

다용량 비타민 C 투여가 생쥐 세포매개면역반응에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 해부학교실, 중앙면역의과학연구센터

노가화 · 김현곤 · 신영아 · 임현자 · 문성규 · 이용택 · 이왕재 · 이동섭 · 황영일

The Effects of High-dose Vitamin C Administration on the Cell-mediated Immune Response in Mice

Kahwa Noh, Heun-gon Kim, Young-ah Shin, Hyunja Lim, Sung-kyu Mun, Yongtaek Lee, Wang Jae Lee, Dongsup Lee and Young-il Hwang

Department of Anatomy and Tumor Immunity Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Vitamin C is an essential nutrient, taken as a daily supplement by many people. Recently, high-dose vitamin C is considered as a therapeutic regimen in some clinical situations. Until now, few studies have been done with the effects of high-dose vitamin C on the immune response. **Methods:** In this experiment, the effects of high-dose vitamin C on cell-mediated immune response in immunologically competent mice were evaluated. After intraperitoneal injection of 2.5, 5, or 10 mg/day of vitamin C for 10 days, delayed type hypersensitivity (DTH) was provoked against DNFB in the pinnae as a model for cell-mediated immune response. Severity of DTH reaction was evaluated as the thickness of pinnae, and the vitamin C levels were measured in the serum, liver, kidney, lung, pinnae, and splenocytes. **Results:** After challenge, the thickness increased at its peak on the 2nd day in all groups. On the first day, the pinnae were thicker in the injected groups than in the control. On the contrary, the increment of the pinnae thickness was attenuated and the number of cells infiltrated in the site of DTH decreased proportionately to the amount of vitamin C administered from the second day on. With vitamin C exogenously given, the serum level peaked at 30 min after injection, and returned abruptly to its basal level without accumulation. However, it accumulated in the liver, kidney, and especially in the pinnae inflamed and splenocytes, proportionately to the amount administered. **Conclusion:** Based on these results, it is suggested that, in one hand, exogenously administered high-dose vitamin C accumulated in the splenocytes and presumably changed the function of them resulting in the augmented cell-mediated immune response, as was revealed in the first day of DTH reaction. On the other hand, it seems likely that the vitamin C also showed anti-inflammatory effects. (*Immune Network* 2003;3(3):211-218)

Key Words: Cell-mediated immune response, delayed type hypersensitivity, vitamin C, high-dose

서 론

비타민 C는 수용성으로서 아교섬유 생성에 관여하

여 결합조직 유지에 중요한 역할을 한다는 것은 이미 오래 전부터 널리 알려진 사실이다. 그러나 비타민 C는 이러한 고전적인 기능 이외에 생체에서 다양한 작용을 한다는 것이 밝혀졌다. 지방의 불완전 연소로 축적되는 아세톤을 해독하거나(1), 실험적으로 cyclophosphamide를 투여한 쥐의 간에서 해독작용을 보여 주기도 한다(2). 또한 철(iron)을 이온 상태로 유지하는 환원제로 작용하여 2-oxoglutarate-와 Fe(II)-dependant

책임저자 : 황영일, 서울대학교 의과대학 해부학교실
☎ 110-799, 서울특별시 종로구 연건동 28번지
Tel: 02-740-8209, Fax: 02-745-9528
E-mail: hyi830@snu.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 기초의과학연구센터사업지원으로 수행되었음.

oxygenase에 조효소(cofactor)로 작용한다(3). 이밖에도 개체의 병적인 상태인 인플루엔자(influenza), 암(cancer), 동맥경화증(arteriosclerosis), 관절염(arthritis) 등에도 직·간접적인 영향을 미친다(4).

한편 비타민 C는 면역기능에도 다양한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며 이들 결과들은 실험 상황에 따라서 서로 상반된 내용을 담고 있다. 체액성 면역반응의 경우에 사람이나 guinea pig에서 비타민 C 복용이 혈중 IgA, IgM 등의 농도를 높인다는 보고(5,6)가 있는 반면에 별다른 변화가 없다는 보고(7-9)가 있다. 한편 chronic granulomatous disease를 앓는 환자에게 하루에 1 gram씩 6개월간 비타민 C를 복용하게 한 경우에는 혈중 Ig가 낮아진다고도 한다(10). in vitro에서는 생쥐의 지라세포가 비타민 C 존재하에 특이항체생산을 증가시키며(11,12) 말초혈액에서 림프구 면역반응은 세포 내 비타민 C 농도에 중요한 parameter로 생각되고 있다(13). 다른 측면에서는 큰포식세포의 화학주향성(chemotaxis)을 높이고(14-16) 혈장 내 인터페론 등의 사이토카인 농도를 증가시켜(17) 면역기능을 상승시킨다고 알려져 있다. 그러나 비타민 C가 처리된 사람 각질세포(keratinocyte)에서는 cytokine mRNA 발현이 억제되고(18), 스트레스를 준 쥐에게 비타민 C를 처리하면 림프구감소증(lymphocytopenia)이 유도되어 면역기능을 떨어뜨린다는 보고도 있다(19). 이처럼 비타민 C가 인체의 면역기능에 미치는 영향이 각 연구마다 상이한 가운데 비타민 C의 다량 섭취가 임상적으로 또는 일상 생활에서 고려되고 있다(20,21).

