

## 천연 암반 심해수의 항산화 활성 및 면역반응에 대한 연구

김유정 · 정일선 · 송효주 · 최은영<sup>1</sup> · 최인순<sup>1</sup> · 최영주\*

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, <sup>1</sup>생명과학과

Received January 15, 2008 / Accepted February 11, 2008

**Study of Deep Ground Sea-Like Water on Antioxidant Activity and the Immune Response in RAW264.7 Macrophages.** Yu Jung Kim, Il Sun Jung, Hyo Ju Song, Eun Young Choi<sup>1</sup>, In Soon Choi<sup>1</sup> and Young Ju Choi\*. *Department of Food and Nutrition, <sup>1</sup>Department of Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea.* - Korean Deep ground sea-like water (KDSW) has a similar mineral composition with deep sea water. KDSW has demonstrated its usefulness and attracted in the medical fields. KDSW and Danasoo (desalted deep ground sea-like water) intake improve antioxidant, antidiabetic activity and immunity. Antioxidant activities of KDSW and Danasoo were measured by using 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical, superoxide dismutase-like activity (SODA) and photochemiluminescence (PCL). DPPH radical scavenging and SOD-like activities of KDSW and Danasoo were remarkably increased in a dose-dependent manner. Antioxidant activities of KDSW and Danasoo 85.32 and 14.02 nmol of ascorbic acid equivalent/ml KDSW and Danasoo, respectively, using the PCL method. Lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in macrophages RAW264.7 cells was inhibited up to 30% by treatment with Danasoo (20%). NO is synthesized by the enzyme of nitric oxide synthase (NOS) and plays an important role tumor growth and angiogenesis. The anti-cancer effects of Danasoo on human gastric and lung cancer cells was performed by levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS). Danasoo significantly reduced iNOS expression of human gastric cancer (SNU-1) and lung carcinoma (A549). The serum glucose level was significantly reduced by Danasoo (20%) diet in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. These result suggest that KDSW has excellent biological activities and thus it has great potential as a source for natural health products.

**Key words :** Deep ground sea-like water, NO/iNOS activity, antidiabetic, antioxidant

### 서 론

21세기에는 우리나라도 물 부족 국가로 분류되고 있다. 이러한 시점에서 새로운 음용수로 주목을 받고 있는 것이 해양심층수(deep sea water, DSW)이다. 해양심층수는 빙하가 녹아 해류를 따라 흐르는 물로서 태양광선이 도달하지 않은 수심 200 m 이상 깊이의 무균상태의 미네랄이 풍부한 물이다 [12,15,23,30]. 해양 심층수는 NaCl를 제거하여 생수로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 식품산업 및 의약품분야 등 많은 분야에서 그 응용분야가 점차 확대되고 있다[22,29,31,32].

최근 미국과 일본을 중심으로 친환경 자원으로서 해양심층수에 대한 관심이 집중되면서 심층수를 이용한 대체에너지 개발, 수자원, 식품산업, 의약과 화장품산업 등에 활용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재 국내의 해양심층수 개발 기술은 미국과 일본에 비해 초기단계에 머무르고 있으며, 이는 아직 해양심층수의 확보가 어렵기 때문이기도 하다. 해양심층수의 개발을 위하여 강원도 고성군에 해양심층수 공동센터를 구축하여 향후 연구개발이 가능하도록

추진 중이며, 한국해양연구원을 중심으로 연구기관에서도 해양심층수를 활용하기 위한 연구가 수행되고 있다.

일본은 고오치현 무로토시에 해양심층수연구소(1989년)를 설립하여 해양심층수를 이미 수산물 배양, 화장품, 음료수 및 식품제조에 등에 이용하고 있다[23]. 특히 해양심층수를 이용한 알코올발효, 청국장 및 된장 등의 발효실험에 발효강화 작용이 있는 것으로 보고되고 있다[30]. 해양심층수는 동맥경화와 고지혈증 등에도 효과적인 것으로 보고되었으며[35], 특히 DSW의 high-salt 섭취에 의한 혈압에도 영향이 없는 것으로 확인되었다[25,31].

그런데 부산 다대포에서 약 1,000 m에서 취수한 심층수(Korean deep sea-like water, KDSW)가 다른 지표수와 달리 해양심층수와 유사하게 마그네슘, 칼슘, 나트륨, 칼륨 및 다른 미네랄이 풍부한 물이 개발되었다. 이러한 성질의 물은 미국 유타주에서도 나오는 것으로 알려져 있다.

