

비타민 C의 만성적 과량투여가 흰쥐의 혈액과 간의 지질성상, 과산화상태 및 혈소판 Thromboxane A₂ 생성에 미치는 영향*

이정원 · 김소영 · 콧충실**

충남대학교 가정대학 가정교육과
서울대학교 의과대학 생화학교실**

Effects of Excess Vitamin C Feeding on Blood and Liver Lipid and its Peroxidation Levels, and Platelet Thromboxane A₂ Formation in Rats

Lee, Joung-Won · Kim, So-Young · Kwak, Chung-Shil**

Department of Home Economics Education, Chungnam National University, Seoul, Korea
Department of Biochemistry,** Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The effects of excess L-ascorbic acid(AsA) in blood, liver lipid levels and peroxidation status were investigated. Ten Sprague-Dawley male rats weighing 150 - 200g were fed 300mg AsA/100g body weight/day, mixed into ground chow diet, for 4 weeks. And another set of ten rats were fed only chow diet as the control. Average body weight gain was slightly lowered by AsA feeding without food intake change. The AsA group showed higher AsA levels in plasma and liver than the control group. In addition, the AsA group showed a higher plasma TBARS value. Liver TBARS seemed to be elevated in the AsA, but not significantly. The hemolysis of red cells tended to increase with excess AsA, accompanied by a raised GSH-Px activity and lowered total GSH levels. Plasma HDL-Chol level was increased while the levels of total Chol, LDL- plus VLDL-Chol, and triglyceride were unchanged. Atherogenic index decreased. Hepatic TG levels were also decreased, but the total amount of Chol increased slightly. Platelet TXA₂ production was inhibited by excess AsA feeding. Above results indicate that oral feeding of excess AsA may be beneficial in reducing the risk of atherosclerosis ; however such practice may be detrimental for tissue lipid peroxidation and weight gain. (*Korean J Nutrition* 30(6) : 639-647, 1997)

KEY WORDS : excess ascorbic acid · lipid peroxide · glutathione peroxidase · lipid pattern · thromboxane A₂.

서 론

비타민 C(L-Ascorbic acid, AsA)는 수용성 환원제로서 여러가지 필수적인 영양적 기능을 가지며 질병 발생과도 관련이 많은 것으로 알려져 있다. 관상 심장질

환, 뇌혈관질환, 당뇨병 및 고혈압 환자들이나 노인, 흡연자의 경우 혈중 AsA농도가 저하되어 있고, AsA가 체내 지질 및 포도당 대사 등에 관계하고 발암물질인 nitrosamine 형성을 방지하는 등 각종 성인 질환의 예방 및 치료에서 중요하다는 연구보고들이 많다¹⁻⁴⁾.

AsA와 동맥경화성 심장 및 뇌질환의 관계는 1930년대 부터 보고되어 왔다. 체내 AsA가 결핍되면 동맥벽의 mucopolysaccharides와 collagen형성이 불완전해지고 동맥혈관 내피조직이 손상될 뿐만 아니라, 혈중

채택일 : 1997년 6월 27일

*본 연구의 일부는 1995년도 충남대학교 학술진흥연구비에 의하여 수행되었음.

total- 및 LDL-cholesterol과 triglyceride 농도를 증가시키고 HDL-cholesterol은 감소시킴으로써 동맥경화 발생을 촉진하는 것으로 논의되고 있다⁵⁻⁷⁾. 또한 AsA를 과량 보충공급하면 고콜레스테롤, 고지방 식이에 의한 혈중 지질의 상승을 억제하여 토끼나 흰쥐 동맥내벽에 atherome 형성을 방지하였다고 보고되었으며⁸⁾, 고지혈증이나 관상심장병, 당뇨병(NIDDM)을 앓는 사람에서도 AsA 다량보충에 의한 혈중 total cholesterol, triglyceride 농도 감소 또는 lipoprotein lipase 수준의 증가효과가 보고되었다⁹⁾¹⁰⁾. 그러나 혈중 지질 농도의 감소 및 HDL-cholesterol 증가 효과가 나타나지 않았다는 보고들도 적지 않다¹¹⁻¹³⁾. AsA는 또한 혈소판 응집에도 영향을 미쳐 atherome 형성을 억제시킬 가능성이 제시되었다. 사람에게 과량의 AsA를 보충투여함으로써 collagen 또는 ADP 첨가에 의한 혈소판 응집이 지연되었으며¹⁴⁾¹⁵⁾, 흰쥐나 guinea pig의 대동맥 조직 배양에서 AsA 첨가가 prostacyclin(PGI₂)의 생성을 촉진하였음이 관찰되고 있다¹⁶⁾¹⁷⁾. 그러나 혈소판 응집 촉진제로서 PGI₂에 대해 길항작용을 하는 thromboxane A₂(TXA₂) 생성에 미치는 AsA의 영향은 보고된 바가 많지 않아 분명하지 않다. 사람의 허파 조직배양실험에서 AsA 첨가에 의해 TXA₂의 생성이 증가되었으나¹⁸⁾, AsA의 생리적 농도범위에서는 TXA₂ 생성에 별 변화가 없다는 보고도¹⁹⁾ 있다. 더우기 in vivo 효과에 관한 연구보고는 별로 없다.

최근 우리나라는 경제 수준의 향상과 식생활의 서구화로 순환기 질환이 급증하고 있다. 통계청의 1993년 사망원인 통계연보에 의하면 동맥경화성 또는 고혈압성 심장 및 뇌혈관 질환이 전체 사망자의 30.2%로 제1 사망원인이 되고 있다. 또한, 건강과 질병에 미치는 영양소의 잠재적 역할에 대한 대중의 관심이 높아짐에 따라 AsA를 비롯한 각종 영양제의 복용이 유행되고 있다. 최근 조사²⁰⁾²¹⁾에 의하면 조사대상 성인의 약 40%가 비타민 보충제를 복용하였는데, 그로 인한 AsA의 섭취량은 1일 평균 556.5mg(90~2250mg)으로서 권장량의 10배에 달하였다. AsA 복용자의 1/3은 권장량의 10~40배의 과량을 섭취하고 있었다.

