

카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대한 침 자극의 간 보호 효과

신화영¹, 이현종¹, 임성철¹, 이윤규¹, 이봉효¹, 정태영², 김재수^{1,*}

¹대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

²제한동의학술원



[Abstract]

The Protective Effects of Acupuncture on the Liver in the Oxidative Stress Caused by Cadmium

Hwa Young Shin¹, Hyun Jong Lee¹, Seong Chul Lim¹, Yun Kyu Lee¹,
Bong Hyo Lee¹, Tae Young Jung² and Jae Soo Kim^{1,*}

¹Department of Acupuncture, Moxibustion, Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

²Je-Han Oriental Medical Academy

This study was performed to investigate the protective effects of acupuncture on the liver in the oxidative stress caused by cadmium accumulation.

Sprague-Dawley male(150 ± 30 g) rats were stabilized for a week and divided into 5 groups which is normal, control, LR₃ acupuncture, BL₂₃ acupuncture and sham acupuncture group. For three days experimental groups were received oral doses of cadmium 2 mg/kg twice a day. Acupuncture was given bilaterally at each point 10 times for two weeks. The depth of stimulation was 1 mm at right angles and torsion of acupuncture was produced 2 times per second for 1 minutes. The liver was shipped off and taken weight at the last day of two weeks, and hepatic functions was confirmed through alanine transaminase(ALT) and aspartate amino-transferase(AST). We measured reactive oxygen species of serum, liver and kidney, and compared expression levels of superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(Gpx), nuclear factor erythroid derived 2-related factor 2(Nrf-2), heme oxygenase-1(HO-1), nuclear factor-κB(NF-κB), cyclooxygenase-2(COX-2), inducible nitric oxide synthase(iNOS), Bax and Cytochrome c. BL₂₃ acupuncture group significantly increased liver weight and decreased ALT compared to control group. For the oxidative stress, LR₃ acupuncture group significantly reduced reactive oxygen species, and BL₂₃ acupuncture group significantly reduced reactive oxygen species and inflammation-related protein compared to control group. But LR₃ acupuncture group and BL₂₃ acupuncture group didn't significantly reduce apoptosis-related protein. Therefore LR₃ and BL₂₃ acupuncture showed the effects of antioxidant and anti-inflammatory, especially BL₂₃ acupuncture was more effective than LR₃ acupuncture on the protection of liver in the oxidative stress.

Key words :

Acupuncture;
Cadmium;
Oxidative stress;
LR₃;
BL₂₃

Received : 2014. 11. 06.
Revised : 2014. 11. 27.
Accepted : 2014. 12. 01.
On-line : 2014. 12. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Daegu Hanny Oriental Medical Hospital, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 704-123, Republic of Korea
Tel : +82-53-770-2112 E-mail : jaice@hanmail.net

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)
Copyright © 2014 KAMMS, Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

I. 서 론

현대 사회는 산업 발달에 수반되는 공해로 인해 카드뮴, 납, 수은, 비소 등과 같은 중금속 화합물에 의한 대기, 토양, 식수 등의 환경오염과 이로 유발되는 2차적인 식품오염 등으로 심각한 사회문제를 겪고 있다¹⁾. 이 중 카드뮴(cadmium, 이하 Cd)은 주로 호흡기나 소화기를 통하여 체내에 유입되며, 체내에서 10~30년의 긴 생물학적 반감기를 가지고 있어 먹이 연쇄에 의하여 계속 축적되고 이에 따라 그 독성도 누적된다²⁾.

카드뮴 독성의 정도는 개체의 영양 상태, 연령, 폭로 기간, 체내 침입 경로, 카드뮴염의 형태 등에 따라 다른데^{3,4)}, 일반적으로 신 기능장애, 간 조직손상, 중추신경 장애, 고혈압, 빈혈, 골연화증 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며^{5,6)}, 발암작용도 일으킨다고 보고되었다⁷⁾.

산화·환원 비활성 금속인 카드뮴은 지질 및 세포막, 단백질 및 핵산 등의 세포 구조 손상에 중요한 매개체가 될 수 있는 활성산소(reactive oxygen species, 이하 ROS) 생산을 유도하여 산화적 스트레스를 일으키고^{8,9)}, 미토콘드리아 기능 장애를 가져와 결국 세포사멸에 이르게 한다¹⁰⁾.

중금속 해독에 대한 다양한 약제와 식품들의 경구 식이 및 투여 또는 복강 투여에 대한 연구가 많이 진행되었고¹¹⁻¹⁶⁾, 약침을 사용하여 중금속으로 인한 간과 신장의 손상을 억제하는 연구도 있으나^{17,18)}, 현재 경혈의 침 자극에 의한 해독 연구방법은 전무한 상태이다.

한의학에서는 코카인과 모르핀 및 알코올 중독의 침치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 중금속 중독에 대한 해독 침 자극의 가능성을 제시할 수 있고¹⁹⁻²¹⁾, 여러 중독을 해독하는 경혈에 관한 문헌 연구도 이루어져 있다^{22,23)}. 그 중 태충혈은 간 손상을 보호하고 세포사멸을 방지하며 신경손상을 회복시키는 작용을 하고^{24,25)}, 신수혈은 신장의 기능을 자극하고 모르핀을 해독시키는 작용을 한다^{26,27)}.

이에 본 연구는 동물실험을 통하여 카드뮴의 주요한 표적 장기이며, 급성 폭로 시 다량으로 축적되는 간 조직에 침 자극이 미치는 항산화, 항염증, 세포사멸 보호 효과에 대해 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 체중 150 ± 30 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷 4주령(효창 사이언스, 대구, 대한민국)을 사용하였다. 실험실 환경은 온도 20 °C, 습도 55 %로 유지하고 cage 당 4마리씩 넣어서 일주일동안 실험용 펠레트 사료(신촌사료주식회사, 서울, 대한민국)의 수분을 공급하여 안정화시킨 후 사용하였다. 본 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리규정을 준수하여 시행하였다(DHU2013-064).