기능성이 있는 물로 동의보감에 기록된 지장수가 있는데 무근수라고도 하며, 황토 땅속 깊이 흙을 파고 솥으로 걸러낸 물과 황토를 알맞은 비율로 섞었을 때 생기는 물을 말하며, 해독작용과 피를 맑게 하는 약리작용이 있는 것으로 알려져 있으나 과학적인 근거는 부족한 실정이다.

인간의 수명이 길어지고 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 건강 먹거리를 갈망하는 현대인들에게 해양심층수와 유사한

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

조성을 나타내는 KDSW를 이용한 음용수 및 식품산업에 활용하기 위한 연구는 필수적인 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 KDSW와 NaCl를 제거한 Danasoo의 생리활성을 분석하기 위한 연구로서 항산화력, 면역반응, 당노 및 암에 미치는 천연 미네랄수의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기자재

본 실험에 사용된 해양성 심층수는 (주)대한심층수에서 부산 다대포의 육지 지하 1,050 m에서 취수한 해양성 심층수(KDSW)와 탈염한 다나수(Danasoo)를 사용하였다. NO assay를 위한 macrophage RAW 264.7 cell 배양은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 사용하였으며, 당노측정은 Spargue-Dawley (SD)계 숫 흰쥐를 이용하였다. 항산화 활성 측정을 위한 DPPH 시약과 cell viability 측정을 위한 MTT는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였고, 세포배양용 시약, RPMI1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 등은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 항산화 측정은 microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, California, USA)와 Photochem (Analytik Jena AG, Jena Germany)을 사용하였다.

### DPPH 법에 의한 항산화 활성측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액은 100 ml 에탄올에 DPPH  $1.5 \times 10^{-4}$  M을 녹인 후 증류수 100 ml 혼합하여 Whatman filter paper No.2에 여과시켜 만들었다. Blois의 방법[3]에 따라 DPPH 용액 4 ml 균 배양액 1 ml 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA (%)=1-시료첨가구흡광도/대조구흡광도 $\times 100$ 으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

### SOD 유사활성(Superoxide dismutase-like activity: SODA) 측정

추출물의 SOD 유사활성은 Marklund 와 Marklund의 방법[18]에 따라 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여, 시료 10  $\mu$ l에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM Tris [hydroxymethyl] aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 150  $\mu$ l와 7.2 mM pyrogallol 10  $\mu$ l를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 후 1 N HCl 50  $\mu$ l를 가하여 반응을 정지 시켰다. 반

응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 심층수 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다. SODA (%)=1-시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도 $\times 100$ 으로 계산하였다.

### Photochemiluminescence (PCL) assay

KDSW 및 Danasoo의 항산화력 분석은 Popov and Lewin 방법[26]에 따라 PCL 분석에 의해서 수행되었다. 해양성 심층수는 수용성의 항산화력 친수성 kit (ACW)를 사용하여 Photochem system에 의해서 측정되었다. 항산화력 측정 방법은 1.5 ml reagent 1 (buffer solution pH 10.5), 1 ml reagent 2 (water), 25  $\mu$ l reagent 3 (phosphorescenzstizer), and 10  $\mu$ l of sample 용액을 혼합하여 측정하였다. 해양성 심층수의 항산화력은 여러 농도 lag phase의 평균값에 의해서 분석되었으며, calibration curve를 만들기 위한 표준물질로서 ascorbic acid (nmol/g)를 사용하여 나타내었다.

### NO Assay 및 cell viability 측정

NO의 생성은 비색법으로 세포 상등액에 측정되는 nitrite 양을 측정하였다. 대식세포를 세포 배양판에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포가 되도록 재부유하여 LPS의 자극 하에 24시간 배양하고 그 배양 상등액 내의 NO를 Griess 시약과 반응시켜 측정하였다[9]. 100  $\mu$ l의 세포배양 상등액을 취하여 동량의 Griess 시약[1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (60% acetic acid) 혼합액]을 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 800  $\mu$ g/ml 농도 범위에서 540 nm 흡광도를 측정하였다.

세포활성은 MTT assay에 방법[17]에 따라 96-well microtiter plate (Nunc, NJ)에 RAW 264.7 macrophage를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 해양성 심층수가 함유되어 있는 배지를 100  $\mu$ l씩 넣어 48시간 동안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 20  $\mu$ l 씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 상등액을 제거하였다. DMSO 150  $\mu$ l을 첨가하여 formazan을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 농도는 희석하여( $5 \times 10^{-5} \sim 10^{-2}$   $\mu$ l/well) 사용하였다.

