

台灣高山田鼠糞便中性類固醇濃度變化與生殖之關係

Changes in Daily Fecal Sex Steroid Concentrations with Relation to Reproductive Cycle of the Formosan Mountain Field Vole (*Volemys kikuchii*)

江逸凡¹ 陳湘繁² 陳宣米² 邱智賢^{1,*}

Yi-Fan Jiang¹, Shiang-Fan Chen², Hsuan-Mi Chen²
and Chih-Hsien Chiu^{1,*}

¹ 國立台灣大學動物科學與技術學系 台北市基隆路三段 155 巷 50 號

² 台北市立動物園保育研究中心 台北市新光路二段 30 號

¹ Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

² Conservation and Research Center, Taipei Zoo, Taipei, Taiwan

*通訊作者：chiuchihhsien@ntu.edu.tw

* Corresponding author: chiuchihhsien@ntu.edu.tw

摘 要

本研究之目的在應用糞便中性類固醇的分析，探討台灣高山田鼠(*Volemys kikuchii*)之生殖生理狀態，並提供此一台灣特有動物之基本生殖生理資料。本試驗自 2007 年 7 月至 12 月，於每日上午蒐集飼養於台北市立動物園中的 10 隻雌性台灣高山田鼠之糞便，經萃取後，應用酵素免疫分析法(enzyme-immunoassay, EIA)進行性類固醇包括孕酮(progesterone, P₄)與雌二醇(estradiol, E₂)濃度之分析。結果顯示，未配對之成年雌性高山田鼠糞便中，孕酮與雌二醇於採樣期間存在以 4-5 天為 1 個周期的變化，顯示其動情周期可能以 4-5 天為 1 循環。此外，在配對飼養的高山田鼠部分，其糞便孕酮分析結果推測，高山田鼠的懷孕期約為 24-25 天。由本試驗應用糞便類固醇萃取及酵素免疫分析系統，初步完成高山田鼠之動情周期與懷孕期的生殖生理相關內泌素變化，並提供此一台灣特有之高山田鼠更完整之生殖生理資料。

Abstract

The objective of this study was to investigate the reproductive physiology of the Formosan mountain vole (*Volemys kikuchii*), an endemic species in Taiwan. Fecal samples were collected daily in the morning from ten adult females (5 unpaired and 5 paired) at the Taipei Zoo during the period from July to December, 2007. The progesterone and estradiol concentrations of the fecal samples were determined with the enzyme-immunoassay (EIA) method. The results revealed that the vole had the progesterone and estradiol cycle of 4-5 days and the gestation period of 24-25 days.

關鍵詞：高山田鼠、性類固醇、酵素免疫分析法、生殖周期

Key words: Formosan mountain field vole, *Volemys kikuchii*, sex steroids, enzyme-immunoassay, reproductive cycle

收件日期：97年4月29日

接受日期：98年3月18日

Received: April 29, 2008

Accepted: March 18, 2009

緒 言

台灣高山田鼠(*Volemys kikuchii*)，屬哺乳綱齧齒目的成員，是台灣特有種的鼠類，其分布於台灣 2,000m 以上之山地，以箭竹之竹筍與嫩葉為食(張簡 1997)。台北市立動物園保育研究中心目前進行台灣高山田鼠飼養與繁殖的相關作業，並已有繁殖成功的紀錄，然而有關其生殖生理之相關研究資料仍闕如。

野生動物類固醇內分泌素的研究，將有助於了解其生殖特性，或是否處於緊迫狀態，更可進一步解決野外或圈養時，繁殖過剩、繁殖障礙以及動物福祉等問題(張等 1996)。以性類固醇內分泌素為例，由卵巢分泌的孕酮(progesterone, P₄)與雌二醇(estradiol, E₂)是雌性動物體中兩種重要的性類固醇，二者對下視丘、腦垂腺的回饋調控機制，與雌性動物動情周期及懷

孕與否有直接關係。此外，動物體中若干生理機能亦受此兩種內分泌素所調節，例如第二性徵的顯現，以及母性行為等(Kato 1979; Pardridge 1986)。

類固醇內分泌素普遍存在於各種體液當中，包括血液(Hesterman *et al.* 2008)、乳汁(Hamsuddin *et al.* 2006)、尿液(Pucsock *et al.* 2005)以及唾液(Lewis 2006)等。在採樣方法方面，一般以血液樣品來監測動物即時的生理狀態；然而血液取得不易，尤其是對於野生動物而言，更容易造成緊迫，甚至因採血麻醉等造成動物受傷的風險(陳 1990)，因此，以非侵入式的樣品採集方法更加符合動物的福祉。本試驗即利用非侵入式的方法，持續蒐集自台北市立動物園中人為飼養環境下之高山田鼠的糞便樣本，經萃取後分析其雌二醇與孕酮之含量，配合體重測量與記錄，探討台灣高山田鼠在圈養環境下之生殖生理狀態。

