

***N*-acetylcysteine (NAC)이 어류의 비특이적 면역 parameter인 호흡폭발 및 lysozyme활성에 미치는 영향**

안재영 · 이한나 · 박경일 · 김종연 · 이정열 · 박관하[†]

전라북도 군산시 미룡동 산 68 군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과 · 해양생명과학과

Effects of *N*-acetylcysteine (NAC) on non-specific immune parameters, respiratory burst and lysozyme activities, in different fishes

Jae Young An, Han Na Lee, Kyung Il Park, Jong Yeon Kim, Jeong Yeol Lee and Kwan Ha Park[†]

Departments of Aquatic Life Medicine and Aquaculture & Aquatic Sciences, Kunsan National University, Gunsan City, Jeonbuk, Korea 573-701

It has been reported that various anti-oxidant substances stimulate non-specific immune responses in fishes. In this study it was examined whether *N*-acetylcysteine (NAC), an anti-oxidant glutathione (GSH) precursor, can modulate non-specific immune parameters in 8 different fishes. NAC was intraperitoneally administered at 10 mg/kg to catfish (*Silurus asotus*), loach (*Misgurnus mizolepis*), common carp (*Cyprinus carpio*), crucian carp (*Carassius carassius*), eel (*Anguilla japonica*), snakehead (*Channa argus*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mullet (*Mugil cephalus*). Forty-eight hours later, chemiluminescence (CL) response of head-kidney leukocytes and serum lysozyme activity were assessed. In all fishes except crucian carp and loach, CL responses were amplified by NAC. Lysozyme activity was increased by NAC in all fish species but not in tilapia. This result suggests that NAC stimulates non-specific immune responses in various species, and that such effects may have beneficial significance in aquaculture for practical utilization.

Key words : *N*-acetylcysteine (NAC), Non-specific immune parameters, Chemiluminescence (CL) response, Lysozyme activity

특정 생물의 면역기능은 면역세포내의 항산화상태 (anti-oxidant status), 즉 항산화성분자-산화성분자의 농도 균형에 매우 예민하게 반응한다. 왜냐하면 모든 면역세포에서의 세포막 지질, 단백질, 핵산, 신호전달 및 유전자발현 등의 안정성과 기능성이 그 항산화 상

태에 따라 결정되기 때문이다 (Meydani *et al.*, 1995). 또한 몇 종류의 면역세포는 방어진전의 하나로서 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 생산하기 때문에, 이들 세포내에는 자체에 대한 방어진전으로써 항산화분자가 고농도로 존재하고 있다 (Coquette *et al.*, 1986). 이러한 관련성 때문에 어류에 항산화물질을 투여하면 면역기능, 특히 비특이적 면역능이 증강됨이 vitamin E (Kiron *et al.*, 2004; Ortuno *et al.*, 2000), vitamin C (Ai *et al.*, 2006; Eo and Lee, 2008), 천연

[†]Corresponding author: Kwan Ha Park

Tel : +82-63-469-1885,

Fax : +82-63-63-469-1885

email : khpark@kunsan.ac.kr

항산화물질 (Thawonsuwan, 2010; Enis Yonar *et al.*, 2011) 등을 이용한 연구에서 증명된 바가 있다.

합성 저분자물질인 *N*-acetylcysteine (NAC)은 세포내에서 cysteine으로 가수분해되어 glutathione (GSH) 생합성의 전구물질로 작용함으로써 GSH의 생성을 도울 뿐 아니라, 간접적으로는 GSH의 재생 (산화형 GSSG에서 환원형 GSH로의 변환)에 필요한 효소인 glutathione reductase의 활성화도 촉진한다 (Banachlocha, 2001). 따라서 이 두 가지 기전은 NAC의 투여 후 세포내의 환원형 GSH농도를 증가시키게 된다 (Issels *et al.*, 1988; Phelps *et al.*, 1992). 이때 생성된 GSH는 항산화 물질로서 ROS를 포함한 여러 가지 산화반응성 독성물질에 대한 방어 물질로서 작용한다 (Bakker *et al.*, 1994; Hoffer *et al.*, 1996; Palevsky *et al.*, 2006; Prescott *et al.*, 1977).