현재 FDA에서 권장하는 비타민 C의 하루 섭취량은 60 mg/day이며 Levin 등(22)은 적절한 혈중 비타민 C 농도의 유지를 위하여 하루에 200 mg 정도는 섭취해야 한다고 하였으나 일부 임상가와 연구자들은 이를 훨씬 상회하는 다용량(mega-dose; 하루 1~10 gm 이상)의 VC를 상시 복용하거나, 자가면역질환이나 천식 등의 치료제로(20), 암의 예방과 치료제로 사용하는 것을 시도하고 있다. 하지만, 비타민 C가 면역반응의 여러 측면에 미치는 영향에 관하여 서로 상이한 결과가 보고되고 있으며, 다용량의 경우에 in vitro에서 높은 농도의 VC에 의하여 T 세포의 viability가 낮아지고 사이토카인 분비 능력이 떨어진다는 보고(23)가 있는 반면에 T 세포의 apoptosis를 억제한다는 보고(24)도 있어서 다용량 비타민 C 사용의 적절성에 관해서는 이견이 있는 상황이다.

따라서 본 연구에서는 다량의 비타민 C가 정상 세포매개면역에 미치는 영향을 알아보려고 하였으며, 이를 위해 생쥐에게 다량의 비타민 C를 복강으로 투여한 후 DTH (Delayed Type Hypersensitivity, 지연형 과

민반응)를 유도하고 그 진행과정을 살펴보았다. 또한 혈장을 비롯한 여러 장기 내의 비타민 C 축적 정도를 확인하여 비타민 C가 세포매개면역반응에 영향을 미치는 기전을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물. 실험동물로는 7주된 수컷 Balb/c 생쥐를 사용하였다. 모든 생쥐는 12시간 간격으로 밤낮주기(12 h light/12 h dark)가 조절되어 있는 서울대학교 의과대학 실험동물실에서 사육하였으며, 동일한 사료와 물이 충분히 공급되었다.

실험방법.

DTH의 유발 및 측정: 실험군과 대조군 생쥐의 등 표면에 1×1 cm 면적의 털을 깎아 피부를 노출시키고 DNFB (Sigma) 25μl (0.5% in 4 : 1 acetone/olive oil)를 발라주어 감작시켰다. 다음 날에도 같은 방법으로 감작시키고 두 번째 감작으로부터 4일 후에 DNFB 20 μl (0.2% in 4 : 1 acetone/olive oil)를 생쥐의 오른쪽 컷바퀴 표면에 발라주어 DTH를 유발하였다(25). DTH 유발 정도는 컷바퀴 두께의 증가를 constant-loading dial micrometer (Mitutoyo, Tokyo)로 측정함으로써 확인하였고, 두께 측정은 DTH 유발 후 6일 동안 매일 동일한 시각에 시행하였다.

비타민 C 측정:

혈중 비타민 C 측정; 생쥐 7마리에게 3주 동안 매일 비타민 C (L-ascorbic acid, Sigma) 10 mg을 복강에 투여하였다. 마지막 비타민 C 투여 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간에 각 생쥐의 눈확정맥혈기에서 혈액을 채취한 후 혈청을 얻었다. 혈청 내 비타민 C의 농도는 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)법(26)을 변형하여 측정하였다.

혈청과 10% metaphosphoric acid (Sigma)를 1 : 1로 섞은 후 원심분리한 상층액에 0.027 M cupric sulfate (Sigma)를 첨가하고 차례로 0.68 M thiourea (Katayama Chemical JIS) 7μl와 0.1 M DNPH (Sigma)를 더하여 37°C 항온수조에서 3시간 반응시켰다. 생성된 침전물을 12 M 황산으로 녹인 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

장기 내 비타민 C 측정; DTH에 의한 염증반응이 완전히 가라앉은 시기에 생쥐를 목뼈탈골로 희생시키고 양쪽 컷바퀴, 간, 허파, 콩팥과 심장을 적출하였다. 이 장기들은 적출된 후 즉시 무게를 측정하고 얼린 후 막자사발에서 갈아 얼렸다 녹이기를 4회 반복하여 세포막을 파괴하였다. 이 후 원심분리하여 상층액을 얻고 앞서 기술한 방법으로 비타민 C 농도를 재고 각 장기의 무게당 비타민 C의 농도를 구하였다.

지라세포 내 비타민 C 측정; DTH에 의한 염증반응이

완전히 가라앉은 시기에 생쥐를 목뼈탈골로 희생시키고 지라를 얻었다. 지라를 분쇄하여 세포 성분을 얻고 RBC lysis buffer를 이용하여 지라세포만을 얻어냈다. 이후 얼렸다 녹이기를 4회 반복하여 세포막을 파괴하고 원심분리하여 얻은 상층액을 10% metaphosphoric acid와 반응시키고 앞서 기술한 방법에 따라서 비타민 C 농도를 재고 세포 5,000개 당 비타민 C의 양을 계산하였다.

조직준비 및 염색: 생쥐를 목뼈탈골로 희생시킨 후, 즉시 귓바퀴를 잘라 Bouin's fluid에 고정시켰다. 24시간 후 ethanol series를 거쳐 탈수하고 paraffin wax에 포매하였다. 조직절편은 5 μ m 두께로 만들어 microscope slide에 올린 후 실온에 두었다. 이후 xylene으로 5분 간 2회에 걸쳐 paraffin을 제거하였고, 100%, 95%, 90%, 70%, 50% ethanol에서 재수화(rehydration)시킨 후 Hematoxylin & Eosin 염색을 시행하였다.

통계분석: 산출된 값은 각 군의 평균값 (means \pm S.D.)을 사용하였고 정량적으로 측정된 모든 값은 통계분석을 위해 PRISM software one-way ANOVA를 이용하였다.

결 과

비타민 C 다량 투여와 DTH 반응. 10일 동안 매일 비타민 C를 각각 2.5 mg, 5 mg, 10 mg씩 투여한 실험군과 대조군은 모두 DNFB로 감작한 4일 후, DTH를 유발시키고 6일 간 귓바퀴 두께를 재어 DTH를 유발시키기 전의 값에 대한 증가%를 그래프로 나타내었다(Fig.

