

고 농도의 비타민 C 첨가가 3T6 섬유아세포의 증식에 미치는 영향

김 미 향

신라대학교 식품영양학과

The Effects of High Concentration of Ascorbic Acid on the Growth of 3T6 Fibroblasts

Mihyang Kim

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea

Abstract

Ascorbic acid (AsA) is unevenly distributed throughout all body cells and fluids. Multiactivities of AsA in many biological systems and in various scientific fields were reported. In this study we aimed to clarify the inhibitory action of high concentration of AsA on the cell growth in 3T6 fibroblasts. The cells were exposed to AsA at various concentration. It showed that 3T6 fibroblasts were dead by the medium which contained AsA at the concentration higher than 0.5 mM. AsA caused hydrogen peroxide (H_2O_2) generation in a concentration dependent manner. These results suggested that the H_2O_2 was formed in the medium by AsA and acted as a cytotoxic agent. Moreover, it is supposed that hydroxyl radical ($\cdot OH$) induced from H_2O_2 also acted as actively cytotoxic agent. This lethal effect of AsA causing the cell death was inhibited by the addition of catalase in the medium. Therefore, addition of AsA at the normal concentrations stimulate cell growth, but excess concentrations of AsA induce cell death.

Key words: ascorbic acid, 3T6 fibroblasts, catalase, hydrogen peroxide

서 론

비타민 C는 일반적으로 항 괴혈병 인자로 알려져 있으며, 비타민 C가 결핍되면 사람의 경우 잇몸 출혈 또는 열증이 생기거나 오늘날의 식생활에서는 중증의 괴혈병은 거의 발생되고 있지 않다. 최근, 비타민 C를 대량 투여하는 것에 의해 항히스타민작용, cholesterol 저하작용, 면역기능 증강작용, 항바이러스·항균작용, 항 종양작용 등의 효과가 보고되고 있으며, 괴혈병 예방인자로서의 영양적 효과보다 오히려 건강증진 등의 임상적인 효과가 주목받고 있다(1-8). 한편 동물의 수정체에도 존재하는 비타민 C는 야행성동물보다 주행성동물의 수정체에 고농도로 함유되어 있다고 한다(9). 이것은 광산화에 의한 손상을 막는 항산화물질로 작용하기 위한 것으로 추측되나, 비타민 C와 천이금속이 공존하면 산화촉진제로서 작용한다는 보고도 있다(10,11). 이러한 작용은 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 실험에서도 일어난다고 하므로(12), 노화, 당뇨병 또는 안염과 같이 구리이온이 증가하는 경우, 구리이온과 비타민 C가 공존하여 지질과산화가 촉진되고, 수정체 상피세포에 상해가 일어난다고 볼 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(10,13-15). 비타민 C는 *in vitro*계에서 지질의 과산화 및 phenol의 수산화 등의 산화 반응을 항진시키고 산화 촉진제로 작용한다는 보고도 있으며(12), 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(16,17). 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 금속이온의 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(18-21).

본 연구에서는 비타민 C가 세포에 미치는 증식 촉진효과와 억제효과라는 상반되는 현상에 대해 그 기구를 해명하는 것을 목적으로 하고 있다. 즉, 비타민 C에 의한 세포 증식 억제 작용의 주요인을 model 실험에 의해 검토하고 나아가 세포

독성의 작용 기전에 대해 알아보고자, AsA 합성능을 가지지 않는 3T6 섬유아세포를 이용하여 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 그의 발생과 비타민 C의 관계를 검토하였다. 세포 중의 catalase의 활성을 측정하고 고 농도 비타민 C의 세포에 대한 영향을 확실히 규명한다면, 종래에는 밝혀지지 않은 세포증식에 대한 비타민 C의 새로운 지견이 얻어지리라 기대된다.

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.

과산화수소의 측정방법

원리 : 과산화수소에 효소 catalase를 첨가하면 산소와 물로 분해된다($H_2O_2 \rightarrow \frac{1}{2}O_2 + H_2O$). 이 반응에 의해 생기는 용존 산소의 증가를 산소전극으로 검출하였다.

