



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

의학석사 학위논문

사람 T 림프구 활성화 과정에
고농도 비타민 C가 미치는
영향에 관한 연구

**The effects of high concentration
vitamin C on human T cell
activation**

2014년 2월

서울대학교 대학원
의학과 해부학 & 면역학 전공
홍 준 만

사람 T 림프구 활성화 과정에 고농도 비타민 C가 미치는 영향에 관한 연구

지도교수 황영일

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함
2013 년 10 월

서울대학교 대학원
의학과 해부학 & 면역학 전공
홍 준 만

홍준만의 의학석사 학위논문을 인준함
2013 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

The effect of high concentration of vitamin C on activation of T cells

by
Jun-man Hong

**A Thesis Submitted to the Department of anatomy in
Partial Fulfillment of the Requirements for Master
Degree in Medicine at the Seoul National University**

December 2013

Approved by Thesis Committee:

Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice chairman

Professor _____

국문 초록

서론: 비타민 C는 세포 내로 흡수되어 여러 종류의 생물학적 반응에 관여한다. 세포가 비타민 C를 흡수하는 방식은 크게 두 가지가 있다. 산화형 비타민 C는 포도당 수송체 (glucose transporter; GLUT)를 통하여 수동적으로 흡수되며, 환원형 비타민 C는 나트륨의존 비타민 C 수송체 (sodium-dependent vitamin C transporter; SVCT)에 의해서 에너지를 사용하며 흡수된다. 또한 비타민 C는 여러 단면의 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 하지만 지금까지 사람 T 림프구에서 SVCT 존재와 비타민 C의 역할은 아직 잘 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 사람 T 림프구에서 비타민 C가 T 림프구 활성화에 미치는 영향을 알아보았다.

방법: 사람 말초혈액에서 T 림프구를 분리한 후 배양하였다. T 림프구에서 SVCT 존재를 확인하기 위하여 비활성 또는 활성화 48시간에 중합효소연쇄반응, 특수단백질 검출법, 면역형광염색 등을 수행하였다. 비타민 C가 T 림프구의 세포증식, 세포 사멸, 활성화 정도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 활성화 전 또는 후에 비타민 C를 첨가하였고, 세포 내 비타민 C 농도 측정, Annexin V, PI 염색 후 유세포분석, 배양 48시간째 [³H]-thymidine 흡수 측정, 세포배양액 내 IL-2 농도 측정을 위한 ELISA, 활성화 세포 표면 표지자인 CD69, CD25 발현 확인, DCFH-DA법을 이용한 세포 내 ROS 양 측정, NF- κ B, c-Jun 활성 측정 등을 시행하였다.

결과: 활성화 전에 첨가한 고농도 비타민 C는 T 림프구의 세포증식을 억제하였으며, 세포사멸 또한 유도하였다. 하지만 활성화 후 24시간에 첨가된 고농도 비타민 C는 세포증식은 물론이고 세포 사멸

에 별다른 영향을 나타내지 않았다. IL-2 분비를 비교하여도 활성화 전에 첨가한 그룹이 감소하였다. 위 현상이 고농도 비타민 C가 T 림프구의 활성화를 억제하여 나타난 현상인지 알아보기 위하여 CD69와 CD25의 발현을 확인한 결과, CD25의 발현이 감소되어 있었다. 비활성 T 림프구와는 달리 활성 T 림프구는 활성화 후 2시간 만에 상당한 정도의 비타민 C를 흡수하여, 활성화 자체가 T 림프구의 비타민 C 흡수를 촉진함을 확인하였다. 활성화에 중요한 역할을 하는 세포 내 ROS는 활성화 전 또는 후에 첨가된 고농도 비타민 C가 모두 비슷하게 감소시켰다. 활성화 전과 후 첨가된 비타민 C는 사람 T 림프구 활성화에 중요한 전사인자인 NF- κ B의 활성을 감소시켰고, c-Jun 활성화에는 큰 영향을 주지 않았다.

결론: 이상의 결과를 토대로 살펴볼 때, 활성화된 T 림프구는 시간에 관계없이 비타민 C를 활발하게 흡수하였으며, 이들은 세포 내 ROS 양을 감소시키는 항산화작용을 나타냄을 알 수 있었다. 그러나 활성화 후에 흡수된 비타민 C와 달리 초기에 흡수된 비타민 C는 T 림프구 활성화 과정에 부정적 영향을 미쳤다. 이는 아마도 T 림프구 초기에 일어나야 할 여러 과정에 ROS가 중요하게 작용하며, 과량의 비타민 C는 ROS를 제거함으로써 이들 과정이 일어나는 것을 방해하였기 때문에 나타난 결과일 것으로 생각된다. 비타민 C의 이러한 특성을 활용하면 생체 내 특이 항원에 대한 면역반응의 강도를 조절할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

주요어: 사람 T 림프구 활성화, 비타민 C, 항산화제, ROS

학 번: 2012-21762

목 차

국문초록.....	i
목차.....	iii
그림목록.....	iv
서론.....	1
실험목적.....	4
실험재료 및 방법.....	5
결과.....	11
고찰.....	29
참고문헌.....	39
초록(영문).....	49

그림 목록

Figure 1. SVCT-2 expression on human T cells.....	13
Figure 2. The effects of vitamin C on the proliferation of human T cells.....	15
Figure 3. The effects of vitamin C on human T cell apoptosis.....	17
Figure 4. High concentration vitamin C before activation affects human T cell IL-2 production.....	17
Figure 5. The effects of vitamin C on the activation marker of human T cells.....	20
Figure 6. Vitamin C concentration measurement in resting or activated human T cells.....	22
Figure 7. Effects of vitamin C on intracellular ROS levels by resting or activated human T cells.....	24
Figure 8. Effects of vitamin C on NF- κ B activity by human T cells.....	26
Figure 9. Effects of vitamin C on c-Jun activity by human T cells.....	28

서론

사람은 포도당으로부터 비타민 C 를 합성하는데 필요한 L-gulonolactone oxidase 가 없어서 비타민 C 를 스스로 합성 할 수 없다. 따라서 사람에게 비타민 C 는 꼭 섭취해야 하는 필수 영양소이다[1]. 비타민 C 는 세포 내로 두 가지 수송체를 통해서 유입된다. 환원형 비타민 C (ascorbic acid; AA)는 나트륨의존 비타민 C 수송체(sodium-dependent vitamin C transporter; SVCT)를 통해서 유입되고[2], 산화형 비타민 C (dehydroascorbic acid; DHA)는 포도당 수송체(glucose transporter; GLUT-1, 3, 4)를 통해서 유입된다[3]. SVCT 는 말 그대로 비타민 C 를 세포 내로 수송할 때 나트륨을 필요로 하고, 종류로는 SVCT-1 과 SVCT-2 가 존재한다[4-9]. 현재까지 알려진 바에 의하면, SVCT-1 은 간, 소장, 신장의 상피세포에 존재하고, SVCT-2 는 뇌, 눈, 비장, 고환, 난소에 존재한다[4-9]. 하지만 사람 T 림프구에서 SVCT 의 존재는 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

T 림프구는 체액성 면역과 세포성 면역에 중요한 면역세포이고, 몇몇 종류가 있다. 먼저, 활성화된 도움 T 림프구는 B 림프구의 CD40 자극으로 형질세포 분화와 항체 생산을 촉진시켜 항원의 활성을 저해하는 체액성 면역 기능을 한다[10]. 활성화된 독성 T 림프구는 병원체에 감염된 세포, 암세포, 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 퍼포린과 그랜자임으로 직접 파괴시키는 세포성 면역 기능을 한다[11]. 그밖에, 조절 T 림프구는 IL-10, TGF-beta 등

사이토카인이나 CTLA-4 와 같은 보조자극분자를 발현하여 T 림프구와 B 림프구의 면역 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다[12]. 다시 말해, 활성화된 T 림프구는 세포증식 증가로 항원 특이적인 세포를 많이 만들고, 다양한 사이토카인 분비 증가로 면역반응을 활성화하거나 억제 할 수 있다. 사이토카인 중 IL-2 는 T 림프구의 항원 비특이적 세포증식인자로서 세포주기 진행과 클론확장을 시키는 중요한 단백질이다[13]. 활성화된 T 림프구에서 IL-2 발현은 이차전령계로 알려진 활성산소종(ROS) [14]에 의해 조절된다는 몇몇 보고가 있다. T 림프구 수용체 자극 후 미토콘드리아 복합체-I 에서 발생한 ROS 는 NF- κ B 와 AP-1, IL-2 발현을 증가시켰다[15]. 반대로 PMA/ionomycin 자극 30 분 전에 항산화제인 N_L-acetylcysteine (NAC)를 사용하여 ROS 를 감소 시켰을 때는 IL-2, IL-4 발현이 감소했으며, NAC 농도가 증가할수록 그 발현도 감소하였다[15]. 또한, 마우스 T 림프구를 Con A 또는 PMA/ionomycin 자극 10 분 전에 lipo 억제제, hydroxyl radical 억제제, oxygen radical 억제제 등의 항산화제를 사용하였을 때도 세포증식과 IL-2 분비를 억제하였고[16], nonpermeant electron acceptor ferricyanide, iron chelator, butylated hydroxyanisole (BHA) 등의 항산화제 존재 하에 PMA/ionomycin 으로 자극했을 때도 마우스 T 림프구의 세포증식 및 IL-2 수용체 발현을 억제하였다[17, 18]. 하지만 T 림프구를 mitogen 자극 후 24 시간째에 lipo 억제제, hydroxyl radical 억제제, oxygen radical 억제제 등의 항산화제를 처리하였을 때는 활성을 억제하지 않았고, 오직 자극 전 또는 자극 2 시간 이내에 첨가 했을 때만

억제하였다[16]. 그러나 위와 같은 현상이 왜 일어나는지는 자세히 알려지지 않았다.

비타민 C 도 혈청과 세포 내의 ROS 를 제거하는 강력한 항산화제로서 잘 알려져 있으며[19, 20], T 림프구 활성화에 영향을 준다. 실제로, 비타민 C 가 T 림프구에 미치는 영향에 대해 다양한 연구들이 보고되었다. 먼저, 비타민 C 가 T 림프구에 긍정적인 효과를 나타내는 연구보고가 있다. 비타민 C 를 투여한 노인들로부터의 T 림프구는 *in vitro* 에서 세포증식 능력이 증가하였다[21]. 고용량 비타민 C 를 3 주 동안 섭취한 젊은 사람의 T 림프구도 *in vitro* 에서 세포증식 능력이 증가하였다[22]. 지연성 과민반응 유도제(dinitrofluorobenzene)를 투여한 마우스에 비타민 C 를 섭취시킨 T 림프구도 *in vitro* 에서 다양한 자극에 대한 세포증식이 증가하였다[23]. *In vitro* 에서 0.4 ~ 10 mM 비타민 C 를 첨가한 활성화된 B10 마우스 T 림프구는 성장인자 결핍, 자발적, 스테로이드 유도 등으로 인한 세포사멸이 억제되었다[24]. Balb/c 마우스에 250 mg 비타민 C 를 2 ~ 4 주 동안 음수로 먹인 실험에서 Con A 로 자극 시킨 T 림프구의 세포증식이 증가하였고, 세포 매개 면역반응 또한 증가하였다[25]. 반면에 비타민 C 가 T 림프구에 부정적인 영향을 나타내는 연구보고도 있다. 사람 T 림프구에 20 mM 비타민 C 를 2 시간 동안 첨가하고, PMA/ionomycin 으로 5 시간 동안 자극하였을 때 IL-2 양이 감소하였다[26]. 사람 T 림프구에 250 μ M 비타민 C 를 18 시간 동안 첨가하였을 때 세포의 생존율과 IL-2 분비 양이 90% 이상 감소하였고, 비타민 C 를 제거하여도 mitogen 에 대한 반응이 회복되지 않았다[27]. 또한, 0.5 mM 비타민

C 를 자극 30 분 전에 첨가하면 사람 T 림프구에서 ROS 생성을 억제하고, 세포증식을 감소시킨다는 보고가 있다[28].

