

雄性大熊猫褪黑素与睾酮季节性变化

黄河 叶宗金 兰景超 黄祥明 刘玉良
蔡志刚 胡贤彪 张东升 侯蓉*

成都大熊猫繁育研究基地, 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 四川省大熊猫科学研究院 成都 610081

摘要: 褪黑素通过调控下丘脑-垂体-性腺内分泌轴使季节性繁殖动物在适宜的季节进行繁殖活动。大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 在春季集中繁殖。为探究雄性大熊猫褪黑素和睾酮的季节性变化规律, 本研究选取成都大熊猫繁育研究基地 3 只成年雄性大熊猫作为实验对象, 在自然光照下对这 3 只大熊猫进行每周 1 次为期 1 年 (2018 年 8 月至 2019 年 7 月) 的尿液样品采集。依据当地气候情况, 将 3 至 5 月作为春季, 6 和 7 月为夏季, 8 至 11 月为秋季, 12 月至翌年 2 月为冬季。采用酶联免疫法 (ELISA) 测定尿样中褪黑素和睾酮水平。采用单因素方差分析 (one way-ANOVA) 及独立样本 *T* 检验对四个季节激素水平进行差异性分析。结果表明, 褪黑素水平在冬季分别极显著高于秋季、春季及夏季 ($P < 0.01$), 秋季、春季以及夏季三个季节间差异不显著 ($P > 0.05$)。睾酮水平在冬季分别极显著高于秋季与夏季 ($P < 0.01$), 春季亦分别极显著高于秋季与夏季 ($P < 0.01$), 但冬季与春季差异不显著 ($P > 0.05$), 秋季与夏季亦差异不显著 ($P > 0.05$)。研究表明, 雄性大熊猫褪黑素和睾酮分泌水平呈现出季节性变化, 从秋季到冬季, 雄性大熊猫褪黑素和睾酮水平同步升高, 从冬季到春季繁殖季节, 褪黑素水平极显著下降, 但睾酮仍处在高位水平。该研究结果可为进一步研究褪黑素对大熊猫季节性繁殖影响提供基础数据。

关键词: 大熊猫; 尿液; 褪黑素; 睾酮; 季节性

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 01-117-07

Seasonal Changes in Melatonin and Testosterone Levels in Male Giant Pandas

HUANG He YE Zong-Jin LAN Jing-Chao HUANG Xiang-Ming LIU Yu-Liang
CAI Zhi-Gang HU Xian-Biao ZHANG Dong-Sheng HOU Rong*

Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered

Wildlife, Sichuan Academy of Giant Panda, Chengdu 610081, China

Abstract: Melatonin is important for seasonal breeding animals to display their breeding characteristics in an appropriate season by regulating the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The Giant Panda (*Ailuropoda*

基金项目 四川省科技计划项目 (No. 2018JY0232), 成都大熊猫繁育研究基金会项目 (No. CPF2017-09);

* 通讯作者, E-mail: 405536517@qq.com;

第一作者介绍 黄河, 男, 副研究员; 研究方向: 濒危野生动物繁育与保护; E-mail: youngtree@163.com.

收稿日期: 2021-08-05, 修回日期: 2021-11-23 DOI: 10.13859/j.cjz.202201012

melanoleuca) is a seasonal breeding mammal, usually breeding from March to May. **[Objectives]** To explore the seasonal changes in melatonin and testosterone in male giant pandas, **[Methods]** urine samples from three adult male giant pandas housed at the Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding were collected once a week for one year (2018.8-2019.7) under natural photoperiod conditions. Depending on the local climate, spring is from March to May, summer includes June and July, autumn is from August to November, and winter is from December to February of the following year. These samples were analyzed for urinary melatonin and testosterone levels by ELISA. The seasonal changes of melatonin and testosterone levels were analyzed by one one-way ANOVA, and the differences of inter-seasonal data were analyzed by independent sample *t*-test. The data of testosterone levels were adjusted for homogeneity of variance by using the log value for analysis, however, all graphs were expressed in the actual testosterone levels. **[Results]** The results indicated that melatonin levels showed a seasonal secretion pattern (Fig. 1 and 2) and its level in winter was extremely significantly higher than that in autumn, spring and summer, respectively ($P < 0.01$), and there were no significant differences among the levels in autumn, spring or summer ($P > 0.05$). Testosterone levels also showed a seasonal secretion pattern (Fig. 3 and 4) and its level in winter was extremely significantly higher than that in autumn or summer ($P < 0.01$). Testosterone level in spring was also extremely significantly higher than that in autumn or summer ($P < 0.01$), however no significant difference was detected between winter and spring ($P > 0.05$). Additionally, there was no significant difference between autumn and summer either ($P > 0.05$). **[Conclusion]** Urinary melatonin and testosterone levels show seasonal changes. Melatonin and testosterone levels increase synchronously from autumn to winter; melatonin level decreases sharply, while testosterone remains at a high level from winter to spring. The results provide reference data for further investigation of the effect of melatonin on the seasonal breeding of giant pandas.