다양한 종류의 항산화물질이 어류의 면역기능을 증강시킴이 부분적으로 증명되어 있고 NAC가 항산화작용이 있으므로 NAC나 GSH가 면역증강효과가 있을 가능성을 시사한다. 실제로 NAC의 면역증강효과가 포유류 실험동물과 (Ferrandez *et al.*, 1999; Puerto *et al.*, 2002; Victor *et al.*, 2003)와 인간 (Arranz *et al.*, 2008; Venketaraman *et al.*, 2008)에서는 보고되어 있다. 그러나 어류에서는 NAC의 효과에 대해서는 검토된 바가 전혀 없다.

본 연구에서는 어류에서 NAC가 비특이적 면역기능을 증가시키는지를 검토하기 위해, NAC 투여 후 비특이적 면역지표인 두신백혈구 내 ROS의 생성능인 chemiluminescence (CL) 반응과 혈청중의 라이소자임 활성을 총 8종의 어류에서 측정하였다.

재료 및 방법

실험용 어류 및 *N*-acetylcysteine의 투여

실험어는 인근 양식장에서 공급받아 사용하였다

(Table 1). 실험실에서 1주간 순치시킨 후 외관상 질병의 증세가 없는 건강한 개체만을 사용하였다. 어류는 수온 22.1±1.0°C로 일정하게 유지하였으며 지속적으로 폭기하여 산소를 공급하였다. *N*-acetylcysteine (NAC)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 녹여서 사용하였다. 어류에 투여시 NAC의 효과를 여러 어종에서 시험하기 전에, 메기를 이용한 예비시험을 통해 어류 체중 당 NAC 10 mg/kg의 용량이 chemiluminescence (CL) 반응을 NAC 투여 48시간 후에 최대효과를 발휘함을 확인한 후에 모든 어종에서의 시험을 수행하였다. NAC는 복강내로 마리당 0.1 ml씩 투여하였으며, 대조군의 어류에는 동일량의 PBS를 투여하였다.

Table 1. Fish statistics used in this experiment

Fish Species	Weight (g)	Length (cm)	n
Catfish (<i>Silurus asotus</i>)	124.1 ± 18.9	28.4 ± 8.0	6
Loach (<i>Misgurnus mizolepis</i>)	19.8 ± 12.3	12.1 ± 3.2	6
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	324.9 ± 24.2	34.3 ± 8.9	6
Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	301.2 ± 18.9	28.8 ± 10.1	6
Eel (<i>Anguilla japonica</i>)	131.2 ± 14.1	39.3 ± 2.3	6
Snakehead (<i>Channa argus</i>)	245.5 ± 15.1	38.2 ± 5.6	6
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	167.6 ± 29.5	14.3 ± 7.1	6
Mullet (<i>Mugil cephalus</i>)	171.8 ± 28.3	37.4 ± 4.7	6

두신 백혈구의 chemiluminescence (CL) 반응

어류로부터 두신을 무균적으로 분리하여 heparin (10 U/ml, Sigma), streptomycin (100 U/ml, Sigma)과

penicillin G (100 μ g/ml, Sigma)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 넣고 가는 nylon 망을 이용하여 세포들을 분리하였다. 분리된 두신 세포는 34/51% Percoll density gradient (Sigma) 용액에 중층하고 4°C에서 400 × g로 30분간 원심 분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 분리하였다. DMEM으로 400 × g에서 5분간 원심분리과정을 2번 반복함으로써 불순물을 제거하였다. 세포의 생존을 판정은 0.5% trypan blue (Sigma) 용액을 이용하였으며, 모든 시험군에서 분리된 세포들의 생존율은 98.0% 이상이었다. CL 반응의 시험에 사용할 백혈구 현탁액의 세포수를 최종적으로 0.5 × 10⁶ cell/ml로 조절하였다. 분리한 백혈구 세포는 불투명 백색 바탕의 96-well plate에 200 μ l씩 넣은 후 2시간 동안 25°C에서 미리 안정화를 시켰다. 검출시약인 형광 luminol은 10mM의 농도로 조제(봉산에 용해한 후 NaOH로 pH 조절, 서 등, 2004)하여 25 μ l를 백혈구 현탁액이 든 well plate에 가하고 10분간 25°C에서 pre-incubation하였다. CL반응의 야기를 위해 opsonin화된 10 mg/ml의 zymosan (Sigma) 25 μ l을 백혈구에 첨가한 직후 automatic photoluminometer (MPL2 model, Berthold Detection Systems, Hamburg, Germany)를 사용하여 40분간 연속적으로 CL반응을 측정하였다 (Stolarek, 2002). CL 반응의 크기는 relative luminescence unit (RLU)/sec의 단위로 산출하였다. 별도로 zymosan의 opsonin화를 위해 미리 시험에 사용할 종류와 동일한 각 어종으로부터 혈청을 분리하고 zymosan을 10 mg/ml이 되도록 혼합하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 이 과정을 통해 opsonin화된 zymosan을 원심분리과정을 통해 PBS로 3회 세척 (600 × g 5분) 후 다시 10mg/ml 되도록 재희석 하여 사용하였다(Rodriguez *et al.*, 2008).