실험 목적

항산화제가 T 림프구 활성화 전 또는 초기에 처리 되었을 때 세포증식 및 IL-2 분비 감소를 보였지만, 활성화 후 24 시간째 처리하였을 때는 아무런 영향이 없었다. 하지만 같은 항산화제가 처리되는 시점에 따라 T 림프구에 미치는 영향이 다른 이유에 대해서는 지금까지 잘 알려지지 않았다.

따라서 본 연구의 목적은 항산화제인 비타민 C 도 사람 T 림프구에 자극 전 또는 후에 첨가되었을 때 세포활성에 서로 다른 영향을 주는지 확인하고, 만약 그렇다면 비타민 C 가 사람 T 림프구에 첨가되는 시점에 따라 왜 서로 다른 영향을 보이는지에 대해서 알아보는 것이다.

재료 및 방법

1. 지원자

신체 건강한 지원자의 혈액에서 T 림프구를 분리하였다. 모든 실험에 대한 설명을 하고 사전 동의를 받아서 혈액을 채취하였으며, 이는 서울대학교 윤리 위원회인 IRB 에서 승인을 받았다(C-1208-149-424). 연령은 20 에서 40 대 사이의 지원자 10 명을 대상으로 하였다. 혈액 샘플은 바로 실험에 사용하였다.

2. 세포 및 시약

말초혈액 단핵세포(PBMC)는 Ficoll-paque PLUS (1.077 ± 0.001 g/ml, GE Healthcare, 17-1440-02)를 이용하여 밀도구배 원심분리로 수집하였고, CD3+ T 림프구는 negative selection pan T cell isolation kit II (Cat. No. 130-091-156, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)와 LS column (Cat. No. 130-042-401, Miltenyi Biotec GmbH)를 사용해 negative selection 하였다. 분리한 T 림프구는 anti-CD3-PE (Cat. No. 347347, Becton Dickinson, NJ, USA)로 염색하여 유세포분석을 했을 때 95% 이상의 순도를 확인하였다.

분리한 T 림프구는 RPMI 1640 (Cat. No. LM 011-01, Welgene, Daegu, Korea)에 10% fetal bovine serum (Gibco, 16000-044), 1% penicillin/streptomycin, 1% GlutaMAXTm (Gibco, 35050-061), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, 11360-070), 1% non-essential amino acids (Gibco, 11140-

050), 55 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco, 21985-023)를 첨가하여 배양하였다.

3. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

사람 T 림프구의 전체 RNA 는 Trizol (Cat. No. 15596026, invitrogen, USA)을 사용하여 추출하였다. 각각의 프라이머는 hSVCT-1 (sense; 5'-GCC CCT GAA CAC CTC TCA TA-3', antisense; 5'-ATG GCC AGC ATG ATA GGA AA-3'; 360 bp), hSVCT-2 (sense; 5'-TTC TAT GCT CGC ACA GAT GCC-3', antisense; 5'-TAA AAG CCA CAC AGC CCC CTA C-3'; 667 bp), GAPDH (sense; 5'-GTG GAG TCT ACT GGC GTC TT-3', antisense; 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TT-3'; 509 bp)이다. SVCT-1 과 -2 프라이머의 annealing 온도는 각각 55 $^{\circ}$ C, 61 $^{\circ}$ C 이다.

4. 특수 단백질 검출 검사(Western blot)

사람 T 림프구의 전체 세포 용해물은 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% sodium deoxychloride, 0.1% SDS, 1% triton X-100, 2 mM EDTA, protease inhibitor)를 이용하여 얻었다. 단백질 농도는 BCA assay 를 통해 정량 하였다. 단백질 20 μ g 은 12% SDS-PAGE 로 분리하고, nitrocellulose membrane 에 옮겼다. 0.1% (v/v) Tween 20 과 5% (w/v) non-fat milk 단백질이 첨가된 TBST 에 membrane 을 넣고, 1 시간 동안 blocking 하였다. Blocking 한 membrane 은 1 차 항체인 goat anti-human SVCT-2 (Cat. No. SC-9927, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA)와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하였다. Membrane 은 5 분씩 3 번을 0.1% (v/v) Tween 20 이 첨가된 PBS 로 수세 후 2 차

항체인 HRP-conjugated anti-goat IgG (Cat. No. SC-2020, 1:10,000, Santa Cruz Biotechnology, CA)와 함께 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. Membrane 은 5 분씩 3 번을 0.1% (v/v) Tween 20 이 첨가된 TBST 로 수세 후 enzyme-linked chemiluminescence (ECL detection kit, Cat. No. RPN2132, Amersham, GE Healthcare, UK)을 처리하였다.

5. 면역형광염색

사람 T 림프구는 유리 슬라이드 위에 분주 후 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. PBS 로 3 회 수세 후 세포를 4% PFA 로 20 분간 배양하였다. 그 후, PBS 로 수세하고, 10% normal donkey serum 으로 상온에서 1 시간 동안 blocking 한 후 1 차 항체인 goat anti-human SVCT-2 (Cat. No. SC-9927, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA)를 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. PBS 로 3 회 수세 후 2 차 항체인 donkey anti-goat Alexa 555 (1:500)을 상온에서 차광된 상태로 1 시간 동안 배양하였다. PBS 로 3 회 수세 후 핵 염색을 위해 DAPI (1:4000)를 상온에서 차광된 상태로 30 분 동안 배양하였다. PBS 로 3 회 수세 후 mounting solution (Cat. No. S3025, DakoCytomation, USA)을 사용하여 커버슬라이드를 덮고, 상온에서 2 시간 동안 배양 후 콘포칼 현미경으로 확인하였다.

6. 비타민 C 농도 측정

사람 T 림프구 또는 혈중 비타민 C 농도 측정은 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method 를 이용하였다[29]. 세포

용해물을 동량의 10% meta-phosphoric acid (Cat. No. M6288, Sigma, USA)와 10 분간 혼합 후 원심분리로 상층액을 수집하였다. 상층액은 0.027 M cupric sulfate (Cat. No. C-1297, Sigma)와 10 분간 배양 후 0.68 M thiourea 를 첨가하였다. 0.1 M DNPH (Cat. No. D199303, Sigma)를 첨가 후 37℃ 수조에서 3 시간 동안 배양하였다. 그 후, 65% sulfuric acid (Cat. No. 83010-0350, Junsei, Japan)를 첨가하고, 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. 세포 증식 분석

사람 T 림프구는 96-well plate 에 분주하였고, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 10 ng/ml, Cat. No. 524400, Calbiochem, San Diego, CA)와 ionomycin (50 ng/ml, Cat. No. I0634, Sigma) 또는 dynabeads human T-activator CD3/CD28 (Cat. No. 111-31D, Invitrogen)로 자극하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 활성화된 T 림프구는 48 시간 후에 1 µCi/well [Methyl ³H]-thymidine (Cat. No. ART0178, American radiolabeled chemicals)을 처리하고, 16 시간 추가 배양하였다. 방사능은 β-선 측정기로 측정하였으며, 모든 샘플은 quintuplicate 하였다.

8. 세포사멸 분석

사람 T 림프구는 24-well plate 에 분주하였고, PMA (10 ng/ml), ionomycin (50 ng/ml)으로 자극 2 시간 전에 1 mM 비타민 C 를 첨가 후 24 시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. T 림프구(1×10^6)를 Annexin V binding buffer (Cat. No. 556454, BD pharmingen)에

부유한 후 Annexin V (Cat. No. 556420, BD)와 15 분간 배양하였다. Propidium iodide (PI) (Cat. No. 556463, BD)는 분석 직전에 첨가하였다. 분석기기는 FACS calibur (BD Biosciences, San Diego, CA)를 사용하였다.

9. 유세포 분석(FACS)

사람 T 림프구(1×10^6 /tube)를 FACS tube 로 옮겨서 0.05% bovine serum albumin (BSA, Cat. No. 0332, Amresco)이 첨가된 차가운 PBS 로 2 번 수세하고, anti-human CD69-FITC (Cat. No. 555530, BD) 0.2 μ g, anti-human CD25-FITC (Cat. No. 555431, BD) 0.2 μ g 를 얼음에서 30 분 동안 배양하였다. 결합 후 2 번 수세 하여 FACS Calibur 로 분석하였다.

10. 사이토카인 양 측정

사람 T 림프구(5×10^5 /well)는 24-well plate 에 분주하고, 500 μ M 비타민 C 를 첨가 후 2 시간째 PMA (10 ng/ml), ionomycin (50 ng/ml)으로 자극 하였다(Before). 또는, 자극 후 24 시간째 비타민 C 를 첨가하고(After), 36 시간째 각 그룹의 상층액을 걷어서 IL-2 ELISA kit (Cat. No. KHC0021, Invitrogen)를 사용하여 IL-2 양을 측정하였다.

11. 세포 내 ROS 수준 측정

세포 내 존재하는 ROS 수준은 형광 탐색기인 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, MO)를 이용하여 측정하였다[30]. 분리한 사람 T 림프구를 24-well plate 에

well 당 1×10^6 개씩 분주하고, 50 μ M DCFH-DA 를 처리하여 37°C 에서 30 분 동안 배양하였다. PBS 로 수세 후 24-well plate 에 다시 배양하였다. 사람 T 림프구는 비타민 C 첨가 후 20 분째 PMA (10 ng/ml), ionomycin (50 ng/ml)로 자극하고, 2 시간 동안 배양 후 FACS Calibur 로 FITC 파장에서 형광을 측정하였다. 활성화된 시점으로부터 6, 12 시간의 T 림프구 내 ROS 수준 측정은 지정된 시간이 되기 30 분 전에 DCFH-DA 와 배양, PBS 수세, 새 배지에 비타민 C 첨가 후 2 시간 동안 배양한 뒤 측정하였다.

