

비타민 C의 방사선에 의한 간독성 완화 효과

인제대학교 의과대학 부산백병원 방사선종양학과*, 경상대학교 의과대학 방사선종양학교실[†],
경상대학교 응용생명과학부[‡], 진주국제대학교 식품과학부[§]

안기정* · 박성광* · 조홍래* · 강기문[†] · 정덕화[‡] · 강진순[§] · 채규영[‡]

목적: 본 연구는 방사선에 의한 간 손상에 대한 비타민 C의 보호 효과를 알아보기 위해서 시행되었다.

대상 및 방법: Sprague Dawley 실험 쥐를 대조군, 방사선 조사군, 방사선 조사 후 비타민 C 투여군, 3그룹으로 나누어 각 그룹에 무작위로 6마리를 분배하여 실험을 진행하였다. 비타민 C의 항산화 효과를 알아보기 위해서 Superoxide dismutase (SOD), 카탈라제, Malondialdehyde (MDA), 간 효소를 측정하고 그 값을 비교하였다.

결과: 방사선에 의해서 증가된 MDA 수치와 감소된 SOD 활성도 및 카탈라제의 활성도는 비타민 C 투여로 개선되었으나 통계적 유의성은 없었다. GOT, GPT, LDH, ALP 수치들은 방사선 조사로 증가되었으나 비타민 C 투여로 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, GPT의 경우에는 통계적으로 유의하게 감소하였다. 전자 현미경 소견에서도 간세포 구조의 손상 정도가 비타민 C 투여군에서 뚜렷하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

결론: 비타민 C는 방사선에 의한 간세포 손상에 대해서 비록 통계적 유의성은 없었으나 항산화 효과를 보였다.

핵심용어: 비타민 C, 방사선, 간 독성, 항산화 효과

서 론

방사선 치료는 수술, 항암약물요법과 더불어 환자의 생존율을 증가시키는데 크게 기여하고 있는 치료 방법으로 현재 임상에서 널리 사용되고 있다. 그러나 방사선이 정상 조직에 조사될 경우 창상 치유가 늦어지고 조직 내에서 산소 결핍 및 국소적 부종, 조직 괴사, 염증 반응의 소실 등을 일으키고, 혈관 손상을 통한 조직 저산소증 등을 유발하기도 한다.^{1,2)}

방사선 치료에 사용되는 고 에너지 방사선이 인체에 흡수되면 H₂O를 HO·, H·, e⁻aq, H₃O⁺, H₂, H₂O₂로 분해시키며, 이들 분해 산물들은 산소와 반응하여 과산화물을 생성한다.^{3,4)} 과산화물은 반응성이 아주 강한 파괴적인 물질로 DNA, 단백질, 지질과 같은 많은 거대 분자들과 반응한다. 특히 생체 구성 단백질들과 세포막을 구성하는 지질을

변성시키고 미토콘드리아와 미세소체의 구조의 변화가 유발되어 세포가 파괴되며, 효소의 기능도 파괴된다. 그리고 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 의존성 지질 과산화물을 유발하여 조직 손상을 일으키고,⁵⁻⁸⁾ 암을 비롯한 여러 질병을 유발한다.⁹⁾ 과산화물에 대한 신체 방어 기전으로 과산화 디스무타제(superoxide dismutase, SOD)가 생성된다. SOD는 과산화물을 과산화수소나 산소 분자로 전환시키고, 과산화수소를 제거하는 카탈라아제(catalase)를 유도하여 과산화수소를 물과 산소로 바꾸어서 산화적 손상에 대응한다.¹⁰⁾

라디칼을 제거하는 효과를 나타내는 것에는 효소, 지용성 화합물, 수용성 화합물, 고분자 항산화물질로 분류된다. 효소에는 과산화 디스무타제(superoxide dismutase, SOD), GSH (glutathione peroxidase)이 있고, 지용성 화합물에는 비타민 E, 베타 카로틴이 있다. 수용성 화합물에는 비타민 C가 있고 고분자 항산화물은 알부민이 있다.¹¹⁾ 이들 중에서 비타민 C는 많은 용량을 섭취하여도 부작용이 적고 많은 양을 손쉽게 구입할 수 있는 물질이므로 비타민 C를 선택하여 본 실험을 하게 되었다. 비타민 C는 수용성 항산화제로서 과산화물이나 라디칼과 빠르게 반응하여 라디칼을 제거하고,^{12,13)} 항산화 효소의 활성도를 높여서 항산화 효과를 발휘한다.^{14,15)} 비타민 C를 섭취하면 질산염으로부터 니

이 논문은 2004년 8월 16일 접수하여 2004년 10월 22일 채택되었음.

