

SCPE99255-10650-3

해수 성분이 아토피성 피부질환에 미치는  
치유 효과

Therapeutic Effects of Sea Water Therapy in Murine  
Model of Atopic Dermatitis

2015. 2. 28

한 국 해 양 과 학 기 술 원

# 제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해수 성분이 아토피성 피부질환에 미치는 치유 효과에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2015. 2. 28

총괄연구책임자 : 김 충 곤

참 여 연 구 원 : 정 회 수  
이 윤 호  
이 희 승  
신 희 재  
박 세 현  
김 동 성  
노 현 수  
최 영 호  
민 원 기  
임 미 연  
강 미 혜  
정 다 금

## 보고서 초록

과제고유 번호	PE99255	해당단계 연구기간	2014.01.01 - 2014.12.31	단계 구분	-
연구사업명	중사업명	해양헬스케어산업 활성화를 위한 실증 연구			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명	해수 성분이 아토피성 피부질환에 미치는 치유 효과			
	세부과제명				
연구책임자	김충곤	해당단계 참여연구원수	총 : 14 명 내부: 8 명 외부: 6 명	해당단계 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 14 명 내부: 8 명 외부: 6 명	총 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 생물연구본부		참여기업명	주식회사 아리바이오	
국제공동연구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	60
<p>본 연구과제는 현재 면역조절, 항염 및 항산화 효과를 통한 아토피 피부염 개선 효과를 보이는 것으로 알려지기 시작한 수치료의 일환으로 우리나라 주변에서 취수한 4 종류의 해수 - 서해 표층수(강화도 외포리), 서해 온천해수(석모도 용궁온천 해수), 동해 표층수(울진 나곡리) 및 동해 염지하수(울진 후정리)의 입욕에 따른 아토피 피부염 개선 효과를 DNCB로 유발시킨 아토피 피부염 hairless 마우스 모델[Qi et al., 2009; Kang et al., 2011]을 이용하여 평가하였다.</p> <p>우리나라 주변에서 취수한 4종류의 해수에 대한 입욕 효과는 동해 염지하수 (울진 후정리), 서해 온천해수 (석모도 용궁온천 해수), 동해 표층수 (울진 나곡리) 및 서해 표층수 (강화도 외포리) 입욕군 순으로 나타났다. 비교적 우수한 국소 및 전신적인 면역조절, 각질세포 보호, MMP활성 억제, 항염 및 항산화 효과를 통해 DNCB 유발 아토피 피부염을 현저히 억제하는 것으로 판단되며, 이러한 차이는 해수의 염도 및 미네랄 함량 차이와 직결될 것으로 판단되고, 금후 아토피 치료의 중요한 대체 요법으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	해양 치유, 해수, 입욕 효과, 아토피			
	영 어	Thalassotherapy, Sea Water, Therapy, Bathing, Atopic Dermatitis, DNCB			

# 요 약 문

## I. 제 목

- 해수 성분이 아토피성 피부질환에 미치는 치유 효과

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 해수성분의 효능을 밝혀 해양헬스케어산업의 조기 정착
- 해수성분을 이용한 아토피성 피부염 치료 효능 발굴

## III. 연구개발의 내용 및 범위

- 해수성분 분석
- 해수성분의 아토피질환 치유 효능 검증 실험
- 해수성분의 해양헬스케어 산업 자원으로 유용성 도출

## IV. 연구개발결과

- DNCB로 유발시킨 아토피 피부염 hairless 마우스를 이용한 4 종류의 해수(서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 동해 염지해수)의 입욕 효과 검증
  - Clinical skin severity score 변화 확인
  - Scratching behavior 변화 확인
  - 혈청 중 총 Ig E 함량 변화 확인
  - 악하임과절 및 비장 중량 변화 확인
  - 비장 cytokine 함량 변화 확인
  - 피부 조직내 cytokine mRNA 발현 변화 확인
  - 피부 조직내 항산화 방어 시스템 변화 확인
  - 조직병리학적 변화 확인
    - 피부의 조직병리학적 변화 확인
    - 비장의 조직병리학적 변화 확인
    - 악하임과절의 조직병리학적 변화 확인

## IV. 연구개발결과의 활용계획

- 해양헬스케어 자원 발굴
- 해양헬스케어산업화를 위한 과학적인 체계 마련
- 대형 국가 R&BD과제 개발을 위한 기반 구축

# S U M M A R Y

**Title:** Bathing Effects of Various Seawaters on Allergic (Atopic) Dermatitis-like Skin Lesions-induced by 2,4-Dinitrochloro-benzene in Hairless Mice

ALLERGIC/ATOPIC DERMATITIS (AD) is a chronic inflammatory skin disease accompanied by several common symptoms including itching, erythema, eczema skin lesions, chronic relapse and pruritus [Leung, 2000]. This systemic disorder is caused by skin barrier dysfunction, severe skin dehydration, and mutations in the filaggrin gene, which has an essential role in modulating epidermal homeostasis. All these symptoms are the consequence of an imbalanced immune response to various allergens. Another defining characteristic of the allergic immune system is the capacity to generate elevated immunoglobulin E (Ig E) antibodies and type 2 helper T (Th2) cells are critical for Ig E synthesis. Th2 cells predominantly produce interleukin (IL) families, and these cytokines are associated with specific function of immune cells in AD. The skin lesions of atopic dermatitis are generally characterized by infiltration with various inflammatory cells such as Ig E-mediated mast cells, basophils, eosinophils and T cells. Ig E can sensitize mast cells in the skin culminating the production of inflammatory mediators, such as cytokines, IL-4, IL-5, IL-13, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and oxidative stresses also involved in the pathogenesis of AD.

Adrenocorticosteroids and anti-histamine agents have been used for treatment of AD and they showed favorable ameliorating effects, but they also have been showed serious side effects. According to these facts, alternative therapy or natural products vigorously tried to ameliorate the AD. Among them, one of the approaches that may be considered is hydrotherapy. It has a place in its own right in the therapeutic arsenal as complementary therapy. Indeed, several studies have tested different water baths and reported their beneficial effect on dermatological disorders. Even if the composition of waters differs, each has somewhat unique characteristics. Hydrotherapy was able to modulate lymphocyte proliferation and cytokine production, and some compositions of mineral waters have been showed favorable antioxidant effects. Moreover, various types of seawaters have been showed favorable effects on various types of dermatitis.

In the present study, therefore, we intended to observe the truthful anti-AD effects of various types of seawaters collected around Korea - west surface

seawater (WSSW collected around Wepo-ri, Ganghwa-do, Korea), west saline groundwater (WSGW collected at Yonggungoncheon, Seokmo-do, Korea), east surface seawater (ESSW collected around Nagok-ri, Uljin, Korea) and east saline groundwater (ESSW collected around Hoojeong-ri, Uljin, Korea) on the DNCB-induced AD hairless mouse model, one of typically used AD animal model, after 6 weeks of bathing (once a day for 42 days; 20min/day), and the results were compared with those of 1% dexamethasone (DEXA) topically applied mice (once a day for 42 days) in this experiment.

Animals were selected at 1 day before initial treatment of DEXA or bathing, at 4 weeks after initial DNCB boosting based on the individual clinical skin severity scores and scratching behaviors. DNCB-induced AD mice were bathing on four types of seawaters - WSSW, WSGW, ESSW or ESGW for 20min/day, once a day for 6 weeks from 5 weeks after DNCB sensitization, respectively. After 6 weeks of bathing or topical treatment of 1% DEXA on the dorsal back skin from end of last boosting treatment by 0.5% DNCB, the changes on the body weight, clinical skin severity scores, scratching behavior, serum total Ig E levels, submandibular lymph node (LN) and spleen weights, splenic cytokine levels - tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10, skin cytokine mRNA expressions - TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 and IL-13, antioxidant defense systems - skin tissue glutathione (GSH) contents, lipid peroxidation (malondialdehyde; MDA levels) and superoxide anion productions were evaluated to observe the effects of bathing with histopathology of dorsal back skin tissues, submandibular LN and spleen - mean epithelial thicknesses, mean numbers of inflammatory and mast cells infiltrated in the dermis, collagen fiber occupied region percentages in dermis, total splenic thicknesses, white pulp and red pulp cell numbers, total submandibular LN thicknesses, cortex lymphoid follicle numbers and cortex thicknesses, caspase-3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), nitrotyrosine (NT) and 4-Hydroxynonenal (4-HNE) immunoreactivities in the epidermis, matrix metalloprotease (MMP)-9 in the dermis, and IFN (interferon)- $\gamma$ , inducible nitric oxide synthase 2 (iNOS), IL-1 $\beta$ , IL-2 and TNF- $\alpha$  immunoreactive cells in the dermis, spleen and submandibular LN, in this experiment.

(KEYWORDS : 해양 치유, 해수, 입욕 효과, 아토피, Thalassotherapy, Sea Water, Therapy, bathing, Atopic Dermatitis, DNCB)

# 목 차

## 제 1 장 서론

- 1절 연구개발의 목적
- 2절 연구개발의 필요성

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1절 국내외 연구 개발 동향
- 2절 지금까지의 연구 개발 현황

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 1절 연구개요
- 2절 연구방법
- 3절 연구결과
- 4절 연구고찰 및 결론

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- 1절 연구개발목표의 달성도
- 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 1절 추가연구의 필요성
- 2절 응용분야

## 제 6 장 Acknowledgement

## 제 7 장 참고문헌

## 제 1 장 서론

### 1절 연구개발의 목적

- 해수성분의 아토피질환 치유 효능 검증 실험
  - 기전에 대한 in vivo 실험
  - Scratching behavior 시험
  - 혈중 IgE 및 기타 면역글로불린 변화 측정
  - 조직학적 변화 측정
- 해수성분의 해양헬스케어 산업 자원으로 유용성 도출

### 2절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

- 해양자원을 이용한 해양헬스케어(해양 치유)산업 개발
  - 해양 자원을 이용한 질병 예방 방법으로 해수, 머드, 해양기후, 해조 등을 이용할 수 있다.
  - 선진국의 해양자원 치유력을 이용한 국민건강 증진과 산업적 활용 기술 도입이 시급하다.
  - 산업화로 인한 환경오염과 서구화된 식생활 변화로 인한 아토피성 질환자의 증가에 따른 경제적, 사회적 부담 급증하면서 해결 방안이 시급하다.
- 해수성분의 치유효과 검증을 통한 해양헬스케어 산업의 기반 마련
  - 해양헬스케어 산업에 이용 되는 자원 중 가장 중요한 자원인 해수성분에 대한 효능 검증을 통한 대국민 홍보 진행해야 한다.
  - 해수에 녹아 있는 각종 미네랄, 염화나트륨, 마그네슘 등은 인체의 혈액 내 성분과 비슷하여 신진 대사를 증가시키며, 항산화제 등이 풍부하여 피부와 점막의 기능을 향상시키는 것으로 알려져 있다.
  - 해수성분의 피부질환 치유효과에 대한 연구는 높은 염분을 함유한 사해지역에 대해 알려져 있으며, 국내 연구는 아직 시도되지 않았다. 새로운 연구 분야로 해양자원과 인간질병간의 상관관계를 밝힐 필요성이 제기된다.
- 해양헬스산업 육성에 관한 국가연구개발 사업의 주도적 참여를 위한 기층 마련



- 국가연구개발사업 추진을 위한 의학 분야와의 협력관계에서 해양 분야의 구체적 참여방법이 미흡한 실정이다.
- 해수를 이용한 동물 대상 기초 실험 등을 통해 해양헬스케어 연구에 필수적인 해양 연구 아이템 도출이 필요하다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

- 해양자원을 이용한 만성질환 치유에 대한 관심과 수요 증가
  - 산업화 도시화에 따른 아토피성 피부질환이 급증하고, 대책이 시급하다.
- 해양헬스케어 연구 결과의 실용화를 통한 직접적인 국민 생활환경 개선
- 현재까지 시도된 적이 없는 새로운 해양산업의 연구분야로의 활용

## 3. 사회 · 문화적 측면

- 국민의 건강관리 생활화 및 고령화, 웰빙 산업 증가, 복지문화 확산에 따른 헬스케어 산업 개발 수요 증가 및 필요성 제기
- 해양자원이 만성질환 치유에 도움을 줄 수 있다는 국가적 희망 제시
  - 2010년 현재 우리나라의 아토피성 질환자수는 890 만 명에 달하며, 소아, 사춘기청소년, 성인에 이르기 까지 장기간 지속되는 아토피 질환으로 인해 고통 받는 환자들의 정신적, 경제적 피해가 심각해지고 있다.
- 해양헬스케어 新산업 육성을 통해 지역경제 활성화 및 창조경제 실현
  - 해양헬스케어 연구는 내수 복지산업과 새로운 일자리를 창출을 할 수 있는 창조경제와 복지사회 구현이라는 정부의 정책에 부합된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내외 연구 개발 동향

#### 1. 국외 연구 개발 동향

- 유럽의 ‘해양요법(thalassotherapy)’ 발달에 의한 의료 대안 치료법 대두
  - 19세기 중반부터 발달하였으며, 그리스어의 바다를 의미하는 ‘thalassa’와 치료를 뜻하는 ‘therapy’가 합쳐진 말로 해양요법을 의미한다.
  - 스트레스 해소, 기분 전환, 노화방지 요법으로 이용된다.
- 각 나라별 적용 사례
  - 독일: 독일 전역 치유 휴양단지(kurort) 약 350개소 개설. 질병예방, 치료, 재활, 휴양, 관광, 문화체험 등을 위한 중장기형 체류 형태로 거주한다. 연간 지출 직접 비용 400억 달러로 추산되며, 고용 인력 약 45만 명이다. 방문객은 주로 만성호흡기, 순환기, 근골격계, 피부, 정신건강, 소아청소년, 암, 뇌질환 순의 비급성기 환자로 이루어진다.
  - 프랑스: 해안 건강리조트의 건강요법 일부를 건강보험에 등재하여 국가가 비용을 지원한다. 프랑스 해양요법 시설 거점중 하나인 랑그독-루시용 해안에 한 해 625만 명이 방문한다.
  - 이스라엘: 사해를 이용하여 질병치료와 미용 등 건강증진을 위한 복합단지로 조성. 사해는 바닷물의 10배에 달하는 염도로 생물이 살지 못하며, 각종 미네랄이 풍부함. 사해의 해수와 머드가 건선 피부질환, 류마티스 관절염, 근골격계 질환을 치유하는데 탁월한 효과가 보고되었고, 전 세계 60개 나라에서 환자가 방문한다. 사해브랜드의 소금, 머드 등 수출되고 있다.
  - 일본: 해양심층수를 이용한 탈라소테라피 시설이 전국10여 개소에 설립되어 운영이다. 심층수의 청정한 바닷물에 의해 해독 정화 작용을 해주고, 신진대사를 촉진시킨다. 효능으로는 어깨 결림, 통증, 편두통, 불면증, 냉증, 체질개선, 아토피 등이 있다.

#### 2. 국내 연구 개발 동향

- 일부 해양심층수 및 용암해수의 아토피 효과를 시도한적 있으나, 매우 제한적인 연구가 진행 중이다.
- 국내 해양치유 관련 선행 연구, 관련기관, 전문가는 전무한 실정이다. 단, 해

- 조류 및 해양생물의 기능성 및 효능에 대한 연구는 많이 있다.
- 기존의 해양과학연구 결과를 의학 분야와 연결시켜 해양헬스케어산업으로 발전시키는 과정이 필요하다.
    - 국내 해양치유자원 및 소재 발굴
    - 해양치유 전문가 양성
    - 지역별 특징(특화소재)을 고려한 특정 질병에 대한 치유 효능 차별화
    - 해양치유 과학화를 위한 임상연구
    - 국민들에게 안심하고 신뢰할 수 있는 기반 마련

## 2절 지금까지의 연구 개발 현황

### 1. 국외 해수 효능에 대한 연구

- 각 질병별 효능 검증 시행
  - 천식: 항 박테리아, 항염증, 점액용해 능력 음이온 발생으로 천식 치유
  - 관절염: 해수에 포함된 미네랄과 화합물이 관절과 척추질환 통증완화회복
  - 근육통증: 혈관확장, 심박출량 증가 등으로 인한 통증완화
  - 아토피 건조피부: 고농도의 마그네슘과 칼슘은 피부 방어기능 향상, 표피 증식과 세포 분화의 활성화
  - 건선 아토피피부염: 이스라엘 사해의 고농도 염분의 치유 효과

### 2. 국내 해수 효능에 대한 연구

- 해양심층수를 이용한 당뇨병 치료에 대한 연구결과 발표[Ha et al. Mar. Drugs 2013(11) 4193-4212]
- 해수의 아토피 효능에 관한 연구는 전무한 실정이다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1절 연구개요

- 아토피 피부염은 현재 전 세계적으로 유아의 3%, 소아의 10~20% 및 성인의 1~3%에서 관찰되는 과민반응에 의한 만성 염증성 피부 질환이다[Li et al., 2010]. Ig E 또는 Ig E 매개성 염증세포 및 type 2 helper T(Th2)에 의

한 과민반응이 가장 주요한 아토피성 피부염의 원인으로 주목 받고 있으며 [Nystad et al., 2005; Li et al., 2010], Ig E에 감작된 이들 염증세포들은 IL-4, IL-5, IL-13 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 다양한 염증 매개 인자들을 생산하여, 국소 염증반응을 유발함과 동시에 주변 조직에 oxidative stress를 가하여 다양한 병적 증상을 초래 한다[Briganti and Picardo, 2003; Okayama, 2005; Park and Oh, 2014].

