

維生素 E 對點帶石斑稚魚的頭腎白血球免疫反應之影響

吳豐成* · 陳敏隆 · 張丁仁 · 丁雲源

行政院農業委員會水產試驗所 海水繁養殖研究中心

摘 要

本研究以添加不同濃度的維生素 E (all-rac- α -tocopherol) (0、50、500 和 5000 mg/kg) 的四種飼料分別餵飼平均體重 10.2 ± 0.3 g 的點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 稚魚，以探討飼料中維生素 E 的含量對石斑稚魚頭腎白血球的吞噬、呼吸猝發 (respiratory burst) 和白血球增生等活性之影響。結果顯示，攝取添加維生素 E 飼料的各組試驗魚，其成長和頭腎白血球的吞噬和增生活性等均顯著優於未添加維生素 E 者，但存活率則不受飼料維生素 E 影響。飼料添加維生素 E 500 mg/kg DW (dry weight) 飼料的試驗魚，其白血球的吞噬活性顯著高於其他試驗組者 ($p < 0.05$)，然頭腎白血球的呼吸猝發活性則不受維生素 E 影響。當以 Con-A、PHA-P 或 LPS 誘導白血球，攝取含高量維生素 E 飼料 (500 或 5000 mg/kg DW) 的試驗魚之增生活性顯著高於攝取不添加維生素 E 試驗組者。因此，攝取 500 mg/kg DW 維生素 E 可有效地促進石斑魚的白血球之吞噬和增生活性，但不會影響呼吸猝發活性。

關鍵詞：點帶石斑、維生素 E、吞噬活性、呼吸猝發活性、白血球增生作用。

前 言

維生素 E 為硬骨魚類的必需營養素 (Halver, 2002)，魚類之維生素 E 最適需求量約為 15 ~ 100 mg/kg DW (Watanabe *et al.*, 1970; Hung *et al.*, 1981; Cowey *et al.*, 1983; Roem *et al.*, 1990)，且其需求量隨著魚種和飼料中高度不飽和脂肪酸的含量而異 (Cowey *et al.*, 1981; Hung *et al.*, 1981)。當以含 3 % 玉米油之飼料餵飼歐利亞吳郭魚 (*Oreochromis aureus*)，其維生素 E 需求量为 15 mg/kg DW，但將玉米油提高至 6 %，其維生素 E 需求量則增加至 25 mg/kg DW (Roem *et al.*, 1990)。同樣地，把飼料中的鯪魚油添加量從 15 % 減少至 7.5 %，虹鱒 (*Salmo gairdneri*) 的維生素 E 需求量則自 100 mg/kg DW (Watanabe *et al.*, 1970) 降低至 24 mg/kg DW (Hung *et al.*, 1981)。維生素 E 為生物體組織內最主要的脂溶性抗氧化劑。在嗜氧代謝或

曝露於輻射環境下，生物體會產生一些包括超氧子、過氧化物或單氧離子等活性氧化物 (Simic, 1981; Mascio *et al.*, 1991)，這些活性氧化物極易與 DNA、蛋白質、醣類和脂質等反應，致使正常的細胞代謝或構造受損，甚至發生細胞性損害效應 (Mascio *et al.*, 1991; Niki *et al.*, 1991)。細胞膜上含有豐富的多元不飽和脂肪酸和不飽和磷脂質，而維生素 E 可提供其酚氫原子 (phenolic hydrogen atom) 至磷脂質的不飽和脂酸醯基，以清除游離基，進而保護細胞膜免於因過氧化而受損 (Simic, 1981; McCay, 1985; Mascio *et al.*, 1991; Packer, 1991)。

維生素 E 除具抗氧化功能外，也可調節哺乳動物的免疫功能 (Bendich *et al.*, 1986; Bendich, 1990)。當維生素 E 缺乏時，會抑制魚類的免疫功能 (Blazer and Wolke, 1984; Hardie *et al.*, 1990)。如在飼料中補充維生素 E 可促進虹鱒對免疫原的細胞性反應 (Velhac *et al.*, 1991)、增加對細菌的抗病能力 (Furones *et al.*, 1992) 以及提高腸白血球的吞噬能力 (Clerton *et al.*, 2001)，另維生素 E 也影響大西洋鮭 (*Salmo salar*) 的吞噬細胞之呼吸猝

*通訊作者 / 台南縣七股鄉三股村海埔四號，TEL: (06) 788-0461; FAX: (06) 788-1597; e-mail: wufc3480@ms11.hinet.net

