

고농도 비타민 C 첨가가 연골 초대배양세포의 증식에 미치는 영향

김 미 향

신라대학교 식품영양학과 및 해양신의약소재융합기술연구소

The Effect of High Concentration of Ascorbic Acid on the Growth of Primary Cultured Cells of Chondrocytes

Mihyang Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Silla University, and Fusion Technology Research Institute for Marine Pharmaceutical Materials, Busan 617-736, Korea

Abstract

L-Ascorbic acid (AsA), commonly known as vitamin C, which is one of the antioxidant vitamins, plays a role in cellular oxidant quenching. Some of the biochemical reactions in which it takes part have been traced through organ culture technique. But in cell cultured system, views on stimulatory and inhibitory action of AsA on cell growth are conflicting. Therefore, this study aimed to clarify the inhibitory action of high concentration AsA on the cell growth in primary chondrocyte isolated from rat ribs. Cells were exposed to ascorbate at various concentrations. Supplement of AsA induced stimulation of cell growth in primary cultured cells of chondrocytes. Most remarkable stimulation of cell growth by AsA was found in primary cultured chondrocytes. However, it showed that they were dead in the medium which contained AsA at the concentration higher than 1.0 mM. This lethal effect of AsA causing the cell death was inhibited by the addition of catalase in the medium. This supposed that hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) induced from H_2O_2 was actively cytotoxic agent. Based on the results, when AsA was added in medium at normal concentrations, the cell growth was stimulated by inducing the formation of extracellular matrix. On the contrary, if added in medium at excess concentrations, the cell growth was inhibited because H_2O_2 were generated from AsA in medium. Therefore, addition of AsA at the normal concentrations stimulates cell growth, but excess concentrations of AsA induces cell death.

Key words: ascorbic acid, chondrocytes, high concentration, extracellular matrix

서 론

최근 세포 배양 기술의 급속한 진보에 의해 세포 수준에서의 연구가 가능해지고 비타민 C의 생리작용도 실험용 소 동물뿐만 아니라 배양세포를 이용하여 규명하는 예가 많아졌다. 배양세포를 사용한 실험에서 비타민 C 첨가에 의해 세포가 층을 형성하나 비타민 C 무 첨가에서는 1~2층만을 형성한다(1). 세포의 matrix는 여러 종류의 성분이 상호 관여하면서 구축되어 기능을 발휘하므로 비타민 C의 첨가는 세포의 matrix 성분에 영향을 줄 가능성도 있다. 비타민 C가 부족하면 상처의 치유가 지연되고 뼈가 약해지며 모세혈관의 출혈이 나타나지만, 이것은 조직이 정상적으로 형성되지 못한 결과이다. 이와 같이 비타민 C는 세포의 matrix의 주성분인 collagen의 합성과 밀접한 관계에 있고 세포증식과 분화의 제어작용에도 관여하고 있는 것으로 추측할 수 있다. 비타민 C는 배양세포의 증식을 촉진하는 효과를 나타낸다고 알려져 있으나(2), 그 기전에 관해서는 확실하지 않다.

세포 증식이나 분화, 유주, 조직화 등의 세포기능은 세포 matrix에 영향을 받으나, 비타민 C는 그 주성분인 collagen 합성에 필수인자이므로 간접적으로 세포증식에 효과를 가지는 것으로 추측할 수 있다.

비타민 C와 세포증식과의 관계에서는 비타민 C의 첨가농도, 비타민 C가 첨가되었을 때의 세포밀도와 계대횟수 등의 세포의 상태 또는 공존 물질에 의해 세포 증식이 억제되는 것으로 알려져 있다(3-6). 비타민 C는 *in vitro* 계에서 지질의 과산화 및 phenol의 수산화 등의 산화 반응을 항진시키고 산화 촉진제로 작용한다는 보고도 있으며(7), 비타민 C의 항바이러스 작용 및 항균 작용은 이러한 성질에 의한 것으로도 추측할 수 있다. 또한 미량의 hydroxyperoxide를 포함하는 linolate methylester는 37°C 공기 중에서 micelle 상태로 거의 산화되지 않으나 2가 철을 가하였을 때 급속히 산화되고 비타민 C는 산화 속도를 더욱 상승시킨다고 한다(8,9). 그러므로 *in vitro* 계에서의 비타민 C의 산화 촉진 작용은 유리 금속이온에 의존하는 것을 알 수 있으나 *in vivo*에서

정상상태로는 비타민 C의 산화 촉진 작용은 거의 일어나지 않을 것으로 추측된다. 질병의 경우 질환 부위에서 유리 금속 이온의 상승과 함께 비타민 C가 산화 촉진제로서 작용할 가능성은 있으나 그 작용기구에 관해서는 확실하지 않다. 지금까지도 비타민 C의 세포 증식효과와 억제효과의 상반되는 연구가 다수 보고되고 있는 실정이다(10-13).