필수영양소인 AsA는 성인의 경우 1일 권장량이 45~60mg으로서 하루에 최고 40g까지의 복용은 신체의 여러 생리적, 심리적 스트레스를 완화시키며, 일반적으로 유독하지 않고 무해한 것으로 알려져 왔다²²⁾. 실제로 AsA의 독성에 대한 보고는 극히 드물다. 매일 5g의 AsA를 섭취한 사람에게서 oxalate의 뇨중 배설이 증가하였으나²³⁾ calcium oxalate 결석의 위험이 있을 정도는 아닌 것으로 보고되고 있다. 이 밖에 제기되

었던 AsA의 체내이용효율의 감소, 구리 대사장애, 비타민 B₁₂의 길항제로 작용한다는 등의 문제도 거의 배제되고 있다²⁴⁾. 그러나 AsA는 Fe²⁺ 등 금속이온을 환원 형태로 유지시켜 주며 superoxide 래디칼의 공급원이 되어 강력한 산화촉진제로서도 자주 논의 되고 있다²⁵⁾. 또한 AsA의 과량공급이 특히 적혈구 용혈을 증가시킴이 보고되고 있다. Bai 등²⁷⁾은 과량의 AsA를 흰쥐에게 2주간 복강내 주사하였을 때 조직의 지질과산화 수준은 감소하였으나 용혈현상이 증가되었다고 보고하였으며, 이 등²⁸⁾도 guinea pig에게 5주간 경구투여했을 때 용혈현상이 증가되었음을 보고하였다.

이러한 점들을 고려할 때 AsA 과량섭취가 체내 과산화현상이나 동맥경화 위험성에 미치는 영향에 대한 실험적 확인을 통해 인체건강에 미치는 긍정적 또는 부정적 작용을 동시에 파악해 볼 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 일반 사료를 먹는 흰쥐를 대상으로 다량 AsA의 경구 투여가 혈청과 간조직의 지질 정상 및 혈소판내 TXA₂ 생성에 미치는 영향을 측정하고 동시에 적혈구 용혈을 포함한 조직의 과산화양상을 분석함으로써 AsA의 과량섭취가 건강에 미치는 영향을 전반적으로 검토해 보고자 하였다. 본 연구결과는 최근 일반인들의 영양보충제나 건강보조식품에 대한 선호도가 지나쳐서 과학적인 검토의 필요성이 제기되고 있음을 고려할 때 국민보건증진을 위한 영양교육의 기초자료로도 활용될 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 동물 사육 및 비타민 C 공급

체중 150~200g의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐(대한실험동물센터) 20마리를 사육 환경에 6일간 적응시킨 후 체중이 균등분배 되도록 각각 10마리씩 대조군과 AsA군으로 나누어 사육 상자당 1마리씩 넣어 4주간 사육하였다. 사육실은 12시간씩 명암주기, 온도 23±1°C, 습도 60~70%를 유지하였으며, 물과 표준고형사료(천하제일사료)는 자유로이 먹게하였다.

비타민 C는 사료에 첨가되어 AsA군에게 체중 100g당 일일 약 300mg이 경구투여되었다. 흰쥐의 하루 평균 사료 섭취량을 조사, 계산한 결과를 토대로 표준고형사료를 고운가루로 마쇄한 다음 사료 100g당 3.75g의 L-ascorbic acid(분말형)를 첨가하고 신맛을 완화시키기 위해 사료 100g당 2g의 설탕을 넣어 잘 혼합한 것을 냉동 저장시키면서 매일 저녁 5시에 제공하여 자유로이 먹게하였다. 이때 AsA가 공기중에 불안정함을 고려하여 다음날 아침 9시와 저녁 5시에 사료섭취량과 먹고

남은 사료내 비타민 C 함량을 측정하여 비타민 C의 하루 섭취량을 대략 산출하여 본 결과 체중 100g당 300mg이상의 비타민 C를 섭취하고 있음이 확인되었다. 대조군에는 마쇄한 고품사료에 사료 100g당 설탕 2g만 혼합한 것을 공급하였다. 체중은 1주일 간격으로, 사료섭취량은 매일 측정하였다.

2. 시료 채취

혈액과 조직은 실험 4주 마지막 날에 overnight으로 16시간 절식시킨 다음 채취하였다. 혈액은 흰쥐를 ethyl ether로 약하게 마취시킨 상태에서 heart puncture로 EDTA(K3)를 항응고제로 하여 채취하였다. 일부 혈액은 용혈실험과 TXA₂측정을 위한 전처리에 사용하였고, 나머지는 3000rpm에서 15분간 냉장원심분리하여 혈장과 혈구로 분리하고 적혈구는 saline-phosphate buffer로 3회 세척한 다음 -70°C에 분석시까지 냉동 보관하였다. 간과 소뇌는 채혈직후 적출하여 즉시 냉각된 식염수로 세척하고 여과제로 표면의 물기를 제거한 다음 분석시까지 -70°C에 보관하였다.

3. 시료 분석

1) 혈장과 간의 총 AsA 농도

혈장과 간의 총 AsA농도는 Roe와 Kuether²⁹⁾의 2,4-dinitrophenylhydrazine법으로 분석하였다.

