

자외선으로 손상된 무모생쥐의 피부에 알칼리환원온천수의 침수치료효과

윤양숙^{1,2}, 김동희¹, 김 단³, 박미순⁵, 장병수⁴, 이지연⁴, 이규재^{1,2,*}

¹연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실, ²연세대학교 빈곤문제국제개발연구원,
³연변대학교 의과대학 면역병리생물학교실, ⁴한서대학교 보건학부 피부미용학과,
⁵서울의과학연구소

The Effects of Balneotherapy in Alkaline Reduced Spring Water on Skin Injury Induced by UV Irradiation in Hairless Mice

Yang-Suk Yoon^{1,2}, Dong-Heui Kim¹, Dan Jin³, Mi Soon Park⁵,
Byung-Soo Chang⁴, Jee-Yeon Lee⁴, Kyu-Jae Lee^{1,2,*}

¹Department of Environmental Medical Biology, Yonsei University Wonju College of Medicine,
Wonju, Gangwon 220-701, Korea

²Institute for Poverty Alleviation and International Development, Yonsei University Wonju Campus,
Wonju, Gangwon 220-710, Korea

³Department of Immunology and Pathogenic Biology, College of Medicine, Yanbian University,
Yangi, Jilin 133000, China

⁴Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

⁵Seoul Medical Science Institute, Seoul 140-809, Korea

(Received February 14, 2011; Revised March 21, 2011; Accepted March 22, 2011)

ABSTRACT

Balneotherapy has been widely used for the treatment of skin diseases in the world. The purpose of this study was to determine the bath effect of the alkaline reduced spring water with the properties of high pH and low oxidation reduction potential (ORP) on the skin injury induced by ultra violet (UV) irradiation. For this purpose, hairless mice were irradiated with UV-B to cause skin injury, and individually taken a bath in spring water (experimental group) and tap water (control group) once a day for 40 min during 21 days. We observed histological changes of the back skin through macro- and microscopic methods compared to the control group. We found that skin injury of the experimental group was more quickly recovered than that of the control group. Under the light microscope, the experimental group showed that epidermal thickening ($p < 0.01$) and the mast cell activation ($p < 0.001$) were lower compared with the control group, in addition infiltration of inflammatory cells and degranulation of mast cells were less observed. These results suggest that regular bath in the spring water with the properties of high pH and low ORP has a positive effect on the skin injury induced by UV irradiation.

Keywords : Balneotherapy, Alkaline reduced spring water, Ultra violet irradiation

*이 논문은 2010년도 정부재원(교육과학기술부 인문사회연구역량강화사업비)으로 한국연구재단의 지원을 받아 연구되었음(NRF-2010-413-B00024).

* Correspondence should be addressed to Dr. Kyu Jae Lee, Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, 162 Ilsan-dong, Wonju, Kangwon-do 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0331, Fax: (033) 731-6953, E-mail: medbio@yonsei.ac.kr

서 론

피부 노화는 나이가 들어감에 따라 피부의 생리적 기능 감소와 구조적 변화로 인해 나타나는 생리적 노화(intrinsic aging)도 있으며, 자외선 등 외부 자극의 산화적 스트레스에 의한 광노화(photoaging)로 구분할 수 있다. 피부가 자외선에 노출되면 홍반, 부종, 화상반응, 색소침착, 거칠어짐, 탄력 손실 및 주름 발생 같은 일련의 피부 손상 혹은 노화과정이 촉진된다(Chung, 2003). 반복적인 자외선 노출로 인하여 collagen 분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)가 증가하여 피부의 collagen을 분해하는 것으로 알려져 있다(Brenneisen et al., 2002). 활성산소(reactive oxygen species; ROS)는 DNA의 손상과 세포막 지질의 과산화를 유발하여 피부 조직의 collagen과 elastin을 손상시켜 피부노화를 촉진시킨다(Lubart et al., 2007). 인체의 상피층은 다른 조직보다 우수한 항산화능이 있어 미생물이나 allergen 등의 침입을 방어하는 역할을 하며 UVB는 조직 내에서 활성산소를 형성함으로써 피부의 항산화물질을 감소시켜 효소적·비효소적 항산화 방어기구의 불균형을 초래하여 산화적 스트레스를 유발시킨다(Darr & Fridovich, 1994). 따라서 피부조직에서 비정상적으로 증가되는 활성산소를 신속하게 제거하는 것은 자외선에 의한 피부 손상을 최소화할 수 있는 효율적인 방법으로 추측된다. 실제로 피부조직에는 다양한 항산화효소들이 존재하며, 각질형성세포에 항산화제를 투여하면 세포가 활성화되고 증식한다(Chung, 2003). 이렇듯 피부 노화는 유전적, 영양적인 요인 외에 환경적 요인에 의해 크게 영향을 받을 수 있으며, 개인에 따라 노화의 진행 정도는 크게 달라지기 때문에 생물학적 관점에서 생활환경에 따른 피부노화를 규명하려는 연구가 활발히 진행되는 추세이다.

