

龍膽石斑稚魚之飼料維生素 E 需求及其免疫反應

吳豐成* · 葉信利

行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

摘 要

本研究以添加七種不同濃度 (0、7.5、15、30、60、120 和 240 mg/kg) 的維生素 E (all-rac- α -tocopherol) 飼料，餵飼平均體重 8.5 ± 0.5 g 的龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 稚魚 12 週，以探討其對維生素 E 之需求，以及維生素 E 對其頭腎白血球的吞噬、呼吸爆 (respiratory burst) 等活性和白血球增生之影響。結果顯示，飼料中添加維生素 E 顯著 ($p < 0.05$) 影響龍膽石斑之成長、活存率和肌肉硫巴比妥酸值 (TBARS)。攝取添加維生素 E 大於或等於 15 mg/kg DW 飼料組之試驗魚的頭腎白血球吞噬活性及增生作用顯著高於未添加組，但對白血球的呼吸爆活性則無影響。將成長結果以 Broken-line 模式分析後，可得出龍膽石斑魚的維生素 E 需求量为 46 mg/kg DW (95% 信賴區間為 32.1 ~ 59.9 mg/kg DW)。

關鍵字：龍膽石斑、維生素 E 需求、免疫反應

前 言

維生素 E 為硬骨魚類的必需營養素 (Halver, 2002)，魚類的維生素 E 最適需求量約為 15 ~ 300 mg/kg DW (dry weight) (Watanabe *et al.*, 1977; Wilson *et al.*, 1984; Hamre and Lie, 1995; Kocabas and Gatlin, 1999; Sau *et al.*, 2004; Lin and Shiau, 2005)，且其需求量隨著飼料中高度不飽和脂肪酸含量的增加而增加 (Schwarz *et al.*, 1988; Shiau and Shiau, 2001)。當以含 3% 玉米油脂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 需求隨之提高至 25 mg/kg DW (Roem *et al.*, 1990)。同樣的，飼料中鯪魚油添加量從 15% 減少至 7.5%，虹鱔 (*Salmo gairdneri*) 的維生素 E 需求量为 100 mg/kg DW (Watanabe *et al.*, 1970) 降至 24 mg/kg DW (Hung *et al.*, 1981)。維生素 E 為重要的外源性抗氧化脂溶性營養素 (Buettner, 1993; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996; Wang and

Quinn, 1999)，其抗氧化效應為扮演單氧游離自由基的抑制者角色，而防止組織及不飽和脂質之損害 (Gorman *et al.*, 1984; Wang and Quinn, 1999)；另外也可以提供其酚氫原子 (phenolic hydrogen atom) 至磷脂質的不飽和脂酸酯基，以終止脂質的過氧化反應 (Burton and Ingold, 1989)。

維生素 E 除抗氧化功能外，也可調整哺乳動物的免疫功能 (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 可促進虹鱔對免疫原的細胞性反應 (Velhac *et al.*, 1991)、增加抗細菌能力 (Furones *et al.*, 1992)、提高腸道白血球的吞噬能力 (Clerton *et al.*, 2001) 以及促進肥脂鯉 (*Piaractus mesopotamicus*) 的巨噬細胞之聚集能力 (Belo *et al.*, 2005)。Wu *et al.* (2004) 發現適量的維生素 E 可有效促進點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 稚魚的白血球之吞噬活性和增生作用 (proliferation)。另，維生素 E 會影響大西洋鮭 (*Salmo salar*) 吞噬細胞之呼吸爆 (respiratory burst) 活性 (Hardie *et al.*, 1990)；然而河魨 (*Ictalurus punctatus*) (Wise *et al.*, 1993)、烏鰡 (*Sparus aurata*) (Ortuno *et al.*, 2000)、虹鱔 (Clerton *et al.*, 2001) 和點帶石斑魚 (Wu *et al.*,

*通訊作者 / 台南縣七股鄉三股村海埔四號, TEL: (06) 788-0461 轉 213; FAX: (06) 788-1597; E-mail: mrc06fri@yahoo.com