한편, 연골은 조직 내에 혈관이 분포되어 있지 않으므로 생체에서 연골세포만을 분리하기 쉽고 초대배양이 가능하다. 연골세포는 연골형 proteoglycan 및 collagen 생합성 등 분화기능발현 뿐만 아니라 DNA 합성, 세포증식, 성장인자 및 호르몬 등의 작용을 연구하기 위한 재료로 적합하고 세포의 matrix의 주성분인 collagen 합성에는 비타민 C가 필수이므로 연골세포는 비타민 C와 세포증식의 관계를 연구하는데 적합한 것으로 예상된다(14-20).

본 연구에서는 연골세포가 초대배양이 가능한 점, 세포증식 연구에 적합한 점 및 세포의 matrix의 주성분인 collagen의 생합성에는 비타민 C가 필수적으로 요구되고 연골세포는 비타민 C에 의한 영향이 큰 것으로 예상되므로 쥐에서 분리한 연골세포를 사용하여 그 증식에 대한 비타민 C의 영향을 검토하였다. 또한 세포독성의 작용 기전에 대해 알아보고자 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 초대연골세포의 증식 및 세포독성에 대한 catalase 활성에 의한 영향에 관해서도 조사하였다.

재료 및 방법

배지의 조제

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(日水製藥, Japan)은 용해한 후 120°C에서 15분간 멸균하였고, 2.92 g/100 mL L-glutamic acid(和光純藥工業, Japan) 10 mL와 7% sodium carbohydrate(大塚製藥, Japan) 10 mL를 첨가하였다. Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco Laboratories)은 56°C에서 30분간 가열처리에 의해 불활성화시켜 사용하기 전까지 -20°C에서 동결 보존하였다.

연골세포의 분리

3주령의 Sprague-Dawley계(60~70 g) 흰쥐에 마취약(sodium pentobarbital, 일본제약)을 복강 내 투여하여 마취하고 염화 benzalcornium액으로 소독하였다. 흉부로부터 늑골을 적출한 후 늑연골을 하나씩 분리하고 주위의 연조직을 제거한 후 성장연골만을 잘게 잘랐다. 0.1% EDTA-2Na 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 보존한 후 phosphate-buffered saline 용액으로 3번 세정한 후 0.2% collagenase 용액으로 37°C에서 2~3시간 각반하고 세포를 분산시켰다. 세포 현탁액을 여과하고 여액을 1,500 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 원심분리 조작을 3번 반복하고 다시 현탁액을 500 rpm으로 수 초간 원심 분리하여 조직단편 등의 침전을 제거하여 연골세포를 얻었다.

세포배양 조건

실험동물에서 분리한 초대연골세포를 $\phi 60$ mm dish에 2.5×10^5 /dish 되도록 접종하여 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 정치 배양하였다. 배지는 FBS를 5% 첨가한 DMEM(DMEM-5)를 사용하였고, 배지는 2~3일에 1회 교환하였다. 연골세포의 혈청농도 의존성을 조사하기 위하여 1%와 5%의 혈청을 첨가하여 세포수를 측정하였다. 또한 비타민 C가 세포증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 비타민 C의 첨가농도는 최종농도가 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 및 5.0 mM 되도록 하였다.

세포 중의 DNA 양 측정

시약: A액 - 0.1 M NaCl과 5 mM EDTA를 포함하는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)

B액 - 1 mg/mL DAPI 용액(Sigma Co.)

C액 - 10 U/mL pronase(Type I Crude, Sigma Co.)

D액 - 1 g/mL 송아지 흉선 DNA 용액(Sigma Co.)

방법: PBS(-)로 세정 후 C액을 A액으로 200배 희석한 용액을 가하여 37°C에서 1시간 가온한 후 세포를 파쇄하여 B액을 A액으로 10,000배로 희석하여 첨가하고 잘 혼합하여 여기파장 350 nm, 형광파장 452 nm에서 형광광도를 측정하였다. 검량선은 D액을 A액으로 희석하여 표준 송아지흉선 DNA가 40, 20, 10, 5 μ g/mL 되도록 하여 작성하였다.

