

Diethyl Nitrosamine (DEN) 처리 실험동물에 있어 기간에 따른 자화육각수의 임파구 DNA 손상 개선효과*

이혜진 · 조혜련 · 전은재 · 강명희[§]

한남대학교 대덕밸리캠퍼스 생명나노과학대학 식품영양학과

Effect of the Magnetized Water Supplementation on Lymphocyte DNA Damage in Mice Treated with Diethylnitrosamine*

Lee, Hye-Jin · Jo, Hye-Ryun · Jeon, Eun Jae · Kang, Myung-Hee[§]

Department of Food & Nutrition, Daedeok Valley Campus, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

ABSTRACT

Water gets magnetically charged when it is contacted with a magnet. Although magnetic water products have been promoted since the 1930's, they have received very little recognition due to questionable effectiveness. Diethylnitrosamine (DEN) is a widely occurring nitrosamine that is one of the most important environmental carcinogens primarily inducing tumors of liver. In this study, the effect of magnetized water supplementation on lymphocyte DNA damage in ICR mice treated with DEN was evaluated using the Comet assay. Mice were divided into 3 groups: control, DEN, and DEN + magnetized water group. Fifteen mice were maintained in each group for the entire experimental period of 6, 12 and 18 weeks. Five mice in each group were sacrificed at 6, 12, and 18th weeks, followed by the Comet assay using the blood obtained from heart puncture of the mice. The level of lymphocyte DNA damage reflected by tail moment and other DNA damage indices of tail DNA (%) or tail length of the magnetized water group were significantly decreased after the 6th, 12th and 18th weeks of supplementation compared with the positive control, the DEN group. The relative DNA damage of the magnetized water groups compared to the DEN control group after 6th, 12th, and 18th weeks of supplementation were 42.2%, 40.8%, and 32.9% for DNA in tail, 31.2%, 32.6%, and 21.3% for tail length, and 33.8%, 33.8%, and 24.6% for tail moment, respectively. This is the first report demonstrating that magnetized water may be involved in the lowering effect of the DNA damage in DEN-treated ICR mice. This result suggests that the magnetized water might have minimized the DNA damage by improving the antioxidant status of the mice. However, further studies are needed to characterize the condition of the magnetization and examine the long-term effect of the water product. (Korean J Nutr 2010; 43(6): 570~577)

KEY WORDS: magnetized water, DNA damage, comet assay, diethyl nitrosamine (DEN).

서 론

환경오염으로 인한 화학물질의 노출 기회가 쉬워지게 되면서 체내에 해로운 활성을 가진 자유라디칼의 생산이 증가하고, 증가된 산화 스트레스로 인해 인체 내 DNA 손상이 증가하게 되며 궁극적으로 암에 걸릴 확률이 높아진다. DNA 손상은 암의 개시단계에서 필연적으로 일어나는 과

정으로써 DNA가 많이 손상되면 암에 걸릴 확률이 높을 것으로 생각되므로 DNA 손상정도를 측정하는 것은 발암물질의 노출위험도 평가 및 암 예방 효과를 알아보는 효과적인 방법이다.¹⁻⁴⁾

DNA 손상을 개선하여 암을 예방하기 위해서는 체내에 축적된 산화 스트레스를 감소시켜야 한다. 최근 우리나라에서 암은 한국인 사망원인의 1위를 차지하고 있으므로⁵⁾ 체내 산화 스트레스를 감소시켜 암을 예방하거나 치료하기 위한 건강기능식품의 개발이 활발하게 추진되고 있으나 건강기능식품보다는 우리 몸의 기초가 되는 기능성 물을 통한 건강증진 효과가 더 효율적일 것으로 기대된다.

최근 음료수의 기능성에 대한 관심과 함께 영구자석에 물을 통과시켜서 물 분자구조를 이온 활성화시킨 물인 자

접수일 : 2010년 10월 6일 / 수정일 : 2010년 10월 20일

채택일 : 2010년 11월 2일

*This work was supported by Grants from Hannam University in 2010.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mhkang@hnu.kr

화육각수에 대한 관심이 증가하고 있다. 특수 제작된 영구 자석에 물을 통과시키면 물 분자구조가 이온 활성화되어 우리 몸의 생체수와 같은 육각형구조(육각수)로 변화되며 이를 자화육각수라고 부른다. 자화육각수는 1930년대 이후 생체에서 조직세포의 생체 활성을 증가시키고 혈액 순환 및 신진대사 과정을 촉진시킴으로써 위장의 기능을 정상화시키고 세포에 활력을 더해 자연 치유력을 증대시키는 것으로 알려져 왔으나⁶⁾ 국내외적으로 이에 대한 과학적인 근거자료나 실험 연구는 많지 않다. 산화 스트레스에 의해 발생하는 여러 만성 질환 예방에 자화육각수 섭취가 효과 있음이 개인 체험 사례로 보고되었으며, 이로 보아 자화육각수에도 강력한 DNA 손상 개선 생리활성이 있을 것으로 생각된다.