2004) 等魚類的頭腎白血球之呼吸爆活性則不受維生素 E 影響。一般而言, 促進免疫反應所需的維生素 E 濃度高於維持正常生理功能之需求, 但餵飼高濃度維生素 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)。

石斑魚為熱帶和亞熱帶地區重要經濟性實用魚類, 由於其食物中含大量易受氧化的高度不飽和脂肪酸, 因此飼料中需補充適量的維生素 E, 以避免脂質被氧化。Lin and Shiau (2005) 研究發現, 當飼料中脂質含量為 4% 及 9% 時, 瑪拉巴石斑 (*E. malabaricus*) 稚魚之維生素 E 之最適需求量分別為 61 ~ 68 及 104 ~ 115 mg/kg。同為石斑魚種中的龍膽石斑魚 (*E. lanceolatus*) 為體型最大, 且為目前養殖石斑魚種中成長最快的魚種, 然其對維生素 E 之需求及其與免疫相關性仍不明瞭。因此, 本研究以不添加及分別添加六種不等量維生素 E 的飼料餵飼龍膽石斑稚魚十二週, 探討其維生素 E 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 (AOAC, 2003) 如 Table 1 所示。飼料以酪蛋白為單一蛋白來源, 粗蛋白含量為 47.1 g/100g; 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 12.3 g/100g。飼料中的維生素 E (all-*rac*- α -tocopherol) 來源為 Rovimix E-50 SD (純度: 50%, Hoffmann La Roche and Co. Ltd), 添加量分別為 0 (E_0)、7.5 ($E_{7.5}$)、15 (E_{15})、30 (E_{30})、60 (E_{60})、120 (E_{120})、240 mg/kg (E_{240}) 等七組。飼料製作時, 維生素 E 和油脂混合物混合均勻後, 隨即加入預先配製的原料, 所有飼料原料經混勻後, 加入水充分攪拌成麵糰狀, 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

實驗用的龍膽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。馴養四週後, 選取外觀健康和體型相近的石斑魚 315 尾, 經個別稱重後 (平均體重為 8.5 ± 0.5 g), 隨機放入試驗桶內進行飼育試驗。

Table 1 Ingredient and proximate compositions of the basal diet

	Quantity
Ingredient composition (g/kg)	
Casein, solvent-extracted	500.0
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
Attractant ⁴	60.0
α -cellulose	103.0
Proximate composition (g/100g dry diet) ⁵	
Crude protein	47.1 $\pm$ 0.4
Crude lipid	12.3 $\pm$ 0.2
Moisture	7.2 $\pm$ 0.5
Ash	12.1 $\pm$ 0.4

¹Contained cod liver oil, linseed oil and safflower oil (2:1:1; wt/wt/wt)

²Vitamin 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; vitamin A acetate, 0.045

³Mineral 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; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0525

⁴Attractant supplied the following (mg/kg dry diet): L-aspartic acid, 18.6; L-threonine, 43.8; L-serine, 33.0; L-glutamic acid, 53.4; L-valine, 36.6; L-methionine, 36.6; L-isoleucine, 29.4; L-leucine, 55.2; L-tyrosine, 22.2; L-phenylalanine, 29.4; L-lysine HCl, 29.4; L-histidine HCl, 14.4; taurine, 340.2; L-proline, 1481.4; glycine, 901.8; L-alanine, 276.0; L-arginine, 230.4; betaine HCl, 920.4; trimethylamine HCl, 91.8; trimethylamine *n*-oxide HCl, 1150.2; hypoxanthine, 48.0; inosine, 25.8; adenosine-5-monophosphate, 40.2; L-(+)-lactic acid, 91.8 (Mackie and Mitchell, 1985)

⁵n=21, mean $\pm$ S.E.M.

