

## 魩仔魚萃取物 (FL5) 對 BALB/c 小鼠免疫調節作用之研究

高淑雲<sup>1</sup>、馮貢國<sup>1\*</sup>、王文政<sup>1</sup>、龔瑞林<sup>2</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所 水產加工組

<sup>2</sup>國立臺灣海洋大學 食品科學系

### 摘要

生鮮魩仔魚經鹽水煮加工後，所產生的含鹽煮液含有相當豐富的生理活性物質，利用電氣透析將該煮液予以脫鹽，再經酸調整 pH 值至 5 產生沉澱物，沉澱物再以 pH 值 7.2 之磷酸緩衝溶液處理及真空凍結乾燥，可得魩仔魚萃取物 (FL5)。本實驗以 FL5 添加至飼料中餵食 BALB/c 小鼠經自由攝食 10 週後犧牲，探討對小鼠的免疫調節作用。結果顯示，在非特異性免疫反應 (Non-specific immune response) 的實驗上，其生長狀況、器官相對重量及攝食利用效率無顯著差異 ( $p>0.05$ )。以含不同劑量之 FL5 0.25、0.5、1% (w/w) 餵食 BALB/c 小鼠，評估小鼠血清中抗體分泌量的表現，其 IgM 濃度與控制組可觀察出有升高的趨勢，但無統計上差異 ( $p>0.05$ )。將致裂殖原 Con A、PHA、LPS 與小鼠脾臟細胞共同培養，以無血清動物細胞培養測定細胞增生能力，結果發現皆有增高趨勢，但以餵食 1% FL5 的試驗組為最佳 ( $p<0.05$ )。在添加 Con A 1.25  $\mu\text{g/ml}$  濃度下，餵食 1% FL5 的小鼠其脾臟細胞增生倍率比控制組高 ( $p<0.05$ )。綜合以上結果顯示，魩仔魚萃取物對 BALB/c 小鼠可能具有免疫調節之作用。

關鍵詞：魩仔魚、萃取物、非特異性免疫反應、抗體、脾臟細胞。

### 前言

水產品所含營養素均衡，且富含生理活性物質<sup>(1-5)</sup>。以水產品加工後所產生的副產物之可利用資源<sup>(6-8)</sup>，作為機能性食品原料，是提高水產品附加價值的良好方式。水產品副產物的來源極廣，其中包括有各種生鮮品、冷凍品、乾製品、水產罐頭的加工及在加工過程中所產生的廢液

及蒸煮液等，這些廢棄物中均含有許多可再利用之物質<sup>(9)</sup>。在水產加工的廢棄物的回收利用方面，以各種加工技術的處理，將水產品副產物製成各種機能性配料及成分，不但可有效的擴展水產品的利用價值，同時可以減少加工廢棄物污染環境<sup>(10)</sup>。

魩仔魚是指體型延長且呈透明狀之魚類幼魚的總稱。台灣所產的魩仔魚有 95% 為鯊科 (Engraulidae) 魚類<sup>(11)</sup>。魩仔魚捕獲後必須立刻

\* 通訊作者 / 基隆市和一路 199 號，TEL: (02) 2462-2101；FAX: (02)2462-9388；e-mail: kkfong@mail.tfrin.gov.tw.

進行加工處理，因為保持良好鮮度是魴仔魚加工最重要的成敗關鍵，一旦原料鮮度降低，魚體便會產生軟化現象，甚至呈現泥濘狀態而喪失商品價值<sup>(12)</sup>。傳統的魴仔魚加工方式大多採用以鹽水煮，因此加工過程中會產生大量含鹽的廢液。漁民通常都把這些廢液當作廢棄物丟棄。然根據高等<sup>(13)</sup>研究指出，利用電氣透析法<sup>(14)</sup>，將這些廢棄的魴仔魚水煮液 (Fish larvae cooking water) 中的鹽分脫除。以無血清動物細胞培養模式進行 *in vitro* 的實驗，結果發現魴仔魚水煮液經脫鹽後，其脫鹽液能促使免疫細胞 HB4C5 增生及分泌 IgM 抗體，亦能活化 UMφ 及 U937 等巨噬細胞。本研究進一步取魴仔魚水煮液為原料，探討其對 BALB/c 雌性小鼠的免疫調節作用。

