

TMA로 유도된 접촉성 과민 반응 마우스 질환모델에서 해양성 광천수 도포시의 치료효과

김재진 · 김완재 · 심재만* · 최선강* · 권순성** · 김정득** · †이광호
건국대학교 의료생명대학 생명공학과, *강릉과학산업진흥원, ** (주)금진 생명과학

Effect of Brine Mineral Water on TMA-Induced Contact Hypersensitivity Reaction in the Mouse Model

Jae-Jin Kim, Wan-Jae Kim, Jae-Man Sim*, Seon-Kang Choi*, Soon-Sung Kwon**,
Jung-Duk Kim** and †Kwang-Ho Lee

Dept. of Biotechnology, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

*Gangneung Science Industry Foundation, Gangneung 210-340, Korea

**Geumjin Life Science Co., Ltd, Gangneung 210-340, Korea

Abstract

Effect of brine mineral water(BMW) on contact hypersensitivity reaction(CHR) was estimated using trimellitic anhydride (TMA) induced CHR in the mouse. BMW exhibited potent inhibitory activity on TMA induced CHR. BMW treatment suppressed the ear swelling, and attenuated hyper-activated lymph nodes stimulated by TMA challenge, thereby reduced their weight. The immunological index was analyzed after BMW administration in CHR. The level of serum IgE was significantly down regulated after BMW treatment. Furthermore, BMW showed inhibitory property of cytokine production. BMW treatment suppressed not only Th2 type cytokine, IL-4 but also pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6. From the histological analysis, the inflammatory context appeared by atopic dermatitis lesion after challenging with TMA are diminished by BMW treatment. Our results suggest that BMW may attenuate the development of CHR, and can be available for functional ingredient.

Key words: brine mineral water, contact hypersensitivity reaction, TMA, cytokine.

서 론

해양 심층수(deep sea water)는 일반적으로 수심 200 m 이상의 해양에서 얻는 해양수를 말하며, 온도가 낮고, 무기 영양소 및 미량원소가 풍부한 것이 특징이다(Moon 등 2004; Chung & Lee 2008). 해양 심층수는 1970년부터 그 중요성을 인식하여 기초 및 실용화 연구가 진행되어 유용자원으로서의 가치를 인식하게 되었다. 우리나라는 세계에서 4번째 해양 심층수 생산 국가이며, 해외에서도 유용물질 추출과 음용수 및 의약품까지 확장되어 산업화를 추진하고 있다(Chung & Lee 2008).

해양성 광천수(brine mineral water)는 해양 암반 심층수라고도 하며, 일반적으로 해안에서 약 1 km 이내 육지 지하의 800 m 이하의 용출수를 말한다. 해양성 광천수는 주변 지질로부터의 영향을 많이 받을 수 있으며, 따라서 지하의 토양 및 암반의 특성에 따라 수질의 성분뿐만 아니라 유용 가치도 달라질 수 있다(Moon 등 2004). 강릉 금진지구의 해양성 광천수는 일반 천연수에서 존재하기 어려운 Se, V 등 희귀 기능성 미네랄이 다량 포함되어 있으며, Ca과 Mg의 농도가 인체에 흡수하기 쉬운 비율로 존재하나, 인체에 유해한 중금속인 Hg, Pb, Cd 등은 검출되지 않는 것으로 보고되었다(Kim 등 2009).

† Corresponding author: Kwang-Ho Lee, Dept. of Biotechnology, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea. Tel: +82-43-840-3613, Fax: +82-43-851-5235, E-mail: kwangho@kku.ac.kr

해양 심층수 또는 해양성 광천수는 이들 속에 포함되어 있는 성분에 의해 항산화 효과와 항암 효과 가능성에 대한 보고가 있었으며(Ham 등 2005; Jung 등 2006; Kim 등 2008; Shon 등 2008; Kim 등 2009), 아토피성 피부염 환자에게 해양 심층수 복용 시 미네랄의 불균형 개선과 함께 피부 증상이 개선되었다는 보고가 있다(Kimata 등 2002; Hataguchi 등 2005). 또한 해양 심층수를 역삼투압 막을 통과시켜, 탈염한 후 Mg/Ca/K/Na를 일정비로 혼합한 가공 해양 심층수가 *ob/ob* mouse를 이용한 실험에서 체중을 감소시키고, 혈중 glucose, 총 콜레스테롤, triglyceride의 양을 감소시킨다는 보고가 있다(Hwang 등 2008).