2) 침

침은 스테인레스 호침(직경 0.18 mm 길이 3.0 mm, 동방침구, 한국)을 사용하였다.

3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare(Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고, β -actin, superoxide dismutase(이하 SOD), catalase, glutathione peroxidase(이하 Gpx), p22phox(phagocyteoxidase), nuclear factor erythroid derived 2-related factor 2(이하 Nrf-2), heme oxygenase-1(이하 HO-1), nuclear factor- κ B(이하 NF- κ B), cyclooxygenase-2(이하 COX-2), inducible nitric oxide synthase(이하 iNOS), Bax, cytochrome c 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, NADPH oxidase(Nox)-4는 Life Span Bio Sciences(Seattle, WA, USA)로부터 구입하였다. 그리고 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probe, Inc(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 혈청 alanine transaminase(이하 ALT)와 aspartate aminotransferase(이하 AST) assay kit은 Sentron GmbH(Dresden, Germany)에서 구입하였으며, 그 외의 모든 시약은 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 군 분류

1주일간의 적응기를 둔 후 카드뮴을 투여하지 않은 정상군과 카드뮴을 투여한 실험군으로 나누고, 카드뮴 투여 실험군

은 다시 아무런 침 자극을 하지 않은 대조군, 태충혈에 침 자극한 태충혈군, 신수혈에 침 자극한 신수혈군 그리고 꼬리에 침 자극한 꼬리침군으로 나누었다. 실험동물은 각 군별로 10마리씩 총 50마리를 사용하였고, 6마리 이하로 감소하면 2차 실험을 다시 시행하였으며, 2차 실험은 1차 실험과 동일하게 진행하였다.

2) 침 자극

침 자극은 동물 아틀라스에 해당되는 태충·신수혈을 찾아 펜으로 점을 찍고 양쪽으로 자극하며, 꼬리침군은 혈 자리 이외의 침 자극으로 인해 발생할 수 있는 해독 효능을 배제하기 위하여 흰 쥐 꼬리 부분의 sham 경혈을 잡아 자극하였다. 침 자극은 주 5회 2주간 실시하는데, 자극의 깊이는 1 mm 직각으로 자입하여 1분 동안 1초당 2번 염전하였고, 활동할 수 있는 흰 쥐에 침 자극을 하면 스트레스로 인해 침의 효과에 영향을 끼칠 수 있으므로 마취 후 시행하였다.

3) 카드뭴 축적 흰쥐 모델

카드뭴은 체중에 따라 2 mg/kg로 1일 2회 오전, 오후 연속 3일간 경구 투여하였다. 침 자극 2주의 최종일에는 12시간동안 절식시킨 후 에테르로 마취시켜 개복하고 복부대정맥에 관류하여 채혈투여 종료 후 마취상태에서 심장천자를 통해 흰 쥐의 모든 혈액을 채취하였고, 간은 빠르게 적출하여 액체 질소에 냉동한 뒤 -80 °C에서 보관하였다.

4) 체중 및 장기 무게 측정

실험 전 물은 자유롭게 공급하면서 약 16시간 동안 절식한 후 체중을 측정하였으며, 체중증가(g)는 침 자극 0일의 체중과 침 자극 최종일의 차이로 나타내었다. 또한, 장기의 중량은 침 자극 최종일에 실험동물의 간을 적출하여 무게를 측정하였으며, 기관의 무게를 체중으로 나눈 간의 index값은 침 자극 최종일의 체중에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

5) 혈청 분석

복부대정맥에서 채혈한 혈액을 5417R microcentrifuge (Eppendorf Co, Hamburg, Germany)를 이용하여 원심분리 후 혈청을 얻었다. 혈청 ALT, AST assay kit는 제작사 (Shinyang Chemical Co)의 프로토콜에 따라 측정하였다. 혈청 샘플 5 μ l에 시약 200 μ l를 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubate 한 뒤, multi micro-plate reader로 Infinite M200 PRO(TECAN Group Ltd., M nendorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 ROS 생성량의 측정은 혈청에 25 mM DCFH-DA를 혼합한

후, 0분부터 매 10분씩 486 nm emission wavelength와 530 nm excitation wavelength를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

6) ROS 생성량 측정

ROS 생성량의 측정은 간 조직을 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 분쇄한 후 25 mM DCFH-DA를 혼합하고, 0분부터 매 10분씩 486 nm emission wavelength와 530 nm excitation wavelength를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

7) Cytosol extract

간 조직을 100 mM Tris-HCl(pH 7.4), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 2 M Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 μ M pepstatin and 80 mg/L trypsin inhibitor가 포함된 homogenate buffer [10 mM HEPES(pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF]와 함께 얼음으로 차갑게 하여 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 미토콘드리아 침전물을 얻기 위해 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다.

8) Nuclear extract

간 조직을 500 μ l hypotonic buffer A [10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF]에 넣어 차가운 상태에서 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 10% NP-40 용액 62.5 μ l를 첨가하여 12,00 rpm으로 30초간 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 pelleted nuclei를 10% NP-40가 더해진 buffer A에 한번 헹구어 12,000 rpm으로 원심분리하고 100 μ l의 buffer C(50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10 % glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 핵단백질을 포함한 상층액은 수집되어 -80°C에서 냉동 보관하였다.

9) Western blot analysis

SOD, catalase, Gpx, Nrf-2, NF- κ B 단백질의 발현을 측정하기 위해 nuclear extract 10 μ g의 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 5 % skim milk를 함유한 TBS-T(0.5 % Tween 20 in TBS)에 담그고 1시간동안 blocking 처리한 후 TBS-T로 5분마다 5회

세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 4 °C에서 overnight 시킨 다음 TBS-T로 10분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(TBS-T로 1 : 5,000으로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다.