材料與方法

一、試驗動物高山田鼠

本試驗使用飼養在台北市立動物園的 15 隻成年高山田鼠(5 雄 10 雌)。試驗期間所有動物皆飼養於同一鼠舍，維持在溫度 16°C、長日照(L:D=16:8)之環境中。在鋪有墊料之壓克力

製透明大鼠盒中，餵飼粒狀鼠飼料並補充青菜、蔬果等，為求飼養環境豐富化，於鼠盒中置入一截水管給予躲藏及繁殖之用，爾後依試驗需要分成未配對組與配對組。在未配對組中，試驗期間每隻田鼠皆單獨飼於不同的鼠盒中進行採樣；而在配對組方面，各鼠盒內則以 1 雄 1 雌的配對方式飼養。詳細分組如表 1 所示。

表 1. 試驗之高山田鼠的編號與採樣之時間

Table 1. The fecal sampling periods of paired and unpaired Formosan mountain field voles in 2007

Groups	Voles	Sampling periods	
		Starting	Ending
Unpaired (female)	F1011	June 26	November 24
	F1041	October 18	November 24
	F1010	October 18	November 24
	F1023	October 18	November 24
	F1012	October 18	November 24
Paired (female × male)	C1195-3 × C1195-9	October 29	December 3
	F1018 × F1004	October 29	November 24
	C1221-5 × C1195-7	October 18	November 24
	C1195-6 × C1221-2	October 25	November 24
	F1024 × F1029	October 18	November 24

表 2. 成年雄性(n=5)與成年未配對雌性高山田鼠(n=5)在試驗期間之平均體重(mean ± SD)

Table 2. Body weights (mean ± SD) of the adult males (n=5) and unpaired females (n=5) of the Formosan mountain field vole

Gender	Body weight (g)
Female (n=5)	51.7 ± 5.6
Male (n=5)	47.7 ± 9.6

二、秤重與糞便蒐集

於每日上午固定時間用封口塑膠袋收集糞便，隨後更換墊料並秤量體重；糞樣則置於 -20°C 之冷凍櫃中凍存，待收集完整後，定期進行萃取並分析(彭等 2001)。

三、類固醇萃取

本試驗使用甲醇溶液進行萃取，先將糞便黏附之墊料去除，取田鼠糞樣約 0.08g，置於微量離心管中，加入 0.08 ml 去離子水與 0.64 ml 甲醇，震盪混合 40 min。再加入 0.3 ml 石油醚後震盪 15 sec，並以 3,000 rpm 離心 15 min。

此時微量離心管內可分成 3 層，由上而下分別為石油醚層、甲醇層與不溶之糞便層，此時利用微量吸管吸取約 0.5 ml 之甲醇層，移入新的微量離心管中置於 -20°C 保存以待分析(張等 1994)。

四、孕酮與雌二醇分析

樣品之分析參照酵素免疫分析法(enzyme-immunoassay, EIA) (Wu *et al.* 2000; Chen *et al.* 2002; Chun *et al.* 2002; Wu *et al.* 2002)，本方法是利用分析緩衝液(assay buffer)將樣品適當稀釋後，與該種類固醇內分泌素-蕁草根過氧化酵素連結體(steroid hormone-horseradish peroxidase coupler, HRP)混合，並加入經該種類固醇抗體吸附之 96 孔微滴盤中，使兩者於室溫下競爭抗體接位 30 min，再以清洗緩衝液(washing buffer)沖洗，去除非結合態抗原，隨即加入呈色物質鄰-苯二胺(o-phenylenediamine, OPD)，於室溫下反應 20 min 後，加入 8N 硫酸以中止反應，並測定盤上每孔的 490 nm 波長之吸光值。最後用半對數法計算類固醇之濃度。

結果與討論

試驗期間未配對組的雌性高山田鼠與配對組的雄性高山田鼠之平均體重為 $51.7 \pm 5.6\text{g}$ 及 $47.7 \pm 9.6\text{g}$ ；二者間並沒有顯著差異，而此體重紀錄較文獻中之資料 36.0g 為重(張簡 1997)。推測可能是人為飼養環境之食物營養較野外充足所致，而高山田鼠在圈養下活動空間較小也可能是原因之一。