수치료요법은 환자의 고통을 경감시켜주고(Bender et al., 2005; Pittler et al., 2006), 해수 미네랄워터는 만성적 아토피 피부염의 치료에 이용되며(Yoshizawa et al., 2008), 프랑스 남부에 위치한 아벤느 온천(Avène spring water)의 수치료는 항알레르기 및 항염증효과가 있어(Joly et al., 1998) 아토피 피부염에 효과적으로 이용되며, 헝가리에 위치한 Mórahalom 과 Cserkeszőlő 온천욕은 체내 활성산소 형성을 억제(Bender et al., 2005)하며, 세계 각지의 물의 성상에 따라 여러 효과가 있어 피로를 회복할 뿐만 아니라 질병을 치료하기 위해 예로부터 널리 이용되어왔다. 물속에 용해되어 있는 황 이온은 피부에서 시스테인(cysteine) 및 그 대사물질과 주로 반응하여 항염증, 각질 분해, 항소양 작용 등을 한다.

환원력이 있는 알칼리이온수는 활성산소 제거와 DNA의 산화적 손상을 방지(Shirahata et al., 1997; Chen et al., 2003; Lee et al., 2006; Tsai et al., 2009)하고 염증반응을 완화시키며 면역반응을 활성화시키고(Lee et al., 2009), 말기 신부전 환

자의 혈액 투석에 기인하는 산화적 스트레스를 억제(Huang et al., 2006)한다는 보고가 있다. 다량의 미네랄을 함유하고 높은 산도를 나타내는 알칼리환원온천수 또한 낮은 산화환원전위(Oxidation Reduction Potential; ORP)를 나타내어 항산화능이 있을 것으로 판단된다. 이에 본 연구에서는 자외선 조사로 피부 손상을 인위적으로 유발한 무모생쥐(hairless mice)에 수치료요법을 적용하여 손상된 피부의 치유에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 온천수 및 수돗물

온천수는 부곡온천수(경상남도 창녕군 부곡면 거문리 228-8번지)를 이용하였으며, 수돗물은 연세대학교 원주의과 대학 동물실험실(강원도 원주시 일산동 162번지)에 공급되는 상수도를 이용하였다. 물의 종류에 따른 pH 및 산화환원전위(ORP)는 Table 1과 같다.

2. 실험동물

체중 30 ± 2 g인 6주령의 수컷 무모생쥐를(주)오리엔트바이오에서 분양받아 각 11마리씩 4개 군으로 나누어 일주일간 기본식이와 물을 충분히 공급하면서 순응시켰다. 사육실 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 5\%$ 로, 12시간 주기로 광주기를 유지하였다. 4개 군 중 1개 군은 자외선을 처리하지 않은 정상군이며, 나머지 3군은 자외선을 처리하여 피부노화를 유발시켰다.

자외선을 처리한 군은 목욕시키지 않은 군, 수돗물로 목욕시킨 군 그리고 나머지 한 군은 온천수로 목욕시켰다.