### 실험동물 식이 및 혈당측정

실험동물은 최적조건(20 $\pm$ 1°C, 습도 50 $\pm$ 10%, 명암주기 07:00~10:00에서 예비 사육한 외관상 건강한 200 $\pm$ 10 g의 Spargue-Dawley (SD)계 숫 흰쥐를 난피법에 의해서 6마리씩 4군으로 나누어 사육 상자에 한 마리씩 넣어 4주간 실험 사

육한다.

기본식이를 섭취하는 1군은 saline (0.9%, NaCl, 1.5 ml/day)을 복강 내 주사하고, 2군은 saline에 용해한 streptozotocin (15 mg/kg, B. W./day)을 복강 내 주사하여 당뇨병을 유발시킨 실험군에 물을 급이 하고, 3군은 물 대신 대한심층수를 급이 하였다.

당뇨유발 4주 후 실험동물은 7시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 심장 채혈법으로 채혈하고 간장은 0.9% 생리 식염수로 문맥을 통해 관류 탈혈한 후 여과지로 물기를 제거하고 혈액은 약 1시간 정도 빙수 중에 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 취하여 실험에 사용한다. 혈당 농도는 혈당 측정용 kit 시약(Glyzime, Eiken)으로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**대한심층수의 수질분석**

대한심층수(KDSW)의 수질분석은 Table 1과 같이 해양심층수와 유사한 조성을 나타내고 있다. 해양심층수의 생리활성은 동맥경화증[22], 고지혈증[35], 면역기능, 항산화 등[14]에 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. 해양심층수는 건강 및 의료용 소재, 화장품, 식품, 양식업 등에 널리 이용될 수 있는 것으로 알려져 있어, 해양심층수와 유사한 조성을 가지는 KDSW의 생리활성을 연구함으로써 생리활성 소재로 응용가능성을 연구하는 것은 큰 의미가 있는 것으로 생각된다. 특히 해양심층수에서 거의 존재하지 않는 특수한 미네랄 성분 즉 Sr, Mn, Zn, Fe 등이 KDSW에는 다량 함유되어 있으며, 이러한 성분들이 중요한 생리활성을 나타내는 것으로 추정되고 있다. 해양심층수는 조류 등의 생육을 촉진하며[21], 특히 심층수를 발효미생물 배지에 첨가하면 발효관련 미생물의 생육이 촉진되는 것으로 알려져 있다.

**심층수의 첨가에 따른 항산화 활성 측정**

DPPH에 의한 항산화 측정은 Fig. 1A에 나타난 바와 같이

Table 1. Comparison of mineral contents of KDSW and JDSW (Japanese deep seawater) (Unit: mg/l)

Elements	KDMW	Sea	JDSW	Comparison
Na	6,000	10,500	10,767	56%
Ca	3,300	401	414	8X
Mg	1,300	1,300	1,320	1X
St	25	8	7.54	3X
K	16	380	410	4%
Mn	1.9	0.002	0.001	170X
Zn	0.68	0.001	0.009	75X
Fe	0.18	0.01	0.023	8X
Cu	<0.01	0.0006	0.0004	25X
Ni	<0.01	0.0005	0.0004	25X
Co	<0.01	0.0005	0.0002	20X

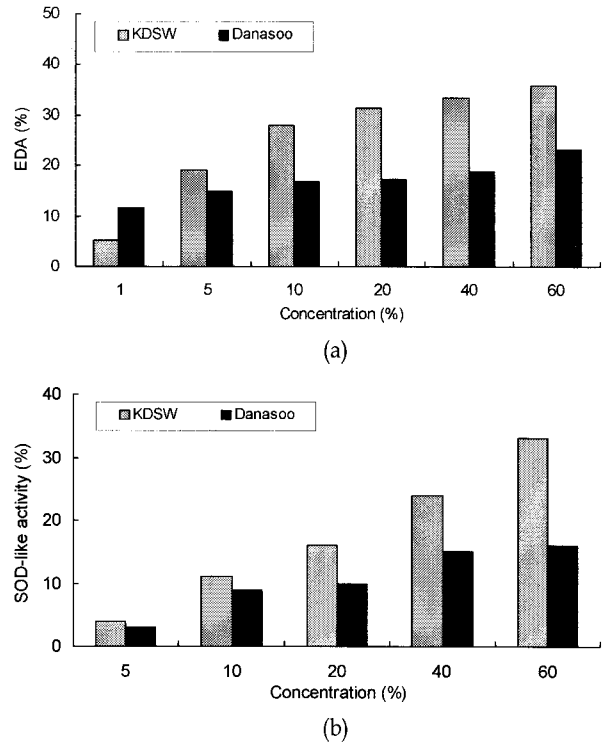


Fig. 1. Electron donating ability [A] and superoxide dismutase (SOD)-like activity [B] of KDSW and Danasoo. Antioxidant activities were measured by using DPPH radical scavenging and SOD-like activity.