2) 혈장과 간의 지질 조성 및 지질과산화물 농도

혈장 triglyceride농도는 glycerol-3-phosphate oxidase-p-chlorophenol발색법을 이용한 kit(Wako), 총 cholesterol은 cholesterol oxidase-p-chlorophenol 발색법의 kit(아산제약), HDL-cholesterol은 phosphotungstic acid-Mg²⁺ 침전법의 kit(아산제약)을 사용하여 측정하였다. 동맥경화지수는(총cholesterol-HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol의 식으로부터 계산하였다. 간은 Folch 등³⁰⁾의 방법으로 지질을 추출한 후 혈장과 동일한 방법으로 triglyceride와 cholesterol을 정량하였다.

혈장 과산화지질 농도(TBARS)는 무산소 상태에서 FeCl₃를 첨가하여 실시된 2-thiobarbituric acid반응을 이용한 이 등의 정량법³¹⁾, 간과 소뇌의 TBARS 농도는 Uchiyama와 Mihara의 방법³²⁾으로 측정하였다.

3) 적혈구의 용혈%, glutathione peroxidase활성 및 총glutathione농도

적혈구 용혈%는 채혈 직후 적혈구 부분을 saline-phosphate buffer로 세척, 분산시킨 다음 일부는 즉시, 일부는 대조군과 AsA사이의 용혈정도의 차이를 확

대시키고져 24시간 냉장보관을 통해 노화시킨 후 Buckingham의 방법³³⁾으로 측정하였다.

적혈구 내 glutathione peroxidase활성은 Paglia와 Valentine의 방법³⁴⁾으로 측정하였고, 총 glutathione 함량은 Tietze 방법³⁵⁾으로 측정하였다. 적혈구 용혈액의 hemoglobin농도는 cyanomethemoglobin법으로 측정하였다.

4) Thromboxane A₂ 측정

TXA₂ 측정을 위해 혈액 0.9ml을 채취 즉시 polystyrene tube에 넣고 3.8% trisodium citrate 0.1ml를 섞은 다음 생리적 식염수 1ml를 첨가하고, 여기에 2μl/ml의 농도로 collagen을 넣고 37°C의 shaking water-bath에서 15분간 가온하여 TXA₂ 생성을 자극한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 얻어 분석시 까지 -70°C에서 저장해 두었다. 이 상층액을 시료로 하여 불안정한 TXA₂의 전환물인 TXB₂를 thromboxane B₂(³H) radioimmunoassay kit(Amersham, TRK780)으로 정량하였다¹⁸⁾.

4. 통계처리

모든 측정치는 SAS package program을 이용하여 실험군 별로 나누어 평균과 표준편차를 구했으며, 실험군간의 차이는 unpaired t-test로 검증하였고, 측정치간의 상관관계는 Pearsons correlation coefficient로 평가하였다.

연구결과 및 고찰

1. 체중 증가와 식이 섭취량

실험 4주 동안 흰쥐의 체중 증가와 식이섭취량은 Table 1과 같다. 실험 초기와 마지막 체중은 대조군과 AsA군 사이에 유의적인 차이가 없었으나 체중 증가량이 AsA군은 79.6±10.9g으로서 대조군의 92.5±19.6g에 비해 유의성 있게 낮았다. 하루 평균 식이섭취량은 AsA군과 대조군이 각각 27.9±2.0g, 28.2±2.2g으로서 서로 차이가 없었다.

그러므로 본 실험에서 공급한 과량의 AsA가 사료섭취량에는 영향을 미치지 않았으나 체중 증가에는 부정적인 영향을 주었다고 볼 수 있다. 흰쥐는 AsA가 체내에서 합성되는데 본 실험에서 공급한 체중 100g당 300mg의 AsA는 최저필요량으로 참고할 수 있는 guinea pig의 2mg/100g체중의 150배에 상당한다. Barja 등³⁶⁾도 guinea pig에게 최소필요량의 40배의 AsA를 사료에 혼합공급하였을 때 체중증가가 감소되었다는 본 결과와 일치하는 경향을 보고하였다. 그러나 흰쥐에게 체중

Table 1. Body weight gain and food intake of rats during AsA feeding

Group	Body weight			Food intake (g/day)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g/4weeks)	
AsA(n=10)	283.5±26.4	363.0±22.5	79.6±10.9*	27.9±2.0
Control(n=10)	288.5±28.4	381.0±39.5	92.5±19.6	28.2±2.2

Mean±SD. *p<.05 compared with the control

Table 2. Effects of excess AsA feeding on the levels of plasma AsA and lipid peroxide and of erythrocyte hemolysis, total glutathione and glutathione peroxidase activity in rats

Group	Plasma		Erythrocyte			
	Total AsA	TBARS	Total GSH	GSH-Px	Hemolysis %	
	mg/dl	MDA nmole/ml	mg/gHb	μmole/min/	Fresh	24hr-refrigerated
AsA	1.15±0.15*	179.9±43.9***	4.16±3.15	61.09±36.00**	9.36±4.10*	10.20±2.26**
Control	0.98±0.16	14.0±7.5	5.39±3.38	23.58±13.06	7.56±2.73	7.34±1.21

Mean±SD. *p<.05, **p<.01, ***p<.001 compared with the control

TBARS : Lipid peroxide, GSH : Glutathione, GSH-Px : Glutathione peroxidase

100g당 100mg의 AsA를 6~20주 까지 경구투여 했을 때도 체중 증가 및 사료 섭취량에 전혀 영향이 없었다는 상반된 보고도 있는데³⁷⁾ 이러한 차이는 AsA공급량, 사료 등 실험조건이 다르기 때문일 것으로 사료된다.

2. 혈장의 총 AsA 와 지질과산화물(TBARS) 농도

혈장 총 AsA수준은 Table 2와 같이 AsA군이 1.15±0.15mg/100ml로서 대조군의 0.98±0.16mg/100ml보다 높았다(p<.05). 이것은 100mg/100g체중의 AsA를 이들에 1번씩 흰쥐에게 복강내 주사로 2주간 투여한 임과 이³⁸⁾ 및 흰쥐에게 150mg/100g체중의 AsA를 4주간 경구투여 한 Bai 등²⁷⁾의 연구와 일치하였다.

