

# 利用尿液中的雌二醇、孕酮含量监测雌性川金丝猴的 月经周期和妊娠\*

阎彩娥 蒋志刚\*\* 李春旺 曾岩 谭妮妮 夏述忠

(中国科学院动物研究所, 北京 100080) (成都动物园, 成都 610081)

(上海野生动物园, 上海 201300)

**Monitoring the menstrual cycle and pregnancy in the Sichuan golden monkey  
(*Rhinopithecus roxellana*) by measuring urinary estradiol and progesterone\***

YAN Cai-E JIANG Zhi-Gang\*\* LI Chun-Wang ZENG Yan TAN Ni-Ni

XIA Shu-Zhong

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(Chendu Zoo, Chengdu 610081, China) (Shanghai Wild Animal Park, Shanghai 201300, China)

**Abstract** During two consecutive mating seasons from August 2001 to December 2002, we observed the sexual behavior of Sichuan golden monkeys in the Chengdu Zoo and the Shanghai Wild Animal Park. We collected urine samples from females in the early morning. We also measured urinary estradiol and progesterone levels using radioimmunoassay. Based on the estradiol concentration during the menstrual cycle, we discovered that the length of the menstrual cycle was  $286.33 \pm 1.67$  days. The length of pregnancy was about 200 days. The level of estradiol after impregnation was significantly different with the level during the same period in the non-receptive part of the cycle. Thus we could diagnose early pregnancy in female Sichuan golden monkeys by checking their urinary estradiol level [*Acta Zoologica Sinica* 49 (5): 693 - 697, 2003].

**Key words** Sichuan golden monkey (*Rhinopithecus roxellana*), Estradiol, Progesterone, Radioimmunoassay, Menstrual cycle, Pregnancy

**关键词** 川金丝猴 雌二醇 孕酮 放射免疫 月经周期 妊娠

监测性激素可以了解非人灵长类繁殖生理特性。最理想的方法是连续收集一个物种若干个体的血液样品,测定其中的性激素含量。尿液和粪便中性激素和性激素代谢产物的含量也很好地反映了血液中相应激素的含量 (Li *et al.*, 2001; Wasser *et al.*, 1988), 因此,可以通过测定尿样和粪便中性激素的含量,监测动物的繁殖状态 (Lasley *et al.*, 1991; Jurke *et al.*, 2000)。近些年来,这种方法在一些灵长类动物中得到了成功应用 (Whitten *et al.*, 1998; Carosi *et al.*, 1999; Bardi *et al.*,

2001)。但是,连续采集血液样品会给动物带来损害,也会干扰动物的正常行为。此外,连续采集野生个体或者饲养在较大空间中的个体的血液样品非常困难。

川金丝猴是季节性繁殖的动物,9~12月份是川金丝猴的交配高峰期 (Zhang *et al.*, 2000; 任宝平等, 2002)。交配行为通常由雌性川金丝猴邀配行为诱导,很少出现雄性川金丝猴强行爬跨的现象 (Ren *et al.*, 1995)。戚汉君等 (1995) 对雌性川金丝猴尿液中的生殖激素进行了初步研究,但是

2003-01-27 收稿, 2003-04-28 修回

\* 中国科学院知识创新工程 (No. KSCX2-1-03, No. KSCX2-SW-118) 项目资助 [This research was funded by Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-1-03, No. KSCX2-SW-118)]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: jiangzg@panda.ioz.ac.cn

第一作者简介 阎彩娥, 25岁, 硕士。研究方向: 野生动物行为。E-mail: yance@panda.ioz.ac.cn

© 2003 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

目前还缺乏关于川金丝猴繁殖生理的系统报道。川金丝猴经期没有性皮红肿现象, 经血的量也非常少, 很难通过观察判断月经周期。川金丝猴腹部肥大, 即使妊娠后期, 也很难从体态上观察到明显变化。因此, 我们试图通过性激素水平的变化, 对川金丝猴不同时期的生理状态进行监测, 并寻找早期诊断妊娠的方法, 推测产仔日期。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

2001年8月~2002年4月, 我们收集了成都动物园1只成年雌猴的尿样, 这只雌猴属于一个由1只成年雄猴、2只成年雌性川金丝猴(其中1只失去生育能力)和1只幼猴组成的家庭单元, 它们饲养在6.0 m × 5.0 m × 5.5 m的笼舍内。该雌猴生育史正常。

