

원저

흰쥐의 申脈(BL₆₂)에 시술한 저주파 전침자극의 항산화 효과에 대한 실험적 연구

전주현 · 김영일 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Study on the Effect of Electroacupuncture at *Shinmaek*(BL₆₂) on Anti-Oxidation

Jeon Ju-hyun, Kim Young-il and Lee Hyun

Department. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Dae jeon University

Objectives : The purpose of this study is to investigate the anti-oxidative effect of electroacupuncture at *Shinmaek*(BL₆₂) in rats.

Methods : In order to cause oxidative stress, AAPH was administered to the abdominal cavity of rats, after we stimulated BL₆₂ of the rat by electroacupuncture. Blood test and anti-oxidative test(LDL-cholesterol, GOT, GPT SOD, GSH, catalase, NO, MDA) were performed at the end of treatment.

Results :

1. SOD, glutathione, catalase activity were significantly increased in the BL₆₂-EA group compared with the holder group.
2. NO density was significantly decreased in the BL₆₂-EA group compared with the holder group.
3. Glutathione was significantly increased in the BL₆₂-EA group compared with the sham-EA group.

Conclusion : These results suggest that electroacupuncture at BL₆₂ has an anti-oxidant effect in human.

Key words : anti-oxidative effect, *Shinmaek*(BL₆₂), electroacupuncture

I. 서론

통계청에서 발표된 보고에 따르면 2001년 사망자의 5대 사망 원인질병은 암, 뇌혈관질환, 심장병, 당뇨병, 간질환이며, 특히 1991년의 사망원인과 비교해 보면 암, 당뇨병, 뇌혈관질환에 의한 사망률이 증가하고 있다¹⁾.

자유유리기설(free radical theory)은 산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 free radical에 의하여 세포내 산화적 손상이 축적되어 질병과 죽음이 초래된다는 설로²⁾, 세포의 산화적 손상은 동맥경화증, 퇴행성 관절염, 당뇨병 등 여러 가지 퇴행성 질환이나 암의 발생 및 노화와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며³⁾, 현재 free radical의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지하는 항산화계에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다⁴⁾.

한약을 이용한 최근 항산화관련 실험적 연구들은 약침제제⁵⁻⁸⁾와 단미제⁹⁻¹¹⁾ 및 복합침방¹²⁾을 이용하여 시행되었으나, 經穴 전침자극의 항산화 효과에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

침 치료는 한의학의 가장 중요한 치료방법 중 하나로 오랫동안 여러 질병의 예방과 치료에 사용되고 있다¹³⁾. 특정 經穴에 대한 침 자극은 국소부위에 한정되지 않고 전신적이고 계통적인 작용과 치료효과가 있어 국소 통증뿐만 아니라 많은 내상질환에도 응용이 가능하며¹⁴⁾, 電鍼은 기계적 자극과 전기적 자극을 결합시킨 치료법으로서 지속적인 자극을 유지할 수 있고, 자극량을 객관적으로 조절할 수 있는 장점이 있어 기능적 질환에 효과적으로 사용되고 있으며, 일반적인 刺鍼療法の 적용중에 모두 응용되고 있다^{15,16)}.

申脈(BL₆₂)은 足太陽膀胱經의 經穴이며, 陽蹻脈의 所生之處이고, 八脈交會穴의 하나로 督脈과 통하며, 治風痰, 寧神志 하는 효능¹⁷⁾이 있다. 申脈과 관련된 연구로는 치매 및 신경원 표지부위에 대한 연구^{18,19)} 등이 있었으나, 항산화 효과와 관련된 연구는 아직 없는 실정이다.

이에 저자는 申脈 電鍼의 항산화효과를 실험적으로 규명하고자 AAPH를 투여하여 산화적 스트레스를 유발한 쥐의 申脈에 電鍼을 시행한 후 혈청 중 LDH, GOT, GPT의 변화, 간 조직에서 SOD, glutathione, NO, catalase, MDA의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

실험동물은 (주)대한 바이오 링크(Korea)로 부터 공급받은 웅성의 6주령 Sprague-Dawley Rat(180±10g) (이하 SD Rat)을 1주일 동안 일정한 조건의 실험실 환경(온도 : 22±2°C, 습도 : 50%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시약

시약명	제조사	제조국
SOD assay kit	Dojindo	Japan
Glutathione kit		
Lipid peroxidation assay kit	Oxford	
Nitric Oxide assay kit		
Catalase kit		USA
Hematoxylin		
Eosin B	Sigma	
Xylene		
OCT compound		

(2) 기기

기기명	제조사	제조국
Thermo aluminum bath	Fine PCR	Japan
	Vision Scientific	Korea
Vortex mixer	Co	
Water bath	Intron biotech	
Electric chemical balance	MC1	Germany
Primus 96 thermocycler system	MWG Biotech	
ELISA reader	TECAN	Canada
Microscope	BD Biosciences	USA
Homogenizer	OMNi	
Stainless steel	Dong Bang Acupuncture Co	Korea
Electric stimulator(PG-6)	Ito Co	Japan
	Nikon	
Camera	Sanyo	
Bio-freezer		
Cryotome	Shandon	UK

2. 방법

1) 실험군 설정

실험동물은 각각 정상군(normal group), 대조군(control group), 구속대조군(holder group), 임의혈전 침군(sham-EA group), 申脈 자침군(BL₆₂-NR group), 申脈 전침군(BL₆₂-EA group)으로 분류하였고 각 실험군은 8마리씩으로 하였다.

