

Vitamin C 투여에 의한 항스트레스 효과

오 찬 호 · 최 동 성
전주우석대학교 생물공학과

Anti-stress Effect by the Treatment of Vitamin C

Chan-Ho Oh and Dong-Seong Choi

Department of Biotechnology, Chonju Woosuk University, Chonju 565-800, Korea

ABSTRACT

The anti-stress effect by the treatment of vitamin C was investigated in this study. The treatment of ascorbic acid in the presence of Cu^{2+} ion induced strong time- and dose-dependent degradation of histamine, and also the addition of histamine accelerated time-dependent decomposition of ascorbic acid *in vitro*. The treatment of ascorbic acid in ODS^{-od}/_{od} rats, which cannot synthesize ascorbic acid, significantly decreased the urinary histamine. The pretreatment of ascorbic acid, dexamethasone and promethazine inhibited the lethal effect induced by immobilization stress, but that of dimethylsulfoxide did not. The addition of ascorbic acid to a culture of spleen cells of ODS^{-od}/_{od} rats significantly increased the Con A-dependent T lymphocyte proliferation.

서 론

오늘날 격심한 생존경쟁, 복잡한 대인관계 및 고도의 긴장지속 등의 일상생활을 영위하는 현대인에게 부과되는 정신적, 사회적 스트레스에 수반되어 신경불안증 등의 증가가 심각한 사회문제로 대두되고 있는 실정이다. 또한 고혈압, 소화성 위궤양, 당뇨병, 심장질환 및 뇌졸중 등의 현대 성인병도 이른바 심신증으로서 스트레스가 중요한 원인이 되는 것으로 알려져 있고 암의 발생 및 진행을 촉진하는 중요요인으로도 보고되고 있다(1-3).

Cannon(4) 등에 의해 처음으로 제안된 스트레스의 개념은 그 후 Selye(5)에 의하여, 원인으로 비특이적인 생체방어기구로서 발전하였다. 그러나 이러한 스트레스의 발현기구의 해명에 대하여는 아직도 미흡한 점이 많으나 전형적인 스트레스 응답반응의 하나로서 부신피질로부터의 glucocorticoid(GC)의

분비가 있으며 Selye는 이 GC를 생체의 스트레스 반응의 성립에 무엇보다도 중요한 조절인자로 인정하였다. 실제로 이 GC의 분비가 스트레스 상태에 있는 동물의 생명유지에 중요하다는 것은 부신을 적출한 rat에 세균내 독소 등의 스트레스(stressor)로 자극하면 사망률이 현저히 높아지고 미리 GC를 투여하는 것으로 억제된다는 보고(6)로 증명이 된다. 또한 이러한 GC의 분비에 관여하는 매개물질로서는 시상하부에서 분비되는 뇌하수체자극호르몬(CRF)을 비롯하여 ACTH(7), vasopressin(8), catecholamine(9), serotonin(10) 및 histamine(11) 등이 잘 알려져 있는데 그 중에서도 특히 생체내 미량 생리활성물질의 하나인 histamine의 역할에 대하여는 최근에 Suzuki 등이 구체적으로 연구 보고하였으며(12), 이 histamine은 각종 염증반응과 알레르기를 유발하는 원인물질로 알려져 있고(13) histamine 투여로 야기되는 증상과 스트레스 응답반응과는 밀

접한 상관관계가 있음도 보고된 바 있다(14).

한편, Vitamin C는 생체의 세포 내의 중요한 물질대사에 관여하고 있으며 세포간의 결합조직 특히 collagen의 생성과 유지에 필수적이고(15) 또한 암 예방 및 치유에 있어서의 Vitamin C의 중요성에 대하여도 많은 연구결과가 있으며(16, 17), 현재는 면역계에 있어서도 Vitamin C의 중요성이 점차로 부각되고 있다(18). 이러한 Vitamin C는 부신피질에 다량으로 함유되어 있으며 ACTH에 의해 부신으로부터 GC가 분비될 때에는 Vitamin C가 감소되는데 이는 Vitamin C에 의한 GC의 수산화로 추정되고 있다(19). 스트레스가 부하되면 Vitamin C의 소비량이 급격히 증가되는데 실제로 스트레스가 가해진 rat에서는 혈장중의 Vitamin C 수준이 감소되면 한랭상태와 같은 스트레스 조건 하에서는 Vitamin C의 합성이 수배로 증가됨을 알 수 있다(20).