비타민 C에 의한 세포독성 억제를 위한 최적 catalase 활성

세포에 대한 과산화수소의 독성을 조사하기 위하여 배지에 과산화수소의 농도가 0.001~0.15 mM 범위로 첨가하여 세포 생존율을 검토하였다. 비타민 C에 의한 세포독성 억제를 위한 최적 catalase 활성을 조사하기 위한 실험은 다음과 같은 조건에서 실시하였다. 세포주를 $\phi 60$ mm dish에 1.5×10^5 /dish 되도록 접종하여 비타민 C의 농도가 세포독성을 발현시키는 1 mM 되도록 첨가하고, catalase는 활성이 1500, 500 및 100 U/mL 되도록 조제한 배지를 각각 3 mL 첨가하였다. 매일 배지 교환을 하고 DNA양을 측정하였다. 대조군은 비타민 C와 catalase를 첨가하지 않은 배지로 배양하였다.

결과 및 고찰

연골 초대배양세포의 증식 변화

본 실험에서 연골조직에서 분리한 연골세포의 배양일수는 31일간이었으나 이 시점에서 세포는 배양기에 접촉되어 있었으며 생존하고 있음이 확인되었다. 연골세포의 증식은 세포 접종 후 증식을 시작하였으며, 배양 10일까지 대수가 계속되었고 그 후 정상기에 들어갔다(Fig. 1). 전보(21)에서 3T6 섬유아세포의 경우 대수는 배양 후 2일에서 5일까지였고, 배양 후 contact inhibition에 의해 세포의 증식은 더 이상 일어나지 않았으며 사멸하는 결과가 나타났으나,

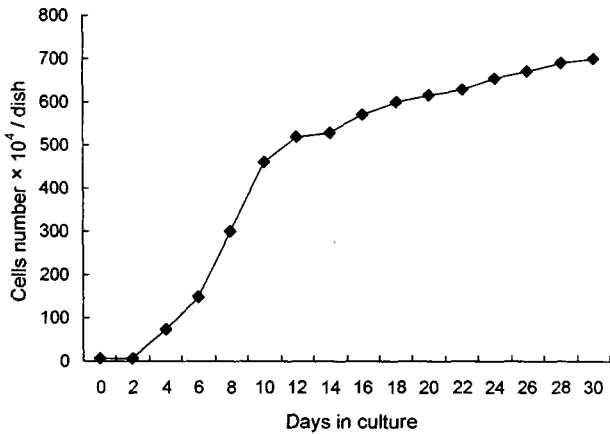


Fig. 1. Growth curve of primary chondrocytes.

연골세포의 경우 대수기 이후에도 증식이 일어나 3T6 섬유아세포와는 다른 특징을 나타냈다. 畑(22)에 의하면 세포의 matrix와 세포증식의 관계에 있어서, 세포의 matrix 형성은 세포의 3차원적 배열을 가능하게 하므로 contact inhibition이 나타나지 않고 세포는 증식을 계속한다고 하였다. 연골세포는 세포의 matrix 형성을 위한 세포로 3T6 섬유아세포와 초대연골세포의 배양일수의 차이점은 세포의 matrix 형성의 차이라고 볼 수 있다. 연골세포의 증식에 미치는 혈청의 영향은 1%보다 5%의 혈청에서 그 증식이 더욱 증가하여 연골세포의 증식 또한 혈청 농도에 의존함을 알 수 있었다(Fig. 2). 혈청은 배지 중에 2% 이상 함유되어 있으면 세포증식에 충분하나 비타민 C에 의한 증식저해를 완화시키기 위해서는 그 이상의 혈청농도가 필요할 것으로 사료된다.

비타민 C가 연골 초대배양세포의 증식에 미치는 영향

사람 혈장 중 비타민 C 농도와 비슷한 0.05 mM과 0.01 mM의 비타민 C 농도가 되도록 연골세포에 첨가하여 6일까지 배양하였을 때 세포의 DNA양의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 배양초기 DNA 양은 무첨가의 경우와 거의 차이가 나

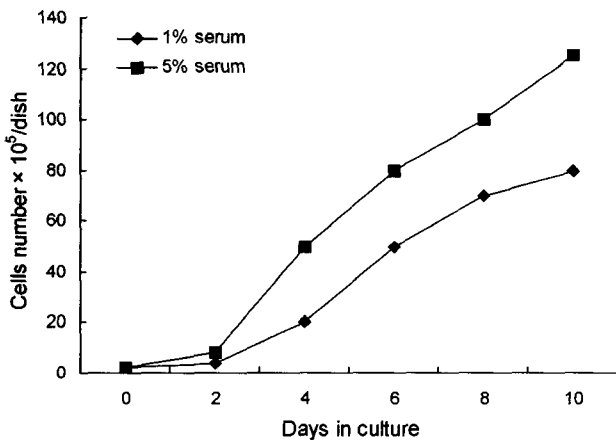


Fig. 2. Effect of serum on growth of primary chondrocytes. Cells were cultured in DMEM added 5% and 1% fetal bovine serum.