현재까지 국내·외에서 자화육각수의 생리활성 효능에 관한 과학적인 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 특히 항암과 관련하여 최근 많은 관심이 집중되어 있는 DNA 손상 억제효과에 관한 연구는 국내외적으로 보고된 바 없다. 다만 자화수 섭취가 치근막 환자의 치석을 감소시키는 효과가 있었다는 보고⁷⁾ 및 자화수가 glutamate decarboxylase 활성을 증가시킨다는 보고⁸⁾ 등이 있으며, 그 외 중국에서의 연구를 중심으로 자화수의 회충증 치료 효과,⁹⁾ 요석증 치료 효과,¹⁰⁾ 결석 용해 효과^{11,12)} 등이 보고되고 있을 뿐이다. 우리나라 연구로는 저자의 실험실에서는 산학협동 연구 사업으로 자화육각수의 항 유전독성 효과에 관한 예비 실험을 동물실험으로 수행한 결과, 일반 음용수 섭취 당뇨군 동물에 비해 자화육각수를 섭취한 동물군의 DNA 손상정도가 감소하는 경향을 보임을 관찰한 바 있다 (자료 미제시).

Diethyl nitrosamine (DEN)은 DNA 손상 유발물질 중 하나로서 발암성 관찰이 쉽고 발암효과가 크게 나타나 실험동물의 발암물질로 자주 사용되고 있다.¹³⁾ 따라서 본 연구는 자화육각수를 장기 투여할 경우, 그 투여 기간에 따라 발암물질로 DEN을 투여한 쥐의 DNA 손상 개선 정도가 달라지는지를 알아보려고 하는 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

실험동물의 사육 및 실험설계

자화수의 DNA 손상 감소효과를 보기위한 실험동물로는 4주령 ICR 마우스 45마리를 사용하였으며 중앙실험동물(Central Lab. Animal Inc. Korea)에서 구입하여 온도와 습도가 자동 조절되는 동물실험실에서 사육하였다. 실험동물은 5~6 마리씩 케이지에 넣어 사육하였으며 물과 사료를 마음껏 먹게 하여 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

체중이 19~20 g 정도 되는 마우스를 각 군 당 15마리씩 대조군(일반 물을 투여한 대조군), DEN 투여군(일반 물과 DEN을 투여한 DEN 대조군) 및 자화수 투여군(자화수와 DEN을 투여한 실험군)의 세 군으로 나누어 18주 동안 사육하였다.

실험에 사용한 자화육각수는 9,000~13,000 가우스의 자장을 통과한 물로서 (주)코리아크린시스템으로부터 공급받아 물 대신에 투여하였다. 실험동물의 기본 실험 식이는 AIN-93 식이를 제조하여 사용하였으며¹⁴⁾ AIN-93 실험식이의 내용은 Table 1과 같다. 세 군 모두 동일한 사료를 주되, 대조군과 DEN 투여군은 일반 식수를 먹게 하고 자화수 투여군은 일반식수 대신에 자화수를 먹게 하였다. DNA 손상에 미치는 자화수의 섭취 효과가 기간에 따라 어떻게 달라지는지 관찰하기 위해 6주, 12주, 18주가 되는 시점에서 각각 5마리씩의 동물을 무작위로 선정하여 희생시켜 임파구 DNA 손상정도를 측정하였다. 본 실험에서 사용한 동물의 실험 설계는 Fig. 1과 같다.

DEN 투여 및 채혈

실험동물에 DNA 손상을 일으키는 물질로는 Diethyl nitrosamine (DEN)을 선정하여 사용하였다. Diethyl nitrosamine은 DNA 손상 유발물질 중 하나로서 발암성 관찰이 쉽고 발암효과가 크게 나타나 실험동물의 발암물질로 자주 사용되고 있다.¹³⁾ 본 실험에서는 DEN을 post-treatment 방식, 즉 자화수를 먼저 투여한 후에 DEN을 나중에 투여하는 방식으로 투여하였다. 먼저 ICR 마우스에게 자화수를 장기간 섭취시키면서 기간에 따라 6주, 12주, 18주되는 시점에서 DEN을 투여하였다. DEN은 200 mg/kg BW가 되도록 0.9% saline에 녹여 대조군을 제외한 DEN 투여군과 자

Table 1. Composition of experimental diet¹⁾

Ingredients	Grams/kilogram diet
Casein	200.000
Cornstarch	397.486
Dextrose	132.000
Sucrose	100.000
Cellulose	50.000
Soybean oil	70.000
t-Butylhydroquinone	0.014
Salt mix	35.000
Vitamin mix	10.000
L-Cystine	3.000
Choline bitartrate	2.500

1) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993; 123(11): 1939-1951

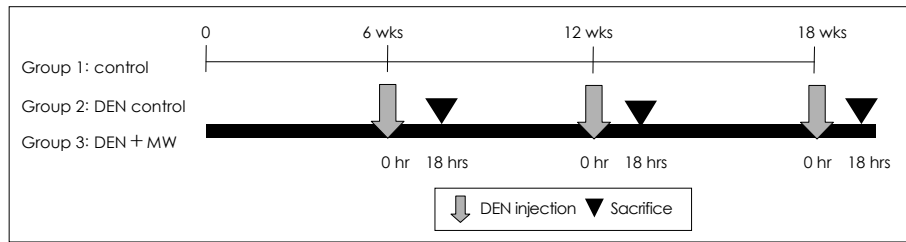


Fig. 1. Experimental design. DEN: diethyl nitrosamine, MW: magnetized water.