12. NF- κ B 활성 측정

사람 T 림프구(1×10^6 /well)는 24-well plate 에 분주하고, 1 mM 비타민 C 를 첨가 후 30 분 뒤 PMA (10 ng/ml), ionomycin (50 ng/ml)으로 자극 하였다(Before). 또는, 자극 후 5 시간째 비타민 C 를 첨가하고(After), 45 분 뒤 각 그룹의 세포들을 건어서 Nuclear extraction kit (Cat. No. 10009277, Cayman.)를 사용하여 핵만 분리하였다. 분리한 핵 내 NF- κ B 단백질 양은 NF- κ B (p65) transcription factor assay kit (Cat. No. 10007889, Cayman.)를 사용하여 분석하였다.

13. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Mann-Whitney 또는 일원배치분석을 사용했으며, 사후검정은 Turkey HSD 분석을 하였다. 유의성은 P value 가 < 0.05 보다 이하일 때 인정하였다. 모든 분석은 SPSS 통계 프로그램을 이용하였다.

결 과

1. 사람 T 림프구에서 활성화에 따른 SVCT 발현 변화

사람 혈액 내의 비타민 C 는 주로 환원 형태로 존재한다[31]. 환원형 비타민 C 를 사람 T 림프구가 흡수하려면 SVCT 가 존재해야 하는데, 지금까지 사람 T 림프구에 SVCT 의 존재는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 사람 T 림프구에 SVCT 가 존재 하는지 확인하고, 활성화되면 SVCT 발현이 증가하는지 확인해 보았다. 사람 말초 혈액에서 T 림프구를 분리한 후 PMA (100 ng/ml)와 ionomycin (500 ng/ml) 처리로 0, 24, 48 시간 동안 활성화 시킨 후 세포들로부터 mRNA 를 추출하여 SVCT-1, 2 발현 여부를 RT-PCR 을 통해 확인하였다. 그 결과, SVCT-2 만 관측되었으며 활성화 시 mRNA 양이 증가하였고(Fig. 1A, B), western blot 를 통해 단백질 수준에서 확인했을 때도 SVCT-2 의 발현이 증가하였다(Fig. 1C, D).

면역형광염색을 통해서 SVCT-2 발현을 확인해보았다. 그 결과, SVCT-2 는 활성화 시 발현 양이 증가한 것을 확인하였다(Fig. 1E).

앞 실험들로 사람 T 림프구에 SVCT-2 가 존재하는 것을 확인하였는데, SVCT 가 사람 T 림프구에서 기능적으로도 비타민 C 를 흡수 할 수 있는지 알아보았다. T 림프구를 48 시간 동안 활성화 시킨 후 0.5 mM 비타민 C 를 배지에 첨가하였다. 비타민 C 가 산화되어 GLUT 를 통한 비타민 C 흡수를 막기 위해 3 mM

dithiothreitol (DTT)를 사용하였다. SVCT 를 통한 비타민 C 가 흡수되는 것을 막기 위해 sodium free buffer 를 사용하였다. 각각의 조건에서 사람 T 림프구를 2 시간 동안 배양 후 DNPH 방법으로 세포 내 비타민 C 농도를 측정하였다. 그 결과, 환원형 비타민 C 만 존재하는 조건인 DTT+VC 그룹에서는 T 림프구 내 비타민 C 농도가 증가했고, SVCT 를 통한 비타민 C 흡수를 억제하는 조건인 sodium free buffer+DTT+VC 그룹에서는 T 림프구 내 비타민 C 농도가 비타민 C 를 주지 않은 그룹과 비슷하게 측정되었다(Fig. 1F).

2. 비타민 C 가 사람 T 림프구 증식에 미치는 영향

비타민 C 가 사람 T 림프구 활성화에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 먼저 활성화 전 또는 후에 첨가 되었을 때 세포 증식을 확인해 보았다. 사람 T 림프구에 혈중 비타민 C 농도와 유사한 62.5 μ M[40]부터 고농도인 1 mM 를 첨가하고, PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml) 또는 anti-CD3/CD28 자극 2 시간 전에 첨가하거나(Before), 24 시간째 첨가했고(After), 48 시간째 [^{3} H]-thymidine (1 μ Ci/well)을 처리하여 16 시간 동안 추가 배양 후 방사능 측정을 하였다. 그 결과 PMA/ionomycin (Fig. 2A) 또는 anti-CD3/CD28 (Fig. 2B)으로 자극을 주기 전에 비타민 C 를 첨가하면 고농도로 갈수록 세포증식이 억제되었다. 하지만 자극 후 24 시간째 비타민 C 를 첨가했을 때는 고농도에서도 세포증식이 억제되지 않았다.

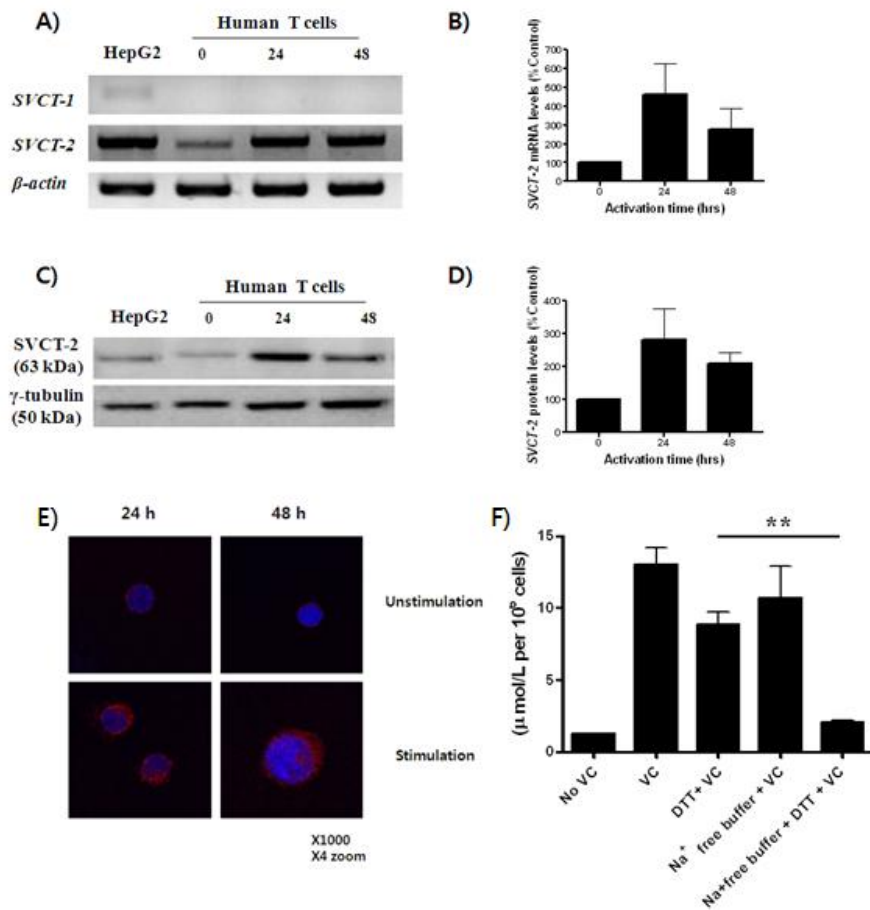


Figure 1. SVCT-2 expression on human T cells.

Human T cells were collected, total RNA was extracted, and cDNA was synthesized. The expression of SVCT-1, -2 was assessed using RT-PCR. The PCR products were separated on 1% agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide (A). Cell lysate was extracted by using RIPA buffer. The expression of SVCT-2 was assessed using western blot. The same amount of cells lysate was separated on 12% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane and visualized by staining with ECL (C). Bands were measured using an analytical software, and reported as the ratio of

SVCT-2 to β -actin or γ -tubulin. HepG2 (hepatoma cell line) was used as a positive control of SVCT-1, 2. Representative three experiments are shown (B, C).

Human T cells were collected after 24, 48 h stimulation or not. Cells were attached on a slide. The expression of SVCT-2 was assessed by immunofluorescence. Data show a confocal microscopy image (E).

Human T cells (4×10^6 cells/group) were collected, and cultured with PMA/ionomycin for 48 h. 0.5 mM vitamin C was treated, VC no treatment (No VC), VC treatment (VC), VC treatment with DTT (DTT+VC), VC treatment in sodium free buffer (Na^+ free buffer+VC), VC treatment with DTT in sodium free buffer (Na^+ free buffer+DTT+VC) for 2 h. Then T cells were collected and measured vitamin C concentration according to DNPH method (F).

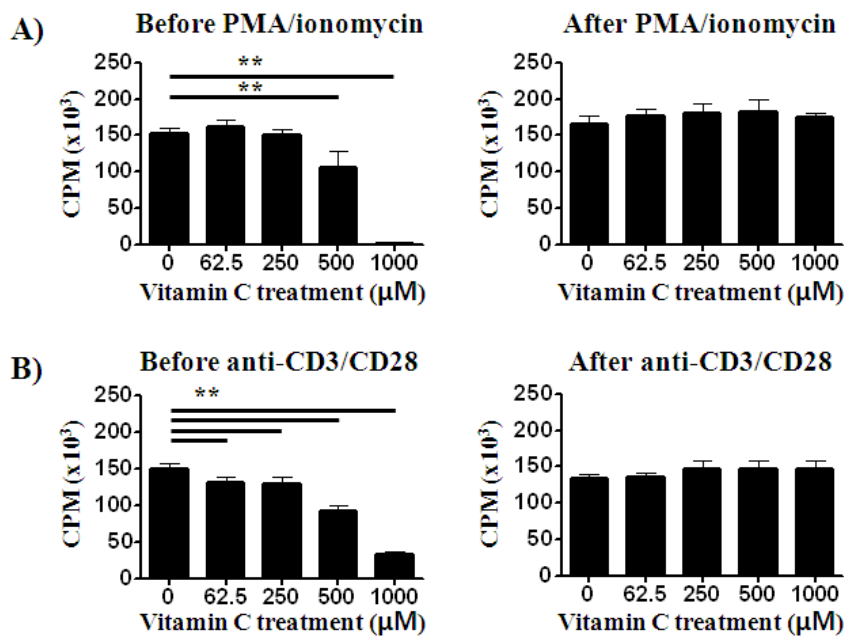


Figure 2. The effects of vitamin C on the proliferation of human T cells.

Human T cells (1×10^5 /well) were plated in 96-well flat bottom and different concentration of vitamin C (62.5 μM , 250 μM , 500 μM , 1 mM) treated 2 h before activation (Before) or 24 h after activation (After). [^3H]-thymidine treated at 48 h, then cultured 16 h. PMA/ionomycin stimulation (A), anti-CD3/CD28 stimulation (B).

3. 자극 전 또는 후에 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구 세포사멸에 미치는 영향

위 실험에서 고농도 비타민 C가 자극 전에 첨가되었을 때만 사람 T 림프구의 세포증식을 억제하였는데, 억제된 세포증식이 고농도 비타민 C가 세포를 죽게 만들어서 나타난 현상인지 확인하기 위해 세포사멸 분석을 하였다. 사람 T 림프구 배양액에 1 mM 비타민 C를 첨가하고 (Before), PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml) 자극을 주거나, 자극 후 24시간째 비타민 C를 첨가하고 (After), 48시간째 Annexin V와 PI 염색 후 유세포분석 하였다. 그 결과 대조군에 비해 Before 그룹의 살아있는 세포 비율은 약 40% 감소하였고, After 그룹은 큰 차이가 없었다. 즉, 활성화되기 전에 1 mM 비타민 C는 대조군에 비해 사람 T 림프구의 세포사멸을 유도하였지만 활성화 후에는 대조군에 비해 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 3).