發活性 (Hardie *et al.*, 1990); 然而河魴 (*Ictalurus punctatus*) (Wise *et al.*, 1993)、虹鱔 (Clerton *et al.*, 2001) 和烏鰡 (*Sparus aurata*) (Ortuno *et al.*, 2000) 等魚類的頭腎白血球之呼吸猝發活性則不受維生素 E 影響。一般而言, 促進魚類免疫反應所需要的維生素 E 濃度高於維持正常生理功能之需求, 但餵食高濃度的維生素 E 會導致魚類成長低下、紅血球濃度降低以及血容積比減少等症狀 (Bai and Lee, 1998)。維生素 E 對魚類的非特異性免疫功能調節上雖已有很多文獻, 但促進魚類免疫反應的飼料維生素 E 需求則仍相當缺乏。

石斑魚為熱帶和亞熱帶地區重要的經濟性食用魚類, 由於其食物中含大量易受氧化的高度不飽和脂肪酸, 因此飼料中需補充較高量的維生素 E, 以避免脂質被氧化; 但飼料中添加量過高或不足維生素 E 與石斑魚免疫反應的相關性仍不明瞭。因此本研究分別以不添加、添加適量、過量及高量維生素 E 等四組飼料餵飼點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 稚魚十二週, 探討飼料維生素 E 添加量對石斑魚頭腎白血球的吞噬功能和增生活性之影響, 並探討維生素 E 的營養需求。

材料與方法

一、試驗飼料

本研究使用之試驗飼料的原料組成與一般成分分析如 Table 1 所示。飼料以魚粉為單一蛋白來源, 粗蛋白含量為 51.1 g/100 g; 油脂來源包括鱈魚肝油、亞麻籽油和紅花籽油 (2:1:1; wt/wt/wt) 等天然油脂, 粗脂質含量為 13.5 g/100 g。飼料中之維生素 E (all-rac- α -tocopherol) 來源為 Rovimix E-50 SD (Hoffmann La Roche and Co. Ltd), 添加量分別為 0 mg/kg (E_0)、50 mg/kg (E_{50})、500 mg/kg (E_{500}) 和 5000 mg/kg (E_{5000}) 等四組。飼料製作時, 維生素 E 和油脂混合物經混合均勻, 隨即加入預先配製的原料, 所有飼料原料經混勻後, 加水充分攪拌成麵團狀, 最後以小型絞肉機擠製成 6 × 5 mm 的條狀飼料, 經真空冷凍乾燥後, 以真空小包裝方式儲存於 -20 °C。

二、實驗動物和成長試驗

實驗用的點帶石斑稚魚購自台南縣之民間繁

殖場, 石斑魚運至水產試驗所海水繁養殖研究中心後, 先將魚蓄養在水泥池中, 以不含維生素 E 的試驗飼料馴養。馴養二週後, 選取外觀健康和體型大小相近的石斑魚 120 尾, 經個別稱重後 (平均體重為 10.2 ± 0.3 g), 隨機放入試驗桶內進行飼育試驗。試驗共有四個飼料處理組, 每一處理組均為三重複, 每一重複各有十尾魚。養殖系統為 290 L 的黑色塑膠桶的室外開放式流水系統, 換水速率為 500 ml/min, 所有的蓄養桶均覆蓋黑色聚乙烯浪板, 以減少光照和其他緊迫干擾。試驗用海水是在漲潮時抽取大排水溝的海水儲存於水泥蓄水池中經靜置後使用。在十二週的飼育期間, 水溫和鹽度未加以人為控制, 水溫範圍為 26 ~ 31 °C, 鹽度範圍為 30 ~ 34 ppt。

Table 1 Ingredient and proximate compositions of the basal diet

	Quantity
Ingredient composition (g/kg)	
Fish meal, solvent-extracted	651.5
Corn starch	43.5
α -starch	43.5
Lipid mixture ¹	100.0
Vitamin mixture ²	40.0
Mineral mixture ³	80.0
Carboxymethyl-cellulose	30.0
α -cellulose	11.5
Proximate composition (g/100g dry diet) ⁴	
Crude protein	51.1 $\pm$ 0.6
Crude lipid	13.5 $\pm$ 0.4
Moisture	4.1 $\pm$ 0.3
Ash	10.2 $\pm$ 0.3

¹The diet contained cod liver oil, linseed oil, and safflower oil (2 : 1 : 1; wt/wt/wt).

²The vitamin mixture supplied the following (mg/kg dry diet): thiamin HCl, 60; riboflavin, 200; pyridoxine HCl, 40; nicotinic acid, 800; Ca-pantothenate, 28; inositol, 4000; biotin, 6; folic acid, 15; p-aminobenzoic acid, 400; choline chloride, 8000; cyanocobalamin, 0.09; L-ascorbic acid, 2000; menedione, 40; β -carotene, 12; and vitamin A acetate, 0.045.