## 材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 製備魴仔魚萃取物 (FL5) 樣品

魴仔魚煮液由淡水區漁會提供，FL5 之製備流程如 (Fig. 1) 所示，將取回的魴仔魚煮液先以 200 mesh 篩網過濾，除去懸浮固形物後，經 8,000×g (Beckman J-25) 離心 30 分鐘後，以電氣透析 (Micro Acilzer G3) 脫鹽處理。取脫鹽液經 8,000×g 離心 30 分鐘，取上澄清液調整 pH 至 5，迨蛋白質沉澱後，經 12,000×g 離心 30 分鐘，取沉澱部分，添加 pH 7.2 之 20 mM 磷酸緩衝溶液 (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer solution) 均質 (此步驟重覆 3 次)，再以超過濾器 (Amicon) 濃縮。所得溶液進行真空凍結乾燥 (FTS Freeze Dryer Model No. TD-2-372 DURA-DRY)，乾燥粉末即為 FL5。

#### (二) 實驗動物

實驗用小鼠為出生 5 週之雌性 BALB/c 品系小鼠，購自臺大動物中心，置於動物室的不銹鋼籠中馴養，從鼠齡八週齡時開始進行實驗。

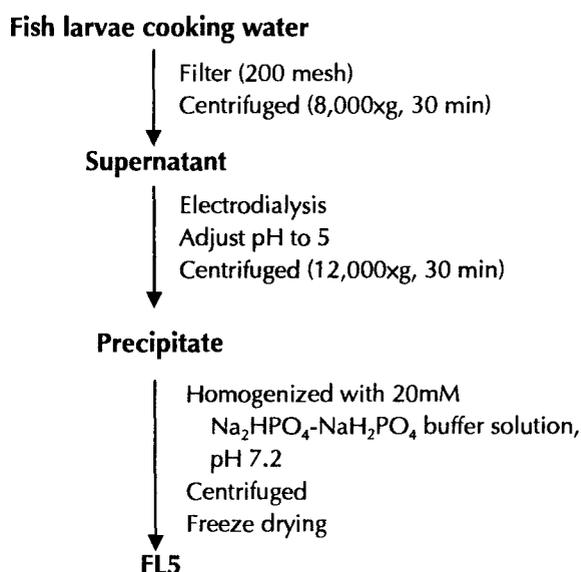


Fig. 1. Procedure for preparing the FL5 from fish larvae cooking water.

### (三) 動物分組

使用 5 週齡之 BALB/c 雌性小鼠為實驗動物，40 隻小鼠經 3 週適應期後，依體重 (每組平均體重約 18.54 g 左右) 隨機分成 4 組。此試驗為非特異性免疫反應，分別餵食基礎飼料之控制組 (Control) 及含 0.25、0.5 及 1% (w/w) FL5 實驗組。

### (四) 動物飼養

小鼠飼養於不銹鋼籠；室溫維持在 25±2°C，光暗循環時間為 12 小時。飼料及飲水均超量供應，使小鼠自由攝食，並每週記錄小鼠體重。

### (五) 飼料配製

試驗進行並餵以基礎飼料 (Rodent laboratory chow 5001 Purina. Co., U.S.A.)，其成分如 Table 1 所示。將基礎飼料經粉碎後，分別添加 0.25、0.5 及 1% (w/w) 之 FL5 樣品，混合均勻後，製成粒狀小丸，經冷風乾燥後，作為各組試驗飼料。

