

根田鼠粪便皮质酮的检测效能

何慧^{1,2} 曹伊凡¹ 陈黎林³ 堵守杨^{1,2} 聂绪恒^{1,2} 边疆晖^{1*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001)

(2 中国科学院大学, 北京 100049) (3 青海省地方病预防控制研究所, 西宁 811602)

摘要: 为验证根田鼠粪便皮质酮的可检测效能, 本研究检测根田鼠粪便皮质酮含量的昼夜变化, 并检测急性应激后和慢性应激期间根田鼠粪便皮质酮含量变化, 及其慢性应激个体的 HPA 轴负反馈功能。结果表明, 根田鼠粪便皮质酮水平具有明显的似昼夜节律, 粪便中皮质酮含量的最高点出现在 08:00 和 24:00, 最低点在 12:00 和 16:00; 在终止急性应激 12 h 后, 根田鼠粪便皮质酮含量显著增加, 且有性别间差异; 慢性应激根田鼠粪便皮质酮含量始终保持在高水平; 再次急性应激, 慢性应激根田鼠个体的粪便皮质酮含量较对照个体升高的时间延后。上述结果说明, 根田鼠的粪便皮质酮含量能够反映机体所处的生理状态及应激水平, 因此, 该方法可用于野外根田鼠种群的相关研究并具有可靠性。

关键词: 根田鼠; 粪便; 皮质酮; 日节律; 束缚应激

中图分类号: Q494

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2013) 02 - 0164 - 08

The utility of detecting corticosterone levels in feces of root vole (*Microtus oeconomus*)

HE Hui^{1,2}, CAO Yifan¹, CHEN Lilin³, DU Shouyang^{1,2}, NIE Xuheng^{1,2}, BIAN Jianghui^{1*}

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 Qinghai Institute for Endemic Disease, Prevention and Control, Xining 811602, China)

Abstract: To determine the utility of detecting corticosterone levels in feces of root vole (*Microtus oeconomus*), fecal corticosterone concentration during 24-hour rhythm, alteration induced by acute and chronic restraints and the negative feedback function of HPA axis were measured. The results showed that the fecal corticosterone concentration in root voles displayed dynamic diurnal changes. This index peaked at 08:00 and 24:00, and fallen to the bottoms at 12:00 and 16:00. Two hours of restraint caused a 12h-delayed significant increase in fecal corticosterone, with sex-differences. The fecal corticosterone concentration of chronic stressed voles maintained at relatively high levels. Furthermore, the chronically stressed individuals' stress reaction time is relatively long, indicating the negative feedback function of HPA axis was deteriorated. Based on the above, fecal corticosterone measurements provide a reliable, accurate and useful method to assessing individual stress level. It can be assured use in studies related to root vole population.

Key words: Corticosterone; Diurnal changes; Fecal; Restraint stress; Root vole (*Microtus oeconomus*)

应激 (Stress) 是能够直接或间接影响个体机能的一系列生理或心理刺激的总称 (Tsigos and Chrousos, 2002)。研究表明, 慢性应激可对个体繁殖与存活产生重要影响 (Hilary and Smith, 2000; Moynihan, 2003; Bian *et al.*, 2005), 而繁殖与存活是两个关键的种群统计参数 (Dobson and Oli,

2001; Oli and Dobson, 2003)。因此, 应激可能在种群调节中起重要作用 (Boonstra *et al.*, 1998; Sheriff *et al.*, 2010b; Bian *et al.*, 2011)。

在机体的应激反应中, 下丘脑—垂体—肾上腺 (Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴起重要的调节作用 (Chrousos, 1998)。当机体受到任何破坏

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31170394)

作者简介: 何慧 (1987 -), 女, 硕士研究生, 主要从事动物生态学研究。

收稿日期: 2012 - 11 - 12; 修回日期: 2013 - 01 - 26

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: bjh@nwpb.ac.cn

内稳态的环境干扰因子刺激时, 应激信号会沿着中枢神经到达下丘脑, 引起促肾上腺激素释放激素 (Corticotropin-releasing hormone, CRH) 分泌, 在精氨酸加压素 (Arginine vasopressin, AVP) 协同调节下, 垂体分泌促肾上腺激素 (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH), 后者进入机体循环系统, 到达肾上腺皮质细胞, 与相应受体结合, 促进肾上腺皮质分泌糖皮质激素 (Glucocorticoids, GC), 促使机体各组织发生应激防御反应 (Selye, 1946; Sapolsky, 1992; Pickering and Fryer, 1994; Wingfield, 1994)。目前, 对 GC 的测定最为常用的是血浆检测和粪便检测。

血浆检测法优点是短时间内能够反映机体 GC 含量的变化 (Sheriff *et al.*, 2011)。其缺点在于采血操作本身对动物是一种应激, 很容易干扰检测结果。而且, 该方法只能检测某一时间点的瞬时 GC 含量, 而一些小型哺乳动物, 血容量小, 限制了取血量、取血频次及持续时间 (Cavigelli *et al.*, 2005)。其次, GC 进入血液后, 只有 5% ~ 10% 的 GC 是以游离形式存在, 并且只有游离型 GC 才能进入靶细胞, 发挥生物学功能。但血浆检测法反映的是总 GC 水平 (Sheriff *et al.*, 2009), 降低了血浆检测法测定动物应激水平的精确度。

