

DNCB로 아토피가 유도된 NC/Nga생쥐에서 천연 탄산 온천수의 온도별 항아토피 효과

고가연¹ · 박정환¹ · 장순우¹ · 김윤하¹ · 박정미² · 안택원¹ *

The anti-atopic effect of natural carbonated hot spring water on
DNCB-induced NC/Nga mice under different temperature.

Go Gayeon¹ · Park Junghwan¹ · Jang Soonwoo¹

Kim Yoonha¹ · Park Jungmi² · Ahn TaekWon¹ *

¹Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

²Dept. of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives : The aim of this study is to investigate the effect of natural carbonated hot spring water (NCHW) on DNCB-induced NC/Nga mice, an atopic dermatitis (AD) model.

Methods :At first, NC/Nga mice were prepared and induced to have atopic lesion on their back skin by dinitrochlorobenzene (DNCB). They swam for 20 minutes everyday in tanks where the one is filled with 28°C NCHW, the other is with 25°C carbonated hot spring water and another is with artificial carbonated hot spring water (ACHW). After 3 weeks, We assessed the skin clinical score and macroscopic appearance, total IgE, IgG1 levels, WBC differential counting, IFN- γ , IL-4, IL-13, TNF- α production levels and histological changes.

Results : There are meaningful results of improving atopic lesion-state by relieving the count of total IgE, IgG1 levels, WBC differential counting, IFN- γ , IL-4, IL-13, TNF- α production levels and recovering skin clinical score in the group with 28°C NCHW in comparison with the other groups.

Conclusions : The NCHW may have potential as an effective treatment for atopic dermatitis.

Key Words : Natural carbonated hot spring water, Atopic dermatitis

I. 서론

아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 천식, 알레르기 비염 또는 피부염의 가족력이 특징인 아토피 상태가 피부에 나타나는 것으로, 습진성 피부병변과 극심한 소양감을 주소증으로 하는 만성 질환이다¹⁾. 항히스타민제가 搔痒症의 억제에 가장 흔하게 사용되며, 국소치료에 반응하지 않은

심한 악화에는 전신스테로이드를 경구 복용하거나 외용제로 사용한다²⁾. 그러나 항히스타민제는 졸림, 체중의 증가, 기억력 감퇴, 전립선 비대 등의 부작용이, 스테로이드 제제는 장기간 사용시 골다공증, 근육의 위축, 쿠싱증후군 등의 부작용이 보고되고 있으며, 치료 중에는 증상이 호전되거나 약을 끊을 경우 대부분 재발하는 경우가 많다³⁻⁵⁾. 따라서 현재 사용하는 두 약물의 단점을 보완하는 효과적이고 안전한 아토피 피부염 치료의 대체 요법들에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다⁶⁾. 국내의 경우 전체 환자 중 70%가 넘는 환자가 대체의학을 병용하였으며, 제일 많이 사용된 요법은 온천, 목욕 요법이었으며, 식이요법,

* 교신저자 : 안택원, 충남 천안시 서북구 노태산로 4 대 전대학교 천안한방병원 사상체질외과
E-mail : twahn@dju.kr Tel : 041-521-7535
투고일 : 2016년08월07일 수정일 : 2016년08월14일
게재일 : 2016년08월15일

한약, 건강보조식품 순으로 가장 많이 사용된 것으로 밝혀졌다⁷⁻⁸⁾.

상기 서술된 병용 요법 중 제일 많이 사용된 온천 요법의 경우, 아토피뿐만 아니라 여러 만성 피부질환에 대한 치료수단으로 오래전부터 사용되어 왔다. 수 천년전 중국의 『黃帝內經·素問』에 淸水法을 이용한 기록이 있고 우리나라에서는 고려시대부터 온천을 이용하여 질병을 치료하였으며, 조선시대에 이르러 의학적인 요소를 접목한 약 목욕 등으로 발전하였다⁹⁾. 최근 여러 연구에서 온천수의 항아토피 효과에 대한 검증이 이루어지고 있는데, 성인 아토피 피부염 환자의 식염천 입욕 후 피부장벽지표 및 아토피 임상증상의 호전을 보인 심 등¹⁰⁾의 연구, 온천욕 후 환자의 소양감의 유의한 감소를 보인 이 등¹¹⁾의 연구가 대표적이다. 온열효과 외에도 황(sulfur), 마그네슘(magnesium), 탄산(carbon dioxide) 등의 성분 자체의 항염증 효과¹²⁾, 경피하의 모세혈관과 세동맥 확장 유도, 피부피복에 의한 보습 및 보온 효과 등의 약리작용 효과가 주목받고 있으며, 온천수 자체의 입욕제 혹은 외용제로의 가능성 또한 생각해 볼 수 있다¹³⁾.

이에 본 연구에서는 아토피를 유발한 NC/Nga 생쥐를 온도를 달리한 천연 탄산온천수와 인공 탄산온천수에 입욕시킨 후 피부발진점수, 호산구 · 호염구 · 호중구 등의 백혈구 수치, IgE,

cytokine 수치의 변화 및 등조직세포 관찰을 통하여 아토피 피부염의 억제에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1) 동물

아토피 피부염 병변을 관찰하기 위하여 수컷이며 7 주령의 20~22g NC/Nga 생쥐(SLC, Inc, Japan)를 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고품사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인(승인번호 : DJUAR2015-053)을 받았다.

2) 재료

실험에 사용한 천연 탄산수의 경우 충남 천안시 동남구 성남면 용원리 224-11번지에 위치한 테딘 워터파크에서 공급 받았다. 온도는 25℃, 28℃의 2 종류로 나누어 공급 받았다. 천연 탄산온천의 탄산(H₂CO₃)과 중탄산(HCO₃)의 비율은 1.12 : 1 이며, 백분율(%)로 환산하면 전체 탄산

Table.1. The Composition of Natural Carbonated Hot Spring Water

	NCHW	ACHW
pH	6.28	5.35
Na (mg/L)	46.5	12.0
Ca (mg/L)	177	121
Mg (mg/L)	43.9	10.7
HCO ₃ (mg/L)	809	305
H ₂ CO ₃ (mg/L)	906.1	2,913
Si (mg/L)	36.5	16.8
F (mg/L)	2.75	0.12
SO ₄ (mg/L)	12.5	34.3
Sr (mg/L)	0.93	0.31

NCHW: Natural carbonated hot spring water.

ACHW: Artificial carbonated hot spring water.

염종의 52.8%가 탄산이다.

