

# 广西崇左野生猕猴粪便皮质醇水平季节差异比较

吴世军

广西崇左白头叶猴国家级自然保护区管理中心, 广西 崇左

收稿日期: 2023年8月3日; 录用日期: 2023年9月15日; 发布日期: 2023年9月22日

## 摘要

动物的生理激素研究对监测其健康具有重要意义, 皮质醇水平表征动物对环境的应激压力水平。本研究采用酶联免疫法对崇左野生猕猴(*Macaca mulatta*)粪便皮质醇含量进行测定, 并分析不同季节激素含量差异。结果表明: 崇左猕猴粪便皮质醇含量在5.02~10.03  $\mu\text{g/g}$ 之间, 平均值为 $7.50 \pm 1.77 \mu\text{g/g}$ 。雨季崇左野生猕猴粪便皮质醇平均含量为 $9.04 \pm 0.99 \mu\text{g/g}$ , 旱季野生猕猴群粪便皮质醇平均含量为 $6.84 \pm 1.55 \mu\text{g/g}$ 。分析发现, 崇左野生猕猴粪便皮质醇含量在季节上存在显著差异, 表现为雨季皮质醇含量显著高于旱季皮质醇的含量( $t = 2.969, df = 18, P = 0.008$ )。本研究评估了石山生境猕猴的应激状态, 为其提供了重要的生理数据信息和健康监测新视角。

## 关键词

猕猴, 皮质醇, 季节比较

# Seasonal Variation in Fecal Cortisol Levels of Rhesus Macaques Living in Chongzuo, Guangxi

Shijun Wu

Administration Center of Guangxi Chongzuo White-Headed Langur National Nature Reserve, Chongzuo Guangxi

Received: Aug. 3<sup>rd</sup>, 2023; accepted: Sep. 15<sup>th</sup>, 2023; published: Sep. 22<sup>nd</sup>, 2023

## Abstract

Animal physiological hormones studies have vital importance for their health and cortisol is often

used to evaluate the stress levels of animals to the environment. In this study, we collected the fecal samples of wild rhesus macaques from Chongzuo. Fecal samples were analyzed for cortisol levels using an enzyme-linked immunosorbent assay. The cortisol levels ranged from 5.02~10.03  $\mu\text{g/g}$ , with a mean value of  $7.50 \pm 1.77 \mu\text{g/g}$ . Seasonal variation of fecal cortisol was explored. Results indicated that there were significant seasonal differences ( $t = 2.969$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0.008$ ) in the fecal cortisol levels of rhesus macaques. The fecal cortisol level was higher in the rainy season ( $9.04 \pm 0.99 \mu\text{g/g}$ ) than in the dry season ( $6.84 \pm 1.55 \mu\text{g/g}$ ). This study evaluated the stress status of rhesus macaques in limestone and provided physiological information, and will help us to get a new perspective for health monitoring.

## Keywords

Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*), Cortisol, Seasonal Variation

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

评估动物的生理状态对监测动物种群健康具有重要意义[1]。其中，动物对当前环境的应激状态受到广泛关注[2]。研究发现，栖息地质量下降[3]、人类干扰强化[4]、食物资源变化[5]都可能成为动物的应激源。当应激源刺激动物神经系统后，下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)释放糖皮质激素调动身体机能进行生物防御[6]。然而，持续性的高强度应激压力可能会对动物产生危害，例如生育能力下降[7]、免疫系统受损[8]、死亡率下降[9]等，威胁动物种群的存活[3]。因此，监测动物的生理状态有助于监测和评估种群的健康状况。

随着尿液、毛发和粪便等非损伤性采样技术的发展，为动物的生理健康监测开辟新途径[10]。特别是在监测珍稀濒危动物的生理状态中到广泛运用，例如大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*) [11]、维氏冕狐猴(*Propithecus verreauxi*) [12]、鬃毛吼猴(*Alouatta palliata*) [3]。然而，在野外环境中采集动物的尿液和毛发十分困难，因而通过采集野生动物粪便获取生理信息是最佳选择[13]。众多的研究表明，皮质醇常用作表征应激压力强度的生理指标，表现为皮质醇水平与应激压力呈正相关[14]。例如，藏酋猴(*Macaca thibetana*)的雄性个体在交配季节皮质醇水平高于非交配季节[15]。

获取充足食物是动物生存的关键，食物的季节性缺乏使其面临营养压力，表现出较高的应激状态[7]。例如，绒猴(*Callithrix jacchus*) 在食物缺乏的旱季的皮质醇显著高于雨季[16]。相似地，懒吼猴(*Alouatta pigra*) 在高质量食物果实缺乏的季节皮质醇含量显著上升，表现出高应激水平[17]。因此，食物资源的季节性变化是影响灵长类皮质醇水平波动的重要因素[18]。