이와 같은 보고를 종합해 볼 때, 해양성 광천수는 주변 토양 및 지질이 다른 지역에 따라 그 성분 함량이 다르며, 따라서 생리적 효능도 다를 수 있다. 현재까지 강릉 금진 지역의 해양성 광천수의 항알레르기 관련 질환에 대한 연구보고는 없다. 이에 본 연구 그룹은 강릉 금진 지역의 해양성 광천수의 생리활성을 연구하기 위한 일환으로, 실험동물을 이용하여 접촉성 과민 반응(CHR)에 대한 개선 및 치료 효과에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용된 해양성 광천수는 강릉시 옥계면 금진리 해안 인근(해안에서 800 m 지역)의 산 지하 1,100 m 지점에서 취수하여 0.2 μ m의 필터로 처리한 후, 처리수를 분무건조기(Spray Dryer, L-8, Japan)로 수분을 제거한 분말을 원래의 해양성 광천수 농도(2.8%)가 되도록 증류수에 재용해한 뒤 원액 농도의 0.7%와 2% 농도로 본 실험에 사용하였다. 본 연구에 사용한 금진 지역 해양성 광천수의 미네랄 성분 조성은 Kim 등(2009)에 의해 보고되었다. 해양성 광천수에 TMA(trimellitic anhydride, 97%)와 acetone, isopropylmyristate는 (주)Sigma -Aldrich Korea에서 구입하였다.

2. 실험동물의 사육

6주령 암컷 Balb/c 마우스를 (주)나라 바이오텍에서 구입하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $55\pm 5\%$ 를 유지하였고, 매일 광주기와 암주기가 12시간이 되도록 조절하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 마우스 감각 및 시료 투여

TMA 유도 CHR 모델 마우스는 Schneider 등의 방법을 이용하였다(Schneider 등 2009). 각 군당 5두씩 실시하였으며, 5% TMA 용액은 acetone과 isopropylmyristate의 4:1(v/v) 혼합액을

용매로 사용하여 제조하였으며, 실험 개시일에 50 μ l의 5% TMA를 면도기로 제모한 마우스 옆구리에 도포하여 감각하였다. 첫 감각 5일 후에 10 μ l의 5% TMA를 양쪽 귀 뒤쪽에 도포하고 6일부터 17일까지 매일 10 μ l의 2% TMA를 양쪽 귀 뒤쪽에 도포하여 접촉성 과민 반응을 유도하였다. 해양성 광천수 처리군은 5% TMA 도포하고 한 시간 뒤 0.7%와 2.0% 농도로 10 μ l씩 도포하였다. 정상군과 대조군은 해양성 광천수 대신 PBS를 도포하였다. 귀 두께는 6일부터 17일까지 시료를 도포하기 바로 전에 Micrometor(Fisher scientific, USA)로 측정하였다.

4. 염증 매개 인자의 측정 및 림프절 무게 측정

감작 17일째 마우스의 오른쪽 귀를 잘라내고 심장에서 혈액을 채취하였다. 마우스의 귀는 2 ml의 PBS를 이용해서 균질화하고 25,000 \times g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 걷어내고 ELISA kit(BD Bioscience, Germany)를 이용해서 cytokines의 양을 측정하였다. 마우스의 혈액에서 혈청을 분리한 후 IgE의 양을 동일하게 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 또한 마우스 림프절 무게는 오른쪽 귀 아래 부분의 경부 림프절을 분리하여 전자저울로 무게를 측정하였다.