- 현재, dexamethasone(DEXA)을 포함한 다양한 부신피질호르몬제제(adrenocorticosteroids)와 항히스타민 제제(anti-histamine agents)들이 아토피 피부염의 치료에 비교적 유효하게 사용되어왔으나, 각각 면역 억제와 같은 심각한 부작용 역시 초래되고 있어[Tasaka, 1986] 비교적 부작용이 낮은 것으로 기대되는 천연물 유래의 다양한 대체 요법의 개발이 시도 되고 있는 실정이다[Merial-Kieny et al., 2011; Kim et al., 2012; Park and Oh, 2014]. 물을 이용한 수 치료(hydrotherapy) 역시 아토피 피부염을 개선 또는 치료하기 위해 시도 되고 있는 대표적인 대체 요법 중 하나이며[Merial-Kieny et al., 2011], 다양한 피부질환에 수 치료의 유효성이 보고되어 왔다 [Léauté-Labrèze et al., 2001; Tsourelis-Nikita et al., 2006; Brockow et al., 2007; Peroni et al., 2008].
- 특히 물의 구성에 따라 각기 다른 다양한 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 [Portalès et al., 2001]. 수 치료는 입과구의 증식과 cytokine의 생산을 조절하며[Portalès et al., 2001], 특정 조성의 미네랄 수는 매우 효과적인 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[Fioravanti et al., 2013; Prandelli et al., 2013; Soria et al., 2014; Yoon et al., 2014]. 또한 다양한 피부질환에서 해수의 입욕에 따른 개선 효과가 보고되어 있다 [Hataguchi et al., 2005; Adler-Cohen et al., 2012; Bak et al., 2012].
- 본 연구에서는 우리나라 주변에서 취수한 4 종류의 해수 - 서해 표층수(강화도 외포리), 서해 온천해수(석모도 용궁온천 해수), 동해 표층수(울진 나곡리) 및 동해 염지하수(울진 후정리)의 입욕에 따른 아토피 피부염 개선 효과를 DNCB로 유발시킨 아토피 피부염 hairless 마우스 모델[Qi et al., 2009; Kang et al., 2011]을 이용하여 평가하고자 하였다.

## 2절 연구 재료 및 방법

### 1. 실험물질

- 4종류의 해수 - 서해 표층수(강화도 외포리), 서해 온천해수(석모도 용궁온천 해수), 동해 표층수(울진 나곡리) 및 동해 염지하수(울진 후정리) (표 1)
- \* 대조물질: Water-soluble Dexamethasone

표 1. 해수별 염도 및 미네랄 조성

해수종류	수온 (°C)	수심 (m)	염도 (‰)	미네랄 조성(mg/L)			
				Ca	Mg	K	Na
일반지하수	30		0.40	81.00	121.00	12.00	569.00
서해표층수	22	5	26.20	234.61	923.67	481.34	7081.18
서해온천수	70	700	22.40	3243.08	207.79	325.91	3850.67
동해표층수	21.9	5	34.00	417.50	1264.00	383.00	10672.00
동해염지하수	21.7	689	26.00	1856.00	1012.00	38.00	3178.00

\* 채수한 해수는 1.2 µm GF/C Grass microfiber Filter (Korea filter paper Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 여과하였음(WSGW는 제외)

## 2. 실험동물

- 대략 126마리의 SHK-1 hairless mice(6주령 암컷, OrientBio, Seungnam, Korea) [ANNEX I and II]를 11일간 순화시킨 후, DNCB 감작을 시작하였으며, DNCB boosting 시작 4주 후 군당 8마리씩 7군(총 56마리)으로 구분하여 실험에 사용하였으며, 모든 실험동물은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 동물실험윤리 기준에 따라 취급하였으며, 위원회의 사전 승인 하에 동물실험을 실시하였다(승인번호: Approval No 2014-025, 2014. 05. 14 [ANNEX III]).

## 3. 실험방법

- 군 분리(총 7개군; 군 당 8마리)
  - 정상 대조군: DNCB를 처리하지 않고, 멸균증류수에 입욕시킨 매체 대조군
  - DNCB대조군(아토피 피부염 유발 후 멸균증류수에 입욕시킨 매체 대조군
  - DEXA: DNCB 아토피 피부염 유발 후 1% DEXA 200µl/mouse/국소 도포군
  - WSSW: DNCB 아토피 피부염 유발 후 서해 표층수에 입욕시킨 실험군
  - WSGW: DNCB 아토피 피부염 유발 후 서해 온천해수에 입욕시킨 실험군
  - ESSW: DNCB 아토피 피부염 유발 후 동해 표층수에 입욕시킨 실험군
  - ESGW: DNCB 아토피 피부염 유발 후 동해 염지하수에 입욕시킨 실험군
- 아토피 피부염의 유발
  - 이전의 방법들[Kang et al., 2011; Park and Oh, 2014]에 따라, 아세톤과 올리브 오일(3:1) 혼합액에 용해시킨 1% DNCB(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) 용액 200µl/mouse/day을 매일 1회씩 7일간 hairless 마우스의 등쪽 피부 전체에 도포시켜 감작시킨다.

- 주 3회씩 4주간 0.5% DNCB 용액을 도포하여, boosting 시켜 아토피 피부염을 유발시켰다.
- 정상 매체 대조군에서는 DNCB 용액 대신 매체(아세톤과 올리브오일 3:1 혼합액)를 동일한 방법으로 국소 도포하였다(표 2).

표 2. 아토피 피부염 유발을 위한 실험계획

그룹	처리방법	입욕일정 (20min/day)	Animal No.
대조군1	-	증류수, 42일간 1일 1회 실시	HM01~HM08
대조군2	DNCB	증류수, 42일간 1일 1회 실시	HM09~ HM16
대조군3	DNCB	1% DEXA 국소도포, 42일간 1일 1회 실시	HM17~ HM24
실험군1	DNCB	서해표층수(WSSW); 42일간 1일 1회 실시	HM25~ HM32
실험군2	DNCB	서해온천수(WSGW); 42일간 1일 1회 실시	HM33~ HM40
실험군3	DNCB	동해표층수(ESSW); 42일간 1일 1회 실시	HM41~ HM48
실험군4	DNCB	동해염지하수(ESGW); 42일간 1일 1회 실시	HM49~ HM56

\* DEXA = dexamethasone - water soluble

○ 입욕 및 DEXA 처리

- 실험동물을 체온(37 °C)과 유사하게 가온한 각각 4 cm 깊이의 4 종류 해수 1,900 ml과 절식판을 포함한 마우스 사육상자 (200×260×130mm; DJ-101, Daejong Instrument Ind. Co., Seoul, Korea) 에 감각 시작 5주 후부터 매일 1회씩 6주간 20분씩 입욕시켰다.
- DEXA (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)는 멸균 증류수에 1% 농도로 용해시킨 다음 200µl/mouse 씩 등쪽 피부전체에, 감각 시작 5주 후부터 매일 1회씩 6주간 도포하였다.
- 정상 및 DNCB 매체 대조군에서는 동일한 입욕 스트레스를 가하기 위해, 4종의 해수 대신 멸균 증류수에 동일한 방법으로 입욕시켰다(그림 1).

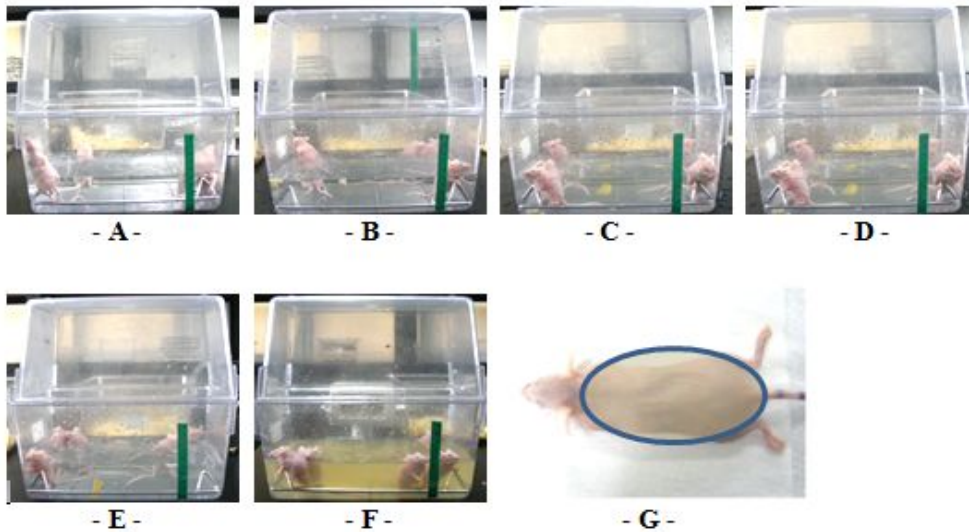


그림 1. 입욕 실험 환경과 처리부위. A~F, 그룹별 입욕 실험 환경; G, 1% DEXA 처리 부위

○ 관찰항목

- DNCB 감작 시작 1일 전부터 1 주일 간격으로 체중의 변화를 측정하였으며, 6주간의 입욕 또는 DEXA 국소 도포 기간 및 11주간의 실험 전 기간 동안의 체중 변화량, 즉 증체량의 변화 역시 산출하였다. 또한 이전의 방법 [Park and Oh, 2014]에 따라 clinical skin severity scores 및 scratching behavior를 각각 감작 시작 5주 후 실험물질 처리 24시간 전부터, 입욕 또는 DEXA 국소 도포 시작 3일 후를 포함하여, 주 1회씩 측정하였다.
- 입욕 시작 6주 후, 최종 희생일에 혈청 중 Ig E 함량, 악하 임파절 및 비장 중량, 비장 cytokine - TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10 함량, 피부 cytokine - TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA 발현, 피부 항산화 방어 시스템 - GSH 함량, 지질과산화 및 superoxide anion 생산능의 변화를 관찰하였고, 피부, 악하 임파절 및 비장의 조직학적 변화 - 피부 상피의 평균 두께 ( $\mu$ m), 진피 내 염증세포 및 비만세포의 침윤 수(cells/mm<sup>2</sup> of dermis), 진피 내 collagen fiber가 차지하는 비율(%//mm<sup>2</sup> of dermis), 비장 전체 두께 (mm/central regions), 비장 백색 수질의 수(white pulps/mm<sup>2</sup> of splenicparenchyma), 적색 수질 세포의 수( $\times 10^3$ cells/mm<sup>2</sup> of splenicparenchyma), 악하 임파절의 전체(mm/central regions) 및 피질 두께 ( $\mu$ m/LN), 피질 내 임파소절의 수(follicles/mm<sup>2</sup> of cortex), 표피 내 caspase-3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), nitrotyrosine(NT) 및 4-Hydroxynonenal(4-HNE) 면역반응성 (cells/100

epithelial cells), 진피 내 MMP-9 면역반응성(%/mm<sup>2</sup> of dermis), 진피 (cells/mm<sup>2</sup> of dermis), 비장(cells/mm<sup>2</sup> of spleen) 및 악하 임파절 (cells/mm<sup>2</sup> of LN) 내 IFN (interferon)- $\gamma$ , inducible nitric oxide synthase 2(iNOS), IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수적 변화 역시 자동영상분석장치(iSolution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Quebec, Canada)를 이용하여, histomorphometry 적으로 측정하였다.

### 3절 연구결과

#### 1. 체중의 변화

○ DNCB 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 체중의 감소가 감작 시작 6 및 7일 후 각각 확인된 반면, boosting 시작 3주 후에는 정상 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 체중의 증가가 일시적으로 확인되었으나, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 6 주간의 입욕 기간 및 11 주간의 실험 전 기간 동안의 증체량의 변화는 확인되지 않았다. 또한 모든 4 종류의 해수 및 DEXA 도포군에서는 DNCB 대조군에 비해 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 실험 전 기간 동안 각각 확인되지 않았다(그림 2).

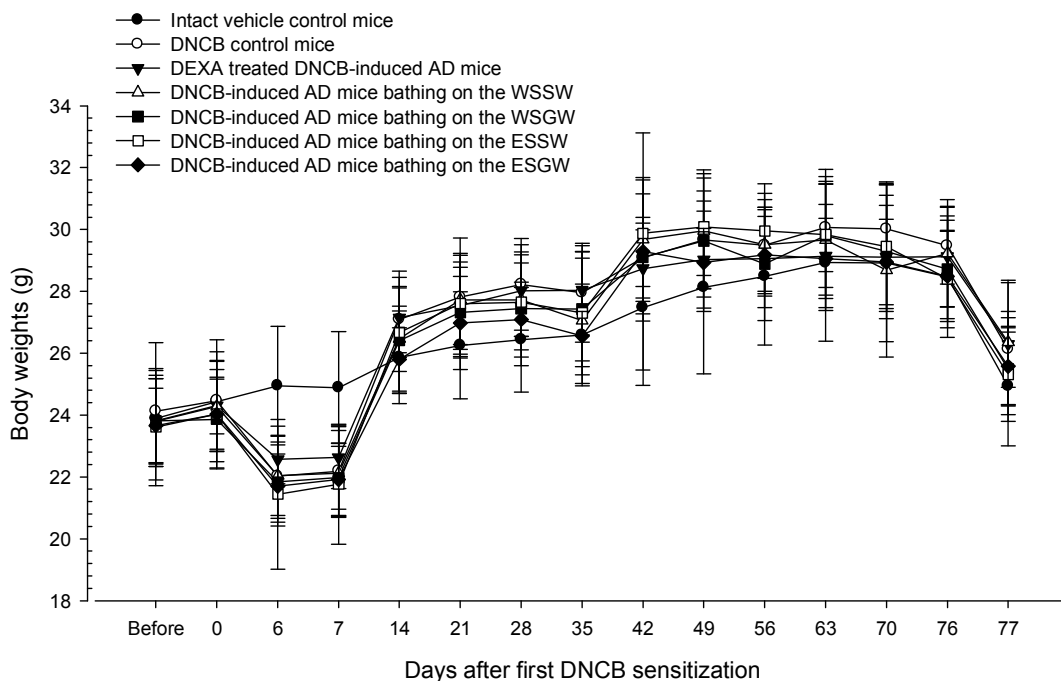


그림 2. 입욕과 DEXA처리에 따른 체중 변화

○ 입욕 또는 DEXA 도포 기간 (6 주) 동안의 증체량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 -19.21%의 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소



도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -28.69, 42.62, -15.57, -27.87 및 27.05%의 변화를 나타내었다.

- 실험 전 기간 (11 주)동안의 증체량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 24.15% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -3.99, -1.25, -3.24, -12.72 및 -10.97%의 변화를 나타내었다.

## 2. Clinical skin severity score의 변화

- 본 실험에서 DNCB 감작 시작 5주 후, pruritus/itching, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion 및 scaling/dryness를 바탕으로 한 clinical skin severity score가 10 이상으로 유사하게 증가된 실험동물을 DNCB 아토피 피부염이 잘 유발된 것으로 판단하고, 선별하여 사용하였으므로, DNCB 대조군에서는 입욕 시작 24시간 전부터 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) clinical skin severity score의 증가를 보여, 실험 전 기간 동안 확인되었다. 한편 1% DEXA 국소 도포군과 서해 온천해수 입욕군에서는 각각 도포 또는 입욕시작 1주일 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) clinical skin severity score의 감소를 보였다. 동해 염지하수 입욕군에서는 입욕 시작 2주 후부터, 서해 표층수 및 동해 표층수 입욕군에서는 각각 입욕 시작 3주 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) clinical skin severity score의 감소를 보였으며, 실험 전 기간 동안 확인되었다(표 3, 그림 3).