혈장 TBARS값은 대조군이 14.0±7.5 MDA nmole/ml임에 비해 AsA군은 179.9±43.9 MDA nmole/ml로서 현저하게 상승하였다(p<.001). 이러한 결과는 임과 이³⁸⁾ 및 guinea pig에게 하루 AsA 100mg/100g체중을 4주간 경구투여한 이 등²⁸⁾의 연구에서 혈장 TBARS값이 감소하였다는 보고와는 상반되는 경향이다. 이 등²⁸⁾의 연구에서는 AsA과량군의 혈장 TBARS값이 4주후에는 AsA적정군보다 낮았으나 5주후에는 높은 값을 보이고 있다. 이러한 결과의 차이는 주로 본 연구의 AsA투여량이 다른 연구보다 3배로서 고도과량이기 때문인 것으로 생각된다. 또한 AsA투여방법의 차이도 결과에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구의 AsA를 사료에 혼합시켜 하루 내내 흰쥐 스스로 조금씩 섭취한 경우와 AsA수용액을 1회에 1일 전량을 복강내 주사³⁸⁾ 또는 syringe로 경구투여²⁸⁾한 경우 사이에는 AsA의 흡수량이나 속도, 혈장 농도의 변화 등이 달랐을 것이며 그로 인해 지질과산화반응에 미치는 영향도 차이가 났을 가능성이 있다.

3. 적혈구의 용혈%, 총 glutathione농도(GSH) 및 glutathione peroxidase활성(GSH-Px)

적혈구 용혈%는 Table 2에서와 같이 채혈 직후에는 AsA군과 대조군이 각각 9.36±4.10%, 7.56±2.73%로서 두 군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 적혈구 분산액을 24시간 냉장보관 후 다시 측정된 용혈%는 AsA군이 약간 증가하여 대조군보다 39.0%(p<.01) 높게 나타났다. 적혈구의 용혈현상은 막지질의 과산화반응에 따른 막의 안정성에 의해 좌우되며, AsA과량공급에 따른 혈장 TBARS값의 상승은(Table 2) 적혈구 막지질의 과산화반응의 증가를 암시한다. 그러므로 24시간 냉장으로 적혈구막의 불안정성이 증가하여 AsA과량공급의 영향이 표면화됨으로써 용혈현상이 증가된 것으로 추정된다. Table로는 제시하지 않았으나 24시간 냉장했던 적혈구 용혈%는 혈장 AsA농도(r=4721, p<.05), 혈장 TBARS값(r=.5763, p<.01), 그리고 적혈구 내 GSH-Px활성(r=.4981, p<.05)과 모두 양의 상관성을 보였다. 이는 다른 연구결과들과 그 경향이 동일하다. 흰쥐나 guinea pig에게 과량 AsA를 2~4주 동안 또는 5일간 공급시킨 결과 적혈구의 용혈현상이 증가되었다고 보고되어 있으며^{27),39)} 이 등²⁸⁾도 guinea pig에게 5주간 과량 AsA의 경구투여로 증가된 용혈을 보고하고 있다. 또한 사람이 매일 5g의 AsA를 섭취하였을 때에도 H₂O₂에 대한 적혈구 용혈은 증가되었으며, AsA의 과량공급이 glucose-6-phosphate dehydrogenase 결핍환자의 용혈을 가속시켰다는 보고도 있다^{40),41)}.

적혈구의 총GSH농도는 Table 2와 같이 대조군 5.39±3.38mg/g Hb, AsA군 4.16±3.15mg/g Hb으로서 AsA군이 낮은 수치를 보였으나 유의성은 없었다.

그러나 적혈구내 GSH-Px활성은 AsA군이 61.09±36 μmole/min/mg Hb으로서 대조군 23.58±13.06 μmole/min/mg Hb에 비해 2.6배 높은 값을 나타내었다(p<.01). Rojas 등은⁴²⁾ guinea pig 에게 5주간 과량 AsA(13200mg/kg사료)를 먹었을 때 심장조직내 산화형GSH와 GSH-Px 활성이 상승하였다고 보고한 바 있다.

GSH와 AsA는 조직세포의 과산화적 손상에 대해 보호적 기능을 공유하며 또한 서로 기능적 연관을 갖는다. GSH는 모든 세포의 항산화적 방어기전의 하나로서 자유라디칼의 scavenger이며 GSH-Px의 기질이 되어 cytosol과 미토콘드리아를 과산화적 손상으로부터 보호한다. GSH는 또한 산화된 AsA와 α-tocopherol를 환원시켜 이들의 항산화적 기능을 촉진시키기도 한다⁴³⁾. 단백질의 -SH기를 환원상태로 유지시키기 위해 thiol transferase의 기질로도 사용된다. GSH-Px는 H₂O₂, organic hydroperoxides 등의 과산화물을 환원시켜 산화적 스트레스로부터 적혈구를 포함한 모든 세포를 보호하는데 GSH-Px활성은 환원형 GSH에 전적으로 의존한다.