Key words: Giant Panda, *Ailuropoda melanoleuca*; Urine; Melatonin; Testosterone; Seasonality

性腺雄激素与雄性动物的生殖状况、繁殖周期变化等密切相关。雄激素包含的种类很多,其中以睾酮(testosterone)生物活性最高。Howell-Skalla等(2002)报道,成年雄性北极熊(*Ursus maritimus*)繁殖周期中睾酮水平与睾丸大小存在正相关,进入繁殖期睾酮水平和睾丸大小分别显著增高和增大。Anel-López等(2017)发现,性成熟棕熊(*U. arctos*)精液中睾酮水平与精子活力的高低无相关性。在对雄性大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)研究中,Macdonald等(2006)报道,成年雄性大熊猫尿液睾酮峰值出现时间与繁殖季节开始相关,睾酮水平与繁殖成功与否无相关性;Kersey等(2010)发现,成年雄性大熊猫在繁殖启动后粪样睾酮与糖皮质激素水平同步升高;Aitken-Palmer等(2012)报道,成年雄性大熊猫粪样

睾酮水平与精液密度及繁殖行为伴随季节变化而同步增加或降低。

不同于性腺激素,褪黑素(melatonin)是主要由松果体分泌的一种生殖激素,通过调控下丘脑-垂体-性腺内分泌轴各部位激素的节律变化,使季节性繁殖动物在适宜的季节启动繁殖活动(Tamarkin et al. 1985)。近年来,研究发现褪黑素对季节性繁殖动物的调控具有物种差异性。仓鼠、马及禽等在褪黑素水平逐渐降低的春夏季节进行繁殖,褪黑素对繁殖表现为抑制作用;而鹿、绵羊和山羊等在褪黑素水平逐渐升高的秋冬季节进行繁殖,褪黑素对繁殖则表现为促进作用(Duncan et al. 1990, Gerlach et al. 2000, Dawson et al. 2001, Dardente et al. 2012)。在褪黑素与睾酮相关报道中,Casao等(2010)发现在拉萨-阿拉贡内斯公羊

繁殖周期中, 成年公羊精浆褪黑素和睾酮水平从夏末开始同步上升并均于秋季繁殖期达到最高水平, 冬季后开始同步下降并持续到翌年夏季。Li 等 (1998) 研究生活在青藏高原的高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 发现, 成年雄性高原鼠兔秋冬季节褪黑素水平逐渐升高, 睾酮水平不断降低; 翌年春季进入繁殖期后褪黑素水平不断降低至全年最低, 睾酮水平则逐渐升高至全年最高; 夏季褪黑素开始恢复上升, 睾酮水平迅速下降。

大熊猫是季节性单次繁殖动物, 在每年春季 3 至 5 月进入集中繁殖期 (蒋辉等 2012)。褪黑素是否影响大熊猫下丘脑-垂体-性腺内分泌轴各部位激素的节律变化需要进一步验证。为此, 鉴于圈养与野生种群大熊猫繁殖时间无显著差异 (张志和等 2006), 本研究首先进行圈养成年雄性大熊猫褪黑素水平季节性变化分析, 同时结合性腺睾酮水平, 探索 and 了解褪黑素对雄性大熊猫繁殖的影响, 期望该研究为充实大熊猫繁殖生物学理论以及进一步研究大熊猫季节性繁殖特征奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验对象与样品采集

选取成都大熊猫繁育研究基地 (北纬 30°42', 东经 104°6') 3 只健康成年雄性大熊猫 (表 1)。在自然光下采集大熊猫尿液样品, 采样时间从 2018 年 8 月到 2019 年 7 月, 每周每只个体采集 1 次, 相邻两次采样间隔 5 ~ 7 d, 每月每只个体共采集 4 个样品。采样时间为 8:00 ~ 9:00 时, 待大熊猫排尿后用一次性注射器从干净的兽舍地面吸取尿液 2 ml, 装入冻存