표 3. 입욕과 DEXA처리에 따른 Clinical Skin Severity Scores의 변화

그룹 항목	대조군		DEXA	실험군			
	정상 매체	DNCB		WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
35	1.00±0.76	12.13±1.55a	12.25±1.39a	12.25±1.83a	12.00±1.51a	12.13±1.25a	12.25±1.67a
38	1.13±0.99	11.75±1.28a	11.00±1.51a	11.38±1.41a	11.13±0.99a	11.00±1.20a	11.25±1.67a
42	0.75±0.71	11.50±1.41a	8.75±1.28ab	10.75±1.04a	10.25±1.16ac	10.50±1.20a	10.38±1.30a
49	1.00±0.53	10.63±1.41a	7.00±1.20ab	9.88±0.83a	8.88±1.13ab	9.75±1.16a	8.63±1.06ab
56	1.00±0.53	10.13±1.46a	6.13±1.13ab	9.00±1.20ac	8.13±0.99ab	9.00±1.20ac	8.00±1.07ab
63	1.25±0.71	9.75±1.49a	4.75±1.49ab	7.75±1.04ab	6.88±1.25ab	7.63±0.92ab	6.50±0.93ab
70	1.13±0.64	9.13±1.46a	4.00±1.31ab	7.25±0.71ab	6.25±1.04ab	6.88±0.64ab	5.75±0.71a
77	2.00±0.76	8.38±1.30a	3.50±1.07ab	6.25±0.71ab	5.25±1.16ab	5.88±0.64ab	4.88±0.83a

\* 항목은 DNCB 감작 5주 뒤 부터의 입욕진행 날짜를 말함

\* Values are expressed mean ± SD of eight hairless mice, scores (Max = 15)

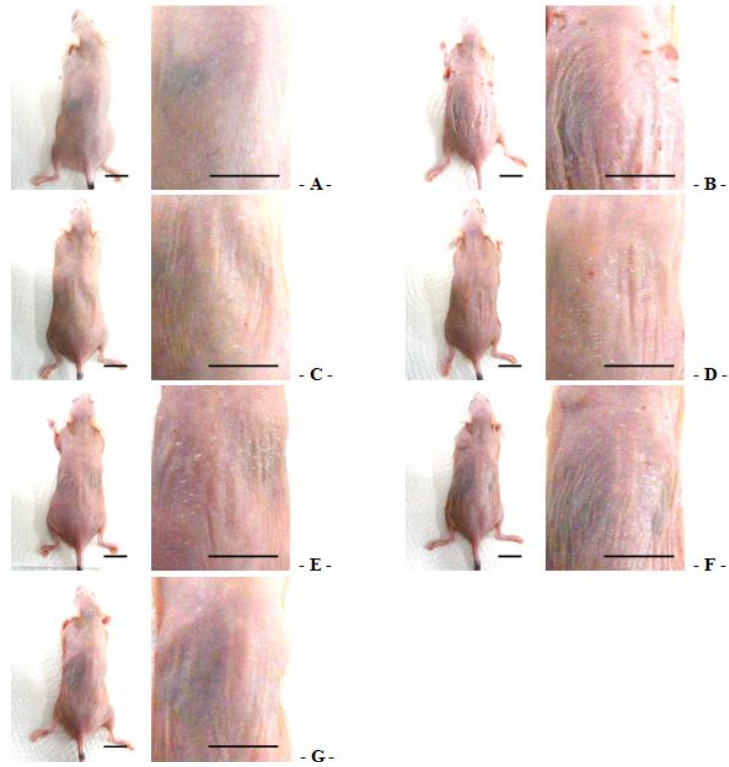


그림 3. 그룹별 등쪽 피부 변화 측정. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표층수 입욕군; D, 서해온천수 입욕군; E, 동해표층수 입욕군; F, 동해염지하수 입욕군; G, DEXA 도포군

○ DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1112.50, 944.44, 1433.33, 962.50, 912.50, 680.00, 711.11 및 318.75%의 clinical skin severity score의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전(감작 시작 5 주 후), 입욕 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었다. DEXA 국소 도포군에서는 DNCB 대조군에 비해 1.03, -6.38, -23.91, -34.12, -39.51, -51.28, -56.16 및 -58.21%의 변화를 각각 도포 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었고, 서해 표층수 입욕군에서는 각각 1.03, -3.19, -6.52, -7.06, -11.11, -20.51, -20.55 및 -25.37%의 변화를 나타내었다. 또한 서해 온천해수 입욕군에서는 DNCB 대조군에 비해 -1.03, -5.32, -10.87, -16.47, -19.75, -29.49, -31.51 및 -37.31%의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었고, 동해 표층수 입욕군에서는 DNCB 대조군에 비해 0.00, -6.38, -8.70, -8.24, -11.11, -21.79, -24.66 및 -29.85%의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었다. 동해 염지하수 입욕군에서는 DNCB 대조군에 비해 1.03, -4.26, -9.78, -18.82, -20.99, -33.33, -36.99 및 -41.79%의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었다.

### 3. Scratching behavior의 변화

○ 본 실험에서 DNCB 감작 시작 5주 후, clinical skin severity score와 함께 scratching behavior가 300회 이상으로 증가된 실험동물을 DNCB 아토피 피부염이 잘 유발된 것으로 판단하고, 선별하여 사용하였으므로, DNCB 대조군에서는 입욕 시작 24시간 전부터 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p<0.01$ ) scratching behavior의 증가를 보였으며 실험 전 기간 동안에 확인되었다. 한편 1% DEXA 국소 도포군에서는 도포 시작 1주일 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p<0.05$ ) scratching behavior의 감소를 보여, 실험 전 기간 동안 유의성 있는( $p<0.01$ ) 감소를 나타내었다. 또한 서해 온천해수 및 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 입욕 시작 2주 후부터, 서해 표층수 및 동해 표층수 입욕군에서는 각각 입욕 시작 4주 후부터 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p<0.01$  또는  $p<0.05$ ) scratching behavior의 감소를 보였으며 실험 전 기간 동안 확인되었다(표 4).

표 4. 그룹별 Scratching Behaviors 변화

그룹 항목	대조군			실험군			
	정상 매체	DNCB	DEXA	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
35	15.31±9.09	478.13±112.61a	480.88±109.99a	484.50±105.49a	480.63±101.37a	475.50±97.90a	481.88±120.67a
38	13.63±6.07	468.50±111.31a	436.13±101.11a	461.13±106.48a	441.50±87.29a	455.25±93.97a	435.38±88.52a
42	13.00±4.41	456.25±102.61a	324.88±88.38ac	448.13±101.73a	393.00±52.97a	415.00±76.14a	390.00±77.26a
49	14.63±6.67	448.63±97.87a	223.25±47.38ab	407.00±85.47a	340.50±42.52ac	369.50±68.29a	432.00±53.17ac
56	16.63±5.42	431.25±90.00a	177.50±22.67ab	381.38±83.58a	306.88±27.97ab	355.63±66.34a	299.38±32.11ab
63	17.38±5.60	412.38±68.67a	149.25±34.85ab	312.13±66.85ac	290.38±37.89ab	307.88±39.20ab	273.63±29.66ab
70	18.00±4.28	410.50±77.21a	90.63±24.11ab	288.38±70.04ab	251.75±26.60ab	284.00±39.37ab	229.75±24.02ab
77	19.25±5.06	405.00±65.20a	70.88±30.89ab	273.00±63.19ab	230.25±27.77ab	258.88±30.68ab	203.75±24.32ab

\* Values are expressed mean ± SD of eight hairless mice, frequencies/30 min

○ DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 3061.16, 3338.53, 3409.62, 2967.52, 2493.98, 2273.38, 2180.56 및 2003.90%의 scratching behavior의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전(감작 시작 5주 후), 입욕 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었으며, DEXA 국소 도포군에서는 DNCB 대조군에 비해 0.58, -6.91, -28.79, -50.24, -58.84, -63.81, -77.92 및 -82.50%의 변화를 각각 도포 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었고, 서해 표층수 입욕군에서는 각각 1.33, -1.57, -1.78, -9.28, -11.57, -24.31, -29.75 및 -32.59%의 변화를 나타내었다. 또한 서해 온천해수 입욕군에서는 DNCB 대조군에 비해 0.52, -5.76, -13.86, -24.10, -28.84, -29.58, -38.67 및 -43.15%의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었고, 동해 표층수 입욕군에서는 DNCB 대조군에 비해 -0.55,

-2.83, -9.04, -17.64, -17.54, -25.34, -30.82 및 -36.08%의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었으며, 동해 염지하수 입욕군에서는 DNCB 대조군에 비해 0.78, -7.07, -14.52, -26.00, -30.58, -33.65, -44.03 및 -49.69%의 변화를 각각 입욕 시작 24시간 전, 도포 3일, 1, 2, 3, 4, 5 및 6주 후 나타내었다.

#### 4. 혈청 중 총 Ig E 함량의 변화

○ DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 혈청 중 총 Ig E 함량의 증가를 보였으나, DEXA 국소 도포군, 동해염지하수, 서해온천해수, 동해표층수 및 서해표층수 입욕군 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 혈청중 총Ig E 함량의 감소하는 것으로 확인되었다(그림 4).

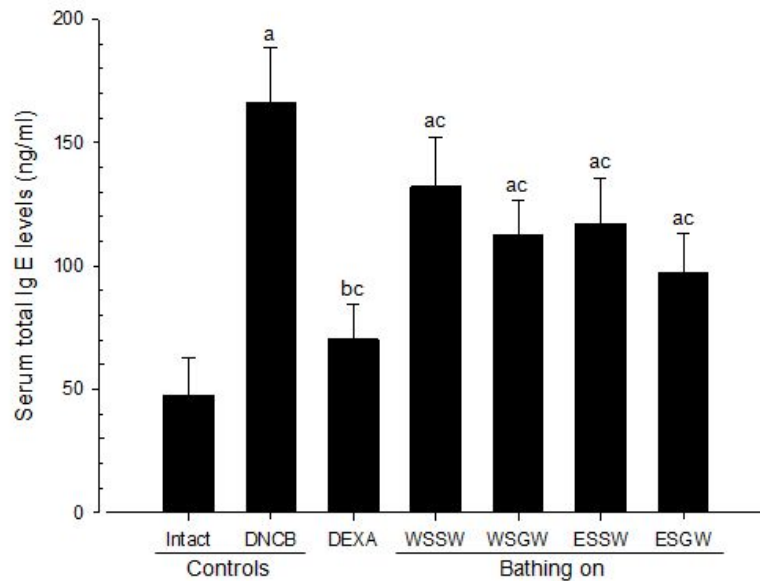


그림 4. 혈청 Ig E의 변화량

○ 혈청 중 총 Ig E 함량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 249.23% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -57.63, -20.50, -32.30, -29.46 및 -41.55%의 변화를 나타내었다.

#### 5. 악하임파절 및 비장 중량의 변화

○ DNCB 대조군의 경우, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 악하 임파절 및 비장 절대 및 상대 중량의 증가가 각각 확인되었으나, DEXA 국소 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입

육군 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 악하임파절 및 비장 절대 및 상대 중량의 감소가 확인되었다(표 5, 그림 5).

표 5. 비장 및 악하임파절의 중량변화

그룹	항목	절대중량 (g)		상대중량 (% of body weights)	
		비장	악하임파절	비장	악하임파절
정상 매체		0.098±0.014	0.007±0.003	0.395±0.069	0.029±0.009
DNCB		0.237±0.032a	0.019±0.003a	0.909±0.135a	0.073±0.011a
DEXA		0.123±0.017bc	0.009±0.002c	0.472±0.082c	0.035±0.00bc
WSSW		0.192±0.026ac	0.015±0.003ac	0.730±0.092ac	0.057±0.007ac
WSGW		0.163±0.027ac	0.013±0.003ac	0.640±0.094ac	0.052±0.013ac
ESSW		0.177±0.023ac	0.014±0.003ac	0.705±0.115ac	0.055±0.015ac
ESGW		0.144±0.021ac	0.012±0.002ac	0.564±0.076ac	0.046±0.009ac

\* Values are expressed mean ± SD of eight hairless mice, frequencies/30 min

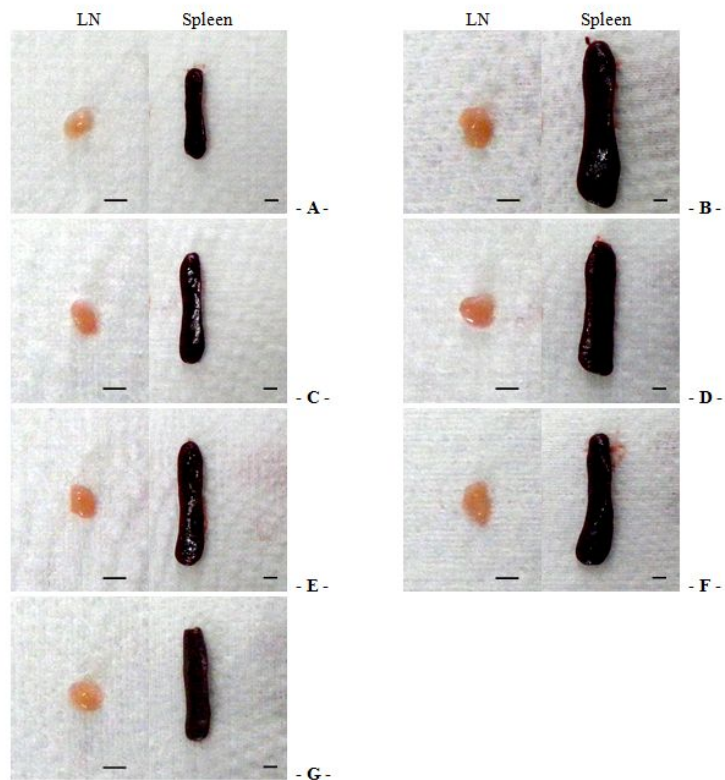


그림 5. 비장(오른쪽)과 악하임파절(왼쪽) 사진

- 비장 절대 및 상대 중량은 DNCB 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 142.15 및 129.93%의 변화를 각각 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -48.05, -18.99, -31.12, -25.16 및 -39.19%의 절대 비장 중량의 변화를 나타내었고, 각각 -48.10, -19.72, -29.61, -22.42 및 -37.94%의 상대 비장 중량의 변화를 나타내었다.
- 악하임파절 절대 및 상대 중량은 DNCB 대조군에서 정상 매체 대조군에 비해 157.63 및 148.05%의 변화를 각각 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -51.97, -20.39, -30.26, -27.63 및 -38.16%의 절대 악하임파절 중량의 변화를 나타내었고, 각각 -52.34, -21.63, -28.06, -24.91 및 -36.52%의 상대 악하임파절 중량의 변화를 나타내었다.

### 6. 비장 cytokine 함량의 변화

- DNCB 대조군의 경우, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 비장 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10 함량의 증가가 각각 확인되었으나, DEXA 국소 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 비장 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10 함량의 감소가 확인되었다(표 6).

표 6. 비장조직의 cytokine 함량 변화

그룹	항목	비장 cytokine 함량 (pg/mg protein)		
		Tumor necrosis factor- $\alpha$	Interleukin-1 $\beta$	Interleukin-10
정상 매체		164.92 $\pm$ 23.50	49.22 $\pm$ 12.57	216.95 $\pm$ 54.25
DNCB		30.62 $\pm$ 113.24c	196.31 $\pm$ 21.62a	88.86 $\pm$ 131.07c
DEXA		198.70 $\pm$ 19.33de	87.83 $\pm$ 14.66ab	317.61 $\pm$ 52.05ce
WSSW		373.00 $\pm$ 39.06ce	150.59 $\pm$ 18.60ab	514.88 $\pm$ 103.99cf
WSGW		322.99 $\pm$ 67.87ce	125.91 $\pm$ 14.36ab	443.48 $\pm$ 76.07ce
ESSW		352.92 $\pm$ 64.20ce	141.80 $\pm$ 21.29ab	508.11 $\pm$ 73.76ce
ESGW		296.31 $\pm$ 65.51ce	114.18 $\pm$ 23.27ab	402.62 $\pm$ 71.39ce

\* Values are expressed mean  $\pm$  SD of eight hairless mice

- 비장 조직내 TNF- $\alpha$  함량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 221.75% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -62.55, -29.70, -39.13, -33.49 및 -44.16%의 변화를 나타내었다.

- 비장 조직내 IL-1 $\beta$  함량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 298.82% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -55.26, -23.29, -35.87, -27.77 및 -41.84%의 변화를 나타내었다.
- 비장 조직내 IL-10 함량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 217.53% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -53.89, -25.26, -35.62, -26.24 및 -41.55%의 변화를 나타내었다.

### 7. 피부 조직내 cytokine mRNA 발현의 변화

- DNCB 대조군의 경우, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 피부 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA의 발현 증가가 각각 확인되었으나, DEXA 국소 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 피부 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA의 발현의 감소가 확인되었다(표 7).

표 7. 피부 조직내 cytokine mRNA 발현의 변화

그룹	항목	Skin mRNA expressions (relative expressions/GAPDH mRNA)			
		비장	악하림프절	비장	악하림프절
정상매체		1.03±0.08	1.01±0.05	1.04±0.11	1.01±0.08
DNCB		5.62±1.22a	4.94±0.74a	5.50±1.14a	3.07±0.54a
DEXA		2.74±1.20ab	1.88±0.56ab	2.25±0.52ab	1.40±0.21ab
WSSW		4.18±0.52ac	3.87±0.60ac	3.95±0.89ab	2.30±0.37ab
WSGW		3.46±0.77ac	3.06±0.50ab	3.47±0.82ab	1.98±0.26ab
ESSW		3.94±0.62ac	3.59±0.66ab	3.70±0.71ab	2.16±0.28ab
ESGW		2.82±1.22ac	2.55±0.79ab	3.13±0.63ab	1.74±0.34ab

\* Values are expressed mean  $\pm$  SD of eight hairless mice, frequencies/30 min

- 피부 조직내 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 444.67% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -51.28, -25.61, -38.50, -29.92 및 -49.86%의 변화를 나타내었다.
- 피부 조직내 IL-4 mRNA 발현은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 391.54% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조

- 군에 비해 -61.97, -21.71, -38.01, -27.35 및 -48.36%의 변화를 나타내었다.
- 피부 조직내 IL-5 mRNA 발현은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 430.36% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -59.09, -28.26, -37.01, -32.76 및 -43.16%의 변화를 나타내었다.
  - 피부 조직내 IL-13 mRNA 발현은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 203.58% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -54.52, -25.00, -35.59, -29.68 및 -43.40%의 변화를 나타내었다.

### 8. 피부 조직내 항산화 방어 시스템의 변화

- DNCB 대조군의 경우, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 피부 조직내 GSH 함량의 감소와 함께 지질 과산화(MDA 함량) 및 superoxide anion 생산량의 증가가 각각 확인되었으나, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 각각 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 피부 조직내 GSH 함량의 증가, 지질 과산화 및 superoxide anion 생산량의 감소가 확인되었다. 한편 1% DEXA 도포군에서는 DNCB 대조군과 비교하여 유의성 있는 피부 조직내 GSH 함량, 지질 과산화 및 superoxide anion 생산량의 변화는 확인되지 않았다(표 8).

