J. Fd Hyg. Safety 20(1), 53-57 (2005)

광천수의 항산화성, 항돌연변이원성 및 세포독성 효과

함승시† · 김수현 · 문선영 · 전미선 · 오덕환 · 최승필
강원대학교 식품생명공학부

Antioxidative, Antimutagenic and Cytotoxic Effects of the Mineral Water

Seung-shi Ham†, Soo-hyun Kim, Seon-young Moon, Mi-Sun Jeon, Deog-Hwan Oh and Cheng-Bi Cui
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT – This study was performed to observe the components, antioxidative, antimutagenic and cytotoxic effects of the mineral water using AOAC method, DPPH free radical donating method, Ames test and SRB assay. Mineral water contained eleven kinds of minerals among the total seventeen components and sodium and potassium ion were main components. Mineral water showed electron donating activities (175.9 μg). The inhibition rate of mineral water (200 μg/plate) in the *Sallmonella typhimurium* TA98 strain showed 54% against the mutagenesis induced by Trp-P-1. In addition, same concentration of mineral water the *Sallmonella typhimurium* TA100 strain showed highest 67%, 65.8% and 63% inhibition against B(a)P, 4NQO and Trp-P-1, respectively. The cytotoxic effects of mineral water against the cell lines with Human lung carcinoma (A549), Human breast adenocarcinoma (MCF-7), Human stomach adenocarcinoma (AGS) and Human cervical adenocarcinoma (Hela) were inhibited with the increase of the mineral water. The treatment of 50 μg/well of mineral water showed cytotoxicities of 66%, 47.6%, 37.7% and 45.6% against A549, MCF-7, AGS and Hela.

Key words: Antimutagenicity, cytotoxicity, mineral water

자연계에 존재하는 물은 순수한 물로 존재하는 경우는 드물며 대기수라 하더라도 일정량의 이온성분과 기체성분이 녹아 있다. 대기, 토양, 암석, 부식질과 항상 접촉하고 있는 천연수는 각종 성분을 용해하고 있으며 이와 같은 천연수의 화학성분은 주로 기체성분을 비롯하여 이온성분과 미량원소 그리고 유기질을 포함하고 있을 뿐만 아니라 각종 미생물을 포함하고 있다. 천연수 중에 용해되어 있는 기체로는 O_2, N_2, CO_2, H_2S, CH_4 및 H_2가 있으며 미량의 활성 기체인 He, Ne, Ar, Kr, Xe 그리고 Rn가 있다.[1)] 온천이라 함은 지하로부터 용출되는 25°C 이상의 온수로 그 성분이 인체에 해롭지 아니한 물로 법적으로 규정되어 있으나 온천수는 예로부터 인간의 질병예방 및 치료제로서 널리 이용하여 왔던 천연수 중의 하나이다. 또한 온천수에 대한 현대 과학적 연구가 미흡한 상태임에도 불구하고 널리 이용되어 왔던 것이 사실이다. 따라서 경산의 압양면 금구리 398-1번지에서 취수되는 광천수에 대해서도 과학적으로 성분분석과 각종 생리활성 연구를 통하여 안정성을 평가하는 것이 필요하다고 본다. 경산의 광천수에 대한 성분 분석 결과를 보면 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 리튬, 스트론튬, 규소, 철, 아연 등이 함유되어 있으며 음용수 기준을 넘지 않고 있다. 그러나 경도, 맛, 증발잔류물, 황산이온과 보론의 함량에서 기준치를 다소 초과하는 것으로 나타났다. 특히 무기물의 함량은 기능성과 밀접한 관계가 있으며 나트륨(Na)과 칼륨(K)성분은 모두 세포의 중요한 양이온으로 세포의 정상 구조와 기능을 유지하는데 중요한 작용을 한다. 마그네슘(Mg)성분은 종양을 억제하는 작용을 하며 콜레스테롤이 높아져서 생기는 실험성동맥경화증을 예방하기도 한다. 칼슘(Ca)성분은 인체에에서 중요한 영향을 끼치며 칼슘이 부족하면 고혈압과 골질송취병이 발병되기 쉽다. 규소(SiO_2)는 연골소 안의 중요 성분으로 적당량의 규소는 골격의 칼슘화에 유리하여 골생성을 촉진시켜 준다. 그리고 리튬(Li)성분은 인체대사에 필요한 소량의 원소로 식물신경의 안정성을 조절하는 중요한 작용을 하며 리튬이 부족하면 신경이 지나치게 흥분하여 광조증을 일으킬수 있다. 철(Fe)성분은 중요한 생물학적 기능이 많은데 세포의 주요 조성성분으로서 많은 효소의 활성 부위에 존재한다. 아연(Zn)성분은 매우 중요한 생물 필수 미량원소로서 인체에 아연이 결핍되면 생식력이 떨어지고 난장이가 될 수 있다. 스트론튬(Sr)성분은 약 99%가 골격에 들어 있으며 전형

†Author to whom correspondence should be addressed.