試驗共七個飼料處理組，每一處理組均為三重複，每一重複組各有 15 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 600 ml/min 所有的畜養統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 12 週的飼育期間，水溫和鹽度未加以人為控制，水溫範圍為 25 ~ 31℃，鹽度範圍為 30 ~ 33 psu。

每天固定在 08:00 ~ 09:00 投餵飼料一次，投餵前先清除殘餌和糞便。投餌初期採過量餵食，投餵量約為體重之 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備製

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

血清之收集，從非試驗的石斑魚尾脊椎靜脈處抽取血液。每尾魚的血液樣品個別放置在 4℃ 下靜置十二小時後，離心 (2800 × g) 15 分鐘，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 分鐘不活化血清中補體的活性後，儲存於 -70℃ 下以備使用。

頭腎白血球懸浮液之備製方法 (Wu *et al.*, 2003)，其中白血球分離參考 Solem *et al.* (1995) 的 Percoll 密度梯度法，收集 37% 和 51% 兩密度梯度分界面間的白血球細胞層。白血球懸浮液活細胞分析，為取 25 μL 白血球懸浮液在 50 μL 0.4% 錐蟲藍中靜置 3 分鐘後，以 Neubauer 血球計數板計算。所有樣品的活細胞數量均大於 95%。

四、白血球吞噬活性和呼吸爆活性分析

白血球的吞噬和呼吸爆活性均在 27℃ 環境下進行分析，分析前活白血球濃度先調至 2×10^7 細胞。

吞噬活性分析參考 Gebran *et al.* (1992) 和 Solem *et al.* (1995) 的分析法，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 100 μL 中每 2×10^7 白血球細胞的 OD₆₂₀ 表示。

呼吸爆活性依據快速微量分析法 (Pick and Mizel, 1981; Lemaire-Gony *et al.*, 1995; Wu *et al.*,

2003) 分別測定白血球的基礎呼吸爆活性和激刺呼吸爆活性，其呼吸爆活性為基礎呼吸爆活性和激刺呼吸爆活性間的差異程度，以 50 μL 中每 2×10^7 白血球細胞的 OD₆₂₀ 表示。

五、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。

六、硫巴比妥酸值 (thiobarbituric acid reaction substance, TBARS)

自試驗魚體取下背部肌肉，並保存於 -80℃ 直到分析。TBARS 值以 Uchiyama and Mihara (1978) 法分析。

七、統計分析

所有成長、活存率、TBARS 值和免疫分析等數據以 mean ± SEM 表示，實驗數據均以 SAS/PC 套裝軟體 (SAS Institute, Car, NC) 的單項變方分析 (one-way ANOVA) 檢定試驗組間是否有顯著差異，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 $p < 0.05$ 。以 Broken-line 迴歸分析法 (Robbins *et al.*, 2006) 分析龍膽石斑魚之飼料維生素 E 需求量。

結 果

一、成長試驗

各飼料處理組間之魚體成長、活存率和肌肉油脂過氧化等有顯著差異 (Table 2)。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低者 (平均增重率為 $128.0 \pm 15.7\%$ ，活存率為 $66.7 \pm 6.7\%$)，其成長情形顯著 ($P < 0.05$) 低於攝取任一添加維生素 E 飼料組者。攝取含維生素 E 60 mg/kg DW (E₆₀) 組之試驗魚成長最佳，除 E₁₂₀ 和 E₂₄₀ 兩試驗組者外，其成長顯著高於其他試驗組者。以成長結果經 Broken-line 模式分析龍膽石斑魚維生素 E 需求量為 46 mg/kg DW (95%信賴區間為 32.1 ~ 59.9

Table 2 Weight gain, survival rate and muscle thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) of the juvenile groupers fed diets with different vitamin E levels for 12 weeks^{1,2}

Diet ³	Weight gain (% initial weight)	Survival rate (%)	TBARS (nmol malonaldehyde / g tissue)
E ₀	128.0 ± 15.7 ^e	66.7 ± 6.7 ^c	38.3 ± 4.5 ^a
E _{7.5}	163.0 ± 7.9 ^d	80.0 ± 6.7 ^{bc}	31.7 ± 4.0 ^{ab}
E ₁₅	204.0 ± 15.5 ^c	91.1 ± 10.2 ^{ab}	29.3 ± 2.5 ^b
E ₃₀	233.7 ± 12.1 ^{bc}	93.3 ± 6.7 ^{ab}	20.7 ± 3.1 ^c
E ₆₀	268.0 ± 7.0 ^a	97.8 ± 3.8 ^a	18.7 ± 1.5 ^c
E ₁₂₀	251.3 ± 10.6 ^{ab}	95.6 ± 7.7 ^a	15.7 ± 1.5 ^{cd}
E ₂₄₀	248.7 ± 12.7 ^{ab}	93.3 ± 6.7 ^a	14.0 ± 1.7 ^d

