

# 硒和维生素 E 对牙鲆生长和非特异性免疫力的影响

常 青<sup>1</sup> 梁萌青<sup>1</sup> 关长涛<sup>1</sup> 姜泽明<sup>2</sup> 张 霖<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 山东威海正明海洋科技开发有限公司, 264300)

(<sup>3</sup> 山东荣成出入境检验检疫局, 威海 264300)

**摘 要** 在基础饲料中分别添加维生素 E ( $V_E$ ) (60 mg/kg 标为  $e$  或 300 mg/kg 标为  $E$ ) 和硒 (Se) (0 mg/kg 标为  $s$  或 2.5 mg/kg 标为  $S$ ), 制成 4 种试验饲料 ( $s/e, s/E, S/e, S/E$ ) 分别饲喂初始体重为  $38.5 \pm 0.15$  g 的牙鲆 70 d, 观察其对生长性能、肝脏及血清中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、非特异免疫力以及抗病力的影响。结果表明, 饲喂添加高剂量  $V_E$  的两组饲料 ( $s/E, S/E$ ), 牙鲆的特定生长率和吞噬率明显地提高 ( $P < 0.05$ )。饲喂添加硒的两组饲料 ( $S/e, S/E$ ), 牙鲆血液和肝脏的 GSH-Px 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。70 d 投喂实验结束后, 利用鳃弧菌进行攻毒试验, 不添加硒和低剂量  $V_E$  ( $s/e$ ) 使牙鲆的累积死亡率明显高于其他 3 组。

**关键词** 牙鲆 硒 维生素 E 生长 非特异性免疫

**中图分类号** S963.16 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0091-06

## Effects of dietary vitamin E and selenium on growth, nonspecific immune responses and disease resistance in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

CHANG Qing<sup>1</sup> LIANG Meng-qing<sup>1</sup> GUAN Chang-tao<sup>1</sup>  
JIANG Ze-ming<sup>2</sup> ZHANG Lin<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Zhengming Marine Technology and Development Ltd., Weihai 264300)

(<sup>3</sup> Rongcheng Import and Export Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264300)

**ABSTRACT** A 10-week feeding trial was conducted to investigate the effects of four diets containing different combinations of selenium and vitamin E on the growth performance, non-specific immune responses of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and disease resistance when challenged with *Vibrio anguillarum*. The fish were fed purified diets with supplemented vitamin E at 60 mg/kg (designated  $e$ ) or 300 mg/kg (designated  $E$ ) combination with selenium at 0 mg/kg (designated  $s$ ) or 3 mg/kg (designated  $S$ ). Each diet was fed to triplicate groups of flounder with initial body weight of  $38.5 \pm 0.15$  g. After the final weighing, 8 fish were ran-

domly taken from each aquarium and injected with *V. anguillarum*. Mortality was recorded daily for 7 days and nonspecific immune parameters were monitored in the remaining fish. At the end of the experiment, weight gain and phagocytic activity in blood was significantly greater in those fish fed the *s/E* and *S/E* diets compared with those fed the *s/e* and *S/e* diets. Glutathione peroxidase activity in serum and liver were significantly higher in fish fed the *S* diets compared with those fed the *s* diets. High cumulative mortality was found in fish fed the *s/e* diet than other dietary groups. These results indicate that no synergistic effect of excessive dietary vitamin E and selenium on growth performance, nonspecific immune responses and disease resistance to *V. anguillarum* in Japanese flounder.

**KEY WORDS** *Paralichthys olivaceus* Se Vitamin E( $V_E$ ) Growth performance  
Non-specific immunity

维生素 E(Vitamin E)又名生育酚,在清除自由基、维护生物膜结构、抗氧化和增强机体免疫力方面发挥着巨大的作用,在水产养殖中应用较为广泛,是对水产动物免疫功能影响较大的维生素之一(周立斌等 2009)。在饲料中添加适量的维生素 E,可以增强水生动物的体液免疫和细胞免疫反应(Clerton *et al.* 2001; 蔡中华等 2001; Lee *et al.* 2004)、提高抗病力(Hardie *et al.* 1990; Blazer *et al.* 1984)。硒(Se)是维持动物生长、繁殖的必需微量营养元素。抗氧化性是硒生化作用的基础,硒作为依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的核心组成部分,参与了生物体中有机和无机过氧化物的清除过程(Avanzo *et al.* 2001; Fang *et al.* 2002),许多研究已经发现  $V_E$  和 Se 在生物体抗氧化保护方面发挥着至关重要的作用。