본 논문은 2004년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

책임저자: 채규영, 경상대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 055)750-8220, Fax: 055)750-8217
E-mail: cgyinj@nongae.gsnu.ac.kr

트로사민(nitrosamine)의 형성이 억제되며, 동물실험에서는 아질산염의 발암성을 낮춘다고 알려져 있다.¹⁶⁾ 암 환자에게 10 gm의 비타민 C를 투여할 경우 대조군에 비해 생존율이 4배 증가하고¹⁷⁾ 나이트로화합물(nitrocompound)에 의한 세균에서의 돌연변이가 억제된다.¹⁸⁾ 사람을 포함한 포유류에서는 에스트로젠 분비를 유도하고,¹⁹⁾ 돌연변이원 전구물질이 DNA에 붙는 것을 억제한다.²⁰⁾

본 연구는 방사선 조사에 의한 간세포 손상 정도를 알아보고 비타민 C에 의한 세포손상의 완화 기전을 규명하고자 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료

실험쥐는 Sprague-Dawley 계통의 생후 6주, 평균무게 150 ± 20 gm의 수컷 실험쥐를 대한실험동물센터에서 구입하여 동물 사육장에서 1주일 간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험동물의 사육

사육장은 25°C를 유지하도록 하였으며 명암주기는 자연 채광으로 하고 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 실험군의 구성 및 투여농도 및 용량

실험군은 7군으로 나누었으며 각 군당 6마리를 배정하였다. 방사선 조사는 실험 기간 내 단 1회로 실험 첫날에 조사하였고 비타민 C는 kg당 10 mg 투여하였다. 비타민 C는 복강 주사로 실험 첫날 1회 투여 후 3일에 한 번씩, 5회 반복 투여하였으며 총 15일 간 실험을 시행하였다.

대조군인 제 1군은 용매인 DMSO 0.1 ml, 0.1M NaHCO₃ 0.1 ml를 투여하였다. 제 2군은 방사선 조사 후 대조군과 같은 용매제를 투여하였으며 제 3군은 방사선 조사 후 비타민 C를 0.1 ml와 용매 DMSO 0.1 ml를 투여하였다.

3) 방사선조사

마취제에 의해서 생길 수 있는 실험쥐의 간 독성을 배제하기 위해 마취를 시키지 않은 상태로 실험을 하였다. 투시검사기로 실험쥐의 간 부위를 확인한 뒤 위치를 표시하고 실험쥐를 스타킹 안에 넣은 뒤 아크릴 판 위에 놓고 테이프로 고정하였다. 6 MV 방사선을 1.5 cm 깊이에 1,500 cGy 1회 조사하였다.

4) 실험동물의 처리

십오일 째에 에테르로 마취시켜 실험을 시행하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며 50 ml 주사기를 사용하여 차가운 phosphate buffer (0.1M pH 7.4)를 복부 대정맥을 통해

주입하여 혈액을 제거한 다음, 간을 적출하여 차가운 PBS에 넣어 잔여혈액을 다시 제거하였으며 간 무게를 잰 후 실험에 사용하였다. 혈청 및 간 조직은 적출 즉시 실험을 실시하였으며 ELISA, high-power liquid chromatography (HPLC) 측정을 위한 혈청 및 조직은 -70°C에 보관한 후 실험을 시행하였다.

5) 혈청 및 간 세포의 분획

혈청은 4°C 냉암소에서 2시간 방치 후 700g에서 10분간 원심분리하였다. 간 세포막의 분획은 다음의 방법으로 시행하였다. 저온실에서 간의 무게 당 10배의 완충용액(1.15% KCL/10 mM phosphate buffer+5 mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 균질화한 다음 700g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 다시 9,000g에서 15분간 원심분리하였다. 이때 생긴 잔사는 완충용액으로 정용(g/ml)하여 미토콘드리아 획분으로 하였다.

6) 지질 과산화 및 항산화 효소활성측정

(1) Malondialdehyde (MDA) 측정: 혈청 및 간 중의 과산화지질 정량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 MDA량을 측정하여 지질의 과산화정도를 산출하였다.²¹⁾ 시료 0.2 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml와 20% acetate 1.5 ml를 가하여 잘 섞은 뒤 1.2% TBA 1.0 ml를 혼합하여 100°C에서 30분간 가열한 뒤 얼음물에 즉시 냉각하였다. 그 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 뒤 상층액 속의 MDA-TBA결합체를 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 MDA 함량은 회귀방정식으로 산출한 표준 1,1,3,3-teramethoxypropane (MDA, Sigma)의 직선방정식에 대입하여 구하였다.