또한 SOD, catalase, Gpx, HO-1, COX-2, iNOS, Bax, cytochrome c 및 β -actin 단백질의 발현을 측정하기 위해 cytosol extract 10 μ g의 단백질을 8~15 % SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 5 % skim milk를 함유한 TBS-T(0.5 % Tween 20 in TBS)에 담그고 1시간 동안 blocking 처리한 후 TBS-T로 5분마다 5회 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 4 °C에서 overnight 시킨 다음 TBS-T로 10분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(TBS-T로 1 : 5,000으로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 30분간 반응시킨 후, TBS-T로 10분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence(ECL) Western Blotting detection reagents(GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후, Davinch-Chemi CAS-400SM Western Imaging System(Davinch-K, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

10) 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 표기하였으며, SPSS 18.0 for Windows program을 사용하여 one-way

analysis of variance(ANOVA)로 유의수준 p -value < 0.05에서 검정하였다.

III. 결 과

1. 체중과 간 무게에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 체중이 유의하게 감소하였으나, 태충혈군과 신수혈군은 대조군에 비해 유의한 체중 변화는 없었다.

대조군의 간 무게와 체중 100 g 당 무게로 환산한 간 index값은 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나 신수혈군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 꼬리침군은 대조군에 비해 체중과 간 무게, 간 index값에서 모두 유의한 변화는 없었다(Table 1).

2. 간 기능에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 ALT 수치가 유의하게 증가하였으나, 신수혈군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. AST 수치는 모든 군에서 유의한 변화가 없었고, 꼬리침군은 대조군에 비해 모든 검사 수치에서 유의한 변화가 없었다(Table 2).

Table 1. Body Weight Gain and Liver Weight

Item	Normal	Cadmium 2 mg/kg			
		Control	LR ₃	BL ₂₃	Sham
Body weight gain(g / 3 weeks)	89.8 \pm 4.2 ^c	81 \pm 7.0	74.6 \pm 12.9	77.6 \pm 9.6	79.8 \pm 10.5
Tissue weight(g)	11.78 \pm 0.54 ^c	7.54 \pm 0.24	8.10 \pm 0.30	13.11 \pm 0.96 ^a	7.56 \pm 0.30
% of tissue weight(g / 100 g BW)	4.77 \pm 0.18 ^c	3.11 \pm 3.08	3.33 \pm 0.09	6.40 \pm 0.63 ^b	3.06 \pm 0.09

a : p < 0.05, b : p < 0.01, c : p < 0.001 compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

Table 2. Parameters of Hepatic Functions

Item	Normal	Cadmium 2 mg/kg			
		Control	LR ₃	BL ₂₃	Sham
ALT(IU/L)	58.2 \pm 0.8 ^b	63.9 \pm 0.3	61.8 \pm 0.8	56.0 \pm 0.2 ^a	63.2 \pm 0.7
AST(IU/L)	78.4 \pm 0.8	79.4 \pm 0.5	79.7 \pm 0.7	72.2 \pm 2.3	79.4 \pm 0.6

a : p < 0.05, b : p < 0.001 compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

3. 산화적 스트레스 억제 효과

혈청의 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충혈군과 신수혈군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 신수혈군은 대조군에 비해 간 조직의 ROS 생성량도 유의하게 감소하였고, 꼬리침군은 대조군에 비해 혈청과 간 ROS 생성량에 모두 유의한 변화는 없었다(Table 3).

4. 간 조직에서 항산화 효소 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 SOD와 Gpx 발현량이 유의하게 감소하였다. 대조군에 비해 태충혈군은 catalase 발현량이 유의하게 증가하였으며, 신수혈군은 Gpx 발현량이 유의하게 증가하였다. 꼬리침군은 대조군에 비해 SOD, catalase 및 Gpx 발현량에 모두 유의한 변화는 없었다(Fig. 1).

5. 간 조직에서 항산화 유전자 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 Nrf-2와 HO-1 발현량이 모두 유

의하게 감소하였으나, 신수혈군은 대조군에 비해 HO-1 발현량이 유의하게 증가하였다. 태충혈군과 꼬리침군은 대조군에 비해 Nrf-2와 HO-1 발현량에 유의한 변화는 없었다(Fig. 2).

6. 간 조직에서 염증 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 NF- κ B, COX-2 및 iNOS 발현량이 모두 유의하게 증가하였다. 신수혈군은 대조군에 비해 NF- κ B, COX-2 및 iNOS 발현량이 유의하게 감소하였고, 태충혈군과 꼬리침군은 대조군에 비해 NF- κ B, COX-2 및 iNOS 발현량이 감소하는 경향성을 나타냈으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

7. 간 조직에서 세포사멸 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 Bax와 cytochrome c 발현량이 유의하게 증가하였다. 태충혈군과 신수혈군은 대조군에 비해 Bax와 cytochrome c 발현량이 감소하는 경향성을 나타냈으나 유의성은 없었고, 꼬리침군도 대조군에 비해 유의한 변화

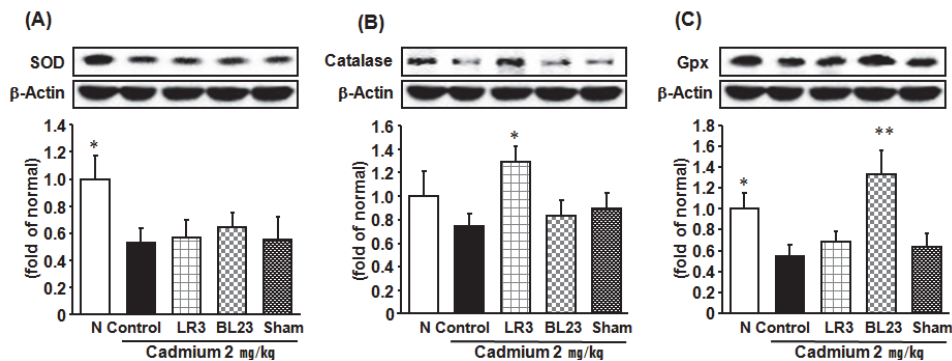


Fig. 1. Hepatic antioxidant enzyme-related protein expressions

(A) superoxide dismutase(SOD), (B) catalase, (C) glutathione peroxidase(Gpx).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