따라서 본 연구에서는 이러한 Vitamin C의 항스트레스 효과를 살펴 보기 위하여 상기의 histamine과 Vitamin C와의 상호 분해과정과 histamine의 뇨 중 배설 및 속박스트레스 부하시의 Vitamin C의 투여효과 및 면역반응에 미치는 Vitamin C의 작용 등을 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 rat로서는 S. D.계통의 웅성rat는 구입하고 유전적으로 Vitamin C의 합성불능인 ODS^{o/a} 계통의 rat(21)는 일본 나고야대학 농학부의 Nakano 박사의 호의에 의하여 분양받아 8-12주령의 것을 사용하였으며 사료는 ascorbic acid-free diet를 별도로 조제하여 급여하였다.

사료

Ascorbic acid-free diet 100g 중에는 casein 25g, salt mixture 4g(22), Vitamin mixture 2g, corn oil 4g, choline HCl 0.15g, retinyl palmitate 0.4mg, ergocalciferol 0.75 μ g, α -tocopherol 1mg 및 α -starch 63.8g이 함유되어 있으며, 2g의 vitamin mixture에는 thiamine hydrochloride 2.4mg, riboflavin 8mg, pyridoxal phosphate hydrochloride 1.6mg, cyanocobalamin 1 μ g, menadione 10 μ g, biotin 40 μ g, folic acid 400 μ g, calcium pantothenate 10mg, niacin 12mg, inositol 12mg 및 lactose 1.95g이 함유되었다.

세포 배양액 및 기구 멸균

본 실험에 사용된 세포배양액은 3차증류수에 용해하여 멸균 filter(pore size, 0.22 μ m)로 여과 멸균시켰으며, 기구는 121 $^{\circ}$ C, 15psi. 하에서 가압 증기 멸균하여 사용하였다.

Ascorbic acid의 측정

Ascorbic acid의 측정은 Baverstock 등의 방법(23)을 수정한 방법을 이용하였다. 즉 검체를 최종농도 1%의 meta인산으로 제단백한 후, 상등액을 각각 1ml씩 A, B, C로 나눈다. A액은 ascorbic acid, dehydroascorbic acid 및 diketogulonic acid의 총합으로서 브롬포화수로 황색이 될 때까지 산화시킨다. B액은 dehydroascorbic acid와 diketogulonic acid의 합으로 그대로 사용하고, C액은 diketogulonic acid검체로서 0.1%의 SnCl₂를 가하여 15분간 H₂S로 산화시켜 원심분리하여 흑색침전을 제거한다. A, B, C액 각 50 μ l에 증류수 3.95ml를 가하여 희석한 다음 이액 0.5ml를 취하여 최종농도 1%의 meta인산 + thio urea액 0.5ml, 2%의 2, 4 DNP-9N H₂SO₄용액 0.25ml를 혼합한 후, 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 osazone을 형성시킨 다음 0 $^{\circ}$ C 하에서 1.25ml의 85% H₂SO₄용액을 가하여 반응을 종결시키고, 분광광도계를 이용하여 530nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Histamine의 측정

Histamine의 측정은 Endo의 방법(24)을 변형한 방법을 이용하였다. 즉 검체 1ml당 0.4N의 HClO₄용액 2.5ml를 가하여 제단백한 후, 3000rpm에서 5분간 원심분리하여 그 상등액을 미리 활성화시킨 phospho-cellulose column에 충전한 다음 0.03M의 phosphate buffer(pH 6.2), 0.06M의 phosphate buffer(pH 6.2) 및 3차 증류수로 차례로 washing한 후에 0.1M의 borate buffer(pH 8.5)를 이용하여 histamine을 용출시켰다. 용출액 3ml에 1%의 o-phthal aldehyde MeOH용액 0.2ml를 가하여 5분간 반응시키고 3.5M의 H₃PO₄용액 0.4ml를 가하여 형광 발현시킨 후에 형광분광광도계를 이용하여 여기파장 350nm(slit; 5), 형광파장 444nm(slit; 10)에서 형광도를 측정하고 표준 histamine의 검량선을 이용하여 정량하였다.