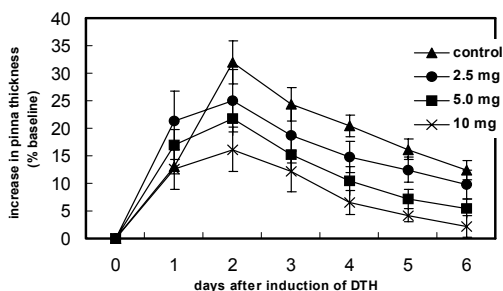


Figure 1. The time course of the thickness of pinnae after DNFB challenge in control and experimental groups. Mice were injected intraperitoneally with 0 mg, 2.5 mg, 5 mg, or 10 mg of vitamin C respectively in each group for 14 days. The thickness of the pinnae reached at its peak on day 2 after challenge and decreased thereafter in all groups. During the experimental period, the increment of the thickness was most prominent in control group, and the level of increment was less prominent as the given amount of vitamin C was higher. However, exceptionally, the thickness of ears of the experimental groups measured on day 1 was thicker than those in the control group. (means \pm S.D. n=8 for each group) DNFB= dinitrofluorobenzene.

1). 실험군과 대조군 모두 DTH를 유발시킨 후 2일째 귓바퀴의 두께가 가장 두꺼워졌다. DTH를 유발한 후 1일째에는 실험군에서 대조군보다 귓바퀴의 두께가 더 두꺼웠던 반면에 2일째에는 대조군에서는 31.9 \pm 3.9%, 비타민 C를 2.5, 5, 10 mg 투여한 군에서 각각 25.0 \pm 6.0%, 21.7 \pm 3.1%, 16.1 \pm 3.83%가 증가하여 대조군에 비해 실험군에서 투여해 준 비타민 C 농도에 비례하여 귓바퀴의 두께가 덜 증가하였으며, 이러한 추세는 이후로도 계속 관찰되었다. DTH 유발 3일부터는 투여군과 대조군 모두에서 귓바퀴의 두께가 지속적으로 감소하였다.

조직학적 소견. DNFB로 감작하기 전 정상 귓바퀴 조직은 귀의 앞면과 뒷면이 지방세포층을 기준으로 대칭을 이루며 진피 내 샘조직, 근육섬유다발, 혈관 등이 관찰된다. DTH를 유발시킨 후 24시간째 대조군의 귓바퀴에서는 침투된 세포와 림프구들이 진피에서 많이 보이며 혈관 내 중성구도 관찰되지만 비타민 C를 2.5 mg, 10 mg 투여한 실험군에서는 농도에 비례하여 침투된 염증세포와 호중구가 덜 관찰되며 귀 두께가 가장 두꺼운 상태인 DTH 유발 후 48시간째 귓바퀴 조직은 대조군에서 염증세포의 진피 내 침투정도, 혈관 내 중성구, 근육다발의 와해 정도가 가장 심하며 실험군에서는 그 정도가 농도에 비례하게 감소하여서, 귀 두께 측정 결과와 잘 일치하는 소견을 보여주었다. **혈 중 비타민 C 농도의 변화.** 귀 두께와 조직학적인 변화로 살펴본바, 비타민 C 다량 투여로 세포매개성 면역의 변화가 초래되었음을 확인하였다. 이러한 변화가 다량 투여로 인한 혈중 비타민 C 농도 증가에 기인한 것인지를 확인하기 위하여 투여 전과 투여 후의 혈중 비타민 C의 농도를 측정하여 비교하였다.

비타민 C 투여 전 정상 생쥐의 혈청 내 비타민 C 농도는 2.27 \pm 0.55 mg/dl였으며, 3주간 지속적으로 매일 10 mg의 비타민 C를 투여한 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간에 측정한 혈청 내 비타민 C 농도는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 3주간 비타민 C를 다량 투여하여도 혈중 비타민 C 농도는 투여 30분 후에 정상치의 4배 가량 증가한 후 지속적으로 감소하여 투여한 시간으로부터 8시간 이후에는 비타민 C를 투여하기 전의 농도와 유사한 수준으로 감소하여(Fig. 3) 장기 투여된 비타민 C가 혈중에 축적되지는 않음을 확인하였다.

지라세포 내 비타민 C 농도. 앞의 실험결과는 다량 투여된 비타민 C에 의한 DTH 반응 경과의 변화가 혈중 비타민 C 농도 증가에 의해서 유도되는 것이 아님을 시사하는 것으로 생각된다. 따라서, 또 다른 기전의 가능성으로 면역반응에 관여하는 세포 내의 비타민 C 축적 여부를 확인하기 위하여 지라세포에서의 비