¹Values, means ± SEM within the same column with the same superscript letter are not significantly different ($p > 0.05$)²Initial weight is 8.5 ± 0.5 g; n = 3 replicates of 15 fish each, initially³E_x represents the vitamin E (E), and x indicate concentrations of vitamin E (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 mg/kg DW)

mg/kg DW)。攝取含維生素 E 60 mg/kg DW (E₆₀) 組試驗魚的活存率最高 (97.8 ± 3.8%)，活存率顯著高於 E₀ 和 E_{7.5} 兩試驗組魚，但與其他試驗組者間並沒有統計差異。攝取不添加維生素 E 飼料組 (E₀) 的試驗魚之肌肉 TBARS 值最高 (38.3 ± 4.5 nmol MDA/g)，與攝取添加維生素 E 7.5 mg/kg DW 飼料 (E_{7.5}) 組試驗魚肌肉 TBARS 值間並無顯著差異 ($p > 0.05$)，但顯著高於其他攝取添加維生素 E 飼料組者，且肌肉 TBARS 值隨飼料維生素 E 濃度之增加而降減。在整個蓄養期間，所有試驗組石斑魚並未發現任何文獻曾描述的表觀維生素 E 缺乏症狀。

二、飼料維生素 E 含量對白血球吞噬和呼吸爆活性之影響

龍膽石斑魚頭腎白血球之吞噬活性顯著受飼料維生素 E 含量影響，但此一顯著關係並不存在於白血球的呼吸爆活性 (Table 3)。攝取不添加維生素 E 的 E₀ 飼料之試驗魚，其白血球吞噬活性 (0.987 ± 0.116) 為所有試驗組中最差者，但其白血球吞噬活性與攝取 E_{7.5} 飼料之試驗組間並無統計 ($p > 0.05$) 差異。攝取添加維生素 E₂₄₀ mg/kg DW 飼料之 E₂₄₀ 組的白血球的吞噬活性最高，其吞噬活性與 E₃₀、E₆₀ 和 E₁₂₀ 等三試驗組試驗魚者並無統計差異。各試驗組間的白血球呼吸爆活性則沒有統計差異，以 E₀ 組試驗魚最低 (0.310 ± 0.020)，而以 E₂₄₀ 組者為最高 (0.379 ± 0.046)。

Table 3 Phagocytic activity (Optical density, OD_{620nm}) and respiratory burst activity (OD_{620nm}) of head-kidney leucocytes isolated from the juvenile grouper fed for 12 weeks on diets differing in vitamin E level¹

Diet ²	Phagocytic activity	Respiratory burst activity
E ₀	0.987 ± 0.116 ^d	0.310 ± 0.020
E _{7.5}	1.075 ± 0.061 ^{cd}	0.324 ± 0.017
E ₁₅	1.196 ± 0.041 ^{bc}	0.350 ± 0.070
E ₃₀	1.362 ± 0.042 ^{ab}	0.362 ± 0.021
E ₆₀	1.411 ± 0.030 ^a	0.377 ± 0.036
E ₁₂₀	1.436 ± 0.065 ^a	0.355 ± 0.014
E ₂₄₀	1.447 ± 0.065 ^a	0.379 ± 0.046

¹Values are the means ± SEM (n = 9) within the same column with the same superscript letter are not significantly different ($p > 0.05$)²E_x represents the vitamin E (E), and x indicate concentrations of vitamin E (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 mg/kg DW)