Table 2. Initial and final Body weight, and water intake of ICR mice

	Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Water intake (mL/day)
6 weeks	Normal control	19.89 ± 0.81 ¹⁾	35.57 ± 4.28	10.56 ± 0.28
	DEN control	20.23 ± 0.42	39.52 ± 3.81	10.70 ± 0.26
	DEN + magnetic water	19.84 ± 1.25	33.47 ± 5.20	10.65 ± 0.49
12 weeks	Normal control	19.66 ± 0.62	46.55 ± 5.76	13.01 ± 0.36 ²⁾
	DEN control	19.82 ± 0.67	46.97 ± 4.21	12.22 ± 0.64 ^b
	DEN + magnetic water	20.10 ± 0.91	46.06 ± 7.12	11.16 ± 0.60 ^c
18 weeks	Normal control	18.63 ± 0.60	46.38 ± 5.28	13.5 ± 2.28
	DEN control	18.68 ± 0.45	48.84 ± 9.07	15.49 ± 1.59
	DEN + magnetic water	19.05 ± 0.58	52.42 ± 10.02	13.53 ± 0.96

1) Values are Mean ± S.D. 2) Means with different superscript letters are significantly different from control group ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

회수 투여군의 마우스 복강에 각각 투여하였다. 투여 후 18 시간이 지난 뒤 대조군을 포함한 세 군의 동물을 모두 희생시켜 심장에서 혈액을 채취하였다 (Fig. 1).

Comet assay에 의한 임파구 DNA 손상 측정

임파구 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay는 선행연구¹⁵⁾에서와 같이 Singh의 방법¹⁶⁾을 수정, 보완하여 실시하였다. 전혈 70 μ L를 1 mL의 PBS에 섞은 후 Histopaque 1077을 이용하여 임파구를 분리하였다. 임파구 20 μ L를 취하여 low melting agarose gel (LMA)과 섞은 후 0.5% normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 gel이 굳도록 4°C에 냉장 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ L로 한 겹 더 덮었다. Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지 시키어 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis 탱크에 배열하고 냉장보관 하였던 4°C의 차가운 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH > 13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 알칼리에 취약한 부위가 드러나게 한 후 25 V/300 ± 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3

회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 μ L/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany)상에서 관찰하고 CCD 카메라 (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 이미지는 comet image analyzing system (kinetic image 4.0, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상 및 자화육각수에 의한 손상억제 정도는 전보¹²⁾에서와 같이 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리인 tail length (TL), % DNA in tail, 그리고 TL과 % DNA in tail을 곱한 값인 tail moment (TM) 등 3가지 분석 지표로 보았다.

자료의 처리

모든 자료는 SPSS-PC⁺ 통계 package (version 10.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 ± 표준오차 (SE)를 구하였고 각 군별로 유의성 검증을 위해서 일원분산분석 (one-way ANOVA) 혹은 이원분산분석 (two-way ANOVA)을 실시한 후 사후검증 방법으로는 Duncan's Multiple Range Test를 통해 각 군 간의 평균 차이에 대한 유의성을 검증하였다. 모든 통계적 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결 과

본 연구에서 사용한 ICR 마우스의 6주, 12주, 18주에서의 체중과 수분섭취량은 Table 2와 같다. 발암물질 (DEN)

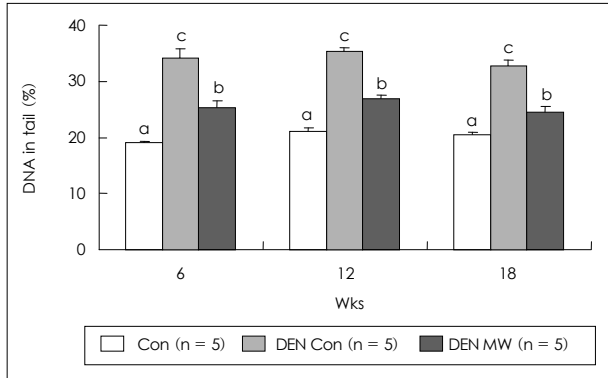


Fig. 2. Effect of 6-, 12- and 18-weeks treatment with a magnetic water on leukocyte DNA damage represented as DNA in tail (%) in diethyl nitrosamine (DEN)-treated ICR mice, respectively. Control: Negative control (n = 5), DEN control: Diethyl nitrosamine positive control (n = 5), DEN MW: DEN + Magnetic water (n = 4). Means with different letters are significantly different from control group (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