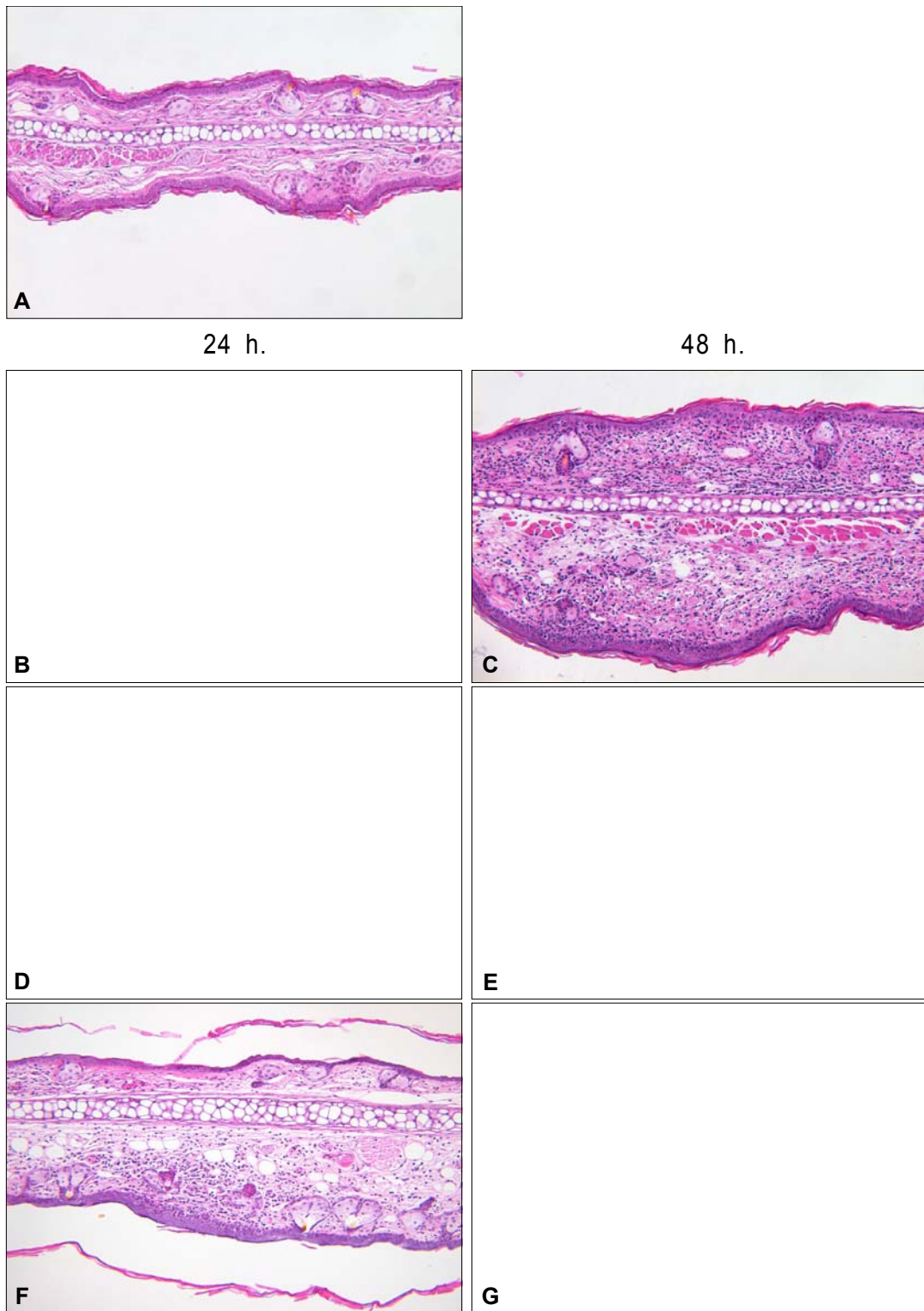


Figure 2. Histological analysis of the pinnae stained with H&E (× 200). A. Normal pinna has glands, muscle fibers, adipose tissue, arterioles, and Vater-Pacini corpuscle. B and C. Pinnae of control mice 24 and 48 hours after challenge. D and E. Pinnae of mice treated with 2.5 mg of vitamin C, 24 and 48 hours after challenge. F and G. Pinnae of mice treated with 10 mg of vitamin C, 24 and 48 hours after challenge. Not only the number and the diameter of blood vessels increased but the number of inflammatory cells in the dermis increased with the lapse of time. At 48 hours, it is prominent that the muscle fibers became separated with each other and the continuity of connective tissues decreased, indicating increased tissue edema. In the groups given with vitamin C, compared to the control group, the number of penetrated cells and the level of expansion decreased and the edema was less severe as the given amount of vitamin C was higher.

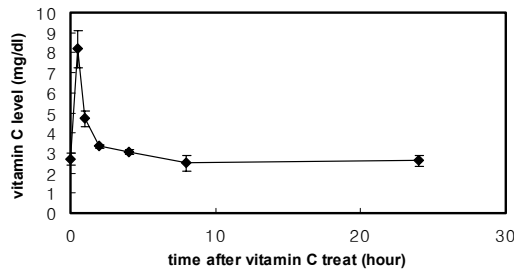


Figure 3. Blood concentration of vitamin C at various times after intraperitoneal injection of high dose vitamin C. The mice were administrated with 10 mg of vitamin C for 3 weeks at a same time on a day. Blood was drawn at the indicated time (30 min., 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h.) after last administration, and the vitamin C concentrations in the blood were measured. The concentration reached at its peak point 30 minutes after intraperitoneal injection and then drastically decreased thereafter returning to the basal level 8 hours after injection. Then, the concentration was maintained unchanged for following hours. Values are the means \pm S.D. (n=7).

타민 C 농도를 측정하였다.

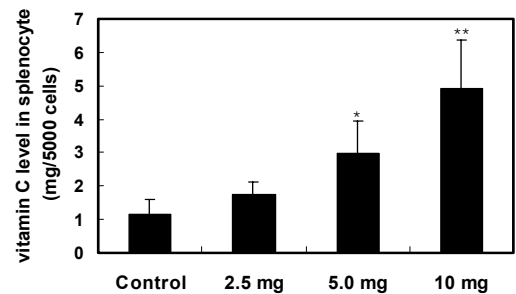
3주간 지속적으로 매일 2.5 mg, 5 mg, 10 mg의 비타민 C를 투여한 후 생쥐를 희생시키고 지라를 적출하여 세포 5,000개당 비타민 C의 농도를 측정하였다. 그 결과 비타민 C를 투여하지 않은 대조군의 지라세포에는 세포 5,000개당 약 1.14 mg의 비타민 C가 검출되었으나 매일 비타민 C를 2.5 mg, 5 mg, 10 mg 투여한 실험군의 경우 각각 1.76 mg, 2.97 mg, 4.91 mg의 비타민 C가 검출되어 복강으로 투여한 다량의 비타민 C는 농도에 비례하게 지라세포에 축적됨을 확인하였다 (Fig. 4A). 실험 방법에 대한 검증으로서 같은 생쥐에서 다른 장기-간, 콩팥, 허파에서의 비타민 C 농도를 살펴본 결과 허파에서는 대조군과 실험군에서 모두 높은 농도의 비타민 C가 검출되었고 간과 콩팥에서는 투여한 비타민 C 농도에 비례하여 비타민 C가 검출되었다 (Fig. 4B).