³The mineral mixture supplied the following (g/kg dry diet): KCl, 5.18; $MgSO_4 \cdot 2H_2O$, 6.85; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 30.805; Ca-lactate, 19.74; Ferric citrate, 1.845; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.009; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.178; CuCl, 0.0055; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.04; KI, 0.0085; and $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0525.

⁴ $n = 16$, mean $\pm$ S.E.M.

每天固定在 08:00 ~ 09:00 投餵一次，在投餵飼料前先清除殘餌和糞便。投餌初期採過量餵食，投餵量約為體重的 5%，隨後再依前一餐的攝食反應調整其投餌量，但仍以飽食為原則。

三、血清收集和頭腎白血球之製備

所有試驗魚以 0.4% 對氨基苯酸乙酯 (benzocaine, Sigma Chem Co.) 麻醉後再取樣。

血清之收集，是從非試驗石斑魚的尾脊椎靜脈處抽取血液。每尾魚的血液樣品分別在 4℃ 下靜置 12 h，經離心 ($2800 \times g$, 15 min) 後，取其上清液 (即為血清)。所有蒐集的血清樣品經混合後，以 45℃ 水浴 30 min 不活化血清中補體的活性後，儲存於 -70℃ 下備用。

頭腎白血球懸浮液之製備方法 (Wu *et al.*, 2003)，其中白血球分離參考 Solem *et al.* (1995) 的 Percoll 密度梯度法。白血球懸浮液活細胞 (viable cell) 以錐蟲藍排除法分析，所有樣品的活細胞數量均大於 95%。

四、吞噬活性和呼吸猝發活性分析

白血球的吞噬活性分析參考 Gebran *et al.* (1992) 和 Solem *et al.* (1995) 的分析法，在 27℃ 環境下進行分析。白血球的吞噬活性為激刺試驗組培養盤孔的平均吸光值減對照組培養盤孔的平均吸光值，以每 2×10^7 細胞的 OD₆₂₀ 表示。

五、呼吸猝發活性分析

呼吸猝發活性依據的快速微量分析法 (Pick and Mizel, 1981; Lemaire-Gony *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2003)，在 27℃ 環境下，分別測定白血球的基礎呼吸猝發活性和激刺呼吸猝發活性。頭腎白血球細胞呼吸猝發活性為基礎呼吸猝發活性和激刺呼吸猝發活性間的差異程度，以每 2×10^7 細胞的 OD₆₂₀ 表示。

六、白血球增生分析

白血球細胞增生以 MTT 比色法分析 (Plumb *et al.*, 1989; Daly *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2003)，以刺激指標 (stimulation index, SI) 表示。SI 的計算公式如下：

SI = (含測試免疫原的白血球平均吸光值 / 不含免疫原的白血球平均吸光值) - 1

七、統計分析

所有成長、活存率和免疫分析等試驗數據以 means $\pm$ SEM 表示，實驗數據均以 SAS 套裝軟體 (SAS Institute, Cary, NC) 的單向變方分析 (one-way ANOVA) 檢定試驗組間是否有顯著性差異，再以特奇檢定法 (Tukey's test) 檢定處理組平均數間的顯著差異程度，顯著水準界定在 $p < 0.05$ 。

結 果

一、成長試驗

各飼料處理組間之魚體成長有顯著差異 (Table 2)，但活存率 (80.0 ~ 96.7%) 則無顯著差異。攝取不添加維生素 E 飼料組 (E₀) 的試驗魚之成長和活存率為所有試驗組中最差者 (平均增重率為 $134.0 \pm 7.6\%$ ，活存率為 $80.0 \pm 10.0\%$)，其成長顯著 ($p < 0.05$) 低於攝取任一添加維生素 E 飼料組者 ($190.5 \pm 10.0 \sim 219.8 \pm 21.0\%$)。E₅₀₀ 組之試驗魚成長最佳 (平均增重率為 $219 \pm 21.0\%$)，但與 E₅₀ 和 E₅₀₀₀ 兩試驗組間 (平均增重率分別為 206.4 ± 16.2 和 $190.5 \pm 10.0\%$) 並沒有統計差異。飼料 E₅₀₀ 飼料之石斑魚的活存率 ($96.7 \pm 5.8\%$) 高於其他試驗組者 ($80.0 \pm 10.0 \sim 93.3 \pm 5.8\%$)，但並沒有統計差異。所有試驗組之試驗魚均未發現任何文獻曾描述的表觀維生素 E 缺乏症狀。

Table 2. Weight gain and survival rate of juvenile orange-spotted grouper fed diets with different vitamin E levels for 12 wk^{1, 2}

Diet ³	Weight gain (% initial weight)	Survival rate (%)
E ₀	134.0 ± 7.6^b	80.0 ± 10.0
E ₅₀	206.4 ± 16.2^a	96.7 ± 5.8
E ₅₀₀	219.8 ± 21.0^a	93.3 ± 5.8
E ₅₀₀₀	190.5 ± 10.0^a	86.7 ± 15.3

¹Values are the mean $\pm$ SEM ($n = 3$ replicates of 10 fish each, initially); values in the same column with the same superscript letter do not significantly differ ($p > 0.05$).