(2) 과산화소디스뮤타아제(SOD)의 활성측정: 혈청 및 간 중의 SOD 양은 혈청과 간 중의 미세소체, 미토콘드리아 획분을 인산완충액(pH 8.2)으로 100배 희석하여 그 0.1 ml에 증류수 0.5 ml, A시약(52.125 mg of hydroxylamine+102.1 mg of hypoxanthine/250 ml D.W), B시약(7.5 mU/ml xanthine oxidase with 10⁻⁴ MEDTA-2Na/ phosphate buffer, pH 8.2)을 각각 0.2 ml를 첨가, 혼합하여 37°C 항온 수조에서 40분간 정치한 후 C시약(300 mg of sulfanilic acid+N-1-naphthylethyenediamine/500 ml of 16.7% acetic acid) 2.0 ml를 첨가, 혼합하여 분광광도계를 사용, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준품(superoxide dismutase from human erythrocytes, Sigma제, USA)을 이용한 표준 검량선에 의해 SOD를 정량하였다.²²⁾

(3) 카탈라아제의 활성측정: Rigo 등²³⁾이 제안한 polarography에 의해서 혈청 및 간 중의 카탈라아제 양을 산출하였고, 미토콘드리아에서 카탈라아제 활성의 측정은 먼저

미토콘드리아 핵분을 인산완충용액(130 mM, pH 7.0)으로 10배 희석하여 사용하며 혈청은 원액을 그대로 사용하였다. 시험관에 인산완충용액(130 mM, pH 7.0) 250 μ l, 증류수 330 μ l, 미토콘드리아핵분 20 μ l에 15 mM의 과산화수소 용액 900 μ l을 첨가, 5초간 잘 섞은 다음 분광광도계를 사용하여 240 nm에서 시간에 대한 흡광도의 변화를 2분간 측정하여 1 unit는 1분간 과산화수소 1 μ mole의 분해로 정의하여 계산하였다.

(4) 단백질 정량: MDA 함량과 SOD와 카탈라아제 활성도의 분석은 mg으로 단백질에 대한 함량과 활성도로 표시하였으며, 각 시료의 단백질 정량은 Bio-Rad 사의 protein assay dye reagent (USA)를 이용하여 측정하였다.

7) 혈청속의 간 효소의 활성 측정

혈청에서의 간 효소인 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase) 측정은 GOT/GPT kit를 사용하였으며 Karmen unit로 나타내었다. LDH (lactate dehydrogenase)는 LDH-LQ (Asan, co)를 사용하여 Wroblewski unit로 나타내었으며, ALP (alkaline phosphatase)는 kind-king 측정법으로 만들어진 New-K-PHOS kit를 사용하여 King-Armstrong (K-A)단위로 나타내었다.

8) 전자현미경 관찰

간 조직을 각각 1~2 mm³의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde로 전 고정한 후 1% osmium tetroxide로 고정을 하였다. 이 때 사용하는 모든 시약은 0.1 M 인산완충용액으로 희석 및 세척하였다. 알콜 농도를 높여가면서 시료를 탈수하고 propylene oxide로 조직을 치환시킨 다음 epon 812에 포매하였다. 포매된 조직을 60°C 오븐에서 24시간 중합시킨 후 초박절기를 이용하여 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 뒤 투과 전자현미경(Hitachi H-600)으로 75 KV에서 관찰하고 사진 촬영하였다.

9) 통계처리

분석 결과의 통계처리는 실험군당 평균±표준편차로 표시하였다. 통계검증은 SAS를 이용하여 one-way ANOVA

분석을 실시한 후 유의성이 있는 경우 사후 분석으로 다중 비교의 하나인 Duncans의 다중 범위 검증을 실시하여 통계적 차이를 확인하였다. 모든 통계는 p 값이 0.05 미만일 때 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 간의 무게에 미치는 영향

15일 동안 사육한 쥐의 간의 무게를 측정한 결과 대조군에 비해서 방사선 조사군과 방사선 조사 후 비타민 C 투여군 간의 유의한 차이는 없었으나 대조군에 비해 방사선 조사군에서 간의 무게가 증가하였다(Table 1). 비타민 C의 투여 후 간의 무게가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다.

2. MDA 정량

통계적 유의성은 없었으나 방사선 조사에 의해서 MDA의 수치가 대조군에 비해 증가되었으며, 비타민 C를 투여할 경우 미세소체와 미토콘드리아에서 MDA의 수치가 감소 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 혈청에서는

Table 2. Malondialdehyde Level of the Serum, Liver Microsome and Mitochondria

	MDA (nmol/mg protein)	
	Serum	Liver mitochondria
G1	69.59±7.41	11.74±3.62
G2	71.41±13.34	15.09±4.37
G3	72.56±17.73	10.75±4.29
p	0.050	0.902

G1: control group, G2: radiation exposed group, G3: radiation +vitamin C treated group

Table 3. Superoxide Dismutase Activities of the Serum, Liver Microsome and Mitochondria

	SOD (unit/mg protein)	
	Serum	Liver mitochondria
G1	1.33±0.42	921.35±48.38
G2	1.10±0.18	744.49±59.04
G3	1.19±0.28	773.79±41.11
p	0.170	0.993

G1: control group, G2: radiation exposed group, G3 : radiation +vitamin C treated group

Table 1. Liver Weight of Rats

Group	Liver weight (gm)
G1	11.17±1.45
G2	12.16±0.82
G3	11.36±0.82
p	0.62

G1: control group, G2: radiation exposed group, G3: radiation +vitamin C treated group

약간 증가하는 것으로 나타났다(Table 2).