인공 탄산수의 경우 지하수를 40℃로 데운 후 대전대학교부속 천안한방병원에서 제조하였으며, 탄산가스 주입장치를 통하여 지하수에 탄산가스를 넣고 나서 미네랄 팩을 통과시켜 제조하였다. 함유된 탄산은 탄산, 중탄산의 형태로 존재하고, 그 함유량은 탄산(H₂CO₃) 2913mg/L, 중탄산(HCO₃) 305mg/L이며, 그 구성비는 9.55 : 1이다. 천연 탄산수와 인공 탄산수의 주요 구성은 다음과 같다(Table.1).

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 적혈구 용혈액(ACK lysis solution), DMEM(Dubecco's modified Eagle's medium) 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate(SDS), Streptomycin(Gibco, USA)을 사용하였다. HPLC 표준시료는 rutin(Sigma,USA)과 quercetin(Sigma, USA)제품을 사용하였다. 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), T-stim은 BD Bioscience(USA)사 제품을, anti-B220-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD3 mAb 등은 Pharmingen사(USA) 제품을, IL-4, IL-5, IFN- γ , 그리고 IL-13 ELISA kit는 BioSource사(USA) 제품을, IgE ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit는 Shibayagi사(Shibukawa, Japan) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO₂ 배양기(Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, USA),

spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Molecular Devices, USA), HPLC (High performance liquid chromatography ; Waters Co. USA) 등을 사용하였다.

4) 실험군 분류 및 방법

(1) 피부염 유도 및 시료처리

7주령의 NC/Nga 생쥐를 그룹당 3마리씩 7그룹을 1주일 동안 적응시킨 후 정상군(SPF-NC/Nga)을 제외한 나머지 NC/Nga 생쥐의 등에 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치 후 1%의 DNCB(dinitrochlorobenzene)가 들어 있는 아세톤 : 올리브오일(3 : 1) 200 μ l를 제모 부위에 도포하고, 3일 후 2차 도포하였다. 1차 도포 후 7일째부터는, 1주일에 3회씩 3주간 0.4% DNCB 용액 150 μ l를 재차 도포 (10주령 ~13주령)하여 아토피 피부염을 유발시켰다.

(2) 아토피 개선용 탄산온천수 처리

아토피 유발을 하지 않은 SPF-NC/Nga 정상군을 제외한 나머지 6개 군에 DNCB로 유도하여 아토피피부염을 유발한 후, 한 군은 아무 처치도 하지 않은 대조군(DNCB-NC/Nga), 한 군은 25℃의 동일한 수돗물에서 수영시켜 동일한 스트레스를 유발한 수돗물 군(DNCB-Tap_W), 천연 탄산온천수 실험군은 DNCB로 유도한 생쥐를 각각 25℃, 28℃의 천연 탄산온천수에서 수영을 시켰으며(DNCB-Tedin 25℃, DNCB-Tedin 28℃), 인공탄산수 실험군은 DNCB로 유도한 생쥐를 인공탄산수에서 동일하게 수영을 시켰다. 양성대조군실험군은 DNCB로 유도한 생쥐를 입욕 없이 면역억제제의 하나인 FK506 0.5%용액을 환부에 매일 100 μ l씩 도포하였다. 습도 및 온도 조건은 동일하게 유지하였으며 수영 시간의 경우 3주간 매일 20분간 유지하였다(Fig.1).

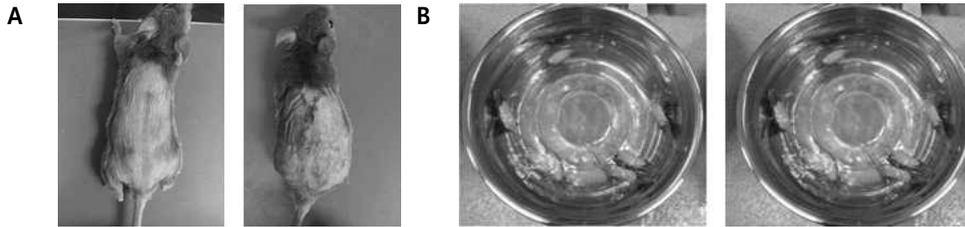


Fig. 1. DNCB-induced NC/Nga mice(A), bathing of DNCB-induced NC/Nga mice(B).

(3) 피부발진 점수 측정

실험군의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 육안 평가법을 이용하여 입욕수영 종료 후 육안평가를 실시하였다. 육안평가 항목은 Yamamoto의 평가항목을 참고하여 erythema / hemorrhage, dryness / scarring, edema, excoriation / erosion, lichenification 5 가지 항목으로 하고 육안평가 결과는 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타냈다. 각각의 항목은 없음 (0), 약함 (1), 중증도 (2), 심함 (3) 으로 채점하였으며 최소 0 점에서, 최고 15 점 사이의 점수를 측정하였다.

(4) 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구 세포수의 측정

최종 실험종료 후 heparin (20 IU) 30 μ l 처리된 3ml syringe 주사기로 심장 혈액 0.8ml를 채취하였다. 전혈을 서울의과학연구소(서울시 용산구)에 의뢰하여 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구의 총 세포수를 자동 혈액 분석기로 측정하였다.

(5) 채혈 및 IgE 와 IgG1 측정

NC/Nga 생쥐의 후안와 정맥총 (retro-orbital venus plexus)에서 10주(피부염 유도기), 12주(실험 1주), 14주(실험 3주)에 capillary tube를 이용하여 약 100 μ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500rpm에서 20분간 원심분리한 후 30 μ l의 혈청을 분리하였다. 혈청은 취하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였고 NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE, IgG1 농도 측정은 ELISA로 IgE 수준을 측정하였다.

(6) 비장세포 분리 및 사이토카인 측정

NC/Nga 생쥐 실험 종료 후 비장을 적출하여 100 mesh로 비장세포를 분리하였으며, 전날

CD3 mAb 1 μ g/ml을 96well plate에 coating하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2회 수세하였다. 분리한 비장세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 DNCB extract가 coating된 각각의 well에 5x10⁵ 세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48시간 동안 배양한 후, 원심분리기 2,000rpm에서 3분간 원심분리한 후 200 μ l의 배양상청액을 얻었으며 배양상청액 내의 IL-4 (BioSource, USA)와 IFN- γ (BioSource, USA), 혈청내 IL-5 (BioSource, USA), 그리고 혈청내 IL-13 (R&D system, USA)의 수준 측정은 ELISA로 측정하였다.