KDSW 및 Danasoo에 대한 항산화 활성은 농도 의존적으로 항산화 활성을 나타내었다. KDSW의 free radical 소거능은 20-40% 농도에서 약 30%의 소거능을 나타냈으며, 탈염한 Danasoo의 경우는 5-40% 범위 내에서 약 15%의 소거능을 나타내었다. 항산화 물질은 동·식물계에 널리 분포되어 있는데, 과일과 채소에 많은 phenolic compound, 대두에 많이 존재하는 flavone류, tocopherol, ascorbic acid, 셀레늄과 같은 항산화 물질은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며, 압, 심혈관계질환 등을 예방함으로써 노화방지와 면역기능 증진에 중요한 역할을 한다[8,13,19]. 이와 같이 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나 그 효과와 경제성 때문에 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제로서 BHT (butyated hydroxytoluene), BHA (butyated hydroxyanisole), PG (propyl galate) 등이 사용되고 있다. 합성 항산화제의 사용은 안정성 때문에 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 시점에서 KDSW의 항산화 효능 연구는 새로운 형태의 항산화 물질의 개발에 대한 무한한 잠재력을 가진 보고라 생각된다.

**SOD 유사활성(Superoxide dismutase -like activity: SODA) 측정**

KDSW 및 Danasoo의 SOD 유사활성 측정 결과를 Fig. 1B

에 나타냈으며, 해양성 심층수의 SOD 활성은 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였다. KDSW의 SOD 유사활성은 60% 농도에서 35%의 활성을 보였으며, 탈염한 Danasoo의 활성은 60% 농도에서 약 15%의 SOD 유사활성을 나타내었다. 이러한 결과는 해양성 심층수에 존재하는 mineral이 중요한 작용을 하는 것으로 추정되며, 특히 심층수에 존재하는 Mn, Cu 및 Fe 등이 SOD의 cofactor로 작용하는 것으로 알려져 있다. Jung 등[14]은 암반 심해수가 항산화 활성이 있는 것을 보고하였다. Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로서 세포에 유해한 oxygen radical를 과산화수소 전환시키고 다시 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다[1]. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로서 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사활성 물질에 대한 연구가 진행되고 있다[27].

**PCL method에 의한 항산화측정**

PCL 법은 radical을 발생시키기 위하여 높은 온도를 필요로 하지 않을 뿐만 아니라 측정이 용이하고 빠르다. 또한 몇 분 안에 nanomolar 범위까지 측정할 수 있는 매우 sensitive한 방법이다[28]. 수용성물질의 항산화 활성은 ascorbic acid equivalents로서 나타내지며, 반면에 지용성 물질은 trolox equivalents로서 표현된다. Table 2에 나타난 것처럼 KDSW와 Danasoo의 항산화 활성은 85.32과 14.02(nmol of ascorbic acid equivalent/ml KDSW and Danasoo)로서 탈염한 해양성 심층수보다 원수에서 높게 나타났는데 이러한 경향은 DPPH법과 SOD-like 측정법과 동일한 결과를 나타내었다. 그러나 탈염한 해양심층수에는 물과 마찬가지로 항산화 활성이 전혀 나타나지 않았다. 최근까지 해양심층수에 대한 항산화 연구는 약간 있지만 PCL 법에 의하여 항산화 활성을 연구한 보고는 전무한 실정이다.

**NO Assay 및 cell viability**

대장균 Bacterial lipopolysaccharise (LPS)를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음 KDSW 및 Danasoo을 대식세포에 처리하여 NO 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig.