相比血浆检测法, 粪便检测法有多种优势。首先, 粪便检测法具有非损伤性, 可以长期重复监测。其次, GC 在肝脏中代谢, 转变为四氢皮质醇和四氢皮质素, 然后与葡萄糖醛酸结合, 随粪便排出。四氢皮质醇和四氢皮质素在结构上仍然保持 GC 的二羟丙酮形式 (徐磊等, 2010)。Sheriff 等 (2009) 的研究表明, 粪便 GC 含量与血浆游离型 GC 水平正相关, 可以作为反映机体游离型 GC 水平的指标。再次, 该方法可以检测 GC 代谢产物形成、储存与分泌整个时期的整体 GC 水平 (Harper and Austad, 2001), 而且在野外研究中, 粪便样品容易获得。此外, 由于皮质酮水平变化在粪便中反映出来的时间相对较慢, 所以野外取样时动物遭受的捕获并不影响对取样前动物经历的应激的评估 (Boonstra *et al.*, 2005)。基于以上优点, 粪便皮质酮检测法已在多种哺乳动物及鸟类动物研究中推广使用 (Harper and Austad, 2000, 2004; Hiebert *et al.*, 2000; Morrow *et al.*, 2002; Carere *et al.*, 2003; Sheriff *et al.*, 2009, 2010a, 2010b, 2011)。

然而, 对于不同物种, 应激引起的生物化学反应不同, 代谢特点也不同 (Klenerova *et al.*, 2003)。

所以, 在应用粪便皮质酮检测法前, 须验证其在所研究的对象物种中的灵敏性和可检测效能。

根田鼠 (*Microtus oeconomus*) 是栖息于青藏高原地区的主要小型哺乳动物。研究表明, 密度应激不仅影响根田鼠种群繁殖 (边疆晖等, 2008), 而且可以通过母体应激效应影响其子代适合度 (吴雁等, 2008; 杨乐等, 2011; Bian *et al.*, 2011)。为进一步开展应激参与小型哺乳动物的种群调节机理的相关研究, 本研究以根田鼠为对象, 检验粪便检测法的可检测效力, 为今后的研究提供技术支持。根田鼠 GC 的主要组成成分是皮质酮 (熊忠和杜继增, 1997)。本研究提出的假设是: 根田鼠的粪便皮质酮含量能够反映机体皮质酮水平的变化, 进而揭示机体所处的生理状态及应激水平。为检验该假设, 本研究设计 4 项实验: (1) 检测根田鼠粪便皮质酮含量的昼夜变化; (2) 检测急性应激根田鼠粪便皮质酮含量的变化; (3) 检测慢性应激期间根田鼠粪便皮质酮含量的变化; (4) 检验慢性应激个体的 HPA 轴负反馈功能。依据上述假设, 本研究做出如下预测: (1) 根田鼠粪便皮质酮水平应具有明显的似昼夜节律变化; (2) 作为检测机体应激状态的重要指标, 根田鼠粪便皮质酮含量急性应激后一段时间应显著升高, 并最终恢复至基础水平; (3) 当慢性应激达到一定程度时, 根田鼠粪便皮质酮水平应升高, 并且持续保持在高水平; (4) 再被施加急性应激, 慢性应激个体与对照个体相比, 其粪便皮质酮含量延迟升高。

1 研究方法

1.1 实验动物

2010 年 8 月中旬从中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站地区捕获根田鼠, 带回西宁并在实验室适应性喂养 2 个月。所有动物单笼单只饲养于标准饲养笼 (464 mm × 314 mm × 200 mm) 中。巢垫物为碎木屑, 巢材为棉花。供以足量的全价兔颗粒饲料 (北京科澳协力饲料有限公司生产) 和饮水, 每日补充适量新鲜胡萝卜。饲养温度和光照条件为室温和自然光。每日 08:00 ~ 09:00 喂食。挑选体重相近的成体 (雄性: 36.92 ± 0.63 g; 雌性: 25.98 ± 0.31 g) 作为实验个体。

1.2 实验处理

1.2.1 似昼夜节律测定

雌雄根田鼠各 6 只, 每天 04:00 ~ 24:00 间隔 4 h 取样, 以保证大部分实验个体的样品量足够用

于检测。由于少数个体仍不能收集到足够的粪便量，因而本实验连续取样3 d。

1.2.2 急性应激实验

雌雄根田鼠各 18 只，随机平均分为对照组和应激组。16:00 将应激组个体置于直径 3 cm，长 10 cm 的聚丙烯塑料管中，固定 2 h。应激前取样。应激期间，由于没有进食，实验个体均排出少量粪便，不足以用于检测。应激终止后 36 h 内间隔 6 h 连续取样。为保证样品量足以用于检测，并兼顾取样频次，本研究通过一些预实验摸索，最终确定的取样时间间隔为 6 h。

1.2.3 慢性应激实验

雌雄根田鼠各 18 只，随机平均分为对照组和应激组。每天上午 08:00 ~ 10:00，14:00 ~ 16:00 将应激组个体置于聚丙烯塑料管中固定 2 h。每天实验的时间不固定，以免产生适应，连续进行 15 d。每天上午在第一次应激之前取样。

1.2.4 HPA 轴功能检测

慢性应激实验结束后，对实验个体均再次施以急性应激，操作方法及取样时间同急性应激实验。在慢性实验结束后雄性个体样本数仅为 3 只，所以本实验仅以雌性根田鼠为研究对象。