(7) 조직 분석

등 쪽 목 부분의 환부 피부를 떼어내어 10% paraform-aldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였으며 그 조직을 파라핀으로 포맷하였고, 5 μ m 두께로 block을 만들었다. 그 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin (H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 (x200, Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

5) 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired Student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, P<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001)

III. 결 과

1) 피부발진의 육안 소견 및 skin clinical score에 대한 효과

정상군에 비하여 DNCB를 이용한 대조군에서 아토피 피부염의 피부발진 증상이 확인되었고, 0.5% FK506를 사용한 양성대조군, 3주간 하루 20분씩 천연탄산온천수 28℃와 천연탄산온천수

25℃에서 입욕한 실험군은 대조군에 비하여 피부 발진이 줄어들었다, 그러나 수돗물 및 인공탄산온천수 입욕군은 대조군과 차이가 없었다 (Fig.2A). Skin clinical score는 대조군에서 증가하였고 FK506를 사용한 양성대조군, 3주간 하루 20분씩 천연탄산온천수 28℃와 천연탄산온천수 25℃에서 입욕한 실험군은 대조군에 비하여 피부 발진이 줄어들었으나 수돗물 및 인공탄산온천수 입

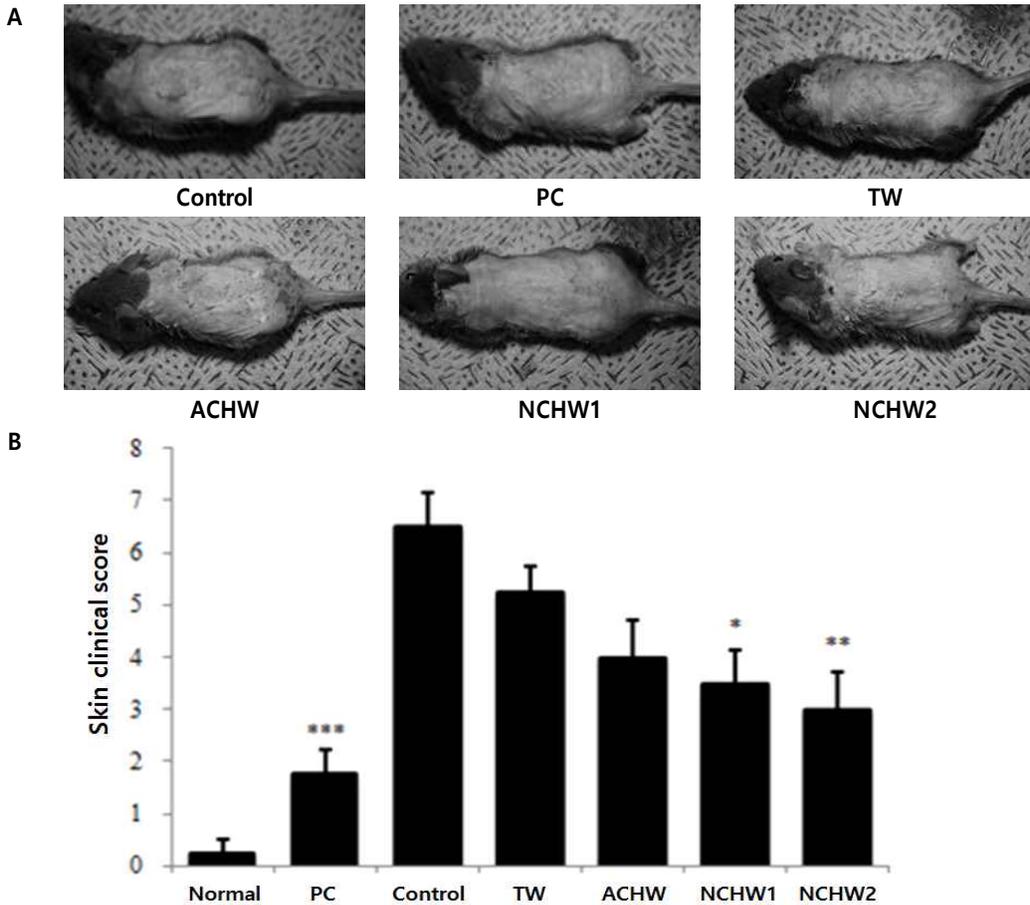


Fig. 2. Effect of natural carbonated hot spring water on the development of AD-like dorsal skin lesions in DNCB-treated NC/Nga mice. Representative feature changes in DNCB-induced skin lesions on the back. The photos were taken 3 weeks after sensitization of each group of mice (A). The skin clinical scores were evaluated on days 21. Data are presented as mean±SE (***p<0.001, **p<0.01 and *p<0.05). Control, control group; PC, FK506 treated positive control group; TW, tap water treated group; ACHW, artificial carbonated hot spring water treated group, NCHW1, 28℃ natural carbonated hot spring water, NCHW2, 25℃ natural carbonated hot spring water.

육군은 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig.2B).

2) NC/Nga 생쥐의 등피부 조직 검사 및 분석

실험 종료 후 NC/Nga 생쥐의 등피부조직을 각 군마다 biopsy하여 H&E 염색과 dermis에 침윤된 비만세포(mast cell)를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색을 실시하였다. 그 결과 대조군과 수돗물 입욕군은 epidermis가 두께(blue arrow)가 hyperplasia로 현저하게 확장되어 그 주변에

hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포(red arrow)의 침윤 등이 정상군에 비하여 현저하게 증가됨이 확인되었다. 0.5% FK506를 사용한 양성대조군, 3주간 하루 20분씩 천연탄산온천수 28℃ 및 천연탄산온천수 25℃에서 입욕한 실험군은 정상군에 가깝게 epidermis의 두께가 줄어들었고, 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis, parakeratosis 그리고 비만세포(red arrow)의 침윤