2001年10月~2001年12月及2002年9月~2002年11月, 我们收集了上海野生动物园半散养的成年雌猴的尿样。它们属于由14个个体组成的一个小群体。群体自然分为家庭和全雄两个单元。1只成年雄猴、3只成年雌猴、1只亚成体雌猴(2002年性成熟, 观察对象增加到4只)和3只婴猴组成家庭单元; 1只成年雄猴、1只亚成年雄猴和1只少年雄猴组成全雄单元。猴群白天在面积约900 m<sup>2</sup>的室外活动场活动, 夜间回到5 m × 20 m × 4.3 m的内室。3只成年雌猴都有正常的生育史。

两地动物园中的川金丝猴上、下午各喂1次, 包括女贞枝叶、鸡蛋、窝头、苹果、梨、香蕉、黄瓜和茄子等时令果蔬, 适当补充维生素和钙。饮用水随时供应。

### 1.2 尿样采集

两地动物园的兽舍地面均为水泥, 每天上午用清水冲洗, 每周消毒1次。为了排除性激素水平日波动的干扰, 只收集每天7:00~8:00的晨尿。试验期间, 每天早晨在兽舍外观察猴群, 发现实验个体排尿后立即进入兽舍, 用微量取样器迅速抽取流到地面的尿液, 放入2 ml离心管, 标明日期和个体编号, 密封后在-20℃保存。我们只收集干净、未与其它个体尿液或者粪便混合的新鲜尿液, 被污染的尿液不再收集。由于天气、尿液污染等因素, 平均每只猴子两天收集到一次尿样。在上海野生动物园共收集了2个繁殖季节180天的尿液样品。成都动物园中的雌猴妊娠后每周收集1次尿样, 共收集46个样品。

### 1.3 性激素和肌酐含量的测定

依照 Abraham (1975) 和 Yalow (1992) 放射免疫法测定尿样中雌二醇和孕酮的含量。所用试剂盒系北方生物技术研究生产的人用雌二醇和孕酮放射免疫分析试剂盒, 计数器是上海核福光电仪器有限公司生产的 SN-682 型放射免疫计数器计数。为了矫正尿液的浓度差异, 使用北京化工厂生产的苦味酸不除蛋白法试剂盒测定了尿样中的肌酐含量。最后的激素含量是放射免疫测定结果与同一样品的肌酐含量的比值。

## 2 结果

由于尿液中性激素的其它代谢产物与性激素抗体有不同程度的交叉反应, 故本试验得出的是性激素的相对含量, 而不是绝对含量, 但是它仍然可以反映性激素的变化趋势。

### 2.1 月经周期及性激素水平的变化

2001年10月到12月期间, 上海野生动物园的3只成年雌猴都在授乳, 虽然它们的交配行为仍然很频繁, 但都没有怀孕。试验期间3只雌猴分别经历了两次月经周期。图1统计了2001年10~12月, 上海野生动物园3只雌猴共6次月经周期内的雌二醇水平变化情况, 以雌二醇高峰(323 ± 223 pg/ml 肌酐)为0天。-2天时雌二醇的含量开始显著升高, 0天达到高峰, 后快速下降, +2天时已经降到基础水平(31 ± 22 pg/ml 肌酐), 在黄体期一直维持在基础水平, 我们没有测出由于黄体分泌导致的雌二醇缓慢上升。

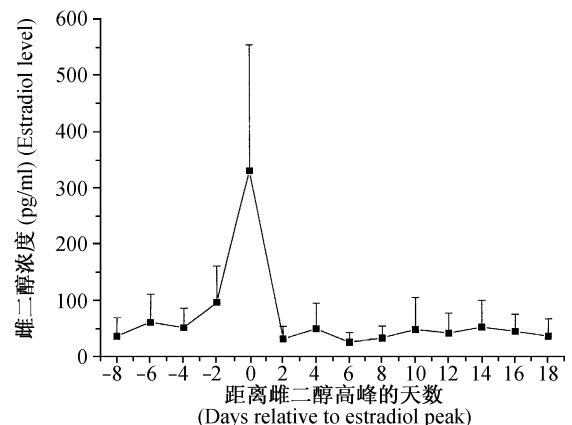


图1 未受精雌猴的月经周期中雌二醇水平的变化  
Fig. 1 Changes in estradiol concentration during non-conceptive cycles in the Sichuan golden monkey (*Rhinopithecus roxellana*)