적인 친골원소라고 볼 수 있다. 과량의 스트론튬은 주로 칼슘과 인의 파괴대사에 영향을 주는 것으로도 알려져 있다. 시료로 사용되는 경산의 광천수는 최근 개발된 온천수로서 이 물에 대한 연구는 이루어진바 없는 실정이다. 광천수는 예부터 인간의 질병 예방 및 치료제로서 널리 이용하여 왔던 천연수 중의 하나이지만 단일컬럼이온크로마티그래피에 의한 광천수 중 음이온의 신속한 동시정량법이[1] 보고된바있으며 광천수의 이화학적 수질평가 지법,[2] 한국 광천수 중 미량금속원소 분포상태에 관한 조사연구만[3] 되어있을 뿐 광천수에 대한 현대 과학적 연구가 미흡한 상태로 널리 이용되어 왔던 것이 사실이다. 따라서 이 광천수의 생리활성 기능을 과학적으로 밝힘으로서 안전성 평가는 물론 이용 가능성을 규명 하는 것은 대단히 중요하다고 사료된다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용한 시료는 경상북도 경산시 압양면 금구리 398-1번지 소재 광천수로서 지하 943 m(3호공)에서 직접 채취한 물로 millipore filter(0.45 μm)로 여과한 후 냉장고에 보관 하면서 실험에 사용하였다.

시 약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Hepes buffer(Gibco), Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA는 Gibco사(U.S.A.)로부터 구입하였다. 그리고 항돌연변이 실험에 필요한 직접변이원 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)은 미국 Sigma회사로부터 구입하였으며 간접변이원인 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indole(Trp-P-1), benzo(a)pyrene(B(a)P), L-histidine 및 dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 일반분석에 사용된 분석시약은 일본 和光純藥 회사의 특급시약을 구입하였다.

암세포주 및 실험균주

실험에 사용한 암세포주로는 인간 폐암세포 A549(Lung carcinoma, Human), 인간 유방암 세포 MCF-7(Breast adenocarcinoma, pleural effusion, Human), 인간 위암세포 AGS(stomach adenocarcinoma, Human), 자궁암세포 HeLa (Cervical adenocarcinoma, Human) 그리고 인간정상세포인 293(transformedprimary human embryonal kidney)은 Korea Cell Line Bank(KCLB) 으로부터 구입하여 사용하였으며 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph)는 TA98, TA100의 두 종류였으며, 미국 Califonia 대학의 B.N. Ames로부터 제공 받았다.

성분분석

광천수의 무기질 성분분석은 AOAC 분석 방법10)에 따라 분석 하였다.

수소전자공여능(electron donating ability)에 의한 항산화 활성

광천수는 Choi[11]의 방법에 의한 수소 전자공여능에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 4 ml의 1.5×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl solution(in methanol)을 1 ml를 첨가한 후, 30분간 암소에서 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하였으며 RC_{50}은 시료가 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는 농도로 표시하였으며, 검체의 농도에 따른 수소전자공여능 검정(standard curve)을 통해 결정하였다.

세포독성의 측정

세포 단백질 염색을 이용하여 세포증식이나 독성을 측정하는 SRB(sulforhodamine B) assay 방법[12]을 사용하였다. 즉 10% fetal bovine serum과 각각의 암세포들인 인간 폐암세포(A549), 인간 유방암 세포(MCF-7), 인간 위암세포(AGS), 인간 자궁암세포(Hela), 인간 정상세포(293)를 함유하는 RPMI 1640 배지 및 DMEM 배지를 5×10^4 cells/mL 농도로 100 μl씩 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양(37^oC, 5% CO_2)한 후 시료를 12.5, 25, 37.5, 50 μg/well 농도로 100 μl씩 첨가하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장보관 한 10%(w/v) TCA를 100 μl씩 첨가한 후 1시간 동안 4^oC에서 방치한 후 증류수로 다섯번 헹구었다. plate를 건조기에서 건조시킨 후 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액 100 μl를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 결합하지 않은 SRB 염색액을 제거하기 위해 1%(v/v) acetic acid용액으로 네 번 세척하였다. 건조기에서 건조된 plate는 10 mM Tris buffer 100 μl로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

항돌연변이성 실험(Antimutagenicity test)