未配對雌性高山田鼠在試驗期間的孕酮濃度變化如圖 1 所示，其中 F1011、F1041、F1010 及 F1023 編號之田鼠，經糞便收集及萃取，分析其孕酮含量後，可以觀察到 4.5 ± 0.4 天 1 次的孕酮分泌高峰，由此可推測高山田鼠是以 4-5 天為 1 個動情周期。同期間相對應的

糞便雌二醇濃度則顯示於圖 2，經對照後可以發現孕酮濃度與雌二醇濃度之高峰期有重疊的現象；實則，一般擁有動情周期的哺乳動物體內，雌二醇是由濾泡內的粒性細胞(granulosa cell)所分泌，分泌量可在發情期(estrus)達到最高峰；隨著動物發情後排卵，粒性細胞在排卵後即形成黃體細胞，並開始分泌孕酮以備懷孕所需，分泌量約於動情間期(diestrus)達到最高峰；因此孕酮與雌二醇之高峰應相互交錯(Hafez and Hafez 2000)。本試驗的結果與預期並非完全吻合，推測可能是因為一般哺乳動物之濾泡期較黃體期短，而齧齒類動物動情周期相對也較短。再者，糞便樣品的性類固醇濃度所反映的是糞便通過腸道期間測定之內分泌變化之平均值，在採樣頻率不夠密集，而類固醇經肝臟代謝至排出腸道又有時間差的情況下(楊等 2005)，此項試驗結果無法偵測出孕酮與雌二醇濃度高峰的交錯變化。

綜合以上孕酮及雌二醇糞便含量分析之實驗結果顯示，未配對組高山田鼠之間，無論是孕酮或是雌二醇在濃度上皆有個體變異，其原因可能是每隻動物之遺傳背景不同所造成；其中以 F1012 之孕酮與雌二醇在糞便中之濃度相對低於其他田鼠，此外，亦不易看出其明顯的動情周期變化，唯單憑孕酮與雌二醇分析仍無法斷定其真正原因，必須進一步進行相關檢測方可確證。

在其他品系的田鼠研究中發現，唯有雌雄混合飼養的田鼠才會表現出動情周期，符合誘發排卵型式(copulatory ovulator)。文獻顯示田鼠的生殖狀態也會受到氣味、費洛蒙等因素影響(Nubbemeyer 1999; Widayati *et al.* 2003)。然而，在本試驗中所有高山田鼠皆飼於同一鼠舍中，但單獨飼養一籠的雌性田鼠也有動情周期存在，因此，尚須更進一步的隔離試驗，才可驗證雌性高山田鼠之動情周期是否為環境中雄性之刺激而產生。