通过计算每只雌猴两个雌二醇高峰之间的间隔，推断出的月经周期为  $28.33 \pm 1.67$  天。

在整个月经周期中，孕酮水平始终在试剂盒的测量范围 ( $0.2 \text{ ng/ml}$ ·肌酐) 以下。

## 2.2 受精前后性激素水平的变化

图 2 是受精前后以及妊娠前期雌二醇水平的变化情况，与未受精的月经周期相比存在显著差异。以受精前的雌二醇高峰为 0 天，+14 天时，与未受精月经周期中同一时期的雌二醇水平 ( $52 \pm 47 \text{ pg/ml}$ ·肌酐) 相比，雌二醇的水平显著上升 ( $185 \pm 65 \text{ pg/ml}$ ·肌酐) (One-Way ANOVA,  $F_{1,8} = 5.489$ ,  $P < 0.05$ )，随后雌二醇水平保持上升趋势。+40 天左右有所下降。妊娠 0~70 天内，雌猴的孕酮水平都在试剂盒测量范围以下。

## 2.2 妊娠期性激素水平的变化

图 3 是成都动物园的雌猴在整个妊娠过程中雌二醇和孕酮水平的变化情况。可以看出，雌猴是在第二个月经周期受精的，而后雌二醇水平总体保持上升趋势分娩后迅速下降。但在妊娠前期，孕酮的水平没有显著升高，后期才开始升高，孕酮含量波动剧烈。根据雌二醇水平变化推测成都动物园雌猴的受精日期为 2001 年 9 月 6 日。该雌猴 2002 年 3 月 18 日正常分娩，妊娠期 193 天。

## 2.4 早期妊娠诊断

根据雌二醇水平变化推测，2002 年上海野生

动物园 4 只成年雌猴 (1#、2#、3# 和 4#) 的受精日期分别是：1# 9 月 22 日，2# 9 月 17 日，3# 9 月 10 日，4# 9 月 18 日。其中 2# 于 10 月 22 日流产。据文献报道 (Zhang *et al.*, 2000; 戚汉君等, 1995)，妊娠期的平均值为 200 天，推测产仔日期分别是：1# 2003 年 4 月 10 日，3# 3 月 29 日，4# 4 月 6 日。实际产仔日期分别是：1# 2003 年 4 月 12 日，3# 3 月 31 日，4# 4 月 10 日，与预测日期基本一致。根据推测的受精日期和实际产仔日期，推测妊娠期长度分别是 202、202、204 天。

## 3 讨论

### 3.1 月经周期和妊娠期

雌二醇在排卵前有一个明显的高峰 (He *et al.*, 2001)，由两个雌二醇高峰之间的间隔推断出月经周期为  $28.33 \pm 1.67$  天。依据雌二醇水平的变化情况与分娩日期，我们推测的妊娠期约为 200 (193~204) 天，存在个体差异。滇金丝猴月经周期  $23.6 \pm 3.5$  天，妊娠期 204 天 (He *et al.*, 2001)，两个亚种的妊娠期长度大致相同，月经周期稍有差别。与 He *et al.* (2001) 对滇金丝猴的测定结果一样，在川金丝猴的尿液样品中，我们也没有测到雌二醇黄体期的高峰。这与很多旧大陆猴和大猩猩中的结论一致 (Hodges *et al.*, 1986; Nadler *et al.*, 1993)。受精后，雌二醇水平逐渐上

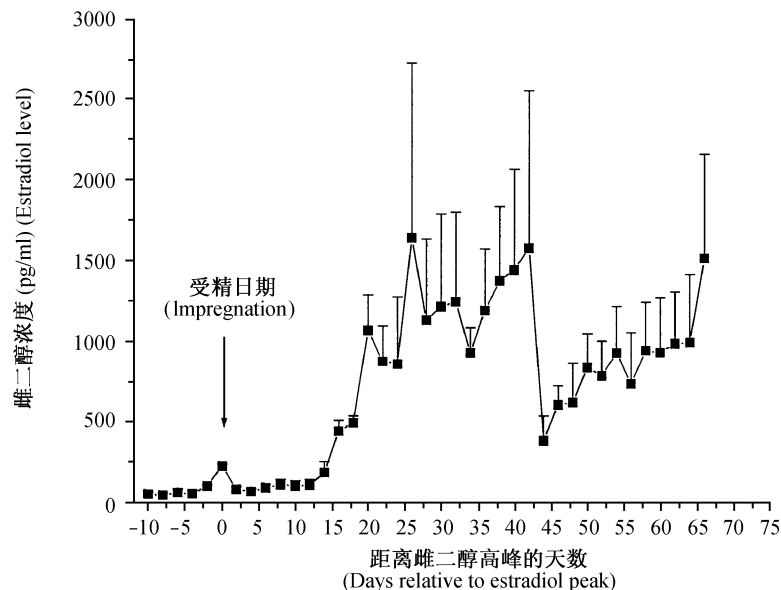


图 2 受精前后雌性川金丝猴尿液中雌二醇含量的变化

Fig. 2 Concentration of urinary estradiol before and after impregnation in the Sichuan golden monkey (*Rhinopithecus roxellana*)

