대한침구의학회지 제32권 제1호 (2015년 3월) : 1-11
The Acupuncture Vol. 32 No. 1 March 2015 : 1-11
pISSN 1229-1137 eISSN 2287-7797
http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015001

Original Article

카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대한 침 자극의 신장 보호 효과※

신화영, 이현종, 김재수*

대구한의대학교 부속대구한방병원 침구의학과

[Abstract]

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

Hwa Young Shin, Hyun Jong Lee and Jae Soo Kim*

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Daegu Oriental Hospital of Daegu Haany University

Objectives : This study was performed to inquire into the protective effects of acupuncture on oxidative stress caused by cadmium accumulation in the kidney.

Methods : Sprague-Dawley male(150±30 g) rats were stabilized for 1 week and divided into 5 groups: normal, control, LR_3 acupuncture, BL_{23} acupuncture and sham acupuncture. For three days experimental groups received oral doses of cadmium 2 ㎎/㎏ twice a day. Acupuncture was applied bilaterally at each point 10 times for two weeks. The depth of stimulation was 1 ㎜ at right angles and torsion of acupuncture was produced 2 times per second for 1 minute. The kidneys were extracted and weighed after two weeks, and renal function was confirmed through blood urea nitrogen(BUN). We measured reactive oxygen species of the serum 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.

Results : The LR_3 acupuncture group and BL_{23} acupuncture group experienced significantly increased kidney weight, and decreased BUN compared to control group. In terms of oxidative stress, the LR_3 acupuncture group and BL_{23} acupuncture group experienced significantly reduced reactive oxygen species compared to the control group.

Conclusions : The LR_3 acupuncture group and BL_{23} acupuncture group experienced showed the effects of antioxidant, anti-inflammatory and apoptosis protection. The BL_{23} acupuncture group was more effective than LR_3 acupuncture group.

Key words :
Acupuncture;
Cadmium;
Oxidative stress;
LR_3;
BL_{23}

Received : 2014. 12.03.
Revised : 2015. 02.27.
Accepted : 2015. 03.02.
On-line : 2015. 03.20.

※ This study was supported by Dongil Munhwa Student Aid Foundation in 2013.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Daegu Oriental Hospital of Daegu Haany University, 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

급속한 산업발달과 경제성장은 필연적으로 환경오염이라는 부작용을 초래하였으며, 우리나라는 1960년대 이후 추진한 공업화 정책과 1970년대 이후 추진한 제철, 석유화학 등 중화학공업의 영향으로 금속을 비롯한 오염물질의 배출이 급격히 증가하였다[1]. 이 중 카드뮴(cadmium, 이하 Cd)은 다른 금속을 도금하는데 사용되며, 플라스틱 제조에서 안정제로 쓰이고 안료로도 사용된다. 또한 니켈-카드뮴 전지의 원료, 저온 합금제, 그리고 은땜에서 사용되는 등 다양한 곳에 활용됨과 동시에 다양한 분야에서 그 중독에 노출되어 있다[2].

카드뮴은 주로 호흡기나 위장관 계통을 통하여 체내에 들어오며 저분자 단백으로서 금속결합 단백질인 metallothionein에 결합되어 간과 신장에 축적된다. 카드뮴은 주로 소변을 통해 배설되고 위장관이나 타액, 머리카락, 손발톱으로 일부 배설되지만[2], 체내에서 10~30년의 긴 생물학적 반감기를 가지고 있어서 먹이 연쇄에 의하여 계속 축적되고 이에 따라 그 독성도 누적된다[3].

카드뮴의 급성 중독 증상으로는 위장관 계통 증상과 화학적 천식이 있으며, 만성 중독 증상으로는 신기능장애, 신결석, 폐기종, 폐쇄성 폐질환, 미만성 간질성 섬유화, 골인화증, 골조송증, 특발성 골절, 후각결여, 비점막의 궤양, 가벼운 빈혈, 간 기능장해, 전립선암 등이 있다[2]. 또한, 산화·환원 비활성 금속인 카드뮴은 세포 구조 손상에 중요한 매개체가 될 reactive oxygen species(ROS) 생산을 유도하여 산화적 스트레스를 일으키고[4,5], 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하여 결국 세포사멸에 이르게 한다[6].

서양의학에서 중금속 해독약으로 British Anti- Lewisite(BAL, 2,3-dimercaptopropanol, dimecaprol), Versene(ethylene diamine tetraacetate: EDTA), Penicillamine(cuprimine, β-β'-dimethylcystine) 등이 사용되나 이 약물들은 간이나 신장에 손상을 끼칠 수 있어 혈액검사가 동반되어야 하며, 신장을 통해 중금속을 제거하기 때문에 신장 손상을 일으킬 수 있다[7,8].