표 8. 피부 조직 내 항산화 방어 시스템의 변화

그룹	피부 조직 내 항산화 방어 시스템		
	Glutathione ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein)	Lipid peroxidation - Malondialdehyde ( $\text{nM}/\text{mg}$ of protein)	Superoxide anion production (NBT reduction/OD at 600nm)
정상매체	1.49 $\pm$ 0.27	0.38 $\pm$ 0.13	0.41 $\pm$ 0.12
DNCB	0.44 $\pm$ 0.17a	2.66 $\pm$ 0.70d	1.68 $\pm$ 0.27d
DEXA	0.43 $\pm$ 0.13a	2.58 $\pm$ 0.87d	1.57 $\pm$ 0.62d
WSSW	0.67 $\pm$ 0.10ac	1.83 $\pm$ 0.35df	1.28 $\pm$ 0.26df
WSGW	0.83 $\pm$ 0.22ab	1.38 $\pm$ 0.22de	1.03 $\pm$ 0.22de
ESSW	0.76 $\pm$ 0.18ab	1.72 $\pm$ 0.20df	1.14 $\pm$ 0.17de
ESGW	1.01 $\pm$ 0.27ab	1.03 $\pm$ 0.31de	0.73 $\pm$ 0.25de

\* Values are expressed mean  $\pm$  SD of eight hairless mice

- 피부 조직내 GSH 함량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 -70.67% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 처리군에서는 각각 DNCB 대조군에



비해 -2.29, 52.44, 90.26, 74.79 및 132.09%의 변화를 나타내었다.

- 피부 조직내 지질 과산화 지표 MDA 함량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 594.44% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -3.06, -30.96, -48.14, -35.29 및 -61.18%의 변화를 나타내었다.
- 피부 조직내 superoxide anion 생산량은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 310.67% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -7.05, -23.76, -38.83, -32.15 및 -56.50%의 변화를 나타내었다.

## 9. 조직병리학적 변화

- 피부의 조직병리학적 변화
  - DNCB 대조군의 경우, 표피 각질층세포의 증생에 의한 상피두께의 현저한 증가가 진피내 비만 세포, 염증세포 및 콜라겐 섬유 증식과 함께 관찰되었으며, caspase-3, PARP, NT 및 4-HNE 면역반응세포의 현저한 수적 증가가 표피 각질층세포에서 확인되었다. 진피내 MMP-9 면역반응성, IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수적 증가 역시 진피내에서 확인되었다. 즉, DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 상피두께, 침윤 비만세포 및 염증세포의 수, 진피내 콜라겐 섬유가 차지하는 비율, 표피내 caspase-3, PARP, NT 및 4-HNE 면역반응세포의 수, 진피내 MMP-9 면역반응성, 진피내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수적 증가가 각각 확인되었다. 한편 모든 4 종류의 해수 입욕에 의해 이러한 조직병리학적 과민반응에 의한 아토피성 피부염 소견이 DEXA 국소 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 유의성 있게( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 감소되었으며, 1% DEXA 도포군에서도 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 상피두께, 침윤 비만세포 및 염증세포의 수, 표피내 caspase-3, PARP, NT 및 4-HNE 면역반응세포의 수, 진피내 MMP-9 면역반응성, 진피내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수적의 감소를 각각 나타내었으나, 진피내 콜라겐 섬유가 차지하는 비율은 DNCB 대조군과 유사하게 확인되었다(표 9, 그림 6~8).

표 9. 피부의 조직병리학적 변화

항목	그룹		DEXA	실험군			
	대조군 정상매 체	DNCB		WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
Caspase-3	3.13±1.96	85.00±7.33a	37.00±10.62ab	71.13±7.04ab	54.25±10.62ab	64.13±11.47ab	34.13±10.74ab
PARP	6.50±2.20	85.00±10.01c	21.38±5.40cd	69.25±9.47ce	48.00±14.58cd	55.13±11.29cd	38.63±12.32cd
Nitrotyrosine	16.38±3.74	87.63±6.55c	16.63±3.50d	71.38±10.93cd	42.50±10.63cd	60.75±12.38cd	27.25±7.27cd
4-HNE	3.63±1.41	85.38±12.78c	24.25±7.03cd	67.50±6.12ce	55.38±11.12cd	64.13±11.78cd	39.63±15.05cd
MMP-9	10.37±5.62	55.34±10.24a	38.74±10.80ab	41.53±6.54ab	34.69±7.06ab	39.28±7.70ab	24.68±6.22ab
IFN-γ	7.42±2.04	138.52±25.95c	39.46±15.48cd	110.67±13.62ce	83.71±13.67cd	101.45±12.69cd	61.28±12.98cd
iNOS	6.68±2.14	237.05±28.70c	62.15±20.37cd	196.20±23.12ce	133.28±39.82cd	154.53±20.51cd	88.08±19.61cd
IL-1β	4.83±2.37	185.70±26.59c	41.73±14.26cd	129.77±31.57cd	87.36±13.42cd	110.18±11.01cd	62.02±17.18cd
IL-2	3.52±1.75	86.46±20.19c	17.15±6.12cd	45.13±9.42cd	30.47±11.94cd	39.48±17.42cd	23.50±5.76cd
TNF-α	5.22±1.29	65.15±14.79c	16.42±5.19cd	38.96±14.48cd	24.26±3.42cd	32.67±9.78cd	20.97±2.58cd

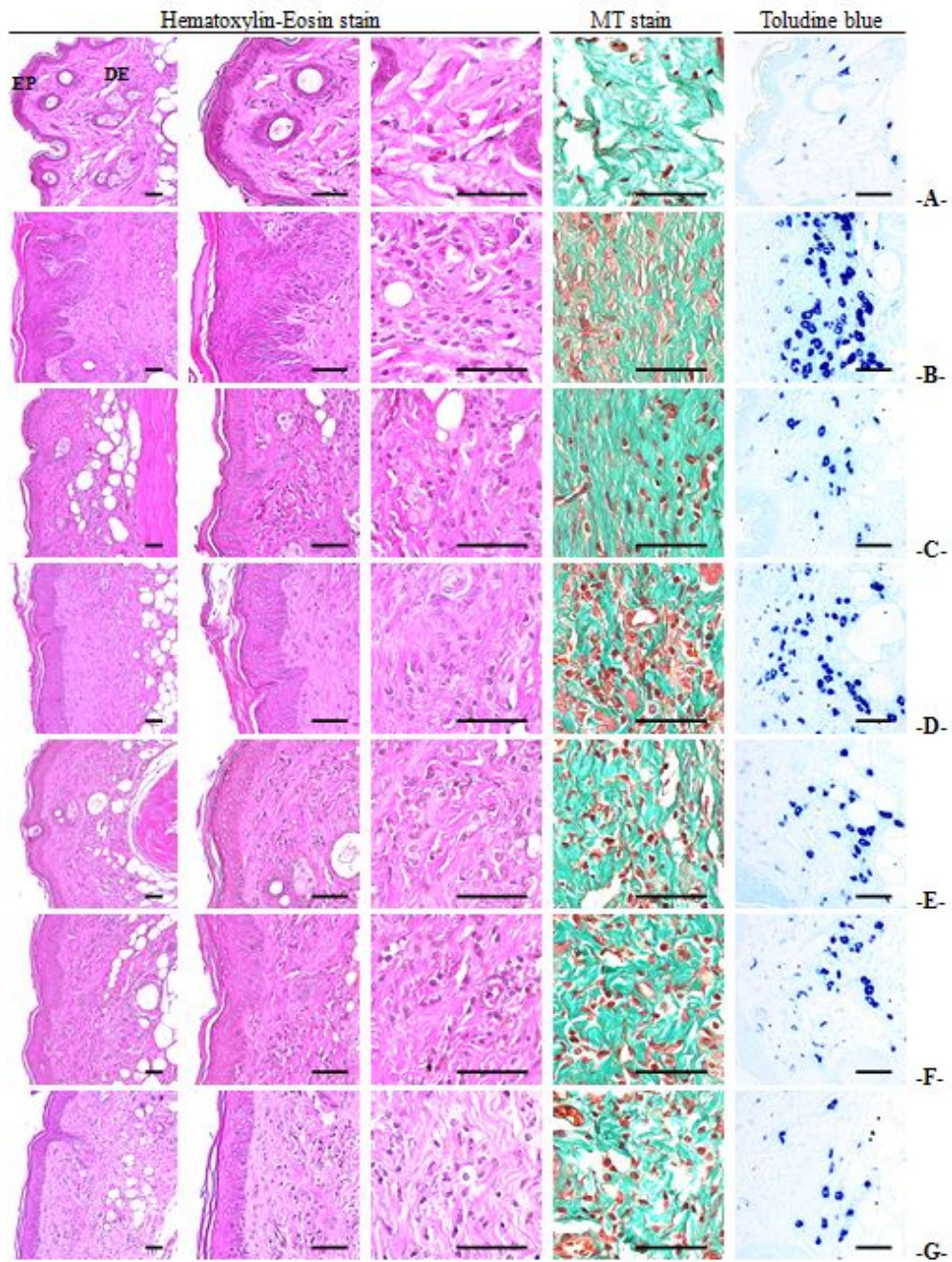
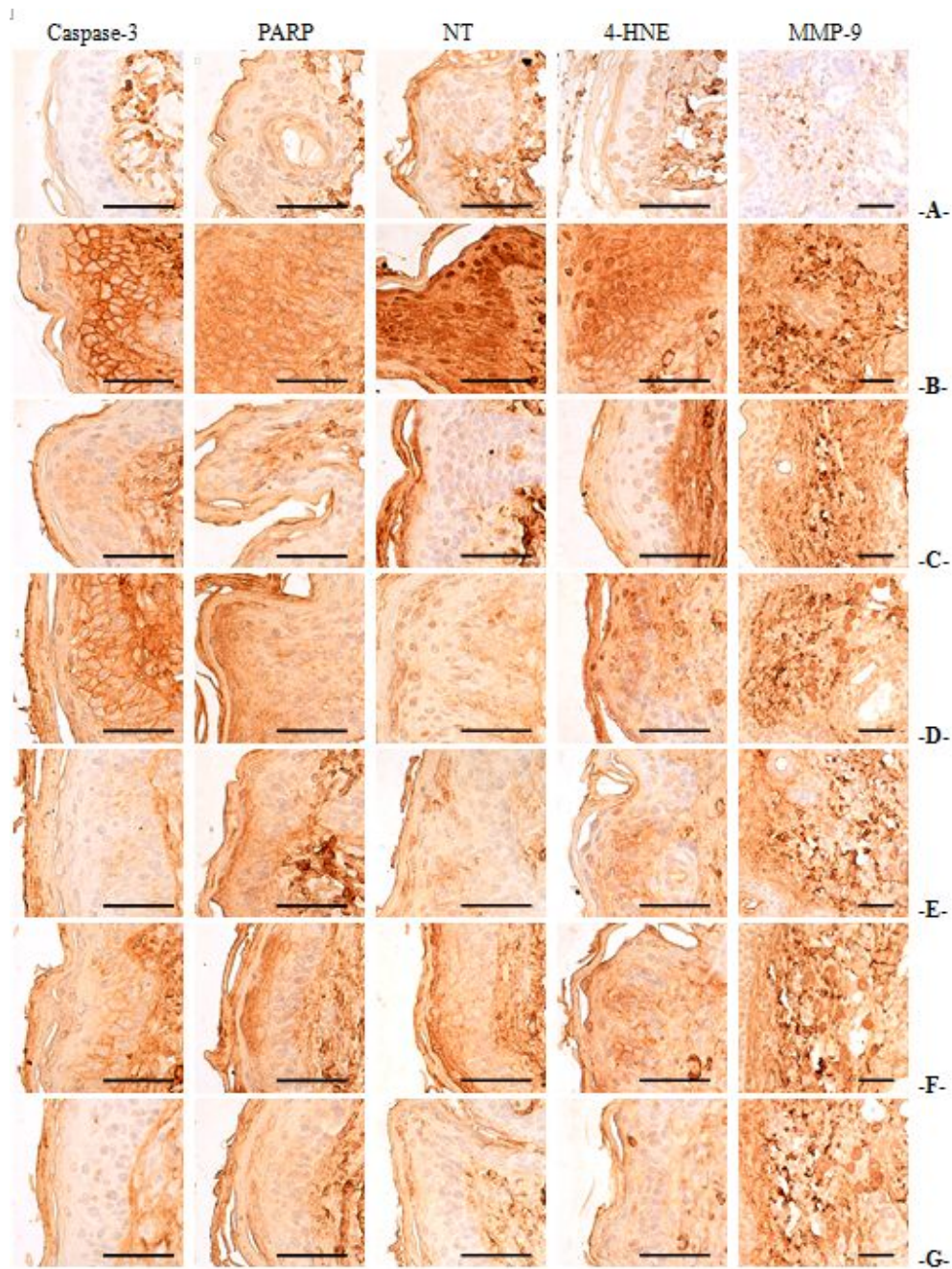


그림 6. 피부조직의 조직학적 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표충수 입욕군; D, 서해온천수 입욕군; E, 동해표충수 입욕군; F, 동해염지하수 입욕군; G, DEXA 도포군





[FIGURE 8 CONTINUES]

그림 7. 피부 면역조직화학상의 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표층수 입욕군; D, 서해온천수 입욕군; E, 동해표층수 입욕군; F, 동해염 지하수 입욕군; G, DEXA 도포군

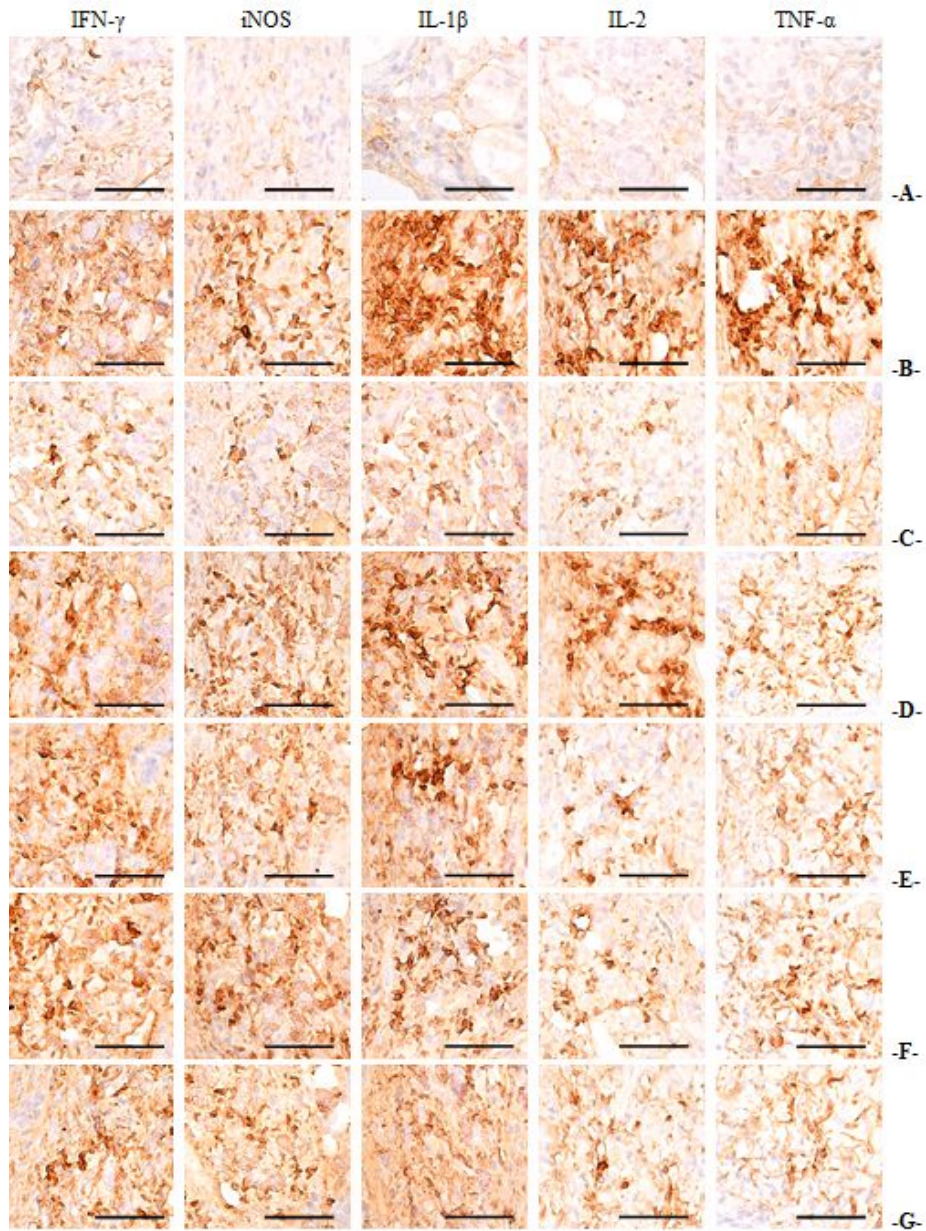


그림 8. 진피 내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ 의 변화 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표층수 입욕군; D, 서해온천수 입욕군; E, 해표층수 입욕군; F, 동해염지하수 입욕군; G, DEXA 도포군

- 상피의 평균 두께는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 282.98% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -67.84, -38.42, -53.18, -47.86 및 -58.75%의 변화를 나타내었다.
- 피부 조직내 침윤 염증세포의 수는DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1673.86% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표



- 층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -82.03, -40.20, -58.58, -44.71 및 -67.65%의 변화를 나타내었다.
- 진피 내 콜라겐 섬유가 차지하는 비율은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 92.63% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -1.11, -17.65, -25.75, -21.87 및 -34.74%의 변화를 나타내었다.
  - 피부 조직내 침윤 비만세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 556.06% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -72.96, -23.31, -39.84, -30.12 및 -58.38%의 변화를 나타내었다.
  - 표피내 Caspase-3 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 2620.00% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -56.47, -16.32, -36.18, -24.56 및 -59.85%의 변화를 나타내었다.
  - 표피내 PARP 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1207.69% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -74.85, -18.53, -43.53, -35.15 및 -54.56%의 변화를 나타내었다.
  - 표피내 NT면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 435.11% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -81.03, -18.54, -51.50, -30.67 및 -68.90%의 변화를 나타내었다.
  - 표피내 4-HNE 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 2255.17% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입육군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -71.60, -20.94, -35.14, -24.89 및 -53.59%의 변화를 나타내었다.