기구 및 장치 : 과산화수소미량측정장치 ORITECTOR MODEL III(Oriental Electric Co. Japan), 기록계, 항온수조, N_2 gas

시료용액의 조제 : 배지는 전 처리를 하지 않은 상태에서 바로 측정하도록 하고, 세포는 배지를 흡인 제거한 후 세포층을 phosphate-buffered saline(PBS, 日水製藥, Japan)으로 2회 세정한 다음, 침출액을 1 mL 첨가하여 세포를 모아 90초간 초음파 처리하여, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상등액을 측정에서 사용하였다.

측정방법 : 셀에 시료 2 mL을 넣고 stirrer로 각반하면서 질소 gas를 가하여 시료용액 중의 용존산소를 제거하여, 산소전극의 출력의 변화를 기록계 상에서 읽은 후 안정한 시점에서 0점으로 조정하여 catalase 용액 20 μ L를 첨가한 다음, 과산화수소의 분해에 의해 발생한 산소를 산소전극 출력에 의해 나타난 peak의 높이를 측정하여 과산화수소의 함량을 계산하였다. 검량선은 Fig. 1에 나타내었다.

비타민 C에 의한 과산화수소의 발생

비타민 C에 의한 세포독성은 과산화수소가 원인으로 추측되므로 비타민 C 용액 중의 과산화수소의 발생에 대하여 조사하였다. 비타민 C 10, 20 및 40 mM을 37°C 또는 4°C 항온수조 내에 시험관을 정치시키고, 경시적으로 sampling하여 과산화수소 농도를 측정하였다.

혈청첨가에 의한 과산화수소 발생의 영향

혈청농도가 90, 80, 70, 60, 50, 10, 5 및 1% 되도록 증류수

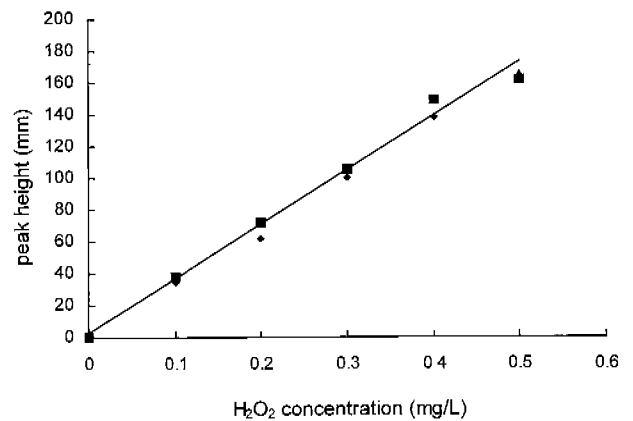


Fig. 1. Standard curve of H_2O_2 concentrations.

로 조제한 용액을 사용하여 1, 5 및 0.5 mM의 비타민 용액을 만들고 37°C에 보존한 후 stirrer로 각반하면서 경시적으로 sampling하여 과산화수소 발생량을 측정하였다.

Catalase에 의한 세포 독성의 억제

본 실험에 사용한 세포주는 3T6 mouse 섬유아세포주로서 大日本製藥(Japan)에서 구입하였다. 세포주를 직경 60 mm의 dish에 1×10^4 cells 되도록 이식한 후 다음 3종류의 배지를 각각 3 mL씩 첨가하였다. 1) 혈청 5%를 함유하는 DMEM 배지 (DMEM-5), 2) DMEM-5에 sodium ascorbate를 최종 농도 0.5 mM 되도록 첨가한 배지, 3) 2)에 catalase를 최종 농도 400 U/mL 되도록 첨가한 배지

비타민 C에 의한 세포독성 억제를 위한 최적 catalase 활성 과산화수소를 기질로 하여 catalase를 작용시켜 경시적으로 과산화수소의 감소율을 측정하였다. 3 mL의 1/30 M 인산완충액(pH 7.0)에 0.1 mL 시료를 첨가하여 혼합 후 25°C의 항온수조에서 2분간 방치한 다음 파장 230 nm에서 흡광도를 0으로 설정하였다. 10 mM의 과산화수소를 포함하는 인산완충액과 시료를 첨가하여 25°C에서 2분간 방치 후 흡광도의 감소를 경시적으로 기록하여 측정하였다. 세포주는 직경 60 mm의 dish에 1×10^4 cells 되도록 이식한 후 sodium ascorbate를 세포독성 발현 농도인 0.5 mM 되도록 첨가하였다.