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 是鲽形目中的一种底栖肉食性鱼类,以其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富而深受人们的喜爱,经济价值较高。近年来,工厂化养殖的迅速发展使牙鲆的养殖环境恶化,病害频发,养殖成活率下降,给牙鲆养殖业造成极大损失。已有研究表明,添加适量的维生素和矿物质是预防疾病行之有效的方法(许群等 2004)。然而有关饲料中添加维生素 E、硒以及二者的相互作用关系对牙鲆生长和免疫力的影响尚未见报道。本实验主要研究添加不同量的维生素 E 和硒对牙鲆的非特异性免疫力的影响,以期为牙鲆高效配合饲料的开发和产业化推广奠定一定的理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验饲料

基础饲料参照薛敏等(2004)配方并稍作修改,配方成分见表 1。添加两个水平的  $V_E$  (60 和 300 mg/kg),两个水平的硒(0 和 2.5 mg/kg),硒的添加以亚硒酸钠的形式加入。制成 4 种实验饲料,分别为饲料 *s/e* (Se 0 mg/kg,  $V_E$  60 mg/kg)、饲料 *s/E* (Se 0 mg/kg,  $V_E$  300 mg/kg)、饲料 *S/e* (Se 2.5 mg/kg,  $V_E$  60 mg/kg)、饲料 *S/E* (Se 2.5 mg/kg,  $V_E$  300 mg/kg)(基础饲料中的  $V_E$  和硒含量忽略不计)。

表 1 基础饲料配方  
Table 1 Composition of the basal diet

组成 Ingredient	含量 Content (%)	组成 Ingredient	含量 Content (%)
无维酪蛋白 Vitamin-free casein	44	豆油 Soybean oil	4
明胶 Gelatin	10	维生素预混料(不含 $V_E$ ) Vitamin premix (without $V_E$ ) <sup>a</sup>	1
糊精 Dextrin	20	矿物质预混料(不含 Se) Mineral premix (without Se) <sup>b</sup>	4
羧甲基纤维素 Carboxymethyl cellulose	5	氯化胆碱 Choline chloride	0.4
褐藻酸钠 Sodium alginate	2.5	卵磷脂 Lecithin	2
鱼油 Fish oil	7	抗氧化剂 Antioxidant	0.1

注:a 为维生素预混料配方参照 Teshima (1999);b 为矿物质预混料配方参照 Teshima (1999)

## 1.2 试验用鱼分组及饲养管理

实验所用的牙鲆为当年人工繁殖的同一批鱼苗, 挑选体格健壮、食欲旺盛的个体作为试验鱼, 实验开始前以基础饲料暂养 14 d, 使之适应环境。驯养结束后挑选平均初始体重为  $38.5 \pm 0.15$  g 的牙鲆, 然后随机分组。试验共分 4 个处理, 每个处理 3 个重复, 每个重复 20 尾鱼, 放养于 200 L 的水族箱中。每天投喂两次(06:00 和 17:00), 达饱食水平。试验共持续 70 d, 试验期间水温为  $21 \sim 24$  °C, 盐度为  $30 \sim 32$ , 溶解氧不低于 7 mg/L, 采用自然光照。

## 1.3 样品采集及分析测定方法

实验 70 d 结束时, 将实验鱼饥饿 24 h 后, 计数、称重。每重复随机捞取 3 尾鱼, 以 1 ml 注射器从尾静脉取血, 一部分加入肝素钠制成抗凝血, 用于白细胞计数和吞噬试验; 一部分不加抗凝剂, 室温静置 2 h 后, 于 4 °C 静置 4~6 h, 5 000 r/min 离心 10 min 即得血清, 待析出血清后将血清转移至 1.5 ml 离心管中, 保存在 -70 °C 冰箱待用, 用于溶菌酶活性和谷胱甘肽过氧化物酶活性测定。另取 3 尾鱼, 逐尾称量体重, 取肝脏称重, 然后用于肝脏的谷胱甘肽过氧化物酶活性测定。

### 1.3.1 溶菌酶活力测定

参照刘岩等(2000)的方法进行。测定波长为 570 nm, 溶菌酶活性(U/ml) =  $(A_0 - A)/A_0$  ( $A_0$  为保温前的光吸收值,  $A$  为保温后的光吸收值)。