1.3 粪便采集

粪便样品直接从笼子底部收集，装入自封袋，标明日期、时间及个体编号，保存在 -20℃ 冰箱中，待测。混有尿液的样品，用滤纸吸去液体再分装。收集样品过程中不移动实验个体，尽量避免产生应激。

1.4 皮质酮含量测定

考虑到酶联免疫法或放射性免疫法是基于抗体—抗原特异性结合，而目前商品化抗体都是针对大鼠和小鼠制备。因此，本研究采用荧光法测定粪便皮质酮含量。目前，该技术已有成熟应用（熊忠和索有瑞，1998；Bian *et al.*，2005；Chen *et al.*，2012）。具体方法为：将粪便冷冻干燥 14 ~ 18 h（Sheriff *et al.*，2009）；将干燥后的粪便研磨、混匀；取 0.1 g 粪便，加入 0.5 mL 浓度为 0.04 mol/L 的 NaOH 溶液，振荡 30 s；加入 5 mL 二氯甲烷，超声波振荡 15 min（Pihl and Hau，2003）；3 000 r 离心 15 min，移去水相和固相（可用吸管吸去，下同）；取 1 mL 溶液，加二氯甲烷，稀释至 4 mL；加入 4 mL 硫酸乙醇（7:3）（须现配现用），振荡 2 min，静置 30 min，弃上层二氯甲烷，静置 30 min；检测：使用荧光分光光度计（日本岛津公司生产，RF-540），在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 470 \text{ nm}/520 \text{ nm}$ ，

狭缝 10 nm/20nm，高灵敏度条件下检测（熊忠和索有瑞，1998）。

1.5 统计分析

采用重复性方差分析（Repeated measure ANOVA）测定实验期间不同处理与不同性别对粪便皮质酮含量的效应。在进行重复性方差分析前，首先对数据进行 Mauchly 球形检验，若 $P > 0.05$ 则满足球形假设，采用一元分析结果；若不满足球形假设，采用多元分析结果。同时，为进一步分析不同性别和不同处理在特定时间点粪便皮质酮含量的变化，采用 *t* 检验（*t*-test）进行比较分析。

所有数据处理均在 SPSS16.0 上进行。显著水平为 0.05，数值表示为平均值 ± 标准误。

2 结果

2.1 根田鼠粪便皮质酮含量的昼夜变化

重复性方差分析结果表明，根田鼠粪便皮质酮水平具有显著的昼夜变化（ $F_{5,50} = 12.645$ ， $P < 0.001$ ，图 1），表现出明显的似昼夜节律。粪便中皮质酮含量的最高点出现在 08:00（雌性： $7.474 \pm 1.084 \mu\text{g/g}$ ；雄性： $3.806 \pm 0.765 \mu\text{g/g}$ ）和 24:00（雌性： $6.661 \pm 1.776 \mu\text{g/g}$ ；雄性： $3.866 \pm$

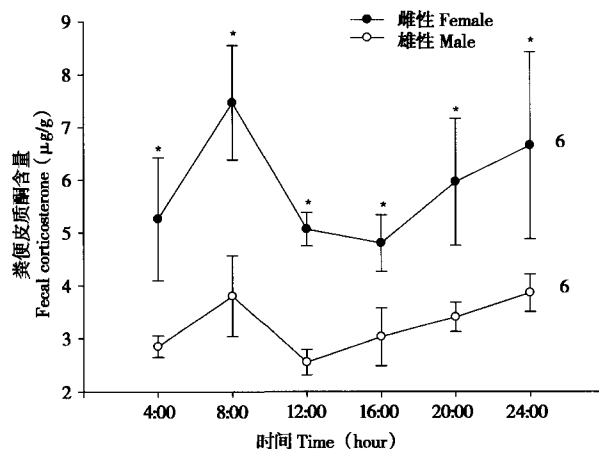


图 1 根田鼠粪便皮质酮含量 (Mean ± SE) 的昼夜变化。重复性方差分析结果表明，根田鼠在测定期间的粪便皮质酮水平有显著差异（ $F_{5,50} = 12.645$ ， $P < 0.001$ ）；雌性根田鼠的粪便皮质酮含量显著高于雄性根田鼠（ $F_{1,10} = 77.236$ ， $P < 0.001$ ）。* 表示 *t* 检验结果（ $P < 0.05$ ）。图中数字表示样本量

Fig. 1 Diurnal changes in fecal corticosterone concentration (Mean ± SE). Repeated measures ANOVA revealed significant variation ($F_{5,50} = 12.645$ ， $P < 0.001$) and sexual differences ($F_{1,10} = 77.236$ ， $P < 0.001$) in corticosterone levels of root vole. Asterisk means the fecal corticosterone concentrations are statistically different at 0.05 significance level using *t*-tests for different sexes. The sample sizes are indicated next to the lines

0.353 $\mu\text{g/g}$), 达到峰值后, 随即降至最低点 (雌性: $4.802 \pm 0.536 \mu\text{g/g}$; 雄性: $2.851 \pm 0.200 \mu\text{g/g}$)。雌性根田鼠的粪便皮质酮含量显著高于雄性根田鼠 ($F_{1,10} = 77.236, P < 0.001$, 图 1)。t 检验结果表明, 雌性和雄性根田鼠的粪便皮质酮含量在任一取样时间点均具有显著差异 (04:00, $t = 4.996, df = 10, P = 0.001$; 08:00, $t = 6.776, df = 10, P < 0.001$; 12:00, $t = 15.451, df = 10, P < 0.001$; 16:00, $t = 5.671, df = 10, P < 0.001$; 20:00, $t = 5.060, df = 10, P < 0.001$; 24:00, $t = 3.780, df = 10, P = 0.004$)。