Ames test를 개량한 preincubation법[13]에 따라 항돌연변이원성 실험을 실시하였고 실험에 사용한 변이원물질은 직접변이원인 4NQO, MNNG와 간접변이원인 B(a)P 및 Trp-P-1을 사용 하였다. 건열멸균시킨 glass cap tube에 시료를

50, 100, 150, 200 μg/plate의 농도별로 첨가하고 변이원 물질을 각각 50 μl씩 첨가하였다. 간접 변이원인 경우 10% S-9 mix를 250 μl를 각각 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 *Salmonella typhimurium* 균액을 100 μl씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 μl가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C)를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판고정화 시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생성된 복귀돌연변이(his+ revertant colony)수를 측정하여 항돌연변이성 유무를 판정하였다. 각 시료와 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며 항돌연변이 활성은 변이원물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다. 억제율은 3회 반복실험을 실시하여 평균치를 나타낸 것이다.

$$\text{Inhibition}(\%) = [(M - S_1)/(M - S_0)]\times 100,$$

M: 돌연변이 물질만 존재한 경우의 복귀 돌연변이 수, S_0: 자연 복귀 돌연변이 수, S_1: 시료를 첨가하였을 때의 복귀 돌연변이 수

결과 및 고찰

광천수의 성분분석

광천수의 성분분석은 지하 943 m(3 호공)로부터 취수한 물을 사용 하였으며 각종 유?무기성분을 분석한 결과 Table 1과 같이 총 17종류의 성분이 검출 되었다. 이중 무기물은 11종류 가 검출 되었으며 무기질 성분 중에서는 나트륨과 칼슘 성분이 많이 함유되어 있는 것이 특징 이었다. 그리고 구리, 납, 탄산가스 및 유화수소는 검출되지 않았다.

Table 2. Antioxidant effect of Kyung-san mineral water

Sample		RC_{50}* (μg)
mineral water	1×(0.1%)	897.6
	2×(0.2%)	763.3
	4×(0.4%)	652.1
	6×(0.6%)	542.8
	8×(0.8%)	237.5
	10×(1.0%)	175.9
BHT**		12.4
α-Tocopherol		14.6

*Amount required for 50% inhibition of DPPH after 30 min.
**Dibutyl hydroxy toluene

항산화 활성

광천수에 존재하는 성분들에 의해 항산화효과가 있는지를 규명하기 위하여 광천수에 대한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 그 항산화 활성을 평가하였다. 실험 결과 Table 2와 같이 광천수의 항산화 효과는 농도 10×(1.0%)일 경우 RC_{50} 값이 175.9 μg으로서 α-tocopherol(RC_{50}=14.6 μg)보다 약한 항산화 활성을 나타내었다.

항돌연변이 효과

광천수의 발암성 물질의 억제활성을 검토하기 위해서 *S. typhimurium* TA98 균주를 이용하여 직접 변이원인 4NQO와 간접변이원인 B(α)P 및 Trp-P-1의 억제 활성을 규명하였다. 실험 결과 Fig. 1에서와 같이 세 종류의 변이원 모두에서 농도 증가에 따라 억제 활성을 나타내었으며 처리 농도 200 μg/plate 첨가 시 간접변이원인 Trp-P-1에 대해서 54.2%의 가장 높은 억제활성을 나타내었으며 B(α)P은 43.1%의 억제활성을 나타내었다. 그리고 직접변이원인 4NQO에 대해서는 40%의 낮은 억제활성을 나타내었다.

Table 1. Analysis of mineral water (unit : %)

Item	Hole NO			Item	Hole NO		
	1	2	3		1	2	3
Depth(m)	694	1,200	943	Free CO_2	7.3	34.32	27.46
Temperature(°C)	27.0	30.0	29.5	Cl	217	254	175
pH	7.75	7.50	7.63	SO_4	8,487	6,125	147
Total solid	8,084	8,362	8.434	F	5.2	ND	1.4
Na	2,320	1,502	1,982	SiO_2	3.28	11.6	13.1
K	30.0	56.3	52.9	Fe	0.23	0.27	0.01
Ca	377.0	158.8	257.2	Zn	0.88	0.94	0.57
Mg	95.5	42.4	51.4	Cu	0.003	ND	ND
Sr	0.25	9.81	9.80	Pb	0.003	ND	ND
Li	21.0	ND	16.1	H_2S	ND	ND	ND
HCO_3	181.1	235.4	210.0	Mn	0.083	0.07	0.11
CO_2	ND	ND	ND	Al	0.01	0.02	0.02