三、飼料維生素 E 含量對白血球增生作用之影響

龍膽石斑魚頭腎白血球增生作用顯著受飼料維生素 E 含量影響，且隨飼料中維生素 E 之添加量增加而增加 (Table 4)。攝取不添加維生素 E 的 E₀ 飼料之石斑魚，其白血球經 ConA、PHA-P 或 LPS 刺激所產生的白血球增生為所有試驗組中最低者 (分別為 0.260 ± 0.015、0.207 ± 0.032 和 0.313 ± 0.014)，且與攝取 E_{7.5} 飼料之試驗組者無統計差異。餵飼 E₂₄₀ 飼料的試驗魚白血球經 ConA、PHA-P

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 leucocytes isolated from the juvenile grouper fed for 12 weeks on diets differing in vitamin E level¹

Diet ²	Stimulation index ³		
	Con A	PHA-P	LPS
E ₀	0.260 ± 0.015 ^e	0.207 ± 0.032 ^e	0.313 ± 0.014 ^f
E _{7.5}	0.291 ± 0.010 ^{de}	0.231 ± 0.010 ^e	0.340 ± 0.011 ^{ef}
E ₁₅	0.317 ± 0.010 ^{cd}	0.249 ± 0.009 ^{de}	0.366 ± 0.014 ^{de}
E ₃₀	0.332 ± 0.013 ^{bc}	0.286 ± 0.008 ^{cd}	0.384 ± 0.013 ^{cd}
E ₆₀	0.360 ± 0.004 ^{ab}	0.312 ± 0.017 ^{bc}	0.416 ± 0.009 ^c
E ₁₂₀	0.369 ± 0.013 ^a	0.356 ± 0.016 ^{ab}	0.460 ± 0.005 ^b
E ₂₄₀	0.387 ± 0.013 ^a	0.372 ± 0.010 ^a	0.497 ± 0.016 ^a

¹Values, means ± SEM (n = 9), within the same column with the same superscript letter are not significantly different ($p > 0.05$)

²E_x represents the vitamin E (E), and x indicates concentrations of vitamin E (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 mg/kg DW)

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

或 LPS 刺激所產生的白血球增生 (分別為 0.387 ± 0.013 、 0.372 ± 0.010 和 0.497 ± 0.016) 為所有試驗組中最高者，其中以 LPS 誘導白血球後所產生的增生顯著高於其他試驗組；以 ConA 刺激白血球的增生與 E₆₀ 和 E₁₂₀ 兩試驗組 (分別為 0.360 ± 0.004 和 0.369 ± 0.013) 間無統計差異，但顯著高於其他試驗組者；以 PHA-P 刺激白血球的增生與 E₁₂₀ 試驗魚 (0.356 ± 0.016) 間無統計差異，但顯著高於其他試驗組者。

討 論

飼料添加維生素 E 顯著影響龍膽石斑魚的成長及存活情形。魚類維生素 E 缺乏時會出現成長低下、高死亡率、貧血、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)。本研究發現攝取添加維生素 E 60、20 或 240 mg/kg 等飼料之試驗組魚的成長及存活率間並無統計差異，且其成長情形顯著優於攝取添加低維生素 E 飼料 (E_{7.5} 及 E₁₅ 兩試驗組) 或不添加維生素 E 飼料 (E₀ 組) 者，顯示當飼料中添加維生素 E 30 ~ 240 mg/kg 可促進龍膽石斑之成長及存活率。本試驗以含脂質為 12.3 g/kg DW 的飼料餵飼 12 週後，以其成長增重率評估維生素 E 需求量，顯示龍膽石斑魚的維生素 E 需求量為 46 mg/kg DW，而在飼料油脂量為 9 g/100g DW 時，瑪拉巴

石斑的維生素 E 需求為 104 ~ 115 mg/kg DW (Lin and Shiau, 2005)，顯示龍膽石斑魚對維生素 E 的需求低於瑪拉巴石斑魚。TBARS 為測定脂質過氧化程度的指標經常使用的指標之一 (Rosmini *et al.*, 1996)，其係利用脂質過氧化的一些次級產物 (特別是 malonaldehyde, MDA) 會與 TBA (Thiobarbituric acid) 反應而產生化學呈色來測定脂質過氧化程度。本試驗發現龍膽石斑魚肌肉 TBARS 值隨著飼料維生素 E 濃度增加反而降減，與瑪拉巴石斑魚者相同 (Lin and Shiau, 2005)，顯示飼料中維生素 E 濃度增加，可顯著降低龍膽石斑魚肌肉均質液內生性脂質過氧化傷害。另在試驗期間除成長低下、高死亡率和肌肉脂質過氧化外，並沒有發現任何維生素 E 缺乏或過多的症狀，或許本試驗之蓄養時間僅 12 週，龍膽石斑稚魚尚未表現出維生素 E 缺乏症所致。