²Initial weight: 10.2 ± 0.3 g.

³E_x represents the vitamin E (E), and x indicates the concentration of vitamin E (0, 50, 500, and 5000 mg/kg DW).

Table 3 Phagocytic activity (Optical density, OD_{620nm}) and respiratory burst activity (OD_{620nm}) of head-kidney leucocytes¹

Diet ²	Phagocytic activity			Respiratory burst activity		
E ₀	1.073	±	0.093 ^c	0.310	±	0.012
E ₅₀	1.304	±	0.079 ^b	0.339	±	0.031
E ₅₀₀	1.470	±	0.042 ^a	0.337	±	0.024
E ₅₀₀₀	1.387	±	0.125 ^b	0.318	±	0.057

¹Values are the mean ± SEM ($n = 9$); values in the same column with the same superscript letter do not significantly differ ($p > 0.05$).

²E_x represents x concentration of vitamin E.

Table 4 Stimulation index depicting the proliferation stimulation with Con A (25 µg/ml), PHA-P (10 µg/ml) or LPS (200 µg/ml) of head-kidney leucocytes¹

Diet ²	Stimulation index ³					
	Con A		PHA-P		LPS	
E ₀	0.307	± 0.009 ^c	0.228	± 0.012 ^b	0.325	± 0.035 ^c
E ₅₀	0.355	± 0.010 ^{bc}	0.301	± 0.062 ^{ab}	0.481	± 0.040 ^b
E ₅₀₀	0.393	± 0.018 ^a	0.376	± 0.013 ^a	0.525	± 0.018 ^a
E ₅₀₀₀	0.385	± 0.017 ^{ab}	0.381	± 0.044 ^a	0.492	± 0.042 ^{ab}

¹Values are the mean ± SEM ($n = 9$); values in the same column with the same superscript letter do not significantly differ ($p > 0.05$).

²E_x represents x concentration of vitamin E.

³Stimulation index = (mean OD_{600nm} of leucocyte wells with test mitogen/mean OD_{600nm} of leucocyte wells without mitogen) – 1.

二、飼料維生素 E 含量對白血球吞噬和呼吸猝發活性之影響

飼料維生素 E 含量對石斑魚頭腎白血球的吞噬活性有顯著影響，但此一顯著關係並不存在於白血球的呼吸猝發活性 (Table 3)。餵飼不添加維生素 E 飼料 (E₀) 之試驗魚的白血球吞噬活性 (1.073 ± 0.093) 為所有試驗組中最差者，顯著 ($p < 0.05$) 低於攝取任一添加維生素 E 飼料者 (1.304 ± 0.079 ~ 1.470 ± 0.42)。所有試驗組間的試驗魚之白血球吞噬活性，以 E₅₀₀ 組者為最高，且顯著高於其它試驗組。各試驗組間的白血球呼吸促發活性則沒有統計差異 ($p > 0.05$)，以 E₅₀ 組的試驗魚最高 (0.339 ± 0.031)，而以 E₀ 組者為最低 (0.310 ± 0.012)。

三、飼料維生素 E 含量對白血球增生作用之影響

石斑魚的頭腎白血球增生作用顯著受飼料維生素 E 影響 (Table 4)。攝取不添加維生素 E 的 E₀ 飼料之石斑魚，其白血球在經 Con-A、PHA-P 或 LPS 刺激所產生的白血球增生活性為所有試驗組中最低者 (分別為 0.307 ± 0.009、0.228 ± 0.012 和 0.325 ± 0.035)，且其經 LPS 刺激所產生的增生活性顯著低於任一餵飼添加維生素 E 飼料 (E₅₀、E₅₀₀ 和 E₅₀₀₀) 之試驗組者 (分別為 0.481 ± 0.040、0.525 ± 0.018 和 0.492 ± 0.042)，但經 Con-A 和 PHA-P 誘導所產生的增生活性則顯著低於餵飼添加高量維生素 E 飼料 (E₅₀₀ 和 E₅₀₀₀) 之試驗組者。對以 Con-A 或 LPS 誘導後所產生的增生活性而言，