혈청의 lysozyme 활성

어류를 MS-222로 마취하고 미부정맥으로부터 혈액을 채취해 800 × g에서 20분간(4°C) 원심분리하여 혈청을 얻었다. *Micrococcus lysodeikticus* 현탁액 (Sigma, 0.2 mg/ml로 Na-phosphate buffer, 50 mM, pH 6.2에 조제) 800 μ l와 혈청 200 μ l를 혼합하여 25°C에서 반응시키면서 530 nm에서 흡광도의 변화를 연속적으로 측정하였다. 효소활성은 units/ml로 나타내었으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값으로 계산하였다 (Chandana *et al.*, 1965).

통계처리

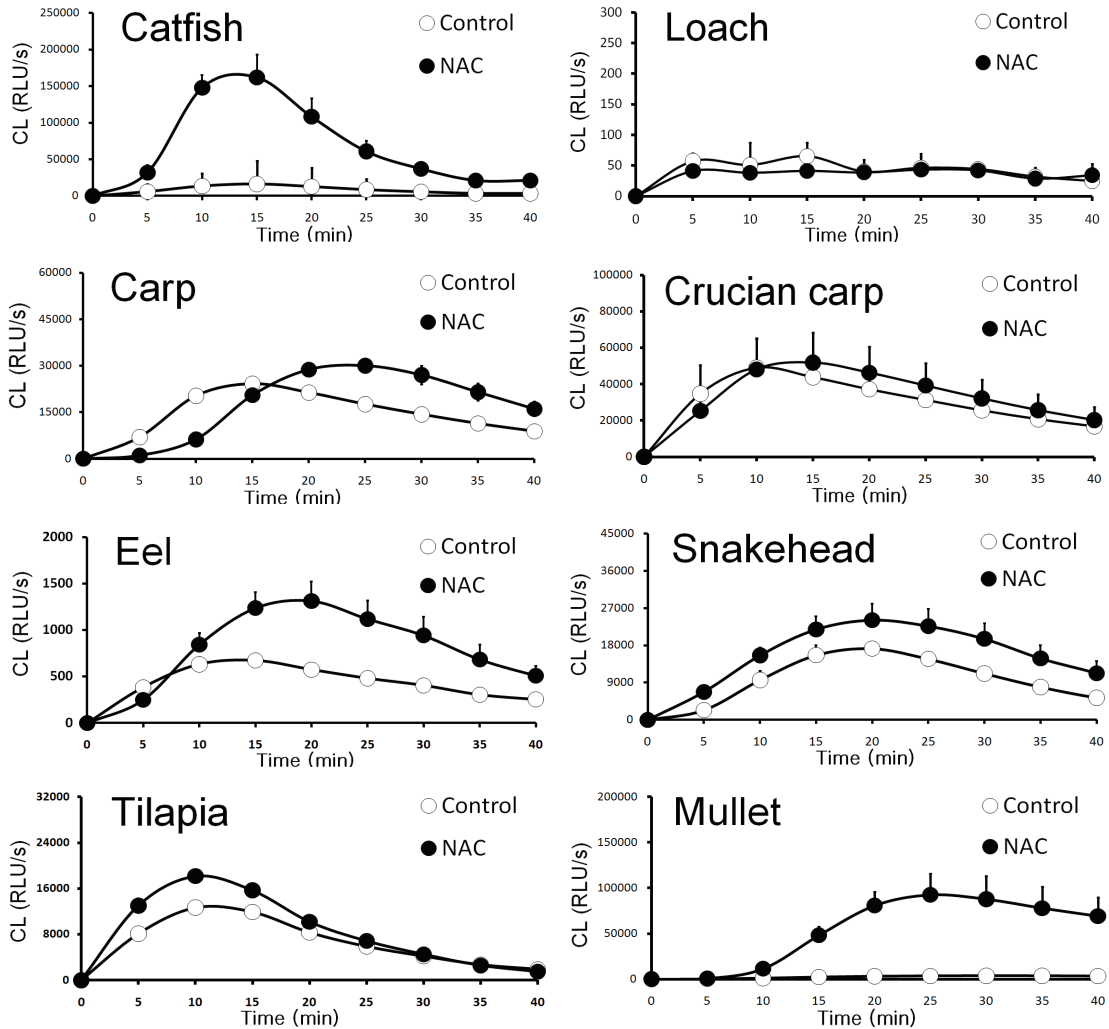
Data는 mean ± S.D.로 표현하였으며, 개별군간의 차이의 유의성은 un-paired t-test를 이용하여 검정하였다. 이 때 P<0.05인 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