DTH가 유발된 컷바퀴에서 조직 내 비타민 C 농도. 장기간 투여된 다량의 비타민 C가 지라세포 내에 축적되어 DTH 반응에 영향을 주었을 가능성이 시사되었다. 기타 다른 부위에서는 장기에 따라서 비타민 C가 농축되는 것도 있었고 그렇지 않은 장기도 있었음을 확인하였다.

DTH에 의해 촉발된 염증이 일어나는 장소에서도 비타민 C는 직접적인 작용을 수행할 가능성이 있기 때문에 DTH를 유발하고 다시 정상적인 두께로 돌아온 컷바퀴와, 동일 개체에서 다른 쪽 컷바퀴에서의 비타민 C 농도를 측정하였다.

앞서 실험처럼 생쥐에게 3주간 지속적으로 매일

A



B

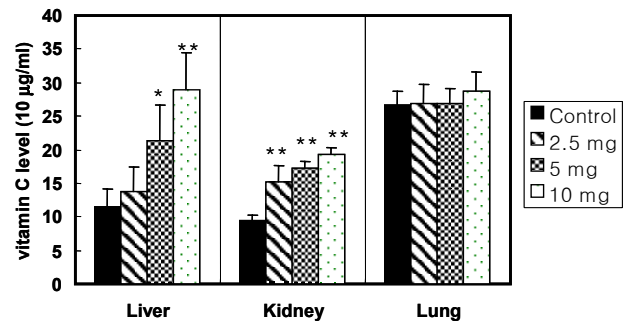


Figure 4. (A) Exogenously given vitamin C was accumulated in splenocytes. Mice were daily treated with vitamin C for 3 weeks before sacrifice. (B) Mice supplemented with daily dose of 2.5 mg, 5 mg, or 10 mg of vitamin C for 3 weeks were measured with their vitamin C concentration in liver, kidney, and lung. No significant differences of vitamin C concentrations in the lung, but significant differences in the kidney and liver were shown. Data are expressed as means \pm SD (n=8 for each group). ** P <0.001 vs. control. * P <0.01 vs. control.

2.5 mg, 5 mg, 10 mg의 비타민 C를 복강으로 투여한 후 24시간째에 DNFB로 DTH를 유발시킨 오른쪽 컷바퀴를 두께가 정상수준으로 돌아온 시점에 컷바퀴를 잘라서 무게를 재고 올려 보관하였다. 이때 DTH를 유발시키지 않은 왼쪽 컷바퀴도 같이 준비하였다. 비타민 C를 투여하지 않은 대조군에서 DTH를 유발시킨 오른쪽 컷바퀴 내 VC 농도는 $60.80 \pm 1.31 \mu\text{g/ml}$ 이며, DTH가 유발되지 않은 왼쪽 컷바퀴에서는 $40.91 \pm 3.34 \mu\text{g/ml}$ 의 Vitamin C가 검출되었다. 투여된 Vitamin C의 양이 많을수록 DTH가 유발된 오른쪽 컷바퀴에서 검출되는 vitamin C의 양은 vitamin C 투여 양과 비례하게 높아지는 반면 DTH가 유발되지 않은 왼쪽 컷바퀴에서는 투여한 비타민 C 양과 상관없이 일정한 양의 vitamin C가 검출되었다.

고 찰

본 실험에서는 다량 투여된 비타민 C가 세포매개 면역반응(cell-mediated immune response)에 미치는 영향을 DNFB로 유도한 DTH 반응을 통해 알아보려고 하였다. 대개의 척추동물과는 달리 사람은 비타민 C 생합성 단계의 마지막 효소인 L-gulonolactone oxidase의 돌연변이로 인하여 비타민 C의 자체 생합성을 하지 못하고 외부에서 섭취하여야 한다(27). 반면에 생쥐에서는 자체 생합성이 되기 때문에 생쥐에서의 실험 상황이 사람에서와는 다를 수 있다. 본 실험에서 생쥐에게 주어진 비타민 C 2.5 mg, 5 mg, 10 mg은 생쥐에게 평소에 필요한 양 이외에 추가로 주어진 것이라고 보아야 할 것이다. 이 양을 단위 체중으로 환산하면 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg으로 성인 권장 비타민 C 섭취량인 10 mg/kg의 최고 40배가 넘는 고용량이며 체중 60 kg의 성인 기준으로는 각각 6 gm, 12 gm, 24 gm에 해당된다. 이 정도의 고용량은 Irwin Stone의 권장량인 하루 2.3~12 gm, 라이너스 폴링 박사가 암 환자에게 사용하도록 권장한 양인 하루 6~20 gm에 해당되는 것이다. 결국 본 실험은 FDA의 일일 권장량 수준을 넘어선, 소위 말하는 mega-dose의 상황을 재현한 상태에서의 실험이라고 할 수 있다.