血液白细胞计数参照常青等(2005)的方法。以 98 ml 蒸馏水加入 1% 亚甲蓝 3 滴, 冰醋酸 2 ml, 配制成 100 ml 白细胞稀释液。将 20  $\mu$ l 抗凝血加入盛有 380  $\mu$ l 白细胞稀释液的试管中, 待红细胞全部溶解后, 吸取白细胞悬液, 在低倍镜下用血球计数器计算白细胞总数。

### 1.3.2 白细胞吞噬活性的测定

参照吴志新等(2004)的方法。在 0.2 ml 抗凝血中加入 0.1 ml 金黄色葡萄球菌(浓度为  $1 \times 10^8$  cells/ml), 摇匀, 在 28 °C 的恒温水浴锅中孵育 1 min, 每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取血细胞涂片, 每个样品涂 5 张, 用甲醇固定 10 min, Wright-Giemsa 染色液染色 15 min, 水洗风干后, 镜检, 并依下列公式计算白细胞吞噬百分比。

$$\text{吞噬百分比} = (\text{100 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数} / \text{100}) \times 100\%$$

谷胱甘肽过氧化物酶活性测定: 采用南京建成生物工程研究所试剂盒, 按试剂盒说明书操作。血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力单位定义: 每 0.1 ml 血清在 37 °C 反应 5 min, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系中谷胱甘肽(GSH)浓度降低 1  $\mu$ mol/L 为 1 个酶活力单位。肝组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力单位定义: 每 mg 蛋白质, 37 °C 每 min 扣除非酶促反应, 使反应体系中谷胱甘肽(GSH)浓度降低 1  $\mu$ mol/L 为 1 个酶活力单位。

### 1.3.3 攻毒试验

养殖 70 d 结束时进行攻毒实验。从每个养殖重复中随机取 8 尾牙鲆, 每尾牙鲆鱼注射 0.2 ml (浓度及剂量通过预实验确定) 的菌悬液到腹腔, 攻毒实验使用的鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 悬液浓度为  $5 \times 10^8$  个/ml。鳃弧菌由中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室提供。注射细菌后, 记录牙鲆 7 d 之内的累积死亡率。

## 1.4 计算公式及统计分析方法

### 1.4.1 计算公式

$$\text{存活率} \% (\text{Survival} \%) = (N_0 - N_t) / N_0 \times 100\%$$

$$\text{特定增长率} (\%/\text{day}) (\text{Specific growth rate, SGR}) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

$$\text{肝体指数} (\text{Hepato-somatic index, HSI}) = 100 \times (L_t / W_t)$$

$$\text{累积死亡率} \% (\text{Accumulative mortality} \%) = D_t / D_0 \times 100\%$$

其中,  $N_0$  和  $N_t$  分别为每箱放养和死亡的牙鲆数,  $W_0$  和  $W_t$  分别为初始体重和终末体重,  $t$  为实验天数,

$L_t$  为牙鲆肝脏重量,  $D_0$  和  $D_t$  分别为攻毒过程中牙鲆初始尾数和累积死亡尾数。

#### 1.4.2 统计分析方法

采用 SPSS 11.0 对所得数据进行方差分析,若差异显著,则进行 Tukey 多重比较,显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 实验结果

表2 维生素 E 和硒对牙鲆生长性能及血清、肝脏 GSH-Px 活性和肝体指数的影响

Table 2 Effects of dietary vitamin E and Se on growth performance, GSH-Px activities in serum and liver, and HSI of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* ( $X \pm SE$ )

饲料号 Diet No.	Se (mg/kg)	$V_E$ (mg/kg)	特定生长率(%/d) SGR	存活率(%) Survival rate	肝体指数 Hepato-somatic index	肝脏 GSH-Px Liver GSH-Px (U/mg protein)	血清 GSH-Px Serum GSH-Px (10U/ml)
s/e	0	60	1.22±0.04 <sup>a</sup>	87.3±5.4 <sup>a</sup>	2.81±0.15 <sup>a</sup>	42.3±2.1 <sup>a</sup>	12.11±3.2 <sup>a</sup>
s/E	0	300	1.38±0.02 <sup>b</sup>	85.2±6.6 <sup>a</sup>	2.78±0.20 <sup>a</sup>	39.8±5.2 <sup>a</sup>	13.16±2.6 <sup>a</sup>
S/e	2.5	60	1.29±0.04 <sup>a</sup>	79.6±6.2 <sup>a</sup>	2.56±0.31 <sup>a</sup>	51.6±3.3 <sup>b</sup>	16.62±4.1 <sup>b</sup>
S/E	2.5	300	1.45±0.02 <sup>b</sup>	83.4±6.0 <sup>a</sup>	2.88±0.22 <sup>a</sup>	53.4±1.5 <sup>b</sup>	16.70±4.9 <sup>b</sup>

