

# 8 ~ 52 周龄比格犬饲喂富含 DHA 鱼油强化食物对其生理功能的影响

叶得军(译)

甘肃省永靖县中小企业局,甘肃永靖 731600

**摘要** 为了评估健康犬饲喂富含二十二碳六烯酸(DHA)鱼油对其成长的认知、记忆、心理活动、免疫学、视网膜功能,和其他监测值的影响。选择 48 只比格幼犬,幼犬在断奶后分成 3 组(样本数  $n=16$ / 每组),并接受 3 种饲料(低 DHA 含量、中 DHA 含量、高 DHA 含量)中的一种作为它们的唯一营养,到 1 岁龄试验结束。在各个时间点对视觉线索辨别学习、记忆任务、心理活动表现任务、心理学进行测试(包括血液和血清生化分析、视网膜电图、双能 X 线吸收测量)。16 周龄注射疫苗后,在 1、2、4、8 周对其抗狂犬病病毒的抗体滴度进行评价。结果显示,除鱼油的 DHA 含量浓度有不同外,食物有类似的组分分析结果;高 DHA 含量食物比其他食物也含有更高的  $V_E$ 、牛磺酸、胆碱、左旋肉碱浓度。高 DHA 含量的样本组比中和低 DHA 含量的样本组,其幼犬在反转学习任务、视觉系统对比辨别、障碍迷宫侧侧运动的早期心理活动能力方面有明显增高效果。高 DHA 含量的食物样本组比其他两个组在疫苗注射后 1 和 2 周内,分别有明显较高的抗狂犬病病毒的抗体滴度。在评估的所有时间点上,视网膜电图(ERG)暗视 b- 波的振幅峰值与血清 DHA 浓度呈显著正相关性。说明在幼犬断奶后,在日粮中添加富含 DHA 成分的强化鱼油或其他搭配的营养成分与幼犬神经认知发育有关,能改善生长期的认知、记忆、心理活动、免疫学、视网膜等功能。

**关键词** 比格犬;DHA;鱼油;神经认知

生长期幼犬的神经系统和体格发育受遗传倾向、环境、疾病、营养的影响。但对幼犬神经认知的发育和维持,特别是学习、记忆、运动功能任务的营养干预作用研究,比较人体来说还处在初级阶段。在老龄的比格犬(研究时的平均年龄  $\geq 8$  岁),复杂基质的抗氧化剂添加到维持型饲料中,可延缓认知下降的起始时间,并和神经病理变化有关。据报道,对怀孕期和泌乳期母犬,在其成长型饲料中添加富含 DHA 鱼油的食物,可改善其幼犬的可训练性和 ERG 记录中的视网膜细胞活性。报道中的这些幼犬认知评估,通常仅仅包括一项认知功能测试指标,而该测试也仅仅在一个生长的时间点进行。

本报告研究的目的,是比较 3 种成长型食物在幼犬生长早期对认知、记忆、心理活动、免疫学反应

(主要是抗狂犬病病毒疫苗的反应)、视网膜功能等方面的影响,以进一步提高我们对断奶到 1 岁龄健康比格幼犬饲喂富含特殊营养的强化食物(包括含有 DHA 鱼油食物)产生影响的认识水平。同时,对幼犬健康发育的另外指标包括体重、体况评分(BCS)、全血细胞计数(CBC)、血清生化指标、骨及软骨组织增长的血清学标志、双能 X 线吸收测量的可变量(体脂、瘦体重、骨含量、骨密度)也进行测定。本研究对食物的合理性选择,目的是对幼犬饲喂的有类似组分分析结果而有不同浓度其他营养成分(与神经认知健康有关的富含 DHA 的鱼油、胆碱、 $V_E$ 、牛磺酸、左旋肉碱)的 3 种食物(2 种是经济类的市售饲料,1 种是研究时购买的非经济类增长型饲料)之间的可变量进行比较而考虑的。

收稿日期:2016-03-26

叶得军,男,1964 年生,兽医师。

译自:STEVEN C Z,DENNIS E J,RYAN M Y,et al. Evaluation of cognitive learning memory psychomotor immunologic and retinal functions in healthy puppies fed foods fortified with docosahexaenoic acid-rich fish oil from 8 to 52 weeks of age [J].Journal of the American Veterinary Medical Association,2012(241):583-594.

使用的认知学习和记忆测试方案是为了评估幼犬的学习、记忆、心理活动能力的发展过程,以确定饲喂幼犬的食物与试验结果之间有何关系(该方案还包括以前进行的有关犬龄与认知下降是否有关而使用的一系列试验)。进行的试验充分评价了包括视觉线索辨别学习、反转学习、单数辨别作业、地标识别学习在内的认知学习和记忆测试。同时进行了短时记忆试验和延迟-非配对位置作业测试。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

根据体检、CBC 检查、血清生化分析、尿液分析、寄生虫粪便检查,对所有评估的犬(母犬和幼犬)进行了全身性疾病症状的诊断。如果是健康的母犬和幼犬,则作为该研究的样本。有全身性疾病临床症状的幼犬从研究样本中剔除,并根据体况接受适当的治疗。按照该标准化方案,所有犬(包括 $\geq 8$ 周龄的幼犬)均进行了犬瘟热病毒、犬腺状病毒第一型、犬腺状病毒第二型、犬细小病毒、博氏杆菌的疫苗(菌苗)注射;16周龄幼犬注射抗狂犬病病毒疫苗。