비타민 C는 UVB 조사(28,29)나 burn stress(30)로 인한 세포매개면역 기능 저하를 방지해 주는 것으로 알려져 있다. 생쥐에서 이들 상황이 주어지면 활성화산소기(reactive oxygen species; ROS)가 발생하며, 이 ROS로 인하여 DNFB에 대한 DTH 반응 정도가 떨어진다. 이때 국소도포하거나 경구 투여한 비타민 C는 ROS를 중화시키는 항산화제(anti-oxidant)로 작용하여 세포매개면역반응의 감소를 방지한다는 것이다. 이들 실험과 달리 본 실험에서는 정상적인 생쥐에서, 저하된 DTH의 회복이 아닌 정상 DTH 반응에 미치는 다량 비타민 C의 영향을 확인하였다. 실험 결과, DTH 반응 첫날에는 투여된 비타민 C 양에 비례하여 보다 증가된 양상을 나타내어 대조군이 가장 낮은 증가율을 보였으나 2일부터는 투여된 비타민 C 양에 비례하여 덜 증가된 양상을 보여서 대조군이 가장 높은 증가율을 보였고, 이후 이러한 경향을 유지하였다(Fig. 1). 다시 말해서 정상적인 상황에서는 주어진 비타민에 의해서 DTH 자체는 빨리 일어나지만 이로 인한 염증반응은 오히려 감소함을 알 수 있으며 조직학적 소견에서 관찰된 바 조직 내의 염증세포 침윤 등의 양상도 이를 뒷받침하고 있다.

세포매개면역반응의 지표로 사용되는 DTH는 Th1 세포와 그 cytokine에 의해서 촉발되며 최종적인 효과세포(effector cell)는 활성화된 큰포식세포(activated macro-

phage)이다. 감작단계(sensitization phase)를 거친 개체에서 기억 T 세포가 만들어지고, 다시 주어진 항원에 대하여 진피 내 T 세포가 반응하고 IFN- γ 등의 사이토카인이 분비되면 큰포식세포가 동원되며 이들 큰포세포에 의해 분비되는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 사이토카인에 의해 염증반응이 증강된다. 과민반응을 유발하는 전형적인 항원들은 매우 작은 합텐으로 본 실험에서는 DNFB를 사용하여 DTH를 유발하였다(25). 피부에 침투된 DNFB는 개체의 자체 단백질과 결합하여 단백질-합텐 복합체를 생성한 후 MHC (주조직적합성복합체)에 결합하여 T 세포에 의해 이중항원으로 인지된다. DTH는 두 단계 즉, 감작단계(sensitization phase)와 유발단계(challenge phase)로 나뉘는데 감작단계 동안에 피부 랑게르한스 세포는 항원을 인지하여 처리하며 인접 림프절로 이동하여 T 세포를 활성화시킴으로써 궁극적으로는 기억 T 세포를 생성하여 진피 내에 도달하게 된다. 감작 후 4일에 유발(challenge)하는 경우에는 반응의 peak가 48시간에 나타나는(31) 것으로 알려져 있어서 본 실험의 결과와 잘 일치하고 있다. DTH의 진행을 단계별로 살펴보면 먼저 T 세포가 항원제공세포(APC) 표면에 있는 항원을 인식하여 활성화되면서 cytokine을 분비하고 분열을 하는 시기와, 분비된 cytokine으로 인하여 neutrophil과 macrophage 등의 염증유발 세포들이 소집되어 조직 내 염증을 유발하고 조직이 파괴되는 과정이 뒤따른다(32). 즉, DTH의 진행을 관련 세포에 따라서 두 단계로 나누어 볼 수 있고, 본 실험에서 주어진 다량의 비타민 C는 두 단계에 각각 달리 작용한 것으로 생각된다.

비타민 C는 흔히 알려진 바와 같이 아교섬유의 생성에 관련된 기능 이외에 비타민 A, E 등과 더불어 항산화제로서의 작용이 잘 알려져 있다(33). 염증반응시에 큰포식세포가 발생하는 ROI (reactive oxygen intermediate)는 조직을 파괴하고 큰포식세포나 중성구 등 염증세포를 활성화하여 염증을 증강시키는데(34), 비타민 C를 포함한 여러 항산화제가 ROI를 제거함으로써 소염효과를 나타낸다는 보고가 있다(35-37). 한편 비타민 C는 단순히 ROI를 제거하는 것뿐만이 아니라 다량 주어진 경우 다핵백혈구의 침윤을 저해하고(38) 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제하여 TNF, IL-1, IL-6 등 염증 관련 cytokine의 분비를 저해함으로써 염증을 막아주기도 한다(39,40). 본 실험의 결과 비타민 C 투여군에서는 첫날을 제외한 전 과정에서 투여된 비타민 C 농도에 비례하여 염증반응의 정도가 낮게 나타난 것은 비타민 C에 의한 소염작용의 결과라고 생각된다. 복강으로 투여된 비타민 C가 혈중에 축적되지는 않았지만 일부 장기에 축적이 되

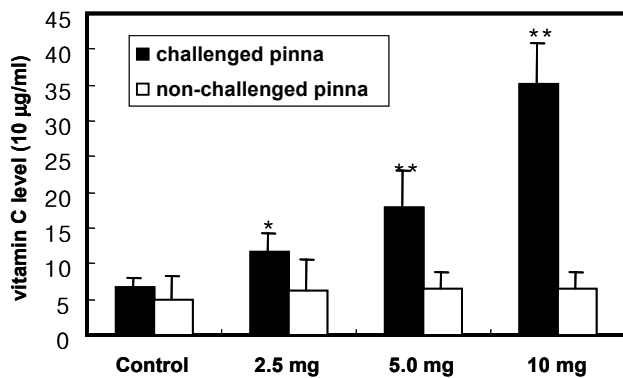


Figure 5. Vitamin C was specifically accumulated in the challenged pinnae. Vitamin C was given to all mice for additional 14 days after finishing measurement of the thickness of ears. Higher vitamin C concentration was detected in the ears applied with DNFB than those without application of the DNFB. Similar results were obtained from groups treated with daily dose of 2.5 mg ($P<0.05$), 5 mg ($P<0.001$), or 10 mg ($P<0.001$). High vitamin C concentration was detected in the pinnae once inflamed, proportionately to the amount of L-ascorbic acid given. However, vitamin C concentrations in un-inflamed pinnae were nearly same regardless of the group to which they belong. Data are expressed as means \pm SD ($n=8$ for each group). ** $P<0.001$ vs. control. * $P<0.05$ vs. control.