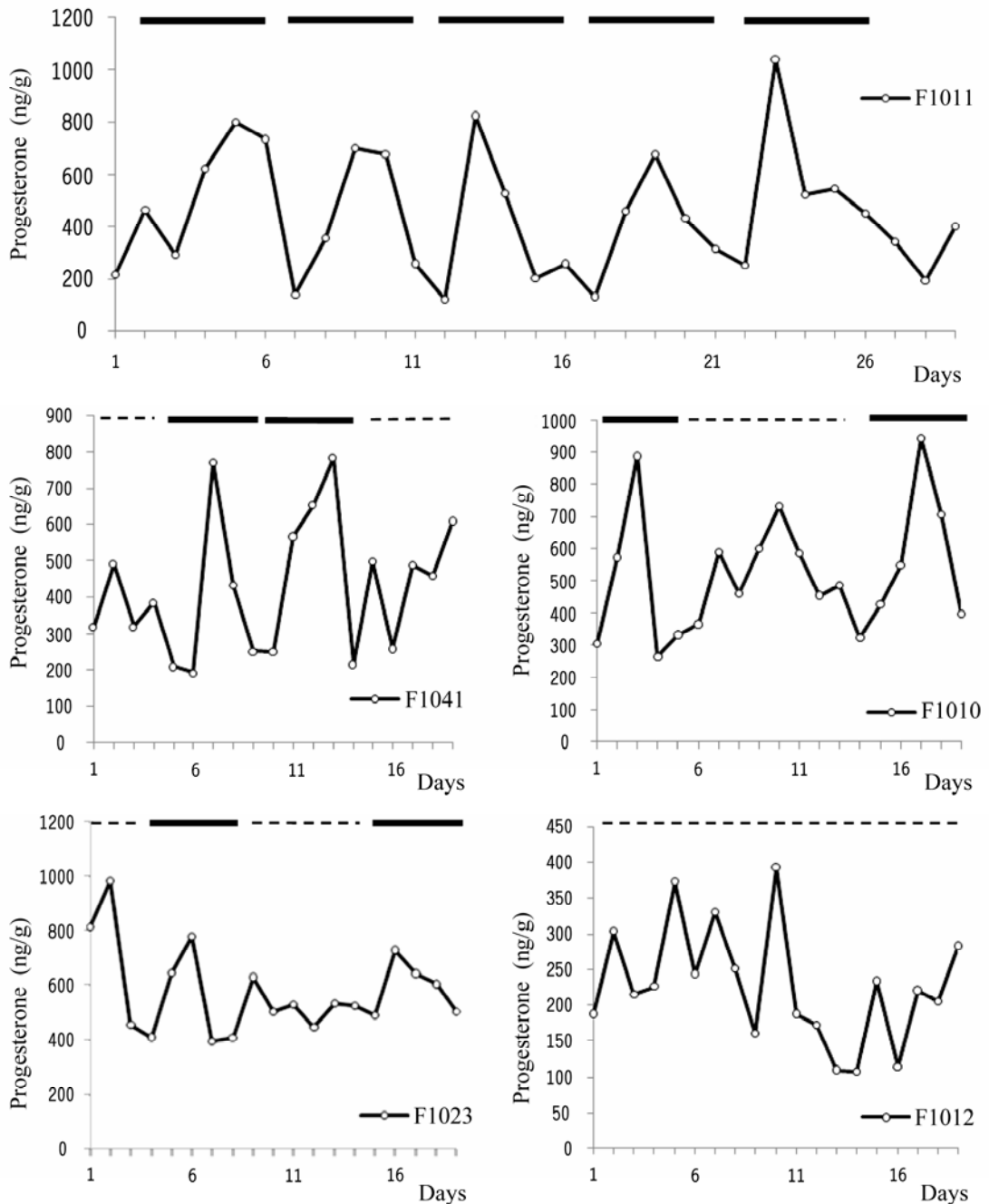


圖 1. 雌性台灣高山田鼠 F1011、F1041、F1010、F1023 及 F1012 於採樣期間內，糞便中孕酮濃度變化。實線標示完整的動情周期；虛線則代表不明顯之動情周期。Day 1 表示試驗開始之第 1 天。
Fig. 1. Daily fecal progesterone concentrations of the unpaired adult female Formosan mountain field voles F1011, F1041, F1010, F1023 and F1012 (horizontal bars, estrous cycle periods; dotted lines, the periods without distinct estrous cycles; Day 1, the first day of sampling).