결과 및 고찰

비타민 C의 첨가농도에 따른 3T6 섬유아세포의 증식 변화

본 연구의 목적인 비타민 C의 세포증식에 미치는 영향을 검토하기 위하여 계대배양이 가능하고 비교적 취급하기 쉬운 3T6 섬유아세포를 사용하였다. 이 세포는 비타민 C 합성능을 가지지 않으므로 사람과 같이 비타민 C를 합성하지 못하는 동물의 생리작용을 밝히기 위한 수단으로 적합한 것으로 사료된다.

3T6 섬유아세포의 증식에 미치는 비타민 C의 적절한 농도를 알아내기 위하여, DMEM-10 배지에 비타민 C 0.01~2

mM 첨가하여 세포배양을 하였다. 0.01 mM과 0.05 mM의 비타민 C를 첨가한 경우 무 첨가와 비교하여 세포수가 증가 하였으나, 0.3 mM 이상에서는 증식율이 저하하였으며, 2 mM의 농도에서는 거의 증식하지 않고 사멸하는 결과가 나타났다(Fig. 2). 즉 비타민 C의 첨가농도가 사람 혈장 중의 농도와 비슷할 경우 세포의 증식이 촉진되나, 혈장농도의 약 6배 이상이 첨가되었을 때는 세포에 독성을 나타내는 것으로 추측되어진다. 지금까지 비타민 C의 세포 증식효과와 억제 효과의 상반되는 연구가 다수 보고되고 있으나(18-21), 본 연구에서도 일치하는 결과로 나타났다. 비타민 C의 세포증식에 미치는 상반되는 효과의 경계는 비타민 C의 첨가농도에 의한 것으로, 고 농도의 비타민 C 첨가가 세포 증식을 억제하는 원인을 밝히고자 활성산소의 하나인 과산화수소에 주목하여 그의 발생과 비타민 C의 관계를 검토하였다.

비타민 C에 의한 과산화수소의 발생

비타민 C 10 mM을 증류수에 용해시켜 37°C에 정지하여 과산화수소 발생량을 경시적으로 관찰하였다(Fig. 3). 반응

10분 후부터 과산화수소가 발생하기 시작하여 100분에서 최대에 달하였다가 그 이후 서서히 감소하였다. 용액 중의 과산화수소가 비타민 C로부터 유래된 것인지를 확인하기 위하여 비타민 C 농도를 변화시켜 용액 중의 과산화수소를 측정하였다. 그 결과, 비타민 C 농도가 높을수록 과산화수소의 양도 증가하였다(Fig. 4). 비타민 C 첨가 후 2시간까지는 급속히 과산화수소가 발생되었고 그 후는 완만히 증가하였다. 과산화수소의 발생은 비타민 C의 농도에 의존하는 것으로 나타났다. 세포 배양 시에는 비타민 C를 배지에 용해시키므로 배지 중의 비타민 C도 과산화수소를 발생시키는지 검토하였다(Fig. 5). 수용액 중에서 과산화수소는 비타민 C 첨가 직후부터 급격하게 발생하여 24시간 후에는 검출되지 않았다. 배지에 비타민 C를 첨가하였을 경우 과산화수소는 약 4시간 후에 발생되기 시작하여 2일 후에도 검출되었다. 배지 중에서의 과산화수소 발생이 수용액보다 늦어진 이유는 배지 중에 가해진 혈청의 영향이라 추측되어지고, 이러한 것은 과산화수소를 분해 또는 발생을 억제하는 혈청 중의 성분에 의한 것이라 할 수 있다.