Fig. 1에서는 분리한 두신백혈구 배양세포에서 zymosan 자극을 시작한 후 나타는 CL반응의 경시적 변화와 NAC의 투여 효과를 보여주고 있다. 또한 Table 2에서는 이들 반응의 peak값의 통계학적 유의성을 검정한 결과를 보여주고 있다. 모든 어류의대조군에서 백혈구를 zymosan으로 자극함으로써 15분 전·후에서 peak를 이루고 40분 정도에서도 자극 전의 수준보다는 약간 높은 양상의 CL반응이 나타났다 (Fig. 1). 이 CL반응은 NAC을 투여한 군에서는 증가하는 것이 시험한 8종 중 6종, 즉 메기 (catfish), 잉어 (carp), 뱀장어 (eel), 가물치 (snakehead), tilapia 및 송어 (mullet)에서 관찰되었으나 미꾸라지, 붕어에서는 NAC의 증강효과가 관찰되지 않았다. 특히 미꾸라지에서는 대조군 및 NAC군 모두에서 아주 미약한 반응

을 보이면서 NAC 투여군의 peak CL값이 대조군 보다 오히려 낮은 결과를 얻었고 (Table 2), 붕어의 경우에는 대조군과 NAC군이 동등한 수준의 반응을 나타내었다. 특이하게도 잉어의 경우에는 NAC투여로 인해 반응은 증강되었으나 peak 시간이 15분에서 25분

정도로 지연되는 현상을 보여주었다. Fig. 2에서는 이들 8종의 어류 혈청내의 lysozyme의 활성을 보여주고 있다. 이 결과에서 보듯이 tilapia를 제외한 모든 어종에서 NAC 투여에 의해 lysozyme 활성이 증가함이 관찰되었다.



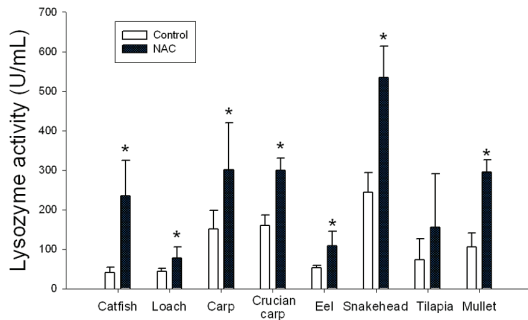
n=6

Fig. 1. Effects of NAC treatment on CL responses in different fishes.

Table 2. Effects of NAC on peak chemiluminescence level in different fishes.

Fish	Peak Chemiluminescence Levels	
	Control	NAC
Catfish	16636.4 ± 536.9	173526.2 ± 29735.4*
Loach	135.4 ± 6.6	104.8 ± 16.8*
Carp	25130.5 ± 1949.5	30055 ± 2031.0*
Crucian carp	49467.1 ± 9787.3	53780.1 ± 18355.0
Eel	690.0 ± 73.2	1369.4 ± 242.7*
Snakehead	17557.9 ± 1609.3	25355.2 ± 3469.4*
Tilapia	12903.2 ± 901.0	18356.6 ± 808.7*
Mullet	3802.0 ± 491.1	89473.0 ± 23580.8*

*Statistical significance between control and NAC groups (p<0.05). n=6.