猕猴(*M. mulatta*) 隶属哺乳纲(Mammalia)，灵长目(Primates)，猴科(Cercopithecidae)，猕猴属(*Macaca*)，为国家二级保护动物。猕猴为群居生活动物，适应能力强，在世界上分布广泛(北纬  $15^{\circ}$ ~北纬  $35^{\circ}$ ，东经  $70^{\circ}$ ~东经  $120^{\circ}$ ) [19]。在中国广西，猕猴主要集中分布在南宁、崇左、百色、河池等地[20]。每年11月~3月为交配期，4~8月产仔期[19]。在广西地区，目前对猕猴的研究主要在种群数量[20]、食物组成[21]、活动节律[22]等方面。石山森林地表水匮乏，植被稀疏，食物资源可利用性在旱季显著下降[23]。猕猴主要以树叶为食，雨季偏好果实[24]。在行为上，猕猴在食物缺乏的旱季通过增加采食食物种类和增加觅食时间以应对营养压力[22] [24]。而在生理上石山猕猴在食物缺乏季节是否表现出较高的应激压力？目前对

石山猕猴的生理状况了解较少, 因此, 为探讨石山猕猴在季节上的生理状态, 本研究通过分析不同季节猕猴粪便皮质醇激素差异, 有助于了解在石山生境的猕猴不同季节的应激状态, 从生理角度提供保护猕猴新依据。

## 2. 研究方法

### 2.1. 研究地点

广西崇左白头叶猴国家级自然保护区(22°15'~22°17'N, 107°29'~107°32'E)位于崇左市江州区和扶绥县境内, 为石灰岩溶地貌, 多峰林谷地和峰丛洼地, 山峰海拔约为 200~300 m, 植被类型为亚热带山地季雨林[25]。保护区属于北热带季风气候, 有明显的干、湿两季, 平均气温为 22.4℃, 年平均降雨量为 1196.4 mm [26]。

### 2.2. 粪便样品采集

在崇左保护区选取一群野生两性猕猴群作为研究对象。在猕猴夜宿地下方收集粪便样品, 采样人员戴一次性手套用灭菌的竹签夹取粪便采集时先清理周围其他杂质, 再夹取粪便中心位置约 5 g 即可, 采集完毕立即封口并做好标记。采集的样品放入干冰盒内, 迅速将样品运回实验室放入-80℃超低温冰箱保存。

研究期间于 2018 年 9 月、11 月每月采集一次崇左猕猴粪便, 共收集粪便样品 20 份。根据降雨量划分 4~10 月为雨季, 11 月~次年 3 月为旱季[27]。因此崇左样本雨季组为 9 月, 旱季组为 11 月。

### 2.3. 样品处理和测定

本研究采用酶联免疫试剂盒测定白头叶猴粪便中的皮质醇的含量。实验操作步骤参照试剂盒说明书进行, 具体如下: 称取 1 g 粉碎的粪便样品加入 50 ml 离心管中, 再加入 9 g pH = 7.3 的磷酸缓冲盐溶液, 放入匀浆器充分震荡混匀。室温条件下, 2500 r/min 离心 20 min, 收集上清液。设置 5 个浓度梯度的标准品, 先用移液枪分别取 150  $\mu$ l 标准品稀释液加入 1~5 号管, 再取 150  $\mu$ l 原倍标准品(24  $\mu$ l/L)加入 1 号管制成 1 号标准品, 取 150  $\mu$ l 1 号标准品加入 2 号管制成 2 号标准品(3~5 号标准品依次倍比稀释)。接着在酶标板上分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上按浓度分别加 50  $\mu$ l 标准品溶液, 待测样品孔中先加 40  $\mu$ l 样品稀释液, 然后再加 10  $\mu$ l 待测样品(样品稀释 5 倍), 轻晃混匀, 覆膜标记, 37℃温育 30 min。取出酶标板, 弃去液体, 甩干后每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复洗涤 5 次, 拍干。除空白孔, 其余每孔加入 50  $\mu$ l 酶标试剂, 覆膜后标记, 37℃温育 30 min。重复洗涤 5 次, 拍干。每孔先加入 50  $\mu$ l 显色剂 A, 再加入 50  $\mu$ l 显色剂 B, 混匀, 覆膜标记, 37℃培养箱避光显色 15 min。待溶液呈明显蓝色梯度, 每孔加 50  $\mu$ l 终止液, 样品孔由蓝色立即转为黄色。