그 밖에 중금속 해독을 위해 다양한 약재와 식품들에 대한 연구가 많이 진행되어 있고[9-12], 약침을 사용하여 중금속으로 유발된 신장의 손상을 억제하는 연구도 있으나[13,14], 현재까지 경혈의 침 자극에 대한 해독 연구방법은 전무한 실정이다.

현재 한의학에서는 코카인, 모르핀 및 알코올 중독에 대한 침 치료 연구가 활발히 진행되고 있어 중금속 해독에 침 자극의 가능성을 제시할 수 있고[15-17], 여러 중독을 해독하는 경혈에 관한 문헌 연구도 이루어져 있다[18,19]. 그 중 태충(LR_3)은 간 손상을 보호하고 세포사멸을 방지하며 신경손상을 회복시키는 작용을 하고[20,21], 신수(BL_{23})는 신장의 기능을 자극하고 모르핀을 해독시키는 작용을 한다[22,23].

이에 본 연구는 카드뮴의 주요한 표적장기이며, 주로 만성 폭로 시 다량으로 축적되는 신장에 경혈의 침 자극이 미치는 항산화, 항염증, 세포사멸 보호 효과에 대해 약간의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 체중 150±30 g의 Sprague-Dawley계 4주령의 수컷 흰 쥐(효창 사이언스, 대구, 대한민국)를 사용하였다. 실험실은 온도 20 ℃, 습도 55 %로 유지하고, cage당 4마리씩 넣어 1주일간 실험용 펠레트 사료(신촌사료주식회사, 서울, 대한민국)의 수분을 공급하여 안정화시킨 후 사용하였다. 본 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리규정을 준수하여 시행하였다(DHU2013-064).

2) 침

침은 스테인리스 호침(직경 0.18 ㎜ 길이 3.0 ㎜, 동방침구사, 한국)을 사용하였다.

3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare(Little. Chalfont, UK)에서 구입하였고, NADPH oxidase(Nox)-4는 LifeSpan BioSciences(Seattle, WA, USA)로부터 구입하였으며, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Molecular probe, Inc(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. β-actin, superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(Gpx), $p22^{phox(phagocyteoxidase)}$, 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, Cytochrome c 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Blood urea nitrogen(BUN) assay kit은 Shinyang

 http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015001

Chemical(Busan, Korea)의 제품을 사용하였고, 그 외의 모든 시약은 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 군 분류

1주일간 안정화 시킨 후 카드뮴을 투여하지 않은 정상군과 카드뮴을 투여한 실험군으로 나누고, 카드뮴 투여 실험군은 다시 아무런 침 자극을 하지 않은 대조군, 태충에 침 자극한 태충군, 신수에 침 자극한 신수군 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 경혈점을 찾아 펜으로 점을 찍고 양쪽으로 자극하며, 꼬리침군은 혈 자리 이외의 침 자극으로 발생할 해독 효능 및 기타 영향을 배제하기 위하여 흰 쥐 꼬리 부분의 sham 경혈을 자극하였다. 침 자극은 주 5회 2주간 실시하는데, 자침의 깊이는 1 ㎜ 직각으로 1초당 2번, 1분 동안 염전하였다. 활동할 수 있는 흰 쥐에 침 자극을 하면 스트레스로 침의 효과에 영향을 끼칠 수 있으므로 마취 후 시행하였다.

3) 카드뮴 축적 흰 쥐 모델

카드뮴은 체중에 따라 2 ㎎/㎏로 1일 2회 오전・오후 연속 3일간 경구 투여하였다. 2주간 침 자극 후 최종일에는 12시간동안 절식 후 에테르로 마취시켜 개복하고, 복부대정맥에 관류하여 채혈투여 종료 후 마취상태에서 심장천자를 통해 흰 쥐의 모든 혈액을 채취하였고, 신장은 빠르게 적출하여 액체 질소에 냉동한 뒤 -80 ℃에서 보관하였다.