Immobilization stress의 부하

Rat에 immobilization stress를 부하하는 방법은

Morita 등의 방법(25)을 이용하였다. 즉 무균적으로 부싯을 적출한 rat의 사지에 반창고를 붙이고 여분의 반창고 부분에 클립을 끼워 고정용 틀에 고정시키는 방법을 사용하였다. 이러한 방법으로 stress를 부하시키기 전에 ascorbic acid 등의 각 검액을 전투여하여 rat의 생존율을 측정하였다.

T 임파구 증식능의 측정

T 임파구 증식능의 측정은 ODS계통의 rat를 경추탈구하여 비장을 적출한 후 Oh 등의 방법(26)에 의하여 GIT무혈청배지로 비장세포 부유액을 조제한 다음 microculture plate (96well)에 각 well 당 5×10^5 세포가 되도록 조정하여 Con A $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, ascorbic acid($10^{-9} \sim 10^{-3} \text{M}$) 등을 첨가한 후 37°C 의 5% -CO_2 incubator에서 48시간 동안 배양했다. 다음에 $0.5 \mu\text{Ci}$ 의 [^3H] $10 \mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하여 다시 16시간 배양을 계속한 후 cell harvester로 세포를 수집한 다음 세포 내에 흡입된 방사활성을 liquid scintillation counter (β -counter)로 측정하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며 그 결과(cpm)를 평균치 \pm S. E.로 표시하였다.

통계처리

유의차 검정은 Duncan's multiple range test 혹은 Student's t-test를 경우에 따라서 적절하게 이용(27)하여 통계처리하였다.

결과 및 고찰

Ascorbic acid와 Histamine의 *in vitro* 상호 분해 작용

Ascorbic acid에 의한 histamine의 시험관 내에서의 분해과정(dose dependency)을 살펴 보기 위하여 reaction mixture로서 histamine($1 \mu\text{M}$) 0.25ml, CuSO_4 ($0.5 \mu\text{M}$) 0.5ml, ascorbic acid($0.8 \sim 40 \mu\text{M}$) 0.5ml 및 citrate phosphate buffer(0.04M , pH 5.5) 1.25ml의 총 2.5ml를 시험관 내에서 60분간 반응시켜 histamine을 측정하고 결과를 RFI(relative fluorescence intensity)로 표시하였다. Histamine은 Cu^{2+} 이온의 존재 하에서 ascorbic acid에 의하여 분해되는 양상을 나타내었으며(Fig. 1), 이러한 분해는 ascorbic acid의 농도 의존적으로 진행됨을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 (Fig. 3)에는 ascorbic acid의 농도를 $20 \mu\text{M}$ 로 고정하여 반응시간에 따른 histamine의 분해과정을 나타내었으며, Fig. 4는 Fig. 3

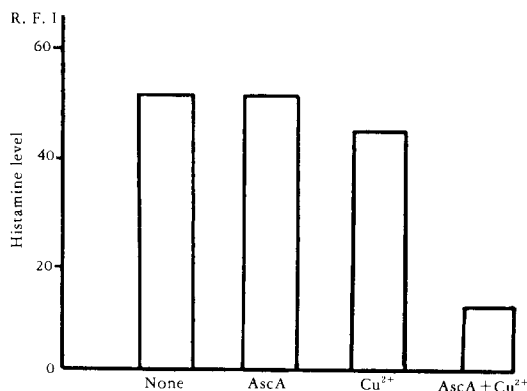


Fig. 1. Effects of ascorbic acid and copper ion on histamine degradation. Reaction mixture composed of histamine($1 \mu\text{M}$), copper sulfate($0.5 \mu\text{M}$), ascorbic acid($20 \mu\text{M}$) and citrate phosphate buffer(0.04M , pH 5.5). AscA; ascorbic acid.