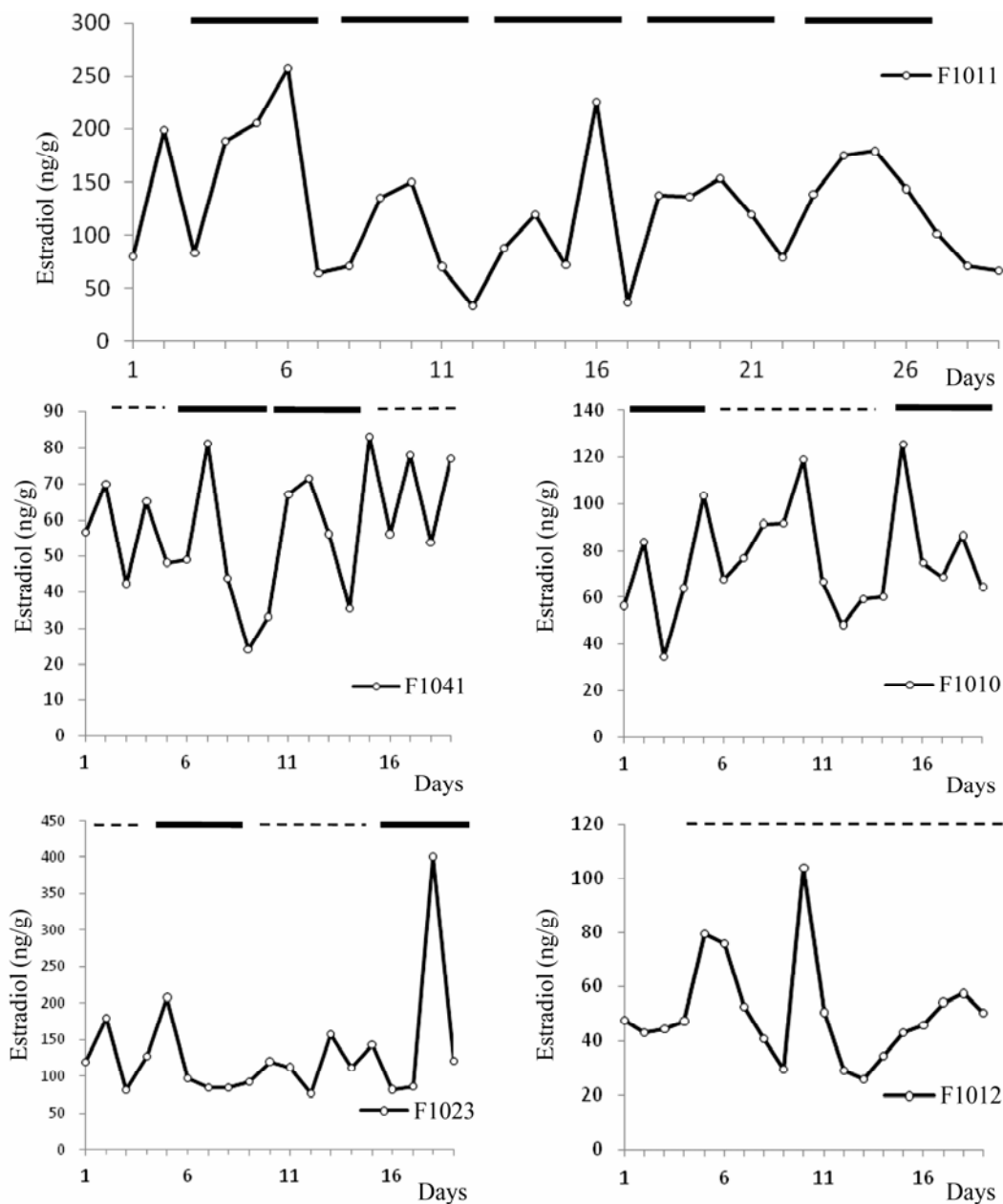


圖 2. 雌性台灣高山田鼠 F1011、F1041、F1010、F1023 及 F1012 於採樣期間內，糞便中雌二醇濃度變化。實線與虛線標示完整與不明顯的周期(利用糞便中孕酮濃度變化判定)。Day 1 表示試驗開始之第 1 天。

Fig. 2. Daily fecal estradiol concentrations of the unpaired adult female Formosan mountain field voles F1011, F1041, F1010, F1023 and F1012 (horizontal bars, the estrous cycle periods determined by the fecal progesterone cycles; dotted lines, the periods without distinct estrous cycles; Day 1, the first day of sampling).