Table 2. Antioxidant activity of KDSW and Danasoo measured using PCL method

Samples	ACW <sup>a</sup> (nmol of ascorbic acid/ml)
Water	-
KDSW	85.32
Danasoo	14.02
Desalted deep sea water	-

<sup>a</sup> ACW: Antioxidant activity of water soluble substances

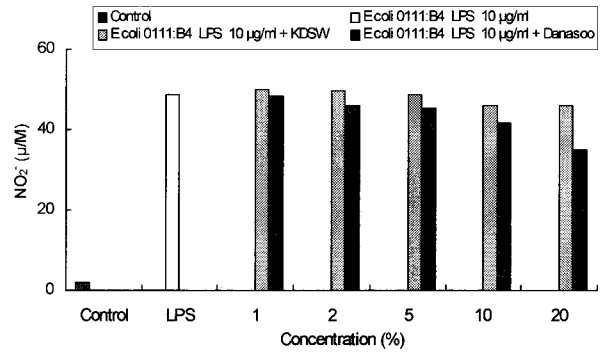


Fig. 2. Effects of KDSW and Danasoo on NO synthesis in RAW264.7 cells stimulated with *E. coli* lipopolysaccharides (LPS). RAW264.7 cells were cultured for 24 hr with various concentration of KDSW and Danasoo in the presence of LPS (10 µg/ml). NO synthesis was measured using the method of Griess (nitrite). Results are expressed as means±S.E. of three independent experiments.

2에 나타난 바와 같이 LPS에 의하여 유도된 NO 활성은 해양성 심층수를 처리함으로써 NO 합성이 Danasoo (20%)농도에서 30%까지 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 Danasoo가 면역기능과 밀접한 관계가 있음을 보여주는 것이다. Jung 등[14]은 암반심해수를 흰쥐에 식이하여 면역반응 및 항산화 활성이 증가하는 것으로 보고하였다. NO는 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 생성되며[11], NO는 분비조직과 세포기능에 영향을 주며, 세포성 면역계의 주된 역할의 하나로 NO는 세포독성이나 성장억제 작용을 한다[6].

NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합작용, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다.

NO의 발현은 농도 및 표적세포의 활성화 여부에 따라 다양한 기능성을 나타내며, 대식세포가 pathogen에 의하여 활성화되면 NO 뿐만 아니라 superoxide anion을 호흡과정에 의하여 대량 생산되는데, NO 자신은 매우 약한 산화성을 가진 라디칼로서 vitamin E와 비슷하게 세포의 지질과산화물을 막는 항산화 기능도 수행한다는 보고도 있다. 최근 염증 반응을 완화시키는데 있어서도 종래에 사용되어 온 NO를 소거하는 방식보다는 superoxide anion의 생성을 저해하거나 NADPH oxidase의 활성을 감소시키는 방법[33]이 더욱 비중 있게 다루어지고 있다.

세포독성은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 MTT 분석을 통해서 측정하였다. LPS로 처리된 대식세포와 거의 같은 수준으로 Danasoo (20%)로 처리했을 때 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다. 그러나 KDSW의 경우는 salt 농도의 증가로 세포독성을 나타내었다.

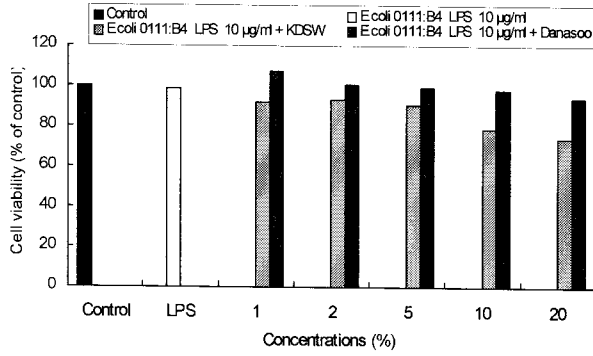


Fig. 3. Cell viability of KDSW and Danasoo on RAW264.7 cells stimulated with *E. coli* lipopolysaccharides (LPS). RAW264.7 cells were cultured for 24 hr with various concentration of KDSW and Danasoo in the presence of LPS (10 µg/ml). The cellular toxicity was carried out MTT assay. The results are mean with standard deviation of triplicate experiments.

**대한심층수의 항암효과**

최근 NO가 신경계의 생리학적 전달자로서 뿐만 아니라, 염증 반응, 면역계 및 세포 독성 외에도 세포의 분화나 세포 내 신호 전달 등의 중요한 조절 물질로 알려지고 있다. 또한 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있다[20,24]. 특히 NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates (ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화시키는 역할이 밝혀짐으로 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 human gastric cancer 배양세포의 iNO 합성은 24시간 배양 후 현저히 증가하였지만 탈염한 Danasoo (20%)를 처리 하였을 때 24시간 배양 후 현저하게 iNO의 활성이 감소하였다. Dincer 등[5]은 위암환자의 leukocyte의 NO 수준은 증가하는 것을 밝혔으며, Bakan 등[2]은 혈장의 총 nitrate 및 nitrite 수준이 건강한 사람보다 위암 환자에서 현저히 높은 것을 연구하였다.