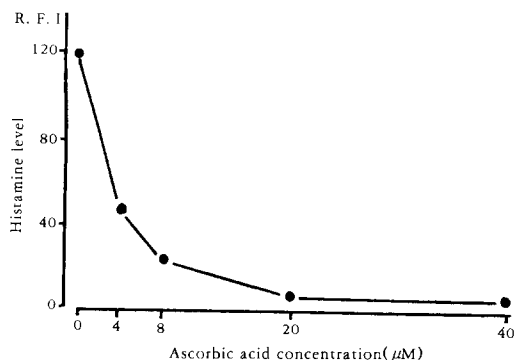


Fig. 2. Effects of various concentrations of ascorbic acid on histamine degradation. Experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 1 except the ascorbic acid concentration.

과 같은 조건 하에서 histamine에 의한 ascorbic acid분해의 경시적인 변화를 검토하였는데 이는 ascorbic acid $\xrightarrow{-2\text{H}}$ dehydroascorbic acid \rightarrow 2, 3-diketogulonic acid로의 생체내 분해과정을 시험관 내에서 확인한 결과이다. 이상과 같이 histamine과 ascorbic acid는 *in vitro* 내에서 상호분해작용을 나타냄을 알 수 있었으며, 이러한 결과들은 이전의 Subramanian 등이 관찰한 ascorbic acid의 항 his-

tamine 작용은 histamine의 비효소적 분해에 기인한다는 보고(28)와 유사한 결과로 나타났고 Vitamin C가 *in vitro* 내에서 직접 유기물질을 파괴하는 중요한 작용을 지니고 있음을 시사한다.

Histamine의 뇨중 배설에 미치는 Ascorbic acid의 효과

Vitamin C의 항 histamine 작용을 검토하기 위하여

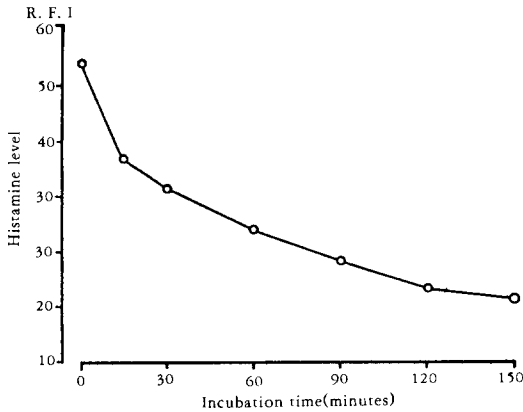


Fig. 3. Effect of ascorbic acid on histamine degradation during the time course. Experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 1 except the incubation time.

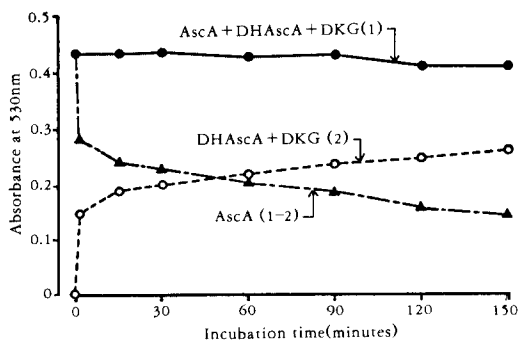


Fig. 4. Effect of histamine on ascorbic acid decomposition during the time course. Experimental conditions were the same as described in the materials and methods.

AscA : ascorbic acid
 DHAscA : dehydroascorbic acid
 DKG : 2, 3-diketogulonic acid

여 유전적으로 vitamin C의 합성불능인 ODS^{od/od} 계통의 rat를 이용하여 vitamin C 결핍사료를 급여한 후에 histamine(2mg/100g B. W.)과 ascorbic acid(50mg/100g B. W.)를 투여(i. p)한 다음 뇨중에서 배설되는 histamine의 양을 정량하였다(Fig. 5). 결과에서 알 수 있는 바와 같이 ascorbic acid를 투여하지 않은 군에 비하여 투여한 군에서 뇨중으로 배설되는 histamine의 양이 현저하게 감소되었는데 이는 vitamin C가 *in vivo* 상태에서도 생체내의 histamine을 분해하고 있음을 나타내는 결과라 할 수 있으며, Chatterjee 등의 보고(29)에서도 각종 약물의 투여에 의하여 rat의 각 조직에서의 histamine 생성능력의 증가와 더불어 간장에서의 ascorbic acid의 생합성이 증가되었는데 이는 과잉으로 생성되는 histamine을 ascorbic acid가 해독시킴으로써 생체의 항상성을 유지한다는 견해이므로 본 실험 결과와 유사하다고 할 수 있다.