Table 1. Composition of the control diet

Chemical composition	(g/100 g dried weight)
Moisture	10.0
Protein	23.4
Total lipid	4.5
Nitrogen-free extract	49.9
Ash	6.9
Crude fiber	5.3

### (六) 血清、臟器及脾臟淋巴細胞之取得

實驗期滿進行小鼠犧牲，犧牲後。將小鼠移至無菌操作台內，先取出脾臟稱重，去除周圍脂肪並用鑷子將脾臟夾至無菌培養皿中，加入 5 ml 培養液（含 0.5 μg/ml penicillin、0.5 μg/ml streptomycin、1 μg/ml neomycin; PSN 三合一抗生素，購自 Sigma），以玻片刮破外囊一端，再將脾臟置兩玻片間，將脾臟內細胞緩緩擠出。利用細胞密度之差異，將細胞液緩置於已裝有 Ficoll-Paque (Pharmacia 試藥) 梯度離心液之無菌離心管，以 1,000×g 離心 30 分鐘，將紅血球沉澱後，收集試管中白色帶狀懸浮。再以 4°C eRDF (極東試藥) 培養液沖洗並離心 (600×g, 5 min) 細胞三次後，以正常淋巴細胞培養條件培養。無菌狀態下脾臟取出後，再將小鼠移出無菌操作台，以針筒抽取腹大動脈血液，經 2,300×g 離心 15 分鐘後，取血清保存於 -85°C，待日後以 ELISA 方法測定血清中 IgM 抗體含量。同時取出肝臟、心臟、肺臟、腎臟等器官並稱重。

## 二、實驗方法

### (一) 酵素聯結免疫分析法測定免疫球蛋白 (血清中 IgM 抗體測定)

評估 B 細胞能力通常會經由測定抗體生成能力，來作為體液性免疫 (Humoral immunity) 的參考指標<sup>(15)</sup>，因此本實驗以 ELISA 方法測定小鼠血清中 IgM 的濃度，測定前先將 goat

anti-mouse IgM coat with capture Ab (購自 Bethyl) 用 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (pH 9.6) 做 100 倍稀釋後，以 100 μl/well 量加入 96 wells immunoplate (購自 Nunc)，置於 37°C 作用 1 小時。取出後，以含有 0.05% Tween 20 之 PBS 清洗 3 次，將 well 內之水分去除後，將 5% 脫脂奶粉以 350 μl/well 量加入 96 wells immunoplate 中置於 37°C 作用 1 小時。取出後，以 TPBS 含有 0.05% Tween 20 之 PBS (Phosphate buffer saline) 清洗 3 次，將 well 內之水分去除後，以 100 μl/well 量將待測物 (包含小鼠血清及 mouse IgM) 加入 96 wells immunoplate，置於 37°C 作用 1 小時後，將 goat anti-mouse IgM-HRP (購自 Bethyl) 以去離子水做 5000 倍稀釋，以 100 μl/well 量加入 well 內，置於 37°C 作用 1 小時。取出後，以 TPBS 清洗 3 次，將 well 內之水分去除後，再將 peroxidase solution ABTS (KPL 試藥) 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) 以 100 μl/well 量加入 well 內，置於 37°C 作用 15 分鐘後，加入 1.5% oxalic acid (Sigma 試藥) 溶液 (100 μl/well) 終止反應，並測 410 nm 吸光值。

### (二) 脾臟細胞增生試驗 (MTT assay)

觀察各淋巴細胞群被刺激活化的程度，可以透過細胞增生試驗 (Cell proliferation assay) 來加以評估<sup>(16)</sup>。如將小鼠脾臟細胞與致裂殖原 (Mitogen)，Concanavalin A (Con A; Sigma 試藥)、Phytohemagglutinin-p (PHA-p; Sigma 試藥) 及 Lipopolysaccharide *E. coli* 055:B5 (LPS; Sigma 試藥) 共同培養，分析脾臟細胞中淋巴細胞增生情形。致裂殖原 Con A、PHA 主要是刺激脾臟細胞中 T 淋巴細胞的增生，當以 LPS 作為致裂殖原時，其主要為刺激脾臟細胞中 B 淋巴細胞的增生作用<sup>(17)</sup>。細胞增生試驗，參考 Kong *et al.*<sup>(18)</sup> 測定細胞的方法，並依實驗需要再作修正與調整，首先取 Con A (20 μg/ml)、PHA