- 진피내 MMP-9 면역반응성은 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 433.73% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -30.00, -24.96, -37.32, -29.03 및 -55.41%의 변화를 나타내었다.
- 진피내 IFN- $\gamma$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1765.66% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -71.51, -20.10, -39.57, -26.76 및 -55.76%의 변화를 나타내었다.
- 진피내 iNOS 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 3444.67% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -73.78, -17.23, -43.77, -34.81 및 -62.84%의 변화를 나타내었다.
- 진피내 IL-1 $\beta$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 3738.76% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -77.52, -30.12, -52.96, -40.66 및 -66.60%의 변화를 나타내었다.
- 진피내 IL-2 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 2352.84% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -80.16, -47.80, -64.75, -54.33 및 -72.82%의 변화를 나타내었다.
- 진피내 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1146.89% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -74.79, -40.20, -62.76, -49.85 및 -67.81%의 변화를 나타내었다.

○ 비장의 조직병리학적 변화

- DNCB 대조군의 경우, 적색 수질의 임파구성 세포의 증생에 의한 현저한

비장 종대 소견이 관찰되었으며, IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 현저한 수적 증가 확인되었다. 즉, DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 비장 전체 두께, 적색 수질 세포의 수, 비장 조직내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수적 증가가 각각 확인되었다. 한편 1% DEXA 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 이러한 조직병리학적 비장 종대 소견이 유의성 있게 ( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 감소되었다. 정상 매체 대조군 및 과 비교하여 의미 있는 비장 백색 수질의 수적 변화는 모든 DNCB 처리군에서 확인되지 않았으며, DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 비장 백색수질의 수적 변화 역시 모든 처리군에서 확인되지 않았다(표 10, 그림 9~10).

- 비장 전체 평균 두께는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 120.11% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -51.28, -31.58, -43.90, -39.22 및 -49.34%의 변화를 나타내었다.
- 비장 백색 수질의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 9.80% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -8.04, 2.68, -7.14, -5.36 및 -2.68%의 변화를 나타내었다.
- 단위 면적당 비장 적색 수질 세포의 평균 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 911.92% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -82.70, -25.73, -47.15, -37.52 및 -61.86%의 변화를 나타내었다.
- 비장 조직내 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 2950.44% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -89.21, -33.30, -62.34, -48.77 및 -77.57%의 변화를 나타내었다.
- 비장 조직내 IFN- $\gamma$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1121.23% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -80.97, -24.57, -48.40, -40.67 및 -65.72%의 변



화를 나타내었다.

- 비장 조직내 iNOS 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1129.13% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -81.47, -27.46, -51.28, -37.39 및 -63.78%의 변화를 나타내었다.
- 비장 조직내 IL-1 $\beta$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 468.35% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -82.13, -25.43, -49.03, -32.27 및 -49.15%의 변화를 나타내었다.
- 비장 조직내 IL-2 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 895.66% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -84.39, -33.16, -58.74, -48.04 및 -72.93%의 변화를 나타내었다.

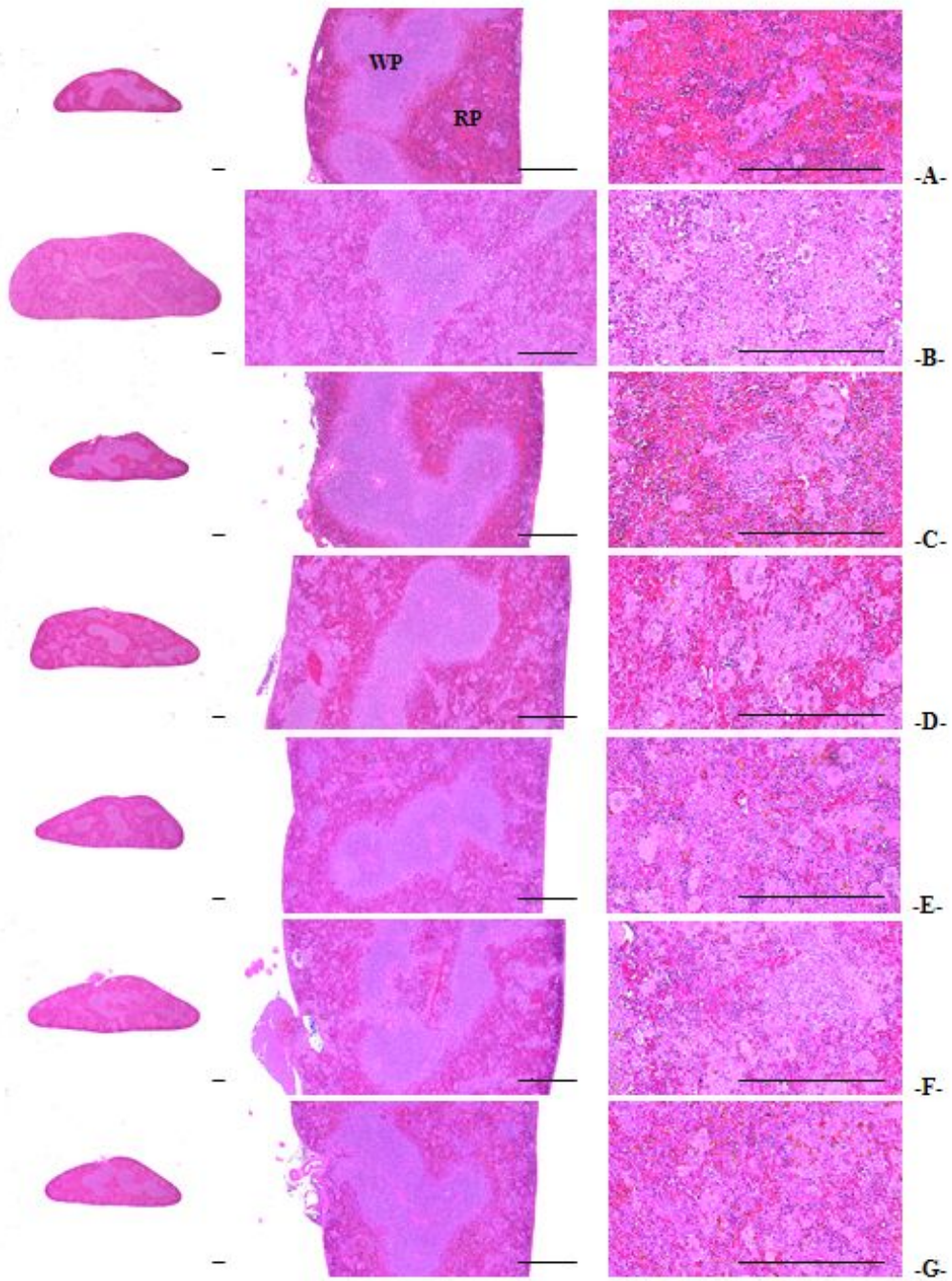


그림 9. 비장조직의 조직학적 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표층수 입욕군; D, 서해온천수 입욕군; E, 동해표층수 입욕군; F, 동해염지하수 입욕군; G, DEXA 도포군

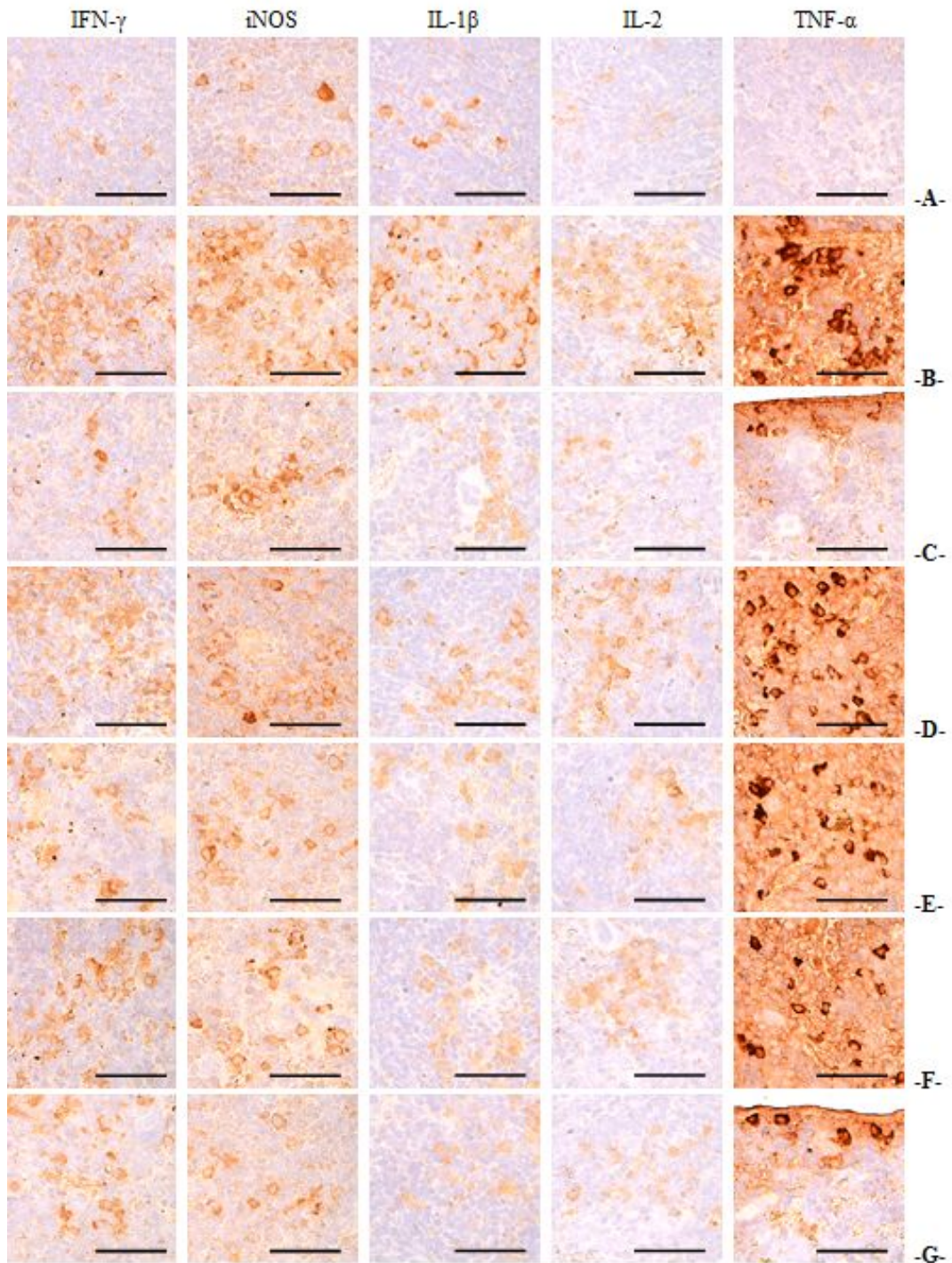


그림 10. 비장조직내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ 의 면역조직화학적 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표충수 입욕군; D, 서해운천수 입욕군; E, 동해표충수 입욕군; F, 동해염지하수 입욕군; G, DEXA 도포군

표 10. 비장조직의 조직형태측학적 분석

항목	대조군		DEXA	실험군			
	Intact	DNCB		WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
전체 두께	1.55±0.28	3.42±0.59a	1.67±0.29c	2.34±0.39ac	1.92±0.25bc	2.08±0.25ac	1.73±0.12c
백색 수질	12.75±1.49	14.00±1.69	12.88±2.03	14.38±2.13	13.00±1.51	13.25±1.67	13.63±2.72
적색 수질	2.91±0.87	29.40±7.33a	5.09±2.65bc	21.83±3.20ad	15.54±2.15ac	18.37±2.19ac	11.21±4.27ac
TNF-α	14.13±6.20	430.88±90.74a	46.50±19.67ac	287.38±79.22ac	162.25±39.33ac	220.75±56.24ac	96.63±16.40ac
IFN-γ	57.13±28.54	697.63±121.01a	132.75±39.64ac	526.25±67.50ad	360.00±100.05ac	413.88±87.74ac	239.13±81.36ac
iNOS	64.38±20.28	791.25±144788	146.63±30.65ac	574.00±117.85ac	385.50±72.73ac	495.38±81.59ac	286.63±82.41ac
IL-1β	143.38±49.11	814.88±172.80a	145.63±65.53c	607.63±105.33ad	415.38±114.67ac	551.88±111.26ac	332.88±98.48ac
IL-2	89.38±47.11	889.88±148.36a	138.88±45.04bc	594.75±141.99ac	367.13±107.45ac	462.38±117.65ac	240.88±117.08ac

\* Values are expressed mean ± SD of eight hairless mice

○ 악하임과절의 조직병리학적 변화

- DNCB 대조군의 경우, 임파구 증생에 의한 현저한 악하임과절 종대 소견이 관찰되었으며, IFN-γ, iNOS, IL-1β, IL-2 및 TNF-α 면역반응세포의 현저한 수적 증가가 확인되었다. 즉, DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 악하임과절 전체 두께, 피질내 임파구성 여포의 수, 피질 두께, 악하임과절 조직내 IFN-γ, iNOS, IL-1β, IL-2 및 TNF-α 면역반응세포의 수적 증가가 각각 확인되었다. 한편 1% DEXA 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 이러한 조직병리학적 악하 임과절 종대 소견이 유의성 있게(p<0.01) 감소되었다(표 11, 그림 11~12).
- 악하임과절 전체 평균 두께는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 131.18% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -42.37, -21.30, -35.59, -24.61 및 -42.96%의 변화를 나타내었다.
- 악하임과절 피질내 임파구성 여포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 207.69% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -58.57, -19.29, -34.64, -27.86 및 -58.21%의 변화를 나타내었다. 악하임과절 피질 평균 두께는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 177.78% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각



DNCB 대조군에 비해 -59.26, -16.15, -23.17, -17.69 및 -46.12%의 변화를 나타내었다.

- 악하임과절 조직내 TNF- $\alpha$ 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1645.68% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -84.67, -27.99, -50.36, -30.24 및 -70.67%의 변화를 나타내었다.
- 악하임과절 조직내 IFN- $\gamma$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 2550.32% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -90.82, -23.59, -61.59, -45.62 및 -77.43%의 변화를 나타내었다. 악하임과절 조직 내 iNOS 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 1675.14% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -87.37, -26.03, -58.15, -46.53 및 -75.56%의 변화를 나타내었다.
- 악하임과절 조직내 IL-1 $\beta$  면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 719.90% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -64.83, -23.53, -48.84, -36.24 및 -65.61%의 변화를 나타내었다.
- 악하임과절 조직내 IL-2 면역반응세포의 수는 DNCB 대조군에서는 정상 매체 대조군에 비해 2867.54% 변화를 나타내었으며, 1% DEXA 국소 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수, 동해 염지하수 입욕군에서는 각각 DNCB 대조군에 비해 -81.91, -46.13, -65.47, -62.21 및 -74.74%의 변화를 나타내었다.