箭头指示估计的受精日期 (The arrow indicates the estimated impregnate date)

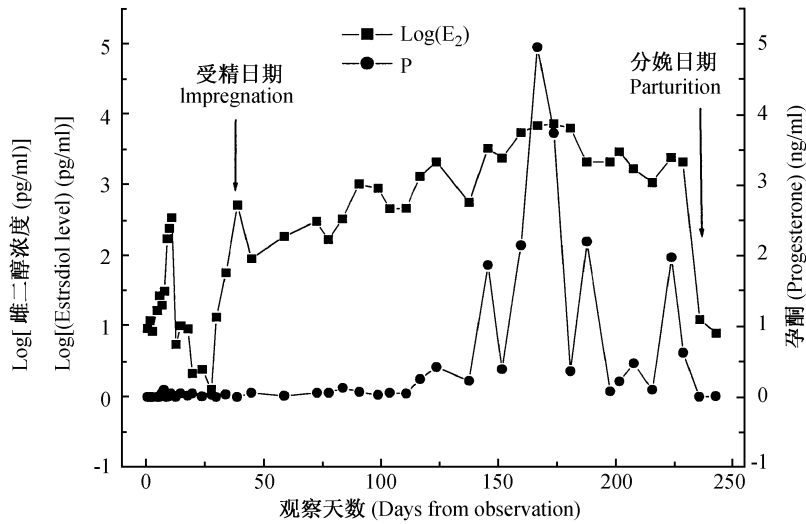


图3 成都动物园成年雌性川金丝猴妊娠过程中雌二醇和孕酮的水平  
Fig. 3 Changes in the level of estradiol and progesterone in a female Sichuan golden monkey during pregnancy in the Chengdu Zoo

升, 分娩后显著下降。但是孕酮的含量在妊娠前期没有显著变化, 后期才开始升高, Ziegler *et al.* (2000) 对叶猴的研究得到类似的结论。但在滇金丝猴中, 受精后 13~16 天后孕酮和雌二醇的水平都开始升高 (He *et al.*, 2001)。受精 40 天后, 雌二醇水平的下降可能与胎盘开始取代卵巢、分泌雌二醇有关。

### 3.2 早期妊娠诊断

受精后, 雌二醇水平的变化情况与未受精的月经周期有显著差异。利用这一特性, 14 天后我们就可以根据尿液中雌二醇的水平诊断妊娠, 估测大致的受精日期, 进而预测产仔的日期。我们预测的产仔日期与实际产仔日期基本一致。不过, 为了保证结果的准确性, 必须多次、连续收集尿样。我们用 hCG 试纸 (人绒毛膜促性腺激素试纸) 测定进入妊娠的雌猴的尿液, 但反应结果为阴性。这与戚汉君等 (1995) 的结果不同。这可能与两种方法选用的抗体不同有关。并且, 根据 CG 只能推断大致的受精日期, 然而, 利用雌二醇可以确定较为确切的排卵和受精日期, 便于更加细致地追踪金丝猴的生理状态。孕酮在妊娠早期没有显著变化, 这一特性使研究者不能使用孕酮在川金丝猴中进行早期妊娠诊断, 或者必须寻找一种特异性更强的抗体。Shideler *et al.* (1983)、Astrid *et al.* (1995) 和 Czekala *et al.* (2000) 利用这一手段, 分别对狮尾猴 (*Macaca silenus*)、低地大猩猩 (*Gorilla gorilla*) 和山地大猩猩 (*Gorilla gorilla beringei*) 等进