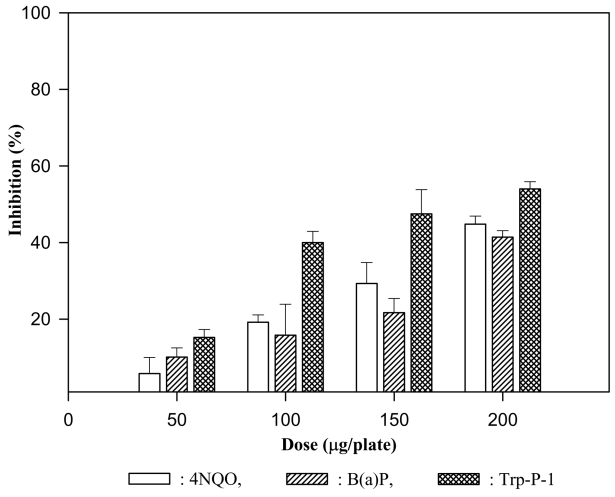

Fig. 1. The Antimutagenic effects of mineral water against each mutagen on *Salmonella typhimurium* TA98.

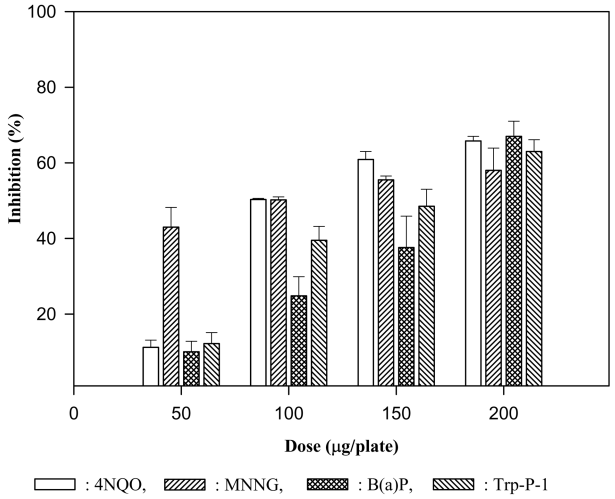

Fig. 2. The Antimutagenic effects of mineral water against each mutagen on *Salmonella typhimurium* TA100.

한편, *S. typhimurium* TA100 균주를 이용하여 직접 변이원인 4NQO 및 MNNG, 간접변이원인 B(α)P 및 Trp-P-1의 억제 활성을 실험한 결과 *S. typhimurium* TA98 균주와 마찬가지로 세 종류의 변이원 모두에서 농도 증가에 따라 억제 활성을 나타내었으며 처리 농도 200 ml/plate 첨가 시 각각 65.8%, 58.6%, 67.0% 및 63.1%로 MNNG를 제외하고는 60% 이상의 억제활성을 나타내었다. 따라서 항돌연변이 활성은 매우 높은 편은 아니나 광천수로서는 비교적 높은 활성을 나타내는 것으로 평가되었다(Fig. 2).

세포독성 효과

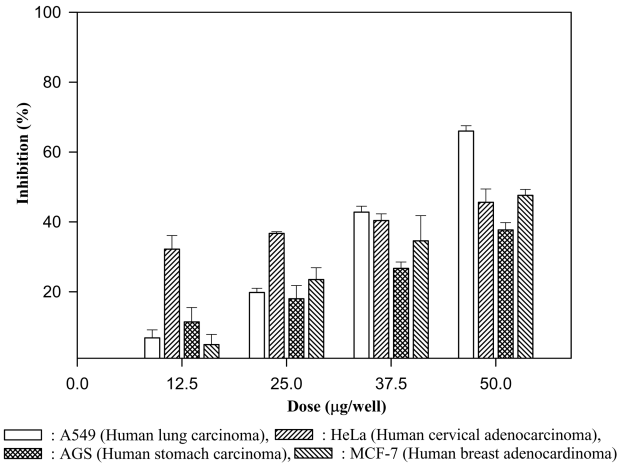

Fig. 3. Inhibitory effects of growth of human cancer cells in adding the mineral water.

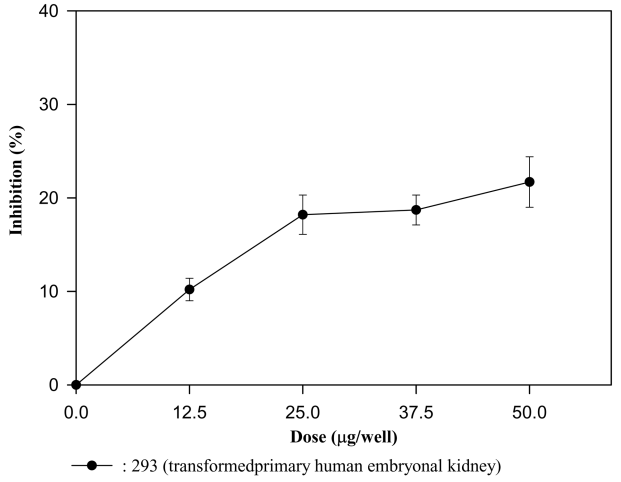

Fig. 4. Inhibitory effects of growth of mineral water on human transfomed primary embryonal kindney (293).