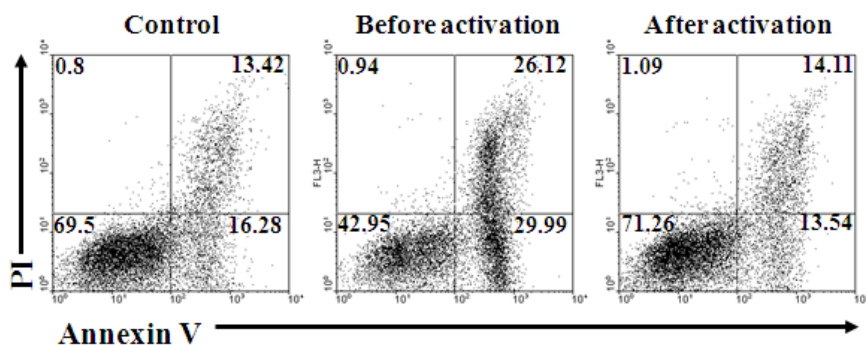


Figure 3. The effects of vitamin C on human T cell apoptosis.

Human T cells (5×10^5 cells/well) were cultured 2 h in a 24-well plate with 1 mM vitamin C before PMA/ionomycin activation (Before) or vitamin C added after activation for 24 h (After). Human T cells were isolated at 48 h and FACS analyses to Annexin V and PI were performed.

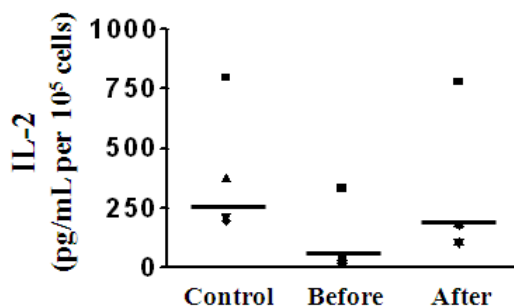


Figure 4. High concentration vitamin C before activation affects human T cell IL-2 production.

Human T cells (5×10^5 cells/well) were cultured in a 24-well plate 2 h with 500 μ M vitamin C before PMA/ionomycin activation (Before). After activation, vitamin C added at 24 h (After). Culture supernatant was collected at 36 h and IL-2 amount were analyzed by using human IL-2 ELISA kit. Each dot of groups indicates different people and total 4 people.

4. 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구의 IL-2 생산에 미치는 영향

위 실험에서 mitogen 자극 전에만 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구의 세포증식을 억제하고, 세포사멸을 유도했는데, T 림프구에서 중요한 세포증식인자인 IL-2 사이토카인 분비가 감소되었기 때문인지 확인해 보았다. 사람 T 림프구는 500 μ M 비타민 C를 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml)으로 자극 전 2시간에 첨가하고 (Before), 자극 후 24시간에 첨가하였다(After). 36시간째 배양액을 모아서 IL-2 ELISA를 수행하였다. 그 결과, Before 그룹이 대조군에 비해 IL-2 양이 약 70% 감소하였고, After은 큰 차이가 없었다(Fig. 4).

5. 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구 활성화에 미치는 영향

위와 같이 자극 전 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구의 정상적인 세포 활성화를 방해하였는데, 세포활성화 마커인 CD69와 CD25 발현도 억제할 수 있는지 확인하였다. 사람 T 림프구는 배양액에 1 mM 비타민 C를 첨가하고, PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml)으로 자극하여 24시간째 anti-CD69와 anti-CD25 염색 후 유세포분석을 하였다. 그 결과, CD69 발현은 대조군과 비슷했지만 CD25 발현은 감소하였다. 그렇다면 활성화 24시간보다 이전 시간에 비타민 C가 첨

가될 경우 어느 시점부터 사람 T 림프구의 활성화에 영향을 주는지 알아보았다. 사람 T 림프구 배양액에 1 mM 비타민 C를 -2 시간, 자극 후 3, 6, 12 시간에 첨가하고, 24시간 뒤에 분석하였다. 그 결과, 자극 후 비타민 C 첨가는 CD69와 CD25 발현 모두 큰 차이는 없었지만, 자극 전 첨가는 CD25 발현이 약 70% 감소되었다(Fig. 5A).

위에서 나타난 현상처럼 자극 후 24시간 이전에 첨가된 고농도 비타민 C가 세포증식에도 큰 영향을 주지 않는지 확인하였다. 사람 T 림프구는 1 mM 비타민 C를 3시간, 6시간, 12시간, 24시간에 첨가하였고, 48시간째 [³H]-thymidine (1 μ Ci/well)을 처리하여 16시간 동안 추가 배양 후 방사능 측정을 하였다. 그 결과, 1 mM 비타민 C를 자극 후 3시간째 첨가한 그룹은 대조군과 비교하여 세포증식이 약간 감소하였지만, 6, 12, 24시간 그룹은 대조군과 비슷하였다. 앞서, 자극 2시간 전에 1 mM 비타민 C를 첨가했을 때 대조군에 비해 세포증식이 상당히 억제된(Fig. 2) 반면에, 자극 3시간 후 첨가는 자극 전 첨가보다는 세포증식을 억제하지 않았다(Fig. 5B).

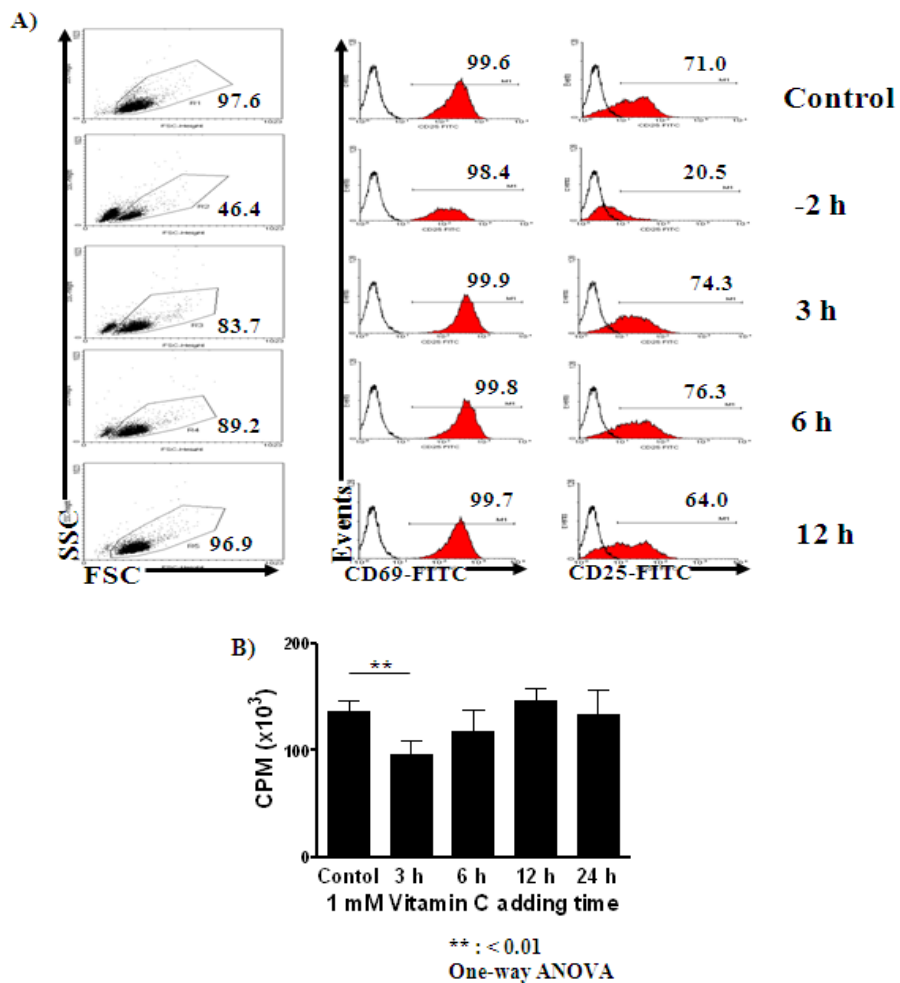


Figure 5. The effects of vitamin C on the activation marker of human T cells.

Human T cells (5×10^5 cells/well) were cultured for 2 h in a 24-well plate with 1 mM vitamin C before PMA/ionomycin activation and 3, 6, 12 h after activation (A). After 24 h, human T cells were collected and cell-surface expressions of CD69, CD25 were analyzed by flow cytometry.

Human T cells (1×10^5 cells/well) were cultured in a 96-well plate with PMA/ionomycin. 1 mM vitamin C treated at 3, 6, 12, 24 h. [^{3} H]-thymidine treated at 48 h, and then cultured 16 h (B).

6. 사람 T 림프구의 고농도 비타민 C 흡수 확인

위에서 사람 T 림프구 활성화 전에 첨가된 고농도 비타민 C는 세포증식과 생존율, IL-2 분비, CD25 발현을 감소하였고, 활성화 3시간 이후에는 CD25 발현과 세포증식에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 그렇다면 고농도 비타민 C가 비활성 또는 활성화 후 3시간 내에 흡수되어 나타난 현상인지 확인하였다. 비활성 사람 T 림프구는 1 mM 비타민 C 첨가 후 2, 24 시간에 세포 내 비타민 C 농도를 DNPH 방법으로 확인하였다. 그 결과, 비활성 T 림프구 내 비타민 C 농도는 24시간까지 증가하지 않았다(Fig. 6A). 그렇다면 mitogen 자극으로 사람 T 림프구가 활성화됨에 따라 빠른 시간 내에 비타민 C 흡수가 증가 할 수 있는지 확인하였다. 사람 T 림프구는 1 mM 비타민 C를 첨가 후 30분 뒤에 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml)으로 자극 하고, 2시간 뒤 세포 내 비타민 C 농도를 측정하였다. 그 결과, 사람 T 림프구는 활성화 후 2시간 만에 산화형 및 환원형 비타민 C의 흡수가 증가 되었다(Fig. 6B).