管, 标注好对应大熊猫名字与采样日期后保存于 -40 °C 冰箱, 待检测分析。

1.2 激素测定

采用酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定大熊猫尿样中褪黑素和睾酮浓度。鉴于动物体内褪黑素主要在肝内代谢为 6-羟基褪黑素硫酸盐后经尿液排出体外, 尿液中 6-羟基褪黑素硫酸盐水平与体内血液中褪黑素水平具有很好的相关性 (Griefahn et al. 2001), 本研究即采用商品化 ELISA 试剂盒 (IBL 公司, 货号 RE54031, 德国, 灵敏度 1.0 µg/L, 批次内变异系数小于 2%, 批次间变异系数小于 14%) 测定大熊猫尿样 6-羟基褪黑素硫酸盐浓度, 指示褪黑素浓度。采用商品化 ELISA 试剂盒 (ARBOR ASSAYS 公司, 货号 K032-H1, 英国, 灵敏度 9.92 ng/L, 批次内变异系数小于 11%, 批次间变异系数小于 11%) 测定大熊猫尿样中睾酮浓度。将尿样从 -40 °C 冰箱取出 (避免反复冻融), 室温融化后室温下 3 000 r/min 离心 10 min, 取离心后尿样分别按照对应 ELISA 试剂盒说明, 利用酶标仪 (Thermo scientific multiskan MK3 型) 检测尿样中褪黑素与睾酮浓度。

1.3 尿液激素水平计算

将尿样测定激素浓度除以该尿样肌酐 (creatinine, Cr) 浓度的比值作为经肌酐校正后尿样激素水平 (mg/g)。大熊猫尿液肌酐浓度测定参照罗婍等 (2011) 报道方法。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 进行实验数据的统计分析。取大熊猫每月 4 个尿样激素结果的平均值代表对应月份激素水平。将 3 只大熊猫作为整体,

表 1 参试雄性大熊猫情况

Table 1 The conditions of the tested male Giant Panda

大熊猫谱系编号 Panda studbook number	大熊猫名 Panda name	出生时间 (年-月) Year of birth (Year-month)	健康状况 Health condition
584	勇勇 Yongyong	2004-08	健康 Healthy
717	蜀祥 Shuxiang	2008-08	健康 Healthy
711	功仔 Gongzi	2008-07	健康 Healthy

分析激素的季节性差异，秋季、冬季、春季及夏季分别对应 2018 年 8 至 11 月、2018 年 12 月至 2019 年 2 月、2019 年 3 至 5 月及 2019 年 6 和 7 月。褪黑素水平季节数据经正态分布和方差齐性检验，符合参数检验条件；睾酮水平季节数据经对数转换后 (White et al. 2005, Kersey et al. 2010) 满足方差齐性检验，符合参数检验条件。褪黑素和睾酮水平季节性变化采用单因素方差分析 (one way-ANOVA)，季节间数据采用独立样本 *T* 检验进行差异性分析。数据以平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示，文中睾酮水平季节数据仍以实际测定数据表示。P < 0.05 为差异显著，P < 0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 褪黑素水平季节性变化

3 只大熊猫 2018 年 8 月至 2019 年 7 月褪黑素水平变化相似 (图 1)。3 只大熊猫褪黑素水平经肌酐校正后在 2018 年 8 至 10 月 3 个月均在低于 6 mg/g 波动；2018 年 11 月均升高到 6 mg/g 以上并持续上升至 2019 年 1 月达到峰值；2019 年 2 月开始持续下降。其中，大熊猫蜀祥与功仔在 2019 年 3 月、勇勇在 2019 年 4 月，褪黑素水平分别降至 6 mg/g 以下。3 只大熊猫 2019 年 5 至 7 月 3 个月褪黑素水平均在低于 6 mg/g 波动。

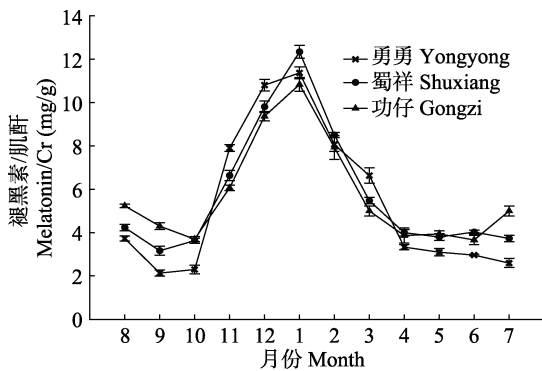


图 1 成年雄性大熊猫个体褪黑素水平月份变化
Fig. 1 Monthly melatonin levels in adult male Giant Panda individual