3. 항산화 효소의 활성

1) SOD의 활성

방사선에 의해서 혈청과 간 미토콘드리아에서 SOD의 수치가 뚜렷하게 감소하는 경향을 보였으며 비타민 C를 투여할 경우 SOD의 활성이 증가되었으나 통계적 유의성은 볼 수 없었다(Table 3).

2) 카탈라아제의 활성

산화적 대사에 의해 생성되는 과산화수소의 제거를 위해 체내 생성되는 항산화효소인 카탈라아제활성에 미치는 방사선과 비타민 C의 효과를 조사하였다. SOD 활성도에서와

같이 방사선에 의해 카탈라제의 활성도가 감소하였으며 비타민 C를 투여할 경우 카탈라제의 활성도가 회복되는 양상을 보였으며 통계적 유의성은 없었다(Table 4).

4. 간 효소(liver function enzyme)의 변화

GOT, GPT, ALP, LDH 모두에서 방사선 조사 후 수치가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 비타민 C 투여 후 전체적으로 수치들이 감소하였고, 특히 GOT, ALP, LDH에 비해 GPT에서는 유의한 차이를 볼 수 있었다(Table 5).

5. 전자현미경에 의한 간 조직의 관찰

대조군(G1)에서는 핵, 핵막이 모두 정상 모양을 하고 있

Table 4. Catalase Activities of the Serum, Liver Microsome and Mitochondria

	Catalase (umole/min/mg protein)	
	Serum	Liver mitochondria
G1	58.94±7.24	360.63±50.17
G2	32.88±6.20	324.65±67.75
G3	33.05±7.12	397.70±32.20
p	0.022	0.576

G1: control group, G2: radiation exposed group, G3: radiation +vitamin C treated group.

Table 5. Alteration of the Liver Function Enzymes in Rat Serum

	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP	LDH
G1	196.00±50.66	61.00±7.16	27.33±4.46	2205.41±491.79
G2	243.50±62.34	80.00±9.03	34.05±6.99	2555.85±548.30
G3	185.17±38.61	73.17±5.91	34.97±8.07	2236.89±507.58
p	0.774	0.001	0.465	0.449

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: glutamic pyruvic transaminase, ALP: alkaline phosphatase, LDH: lactate dehydrogenase. G1: control group, G2: radiation exposed group, G3: radiation +vitamin C treated group

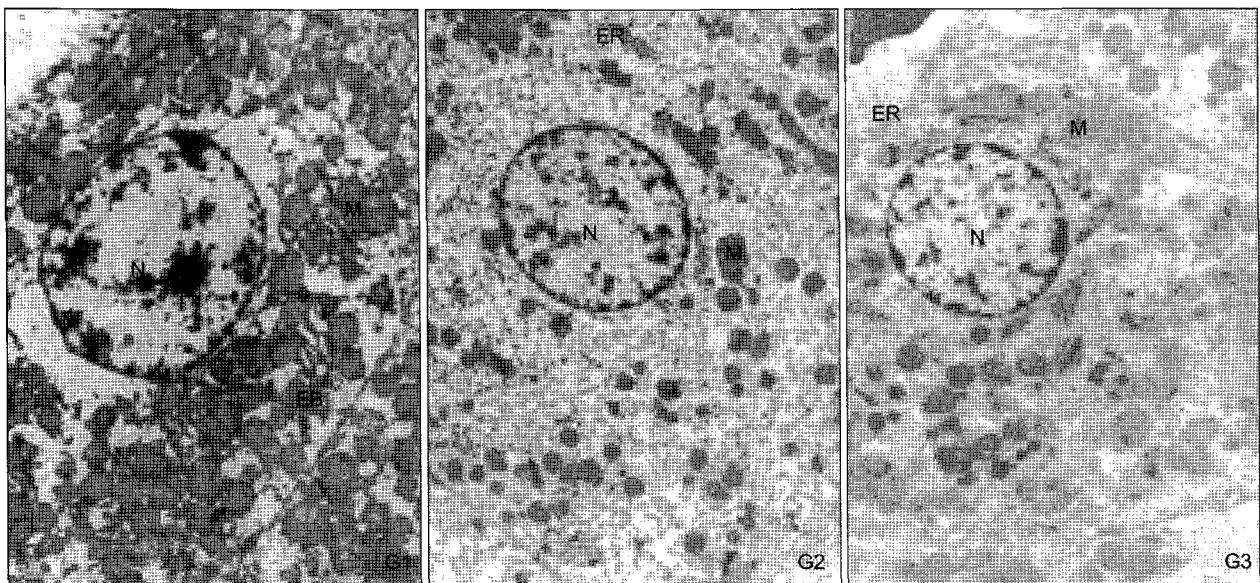


Fig. 1. Electron micrograph of ultrastructural feature of cell organelles in the liver (7,800x). Stained with uranyl acetate and lead citrate. M, mitochondria; N, nucleus; ER, rough endoplasmic reticulum, G1: control group, G2: radiation exposed group, G3: radiation +vitamin C treated group.