본 연구결과에서 적혈구 내 총 GSH의 감소경향은 AsA군의 매우 상승된 혈장 TBA값과 적혈구 내 GSH-Px 활성 증가에 기인한다고 볼 수 있다. 과량 AsA의 만성적 섭취에 의해 야기된 혈장 TBA값의 상승은 적혈구 및 간 등 다른 조직의 산화적 스트레스가 증가하였음을 반영한다(Table 4). 따라서 적혈구 내 GSH 감소 경향은 적혈구 내 활성이 매우 상승된 GSH-Px의 기질로서, 또한 AsA의 항산화작용의 결과로 증가 생성된 dehydroascorbic acid의 AsA로의 환원 등을 포함하여 전술한 여러 항산화적 작용에 GSH가 만성적으로 소모되었기 때문에 나타났다고 생각된다. 혈장에서 생성된 dehydroascorbic acid는 반드시 적혈구 내로 유입되어 그 곳에서 GSH 또는 다른 thiol화합물에 의해 환원된다⁴⁴⁾.

적혈구의 GSH-Px활성은 Table로는 제시하지 않았으나 혈장 TBARS수준 및 24시간 냉장 적혈구의 용혈%와 밀접한 양의 상관관계를 나타내고 있다(각각 r

=.6098 p<.001, r=.4981 p<.05). GSH-Px활성의 증가는 과량 AsA섭취에 따른 적혈구의 산화적 스트레스 증가에 대한 적응의 결과이며, 적혈구의 산화적 스트레스 증가는 아마도 적혈구 내 GSH를 소모하고 적혈구 막의 안정성을 약화시켜 용혈 현상을 증가시켰을 것으로 판단된다. 조직내 GSH 농도의 감소는 세포 손상을 가져온다는 보고는 매우 많으며⁴⁵⁾, 용혈성 빈혈 신생아의 적혈구 내 GSH-Px활성이 정상아에서보다 높게 나타난 Gross 등⁴⁶⁾의 보고도 있다.

4. 혈장의 지질 성상

혈장의 triglyceride(TG) 농도는 Table 3과 같이 AsA군이 대조군보다 낮았으며 총 cholesterol(Chol) 농도는 약간 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 HDL-Chol은 AsA군이 39.05±10.84mg/dl로서 대조군 25.74±9.83mg/dl보다 유의적으로 증가되어(p<.05) 결국 동맥경화지수를 낮추는 효과를 보였다(.05<p<.1). VLDL- 및 LDL-Chol을 합한 양이 두 실험군 사이에 차이가 없는 것으로 보아 AsA군의 총Chol 농도 증가경향은 HDL-Chol의 상승에 기인하는 것으로 생각된다. 본 결과는 AsA보충투여와 혈중 지질농도에 관한 다른 연구결과와 일치한다.⁸⁻¹⁰⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾ Gillman 등⁴⁹⁾은 채소와 과일을 많이 먹는 사람들이 혈청의 TG와 총Chol 및 LDL-Chol 농도가 낮은 반면 HDL-Chol 농도는 높아져 동맥경화지수가 낮아지고 심장병으로 인한 사망율이 크게 줄었다고 보고하였는데, 이 때 채소 및 과일의 효과는 비타민 C, 엽산, 섬유소, K 등의 복합적인 영향에 의한 것으로 생각되나 특히 비타민 C가 항산화제로 작용하여 LDL의 산화를 억제함으로써 혈관 내벽의 상처로 몰려드는 산화 LDL의 양을 감소시켜 동맥경화의 발생을 예방할 수 있다고 하였다.

5. 간 조직의 AsA와 TBARS 농도

간 조직의 AsA수준은 Table 4와 같이 대조군에 비해 AsA군이 높았으며(p<.05), TBARS값도 유의성은 없었으나 대조군 163.5±188.4 MDA nmole/g보다 AsA군이 266.6±97.8 MDA nmole/g 로서 높게 나타

Table 3. Effects of excess AsA feeding on lipid pattern in rat plasma

Group	Total cholesterol	HDL-Cholesterol	(VLDL+LDL)-Cholesterol ^a	Triglyceride	Atherogenic index ^b
AsA	86.65±17.08	39.05±10.84*	45.60±22.59	77.26± 5.33	1.35±0.91 [†]
Control	76.33±13.94	25.74± 9.83	50.59± 7.12	91.08±31.07	2.18±0.67

Mean±SD. *p<.05, [†].05<p<.1 compared with the control

^aTotal cholesterol - HDL-cholesterol

^bTotal cholesterol - HDL-cholesterol / HDL-cholesterol

Table 4. Effect of excess AsA feeding on the levels of AsA, lipid peroxide, total cholesterol, and triglyceride in rat liver

Group	Total AsA	TBARS	Total cholesterol	Triglyceride
	$\mu\text{mol/g wet wt}$	MDA nmole/g wet wt	mg/g wet wt	mg/g wet wt
AsA	$1.44 \pm 0.25^*$	266.6 ± 97.8	$5.449 \pm 1.443^*$	$6.107 \pm 1.739^{**}$
Control	1.21 ± 0.09	163.5 ± 188.4	4.085 ± 1.075	10.707 ± 4.875

Mean \pm SD. * $p < .05$, ** $p < .01$ compared with the control.

났다. 그러나 TBARS값과 AsA농도 사이에 유의적인 상관관계는 보이지 않았다. Chen과 Chang²⁵⁾, Gazdarova 등⁵⁰⁾ 및 Cadenas 등⁵¹⁾이 guinea pig에서 과량 AsA섭취가 간 조직중 지질과산화물과 protein carbonyl의 생성을 증가시켰다고 보고하고 있어 본 결과와 일치한다. 그러나 과량 AsA투여에 의해 간의 AsA농도는 상승하였으나 TBARS값이 변화가 없거나²⁶⁾³⁸⁾ 감소하였다²⁷⁾는 상반된 보고도 있다.