- ① 정상군 : normal SD rat 군
- ② 대조군 : 1주간 매일 AAPH(50mg/kg)를 복강투여한 군
- ③ 구속대조군 : 1주간 매일 AAPH(50mg/kg)를 복강투여하고 주 3회 15분간 아크릴 홀더에 구속한 군
- ④ 임의혈 전침군 : 1주간 매일 AAPH(50mg/kg)를 복강투여하고 주 3회 아크릴 홀더에 넣은 상태에서 좌측 둔부에 15분간 전침자극(electroacupuncture)한 군
- ⑤ 申脈 유침군 : 1주간 매일 AAPH(50mg/kg)를 복강투여하고 주 3회 아크릴 홀더에 넣은 상태에서 왼쪽 申脈(BL₆₂)에 자침 후 15분간 유침(needle retention)한 군
- ⑥ 申脈 전침군 : 1주간 매일 AAPH(50mg/kg)를 복강투여하고 주 3회 아크릴 홀더에 넣은 상태에서 왼쪽 申脈(BL₆₂)에 자침 후 15분간 전침자극한 군

2) AAPH에 의한 산화적 스트레스 유발

정상군을 제외한 모든 군의 실험동물에게 매일 오전 AAPH를 50mg/kg씩 1주일간 복강에 투여하여 산화적 스트레스를 유발하였으며, 각 군에 맞게 전침처치를 실시하였다.

3) 취혈 및 전침 처치

길이 20cm, 지름 5cm의 원통형 아크릴 홀더를 제작하여 4개의 구멍을 뚫어 실험동물의 사지를 노출하여 자침 및 전침을 시행할 수 있도록 하였다. 멸균된 stainless steel 호침(0.25×30mm, Dong Bang Acupuncture Co. Korea)으로 골도분촌법에 준하여 인체의 申脈(BL₆₂)에 상응하는 부위를 실험동물의 좌측 전지에서 취하여 약 2~3mm 깊이로 자입하였다. 전침 자극군은 0.5×1cm²의 패드를 좌측 解谿(ST₄₁) 상응 부위에 부착한 후, 저주파 치료기(PG-6, Suzuki iryoki, Japan)의 한쪽 극을 자입된 침의 끝에 연결하고 다른 한쪽 극을 패드에 연결하여 2Hz의 저빈도에서 근육의

수축이 육안으로 확인되는 정도로 전압을 조절하여 15분간 자극을 가하였다. 전침자극은 AAPH 투여 기간 동안 격일로 오후에 시행하였다. 임의혈 대조군은 좌측 둔부에 같은 방법으로 전침자극을 가하였고, 申脈 자침군은 좌측 申脈에 자침 후 전침 자극을 가하지 않고 15분간 유침하였다.

4) 항산화 효과 측정

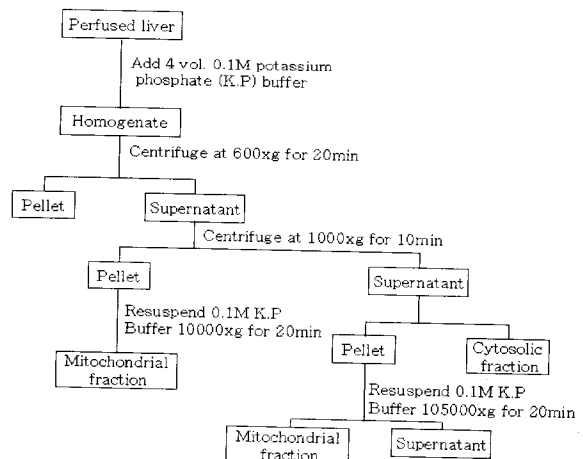
(1) 혈액학적 분석

실험 종료 후, ethyl ether를 이용하여 rat를 마취하고 심장 채혈법으로 채취하였다. 채혈한 혈액을 (주)이원 임상검사센터(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 혈중 LDL-Cholesterol, GOT, GPT를 측정하였다.

(2) 간에서의 항산화 효과 측정

① 간 조직의 적출 및 분획

생리 식염수로 관류하여 혈액을 제거한 후 간과 비장 조직의 일부를 적출하여 여지로 혈액 및 이물질을 제거하고 Bansal²⁰⁾ 등의 방법에 의해 간 조직 1g에 4배의 150mM의 KCl을 가하여 homogenizer를 이용하여 균질화하였다. 균질화한 조직을 600×g에서 10분간 원심분리하여 균질화되지 않은 조직 등을 제거한 후 상등액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 이 상등액을 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 cytosolic fraction을 얻고, 그 침전물에 동일한 양의 0.1M potassium phosphate buffer를 가하며 현탁시켜 microsomal fraction을 얻었다. microsomal fraction에서 glutathione의 함량과 MDA



Scheme 1. Preparation of mitochondrial, microsomal and cytosolic fractions

의 함량을 측정하였고, cytosolic fraction을 이용하여 SOD 생성저해 효과와 NO 함량을 측정하였으며, mitochondrial fraction에서 catalase의 활성을 측정하였다(Scheme 1).

② Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD 활성도는 SOD assay kit(Dojindo, Japan)을 이용하였다. 간 분획으로 얻은 sample 중에서 20,000 rpm으로 얻은 sample을 사용하였으며, sample solution을 96well plate에 각 well과 blank2에 20 μ l씩 분주한다. Blank1과 blank3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200 μ l/well로 모든 well에 첨가한다. blank2와 blank3 well에 dilution buffer를 20 μ l씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank1에 20 μ l/well으로 분주한다. 20분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 incubating을 실시하고 450nm에서 흡광도를 측정 하고 SOD 활성도를 환산하였다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{\{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})\}}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

③ Glutathione

조직 내 glutathione함량은 glutathione kit(Dojindo, Japan)을 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 얻었다.

④ NO assay

조직 내 NO함량은 nitric oxide assay kit(Oxford, USA)을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 얻었다.