으며, 미토콘드리아에서도 규칙적인 크리스테(cristae)가 관찰되었다. 또한 미토콘드리아 주변의 소포체도 전형적인 평형구조를 나타내고 있다. 방사선을 조사한 군(G2)에서는 핵과 핵막이 팽창되어 있으며 소포체가 변형되어 나타나고 미토콘드리아의 감소와 파괴가 관찰되었다. 방사선 조사 후 비타민 C의 효과를 관찰한 군(G3)에서는 정상 모양은 아니지만 파괴정도가 방사선 조사군보다 훨씬 덜한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

고안 및 결론

본 연구는 방사선에 의한 간독성의 정도를 평가하고 비타민 C의 항산화 효과를 평가하고자 하였기 때문에 마취제로 인하여 생길 수 있는 간 독성을 배제하는 것이 필요하였다. 이에 실험쥐를 마취시키지 않은 상태에서 고정시키고 방사선 조사를 시행하였다. 방사선 조사는 1500 cGy를 1회 조사하였으며 실험 쥐 모두 이것을 잘 견뎌는 것으로 보아 1500 cGy의 선량은 실험 쥐의 간이 견딜 수 있는 선량으로 생각된다.

간의 무게에 미치는 영향은 대조군을 포함한 전체 군에서 각 군 별로 유의한 차이는 없었으나 대조군에 비해 방사선 조사군에서 간의 무게가 증가한 것은 간세포조직의 국소적 변형에 따라 탄수화물 변화가 일어나 과량의 글리코겐과 지질의 축적으로 인해 간 무게가 증가한다고 보고하고 있다.²⁴⁾ 비타민 C의 효과는 통계적인 유의성은 없었으나 모든 군에서 비타민 C를 투여할 경우 간 무게가 감소하는 경향을 나타낸 것은 비타민 C가 간세포 증식과 비대를 억제시키는 효과가 있기 때문인 것으로 판단된다.

MDA는 지질 과산화의 정도를 간접적으로 나타내는 수치로²⁵⁾ 대조군에 비해 방사선 조사군에서 증가한 것은 이들 산화성 인자들에 의해 지질 과산화가 일어났음을 의미한다. 또한 방사선이 지질 과산화를 일으켜서 간세포 손상을 일으킨다는 사실을 알 수 있다. 지질 과산화에 대한 비타민 C의 효과는 간 조직의 미토콘드리아에서 방사선 조사 후 비타민 C를 투여할 경우 MDA의 수치가 감소하는 것으로 나타났다. Helen과 Vijayammal은²⁶⁾ 담배연기에 노출된 쥐에게 비타민 C를 투여할 경우 지질 과산화를 억제하고 라디칼을 제거하는 효소를 활성화시킴을 보고하고 있다. 따라서 비타민 C가 방사선으로 인해 생성된 과산화물을 감소시켜 지질 과산화작용을 억제하여 간 세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

SOD는 과산화물을 과산화수소나 산소 분자로 변화시켜 산화적 손상에 대응하지만^{10,11)} 외부적 산화성 자극에 의해

생긴 ROS (reactive oxygen species)들에 의해 수치가 감소하기도 한다.²⁷⁾ 방사선 조사시에 외부에서 인위적으로 SOD를 투여할 경우 방사선 폐렴이 대조군에 비해서 감소되었다는 보고가 있다.²⁸⁾ 따라서 SOD는 방사선에 의해서 생기는 산화성 손상으로부터 세포를 보호하는 역할을 담당하는 효소인 것을 알 수 있다. 본 연구에서도 대조군에 비하여 방사선 조사군에서 SOD의 수치가 감소되었다. 그러나 비타민 C를 투여할 경우 통계적 유의성은 없었지만 SOD의 수치가 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 비타민 C가 SOD의 활성도를 높여서 항산화 효과를 나타내는 것으로 생각되며 Michael 등²⁹⁾도 동일한 결과를 보고하였다.