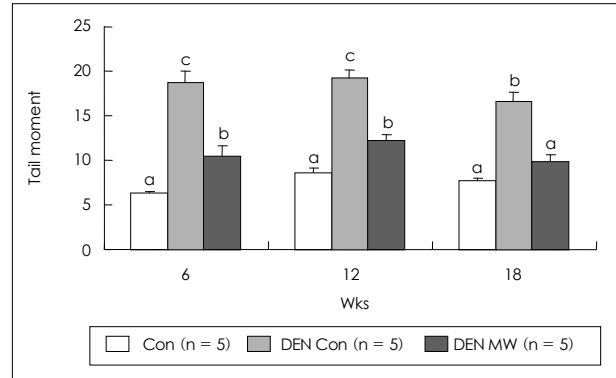


Fig. 4. Effect of 6-, 12- and 18-weeks treatment with a magnetic water on leukocyte DNA damage represented as tail moment in diethyl nitrosamine (DEN)-treated ICR mice, respectively. Control: Negative control (n = 5), DEN control: Diethyl nitrosamine positive control (n=5), DEN MW: DEN + Magnetic water (n = 4). Means with different letters are significantly different from control group (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

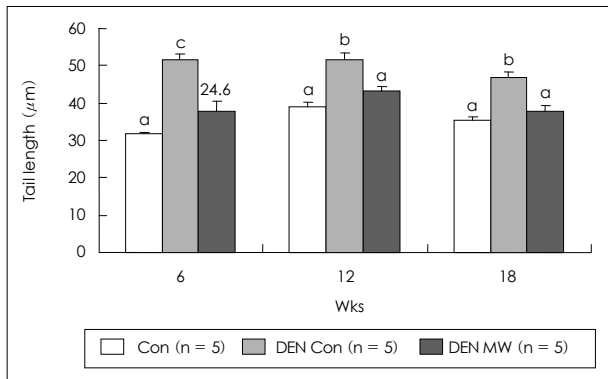


Fig. 3. Effect of 6-, 12- and 18-weeks treatment with a magnetic water on leukocyte DNA damage represented as tail length in diethyl nitrosamine (DEN)-treated ICR mice, respectively. Control: Negative control (n = 5), DEN control: Diethyl nitrosamine positive control (n = 5), DEN MW: DEN + Magnetic water (n = 4). Means with different letters are significantly different from control group (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

투여 실험동물인 ICR 마우스를 18주 동안 사육한 결과, 12주에서의 수분섭취량이 대조군에 비해 DEN 투여군 및 자화수 섭취군에서 유의적인 감소를 보였다. 그러나 6주와 18주의 경우 모든 군에서 체중변화나 수분섭취량에 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 2).

자화육각수를 6주, 12주, 18동안 섭취시킨 후 발암물질인 DEN을 투여하여 임파구 DNA 손상정도를 세가지 지표로 살펴본 결과는 Fig. 2-4와 같다. 먼저 DNA 손상 정도를 DNA in tail (%) 지표로 본 결과 (Fig. 2), 실험 6주 후에 일반음용수를 투여한 대조군 (19.0 ± 0.2%)에 비해 양성 대조군인 DEN 투여군 (34.2 ± 1.5%)에서 유의적으로 증가하였으며 자화수 투여군 (25.4 ± 1.2%)에서 유의적으로 감소하였다. 이러한 현상은 12주에서도 나타나서 12주

섭취 후에도 대조군 (21.1 ± 0.6%)에 비해 DEN 투여군 (35.3 ± 0.8)에서 증가하였으며 자화육각수 투여군 (26.9 ± 0.6%)에서 유의적으로 감소하였다. 마찬가지로 18주 투여 후에도 대조군 (20.5 ± 0.4%)에 비해 DEN 투여군 (32.7 ± 1.1%)에서 높았고 자화수 투여군 (24.5 ± 0.9%)에서 유의적으로 낮아졌다 (Fig. 2). 각 군별로 시간에 따른 DNA 손상도 변화를 보면 대조군에서 6주에 비해 12주와 18주에서 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었으며 각 군 모두 6주, 12주, 18주 동안 DNA in tail (%) 지표에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

DNA 손상의 다른 지표인 tail length에서도 마찬가지로 현상이 나타났다 (Fig. 3). 6주 사육 후에 대조군 (31.7 ± 0.5 µm)에 비해 DEN 투여군 (51.5 ± 1.5 µm)에서 유의적으로 증가하였고 자화수 투여군 (37.9 ± 2.7 µm)에서 감소하였다. 이러한 현상은 12주에서도 나타나서 대조군 (39.1 ± 1.2 µm)에 비해 DEN 투여군 (51.6 ± 1.8 µm)에서 유의적으로 증가하였고 자화수 투여군 (43.2 ± 1.2 µm)에서는 대조군 수준으로까지 감소하였다. 마찬가지로 18주 투여 후에도 대조군 (35.3 ± 1.0 µm)에 비해 DEN 투여군 (46.8 ± 1.5 µm)에서 증가하였고 자화수 투여군 (37.8 ± 1.5 µm)에서는 감소하였다 (Fig. 3). 대조군, DEN 투여군, 자화육각수 투여군 모두 6주, 12주, 18주 섭취하는 동안 시간에 따른 DNA 손상도 변화는 Tail length 지표에서도 유의적으로 나타나지 않았다.