4) 체중 및 장기 무게 측정

실험 전 실험동물에게 물은 자유롭게 공급하면서 약 16시간 동안 절식 후 체중을 측정하였으며, 체중의 증가(g)는 침 자극 0일의 체중과 침 자극 최종일의 차이로 나타내었다. 신장의 중량은 침 자극 최종일에 실험동물에서 적출하여 측정하였으며, 신장의 무게를 체중으로 나눈 신장 index 값은 침 자극 최종일의 체중에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

5) 혈청 분석

복부대정맥에서 채혈한 혈액을 5417R microcentrifuge (Eppedorf Co, Hamburg, German)로 원심분리한 후 혈청을 얻었으며, 혈청 BUN assay kit는 제작사(Shinyang Chemical Co)의 프로토콜에 따라 측정하였다. 혈청 샘플 5 ㎕에 시약 200 ㎕를 첨가한 후 37 ℃에서 5분간 incubate하고, multi micro-plate reader로 infinite M200 PRO (TECAN Group Ltd, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 ROS의 생성량 측정은 혈청에 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 0분부터 매 10분씩 486 ㎚ emission wavelength와 530 ㎚ excitation wavelength를 이용하여 30분간 측정하고 산출값을 계산하였다.

6) 신장의 ROS 생성량 측정

신장조직을 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 분쇄한 후 25 mM DCFH-DA를 혼합하고, 0분부터 매 10분씩 486 ㎚ emission wavelength와 530 ㎚ excitation wavelength로 30분간 측정한 산출 값을 계산하였다.

7) Cytosol extract

신장조직을 100 mM Tris-HCl(pH 7.4), 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF, 2 M Na_3VO_4, 1mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 μM pepstatin and 80 ㎎/L trypsin inhibitor가 포함된 homogenate buffer[10 mM HEPES(pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 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. 또한, 미토콘드리아의 침전물을 얻기 위해 4 ℃에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다.

8) Nuclear extract

신장조직을 500 ㎕ hypotonic buffer A[10 mM HEPES(pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF]에 넣어 차가운 상태에서 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄하고, 10 % NP-40 용액 62.5 ㎕를 첨가하여 12,000 rpm으로 30초간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 pelleted nuclei를 10 % NP-40가 더해진 buffer A에 한번 헹구어 12,000 rpm으로 원심분리하고 100 ㎕의 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 첨가하여 재부

유 시킨 후 4 ℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 핵단백질을 포함한 상층액은 수집되어 -80 ℃에서 냉동 보관하였다.

9) Western blot analysis

SOD, catalase, Gpx, Nrf-2, NF-κB 단백질 발현을 측정하기 위해 nuclear extract 10 ㎍의 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide gel로 전기영동한 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 ℃에서 overnight 시킨 다음 TBS-T로 10분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(TBS-T로 1 : 5,000로 희석해서 사용)로 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다.

또한, SOD, catalase, Gpx, HO-1, COX-2, iNOS, Bax, cytochrome c 및 β-actin 단백질 발현을 측정하기 위해 cytosol extract 10 ㎍의 단백질을 8~15 % SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동한 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 ℃에서 overnight 시킨 다음 TBS-T로 10분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(TBS-T로 1:5,000로 희석해서 사용)로 상온에서 1시간 30분간 반응시킨 후, TBS-T로 10분마다 5회 세척하였다. 마지막으로 enhanced chemilumine-scence (ECL) western blotting detection reagents(GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA)에 노출 후 Davinch-Chemi CAS-400SM western imaging system (Davinch-K, Seoul, Korea)으로 단백질의 발현 정도를 분석하였다.

10) 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차(mean±SD)로 표기하였으며, SPSS 18.0 for Windows program으로 one-way analysis of variance(ANOVA)로 유의수준 p-value<0.05에서 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체중과 신장 무게에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 체중이 유의하게 감소하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의한 체중 변화는 없었다.

신장 무게는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나, 신수군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 체중 100 g당 무게로 환산한 후의 신장 무게(신장 index)는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

꼬리침군은 대조군에 비해 체중, 신장 무게, 신장 index 값 모두에서 유의한 변화는 없었다(Table 1).

2. 신장 기능에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 BUN 수치가 유의하게 증가하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 꼬리침군은 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다(Table 2).

Table 1. Body Weight Gain and Kidney Weight

Item	Normal	Cadmium 2 ㎎/㎏			
		Control	LR_3	BL_{23}	Sham
Body weight gain (g/3 weeks)	89.8±4.2^c	81±7.0	74.6±12.9	77.6±9.6	79.8±10.5
Tissue weight (g)					
Kidney	2.52±0.07^c	2.01±.0.03	2.05±0.05	2.41±0.10^b	1.96±0.08
% of tissue weight (g/100 g B.W.)					
Kidney	0.99±0.03^c	0.81±0.01	0.85±0.01^a	1.16±0.07^b	0.81±0.03

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

 http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015001

Table 2. Parameters of Renal Function

Item	Normal	Cadmium 2 ㎎/㎏			
		Control	LR_3	BL_{23}	Sham
BUN(mg/dl)	13.6±1.0[b]	23.6±1.4	15.3±1.7[a]	14.4±1.4[b]	20.6±0.5

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

Table 3. ROS Generation in the Serum and Kidney

Item	Normal	Cadmium 2 ㎎/㎏			
		Control	LR_3	BL_{23}	Sham
Serum ROS(flu/min/㎖)	61±3[b]	145±17	62±5[b]	34±2[c]	145±21
Renal ROS(flu/min/㎎ protein)	214±29[c]	485±35	176±17[c]	169±18[c]	466±19

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

3. 산화적 스트레스 억제 효과

혈청과 신장 조직의 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 꼬리침군은 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다(Table 3).