供研究的 14 只成熟比格母犬,按营养比例进行饲喂。母犬饲养在特许的分组繁殖场,直到确定怀孕,再转移到产房待产。分娩后的母犬和幼犬仍在同一产房喂养,直到幼犬 8 周龄断奶时移出产房,分组饲养(4 只/间)在随季节变换的自然光线的室内运动场(1.5 m $\times$ 5.2 m)。每天饲喂一次。幼犬通过相互交往,以及同饲养员打逗玩耍、运动锻炼、玩玩具,实现其行为的丰富化;该研究方案由美国希尔斯宠物营养食品有限公司动物保护和利用委员会审查批准。

### 1.2 食物和试验组分配

所有食物,均根据标准分析方案在商业实验室做了营养分析,成熟的比格母犬在怀孕前 $\geq 2$ 周以及整个怀孕和泌乳期饲喂经济的、适合怀孕和泌乳期的低 DHA 含量食物。幼犬在 8 周龄断奶前饲喂和母犬几乎同样的食物。

根据每组均有同数量同窝幼犬的分组原则,断奶后的 48 只比格幼犬(22 只雄性,26 只雌性)被分成 3 组。例如,一个母犬有 8 个同窝幼犬,本研究只选用 6 只,每组分配 2 只。

各组分别饲喂 3 种食物(低 DHA 含量、中 DHA

含量、高 DHA 含量)中的一种。7 雄 9 雌(16 只)的一组饲喂低 DHA 含量的食物;7 雄 9 雌(16 只)的另一组饲喂中 DHA 含量的食物;8 雄 8 雌(16 只)的一组饲喂高 DHA 含量的食物。

### 1.3 饲喂方案

两种经济类饲料重新被包装在白纸袋中,作为试验组使用,且用不同颜色的标签做记号;饲喂量以原包装的说明按比例进食,幼犬按组分别在各组的饲养室喂食,直到 6 月龄大;这段时间,每组均制定饲喂方案。整个试验过程中,每天按组分别记录幼犬进食量;每周测量体重;每周进行一次体况评分(BCS);根据 5 分制系统评价,随时调整进食比例,使体况接近 3 分的标准;但调整的比例不能高于或低于厂家在纸袋上注明的幅度范围。

### 1.4 血样采集和分析

在 10 个月的试验期间,从 7 周龄(断奶前 1 周,作为研究用基础值)到 52 周龄在预定的时间点,从颈静脉采血取样。在 7、12、24、36、52 周龄对 CBC、血清生化指标、全血牛磺酸含量进行测定。血清脂肪酸(包括 DHA 和  $V_E$  含量)在 7、12、16、24、36、52 周龄被测定。抗狂犬病病毒抗体滴度在 16 周龄(注射狂犬病疫苗前立即测定)和 17、18、20、24 周龄进行测定。骨及软骨组织增长的血清学标志则在 7、16、24、36、52 周龄测定。血清样本按 1-mL 等分(溶液)存储在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [华氏  $4^{\circ}\text{F}$ ]的温度下,直到试验开始。使用市售试剂盒按照饲料厂家说明,对样本的骨碱性磷酸酶(BALP)活性、前胶原交联氨基端肽、II 型软骨组织蛋白合成、脱氧吡啶酚总含量、吡啶酚、骨钙素、胶原交联羧基、末端肽进行分析。

### 1.5 眼科检查和视网膜电图检查

在断奶期间,由兽医眼科学专家对幼犬做了整套眼科检查,以评价眼部病变。结果均为正常。为评价视网膜功能的发育程度,在 2、4、6、9、12 月龄,对幼犬进行了一只眼的视网膜电图检查(每次检查均为同一只眼)。

视网膜电图为可携带的手握设备,用超感官知觉全域测试刺激剂来完成;幼犬先进行暗适应 $\geq 1\text{ h}$ ,在红光下肌内注射麻醉剂美托咪定(0.1 mg/kg [0.045 mg/lb])和氯胺酮(5.0 mg/kg [2.27 mg/lb]),然后使用传统的 1%托吡卡胺滴眼液使瞳孔最大化放大,再使用 0.5%盐酸丙美卡因对角膜表面麻醉;视网膜电图隐形眼镜的电极用甲基纤维素溶液粘合

安放在该只眼睛。皮下铂金针电极则分别放置于枕骨结节和该眼外眦的 0.5 cm 处,作为接地电极和参考电极。该设备(0 log 单位)的标准闪光是 1.7 cd/(s·m<sup>2</sup>)(白色 LEDs 灯光源),闪光强度能以 0.3 log 单位的增量调整(从 -3.0 调整到 1.2 log cd/(s·m<sup>2</sup>));为暗视闪光刺激,标准闪光强度可调整到 -3.0 log、0 log、1.2 log cd/(s·m<sup>2</sup>);适应光源(由室内普通荧光灯产生的光源)10 min 后,进行 0 和 1.2 log cd/(s·m<sup>2</sup>)的明适应记录,再获取 30-Hz flicker 的反应闪光刺激光强值。所有视网膜电图的记录被储存,再转输到计算机上进行进一步评估。