本試驗雖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 影響魚類的細胞性免疫反應 (Blazer, 1992; Waagboe, 1994)。本研究發現飼料添加維生素 E 可促進龍膽石斑魚頭腎白血球的吞噬活性，此一結果與點帶石斑魚相類似 (Wu *et al.*, 2004)。Wu *et al.* (2004) 發現攝取添加維生素 E 500 mg/kg 飼料的點帶石斑魚之頭腎白血球吞噬活性顯著高於攝取添加 50 mg/kg DW 維生素 E 飼料者，本研究則發現餵飼 E₃₀ 飼料之試驗魚

頭腎白血球吞噬活性與 E_{60} 、 E_{120} 和 E_{240} 等三試驗組魚者間無統計差異，但顯著高於攝取不添加維生素 E 及添加維生素 E 7.5 mg/kg 者，且其吞噬活性隨著維生素 E 添加量而增加。雖然本研究之飼料添加維生素 E 最高量僅為 240 mg/kg，但或許飼料維生素 E 之添加量增加至 500 mg/kg 時，龍膽石斑魚的頭腎白血球吞式活性也和瑪拉巴石斑魚一樣顯著增加。此一結果顯示飼料添加維生素 30 mg/kg 雖可促進龍膽石斑的頭腎白血球吞噬活性，然提高飼料中維生素 E 添加量似乎有利於龍膽石斑魚的頭腎白血球吞噬活性達到較佳狀態。

本研究發現飼料添加維生素 E 量與龍膽石斑頭腎白血球之呼吸爆活性間無顯著差異，顯示龍膽石斑魚頭腎白血球之呼吸爆活性不受維生素 E 影響。同樣的結果也見河魴 (Wise *et al.*, 1993)、烏鰡 (Ortuno *et al.*, 2000)、虹鱔 (Clerton *et al.*, 2001) 和點帶石斑魚 (Wu *et al.*, 2004)，但 Mulero *et al.* (1998) 則發現烏鰡的呼吸爆活性增加僅見於維生素 E 和 C 同時存在時。在吞噬作用過程中，白血球會形成偽足 (pseudopodia) 將抗原包起來，形成所謂的吞噬泡 (phagosome)，吞噬泡隨後與溶解體 (lysosome) 結合並形成吞噬溶解體 (phagolysosome)，溶解體中的過氧酵素、氧游離子 (即呼吸爆) 以及一些水解酵素，可以破壞吞噬泡內的抗原。本研究結果顯示維生素 E 可促進龍膽石斑魚的頭腎白血球的吞噬活性，但無法影響白血球的呼吸爆活性，雖然維生素 E 影響免疫反應之機制仍不清楚，但影響免疫細胞的呼吸爆活性可能與維生素 E 和其他抗氧化物質存在的比例有關 (Ortuno *et al.*, 2000)，或者維生素 E 的抗氧化機制與免疫細胞之呼吸爆活性間無關。

維生素 E 顯著影響龍膽石斑魚頭腎白血球增生。Con-A 和 PHA-P 兩免疫原可誘導 T 淋巴細胞增生，LPA 則誘導 B 淋巴細胞增生。維生素 E 會保護人類 (Meydani *et al.*, 1990) 和老鼠 (Bendich *et al.*, 1986) 之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)。本試驗發現攝取添加維生素 E 30 mg/kg 以上之飼料 (E_{30} 、 E_{60} 、 E_{120} 和 E_{240})，龍膽石斑的頭腎白血球經 Con-A、PHA-P 和 LPS 等免疫原誘導後產生之增生顯著高於攝取不添加維生素 E 者 (E_0)。因此本研究顯示維生素 E 可促進龍膽石斑魚之 B 和 T 淋巴細胞增生，此結果也見於點帶石斑