부신적출 Rat에 Immobilization stress 부하시의 Ascorbic acid의 효과

S. D. 계통의 rat의 부신을 적출한 후에 rat의 사

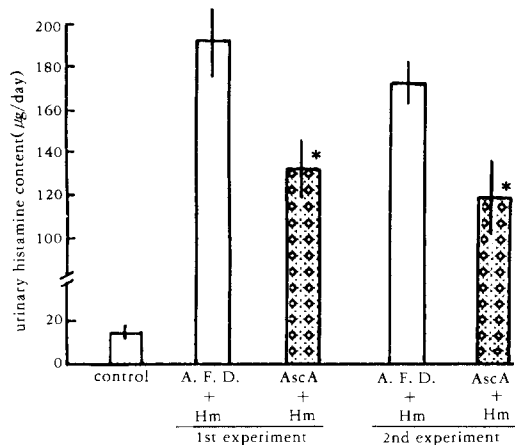


Fig. 5. Effect of ascorbic acid on urinary histamine content in ODS rat. ODS rats, which cannot synthesize ascorbic acid, were fed an ascorbic acid-free diet from weaning and were killed after 2weeks. Each bar represents the mean \pm SEM of the values from three experiments. * P<0.05 as compared with the A. F. D. + Hm group. A. F. D.: ascorbic acid-free diet AscA : ascorbic acid, Hm : histamine

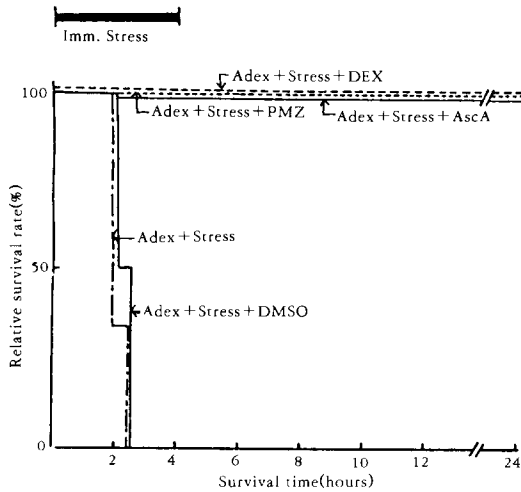


Fig. 6. Effects of ascorbic acid, dexamethasone, promethazine and dimethylsulfoxide on survival time of immobilization stressed rats. Adrenalectomized rats were subjected to 2.5 hours of the immobilization stress and were killed.

Adex: adrenalectomized, DEX: dexamethasone PMZ: promethazine, DMSO: dimethylsulfoxide.

지를 고정하는 immobilization stress 부하(4시간) 시에 있어서 rat의 생존율에 미치는 ascorbic acid의 투여효과를 살펴 보았다(Fig. 6). 부신을 적출한 rat에 immobilization stress를 부하하면 2.5시간 내에 전부 사망했으나 미리 ascorbic acid (50mg/100g B. W.)를 투여해 두면 stress에 의한 치사작용이 완전히 억제되었으며, 또한 dexamethasone(인공 glucocorticoid, 10mg)과 histamine H₁ 길항제인 promethazine(10mg/100g B. W.)을 투여해도 치사작용이 완전히 억제되었다. 그러나 dimethylsulfoxide(DMSO; OH radical scavenger, 1mM)의 투여는 효과가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 *in vivo*에서의 vitamin C의 histamine 분해작용을 나타내는 또 다른 지표라 할 수 있다.