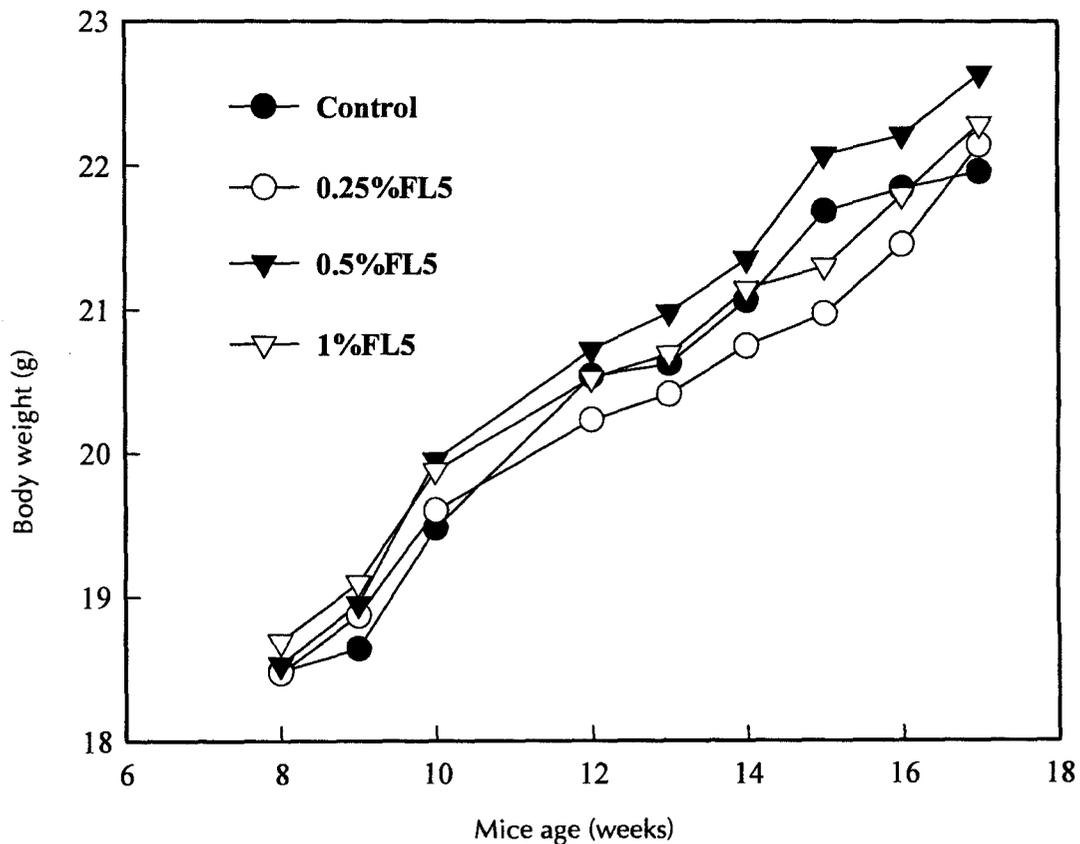


Fig. 2. Effect of extracts (FL5) from cooking water of fish larvae on body weight change in mice.