### 1.6 双能 X 线吸收测量(DEXA)

幼犬在 2、4、6、9、12 月龄进行双能 X 线吸收测量法测定,正如前述的 ERG 被麻醉的一样进行全身麻醉;根据标准化方案,按照厂家的推荐,利用双能 X 射线吸收法测量体成分,收集包括全身体脂、瘦体重、骨含量、骨密度在内的 DEXA 数据。

### 1.7 认知功能测验

在整个研究过程中,在 T 形迷宫里,使用多伦多通用测试设备(TGTA)进行一系列视觉线索辨别任务测试,以评估幼犬的学习效果。迷宫里放置等量的食物;选择正确的给予食丸奖赏;对选择错误或选择模糊而又再次不能正确选择的犬,则不能给予奖赏食丸。按照过去报道的使用获取视觉刺激物反应的延迟-非配对位置作业的奖赏食丸方法,做了短时记忆测试。每个犬每天对 2 项选择任务进行 10 次试验,对 3 项选择任务进行 12 次试验。为获取奖赏,幼犬需要跑过一个物体或门后寻找隐藏的食物。完成该测试,进入下一个阶段的试验;要求幼犬在一天内有 90% 的正确选择,或在相继的 2 d 内有 80% 的正确选择。测试结束前记录的错误总次数用来统计分析。进行幼犬认知试验的饲养人员要对食物的分配做到事先不知。所有试验中的奖赏食丸是一个营养完全的、平衡的保湿配方,以适应幼犬生长的需要。奖赏食丸包装成 1 g 标准重量的平常食物,大约有 250 mg 的干物质。多数试验任务每天最多只有 10 个正确答案,因此,每只犬奖赏食丸的最大量是 2.5 g 干物质。断奶期的幼犬重量通常是 2.5~4 kg,根据此标准,本研究评估的幼犬每只每天进食量是 100~150 g 干物质;也即幼犬每只每天奖赏食丸总体只占进食量的≤2.5%。

1) T 形迷宫试验。在 8~13 周龄,利用 T 形迷宫

定位试验范型进行初次认知学习功能评估。试验前,幼犬被引导如何从迷宫任一臂的目标盒里寻找奖赏食丸,然后进行定位任务测试。幼犬在 T 形迷宫的一侧有反应,就能获得另一侧目标盒的食丸奖赏。它们一旦学会定位辨别,反转学习任务阶段便开始;在这阶段,幼犬只有正确选择 T 形迷宫原先奖赏一侧(非首选的一侧)的对侧,才能获得奖赏食丸,然后重复反转学习任务过程。每次幼犬学会新的正确选择,奖赏一侧的位置便被转换,使用反转和重复反转试验,以评估比传统定位辨别水平更高的额叶功能有关的学习效果。

2) TGTA 试验。使用 TGTA(多伦多通用测试设备)试验进行剩余的认知学习任务评估。该方案由一个最初的预训练阶段组成,对 14~16 周龄幼犬培训寻找和搬动放置在它们前面物体的能力,以获取在后续试验中准备的奖赏食丸。在 16~20 周龄,幼犬进行简单的物体辨别和反转学习任务测试;在 20~25 周龄,使用认知试验辨别学习能力的第三个方案,对幼犬进行两项任务测试,此两项试验要求它们在三组物体中移动出单目标物体。

在 27~33 周龄,进行对比辨别学习任务测试,并在各组间比较。幼犬首先进行训练,然后测试(用最高[100%]图像对比度)在白色背景下对标有黑色三角和圆圈纸牌的选择反应。此后用同样图像的纸牌测试,但三角、圆圈、背景是在灰色阴影下,对比度也降低(25%对比度)。对比辨别测试的第三部分则用各种程度对比度的图像,检测每个犬的表现。试验中有不同阴影下的各种对比度(最小 1%~25%)的物体和背景,利用成对的 6 个物体(三角和圆圈图像)进行测试。

延迟-非配对位置(DNMP)试验用来对 33~44 周龄幼犬进行短时记忆功能评估。该方案包括学习记忆和获取信息两个评估阶段。在获取信息阶段,一个物体(红色块状物)放置在幼犬面前,在选择奖赏食丸时,便于将幼犬定位到中线的左边和右边,然后物体从视线中移走 5 s;再将 2 个相同的物体(红色块状物)以新异位置出现,表明选择正确,可获得奖赏食丸。完成该阶段的幼犬将转移到记忆阶段。在此阶段,使用延迟 25~50 s 的相同方案评估。

44~51 周龄,对三组幼犬进行最后一轮的认知学习任务方案试验:测试和评估地标识别任务能

力。将黄色木块置于奖赏食丸盘上,再把两个平的圆型底托放置在中线等距的食物井内,对最靠近地标的杯托有反应时,幼犬给予奖赏食丸。地标任务 0 被确定为选择正确杯托地标刻度的中心。在以后的任务测试中,地标逐步远离正确杯托或靠近中线 1 cm(任务 1)到 2 cm(任务 2)放置,以增加任务难度。