폐암 세포에도 iNO 합성은 탈염한 Danasoo (20%)를 처리

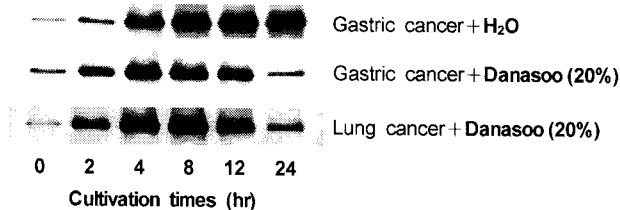


Fig. 4. Effects of Danasoo on iNOS protein expression in gastric (SNU-1) and lung cancer (A549). iNOS protein expression was detected by Western blot of cell lysates using iNOS-specific antibody.

하였을 때 24시간 배양 후 현저하게 iNO의 활성이 감소하였다. 폐암세포에서 iNOS/NO 수준에 대한 연구가 많이 수행되어 왔다. 최근 Chem 등[4]은 흡연자의 폐암세포에서 iNOS/NO 활성이 높은 것을 확인하였다. 그러나 iNOS의 발현이 DNA에 손상을 주어 neoplastic 성장을 촉진한다는 보고도 있지만 그 작용기작은 불분명하다. Wink와 Mitchell [33]은 NO가 암을 촉진하기도 저해하기도 한다고 보고하였다. Ham 등[10]은 광천수가 위암세포와 폐암 세포주에서 성장저해 및 항돌연변이 효과를 밝혔다.

일반적으로 암에 걸린 세포는 NO 합성이 증가하는데 항암제 등을 투여하면 NO 합성이 감소하는 것으로 알려져 있다. 정상적인 조직에서는 apoptosis를 통해서 세포의 증식과 사멸이 적절히 조절되는데, 이러한 cell cycle의 조절에 이상이 생김으로써 암세포로 된다. 따라서 암세포의 apoptosis를 인위적으로 유도하여 세포의 증식을 조절함으로써 암을 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

**Danasoo의 항 당뇨효과**

Alloxan과 streptozotocin은 당뇨연구에서 가장 우수한 diabetogenic chemicals로서 cytotoxic glucose analogous로 알려져 있다. 비록 두 화학물질은 다른 pathway에 의하여 cytotoxicity을 일으키며, 베타 세포 선택적 작용기작은 동일하다. STZ는 insulin 분비를 억제하여 인슐린 의존성 당뇨병을 유발한다[16].

본 연구에서는 정상 쥐에 STZ를 처리하여 당뇨를 유발한 후 각각 생수와 Danasoo를 먹인 후 1주일 간격으로 4주간의 혈당량을 측정하였다(Fig. 4). 쥐에 streptozotocin을 처리하여 당뇨를 유발한 후 Danasoo를 식이 한 쥐는 당뇨군의 쥐에 비하여 거의 정상 수준으로(대조군과 유사) 회복되는 결과를 보였고, 쥐의 배설물이 다나수를 섭취한 쥐에서 현저하게 증가하였다(data not shown). 이러한 결과는 Danasoo가 당뇨뿐

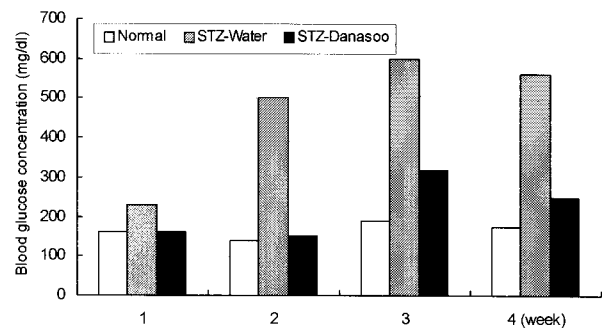


Fig. 5. The serum glucose levels of normal and diabetic rats fed on streptozotocin-water and streptozotocin-danasoo (20%). Streptozotocin (45 mg/kg, b.w) [0.01 M citric acid buffer, pH 4.5] was intravenous injected into the tail vein. The Danasoo was administrated orally in experimental rats for 4 weeks.