고, 특히 염증이 유발되었던 귓바퀴에 상대적으로 매우 높은 농도가 주어진 양에 비례하여 축적된 결과 (Fig. 5)는 염증반응 전 기간에 걸쳐서 비타민 C가 관여하였을 가능성을 뒷받침하는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과 DTH 유발 첫날에 비타민 C 투여군의 염증 정도는 모두 대조군보다 높았으며 또한 투여군 내에서는 투여된 양에 비례하여 귓바퀴의 두께가 증가하였다. 이는 주어진 비타민 C에 의해서 DTH 초기 반응의 정도가 증강된 것으로 해석할 수 있다. 실험동물과 인체 실험의 결과 추가로 보충된 비타민 C는 T 세포의 증식을 촉진하며, 튜버큘린 반응을 향상시켜 세포매개면역반응을 증강함이 보고된 바 있다 (7,41). 본 실험에서도 투여된 비타민 C는 지라의 백혈구들에 비례적으로 축적된 결과를 보여서 이들 세포의 기능에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 실험의 편익상 지라세포를 실험대상으로 하였으나, 말초에 있는 백혈구에도 유사하게 비타민 C가 축적되었을 것으로 생각되며, 이에 따라 DTH에 관여하는 T 세포들이 기능이 향상되었을 것도 가능할 것이다. 그러나 한편으로는 *in vitro*에서 고농도의 비타민 C에 노출된 T 세포는 활성이 떨어지고 증식 능력도 회복되지 않는다는 보고(23)가 있어서, 본 실험의 결과 첫날에 투여군에서 나타난 높은 염증 반응이 T 세포에서 기인한 것으로 보기에 아직 근거가 미약한 것으로 생각된다. 또한 DTH 반응의 첫 번째 고리인 기억 T 세포에

대한 비타민 C의 영향에 대해서는 알려진 바가 없다. 그럼에도 불구하고 소염작용과는 반대로 초기에 DTH의 강도가 높게 나타난 것은 비타민 C에 의한 국소적인 영향보다는 면역반응에 관여하는 세포의 변화에 기인한 것으로 생각된다.

초기 반응에 관여하는 또 하나의 세포로 큰포식세포를 들 수 있다. 언급한 바와 같이 T 세포가 분비한 cytokine에 의해서 큰포식세포가 모여들고 활성화되어 염증반응을 유도하게 된다. 비타민 C를 포함한 몇몇 항산화제가 큰포식세포의 접착성이나 이동성, superoxide anion의 생산성 등을 높인다는 보고(15)가 있어서 본 실험에서도 사전에 주어진 비타민 C에 의한 큰포식세포 기능이 향상되었거나 큰포식세포의 동원이 좀 더 빨리 이루어져 DTH 유발 첫날의 염증 반응을 증가시켰을 가능성이 제시될 수 있지만, 이에 관해서는 좀 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

한 가지 재미있는 결과는 염증이 있었던 귓바퀴에서 염증이 가라앉은 후에도 반대쪽 정상 귓바퀴에 비해서 그 조직에서 다량의 비타민 C가 검출되었다는 점이다(Fig. 5). 측정된 시기는 염증이 가라 앉고, 조직 내에 조직액이나 염증세포의 침윤이 없을 것으로 짐작되는 시기였음에도 불구하고 주어진 비타민 C 양에 비례하게 많은 양이 조직에 축적되는 현상은 문헌상 보고된 바가 없다.

이상의 결과를 볼 때 비타민 C는 정상 생쥐에서 DNFB에 대한 DTH 반응을 초기에는 증가시키지만 뒤따라 수반되는 염증반응은 억제한다. 초기 효과는 비타민 C가 염증세포에 축적되어 이들 세포의 기능을 향상시킨 결과로 생각되며, 후기의 효과는 비타민 C 자체의 여러 기전에 의한 소염작용의 결과로 생각된다. 염증세포 중에서 구체적으로 어떤 종류의 세포가 영향을 받는지 확인하기 위해서는 좀 더 심층적인 연구가 요구된다.

참 고 문 헌

- Richardson JH, Allen RB: Dietary supplementation with vitamin C delays the onset of fatigue in isolated striated muscle of rats. *Can J Appl Sport Sci* 8;140-142, 1983
- Ghosh S, Ghosh D, Chattopadhyay S, Debnath J: Effect of ascorbic acid supplementation on liver and kidney toxicity in cyclophosphamide-treated female albino rats. *J Toxicol Sci* 24;141-144, 1999
- Smirnoff N, Wheeler GL: Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35;291-314, 2000
- Thomas WR, Holt PG: Vitamin C and immunity: an assessment of the evidence. *Clin Exp Immunol* 32;370-379, 1978
- Prinz W, Bortz R, Bregin B, Hersch M: The effect of ascorbic acid supplementation on some parameters of the human immunological defence system. *Int J Vitam Nutr Res* 47;248-257, 1977
- Feigen GA, Smith BH, Dix CE, Flynn CJ, Peterson NS,