*Statistical significance (p<0.05) between control and NAC groups. n=6.

Fig. 2. Effects of NAC on serum lysozyme activity in different fishes.

고찰

8종의 어류에서 평가한 이 실험에서 대부분의 어류에서 항산화제 GSH의 전구물질인 NAC를 투여하면, 어종별로 다소 차이는 있었지만 비특이적인 면역기능의 parameter인 CL 반응 및 lysozyme활성을 증가시키는 효과가 있음을 발견하였다. NAC의 이런 효과

가 특정 어종에 국한된 현상인지 아닌지는 아직 분명하지 않지만 시험한 8종의 어류 중 적어도 6종에서 동일한 방향의 변화가 발견된 것을 고려하면 어류에서의 일반적 현상일 가능성이 제시된다. 이 논문에서는 10 mg/kg 단회 투여 및 48시간에서의 반응만을 제시하고 있으나, 처음 분석조건을 설정하는 과정에서는 투여 후 분석 시점과 용량을 다양(투여 후 6, 24, 48, 96 및 240시간 후 분석, 1, 10 및 100 mg/kg body weight 용량)하게 설정하여 시험한 후 10 mg/kg 와 48시간에 대한 평가를 수행하였다.

호흡폭발(respiratory burst)반응이나 혈청 내 lysozyme 활성은 어류에서 비특이적 면역능 (innate immunity)의 척도로서 사용되어 왔다 (Bols *et al.*, 2001). 호흡폭발반응은 탐식세포 (granulocytes, monocytes 및 macrophages)가 산소분자(O₂)를 환원하여 superoxide radical ($\cdot O_2^-$)을 생성하는 반응을 지칭하며, 본 연구에서는 CL 반응의 크기를 측정하여 그 수준을 평가하였다. 이 반응은 세포내에 존재하는 HADPH oxidase에 의해 수행되며 반응의 결과 생성된 superoxide는 자발적으로 또는 추가적인 효소에 의해 과산화수소 (H₂O₂), hydrochlorous acid (HOCl), hydroxy radical ($\cdot OH$) 및 singlet oxygen (¹O₂) 등 통칭 반응성산소종 (reactive oxygen species, ROS)를 생성한다. ROS는 생분자와의 강력한 반응성 때문에 어류 병원성 기생생물을 용이하게 살상하며 이 또한 lysozyme과 더불어 비특이적인 항병성의 지표로 사용된다 (Babior, 1999). ROS와 luminol을 반응시켜 생성되는 형광물질의 양을 측정하는 CL 반응법은 민감도가 매우 높고 연속적으로 측정할 수 있는 장점이 있기 때문에 비특이적 면역능의 평가에 많이 활용되고 있다 (Roszell and Anderson, 1994). 본 연구에서 발견한 것은 NAC 투여로 CL반응이 대부분의 어류에서 증가하였지만, 일부에서는 변화하지 않았고 (붕어), 미꾸라지에서는 오히려 약간

의 감소하는 현상이 발견되었다. 한편 lysozyme 활성은 모든 어류에서 NAC로 인해 증가하였지만 틸라피아에서는 평균값에서 증가경향은 나타났지만 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 따라서 이 연구에서 분석한 두 종류의 parameter는 공히 비특이적 면역능의 지표이지만 어종별로 반응 유발기전이 다소 상이하며 이들의 활성 항상 동일한 방향으로 변화하지는 않음을 의미한다 (Caruso *et al.*, 2011; Christyapita *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2008). 특히 본 연구에는 단지 1개 수준의 NAC의 투여 용량과 투여 후 반응평가 시점이 제한적이었기에 전반적인 현상을 파악할 수는 없는 부분적 한계가 있는 실험설계였다.