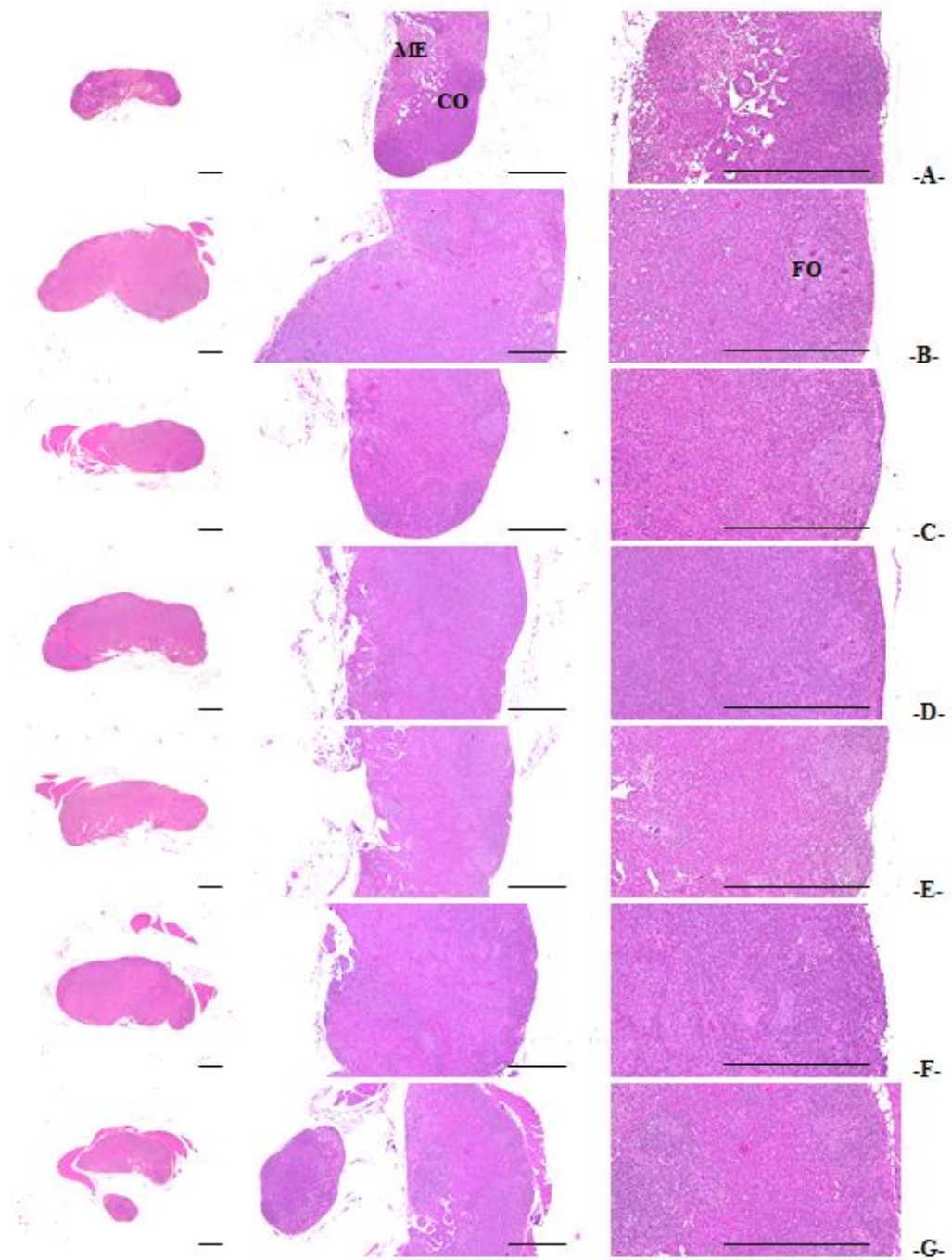


그림 11. 약하림프질의 조직학적 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표층수 입육군; D, 서해온천수 입육군; E, 동해표층수 입육군; F, 동해염 지하수 입육군; G, DEXA 도포군

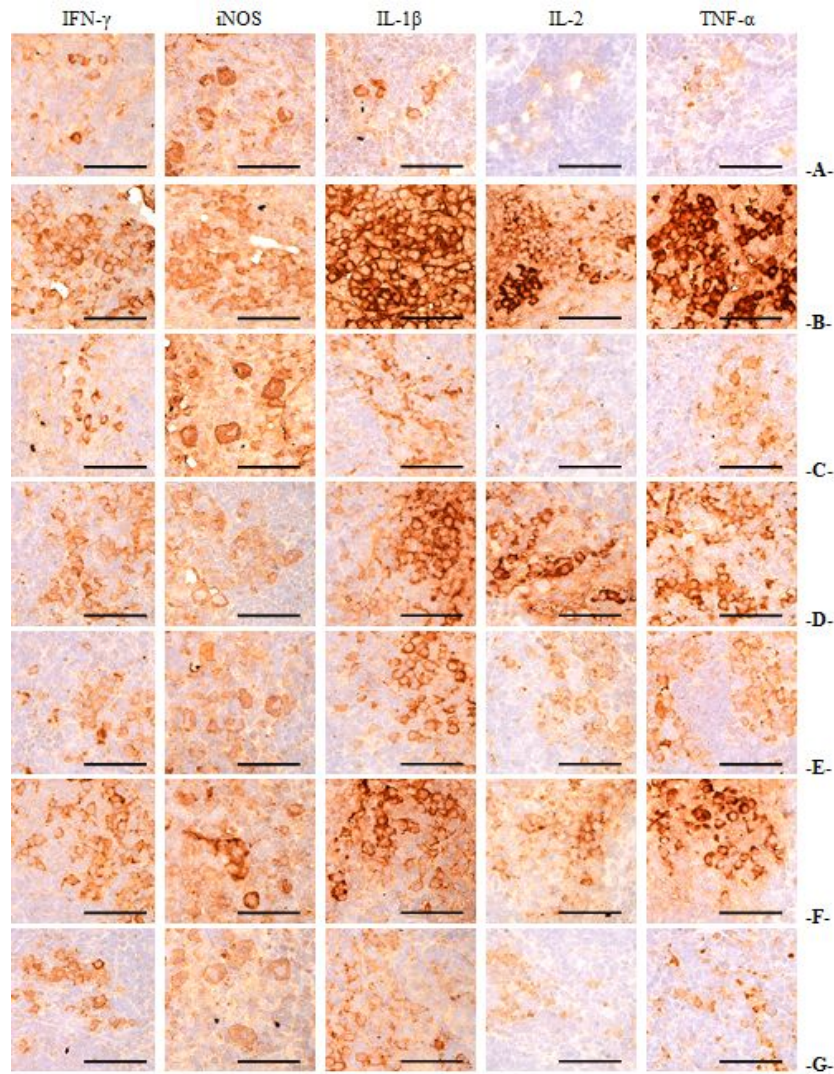


그림 12. 악하림프절의 면역조직화학적 분석 이미지. A, 정상 매체 대조군; B, DNCB 대조군; C, 서해표충수 입육군; D, 서해온천수 입육군; E, 동해표충수 입육군; F, 동해염지하수 입육군; G, DEXA 도포군

표 11. 악하림프절의 조직형태계측학적 분석

항목	대조군			실험군			
	정상 매체	DNCB	DEXA	WSSW	WSGW	ESSW	ESGW
전체 두께	0.73±0.17	1.70±0.39a	0.98±0.20bc	1.34±0.14ac	1.09±0.17ac	1.28±0.22ac	0.97±0.12bc
여포 수	11.38±2.77	35.00±5.81a	14.50±2.73c	28.25±5.60ac	22.88±3.60ac	25.25±5.75ac	14.63±2.07ac
피질 두께	353.27±104.03	981.34±123.88a	399.76±98.96c	822.82±100.84ac	753.92±123.13ac	807.70±119.32ac	528.73±128.20ac
TNF-α	7.52±2.03	131.36±24.32d	20.13±11.80de	94.60±12.60de	65.21±23.35de	91.63±14.44de	38.52±11.13de
IFN-γ	7.80±5.27	206.72±15.82d	18.97±5.99de	157.95±25.35de	79.41±15.14de	112.41±14.85de	46.65±27.73de
iNOS	8.65±4.11	153.55±24.80d	19.38±7.03de	113.57±21.64de	64.26±12.58de	82.10±26.17de	37.52±15.17de
IL-1β	15.07±6.75	123.60±20.31d	43.47±12.23de	94.51±13.83de	63.23±95.66de	78.81±18.19de	42.50±14.74de
IL-2	2.85±1.54	84.57±17.53d	15.30±5.39de	45.56±13.55de	29.20±7.20de	31.96±8.98de	21.36±72.07de

\* Values are expressed mean ± SD of eight hairless mice

## 4절 연구고찰 및 결론

### 1. 고찰

- 아토피 피부염은 소양증을 동반하는 만성 염증성 피부질환[Leung, 2000]으로, 피부 방어 기능의 손상, 탈수 및 표피의 항상성을 조절하는 filaggrin 유전자의 돌연변이에 의해 유발되며, 아토피 피부염과 관련된 모든 증상들은 다양한 알레르겐에 대한 면역반응체계의 이상으로 유발되는 것으로 알려져 있다[Park and Oh, 2014]. 아토피 피부염과 관련된 가장 중요한 면역계의 이상은 Ig E 및 Ig E 합성에 매우 중요한 역할을 하는 type 2 helper T(Th2) 세포의 현저한 증가이며, 이들 Th2세포들은 interleukin(IL) 류를 생산하여, 전형적인 아토피 피부염의 면역 이상을 유발하는 것으로 알려져 있다[Pugliarello et al., 2011]. 따라서 Ig E 매개성 비만세포, 호염기구, 호산구 및 T 세포들의 현저한 피부 침윤이 아토피 피부염에서 동반되며[Nystad et al., 2005; Li et al., 2010], Ig E에 감작된 이들 염증세포들은 IL-4, IL-5, IL-13 및 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 와 같은 다양한 염증 매개 인자들을 생산하여, 국소 염증반응을 유발함과 동시에 주변 조직에 oxidative stress를 가하여, 다양한 병적 증상을 초래한다. 따라서, 아토피 피부염은 과감작된 Ig E에 매개된 면역반응 이상에 따른 염증반응과, 주변 조직의 oxidative stress에 의한 손상으로 심한 소양증과 함께 피부의 만성 염증성 병변을 일으킨다[Briganti and Picardo, 2003; Okayama, 2005; Park and Oh, 2014].
- 본 연구에서는 현재 면역조절, 항염 및 항산화 효과를 통한 아토피 피부염 개선 효과가 알려지기 시작한 수치료(hydrotherapy) [Portalès et al., 2001; Hataguchi et al., 2005; Merial-Kieny et al., 2011; Adler-Cohen et al., 2012; Bak et al., 2012; Fioravanti et al., 2013; Prandelli et al., 2013; Soria et al., 2014; Yoon et al., 2014]의 일환으로 우리나라 주변에서 취수한 4 종류의 해수 - 서해 표층수(강화도 외포리), 서해 온천해수(석모도 용궁온천해수), 동해 표층수(울진 나곡리) 및 동해 염지하수(울진 후정리)의 입욕에 따른 아토피 피부염 개선 효과를 DNCB로 유발시킨 아토피 피부염 hairless 마우스 모델[Qi et al., 2009; Kang et al., 2011]을 이용하여 평가하고자 하였다.
- 본 실험에서 아토피성 피부염은 acetone과 olive oil 3:1 혼합액에 용해시킨 1% DNCB 용액 200  $\mu$ l/mouse/day을 매일 1회씩 7일간 을 등쪽 피부 전체에 도포시켜 감작시킨 다음 주 3회씩 4주간 0.5% DNCB 용액을 도포하여, boosting시켜 유발시켰으며, 감작 시작 5주 후, 입욕 또는 DEXA 국소 도포 24시간 전 체중, clinical skin severity scores 및 scratching behavior를 기준으로 군당 8마리씩 7군으로 실험동물을 선정하고, 4 종류의 해수에 감작 시작 5주 후부터 매일 1회씩 6주간 20분씩 입욕시킨 다음 체중, clinical



skin severity scores, scratching behavior, 혈청 중 Ig E 함량, 악하임과절 및 비장 중량, 비장 cytokine - TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10 함량, 피부 cytokine - TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA 발현, 피부 항산화 방어 시스템 - GSH 함량, 지질과산화 및 superoxide anion 생산능의 변화를 관찰하여, 해수의 입욕 효과를 평가하였으며, 이와 함께 피부, 악하임과절 및 비장의 조직학적 변화 - 피부 상피의 평균 두께, 진피내 염증세포 및 비만세포의 침윤 수, 진피내 collagen fiber가 차지하는 비율, 비장 전체 두께, 비장 백색 수질의 수, 적색 수질 세포의 수, 악하임과절의 전체 및 피질 두께, 피질내 임파소절의 수, 표피내 caspase-3, PARP, NT 및 4-HNE 면역반응성, 진피내 MMP-9 면역반응성, 진피, 비장 및 악하임과절내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수적 변화 역시 관찰하였으며, 본 실험에서 해수의 입욕 효과는 현재 아토피 피부염에 유효한 것으로 알려져 있는 1% DEXA 국소 도포군[Kang et al., 2011; Ku et al., 2012]과 비교 평가하였다.

- DNCB 감작 시 감작 시작 5주 후, 입욕 또는 DEXA 국소 도포 24시간 전 체중, clinical skin severity scores 및 scratching behavior를 기준으로 실험 동물을 선정하여 사용하였으므로, 의미있는 증체량의 변화는 확인되지 않았으나, DNCB 대조군에서는 입욕 시작 24시간 전부터 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 clinical skin severity score 및 scratching behavior의 증가가 확인되기 시작하여, 실험 전 기간 동안 확인되었으며, 혈청 중 Ig E 함량, 악하임과절 및 비장 중량, 비장 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10 함량, 피부 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA 발현, 지질과 산화, superoxide anion 생산량의 현저한 증가가 GSH 함량의 감소와 함께 확인되었다.
- 조직병리학적 검사에서 상피두께, 진피 조직내 염증세포 및 비만세포의 침윤, 콜라겐 섬유, 비장 전체 두께, 비장 적색 수질세포, 악하임과절 전체 및 피질 두께, 악하임과절 피질내 임파구성 세포의 수, 표피내 NT, 4-HNE, caspase-3 및 PARP 면역반응세포의 수, 진피내 MMP-9 면역반응성, 진피, 악하임과절 및 비장내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 수의 유의성 있는 증가 즉, 전형적인 Ig E 매개성 과민반응과 활성화소 관련 염증반응, MMP 활성화 및 표피 각질세포의 apoptosis에 의한 DNCB 유발 아토피성 피부염 소견이 유발되었다. 한편 이러한 DNCB 유발 아토피성 피부염 소견이 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 유의성 있게 억제되었다. 또한 1% DEXA 도포군에서도 DNCB 대조군에 비해 유의성 있는 DNCB 유발 아토피성 피부염에 대한 억제 효과가 확인되었으나, 항산화 효과는 확인되지 않았다.
- 따라서 우리나라 주변의 4종류의 해수에 대한 입욕은 비교적 우수한 국소

및 전신적인 면역조절, 각질세포 보호, MMP활성 억제, 항염 및 항산화 효과를 통해 아토피 피부염을 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해 표층수 입욕군 순으로 현저히 억제하는 것으로 판단되며, 이러한 차이는 해수의 미네랄 조성에 따라 피부질환에 대하여 다양한 약리효과가 확인된다는 이전의 연구들 [Hataguchi et al., 2005; Adler-Cohen et al., 2012; Bak et al., 2012; Fioravanti et al., 2013; Prandelli et al., 2013; Soria et al., 2014; Yoon et al., 2014]로 미루어 보아, 해수의 염도 및 미네랄 함량 차이와 직결될 것으로 판단된다.

- 일반적으로 DNCB에 감작시 마우스에서 현저한 체중 감소가 확인되나, 이후 만성적인 DNCB노출에 의한 과민반응이 유발됨에 따라, 체중의 증가가 확인되어, 전체적인 체중의 변화에는 별 다른 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다[Im et al., 2011; Kim et al., 2012]. 본 실험의 결과에서도 감작 기간 동안 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중의 감소가 DNCB 대조군에서 확인된 반면, boosting 기간 동안에는 정상 매체 대조군에 비해 현저한 체중의 증가가 확인되어, 정상 매체 대조군에 비해 유의성 있는 11 주간의 실험 전 기간 및 6 주간의 입욕기간 동안의 증체량의 변화는 확인되지 않았다. 1% DEXA 도포군, 서해 표층수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 동해 염지하수 입욕군에서도 DNCB 대조군과 비교하여 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 확인되지 않았다. DNCB 대조군을 포함한 본 실험에 사용한 모든 hairless 마우스는 동일한 연령의 정상 hairless 마우스의 체중 증가 범주[Fox et al., 1984; Tajima, 1989] 내에서 체중 증가를 각각 나타내었다. 따라서 본 실험에 사용한 모든 4 종류의 해수에 대한 6주 연속적인 입욕은 마우스의 체중 및 증체량에 별 다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.
- 아토피성 피부염 시 피부조직에는 비만세포, 호산구, 호염기구 및 T 림프구 등과 같은 다양한 염증세포의 침윤이 유발되며[Nystad et al., 2005; Li et al., 2010], 이에 따라 만성 재발성의 소양증, 습진성 병변 및 과각화증 등과 같은 일반적인 피부 증상이 초래되며[Leung, 2000], DNCB의 반복적인 피부 적용시에도 이와 유사한 일반 피부증상과 함께 다양한 염증세포의 침윤 및 피부 경화증이 유발되는 것으로 알려져 있어[Kandolf- Sekulovic et al., 2003; Nadworny et al., 2008], 실험동물의 scratching behavior와 함께 pruritus/itching, erythema/hemorrhage, edema, excoriation/erosion 및 scaling/dryness를 기초한 clinical skin severity scores가 아토피성 피부염의 진행 정도를 파악하는데 귀중한 지표로 이용되어져 왔다[Park and Oh, 2012]. 비만세포는 과민 및 알레르기 반응과 같은 만성 염증질환을 매개하는 중요한 세포로 세포막의 Ig E 수용체를 매개로, 항원과 결합시 histamine, leukotrienes, proteases, prostaglandins 및 cytokine과 같은 다양한 염증 매개 화학물질을 분비하여, 염증반응을 시작하게 하며[Kim et al., 2012], 특히

histamine은 초기 염증반응시 비만세포로부터 유리되어, 소양증을 일으키는 주요 원인으로 즉시형 과민반응(type I allergic responses)을 시작시키는 염증 매개성 화학물질로 알려져 있고[Kawakami et al., 2009; Stone et al., 2010; Kim et al., 2012], 다양한 종류의 아토피성 피부염시 현저한 비만세포의 증식 및 침윤이 피부조직에서 관찰되어져 왔다[Han et al., 2012; Kim et al., 2012]. 본 연구자 등은 clinical skin severity scores와 scratching behavior를 DNCB 감작 및 boosting 완료 후, 1% DEXA 도포 또는 입욕 24시간 전 아토피성 피부염이 유발된 실험동물을 선별하는 지표로 사용하였다. 본 실험의 결과, 현저한 clinical skin severity scores, scratching behavior 및 혈청 중 총 Ig E 함량의 증가와 함께 조직병리학적 검사시 표피 두께, 진피내 염증세포 및 비만세포 침윤, 피부 경화증 소견의 증가가 DNCB 대조군에서 관찰되었으나, 이들 Ig E 매개성 과민반응, 피부경화증, 염증 및 비만세포 침윤 소견이 1% DEXA 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해표층수 입욕군 순으로 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 본 실험에 사용한 우리나라 근처에서 취수한 4 종류의 해수의 입욕에 의해 DNCB 유발 아토피성 피부염의 증상들이 현저히 완화되는 직접적인 증거로 판단된다.