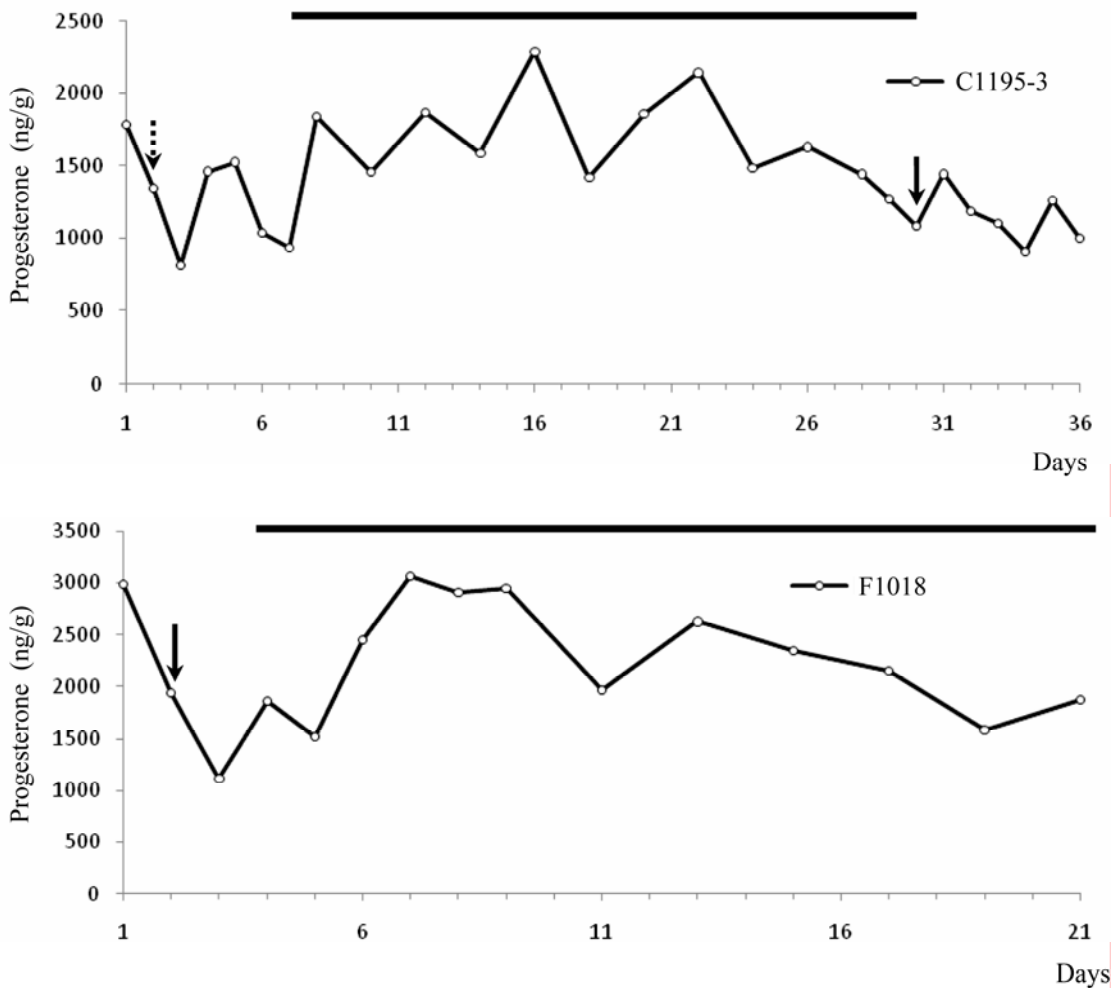


圖 3. 雌性台灣高山田鼠 C1195-3 及 F1018 於採樣期間內，糞便中孕酮濃度變化。實線標示懷孕期；實線箭頭代表分娩日期；虛線箭頭代表仔鼠死亡。Day 1 表示試驗開始之第 1 天。

Fig. 3. Daily fecal progesterone concentrations of the paired adult female Formosan mountain field voles C1195-3 and F1018 (horizontal bars, gestation periods; solid arrow, parturition; dotted arrow, loss of her offspring; Day 1, the first day of sampling).

在配對組試驗部分，5 組配對組中在試驗時間內有兩組產下仔鼠(C1195-3、F1018)，兩組於試驗期間中之孕酮變化如圖 3 所示。孕酮是哺乳動物維持懷孕非常重要的內分泌素，懷孕期間體內必須有高量孕酮以抑制子宮收縮、維持胚胎發育之環境；隨著胚胎發育成長直到分娩前，胚胎發育空間相對較小的子宮開始對胎

兒造成緊迫，刺激胎兒腎上腺類固醇的分泌，分娩前黃體解體，而母體內孕酮濃度快速下降則導致子宮壁開始收縮，將胎兒自陰道排出，完成分娩(Hafez and Hafez 2000)。由此推斷孕酮應於懷孕期間維持高濃度，而分娩後濃度則降低；本試驗結果符合，並發現其懷孕期約為 24-25 天。在 C1195-3 組中，於試驗開始第 2

天時失去剛出生之仔鼠，藉由糞樣中孕酮之分析，發現 C1195-3 隨後於試驗第 3 天進入下一次之動情周期，雖然該次周期並未懷孕，但其在第 7 天後再次懷孕，並於約 24 日後分娩，且隨即在分娩後再次進入動情周期。F1018 組中也有類似情形，F1018 於試驗第 2 天生產，且在試驗第 4 天時再次進入懷孕期，並於約 25 天後(試驗結束後 1 周)再次分娩生產。此外，

試驗期間此 2 組高山田鼠之體重變化如圖 4。實驗結果可以發現兩隻田鼠之體重隨著懷孕期上升，並於分娩後下降。由以上結果可以得到兩點結論：(1)雌性台灣高山田鼠之懷孕期約為 24-25 天；(2)台灣高山田鼠存在產後發情的現象，無論仔鼠是否存活，雌性田鼠似可在產後迅即再次發情，此現象在許多齧齒類動物都曾發現(Franceschini *et al.* 2007)。