2.2 急性应激后根田鼠粪便皮质酮含量变化

急性束缚应激实验对根田鼠粪便皮质酮含量有显著影响 ($F_{1,27} = 15.557, P = 0.001$, 图 2)。不同性别间的粪便皮质酮含量有显著差异 ($F_{1,27} = 52.649,$

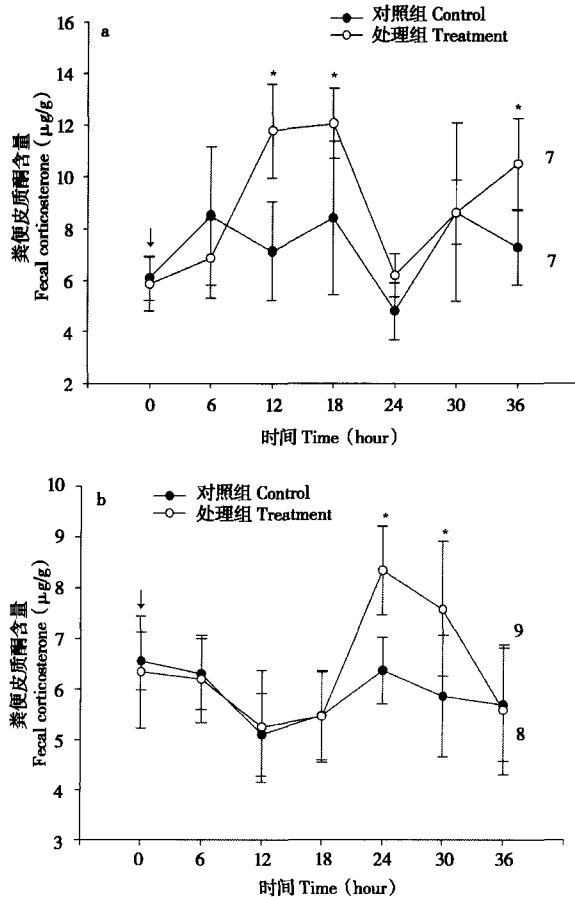


图 2 急性应激后雌性根田鼠 (a) 和雄性根田鼠 (b) 粪便皮质酮含量 (Mean \pm SE)。“ \downarrow ”指示急性应激的时间. 图中的数字及 * 与图 1 同义

Fig. 2 The temporal dynamics of fecal corticosterone concentration in female (a) and male (b) root voles following acute stress response. Arrowhead indicates the time when individual root voles were subjected to 2 hours restraint stress. The numbers and asterisk in this figure have the same meaning with those in Fig. 1

$P < 0.001$, 图 2)。应激结束 12 h 后, 粪便皮质酮含量增加, 并在此之后的 12 h 恢复至基础水平。应激组个体粪便皮质酮含量的最大值 (雌性: $12.038 \pm 1.343 \mu\text{g/g}$; 雄性: $8.344 \pm 0.871 \mu\text{g/g}$) 与最小值 (雌性: $5.858 \pm 1.052 \mu\text{g/g}$; 雄性: $5.258 \pm 1.106 \mu\text{g/g}$) 相差 60% 以上, 并且雄性的粪便皮质酮含量波动范围比雌性小。

2.3 慢性应激对根田鼠粪便皮质酮含量的影响

慢性应激期间, 处理组与对照组个体粪便皮质酮含量差异显著 ($F_{1,25} = 19.155, P < 0.001$, 图 3), 并有显著的性别差异 ($F_{1,25} = 20.633, P < 0.001$, 图 3)。雌性个体的慢性应激效应从第 13 天开始在粪便中可以检测出来 ($F_{1,12} = 5.822, P = 0.033$, 图 3a), 而雄性到第 15 天出现 ($F_{1,13} = 7.238, P = 0.019$, 图 3b)。