(100  $\mu\text{g/ml}$ ) 及 LPS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 各 20  $\mu\text{l}$ ，在 96 well 培養盤內作連續 2 倍稀釋後，再將脾臟細胞密度調整為  $2 \times 10^6$  cells/ml，每個 well 加入 100  $\mu\text{l}$  脾臟細胞。置於 37°C，培養 48 小時後，添加 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT 購自 Sigma)。反應 4 小時後，測定其 570 nm 吸光值。另外本實驗除了以 FL5 添加於飼料中餵食小鼠外，另外取 FL5 (60  $\mu\text{g/ml}$ ) 與小鼠脾臟細胞共同進行體外培養，以了解 FL5 是否能對細胞產生活化作用。

### (三) 統計分析

實驗測定結果以平均值 $\pm$ 標準偏差 (Mean  $\pm$  S.D.) 表示，數據之統計分析是採用 Duncan's multiple range test 分析各組間的差異性，其顯著水準 (Significant level) 設為 0.05。以 SAS window 6.12 版套裝程式軟體於電腦中進行統計分析。

## 結果與討論

### (一) 實驗小鼠的體重、攝食情形、生長狀況及器官相對重量

經 10 週的飼養後，各組小鼠的體重均維持穩定上升的趨勢 (Fig. 2)，四組小鼠，由原平均體重 18.54 g 成長至 21.95-22.64 g，平均體重成長約 3.47-4.11 g。攝食量與攝食利用效率，試驗組及控制組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。整體而言 FL5 的添加，並不會影響正常小鼠的攝食情形及攝食利用效率。飼養期間小鼠毛色光滑、平順且生長狀況均呈現健康、正常的狀態。經餵食試驗飼料 10 週後，可能會造成各組間器官重量的改變，因此以器官相對重量 (器官重量相對於體重之百分比) 來表示，對 10 週的攝食，四組小鼠的器官相對重量方面，並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，表示添加 FL5 對小鼠器官並不會造成影響。

Table 2. Effect of extracts (FL5) from cooking water of fish larvae on the Con A, PHA and LPS test of spleen proliferation\*

Group	Lymphocyte proliferation (Stimulation index)		
	Con A (1.25 µg/ml)	PHA (50 µg/ml)	LPS (25 µg/ml)
Control	0.26 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.13 ± 0.00 <sup>b</sup>
0.25% FL5	0.35 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>
0.5% FL5	0.33 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>
1% FL5	0.47 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>

\*Results are expressed as mean ± S.D. for 6 mice per each group. Values in the same column with different superscripts letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### (二) 餵食 FL5 對小鼠抗體生成之影響

抗體由漿細胞 (Plasma cell) 合成，其中 IgM 大部分存在於血管內，可與抗原結合形成巨大 complex，使之無法侵害人體，另有活化補體 (Complement) 及幫助吞噬細胞 (Phagocyte) 辨識抗原的功能<sup>(19)</sup>。在非特異性免疫反應中，小鼠體內血清中抗體 IgM 的變化，分別為 0.32、0.33 及 0.33 mg/ml，控制組則為 0.31 mg/ml (Fig. 3)，隨著 FL5 含量濃度的增加，雖未達顯著差異 ( $p > 0.05$ )，但可觀察出有升高的趨勢。對於 FL5 在促進抗體生成能力的表現，其投予劑量的

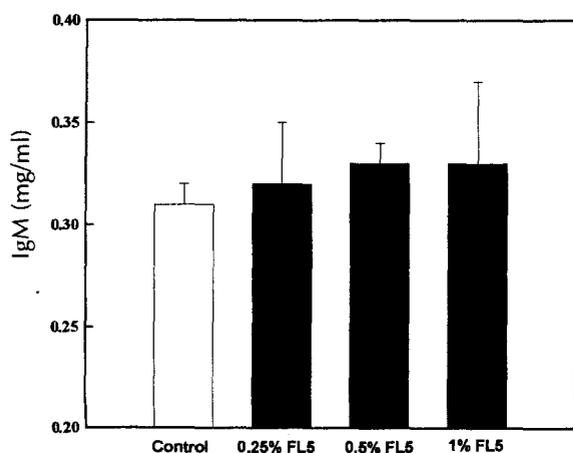


Fig. 3. Effect of extracts (FL5) from cooking water of fish larvae on serum IgM concentration in female BALB/c mice. Each column represents the mean ± S.D. for 3-5 mice.