4. 신장 조직에서 항산화 효소 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 SOD와 catalase 발현량이 유의하게 감소하였고, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 SOD, catalase 및 Gpx 발현량이 유의하게 증가하였다. 꼬리침군은 대조군에 비해 SOD, catalase 및 Gpx 발현량에 유의한 변화는 없었다(Fig. 1).

5. 신장 조직에서 항산화 유전자 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 Nrf-2와 HO-1 발현량이 유의하게 감소하였으나, 신수혈군은 대조군에 비해 Nrf-2와 HO-1 발현량이 유의하게 증가하였다. 태충군은 대조군에 비해 Nrf-2와 HO-1 발현량이 증가하는 경향성을 나타냈으나 유의성은 없었고, 꼬리침군은 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다(Fig. 2).

6. 신장 조직에서 염증 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 NF-κB, COX-2 및 iNOS 발현량이 유의하게 증가하였으나, 태충군은 대조군에 비해 NF-κB와 COX-2 발현량이 유의하게 감소하였고, 신수군

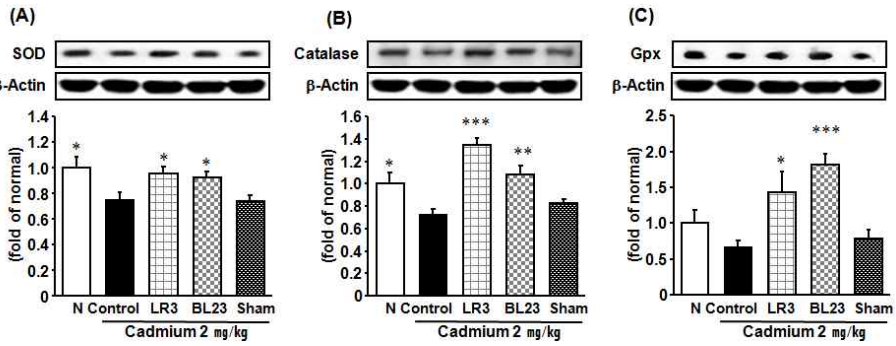

Fig. 1. Renal antioxidant enzyme-related protein expressions
(A) superoxide dismutase(SOD). (B) Catalase. (C) glutathione peroxidase(Gpx).
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

은 대조군에 비해 NF-κB, COX-2 및 iNOS 발현량이 유의하게 감소하였다. 꼬리침군은 대조군에 비해 NF-κB, COX-2 및 iNOS 발현량이 감소하는 경향이었으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

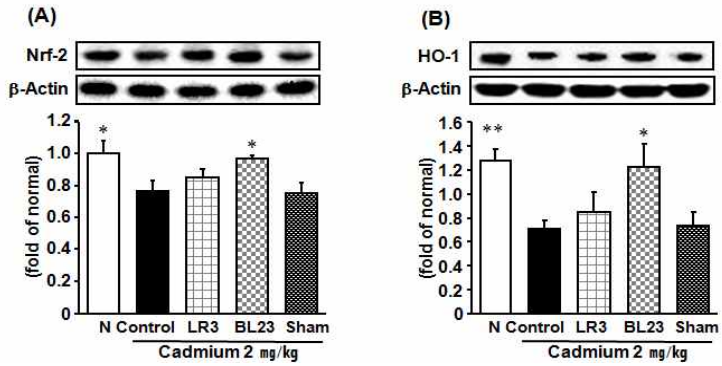

Fig. 2. Renal antioxidant gene-related protein expressions
(A) nuclear factor erythroid derived 2-related factor 2(Nrf-2).
(B) heme oxygenase-1(HO-1).
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