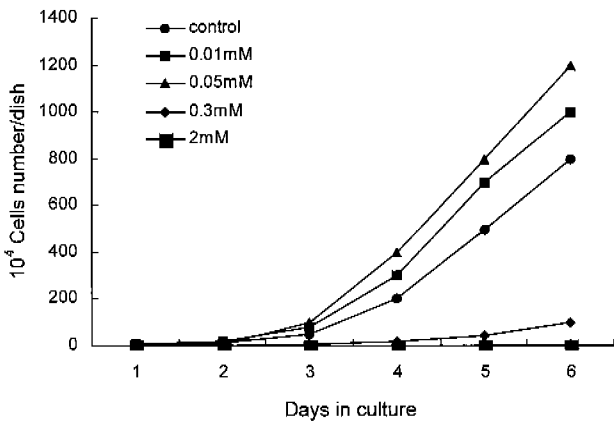


Fig. 2. Effect of AsA on growth of 3T6 fibroblasts. Cells were cultured in DMEM-10 with (0.01, 0.05, 0.3 and 2 mM) or without (control) AsA.

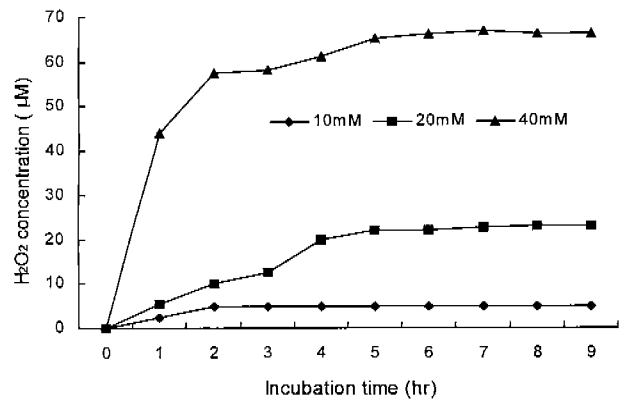


Fig. 4. Effect of various concentrations of AsA on H₂O₂ generation.

Ascorbate was dissolved in water at a concentration of 10 mM, 20 mM and 40 mM and incubated at room temperature.

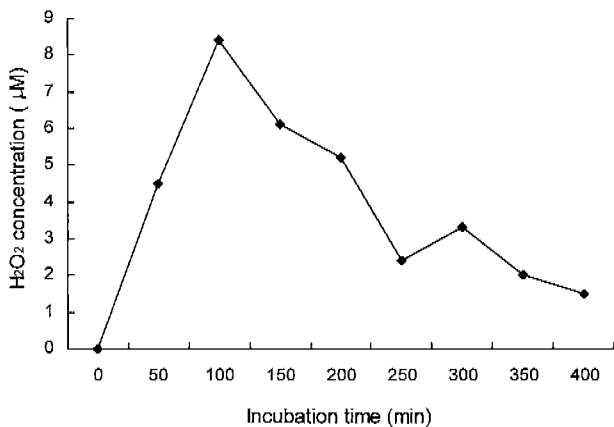


Fig. 3. Effect of water dissolved AsA on H₂O₂ generation. AsA of 10 mM dissolved in distilled water at 37°C.

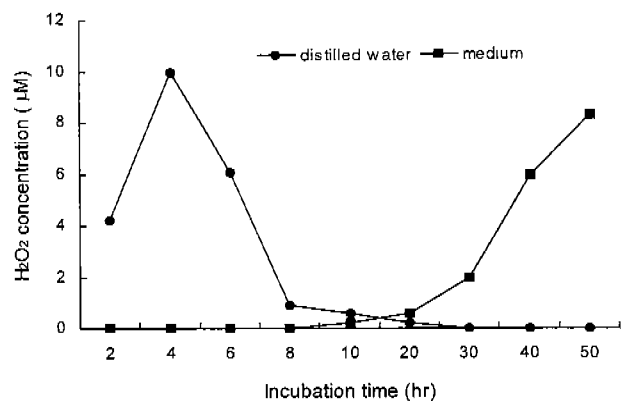


Fig. 5. H₂O₂ Concentration in distilled water and in medium. 5 mM ascorbate was dissolved in distilled water on DMEM-5 and incubated at 37°C.