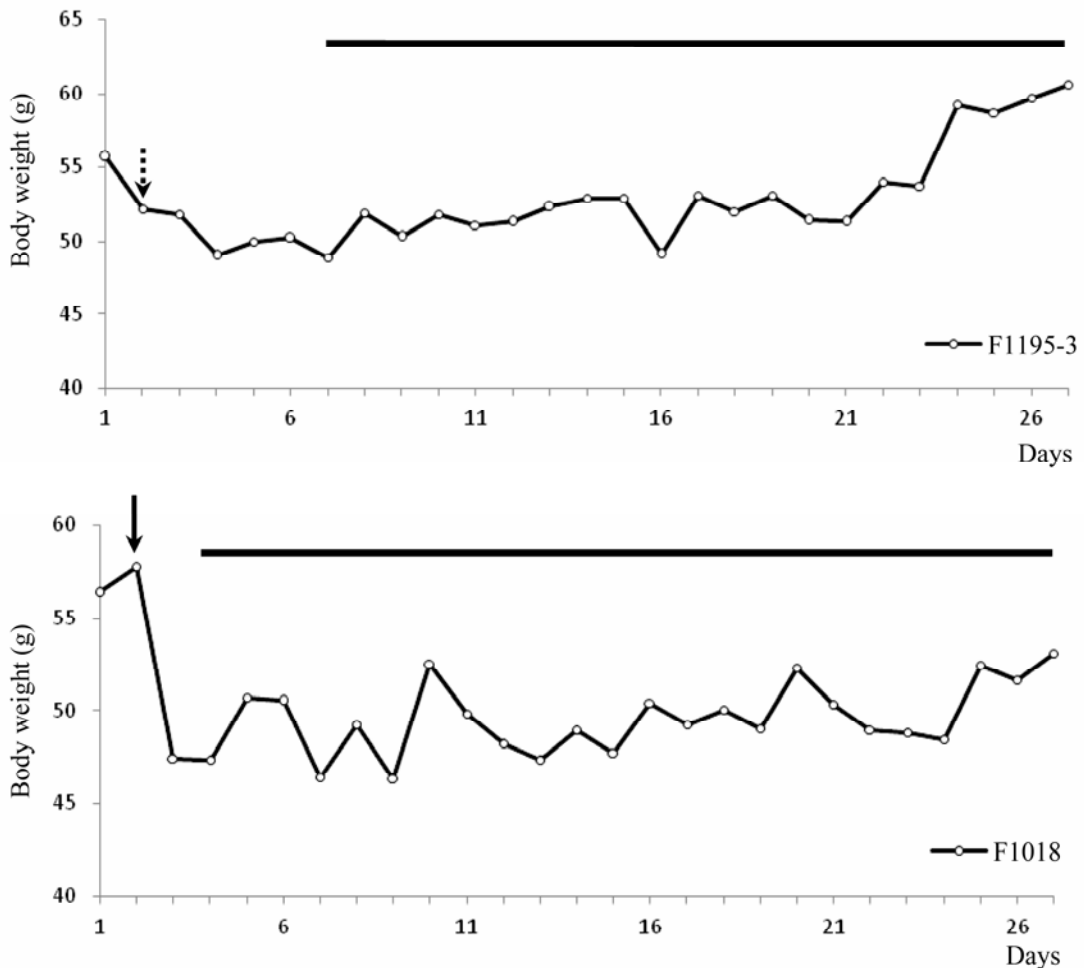


圖 4. 雌性台灣高山田鼠 C1195-3 及 F1018 於採樣期間內體重的變化。實線標示懷孕期；實線箭頭代表生產日期；虛線箭頭代表仔鼠死亡。Day 1 表示試驗開始之第 1 天。

Fig. 4. Daily body weights of the paired adult female Formosan mountain field voles C1195-3 and F1018 (horizontal bars, gestation periods; solid arrow, parturition; dotted arrow, loss of her offspring; Day 1, the first day of sampling).