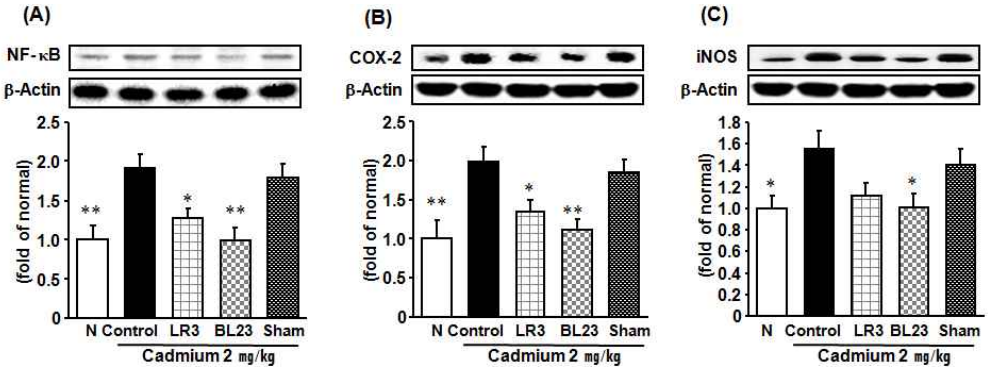

Fig. 3. Renal inflammation-related protein expressions
(A) nuclear factor-κB(NF-κB). (B) cyclooxygenase-2(COX-2). (C) inducible nitric oxide synthase(iNOS).
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

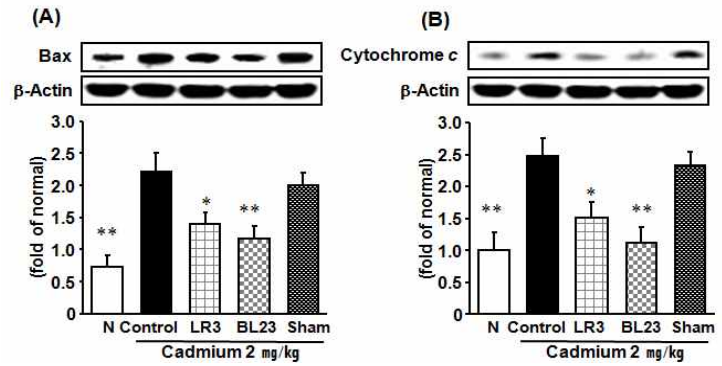

Fig. 4. Renal apoptosis-related protein expressions
(A) Bax. (B) cytochrome c.
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to cadmium-treated control group by ANOVA.

 http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015001

7. 신장 조직에서 세포사멸 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

대조군은 정상군에 비해 Bax와 cytochrome *c* 발현량이 유의하게 증가하였으나 태충군과 신수군은 대조군에 비해 Bax와 cytochrome *c* 발현량이 유의하게 감소하였고, 꼬리침군은 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다(Fig. 4).

Ⅳ. 고 찰

우리나라의 전국적인 카드뮴 섭취량에 대한 보고는 아직 없으나 1980~1990년 사이의 지역별 카드뮴 섭취 실태 조사에 의하면 1인당 평균 섭취량이 55~84 ㎎/day로 국제식량농업기구와 세계보건기구 합동식품첨가물전문가위원회에서 허용한 카드뮴에 대한 식이 섭취 잠정 기준인 57~71 ㎎/day를 넘고 있어 경계해야 할 단계에 진입했다고 볼 수 있다[24].

카드뮴의 대표적인 표적 장기는 간과 신장으로서 이들 기관에 나타나는 증상은 노출되는 양과 형태, 노출시간, 체내 침투 경로 등에 따라 다양한 독성을 나타내는데, 급성 중독 증상은 고농도의 카드뮴을 소화기를 통해 섭취하거나 호흡기를 통해 흡입함으로써 발생한다. 소화기를 통해서 발생하는 주요 증상은 설사, 급성 위장염, 두통, 근육통, 착색뇨, 그리고 간과 신장의 기능장애 등이며[25,26], 호흡기를 통해 발생하는 주요 증상은 인두부의 통증, 기침, 두통, 흉부 압박감, 점액성 가래, 호흡곤란, 신장의 부종, 폐수종 등이다[27]. 만성 중독 증상은 신장 장애, 만성 호흡기 질환, 폐기종, 골격계 장해 및 심혈관계 장해 등으로 나타나며[28], 이따이이따이 병은 카드뮴 중독의 대표적인 골대사 장애이다[29].

카드뮴의 장기 폭로 시 가장 많이 축적되는 신장에서의 기능적 장애는 근위세뇨관이며, 세뇨관형 요단백이 나타나는 것이다. 요단백의 증가는 특히 저분자의 β2-마이크로글로빈과 레티놀 결합 단백 같은 것이며, 총 단백은 정상범위인 경우도 있다. 사례에 따라 사구체 기능장애로서 고분자 단백의 배설이 저분자 단백의 증가와 함께 나타나거나 선행되는 경우도 있다. 요단백은 당뇨, 아미노산뇨, 산배설의 장해, 신장의 요 농축기능 저하, 칼슘과 인의 배설증가, 그리고 혈장 크레아티닌 증가와 함께 올 수 있으며, 칼슘뇨는 신 결석을 초래할 수 있다[2].