본 실험에서는 각종 암세포에 대한 광천수의 세포독성을 규명하기 위하여 인간 암세포로 A549, Hela, AGS 및 MCF-7와 대조군으로서 정상세포 293을 이용하여 SRB assay를 행하였다. 광천수에 의한 A549, Hela, AGS 및 MCF-7 세포주에 대하여 성장 저해효과를 검토한 결과 Fig. 3에서와 같이 광천수 50 μg/well 첨가 시 각각 66%, 45.6%, 37.7% 및 47.6%의 억제효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 항돌연변이 효과에서 나타난 Trp-P-1, B(α)P, MNNG 및 4NQO에 대한 억제효과와 비슷한 억제활성을 나타내었다. 또한 인간 정상 신세포 293에 대한 광천수 농도에 따른 세포독성 효과는 20% 이하의 낮은 생육 억제율을 보였으며 이것은 광천수가 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 독성효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4).

감사의 말씀

본 연구는 경산 사이판 온천의 연구사업 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

국문요약

지하 943 m(3 호공)로부터 취수한 경산 광천수의 유·무기성분을 분석한 결과 총 17종류의 성분 중 무기물은 11종류가 검출 되었으며 무기성분 중에서는 나트륨과 칼슘 성분이 많이 함유되어 있는 것이 특징 이었다. 그리고 구리와 납과 같은 중금속과 탄산가스 및 유화수소는 검출되지 않았다. 그리고 항산화 활성, 항돌연변이원성 및 인간 암세포 성장억제 실험 결과 항산화 활성에서는 비교적 약한 활성을 나타내었다. MNNG, 4NQO, Trp-P-1및 B(α)P와 같은 돌연변이원을 이용한 미생물 수준에서의 항돌연변이원성 실험 결과 *S. typhimurium* TA98에 대해서 간접변이원인 Trp-P-1은 시료 농도 200 μg/plate 첨가 시 54%의 억제 활성을 나타내었다. 또한 *S. typhimurium* TA100 균주에서 4NQO 및 MNNG는 각각 65.8% 와 58.6%의 억제활성을 보였으며 B(α)P 및 Trp-P-1에 대해서도 각각 67%와 63%의 높은 억제활성을 나타내었다. 그리고 광천수의 항암활성을 규명하기 위한 암세포 성장억제 효과에서는 시료농도 50 μg/well 첨가 시 A549, Hela, AGS 및 MCF-7에 대해서 각각 66%, 45.6%, 37.7% 및 47.6%의 억제효과를 나타내었다. 또한 인간 정상 신세포 293에 대한 온천수 농도에 따른 세포독성 효과는 20% 이하의 낮은 생육 억제율을 보였으며 이것은 광천수가 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 독성효과를 나타냄을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 임연중, 의학환경 지구화학, *도서출판 춘광*, pp. 51-169 (1996).s
2. Kim JH, Choi YW, Chung TK : Rapid simultaneous determination of anions in mineral water by single column ion chromatography. *Kor J Chemical Society* **39**, 910-917 (1995).
3. Nam SH : A study on a classification technique of natural mineral waters by its constitution and physico-chemical properties. *Kor J Env Hlth Soc,* **14**(1), 33-38 (1988).
4. Ko IS, Kim DH : Investigation on trace elements distribution in hot an cold mineral spring waters in the south Korea. *Bull K H Pharma Sci*, **12**, 85-91 (1984).
5. AOAC. Offcial methods of analysis(15th ed.). Arlington, VA : Association of Official Analytical Chemists (1990).
6. Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI : Screening for antioxidant activity of plants and marune algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor J Pharmacol* **24**, 299-303 (1993).
7. Scudiero DA, Shoemarker RH, Paul KD, Monks A, Tiemey S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR : Evaluation of a solube tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* **48**, 4287-4836 (1988).
8. Yahagi T, Nagao M, Seino Y, MSTSUSHIMA T, Sugimura T, Okada M : Mutagenicites of N-nitrosoamines on *Salmonella*. *Mutation Res* **48**, 121-130 (1997).