6. 간 조직의 TG와 총Chol 농도

간 조직의 총Chol 농도는 Table 4와 같이 AsA군이 대조군에 비하여 높았고($p < .05$) TG 농도는 감소한 결과를 보였는데($p < .01$) 이는 혈중지질 농도의 변화와 유사한 경향이였다. 그러나 Nagyova 등⁴⁸⁾은 guinea pig에게 최저필요량 100배의 비타민 C를 음용수로 주었을 때 간 조직의 총Chol이 감소하였다고 하였고, Sharma 등⁵²⁾은 AsA를 결핍시킨 guinea pig에게 고콜레스테롤 식이를 먹었더니 간에 Chol과 TG가 많이 축적되었다고 하여 본 결과와 같이 AsA 섭취 수준이 간 조직의 지방대사에 영향을 줄 수 있음을 보고하고 있다. 본 결과에서 간의 총Chol 증가는 아마도 혈중 HDL-Chol의 증가와 관련이 있을 것으로 사료된다.

7. 혈소판의 TXA₂ 생성

AsA 투여군에서 혈장내 지질과산화물이 대조군에 비하여 많았음에도 불구하고 혈소판으로부터 생성되어 나온 TXA₂의 양은 Fig. 1에서 보듯이 AsA군은 $207 \pm 66.4\text{pg/tube}$ 로 대조군의 $445.5 \pm 183.3\text{pg/tube}$ 와 비교시 유의적으로 감소되어 대조군의 46.6%로 나타났다($p < .05$).

TXA₂는 혈소판의 응집력을 촉진하고 혈관수축제로 작용하는 것으로 알려져 있으므로 AsA 투여로 인해 TXA₂의 생성이 크게 줄었다면 혈소판의 응집이 감소되고 혈관수축이 억제되어 동맥경화와 혈압상승을 억제하는 효과를 기대할 수 있다. 실제로 소금물을 먹여 고혈압을 유발시킨 쥐에게 0.3%의 ascorbic acid용액을 먹었을 때 혈압이 감소하고 소변 중 PGE₂/PGF₂의 비율이 증가하였다고 하였으며⁵⁴⁾, AsA가 혈관수축을 이완케 하는 PGE₂의 합성을 상대적으로 증가케 함으로써 혈관을 확장시켜 혈압을 낮추었을 것이라고 설명하

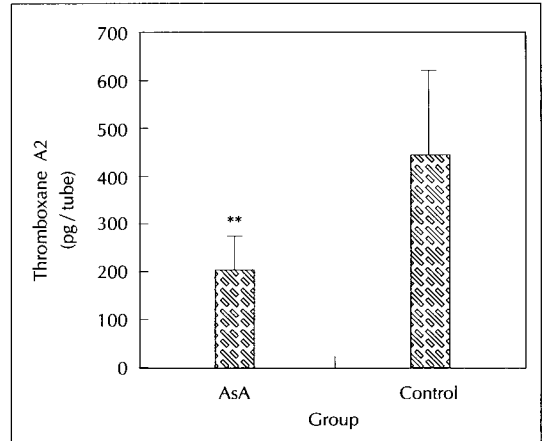


Fig. 1. Effect of excess AsA feeding to rats on the production of thromboxane A₂.

였다. 사람에서도 과량 AsA투여가 혈관질환과 관련되어 혈소판 응집¹⁴⁾¹⁵⁾⁵³⁾ 및 TXA₂ 생성⁵³⁾에 대해 보호작용을 보였다는 보고가 있다. Beertens와 Herman¹⁷⁾은 흰 쥐 및 guinea pig의 대동맥 조직 배양에서 AsA첨가가 PGI₂의 생성을 촉진하였다고 보고하였는데, PGI₂생성 증가는 혈소판에서의 cAMP 상승과 그에 따른 TXA₂ 생성 감소를 의미할 수도 있다⁵⁵⁾.

그러나 이 등은²⁸⁾ guinea pig에게 100mg/100g체중의 AsA를 공급하였을 때 적정량의 AsA를 공급한 경우보다 적혈구 용혈이 상승하였으며 동시에 prostaglandin(PG) endoperoxides의 생성이 촉진되었음을 보고한 바 있고, 최근 Fann 등¹⁸⁾은 사람 허파 조직을 사용한 in vitro조직 배양 실험에서 AsA의 첨가가 TXA₂와 PGI₂를 포함하여 모든 prostanoids의 생성을 촉진시킨 것을 관찰하여 AsA가 cyclooxygenase의 활성을 증가시키거나 기질의 이용성을 증가시킴으로써 arachidonic acid로부터 prostanoid의 생성을 촉진할 것이라고 보고하고 있어 좀더 연구할 필요가 있으리라 생각된다. 또한 PGI₂도 함께 측정하여 PGI₂/TXA₂ 비율을 검토한다면 과량 AsA의 동맥경화 관련 기전을 보다 포괄적으로 파악할 수 있을 것이다.

요약 및 결론

비타민 C의 만성적 과량섭취가 혈장과 간 조직의 지

질과산화 수준과 지질 농도에 미치는 영향을 검토하기 위하여 흰쥐에게 4주간 300mg/100g체중의 L-ascorbic acid(AsA)를 사료에 혼합하여 공급한 결과는 다음과 같다.

1) 흰쥐의 실험 초기 및 마지막 체중과 식이섭취량은 대조군과 AsA군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 체중 증가량은 AsA군이 대조군보다 적었다.

2) 혈장과 간조직의 AsA농도가 대조군에 비해 AsA군이 상승했으며, 혈장 TBARS값도 AsA군이 대조군보다 매우 증가하였고, 간의 TBARS값도 통계적 유의성은 없었으나 AsA군이 월등 높았다.

3) 적혈구의 용혈%는 AsA군에서 증가된 경향을 보였으며, 총GSH 농도는 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었으나 AsA군이 낮았다. 그러나 적혈구 내 GSH-Px활성은 AsA군이 대조군보다 매우 증가하였다.

4) AsA군이 대조군에 비해 혈장 HDL-Chol 농도가 높고 동맥경화지수가 낮았으며, 간 조직에서는 총 Chol 농도는 높았으나 TG 농도는 낮아졌다.