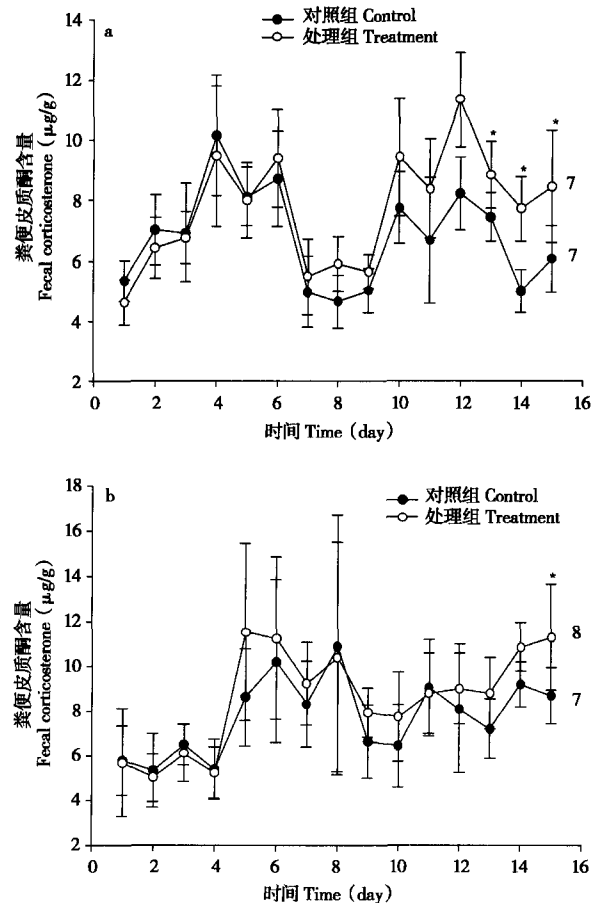


图 3 慢性应激实验中雌性根田鼠 (a) 和雄性根田鼠 (b) 粪便皮质酮含量 (Mean \pm SE) 变化. 图中的数字及 * 与图 1 同义

Fig. 3 The fecal corticosterone concentration (Mean \pm SE) of female (a) and male (b) root voles associated with the chronic stress response. The treatment group experienced restraint stress twice a day during 1 - 15 days. The numbers and asterisk in this figure have the same meaning with those in Fig. 1

2.4 慢性应激个体的 HPA 轴负反馈功能检测

再次施加急性应激, 慢性应激个体和对照个体的粪便皮质酮含量存在显著差异 ($F_{1,12} = 13.735$, $P = 0.003$, 图4)。进一步的 t 检验结果表明, 对照 + 急性应激处理组和慢性应激 + 急性应激处理组粪便皮质酮含量在急性应激之前、应激后 12 h、18 h、24 h 和 36 h 等取样时间点均有显著差异 (0 h, $t = -4.417$, $df = 12$, $P = 0.001$; 12 h, $t = 4.024$, $df = 12$, $P = 0.002$; 18 h, $t = 2.666$, $df = 12$, $P = 0.021$; 24 h, $t = -6.669$, $df = 12$, $P < 0.001$; 36 h, $t = -2.635$, $df = 12$, $P = 0.022$)。对照 + 急性应激处理组在急性应激后 12 h 粪便皮质酮水平达到峰值, 而慢性应激 + 急性应激处理组的相应时间节点却出现在 30 h。慢性应激 + 急性应激处理组的个体粪便皮质酮含量比对照 + 急性应激处理组个体波动范围小, 最大值 ($10.941 \pm 1.991 \mu\text{g/g}$) 与最小值 ($7.335 \pm 0.733 \mu\text{g/g}$) 相差不到 40%。

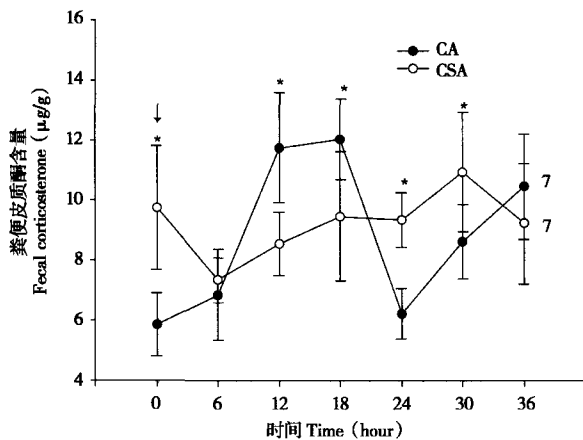


图4 慢性应激雌性根田鼠再次遭受急性应激后的粪便皮质酮含量(Mean ± SE). 重复性方差分析结果表明不同实验处理对根田鼠粪便皮质酮含量有显著影响 ($F_{1,12} = 13.735$, $P = 0.003$). 0 h 为对处理组施加急性束缚应激的时间. CA: 对照 + 急性应激处理; CSA: 慢性应激 + 急性应激处理. 图中的数字及 * 与图1 同义

Fig. 4 Time course of chronic stressed female individuals' fecal corticosterone concentration (Mean ± SE) after implementation of acute stress. Repeated measures ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{1,12} = 13.735$, $P = 0.003$). 0 h indicates the onset of acute restraint stress. CA: Acute stress only; CSA: Implementing acute stress after chronic stress. The numbers and asterisk in this figure have the same meaning with those in Fig. 1

3 讨论

本研究结果表明, 根田鼠粪便皮质酮含量呈现

明显的似节律性变化。目前有关粪便皮质酮含量变化的似节律性探讨主要集中在动物活动性节律的相关研究 (Touma *et al.*, 2003; Carere *et al.*, 2003)。血浆检测法的相关研究 (Boonstra *et al.*, 2004) 表明, 血浆皮质酮含量在夜间逐渐升高, 活动期开始之前达到最大值, 活动期期间逐渐降低, 在休息期开始之前降至最小值。本研究中粪便皮质酮含量在 08:00、24:00 出现最高值, 16:00 出现最低值, 说明粪便皮质酮含量的峰值出现相对滞后, 这可能与激素代谢及肠道消化所需要的时间有关 (Wasser *et al.*, 2000)。而且, 动物激素分泌、代谢和排泄都具有脉冲式的特点, 所以取样期间 GC 的分泌速率与代谢和排泄速率对指标有显著影响 (Sheriff *et al.*, 2009)。虽然根田鼠粪便皮质酮含量不能反映与其活动性节律的关系, 本实验结果足以验证所提出的粪便检测法能够反映出根田鼠粪便皮质酮含量的似昼夜节律的预测。