以空白孔调零, 在 15 min 内用 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值), 记录数值。以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为粪便样品中皮质醇的实际浓度, 单位为  $\mu$ g/g。

### 2.4. 数据处理

以每份粪便样品测出的皮质醇含量为基本的统计单位, 取 6 份雨季组粪便皮质醇含量的平均值表示雨野生猕猴粪便皮质醇含量, 同时取 14 份采集到的旱季组粪便皮质醇含量的平均值表示旱季野生猕猴粪便皮质醇含量。所有数据用平均值  $\pm$  标准差(Mean  $\pm$  SD)表示。

为提高回归分析的线性效应, 统计分析时先分别对旱季组和雨季组的数据进行对数(Log<sub>10</sub>)转换, 再用 Kolmogorov-Smirnov Test 分别对旱季组、雨季组的数据进行正态分布拟合检验, 结果表明旱季组和雨

季组的数据均成正态分布( $P > 0.05$ )。因此,采用独立样本  $t$  检验分析旱季组和雨季组粪便皮质醇含量差异。显著水平设为 0.05,数据处理和分析在 SPSS22.0 上完成。

### 3. 结果

总的来看,崇左猕猴粪便皮质醇含量在 5.02~10.03  $\mu\text{g/g}$  之间,平均值为  $7.50 \pm 1.77 \mu\text{g/g}$ 。猕猴雨季皮质醇含量在 7.03~10.03  $\mu\text{g/g}$  之间波动,旱季皮质醇含量在 5.02~9.55  $\mu\text{g/g}$  之间波动。分析发现,崇左野生猕猴粪便皮质醇含量在季节上存在显著差异( $t = 2.969, df = 18, P = 0.008$ ),表现为雨季( $9.04 \pm 0.99 \mu\text{g/g}$ )粪便皮质醇含量显著高于旱季( $6.84 \pm 1.55 \mu\text{g/g}$ )粪便皮质醇含量(图 1)。

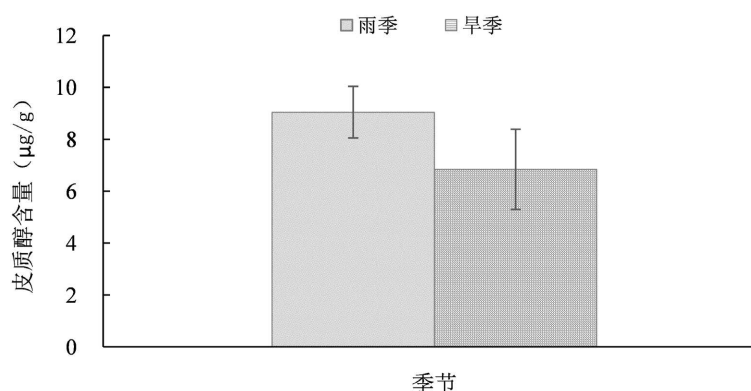


Figure 1. Seasonal difference in fecal cortisol of wild rhesus macaques

图 1. 野生猕猴皮质醇含量季节差异比较

### 4. 讨论

食物资源的季节性变化是影响动物应激反应的重要因素[18]。这一规律在灵长类动物、鸟类等哺乳动物的研究中都可见报道[16]。在灵长类的研究中发现,其体内的应激状态与食物缺乏带来的营养压力有关,表现为体内皮质醇水平与其食物需求量呈正相关[14]。如绒猴[16]、维氏冕狐猴[12]和红腹红疣猴(*Ptilocolobus temminckii*) [28]。与其他研究不同,本研究中猕猴在食物缺乏的旱季表现出更高的应激压力,这可能与食物组成有关。研究发现,崇左猕猴在雨季比旱季采食更多的果实,对营养丰富的果实表现出明显的偏好性[24]。尽管猕猴属是典型的果实性动物,然而食性也受到气候条件和栖息地类型的影响[29]。研究证实果实产量与纬度呈负相关,因而低纬度的热带地区猕猴属灵长类动物相比采食果实比例更高[30]。另外,石山森林地表水匮乏,植被稀疏,果实可利用性明显降低[23]。然而,在本研究中,在果实缺乏的旱季石山猕猴的皮质醇激素并没有显著高于雨季,说明石山猕猴在旱季并没有因为缺乏高质量食物而面临营养压力。从整体上来看,石山猕猴雨季采食的果实比例仅占 27.3%~29.8%,而树叶占食物组成的 56.5%~62.5% [24]。旱季缺乏高质量的食物时,猕猴采食更多的成熟叶和更多的食物种类,甚至采食农民种植的甘蔗以补充能量[24]。另外,石山猕猴还会采取能量最大化策略也就是通过增加觅食时间来补充能量[22]。灵活的觅食策略使石山猕猴在旱季没有受到营养压力的影响,因而在旱季没有表现出更高的皮质醇水平。相反,雨季比旱季表现出更高的皮质醇水平,这可能与食物竞争有关。但是受限于地理因素,高质量果实生产周期短、产量少[21]。另外,石山猕猴在雨季对食物有选择性,表现在雨季比旱季采食的食物种类更少,并且主要采食食物的嫩叶和果实部位[24]。雨季短周期的高质量食物供应可能使猴群内产生食物竞争压力,从而可能影响体内的皮质醇含量,表现出较高的应激压力。