카탈라아제의 활성은 혈청과 간 조직에서 전체적으로 각 군별 유의성은 없었다. 혈청에서는 대조군에 비하여 카탈라아제의 수치가 감소하는 경향을 보였다. 이것은 방사선조사가 혈청내의 항산화효소의 활성을 억제하는 것으로 사료된다. 비타민 C를 투여한 군의 카탈라아제의 활성은 비교적 높은 경향을 나타냈다. 따라서 외부의 산화적 자극이 있는 경우 비타민 C를 투여할 경우 비타민 C자체에 의한 항산화 효과뿐 아니라 효소적 기전의 회복에 의한 항산화 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 결과는 전자 현미경 관찰 결과에서도 비타민 C를 투여한 군에서 산화성 손상에 의한 간세포의 파괴가 적다는 사실과 잘 일치하였다. 비타민 C에 의한 간세포 보호 효과는 Patricia도 보고하였다.³⁰⁾

일반적으로 LDH 수치는 세포 생존가능성과 연관성이 있다고 알려져 있다. 즉 LDH 수치가 세포막 손상여부를 나타내는 지표로 사용될 수 있다는 의미이다.³¹⁾ 그리고 간세포내에 존재하는 GOT와 GPT의 증가는 간세포의 파괴 정도를 반영하는 지표로 사용되어 왔다.³⁰⁾ 간세포 파괴에 대한 비타민 C의 보호 효과는 GPT에 대해서만 유의하게 관찰되었지만 GOT, GPT, LDH의 수치가 비타민 C의 투여로 인해 모두 감소되는 경향을 보이는 것으로 보아 비타민 C가 방사선과 아플라톡신의 산화성 공격으로부터 세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

Jagetia 등³²⁾에 의하면 비타민 C를 투여할 때 항산화 효소인 SOD와 glutathione peroxidase를 증가시키고 방사선 조사 1시간 30분 후에 그 수치가 최고조에 달했다고 보고하였으며³³⁾ 방사선 조사 전에 비타민 C를 투여할 때 방사선에 의한 피부 손상을 줄일 수 있다고 보고하였다. 라디칼이 세포를 공격하게 되면 세포는 몇 가지 보호 시스템을 가동시켜 세포를 보호하게 된다. 첫째로 비타민 C나 glutathione (GSH) 등과 같은 항산화 물질들에 의해서 라디칼들이 제거되며^{12,13)} 둘째, SOD나 카탈라제와 같은 효소들

에 의해서 라디칼들이 독성이 적은 물질로 환원되게 된다.^{14,15)} 또한 손상된 DNA의 복구 시스템이 가동된다.³⁴⁾ 이와 같이 산화성 세포 손상에 대한 비타민 C의 역할은 직접 라디칼을 없애버리거나 간접적으로 항산화 효소의 활성도를 증가시키고 DNA의 복구를 도움으로써 라디칼에 의한 세포 손상을 보호한다.

방사선에 의한 손상은 라디칼에 의한 세포 손상으로 일어나며 라디칼들은 극히 짧은 시간동안 존재하다 세포 손상을 일으키고 사라지기 때문에 비타민 C가 라디칼을 제거하여 라디칼의 공격으로부터 세포를 보호하는 라디칼 제거 효과(scavenger)를 발휘하기 위해서는 방사선 조사 전에 세포 내에 비타민 C가 존재하는 것이 유리하다.³²⁾ 이에 비해 본 연구에서는 비타민 C가 방사선 조사 직후에 투여되었으며 본 연구 결과에 의하면 방사선 조사 후 비타민 C를 투여하였음에도 불구하고 방사선 조사군에 비해 비타민 C 투여군에서 간 효소 수치와 전자현미경 소견을 통해서 간세포의 손상이 작음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 비타민 C가 파괴되었던 세포를 어느 정도 회복시키고 더 이상의 세포 손상이 진행되는 것을 막는 능력을 가지고 있기 때문일 것이라고 추측할 수 있다. Jagetia 등³²⁾의 연구에 의하면 지질 과산화는 방사선 조사 후 약 3시간 경과한 때에 최고치에 도달한다고 보고하고 있다. 이는 라디칼에 의한 세포의 손상은 순간적으로 일어나지만 그 손상이 라디칼이 사라진 뒤에도 계속 진행된다는 의미를 가진다. Konopacka 등³⁵⁾에 의하면 비타민 C의 투여가 방사선 조사 전과 방사선 조사 후 모두에서 DNA 손상을 회복시키는 효과를 보였으며 오히려 방사선 조사 직후에 비타민 C를 투여할 때 가장 높은 보호 효과를 보였다고 보고하였다. 그러나 방사선 조사 2시간 이후부터는 비타민 C를 투여하여도 보호효과를 볼 수가 없었으며 1시간 이내에 투여할 경우에만 보호 효과를 관찰하였다고 보고하였다. 따라서 이미 세포 손상이 시작되었다 하더라도 빠른 시간 안에 비타민 C를 투여할 경우 지질 과산화를 억제하여 어느 정도 세포 손상의 회복 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구결과와 Konopacka의 연구 결과를 종합해 볼 때, 비타민 C의 항산화 효과 기전 중에서 라디칼을 직접 제거하는 역할보다 SOD, 카탈라제 등에 의한 지질 과산화 억제와 DNA 손상 회복이 더 큰 비중을 차지하는 것으로 생각된다. 또한 방사선에 의한 세포 손상은 극히 짧은 시간 동안 존재하는 라디칼들에 기인할 뿐 아니라 라디칼이 사라진 뒤에 일어나는 과산화물들에 의한 세포 손상도 큰 비중을 차지한다는 사실을 알 수 있다. 실제 임상에서 방사선 치료 후 발생한 직장염증에 대해 비타민 C 투여 시 환