ROS는 세포 내에서 방어작용을 위해 꾸준히 형성되고 있으며 이러한 ROS의 축적이나 해로운 산화작용을 막기 위해서 세포내에서는 ROS제거 system도 동시에 작동하고 있다. Thiol기 (-SH)를 함유하는 GSH는 환원력을 가지고 있어서 ROS에 전자를 제공함으로써 ROS를 제거한다 (Winterbourn and Hampton, 2008). 또한 대표적인 free radical scavenger 들인 vitamin E, ascorbic acid, β -carotene 및 uric acid 등은 GSH와 세포내에서 상호 보완하는 작용을 발휘함으로써 인해 한 물질의 존재는 다른 물질의 소모를 방지하는 작용 (reserve effect)도 있다 (Ghiselli *et al.*, 2000).

본 연구에서는 NAC의 효과를 *in vivo*에서 평가한 것으로서, NAC 투여 후 CL반응의 증가, 즉 ROS의 생성능이 강화되는 현상을 발견하였다. 그러나 NAC나 GSH 자체는 ROS를 소거하는 기능이 있기 때문에 배양세포에 NAC를 직접 가하면 *in vitro*에서는 오히려 CL 반응을 억제하게 된다 (Stolarek *et al.*, 2002). 따라서 NAC는 임상적으로 GSH가 감소하는 조건이나 산화적 stress가 높아지는 병리적 상황이나 ROS의 증가가 관련된 질환들에 효과가 있음이 보고되었다 (Ferrari *et al.*, 1995; Sener *et al.*, 2003). 이런 CL감소

현상과는 달리 본 연구를 통해서 NAC가 *in vivo*에서 투여하였을 때 비특이적 면역능의 지표인 식세포의 ROS 생산능을 증강시킴을 발견하였으며 이는 *in vivo*와 *in vitro* 시험계에서 얻어지는 여러 항산화작용 물질들에서 발견되는 상반되는 현상과 같은 맥락으로 해석될 수 있을 것이다.

이 연구에서 시험한 8종의 어류 중 7종에서 혈청내 lysozyme의 활성이 증강됨을 관찰하였다. Lysozyme은 세균의 세포벽에 존재하는 glycoside 결합을 직접적으로 절단함으로써 어병세균의 살상을 유발 (Yano, 1996)할 수 있고 대부분 어류의 조직과 분비물에 존재함으로써 어체의 방어에 있어서 보편적이면서도 매우 중요한 비특이적 면역기능으로 인식되고 있다 (Alexander and Ingram, 1992). Lysozyme활성은 보편적인 체액성 비특이적 면역지표이나 어종별 lysozyme의 증가현상이 동일하지는 않은 것이 사실 (Magnaldóttir, 2006)이며, 이 연구에서도 tilapia에서는 증가반응이 미약 (통계적 유의성 없음)하였다. 어종별 차이는 일차적인 screening수준에서의 본 연구에서는 용량, 분석 timing, 수온 등 가능성 있는 넓은 범위의 투여용량과 사육조건을 설정하지 못하였기에 발생하는 차이점으로 판단된다.

항산화작용을 가진 NAC가 다른 생물 시험계에서 비특이적 면역능 지표들을 증강시키는 것이 보고 (Ferrandez *et al.*, 1999; Puerto *et al.*, 2002; Victor *et al.*, 2003; Arranz *et al.*, 2008; Venketaraman *et al.*, 2008) 되어 있지만, 어류에서 이 지표들을 변화시키는 현상에 대한 발견은 중요한 의미를 갖는 것으로 생각된다. 그러나 여기에서 관찰된 현상들이 NAC가 항산화물질인 GSH로 전환되어 나타난 현상인지 아니면 NAC 자체가 발휘하는 작용인지 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다. 특히 본 연구에서는 투여한 NAC의 용량과 효과 평가시점에 대해 하나

의 조건만을 평가하였기 때문에, 어종별 최적의 용량이나 효과발휘 시간에 대한 추가적인 연구가 있어야 할 것이다.