多寡與有效成分之間的相關性，此部分仍有待進一步的研究。

### (三) 餵食 FL5 對小鼠脾臟細胞增生之影響

脾臟是人體最大的免疫器官，脾臟內除含有 T 淋巴細胞、B 淋巴細胞及漿細胞，亦具有與淋巴結相似的功能<sup>(20)</sup>。在脾臟淋巴細胞增生試驗中以 LPS 25 µg/ml 作為刺激原時，餵食 1% FL5 的試驗組顯著的優於控制組，當以 Con A 1.25 µg/ml 及 PHA 50 µg/ml 作為刺激時，餵食 0.25% 及 0.5% FL5 的小鼠，脾臟細胞逐漸呈現增加的趨勢，這個結果顯示餵食不同劑量的 FL5，對於細胞增生情形具有劑量依存性的關係。整體而言脾臟細胞增生情形皆以餵食 1% FL5 為最佳 (Table 2) ( $p < 0.05$ )。由以上結果得知餵食 FL5，可能可以活化小鼠脾臟細胞中 T、B 淋巴細胞的增生。在 Con A 1.25 µg/ml 濃度下，餵食 FL5 的小鼠其脾臟細胞增生倍率曲線 (Fig. 4) 均比控制組有較高的趨勢，特別是 1% FL5 組明顯增加 ( $p < 0.05$ )。然而添加較高濃度的 Con A (20 µg/ml) 後，四組細胞增生效果反而降低，對於這個結果我們推測可能與細胞的受器 (Receptor) 或細胞內訊息傳遞物質過度活化後 down regulation 有關。除此之外，當添加 FL5 (60 µg/ml) 與脾臟細胞一同進行體外培養時，亦有促進增生

的效果，而這個結果表現在以餵食 1% FL5 的試驗組，出現明顯的提昇能力( $p < 0.05$ ) (Fig. 5)。由顯微鏡下觀察細胞型態，發現添加 FL5 可以使小鼠脾臟細胞大量增生及凝集 (Fig. 6)，此現象可能是 FL5 經由結合某 T 淋巴細胞的受器，進而活化了細胞。

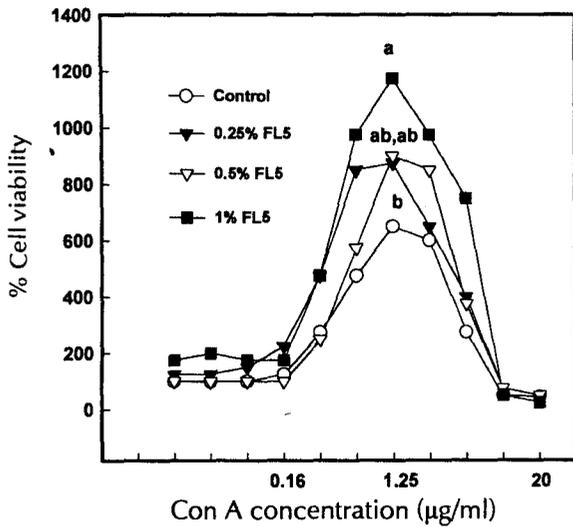


Fig. 4. Con A induced proliferation of spleen cells of female BALB/c mice. Results are expressed as means for 6 mice. Values different superscripts letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