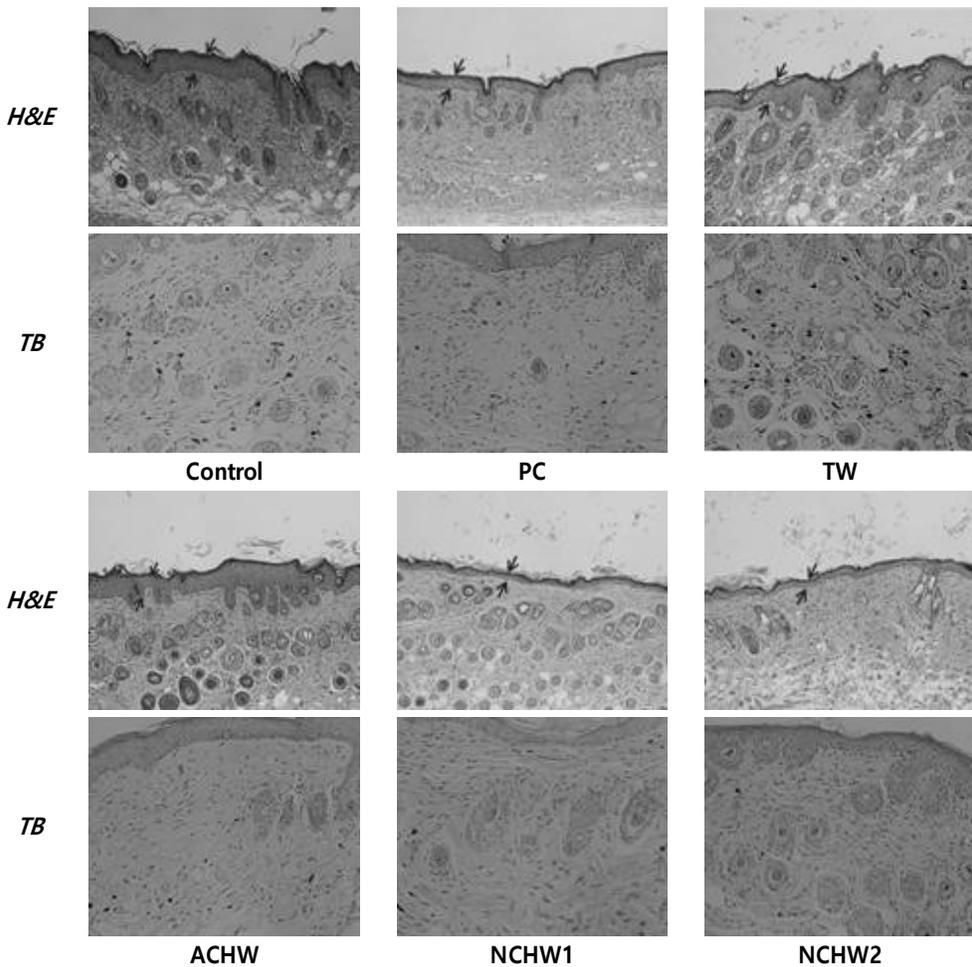


Fig. 3. Effect of natural carbonated hot spring water on the histological features of AD-like dorsal skin lesions in DNCB-treated NC/Nga mice. The photos were taken 3 weeks after sensitization of each group of mice (A). Control, control group; PC, FK506 treated positive control group; TW, tap water treated group; ACHW, artificial carbonated hot spring water treated group, NCHW1, 28℃ natural carbonated hot spring water, NCHW2, 25℃ natural carbonated hot spring water.

등이 현저하게 감소를 나타내었다, 그러나 수돗물 및 인공탄산온천수 입욕군은 상대적으로 적은 감소를 나타냈다(Fig. 3).

3) 혈청 IgE 및 IgG1수준에 미치는 영향

혈청 IgE와 IgG1의 양은 8주령 NC/Nga 생쥐에서 12주령으로 되면서 자연적으로 증가가 되고, DNCB-CT군은 12주에서 DNCB를 도포하지 않은 정상군 군에 비하여 혈청 IgE와 IgG1의 수준이 크게 증가하였다. 12주부터 3주간 FK506을 도포한 양성대조군은 DNCB-CT군에 비하여 현저하게 IgE와 IgG1 수준이 감소하였다. DNCB-ACS_W군은 혈청 IgE 및 IgG1수준이 DNCB-Tap_W군과 차이가 없었다. DNCB-Tedin_28°C군 및 DNCB-Tedin_25°C군의 혈청내 IgE와 IgG1 수준은 DNCB-Tap_W군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타내었다(p<0.01)(Fig. 4).

4) NC/Nga mice의 비장세포 및 혈청 내의 Cytokine(IL-4, IFN-γ, IL-13, TNF-α) 측정

DNCB를 도포하지 않은 정상군에 비하여 DNCB-CT군의 경우 IL-4수치가 약 8배 이상

증가하였으며, IFN-γ의 경우 약 4배 이상 증가하였다. DNCB-Tap_W군에 비하여 IL-4,IFN-γ 수치가 DNCB-Tedin_28°C군, DNCB-Tedin_25°C군이 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다(p<0.05). DNCB-Tap_W군에 비하여 DNCB-ACS_W군은 IL-4 수치에 있어서 유의한 차이가 나타나지 않았으나, IFN-γ의 경우 DNCB-ACS_W군이 DNCB-Tap_W군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(p<0.05)(Fig. 5).

IL-13과 TNF-α의 경우, DNCB-Tap_W군에 비하여 DNCB-Tedin_28°C군(p<0.01),DNCB-Tedin_25°C군(p<0.01)이 모두 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다. 또한 DNCB-Tap_W군에 비하여 DNCB-ACS_W군은 IL-13의 생산량이 약간 감소하였으나 유의성은 없었고, TNF-α만 통계적으로 유의하게 감소하였다(p<0.05)(Fig. 6).

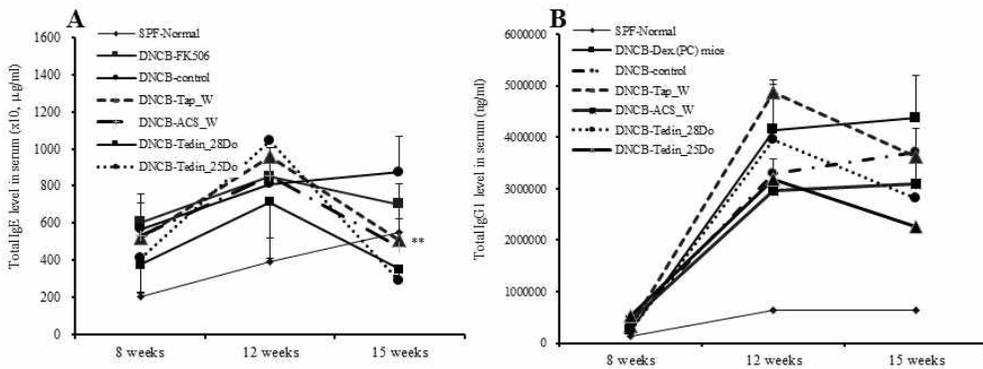


Fig. 4. Serum IgE and IgG1 elevation and development of atopy dermatitis skin lesions-induced in NC/Nga mice by DNCB. DNCB_Control, control group; DNCB_FK506, treated positive control group; DNCB_Tap_W, tap water treated group; DNCB_ACS_W, artificial carbonated hot spring water treated group, DNCB-Tedin_28Do, 28°C natural carbonated hot spring water, DNCB-Tedin_25Do, 25°C natural carbonated hot spring water.