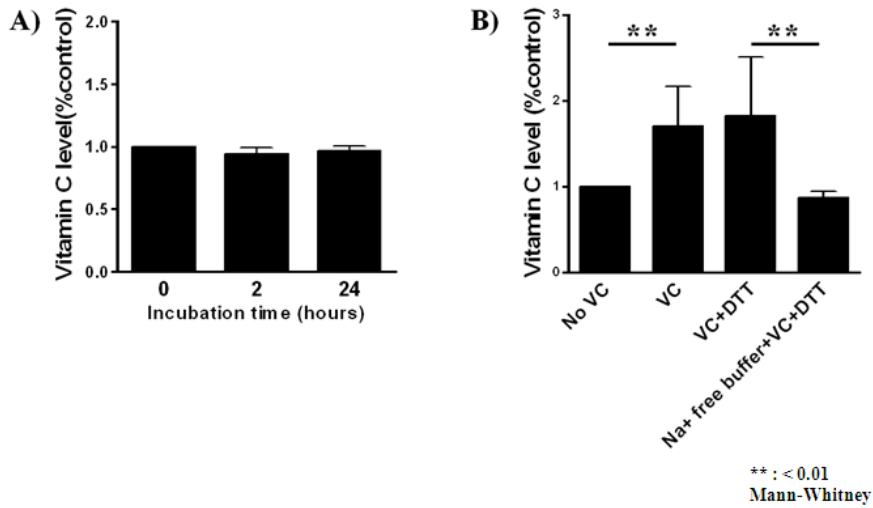


Figure 6. Vitamin C concentration measurement in resting or activated human T cells.

Human T cells were seeded at a density of 1×10^6 /well in 24-well plates. The group of 0 h were collected directly after isolation of human T cells. After 1 mM vitamin C treatment, cells were collected at 2, 24 hours and measured vitamin C concentration according to DNPH method. Results are representative of two experiments (A). VC no treatment (No VC), VC treatment (VC), VC treatment with 3 mM DTT (DTT+VC), VC treatment with 3 mM DTT in sodium free buffer (Na⁺-free buffer+DTT+VC) for 30 min, and treated PMA (10 ng/ml)/ionomycin (50 ng/ml). After 2 hours, we collected human T cells and measured vitamin C concentration. Results are representative of six experiments (B).

7. 사람 T 림프구에 흡수된 고농도의 비타민 C가 세포 내 ROS에 미치는 영향

위 실험을 통해 사람 T 림프구는 활성화 후 2시간 만에 비타민 C를 GLUT 또는 SVCT를 통해서 세포 내로 흡수되는 것을 확인하였다. 그렇다면 세포 내로 흡수된 비타민 C가 항산화제로서 작용하여 mitogen 자극 초기에 발생한 ROS [32]를 억제 할 수 있는지 확인하였다. 사람 T 림프구(1×10^6 /well)를 24-well plate에 분주하고, $50 \mu\text{M}$ DCFH-DA를 처리하여 37°C 에서 30분 동안 배양 후 PBS로 수세하였다. 다시 24-well에 분주하고, 비타민 C 첨가 후 20분 동안 배양 한 후에 PMA (10 ng/ml)/ionomycin (50 ng/ml)으로 자극하여 2시간 추가 배양하였다. 사람 T 림프구 내 ROS 수준은 FACS calibur로 FITC 파장에서 DCF 형광 값으로 측정하였다. 자극 후 6, 12시간 그룹의 ROS 측정은 해당 시간의 30분전에 DCFH-DA를 넣고, PBS 수세 후 배양액에 비타민 C를 첨가하고, 2시간 배양한 뒤 분석하였다. 그 결과, 비활성과 활성화 그룹 모두에서 비타민 C는 ROS 수준을 비슷하게 감소시켰다. 즉, 첨가 시점에 상관없이 사람 T 림프구로 흡수된 비타민 C는 항산화제로서 ROS 수준을 감소시킨다(Fig. 7).

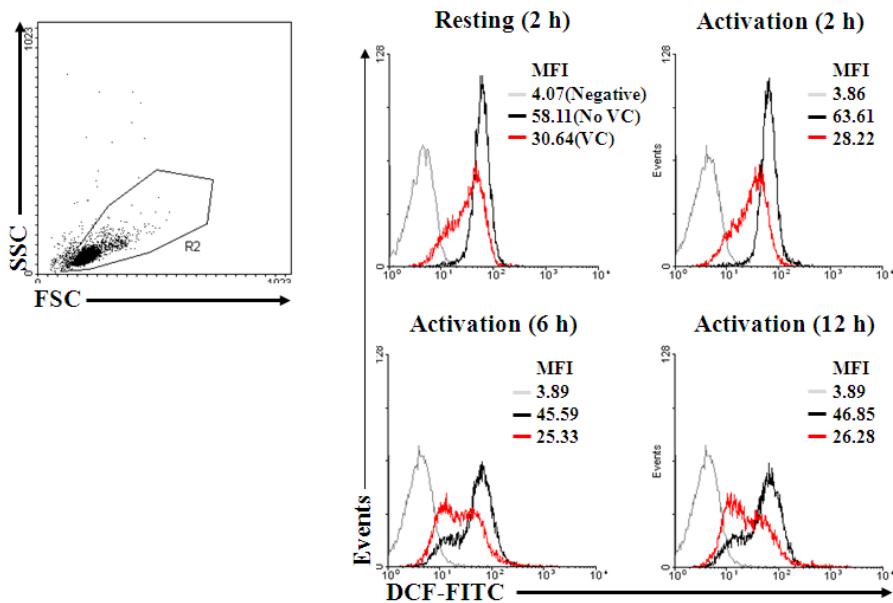


Figure 7. Effects of vitamin C on intracellular ROS levels by resting or activated human T cells.

Human T cells (1×10^6 cells/well) were cultured 30 min in a 24-well plate with 50 μ M DCFH-DA. Vitamin C was pre-treated. After 20 min, T cells were activated by PMA/ionomycin and then fluorescence was detected at indicated times. DCFH-DA was treated after stimulation and vitamin C was treated for 2 h.

8. 사람 T 림프구에 흡수된 고농도의 비타민 C가 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

위 실험을 통해 활성화 전과 후 첨가된 고농도 비타민 C는 사람 T 림프구 내 ROS를 억제하였다. 그렇다면 자극 전과 후 세포 내로 흡수된 비타민 C가 ROS를 억제하여 T 림프구 활성화에 중요한 전사인자인 NF- κ B의 활성화 또한 억제할 수 있는지 확인하였다. 사람 T 림프구 배양액에 1 mM 비타민 C를 첨가하고, PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml) 자극 후 45분 뒤 세포를 건어서 핵을 분리하였고, 핵 내 NF- κ B 양을 측정하였다(Fig. 8A). 자극 후 5시간째 비타민 C를 첨가하고, 45분 뒤 세포를 건어서 핵을 분리하였고, 핵 내 NF- κ B 양을 측정하였다(Fig. 8B). 그 결과 활성화 전과 후에 첨가된 1 mM 비타민 C는 모두 NF- κ B 활성을 감소시켰다.

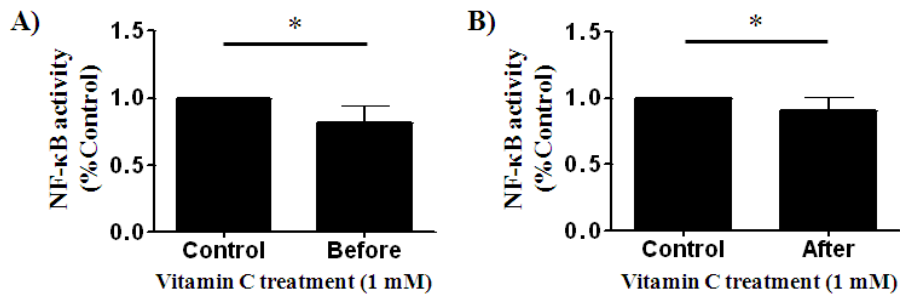


Figure 8. Effects of vitamin C on NF-κB activity by human T cells.

Human T cells (1×10^6 cells/well) were cultured in a 24-well plate 20 min with 1 mM vitamin C before PMA/ionomycin activation (A). After activation, vitamin C added at 5 h (B). After 45 min, cells were collected and isolated nucleus by using nuclear extraction kit. NF-κB levels were analyzed by using NF-κB (p65) transcription factor assay kit. Results are representative of three experiments (A), six experiments (B).

9. 사람 T 림프구에 흡수된 고농도의 비타민 C가 c-Jun 활성화에 미치는 영향

위 실험을 통해 활성화 전과 후 첨가된 고농도 비타민 C는 사람 T 림프구 내 ROS를 억제하였다. 그렇다면 자극 전과 후 세포 내로 흡수된 비타민 C가 ROS를 억제하여 T 림프구 활성화에 중요한 전사인자인 c-Jun의 활성을 억제할 수 있는지 확인하였다. 사람 T 림프구 배양액에 1 mM 비타민 C를 첨가하고(Before), PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (50 ng/ml) 자극 후 6시간 뒤 비타민 C를 첨가하고(After), 24시간째 세포를 걷어서 p-c-Jun 단백질 양을 western blot으로 측정하였다. 그 결과 활성화 전과 후에 첨가된 1 mM 비타민 C는 c-Jun 활성화에 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 9).

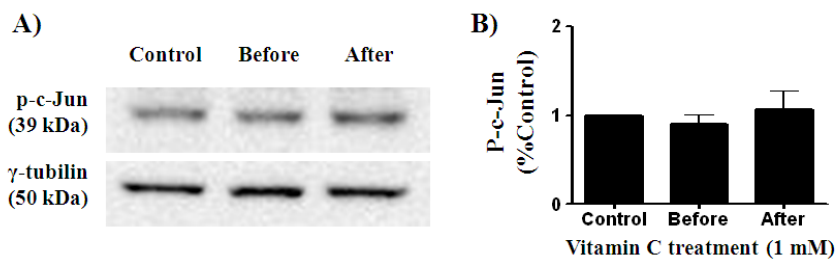


Figure 9. Effects of vitamin C on p-c-Jun by human T cells.

Human T cells (1×10^6 cells/well) were cultured in a 24-well plate 20 min with 1 mM vitamin C before PMA/ionomycin activation. After activation, vitamin C added at 6 h. After 24 hour, cell lysate was extracted by using RIPA buffer. The expression of phosphorylated c-Jun was assessed using western blot (A). The same amount of cells lysate was separated on 12% polyacrylamide gel and transfered to nitrocellulose membrane and visualized by staining with ECL. Bands were measured using an analytical software, and reported as the ratio of p-c-Jun to γ -tubulin. Results are representative of three experiments (B).

고 찰

본 연구의 목적은 항산화제인 비타민 C가 사람 T 림프구에 자극 전 또는 후에 첨가되었을 때 세포활성에 서로 다른 영향을 주는지 확인하고, 만약 그렇다면, 그 기전은 무엇인지 알아보는 것이다.

실험 결과 활성화 전에 고농도 비타민 C를 첨가하였을 때는 세포 증식, 생존율, 사이토카인 분비, CD25 발현이 저해되지만, 활성화 후 첨가했을 때의 영향은 첨가 시점이 활성화 이후일수록 점차 감소하여 6시간부터는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 고농도 비타민 C를 사람 T 림프구 자극 전에 첨가하면 세포증식, 생존율, IL-2 분비를 억제한다는 보고들[26-28]과 상응한다. 또한 활성화 후 비타민 C 첨가 결과는 lipo 억제제, hydroxyl radical 억제제, oxygen radical 억제제 등의 항산화제를 활성화 후 첨가하였을 때 별 다른 영향을 미치지 않았다는 보고[16]와 유사하다.