혈청첨가에 의한 과산화수소발생의 영향

과산화수소의 발생은 비타민 C를 증류수에 용해시킨 것보다 배지 중에 용해한 경우 더 지연되었으므로 혈청의 과산화수소 발생에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 6). 비타민 C 농도가 1 mM에서 혈청농도가 90%와 80%의 경우 과산화수소의 발생은 비타민 C 첨가 후 90분까지는 나타나지 않았다. 혈청 70%에서도 그 발생량은 아주 적었으며 혈청농도가 낮아짐에 따라 과산화수소 발생량은 증가하였다. 혈청 중에는 많은 미량금속도 함유되어 있으므로 이러한 미량금속과 비타민 C가 반응하여 과산화수소가 발생할 가능성도 배제할 수 없으나, 혈청 중에는 catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione-s-transferase 등의 과산화수소 분해효소가 존재하므로(22) 과산화수소가 이들의 효소에 의해 분해한 것으로도 생각할 수 있다. 또한 생체 중에는 비타민 C와 직접 결합하는 단백질이 존재할 가능성도 있으므로, 혈청 중의 단백질이 비타민 C와 결합하여 비타민 C의 산화를 억제하여 과산화수소의 발생을 억제할 가능성도 있다. 이상의 결과에서 비타민 C에 의한 세포독성의 원인이라 생각되어지는 과산화수소의 발생은 혈청에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 과산화수소의 발생을 완전하게 억제하기 위해서는 용액 중에 혈청의 농도가 70% 이상이 되지 않으면 안되므로 세포배양에는 적용하기 어려운 것으로 나타났다.

Catalase에 의한 세포독성의 억제 효과

고농도의 비타민 C는 세포에 대하여 독성을 나타내나, 그 원인으로 비타민 C 용액 중에 독성성분인 과산화수소가 발생되기 때문이라고 추측되었다. 그러므로 과산화수소분해효소인 catalase를 배지 중에 첨가하여 비타민 C에 의한 세포독성 여부를 조사하였다(Fig. 7). 비타민 C 0.5 mM 첨가하였을 때 세포의 증식이 저해되었으나, catalase를 첨가한 배지에 같은 농도의 비타민 C를 첨가하여도 세포는 사멸하지 않고 순조롭게 증식하였고 세포수는 비타민 C를 첨가하였을 때

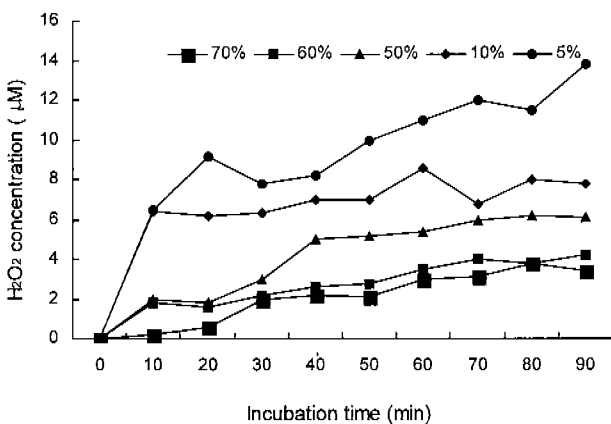


Fig. 6. Effect of addition of serum on H₂O₂ generation AsA of 1 mM was dissolved in water containing 70%, 60%, 50%, 10% and 5% serum. Solution was incubated at 37°C.

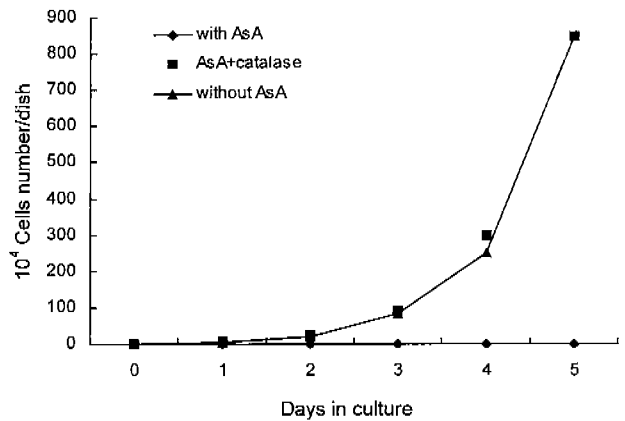


Fig. 7. Inhibitory effect of catalase on AsA toxicity in 3T6 fibroblasts.