将 3 只大熊猫作为整体进行褪黑素水平季节性变化分析，褪黑素水平季节性差异极显著 ($F_{3,32} = 31.688$, $P < 0.01$, 图 2)。褪黑素水平经肌酐校正后，冬季 (9.88 ± 0.51) mg/g 极显著高于秋季的 (4.42 ± 0.67) mg/g ($t = 6.468$, $P < 0.01$)、春季的 (4.35 ± 0.38) mg/g ($t = 8.165$, $P < 0.01$) 及夏季的 (3.66 ± 0.34) mg/g ($t = 8.906$, $P < 0.01$)。此外，褪黑素水平秋季高于春季，夏季最低，但三个季节间差异不显著 ($F_{2,24} = 0.544$, $P > 0.05$)。

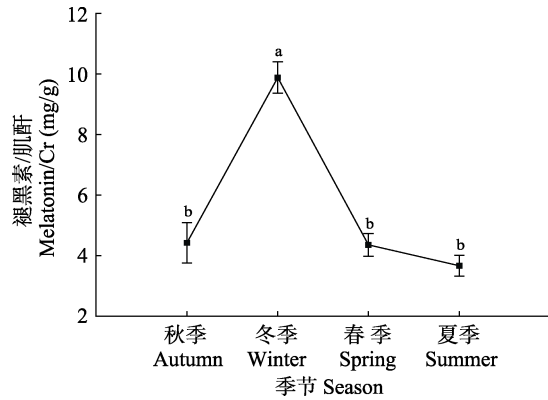


图 2 成年雄性大熊猫褪黑素水平季节性变化

Fig. 2 Seasonal changes of melatonin levels in adult male Giant Pandas (n = 3)

标识字母不同的季节间差异极显著，P < 0.01。

Different letters indicate extremely significant differences among seasons (P < 0.01).

2.2 睾酮水平季节性变化

3 只大熊猫 2018 年 8 月至 2019 年 7 月睾酮水平变化相似 (图 3)。3 只大熊猫睾酮水平经肌酐校正后 2018 年 8 月至 10 月 3 个月份均在低于 20 mg/g 波动；2018 年 11 月均升高到 20 mg/g 以上。大熊猫勇勇与蜀祥睾酮水平从 2018 年 11 月至 2019 年 3 月持续上升并于 2019 年 3 月达到峰值；2019 年 4 至 7 月开始持续下降，其中 2019 年 5 至 7 月 3 个月睾酮水平均低于 20 mg/g。大熊猫功仔睾酮水平从 2018 年 11 至 12 月持续上升；2019 年 1 月有所回落后于 2 月上升并达到峰值；2019 年 3 至 7 月持续下降，

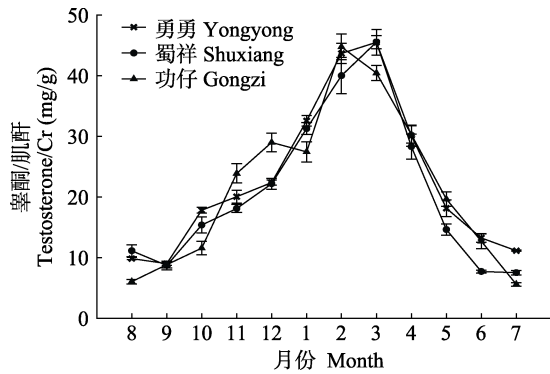


图3 成年雄性大熊猫个体睾酮水平月份变化

Fig. 3 Monthly testosterone levels in adult male Giant Panda individual

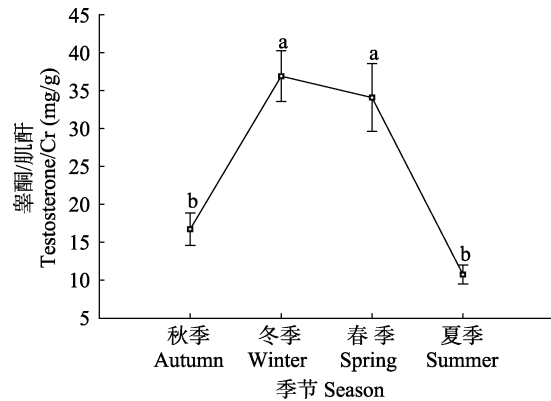


图4 成年雄性大熊猫睾酮水平季节性变化

Fig. 4 Seasonal changes of testosterone levels in adult male Giant Pandas ($n = 3$)