5. 조직 염색

감작 17일째 귀를 잘라낸 뒤 4% paraformaldehyde에 넣어 4 $^\circ\text{C}$ 에서 고정하였다. 하루 뒤 조직을 30% sucrose에 2일간 탈수하고, 조직을 꺼내어 cell freezing medium에 포매하였다. Cryostat(Leica microsystems, Germany)을 이용하여 6 μ m 두께로 잘라낸 조직을 슬라이드에 올려 말린 뒤에 증류수를 이용하여 cell freezing medium을 씻어내고 toluidine blue 염색과 hematoxylin(Merck, Germany)과 0.5% eosin(Sigma, USA)을 이용하여 H&E 염색을 하였다.

6. 통계분석

모든 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 실험군 간의 통계분석은 Student's *t*-test로 각 군 간의 평균치에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. TMA 유도 접촉성 과민 반응에서 금진 해양성 광천수의 영향

Balb/c mice를 이용한 CHR model에서 TMA는 귀의 두께를 증가시켜 염증 측정에 사용하였다(Schneider 등 2009). Fig. 1(a)에서 보는 바와 같이, 0.7% 또는 2%의 해양성 광천수를 처리한 군에서 1주일 후부터 대조군에 비해 귀의 두께 증가가 역

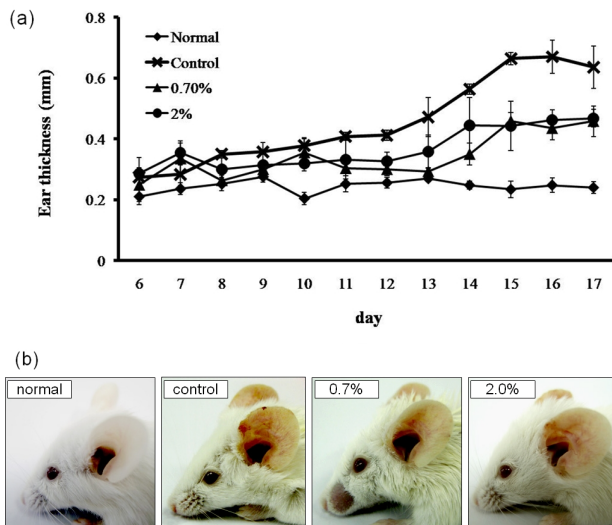


Fig. 1. Effect of BMW on ear thickness and clinical feature in TMA-induced contact hypersensitivity reaction model mice. (a) Ear thickness was measured as described in Materials and Methods. (◆) Normal group, (X) TMA treated control group, (▲) TMA+0.7% BMW treated group and (●) TMA+2% BMW treated group. Each symbol and vertical bar represents mean±S.D.(n=5). (b) This photographs were taken after treatment completion.

제되었다.

귀의 두께뿐만 아니라 혈관 확장에 의한 말초혈 유출을 동반하는 염증반응에서, 대조군은 귀의 색이 붉게 나타나는 반면, 0.7% 및 2%의 시료 처리군에서는 정상군 정도는 아니지만 대조군에 비해 귀의 붉은 색이 감소하였다(Fig. 1(b)). 이러한 결과로 볼 때, 0.7%의 처리로도 염증 억제 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

2. TMA 처리에 의한 림프절 무게의 변화에 대한 금진 해양성 광천수의 영향

TMA 처리에 의한 CHR에서는 면역반응의 증가에 의한 림프절 세포의 증식과 면역세포 유입에 의해 경부 림프절의 무게가 증가한다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 TMA를 처리함으로써 경부림프절의 무게가 약 8배 증가하였다. 그러나 해양성 광천수를 처리한 시험군에서는 림프절의 무게가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

따라서, 해양성 광천수의 피부 도포 처리로 림프절에서 면역작용의 억제에 의한 CHR을 억제하는 것을 예측할 수 있다. 향후, 해양성 광천수의 예방 효과와 응용에 의한 개선 효과를 알아보기 위해서는 TMA 처리 전 도포 및 경구 투여 시의 조건에서도 조사할 필요성이 있다.