3. 피부 노화 유발 및 수치료

목욕은 투명한 그릇에 실온의 물을 채우고 생쥐의 등부위 80% 이상이 잠기도록 하였다. 자외선 조사장치의 광원은 UVB fluorescent sunlamp (TL40W/12RS, Philips, Netherlands)를 사용하였다. 총 조사된 UVB량은 300 mJ/cm^2 이었다. 수돗물 목욕군과 ERW 목욕군은 자외선 조사시간 동안 목욕시켰고 이후 자외선 조사 없이 매일 40분씩 21일간 목욕시켰다. 목욕은 투명한 그릇에 실온의 물을 채우고 실험

Table 1. pH and ORP of test waters

	Tap water	Hot spring water
pH	7.14	9.41
ORP (mV)	586.0	-27.0

ORP; Oxidation reduction potential

동물의 등부위 80% 이상이 잠기도록 하였다.

4. 피부 조직 관찰

1) 상피층 조직처리

무모생쥐의 등쪽 피부를 1 cm²의 넓이로 잘라내어 10% neutral buffered formalin (pH 7.4) 용액에서 24시간 고정한 후 파라핀으로 포매하여 4 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 (Olympus, Japan) 을 이용하여 상피의 염증성 세포의 침윤정도를 관찰하였고 또한 400배 배율에서 마리당 각각 다섯 곳에서 상피의 두께를 측정하였다. 단 상피의 두께측정은 입욕으로 인한 각질층(stratum corneum)의 분리를 고려하여 각질층을 제외한 상피층 즉, 과립층(stratum lucidum), 가시층(stratum spinosum), 바닥층(stratum basale)의 두께만 측정하였다.

2) 교원섬유

상피층 조직처리의 방법에 따라 만들어진 조직절편을 Masson's trichrome 염색법을 이용하여 56°C Bouin 용액에 1 시간 담근 후 수세하였다. Weigert iron hematoxylin으로 10 분간 핵을 염색한 후 Biebrich Scarlet fuchsin 용액으로 10 분간 염색하였다. 증류수로 수세한 후 Phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액으로 10분간 처리하였다. Aniline blue 용액에서 5분, light green 용액에 1분간 염색한 후 1% acetic acid 용액에 3분간 처리한 후 교원섬유의 변화를 관찰하였다.

3) 비만세포

조직절편을 toluidine blue (pH 4.5) 염색액에서 20분간 염색하고 수세한 후 여과지로 수분을 제거한 후 아세톤을 처리하여 광학현미경 (Motic, Motic China Group Co. Ltd., China) 400배율에서 마리당 5 field의 비만세포 개수를 계수(Motic Images Plus 2.0, China)하였다.

4) 피부 각질층 세포관찰

피부를 1 cm²로 잘라 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조성된 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 2시간 동안 전고정한 후 동일 완충용액으로 20분간 2번 세척하였다. 후고정은 1% osmium tetroxide로 90분간 실시하였고, 동일 완충용액으로 20분간 2번 세척한 후 ethanol 농도 상승 순으로 탈수시켜 hexamethyldisilazane으로 치환시킨 후 JFC 1100형 ion coater에서 20nm의 두께로 금도금하여 주사전자현미경 (TM-1000, HITACHI, Japan)으로 각질세포의 탈락정도를 관찰하였다.

5. 통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (statistical

package for social sciences Version 17, USA) program을 이용하여 평균±표준편차로 표기하였다. 대조군과 실험군의 비교는 Student's t-test을 사용하여 p<0.05일 때 통계적 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

수치요법(balneotherapy)은 질병의 치료를 목적으로 오래 전부터 이용하였으며 현재도 많은 국가에서 보편적으로 이용되고 있으며 (Nocco et al., 2008), 피부질환의 치료에 효과가 알려지면서 활발한 연구가 이루어지고 있다(Benedetto & Milliban, 1996; Millikan, 2002).

광학현미경으로 관찰한 결과, UV를 조사한 경우 심한 상피층의 비후와 피지선의 증식이 관찰되며, 피부의 초기반응으로 염증이 유발되고 진피 내에 염증세포의 침윤현상이 일어났다. 온천수에 목욕한 실험군의 경우 대조군(수돗물)에 비하여 염증세포의 침착이 상대적으로 적게 나타났다(Fig. 1).