餵飼 E_{500} 飼料的試驗魚白血球之增生活性 (分別為 0.393 ± 0.018 和 0.525 ± 0.018) 最高, 顯著高於 E_{50} 和 E_0 試驗組者, 但與餵飼添加最高量維生素 E 飼料 (E_{5000}) 試驗組 (分別為 0.385 ± 0.017 和 0.492 ± 0.042) 並沒有統計差異。對以 PHA-P 刺激白血球的增生活性而言, 餵飼添加最高量維生素 E 的 E_{5000} 飼料之試驗魚者 (0.381 ± 0.044) 為最高, 顯著高於餵飼不添加維生素 E 飼料者 (0.228 ± 0.012), 但與其它任一餵飼添加維生素 E 之試驗組者間 (E_{50} 和 E_{500}) (分別為 0.301 ± 0.062 和 0.376 ± 0.013) 則沒有統計差異。

討 論

飼料添加維生素 E 顯著影響點帶石斑稚魚的成長。本試驗發現當飼料中添加 50 mg/kg DW 維生素 E 可促進其成長, 且顯著優於不添加維生素 E 飼料者。維生素 E 為魚類必需的營養素, 其需求量約為 15 ~ 100 mg/kg DW (Watanabe *et al.*, 1970; Hung *et al.*, 1981; Cowey *et al.*, 1983; Roem *et al.*, 1990), 維生素 E 缺乏時會出現成長低下、高死亡率、貧血、腹水、凸眼、紅血球不成熟及大小不等、肌肉萎縮和體水分升高等症狀 (Halver, 2002)。雖然本試驗並未觀察紅血球的性狀及魚體水分等, 但結果發現最低成長出現在攝取不添加維生素 E 的試驗魚, 且顯著低於其它攝取維生素 E 的試驗組者, 然而各添加維生素 E 試驗組間之存活率並無統計差異, 在試驗期間除成長低下外, 沒有發現任何維生素 E 缺乏或過多的症狀。由於本試驗所使用的油脂原料中含少量的維生素 E, 此一少量維生素 E 似乎可防止大部分表觀的維生素 E 缺乏症。因此點帶石斑稚魚對維生素 E 有營養需求, 且飼料中添加 50 mg/kg DW 的維生素 E 可滿足其需求。

雖然本研究未分析血清中維生素 E 的濃度, 但魚類血清中維生素 E 濃度與其攝取量間具正相關 (Ortuno *et al.*, 2000)。維生素 E 影響哺乳動物 (Panush and Delafuente, 1985) 和魚類 (Blazer, 1992; Waagboe, 1994) 的細胞性免疫反應。本研究發現飼料添加維生素 E 可促進點帶石斑魚頭腎白血球的吞噬活性, 但無法影響白血球的呼吸猝發活性。本實驗顯示餵飼添加維生素 E 飼料的試驗魚之吞噬活性均顯著高於不添加維生素 E 者, 但

最高的吞噬活性則出現在攝取添加 500 mg/kg DW 維生素 E 的試驗魚, 且顯著高於其它攝取添加 50 或 5000 mg/kg DW 維生素 E 的試驗組。此結果顯示, 飼料添加 500 mg/kg 維生素 E 可有效促進石斑魚的頭腎白血球的吞噬活性, 但添加過量的維生素 E 經長期攝食, 會導致吞噬活性降低; 而維生素 E 添加量不足時, 似乎無法有效促進吞噬活性達到較佳狀態。因此, 飼料中適量添加維生素 E 有利於石斑魚的頭腎白血球吞噬活性。類似的結果, Ortuno *et al.* (2000) 以含 1200 mg/kg DW 維生素 E 之飼料餵養烏鰡 45 天後, 發現烏鰡頭腎白血球之吞噬活性顯著優於攝取不含或含 600 mg/kg DW 維生素 E 飼料者; 但餵飼含 1800 mg/kg DW 維生素 E 者則與上述兩試驗組無統計差異。另攝取添加 28 或 295 mg/kg DW 維生素 E 飼料的虹鱒, 其腸道白血球之吞噬活性顯著高於攝取不添加維生素 E 者 (Clerton *et al.*, 2001)。