Table 3. ROS Generation in the Serum and Liver

Item	Normal	Cadmium 2 mg/kg			
		Control	LR ₃	BL ₂₃	Sham
Serum ROS(flu/min/ml)	61 ± 3 ^b	145 ± 17	62 ± 5 ^b	34 ± 2 ^c	145 ± 21
Hepatic ROS(flu./min/mg protein)	308 ± 14	319 ± 14	312 ± 50	233 ± 21 ^b	294 ± 71

b : $p < 0.01$, c : $p < 0.001$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

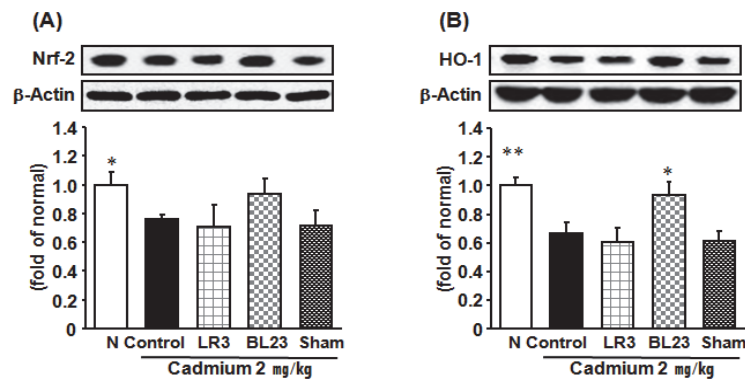


Fig. 2. Hepatic antioxidant gene-related protein expressions

(A) nuclear factor erythroid derived 2-related factor 2(Nrf-2).

(B) heme oxygenase-1(HO-1).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

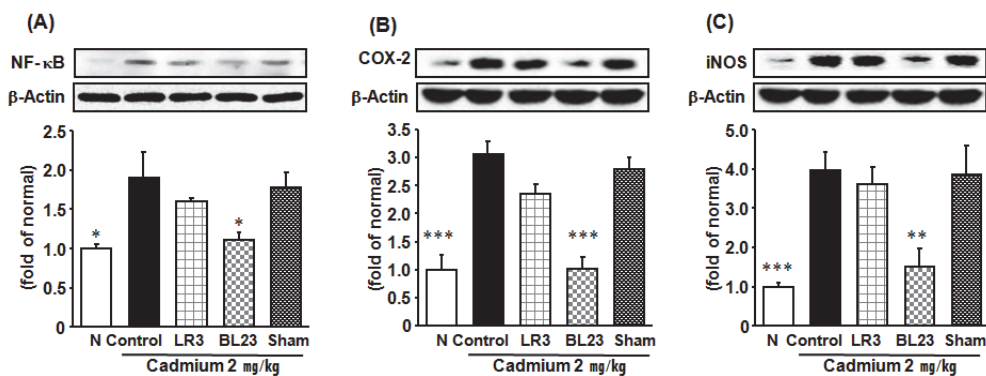


Fig. 3. Hepatic inflammation-related protein expressions

(A) nuclear factor- κ B(NF- κ B). (B) cyclooxygenase-2(COX-2). (C) inducible nitric oxide synthase(iNOS).

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

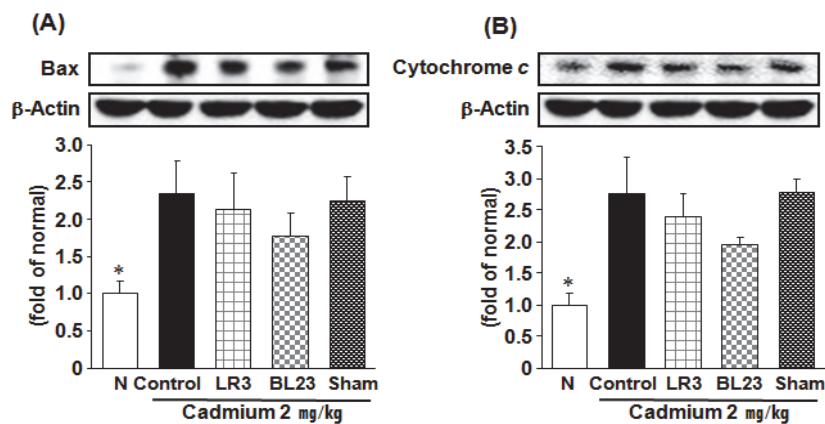


Fig. 4. Hepatic apoptosis-related protein expressions

(A) Bax . (B) cytochrome c.