만 아니라 변비에도 효과가 있음을 간접적으로 나타내고 있다. 일반적으로 심층수에는 천연의 각종 미네랄이 풍부한 물로서 이러한 항당뇨 효과는 심층수에 존재하는 mineral이 중요한 기능을 하는 것으로 추정된다. Yoshioka 등[35] 해양심층수가 hyperlipemia 예방효과가 있는 것으로 보고하였으며, Farvid 등[7] 당뇨병 환자에 mineral을 보충하면 지질 profiles 개선 효과가 있는 것을 밝혔다. 당뇨병은 췌장에 있는 Langerhans섬의  $\beta$ -cell에서 분비되는 insulin의 생리작용이 저조하거나 insulin receptor의 수가 적어 insulin의 생리적 기능의 저하로 나타나는 고혈당 증세이다. 당뇨가 유발되면 insulin의 기능이 저하되면서 생체 대사조절 기능 이상으로 여러 가지 대사성 질환이 발생되며 모세혈관의 상피세포막이 두꺼워져 심장 순환기계 질환 등 많은 합병증을 유발하게 된다. Park 등[25]은 해양성 심층수에 함유되어 있는 고농도 salt를 섭취한 rats에서 고혈압을 유발하지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 일반적으로 salt를 많이 섭취하면 고혈압에 걸리는 것과 상반되는 결과로 해양성 심층수를 섭취하면 salt가 몸에 축적되지 않고 배설되는 것을 확인하였다.

## 요 약

해양성 심층수(KDSW)는 해양심층수(DSW)와 유사한 mineral 조성을 가지고 있어 식품 및 의약품분야에서 그 유용성에 대한 관심이 증대되고 있다. 본 연구에서는 KDSW 및 탈염한 Danasoo의 항산화력, 면역활성, 함압 및 당뇨에 대한 효과를 연구하였다. KDSW와 Danasoo의 항산화 활성은 DPPH radical scavenging 활성, SOD-like 활성 및 PCL 법에 의하여 항산화 활성을 조사하였다. KDSW와 Danasoo의 항산화 활성은 첨가된 농도에 의존적으로 증가하였으며, 특히 PCL법에 의한 KDSW와 Danasoo의 항산화능은 85.32과 14.02(nmol of ascorbic acid equivalent/ml)로 높은 항산화 활성을 나타내었다. Macrophage RAW 264.7 cell에서 LPS에 의하여 유도된 NO 활성은 Danasoo (20%)를 첨가에 의하여 약 30%정도의 NO 함성이 저해되었으며. 이 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 MTT assay에 의하여 확인하였다. NO는 nitric oxide synthase에 의하여 합성되며, tumor성장 및 angiogenesis에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으며, Danasoo (20%)는 위암세포와 폐암세포의 iNOS 발현을 현저히 감소시켰다. STZ에 의하여 유도된 당뇨 쥐의 혈당량은 Danasoo (20%) 식이에 의하여 대조구와 유사한 당뇨효과를 나타내었다. 이러한 결과들은 KDSW가 우수한 biological 활성을 가지고 있으며, 또한 천연 기능성 제품생산을 위한 소재로 사용될 수 있는 높은 가능성을 시사하고 있다.