⑤ Lipid peroxidation

MDA는 lipid peroxidation assay kit(Oxford Biomedical Research, USA)을 이용하여 586nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

⑥ Catalase

조직 내 catalase 함량은 catalase kit(Oxford Biomedical Research, USA)을 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

5) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대하여 ANOVA and

Bonferroni-type multiple t-test(parametric), Ver 1.1로 분석하여 p값을 구하였다. 각 실험군을 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Cryotome	
	— PBS 3min.
Harris Hematoxlin	
Rinse(several times) —	— 1min reaction
Eosin B	
Rinse(several times) —	— 5min
100% EtOH	
	— 1min
Xylene	
	— 5min.
Mount	

Scheme 2. Harris Hematoxylin & Eosin staining

III. 성 적

1. 혈액학적 분석

각 실험군의 혈청으로부터 LDL-cholesterol, GOT 및 GPT 농도를 측정하였다(Table 1).

Table 1. The Effect of the EA at BL₆₂ on Serum Level of Oxidized Rats

Parameter	Normal	Control	Holder	Sham-EA	BL ₆₂ -NR	BL ₆₂ -EA
LDL cholesterol (mg/dl)	14.25 ±3.5	28.5 ±1.29 1	15.25 ±3.86 2	15.75 ±3.68 6	20.6 ±6.02 5	16.6 ±6.22 9
GOT (IU/l)	243.25 ±32.8 37	255 ±36.5 79	313.5 ±98.5 28	281.75 ±41.4 6	249 ±33.3 32	232.8 ±63.1 24
GPT (IU/l)	42.75 ±6.5	52.75 ±7.13 6	50.75 ±6.60 2	49.4 ±2.51	46.8 ±2.38 7	41.25 ±1.5

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Blood samples were taken from rat heart and analysed for levels of various components in serum.

Values represent mean ± SEM(n=5).

1) LDL-cholesterol

각 실험군에서 취한 혈청에서 LDL-cholesterol 생성을 확인한 결과, normal군에 비하여 control군과 holder군에서 LDL-cholesterol은 증가하였고, control군의 LDL-cholesterol 증가는 유의성이 있었다. Control군에 비하여 holder군, sham-EA군, BL₆₂-NR군, BL₆₂-EA군의 LDL-cholesterol은 감소하였고, 그 중 holder군, sham-EA군, BL₆₂-EA군은 유의성이 있었다 (Fig. 1).

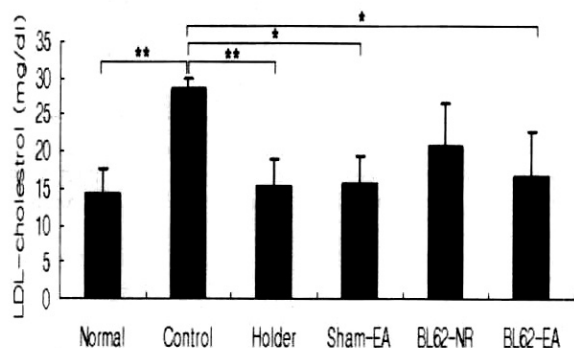


Fig. 1. The effect of EA at BL₆₂ on LDL-cholesterol of oxidized rat serum

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Blood samples were taken from rat heart and LDL-cholesterol level in serum was analysed.

Values represent mean \pm SEM(n=5).

** : P<0.01, * : P<0.05 by ANOVA test.

2) GOT

각 실험군에서 취한 혈청에서 GOT 농도를 측정된 결과, normal군에 비해 control군과 holder군에서 GOT

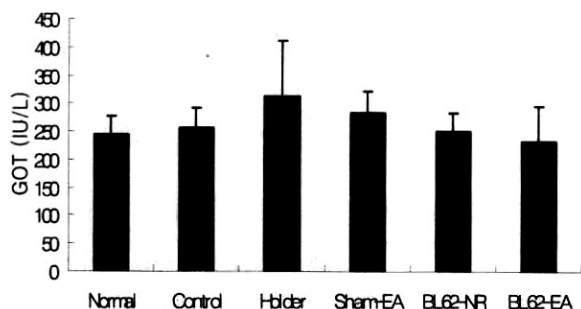


Fig. 2. The effect of EA at BL₆₂ on GOT of oxidized rat serum

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with

AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Blood samples were taken from rat heart and serum GOT level was analysed.

Values represent mean \pm SEM(n=5).

농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. BL₆₂-NR군과 BL₆₂-EA군의 GOT 농도는 holder군에 비해서 감소하였으며 BL₆₂-EA군의 GOT 농도는 sham-EA군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 2).

3) GPT

각 실험군에서 취한 혈청에서 GPT 농도를 측정된 결과, normal군에 비해 control군과 holder군에서 GPT 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. BL₆₂-NR군과 BL₆₂-EA군의 GPT 농도는 control군과 holder군에 비해 감소하였고, control군에 대한 BL₆₂-EA군의 GPT 농도 감소는 유의성이 있었다. Sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군의 GPT 농도는 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

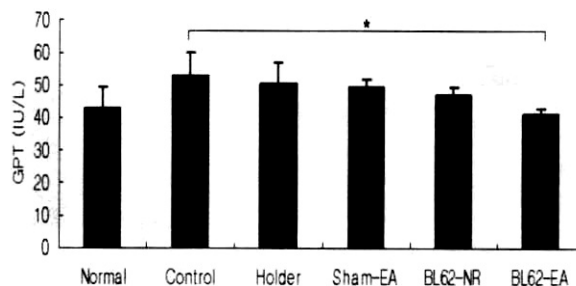


Fig. 3. The effect of EA at BL₆₂ on GPT of oxidized rat serum

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Blood samples were taken from rat heart and serum GPT level was analysed.

Values represent mean \pm SEM(n=5). * : P<0.05 by ANOVA test.

2. 간에서의 항산화 효과

실험동물의 간에서 SOD, glutathione, NO, MDA, catalase의 농도 또는 활성도를 측정하였다(Table 2).