Cells were cultured in DMEM-5 without or with 0.5 mM ascorbate with 400 U/mL catalase.

보다도 약간 높은 경향을 나타내었다. 비타민 C 첨가에 의해 세포의 증식저해가 일어났으므로 세포의 상해는 비타민 C에서 발생하는 과산화수소에 의한 것으로 추측되었다. 과산화수소가 세포에 미치는 독성의 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 과산화수소를 첨가하지 않은 배지에서 세포의 생존율을 100%로 하였을 때, 농도를 변화시켜 과산화수소를 첨가한 경우 세포의 생존율은 과산화수소 0.05 mM 이상 첨가 시 그 첨가농도가 증가할수록 세포의 생존율은 저하하였으나 0.01 mM 이하에서는 영향을 주지 않았다. Peterkofsky 등은 비타민 C 0.5 mM 농도에서 과산화수소가 2.5 mM 생성된다고 보고하였다(23). 본 실험에서는 과산화수소를 2.5 mM 첨가하였을 때 세포 증식은 일어나지 않았다. 과산화수소는 세포막을 구성하는 지질 2중층을 통과하므로 세포 외에서 발생한 과산화수소도 세포 내로 들어가 세포에 장해를 일으킬 수 있다. 또한 catalase는 그 분자량이 커 세포막을 통과할 수 없으므로 세포 외에서 발생한 과산화수소를 분해할 수 있으나, 세포 내에 들어간 과산화수소를 분해할 수 없다. 즉, 비타민 C에 의한 세포독성은 비타민 C를 첨가한 배지 중에

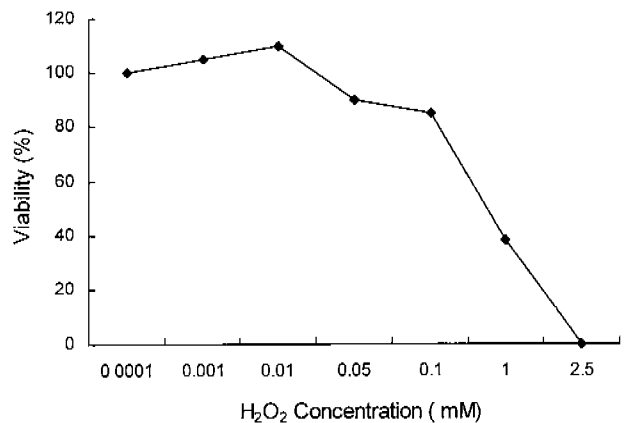


Fig. 8. H₂O₂ toxicity in 3T6 fibroblast.

발생한 과산화수소가 세포 내에 들어가 상해를 줄 수 있으나, catalase가 배지 중에 존재할 경우 세포 외에서 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.

비타민 C에 의한 세포독성억제를 위한 최적의 catalase 활성

Catalase의 첨가에 의해 세포는 사멸하지 않고 무 첨가의 대조군과 동등의 증식을 나타내었고, catalase를 25, 100, 400, 750 U/mL 첨가하였을 때 각 활성간에 세포증식에 미치는 효과의 차이는 보이지 않았으나, 1,600 U/mL의 고 활성의 catalase를 첨가하였을 때 세포증식은 저하하였다(Fig. 9). Catalase의 첨가에 의해 세포상해는 제거되고 그 효과는 활성이 25~750 U/mL의 범위에서는 차이가 보이지 않았으므로, 25 U/mL에서도 세포상해저거는 충분한 것으로 나타났다. 그러나 1600 U/mL의 고 활성 catalase 첨가시 세포증식은 억제되었다. Catalase는 Ferric porpylin 효소에서 1분자 중에 4개의 철 원자를 포함한다. 이러한 헴은 헴의 측쇄와 단백질 부분에 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 1,600 U/mL의 경우 비타민 C 산화를 촉진할 정도의 금속 이온을 공유하고 있음도 배제할 수 없다.