나지 않았으나, 대수증식기 중기에 해당하는 배양 6일째 비타민 C를 첨가한 경우 무첨가보다 높은 수치를 나타내었다. 0.1, 0.25 및 0.5 mM의 비타민 C를 첨가하였을 때 DNA 양은 무첨가의 경우보다 높은 수치를 나타내었고 비타민 C에 의해 세포증식이 촉진되었음이 확인되었다(Fig. 4). 이러한 3가지 농도에는 DNA양은 차이가 없었으나 고농도(1 mM, 5 mM)의 비타민 C를 첨가한 경우의 DNA 양은 무첨가의 경우보다 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 4). 이것은 1 mM보다 5 mM의 비타민 C를 첨가한 경우 현저하였고, 5 mM의 비타민 C를 첨가하였을 때 세포는 거의 생육을 나타내지 않았다. 배지 중에 비타민 C를 첨가할 경우 그 농도가 생리적 농도일 경우 세포증식은 촉진되는 경향을 보이거나 1 mM 이상의 고농도의 비타민 C를 첨가하였을 때 증식은 억제되었다. 즉 비타민 C의 첨가농도가 사람 혈장 중의 농도와 비슷할 경우 세포의 증식이 촉진되나, 혈장농도의 약 10배 이상이 첨가되었을 때는 세포에 독성을 나타내는 것으로 추측되어진다. 지금까지 비타민 C의 세포 증식효과와 억제효과에 상반되는 연구가 다수

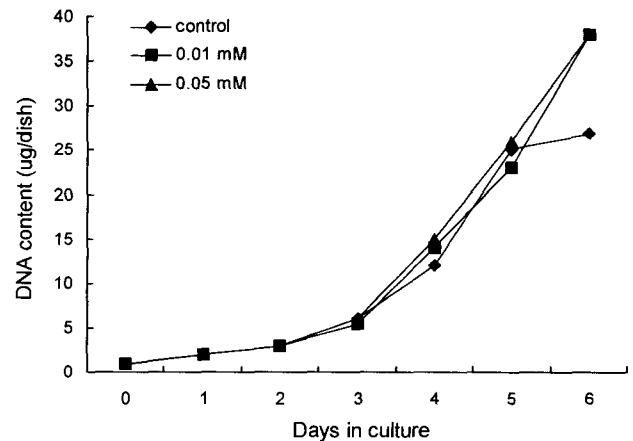


Fig. 3. Effect of AsA on DNA synthesis in primary chondrocytes. Cells were cultured in DMEM-10 with or without ascorbate.

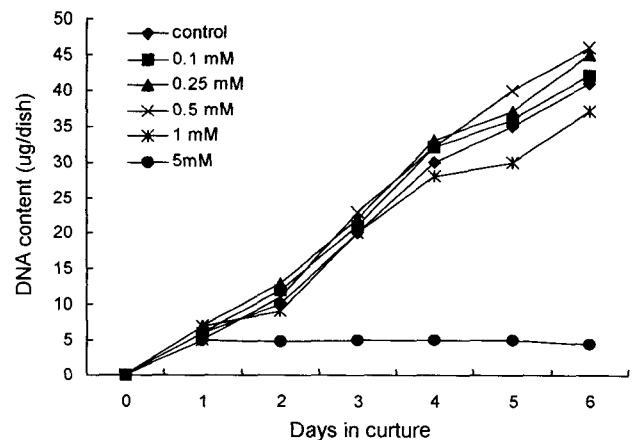


Fig. 4. Effect of AsA on growth of primary chondrocytes. Cells were cultured in DMEM-10 with (0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 mM) or without (control) AsA.

보고되고 있으나(10-13), 본 연구에서도 일치하는 결과로 나타났다.