1) SOD activity

실험동물의 간에서 SOD 활성을 측정된 결과, normal

Table 2. The Effect of EA at BL₆₂ on Concentration of Various Oxidants and Antioxidants in Oxidized Rat Liver

Parameter	Normal	Control	Holder	Sham-EA	BL ₆₂ -NR	BL ₆₂ -EA
SOD activity (%)	62.059 ±6.642	33.937 ±4.711	25.65 ±8.123	36.44 ±13.608	36.417 ±9.121	47.551 ±3.488
Glutathione Conc. (umol/ℓ)	137.11 ±2.059	63.383 ±1.501	56.937 ±16.862	102.097 ±13.149	141.477 ±14.147	142.693 ±3.272
NO Conc. (umol/ℓ)	32.967 ±11.807	76.137 ±11.227	101.72 ±10.681	53.583 ±8.848	68.723 ±13.37	48.783 ±11.283
MDA Conc. (umol/ml)	0.373 ±0.006	0.457 ±0.006	0.297 ±0.012	0.34 ±0	0.37 ±0.01	0.36 ±0.017
Catalase activity (U/ml)	168.827 ±0.318	130.867 ±11.241	152.84 ±0.087	168.08 ±0.15	152.733 ±0.179	168.08 ±0

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Rat liver was removed and the tissue was analysed for the detection of concentrations of various antioxidants and oxidants components.

Values represent mean ± SEM(n=3).

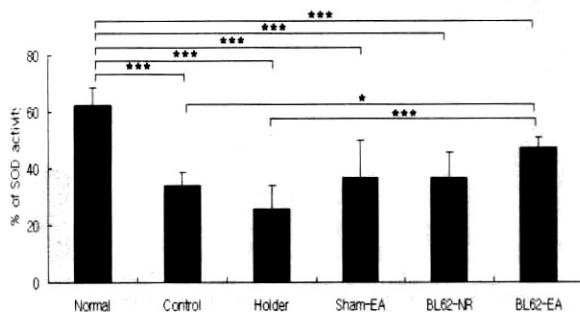


Fig. 4. The effect of EA at BL₆₂ on SOD activity of oxidized rat liver

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Rat liver was removed and the tissue was analysed for the SOD activity.

Values represent mean ± SEM(n=3).

*** : P<0.001, * : P<0.05 by ANOVA test.

군에 비하여 control군과 holder군에서 SOD 활성도가 유의성 있게 감소하였으며, control군과 holder군에 비하여 BL62-EA군에서 SOD 활성도는 유의성 있게 증가하였다. Sham-EA군에 비하여 BL62-EA군의 SOD 활성도는 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

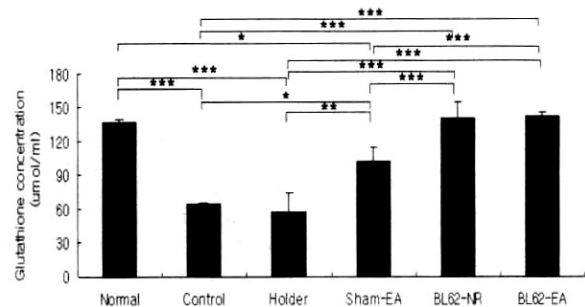


Fig. 5. The effect of EA at BL₆₂ on glutathione level of oxidized rat liver.

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL₆₂-NR and BL₆₂-EA groups were treated as described in the experimental methods. Rat liver was removed and the glutathione concentration in liver tissue was measured.

Values represent mean ± SEM(n=3).

*** : P<0.001, ** : P<0.01, * : P<0.05 by ANOVA test.

2) Glutathione concentration

실험동물의 간에서 glutathione의 함량을 측정할 결과, normal군에 비하여 control군 및 holder군에서 glutathione의 함량은 유의성 있게 감소하였으며, control군 및 holder군에 비하여 BL₆₂-NR군과 BL₆₂-EA군에서 유의성 있게 증가하였다. Sham-EA군에 비하여

BL62-EA군의 glutathione의 함량도 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5).

3) NO concentration

실험동물의 간에서 Nitric oxide(NO) 함량을 측정 한 결과, normal군에 비하여 control군과 holder군에서 NO 함량이 유의성 있게 증가하였다. Holder군에 비하여 BL62-NR군과 BL62-EA군에서의 NO 함량은 모두 감소하였고, BL62-EA군의 NO 함량 감소는 유의성이 있었다. Sham-EA군에 비하여 BL62-EA군의 NO 함량은 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

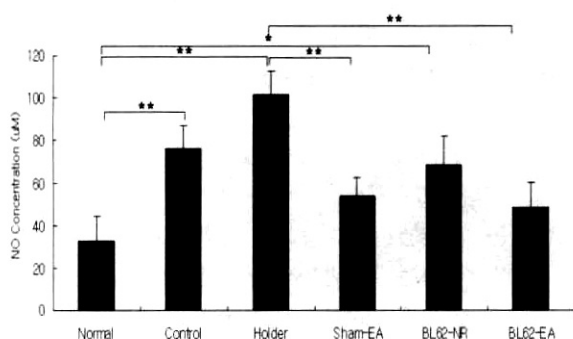


Fig. 6. The effect of EA at BL62 on NO concentration of oxidized rat liver

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL62-NR and BL62-EA groups were treated as described in the experimental methods. Rat liver was removed and NO concentration in liver tissue was analysed.

Values represent mean \pm SEM(n=3).