- Rosenberg LT, Pavlovic S, Leibovitz B: Enhancement of antibody production and protection against systemic anaphylaxis by large doses of vitamin C. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38;313-333, 1982
7. Siegel BV, Morton JI: Vitamin C and the immune response. *Experientia* 33;393-5, 1977
8. Anderson R, Oosthuizen R, Maritz R, Theron A, Van Rensburg AJ: The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. *Am J Clin Nutr* 33;71-76, 1980
9. Prinz W, Bloch J, Gilich G, Mitchell G: A systematic study of the effect of vitamin C supplementation on the humoral immune response in ascorbate-dependent mammals. I. The antibody response to sheep red blood cells (a T-dependent antigen) in guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res* 50;294-300, 1980
10. Anderson R, Dittrich OC: Effects of ascorbate on leucocytes: Part IV. Increased neutrophil function and clinical improvement after oral ascorbate in 2 patients with chronic granulomatous disease. *S Afr Med J* 56;476-480, 1979
11. Yamamoto I, Tanaka M, Muto N: Enhancement of in vitro antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2-O- α -glucoside. *Int J Immunopharmacol* 15;319-25, 1993
12. Yanagita M, Gohda E, Yamamoto I: Nerve growth factor enhances antigen-specific antibody production in ascorbate-stimulated murine splenocytes. *Life Sci* 59;2075-2081, 1996
13. Mitsuzumi H, Kusamiya M, Kurimoto T, Yamamoto I: Requirement of cytokines for augmentation of the antigen-specific antibody responses by ascorbate in cultured murine T-cell-depleted splenocytes. *Jpn J Pharmacol* 78;169-179, 1998
14. Ciocoiu M, Lupusoru EC: The involvement of vitamins C and E in changing the immune response. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 102;93-96, 1998
15. Del Rio M, Ruedas G: Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* 63;871-881, 1998
16. Victor VV, Guaybas N: Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock. *Immunopharmacology* 46;89-101, 2000
17. Nieman DC, Peters EM: Influence of vitamin C supplementation on cytokine changes following an ultramarathon. *J Interferon Cytokine Res* 20;1029-1035, 2000
18. Tebbe B, Wu S: L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 α and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 108: 302-306, 1997
19. Richardson J: Vitamin C and immunosuppression, *Med Hypotheses* 21;383-385, 1986
20. Kodama M, Kodama T, Murakami M: The value of the dehydroepiandrosterone-annexed vitamin C infusion treatment in the clinical control of chronic fatigue syndrome (CFS). I. A Pilot study of the new vitamin C infusion treatment with a volunteer CFS patient. *In Vivo* 10;575-584, 1996
21. Lamm DL, Riggs DR, Shriver JS, vanGilder PF, Rach JF, DeHaven JI: Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. *J Urol* 151;21-26, 1994
22. Alberts DS, Lipkin M, Levin B: Genetic screening for colorectal cancer and intervention. *Int J Cancer* 69;62-63, 1996
23. Eylar E, Baez I, Navas J, Mercado C: Sustained levels of ascorbic acid are toxic and immunosuppressive for human T cells. *PR Health Sci J* 15;21-26, 1996
24. Campbell JD, Cole M, Bunditratavorn B, Vella AT: Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis. *Cell Immunol* 194;1-5, 1999
25. Dhabhar F: Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 917;876-893, 2000
26. Marquez M, Rincon M, Sutil R, de Yopez CR, Saer R, Ponte S: Serum levels of vitamin C in young adults who chronically use drugs of abuse. *Invest Clin* 42;183-194, 2001
27. Nandi A, Mukhopadhyay CK, Ghosh MK, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB: Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. *Free Radic Biol Med* 22;1047-1054, 1997
28. Steenvoorden DP, Beijersbergen van Henegouwen G: Protection against UV-induced systemic immunosuppression in mice by a single topical application of the antioxidant vitamins C and E. *Int J Radiat Biol* 75;747-755, 1999
29. Quevedo WC Jr, Holstein TJ, Dyckman J, McDonald CJ, Isaacson EL: Inhibition of UVR-induced tanning and immunosuppression by topical applications of vitamins C and E to the skin of hairless (hr/hr) mice. *Pigment Cell Res* 13; 89-98, 2000
30. Cetinkale O, Senel O, Bulan R: The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. *Burns* 25;113-118, 1999
31. Jacysyn JF, Abrahamsohn IA, Macedo MS: Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen. *Immunology* 102;373-379, 2001
32. Marcinkiewicz J: Cell-mediated immunity: role of IL-3 and IL-6 in the regulation of contact sensitivity reaction. *Folia Histochem Cytobiol* 28;107-119, 1990
33. De la Fuente M, Victor VM: Ascorbic acid and N-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res* 35;73-84, 2001
34. Bulger EM, Garcia I, Maier RV: Intracellular antioxidant activity is necessary to modulate the macrophage response to endotoxin. *Shock* 18;58-63, 2002
35. Winkhofer-Roob BM, Ellemunter H, Fruhwirth M, Schlegel-Haueter SE, Khoschsorur G, van't Hof CA, Shmerling DH: Plasma vitamin C concentrations in patients with cystic fibrosis: evidence of associations with lung inflammation. *Am J Clin Nutr* 65;1858-1866, 1997
36. Goto Y, Watanabe N, Kogawa N, Tsuchiya M, Takahashi O, Uchi H, Furue M, Hayashi H: CX-659S: a novel diamino-uracil derivative that has antioxidative and acute anti-inflammatory activities. *Eur J Pharmacol* 438;189-196, 2002
37. Lloberas N, Torras J, Herrero-Fresneda I, Cruzado JM, Riera M, Hurtado I, Grinyo JM: Postischemic renal oxidative stress induces inflammatory response through PAF and oxidized phospholipids. Prevention by antioxidant treatment. *FASEB J* 16;908-910, 2002
38. Nowak D, Ruta U, Piasecka G: Ascorbic acid inhibits polymorphonuclear leukocytes influx to the place of inflammation-possible protection of lung from phagocyte-mediated injury. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 37;213-218, 1989
39. Bowie AG, O'Neill LA: Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 165;7180-7188, 2000
40. Horton JW, White DJ, Maass DL, Hybki DP, Haudek S, Giroir B: Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma-mediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion. *J Trauma* 50;397-408, 2001
41. Kennes B, Dumont I, Brohee D, Hubert C, Neve P: Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. *Gerontology* 29;305-310, 1983