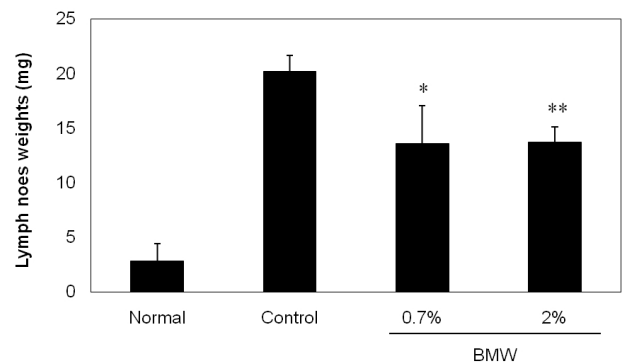


Fig. 2. Weight change of cervical lymph nodes in TMA-induced CHR model mice. Weights of cervical lymph nodes were measured by electronic scale. Weights are shown as mean±S.D.(n=5). * p <0.05 and ** p <0.01 vs. control group.

3. TMA 처리에 의한 혈중 IgE 및 Cytokine의 증가에 미치는 금진 해양성 광천수의 영향

대부분의 아토피성 피부염 환자에서 혈중 IgE가 증가하며, TMA에 의해 유도되는 CHR은 Th2 조건하에서 체액성 면역에 대한 측정 단위로 사용될 수 있다(Schneider 등 2009). 또한 Balb/c mouse에서 TMA에 의해 유도된 급성 및 만성 CHR model에서, 귀에서의 cytokine의 발현은, IL-4는 만성반응에서, TNF- α 는 급성 및 만성 반응에서 뚜렷하게 증가한다는 보고가 있다(Schneider 등 2009).

본 연구에서도 Balb/c를 TMA로 처리시에 IgE가 뚜렷하게 증가하였으며, 해양성 광천수 처리에 의해 유의성 있게 IgE가 감소하는 것으로 나타났다. Pro-inflammatory cytokines 중 IL-6와 TNF- α 도 감소하는 경향을 보였으며, 염증의 후기 반응과 관련이 있는 cytokine인 IL-4 역시 감소 효과를 보였다(Fig. 3). 이들 결과를 볼 때 접촉성 과민 반응에 의한 해양성 광천수의 염증 억제 효과는 pro-inflammatory cytokines 중 IL-6의 생산 억제가 중요한 작용을 할 수 있으며, TNF- α 또는 IL-4도 일부 관여할 것으로 추측된다. 혈청 IgE의 농도와 조직의 IL-6 농도가 0.7%에서 2%와 비슷한 수준 또는 오히려 강한 효과를 나타내는 것을 볼 때 IgE와 IL-6에 의한 CHR 억제는 0.7%의 농도에서도 충분하다는 것을 시사한다.

4. 금진 해양성 광천수가 TMA에 의해 유도된 CHR Model에서 피하조직에의 세포 유입에 미치는 영향

염증이 유발된 피부에서 형태학적인 변화와 피하에의 세포 유입은 조직학적 또는 면역 조직화학적 검사에 의해 특징을 구별할 수 있다. TMA 유도 CHR model에서 강한 세포 유입과 가시세포증(acanthosis)이 관찰된다. 특히 hematoxylin과 eosin으로 호염기구의 지속적인 유입을 관찰할 수 있다(Schneider