* : $p < 0.05$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

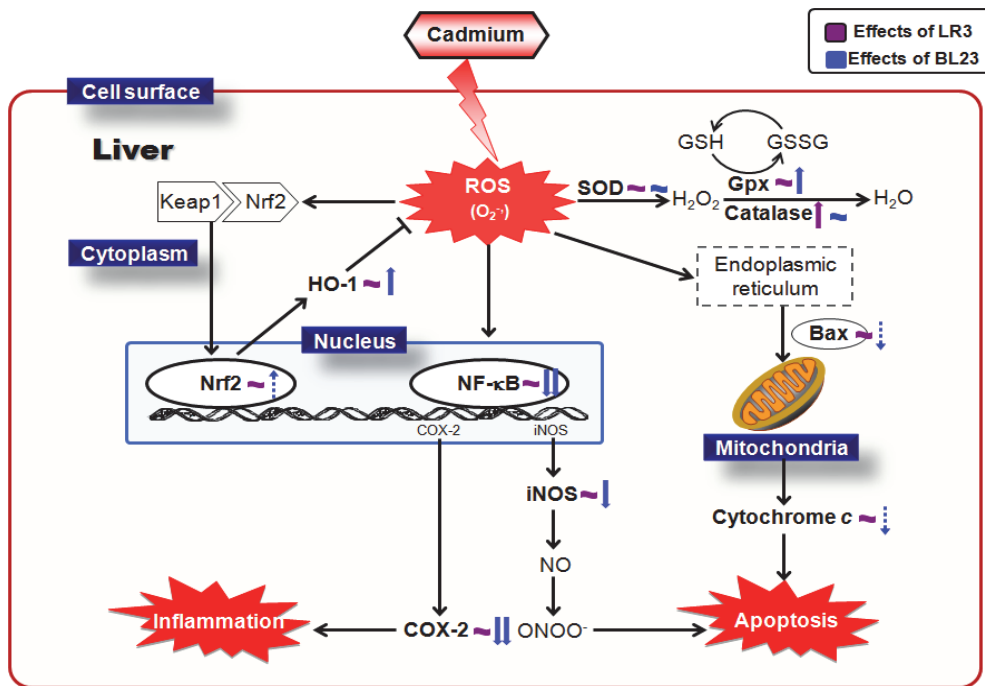


Fig. 5. Predictable mechanisms in hepatic tissues applied acupuncture

는 없었다(Fig. 4.).

8. 간 조직에서 항산화, 항염증, 세포 보호 효과에 대한 종합적인 영향

태충혈과 신수혈이 산화적 스트레스를 억제시킬 수 있는 항산화 효소 및 유전자 관련 단백질, 염증 관련 단백질, 세포사멸 관련 단백질 등의 발현에 미치는 영향을 정리하면 Fig. 5와 같다.

IV. 고 찰

산업의 발달로 카드뮴, 수은, 납 등의 중금속 오염이 급증하고, 이로 인한 공해병이 날로 심각해져 국내외적으로 큰 사회적 문제가 되고 있다. 그 중에서도 카드뮴은 공업적으로 전기도금, 배터리, 합금, 연료 등의 생산에 이용되어 왔고, 이러한 공업적인 이용의 증가로 인해 토양, 공기, 물이 오염되고, 인산 비료와 하수, 카드뮴 함유 살균제의 이용 등을 통해 상당량이 토양에 축적되고 있다¹⁾.

카드뮴은 1817년 Strohmeyer에 의해 처음으로 분리되었으며 인체에 미치는 영향은 1932년 Prodan이 처음으로 기

술하였다²⁸⁾. 카드뮴의 대표적 표적 장기는 간과 신장으로서 이들 기관에 나타나는 증상은 노출되는 양과 형태, 노출시간 및 체내 침투 경로에 따라 다양한 독성이 나타나게 된다. 카드뮴의 인체중독 현상으로는 간, 위장, 중추신경 장애 등의 급성중독 증상과 신장 기능 장애, 칼슘 흡수 장애, 골 장애를 일으키는 이파이이파이 질환과 같은 만성 중독 증상이 있다²⁹⁻³⁹⁾.

간 조직은 체내에서 카드뮴이 50~80 %가 축적되어 카드뮴 중독에 가장 큰 영향을 받는 기관이면서 동시에 해독 기관이다. 중독 초기에는 간 조직에서의 카드뮴 함량이 높아 조직 손상을 일으키고, 말기에는 신장에 더 많이 축적되어 신장 기능 부전 및 조직 손상 등을 일으킨다³¹⁾.

카드뮴의 생체 내 해독 기전의 하나로 합성되는 cadmium-metallothionein(이하 Cd-MT)는 간이나 신장 등에서 합성된다. 간에서 합성된 무독성의 Cd-MT는 그대로 머물러 있지 않고 혈액으로 방출되어 나오며, 혈액 중의 Cd-MT는 다른 기관이나 조직의 세포막을 투과하지 못하나 신장의 사구체 막을 선택적으로 투과하기 때문에 빠르게 신장으로 이행된 후 서서히 오줌으로 배출된다³²⁾.

대부분의 중금속은 수산화라디칼(hydroxyl radical, OH)이나 초과산화이온(superoxide, O₂⁻) 및 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)와 같은 ROS를 생성하며, 이에 따라 과산화지방질(lipid peroxide)이 증가하고 DNA가 손상되어 다양한 세포와 조직 등에서 세포사멸 및 독성을 초래하게 된다.

카드뮴에 의해 생성되는 ROS도 세포 내 산화적 스트레스를 유발하여 세포사멸을 일으킨다³³⁾.

인체는 카드뮴 중독이 일으키는 산화적 스트레스에 대해 생체 방어기구를 갖추고 있으며, 이는 효소성 항산화 방어 기전과 비효소성 항산화 방어기전의 두 가지 형태로 구분된다³⁴⁾. 이 중 효소성 방어기전은 SOD, catalase, Gpx 등이 있는데, SOD는 초과산화이온을 과산화수소로 전환시키고, catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하여 제거하는 역할을 하며, Gpx는 glutathione과 과산화수소를 반응시켜 항산화 작용을 한다.

비효소성 방어기전은 전사인자 Nrf-2와 센서인자 Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1)로 구성된 것으로, Nrf-2는 세포 내 산화적 스트레스 환경에서 항산화 작용을 전사하는 핵 인자이며, 스트레스에 응답하여 안정화하고 활성화되는데, 이 Nrf-2의 활성화가 hemo catabolism의 속도 결정 단계에 작용하는 효소인 HO-1을 활성화하여 세포 보호 효과를 나타낸다³⁵⁾.