### 1.8 心理活动评估

根据幼犬快速穿过设有障碍物的 T 形迷宫能力,来评价它们的运动技能。把穿过迷宫找回奖赏食丸所需的时间(以秒计,即潜伏期评分)确定为心理活动能力(感觉和运动协调)的定量测度。心理活动测试在 3 个时间点(相当于 3.3、6.1、12.3 月龄)进行,在每个时间点有 2 次测试的训练课(需要一些图样和半块复合材料层合板),每次有 10 个试验;第一次测试开始前,幼犬进行 2 次训练,以保证它们在没有放置障碍物的迷宫有高水平的表现(平均时间在 60 s 以下)。在第一次放置障碍物的迷宫测试中,带有圆形图样的全幅层合板分别放在 T 形迷宫的主干臂(长臂)和分枝(垂直于长臂的短臂)部分;幼犬为寻觅层合板上的图样,不得不进入任意一个目标盒分枝的部分(层合板上挖空的图样形状和高度要随着每个时间点幼犬的成长能够调整)。第二次放置障碍物的迷宫测试中,半块复合材料层合板放置在 T 形迷宫主干臂的对侧,要求幼犬绕过障碍物周围的 S 型图样(侧侧运动),到达目标盒。这 2 次测试,奖赏食丸均放在 2 个分枝部分的目标盒食物井内,寻觅到任意一个目标盒内 1 个奖赏食丸的潜伏期被作为心理活动的首要度量指标。

### 1.9 统计分析

鉴于系列资料和试验设计的实际,所有数据使用带有各种模型的统计软件来分析;本试验数据使用均数  $\text{mean} \pm$  标准差 SD(认知和学习试验)和均数  $\text{mean} \pm$  标准误 SEM(其他所有试验)统计法分析。为尽可能减小对认知任务的分析偏差,在揭示设有颜色编码的试验分组信息前,由一名统计专家事先进行了数据分析。所有  $P$  值用双尾检验确定, $P$  值  $\leq 0.05$  被认为是双尾显著性检验。采用 ANOVA 法对体重、DEXA 数据、骨及软骨组织增长血清学标志(前胶原交联氨基端肽、II 型软骨组织蛋白合成、骨碱性磷酸酶活性、脱氧吡啶酚总含量、吡啶酚、骨钙素、胶原交联羧基末端肽)进行评估。在试验开始和

结束时,以试验营养组(按食物营养不同分组)为因变量在各组间进行了分析;在软件模型中,将时间点和试验营养组作为可变量,通过 Mixed 过程对抗狂犬病病毒的抗体滴度、视网膜电图数据、DHA 血清浓度、 $V_E$  含量、牛磺酸浓度进行评估;Tukey-Kramer 法对视网膜电图数据进行分离分析;对其他数据用最小平方均值处理。将食物营养分组作为被试间变量,对认知和心理活动测试资料进行单一或重复的 ANOVA 法适当分析。鉴于此,当正态性及方差齐性假设满足时,分别用 Shapiro-Wilk test(显著性水平是  $P=0.05$ )和 Levene 检验、BOX 试验(两个试验的显著性水平均是  $P=0.001$ )进行评估;不能完全满足任一假设时,应用最大限度减少选择错误次数的转换(平方根和对数)来处理。根据方差不齐和调整的比较次数(Bonferroni 校正法),通过 Tukey 最小显著差异试验、Dunnett 试验、Tamhane-2 试验,利用成对比较,对显著性检验结果进行细致分析。经过和 DHA 浓度测算变量与对比度响应时间变量相比较的多元回归分析,对 DHA 血清浓度和辨别能力比较之间的联系进行了评估。

## 2 结果

根据美国饲料质量委员会设定的分析方差对粗蛋白、脂肪、钙、磷的含量进行的组间分析结果是相似的。除鱼油的 DHA 浓度外,其他可分析的营养浓度在 3 种分组食物间都有变化;高 DHA 含量的食物比其他食物,含有更高浓度的神经认知发育有关的营养( $V_E$ [标准品 DL- $\alpha$ -Tocopherol]、牛磺酸、胆碱、左旋肉碱);中 DHA 含量的食物  $V_E$  和牛磺酸的浓度,比低 DHA 含量的食物浓度更高;而低 DHA 含量的食物中胆碱浓度比中 DHA 含量的食物更高。

分配到 3 个试验营养组的所有幼犬,根据日粮 DHA 浓度(低 DHA 含量、中 DHA 含量、高 DHA 含量)不同完成了研究任务;在研究开始和结束时,3 组在体重、体况评分(BCS)之间无显著性差异;整个研究过程,所有组和描述的所有时间点的血清常规生化分析指标,和全血细胞计数(CBC)均在正常的实验室参考范围。对 3 组之间的可变量没有做统计分析比较。

### 2.1 DHA、 $V_E$ 、牛磺酸浓度的测算结果

饮食干预前,各组间的血清 DHA 浓度无显著

性差异,随后进行的各时间点测算,高 DHA 含量的食物组幼犬,其血清 DHA 浓度比低 DHA 含量和中 DHA 含量的食物组幼犬明显要高;此外,基线(7 周龄)之后的各时间点测算,中 DHA 含量的食物组,幼犬血清 DHA 浓度明显高于低 DHA 含量组。

饮食干预前,各组间的血清  $V_E$  浓度和整个血液中的牛磺酸浓度无显著性差异;在之后进行的各时间点测算,除 12 周龄的中 DHA 含量的食物组幼犬牛磺酸浓度外,其余时间点,高 DHA 含量的食物组幼犬比低 DHA 含量和中 DHA 含量的食物组幼犬,其  $V_E$  和牛磺酸浓度明显要高。基线(7 周龄)之后的各时间点测算,中 DHA 含量的食物组幼犬,其血清  $V_E$  浓度比低 DHA 含量食物组幼犬明显更高;最后,测算 24~36 周龄幼犬血液中的牛磺酸,中 DHA 含量食物组的浓度明显高于低 DHA 含量食物组的浓度。