DNA 손상도를 DNA in tail (%)와 tail length를 곱한 값인 tail moment 지표로 본 결과도 같은 경향을 보였다 (Fig. 4). 실험 6주 후에 분석한 tail moment 값은 대조군 (6.3 ± 0.1)에 비해 DEN 투여군 (18.7 ± 1.3)에서 유의적으로

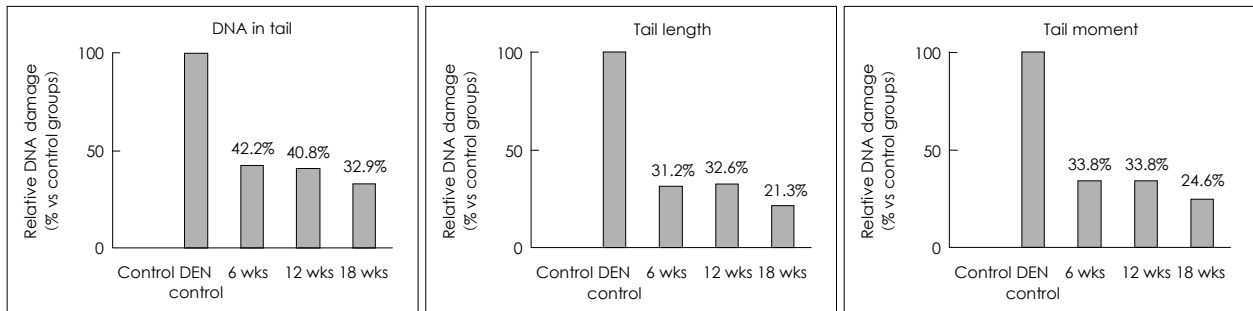


Fig. 5. Comparison of relative DNA damage levels (%) among negative control, positive diethyl nitrosamine (DEN) control, and 6-, 12-, 18-weeks magnetic water treated groups in DEN-treated ICR mice leukocyte. Control: Negative control, DEN control: Diethyl nitrosamine positive control, and DEN MW: DEN + Magnetic water. Means with different letters are significantly different from control group ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

증가하였고, 자화수 투여군 (10.5 ± 1.2)에서 유의적으로 감소하였다. 섭취 12주 후의 tail moment도 대조군 (8.6 ± 0.4)에 비해 DEN 투여군 (19.3 ± 0.8)에서 유의적으로 증가하였고, 자화수 투여군 (12.1 ± 0.7)에서 유의적으로 감소하였다. 마찬가지로 18주 섭취 후 tail moment로 본 DNA 손상정도도 대조군 (7.7 ± 0.3)에 비해 DEN 투여군 (16.6 ± 1.0)에서 증가하였고 자화수 섭취군 (9.9 ± 0.7)에서는 대조군의 수준으로 유의적으로 감소하였다 (Fig. 4).

자화수를 6주, 12주, 18주 동안 투여한 후 DEN 투여 쥐의 기간에 따른 임파구 DNA 손상 정도를 상대적 손상도로 비교해 본 결과는 Fig. 5와 같다. 대조군을 0으로 하고, 양성대조군인 DEN 투여군을 100으로 하였을 때 DNA in tail (%)로 본 자화수 투여군의 DNA 손상정도는, 6주엔 42.2%, 12주엔 40.8%, 그리고 18주 투여 후에는 32.9%로 시간이 길어짐에 따라 계속 감소해 나가는 경향을 보였다. 이와 같은 현상은 DNA 손상의 다른 지표인 tail length와 tail moment에서도 확인할 수 있었으며 역시 대조군의 손상도를 0으로 하고 양성대조군인 DEN 투여군을 100으로 하였을 때, 자화수 투여군의 tail length는 31.2%, 32.6%, 21.3%로 감소하였고 tail moment도 33.8%, 33.8%, 24.6%로 지속적으로 감소하였다. 이는 자화수 섭취가 실험동물의 DNA 손상에 미치는 영향을 기간별 및 각 군별로 알아보기 위해 이원 분산분석을 행한 결과, 각 군별 뿐 아니라 기간에 따라서도 유의적인 차이를 보인 것으로도 확인되었다 (자료 미제시).

결과를 요약하면 자화수의 DNA 손상 감소효과는 자화수 섭취 기간 6주 후 부터 나타났으며, 12주 후까지는 6주 후와 큰 차이가 나타나지 않았으나, 18주 후엔 6주 혹은 12주 후에 비해 DNA 손상 감소효과가 더 크게 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 6주 이상의 자화수의 장기 섭취는 외부로부터 발생되는 발암물질에 의한 임파구 DNA 손상 억제 효과가 있는 것으로 생각되며 18주 이상의 장기 섭취

일 경우 그 효과가 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

고 찰

자화육각수는 예로부터 구전으로 당뇨병, 암 등의 치료에 효과적이라고 알려져 왔으나 그의 생리활성에 대해서는 많이 연구되지 않고 있다. 1998년 미국의 Johnson 등⁷⁾은 자화수의 섭취가 치근막 환자의 치석을 감소시키는 효과가 있다는 보고하였으며, Ma 등⁸⁾은 자화수가 glutamate decarboxylase 활성을 증가시킨다고 하였다. 전통 중의 (Traditional Chinese Medicine)에서는 자화수를 마시면 혈액의 점도를 감소시키고 세포막의 투과성을 증가시킨다고 여겨져 왔으며 자화수는 노화와 피로를 막아주는 기능이 있다고 믿고 있다.⁸⁾ 그러나 현재까지 이러한 신념을 뒷받침 할 만한 충분한 임상적 관찰이나 만족스러운 수준의 실험 연구 결과들이 매우 제한되어 있는 실정이다. 그 외 1980년대에 중국을 중심으로 자화수의 회충증 치료 효과,⁹⁾ 결석 용해효과^{11,12)} 등이 보고되었으나 과학적인 근거를 가진 연구는 많이 이루어지지 않고 있다.