과산화수소가 연골 초대배양세포에 미치는 영향

비타민 C의 세포증식에 미치는 상반되는 효과는 비타민 C의 첨가농도에 의한 것이며, 고농도의 비타민 C는 세포독성의 원인이 되는 과산화수소를 발생한다는 진보의 연구 결과(21)를 바탕으로 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 과산화수소가 연골 초대배양세포의 생존율에 미치는 영향을 검토하였다. 동물의 수정체에도 존재하는 비타민 C는 야행성동물보다 주행성동물의 수정체에 고농도로 함유되어 있다고 한다(23). 이것은 광산화에 의한 손상을 막는 항산화물질로 작용하기 위한 것으로 추측되나, 비타민 C와 천이금속이 공존하면 산화촉진제로서 작용한다는 보고도 있다(3, 24). 이러한 작용은 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 실험에서도 일어난다고 하므로(7), 노화, 당뇨병 또는 안염과 같이 구리이온이 증가하는 경우, 구리이온과 비타민 C가 공존하여 지질과산화가 촉진되고, 수정체 상피세포에 상해가 일어난다고 볼 수 있다. 생체 내에서는 거의 일어나지 않는 것으로 추측되는 비타민 C의 산화촉진 작용이 배양세포에서 일어나고, 전보(21)에서 특히 고농도의 비타민 C는 3T6 섬유아세포에 독성을 나타내며 비타민 C 용액 중에 독성성분인 과산화수소의 발생이 그 원인 중에 하나인 것으로 밝혀졌으므로, 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 연골 초대배양세포에 대한 독성을 검토하였다(Fig. 5). 과산화수소를 첨가하지 않은 배지에서 세포의 생존율을 100%로 하였을 때, 농도를 변화시켜 과산화수소를 첨가한 경우, 세포의 생존율은 과산화수소 0.1 mM 이하의 농도로 첨가하였을 때는 영향을 주지 않았으나, 0.1 mM보다 높은 농도에서는 세포의 생존율이 급격하게 감소하였다. Bird와 Peterkofsky(25)는 비타민 C 0.5 mM 농도에서 과산화수소가 2.5 mM 생성된다고 보고하였다. 본 실험에서는 과산화수소를 2.5 mM 첨가하였을 때 세포 증식은 일어나지 않았다. 과산화수소는 세포막을 구성하는 지질 2중층을 통과하므로 세포 외에서 발생한 과산화수

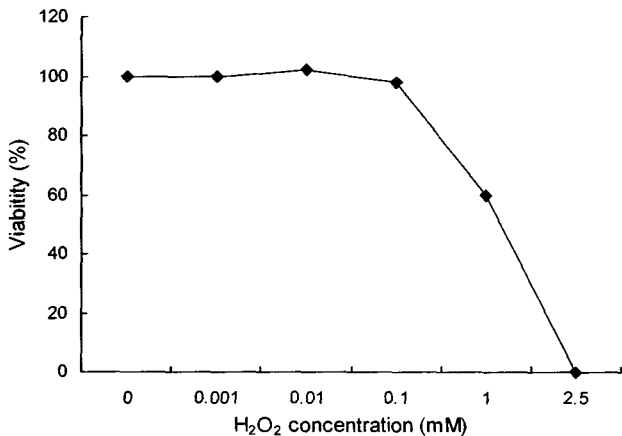


Fig. 5. H₂O₂ toxicity in primary chondrocytes.

소도 세포 내로 들어가 세포에 장해를 일으킬 수 있다. 또한 catalase는 그 분자량이 크므로 세포막을 통과할 수 없고 세포 외에서 발생한 과산화수소를 분해할 수 있으나, 세포 내에 들어간 과산화수소를 분해할 수는 없다. 즉, 비타민 C에 의한 세포독성은 비타민 C를 첨가한 배지 중에 발생한 과산화수소가 세포 내에 들어가 상해를 줄 수 있으므로 catalase가 배지 중에 존재할 경우 세포 외에 발생한 과산화수소가 분해되어 증식저해는 저지되어짐이 밝혀졌다. 그러나 과산화수소를 분해하는 효소는 catalase 뿐만 아니라 혈청 중의 glutathione peroxidase 및 glutathione-S-transferase가 포함되어 있다. 따라서 비타민 C에 의한 세포의 증식저해는 이러한 효소에 의해서도 억제되어지는 것으로 추측된다.