산화적 스트레스에 의한 세포 내 반응은 cytokine, 성장 인자나 호르몬의 작용과 분비의 조절, 이온 수송의 영향, 전사의 변화, 세포사멸로 나누어지며 다양한 유전자의 세포 내 신호전달 체계(signal transduction pathway)에 영향을 주는데, 분자수준에서의 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 그 중 가장 많이 연구되고 있는 신호전달 체계는 MAPK 체계와 NF- κ B 신호전달 체계를 들 수 있다³⁶⁾. 그 중 NF- κ B 신호전달체계의 활성화는 염증 반응에 관여하는 COX-2와 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 nitric oxide 등을 생성하는 iNOS의 발현과 관련되어 있어, NF- κ B의 활성화가 증가되면 COX-2와 iNOS가 활성화되어 염증반응을 증가시킴으로써 세포사멸을 유발한다³⁷⁾.

또 다른 세포사멸의 과정은 세포 성장을 방해하는 Bax의 구조적 변화로 인하여 미토콘드리아가 손상을 받아 막 전압이 감소되며, 이후 세포사멸을 매개하는 다양한 단백질들이 미토콘드리아로부터 세포질로 유출되는 과정을 촉진하게 된다. 그 중 대표적인 것이 cytochrome c인데, 이는 다양한 하위 caspase를 활성화시켜 궁극적으로 세포사멸을 매개하게 된다³⁸⁾.

중금속 중독에 사용되는 킬레이션 치료는 유기체가 금속 이온과 결합하여 이를 제거하는 것으로 간과 신장에서 카드뮴의 잔류량을 최소화시키는 효과가 있으나 장기 손상의 우려가 있다³⁹⁾. 그러므로 마약과 알코올 중독의 침치료에 대한 연구¹⁹⁻²¹⁾를 초석으로 삼아 각종 약재와 식품들을 이용한 해독 치료¹¹⁻¹⁶⁾, 또는 약침을 사용하여 간과 신장 손상을 억제하는 치료^{17,18)}보다 부작용이 적고 안전하며, 조작이 간편한 침치료에 대한 연구가 필요하다.

카드뮴의 표적 장기인 간의 보호를 위해 고려한 자침 혈위는 태충혈과 신수혈이다. 태충혈은 足厥陰肝經의 原穴 및 兪穴로서 생식기, 소화기, 신경계, 혈관계 질환 등을 치료하며⁴⁰⁾, 특히, 간 손상을 억제하고 조직 세포의 사멸을 보호하며 신경 손상도 보호한다고 알려져 있다^{41,42)}. 신수혈은 足少陰腎經의 背兪穴로서 생식기, 비뇨기, 호흡기, 순환기, 신경계, 부인과, 대사 질환 등을 치료하며⁴⁰⁾, 특히, 신장 기능을 촉진시키고 모르핀을 해독하는 연구에 사용되었으므로^{26,27)}, 신장의 배설기능이 향상되면 水生木의 상생원리에 의해 간의 중독 증상도 완화시킬 수 있을 것이라는 가정 아래 본 연구를 진행하였다.

기존의 카드뮴 연구에서는 공통적으로 대조군이 정상군에 비해 체중 증가량의 감소를 보이는데⁴³⁾, 본 연구에서도 대조군이 정상군에 비해 체중 증가량이 낮았으나 침 자극으로 인한 변화는 없었다. 간의 무게는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였는데, 이는 카드뮴 중독에 의해 조직이 손상되어 나타나는 것이지만, 체중이 감소함에 따라 기관의 무게도 감소할 수 있으므로, 기관의 무게를 체중으로 나눈 값인 간의 index값도 함께 비교하였다. 신수혈군은 간의 무게 및 index값이 대조군에 비해 모두 유의하게 증가되었으며, 태충혈군은 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다.

각 기관의 기능 검사에서 신수혈군은 대조군에 비해 ALT 수치를 유의하게 감소시켜 간 기능의 회복에 효과가 있다고 사료된다. 카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대해 태충혈과 신수혈이 미치는 영향을 확인하기 위하여 혈청과 간 조직에서의 ROS를 측정하였는데, 혈청에서 대조군이 정상군에 비해 ROS 생성량이 유의하게 증가하여 카드뮴 중독으로 인한 산화적 스트레스가 있음을 확인하였다. 또한 태충혈군과 신수혈군 모두에서 혈청의 ROS 생성량이 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 특히 신수혈군은 간 조직의 ROS 생성량도 대조군에 비해 유의하게 감소하여 태충혈과 신수혈이 산화적 스트레스를 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

항산화 효소 및 유전자 관련 단백질에 대하여 태충혈군은 대조군에 비해 catalase 발현량만 유의하게 증가하였고, 신수혈군은 대조군에 비해 Gpx와 HO-1 발현량이 유의하게 증가하여 간 조직 ROS를 감소시킨 것으로 보인다(Fig. 1, 2). 염증 관련 단백질에 대하여 태충혈군은 대조군에 비해 유의한 변화가 없었으나, 신수혈군은 대조군에 비해 NF- κ B, COX-2 및 iNOS 발현량이 유의하게 감소하여 항염증 효과를 나타내었다(Fig. 3). 세포사멸 관련 단백질에 대하여 태충혈군과 신수혈군은 대조군에 비해 Bax와 cytochrome c 발현량이 감소하는 경향성을 나타냈으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

간 조직에서 태충혈과 신수혈이 산화적 스트레스를 억제시킬 수 있는 항산화 효소 및 유전자 관련 단백질, 염증 관련

단백질, 세포사멸 관련 단백질 등의 발현에 미치는 영향을 정리하면 다음과 같다(Fig. 5).