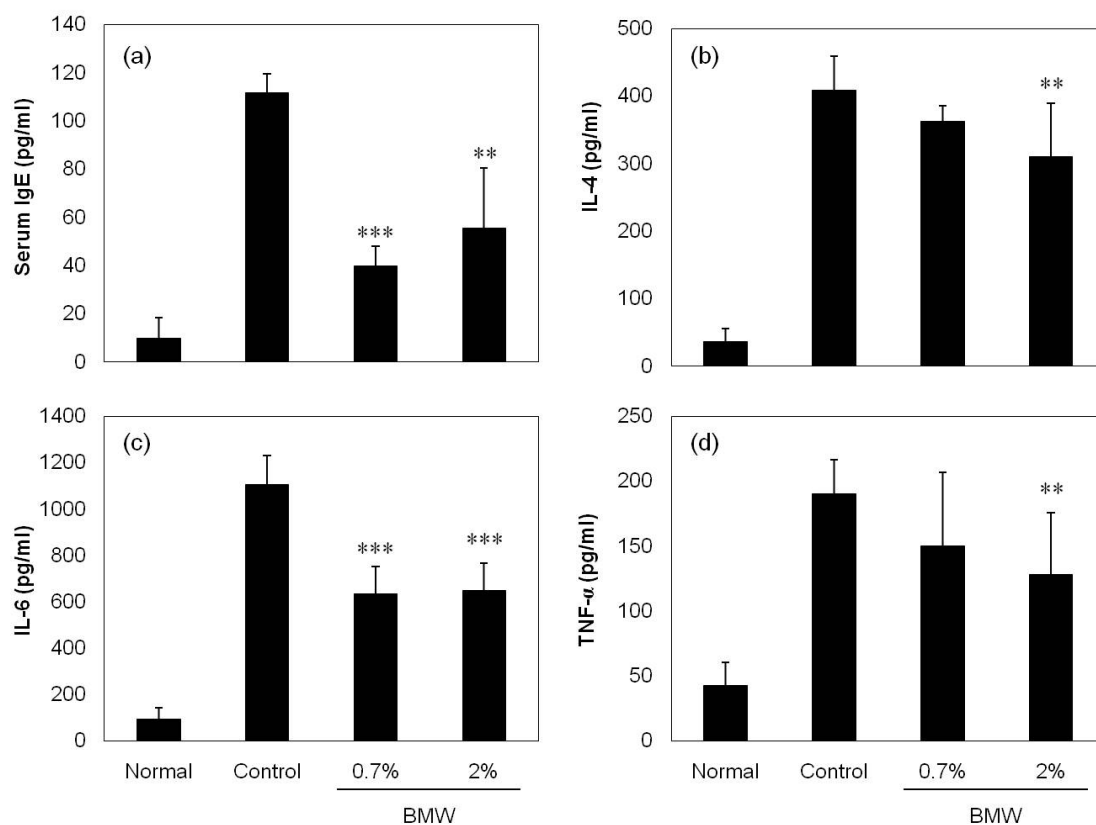


Fig. 3. Productions of (a) serum IgE and ear cytokines (b) IL-4, (c) IL-6, and (d) TNF- α on TMA induced CHR model mouse. Cytokines level were measured by ELISA kits. Each column and vertical bar represents means \pm S.D.(n=5). ** p <0.01 and *** p <0.001 vs control group using Student's t -test.