** : P<0.01, * : P<0.05 by ANOVA test.

4) MDA concentration

실험동물의 간에서 MDA 함량을 측정 한 결과, normal군에 비하여 control군에서 유의성 있게 증가하였고, control군에 비하여 BL62-NR군과 BL62-EA군

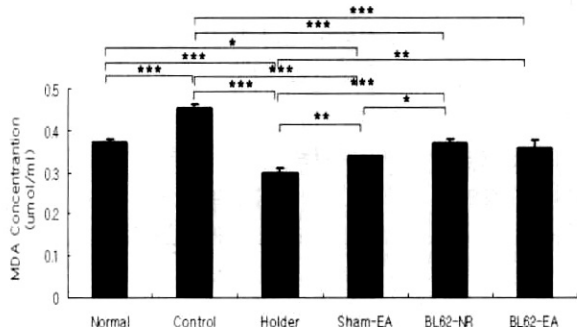


Fig. 7. The effect of EA at BL62 on MDA concentration of oxidized rat liver

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL62-NR and BL62-EA groups were treated as described in the experimental methods. Rat liver was removed and MDA concentration in liver tissue was analysed.

Values represent mean \pm SEM(n=3).

*** : P<0.001, ** : P<0.01, * : P<0.05 by ANOVA test.

에서 MDA 함량은 유의성 있게 감소하였으나, normal군에 비하여 holder군에서는 유의성 있게 감소하였으며, holder군에 비하여 BL62-NR군과 BL62-EA군에서 MDA 함량은 유의성 있게 증가하였다. Sham-EA군에 비하여 BL62-EA군에서 MDA 함량은 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

5) Catalase activity

실험동물의 간에서 catalase 농도를 측정 한 결과, normal군에 비하여 control군과 holder군에서 유의성 있게 감소하였으며, holder군에 비하여 BL62-EA군의 catalase 농도는 유의성 있게 증가하였다. Sham-EA군에 비하여 BL62-EA군에서 catalase 농도는 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

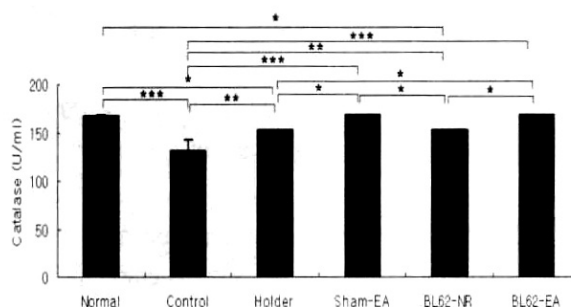


Fig. 8. The effect of EA at BL62 on catalase activity of oxidized rat liver

The rats were injected intraperitoneally (i.p) with AAPH for 7days (once a day, 50mg/kg). Those in the holder, sham-EA, BL62-NR and BL62-EA groups were treated as described in the experimental methods. Rat liver was removed and catalase level in liver tissue was analysed.

Values represent mean \pm SEM(n=3).

*** : P<0.001, ** : P<0.01, * : P<0.05 by ANOVA test.

IV. 고 찰

호기성 생물체가 소비하는 산소의 일부는 free radical로 변화되는데, 자유유리기설은 산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 free radical에 의하여 질병과 죽음이 초래된다는 설로²⁾, 인체의 노화나 여러 종류의 성인병은 자유유리기설과 연관이 있는 것으로 보고되고 있으며, 현재 항산화계에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다.^{3,4,6,7)}

Free radical이란 분자 혹은 원자 최외각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 말하는데, 생체 내에서 문제가 되는 것은 대사과정에서 부수적으로 생기는 활성산소로 superoxide(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂), hydroxy radical(-OH) 등이 해당되며 이들은 세포내 과질(mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성되고 macrophage, 백혈구에서도 생성된다²¹⁾. 이들 유독성 산소 대사물은 반응성이 매우 강하여 이들에 의한 free radical 반응은 핵산, 단백질, 지질 등 모든 세포내 거대분자를 변성 내지 파괴시킬 수 있으며, 특히 불포화 지방산을 포함한 여러 지질을 쉽게 산화시켜 지질과산화물을 초래하고, 세포막의 투과성을 변화시켜서 세포독성을 유발하며²²⁾, 증가하는 산화스트레스는 세포구성성분에 손상을 초래하여 암, 효소활성의 저하, 염증 촉진 및 세포막의 변화를 가져와 노화 및 돌연변이를 유발한다고 알려져 있다²³⁾.

생체에는 유독성 산소 대사물에 의한 유해 작용을 방해하는 산소라디칼 제거효소와 비효소계인 항산화 물질이 존재하는데²⁾, superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, protein bound-SH, nonprotein bound-SH, vitamin E 등이 이에 해당되며^{24,25)}, 또한 세포의 산화방지 효과를 가지는 화합물은 free radical의 형성을 억제 혹은 직접 제거하거나, 세포의 항산화기전을 강화시키는 작용을 할 수 있을 것이다. 그러므로 radical scavengers와 항산화제는 산소를 매개로 하는 질환에 대한 예방책이 될 수 있다²⁶⁾.

침 치료는 한의학의 가장 중요한 치료방법 중 하나로 오랫동안 여러 질병의 예방과 치료에 사용되고 있다¹⁴⁾. 刺鍼의 작용원리에 대해 《靈樞·刺節眞邪篇》²⁷⁾에 “用鍼之道 在於調氣”, 《素問·寶命全形論》²⁸⁾에 “凡刺之眞 必先治神”이라 하여 調氣治神의 과정을 통

해 補虛瀉實의 방법으로 생체의 각 기관 조직의 正氣를 강화시키고 항상성을 유지하게 함을 언급하였다²⁹⁾. 따라서 특정 經穴에 대한 침 자극이 국소 부위에 한정되지 않고 전신적이고 계통적인 작용과 치료효과를 발휘하므로 국소 통증뿐만 아니라 많은 내상질환에도 응용되는 것이다¹⁵⁾.

申脈(BL₆₂)의 異名은 ‘鬼路, 陽驕, 十三鬼穴之五’로서¹⁷⁾, 足外踝 下 5分으로, 外踝 바로 밑을 만져보아 踵骨과 外踝사이의 공간이 느껴지는 곳에 위치한다³⁰⁾. 申脈은 足太陽膀胱經의 經穴이며, 陽驕脈의 所生之處이고, 八脈交會穴의 하나로 督脈과 통하며 治風痰, 寧神志하는 효능¹⁷⁾이 있어, 人體 氣血陰陽의 조화를 목적으로 활용할 수 있는 穴位이다.