从表2中可以看出,添加维生素 E 和硒对牙鲆的存活率和肝体指数没有影响。但是添加高剂量维生素 E 可以明显提高牙鲆的特定生长率( $P < 0.05$ )。在低剂量维生素 E 的情况下,添加硒对特定生长率没有影响( $P > 0.05$ )。饲料中不添加硒,高剂量维生素 E 会使血清谷胱甘肽过氧化物酶的活性增加,但是与低剂量维生素 E 相比没有显著差异( $P > 0.05$ );饲料中添加硒能够显著地增加血清和肝脏中谷胱甘肽过氧化物酶的活性,但是维生素 E 含量高低对其没有影响。

表3 维生素 E 和硒对牙鲆的白细胞总数、吞噬率和溶菌酶活力的影响

Table 3 Effects of dietary vitamin E and Se on total number of leucocyte, phagocytic rate and lysozyme activity of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* ( $X \pm SE$ )

饲料号 Diet No.	白细胞总数( $\times 10^9$ /ml) Total number of leucocyte	吞噬率(%) Phagocytic rate	溶菌酶活力(U/ml) Lysozyme activity
s/e	1.79±0.2 <sup>a</sup>	53.5±3.2 <sup>a</sup>	110.0±3.0 <sup>a</sup>
s/E	1.98±0.3 <sup>a</sup>	59.4±4.1 <sup>b</sup>	95.0±3.0 <sup>a</sup>
S/e	1.86±0.8 <sup>a</sup>	56.1±2.8 <sup>a</sup>	97.0±1.0 <sup>a</sup>
S/E	1.70±0.6 <sup>a</sup>	58.5±2.5 <sup>b</sup>	113±6.0 <sup>a</sup>

维生素 E 和硒的添加对牙鲆的白细胞总数和血清溶菌酶活力均无影响( $P > 0.05$ ) (表3)。高剂量的维生素 E 能够显著地提高白细胞的吞噬率( $P < 0.05$ ),维生素 E 含量相同的情况下,饲料中添加硒对白细胞的吞噬率没有影响( $P > 0.05$ )。

图1所示为腹腔注射鳃弧菌后,7 d 之内各试验组的累积死亡率。从图1中可以看出,攻毒后无硒的试验组最早出现死亡个体,无硒且低剂量的维生素 E 试验组的累积死亡率始终最高,在第7天达到 83.33%,明显地高于其他组( $P < 0.05$ )。在缺硒的情况下,补充高剂量维生素 E 可以显著地降低累

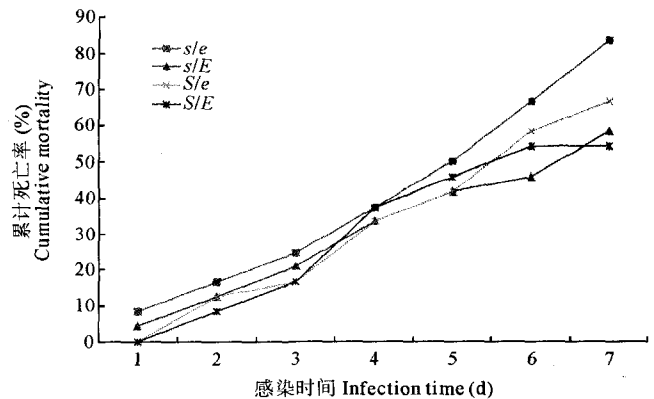


图1 用鳃弧菌攻毒后实验牙鲆的累积死亡率  
Fig.1 Cumulative mortalities of *P. olivaceus* after attack by *V. anguillarum*

积死亡率,第7天的累积死亡率仅为58.33%。添加硒的试验组,在第2天出现死亡个体,高剂量维生素E组第7天的累积死亡率最低,明显地低于无硒低剂量维生素E组( $P < 0.05$ ),但是与其他两组之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