상피의 두께를 측정된 결과 정상군에 비해 자외선을 처리한 군의 상피는 상당히 두꺼워졌으며 자외선만 처리한 경우와 자외선처리 후 수돗물(p<0.05)과 온천수(p<0.01)에 목욕시킨 경우 통계학적으로 유의하게 상피두께가 감소하는 경향을 보였다. 수돗물과 온천수에 목욕시킨 군간의 유의성은 없었으나 수치상으로 온천수가 더 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

UV 조사는 진피층의 교원섬유와 세포외 기질(extracellular matrix)을 구성하는 단백질을 파괴하여 피부노화의 특징인

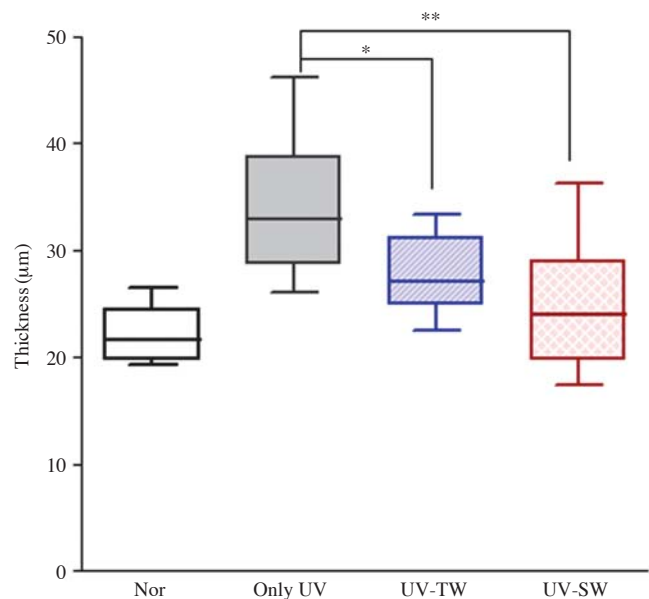


Fig. 2. Epidermis thickness of hairless mice (*p<0.05, **p<0.01).

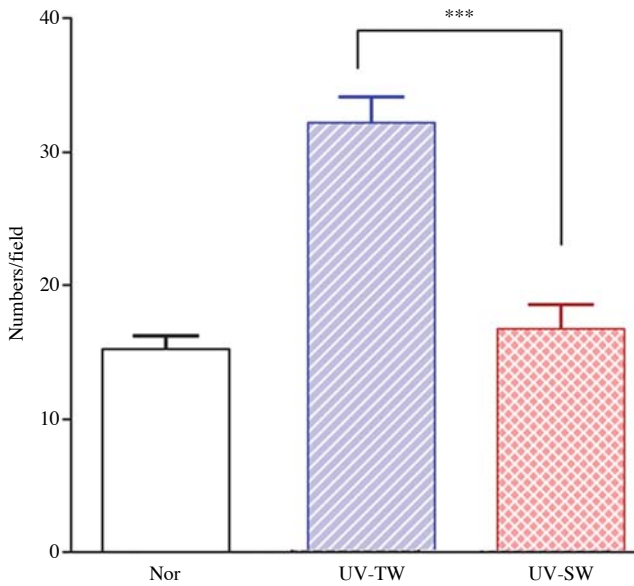


Fig. 5. Mast cell Number (400x field). *** $p < 0.001$.

주름을 생성시키는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서는 교원섬유층의 두께와 형태에 특이한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

목욕의 발열 작용은 cortisol과 catecholamine의 분비를 증가시켜 항염증작용을 하며 (Cozzi et al., 1995), 과립구 (granulocyte)의 활성화에 영향을 끼쳐 항균, 효소 활성을 변화시킨다. 38°C 정도의 체온에서 과립구의 리소좀 (lysosome) 세포막이 불안정화하여 면역반응을 자극하게 되며 세균의 포식작용이 증가하고 광천수나 미네랄수와 같이 특정한 성분들을 함유한 기능수들은 질병 치료의 보조적 수단으로 활용되어 만성질환의 치료효과에 대한 활발한 연구가 진행되는 추세이다 (Lee & Youn, 2002; Tamasidze, 2006). 수치료요법이 어떻게 피부질환을 개선하는지에 대하여는 아직까지 명확한 기전이 밝혀지지 않았지만 광천수의 효과와 목욕의 효과가 복합적으로 작용하여 피부질환을 개선하는 것으로 알려졌다 (Tishler, 1996).