비타민 C를 추가로 섭취한 사람에서 얻은 T 림프구는 in vitro에서 mitogen에 대한 세포증식[21, 22]이 증가하였고, 비타민 C를 투여한 마우스에서 얻은 T 림프구 또한 세포증식 및 IL-2 분비가 증가[23]한다는 보고들이 있는데, 이는 추가로 섭취한 비타민 C가 T 림프구로 흡수되어 나타난 영향이라고 생각된다. 이와 관련하여 사람 T 림프구 세포주인 H9 T cell line[38]과 Jurkat cell line[39]에서 비타민 C를 흡수 할 수 있다는 보고가 있지만, 사람 T 림프구의 비타민 C 흡수 기전은 명확하지 않다. 마우스 T 림프구는 GLUT-1, 3를 통한 산화형 비타민 C 흡수를 할 수 있다는 보고[37]를 통해 사람 T 림프구도 산

화형 비타민 C를 흡수 할 것으로 예상할 수 있다. 또한, 사람 T 림프구에는 SVCT-2가 존재한다는 언급은 있지만, 실험적 근거가 제시되지 않아서 그 존재를 확실히 뒷받침하지 못 하였다[9]. 혈액 내 비타민 C는 주로 환원형으로 존재하는데[31], 이를 흡수하려면 사람 T 림프구에 SVCT가 존재해야 한다. 따라서 본 실험에서는 사람 T 림프구에 SVCT 존재 여부를 밝히고, 비타민 C를 흡수 할 수 있는지 확인하였다. 그 결과 사람 T 림프구에 SVCT-2가 존재하며, 활성화 시 발현이 증가하고, 이를 통해 환원형 비타민 C를 흡수 할 수 있었다(Fig. 1). 즉, 인체 내에서 T 림프구는 혈액에 존재하는 비타민 C를 SVCT-2를 통해 흡수 할 것으로 생각된다.

몇몇 항산화제들이 사람 T 림프구 활성화 전과 후에 처리되었을 때 미치는 영향이 서로 다르다[16, 17]. 비타민 C도 항산화제이기 때문에 유사한 경향을 보일 것으로 예상된다. 이와 관련하여 사람 T 림프구 활성화 전에 비타민 C가 첨가되었을 때 세포증식[27, 28]과 IL-2 생산[26]이 감소된다는 보고가 있다. 하지만 활성화 후 첨가된 비타민 C가 미치는 영향에 대해서는 알려져 있지 않다. 따라서 활성화 전과 후에 첨가된 비타민 C가 사람 T 림프구에 미치는 영향을 확인하였다. 다른 항산화제와 유사한 경향을 보일 것이라는 예상대로, 활성화 전과 후의 비타민 C 첨가는 세포증식에 미치는 영향이 달랐다. 비타민 C가 500 μ M과 1 mM 농도로 활성화 전에 첨가되면 세포증식을 각각 50%, 80% 억제하지만 활성화 후에 첨가되면 이러한 현상은 나타나지 않았다(Fig. 2). 이전 보고와 비교해보면, 활성화 전 1 mM 비타민 C 첨가가 PBMC의 세포증식을 50% 억제하였다는 보고[28]와 유사한 결과이다.

고농도 비타민 C는 몇몇 세포에서 세포사멸을 유발한다는 것이 보고된 바 있다. 10 mM 비타민 C가 B16F10 악성 흑색종 세포에서 세포사멸을 유도하고[41], 2 mM 비타민 C가 사람 대장암세포에서 세포사멸을 유도하고[42], 자극 전 250 μ M 비타민 C 첨가는 사람 T 림프구[27]와 마우스 T 림프구[37] 생존율을 감소 시켰다. 반면에 1.5 mM 비타민 C가 첨가된 활성화 마우스 T 림프구는 세포사멸이 억제되었다는 보고가 있다[24]. 이상의 보고를 보았을 때, 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구 세포사멸을 유도하였고, 활성화 후에는 세포사멸을 유도하지 않을 것이라고 예상하여 확인하였다. 그 결과 예상대로 고농도 비타민 C는 T 림프구 활성화 전에 첨가되었을 때만 대조군에 비해 세포사멸이 증가하였고, 활성화 후 24시간에 첨가하였을 때는 큰 영향이 없었다(Fig. 3). 위 결과를 통하여 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C로 증가된 사람 T 림프구 세포사멸이 세포증식 감소에도 영향을 주었을 것으로 생각된다. 한편, 고농도 비타민 C 첨가에 의한 T 림프구의 생존율 감소 정도는 보고마다 조금씩 다르다. mitogen 자극 전 250 μ M 비타민 C가 사람 T 림프구의 생존율을 90% 감소 시켰다는 보고[27]와 마우스 T 림프구의 생존율이 250 μ M 비타민 C 농도에서 20%, 500 μ M에서는 50% 감소하였다는 보고[37]가 있다. 본 실험결과에서 1 mM일 때 사람 T 림프구 생존율이 약 40% 감소하여 비타민 C 농도와 생존율 감소 정도가 이전 보고들과 다소 차이 나지만, 250 μ M 이상의 비타민 C가 T 림프구 자극 전에 첨가되면 생존율이 감소한다는 점은 유사하다. 또한, 앞에서 언급한 보고들 중 *in vivo*에서 포도상구균 장내독소 B (SEB, superantigen)로 48시간 동안 자극한 마우스 T 림프구를 *in vitro*

에서 추가로 24시간 동안 배양할 때 1.5 mM 비타민 C 첨가는 T 림프구 세포사멸을 억제한다는 보고가 있다[24]. 위 보고와 달리 본 실험 결과에서 활성화 후 24시간에 첨가된 비타민 C로는 사람 T 림프구의 세포사멸이 억제되지는 않았는데, 자극원, 자극 환경 등 실험 조건도 다르고, T 림프구 활성화 후 세포사멸을 확인한 시간이 위 보고보다 24시간 앞선 48시간이라 활성화로 유도된 세포사멸이 상대적으로 적게 일어나 고농도 비타민 C가 큰 영향을 미치지 않았을 가능성을 생각해 볼 수 있다.

세포사멸 외에도 세포증식 감소에 영향을 주는 요인으로 IL-2가 있다. T 림프구 사이토카인 IL-2는 항원 비특이적 세포증식인자로서 세포주기 진행과 클론확장을 시키는 중요한 단백질이다[13]. 비타민 C가 T 림프구의 IL-2 분비에 영향을 준다는 보고들이 있다. PBMC를 PMA와 ionomycin으로 활성화 전 20 mM 비타민 C를 첨가하면 CD3⁺ IL-2⁺인 세포들이 감소하고[26], PBMC를 PMA와 anti-CD3 항체로 자극 전 1 mM 비타민 C를 첨가하면 IL-2 분비가 감소한다[28]. 하지만 활성화 후 비타민 C가 첨가되면 IL-2 분비에 영향을 주는지에 대해서는 알려지지 않았다. T 림프구 활성화 후 처리한 항산화제는 세포증식에 영향을 주지 않고[16, 17], 고농도 비타민 C가 세포사멸을 유도하지 않는다는 보고[24]가 있다. 위 보고들과 활성화 전에만 첨가된 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구 세포사멸, 세포증식을 감소시킨 결과들(Fig. 2, 3)을 통해, 활성화 후 첨가된 고농도 비타민 C는 IL-2 분비에도 큰 영향을 주지 않을 것으로 예상하여 확인해보았다. 그 결과, 예상대로 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C는 사람 T 림프구의 IL-2 분비를 대조군에 비해 70% 정도 감소 시켰고, 활성화

후 첨가한 경우에는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). T 림프구에서 IL-2 부족 시 세포증식 감소와 세포사멸이 유도된다는 많은 보고들이 있다. 세포독성 T 림프구 세포주(CTLL-2)에서 IL-2 결핍 시 세포증식이 감소하였다는 보고가 있다[43]. IL-2 수용체 돌연변이로 IL-2와 반응 할 수 없는 마우스 T 림프구는 TCR과 보조자극분자 자극에 대한 세포증식이 대조군에 비해 억제되었고, 세포독성 또는 IFN- γ 를 분비하는 작용세포(effector cell) 분화도 억제되었다는 보고도 있다[46]. 또한 활성화된 CD4⁺ T 림프구에서도 IL-2 결핍은 성장억제와 세포사멸을 유도한다는 보고가 있다[47]. 위 보고들에 근거하여, 활성화 전 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구 IL-2 분비를 억제하여 세포증식 감소와 세포사멸 유도에 영향을 주었다고 생각된다.

IL-2 수용체(CD25) 발현은 IL-2 의존적 세포증식에 중요하다[17]. 활성화 전 처리된 몇몇 항산화제는 마우스 T 림프구 CD25 발현을 억제한다는 보고가 있고[16-18], lipo 억제제는 자극 후 PKC 의존적 세포 내 자유 칼슘 농도 증가를 억제하여 CD25 발현을 억제한다는 보고가 있다[16]. 하지만 활성화 후 처리된 항산화제가 CD25 발현에 미치는 영향에 대해서는 알려지지 않았다. 항산화제가 마우스 T 림프구 활성화 후 처리되면 세포증식이나 IL-2 분비에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보아 CD25 발현에도 큰 영향이 없을 가능성이 있다고 생각되었다. 한편, CD69도 CD25와 같이 T 림프구 활성화 후 18 ~ 24 시간에 세포 표면에서 발현이 증가하는 활성화 마커로 알려져 있다[44]. CD69의 발현은 T 림프구 세포증식에 중요한 Jak3/Stat5 pathway를 활성화시킬 수 있는데[51], 지금까지 항산화제나 비타민 C가 사람 T 림프구의 CD69 발현에 미치는 영향에 대해서는 알려지지 않

았다. 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C가 세포활성을 저해하였다면 CD69와 CD25 발현을 저해하였을 가능성이 있다고 생각되었다. 따라서 사람 T 림프구 활성화 전 또는 후 첨가된 고농도 비타민 C에 따른 CD69와 CD25 발현을 확인하였다. 그 결과, 활성화 전 고농도 비타민 C가 첨가된 사람 T 림프구의 CD69 발현은 대조군에 비해 큰 차이 없었지만, CD25 발현은 감소하였다(Fig. 5A). 활성화 후 24시간에 첨가된 고농도 비타민 C는 사람 T 림프구 세포증식을 억제하지 않았는데(Fig. 2), 항산화제가 활성화 후 2시간 이내에 처리되면 세포증식을 억제한다는 보고가 있다[16]. 그렇다면 사람 T 림프구 활성화 후 고농도 비타민 C가 CD25 발현 및 세포증식에 영향을 주는 시점이 있을 것이라 예상하고, 이를 확인하였다. 그 결과, 사람 T 림프구 활성화 후 3시간에 고농도 비타민 C 첨가는 대조군과 큰 차이가 없는 CD25 발현을 보였지만, 세포증식은 유의한 감소를 보였고, 6시간부터는 CD25 발현과 세포증식 모두에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5B, C). 활성화 3시간 이후부터는 고농도 비타민 C가 CD25 발현을 억제하지 않는 것으로 보아, 활성화 후 3시간에 고농도 비타민 C 첨가로 세포증식이 억제된 것은 CD25 발현과 관련이 적을 것으로 생각된다. 기존의 보고에 의하면, 활성화 24시간 이후 처리된 항산화제는 T 림프구 세포증식에 큰 영향을 주지 않았는데 [16, 17], 항산화제가 IL-2 수용체 발현 후 처리되었기 때문이라는 보고가 있다[17]. 고농도 비타민 C 첨가는 사람 T 림프구 활성화 후 CD25가 발현하기에는 이른 시간인 6시간에 세포증식이 대조군과 큰 차이를 보이지 않았는데, 활성화 후 6시간 이내에 발생하는 ROS가 세포증식에 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있다.