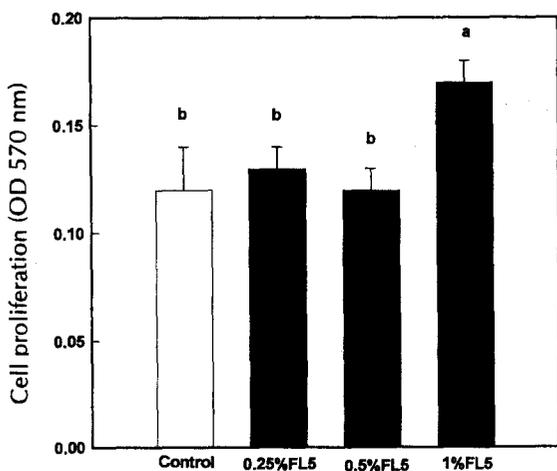


Fig. 5. Effect of extracts (FL5) from cooking water of fish larvae on spleen cell proliferation in mice. Each column represents mean  $\pm$  S.D. for 6 mice. Values with different superscripts letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

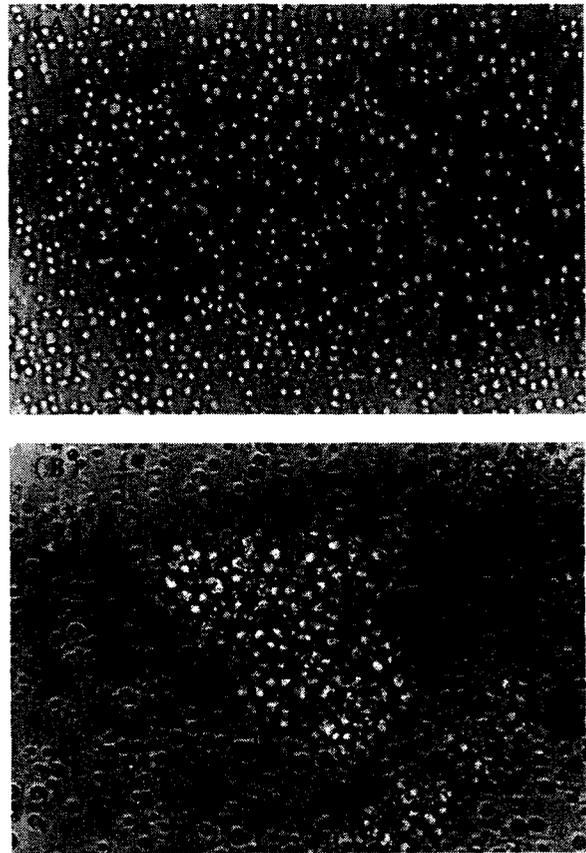


Fig. 6. Cell proliferation and aggregation on spleen cells. (A) untreated cells; (B) cells treated with FL5 (60 µg/ml) for 48 h.

## 結論

綜合以上動物試驗結果發現，BALB/c 小鼠攝食 1% 魷仔魚萃取物 (FL5) 10 週後，能促進小鼠脾臟細胞增生，並且使淋巴細胞對致裂殖原的感受性增強，推測餵食 1% FL5 對小鼠體內的免疫系統有活化作用。

魷仔魚萃取物 (FL5) 雖為加工所產生的副生物質但卻含有具免疫調節功能的生理活性物質，因此如能應用在發展機能性食品的素材上，必能提高其附加價值。

## 參考文獻

1. 陳聰松 (1999) 介紹幾種水產食品的特殊機能. 潮訊, 109:4-11.
2. Francis, F. and Z. L. Kong (1994) Purification and