### 2.2 狂犬病毒接种的免疫学反应结果

在接种狂犬病病毒疫苗后第 1 和第 2 周,其抗狂犬病病毒的抗体滴度血清反应,高 DHA 含量食物组幼犬分别(12.4 和 13.7 IU/mL)明显高于低 DHA 含量(1.5 和 3.7 IU/mL)和中 DHA 含量(2.4 和 3.5 IU/mL)食物组幼犬;然而,在接种  $\geq 4$  周后,所有指标无显著性差异。

### 2.3 骨及软骨组织增长的血清学标志分析结果

各组之间在基线的各时间点,血清骨碱性磷酸酶(BALP)活性没有明显不同;然而,在随后进行的各时间点测算,高 DHA 含量和中 DHA 含量食物组比低 DHA 含量食物组,幼犬有明显更低的血清骨碱性磷酸酶(BALP)活性。检测的高 DHA 含量和中 DHA 含量食物组幼犬之间的该指标可变量无显著性差异。在基线和其他任何时间点到 36 周龄,3 组幼犬之间的血清中 II 型软骨组织蛋白合成浓度无显著性差异;但在 36 和 52 周龄时,高 DHA 含量食物组幼犬,其蛋白浓度明显低于低 DHA 含量食物组幼犬;52 周时,中 DHA 含量食物组比低 DHA 含量食物组,其幼犬蛋白浓度明显要低。在任何时间点,各组幼犬的血清中,前胶原交联氨基端肽、脱氧吡啶酚总含量、吡啶酚、骨钙素、胶原交联羧基末端肽的浓度无显著性差异。

### 2.4 DEXA 数据分析结果

除了 4 月龄在中 DHA 含量食物组和高 DHA 含量食物组,其幼犬体脂不同外,测量的其他 DEXA

数据可变量(体脂、瘦体重、骨含量、骨密度),在各组间无显著性差异。另外,当被测值在基线与 12 月龄相比时,任何一个这些可变量也无显著性差异。

### 2.5 视网膜电图(ERG)数据分析结果

对 ERG 实验测算的可变量所有显著影响时间做了记录;各组间出现显著性差异的时间:ERG b-波振幅峰值的  $1.2 \log \text{ cd}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ 暗适应闪光刺激时间,发生在 4、6、12 月龄; $0 \log \text{ cd}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ 暗适应闪光刺激时间,发生在 6 月龄。b-波振幅峰值测量的两个强度具有按时间分组的显著交互效应。幼犬 b-波振幅峰值的两个强度,高 DHA 含量和中 DHA 含量食物组比低 DHA 含量食物组明显更高;而高 DHA 含量和中 DHA 含量食物组之间检测的数据无显著性差异。

幼犬血清中 DHA 浓度和 ERG b-波振幅峰值的  $1.2 \log \text{ cd}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ 暗适应闪光刺激时间,在所有时间点有显著相关性( $P < 0.001$ ;  $r^2=0.21$ ),监测的任何其他 ERG 数据可变量(暗视反应、a-波振幅、潜伏期、闪光融合)在各组间无显著性差异。

### 2.6 认知功能测验结果

认知学习评估和经过 T 形迷宫与 TGTA 实验所做的短时记忆测试结果汇总如下(表 1~2)。

表 1 8 到 13 周龄的 48 只犬在 T 形迷宫试验时,其位置任务、反转任务错误选择次数和获得反转次数的均数 mean  $\pm$  标准误 SEM 统计

食物组	位置任务错误次数	反转任务错误次数	获得反转次数
低-DHA	2.5 $\pm$ 1.2*	16.8 $\pm$ 1.6*	6.8 $\pm$ 0.4*☆
中-DHA	2.9 $\pm$ 1.0*	11.3 $\pm$ 1.4☆	6.6 $\pm$ 0.2*
高-DHA	3.4 $\pm$ 1.3*	9.5 $\pm$ 1.4☆	7.7 $\pm$ 0.4☆

\*☆同一列中数值,标有不同上标者,通过最小二乘均数估计,在各组间差异显著。

表 2 44 到 51 周龄的 48 只犬在地标识别任务试验中,错误选择次数的均数 mean  $\pm$  标准误 SEM 统计

食物组	地标识别任务			全部(综合)
	0	1	2	
低-DHA	28.5 $\pm$ 3.6*☆	36.8 $\pm$ 3.9*	12.4 $\pm$ 1.7*☆	25.9 $\pm$ 2.5*
中-DHA	32.2 $\pm$ 2.4☆	38 $\pm$ 3.9*	14.3 $\pm$ 1.4☆	28.2 $\pm$ 2.5*
高-DHA	21.9 $\pm$ 3*	27.7 $\pm$ 3.8*	9.2 $\pm$ 1.3*	19.6 $\pm$ 2.5☆

\*☆同一列中数值,标有不同上标者,通过最小二乘均数估计,在各组间差异显著。

1)T 形迷宫试验结果。各组的位置学习任务试验显示无显著差异,但对各组反转学习任务则具有显著影响;高 DHA 含量和中 DHA 含量食物组,其幼犬反转任务的平均错误次数明显低于低 DHA 含