综上所述,石山猕猴灵活的觅食策略是有效平衡旱季高质量食物缺乏可能带来的营养压力的关键因

素，而石山猕猴雨季粪便应激压力显著高于旱季，可能是受到食物季节性变化带来的食物竞争压力的影响。

## 5. 小结

石山猕猴在食物缺乏的旱季并没有像其它灵长类动物表现出更高的应激压力，这可能是石山猕猴通过灵活的觅食策略平衡食物缺乏季节带来的食物营养压力。相反，崇左猕猴粪便皮质醇含量雨季显著高于旱季，猕猴雨季应激压力更高，可能与石山短周期高质量食物供给产生的食物竞争压力有关。

## 参考文献

- [1] Kaisin, O., Fuzessy, L., Poncin, P., Brotcorne, F. and Culot, L. (2021) A Meta-Analysis of Anthropogenic Impacts on Physiological Stress in Wild Primates. *Conservation Biology*, **35**, 101-114. <https://doi.org/10.1111/cobi.13656>
- [2] Newbold, T., Hudson, L.N., Hill, S.L., et al. (2015) Global Effects of Land Use on Local Terrestrial Biodiversity. *Nature*, **520**, 45-50. <https://doi.org/10.1038/nature14324>
- [3] Dunn, J.C., Cristóbal-Azkarate, J., Schulte-Herbrüggen, B., Chavira, R. and Veà, J.J. (2013) Travel Time Predicts Fecal Glucocorticoid Levels in Free-Ranging Howlers (*Alouatta palliata*). *International Journal of Primatology*, **34**, 246-259. <https://doi.org/10.1007/s10764-013-9657-0>
- [4] Spaan, D., Ramos-Fernández, G., Bonilla-Moheno, M., et al. (2020) Anthropogenic Habitat Disturbance and Food Availability Affect the Abundance of an Endangered Primate: A Regional Approach. *Mammalian Biology*, **100**, 325-333. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00025-x>
- [5] Martínez-Mota, R., Valdespino, C., Sánchez-Ramos, M.A. and Serio-Silva, J.C. (2007) Effects of Forest Fragmentation on the Physiological Stress Response of Black Howler Monkeys. *Animal Conservation*, **10**, 374-379. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2007.00122.x>
- [6] Cañadas Santiago, S., Dias, P.A.D., Garau, S., et al. (2019) Behavioral and Physiological Stress Responses to Local Spatial Disturbance and Human Activities by Howler Monkeys at Los Tuxtlas, Mexico. *Animal Conservation*, **23**, 297-306. <https://doi.org/10.1111/acv.12541>
- [7] Gesquiere, L.R., Onyango, P.O., Alberts, S.C. and Altmann, J. (2011) Endocrinology of Year-Round Reproduction in a Highly Seasonal Habitat: Environmental Variability in Testosterone and Glucocorticoids in Baboon Males. *American Journal of Physical Anthropology*, **144**, 169-176. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21374>
- [8] Padgett, D.A. and Glaser, R. (2003) How Stress Influences the Immune Response. *Trends in Immunology*, **24**, 444-448. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00173-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00173-X)
- [9] Sapolsky, R.M., Romero, L.M. and Munck, A.U. (2000) How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*, **21**, 55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- [10] Foley, C.A.H., Papageorge, S. and Wasser, S.K. (2001) Noninvasive Stress and Reproductive Measures of Social and Ecological Pressures in Free-Ranging African Elephants. *Conservation Biology*, **15**, 1134-1142. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.0150041134.x>
- [11] Kumari Patel, S., Biswas, S., Goswami, S., et al. (2021) Effects of Faecal Inorganic Content Variability on Quantifying Glucocorticoid and Thyroid Hormone Metabolites in Large Felines: Implications for Physiological Assessments in Free-Ranging Animals. *General and Comparative Endocrinology*, **310**, Article ID: 113833. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113833>
- [12] Rudolph, K., Fichtel, C., Heistermann, M. and Kappeler, P.M. (2020) Dynamics and Determinants of Glucocorticoid Metabolite Concentrations in Wild Verreaux's Sifakas. *Hormones and Behavior*, **124**, Article ID: 104760. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104760>
- [13] Behringer, V., Deimel, C., Hohmann, G., et al. (2018) Applications for Non-Invasive Thyroid Hormone Measurements in Mammalian Ecology, Growth, and Maintenance. *Hormones and Behavior*, **105**, 66-85. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.07.011>
- [14] Tecot, S.R., Irwin, M.T. and Raharison, J.-L. (2019) Faecal Glucocorticoid Metabolite Profiles in Diademed Sifakas Increase during Seasonal Fruit Scarcity with Interactive Effects of Age/Sex Class and Habitat Degradation. *Conservation Physiology*, **7**, Article ID: Coz001. <https://doi.org/10.1093/conphys/coz001>
- [15] 吴明阳, 陈仕望, 孙丙华, 等. 季节和等级顺位对雌性黄山短尾猴粪样皮质醇水平的影响[J]. 兽类学报, 2021, 41(4): 398-405.