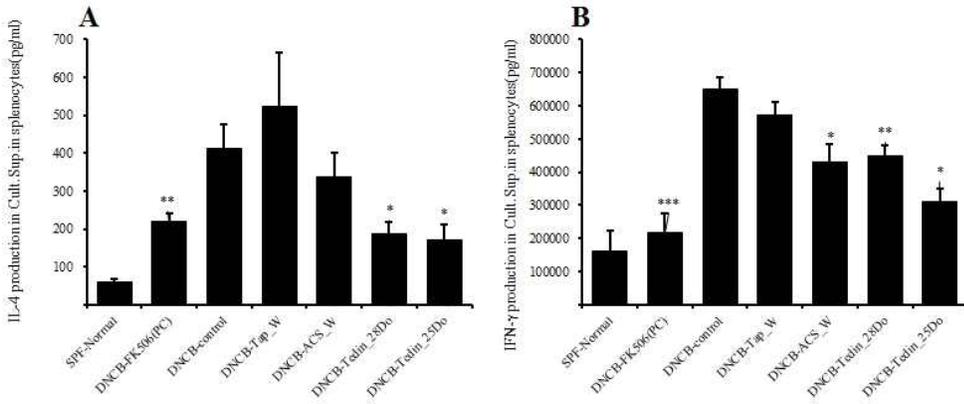


Fig. 5. Culture supernatant IL-4 and IFN- γ level in splenocytes and serum cytokines level in NC/Nga mouse by DNCB. DNCB_Control, control group; DNCB_FK506, treated positive control group; DNCB_Tap_W, tap water treated group; DNCB_ACS_W, artificial carbonated hot spring water treated group, DNCB-Tedin_28Do, 28°C natural carbonated hot spring water, DNCB-Tedin_25Do, 25°C natural carbonated hot spring water.

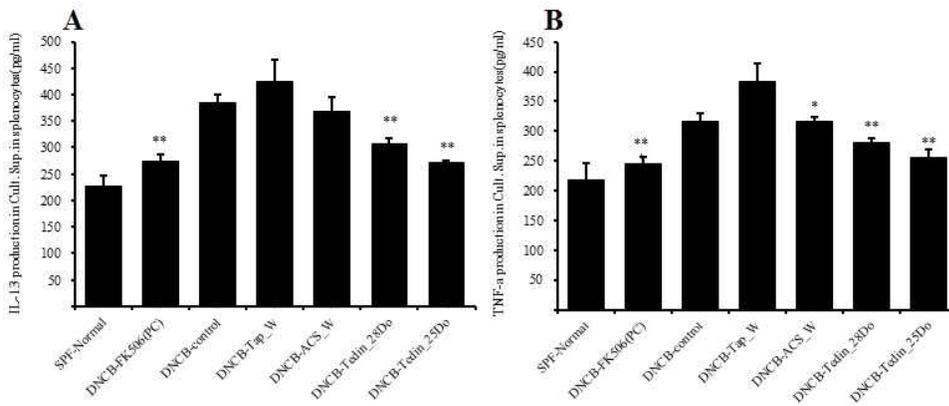


Fig. 6. Culture supernatant IL-13 and TNF- α level in splenocytes and serum cytokines level in NC/Nga mouse by DNCB. DNCB_Control, control group; DNCB_FK506, treated positive control group; DNCB_Tap_W, tap water treated group; DNCB_ACS_W, artificial carbonated hot spring water treated group, DNCB-Tedin_28Do, 28°C natural carbonated hot spring water, DNCB-Tedin_25Do, 25°C natural carbonated hot spring water.

5) NC/Nga생쥐의 혈액분석 (*hematology*)

실험종료 후 WBC의 수는 정상군에 비하여 대조군(DNCB-CT)이 30%이상 감소를 나타내었고, DNCB-Tap_W군, DNCB-ACS_W군의 WBC

수는 감소하였으나 통계적 유의는 없었다. 그리고 FK506군, DNCB-Tedin_28°C군, DNCB-Tedin_25°C군은 DNCB-Tap_W군에 비해 모두 WBC의 수의 증가를 나타내었으나 통계학적

유의성은 나타나지 않았다(Fig. 7A).

neutrophil과 monocytes은 정상군에 비하여 대조군(DNCB-CT)이 2배 이상 증가하였고, DNCB-Tap_W군, 그리고 DNCB-ACS_W군의 Neutrophil 수는 감소하였으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다. DNCB-Tap_W군에 비하여 DNCB-Tedin_28℃군, DNCB-Tedin_25℃군은 모두 Neutrophil과 Monocytes의 수가 감소하였으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 7B).

eosinophil의 경우 정상군에 비하여 대조군(DNCB-CT)이 4.5배 이상 증가하였고,

DNCB-Tap_W군, DNCB-ACS_W군의 eosinophil 수치는 현저하게 증가를 하였다. DNCB-Tap_W군에 비하여 DNCB-Tedin_28℃군, DNCB-Tedin_25℃군이 모두 eosinophils의 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성은 DNCB-Tedin_28℃군에서만 나타났다 ($p < 0.01$)(Fig. 7C).