고농도 비타민 C에 의한 연골세포 독성 억제

초대연골세포의 증식에 대한 catalase 첨가의 영향을 Fig. 6에 나타내었다. Catalase의 첨가에 의해 세포는 사멸하지 않고 무 첨가의 대조군과 동등의 증식을 나타내었고, catalase를 100 및 500 U/mL 첨가하였을 때 각 활성 간에 세포증식에 미치는 효과의 차이는 보이지 않았으나, 1,500 U/mL의 고활성의 catalase를 첨가하였을 때 세포증식은 저하하였다. 이러한 결과는 고농도의 비타민 C(1 mM)를 첨가해도 catalase에 의해 세포는 사멸하지 않고 증식을 나타내는 결과가 얻어졌다. Catalase는 ferric porphyrin 효소에서 1분자 중에 4개의 철 원자를 포함한다. 이러한 헴은 헴의 측쇄와 단백질 부분간에 공유결합이 있으므로 공유결합을 절단하지 않는 한 헴을 분해할 수 없다. 일반적으로 Fe(II) 착체는 자동화능력이 높으므로 용이하게 산화되어진 Fe(III) 착체가 된다. 배지 중에 첨가되어진 catalase는 비타민 C에 의해 catalase 중의 헴 측쇄의 공유결합이 절단되고, Fe(II)가 떨어져 나와 배지에 철 이온이 첨가된 경우와 같은 반응이 일어나 비타민 C 유래의 과산화수소의 발생이 촉진되어질 가능성이 유추되었다. Catalase 활성이 1,500 U/mL의 경우 비타민 C 산화를 촉진

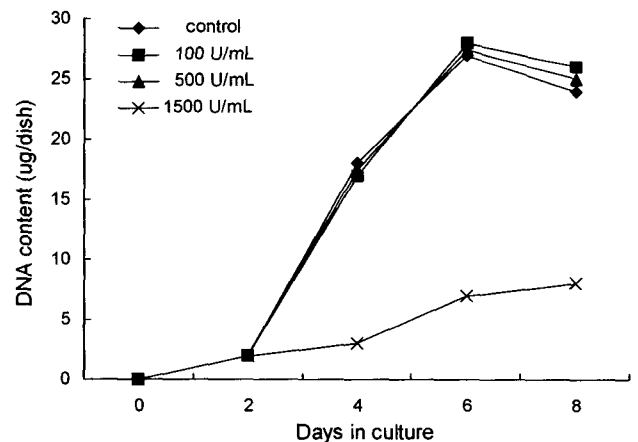


Fig. 6. Effect of catalase on AsA toxicity in chondrocytes. Cells were cultured in DMEM-5 in the absence (control) or presence of 1 mM ascorbate and catalase (100~1500 U/mL).

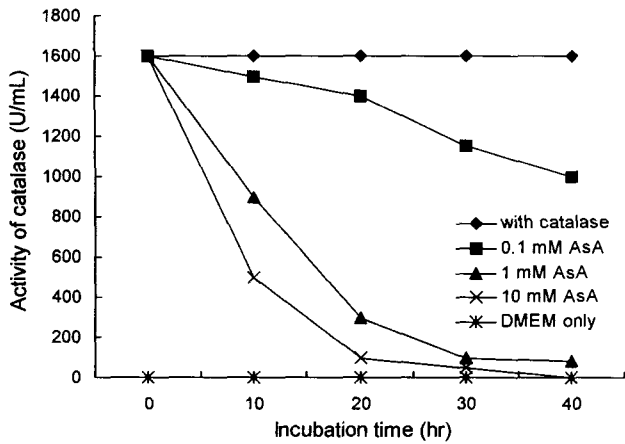


Fig. 7. Effect of AsA on catalase activity. Catalase was dissolved in DMEM-5 at concentration of 1600 U/mL (with catalase). Ascorbate was added in catalase solution at each concentration (0.1~10 mM AsA).