電鍼療法은 한의학의 침 요법과 현대과학기술의 결합에 의하여 발전된 鍼灸治療方法 중 하나로 장시간의 지속적인 運鍼에 대체할 수 있으며, 비교적 객관적으로 자극량을 조절할 수 있고, 인체조직의 어느一點에 자극을 집중시킬 수 있는 장점이 있어 최근 임상에서는 電鍼療法을 다양하게 사용하고 있다^{15,16)}.

본 실험에서는 AAPH(2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride)를 SD Rat에 투여하여 산화적 스트레스를 유발하였다. AAPH는 수용성의 azo화합물의 일종으로서 열분해에 의해서 free radical을 생성시키는 것으로 알려져 있고, 복강 내로 투여된 AAPH는 수분 내에 혈류를 타고 전신 순환되며, AAPH와 산소분자가 반응하여 생성된 탄소 자유기(carbon radical)는 과산화자유기(peroxyl radical)를 생성하여 여러 형태의 생물학적 분자와 결합반응을 일으켜 생체막의 구조를 파괴하는 것으로 생각된다^{31,32)}. AAPH로부터 생성된 자유기는 순환 혈액과의 직접적인 접촉에 의해 혈액에 있는 고분자 물질 또는 세포의 원형질막과 반응할 수 있어 모든 장기에 손상을 줄 가능성이 크나³³⁾, 그 중에서도 간과 뇌에 현저한 산화적 손상을 초래한다고 보고되었다³⁴⁾.

인체 장기 중에서 간은 항상성과 건강 유지를 위해 필수적인 많은 작용을 하는데³⁵⁾, 그 중에서 생체에 대해 유해한 이물질들을 무해한 것으로 바꾸는데 주된 역할을 담당한다. 이러한 해독작용의 근본은 주로 인체 내외에서 생성되거나 유입되어온 산물들을 수용성 형태로 바꾸어 체외로, 주로 소변을 통하여 배출하는 것이다³⁶⁾. 또한 간세포는 대부분의 주요 혈청 단백질(알부민, 운반단백질, 혈액응고인자들, 여러 호르몬과 성장인자들)을 합성하고, 담즙 및 그 운반물질들(담즙산, 콜레스테롤, lecithin, 인지질)을 생산하

며, 각종 영양소들(포도당, 글리코겐, 지방, 콜레스테롤, 아미노산)을 조절한다³⁶⁾. 따라서 본 연구에서는 AAPH로 유발된 산화적 스트레스를 받은 실험동물의 체중 변화 및 간비중의 변화를 관찰하였으며, 혈액학적 분석 항목으로 LDL-cholesterol, GOT, GPT의 농도 변화를 관찰하였으며, 분획한 간 조직으로부터 SOD, glutathione, NO, MDA, catalase 농도를 측정하였다.

LDL은 주로 간에서 말초로 cholesterol을 운반하는 지질단백으로, 혈관 내피 하에서 산화 변성을 받아 산화 LDL로 되며 세포내에 축적되어 동맥경화를 진전시키는 것으로 이해되는 물질이다³⁷⁾. 각 실험군에서 LDL-cholesterol을 확인한 결과 normal군에 비하여 control군에서 유의성 있게 증가하였으며, control군에 비하여 holder군, sham-EA군, BL₆₂-EA군은 유의성 있게 감소하였다. 하지만 normal군과 비교한 holder군과, holder군과 비교한 BL₆₂-EA군의 LDL-cholesterol은 유의성이 없었다(Table 1, Fig. 1).

혈중 GOT, GPT 효소 활성치의 증가는 세포장애의 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐만 아니라 다른 혈중 유출 효소에 비하여 예민하게 변동하며, GOT와 GPT 증가 태도에 따른 차이는 간질환의 진단뿐만 아니라 다른 질환과의 감별 등에 널리 이용되고 있다. GOT(glutamate oxaloacetate transaminase)는 AST(aspartate aminotransferase)라고 불리며 심근, 간, 근육, 혈구 조직에 장애가 생기면 혈중으로 효소가 유출하여 혈중 효소활성이 증가한다. GPT(glutamate pyruvate transaminase)는 ALT(alanine aminotransferase)라고 불리는데 간 장애에 예민한 검사이다³⁷⁾. 혈청 내 GOT, GPT 농도를 측정한 결과, normal군에 비해 control군과 holder군에서 약간 증가하였고, holder군에 비해 BL₆₂-NR군과 BL₆₂-EA군에서 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. 또한 sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군에서 GOT, GPT 농도는 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. 그러나 BL₆₂-EA군의 GPT 농도는 control군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 1, Fig. 2, 3). GOT, GPT 농도를 고려할 때 AAPH가 유발한 산화적 스트레스는 간 손상과 밀접한 관련이 있으며, 申脈 電鍼은 간의 산화적 스트레스에 대응하는 효과가 있으리라 생각되어 이에 관하여 추후 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

SOD(superoxide dismutase)는 주로 세포내 세포질 또는 미토콘드리아 내에 분포하며 대표적인 활성산소종의 하나인 superoxide anion을 제거하여 생체를 방어하는 물질이다³⁷⁾. 생체 내에서 반응성이 큰 활성산

소는 일단 SOD에 의해 과산화수소가 된 후 catalase에 의해 물로 되어 무독화되며, SOD는 산소 대사 과정에서 가장 먼저 생성되는 활성산소를 제거시킨다는 점에서 free radical 반응에 대한 방어기전으로서 그 역할이 강조되고 있다³⁸⁾. 간에서 SOD의 활성을 측정한 결과, normal군에 비하여 control군과 holder군에서 SOD 활성도가 유의성 있게 감소하였으며, BL₆₂-EA군에서는 holder군에 비하여 SOD 활성도가 유의성 있게 증가하여 申脈 電鍼이 세포독성에 대한 1차 방어라인인 SOD활성을 증가시킴으로써 항산화 작용을 하는 것으로 생각된다. Sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군에서 SOD 활성도는 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 4).