대부분의 중금속은 hydroxyl radical(OH)이나 superoxide (O_2^-) 및 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 같은 ROS를 생성하고 lipid peroxide을 증가시켜 DNA를 손상시킴으로써 다양한 세포와 조직 등에서 세포사멸 및 독성을 초래한다. 카드뮴에 의해 생성되는 ROS도 세포 내 산화적 스트레스를 유발하여 세포사멸 및 독성을 일으키게 된다[30].

인체는 카드뮴 중독이 일으키는 산화적 스트레스에 대해 생체 방어기전을 갖추고 있으며, 이는 효소성과 비효소성의 두 가지 형태로 구분된다[31,32]. 효소성 방어기전은 SOD, catalase, Gpx 등이 있는데, SOD는 초과산화이온을 과산화수소로 전환시키고, catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하며, Gpx는 glutathione과 과산화수소를 반응시켜 항산화 작용을 한다. 비효소성 방어기전은 전사인자 Nrf-2와 센서인자 Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap 1)으로 구성된 것으로, Nrf-2는 세포 내 산화적 스트레스 환경에서 항산화 작용을 전사하는 핵 인자로서 스트레스에 응답하여 안정화하고 활성화되는데, 이 Nrf-2의 활성화가 hemo catabolism의 속도 결정 단계에 작용하는 효소인 HO-1을 활성화하여 세포 보호 효과를 나타낸다[33].

산화적 스트레스에 의한 세포 내 반응은 다양한 유전자의 세포 내 신호전달 체계(signal transduction pathway)에 영향을 주는데, 그 중 NF-κB 신호전달체계의 활성은 염증 반응에 관여하는 COX-2와 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 nitric oxide 등을 생성하는 iNOS의 발현과 관련되어 있어, NF-κB의 활성이 증가하면 COX-2와 iNOS가 활성화되어 염증반응을 증가시킴으로써 세포사멸을 유발한다[34]. 또한, 세포 성장을 방해하는 Bax의 구조적인 변화로 인해 미토콘드리아가 손상을 받으면 막 전압이 감소하여 세포사멸을 매개하는 다양한 단백질이 미토콘드리아로부터 세포질로 유출되는데[35], 그 중 cytochrome *c*는 다양한 하위 caspase를 활성화시켜 궁극적으로 세포사멸을 일으킨다[36].

중금속 중독에 사용되는 킬레이션 치료는 유기체가 금속이온과 결합하여 이를 제거하는 것으로, 사용되는 해독약은 D-penicillamine(DPA), disodium calcium ethylene-diaminetetraacetate(EDTA), 1,2-diaminocyclohexane-tetraacetate(CDTA), sodium 2,3-diethyldithiocarba-mate(DDTC) 등이 있으며 간과 신장에서 카드뮴의 잔류량을 최소화시키는 효과가 있다[7]. 그러나 체내에 축적된 독성 중금속과 결합한 후 소변, 대변, 담즙 등으로 배출시키는 과정에서 신장을 손상하는 부작용이 있으므로[8], 코카인 및 모르핀과 알코올 중독의 침 치료에 대한 연구[15-17]를 바탕으로 각종 약재와 식품을 이용한 해독 치료[9-12], 또는 약침으로 신장 손상을 억제하는 치료[13-14] 등이 있으나, 보다 부작용이 적고 안전하며, 조작이 간편한 중금속 중독에 대한 침 치료 연구가 필요하다.

카드뮴에 장기간 노출 시 표적이 되는 신장 보호를 위해 고려한 자침 혈위는 태충과 신수인데, 카드뮴 축적의 주요

장기가 간과 신장이며, 두 장기는 오행상 木과 水에 속하는 상생관계에 있으므로 두 혈위를 선택하였다. 태충은 足厥陰肝經의 原穴 및 兪穴로서 생식기, 소화기, 신경계, 혈관계 질환 등을 치료하며[37], 간 손상을 억제하고 조직 세포의 사멸을 보호하며 신경 손상도 보호한다[20,21]. 신수는 足少陰腎經의 背兪穴로서 생식기, 비뇨기, 호흡기, 순환기, 신경계, 부인과, 대사 질환 등을 치료하며[37], 신장 기능을 촉진시키고 모르핀을 해독하는 연구에 사용되었다[22,23].