頭腎白血球的呼吸猝發活性不受維生素 E 影響也見於河魴 (Wise *et al.*, 1993)、烏鰡 (Ortuno *et al.*, 2000) 和虹鱒 (Clerton *et al.*, 2001) 等魚類。吞噬細胞在殺死吞噬泡內的病原體過程中牽涉到需氧與不需氧等兩種殺噬機制 (Secombes and Fletcher, 1992), 其中需氧的殺噬機制是透過呼吸猝發作用產生如超氧離子、過氧化物和活性單氧離子等活性氧化物來殺死病原。Wise *et al.* (1993) 以 PMA 刺激河魴的吞噬細胞, 發現吞噬細胞產生的過氧化物不受飼料維生素 E 含量影響。同樣的結果也見於虹鱒 (Clerton *et al.*, 2001) 和烏鰡 (Ortuno *et al.*, 2000)。相對於上述結果, Montero *et al.* (1996) 發現攝取維生素 E 缺乏的飼料烏鰡, 烏鰡的血液嗜中性白血球之過氧化物產量會減少; 攝取含少量維生素 E 和硒 (分別低於 240 和 0.8 mg/kg DW) 的河魴, 會導致其吞噬細胞內的超氧離子產量降低 (Wise *et al.*, 1993); 而以維生素 E 和維生素 C 混合 (分別為 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 1 μM) 離體培養 48 小時後的烏鰡之吞噬細胞所產生的呼吸猝發活性最高, 且其呼吸猝發活性之增加僅見於維生素 E 和 C 兩者同時存在時 (Mulero *et al.*, 1998)。雖然維生素 E 影響免疫反應的機制仍不清楚, 但免疫細胞的呼吸猝發活性不受維生素 E 影響的可能原因有二, 一為維生素 E 和其他抗氧化物質的比例是否平衡 (Ortuno *et al.*, 2000), 另一為免疫細胞內的呼吸猝發產物與維生素 E 的抗氧化機制無關。

本研究結果顯示，維生素 E 顯著影響點帶石斑稚魚的頭腎白血球增生活性。本試驗發現攝取高量維生素 E 飼料 (E_{500} 和 E_{5000}) 之試驗魚，其頭腎白血球在經 Con-A、PHA-P 或 LPS 等免疫原刺激所產生的白血球增生活性均顯著高於攝取不添加維生素 E 者 (E_0)，且 E_0 試驗組魚之白血球經 LPS 誘導所產生的增生活性顯著低於任一餵飼添加維生素 E 飼料 (E_{50} 、 E_{500} 或 E_{5000}) 之試驗組者。Con-A 和 PHA-P 兩免疫原可誘導 T 淋巴細胞的增生，而 LPS 誘導可促使 B 淋巴細胞增生。因此本研究顯示，維生素 E 可促進石斑魚頭腎 B 淋巴細胞的增生，但要有效促進 T 淋巴細胞增生效能則需高量維生素 E。維生素 E 會保護人類 (Meydani *et al.*, 1990; Secombes, 1990) 和老鼠 (Meydani *et al.*, 1986; Bendich *et al.*, 1989) 之 T 和 B 淋巴細胞的免疫功能，且可促進老鼠胸腺之 T 細胞的分化和成熟 (Moriguchi *et al.*, 1993)。然而維生素 E 與魚類特異性反應之相關研究相當少，對 T 淋巴細胞的相關研究更是缺乏。本研究發現，攝取高濃度維生素 E (E_{500} 和 E_{5000}) 的試驗魚，當以 PHA-P 或 Con-A 誘導頭腎白血球，其增生活性間並沒有顯著差異，但增生活性則顯著高於不添加維生素 E 者 (E_0)，顯示維生素 E 具有促進石斑魚之 T 淋巴細胞的增生活性。在目前已發表的文獻中，尚未有任何魚種有類似的結果。本研究也發現攝取高量維生素 E 的試驗組魚 (E_{5000} 和 E_{500}) 之 B 淋巴細胞的增生活性雖沒有統計差異，但 E_{5000} 試驗組魚的增生活性低於 E_{500} 者。在少數的維生素 E 影響魚類的 B 淋巴細胞文獻曾報導，Ndoye *et al.* (1989) 以過量維生素 E 餵食虹鱒 90 天，發現可促進其抗體之產生，然缺乏維生素 E 則會致使虹鱒的抗體反應減低；但經 22 週餵飼添加高量維生素 E 飼料的虹鱒，其血清抗體反應則不受影響 (Furone *et al.*, 1992)。另 Obach *et al.* (1993) 以維生素 E (0, 40 or 300 mg/kg DW) 餵飼海鱸 (*Dicentrarchus labrax*) 35 週後，以鰻魚弧菌誘導其抗體反應，發現海鱸的免疫反應不受維生素 E 影響。這些相互矛盾的結果，可能是由於不同魚種或者高量維生素 E 長期在體內蓄積導致魚類抗體反應的負面效果或是其他機制所造成，仍待更深入的探討。