Glutathione은 모든 조직에 분포하는 세포 내 환원제로서 세포 내 수송과 저장, 세포 산화환원의 균형 조절, DNA 합성, 면역기능 및 세포증식에서 매우 중요한 물질로 이물질 화합물의 탈독성을 위한 반응을 촉진하며 free radical의 항산화를 위한 반응을 촉매한다³⁷⁾. 간에서 glutathione의 함량을 측정한 결과 normal군에 비하여 control군 및 holder군에서 유의성 있게 감소하였으며, holder군에 비하여 BL₆₂-NR군과 BL₆₂-EA군에서 유의성 있게 증가하였다. 또한 sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군의 glutathione 함량은 유의성 있게 증가하였다(Table 2, Fig. 5). 따라서 申脈 電鍼자극은 glutathione을 활성화시켜 독성물질에 대한 생체 방어능력을 향상시키는 항산화 효과가 있는 것으로 보인다.

NO(Nitric oxide)는 병리적 혈관확장, 세포독성, 세포손상 등 생체에 유해한 작용을 나타내고, 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 간에서 NO함량을 측정한 결과 normal군에 비하여 control군과 holder군에서 NO 함량이 유의성 있게 증가하였으며, holder군에 비하여 BL₆₂-NR군과 BL₆₂-EA군의 NO 함량은 감소하였고, 그 중 BL₆₂-EA군의 NO 함량 감소는 유의성이 있었다. Sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군의 NO 함량은 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 6). 이러한 결과로 보아 申脈 電鍼자극이 생체 내 유해한 자극에 대하여 억제작용을 하리라 생각된다.

MDA(malondialdehyde)는 다불포화지방산이 직접적 또는 간접적인 과산화 과정을 거치면서 분해되어 생성되는 물질이다. 생성된 과산화지질은 생체막 등에 손상을 입히고 세포 기능을 저하시키며 피사에 관여하여 여러 가지 질병을 야기하는데, 연령증가에 따른

혈관벽의 퇴행변성이나 간질환 및 당뇨병 등에서 혈중 과산화지질이 증가한다는 보고가 있다³⁷⁾. 간에서 MDA 함량을 측정된 결과 normal군에 비하여 control군에서 유의성 있게 증가하였고, control군에 비하여 BL₆₂-NR군 및 BL₆₂-EA군에서 MDA 함량은 유의성 있게 감소하였으나, normal군에 비하여 holder군에서는 유의성 있게 감소하였으며, holder군에 비하여 BL₆₂-NR군 및 BL₆₂-EA군의 MDA 함량은 유의성 있게 증가하였다. Sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군의 MDA 함량은 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 7). 이러한 실험 결과 중 control군에 비하여 BL₆₂-EA군에서 MDA 함량이 유의성 있게 감소한 결과는 기존 항산화 연구 중 李⁵⁾ 등의 연구결과와 일치하여 申脈 電鍼 자극이 지질과산화의 최종산물인 MDA의 생성을 억제시키고 지질과산화에 의한 생체변성을 방어하는 기능이 있음을 유추할 수 있으나, control군과 holder군 간의 편차가 심하여 추후 control군과 holder군의 구속 스트레스에 대한 보다 많은 연구가 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

Catalase는 세포내에서 과산화수소를 제거하는 효소로 생체의 모든 주요 기관에 존재하나 특히 간과 적혈구에 많이 분포하며¹²⁾, free radical에 의한 세포독성 초기에 반응하는 중요한 항산화 효소로 과산화수소를 분해함으로써 조직 손상을 방지하는 효과가 있다³⁷⁾. 간에서 catalase 농도를 측정된 결과, normal군에 비하여 control군과 holder군에서 유의성 있게 감소하였고, holder군에 비하여 BL₆₂-EA군에서 유의성 있게 증가하였다. Sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군의 catalase 농도는 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 8). 이러한 결과로 보아 申脈 電鍼 자극은 조직손상을 방지하는 항산화효과가 있을 것이라 생각된다.

본 실험 결과에서 sham-EA는 대부분 BL₆₂-EA와 유사한 경향을 보였으나, 항산화 효과에 있어서는 BL₆₂-EA군에서 더욱 뚜렷하게 나타났고, glutathione 항목에서는 sham-EA군에 비하여 BL₆₂-EA군에서 유의성 있게 나타나, 申脈의 경혈적 특성과 電鍼의 물리적 자극이 상승작용을 일으켜 항산화 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

또한 본 실험에서 실험동물에게 유침 및 전침 자극을 가하는 동안 실험동물의 움직임은 방지하기 위하여 아크릴 홀더에 실험동물을 구속하였는데, 산화 스트레스만을 가한 control군과 산화 스트레스와 구속 스트레스를 동시에 가한 holder군을 비교하였을 때

대부분의 항목에서 유의한 차이는 없었으나, LDL-cholesterol, MDA 항목에서는 control군과 holder군 간의 편차가 심하여 추후 구속 스트레스에 관한 심도 있는 비교 연구가 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 申脈 電鍼은 산화적 스트레스에 대한 생체 방어능을 향상시키고 간손상을 억제하여 항산화 효과를 발휘하는 것으로 생각되며, 향후 free radical과 관련하여 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

AAPH로 산화적 스트레스를 유발시킨 흰쥐를 대상으로 申脈 電鍼이 항산화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간장 내 SOD 활성도, glutathione 농도, catalase 농도는 BL₆₂-EA에서 holder군에 비하여 유의성 있게 증가하였다
2. NO 농도는 BL₆₂-EA군에서 holder군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
3. Glutathione 농도는 BL₆₂-EA군에서 sham-EA군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