量食物组;和最初的位置任务学习相比较,对获得反转任务错误次数(位置对比反转)的增加有明显的影 响。另外,表现有按组分配任务的显著交互效应。在重复反转任务测试期间获得的成功反转次数表明:高 DHA 含量食物组比中 DHA 含量食物组,幼犬明显获得更多的反转;但在高 DHA 含量组和低 DHA 含量组之间反转次数无显著性差异( $P=0.10$ )。

2)TGTA 试验结果。简单的物体辨别任务,在各组间无显著性差异。此外,通过对幼犬血清 DHA 浓度与简单的物体辨别结果联系的回归分析,测算值也无显著性差异。根据方案标准,确定正确选择的任一两个单数辨别之间,没有明显的组间影响;在 27~33 周龄进行的对比辨别测试,使用最大对比度的图像评估时,其分离分析法显示:高 DHA 含量食物组比中 DHA 含量(72.1 ± 11.7)与低 DHA 含量(72.2 ± 11.2)食物组,幼犬有更好的表现(平均 ± SEM 误差次数,42.8 ± 8.6)。血清 DHA 浓度与最大对比辨别误差评分之间,重复的回归分析显示有显著性关系( $P < 0.01$ ;  $r^2=0.21$ )。在延迟-非配对位置(DNMP)的短时记忆功能试验中,所有幼犬成功完成了获取信息阶段的任务,组间监测值无显著影响;组间的记忆阶段评估,监测值无显著性差异。但结合地标识别能力任务 0、1、2 的误差分析,组间出现显著性差异;分析任务误差表明,各组间幼犬表现的地标识别能力任务 2 比任务 0 和 1,误差明显更少,对任务测试结果影响显著。分离分析法显示:在任务 0 和 2 的试验中,高 DHA 含量食物组比中 DHA 含量食物组,其幼犬的误差更少。但与低 DHA 含量食物组比较,所有监测值无显著性差异。

### 2.7 心理活动评估结果

在具有圆型开孔图样的层合板障碍物躲避试验中,分析认为:依据年龄和试验的不同有显著交互效应,在任何时间点,各组之间的监测值没有显著影响;不同试验间的显著影响显示:不同训练课之间,幼犬对完成任务需要的时间在试验 1 和试验 10 之间总体呈减少趋势。在 3、6、12 月龄,侧侧运动的障碍物躲避试验分析结果显示:不同组的同龄幼犬有显著交互效应;每个时间点的分离法比较显示:在 3 月龄,高 DHA 含量食物组,幼犬完成此过程的时间(平均值 ± SD,3.2 ± 0.1 s)比中 DHA 含量食物组明显要少(5.6 ± 1.1 s);但高 DHA 含量食物组与低 DHA 含量食物组之间,其时间无显著性差

异(4.2 ± 0.8 s)。在 6 月龄,低 DHA 含量食物组(平均值 ± SD,5.5 ± 0.8 s)比高 DHA 含量食物组(3.6 ± 0.3 s),幼犬完成此过程时间明显更多。尽管数值小,但高 DHA 含量食物组比中 DHA 含量食物组(6.6 ± 3.1 s),其时间没有明显缩短;在 12 月龄,各组间进行的该项任务试验,监测值无显著性差异。

## 3 讨 论

过去,充足营养被定义为:在日粮中,按要求的浓度补充另外成分时,为达到选定理想结果的生理学参数变化,而提供的营养需求量。以前的营养学研究,是使用生长期动物和成年动物生殖能力的最大增长量,作为充足营养的确定因素。现在的定义,则是按照多于传统确定的最小需要量浓度,除成长发育(如体格发育、免疫学反应、认知功能)需求外,为获得最大生理学结果而增加另外成分使用的营养量。例如,使用抗氧化剂可通过细胞多步骤的复杂网络,减少自由基对机体的影响。该步骤要求在细胞网络的每个节点有重复性防御,以取得系统的最大化反应。另外,超生理学剂量  $V_E$  的功能显示,能延缓阿尔茨海默氏病病人的发病过程。基质复杂的抗氧化剂,据报道能延缓老龄犬认知能力的下降。

本报告支持这个假设:即由美国饲料质量委员会推荐的,高于最小日粮的含有特殊营养浓度的强化复合食物,能提高成长健康幼犬的特殊生理需求。目前的研究中,比格幼犬在断奶(8 到 52 周龄)后,饲喂 3 种食物(2 种是低和中 DHA 含量的经济类,另 1 种是高 DHA 含量的非经济类)。这些食物,除含有被认为能增强学习、记忆、视力发展(胆碱、来自鱼油的 DHA 成分、 $V_E$ [DL-a- $V_E$  标准品]、牛磺酸、左旋肉碱)和免疫学功能( $V_E$ )以及调整氧化应激功能( $V_E$ )的不同浓度营养外,有同样的组分分析结果。高 DHA 含量食物比另外 2 种经济类食物含有更高的左旋肉碱、 $V_E$ 、胆碱、牛磺酸浓度;中 DHA 含量食物比低 DHA 含量食物含有更高的  $V_E$  和牛磺酸浓度,而低 DHA 含量食物比中 DHA 含量食物含有更高的胆碱浓度。

本报告认为:高 DHA 含量食物比中和低 DHA 含量的两类食物有更多益处。通过复杂背景建模方法,对特殊食物的多元回归分析显示:DHA 的血清浓度与对比辨别测试和视网膜功能(ERG b-波振