微量营养物质包括维生素和矿物质,是保证鱼类正常生长、繁殖和健康的必要成分。维生素E和硒是维持鱼类生长和代谢功能所必需的物质。

通过70 d的生长试验发现,摄食高 $V_E$ 含量饲料组的牙鲆,特定生长率明显高于低 $V_E$ 饲料组,这说明高含量 $V_E$ 能够促进牙鲆的生长,提高其生产性能。同样在花鲈的基础饲料中添加不同含量的 $V_E$ ,养殖56 d后发现,摄食缺乏 $V_E$ 的花鲈生长缓慢,随饲料 $V_E$ 的增加,花鲈生长状况明显改善,当饲料 $V_E$ 添加量达到或超过49 mg/kg时,增重率和特定生长率达到一平台(周立斌等 2009)。在尼罗罗非鱼的饲料中添加高含量 $V_E$ (240 mg/kg)也能改善其生长性能(Kim *et al.* 2003)。但是Satoch等(1987)报道罗非鱼饲料中 $V_E$ 添加量在50~500 mg/kg对生长没有影响。实验发现添加2.5 mg/kg硒对牙鲆的生长没有影响,这与在尼罗罗非鱼(0.5 mg Se/kg, Kim *et al.* 2003)和斑点叉尾鲷(0.1~10 mg Se/kg, Gatlin *et al.* 1984)的研究结果相似。李爱杰等(2009)推荐牙鲆饲料中硒的适宜含量为1.94~2.19 mg/kg,本实验添加硒的含量高于这个范围,但未见有中毒现象。当饲料中硒的含量超过3 mg/kg,会导致虹鳟生长缓慢、死亡率高(Bell *et al.* 1986)。

硒的生物功能主要是通过各种硒酶表现出来,其中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是动物体内重要的抗氧化酶。它催化还原不同种类的氢过氧化物,从而清除组织中有害的氢过氧化物和自由基,保护生物大分子和生物膜结构免受过氧化物损伤(徐辉碧等 1994)。饵料中添加亚硒酸钠和有机硒可提高异育银鲫的谷胱甘肽过氧化物酶活性(魏志文等 2001)。实验中添加硒可以明显提高血清中GSH-Px的活性。当饲料硒水平为0~0.4 mg/kg时,鲈鱼的肝脏、血清中GSH-Px活性随着硒添加量的增加而提高,饲料硒水平为0.4 mg/kg时达到最高(梁荫青等 2006)。

饲料中高含量的维生素E可提高牙鲆白细胞的吞噬率。 $V_E$ 主要分布在生物膜上,在膜上发挥其抗氧化作用,通过抗氧化作用来影响机体的免疫功能。 $V_E$ 是血液和组织中的脂溶性链式阻断抗氧化剂,防止细胞器膜磷脂内过氧化物的生成,从而保护生物膜的结构与功能,使免疫细胞能够发挥正常的生理功能(李义等 2005)。Wise等(1993)研究发现高含量的硒或 $V_E$ 能够提高斑点叉尾鲷巨噬细胞的活性。因此,饲料中添加 $V_E$ 能使水产动物的吞噬细胞获得保护,从而增强吞噬细胞对微生物等异物的吞噬和清除能力。Pulsford等(1995)报道,给大菱鲆饲料中补充 $V_E$ 可使其吞噬细胞活性提高。

研究表明,当饲料中缺乏 $V_E$ 时,水产动物的抗病能力显著降低。Hardie等(1990)发现摄食高 $V_E$ 含量饵料的大西洋鲑在感染气单胞菌*A. Salmonicida*后的死亡率显著低于 $V_E$ 含量低的饲料组。同样,当用鳟鱼红嘴病耶氏杆菌*Yersinia ruckeri*攻毒时,食用 $V_E$ 含量低的饲料的虹鳟死亡率显著高于 $V_E$ 含量高的饲料组(Blazer *et al.* 1984)。用含不同剂量 $V_E$ 和硒的饵料投喂自然感染分枝乳酸杆菌的大鳞大麻哈鱼*Oncorhynchus tshawytscha*,结果发现,高 $V_E$ 和高硒饲料组没有死亡,低 $V_E$ 低硒饲料组的死亡率为31%,低 $V_E$ 高硒或高 $V_E$ 低硒饲料组的死亡率均为3%(Thorarinsson *et al.* 1994)。本实验发现,单一添加高剂量的硒或 $V_E$ ,或者二者同时高剂量添加能够显著提高牙鲆对鳃弧菌的抵抗能力。但是这与在罗非鱼中(Kim *et al.* 2003)的研究结果不一致。给鱼类投喂高剂量的微量元素,其对疾病的抵抗能力有所差异,其中的机理还不清楚。造成差异的原因可能与鱼的品种、大小、病源种类、感染方式、感染剂量以及环境因素等有关。