자화수는 일반 음용수에 비해 pH와 전기전도율 (electric conductivity)이 높다.¹⁷⁾ 물에 자장을 걸게 되면 물의 삼투압이 높아져서 세포막을 통한 침투성 (permeability)이 강해진다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 세포배양 실험을 해보면 static magnetic field는 DNA 손상을 일으키며 strong magnetic field는 orientation phenomena (정위현상)를 유도할 수 있다.²⁰⁾ 또 자화된 토양은 respiration rate, invertase activity, 그리고 fertility capability를 보이며,²¹⁾ 자장은 세포 내액과 세포내 물질에 직접적으로 영향을 주어 세포 내 효소들을 활성화시키고 생체내 생화학적 반응들을 가속화시킨다.²²⁾

본 연구에서 일반 음용수를 9,000~13,000 가우스의 자장에 통과시켜 자화수를 제조한 후에 일반 물 대신 자화수를 동물에 섭취시킨 후 암의 초기단계인 백혈구 DNA 손

상 정도에 미치는 영향을 보고자 하였다. 동물에 사용하는 발암물질로는 DEN을 사용하였다. 연구 결과 DEN으로 DNA 손상을 유발한 동물에 있어서 자화수의 DNA 손상 감소효과가 나타났고 이 효과는 자화수 섭취 6주 후 부터 나타났으며, 18주 후엔 DNA 손상 감소효과가 더 크게 나타났다 (Fig. 5). 즉 6주 이상의 자화수의 장기 섭취는 외부로부터 발생하는 발암물질에 의한 임파구 DNA 손상 억제 효과가 있으며 18주 이상의 장기 섭취일 경우 그 효과가 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

이렇게 자화수가 물의 microstructure에 미치는 생리적 영향, 나아가 생체의 DNA 손상 정도에 미치는 영향에 대한 기전은 확실하지 않다. 현재까지 문헌에 보고된 것도 아주 적으며 그나마도 자화수가 효소 활성도에 미치는 영향 등이 있을 뿐이다. 본 연구실에서 수행한 선행 예비연구에서도 일반 음용수를 섭취한 당뇨 동물군에 비해 자화수각수를 섭취한 당뇨 동물군의 DNA 손상정도가 감소하는 경향을 보임을 관찰한 바 있으나, 어떤 기전에 의해 자화수각수가 동물의 DNA 손상 정도를 감소시키는지에 대해서는 아직도 알려지지 않았다.

자화수의 생리적인 효과에 대한 기전의 하나로 glutamate decarboxylase 활성도의 증가가 제안되었다. Ma 등⁹⁾은 자화수의 효소활성도에 미치는 영향을 정량적으로 관찰하고 평가하기 위한 전위차 효소전극 (potentiometric enzyme electrode)을 개발하였으며 이 전극으로 측정된 결과, 자화수가 glutamate decarboxylase의 활성도를 약 30% 정도 유의적으로 증가시키는 것을 관찰하였다. 이는 자화수로 인해 형성된 약한 자장에서 자화수 분자들 간의 상호작용의 감소로 인해 효소와 자화수 간의 상호작용이 촉진되고 이것이 효소의 구조에 영향을 주어 효소 활성도를 변화시키는 것으로 보인다.

물속에 있는 전해질들은 이온화 정도가 높는데 여기에 자기 처리를 하면 이온의 운동에너지가 전기에너지로 변화되면서 물의 화학적, 물리적 특성이 변화되어 전해질 이온은 다른 것과 결합하기 쉬운 상태로 활성화 된다. 이렇게 활성화된 전해질들은 체내에서 흡수가 빨라지게 되어 조직세포에서의 생체 활성이 촉진되어 체내 대사과정에서 효소의 작용을 활성화시킬 수 있다.⁶⁾

따라서 본 연구에서 자화수 섭취 후에 동물의 DNA 손상 정도가 낮아진 것도 생체 효소활성도와 관련이 있을 것으로 추론된다. 인체에는 수많은 효소가 있고 그들의 생리학 혹은 생화학적 대사와 병리학적 과정들은 특정한 효소의 활성이 촉진되거나 저해되는 것과 매우 밀접하게 상호 연관되어 있기 때문이다. 그러나 본 실험에서 DNA 손상 회

복과 관련된 항산화 효소 활성도들을 측정하지 않았으므로 이를 확인할 수는 없었다.