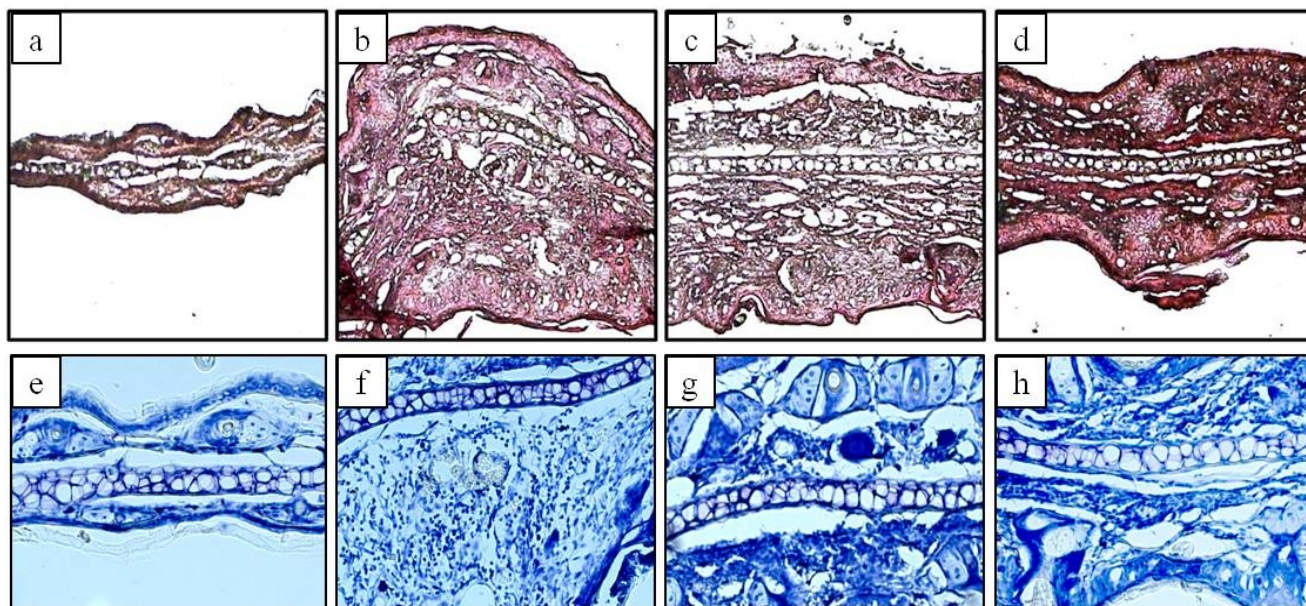


Fig. 4. Representative histological sections of ears stained with hematoxylin and eosin(a~d) or toluidine blue(e~h) in TMA-induced CHR model mice. Photographs of ears of normal group (a and e), control group (b and f), BMW 0.7% group (c and g) and BMW 2% group (d and h). Details regarding treatment of the animals are described in Materials and Methods.

등 2009).

본 연구에서 hematoxylin-eosin으로 염색하여 조직의 형태를 관찰하였다. Fig. 4(a)~(d)와 같이 정상군에 비해 대조군에서 조직이 약 3배 정도 두꺼워진 것을 관찰할 수 있었으며, 조직의 형태가 와해되어 있는 것을 관찰할 수 있다. 0.7% 또는 2% 해양성 광천수 처리군에서는 대조군에 비해 조직의 두께가 감소한 것을 확인할 수 있으며, 조직 형태도 농도 의존적으로 정상군에 가까운 것을 확인할 수 있었다. 또한 toluidine blue를 이용하여 비만세포 등과 같은 과립구를 염색한 결과, 보라색으로 염색되는 과립구의 수가 해양성 광천수 처리군에서 상당량 감소한 것을 확인할 수 있다(Fig. 4(e)~(h)).

이들 결과를 Fig. 3의 결과와 종합하여 볼 때, 해양성 광천수 처리에 의한 IL-6, TNF- α 그리고 IL-4 등의 염증반응 관련물질의 억제가 TMA로 유도된 CHR에서 과립구의 유입, 조직의 괴사 등에 대한 억제 효과를 유도하였다고 볼 수 있겠다.

결론

강릉 금진 지구 해양성 광천수의 접촉성 과민 반응에 대한 접촉성 과민 반응 억제 효과를 동물 모델을 이용한 피부 도포 실험으로 조사하여 본 결과, TMA에 의해 유도된 혈관 팽창에 의한 말초혈 유출과 염증반응의 대표적 증상인 부종을 억제하였다. 또한, TMA 유도 CHR에서 해양성 광천수의 처리에 의해 경부 림프절의 무게가 감소하였으며, 이는 TMA 유도에 의한 접촉성 과민 반응에서 증가된 면역반응이 해양성 광천수의 처리에 의해 일부 감소한다는 것을 시사한다.

만성 과민 반응에서 가장 두드러지게 나타나는 현상은 혈중 IgE의 증가이며, TMA에 의해 유도된 CHR에서의 혈중 IgE의 증가를 해양성 광천수가 유의적으로 감소시켰다. 또한 조직 내 cytokine은 해양성 광천수를 처리한 군에서 IL-6의 뚜렷한 감소를 보였으며, 그 외 pro-inflammatory cytokine 또는 Th2 형 cytokine인 TNF- α 또는 IL-4도 역시 감소 현상을 보였다.