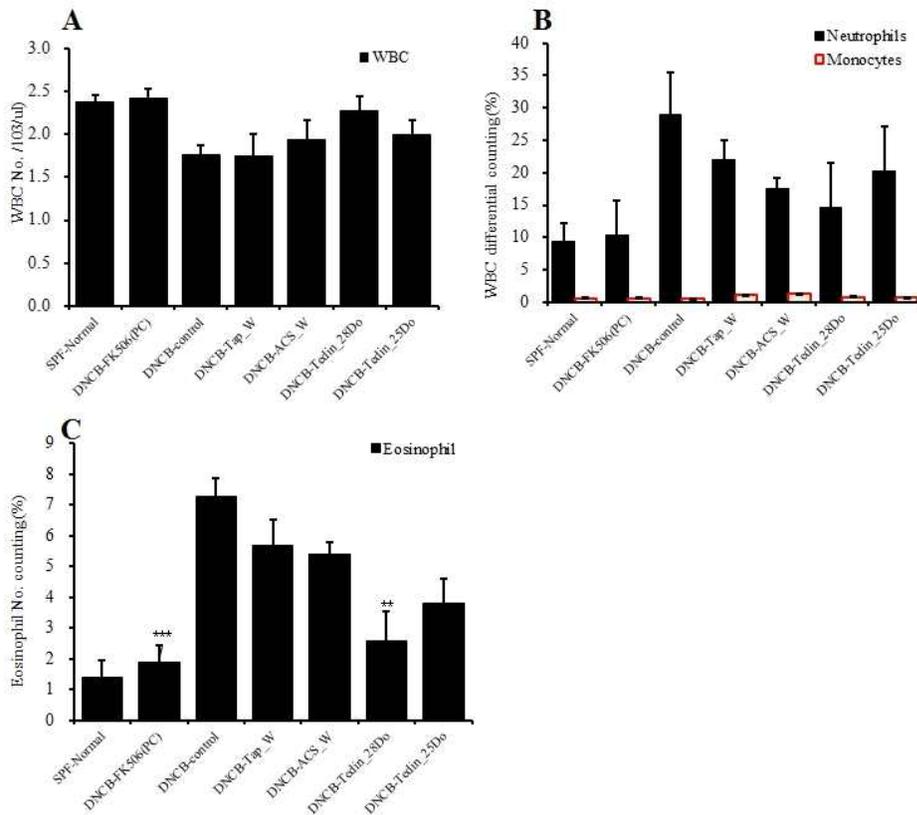


Fig. 7. Hematology in NC/Nga mouse. DNCB_Control, control group; DNCB_FK506, treated positive control group; DNCB_Tap_W, tap water treated group; DNCB_ACS_W, artificial carbonated hot spring water treated group, DNCB-Tedin_28Do, 28℃ natural carbonated hot spring water, DNCB-Tedin_25Do, 25℃ natural carbonated hot spring water.

IV. 고 찰

아토피 피부염은 알레르기 행진(allergic march)에 동반하는 질환 중 하나로, 영 유아에서 증상이 시작되며 우리나라에서 유병율이 점차 증가추세에 있다¹⁴⁾. 아토피 피부염은 다른 알레르기 질환과 마찬가지로 유전, 면역과 관련이 있는 내인성 요인과 환경, 사회적 요소의 외인성 요인이 복합적으로 관여하며, IgE 항체와 T cell, cytokine, 호산구(eosinophil)와 연관이 있다¹⁴⁻¹⁵⁾. 항원의 자극으로 IgE 항체가 생산되고 이것이 비만세포와 결합한 상태에서 지속적으로 항원의 자극을 받게 되면, cytokine, Histamine, Leukotrienes 등의 알러지 유발물질이 분비되게 된다. 또한 항원 자극 시 helper T cell 중 2형 T cell(Th2)이 활성화되면서 IL-4, IL-13 등의 분비가 늘어나고 호산구 생산이 활성화되게 된다¹⁶⁾. 이 기전으로 말미암아 아토피의 소양증 및 피부 염증 작용이 나타나게 된다.

서양의학에서 현재 사용되는 아토피 피부염 치료제로는 부신피질호르몬제 등의 스테로이드 제제, 항히스타민제, 인터페론- γ 등의 면역제제 등이 사용되어 유의성 있는 치료 효과를 보이나, 일부 환자들에게는 치료 반응이 적거나 과민 반응 및 간신독성 등으로 인한 부작용이 문제시 되고 있다¹⁷⁾.

한의학에서 아토피 피부염은 奶癬(胎斂瘡, 胎癬, 胎熱, 乳癬), 異位性皮炎으로 정의한다. 奶癬은 출생으로부터 1세 전후에 이르는, 영유아기 질환이고, 異位性皮炎은 영아기, 아동기, 성인기에 이르는 전 연령의 아토피성 피부염을 의미한다. 아토피성 피부염의 韓醫學的 辨證의 기준은 熱, 濕, 燥, 虛인 경우가 많고, 治法으로는 祛風, 清熱, 利濕, 益氣, 養血, 滋陰 등이 다용된다¹⁸⁾. 한의학적 치료로는 편백, 백선피, 별갑 등의 단방 약초가 아토피의 염증 반응 및 증상 개선에 유의한 효과가 있다는 연구가 있으며, 처방으로도 加味清心蓮子湯, 養血潤膚湯 등이 동물 실험에서 효과가 있음이 보고되었다¹⁹⁻²³⁾.

한의학에서는 온천요법의 원리를 “蓋水爲 萬

化之原”, “其體純陰, 其用純陽”, “水居卽營竭”이라 하여 인체장부 기기의 昇降出入이 水의 濡潤作用에, 氣血津液은 水의 滋營作用에 말미암은 것이다. 온천은 대체로 性味가 辛熱하고 약간의 독이 있어 목욕을 하게 되면 疥癬과 어떠한 瘡毒이든 제거할 수 있고 더불어 溫通經絡, 活暢氣血, 化癆舒筋, 精神愉快하게 한다²⁴⁾. 따라서, 기존의 문헌들을 총체적으로 볼 때, 기존 아토피 피부염의 한의학적 치료법인 養血, 滋陰의 의미를 온천요법의 한의학적 치료기전으로 설명할 수 있다.

본 연구에서는, 온천의 한의학적 효과에 입각하여 천연 탄산 성분이 포함된 테딘 워터파크 내 온천수와 인공 탄산 성분이 포함된 온천수를 이용하여 아토피 피부염에 대한 치료 효과에 대한 연구를 진행하였다. 탄산온천은 피부가 미끈미끈해지는 알칼리성분이 대부분을 차지하기 때문에 온열 및 염증에 대한 진정작용이 있고 피부의 혈행 및 말초 순환을 항진시키며, 중추 신경계에 반사하여 흡수작용을 촉진하며 신경통, 류마티스성 질환에 특히 효과가 뛰어나다. 또한, 낮은 온도임에도 일반적인 온탕의 효과인 통증, 경직, 피로감, 내장기관의 울혈 경감, 발한 증진에도 효과가 있다^{13,25)}. 본 논문에서는 천연 탄산온천수(테딘 온천수)의 온도별 사용에 대해 인공적으로 만든 탄산수와 함께 아토피 동물모델에서 호전도 여부 파악 및 면역기능 변화에 대해 비교하여 실험적으로 증명해 보고자 하였다.

상기 실험에 사용된 NC/Nga mice model은 사람의 아토피 피부염과 면역학적 변화가 유사하여 아토피 피부염 실험에 가장 일반적으로 이용되는 모델이다²⁶⁾.