자화수는 체내에서 흡수되면 간 문맥을 통해 심장으로 가서 전신으로 순환되는데 혈액의 운동에너지 일부가 전기 에너지로 변화하여 혈액 속에 새로운 전기가 발생되며 전기에 의하여 지금까지 이온으로 되어 있지 않은 전해질들도 이온으로 바뀐다.⁶⁾ 이런 이온들이 자율신경에 작용하면 혈액순환을 원활하게 하므로 혈액순환과 관련된 여러 질환들을 치료하는 효과를 증진시킬 수 있을 것이다.

자화수의 생리적인 효과에 대한 다른 연구로 신장이나 요도에서의 결석형성을 저해하는 효과가 있는 것이 보고되었다.^{10,12)} 물을 자화시키면 물 분자 속의 수소결합이 깨져서 물의 분자간 힘이 감소되고 이렇게 되면 자화수에 있는 물질들의 용해도가 증가하며⁸⁾ 이 기전에 의해 자화수가 결석의 형성을 저해하거나 요도결석 형성이 감소되는 것으로 생각된다.¹⁰⁾

Watt 등¹¹⁾은 자화수를 치아세척제로 사용하면 산화물의 축적인 치석을 감소시키는 효과가 있을 것이라는 가정에 double-blind study를 수행하였다. 64개의 세척기 중에서 30개는 일반 음용수로 나머지는 자화수를 공급하여 실험을 수행한 결과 자화수로 세척한 대상자에게서 일반 음용수로 세척한 대상자에 비해 치석과 플라크의 양이 44% 감소하였으며 ($p < 0.0005$), 면적으로는 42% 감소함 ($p < 0.0001$)을 관찰하였다. 자화수의 이러한 기능은 이론적으로 자기유체역학 (magnetohydrodynamics)의 원리에 기초하고 있으며 박테리아가 colony를 형성하여 치아에 플라크를 만드는 bonding 과정을 저해함으로써 치아의 표면에 들러붙는 deposits의 형성을 방해하게 되어 액체속의 무기질이 고체로 침착되는 것을 막아주는 것으로 생각된다.²³⁾

Watt의 연구가 자화수를 표준화 시키지 않은 점, 실험군과 대조군의 deposit 형성 능력을 매치시키지 않은 점, 그리고 치석과 플라크를 분리하지 않은 점 등의 문제가 있는 점을 비판한 Johnson 등⁷⁾은 32명의 환자들을 대상으로 double-blind cross-over design을 사용하여 자화수의 섭취가 치근막 환자의 치석을 감소시키는지 알아보는 연구를 새롭게 수행한 결과, 자화수 사용 3개월 후 플라크 지표 (plaque index), 잇몸지표 (gingival index), 결착지표 (accretion index)가 모두 감소하였고, 자화수를 세척수로 사용한 군에서 일반 음용수를 사용한 군에 비해 치석과 잇몸 감염이 유의적으로 감소함을 관찰하였다. 치석은 무기질화된 플라크로써 Ca^{++} 과 PO_4^- 를 함유하고 있는 침 용액에 잠길 때 무기질화 되어 형성되는데 자화수는 단순히 이 무기질화 과정을 저해하고 예방함으로써 플라크는 정상적으로 형성

되나 플라크의 무기질화 과정이 저해되는 것으로 생각된다.⁷⁾ 자기유체역학의 이러한 원리는 1832년 Faraday에 의해 밝혀졌으며 초기엔 이 원리가 산업체에서 파이프에 침전물이 축적되는 것을 막는데 사용되었다.²³⁾

자화수가 생체 내에서 이렇게 다양한 생리활성이 있으나 각 활성에 대한 기전 연구는 매우 제한되어 있으므로 앞으로는 자화수 생리활성, 특히 암과 관련된 활성 및 그 기전에 대한 연구가 더 광범위하고 깊게 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요약 및 결론

최근 자석에 물을 통과시키어 물 분자구조를 이온 활성화시킨 자화수에 대한 관심이 증가하고 있다. 자화육각수는 생체에서 조직세포의 생체 활성을 증가시키고 혈액 순환 및 신진대사 과정을 촉진시킴으로써 세포에 활력을 더해 자연 치유력을 증대시키는 것으로 알려져 있으나 국내외적으로 이에 대한 과학적인 근거자료나 실험 연구는 많지 않다. Diethyl nitrosamine (DEN)은 DNA 손상 유발물질 중 하나로서 발암성 관찰이 쉽고 발암효과가 크게 나타나 실험동물의 발암물질로 자주 사용되고 있다. 따라서 본 연구는 자화육각수를 장기 투여할 경우, 그 투여 기간에 따라 발암물질로 DEN을 투여한 쥐의 DNA 손상 개선 정도가 달라지는지를 알아보려고 하는 목적으로 수행되었다.