- [16] Garber, P.A., Mckenney, A., Bartling-John, E., *et al.* (2020) Life in a Harsh Environment: The Effects of Age, Sex, Reproductive Condition, and Season on Hair Cortisol Concentration in a Wild Non-Human Primate. *PeerJ*, **8**, e9365. <https://doi.org/10.7717/peerj.9365>
- [17] Behie, A.M., Pavelka, M.S.M. and Chapman, C.A. (2010) Sources of Variation in Fecal Cortisol Levels in Howler Monkeys in Belize. *American Journal of Primatology*, **72**, 600-606. <https://doi.org/10.1002/ajp.20813>
- [18] Lynch, J.W., Ziegler, T.E. and Strier, K.B. (2002) Individual and Seasonal Variation in Fecal Testosterone and Cortisol Levels of Wild Male Tufted Capuchin Monkeys, *Cebus apella nigrinus*. *Hormones and Behavior*, **41**, 275-287. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1772>
- [19] 路纪琪, 田军东, 张鹏. 中国猕猴生态学研究进展[J]. 兽类学报, 2018, 38(1): 74-84.
- [20] 李友邦, 黄乘明, 韦振逸, 苏勇. 广西猕猴分布数量及其保护[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2009, 27(1): 79-83.
- [21] 周岐海, 唐华兴, 韦春强, 黄乘明. 桂林七星公园猕猴的食物组成及季节性变化[J]. 兽类学报, 2009, 29(4): 419-426.
- [22] 唐创斌, 蒋建波, 黄乘明, 等. 环境和社会因素对喀斯特石山猕猴日活动节律和活动时间分配的影响[J]. 兽类学报, 2017, 37(2): 131-138.
- [23] Huang, Z., Huang, C., Tang, C., *et al.* (2015) Dietary Adaptations of Assamese Macaques (*Macaca assamensis*) in Limestone Forests in Southwest China. *American Journal of Primatology*, **77**, 171-185. <https://doi.org/10.1002/ajp.22320>
- [24] Tang, C., Huang, L., Huang, Z., *et al.* (2016) Forest Seasonality Shapes Diet of Limestone-Living Rhesus Macaques at Nonggang, China. *Primates*, **57**, 83-92. <https://doi.org/10.1007/s10329-015-0498-7>
- [25] 谭伟福. 广西自然保护区[M]. 北京: 中国环境出版社, 2014.
- [26] 黄万辉, 潘文石. 广西白头叶猴栖息地特征[J]. 生态学杂志, 2010, 29(3): 605-610.
- [27] 广西林业厅. 广西自然保护区[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993.
- [28] Chapman, C.A., Saj, T.L. and Snaith, T.V. (2007) Temporal Dynamics of Nutrition, Parasitism, and Stress in Colobus Monkeys: Implications for Population Regulation and Conservation. *American Journal of Physical Anthropology*, **134**, 240-250. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20664>
- [29] Tsuji, Y., Hanya, G. and Grueter, C.C. (2013) Feeding Strategies of Primates in Temperate and Alpine Forests: Comparison of Asian Macaques and Colobines. *Primates*, **54**, 201-215. <https://doi.org/10.1007/s10329-013-0359-1>
- [30] Hill, D.A. (1997) Seasonal Variation in the Feeding Behavior and Diet of Japanese Macaques (*Macaca fuscata yakui*) in Lowland Forest of Yakushima. *American Journal of Primatology*, **43**, 305-320. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1997\)43:4<305::AID-AJP2>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1997)43:4<305::AID-AJP2>3.0.CO;2-0)