### 参 考 文 献

- 李义,徐建春,陈星,李红霞. 2005. 维生素E对水产动物免疫功能的影响. 饲料工业, 26(24):44~46  
刘岩,江晓路,吕青,管华诗. 2000. 聚甘露糖酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响. 水产学报, 24(6):549~553  
许群,王安利. 2004. 营养素对水生经济动物免疫机能的影响. 动物营养学报, 16(1):6~11

- 李爱杰,张道波,魏万权,张显娟. 2009. 牙鲆营养需要的研究. 饲料工业,30(16):39~41
- 吴志新,陈孝焯,李丽鹃,覃江凤,王雄,邓薇. 2004. 微生态制剂对银鲫免疫机能的影响. 水利渔业,24(6):67~68
- 周立斌,王安利,张伟,张海发. 2009. 饲料维生素E含量对美国红鱼生长和非特异性免疫的影响. 渔业科学进展,30(1):47~53
- 周立斌,张伟,王安利,张海发,刘付永忠. 2009. 饲料维生素E添加量对花鲈生长、组织中维生素E积累量和免疫指标的影响. 水产学报,33(1):95~102
- 徐辉碧,黄开勋. 1994. 硒的化学、生物化学及其在生命科学的应用. 武汉:华中理工大学出版社,25~35
- 常青,梁萌青,王印庚,高淳仁,王家林. 2005. 饲料Vc对大菱鲆非特异性免疫力的影响. 海洋水产研究,26(5):22~26
- 梁萌青,王家林,常青,柳旭东,麦康森. 2006. 饲料中硒的添加水平对鲈鱼生长性能及相关酶活性的影响. 中国水产科学,13(6):1017~1022
- 蔡中华,邢克智,董双林. 2001. 维生素E对鲤鱼健康的影响. 动物学报,47:120~124
- 薛敏,李爱杰,张显娟. 2004. 牙鲆幼鱼对EPA和DHA的营养需求. 水产学报,28(3):285~291
- 魏志文,杨志强,罗方妮,王为松. 2001. 饲料中添加有机硒对异育银鲫生长的影响. 淡水渔业,31(3):45~46
- Avanzo, J. L., Mendonca, C. X., Pugine, S. M., and Cesar, M. C. 2001. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. Comp. Biochem. Phys. C. 129:163~173
- Blazer, V. S., and Wolke, R. E. 1984. The effects of  $\alpha$ -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. J. Fish Biol. 41:1037~1041
- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J., and Deschaux, P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish Shellfish Immunol. 11:1~13
- Fang, Y., Yang, S., and Wu, G. 2002. Free Radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, 18:872~879
- Gatlin, D. M. III, and Wilson, R. P. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. Journal of Nutrition, 114:627~633
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C., and Secombes, C. J. 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 87:1~13
- Kim, K. W., Wang, X. J., Choi, S. M., Park, G. J., Koo, J. W., and Bai, S. C. 2003. No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture Research, 34:1053~1058
- Lee, M. H., and Shiau, S. Y. 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. Fish Shellfish Immunol. 16:475~485
- Pulsford, A. L., Crampe, M., Langston, A., and Glynn, P. J. 1995. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. Fish Shellfish Immunol. 5(8):631~643
- Satoch, S., Takeuchi, T., and Watanabe, T. 1987. Requirement of Tilapia for  $\alpha$ -tocopheryl. Nippon Suisan Gakkaishi, 53:119~124
- Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S., Yunoki, M., Kanazawa, A., and Hayashida, S. 1999. Metabolism of ursodeoxycholic acid in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture, 179:365~373
- Thorarinnsson, R., Landolt, M. L., Elliott, D. G., Pascho, R. J., and Hardy, R. W. 1994. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture, 121:343~358
- Wise, S. J., Tomasso, J. R., Gatlin, D. M. III, Bai, S. C., and Blazer, V. S. 1993. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 5:177~182