在本研究中, 根田鼠遭受急性束缚应激后 12 h 或更长时间粪便皮质酮含量显著升高, 并且在升高后的 12 h 内恢复至基础水平。说明对根田鼠的急性束缚应激效应至少在应激后 12 h 才会在粪便中检测到, 而且该效应在一定时间后消失。由此, 验证了粪便检测法用于检测根田鼠急性应激状态的可用性的预测。

已有小型哺乳动物的相关研究发现注射的 ACTH 或外源性 GC 类似物在 24 h 之内可从粪便中检测。例如美洲兔 (*Lepus americanus*) 需 10 h (Sheriff *et al.*, 2009); 小鼠需 4 ~ 10 h (Touma *et al.*, 2003); 拜氏黄鼠 (*Spermophilus beldingi*) 6 ~ 30 h (Mateo and Cavigelli, 2005); 穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 12 h (Monclús *et al.*, 2006)。这说明血浆中 GC 分泌量的变化在粪便中的可检出时间具有种属特异性。由此可以推断应激效应在粪便中的可检出时间也因物种而异。因此, 在应用粪便检测法时需考虑研究对象的代谢和排泄特点, 充分了解 GC 代谢及排泄的延迟性, 设计适合的取样时间及间隔期。

在不清楚个体身份和性别等信息的情况下, 粪便皮质酮是一个粗略的指标 (Boonstra, 2004)。但在哺乳动物种群研究中, 特别是一些控制实验中, 一般采用标志重捕方法估计种群数量及种群统计参数的变化, 标志可明确个体身份。但在标志重捕过程中, 动物从进活捕笼到检查鼠笼之间有一定的时间间隔, 而动物在笼中可能产生应激反应, 这是研

究者不能回避的一个问题。从本研究的结果看，当次捕获应激的效应至少要在应激后 12 h 才显现，而对小哺乳动物种群而言，在标志重捕过程中，一般间隔数小时检查一次鼠笼。因而可能产生的捕获应激效应不可能表现在捕获期间所收集的粪便中。野外研究中，为了避免数据间的假重复问题，往往只在每天的特定时间段收集粪便样品，同一个体在每个诱捕期内只取样一次，而标志重捕最短的诱捕期间隔时间为 1 周，所以动物在两次取样间隔期有足够的时间恢复，上一次取样时造成的动物的应激反应不会对下一次收集的粪便样品中皮质酮含量有影响。因此，在野外研究中，粪便皮质酮检测法比血浆检测法更可靠、准确、实用。

需要进一步说明的是，Touma 等（2003, 2004）研究证明粪便检测法的时滞不仅与激素在肠道中的运转时间有关，而且与注射外源性糖皮质激素的时间有关。考虑到粪便皮质酮含量具有自身固有的昼夜节律变化，施加应激的时间以及取样的时间也可能影响粪便皮质酮含量变化格局。因此，在今后的相关实验中，建议在粪便皮质酮含量基础水平具有不同变化趋势的各个时间段分别进行急性应激，以获取更加全面的数据资料。

慢性应激反应的一个重要特征是 HPA 轴的持续慢性激活，表现为下丘脑 CRH、垂体 ACTH 和肾上腺 GC 持续升高，最终造成导致 HPA 轴的负反馈机制失调（Raone *et al.*, 2007）。本研究的结果表明，根田鼠粪便皮质酮含量从第 13 d 之后显著升高，说明第 13 d 之后根田鼠的慢性应激效应在粪便中可以检测出来。可见，以粪便皮质酮含量作为检测慢性应激处理效应的指标具有可行性。

动物被重复或长期暴露给应激源，持续释放的 GC 对有机体将产生干扰及病理性后果，如代谢和心血管疾病，而且会对生长发育以及免疫和繁殖功能产生抑制。HPA 轴负反馈机制对保持 GC 的正常水平及维持机体稳态具有极其重要的作用。HPA 轴负反馈调节具有两类途径，一类是 GC 长环反馈（Long-loop feedback）调节 ACTH 分泌。这类反馈调节作用在下丘脑和垂体两个水平。在下丘脑中，GC 主要抑制 CRH 的含量；在垂体中，GC 抑制 ACTH 合成及释放。同时，ACTH 也可对下丘脑 CRH 神经元产生快速反馈抑制，该途径为短反馈（Short-loop feedback）。可见，HPA 轴是一个极为有效和灵敏的机能轴（Boonstra *et al.*, 1998）。目前，有关检验 HPA 轴负反馈功能的方法有 2 种：