- 아토피 피부염은 다양한 저분자량의 화학물질에 대한 개개인의 감수성이 증가되어 유발되는 전형적인 지연형 과민반응의 일종으로[Kimber et al., 1999; Lee et al., 2002], 유전적, 환경적, 면역적 요인 등 복잡한 요인들이 발병 기전으로 작용하나, 현재 Th2 세포에 의해 생산 분비되는 IL-4, IL-5 및 IL-13이 아토피 피부염을 유발시키는 가장 중요한 인자로 알려져 있다[Jung et al., 2010; Choi et al., 2013]. 정확한 아토피성 피부염의 발병 기전 및 원인은 알려져 있지 않으나, 최근의 연구에 따르면 Th2 세포 매개성 cytokine의 증가와 Th1 세포 매개성 cytokine의 감소가 공통적으로 관찰되며[Sawada et al., 2012], Th2 세포들은 초기 아토피성 피부염의 유발에 관여하며, Th1 세포들은 후기 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[Vestergaard et al., 1999]. 즉, IL-4에 의한 Ig E 함량의 증가는 아토피성 피부염의 가장 주된 hallmark 이며, IL-4는 B 세포의 Ig E 생산을 촉진시키고, B 세포에서 유리된 Ig E는 비만세포에 부착된다. 이후 비만세포dml 탈과립은 다양한 염증성 화학물질을 유리시키고, 전형적인 Ig E 매개성 아토피성 피부염이 유발된다[Kishimoto and Hirano, 1988; Poulsen and Hummelshoj, 2007]. 아토피성 피부염의 예후 및 발병은 Th2 세포에 의한 IL-4, IL-5 및 IL-13 분비에 달려 있으며, 대부분의 아토피성 피부염 환자에서 Th2 세포에 의한 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생산 증가에 따른 호산구 및 Ig E 함량의 증가가 관찰된다[Yamanaka and Mizutani, 2011]. TNF- $\alpha$ 는 활성화된 대식세포에서 생산되는 17-kDa 단백질로 최초로 발견된[Beutler et al., 1985], 잘 알려진

proinflammatory cytokine 중 하나로[Whittle et al., 2008], DNCB 유발 아토피성 피부염시에도 현저한 증가가 잘 알려져 있다[Qi et al., 2009; Schottelius et al., 2010]. TNF는 IL-1과 같은 다른 cytokine의 유리를 촉진하여 염증반응을 촉발하며, IL-1은 중성호성 백혈구와 대식세포를 활성화하여, 주변 국소 조직의 손상을 초래하는 활성산소류와 nitric oxide의 분비를 촉진한다[Assuma et al., 1998]. 또한 IL-2는 T 세포의 증식 및 효과 T 세포로의 분화를 담당하는 cytokine으로 면역반응 시 정상적으로 T 세포에 의해 분비되어[Cantrell and Smith, 1984; Smith, 1988], 소양증 및 아토피성 피부염의 유발에 관여한다[Fallahzadeh et al., 2011]. IFN- $\gamma$ 는 20에서 25kDa의 당단백질로, IL-2에 반응하여, 세포독성 CD8<sup>+</sup> T 세포, Th1 세포 및 자연살해세포에서 생산되며, B 및 T 세포의 기능에 다양한 영향을 미치고, 자연살해세포와 대식세포를 활성화 시킨다 [Isaacs, 1995]. IFN- $\gamma$ 의 상승 또는 활성 증가가 DNCB 유발 아토피성 피부염에서 확인된다[Ulrich et al., 2001; Ku et al., 2008]. iNOS는 L-arginine으로 부터 nitric oxide의 생산을 담당하는 일련의 catalyzing enzyme으로 과량의 iNOS의 생성은 일반적으로 주변환경에 산화성 손상을 유발하고, 세포 독성을 나타낸다 [Mungrue et al., 2002]. 즉, iNOS의 활성 증가는 endotoxin, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  와 같은 다른 proinflammatory agent의 활성을 조장하여, 신체에 shock와 과도한 염증반응을 초래하며[Szabó, 1995; Southan and Szabó, 1996], 아토피 피부염의 발병 기전으로 작용하고 있다[Lee et al., 2011]. 따라서 iNOS, IL-2, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  발현 감소는 다양한 알레르기성 질환의 치료에 적용할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 또한 아토피성 피부염은 전신 과민반응으로, 말초 및 중추성 임파조직에서의 임파구들, 특히 T 세포의 증식 및 분화를 초래한다 [Arts et al., 1996; Lee et al., 2002]. 본 연구에서도 DNCB 감작 및 Boosting에 의해, 현저한 비장 적색 수질 및 악하임파절 피질 임파구 증생에 의한 중량의 증가가 확인되었으며, 비장 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-10 함량의 증가, 피부 조직내 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 및 IL-13 mRNA 발현의 증가가 전신 및 국소 과민반응의 일환으로 확인되었다. 또한 DNCB 처리는 피부, 악하임파절 및 비장 조직내 IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$  면역반응세포의 현저한 수적 증가 역시 유발하였다. 한편 이러한 DNCB 유발 전신 및 국소 과민반응들이 일반 피부 증상들에서의 결과와 잘 일치되어, 1% DEXA 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해표층수 입욕군 순으로 현저히 억제되어, 우리나라 근처에서 취수한 4 종류의 해수의 입욕에 의한 DNCB 유발 아토피성 피부염의 증상의 완화에 전신 및 국소 면역 조절 효과가 관여하는 것으로 판단되며, 이미 해수의 입욕에 의한 임파구 증생 및 cytokine 분비 조절과 같은 면역조절 효과가 알려져 있다[Portalès et al., 2001].

- 지질 과산화에 의해 형성되는 다양한 유독성 물질, 특히 ROS는 주변 조직의 파괴를 초래하는 것으로 알려져 있고[Comporti, 1985], 아토피 피부염 시에도 대표적인 내인성 항산화제로, 피부 각질세포 내에서 형성되는 활성 산소류를 감소시켜 다양한 조직 손상을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 조직에서 대표적인 항산화 인자로 작용하는 GSH [Odabasoglu et al., 2006]의 고갈을 초래하여, 산화 스트레스에 대한 피부조직의 감수성이 증가된다 [Tsukahara et al., 2003; Sivaranjani et al., 2013; Yoon et al., 2014]. GSH의 sulfhydryl group은 매우 높은 극성을 나타내어 유해한 free radical을 제거시키는 것으로 알려져 있으며[Campanini et al., 2013], 세포내 내인성 항산화 효소인 glutathione peroxidase 및 glutathione reductase와 동시에 작용하여 세포내에서 과산화수소와 지질 과산화를 감소시킨다[Carini et al., 2000; Pinnell, 2003]. 4-HNE는 지질 과산화에 의해 생산되는  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated hydroxyalkenal로 다양한 질병 특히, 만성 염증, 신경병성 질환, 성인 호흡곤란 증후군, 혈관계 질환, 당뇨 및 종양의 원인으로 주목받고 있으며, 현재 지질 과산화의 marker로 사용되고 있고[Dubinina and Dadali, 2010; Smathers et al., 2011], NT는 peroxy nitrite anion 및 nitrogen dioxide와 같은 reactive nitrogen species에 의해 매개되는 tyrosine nitration의 산물로, 다양한 산화 스트레스성 질환에 관여하며, 대표적인 iNOS 관련 oxidative stress의 marker로 활용되고 있다[Mohiuddin et al., 2006; Pacher et al., 2007]. 본 실험의 결과, DNCB에 의해 내인성 항산화제인 GSH 함량 감소와 함께 superoxide anion 생산량의 현저한 증가가 관찰되었으며, 피부 표피내 NT 및 4-HNE 면역반응세포의 수적 증가가 각각 유발되었으나, 이러한 내인성 항산화제의 고갈 및 표피내 산화 스트레스의 증가가 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해표층수 입욕군 순으로 현저히 억제되어, 우리나라 근처에서 취수한 4 종류의 해수의 입욕은 내인성 항산화 방어 시스템인 GSH system을 유지시키고, DNCB 노출에 의한 산화 스트레스에 보다 효과적으로 저항하는 것으로 관찰되었으며, 이미수 치료의 항산화 효과는 비교적 잘 알려져 있다[Fioravanti et al., 2013; Prandelli et al., 2013; Soria et al., 2014; Yoon et al., 2014]. 한편 1% DEXA 처리군에서도 표피내 NT 및 4-HNE 면역반응세포의 수적 감소가 확인되었으나, 1% DEXA 도포군에서는 DNCB 대조군과 유사한 GSH 함량 및 superoxide anion 생산량이 관찰되었다. 한편 본 실험에서는 해수 입욕에 따른 항산화 효과를 TBARS assay를 통한 지질 과산화 지표인 MDA 함량 [Cuzzocrea et al., 1998]의 측정을 통해 재 확인하였다.
- Apoptosis는 세포의 사멸을 조절하는 중요한 방편으로, apoptosis가 진행되는 동안 세포는 대표적인 apoptosis 마커인 caspase-3와 PARP[Nunez et al., 1998; Barrett et al., 2001]의 활성화에 의해 염색질 농축과 apoptotic

body(세포 자멸체)의 형성을 특징으로 한다[Chen et al., 1998, 2004]. 따라서 피부 각질세포에서 이들 caspase-3 및 PARP의 증가는 apoptosis에 의한 피부 세포의 손상을 의미하며 El-Mahdy et al., 2008; Hasegawa et al., 2013], DNCB 유발 아토피성 피부염 시의 피부 병변에도 apoptosis가 관여하는 것으로 알려져 있다[Lindberg, 1982; Nadworny et al., 2008]. 본 실험의 결과, DNCB의 도포에 의해 피부 표피내 caspae-3 및 PARP 면역반응세포의 증가가 면역조직화학적으로 확인되었으나, 1% DEXA 도포군, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해표층수 입욕군 순으로 피부조직의 일반 조직학적 변화와 잘 일치되어 표피내 caspae-3 및 PARP 면역반응세포의 수가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 우리나라 근처에서 취수한 4 종류의 해수의 입욕이 강력한 apoptosis 억제 효과를 통한 피부 보호 작용을 나타내는 중요한 증거로 판단된다.

- MMPs는 일반적으로 정상 피부세포에서의 MMP 발현은 매우 낮은 것으로 알려져 있으나, 자외선, 성장인자, cytokine 및 원발암성 물질 등 다양한 세포외 자극에 의해 발현이 유도된다 [Nagase and Woessne, 1999; Sternlicht and Werb, 2001; Rittie and Fisher, 2002]. 최근의 연구에 따르면 아토피성 피부염 시에도 다양한 MMP발현, 특히 MMP-8 및 MMP-9의 발현 증가가 초래되며[Devillers et al., 2007; Lü et al., 2009], 이들 MMP 발현 억제는 아토피성 피부염의 진행을 억제, 예방 또는 치료할 수 있는 주요 표적으로 제안되고 있다[Harper et al., 2010]. 본 실험의 결과, DNCB의 국소 도포에 의해 면역조직화학적으로 진피내 MMP-9 면역반응성의 증가와 이와 관련된 진피내 비정상적인 collagen 섬유 축적이 관찰되었으나, 동해 염지하수, 서해 온천해수, 동해 표층수 및 서해표층수 입욕군 순으로 진피내 MMP-9 면역반응성의 증가 및 비정상적인 collagen fiber 축적이 억제되어, 우리나라 근처에서 취수한 4 종류의 해수 입욕의 MMP 활성화 억제 효과를 통한 피부 경화 완화 작용 역시 확인하였다, 한편 1% DEXA 도포군에서도 현저한 진피내 MMP-9 면역반응성의 증가 억제 효과가 확인되었으나, 진피내 콜라겐 축적 억제 효과는 확인되지 않았다.

## 2. 고찰

- 우리나라 주변에서 취수한 4종류의 해수에 대한 입욕은 동해 염지하수(울진 후정리), 서해 온천해수(석모도 용궁온천 해수), 동해 표층수(울진 나곡리) 및 서해 표층수(강화도 외포리) 입욕군 순으로 비교적 우수한 국소 및 전신적인 면역조절, 각질세포 보호, MMP활성 억제, 항염 및 항산화 효과를 통해 DNCB 유발 아토피 피부염을 현저히 억제하는 것으로 판단되며, 이러한 차이는 해수의 염도 및 미네랄 함량 차이와 직결될 것으로 판단되고, 금후 아토피 치료의 중요한 대체 요법으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1절 연구개발목표의 달성도

#### 1. 연구성과별 목표 달성도

성과목표(가중치)	2014년 연구성과	목표 달성도
1. 해수성분의 아토피질환 치유 효능 검증 실험(80 %)	1. 해양치유 과학화를 효능검증 실험 - 국소 및 전신적인 면역조절, 각질세포 보호, MMP 활성 억제, 항염 및 항산화 효과를 통해 DNCB 유발 아토피 피부염 억제 확인 2. 국내 해양치유자원 및 소재 발굴 - 우리나라 주변 4종류의 해수의 동물실험을 통해 해양헬스케어 자원으로서의 유용성 도출함 - 특히 동해염지하수의 아토피 억제 효과가 가장 뛰어나다는 새로운 사실을 확인	100 %
2. 해수성분의 해양헬스케어 산업 자원으로 유용성 도출(20 %)	○ 해수성분의 아토피피부염 치유효과 검증을 통한 해양헬스케어 산업의 기반 마련 - 향후 해양헬스케어 산업을 성공을 위한 대국민 신뢰 구축에 일익을 담당함	100 %
합계(100 %)		100 %

### 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 우리나라 해양헬스케어산업 조기정착 및 활성화 분야
  - 해수의 아토피 억제 효능을 과학적으로 입증
  - 향후 다른 해양자원의 해양헬스케어 소재 탐색 기반 마련
  - 국내 해양헬스케어 산업 조기정착에 기여

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1절 추가연구의 필요성

- 해수의 아토피 치유의 극대화 도출
  - 우리나라주변 4종류의 해수에 대한 입욕효과는 아토피 피부염을 현저히 억제하는 효과가 있는 것으로 나타남

- 특히 동해염지하수는 그 중에서도 아토피 억제 효과가 가장 뛰어나다는 사실을 처음으로 확인
  - 이전의 연구에 의하면 해수의 미네랄 구성에 따라 피부질환에 다양한 약리 효과가 확인된다고 하였으므로, 본 실험결과에서 가장 좋은 효과를 보인 동해염지하수에 대해서 농도를 달리하고, 주요 미네랄함량을 조절하여 분석할 필요가 있음
  - 또한 입욕시간과 입욕기간을 달리하여 최적의 아토피 치유 입욕효과를 도출 할 필요가 있음
- 해양헬스케어산업 측면
- 해양헬스케어 산업의 조속한 정착과 발전을 위해서는 해수의 아토피 효능 이외에 다양한 질환에도 효과가 있는지 과학적인 검증이 필요
  - 동해염지하수가 일반 표층해수 보다는 아토피 억제 효과가 높은 것으로 나타났으나, 최근 주목을 받고 있는 해양심층수와의 효능 비교도 할 필요가 있음
  - 해양에는 해수 이외에도 헬스케어자원으로서 가능한 후보군이 많이 있다. 예를 들어, 해양성기후, 모래, 염분, 해조류 등은 외국에서 많은 연구가 이루어져 효과가 알려져 있다. 우리나라 해양자원들도 같은 효과를 보이는지 검증이 필요함

## 2절 응용분야

- 해양헬스케어산업
- 전 국민의 건강관리 생활화에 따른 헬스케어산업에 대한 관심이 증가하고 있으며, 유례없는 고령화, 웰빙, 복지문화 확산에 따른 복지산업의 수요도 증가하고 있어 해양헬스케어 산업 도입에 적절한 시기임
  - 우리나라 주변 4종류의 해수를 이용한 아토피 억제 효능 실험에서 모든 해수는 아토피 치유에 효과가 있었으며, 특히 동해염지하수가 가장 뛰어난 효과를 보였으므로, 향후 아토피피부 환자를 위한 해수치유센터를 설립할 시에는 본 실험 결과 참고 가능
  - 정부에서도 향후 해양헬스케어 산업 발전을 위하여 국가 R&D 사업을 계획 중에 있으므로, 본 실험 결과를 바탕으로 대형 국가 R&D 과제를 수주
  - 성공적인 해양헬스케어 산업 발전을 위해서는 헬스케어 효능의 과학적인 검증이 최우선으로 이루어져야할 전제이다. 본 연구결과는 해수의 아토피



효능을 밝힌, 과학적이고 체계적인 과정으로 향후 해양헬스케어 산업 활성화  
화를 위한 과학적인 검증의 기틀이 될 수 있음

## 제 6 장 Acknowledgement

본 보고서는 한국해양과학기술원 Lab 창의 연구과제 “해수성분이 아토피성 피부질환에 미치는 치유효과”(PE99255)의 지원으로 작성 되었으며, 일부 해수를 이용한 아토피 효능 실험에는 경상북도 용역과제 “동해안 해양헬스케어산업 육성을 위한 용역사업”의 공동지원으로 이루어 졌으며, 실험 결과는 공동으로 사용되었음을 밝혀둔다.