자의 증상 및 출혈이 호진된다고 보고한 논문에서도 방사선 조사 후 일어난 조직 손상에 대해 비타민 C가 효과를 나타내었다고 발표하였다.³⁶⁾

비타민 C의 용량에 따른 항산화 효과의 증가에 대한 논란이 있으므로³⁷⁾ 비타민 C의 용량별 항산화 효과에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한 방사선 조사 방법에 있어서 본 연구에서는 1회의 고용량의 방사선을 조사하였으나 실제 임상에서는 분할 조사를 시행하게 되므로 분할 방사선 조사 시에 비타민 C의 항산화 효과가 어떻게 나타나는지에 대한 비교 연구도 필요하리라 생각된다.

본 연구에서는 방사선에 대한 비타민 C의 항산화 효과를 알아보기 위해 MDA 수치 비교, SOD, 카탈라제 활성도 비교, 간 효소 측정 비교, 등의 방법을 사용하였다. 이러한 분석 방법은 간접적인 분석 방법이므로 ROS 양을 직접 측정하거나²⁹⁾ DNA 파괴 정도를 비교한다면²⁰⁾ 더욱 정확하게 비타민 C의 항산화 효과를 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 비타민 C의 항산화 효과를 분석하기 위해 시행한 이상의 연구에서 지질 산화 정도를 나타내는 MDA의 수치가 비타민 C의 투여로 감소하는 경향을 보였다. 항산화 효소로 작용하는 카탈라제와 SOD의 활성도는 비타민 C의 투여로 인해 증가하는 경향을 보였다. 간세포 파괴 정도를 간접적으로 나타내는 지표인 GOT, GPT 및 LDH가 비타민 C의 투여로 감소하는 경향을 보였고 GPT는 통계적으로 유의하게 감소하였다. 전자 현미경 사진을 통해서 세포의 모양이 비타민 C의 투여군에서 잘 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 비타민 C는 방사선에 의한 산화성 간세포 손상에 대해 보호 효과가 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Rudolph R, Aeganese T, Woodward M. The ultrastructure and etiology of chronic radiotherapy damage in human skin. *Am Plast Surg* 1982;9:282-292
2. Aitasalo K, Aro H. Irradiation-induced hypoxia in bones and soft tissue: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1986; 77:256-265
3. Krizala J, Ledvina M. The activity of superoxide dismutase in the liver and bone marrow of irradiated rats. *Int J Rad Biol* 1980;37:459
4. Kratochvilova V, Krizala J, Ledvina M. Activity of superoxide dismutase in erythrocyte of irradiated rats. *Stud. Biophys* 1981;82:121
5. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC. Crit Rev Toxicol* 1987;18:27-79
6. Gregory EM, Fridovich I. Oxygen toxicity and the super-