应激源刺激方法和激素刺激方法（Uhart *et al.*, 2006）。应激源刺激方法是通过标准化的应激源来评估动物应激反应能力及负反馈功能。激素刺激方法是通过注射外源性激素地塞米松（Dexamethasone, DEX）和 ACTH，测定实验个体在一系列时间段内的糖皮质激素含量（Boonstra *et al.*, 1998）。考虑到应激源刺激方法操作的简单性，便于野外研究，本实验选用了该方法进行验证。对正常个体而言，急性应激后，下丘脑分泌大量 CRH，继而引发 HPA 轴系列反应，导致 GC 水平升高。在 HPA 轴的负反馈调节作用下，抑制 CRH 及 ACTH 分泌，使 GC 含量回落并维持在基础范围之内。如果个体 HPA 轴功能受损，则其中各级靶器官对相应激素的反应会相对迟钝，即响应时间相对延长，表现为机体对应激源的反应滞后，负反馈调节失灵，末端激素 GC 含量持续保持在高水平。本研究结果表明，慢性应激个体当再次遭受急性束缚应激时，粪便皮质酮在之后的 30 h 开始上升，比正常个体延后了 18 h。说明慢性应激动物的 HPA 轴对应激源刺激的响应速度变慢，响应时间相应延长。此外，正常个体在急性应激后 24 h 内，粪便皮质酮含量恢复至基础水平，而慢性应激个体的粪便皮质酮含量依然保持在较高水平。上述结果说明慢性束缚应激使根田鼠个体 HPA 轴负反馈调节功能受损。本研究验证了在应激源刺激法中，可通过测定粪便皮质酮含量检验根田鼠 HPA 轴的负反馈功能，这为野外种群的应激轴系功能研究提供了一个简单易行的方法。

本研究结果表明，在正常生理状态或应激状态下，根田鼠粪便皮质酮含量均具有显著的性别差异。该结果与一些研究结论一致（Galea *et al.*, 1997; Solomon and Herman, 2009; Zavala *et al.*, 2010）。这可能与睾酮与雌二醇对 HPA 轴的不同调节作用有关（Kudielka and Kirschbaum, 2005; Louvar *et al.*, 2006; Weiser and Handa, 2006）。

综上所述，本文验证了所提及的假设及预测，无论皮质酮自身昼夜节律性变化或施加的各种应激效应，都可在根田鼠粪便中得以检测，粪便皮质酮含量作为揭示根田鼠所处生理状态和应激水平的指标，具有足够的可靠性和实用性。

参考文献：

- Bian J H, Wu Y, Zhou K K. 2008. Effects of population density on demography and individual corticosterone level during breeding period

- in root voles (*Microtus oeconomus*). *Acta Theriologica Sinica*, **28** (2): 135–143. (in Chinese)
- Bian J H, Wu Y, Liu J K. 2005. Breeding behavior under temporal risk of predation in male root vole (*Microtus oeconomus*). *Journal of Mammalogy*, **86** (5): 953–960.
- Bian J H, Wu Y, Getz L L, Cao Y F, Chen F, Yang L. 2011. Does maternal stress influence winter survival of offspring in root voles *Microtus oeconomus* Aeld experiment. *Oikos*, **120**: 47–56.
- Boonstra R, Hik D, Singilton G R, Tinnikov A. 1998. The impact of predation-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecology Monographs*, **79** (5): 371–394.
- Boonstra R. 2004. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. *Integrative and Comparative Biology*, **44**: 95–108.
- Boonstra R. 2005. Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Mammalogy*, **86** (2): 236–247.
- Carere C, Grootuis T G G, Mostl E, Daan S, Koolhaas J M. 2003. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. *Hormones and Behavior*, **43**: 540–548.
- Chrousos G P. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci*, **851**: 311–335.
- Chen F, Du S, Bian J H, You Z B, Wu Y. 2012. Chronic hypoxia exposure during pregnancy is associated with a decreased active nursing activity in mother and an abnormal birth weight and postnatal growth in offspring of rats. *Hormones and Behavior*, **61**: 504–511.
- Cavigelli S A, Monfort S L, Whitney T K, Mechref Y S, Novotny M, McClintock M K. 2005. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *Journal of Endocrinology*, **184**: 153–163.
- Dobson F S, Oli M K. 2001. The demographic basis of population regulation in Columbian ground squirrels. *American Naturalist*, **158**: 236–247.
- Galea L A, Lee T T, Kostaras X, Sidhu J A, Barr A M. 1997. High levels of estradiol impair spatial performance in the Morris water maze and increase ‘depressive-like’ behaviors in the female meadow vole. *Physiology & Behavior*, **77** (2–3): 217–225.
- Harper J M, Austad S N. 2000. Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological & Biochemical Zoology*, **73** (1): 12–22.
- Harper J M, Austad S N. 2001. Effect of capture and season on fecal glucocorticoid levels in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). *General and Comparative Endocrinology*, **123**: 337–344.
- Harper J M, Austad S N. 2004. Fecal corticosteroid levels in free-living populations of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and southern red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). *The American Midland Naturalist*, **152**: 400–409.
- Hilary D, Smith R F. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction. *Animal Reproduction Science*, **60–61**: 743–752.
- Hiebert S M, Ramenofsky M, Salvante K, Wingfield J C, Gass C L. 2000. Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds. *General and Comparative Endocrinology*, **120**: 235–247.
- Klenerova V, Jurcovicova J, Kaminsky O, Sida P, Krejci I, Hlinak Z, Hynie S. 2003. Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behavior & Brain Research*, **142** (1–2): 143–149.
- Kudielka B M, Kirschbaum C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biology & Psychology*, **69**: 113–132.
- Louvarat H, Maccari S, Lesage J, Léonhardt M, Dickes-Coopman A, Darnaudéry M. 2006. Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behaviour in the aversive context in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, **31**: 92–97.
- Morrow C J, Kolver E S, Verkerk G A, Matthews L R. 2002. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *General and Comparative Endocrinology*, **126**: 229–241.
- Moynihan J A. 2003. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behavior and Immunity*, **17**: 11–16.
- Monclús R, Rödel H G, Palme R, von Holst D, de Miguel J. 2006. Non-invasive measurement of the physiological stress response of wild rabbits to the odour of a predator. *Chemoecology*, **16**: 25–29.
- Mateo J M, Cavigelli S A. 2005. A validation of extraction methods for noninvasive sampling of glucocorticoids in free-living ground squirrels. *Physiological & Biochemical Zoology*, **78**: 1069–1084.
- Oli M K, Dobson F S. 2003. The relative importance of life-history variables to population growth rate in mammals: Cole’s prediction revisited. *American Naturalist*, **161**: 422–440.
- Pickering A D, Fryer J N. 1994. Hormones and stress: a comparative perspective. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 517–519.
- Pihl L, Hau J. 2003. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Laboratory Animals*, **37**: 166–171.
- Raone A, Cassanelli A, Scheggi S, Rauggi R, Danielli B, De Montis M G. 2007. Hypothalamus-pituitary-adrenal modifications consequent to chronic stress exposure in an experimental model of depression in rats. *Neuroscience*, **146** (4): 1734–1742.
- Sapolsky R. 1992. Neuroendocrinology of the stress-response. *Behavioral Endocrinology*, 287–324.
- Selye H. 1946. The general-adaptation-syndrome and diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **6**: 117–230.
- Solomon M B, Herman J P. 2009. Sex differences in psychopathology: Of gonads, adrenals and mental illness. *Physiology & Behavior*, **97**: 250–258.
- Sheriff M J, Bosson C O, Krebs C J, Boonstra R. 2009. A non-invasive technique for analyzing fecal cortisol metabolites in snowshoe hares (*Lepus americanus*). *Journal of Comparative Physiology*, **179**: 305–313.