할 정도의 금속 이온을 공유하고 있음도 배제할 수 없다. 이상의 실험결과에서 catalase를 첨가한 경우 비타민 C에 의한 세포독성은 발현되지 않고 오히려 비타민 C가 세포증식을 촉진하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 고활성 catalase를 배지 중에 첨가하였을 때 세포증식은 억제하는 결과가 나타나 catalase와 비타민 C의 상호작용이 있을 것으로 추측된다. Catalase 활성과 비타민 C의 상호작용을 검토하기 위하여 1,500 U/mL이 되도록 catalase를 첨가한 배지에 0.1 mM, 1 mM 및 10 mM의 비타민 C를 첨가하여 37°C에서 incubation하였을 때 catalase 활성의 경시적인 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 1 mM과 10 mM의 비타민 C를 첨가하였을 때 catalase 활성은 첨가 4시간 후 급격히 감소하였고 24시간 이후에는 거의 활성이 보이지 않았다. 한편 세포가 사멸하지 않는 농도인 0.1 mM의 비타민 C를 첨가하였을 때 40시간 후에도 약 50%의 catalase가 남아있었다. 따라서 본 연구에서 과잉의 catalase를 첨가하여도 고농도의 비타민 C에 의한 세포독성이 제거되지 못한 이유는 비타민 C가 catalase를 실패시켰기 때문이라 사료된다. 고농도의 비타민 C에 의한 세포 독성은 비타민 C에 의해 발생한 대량의 과산화수소에 의한 것으로 생각되었으나, 본 연구의 결과로부터 비타민 C에 의한 세포독성의 원인은 과산화수소뿐만 아니라 비타민 C가 세포내에 존재하는 catalase를 실패시켜 과산화수소가 분해되지 않고 세포가 상해를 입는 이중의 영향에 의한 것으로 추측된다.

요 약

본 연구에서는 연골세포가 초대배양이 가능한 점, 세포증식 연구에 적합한 점 및 세포의 matrix의 주성분인 collagen의 생합성에는 비타민 C가 필수적으로 요구되고 연골세포는 비타민 C에 의한 영향이 큰 것으로 예상되므로 쥐에서 분리한 연골세포를 사용하여 그 증식에 대한 비타민 C의 영향

을 검토하였다. 또한 세포독성의 작용 기전에 대해 알아보고자 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 연골 초대배양세포의 증식 및 세포독성에 대한 catalase 활성에 의한 영향을 조사하였다. 연골 초대배양세포의 증식에 미치는 혈청의 영향은 1%보다 5%의 혈청에서 그 증식이 더욱 증가하여 연골세포의 증식 또한 혈청 농도에 의존함을 알 수 있었다. 혈청은 배지 중에 2% 이상 함유되어 있으면 세포 증식에 충분하나 비타민 C에 의한 증식저해를 완화시키기 위해서는 그 이상의 혈청농도가 필요할 것으로 사료된다. 연골세포의 증식에 미치는 비타민 C의 적절한 농도를 알아내기 위하여, DMEM-10 배지에 비타민 C 0.01~5 mM 첨가하여 세포배양을 하였다. 배지 중에 비타민 C를 첨가할 경우 그 농도가 생리적 농도일 경우 세포증식은 촉진되는 경향을 보이나 1 mM 이상의 고농도의 비타민 C를 첨가하였을 때 증식은 억제되어, 혈장농도의 약 10배 이상이 첨가되었을 때는 세포에 독성을 나타내는 것으로 추측되어진다. 고농도의 비타민 C는 세포 독성을 나타내며 비타민 C 용액 중에 독성성분인 과산화수소의 발생이 그 원인 중에 하나인 것으로 추측되어, 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 연골세포에 대한 독성을 검토하였다. 과산화수소를 첨가하지 않은 배지에서 세포의 생존율을 100%로 하였을 때, 과산화수소 0.1 mM 이하의 농도로 첨가하였을 때는 영향을 주지 않았으나, 0.1 mM 보다 높은 농도에서는 세포의 생존율이 급격하게 감소하였다. Catalase를 첨가한 경우, 비타민 C에 의한 세포독성은 발현되지 않고 오히려 비타민 C가 세포증식을 촉진하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 고활성 catalase를 배지 중에 첨가하였을 때 세포증식은 억제하는 결과가 나타나, catalase와 비타민 C의 상호작용이 있을 것으로 추측된다. 본 연구의 결과로부터 비타민 C에 의한 세포독성의 원인은 과산화수소뿐만 아니라 다른 생체성분과 상호작용 또는 자신의 존재농도에 의해 세포증식을 촉진 또는 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 신라대학교 교내연구비에 의해 수행된 연구결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. 藤本大三郎 1990. 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. アイピーシー, 東京. p 32.
2. 村田晃. 1990. ビタミンC의 다양한 작용과 작용기작. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 64: 1843-1845.
3. Samuni A, Aronovitch J, Godinger D, Chevion M, Czapski G. 1983. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific fenton mechanism. *Eur J Biochem* 137: 119-125.
4. Kageyama K, Yamada R, Otani S, Hasuma T, Yoshimata T, Seto C, Takeda Y, Yamaguchi Y, Kogawa H, Miwa N. 1999. Abnormal cell morphology and cytotoxic effect are