魚 (Wu *et al.*, 2004)。攝取過量維生素 E，可促進虹鱔抗體之產生 (Ndoye *et al.*, 1989)，但經 22 週長期餵飼高量維生素 E 時，虹鱔之血清抗體則不受維生素 E 影響 (Furone *et al.*, 1992)。本研究發現龍膽石斑魚的白血球經 LPS 誘導所產生之白血球增生，隨飼料維生素 E 添加量之增加而增加，此結果顯示，連續 12 週餵食添加維生素 E 240 mg/kg，可促進龍膽石斑魚的抗體反應。有效誘導點帶石斑白血球增生之維生素 E 添加量為 500 mg/kg (Wu *et al.*, 2004)，而本研究結果發現餵飼添加維生素 E 240 mg/kg 之飼料 (E_{240})，龍膽石斑的頭腎白血球經 Con-A、PHA-P 和 LPS 等免疫原誘導後產生之增生為所有試驗組中最高者，且由本研究成長增重結果計算的龍膽石斑魚之維生素 E 需求量为 46 mg/kg (95% 信賴區間為 32.1 ~ 59.9 mg/kg)，顯示飼料維生素 E 添加量高於營養需求所需時，可促進龍膽石斑魚之頭腎白血球增生作用。

綜合本研究結果，經十二週的成長試驗顯示，維生素 E 為龍膽石斑魚必需營養素，當飼料粗脂質量為 12% 時，其飼料維生素 E 需求量为 46 mg/kg (95% 信賴區間為 32.1 ~ 59.9 mg/kg)，且維生素 E 可促進龍膽石斑魚的頭腎白血球的吞噬活性及增生活性，但無法影響白血球的呼吸爆活性。

謝 辭

本研究承蒙水產試驗所海水繁養殖研究中心陳麗靜小姐、張丁仁先生協助及同仁提供寶貴意見，特此一併致謝。

參考文獻

- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) (2003) Official Methods of Analysis (17th ed.). AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- 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 schlegelii*. *Aquaculture*, 161: 405-414.
- Belo, M. A. A., S. H. C. Schalch, F. R. Moraes, V. E. Soares, A. M. M. B. Otoboni and J. E. R. Moraes (2005) Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost

- fish (*Piaractus mesopotamicus*). J. Comp. Pathol., 133: 146-154.
- 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.
- 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 nonspecific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture, 37: 1-9.
- Buettner, G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys., 300: 535-543.
- Burton, G. W. and K. U. Ingold (1989) Vitamin E as in vitro and in vivo antioxidant. Ann. N.Y. Acad. Sci., 570: 7-22.
- Clerton, P., D. Troutaud, V. Verlhac, J. Gabaudan and P. Deshchaux (2001) Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunol., 11: 1-13.
- 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 Immunol., 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.
- Gebzan, 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-diamino fluorine. J. Immunol. Methods, 15: 255-260.
- Gorman, A. A., I. R. Gould, I. Hamblett and M. C. Standen (1984) Reversible exciplex formation between singlet oxygen ($^1\Delta_g$) and vitamin E: solvent and temperature effects. J. Am. Chem. Soc., 106: 6956-6959.
- Halver, J. E. (2002) The vitamin. In Fish Nutrition (J. E. Halver and R. W. Hardy eds.), Academic Press, San Diego, CL, USA, 62-141.
- Hamre, K. and O. Lie (1995) Minimum requirement of vitamin E for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at first feeding. Aquacult. Res., 26: 175-184.
- Hardie, L. J., T. C. Fletcher and T. 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.
- Kamal-Eldin, A. and L. A. Appelqvist (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids, 31: 671-701.
- Kocabas, A. M. and D. M. Gatlin III (1999) Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female $\times$ *M. saxatilis* male). Aquacult. Nutr., 5: 3-7.
- 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.
- Lin, Y. H. and S. Y. Shiau (2005) Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. Aquaculture, 248: 235-244.
- Mackie, A.M. and A.I. Mitchell (1985) Identification of gustatory feeding stimulants for fish – applications in aquaculture. In Nutrition and Feeding in Fish. (C. B. Cowey, A. M. Mackie and J. B. Bell eds.), Academic Press, London, UK, 177-189.
- 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.
- 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 immunity: Effects of vitamin E on the production of anti-Yersinia ruckeri antibodies in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Ichthyophysiol. Acta., 13: 17-23.
- Ortuno, J., M. A. Esteban and J. Meseguer (2000) High