실험동물로는 4주령 ICR 마우스 45마리를 사용하였고, 대조군 (일반 물을 투여한 음성대조군), DEN 투여군 (일반 물과 DEN을 투여한 양성대조군) 및 자화수 투여군 (자화수와 DEN을 투여한 실험군)의 세 군으로 나누어 18주 동안 사육하였다. DNA 손상 개선효과를 보기 위한 사육기간으로는 6주, 12주, 18주를 선정하였으며 6주, 12주, 18주간 사육한 후에, DNA 손상 유발을 위해 200 mg/kg B.W의 DEN (Diethyl nitrosamine)을 0.9% saline에 녹여 복강투여한 후 18시간이 지난 뒤 각각 희생시켜 심장에서 혈액을 채취하여 Comet assay를 실시하였다. 자화수 섭취에 의한 DNA 손상은 Comet assay의 세 가지 지표인 tail DNA (%), tail length 및 tail moment로 살펴보았다. 자화육각수를 6주, 12주, 18주 등 장기간 투여한 후 발암물질로 DEN을 투여한 쥐의 임파구 DNA 손상 정도를 살펴본 결과, 양성대조군인 DEN 투여군에 비해 자화수를 장기간 투여한 후에 DEN을 투여한 자화수 투여군의 경우 임파구 DNA 손상정도가 현저하게 감소함을 보여, 자화수 섭취 6주, 12주, 18주 후의 DNA 손상 감소정도는 tail DNA (%)의 경우 각각 57.8%, 59.2%, 67.1%, tail length의 경우 각각

68.8%, 67.4%, 78.7%, tail moment의 경우 각각 66.2%, 66.2%, 75.4%를 보였다. 이와 같은 자화수의 DNA 손상 감소효과는 자화수 섭취 기간 6주 후 부터 나타났으며, 기간이 길어질수록 더 크게 나타나 6주 혹은 12주에 비해 18주일 경우 유의적으로 더 크게 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 6주 이상의 자화수의 장기 섭취는 외부로부터 발생하는 발암물질에 의한 임파구 DNA 손상 억제 효과가 있는 것으로 생각되며 18주 이상의 장기 섭취일 경우 그 효과가 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Literature cited

- 1) Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7(1): 9-16
- 2) Wogan GN. Detection of DNA damage in studies on cancer etiology and prevention. *IARC Sci Publ* 1988; 89: 32-51
- 3) Santella RM. DNA damage as an intermediate biomarker in intervention studies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216(2): 166-171
- 4) Bonassi S, Neri M, Puntoni R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res* 2001; 480-481: 349-358
- 5) National Bureau of Statistics, Republic of Korea. Annual report on the cause of death statistics (Based on vital registration), Seoul; 2009
- 6) Kang BJ. Magnetized Water. Seoul: Soe-Um Media Pub Co. ; 2005. p.49-63
- 7) Johnson KE, Sanders JJ, Gellin RG, Palesch YY. The effectiveness of a magnetized water oral irrigator (Hydro Floss) on plaque, calculus and gingival health. *J Clin Periodontol* 1998; 25(4): 316-321
- 8) Ma YL, Ren H, Ren S, Zhen EK, Hao G, Zhao YW. A study of the effect of magnetized water on enzyme activities by potentiometric enzyme electrode method. *J Tongji Med Univ* 1992; 12(4): 193-196
- 9) Wu J. Further observations on the therapeutic effect of magnets and magnetized water against ascariasis in children--analysis of 114 cases. *J Tradit Chin Med* 1989; 9(2): 111-112
- 10) Zhang YS, Wu HW. Effect of magnetic water on urinary calculi--an experimental and clinical study. *Z Urol Nephrol* 1987; 80(9): 517-523
- 11) Watt D, Sutton CD. The effect of oral irrigation with a magnetic water treatment device on plaque and calculus. *J Clin Periodontol* 1993; 20(5): 314-317
- 12) Zhang YS, Wu HW. Effect of magnetized water on urinary calculi: an experimental and clinical study. *Acta Acad Med Wuhan* 1984; 4(1): 31-37
- 13) Akintonwa DA. The derivation of nitrosamines from some therapeutic amines in the human environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 1985; 9(1): 64-70
- 14) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-

- 76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11): 1939-1951
- 15) Park YK, Kim JS, Jeon EJ, Kang MH. The Improvement of Chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*) extract supplementation on the blood glucose and cellular DNA damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 2009; 42(1): 5-13
- 16) Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 184-191
- 17) Xu YB, Sun SY. Effect of stable weak magnetic field on Cr (VI) bio-removal in anaerobic SBR system. *Biodegradation* 2008; 19(3): 455-462
- 18) Gonet B. Influence of constant magnetic fields on certain physicochemical properties of water. *Bioelectromagnetics* 1985; 6(2): 169-175
- 19) Lednev VV. Possible mechanism for the influence of weak magnetic field on biological system. *Bioelectromagnetics* 1991; 12(2): 71-75
- 20) Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 87(2-3): 213-223
- 21) Zhang JX, Yu JY. The effect of magnetic field on soil microorganism and enzymic activity. *Chin J Soil Sci* 1999; 30(1): 26-28
- 22) Liboff AR, Cherng S, Jenrow KA, Bull A. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity is altered by 20 μ T magnetostatic fields. *Bioelectromagnetics* 2003; 24(1): 32-38
- 23) Grutsch JF, McClintock JW. Corrosion and deposit control in alkaline cooling water using magnetic water treatment at amoco's largest refinery. *Corrosion* 1984; 84: Paper No. 330