行了相似的研究。但是物种间的差异很大, 因此为每个物种建立自己的基础数据很有必要。我们的结论可以为判断野生状态下金丝猴的生理状态提供参照。

致谢 本研究得到成都动物园和上海野生动物园的大力支持, 特此致谢。

### 参考文献 (References)

- Abraham, G. 1975 Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J. Steroid. Biochem.* 6: 261~270.
- Astrid, C. B., S. L. Monfort and K. L. Goodrowe 1995 Monitoring reproductive development, menstrual cyclicity, and pregnancy in the Lowland Gorilla (*Gorilla gorilla*) by enzyme Immunoassay. *J. Zoo. Med.* 26 (1): 24~31.
- Bardi, M., K. Shimizu, S. Fujita, S. Borgognir-Tarli and M. Huffman 2001 Hormonal correlates of maternal style in captive macaques (*Macaca fuscata* and *M. mulatta*). *Am. J. Primatol.* 22: 647~662.
- Carosi, M., M. Heistermann and E. Visalberghi 1999 Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progestin levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys. *Horm. Behav.* 36: 252~265.
- Czekala, N., S. Pascale 2000 Reproductive monitoring of free-ranging female mountain gorillas by urinary hormone analysis. *Am. J. Primatol.* 51: 209~215.
- He, Y. M., Y. J. Pei, R. J. Zou and W. Z. Ji 2001 Changes of urinary steroid conjugates and gonadotropin excretion in the menstrual cycle and pregnancy in the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*). *Am. J. Primatol.* 55: 223~232.
- Hodges, J. K., R. Tarara, J. P. Hearn and J. G. Else 1986

- The detection of ovulation and early pregnancy in the baboon by direct measurement of conjugated steroids in urine. *Am. J. Primatol.* **10**: 329 ~ 338.
- Jurke, M. H., L. R. Hagey, S. Jurke and N. M. Czekala 2000 Monitoring hormones in urine and feces of captive bonobos (*Pan paniscus*). *Primates* **41** (3): 311 ~ 319.
- Lasley, B. L. and J. F. Kirpatrick 1991 Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J. Zoo. Wildl. Med.* **22**: 23 ~ 31.
- Li, C., Z. Jiang, G. Jiang and J. Fang 2001 Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Père David's deer. *Hormones and Behavior* **40**: 518 ~ 525.
- Nadler, R. D., J. F. Dahl and C. D. Collins 1993 Serum and urinary concentrations of sex hormones and genital swelling during the menstrual cycle of the gibbon. *J. Endocrinol.* **136**: 447 ~ 455.
- Qi, H. J., B. Liang, W. Y. Bao, Y. C. Jia, N. Hama, N. M. Czekala and N. C. Harvey 1995 The hormone change in the urine of female snub-nosed monkeys. *Acta Theriol. Sin.* **15** (2): 106 ~ 112. [戚汉君, 梁冰, 鲍文永, 贾玉春, 浜夏树, N. M. Czekala, N. C. Harvey 1995 雌性川金丝猴尿中生殖激素变化的研究. *兽类学报.* **15** (2): 106 ~ 112.]
- Ren, B. P., S. Z. Xia, Q. F. Li, S. Y. Zhang, B. Liang and J. H. Qiu 2002 Male copulatory patterns in captive Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *Acta Zool. Sin.* **48** (5): 577 ~ 584. [任宝平, 夏述中, 李庆芬, 张树义, 梁冰, 邱军华 2002 圈养雄性川金丝猴交配模式. *动物学报* **48** (5): 577 ~ 584.]
- Ren, R., K. Yan, Y. Su, H. Qi, B. Liang and W. Bao 1995 The reproductive behavior of golden monkeys in captivity (*Rhinopithecus roxellana*). *Primates* **36**: 135 ~ 143.
- Shideler, S. E., N. M. Czekala, L. H. Kasman, D. G. Lindburg and B. L. Lasley 1983 Monitoring ovulation implantation in the lion-tailed macaque (*Macaca silenus*) through urinary estrone conjugate evaluations. *Biol. Reprod.* **29**: 905 ~ 911.
- Wasser, S. L., L. Risler and R. A. Steiner 1988 Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* **39**: 862 ~ 872.
- Whitten, P. L., D. K. Brockman and R. C. Stavisky 1998 Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. *Am. J. Phys. Anthropol.* **27** (Suppl.): 1 ~ 23.
- Yalow, R. 1992 Radioimmunoassay of hormones. In: Wilson, J. and D. Foster ed. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: W. B. Saunders Co.
- Zhang, S. Y., B. Liang and L. X. Wang 2000 Seasonality of matings and births in captive Sichuan golden monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *Am. J. Primatol.* **51**: 265 ~ 269.
- Ziegler, T., K. Hodges, P. Winkler and M. Heistermann 2000 Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female Hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *Am. J. Primatol.* **51**: 119 ~ 134.