- induced by 6-*o*-palmitol-ascorbate-2-*o*-phosphate but not by ascorbic acid or hyperthermia alone. *Anticancer Res* 19: 4321-4326.
5. Jampel HD. 1990. Ascorbic acid is cytotoxic to dividing human tenon's capsule fibroblasts: a possible contributing factor in glaucoma filtration surgery success. *Arch Ophthalmol* 108: 1323-1329.
 6. Yue BY, Niedra R, Baum JL. 1989. Human corneal endothelial cell culture. *Invertig Ophthalmol Vit Sci* 30: 248-254.
 7. Kirkland DJ, Galloway SM, Sofuni T. 1994. Summary of major conclusions. *Mutat Res* 312: 205-211.
 8. Takahashi M, Niki E, Kawakami A, Kumasaka A, Yamamoto Y, Kamiya Y, Tanaka K. 1986. Oxidation of lipids. XIV. Inhibition of oxidation of methyl linoleate by fatty acid esters of L-ascorbic acid. *Bull Chem Soc Jpn* 59: 3179-3186.
 9. Yamamoto K, Takahashi M, Niki E. 1987. Role of iron and ascorbic acid in the oxidation of methyl linoleate micells. *Chem Lett* 1987: 1149-1154.
 10. Miwa N, Nakamura S, Nagao N, Naruse S. 2000. Anti-metastatic effect of an autooxidation-resistant and lipophilic ascorbic acid derivative through inhibition of tumor invasion. *Anticancer Res* 20: 113-118.
 11. Miwa N, Yamazaki H, Nagaoka Y, Kageyama K, Onoyama Y, Matsui-yuasa I, Otani S, Morisawa S. 1988. Altered production of the active oxygen species is involved in enhanced cytotoxic action of acylated derivatives of ascorbate to tumor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 972: 144-150.
 12. Fisher E, McLennan SV, Tada H, Heffernan S, Yue DK, Turtle JR. 1991. Interaction ascorbic acid and glucose on production of collagen and proteoglycan by fibroblasts. *Diabetes* 40: 371-376.
 13. Ono M, Aratani Y, Kitagawa I, Kitagawa Y. 1990. Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp Cell Res* 187: 309-314.
 14. 野田政樹. 1998. 骨のバイオロジー. 羊土社, 東京. p 56.
 15. Benton HP, Tyler JA. 1998. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 421-428.
 16. Berg RA, Steinmann B, Rennard SI, Crystal RG. 1983. Ascorbate deficiency results in decreased collagen production: Under hydroxylation of proline leads to increased intracellular degradation. *Archives Biochem Biophys* 262: 681-686.
 17. Pacifici M. 1990. Independent secretion of proteoglycans and collagens in chick chondrocyte cultures during acute ascorbic acid treatment. *Biochem J* 172: 193-199.
 18. Yu R, Kurata T, Kim M, Arakawa N. 1991. The behavior of L-ascorbic acid in the healing process of dorsal wounds in guinea pigs. *J Nutr Sci Vitaminol* 37: 207-211.
 19. Kim M, Otsuka M, Yu R, Kurata T, Arakawa N. 1992. The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Internat J Vit Nutr Res* 64: 56-59.
 20. Kim M, Otsuka M, Shimamura E, Arakawa N. 1998. The effect of L-ascorbic acid on age-related changes of pyridinoline in cartilage collagen of guinea pigs. *J Nutr Sci Vitaminol* 44: 217-224.
 21. Kim M. 2001. The effects of high concentration of ascorbic acid on the growth of 3T6 fibroblasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 651-656.
 22. 畑隆一郎. 1988. 生化学. 東京化学同人, 東京. 第60卷, 第3号, p 201.
 23. Varma SD, Devamanoharan PS. 1995. Oxidative denaturation of lens protein: Prevention by pyruvate. *Ophthalmic Res* 27: 18-25.
 24. Ueda J, Hanaki A, Hatano K, Nakajima T. 2000. Oxidation of ascorbic acid catalyzed by the copper (II) bound to L-histidine oligopeptides, (His)_i~iGly and acetyl-(His)_i~iGly (i=9, 19, 29). Relationship between catalytic activity and coordination mode. *Chem Pharm Bull* 48: 908-913.
 25. Bird TA, Peterkofsky B. 1986. Mechanism for the decreased biosynthesis of cartilage proteoglycan in the scorbutic guinea pig. *J Biol Chem* 261: 11166-11171.

(2004년 2월 26일 접수; 2004년 4월 28일 채택)