綜合本試驗結果，提出以下結論，在未配對組方面，雌性高山田鼠在 16°C、長日照之環境中，具有約 4-5 日之動情週期；而配對組中，則發現雌性高山田鼠懷孕期長約 24-25 日，並有產後發情之現象。本試驗應用糞便中萃取類固醇內泌素與酵素免疫分析法，輔以體重之測定及行為觀察，初步瞭解台灣高山田鼠生殖生理與性類固醇內泌素的關係，未來藉由此一糞便類固醇分析系統，將可進一步拓展糞類固醇內泌素在野生動物生殖生理學領域之應用。

謝 誌

感謝林華慶先生任職於台北市立動物園保育研究中心副研究員時的協助，以及楊建仁副園長與施玲玲小姐在糞樣萃取與類固醇分析之協助與指導，使樣品採集及分析作業得以順利進行。

引用文獻

陳玉燕。1990。動物糞便與其生殖、生理關係之探討。動物園學報 2: 55-60。

張希賢、邱若君、李素蘭、陳玉燕、趙明杰、楊建仁、陳寶忠、林仁壽、吳兩新。1994。捲尾食蟻獸之糞便中性類固醇濃度變化。動物園學報 6: 61-65。

張志華、林安仲、吳兩新、趙明杰、陳寶忠。1996。母狒狒生殖周期之卵巢、生殖道與生殖內泌素變化。動物園學報 8: 17-38。

張簡琳玟。1997。也是台灣國寶-台灣高山田鼠。自然保育季刊 17: 47-49。

彭松鶴、林仁壽、陳玉燕、吳兩新。2001。利用糞中孕酮與雌二醇濃度變化監測母豬隻生殖狀態。中國畜牧學會會誌 30(3): 171-186。

楊健仁、吳兩新、陳玉燕、陳寶忠、林仁壽。2005。糞尿作為類固醇內泌素檢測之探討

-以台北動物園為例。動物園學報 17: 13-26。

Chen, J. C., J. H. Lin, L. S. Wu, Y. F. Tsai, T. H. Su, C. J. Chen and T. J. Chen. 2002. Luteotropic roles of prolactin in early pregnant hamsters. *Biology of Reproduction* 67(1): 8-13.

Chun, W. B., W. F. Cheng, L. S. Wu and P. C. Yang. 2002. The use of plasma progesterone profiles to predict the reproductive status of anestrus gilts and sows. *Theriogenology* 58(6): 1165-1174.

Franceschini, C., C. Siutz, R. Palme and E. Millesi. 2007. Seasonal changes in cortisol and progesterone secretion in Common hamsters. *General and Comparative Endocrinology* 152(1): 14-21.

Hafez, B. and E. S. E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*, 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA.

Hamsuddin, M., M. M. Bhuiyan, P. K. Chanda, M. G. Alam and D. Galloway. 2006. Radioimmunoassay of milk progesterone as a tool for fertility control in smallholder dairy farms. *Tropical Animal Health and Production* 8(1): 85-92.

Hesterman, H., S. M. Jones and F. Schwarzenberger. 2008. Reproductive endocrinology of the largest Dasyurids: Characterization of ovarian cycles by plasma and fecal steroid monitoring. Part II. The spotted-tailed quoll (*Dasyurus maculatus*). *General and Comparative Endocrinology* 155(1): 245-254.

Kato, J. 1979. Action mechanism of sex steroid hormones. *Nippon Rinsho* 37(6): 1218-1226.

Lewis, J. G. 2006. Steroid analysis in saliva: An overview. *The Clinical Biochemist Reviews* 27(3): 139-146.

- Nubbemeyer, R. 1999. Progesterone and testosterone concentrations during oestrous cycle and pregnancy in the common vole (*Microtus arvalis* Pallas). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molecular and Integrative Physiology* 122(4): 437-444.
- Pardridge, W. M. 1986. Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 15(2): 259-278.
- Pucsok, J. M., I. Gyore, I. Hollosi, E. Soos, N. R. Ali Ghasemi and R. Frenkl. 2005. Urine steroid profile of judo competitors affected by acute physical exercises. *Journal of Chromatographic Science* 43(8): 438-440.
- Widayati, D. T., K. Mekada, S. Oda, E. Zholnerovskaya, S. M. Zakiyan and K. Fukuta. 2003. Reproductive features of the Russian vole in laboratory breeding. *Experimental Animals* 52(4): 329-334.
- Wu, L. S., J. C. Chen, S. Y. Sheu, C. C. Huang, Y. H. Kuo, C. H. Chiu, W. X. Lian, C. J. Yang, K. Kaphle and J. H. Lin. 2002. Isocupressic acid blocks progesterone production from bovine luteal cells. *The American Journal of Chinese Medicine* 30(4): 533-541.
- Wu, L. S., S. Y. Sheu, C. C. Huang, C. H. Chiu, J. C. Huang, J. R. Yang, W. X. Lian, C. H. Lai, Y. P. Chen and J. H. Lin. 2000. Ginseng flowers stimulate progesterone production from bovine luteal cells. *The American Journal of Chinese Medicine* 28(3-4): 371-377.