카드뮴으로 유발된 간의 산화적 스트레스에 대하여 신수혈은 태충혈에 비해 항산화, 항염증, 세포사멸 보호 등 모든 기전에서 뛰어난 효과를 나타냈으며, 이는 신수혈이 간과 신장으로 연계되는 인체의 해독 시스템에서 신장의 역할을 증대시킴으로써 간의 기능을 도와준 것으로 사료된다. 태충혈과 신수혈의 침 자극은 부작용이 없는 안전한 치료로서 카드뮴으로 손상된 간을 보호하는데 효과가 있으며, 중금속 해독의 약물 치료와 병행하여 시너지 효과를 기대할 수 있을 것이다.

다만, 혈액산소수준의존(blood-oxygen-level dependent, BOLD) 뇌기능자기공명영상(functional magnetic resonance imaging, fMRI)을 이용한 국소 마취 전후의 침 자극으로 유발된 뇌 반응 연구⁴⁴⁾에서 마취 전 침 자극은 통증 전달 경로 및 의미, 인식, 실행 기능의 영역 등 통증과 관련된 경로를 활성화시켰고, 마취 후 침 자극은 감각, 운동, 의미, 공간 지각 기능 등 통증과 무관한 경로를 활성화시켰다. 이는 마취 전후의 침 자극이 주로 통증과 관련된 신경기능 경로에서 차이를 보이는 것으로, 마취의 유무는 침 자극 시 통증의 유무에 영향을 끼칠 뿐 침 자극으로 인한 기능적 효과와는 무관한 것으로 볼 수 있다. 따라서 각 군에서의 마취 시행 유무는 본 연구의 결과에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되나, 뇌 영역에서의 경로 이외에 장기 영역에서의 침 자극 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대한 태충혈과 신수혈 침 자극의 간 보호 효과에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체중은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나 태충혈군과 신수혈군은 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다. 간의 무게는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였고, 신수혈군만 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 간 무게를 체중으로 나눈 index값에서 대조군의 간 index값은 정상군에 비해 유의하게 감소하였고, 신수혈군은 대조군에 비해 간 index값이 유의하게 증가하였다.
2. ALT는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나 AST는 모든 군에서 유의한 변화가 없었다. 대조군에 비해 신수혈군은 ALT가 유의하게 증가하였다.

3. 대조군 혈청의 ROS는 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, 간 조직의 ROS는 정상군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다. 대조군에 비해 태충혈군은 혈청의 ROS가 유의하게 감소하였고, 신수혈군은 혈청과 간 조직의 ROS가 모두 유의하게 감소하였다.
4. 간 조직에서 태충혈군은 대조군에 비해 catalase 발현량만 유의하게 증가하였고, NF- κ B, COX-2, iNOS, Bax 및 cytochrome c 발현량은 유의한 변화가 없었다. 신수혈군은 대조군에 비해 Gpx와 HO-1 발현량이 유의하게 증가하여 항산화 효과를 나타내었고, NF- κ B, COX-2 및 iNOS 발현량이 유의하게 감소하여 항염증 효과를 나타내었으나, Bax와 cytochrome c 발현량은 감소하는 경향은 있었으나 유의성이 없어 세포 사멸에 대한 유의한 보호 효과는 나타나지 않았다.
5. 카드뮴으로 유발된 간의 산화적 스트레스에 대한 태충혈 침 자극은 유의한 항산화 효과를 나타내었고, 신수혈 침 자극은 유의한 항산화, 항염증 효과를 나타내었으나 세포사멸에 대한 보호 효과는 유의성이 없었으며, 전반적으로 신수혈이 태충혈보다 간의 보호 작용에 더 유의한 효과를 나타내었다.

VI. References

1. Settle DM, Patterson CC. Lead in albocore: guide to lead pollution in Americans. Science, 1980 ; 207(4436) : 1167-76.
2. Underwood EJ. Trace elements in human and animal nutrition. New York : Academic Press, 2012 : 319.
3. Kostial K, Rabar I, Blanusa M et al. The effect of iron additive to milk on cadmium, mercury and manganese in rat. Environ Res. 1980 ; 22(1) : 40-5.
4. Dencker L. Possible mechanisms of cadmium fetotoxicity in golden hamsters and mice: uptake by the embryo, placenta and ovary. J Reprod Fertil. 1975 ; 44(3) : 461-71.
5. Axeleson B, Dahlgren SE, Piscator M. Renal lesions in the rabbit after long-term exposure to cadmium. Arch Environ Health, 1968 ; 17(1) : 24-8.
6. Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. Toxicology and Applied Pharmacology. 1982 ;