其中2019年6和7月睾酮水平均低于20 mg/g。

将3只大熊猫作为整体进行睾酮水平季节性变化分析,睾酮水平季节性差异极显著($F_{3,32} = 20.401$, $P < 0.01$, 图4)。睾酮水平经肌酐校正后,冬季(36.89 ± 3.34) mg/g 极显著高于秋季的(16.73 ± 2.13) mg/g ($t = 5.082$, $P < 0.01$)与夏季的(10.75 ± 1.26) mg/g ($t = 6.117$, $P < 0.01$);春季的(34.08 ± 4.47) mg/g 亦极显著高于秋季($t = 3.504$, $P < 0.01$)与夏季($t = 4.140$, $P < 0.01$)。此外,睾酮水平冬季与春季差异不显著($t = -0.505$, $P > 0.05$),秋季与夏季亦差异不显著($t = -2.113$, $P > 0.05$)。

3 讨论

本研究表明,雄性大熊猫褪黑素与睾酮分泌水平均呈现季节性变化。褪黑素分泌水平与日照长短相关,松果体在长日照条件下合成和分泌褪黑素量减少,短日照条件下合成和分泌量增加(Migaud et al. 2001)。雄性大熊猫褪黑素水平的季节性特征反映出圈养条件下生活环境四季日照长短的变化。Macdonald等(2006)对包括中国卧龙大熊猫保护中心、圣地亚哥动物园与日本冒险世界乐园以及Aitken-Palmer等(2012)对成都大熊猫繁育研究基地的成年雄性大熊猫研究均表明,成年雄性个体睾酮水平从秋季10月开始持续上升,并于翌年冬春季

标识字母不同的季节间差异极显著, $P < 0.01$ 。

Different letters indicate extremely differences among seasons ($P < 0.01$).

2至3月达到峰值后持续下降至夏季。本研究中睾酮水平的变化特征与上述研究结论吻合。

本研究表明,雄性大熊猫春季褪黑素由冬季高位水平极显著下降,睾酮则处于高位水平,春季正值大熊猫集中繁殖时期,雄性大熊猫春季褪黑素与睾酮分泌水平符合春夏季节性繁殖动物特征。另一方面,雄性大熊猫秋冬季睾酮分泌表现为与褪黑素水平同步升高并在冬季达到高位水平。先前相关研究认为,不同于其他熊科动物(如亚洲黑熊 *U. thibetanus*、北美黑熊 *U. americanus* 及北极熊)睾酮在繁殖期上升至高位水平,大熊猫睾酮早于繁殖期达到高位水平的特征可能与大熊猫不冬眠和四季食物充足有关(Schaller et al. 1985)。此外, Gocinski等(2018)通过在秋冬季将成年雄性大熊猫与具有发情表现的雌性大熊猫相邻饲养,发现雄性个体睾酮水平显著升高,分析认为在秋冬季非繁殖期,雌性大熊猫发情状况也是影响雄性睾酮分泌的重要因素。本研究推测雄性大熊猫睾酮在秋冬非繁殖季节的分泌特征除受到褪黑素作用外,还与自身物种特性以及圈养条件下异性影响等其他因素的共同作用有关。

褪黑素水平变化信息通过下丘脑内侧基底

部 (mediobasal hypothalamus, MBH) 和垂体腺结节部 (pars tuberalis, PT) 等对应的信号通路引起下丘脑促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 分泌脉冲频率变化, 进而调节下丘脑-垂体-性腺内分泌轴各部位激素的节律变化, 最终调控季节性繁殖动物的繁殖活动 (Yoshimura et al. 2003, Hanon et al. 2008, Barrett et al. 2012)。为进一步明晰褪黑素对大熊猫季节性繁殖影响, 下一步需对雄性和雌性大熊猫整体褪黑素与下丘脑-垂体-性腺内分泌轴相关激素的季节性变化进行研究。在综合考虑诸如年龄、光环境、异性接触等可能影响激素分泌因素的前提下, 明确褪黑素是否调控大熊猫下丘脑-垂体-性腺内分泌轴。若褪黑素对大熊猫下丘脑-垂体-性腺内分泌轴存在调控作用, 则进一步探究褪黑素调控大熊猫下丘脑-垂体-性腺内分泌轴经由的信号通路, 同时结合季节性变化过程中大熊猫生理及行为等变化, 阐明褪黑素对大熊猫季节性繁殖调控的机理。