- Sheriff M J, Krebs C J, Boonstra R. 2010a. Assessing stress in animal populations: do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story. *General and Comparative Endocrinology*, **66**: 614–619.
- Sheriff M J, Krebs C J, Boonstra R. 2010b. The ghosts of predators past: population cycles and the role of maternal programming under actuating predation risk. *Ecology*, **91** (10): 2983–2994.
- Sheriff M J, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, **166**: 869–887.
- Tsigos C, Chrousos G P. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosom Research*, **53**: 865–871.
- Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General Comparative Endocrinology*, **130**: 267–278.
- Touma C, Palme R, Sachser N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, **45**: 10–22.
- Uhart M, Chong R Y, Oswald L. 2006. Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, **31**: 642–652.
- Wasser S K, Hunt K E, Brown J L, Cooper K, Crockett C M, Bechert U, Millsbaugh J J, Larson S, Monfort S L. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General Comparative Endocrinology*, **120**: 260–275.
- Weiser M J, Handa R J. 2006. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, **159** (2): 883–895.
- Wingfield J C. 1994. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 520–528.
- Wu Y, Bian J H, Cao Y F. 2008. Maternal social stress affects immunocompetence of offspring in root voles (*Microtus oeconomus*): a field experiment. *Acta Theriologica Sinica*, **28** (3): 250–259. (in Chinese)
- Xiong Z, Du J Z. 1997. The circadian rhythm of corticosterone level and effect of hypoxia on root vole (*Microtus oeconomus*). *Acta Theriologica Sinica*, **17** (3): 234–235. (in Chinese)
- Xiong Z, Suo Y R. 1998. Spectrofluorometric determination of corticosterone in plasma and tissue. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **18** (2): 237–239. (in Chinese)
- Xu L, Xie J, Liu B, Ge X P, He Y J, Pan L K, Zhou Q L, Chen R L. 2010. Research progress in metabolism and action mechanism of glucocorticoid in fishes under stress. *Acta Agriculturae Jiangxi*, **22** (8): 132–137. (in Chinese)
- Yang L, Wu Y, Cao Y F, Chen F, Bian J H, Chen Z. 2011. Effect of maternal density in field enclosures on sex organ index of F1 offspring in root voles (*Microtus oeconomus*). *Acta Theriologica Sinica*, **31** (2): 164–170. (in Chinese)
- Zavala J K, Fernandez A A, Gosselink K L. 2010. Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. *Physiology & Behavior*, **104**: 215–221.
- 边疆晖, 吴雁, 周抗抗. 2008. 繁殖期根田鼠种群密度对其种群统计参数及个体皮质酮水平的作用. *兽类学报*, **28** (2): 135–143.
- 吴雁, 边疆晖, 曹伊凡. 2008. 围栏条件下母体社群应激对根田鼠子代免疫力的影响. *兽类学报*, **28** (3): 250–259.
- 熊忠, 杜继增. 1997. 根田鼠肾上腺皮质酮水平的日节律及急性低氧的影响. *兽类学报*, **17** (3): 234–235.
- 熊忠, 索有瑞. 1998. 血浆和组织中皮质酮的荧光测定法. *光谱学与光谱分析*, **18** (2): 237–239.
- 徐磊, 谢骏, 刘波, 戈贤平, 何义进, 潘良坤, 周群兰, 陈汝丽. 2010. 应激状态下鱼类糖皮质激素代谢及作用机理的研究进展. *江西农业学报*, **22** (8): 132–137.
- 杨乐, 吴雁, 曹伊凡, 陈芳, 边疆晖, 陈志. 2011. 围栏条件下母体密度应激对根田鼠 F1 代性器官指数的影响. *兽类学报*, **31** (2): 164–170.