앞에서 활성화 후 3시간에도 첨가된 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구 세포증식을 감소 시켰는데(Fig. 5C), 활성화 후 3시간 내 첨가된 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구로 흡수되어 나타난 현상으로 생각된다. 기본 보고에 의하면, 비활성 마우스 T 림프구는 첨가된 비타민 C 흡수가 24시간까지 증가되지 않았지만, 활성화 후 12시간에는 산화형 비타민 C 흡수가 대조군에 비해 약 2배 증가하였다는 보고가 있다[37]. 사람 T 림프구도 활성화를 통해 비타민 C 흡수가 증가될 것으로 예상하고, 3시간 내로 흡수될 수 있는지 확인하였다. 그 결과 비활성일 때 사람 T 림프구에 고농도 비타민 C 첨가 후 24시간까지 흡수가 증가되지 않았지만, 활성화 직후 2시간 만에 산화형, 환원형 비타민 C 흡수 모두가 약 2배 증가하였다(Fig. 6). UVB를 조사한 사람 각질세포주(HaCaT cell line)에서 비타민 C 흡수가 2시간 만에 증가하였는데, 이때 세포질에 있던 SVCT-1이 세포막으로 이동하여 비타민 C 흡수에 기여했다는 보고가 있다[45]. 사람 T 림프구 활성화 시 첨가된 환원형 비타민 C의 세포 내 흡수가 2시간 만에 증가된 결과와 위 보고를 비교해 보면, 활성화 직후 사람 T 림프구도 세포질에 있던 SVCT-2가 세포막으로 이동하여 나타난 현상이었을 가능성을 제시한다. 이상의 보고들을 통해 마우스[37]와 사람 T 림프구에서 활성화 자체가 세포 내 비타민 C 흡수를 촉진한다고 생각된다. 따라서 활성화 전에 고농도 비타민 C가 첨가되어도 사람 T 림프구에 거의 흡수되지 않다가 활성화 직후 흡수된 고농도 비타민 C가 세포 활성화에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

이렇게 사람 T 림프구 활성화 직후 흡수된 비타민 C가 항산화제로서 세포 내 ROS를 제거 할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 사람

T 림프구 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C는 활성화 후 생성된 ROS를 제거하였다(Fig. 7). 한편, 비활성 사람 T 림프구에서도 첨가된 고농도 비타민 C는 세포 내 ROS를 제거하였다. 위에서 비활성 사람 T 림프구는 첨가된 고농도 비타민 C를 24시간까지 거의 흡수하지 못 하였는데(Fig. 6), 고농도 비타민 C 첨가로 2시간 만에 세포 내 ROS가 억제된 것은 다소 상충하는 결과이다. 비활성 세포들은 생존을 위해 GLUT를 통해 포도당을 흡수하는데[3], 이때 GLUT를 통해 산화형 비타민 C가 흡수되었을 것이다. 만약 그렇다면, 비활성 사람 T 림프구에서 세포 내 추가로 흡수된 비타민 C가 검출되기 어려운 정도로 미미하더라도 세포 내 ROS를 제거할 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 결과들로 종합하여 볼 때, 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C에 의해서 사람 T 림프구 활성이 저해되는 것을 알 수 있었다. T 림프구 활성화 초기에 발생하는 ROS는 세포 활성화와 관련된 NF- κ B, AP-1 등 전사인자들의 발현을 증가시킨다[15]. 반대로 고농도 비타민 C가 몇몇 세포들에서 NF- κ B 활성을 저해한다는 보고들이 있다. 내피세포주에서 TNF- α 자극 전 5 mM 비타민 C가 IKK를 억제하여 NF- κ B 활성화를 막는다는 보고가 있다[35]. 또한 HeLa 세포에서 TNF 자극 전 4 mM 비타민 C가 IKK β 와 IKK α 효소 활동을 억제하여 NF- κ B 신호전달을 방해하고[36], 사람 신경모세포종 세포주에서도 TNF 자극 전 10 mM 비타민 C가 I- κ B α 의 분해와 NF- κ B의 활성화를 막는다는 보고도 있다[37]. 위 보고들을 통해 사람 T 림프구에서도 활성화 초기에 발생한 ROS를 고농도 비타민 C가 제거하여 정상적인 NF- κ B 활성을 방해하여, T 림프구 활성이 저해되었을 가능

성을 제시한다. 따라서 활성화 전과 후에 첨가된 고농도 비타민 C에 의해 사람 T 림프구의 NF- κ B 활성이 억제 될 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 활성화 전과 후 모두 첨가된 고농도 비타민 C는 사람 T 림프구 NF- κ B 활성을 감소시켰다(Fig. 8). 다시 말해, NF- κ B는 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C로 사람 T 림프구 활성이 저해된 현상들과 관련이 적은 것으로 생각된다.

NF- κ B처럼 T 림프구 성장과 분화과정에 중요한 전사인자로 AP-1이 있다[52]. AP-1은 c-Fos와 c-Jun로 이형 이합체를 이루고, 활성화된 AP-1은 IL-2 프로모터에 결합하여 IL-2 전사를 유도한다[57]. AP-1의 발현은 T 림프구 자극뿐만 아니라 ROS에 의해 증가한다는 보고들이 있다. Jurkat cell에 mitogen 자극 없이 200 μ M H₂O₂를 처리하면 c-Jun과 c-Fos의 발현이 증가한다는 보고[53]와 murine T cell line ESb에도 200 μ M H₂O₂를 처리하면 c-Jun의 발현이 증가한다는 보고가 있다[54]. 반대로, 항산화제가 몇몇 세포들에서 c-Jun 발현과 활성을 억제한다는 보고들이 있다. HeLa cell에서 UV 또는 casticin으로 유도된 ROS로 증가된 c-Jun 발현[55]과 활성[58]을 NAC가 억제하였다는 보고와 Human ML-2 leukemic cells과 normal human DET-551 fibroblasts에서 H₂O₂로 유도된 c-Jun mRNA 발현을 NAC가 억제한다는 보고가 있다[56]. 위 보고들을 통해 항산화제인 비타민 C가 사람 T 림프구에서도 활성화 초기에 발생한 ROS를 제거하여 c-Jun의 활성을 방해하여, T 림프구 활성이 저해될 가능성을 생각해 볼 수 있다. 따라서 활성화 전과 후에 첨가된 고농도 비타민 C에 의해 사람 T 림프구의 c-Jun 활성이 억제 될 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 활성화 전과 후 첨가된 고농도 비타민 C는 사람 T 림프구 c-Jun 활성화에 큰 영향

을 미치지 않았다(Fig. 9).

향후 연구에서는 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C에 의해 사람 T 림프구의 활성이 억제되는 다른 요인에 대해서 알아보아야 할 것이다.

장기이식 시 수여자의 면역세포가 공여자의 조직에 대한 면역거부반응을 막기 위해 다양한 면역 억제제를 사용한다[48, 50]. 몇몇 면역 억제제는 T 림프구의 활성을 막기 위해 IL-2 생산을 억제하고, 세포증식을 저해한다. 본 실험 결과에서 활성화 전 첨가된 고농도 비타민 C가 사람 T 림프구의 IL-2 분비와 CD25 발현을 억제하였고, 세포증식을 감소시켰다. 이러한 결과를 통해 고농도 비타민 C를 장기이식 전 투여하면 면역거부반응을 막는 연구에 도움이 될 수 있다. 또한, 사람 T 림프구 활성화전 첨가된 고농도 비타민 C의 면역 억제 효과는 자가면역질환 치료 연구에 도움이 될 수 있다. 자가면역질환은 흉선에서 T 림프구에 잘못된 정보를 주어 자신의 신체의 특정 조직이나 기관을 공격하여 유도되는 질병으로 면역반응을 억제하는 쪽으로 치료 연구가 진행된다[48, 49]. 따라서 자가면역질환 발병 초기에 고농도 비타민 C로 추가적인 증상 악화를 막는 연구에 도움이 될 수 있다.

즉, 본 연구 결과는 비타민 C를 이용하여 장기이식 시 생기는 면역거부반응을 막는 연구와 자가면역질환 치료 연구에도 이용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

참고문헌

- (1) Nishikimi, M., R. Fukuyama, S. Minoshima, N. Shimizu, and K. Yagi. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L -gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L -ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:16895–16898.
- (2) Stevenson NR, Brush MK. Existence and characteristics of Na^+ -dependent active transport of ascorbic acid in guinea pig. *Am. J. Clin. Nutr.* 1969. 22:318–326.
- (3) Vera J. C., Rivas C. I., Fischbarg, J., and Golde, D. W. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *nature.* 1993. 364:79-82.
- (4) Faaland CA, Race JE, Ricken G, Warner FJ, Williams WJ, Holtzman EJ. Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacteria and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1442:353-360.
- (5) Daruwala R, Song J, Koh WS, Rumsey SC, Levine M. Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT-1 and hSVCT-2. *FEBS Lett.* 1999. 460:480-484.

(6) Rajan DP, Huang W, Dutta B, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V, Prasad PD. Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 262, pp. 762-768.

(7) Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen X, wang Y, Brubaker RF, Hediger MA. A family of mammalian Na^+ -dependent L -ascorbic acid transports. *Nature.* 1999. 399:70-75.

(8) Wang H, Dutta B, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V, Prasad PD. Human Na^+ -dependent L -ascorbic acid transport 1 (hSVCT1): Primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1461:1-9.

(9) Wang Y, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. Human vitamin C (L -ascorbic acid) transport SVCT1. *Biochim Biophys Res Comm.* 2000. 267:488-494.

(10) Wan YY, and RA Flavell. How diverse-CD4 effector T cells and their functions. *Journal of Molecular and Cell biology.* 2009. 1:20-36.

(11) Wong P, and EG Pamer. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual Review of Immunology.* 2003. 21:29-70.

(12) Littman DR, and AY Rudensky. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 2010. 140:845-858.