## References

- Bannister, J. V., W. H. Bannister and G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 111-180.
- Bakan, E., S. Taysi, M. F. Polat, S. Dalga, Z. Umudum, N. Bakan and M. Gumus. 2002. Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **32**, 162-166.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Chen, G. G., T. W. Lee, H. Xu, J. H. Yip, M. Li, T. S. Mok and A. P. Yim. 2008. Increased inducible nitric oxide synthase in lung carcinoma of smokers. *Cancer* **112**, 372-381.
- Dincer, Y., T. Akcay, O. B. Tortum and G. Dogusoy. 2006. Nitric oxide and antioxidant defence in patients with gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* **51**, 1367-1370.
- Farias-Eisner, R., M. P. Sherman, E. Aeberhard and G. Chaudhuri. 1994. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 9407-9411.
- Farvid, M. S., F. Siassi, M. Jalali, M. Hosseini and N. Saadat. 2004. The imoact of vitamin and/or mineral supplementation on lipid profiles in type 2 diabetes. *Diabetes Res. and Clinical practices* **63**, 21-28.
- Gee, J. M. and I. T. Johnson. 2001. Phenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. *Curr. Med. Chem.* **8**, 1245-1255.
- Guzik, T. J., T. Korbout and T. Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Ham, S. S., S. H. Kim, S. Y. Moon, M. I. Jeon, D. H. Oh and C. B. Cui. 2005. Antioxidative, antimutagenic and cytotoxic effects of the mineral water. *Korean J. Food Hyg.* **20**, 53-57.
- Ignarro, L. J., J. M. Fukutto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and R. E. Byrns. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrite: Comparison with enzymatically formed nitric oxide form L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8103-8107.
- Inaba, H., T. Katsumata and K. Yasuda. 2001. Temporal variations of current and temperature at 300 m in Sutuga bay. *JADOWA Deep Ocean Water Research* **3**, 15-19.
- Jayaprakasha, G. K., R. P. Singh and K. K. Sakariah. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinefera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem.* **73**, 285-290.
- Jung, S. J., E. J. Joo, J. Y. Yoo, Y. K. Kim, Y. J. Cho, B. S. Yoon, J. K. Cho, K. T. Nam and S. G. Hwang. 2006. Effect of the supply of natural water from deep sea rock on the immune response and antioxidant activity in rats. *Korean J. Anim. & Technol.* **48**, 211-218.
- Kim, H. J. 2000. Feasibility study for the multipurpose development of deep ocean water resource. *Korean Ocean Research Lab. MOMAF report*.
- Lenzen, S. 2008. The mechanism of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* **51**, 216-226.
- Lin, H. Y., S. H. Juan, S. C. Shen, F. L. Hsu and Y. C. Chen. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages *in*

- volves heme oxygenase-1. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1821-1832.
18. Marklund, S. and G. Marklund. 1975. Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 468-474.
  19. Makris, D. P. and J. T. Rossiter. 2001. Comparison of quercetin and non-orthohydroxy flavonoid as antioxidants by competing *in vitro* oxidation reactions. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3370-3377.
  20. Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.
  21. Matsuyama, K., Y. Serisawa and T. Nakashima. 2003. Effects of deep seawater on the growth of a green alga, *Ulva* sp. (Ulvophyceae Chlorophyta). *Algae*. **18**, 129-134.
  22. Miyamura, M., S. Yoshioka, A. Hamada, D. Takuma, J. Yokota, M. Kusunose, S. Kyotani, H. Kawakita, K. Odani, Y. Tsutsui and Y. Nishioka. 2004. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1784-1787.
  23. Nakagawa, K., Y. Yokoyama, H. Nakajima and Y. Lkekami. 2000. Application of minerals in deep seawater. *JADOWA Deep Ocean Water Research* **1**, 1-4.
  24. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretary product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
  25. Park, S. K., H. J. Lee, D. H. Kim, Y. K. Deung, E. J. Yang, S. J. Lim, Y. S. Ryang, H. W. Kim and K. J. Lee. 2005. The effect of deep ground water on blood pressure and sodium excretion. *J. Exp. Biomed. Sci.* **11**, 275-279.
  26. Popov, I. and G. Lewin. 1999. Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods Enzymol.* **300**, 437-456.
  27. Pryor, W. A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
  28. Sacchetti, G., S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice and R. Bruni. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* **91**, 621-632.
  29. Suzuki, H. 2000. Characteristics, utilization, and functionality of deep seawater. *Food Research* **7**, 37-41.
  30. Takahashi, M. 2001. It knows and the deep sea water. Doseo Publication, *Science and Technology* **23**, 35-37.
  31. Tsuchiya, Y., K. Nakamura and M. Yamamoto. 2002. Subacute effects of deep seawater from the Japan Sea on blood examination values in mice. *Environ. Health Prev. Med.* **7**, 189-192.
  32. Tsuchiya, Y., K. Nakamura and M. Yamamoto. 2003. Effects of hot deep seawater bathing on the immune cell distribution in peripheral blood from healthy young man. *Environ. Health Prev. Med.* **8**, 161-165.
  33. van der Veen, R. C. 2001. Nitric oxide and T cell immunity. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1491-1500.
  34. Wink, D. A. and J. B. Mitchell. 2003. Nitric oxide cancer: an introduction. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 951-954.
  35. Yoshioka, S., A. Hamada, T. Cui, J. Yokota, S. Yamamoto, M. Kusunose, M. Miyamura, S. Kyotani, R. Kaneda, Y. Tsutsui, K. Odani, I. Odani and Y. Nishioka. 2003. Pharmacological activity of deep-sea water: Examination of hyperlipemia prevention and medical treatment effect. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1552-1559.