이상의 실험결과에서 catalase를 첨가한 경우 비타민 C에 의한 세포독성은 발현되지 않고 오히려 비타민 C가 세포증

식을 촉진하고 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 비타민 C는 다른 생체성분과 상호작용 또는 자신의 존재농도에 의해 세포증식에 대하여 촉진하기도 하고 억제하기도 한다. 따라서 비타민 C의 생리작용의 해석을 위해서는 비타민 C 분자뿐만 아니라 다른 생체성분과의 상호작용도 겸하여 고찰할 필요가 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 비타민 C의 산화로 인해 발생하는 활성산소의 하나인 과산화수소에 착목하여 비타민 C 용액 중에서 과산화수소의 발생에 관한 model 실험을 하였다. 나아가 이러한 결과를 세포에 적용하여 비타민 C에 의한 세포독성의 본체에 대하여 고찰하였다. 3T6 섬유아세포의 증식에 미치는 비타민 C의 적절한 농도를 알아내기 위하여, DMEM-10 배지에 비타민 C 0.01~2 mM 첨가하여 세포배양을 하였다. 0.01 mM과 0.05 mM의 비타민 C를 첨가한 경우 무 첨가와 비교하여 세포수가 증가하였으나, 사람의 혈장농도의 약 6 배에 달하는 0.3 mM 이상에서는 증식율이 저하하였으며, 2 mM의 농도에서는 거의 증식하지 않고 사멸하는 결과가 나타났다. 배지 중의 과산화수소가 비타민 C로부터 유래된 것인지를 확인하기 위하여 비타민 C 농도를 변화시켜 용액 중의 과산화수소를 측정 한 결과, 비타민 C 첨가 후 2시간까지는 급속히 과산화수소가 발생되었고 그 후는 완만히 증가하여, 과산화수소의 발생은 비타민 C의 농도에 의존하는 것으로 나타났다. 세포 배양 시 비타민 C를 배지 중에 용해하여 사용하므로 배지 중의 비타민 C에 의한 과산화수소의 발생을 완전하게 억제하기 위해서는 용액 중의 혈청농도가 70% 이상 요구되어지므로 세포배양에는 적용하기 어려운 것으로 밝혀졌다. 고농도의 비타민 C가 세포에 대하여 독성을 나타내는 원인이 과산화수소의 발생 때문이라고 추측되어, 과산화수소분해효소인 catalase를 배지 중에 첨가하여 비타민 C에 의한 세포독성의 여부를 조사하였다. Catalase에 의한 세포의 독성 억제효과 검토에서 0.5 mM 농도의 비타민 C는 세포의 증식저해를 초래하였으나, catalase를 첨가한 배지에 같은 농도의 비타민 C를 첨가하여도 세포는 사멸하지 않고 순조롭게 증식하였으므로, 세포의 상해는 비타민 C에서 발생하는 과산화수소에 의한 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 0.05 mM 농도 이하의 비타민 C는 세포증식을 촉진하였으나 0.3 mM 이상의 비타민 C 농도에서는 오히려 세포증식의 억제가 초래되었고, catalase를 첨가한 경우 비타민 C에 의한 세포독성은 발현되지 않았으므로, 비타민 C는 다른 생체성분과 상호작용 또는 자신의 존재농도에 의해 세포증식을 촉진 또는 억제함을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 신라대학교 교내연구비에 의해 수행

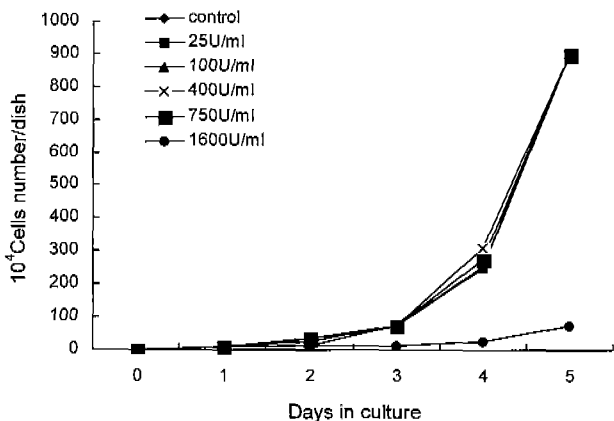


Fig. 9. Effect of catalase on AsA toxicity. Cells were cultured in DMEM-5 in the absence (control) or presence of 0.5 mM ascorbic acid and catalase (25-1600 U/mL).

