2): 124–131.
- [37] Wasser S, Thomas R, Nair P, et al. Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). Journal of Reproduction and Fertility, 1993, 97(2): 569.
- [38] Christina G, Wasser S K, Hunt K E, et al. Factors associated with fecal glucocorticoids in Alaskan brown bears (*Ursus arctos horribilis*). Physiological and Biochemical Zoology, 2004, 77(2): 313–320.
- [39] Yamauchi K, Hamasaki S, Takeuchi Y, et al. Application of enzyme immunoassay to fecal steroid analysis in sika deer (*Cervus nippon*). Journal of Reproduction and Development, 1999, 45(6): 429–434.
- [40] Galama W T, Graham L H, Savage A. Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). Zoo Biology, 2004, 23(4): 291–300.
- [41] Cavigelli S A. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. Animal Behavior, 1999, 57(4): 935–944.
- [42] Khan M, Altmann J, Isani S, et al. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. General and Comparative Endocrinology, 2002, 128(1): 57–64.
- [43] Miyamoto S, Chen Y, Kurotori H, et al. Monitoring the reproductive status of female gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) by measuring the steroid hormones in fecal samples. Primates, 2001, 42(4): 291–299.
- [44] Brown J L, Wasser S K, Wildt D E, et al. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. Biology of Reproduction, 1994, 51(4): 776–786.
- [45] Mateo J M, Cavigelli S A. A validation of extraction methods for noninvasive sampling of glucocorticoids in free-living ground squirrels. Physiological and Biochemical Zoology, 2005, 78(6): 1069–1084.
- [46] 李春, 魏辅文, 胡锦涛. 雌性大熊猫粪样中雌二醇与孕酮水平的变化与繁殖启动的关系. 动物学研究, 2005, 26(2): 147–151.
- [47] Artman V L, Sutherland E K, Downhower J F. Prescribed burning to restore mixed-oak communities in southern ohio: effects on breeding-bird populations. Conservation Biology, 2001, 15(5): 1423–1434.
- [48] Forman R T, Alexander L E. Roads and their major ecological effects. Annual Review of Ecology and Systematics, 1998, 29: 207–231.
- [49] Hildebrand J A. Impacts of Anthropogenic Sound. Marine Mammal Research: Conservation Beyond Crisis. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005: 101–124.
- [50] Wysocki L E, Davidson J W, Smith M E, et al. Effects of aquaculture production noise on hearing, growth, and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 2007, 272(1/4): 687–697.
- [51] Bouton S N, Frederick P C, Rocha C D, et al. Effects of

- tourist disturbance on Wood Stork nesting success and breeding behavior in the Brazilian Pantanal. *Waterbirds*, 2005, 28(4): 487-497.
- [52] Taylor G T, Maloney S, Dearborn J, et al. Hormones in the mentally disturbed brain; steroids and peptides in the development and treatment of psychopathology. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 2010, 9(4): 331.
-

《动物学杂志》第十一届编辑委员会

名誉主编: 马 勇

主 编: 宋延龄

副 主 编: 赵 勇 彭景榭 孙悦华 梁 冰(常务)

编 委: (以姓氏笔画为序)

丁长青 马 勇 马志军 马建章 王德华 计 翔 石树群 孙青原 孙悦华
刘迺发 许木启 李 明 李保国 李枢强 李新正 张正旺 张春光 张明海
张树义 张海燕 宋延龄 宋林生 宋昭彬 杨增明 宛新荣 郑光美 赵 勇
费 梁 钟文勤 桂建芳 夏国良 徐存拴 徐宏发 徐延恭 梁 冰 彭贤锦
彭景榭 蒋志刚 戴家银 魏辅文

责任编辑: 顾亦农 梁 冰