T 림파구 증식능에 미치는 Ascorbic acid의 효과

ODS^{od} 계통의 rat의 비장세포 배양계를 이용하여 T림파구의 mitogen인 Con A(1 μg/ml) 및 ascorbic acid(10⁻⁹-10⁻³M)를 첨가하여 배양한 다

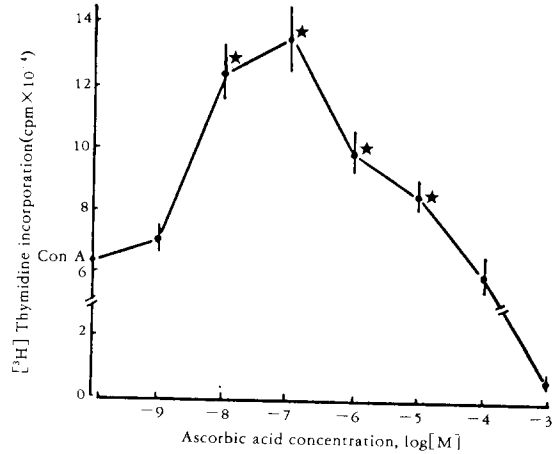


Fig. 7. Effects of various concentrations of ascorbic acid on Con A dependent [3H] thymidine uptake by splenic lymphocytes of ODS rats. Splenic lymphocytes (5 × 10⁶ cells) were cultured in the presence of Con A(1 μg/ml) with or without various concentrations of ascorbic acid. Statistically different from the group treated with Con A alone, * p < 0.05.

음 [3H]-thymidine의 uptake된 양을 측정된 결과(Fig. 7), 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁵M/ml의 ascorbic acid의 농도에서 각각 12.36 ± 0.9, 13.51 ± 1.1, 9.85 ± 0.7 및 8.57 ± 0.5(cpm × 10⁻⁴/well)로서 대조군의 6.23 ± 0.3(cpm × 10⁻⁴/well)에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었으며 10⁻⁹ 및 10⁻⁴M의 농도에서는 효과가 인정되지 않았다. 이러한 결과는 vitamin C가 T림파구의 증식을 촉진하여 결과적으로 생체가 지니고 있는 세포성 면역반응을 증강시키고 있다는 것을 시사하고 있으며, 이는 낮은 농도(5-15 μg/ml)의 vitamin C가 pokeweed mitogen으로 자극한 사람 백혈구의 면역반응을 증강시키고 오히려 고농도(>15 μg)에서는 면역반응이 억제된다는 Panush 등의 보고(30)와 유사하였다. 또한 본 결과는 면역억제작용을 가지고 있는 histamine을 ascorbic acid가 분해함(31)으로써 결과적으로는 생체의 면역능력이 증강되어짐을 시사하고 있다.

이상의 결과에서 생체에 stress가 부하되었을 때 야기되는 상해작용에 대하여 신속하게 대처하기 위한 수단 하나로서 특히 Vitamin C가 효과가 있음

이 입증되었으며, 또한 stress반응 응답기전에 있어서 chemical mediator의 하나로 알려진 histamine을 ascorbic acid가 분해함으로써 항스트레스작용이 나타나는 것으로 추정된다.

요 약

생체에 스트레스가 부하되었을 때의 각종 상해작용을 경감시키는 목적으로 Vitamin C를 투여하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하여 살펴 본 결과, 시험관 내에서 ascorbic acid는 Cu^{2+} 이온의 존재 하에서 histamine을 농도 의존적으로 분해하였고 반응시간이 길어질수록 histamine의 분해가 촉진되었으며, histamine 첨가에 의해서도 ascorbic acid가 분해되는 이른바 *in vitro* 상호분해작용을 나타냈다. 또한 유전적으로 Vitamin C 합성불능으로 알려져 있는 ODS^{od/od} rat를 이용하여 Vitamin C 결핍사료를 급여한 후에 ascorbic acid의 첨가(50mg/100g B. W.)는 histamine의 뇨중 배설을 유의성 있게 감소시켰다. 부신을 적출한 rat에 immobilization stress를 부하하기 전에 ascorbic acid, 인공의 glucocorticoid인 dexamethasone 및 histamine H₁-길항제인 promethazine을 투여하면 stress에 의한 치사작용이 완전히 억제되었으나, OH radical scavenger인 dimethylsulfoxide는 억제작용을 보이지 않았으며, ODS^{od/od} rat의 비장세포 배양제를 이용한 Con A 의존성 T림파구의 증식능에 있어서는 10^{-8} - 10^{-5} M의 ascorbic acid 첨가에 의하여 유의성 있게 증가되었다.