NC/Nga mouse를 이용하여 7그룹으로 나누어, 아무처리 하지 않은 정상군을 제외한 나머지 6그룹을 DNCB로 아토피 피부염을 유도하였다. 천연 탄산온천수 28℃, 25℃에서 각각 수영시켰으며, 한 그룹은 아무 처리도 하지 않았고, 한 그룹은 수영에 대한 동일한 스트레스를 가하기 위해 수돗물에 동일 조건에 수영을 시켰다. 양성대조군에 사용된 FK506은 일종의 면역억제제로서,

최근 연구에서 아토피 피부염에 국소 도포한 결과 면역세포 증식에 강력한 억제작용을 나타내어 여러 면역학적 피부질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

실험결과 육안적으로, 그리고 조직학적으로 천연 탄산온천수 28℃와 25℃에서 입욕한 실험군은 수돗물 입욕군에 비하여 피부 발진이 줄어들었다. 또한, epidermis의 두께와 비만세포의 침윤이 천연 탄산온천수 28℃ 25℃에 입욕한 실험군에서 수돗물 군에 비하여 정상군에 가깝게 줄어들었다. Clinical skin severity에서도 천연 탄산온천수 28℃와 25℃에서 입욕한 실험군은 수돗물 군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 skin severity가 감소하였다. 이는 아토피 피부염의 임상적인 특징인 긁는 행동(搔痒)을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 증상이 천연 탄산온천수를 통해 개선될 수 있음을 보여준다.

상기 실험에서 천연 탄산온천수는 혈청 IgE와 IgG₁에도 영향을 주었다. 혈청 IgE는 아토피 반응 초기 상승하여 비만세포와 결합하며 알러지성 염증반응에 매우 중요한 요소이고, IgG₁은 만성 염증의 지표가 된다²⁷⁾. 천연 탄산온천수 28℃와 25℃에서 입욕한 실험군의 혈청내 IgE와 IgG₁ 수준은 수돗물 실험군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 이는 천연 탄산온천수를 통해 아토피 피부염의 알러지성 염증반응을 down regulation주는 효과가 있음을 뜻한다.

천연 탄산온천수는 또한 비장세포와 혈청의 IL-4, IFN- γ , IL-13, TNF- α 에도 영향을 주었다. 천연 탄산온천수 28℃와 25℃에서 입욕한 실험군의 IL-4, IFN- γ , IL-13, TNF- α 수준은 수돗물 군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타내었으며, 상기 실험의 경우 양성대조군인 FK506과 비슷한 결과를 보여주었다. 인공 탄산수의 경우 IFN- γ , TNF- α 가 수돗물 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였으며, IL-4, IL-13의 변화는 없었다.

급성 염증반응이 일어나면 제 2형 helper T cell(Th2)이 비정상적으로 활성화되어 면역글로

불린 IgE와 IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine의 분비를 증가시키고 제1형 helper T cell(Th1)을 억제하게 되나, 아토피 피부염의 경우 만성 반응으로 발달하여 상기의 급성 반응과 함께 Th1에서의 cytokine 분비도 동시에 증가하게 되어 염증 반응이 더 악화되게 된다^{16,29)}. 상기 실험결과에 따르면, 천연 탄산온천수가 Th1, Th2 cell의 활동을 조절하는 방식으로 항아토피 효과를 가지는 것으로 보인다. 특히, Th2은 급성 알레르기 반응에서, Th1은 만성 알레르기 반응에서 활성화하는 경향이 있는데, 천연 탄산온천수의 효능이 급성 및 만성 알레르기 반응 모두에 있어 유의한 조절작용이 있음을 시사한다. 인공 탄산수의 경우 IFN- γ , TNF- α 가 유의하게 감소한 것으로 보아, 급성이 아닌 만성 알레르기 반응에 유의한 효과가 있을 것으로 볼 수 있다.

상기 실험에서 백혈구 총량, 호중구(Neutrophil), 단핵구(Monocyte)에 대하여 천연 탄산온천수 실험군은 통계학적으로 유의한 변화를 나타내지 않았다. 오직, 천연 탄산온천수 28℃ 실험군에서 호산구(Eosinophil)의 감소가 통계학적으로 유의하게 나타났다. 호산구(Eosiniphil)는 백혈구의 일종으로 피부나 소화기관의 내벽이나 호흡기도의 내벽과 같이 외부에 접해있는 부위에 다량 군집되어 외부로부터 체내로 들어오는 독성 물질을 해독하는데 중요한 역할을 하며, 아토피 등 알레르기 질환에서 증가 후 침착되어 염증 유발 및 질환 악화에 중요한 역할을 하고 있다³⁰⁾. 유일하게 25℃ 실험군에서 통계적인 유의성이 드러나지 않아 천연 탄산온천수의 온도별 차이에 대한 효능을 입증하였다.

총체적으로 볼 때, 천연 탄산온천수는 아토피 유발 모델에 작용하여 아토피 알레르기 반응과 큰 관련이 있는 면역 글로불린 IgE와 IgG₁, Cytokine IL-4, IL-13, IFN- γ , TNF- α 의 감소를 일으키고, 혈구 중에는 알레르기 질환과 밀접한 Eosinophil의 감소를 유발하여 atopy 피부조직의 정상화를 유도한 것으로 볼 수 있으며, Eosinophil의 변화를 볼 때 25℃에 비해 28℃에서 더 많은 혈액학적 변화를 보여준다고 할 수

있다. 이에 천연 탄산온천수 단일 혹은 편백, 백선피, 별갑 등 아토피 치료에 유의성이 있다고 알려진 여러 한의학적 재료들과 함께 배합하여, 아토피 피부염에 대해 부작용이 적은 새로운 외용제로서의 가능성 또한 생각해 볼 수 있다. 그러나 사람의 아토피 피부염의 유전적, 환경적 요인을 배제한 동물 모델로서의 한계가 있는 만큼 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

DNCB로 아토피를 유발한 NC/Nga mouse를 각기 다른 온도의 천연 탄산온천수와 인공 탄산수에서 입욕을 시켜 아토피 피부염 치료에 미치는 영향을 살펴본 결과 대조군과 비교하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었다.

1) 천연 탄산온천수 실험군은 수돗물 입욕군과 비교하여 온도에 상관없이 두 군 모두에서 피부 발진이 육안적으로 감소하였다.

2) 천연 탄산온천수 실험군은 등 피부 조직을 조직학적으로 관찰한 결과 두 군 모두에서 epidermis의 두께와 비만세포의 침윤이 정상군에 가깝게 줄어들었다.