## 제 7 장 참고문헌

- Adler-Cohen C, Czarnowicki T, Dreiherr J, Ruzicka T, Ingber A, Harari M. Climatotherapy at the Dead Sea: an effective treatment modality for atopic dermatitis with significant positive impact on quality of life. *Dermatitis*. 2012;23:75-80.
- Arts JH, Dröge SC, Bloksma N, Kuper CF. Local lymph node activation in rats after dermal application of the sensitizers 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *Food Chem Toxicol*. 1996;34:55-62.
- Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998;160:403-9.
- Bak JP, Kim YM, Son J, Kim CJ, Kim EH. Application of concentrated deep sea water inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:108.
- Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodríguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition*. 2003;19:837-42.
- Barrett KL, Willingham JM, Garvin JA, Willingham MC. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 2001;49:821-32.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*. 1985;316:552-4.

- Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17:663-9.
- Brockow T, Schiener R, Franke A, Resch KL, Peter RU. A pragmatic randomized controlled trial on the effectiveness of low concentrated saline spa water baths followed by ultraviolet B (UVB) compared to UVB only in moderate to severe psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*2007;21:1027-37.
- Campanini MZ, Pinho-Ribeiro FA, Ivan AL, Ferreira VS, Vilela FM, Vicentini FT, Martinez RM, Zarpelon AC, Fonseca MJ, Faria TJ, Baracat MM, Verri WA Jr, Georgetti SR, Casagrande R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 2013;127:153-60.
- Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science.* 1984;224:1312-6.
- Carini M, Aldini G, Piccone M, Facino RM. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Farmaco.* 2000;55:526-34.
- Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 1998;177:324-33.
- Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hsu FL, Lin HY, Ko CH, Tseng SW. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:1713-24.
- Choi JH, Kim HG, Jin SW, Han EH, Khanal T, Do MT, Hwang YP, Choi JM, Chun SS, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG. Topical application of *Pleurotus eryngii* extracts inhibits 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice by the regulation of Th1/Th2 balance. *Food Chem Toxicol.* 2013;53:38-45.
- Choi JS, Kim JW, Kim KY, Ku SK, Sohn JH. Single-dose oral toxicity of fermented rice extracts (FREs): a 14-day observation. *Pak J Pharm Sci.* 2014;27:129-37.
- Clark BD, Bedrosian I, Schindler R, Cominelli F, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA. Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *J Appl Physiol.* 1991;71:2412-8.
- Cole KK, Perez-Polo JR. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents

both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury. *J Neurochem.* 2002;82:19-29.

- Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest.* 1985;53:599-623.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:450-459.
- Devillers AC, van Toorenenbergen AW, Klein Heerenbrink GJ, Muldert PG, Oranje AP. Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase-9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32:311-3.
- Dubinina EE, Dadali VA. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions. *Biochemistry (Mosc).* 2010;75:1069-87.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Patnaik S, Zhao Q, Arafa el-S, Barakat B, Mir SN, Wani AA. Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochem Photobiol.* 2008;84:307-16.
- Fallahzadeh MK, Roozbeh J, Geramizadeh B, Namazi MR. Interleukin-2 serum levels are elevated in patients with uremic pruritus: a novel finding with practical implications. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:3338-44.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1994;269:30761-4.
- Fioravanti A, Lamboglia A, Pascarelli NA, Chelleschi S, Manica P, Galeazzi M, Collodel G. Thermal water of Vetricolo, Trentino, inhibits the negative effect of interleukin-1 $\beta$ ; on nitric oxide production and apoptosis in human osteoarthritic chondrocyte. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013;27:891-902.
- Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FT, Cardoso JC, Cavalcanti De Albuquerque Junior RL, Vieira Fonseca MJ. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. *J Pharm Sci.* 2011;100:2182-93.
- Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. *Laboratory animal medicine.* Academic Press. Inc., Orlando, 1984.
- Ha BG, Shin EJ, Park JH, Shon YH. Anti-diabetic effect of balanced deep-sea water and its mode of action in high-fat diet induced diabetic mice.

Marine Drugs. 2013; 11:4193–4212.

- Harper JI, Godwin H, Green A, Wilkes LE, Holden NJ, Moffatt M, Cookson WO, Layton G, Chandler S. A study of matrix metalloproteinase expression and activity in atopic dermatitis using a novel skin wash sampling assay for functional biomarker analysis. *Br J Dermatol.* 2010;162:397–403.
- Harrigan TJ, Abdullaev IF, Jourd'heuil D, Mongin AA. Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. *J Neurochem.* 2008;106:2449–62.
- Hasegawa T, Shimada S, Ishida H, Nakashima M. Chafuroside B, an Oolong tea polyphenol, ameliorates UVB-induced DNA damage and generation of photo-immunosuppression related mediators in human keratinocytes. *PLoS One.* 2013;8:e77308.
- Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, Kimata H. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome. *Eur J Clin Nutr.* 2005;59:1093–6.
- Hotchkiss RS, Osborne DF, Lappas GD, Karl IE. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 beta, and interleukin-1 alpha in a mouse model of endotoxin. *Shock.* 1995;3:337–42.
- Im LR, Ahn JY, Kim JH, Xin M, Kwon SU, Kim YK, Kim DK, Lee YM. Inhibitory effect of kyungohkgo in the development of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Arch Pharm Res.* 2011;34:317–21.
- Isaacs A. Lymphokines and Cytokines. In: *Immunology an introduction* (Tizard IR editor). 4th edition. Saunders:Philadelphia,1995;155–69.
- Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;80:33–42.
- Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009;129:31–40.
- Jin XJ, Kim EJ, Oh IK, Kim YK, Park CH, Chung JH. Prevention of UV-induced skin damages by 11,14,17-eicosatrienoic acid in hairless mice in vivo. *J Korean Med Sci.* 2010;25:930–7.
- Jung BG, Cho SJ, Ko JH, Lee BJ. Inhibitory effects of interleukin-10 plasmid DNA on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Vet Sci.* 2010;11:213–20.

- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 1997;6:199-213.
- Kang GJ, Han SC, Yi EJ, Kang HK, Yoo ES. The Inhibitory Effect of Premature Citrus unshiu Extract on atopic dermatitis in vitro and in vivo. *Toxicol Res.* 2011;27:173-80.
- Kang SJ, Lee JE, Lee EK, Jung DH, Song CH, Park SJ, Choi SH, Han CH, Ku SK, Lee YJ. Fermentation with *Aquilariae lignum* enhances the anti-diabetic activity of green tea in type II diabetic db/db mouse. *Nutrients.* 2014;6:3536-71.
- Kim KH, Park SJ, Lee YJ, Lee JE, Song CH, Choi SH, Ku SK, Kang SJ. Inhibition of UVB-Induced Skin Damage by Exopolymers from *Aureobasidium pullulans* SM-2001 in Hairless Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014 Jun 26. doi: 10.1111/bcpt.12288. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24964914
- Kim SR, Choi HS, Seo HS, Choi YK, Shin YC, Ko SG. Topical application of herbal mixture extract inhibits ovalbumin- or 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:545497.
- Kimber I, Gerberick GF, Basketter DA. Thresholds in contact sensitization: theoretical and practical considerations. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:553-60.
- Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:485-512.
- Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, Hayakawa K, Shiohara T. Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J Invest Dermatol.* 1995;105:749-55.
- Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008;128:2625-30.
- Ku HO, Jeong SH, Kang HG, Pyo HM, Cho JH, Son SW, Kim HR, Lee KJ, Ryu DY. Intracellular expression of cytokines and granzyme B in auricular lymph nodes draining skin exposed to irritants and sensitizers. *Toxicology.* 2008;250:116-23.
- Ku SK, Kim JW, Cho HR, Kim KY, Min YH, Park JH, Kim JS, Park JH, Seo BI, Roh SS. Effect of  $\beta$ -glucan originated from *Aureobasidium pullulans* on asthma induced by ovalbumin in mouse. *Arch Pharm Res.* 2012;35:1073-81.
- Léauté-Labrèze C, Saillour F, Chêne G, Cazenave C, Luxey-Bellocq ML, Sanciaume C, Toussaint JF, Taïeb A. Saline spa water or combined water

- and UV-B for psoriasis vs conventional UV-B: lessons from the Salies de Béarn randomized study. *Arch Dermatol.* 2001;137:1035-9.
- Lee CS, Yi EH, Kim HR, Huh SR, Sung SH, Chung MH, Ye SK. Anti-dermatitis effects of oak wood vinegar on the DNCB-induced contact hypersensitivity via STAT3 suppression. *J Ethnopharmacol.* 2011;135:747-53.
  - Lee JK, Park JH, Park SH, Kim HS, Oh HY. A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2002;48:53-61.
  - Lee SH, Heo Y, Kim YC. Effect of German chamomile oil application on alleviating atopic dermatitis-like immune alterations in mice. *J Vet Sci.* 2010;1: 35-41.
  - Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immun.* 2000;105:860-76.
  - Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. *Clin Otolary.* 1981;6:145-51.
  - Li C, Lasse S, Lee P, Nakasaki M, Chen SW, Yamasaki K, Gallo RL, Jamora C. Development of atopic dermatitis-like skin disease from the chronic loss of epidermal caspase-8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:22249-54.
  - Lindberg M. Studies on the cellular and subcellular reactions in epidermis at irritant and allergic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1982;105:1-45.
  - Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
  - Lü ZR, Park D, Lee KA, Ryu JW, Bhak J, Shi L, Lee DY, Park YD, Zou F, Yang JM. Profiling the dysregulated genes of keratinocytes in atopic dermatitis patients: cDNA microarray and interactomic analyses. *J Dermatol Sci.* 2009;54:126-9.
  - Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24:294-6.
  - Mar WC, Lee SJ, Nam KW, Kim SK. Essential oil of *Thujopsis dolobrata* suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Biomol Ther.* 2011;19:102-8.
  - Matsumoto K, Mizukoshi K, Oyobikawa M, Ohshima H, Tagami H. Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive

- biophysical instruments. *Skin Res Technol.* 2004;10:122-9.
- McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006;27:17-23.
  - Merial-Kieny C, Mengual X, Guerrero D, Sibaud V. Clinical efficacy of Avène hydrotherapy measured in a large cohort of more than 10,000 atopic or psoriatic patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:30-4.
  - Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res.* 2006;133:143-9.
  - Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev.* 2002;7:407-22.
  - Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine.* 2008;4:241-51.
  - Nagase H, Woessne JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-4.
  - Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995;376:37-43.
  - Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;17:3237-45.
  - Nystad W, Roysamb E, Magnus P, Tambs K, Harris JR. A comparison of genetic and environmental variance structures for asthma, hay fever and eczema with symptoms of the same diseases: a study of Norwegian twins. *Int J Epidemiol.* 2005;34:1302-9.
  - Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:59-65.
  - Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4:517-9.
  - Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87:315-424.
  - Park G, Oh MS. Inhibitory effects of *Juglans mandshurica* leaf on allergic dermatitis-like skin lesions-induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66:97-101.
  - Park MY, Choi HY, Kim JD, Lee HS, Ku SK. 28 Days repeated oral dose

toxicity test of aqueous extracts of mahwangyounpae-tang, a polyherbal formula. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:2477-82.

- Peroni A, Gisondi P, Zanoni M, Girolomoni G. Balneotherapy for chronic plaque psoriasis at Comano spa in Trentino, Italy. *Dermatol Ther.* 2008; 21: S3-S8.
- Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:1-19
- Portalès P, Ariès MF, Licu D, Pinton J, Hernandez-Pion C, Gall Y, Dupuy P, Charveron M, Clot J. Immunomodulation induced by Avène spring water on Th1- and Th2-dependent cytokine production in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14:234-42.
- Poulsen LK, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med.* 2007;39:440-56.
- Prandelli C, Parola C, Buizza L, Delbarba A, Marziano M, Salvi V, Zacchi V, Memo M, Sozzani S, Calza S, Uberti D, Bosisio D. Sulphurous thermal water increases the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and modulates antioxidant enzyme activity. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;26:633-46.
- Pugliarello S, Cozzi A, Gisondi P, Girolomoni G. Phenotypes of atopic dermatitis. *J Deutsch Dermatol Ges.* 2011;9:12-20.
- Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Li JH, Jin D, Deung YK, Lee KJ. Effects of *Bambusae caulis* in Liguamen on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in hairless mice. *J Ethnopharmacol.* 2009;123:195-200.
- Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002;1:705-20.
- Ryu JC, Park SM, Hwangbo M, Byun SH, Ku SK, Kim YW, Kim SC, Jee SY, Cho IJ. Methanol extract of *artemisia apiacea* hance attenuates the expression of inflammatory mediators via NF- $\kappa$ B inactivation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:494681.
- Saeki H, Furue M, Furukawa F, Hide M, Ohtsuki M, Katayama I, Sasaki R, Suto H, Takehara K; Committee for guidelines for the management of atopic dermatitis of Japanese dermatological association. Guidelines for management of atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2009;36:563-77.
- Sawada E, Yoshida N, Sugiura A, Imokawa G. Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: an implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2012;68:25-35.
- Schottelius AJ, Zügel U, Döcke WD, Zollner TM, Röse L, Mengel A,



- Buchmann B, Becker A, Grütz G, Naundorf S, Friedrich A, Gaestel M, Asadullah K. The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in the p38/TNF- $\alpha$  pathway of systemic and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 2010;130:481-91.
- Seo YG, Kim DW, Yeo WH, Ramasamy T, Oh YK, Park YJ, Kim JA, Oh DH, Ku SK, Kim JK, Yong CS, Kim JO, Choi HG. Docetaxel-loaded thermosensitive and bioadhesive nanomicelles as a rectal drug delivery system for enhanced chemotherapeutic effect. *Pharm Res.* 2013;30:1860-70.
  - Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:1599-604.
  - Sivaranjani N, Rao SV, Rajeev G. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagn Res,* 2013;7:2683-85.
  - Smathers RL, Galligan JJ, Stewart BJ, Petersen DR. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem Biol Interact.* 2011;192:107-12.
  - Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* 1988;240:1169-76.
  - Smulson ME, Pang D, Jung M, Dimtchev A, Chasovskikh S, Spoonde A, Simbulan-Rosenthal C, Rosenthal D, Yakovlev A, Dritschilo A. Irreversible binding of poly-(ADP) ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis. *Cancer Res.* 1998;58:3495-8.
  - Smyth PG, Berman SA, Bursztajn S. Markers of apoptosis: methods for elucidating the mechanism of apoptotic cell death from the nervous system. *Biotechniques.* 2002;32:648-65.
  - Soria M, González-Haro C, Esteva S, Escanero JF, Pina JR. Effect of sulphurous mineral water in haematological and biochemical markers of muscle damage after an endurance exercise in well-trained athletes. *J Sports Sci.* 2014;32:954-62.
  - Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol.* 1996;51:383-94.
  - Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
  - Sung JH, Hwang MR, Kim JO, Lee JH, Kim YI, Kim JH, Chang SW, Jin SG, Kim JA, Lyoo WS, Han SS, Ku SK, Yong CS, Choi HG. Gel

characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. *Int J Pharm.* 2010;392:232-40.

- Szabó C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* 1995;3:2-32.
- Tajima Y. Biological reference data book on experimental animals. Soft Science Inc., Tokyo, 1989.
- Tasaka K. Antiallergic drugs. *Drugs of Today.* 1986;22:101-33.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995;81:801-9.
- Thestrup-Pedersen K. Clinical aspects of atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:535-43.
- Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:2644-9.
- Tsourelis-Nikita E, Menchini G, Ghersetich I, Hercogova J. Alternative treatment of psoriasis with balneotherapy using Leopoldine spa water. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16:260-2.
- Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishima S, Mayumi M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci.* 2003;72:2509-16.
- Ulrich P, Grenet O, Bluemel J, Vohr HW, Wiemann C, Grundler O, Suter W. Cytokine expression profiles during murine contact allergy: T helper 2 cytokines are expressed irrespective of the type of contact allergen. *Arch Toxicol.* 2001;75:470-9.
- Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 1999;104:1097-105.
- Whittle BJ, Varga C, Berko A, Horvath K, Posa A, Riley JP, Lundeen KA, Fourie AM, Dunford PJ. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. *Br J Pharmacol.* 2008;153:983-91.
- Woessner JF Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins.

Connect Tissue Res 1998;39:69-73.

- Yamanaka K, Mizutani H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:80-92.
- Yang JH, Kim SC, Shin BY, Jin SH, Jo MJ, Jegal KH, Kim YW, Lee JR, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. O-Methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF- $\kappa$ B activation. *Food Chem Toxicol*. 2013;59:362-72.
- Yoon HS, Kim JW, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Lee HS, Kwon YS, Ku SK. Immunomodulatory effects of *Aureobasidium pullulans* SM-2001 exopolymers on the cyclophosphamide-treated mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2010;20:438-45.
- Yoon YS, Sajo ME, Ignacio RM, Kim SK, Kim CS, Lee KJ. Positive effects of hydrogen water on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull*. 2014;37:1480-5.

## 뒷 면

### 주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.