- characterization of extracted abalone (*Haliotis discus*) bioactive protein. *Basic. & Applied Aspects*, 6: 503-508.
3. 龔瑞林, 林岳輝, 馮貢國 (1996) 文蛤萃取物對免疫細胞的調節作用. *中華民國營養學會雜誌*, 21(4): 421-431.
  4. Kay, R. A. (1991) Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 30: 555-573.
  5. Owusu, A. M. (2001) Nutritional status and humoral immune response in Ghanaian children. Comparing the effects of supplementing a traditional rice diet with fish powder and fish powder plus. Nucleotides from fish-DNA. Institute of Nutrition, Directorate of Fisheries, University of Bergen, Bergen (Norway). 77 pp.
  6. 黃志永, 李翠霞, 孟慶祥 (2002) 以烤鰻下腳料中提取測定牛磺酸的研究. *食品工業科技*, 23: 73-74.
  7. 饒家麟, 柯文慶 (2001) 鮪魚蒸煮液蛋白質水解物之抗氧化特性. *台灣農業化學與食品科學*, 39(5): 363-369.
  8. 王勁, 楊鋒, 張建雄, 沈翔, 戴關海, 周志平 (2000) 鯊骨粉抗癌增效及調節免疫功能的研究. *中國海洋藥物*, 2(74): 14-17.
  9. 鄭世徽, 林信吉 (1993) 水產加工廢棄物之高度利用. *水產食品*, 6: 79-99.
  10. 陳俊成 (2001) 功能性水產蛋白. *食品資訊*, 184: 47-51.
  11. 陳宗雄 (1995) 台灣省魷仔漁業問題與管理—I 魷仔漁業問題之探討. *水產研究*, 3(2): 95-110.
  12. 陳聰松 (1987) 魷仔魚—物小而美老少咸宜. *農業周刊*, 13(50): 17-20.
  13. 高淑雲, 馮貢國, 吳珮君, 陳聰松, 龔瑞林 (1999) 魷仔魚水煮液加工條件對細胞免疫活性之影響. *水產研究*, 7(1&2): 95-105.
  14. 陳再發, 高雪卿, 藍惠玲, 邱思魁 (1994) 電氣透析法對魷及蝦煮液之脫鹽效果與呈味成分回收之探討. *水產研究*, 2(1): 57-68.
  15. 雍建輝, 林炯熙, 周武屏 (1992) 抗原、抗體、補體與免疫反應(上). *當代醫學*, 19(5): 359-369.
  16. 詹伊琳 (2001) T細胞與B細胞之概述. *食品工業*, 22(8): 27-33.
  17. Osamu, H., K. Toshimitsu, and O. Yoshiyuki (1994) Enhancement of antibody in mice by dietary *Spirulina platensis*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 40: 431-441.
  18. Kong, Z. L., H. Murakami, and K. Shinohara (1992) Effect of extracts of some vegetables on proliferation and Antibody secretion of human – human hybridoma cell lines cultured in serum-free medium. *Nippon Shokohin Kogyo Gakkaishi*, 39: 79-87.
  19. Davies, D. R. and H. Metzger (1983) Structure basis of antibody function. *Annu. Rev. Immunol*, 1: 87-117.
  20. 金宗濂, 文鏡, 唐粉芳, 陳文 (1995) 功能食品評價原理及方法. 北京大學出版社.

## Effect of Extracts (FL5) from Cooking Water of Fish Larvae on Immune Modulation of BALB/c Mice

Shwu-Yun Gau<sup>1</sup>, Kuong-Kou Fong<sup>1\*</sup>, Weng-Cheng Wang<sup>1</sup> and Zwe-Ling Kong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Seafood Technology Division, Taiwan Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

### Abstract

The physiology bioactive factor, FL5, was obtained from salted cooking water of fish larvae. BALB/c mice were then fed with pellets that contained 0.25, 0.5, and 1% (*w/w*) dosages of FL5. The feeding was *ad lib* for 10 weeks. The results showed that the pellets with the FL5 did not affect the body weight, fed efficiency and immunoglobulin M (IgM) concentration of mice. No significant differences in IgM levels were observed between the FL5 group and the controlled group. Mice fed with the 1% group had increased proliferation of spleen cells. Results from this study suggest that the FL5 may regulate the immune system in BALB/c mice.

Key words: Fish larvae, Extracts, Non-specific immune response, Antibody, Spleen cell.

---

\*Correspondence: Seafood Technology Division, Taiwan Fisheries Research Institute, 199 Ho-Ih Road, Keelung 202, Taiwan. E-mail: kkfong@mail.tfrin.gov.tw.