기존의 카드뮴 연구에서는 공통적으로 대조군이 정상군에 비해 체중 증가량의 감소를 보이는데[38,39], 본 연구에서는 대조군이 정상군에 비해 체중 증가량이 낮았으나 침 자극에 따른 유의한 변화는 없었다. 신장의 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 신장 index 값도 함께 비교하였다. 신수군은 대조군에 비해 신장의 무게 및 index 값이 모두 유의하게 증가되었으며, 태충군은 대조군에 비해 신장의 무게에 유의한 변화는 없었으나, 신장 index 값이 유의하게 증가되어 신장 조직의 손상을 회복시키는 데 영향을 끼친다고 생각된다(Table 1). 또한, 신장 기능 검사에서 태충군과 신수군 모두에서 카드뮴 중독으로 증가했던 BUN 수치가 대조군에 비해 유의하게 감소하였으므로 침 자극이 신장의 기능을 활성화시킨 것으로 보인다(Table 2.).

카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대해 태충과 신수가 미치는 영향을 확인하기 위하여 측정한 혈청과 신장 조직에서의 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하여 카드뮴 중독으로 인한 산화적 스트레스가 있음을 확인하였다. 또한, 태충군과 신수군 모두에서 혈청과 신장 조직의 ROS 생성량이 대조군에 비해 유의하게 감소하여 두 혈위가 카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스를 효과적으로 억제함을 알 수 있었다(Table 3).

신장 조직에서 태충과 신수가 산화적 스트레스를 억제시킬 항산화 효소 및 유전자 관련 단백질, 염증 관련 단백질, 세포사멸 관련 단백질 등의 발현에 미치는 영향을 정리하면 다음과 같다(Fig. 5.).

항산화 효소 및 유전자 관련 단백질에 대하여 태충군은 대조군에 비해 SOD, catalase 및 Gpx 발현량이 유의하게 증가하여 신장 조직 ROS를 유의하게 감소시켰으며, 신수군은 대조군에 비해 SOD, Gpx, catalase, Nrf-2, HO-1 등 모든 항산화 시스템을 유의하게 활성화시켜 신장조직 ROS를 유의하게 감소시켰다(Fig. 1, 2). 염증 관련 단백질에 대하여 태충군은 대조군에 비해 NF-κB와 COX-2 발현량이 유의하게 감소하여 항염증 효과를 나타내었고, 신수군은 대조군에 비해 NF-κB, COX-2 및 iNOS 발현량이 모두 유의하게 감소하여 항염증 효과를 나타내었다

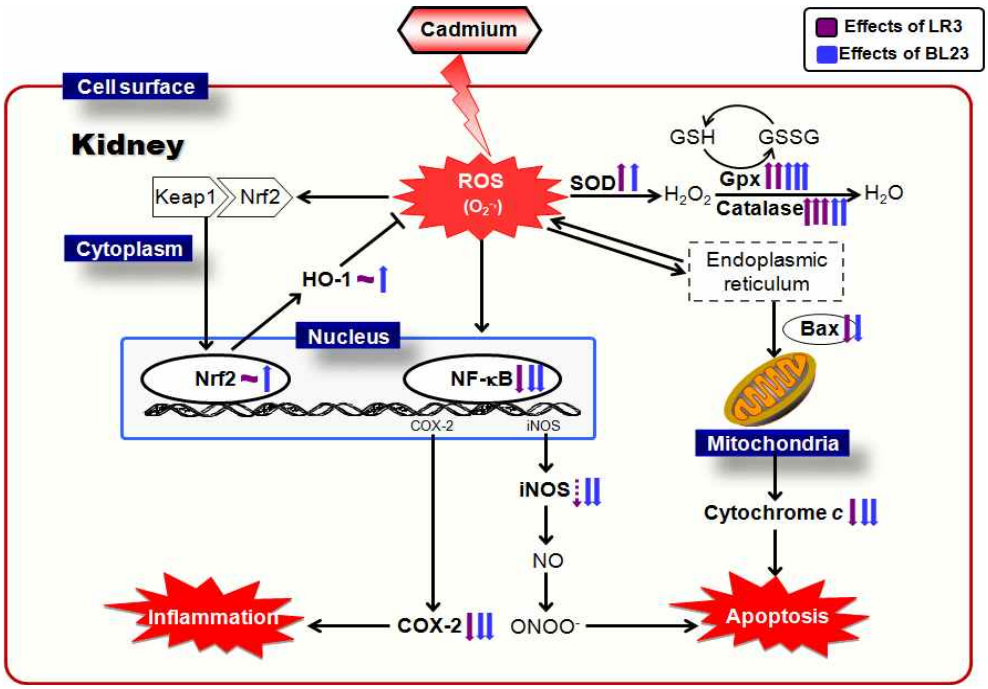

Fig. 5. Predictable mechanisms in renal tissues applied acupuncture

 http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015001

(Fig. 3). 세포사멸 관련 단백질에 대하여 태충혈군과 신수혈군은 대조군에 비해 Bax와 cytochrome *c* 발현량이 유의하게 감소하여 신장 조직 세포 보호에 효과가 있음을 보여주었다(Fig. 4).