綜合本研究結果，經十二週的成長試驗顯示

維生素 E 為點帶石斑稚魚的必需營養素，且維生素 E 可促進點帶石斑魚的頭腎白血球吞噬活性和增生活性，但無法影響白血球的呼吸猝發活性。另飼料添加 500 mg/kg 維生素 E 可有效促進石斑魚的頭腎白血球的吞噬活性和增生活性。因此，點帶石斑稚魚有維生素 E 的營養需求，且飼料中添加 50 mg/kg DW 的維生素 E 已經滿足點帶石斑稚魚的營養需求；但要有效促進免疫功能，維生素 E 的添加量須高於其營養需求所需。

謝 辭

本研究經費由行政院農業委員會水產試驗所 91-AS-3.1.1-AI-A3(1) 計畫項下支助。實驗期間承蒙水產試驗所海水繁養殖研究中心同仁協助及提供寶貴意見，特此致謝。

參考文獻

- Bai, S. C. and K. J. Lee (1998) Different levels of dietary DL- α -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 161:405-414.
- Bendich, A. (1990) Antioxidant micronutrients and immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 587: 168-180.
- Bendich, A., E. Gabriel and L. J. Machlin (1986) Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. *J. Nutr.*, 116: 675-681.
- Bendich, A., E. Gabriel and L. J. Machlin (1989) Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. *J. Nutr.*, 116: 675-681.
- Blazer, V. S. (1992) Nutrition and disease resistance in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 309-323.
- Blazer, V. S. and R. E. Wolke (1984) The effects of α -tocopherol on the immune responses and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 37: 1-9.
- Clerton, P., D. Troutaud, V. Verlhac, J. Gabaudan and P. Deschaux (2001) Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immun.*, 11: 1-13.
- Cowey, C. B., J. W. Adron and A. Y. Youngson (1983)

- The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, 30: 85-94.
- Cowey, C. B., J. W. Adron, J. Murray, A. Youngson and D. Knox (1981) Tissue distribution, uptake and requirement for α -tocopherol of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets with a minimal content of unsaturated fatty acids. *J. Nutr.*, 111: 1556-1557.
- Daly, J. G., A. R. Moore and G. Olivier (1995) A colorimetric assay for the quantification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) lymphocyte proliferation. *Fish and Shellfish Immun.*, 5: 265-273.
- Furones, M. D., D. J. Alderman, D. Bucke, T. C. Fletcher, D. Knox and A. White (1992) Dietary vitamin E and the response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. *J. Fish. Biol.*, 41: 1037-1041.
- Gebran, S. J., E. L. Romano, H. A. Pons, L. Cariani and A. N. Sonayo (1992) A modified colorimetric method for the measurement of phagocytosis and antibody-dependent cell cytotoxicity using 2,7-diaminofluorene. *J. Immunol. Methods*, 15: 255-260.
- Halver, J. E. (2002) The vitamin. In *Fish Nutrition* (J. E. Halver and R. W. Hardy eds.), Academic Press, San Diego, CL, U.S.A., 62-141.
- Hardie, L. J., T. C. Fletcher and J. C. Secombes (1990) The effect of vitamin E on the immune responses of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 87: 1-13.
- Hung, S. S. O., C. Y. Cho and S. J. Slinger (1981) Effect of oxidized fish oil, DL- α -tocopheryl acetate and ethoxyquin supplementation on the vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed practical diets. *J. Nutr.*, 111: 648-654.
- Lemaire-Gony, S., P. Lemaire and A. L. Pulsford (1995) Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.*, 31: 297-313.
- Mascio, P. D., M. E. Murphy and H. Sies (1991) Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 194S-200S.
- McCay, P. B. (1985) Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Annu. Rev. Nutr.*, 5: 323-340.
- Meydani, S. N., M. Meydani, C. P. Verdon, A. A. Shapiro, J. B. Blumberg and K. C. Hayes (1986) Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E_2 synthesis and enhances the immune response of age mice. *Mech. Ageing Dev.*, 34: 191-201.
- Meydani, S. N., P. M. Barklund, S. Liu, M. Meydani, R. A. Miller, J. G. Cannon, R. Morrow, R. Rocklin and J. B. Blumberg (1990) Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52: 557-563.
- Montero, D., L. Tort, M. S. Izquierdo, J. Socorro, L. Robaina, J. M. Vergara and H. Fernandez-Palacios (1996) Effect of α -tocopherol and n-3 HUFA deficient diets on blood cells, selected immune parameters and proximate body composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). In *Modulators of Immune Response – The Evolutionary Trail* (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, C. J. Bayne, C. J. Secombes, J. L. Zelikoff, L. Twerdok and D. P. Anderson eds.), SOS Publ., Fair Haven, NJ, U.S.A., 251-266.
- Moriguchi, S., H. Miwa, M. Okamura, K. Maekawa, Y. Kishino and K. Maeda (1993) Vitamin E is an important factor in T cell differentiation in thymus of F344 rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 39:451-463.
- Mulero, V., M. A. Esteban and J. Meseguer (1998) Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 66: 185-199.
- Ndoye, A., Z. Ghanmi, J. Koenig and P. Deschaux (1989) Vitamin E and immunity: Effects of vitamin E on the production of anti-*Yersinia ruckeri* antibodies in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ichthyophysiol. Acta.*, 13: 17-23.
- Niki, E., Y. Yamamoto, E. Komuro and K. Sato (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:210S-205S.
- Obach, A., C. Quentel and F. B. Laurencin (1993) Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.*, 15: 175-185.
- Ortuno, J., M. A. Esteban and J. Meseguer (2000) High dietary intake of α -tocopherol acetate enhances