- dietary intake of α -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 293-307.
- 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.
- Robbins, K. R., A. M. Saxton and L. L. Southern (2006) Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *J. Anim. Sci.*, 84: E155-E165.
- 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.
- Rosmini, M. R., F. Perlo, J. A. Perz-Alvarez, M. J. Pagan-Moreno, A. Gago-Gago, F. Lopez-Santovenia and V. Aranda-Catala (1996) TBA test by an extractive method applied to 'Pate'. *Meat Sci.*, 42: 103-110.
- Sau, S. K., B. N. Paul, K. N. Mohanta and S. N. Mohanty (2004) Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. *Aquaculture*, 240: 359-368.
- Schwarz, F. J., M. Kirchgessner, H. Steinhart and G. Runge (1988) Influence of different fats with varying additions of α -tocopherol acetate on growth and body composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 69: 57-67.
- Shiau, S. Y. and L. F. Shiau (2001) Re-evaluation of the vitamin E requirements of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Anim. Sci.*, 72: 529-534.
- 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 Immunol.*, 5: 475-491.
- Uchiyama, M. and M. Mihara (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, 86: 271-278.
- Velhac, V. N., 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*, vol. 167 (INRA eds.), 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. *Aquacult. Fish. Manage.*, 25: 175-197.
- Wang, X. and P. J. Quinn (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.*, 38: 309-336.
- Watanabe, T., T. Takeuchi, M. Matsui, C. Ogino and T. Kawabata (1977) Effect of α -tocopherol deficiency on carp. VII: The relationship between dietary levels of linoleate and α -tocopherol requirement. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 43: 935-946.
- Watanabe, T., F. Takashima, C. Ogino and T. Hibiya (1970) Effect of α -tocopherol deficiency on carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 40: 181-188.
- Wilson, R. P., P. R. Bowser and W. E. Poe (1984) Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 114: 2053-2508.
- 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. Aquat. Anim. Health*, 5: 177-182.
- Wu, F. C., M. L. Chen, D. J. Chang and Y. Y. Ting (2004) Effect of vitamin E on the immune responses of head-kidney leucocytes in juvenile Organe-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *J. Taiwan Fish. Res.*, 12: 39-47.
- 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 Shellfish Immunol.*, 14: 223-238.

Dietary Vitamin E Requirement of Giant Grouper, *Epinephelus lanceolatus*, and Its Effects on Immune Responses

Feng-Cheng Wu* and Shinn-Lih Yeh

Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Juvenile giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) were fed experimental diets with one of seven levels of vitamin E (all-*rac*- α -tocopherol) (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 mg/kg diet) for 12 weeks to investigate the dietary requirement and their effects on phagocytic, respiratory burst and leukocyte proliferative activities. Significant differences ($p < 0.05$) in growth, survival rate and muscle TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance) were observed among the dietary treatments. Enhanced growth was observed when the diets supplemented with vitamin E, indicating that the vitamin E was requirement for grouper. When fish fed diet with vitamin E greater or equal to 15 mg /kg, phagocytic and proliferative activities of head-kidney leukocytes were significantly enhanced. However, the supplemented vitamin E did not have effects on respiratory burst activity of head-kidney leukocytes. Weight gain analyzed by broken-line model indicated that the optimum vitamin E concentration for juvenile giant group was 46 mg/kg in diet with lower and upper 95% confidence levels on 32.1 and 59.9 mg/kg, respectively.

Key words: giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*, vitamin E requirement, immune response

*Correspondence: Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute, Cigu, Tainan, Taiwan. TEL: (06) 788-0461 ext. 213; FAX: (06) 7881-597; E-mail: mrc06fri@yahoo.com