3) 천연 탄산온천수 실험군은 온도에 상관없이 두 군 모두에서 수돗물 군과 비교하여 Skin clinical score가 유의성있게 감소하였다.(28℃;p<0.05, 25℃;p<0.01)

4) 천연 탄산온천수 실험군은 온도에 상관없이 두 군 모두에서 수돗물 군과 비교하여 혈청 IgE, IgG1이 유의성 있게 감소하였으며(p<0.01), 인공 탄산 온천수 실험군은 유의성이 없었다.

5) 천연 탄산온천수 실험군은 온도에 상관없이 두 군 모두에서 수돗물 군과 비교하여 비장세포와 혈청의 Cytokine IL-4, IFN- γ (각각 p<0.05), IL-13, TNF- α (각각 p<0.01)이 유의성 있게 감

소하였다. IFN- γ , TNF- α 는 인공 탄산 온천수 실험군에서도 유의성 있게 감소하였다(p<0.05).

6) 천연 탄산온천수 실험군 중 28℃군에서만 혈청 호산구를 유의성 있게 감소시켰다(p<0.01). 호중구와 단핵구는 천연 탄산 온천수(Tedin Spa) 25℃, 28℃ 실험군에서 감소하였지만 유의성은 없었다. 인공 탄산 온천수 실험군에서도 호산구, 호중구, 단핵구를 감소시켰지만 유의성이 없었다.

VI. 감사의 말씀

이 과제는 산업통상자원부 웰니스 스파 임상지원센터 구축사업(과제번호: N0001200)의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. T Bieber. Atopic dermatitis. N Engl J Med.2008;1483-94.
2. Calvin O. McCall, Thomas J. Lawley Eczema, Psoriasis, Cutaneous Infections, Acne, and Other Common Skin Disorders, Harrison's principles of internal medicine 17th edition, 2010;1:377-378
3. Gary G kay(2000) The effects of antihistamines on cognition and performance, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 105: S622-627
4. Chang,I.M :Treatise on Asian Herbal Medicines. Seoul Natl. University Press Inc.Seoul.1:176-177.2003.
5. S R Meadow, J K Sarsfield, D G Scott, S M Rajah : Steroid-responsive nephrotic syndrome and allergy. immunological studies. Archives of Disease in studies. Archives of Disease in Childhood56:517-524.1981.
6. 박민철, 김진만, 홍철희, 황충연. 아토피 피

- 부염의 동서의학적 문헌 고찰. 한방안이비인후피부학회지. 2002;15(1):226-52.
7. 진현우. 아토피피부염 환자의 대체의학 이용 실태에 관한 연구. 부산대약학대학원 석사논문. 2005.
 8. 박성애. 아토피성 피부에 대한 인식과 대체요법 이용 실태 : 초등학교 학부모를 중심으로. 광주여대 대학원 석사논문. 2011.
 9. 차운엽, 김동건, 허성규, 김유진, 허영진, 공인표, 한석훈, 조영호, 공경환, 정수현. 水治療 중 온천요법의 한의학적 문헌고찰 및 효능에 대한 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2007;20(2):132-41.
 10. 심우행, 고현창, 김병수, 김문범, 민정아, 김진우. 성인 아토피 피부염 환자에서 해운대 지구 식염천 입욕 효과에 관한 연구. 대한피부과학회지 2010;48(12):1052-59.
 11. 이해을, 김형래, 임명, 이영, 김창덕, 이종훈, 서영준. 아토피피부염 환자에서 유성 온천수를 이용한 온천욕의 보조적 치료 효과와 안전성에 대한 연구. 대한피부과학회지. 2014;52(2):82-88.
 12. Mcmurtry CW. Dermatologic therapeutics:sulfur, Journal of Cutan. Dis. 1913;322:399-408.
 13. 안택원, 치유의 온천, 1st ed. 집문당, 2016:89-93.
 14. 안효섭, 신희영. 홍창의 소아과학 제 11판, 2016;23:1241
 15. Park YM. Advances In the Pathophysiology of Atopic Dermatitis Allergy Asthma. J of Pediatric allergy and respiratory disease. 2006;16(3):189-96.
 16. Inagaki N, Nagai H. Drugs for the treatment of allergic disease. Jpn J of Pharmacol.2001;86(3):275-80.
 17. 홍정효. 아토피의 치료에 관한 양방과 한방, 민간요법과 자연치유법에 관한 고찰, 생태유아교육연구. 2008;7(1):65-85
 18. 손국호, 이재근, 지선영. 종설(綜說) : 아토피피부염의 한의학적 변증에 대한 문헌적 고찰. 동서의학. 2009;4:15-24.
 19. 손기정, 박정환, 김윤하, 고가연, 안택원 외. 편백유(Chamaecyparis Obtusa Oil)가 DNCB로 유도된 NC/Nga생쥐의 아토피에 미치는 효과 연구. 한방안이비인후피부학회지, 2016;29(1):33-46
 20. 이운실, 白鮮皮추출물이 DNCB로 유발된 NC/Nga생쥐의 아토피 피부염에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 박사논문, 2014.
 21. 심태경, 고대경, 김현창, 백연중, 이재석, 유화승. 별갑이 아토피 피부염에서의 알러지성 염증 반응에 미치는 영향. 대전대학교한의학연구소 논문집. 2011;20(1):69-83.
 22. 박슬기, 한재경, 김윤희, NC/Nga 생쥐에서 加味清心蓮子湯의 GATA-3 조절에 의한 항아토피 피부염 효과. 대한한방소아학회지, 2009;23(2):29-50.
 23. 박병준, 최정준, 김수명 외 2 명, NC/Nga 아토피 피부염 생쥐 모델에서의 養血潤膚湯 효과, 동의생리병리학회지. 2007;21(2):392-398.
 24. 신현대 외. 동의재활의학과학. 서울:서원당. 1995:446.
 25. 박종철, 박지환, 수치료학. 서울:현문사, 1995:212-3, 222.
 26. Vestergard.C., H Yoneyama, K Matsushima, The Nc/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. Trends in Molecular Medicine. 2000;6(5):209-219.
 27. 김소영, PEP-1-FK506BP 융합 단백질의 세포 및 조직 침투 기술을 이용한 아토피 피부염 치료제제의 임상적 응용연구. 한림대학교 대학원 박사논문, 2009.
 28. Kelly D. Stone, Calman Prussin, and Dean D. Metcalfe, IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils, J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(2 Suppl 2): S73-S80.

29. Beltrani VS. The Clinical Spectrum of Atopic dermatitis. *J of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;21(1):80-90.
30. Rothenberg M, Hogan S. "The eosinophil". *Annu Rev Immunol* 24 2006;1:147-74.