5) 혈소판의 TXA₂ 생성은 AsA군이 대조군의 46.6%로서 매우 감소되었다.

이상의 결과에서 보면 본 실험에서 사용한 하루 300mg/100g체중의 AsA과량섭취는 흰쥐의 혈액과 간의 지질과산화수준을 증가시킴으로써 항산화물질인 GSH 소모와 GSH-Px활성 증가를 유도한 것으로 보인다. 그러나 혈중 HDL-Chol을 상승시키고 간의 TG 양을 저하시켰으며 혈소판으로부터 TXA₂ 생성을 감소시켜 동맥경화와 혈전으로 인한 심장병의 발병을 억제시킬 수 있는 가능성을 보여 주었다.

본 실험의 AsA투여량은 다른 동물실험에서 사용한 것보다 매우 많은 양으로서 guinea pig의 AsA 최저필요량의 150배에 해당하며, 성인에게 그대로 필요량(55mg/일)의 150배를 적용한다면 하루에 8.25g을 준 셈이다. AsA를 체내합성하는 흰쥐에게 이러한 고도과량의 AsA공급은 동맥경화 억제 가능성과 함께 반대로 체내 산화적 스트레스의 증가, 성장 지연 등 부정적 영향도 줄수 있을 것으로 판단된다. 그러므로 인체에도 AsA 과량투여에 따른 이점과 동시에 악영향의 가능성을 배제하기 어려우므로 비타민 C를 함유한 영양보충제 등의 남용을 막고 임상치료를 시키기 위하여 비타민 C의 대량처방에 신중을 기하여야 할 것이다.

Literature cited

1) Pelletier O. Vitamin C and cigarette smoker. *Ann NY Acad Sci* 258 : 156-167, 1975

2) Simon JA. Vitamin C and cardiovascular disease. *J Am Coll Nutr* 11(2) : 107-125, 1992

3) Som S, Basu D, Mikherjee S. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metabolism* 30 : 572-577, 1981

4) Mirvish SS. Blocking the formation of N-nitroso-compounds with ascorbic acid. In vitro and in vivo. *Ann NY Acad Sci* 258 : 175-180, 1975

5) Clemetson CAB. Vitamin C, Vol II, CRC Press, Boca Raton, pp147-163, 1989

6) Erden F, Gulenc S, Torun M, Kocer Z, Simsek B, Nebioglu S. Ascorbic acid effect on some lipid fractions in human beings. *Acta Vitaminol Enzymol* 7 : 31-88, 1985

7) Uchida K, Nomura Y, Takase H, Tasaki T, Seo S, Hayashi Y, Takeuchi N. Effect of vitamin C depletion on serum cholesterol and lipoprotein levels in ODS(od/od) rats unable to synthesize ascorbic acid. *J Nutr* 120 : 1140-1147, 1990

8) Manson JE, Gawiano JM, Jones MA, Hennekens CH. Antioxidants and cardiovascular disease : A review. *J Am Coll Nutr* 12 : 426-432, 1993

9) Ginter E, Zdichynec B, Holzerova D, et al. Hypocholesterolemic effect of ascorbic acid in maturity onset diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res* 48 : 368-373, 1978

10) Heine H, Norden C. Vitamin C therapy in hyperlipoproteinemia. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* 49 : 45-54, 1979

11) Khan AR, Seedarnie FA. Effect of ascorbic acid on plasma lipids in healthy young women. *Atherosclerosis* 39 : 89-95, 1981

12) Johnson GE, Obenshain SS. Nonresponsiveness of serum high-density lipoprotein cholesterol to high dose ascorbic acid administration in normal men. *Am J Clin Nutr* 34 : 2088-2091, 1981

13) Fujinami T. Atherosclerosis and dietary minor components with special reference on ascorbic acid. *J Jpn Atheroscler Soc* 13 : 739-749, 1985

14) Lopez A, Yates B, Hardon C, Mellert H. Effects of ascorbic acid on platelet aggregation and serum lipids and lipoproteins. *Clin Res* 26 : 583A, 1978

15) Cordova C, Musca A, Violi F, Perrone A, Alessandri C. Influence of ascorbic acid on platelet aggregation in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 41 : 15-19, 1982

16) Srivastava KC. Ascorbic acid enhances the formation of prostaglandin E in washed human platelets and prostacyclin in rat aortic rings. *Prostaglandins Leukotrienes Med* 18 : 227-233, 1985

17) Beetens JR, Herman AG. Vitamin C increases the formation of prostacyclin by aortic rings from various species and neutralizes the inhibitory effect of 15-hydroperoxyarachidonic acid. *Br J Pharmacol* 80 : 249, 1983