- oxide dismutase. *J Bacteriol* 1973;114:1193-1197
7. **McCord JM, Fridovich I.** The utility of superoxide dismutase in studying free radical reaction. *J Biol Chem* 1970;245:1374-1377
 8. **Crapo JD, McCord JM.** Superoxide dismutase and oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974;226:1401-1407
 9. **Seegers JC, Bohmer LH, Kruger MC.** A Comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and hela cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1994;129:1-11
 10. **Chance B, Oshino N.** Kinetics and mechanism of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. *J Biochem* 1971;122:225-233
 11. **Chai GY, Yoon HS.** Effect of radiotherapy on the ascorbate (vitamin C) levels in whole blood and plasma. *J Korean Soc Ther Radiol* 1993;11:227-231
 12. **Fire B, England L, Ames BN.** Ascorbic acid is an outstanding antioxidant in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6377-6381
 13. **Rose RC, Bode AM.** Biology of free radical scavengers, an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 1993;7:1135-1142
 14. **Rojas C, Cadenas S, Perez-Camp R, Lopez-Torres, Barja G.** Effect of vitamin C on antioxidants, lipid peroxidation, and GSH system in the normal guinea pig heart. *J Nutr Sci Vitaminol* 1994;40:411-420
 15. **Ozturk-Urek R, Bozkaya LA, Tarhan L.** The effects of some antioxidant vitamin- and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO concentrations in chicken tissues. *Cell Biochem Funct* 2001;19:125-132
 16. **Raineri R, Weisburg JH.** Reduction of gastric carcinogens with ascorbic acid. *Ann NY Acad Sci* 1975;258:181
 17. **Cameron E, Pauling L.** Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1976;73:3685
 18. **Guttenplan JB.** Inhibition by L-ascorbate of Bacterial Mutagenesis Induced by Two N-nitroso Compounds. *Nature* 1977; 268:368-370
 19. **Liehr JG, Wheeler WJ.** Inhibition of Estrogen-Induced Renal Carcinoma in Syrian Hamsters by vitamin C. *Cancer Res* 1983;43:4638-4642
 20. **Wagner DA, Shuker DE, Bilmazes C, et al.** Effect of vitamin C and E on endogenous synthesis of N-nitroso- amino acids in humans; precursor-product studies with [¹⁵N]- nitrate. *Cancer Res* 1985;45:6519-6522
 21. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi N.** Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358
 22. **Oynagui Y.** Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 1984; 42:290-296
 23. **Rigo A, Rotilio G.** Simultaneous determination of superoxide dismutase and Catalase in biological materials by polarography. *Anal Biochem* 1977;81:157-166
 24. **Bannasch P, Mayer D, Hackre HJ.** Hepatocellular glycolysis and hepatocarcinogenesis. *BBA* 1980;605:217-245
 25. **Peter MA, Riccardo A.** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 2001; 306:1-17
 26. **Helen A, Vijayammal PL.** Vitamin C Supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. *Journal of Applied Toxicology* 1997;17:289-295
 27. **Kashif SM, Zai R, Naheed Banu.** Antioxidant potential of vitamins A, E, and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta* in press 2004;:1-5
 28. **Kang SK, Rabbani ZN, Folz RJ, et al.** Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *Int J of Rad Oncol Biol Phys* 2003;57:1056-1066
 29. **Michael W, Anatoli N, Osipov, Ian Martin.** Ascorbate as a "redox sensor" and protector against irradiation-induced oxidative stress in 32D CL 3 hematopoietic cells and subclones overexpressing human manganese superoxide dismutase. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 2004;58:851-861
 30. **Patricia GC, Marco VR, Elvira G.** Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 2004;18:13-19
 31. **Del Raso N.** In vitro methods for assessing chemical or drug toxicity and metabolism in primary hepatocytes. In: Watson, R.R. (Ed.), *In Vitro Methods of Toxicology*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 1992:176-201
 32. **Jagetia GC, Rajanikant GK, Rao SK.** Evaluation of the effect of ascorbic acid treatment on wound healing in mice exposed to different doses of fractionated gamma radiation. *Radiat Res* 2003;159:371-380
 33. **Jagetia GC, Rajanikant GK, Rao SK.** Evaluation of the effect of ascorbic acid treatment on wound healing in mice exposed to different doses of fractionated gamma radiation. *Radiat Res* 2003;159:371-380
 34. **Cooke MS, Evans MD, et al.** Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS Letters* 1998;439:363-367
 35. **Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J.** Antioxidant Vitamin C, E and β -carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2001;491:1-7
 36. **Kennedy M, Bruninga K, Ece A.** Successful and sustained treatment of chronic radiation proctitis with antioxidant vitamins E and C. *The American Journal of Gastroenterology* 2001;96: 1080-1084
 37. **Choi JH, Yu BP.** The effect of food restriction on kidney membrane structure of aging rats, *American aging association* 1989;12:133-136

Abstract

The Protective Effects of Vitamin C on Hepatotoxicity Induced by Radiation

Kijung Ahn, M.D.*, Sungkwang Park, Ph.D.*, Heunglae Cho, M.D.*, Kimun Kang, M.D.[†],
Duckwha Chung, Ph.D.[‡], Jinsoon Kang, Ph.D.[§] and Gyuyoung Chai, M.D.[†]

*Department of Radiation Oncology, Pusan Paik Hospital, Inje University,

[†]Department of Radiation Oncology, Gyungang National University,

[‡]Department of Food Science and Technology, Gyungang National University,

[§]Department of Food Science, Jinju International University

Purpose: This study was carried out to determine the protective effects of vitamin C on the hepatotoxicity induced by radiation.

Materials and Methods: The Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups; the control group, the radiation exposed group, and the radiation and vitamin C-treated group. SOD activity, catalase, malondialdehyde and liver enzymes were analyzed to assess the antioxidant effects of vitamin C.

Results: The increased level of malondialdehyde and the decreased catalase activity that were induced by radiation were improved after vitamin C but there was no statistical significance among three groups. The superoxide dismutase activity of the liver was increased by vitamin C, but there were no statistically significant differences between the vitamin C-treated group and the non vitamin C-treated group. The level of liver enzymes in sera such as glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase were remarkably elevated by radiation. The levels of those enzymes were decreased in the vitamin C-treated group and statistical significance was noted for the GPT level ($p < 0.01$). On the electromicrographic findings, the hepatic cell destruction was considerably decreased in the vitamin C-treated group.

Conclusion: Vitamin C is thought to be an effective antioxidant against the hepatotoxicity induced by radiation.

Key Words: Vitamin C, Radiation, Antioxidant