이러한 결과는 Vitamin C가 스트레스에 의한 각종 상해작용을 경감시키는 능력을 가지고 있음을 나타내고 있으며, 이것은 스트레스 반응응답기전의 매개물질의 하나로 알려져 있는 histamine을 Vitamin C가 분해시킴으로써 항스트레스 효과가 발현되는 것으로 추정된다. 또한 Vitamin C 자신은 체내의 면역능력을 증강시키는 작용도 가지고 있는 것으로 사된다.

감 사

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 지방대 육성 과제 학술연구 조성비에 의하여 수행된 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. L. S. Sklar and H. Anisman(1981), *Physiological Bulletin*, **89**, 369.
2. A. Amhraut and G. F. Solomon(1972), *Cancer Research*, **32**, 1428.
3. H. Selye(1978), In *The Stress of Life*. McGRAW-HILL Co., 179, New York.
4. W. B. Cannon(1932), In *the wisdom of the body*. W. W. Norton and Co., 332, New York.
5. H. Selye (1936), *Nature*, **138**, 32, London.
6. L. Chdid and M. Parant(1971), In *microbial toxins*. Academic press, **5**, 451, New York.
7. M. Kaneko, K. Kaneko, J. Shinsako and M. F. Dallman(1981), *Endocrinology*, **109**, 70.
8. P. Mormede(1983), *Nature*, **302**, 345, London.
9. C. Rivier and W. Vale(1983), *Nature*, **305**, 325, London.
10. R. W. Fuller and H. D. Sonddy(1980), *Neuroendocrinology*, **31**, 96.
11. M. Verdier, C. Rose and J. C. Schwartz (1977), *Brain Research*, **129**, 107.
12. S. Suzuki and K. Nakano(1986), *Am. J. Physiol.*, **250**, E243.
13. S. R. Durham, T. H. Lee, O. Cromwell, R. J. Shaw, T. G. Merett, J. Merett, P. Cooper and A. B. Kay(1984), *J. Allergy Clin. Immunol.*, **74**, 49.
14. K. Nakano and S. Suzuki(1984), *J. Nutr.*, **114**, 1602.
15. B. S. Gould and J. F. Woessner(1957), *J. Biol. Chem.*, **226**, 289.
16. E. Cameron and L. Pauling(1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 3685.
17. E. Cameron, L. Pauling and B. Leibobitz (1979), *Cancer Research*, **39**, 663.
18. B. V. Siegel and J. I. Morton(1979), *Experientia*, **33**, 393.
19. A. R. Ratsimamanga and M. Nigeon-Dureuil (1956), *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **38**, 183.
20. A. Kallner(1982), Int. Meeting on Nutrition, Tokyo 1981, 15, (Med. News Group, London).
21. Y. Mizushima, T. Harauchi, T. Yoshizaki and

- S. Makino(1984), *Experientia*, **40**, 359.
22. A. E. Harper(1959), *J. Nutr.*, **68**, 405.
23. K. F. Baverstock(1979), *Brit. J. Radiol.*, **52**, 592.
24. Y. Endo(1981), *J. Chromatogr.*, **205**, 155.
25. A. Morita and K. Nakano(1982), *J. Nutr.*, **112**, 795.
26. C. H. Oh and K. Nakano(1988), *J. Nutr.*, **118**, 639.
27. S. Dowdy and S. Wearden(1983), *In statistics for research*, Wiley, 262, New York.
28. N. Subramanian, B. K. Nandi, A. K. Majumder and I. B. Chatterjee(1974), *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 637.
29. I. B. Chatterjee, A. K. Majumder, B. K. Nandi and N. Subramanian(1961), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **258**, 24.
30. R. S. Panush and J. C. Delafuente(1979), *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **49**, 179.
31. B. K. Nandi, N. Subramanian, A. K. Majumder and I. B. Chatterjee(1974), *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 643.