된 연구결과이며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

문 헌

1. Lesin, S. : *Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential*. Academic Press, London (1976)
2. 吉岡満城: 血清ビタミン濃度と血圧との關係. 武田藥報, **373**, 15-22 (1988)
3. 村田 晃: 中高年の健康とビタミンC. 武田藥報, **373**, 1-8 (1988)
4. 村田 晃: ビタミンC의 다양한作用と作用機作. 日本農芸化学会誌, **64**, 1843-1845 (1990)
5. 堀尾文彦, 吉田昭: ビタミンCと葉物代謝系. 日本農芸化学会誌, **64**, 1861-1864 (1990)
6. Frei, B. : Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1113S-1118S (1991)
7. Hata, R. : Regulation of collagen gene expression by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **72**, 1191-1194 (1998)
8. Takahashi, M., Komuro, E., Niki, E. and Tanaka, K. : Action of fatty acid esters of L-ascorbic acid as antioxidants in phosphatidylcholine liposomal membranes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 679-685 (1992)
9. Varma, S.D. and Devamanoharan, P.S. : Oxidative denaturation of lens protein: Prevention by pyruvate. *Ophthalmic Res.*, **27**, 18-25 (1995)
10. Samuni, A., Aronovitch, J., Godinger, D., Chevion, M. and Czapski, G. : On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific fenton mechanism. *Eur. J. Biochem.*, **137**, 119-125 (1983)
11. Ueda, J., Hanaki, A., Hatano, K. and Nakajima, T. : Autooxidation of ascorbic acid catalyzed by the copper(II) bound to L-histidine oligopeptides, (His)_n-iGly and acetyl-(His)_n-iGly (i=9, 19, 29). Relationship between catalytic activity and coordination mode. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 908-913 (2000)
12. Kirkland, D.J., Galloway, S.M. and Sofuni, T. : Summary of major conclusions. *Mutat. Res.*, **312**, 205-211 (1994)
13. Kageyama, K., Yamada, R., Otani, S., Hasuma, T., Yoshimata, T., Seto, C., Takeda, Y., Yamaguchi, Y., Kogawa, H. and Miwa, N. : 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 (1999)
14. Jampel, H.D. : 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 (1990)
15. Yue, B.Y.J.T., Niedra, R. and Baum, J.L. : Human corneal endothelial cell culture. *Invertig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **30**, 248-254 (1989)
16. Takahashi, M., Niki, E., Kawakami, A., Kumasaka, A., Yamamoto, Y., Kamiya, Y. and Tanaka, K. : 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 (1986)
17. Yamamoto, K., Takahashi, M. and Niki, E. : Role of iron and ascorbic acid in the oxidation of methyl linoleate micells. *Chem. Lett.*, **1987**, 1149-1154 (1987)
18. Miwa, N., Nakamura, S., Nagao, N. and Naruse, S. : Anti-metastatic effect of an autooxidation-resistant and lipophilic ascorbic acid derivative through inhibition of tumor invasion. *Anticancer Res.*, **20**, 113-118 (2000)
19. Miwa, N., Yamazaki, H., Nagaoka, Y., Kageyama, K., Onoyama, Y., Matsui-yuasa, I., Otani, S. and Morisawa, S. : 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 (1988)
20. Fisher, E., McLennan, S.V., Tada, H., Heffernan, S., Yue, D. K. and Turtle, J.R. : Interaction ascorbic acid and glucose on production of collagen and proteoglycan by fibroblasts. *Diabetes*, **40**, 371-376 (1991)
21. Ono, M., Aratani, Y., Kitagawa, I. and Kitagawa, Y. : Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.*, **187**, 309-314 (1990)
22. 野口知雄: ベルオキシソーム 第2版. 講談社, 東京, 日本 (1989)
23. Bird, T.A. and Peterkofsky, B. : Mechanism for the decreased biosynthesis of cartilage proteoglycan in the scorbutic guinea pig. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11166-11171 (1986)

(2001년 5월 17일 접수)