- 65(2) : 302–13.
7. Kanisawa M, Schroeder HA, Life term studies on effect of trace elements on spontaneous tumors in mice and rats, *Cancer Res.* 1969 ; 29(4) : 892–5.
 8. Degraeve N, Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium, *Mutat Res.* 1981 ; 86(1) : 115–35.
 9. Chao JI, Yang JL, Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest, *Chem Res Toxicol.* 2001 ; 14(9) : 1193–202.
 10. Fergusson JE, The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects, Oxford : Pergamon Press, 1990 : 359.
 11. Baek SH, Kim HJ, Kim YO et al, Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants, Part 6, *Korean J Toxicol.* 1996 ; 12(1) : 35–9.
 12. Ji JO, Kim JP, Lee KN et al, Antitoxic effects of semen mungo water extracts against cadmium toxicity in organs of rats, *J Preventive Med.* 1998 ; 2(1) : 175–92.
 13. Kim HK, Jeung JY, Park SJ et al, Effects of extract of radix *achyranthis bidentatae* on cadmium inhalation toxicity in rats, *Korean J Physiology & Pathology.* 2004 ; 18(2) : 474–83.
 14. Kim YH, Park EK, Park KJ, Effect of Korea ginseng root on detoxification of heavy metal, mercury by *fusarium oxysporum*, *Korean J Ginseng Sci.* 1992 ; 16(1) : 24–30.
 15. Choi KD, Lee KN, Bibliographic study on the therapy of gastric cancer by intergrated oriental and western medicine, *J Wonkwang Oriental Med.* 1997 ; 7(1) : 147–54.
 16. Han SH, Shin MK, Kim YW et al, Effects of methanol extracts of black soybean on enzymes activities of serum in rats Fed Pb and Cd solution, *Korean J Soc Food Sci Nutr.* 2000 ; 29(2) : 193–7.
 17. Cho MS, Jang KJ, Song CH et al, The effect of carthami semen herb-acupuncture on the HgCl₂-induced acute renal failure in rabbit, *The Acupuncture.* 1998 ; 15(1) : 503–13.
 18. Park JY, Youn HM, Jang KJ et al, The effect of carthamisemen aquacupuncture on HgCl₂-induced liver cell injury, *The Acupuncture.* 2002 ; 19(5) : 209–18.
 19. Lee JH, Kim HY, Jang EY et al, Effect of acupuncture on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-experienced rats: the mediation of GABA receptors, *Neurosci Lett.* 2011 ; 504(3) : 301–5.
 20. Yoon SS, Kim H, Choi KH et al, Acupuncture suppresses morphine self-administration through the GABA receptors, *Brain Res Bull.* 2010 ; 81(6) : 625–30.
 21. Lee BB, Shim IS, Yang CH et al, Effect of acupuncture(HT₇) on acute cocaine-induced locomotor activity and Fos-like immunoreactivity in the brain of the rats, *Korean J Meridian & Acupoint.* 2002 ; 19(1) : 25–33.
 22. Kim JG, Choi YT, The literature study of acupuncture and moxibustion used by detoxication, *Korea Institute of Science and Technology Information.* 1982 ; 3(2) : 42–9.
 23. Lee BH, Lim SC, Kim JS et al, A short review on the acupoint used in the studies about morphine addiction, *The Acupuncture.* 2012 ; 29(2) : 179–87.
 24. Youn DH, Na CS, Hepatoprotective effects of electro-acupuncture at *Taechung*(LR₃) and *Yangji*(TE₄) on experimental liver injury in rats, *Korean J Meridian & Acupoint.* 2006 ; 23(2) : 167–76.
 25. Park SK, Lee JM, Effects of acupuncture, moxibustion and aqua-acupuncture of *Chong-ganhaeultang* water Extract at BL₁₈, LR₃, LR₁₄ on the liver damage in rats, *The Acupuncture.* 1996 ; 13(1) : 30–44.
 26. Liu S, Zhou W, Liu H et al, Electroacupuncture attenuates morphine withdrawal signs and c-Fos expression in the central nucleus of the amygdala in freely moving rats, *Brain Res.* 2005 ; 1044(2) : 155–63.
 27. Park IK, Lim JK, Effects of moxibustion at the meridian points *Sinsu*(BL₂₃) and *Wisu*(BL₂₁) on the renal function in spontaneously hypertensive rats, *The Acupuncture.* 1995 ; 11(2) : 1–25.
 28. Friberg L, Piscater M, Nordberg GF et al,

- Cadmium in the environment, 2nd ed. Ohio : CRC Press Cleveland, 1974 : 174.
29. Azzouzi BE, Tsangaris GT, Pellegrini O et al. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology*. 1994 ; 88(1-3) : 127-39.
 30. Habeebu SSM, Liu J, Klaassen CD. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 ; 149(2) : 203-9.
 31. Friberg L, Norberg GF, Vouk VB. Handbook of the toxicology of metals. Vol II: specific metals, 2nd ed. Amsterdam : Elsevier, 1986 : 638-63.
 32. Foulkes EC. Biological roles of metallothionein. New York : Elsevier, 1982 : 215.
 33. Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M et al. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species(ROS) production in cell cultures. *Toxicology*. 2000 ; 145(2-3) : 159-71.
 34. Sen CK. Oxidative and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*. 1995 ; 79(3) : 675-86.
 35. Turpaev KT. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry*. 2013 ; 78(2) : 111-26.
 36. Kim TS, Kamg TS, Kang HI et al. Study on the estrogen receptor mediated toxicity of cadmium and protective effects of antioxidant. *Environmental Mutagens & Carcinogens*. 2006 ; 26(1) : 12-9.
 37. Straus DS, Pascual G, Li M et al. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 ; 97(9) : 4844-9.
 38. Kondoh M, Araragi S, Sato K, Higashimoto M, Takiguchi M, Sato M. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology*. 2002 ; 170(1-2) : 111-117.
 39. Lee SH, Lee KT, Lee JH et al. Effects of chelators on liver cadmium contents in chronic cadmium intoxication rats. *Korean J Hepatol*. 1998 ; 4(1) : 59-68.
 40. The part of Acupuncture & Moxibusion in the National College of Oriental Medicine. *Acupuncture & Moxibusion*. Seoul : Jipmundang, 2005 : 489, 667.
 41. Jeon HJ, Lee BH, Lee KM et al. A synergy effect of combination of acupoints in cocaine take. *The Acupuncture*. 2010 ; 27(2) : 31-41.
 42. Lee HI, Kim ML, Kim SY et al. Acupuncture attenuates cocaine-induced dopamine release in the nucleus accumbens and voluntary cocaine intake in rats. *The Acupuncture*. 2003 ; 20(4) : 170-9.
 43. Juhlshamn K, Utne F, Brackan OR. Interactions of cadmium with copper, zinc and iron in different organs and tissues of the rat. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1977 ; 41(5) : 515-24.
 44. Kim NH. Neuronal effects of acupuncture at BL₆₀ before and after local anesthesia using blood oxygen level Dependent(BOLD) fMRI [dissertation]. Seoul : Kyung Hee Univ. 2012. English.