이 결과를 종합하면 NAC가 많은 어종에서 질병에 대한 저항성을 증강시키는 효과를 발휘할 가능성을 시사하기 때문에, 이미 인간에서 사용되어 안전성과 흡수성이 확보 (De Caro *et al.*, 1989; Tsikas *et al.*, 1998)된 이 저분자 물질을 어류양식에서도 기능성 성분으로서의 활용성을 고려해 볼 가치가 있을 것이다. 특히 추가적으로 병원생물로 감염시킨 어류에서의 평가를 한다면 이 가능성은 확인될 수 있을 것이다. 또한 양식 현장에서의 적용하기 위해서는 어류에서의 안전성과 흡수성이 확보되어야 할 것이지만, 포유류인 mouse에 복강으로 500 mg/kg (Rocksen *et al.*, 2000)로, 또 인체에서 치료목적으로 정맥내 150 mg/kg 단회 투여 후 50 mg/kg로 매일 반복 투여 (Paterson *et al.*, 2003)하는 방법이 보고되고 있는 것으로 미루어 심각한 독성은 우려되지 않는다.

요 약

여러 항산화물질이 어류의 비특이적 면역능을 증강시키는 것이 알려져 있다. 본 연구에서는 glutathione의 생합성 전구체인 항산화물질 N-acetylcysteine (NAC)이 8종의 어류에서 비특이적 면역지표를 증가시키는 지를 검토하였다. NAC를 10 mg/kg의 용량으로 메기, 미꾸라지, 잉어, 붕어, 뱀장어, 기물치, 틸라피아 및 송어에 복강내로 투여하고, 48시간 후 두신백혈구 세포의 화학발광반응 및 혈청 lysozyme 활성을 측정하였다. 붕어와 미꾸라지를 제외한 6종의 어류에서 화학발광 반응이, 틸라피아를 제외한 모든 어류에서 lysozyme 활성이 각각 증가하였다. 이 결과는 NAC가 다양한 어종에서 비특이적 면역증을 증가시키며,

이 현상은 어류양식에서의 실용화도 고려해 볼 가치가 있음을 의미한다.

감사의 글

이 논문은 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- 서정수, 정소정, 이상환, 김나영, 엄혜경, 허민도, 정현도, 정준기: 양식산 넙치, *Paralichthys olivaceus* 식세포의 식작용 활성에 미치는 chloramphenicol의 영향. 한국어병학회지, 17:217-222, 2004
- Ai, Q.H., Mai, K.S., Zhang, C.X., Xu, W., Duan, Q.Y., Tan, B.P. and Liufu, Z.G.: Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonica*. *Aquaculture*, 242:489-500, 2004
- Alexander, J.B. and Ingram, G.A.: Noncellular nonspecific defense mechanisms in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2:249-279, 1992.
- Arranz, L., Fernández, C., Rodríguez, A., Ribera, J.M. and De la Fuente M.: The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Rad. Biol. Med.*, 45:1252-1262, 2008.
- Babior, B.M.: NADHP oxidase: an uptake. *Blood*, 93:1464-1476, 1999.
- Bakker, J., Zhang, H., Depierreux, M., Van Asbeck, S. and Vincent, J.L.: Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock. *J. Crit. Care*, 9:236-243, 1994.
- Banaclocha, M.M.: Therapeutic potential of N-acetylcysteine

- in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med. Hypoth.*, 56:472-477, 2001.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C. and Lee, L.E.J.: Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Com. Immunol.*, 25:853-873, 2001.
- Caruso, G., Denaro, M.G., Caruso, R., Mancari, F., Genovese, L. and Maricchiolo, G.: Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bass (*Pagellus bogaraveo*). *Mar. Environ. Res.*, 72:46-52, 2011.
- Christyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Michael, R.D.: Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 840-852, 2007.
- Chandana, R., Parry, R. and Shahania, K.: Purification and some properties of bovine milk lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 110:389-398. 1965.
- Coquette, Á., Vray, B. and Vanderpas, J.: Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 94:529-534, 1986.
- De Caro, L., Ghizzi, A., Costa, R., Longo, A., Ventresca, G.P. and Lodola, E.: Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*, 39:382-386, 1989.
- Enis Yonar, M., Mise Yonar, S. and Silici, S.: Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). *Fish Shellfish Immunol.*, 31:318-325, 2011.
- Eo, J. and Lee, K.J.: Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Tagifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.*, 25:611-616, 2008.
- Ferrandez, M.D., Correa, R., Del Rio, M. and De la Fuente, M.: Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp. Gerontol.*, 34:675-685, 1999.
- Ferrari, G., Yan, C.Y. and Greene, L.A.: N-Acetylcysteine (D-and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurol. Sci.*, 15:2857-66. 1995.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. and Scaccini, C.: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, 29:1106-1114, 2000.
- Heller, A.R., Groth, G., Heller, S.C., Breikreuz, R., Nebe, T., Quintel, M. and Koch, T.: N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit. Care Med.*, 29:272-276, 2001.
- Hoffer, E., Baum, Y., Tabak, A. and Taitelman, U.: N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.*, 84:7-12. 1996.
- Issels, R.D., Nagele, A., Eckert, K.G. and Wilmanns, W.: Promotion of cysteine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem. Pharmacol.*, 37:881-888, 1988.
- Kiron, V., Puangkaew, K., Ishizaka, K., Satoh, S. and Watanabe, T.: Antioxidant status and nonspecific

- immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, 234:361-379, 2004.
- Magnaldóttir, B.: Innate immunity of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20:137-151, 2006.
- Meydani, S.N., Wu, D., Santo, M.S. and Hayek, M.: Antioxidants and immune response in aged persons: overview of the present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62:S1462-S1476, 1995.
- Ortuno J., Esteban, M.A. and Meseguer, J.: High dietary intake of α -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 10:293-307, 2000.
- Palevsky, P. and Murray, P.: Acute kidney injury and critical care nephrology. *Nephrol. Self Assess Program*, 5:81-84. 2006.
- Paterson, R., Galley, H. and Webster, N.R.: The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kB activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit. Care Med.*, 31:2574-2578, 2003.
- Phelps, D.T., Deneke, S.M., Daley, D.L. and Fanburg, B.L.: Elevation of glutathione levels in bovine pulmonary artery endothelial cells by NAC. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7:293-299. 1992.
- Prescott, L.F., Ballantyne, A., Proudfoot, A.T., Park, J. and Adriaenssens, P.: Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet*, 310:432-434, 1977.
- Puerto, M., Guayerbas, N., Víctor, V.M. and De la Fuente M.: Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 73:797-804, 2002.
- Rocksén, D., Lillihook, B., Larsson, R., Johansson, T. and Bucht, A.: Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 122:249-256, 2000.
- Rodriguez, I., Novoa, B., Figueras, A.: Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 25:239-249. 2008.
- Roszell, L.E. and Anderson, R.S.: Inhibition of phagocytosis and superoxide production by pentachlorophenol in two leukocyte subpopulations from *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.*, 38:195-206, 1994.
- Sener, G., Tosun, O., Sehirlí, A., Kacmaz, A., Arbak, S. and Ersoy, Y.: Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci.*, 72:7-18. 2003.
- Stolarek, R.: N-acetylcysteine effect on the luminol-dependent chemiluminescence pattern of reactive oxygen species generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Pulmon. Pharmacol. Ther.*, 15:385-392. 2002.
- Thawonsuwan, J.M., Kiron, V., Satoh, S., Panigrahi, A. and Verlhac, V.: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, 36:87-697, 2010.
- Tsikak, D., Sandmann, J., Ikie, M., Fauler, J., Stichtenoth, D.O. and Frolich, J.C.: Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of

- N*-acetylcysteine. J. Chromatogr. B.: Biomed. Sci. Appl., 708:55-60, 1998.
- Venketaraman, V., Millman, A., Salman, M., Swaminathan, S., Goetz, M., Lardizabal, A., Hom, D. and Connel, N.D.: Glutathione levels and immune responses in tuberculosis patients. Microb. Pathogen., 44:255-261, 2008.
- Victor, V.M., Rocha, M. and De la Fuente, M.: Regulation of macrophage function by the antioxidant *N*-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. Int. Immunopharmacol., 3:97-106, 2003.
- Winterbourn, C.C. and Hampton, M.B.: Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Rad. Biol. Med., 45:549-561, 2008.
- Yano, T.: The nonspecific immune system: humoral defense. In: Iwana G, Nakanishi T, editors. The Fish Immune System, Fish Physiology series vol. 15, San Diego, CA, Academic Press, p. 106-157, 1996,
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H. and Cheng, W.: Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol., 25:19-27, 2008.

Manuscript Received : September 1, 2011

Revised : February 6, 2012

Accepted : February 7, 2012