Toluidine blue 용액으로 염색하여 비만세포를 관찰한 결과, 온천수에 목욕한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 비만세포의 개수가 유의하게 낮았고 ($p < 0.001$) 탈과립의 정도가 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (Figs. 4, 5).

피부조직의 표면에 분포하는 각질층을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 정상군은 탈락된 각질세포가 많이 발견되지 않았으며 자외선만을 처리한 군에서 각질세포가 탈락된 것을 확인할 수 있었다. 수돗물과 온천수에 목욕시킨 경우 자외선만 조사한 군에 비해 탈락된 각질층이 상당히 감소하는 경향을 보였으며 온천수의 경우 더 감소된 경향을 보였다 (Fig. 6).

피부가 강한 자외선에 노출되면 표피층의 비후와 피지선이 증가하며 진피층과 피하층 내 비만세포를 증가시키고 염증이 심한 경우 비만세포의 탈과립으로 히스타민이 방출되어 소양증을 나타낸다. 본 실험에서 수돗물 목욕군에 비하여 온천수 목욕군에서 표피 두께 증가폭이 작고 염증이 덜 유발되었으며, 비만세포의 증가율이 낮았고, 탈과립의 정도가 현저히 적은 것으로 나타났다. 또한 피부각질세포의 탈락정도가 온천수에서 더 낮은 것으로 나타났다. 실험에 사용된 온천수는 수온 25~28°C, pH 9.41, ORP -27.0 mV의 알칼리화환수이자 황화수소(H_2S)가 0.5 mg/L 함유된 유향천이다. 황은 유향수에서 유리이온으로 존재하거나 물이나 다른 이온들과 조합한 결합이온으로 존재한다. 또한 황은 표피의 유리산소와 반응하여 황과 이황화수소(disulfur hydrogen)가 pentathionic acid ($H_2S_5O_6$)로 변하여 항균작용을 하여 (McMurtry, 1913) 하지 궤양, 어루러기, 체부 백선, 두부 백선 등의 치료에 이용되며 (Parish, 1994), 황의 각질용해작용에 의한 박피 효과가 피부 치료에 주로 이용되고 있다 (Hjorth, 1980).

따라서 수온에 의한 면역반응 영향은 미미한 것으로 생각되며 온천수에 함유된 황 성분의 박피효과 및 항균작용과 함께 온천수의 항산화능이 피부조직의 치유에 도움을 준 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bender T, Karagülle Z, Bálint GP, Gutenbrunner C, Bálint PV, Sukanik S: Hydrotherapy, balneotherapy and spa treatment in pain management. *Rheumatol Int* 25(3) : 220-224, 2005.
- Bender T, Bariskav J, Vághy R, Gomez R, Kovács I: Effect of balneotherapy on the antioxidant system, a controlled pilot study. *Arch Med Res* 38(1) : 86-89, 2007.
- Benedetto AV, Milliban L: Mineral water and spas in the United States. *Clin Dermatol* 14 : 583-600, 1996
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K: Ultraviolet B irradiation and matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 973(1) : 31-43, 2002.
- Chen K TS, Keaney JF Jr: Beyond LDL oxidation. ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 35(2) : 117-132, 2003.
- Chung JH.: Photoaging in Asians. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19(3) : 109-121, 2003.
- Cozzi F, Lazzarin P, Todesco S, Cima L: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in healthy subjects undergoing mud-bath application. *Arthritis Rheum* 38 : 724-725, 1995.
- Darr, D, Fridovich I: Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102 : 671-675, 1994.
- Hjorth N: Traditional topical treatment of acne. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 89 : 53-55, 1980.
- Huang KC, Yang CC, Hsu SP, Lee KT, Liu HW, Morisawa S: Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythro-

- cyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 70(2) : 391-8, 2006.
- Joly F, Charveron M, Ariès MF, Bidault J, Kahhak L, Beauvais F, Gall Y: Effect of Avène spring water on the activation of rat mast cell by substance P or antigen. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 11(2) : 111-116, 1998.
- Lee IH, Youn JI: Pain relief and satisfaction by hydrotherapy among urban elderly. *J Korean Soc Phys Ther.* 14(3) : 209-216, 2002. (Korean)
- Lee KJ, Jin D, Chang BS, Teng YC, Kim DH: The immunological effects of electrolyzed reduced water on the *Echinostoma hortense* infection in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull* 32(3) : 456-62, 2009.
- Lee MY, Kim YK, Ryoo KK, Lee YB, Park EJ: Electrolyzed-reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein. *Appl Biochem Biotechnol* 135(2) : 133-144, 2006.
- Lubart R, Friedmann H, Lavie R, Longo L, Jacobi J, Baruchin O, Baruchin AM: A reasonable mechanism for visible light-induced skin rejuvenation. *Lasers in Medical Science* 22 : 1-3, 2007.
- McMurtry CW: Dermatologic therapeutice. *J Cutan Dis* 322 : 399-408, 1913.
- Millikan LE: Complementary medicine in dermatology. *Clin Dermatol.* 20 : 602-605, 2002
- Nocco PB : Mineral water as a cure. *Veroff Schweiz Ges Gesch Pharm.* 29 : 13, 2008.
- Parish LC, Witkowski JA: Dermatologic balneology: the American view of waters, spas and hot springs. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 3 : 465-467, 1994.
- Pittler MH, Karagülle MZ, Karagülle M, Ernst E: Spa therapy and balneotherapy for treating low back pain. *Rheumatology* 45(7) : 880-884, 2006.
- Shirahata S, Kabayama S, Nakano M, Miura T, Kusumoto K, Gotoh M, Hayashi H, Otsubo K, Morisawa S, Katakura Y: Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 234(1) : 269-274, 1997.
- Tamasidze A: Biochemical results of radon treatment. *Georgian Med News.* 141 : 91-93, 2006.
- Tishler M, Shoenfel Y: The medical and scientific aspects of spa therapy. *Isr J Med Sci* 32(3) : 8-10, 1996.
- Tsai CF, Hsu YW, Chen WK, Chang WH, Yen CC, Ho YC: Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 47(8) : 2031-2036, 2009.
- Yoshizawa Y, Kitamura K, Kawana S, Howard IM: Water, salts and skin barrier of normal skin. *Skin Res Technol* 9(1) : 31-33, 2003.

< 국문 초록 >

피부질환의 개선을 위한 수치료요법은 예로부터 세계 각지에서 널리 이용되어 왔다. 본 연구에서는 국내 알칼리환원온천수를 이용한 수치료요법이 손상된 피부에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 무모생쥐 (hairless mice)의 등 부위에 자외선을 조사하여 피부 손상을 인위적으로 유발한 후 매일 실온에서 40분간 침적시켜 21일간 수치료를 실시한 후 생쥐의 피부조직을 분리하여 검경하였다. 수치료를 하는 동안 실험군의 피부 회복속도가 대조군에 비해 더 빠른 경향으로 관찰되었다. 조직학적으로 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 표피층 비후 및 염증세포 침착 현상이 상대적으로 적게 나타났으며, 비만세포의 증가 및 탈과립 현상 또한 적게 나타났다. 이는 온천수에 함유된 황성분의 박피효과 및 항균작용과 함께 온천수의 항산화능이 피부 조직의 치유에 도움을 준 것으로 사료된다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Hematoxylin-eosin stained epidermis tissues of hairless mice. A; Normal, B; UV treatment, C; Bathe in tap water after UV treatment, D; Bathe in spring water after UV treatment.
- Fig. 3.** Masson's trichrome stained epidermis tissues of hairless mice. A; Normal, B; UV treatment, C; Bathe in tap water after UV treatment, D; Bathe in spring water after UV treatment.
- Fig. 4.** Toluidine blue stained epidermis tissues of hairless mice. A; Normal, B; UV treatment, C; Bathe in tap water after UV treatment, D; Bathe in spring water after UV treatment.
- Fig. 6.** Cornified layer of hairless mice (Scale bar=20 µm). A; Normal, B; UV treatment, C; Bathe in tap water after UV treatment, D; Bathe in spring water after UV treatment.