VI. 참고문헌

1. 정영호, 고숙자. 5대 사망원인 질병의 사회, 경제적 비용추계. 재정논집. 2004; 18(2) : 77-104.
2. Harman D. The free radical theory of aging : In free radicals in Biology. New York : Academic Press. 1982; 5 : 255-75.
3. 배학연, 이병래, 고광삼. 고농도 포도당이 생쥐 인슐린종세포의 superoxide dismutase 활성에 미치는 영향. 당뇨병학회지. 1998; 22(3) : 271-9.
4. 양미경. 노화촉진생쥐(SAM)에서 간조직의 SOD 활성에 대해 paraquat가 미치는 영향. 한국미용학회지. 2005; 11(3) : 191-6.
5. 이종무, 이병렬. 텍사 약침의 항산화효과에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2003; 20(1) : 159-76.

6. 김영해, 김갑성. 호도 약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 1996 ; 17(2) : 9-20.
7. 임락철. 적하수오 약침의 AAPH처리된 흰쥐에 대한 항산화작용. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2000 ; 8(2) : 361-74.
8. 이동현. 백하수오 약침의 항산화 작용에 관한 실험적 연구. 대전대학교대학원. 1997.
9. 정광희, 성낙술, 이영중. 박하(薄荷)의 항산화 효능에 대한 연구(1). 대한본초학회지. 2005 ; 20(4) : 103-12.
10. 김영균, 양기호, 조수인. 석곡(石斛)의 항산화효과. 대한본초학회지. 2005 ; 20(4) : 53-60.
11. 조수인, 오원우. 황금(黃芩)의 항산화효과. 대한본초학회지. 2005 ; 20(3) : 67-74.
12. 박성민, 임병현, 이준희, 박재현. 보중익기탕과 육미지황탕이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003 ; 18(4) : 175-91.
13. 조은희, 박민철. 족삼리, 상거허, 하거허의 배혈에 따른 전침의 실험적 연구. 대한침구학회지. 2006 ; 23(6) : 87.
14. 김정신, 김용석, 남상수. 족삼리 전침자극이 알러지모델 생쥐의 면역능에 미치는 영향 및 기전에 관한 연구. 대한침구학회지. 2005; 22(3) : 23-35.
15. 전국한외과대학 침구경혈학교실. 鍼灸學(下). 서울 : 집문당. 1994 : 1447-50.
16. 손성세, 남상수. 고빈도전침자극의 자극시간에 따른 중추신경계 신경세포의 활성변화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998 ; 15(2) : 17-28.
17. 전국한외과대학 침구경혈학교실. 鍼灸學(上). 서울 : 집문당. 2001 : 523.
18. 박우순, 이태영. 신맥 조해의 전침자극이 치매 환자의 뇌파에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(2) : 67-78.
19. 이창현, 김수현. 신경추적자를 이용한 신맥과 조해에서 투사되는 신경원의 표지부위에 대한 연구. 대한침구학회지. 2001 ; 18(2) : 51-66.
20. Bansal VS, Hattori H, Orihel D, Kanfer JN. Distribution of selected phospholipid modifying enzymes in rat brain microsomal subtractions prepared by density gradient zonal rotor centrifugation. Neurochem Res. 1985 ; 10(4) : 439-51.
21. Oyanagui, Y. SOD and active oxygen modulator. Tokyo : Nihon gakukan. 1989 : 17-36.
22. Kellogg EW 3d, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J Biol Chem. 1977 ; 252(19) : 6721-8.
23. 김숙희, 김화영. 노화. 서울 : 민음사. 1997 : 77-106.
24. Harman D. The free radical theory of aging. J Gerontol. 1968 ; 23 : 476-82.
25. 오유진. 활성산소가 질병의 원인이었다. 서울 : 이화문화출판사. 1997 : 57-67.
26. Ames BN, Gold LS, Willet WC. The causes and prevention of cancer. Proc Natl Acad Sci. 1995 ; 92 : 5258-65.
27. 홍원식. 황제내경해석영추. 서울 : 고문사. 1990 : 17-8, 86.
28. 홍원식. 황제내경해석소문. 서울 : 고문사. 1990 : 10, 75.
29. 최민섭, 고동균, 김창환. 침구요법이 면역기능에 미치는 영향에 대한 고찰. 대한침구학회지. 1993 ; 10(1) : 61-74.
30. 김택률, 오현주. 도해입상취혈-오수혈. 경기도 부천시 : 전국의학사. 2003 : 251.
31. Terao K, Niki E. Damage to biological tissue induced by radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. J Free Radicals in Biol Med. 1986 ; 2 : 193-201.
32. Terao K. Liver injuries induced by free radical. J Toxicol Pathol. 1989 ; 2 : 11-8.
33. 강정부, 손호상, 김철호. 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향. 한국임상수의학회지. 1998 ; 15(1) : 75-6.
34. 홍성길, 강봉주, 강상모, 조동욱. Antioxidative Effects of Traditional Korean Herbal Medicines on AAPH-induced Oxidative damage. Food Science and Biotechnology. 2001 ; 10(2) : 183-7.
35. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's 내과학 제2권. 서울 : 도서출판 MIP. 2003 : 1759, 1790.
36. 전국한외과대학 간계내과학교수. 간계내과학.

- 서울 : 동양의학연구원. 1989 : 209-10, 504.
37. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 서울 : 의학문화사. 2003 : 125, 180, 182, 218, 334-5, 345, 367, 373-4, 399, 498, 955.
38. 안상원, 이철완. 국내문헌(35)에 나타난 항노화 및 항산화의 실험적 연구에 대한 검색. 대한한의학회지. 1998 ; 19(2) : 373-90.