- (13) Malek, T. R. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. 26: 453–479.
- (14) Nathan, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Investig.* 2003. 111:769–778.
- (15) Marcin M. Kaminski, Peter H. Krammer, Karsten Gülow. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Control T Cell Activation by Regulating IL-2 and IL-4 Expression: Mechanism of Ciprofloxacin-Mediated Immunosuppression. *J. Immunol.* 2010. 184:4827-4841.
- (16) J. DORNAND & M. GERBER. Inhibition of murine T-cell responses by anti-oxidants: the targets of lipo-oxygenase pathway inhibitors. *Immunology.* 1989. 68:384-391.
- (17) Chaudhri, G., Clark, I. A., Hunt, N. H., Cowden, W. B., and Ceredig, R., .I. Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *Immunol.* 1986. 137:2646.
- (18) Geeta C. Antioxidants Inhibit Proliferation and Cell Surface Expression of Receptors for Interleukin-2 and Transferrin in T Lymphocytes Stimulated with Phorbol Myristate Acetate and Ionomycin. *Cellular Immunology.* 1988. 115:204-213.
- (19) Frei, B., L. England, B. N. Ames. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1989. 86:6377–6381.

- (20) A. Bendich, L.J. Machlin, and O. Scandurra. The antioxidant role of vitamin C. *Free radical biology & medicine*. 1986. Vol. 2;419-444.
- (21) Kennes, B., Dumont, I., Brohee, D., Hubert, C., Neve, P., Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. *Gerontology*. 1983. 29:30–310.
- (22) Anderson, R., Oosthuizen, R., Maritz, R., Theron, A., Van Rensburg, A.J. The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980. 33:71–76.
- (23) Noh, K., Lim, H., Moon, S.K., Kang, J.S., Lee, W.J. Lee, D.S., Hwang, Y.I. Mega-dose vitamin C modulates T cell functions in Balb/c mice only when administered during T cell activation. *Immunol. Lett.* 2005. 98:63–72.
- (24) Campbell, J.D., Cole, M., Bundittravorn, B., Vella, A.T. Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis. *Cell Immunol.* 1999. 194:1–5.
- (25) Siegel BV, Morton JI. Vitamin C and the immune response. *Experientia*. 1977. Mar; 15;33(3):393-5.
- (26) Christoph Härtel, Tobias Strunk, Peter Bucsky, Christian Schultz. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine*. 2004. 27:101–106.

(27) Eylar, E., Baez, I., Navas, J., Mercado, C. Sustained levels of ascorbic acid are toxic and immunosuppressive for human T cells. *Proc. R. Health Sci. J.* 1996. 15: 21–26.

(28) Sangeeta Tatla, Vanessa Woodhead, John C. Foreman, and Benjamin M. Chain. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *PII.* 1998. S0891-5849(98)00133-6.

(29) Joseph H. Roe, Carl A. Kuether. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *The Journal of Biological Chemistry.* 2012. 147:399-407.

(30) Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem.* 1965. 1:1–5.

(31) Gerald F. combs, Jr. The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. 4thEd.USA:Elsevier. 2012. p.237.

(32) Kaminski, M., Kiessling, M., Su" ss, D., Krammer, P.H., and Gu" low, K. Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol. Cell. Biol.* 2007. 27;3625–3639.

(33) Nakamura, H.; Nakamura, K.; Yodoi, J. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. 15:351–369.

(34) 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.* 2000. 165(12):7180-8.

(35) Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O, Zhang B, Sanchez R, Golde DW. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits IkappaBalpha kinase beta. *Mol Cell Biol.* 2004. 24(15):6645-52.

(36) Son EW, Mo SJ, Rhee DK, Pyo S. Vitamin C blocks TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in human neuroblastoma cells. *Arch Pharm Res.* 2004. 27(10):1073-9.

(37) HyungGun Maeng, Hyunja Lim, Young-joo Jeong, Ami Woo, JaeSeung Kang, WangJae Lee, Young-il Hwang. Vitamin C enters mouse T cells as dehydro ascorbic acid in vitro and does not recapitulate in vivo vitamin C effects. *Immunobiology.* 2009. 214 311–320.

(38) Benjamin S. Weeks, Pedro P. Perez. Absorption rates and free radical scavenging values of vitamin C-lipid metabolites in human lymphoblastic cells. *Med Sci Monit.* 2007. 13(10): BR205-210.

(39) Jae B. Park and Mark Levine. Intracellular Accumulation of Ascorbic Acid Is Inhibited by Flavonoids via Blocking of Dehydroascorbic Acid and Ascorbic Acid Uptakes in HL-60, U937 and Jurkat Cells. *J. Nutr.* 2000. 130: 1297–1302.

(40) Sebastian J. Padayatty, MRCP, PhD; He Sun, PhD, CBS; Yaohui Wang,

MD; Hugh D. Riordan, MD; Stephen M. Hewitt, MD, PhD; Arie Katz, MD; Robert A. Wesley, PhD; and Mark Levine, MD. Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use. *Ann Intern Med.* 2004. 140:533-537.

(41) Jae Seung Kang, Daeho Cho, Young-In Kim, Eunsil Hahm, Yoolhee Yang, Daejin Kim, Daeyoung Hur, Hyunjeong Park, Saic Bang, Young Il Hwang, Wang Jae Lee. L-Ascorbic acid (vitamin C) induces the apoptosis of B16 murine melanoma cells via a caspase-8-independent pathway. *Cancer Immunol Immunother.* 2003. 52:693–698.

(42) Jee Eun Kim, Jae Seung Kang and Wang Jae Lee. Vitamin C Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Line, HCT-8 Via the Modulation of Calcium Influx in Endoplasmic Reticulum and the Dissociation of Bad from 14-3-3 β . *Immune Network.* 2012. 12(5):189-195.

(43) Gillis, S., M. M. Ferm, W. Ou, and K. A. Smith. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* 1978. 120:2027.

(44) Gordon Cook, John D. M. Campbell, Christine E. Carr, Kelly S. Boyd, and Ian M. Franklin. Transforming growth factor β from multiple myeloma cells inhibits proliferation and IL-2 responsiveness in T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 1999. Dec;66(6):981-8.

(45) Jae Seung Kang, Ha Na Kim, Da Jung Jung, Jee Eun Kim, Ga Hee Mun, Yeong Seok Kim, Daeho Cho, Dong Hoon Shin, Young-Il Hwang and Wang

Jae Lee. Regulation of UVB-Induced IL-8 and MCP-1 Production in Skin Keratinocytes by Increasing Vitamin C Uptake via the Redistribution of SVCT-1 from the Cytosol to the Membrane. *J. Investigative Dermatology*. 2007. 127, 698–706.

(46) Malek, T. R., A. Yu, P. Scibelli, M. G. Lichtenheld, and E. K. Codias. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J. Immunol*. 2001. 166: 1675–1683.

(47) C. Röpke, P. Gladstone, M. Nielsen, N. Borregaard, J. A. Ledbetter, A. Svejgaard, N. Ødum. Apoptosis following interleukin-2 withdrawal from T cells: evidence for a regulatory role of CD18 (β 2-integrin) molecules. *Tissue antigens*. 1996. 48: 127-135.

(48) Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs*. 1993. 45; pp. 953–1040.

(49) Makover D, Freundlich B, Zurier RB. Relapse of systemic lupus erythematosus in a patient receiving cyclosporine A. *J Rheumatol*. 1988. Jan;15(1):117-9.

(50) Henk-Jan Schuurman. *Modern Immunosuppressives*. Birkhäuser. 2001. 29.

(51) Martín P, Gómez M, Lamana A, Cruz-Adalia A, Ramírez-Huesca M,

Ursa MA, Yáñez-Mo M, Sánchez-Madrid F. CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 2010. Oct;30(20):4877-89.

(52) Peter Angel, Michael Karin. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1991. Dec 10;1072(2-3):129-57.

(53) Beiqing L, Chen M, Whisler RL. Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of c-jun and suppress IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *J Immunol.* 1996. 157:160–169.

(54) Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol.* 1995. 25:159–165.

(55) Yoram Devary, Roberta A. Gottlieb, Tod Smeal, Michael Karin. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of src tyrosine kinases. *Cell.* 1992. 71, 1081-1091.

(56) Collart FR, Horio M, Huberman E. Heterogeneity in c-jun gene expression in normal and malignant cells exposed to either ionizing radiation or hydrogen peroxide. *Radiat Res.* 1995. May;142(2):188-96.

(57) Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S, Nishida E. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J. Biol.*

Chem. 1998. 273:12378-12382

(58) Fanxiang Zeng, Li Tian, Fei Liu, Jianguo Cao, Meifang Quan, and Xifeng Sheng. Induction of apoptosis by casticin in cervical cancer cells: reactive oxygen species-dependent sustained activation of Jun N-terminal kinase. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2012. 44:442–449.

Abstract

Introduction: Vitamin C is involved in various biological reactions in cells. There are two types of vitamin C uptakes. Oxidized vitamin C is passively uptaken by glucose transporter, while reduced vitamin C is actively uptaken by sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT). Vitamin C is also known to be involved in immune response. However, the existence of SVCT and the function of vitamin C are not well known in human T cells. Therefore, in this study, we investigated the existence of SVCT and the effect vitamin C on human T cells.

Methods: Human T cells isolated from peripheral blood were cultured and naive or activated with PMA/ionomycin for 24, 48 hours. After then, RT-PCR, western blot, immunofluorescence were performed for finding the existence of SVCT. Vitamin C treated before or after activation in culture media for investigating the effects of high concentration vitamin C on human T cell proliferation, apoptosis, cytokine secretion and activation. Proliferation assay was performed by using [³H]-thymidine uptake assay, apoptosis analysis was performed by Annexin V and PI staining, IL-2 concentration in culture media was measured by using ELISA, activation surface molecules were analyzed by staining to CD69, CD25. And whether naive or activated within 2 hours human T cells uptake high concentration vitamin C was measured by using DNPH method. And ROS measured in human T cells by using DCFH-DA. NF-κB activity was measured in nucleus. Western blot was performed for measurement of p-c-Jun protein levels.

Results: High concentration vitamin C treatment before activation inhibited human T cell proliferation and reduced apoptosis. However, the treatment at

24 hours after activation didn't any effects on human T cells proliferation, apoptosis and IL-2 secretion. Activation surface molecules CD69, CD25 were analyzed for finding whether high concentration vitamin C treatment before activation inhibit human T cells activation or not, then CD25 expression was reduced. Human T cells uptake high concentration vitamin C when activated within 2 hours, not naive. High concentration vitamin C treatment decreased ROS in human T cells, regardless of adding before or after activation. High concentration vitamin C treatment before and after activation reduced NF- κ B transcription factor and didn't affect p-c-Jun which are important to T cell activation.

Conclusions: Taken together, high concentration vitamin C treated before activation decreased human T cell proliferation, survival, IL-2 production, CD25 expression, but high concentration vitamin C added after activation did not affect human T cell activation. Meanwhile, high concentration vitamin C treatment both before and after activation reduced intracellular ROS. These results may indicate that high concentration vitamin C interrupts T cell activation by reducing intracellular ROS level which is important during early activation stage. It might be possible that vitamin C regulates antigen-specific immune response in vivo.

Keywords: Human T cell activation, vitamin C, antioxidant, reactive oxygen species (ROS)

Student number: 2012-21762