幅峰值)有正相关性。

犬在出生后的最初 4 周,犬脑的发育总体相当快,接近成熟则放慢。就目前所知,日粮对形态学变化的影响,从未在犬体做过试验。然而在母犬孕期日粮中,增加富含 n-3 脂肪酸鱼油的营养,可增强以后幼犬的学习能力以及 ERG 监测中反映的视网膜的功能。目前的研究中,通过采用对成年犬广泛使用的试验,对幼犬初生第一年的认知(视力辨别和学习)、记忆、心理活动能力进行了分析;通过这些试验,评估了幼犬断奶后试验食物的影响和 ERG 监测的结果。

据报道,在母犬怀孕和泌乳期以及幼犬断奶前,补充富含 DHA 的鱼油食物,可改善幼犬的训练反应能力,也认为是改善了认知发育能力。

目前的研究显示:幼犬断奶后,日粮中补充富含 DHA 鱼油的食物,正如一系列试验测试的一样,对认知能力有积极影响。值得注意的是,DHA 成分的作用实际上也是鱼油中其他营养成分(二十碳五烯酸)的作用;正因为如此,评估的 3 种食物中 DHA 的含量被认为反映了这些食物中的鱼油含量。

8~13 周龄幼犬进行的 T 形迷宫试验结果证明:反转任务和额叶功能有关的学习任务,在高和中 DHA 含量的食物组比低 DHA 含量食物组,其幼犬有明显更少的误差。进一步的重复反转任务试验评估认为:高 DHA 含量食物组幼犬比中 DHA 含量食物组幼犬对该任务表现更好,但比较低 DHA 含量食物组幼犬没有积极的表现( $P=0.10$ )。

27~33 周龄的对比辨别试验和 44~51 周龄的地标识别能力试验,像 T 形迷宫试验一样有相似的总体结果。因此认为,断奶后早期学习差异的鉴别,在 1 周龄时仍可测试。经过多元回归分析最大的对比辨别数据,也显示了在所有时间点,DHA 血清浓度间的显著联系和任务表现的改善(误差更少),出现了认知结果对各组影响的非一致性。这也许是因为在每个时间点,幼犬对学习任务和存在差异。多种因素可以影响认知结果(如不连续性观察因素等)。尽管存在不连续性,但在各个年龄段,饲喂较高 DHA 含量鱼油的食物比 DHA 含量少的食物,其幼犬对重复认知任务的表现自始至终更好。从目前进行的各类认知功能试验,能够得出完整的合理定论:给断奶后的幼犬饲喂富含鱼油的强化食物与神经认知发育有关,即与增加 DHA 血清浓度

有关。但也应谨慎地对试验食物间比较的结果下结论,除了 DHA 成分外,也不能排除对牛磺酸、 $V_E$ 、左旋肉碱、另外的脂肪酸,以及其他营养成分存在观察差异的可能。

乙酰左旋肉(毒)碱在人体和小鼠有延缓认知下降过程的积极作用,因为高 DHA 含量食物有最高浓度的乙酰左旋肉(毒)碱,也许这是已描述过的该组(高 DHA 含量食物组)幼犬能改善认知评分的原因。转基因小鼠的代谢组学研究认为:患有类似阿尔茨海默氏病的病例,其大脑组织中几种代谢物(包括牛磺酸以及以卵磷脂结合的胆碱)的含量浓度降低,据此可以认为,这些成分的替代物也能增强认知功能。事实上,包含复杂基质营养(乙酰左旋肉[毒]碱、甘氨酸胆碱、DHA、磷脂酰丝氨酸)的日粮,对小鼠可降低细胞应对氧化应激的能力,改善认知表现功能。

过去的研究中,为实现食物中  $\alpha$ -亚麻酸和长链多不饱和脂肪酸(ALA:LCPUFA)比率的多变性富集,便于将该转基因食物饲喂给怀孕和泌乳期的母犬以及断奶后 6 周的幼犬,要将比率从低到低(0.14%:0.06%)调控到低到高(0.2%:11.6%)甚至高到低(6.8%:0.14%)。过去研究中的低  $\alpha$ -亚麻酸和低长链多不饱和脂肪酸食物,大体相当于目前研究中的低 DHA 含量的食物。过去的研究结果显示:添加有 ALA 和 LCPUFA 的日粮也许对 12 周龄幼犬 ERG 测试中的 a-波振幅反应和潜伏期有积极作用;同时,目前研究中也观察到细微差别:仅添加 ALA 的日粮,不可能像添加富含 DHA 的鱼油食物那样有积极作用。该差别仅仅在 4 到 6 月龄进行暗适应 ERG 测试,在特殊的闪光刺激强度( $1.2 \text{ log cd}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ )b-波波幅记录中,发现有显著的组间作用(即,高和中 DHA 含量食物组比低 DHA 含量食物组,其幼犬监测值增加)。目前研究的中 DHA 含量食物 DHA 浓度类似于过去另外报道的低到中的浓度。过去报道的研究者检测了 ALA:LCPUFA 比率的变量,对 ERG 反应没有影响。比较过去在 12 周龄的单一评估,目前的研究加强了重复监测,以评估在多个年龄段不同食物影响的连续性;重点突出饲喂高和中 DHA 含量食物组幼犬显示的积极结果。同时看到,比较过去研究中描述有积极作用的 ALA:LCPUFA 低到高比率的食物,在目前的研究中,高 DHA 含量食物具有 4 倍 ALA 浓度的含量(相