致谢 感谢成都大熊猫繁育研究基地王成东主任以及动物饲养部吴孔菊科长、奉永友、李翰、张皓在实验及样品采集中提供的建议和帮助, 感谢 James Ayala 对英文部分的校正。

参 考 文 献

- Aitken-Palmer C, Hou R, Burrell C, et al. 2012. Protracted reproductive seasonality in the male Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) reflected by patterns in androgen profiles, ejaculate characteristics, and selected behaviors. *Biology of Reproduction*, 86(6): 195.
- Anel-López L, Ortega-Ferrusola C, Martínez-Rodríguez C, et al. 2017. Analysis of seminal plasma from brown bear (*Ursus arctos*) during the breeding season: Its relationship with testosterone levels. *PLoS One*, 12: 8.
- Barrett P, Bolborea M. 2012. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 52(4): 376–388.
- Casao A, Cebrián L, Asumpcão M E, et al. 2010. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8: 59.
- Dardente H. 2012. Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long day lengths and thyroid hormones. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(2): 249–266.
- Dawson A, King V M, Bentley G E, et al. 2001. Photoperiodic control of seasonality in birds. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4): 365–380.
- Duncan M J, Fang J M, Dubocovich M L. 1990. Effects of melatonin agonists and antagonists on reproduction and body weight in the Siberian hamster. *Journal of Pineal Research*, 9(5): 231–242.
- Gerlach T, Aurich J E. 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, 58(3/4): 197–213.
- Gocinski B L, Knott K K, Roberts B M, et al. 2018. Changes in urinary androgen concentration indicate that male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) respond to impending female oestrus during and outside the typical spring breeding season. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(2): 399–408.
- Griefahn B, Remer T, Blaszewicz M, et al. 2001. Long-term stability of 6-hydroxymelatonin sulfate in 24h urine samples store at -20 °C. *Endocrine*, 15(2): 199–202.
- Hanon E A, Lincoln G, Fustin J M, et al. 2008. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Current Biology*, 18(15): 1147–1152.
- Howell-Skalla L A, Cattet M R, Ramsay M A, et al. 2002. Seasonal changes in testicular size and serum LH₁, prolactin and testosterone concentrations in male polar bears (*Ursus maritimus*). *Reproduction*, 123: 729–733.
- Kersey D C, Wildt D E, Brown J L, et al. 2010. Parallel and seasonal changes in gonadal and adrenal hormones in male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Mammalogy*, 96(6): 1496–1507.
- Li Z W, Sun R Y, Du J Z. 1998. Seasonal reproduction cycles in male plateau pike (*Ochotona curzoniae*). *Acta Theriologica Sinica*, 18(1): 42–49.
- Macdonald E, Czekala N, Wang P Y, et al. 2006. Urinary

- testosterone and cortisol metabolites in male giant pandas *Ailuropoda melanoleuca* in relation to breeding, housing, and season. *Acta Zoologica Sinica*, 52(2): 242–249.
- Migaud M, Chemineau P, Malpoux B. 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4): 336–347.
- Schaller G B, Hu J C, Pan W S, et al. 1985. *The Giant Pandas of Wolong*. Chicago: The University of Chicago Press, 211–223.
- Tamarkin L, Baird C J, Almeida O F. 1985. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*, 227(4688): 714–720.
- White D J, Berardinelli J G, Aune K E. 2005. Seasonal differences in spermatogenesis, testicular mass and serum testosterone concentrations in the grizzly bear. *Ursus*, 16(2): 198–207.
- Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, et al. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, 426(6963): 178–181.
- 蒋辉, 古晓东, 黄雁楠, 等. 2012. 四川与秦岭野生大熊猫在形态和生态习性上的差异. *西华师范大学学报: 自然科学版*, 33(1): 12–18.
- 罗婵, 李键, 张志和, 等. 2011. 产仔大熊猫孕激素变化规律研究. *西南民族大学学报*, 37(5): 752–756.
- 张志和, 魏辅文. 2006. *大熊猫迁地保护理论与实践*. 北京: 科学出版社, 175.