- the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) Fish Shellfish Immun., 10: 293-307.
- Packer, L. (1991) Protective role of vitamin E in biological systems. Am. J. Clin. Nutr., 53: 1050S-1055S.
- Panush, R. S. and J. C. Delafuente (1985) Vitamins and immunocompetence. World Rev. Nutr. Dietet., 45: 97-132.
- Pick, E. and D. Mizel (1981) Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J. Immunol. Methods, 46: 211-216.
- Plumb, J. A., R. Milroy and S. B. Kaye (1989) Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazon absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Res., 49: 4435-4440.
- Roem, A. J., C. C. Kohler and R. R. Stickney (1990) Vitamin E requirements of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), in relation to dietary lipid level. Aquaculture, 87: 155-164.
- Secombes, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In Techniques in Fish Immunology 1 (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Robertson and W. B. van Muiswinkel, eds.), SOS Publ., Fair Haven, NJ, U.S.A., 137-154.
- Secombes, C. J. and T. C. Fletcher (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Ann. Rev. Fish Dis., 2: 53-71.
- Simic, M. C. (1981) Free radical mechanisms in autoxidation processes. J. Chem. Educ., 58: 125-131.
- Solem, S. T., J. B. Jorgensen and B. Robertsen (1995) Stimulation of respiration of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. Fish and Shellfish Immun., 5: 475-491.
- Velhac, V., A. N'Doye, J. Gabaudan, D. Troutaud and P. Deschaux (1991) Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune response of rainbow trout. In Fish Nutrition in Practice (INRA ed.), vol. 167, Les colloques no. 61, Paris, France, 24-27.
- Waagboe, R. (1994) The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A review. Aquacul. Fish. Manage., 25: 175-197.
- Watanabe, T., F. Takashima, C. Ogino and T. Hibiya (1970) Effect of α -tocopherol deficiency on carp. Nippon Suisan Gakkaishi, 40: 181-188.
- Wise, D. J., J. R. Tomasso, D. M. Gatlin III, S. C. Bai and V. S. Blazer (1993) Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. J. Aquacul. Anim. Health, 5: 177-182.
- Wu, F. C., Y. Y. Ting and H. Y. Chen (2003) Dietary docosahexaenoic acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defence responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. Fish and Shellfish Immun., 14: 223-238.

Effect of Vitamin E on the Immune Responses of Head-kidney Leucocytes in Juvenile Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

Feng-Cheng Wu^{*}, Min-Lung Chen, Ding-Jen Chang and Yun-Yuan Ting

Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

Abstract

Juvenile orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) were fed experimental diets with four levels of vitamin E (all-rac- α -tocopherol) (0, 50, 500, and 5000 mg/kg diet) for 12 wk to investigate the effects of feeding these vitamin E-enriched diets on phagocytic, respiratory burst, and leucocyte proliferative activities. Fish fed the diet without vitamin E showed reduced growth, head-kidney leucocyte phagocytic activity, and proliferation, but no difference was detected in survival. When fish were fed 500 mg/kg dry weight (DW) vitamin E, enhanced phagocytic activity was found, which was significantly higher ($p < 0.05$) than those of fish fed the other diets. There were no effects of dietary vitamin E intake on respiratory burst activities of head-kidney leucocytes. Leucocyte proliferation was significantly higher in fish fed the diet with higher vitamin E levels (500 and 5000 mg/kg) than those fed the diet without vitamin E, when stimulated by Con-A, PHA-P, and LPS. Data showed that vitamin E (500 mg/kg DW) could efficiently stimulate grouper leucocyte phagocytic and proliferative activities, but not respiratory bursts.

Key words: *Epinephelus coioides*, vitamin E, phagocytic activity, respiratory burst, leucocyte proliferation.

*Correspondence: Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute, Chigu, Tainan, Taiwan. TEL: (06) 788-0461; FAX: (06) 788-1597; e-mail: wufc3480@ms11.hinet.net