当于 DHA 浓度含量的 1/3)。ERG 暗适应 b- 波波幅增大,说明改善了视网膜内层细胞的活力,提高了在弱光和暗环境下的视觉功能。目前的研究表明,当评估所有时间点监测值时,发现 DHA 血清浓度与 ERG 暗适应 b- 波波幅峰值之间有显著的相关性。过去报道的在发育期反映犬视网膜外层细胞活力的 a- 波振幅的差异,通过在怀孕期添加含有 DHA 的 N-3 长链脂肪酸母犬日粮得到改善。过去和目前研究中出现的差异,可能与饲喂 DHA 食物的时间与数量有关;但在这 2 个(过去和目前)研究实例中,日粮 DHA 浓度对发育的犬 ERG 结果有明显积极影响。

本文的研究报告显示:不同试验营养组的幼犬,在注射抗狂犬病病毒疫苗 2 周到不超过 4 周内,其免疫学反应有所不同;高 DHA 含量食物组(也即有最高浓度  $V_E$  和牛磺酸的组)比较另 2 个组,其幼犬的测试反应有明显改善。血清中  $V_E$  浓度的增加与老年人接种疫苗的体液免疫反应改善有关。在成年犬,饲喂包括复杂基质氧化剂在内的食物,表明能比未强化的食物有更快的增强抗体的过程。目前研究的结果也许与食物的复杂性有关,而不是与单个营养的总量有关。

目前研究中,通过对 DEXA 数据评估,试验营养组对骨格发育的静态衡量没有显著作用。低 DHA 含量食物组的犬明显有最大的体重和 BMD 值;但用 DEXA 数据对体重做回归分析时,作为混杂因素的变量之间有显著的相关性。当每个犬的 DEXA 监测值以体重平均时,各组之间得出的比值没有明显差异。

相比较而言,在断奶后所有时间点,反映骨基质合成分析指标的血清 BALP 活性,在低 DHA 含量食物组幼犬比中和高含量食物组幼犬明显更高。在 52 周龄,反映软骨合成指标的 II 型软骨组织蛋白合成血清浓度,低 DHA 含量食物组幼犬明显高于中和高含量食物组幼犬。日粮微量营养素的变化对骨合成的其他标记以及其他组织的退化也有不同影响;值得一提的是,含有 n-3 脂肪酸的食物对年轻人有增强 BMD 的作用;所以,降低 n-6 到 n-3 脂肪酸的比率对男女两性的 BMD 增强有关系。反之,增强日粮的氧化脂质含量对生长的犬骨形成和体格发育有负面影响。另外,在家禽,增强日粮  $V_E$  的含

量与加快骨小梁形成和生长板软骨的过程有关。目前研究结果认为;在断奶后饲喂不同的日粮对幼犬成长指标有关(在其他动物的试验结果也相同)。这个影响也许复杂,需要进一步研究,以确定成年犬在生长期特殊营养有什么作用,以及影响的程度如何和最终有何改变。此外,对体重的影响也要评估,就像 DEXA 数据分析一样,以保证出现这些不同是因为营养的影响,而不是机械刺激。

目前研究中,在 3~6 月龄,给 T 形迷宫试验增加侧侧障碍运动项目时,高 DHA 含量食物组比低 DHA 含量食物组,在 2 个时间点,其幼犬有更好的测试完成时间;在 3 月龄,高 DHA 含量食物组比中 DHA 含量食物组有更好的测试效果。这个运动过程的改善可能与补充认知过程营养的不同有关,很可能是神经认知发育和视觉功能的增强,改变了穿越障碍物的运动能力和方向改变后寻觅下一个目标物的能力。肌力、软骨组织强度、心排量等额外生理因素和犬灵活性对该运动的结果也有影响。有趣的是:通过 DEXA 数据测试,尽管 3 个试验营养组的身体成份明显不同,但根据侧侧障碍运动任务的心理活动表现,在发育期的 2 个年龄段各组间有明显不同,高 DHA 含量食物组有更好的表现。

目前的研究最终认为:各组间 DNMP 任务(评估短时记忆为目标)的测试没有差异。奇怪的是,在其他动物试验报道中,能延长记忆保持的牛磺酸、 $V_E$  等营养的浓度,在本试验的高 DHA 含量食物组幼犬中比另外 2 个食物组幼犬中浓度更高(也许在幼年动物中,视觉线索辨别记忆功能是最大的;或者这种改善是对视觉记忆能力受损的动物进行日粮改变所致;又或者,所有食物中补充的营养已经满足了成长幼犬记忆功能需求的足够数量)。

本研究的结果支持这个推断:饲喂富含加强神经发育(DHA、 $V_E$ 、牛磺酸),提高免疫功能( $V_E$ )和对抗氧化应激能力( $V_E$  和牛磺酸)的营养食物,能改善各种试验结果(辨别学习、心理活动能力、视网膜功能、抗狂犬病病毒疫苗的免疫学反应)。当然,如果试验的营养种类有别或者搭配的营养不同,因为食物的复杂性,在目前的研究中,可能测试到的差别也不同。不管怎样,血清 DHA 浓度与对比辨别学习、ERG 测试的视网膜功能有显著相关性。总体认为:这些营养是幼犬神经认知发育的主要成分。