- 18) Fann YD, Rothberg KG, Tremml PG, et al. Ascorbic acid promotes prostanoid release in human lung parenchyma. *Prostaglandins* 31 : 361-368, 1986
- 19) Manku MS, Oka M, Horrobin DF. Differential regulation of the formation of the prostaglandins and related substances from arachidonic acid and from dihomogammalinolenic acid. II. Effects of vitamin C. *Prostagl Med* 3 : 129, 1979
- 20) 김선효. 중년기의 비타민, 무기질 보충제 복용실태조사. *한국영양학회지* 27(3) : 236-252, 1994
- 21) 이상선 · 김미경 · 이은경. 서울지역 성인의 영양보충제 복용실태. *한국영양학회지* 23(4) : 187-197, 1990
- 22) Young IS, Torny JJ, Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic Bio Med* 13(1) : 4-46, 1992
- 23) Schmidt KH, Hagmaier V, Horning DH, Vuilleumier JP, Rutishauser G. Urinary oxalate excretion after large intakes of ascorbic acid in man. *Am J Clin Nutr* 34 : 305-311, 1981
- 24) Rivers JM. Safety of high-level vitamin C ingestion. *Ann NY Acad Sci* 498 : 445-454, 1987
- 25) Chen LH, Chang HM. Effects of high level of vitamin C on tissue antioxidants status of guinea pig. *Int J Vit Nutr Res* 49 : 87-91, 1979
- 26) Adlard BPF. Ascorbic acid in developing brain. Possible function as an inhibitor of lipid peroxidation. *Biochem Soc Transact* 2 : 281-284, 1974
- 27) Bai NJ, George T, Remanikuttyamma CN, Krishnamurthy S. Effect of excess ascorbic acid in rats on hemolysis and lipid peroxidation. *Ind J Nutr Dietet* 16 : 16-21, 1979
- 28) 이정원 · 이태녕 · 모수미 · 이진호 · 이태형 · 박수남 · 이보경. L-ascorbic acid가 guinea pig에서 혈장 지질과산화값, prostaglandin 생합성, 광용혈, superoxide dismutase 및 catalase 활성에 미치는 영향. *한국생화학학회지* 24(4) : 378-388, 1987
- 29) Roe JH and Kuether CA. Determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 147 : 399, 1943
- 30) Folch J, Less M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226 : 497-509, 1957
- 31) 이정원 · 모수미 · 이태녕. 무산소상태에서 FeCl₃로 촉진된 thiobarbituric acid반응을 이용한 혈청 중 TBA반응물의 새로운 정량법. *한국영양학회지* 17(1) : 31-40, 1984
- 32) Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86 : 271-278, 1978
- 33) Buchingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr* 115 : 1425-1435, 1985
- 34) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70 : 158-169, 1967
- 35) Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione : applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27 : 502-522, 1969
- 36) Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic Biol Med* 17(2) : 105-115, 1994
- 37) Nandi BK, Majumber AK, Subramanian N, Chatterjee I. Effect of large doses of vitamin C in guinea pigs and rats. *J Nutr* 103 : 1688-1695, 1973
- 38) 임혜선 · 이정원. L-ascorbic acid의 급성 및 만성적 투여가 흰쥐의 적혈구 용혈 및 조직 중의 지질과산화 수준에 미치는 영향. *한국노화학학회지* 2(2) : 153-158, 1992
- 39) Bai NJ, Kumer PS, Geroge Y, Krishnamurthy S. Effect of dietary protein and hypervitaminosis A or C on tissue peroxidation and erythrocytosis of vitamin E deficiency. *Intl J Vitam Nutr Res* 52 : 386, 1981
- 40) Metha JB, Singhal SB, Metha BC. Ascorbic acid induced hemolysis in G-6-PD deficiency. *Lancet Oct* 13 : 944, 1990
- 41) Iwamoto N, Kawaguch T, Horikawa, et al. Haemolysis induced by ascorbic acid in paroxymal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 343(8893) : 357, 1994
- 42) Rojas C, Cadenas S, Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Barja G. Effect of vitamin C on antioxidants, lipid peroxidation and GSH system in the normal guinea pig heart. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)* 40(5) : 411-420, 1994
- 43) Scholz RW, Graham KS, Gumprich E, Reddy CC. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 570 : 514-517, 1989
- 44) Clemetson CAB. Vitamin C. Vol I, CRC Press, Boca Raton, 1989, pp181-182
- 45) Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PAM, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 203 : 1068-1069, 1991
- 46) Gross RT, Bracci R, Rudolph N, Schroeded E, Kochen JA. Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in the erythrocytes of new born infants. *Blood* 29(4), 1967
- 47) Lamon-Favas, Jenner JL, Jacques PF, Schaefer EJ. Effects of dietary intakes on plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins in freeliving elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 59 : 32-41, 1994

- 48) Nagyova A and Ginter E. Interactions between hepatic ascorbic acid, cytochrome P-450 and lipids in female guinea pig with different ascorbic acid intake. *Physiol Res* 43(5) : 307-312, 1994
- 49) Gillman MW, Cupples LA, Gagnon D, Posner BM, Ellison RC, Castelli WP, Wolf PA. Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. *JAMA* 273 : 1113-1117, 1995
- 50) Gazdarova AK, Gazdarova IN. Polarographic estimation of lipid peroxides in liver tissue of guinea pigs treated with various dose of ascorbic acid. *Vopr Med Khim* 25 : 524-527, 1979
- 51) Cadenas S, Rojas C, Perez-Campo R, Lopez Torres M, Barja G. Effect of dietary vitamin C and catalase inhibition of antioxidants and molecular markers of oxidative damage in guinea pigs. *Free Radic Res* 21(2) : 109-118, 1994
- 52) Sharma D, Pramod J, Sharma PK, Sapra M, Manorma, Kothari LK. Effect of vitamin C deficiency and excess on the liver : A histopathological and bio-chemical study in guinea pigs fed normal or high cholesterol diet. *Indian J Pathol Microbiol* 33(4) : 307-313, 1990
- 53) Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Rinta-Kiikka S, Kuukka M, Korpela H, Alfthan G, Kantola M, Schalch W. Effects of antioxidant supplementation on platelet function. *Am J Clin Nur* 53(5) : 1222-1229, 1991
- 54) Ziemlanski S, Wartanowicz M, Potrzebnicka K, Burgos de Moor A, Iwanow K, Ignatowska-Switalska M, Zelakiewicz K. Effects of exogenous arachidonic acid on experimental hypertention and mineral balance in rats fed low- and high-fat diets. *Nutrition* 7(2) : 131-135, 1991
- 55) Gerrard JM, Peller JD, Krick TP, White JG. Cycle AMP and platelet pro-staglandin synthesis. *Prostaplandins* 14 : 39, 1977