Hematoxylin과 eosin 그리고 toluidine blue를 이용한 조직 염색에서 TMA에 의해 뚜렷한 조직의 부종이 관찰되었으며, 조직 내 과립구의 유입이 관찰되었다. 그러나 해양성 광천수의 처리 시 부종이 현저히 감소하였으며, 조직 내 과립구의 유입도 감소하였다. 모든 시험에서 해양성 광천수 0.7% 처리군과 2% 처리군에서 유사한 억제 효과를 나타내는 것을 볼 때 0.7%의 처리로 충분한 억제 효과를 가지는 것을 알 수 있다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 해양성 광천수는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6 등의 생산을 억제하여 염증을 감소

시키고, 과민성 면역반응을 억제하여 림프절의 무게를 감소시킨다. 또한 혈중 IgE의 농도를 억제하고, 접촉성 과민 반응에 의한 국부조직의 비만세포 등 과립구의 유입을 억제하는 것을 보아 해양성 광천수가 접촉성 과민 반응에 억제 효과를 가질 수 있는 것을 시사하였다. 해양성 광천수의 인체에 흡수하기 쉬운 농도로 함유되어 있는 Ca, Mg 등과 그 외에도 다량 포함되어 있는 Se, V 등의 성분이 접촉성 과민 반응 억제 효과를 보이는지는 향후 밝혀야 할 과제이며, 이들 면역학적인 기전도 추후 밝혀야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 지식경제부 지역연계기술개발사업의 지원에 의한 논문입니다.

참고문헌

- Chung KT, Lee SH. 2008. Current status of domestic and overseas research of the characteristics and use of deep sea water. *Korean J Food & Nutr* 21:592-598
- Ham SS, Kim SH, Moon SY, Jeon MS, Oh DH, Choi SP. 2005. Antioxidative, antimutagenic and cytotoxic effects of the mineral water. *J Fd Hyg Safety* 20:53-57
- Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, Kimata H. 2005. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome. *Eur J Clin Nutr* 59:1093-1096
- Hwang HS, Kim HA, Lee SH, Yun JW. 2008. Anti-obesity and antidiabetic effects of deep sea water on *ob/ob* mice. *Mar Biotechnol* (NY) 11:531-539
- Jung SJ, Joo EJ, Yoo JY, Kim YK, Cho YJ, Yoon BS, Cho JK, Nam KT, Hwang SG. 2006. Effect of supply of natural water from deep sea rock on the immune response and antioxidant activity in rats. *Anim Sci & Technol* 48:211-218
- Kim WJ, Li H, Yoon TJ, Sim JM, Choi SK, Lee KH. 2009. Inhibitory activity of brine mineral water on cancer cell growth, metastasis and angiogenesis. *Korean J Food & Nutr* 22:542-547
- Kim YJ, Jung IS, Song HJ, Choi EY, Choi IS, Choi YJ. 2008. Study of deep ground sea-like water on antioxidant activity and the immune response in RAW264.7 macrophages. *J Life Sci* 18:329-335
- Kimata H, Tai H, Nakagawa K, Yokoyama Y, Nakajima H, Ikegami Y. 2002. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients

- with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). *Acta Med* 45:83-84
- Moon DS, Jung HJ, Kim HJ, Shin PK. 2004. Comparative analysis on resources characteristics of deep ocean water and brine groundwater. *J Korean Soc for Marine Environ Engi* 7:185-189
- Schneider C, Döse W, Zollner TM, Röse L. 2009. Chronic mouse model of YMA-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 129:899-907
- Shon YH, Kim MK, Nam KS. 2008. Effect of deep sea water on cytochrom P450 1A1, aromatase and MMP-9. *J Life Sci* 18:503-508
-
- 접 수 : 2010년 8월 12일
최종수정 : 2010년 11월 5일
채 택 : 2010년 11월 28일