카드뮴으로 유발된 신장의 산화적 스트레스에 대하여 태충과 신수는 유의한 신장 보호 효과를 나타냈으며, 특히 신수는 태충에 비해 항산화, 항염증, 세포사멸 보호 등 모든 기전에서 뛰어난 효능을 보였다. 따라서 태충과 신수에의 침 자극은 부작용이 없는 안전한 치료로서 카드뮴으로 손상된 신장을 보호하는 데 효과가 있으며, 중금속 해독의 약물치료와 병행하여 시너지 효과를 기대할 수 있을 것이다.

Ⅴ. 결 론

카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대한 태충과 신수에 침 자극을 통한 신장 보호 효과에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체중은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다. 신장의 무게는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나, 신수군만 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 신장 무게를 체중으로 나눈 index 값에서 대조군의 신장 index 값은 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.
2. 신장 기능 검사에서 BUN은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
3. 대조군의 혈청과 신장 조직의 ROS는 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나, 태충군과 신수군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
4. 신장 조직에서 태충군은 대조군에 비해 SOD, catalase 및 Gpx 발현량이 유의하게 증가하여 항산화 효과를 나타내었고, NF-κB와 COX-2 발현량이 유의하게 감소하여 항염증 효과를 나타냈으며, Bax와 cytochrome *c* 발현량이 유의하게 감소하여 세포 보호 효과도 나타내었다. 신수군은 대조군에 비해 SOD, catalase, Gpx, Nrf-2 및 HO-1 발현량이 유의하게 증가하여 항산화 효과를 나타내었고, NF-κB, COX-2 및 iNOS 발현량이 유의하게 감소하여 항염증 효과를 나타내었으며, Bax와 cytochrome *c* 발현량이 유의하게 감소하여 세포 사멸에 대한 보호 효과도 나타내었다.
5. 카드뮴으로 유발된 산화적 스트레스에 대한 태충과 신수에의 침 자극은 신장에 유의한 항산화, 항염증 그리고 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타냈는데, 특히 신수가 태충보다 더 유의한 효과를 나타내었다.

Ⅵ. References

1. Piscator M. Dietary exposure to cadmium and health effect: impact of environmental changes. Environ Health Perspect. 1985 ; 63 : 127-32.
2. Lee BK. Health effect due to heavy metal intoxication institute of industrial medicine. Journal Korea Association of Occupational Health Nurses. 2002 ; 9(2) : 10-6.
3. Underwood EJ. Trace elements in human and animail nutrition. New York : Academic Press. 2012 : 319.
4. Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mutat Res. 1981 ; 86(1) : 115-35.
5. 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.
6. Fergusson JE. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Oxford : Pergamon Press. 1990 : 359.
7. 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.
8. Craton EM. Kidney effects of ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA): a literature review. J Holistic Med. 1982 ; 2 : 227-34.
9. Han SH, Shin MK, Jung YH. Effects of the *Omija*(*Schizandra chinensis Baillon*) extract on the metabolism and renal cadmium contents in cadmium administered rats. Korean J Soc Food Sci Nutr. 2002 ; 31(6) : 1102-6.
10. Son YH, Kil IH, Lee CS et al. A study on detoxication effects of fols carthami against

cadmium poisoning in rats. J Traditional Korean Med. 1998 ; 8(2) : 86-94.
11. Mun YJ, Park KO, Lee JM et al. A study on antitoxic effects of *Sanquisorba officinalis L.* Against Cadmium Toxicity. J Environmental Science. 1995 ; 4 : 43-8.
12. Lim JA, Kim YH, Baek SH. Inhibitory effects of the methanolic fraction from pueraria radix on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation and cadmium-induced cytotoxicity(iii). Korean J Physiology & Pathology. 2006 ; 20(6) : 1556-60.
13. 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.
14. Kim HS, Song CH. Beneficial effect of scutellaria baicalensis georgi extract on mercury chloride-induced membrane transport dysfunction in rabbit renal cortical slices. Korean J Pharmacopuncture. 2001 ; 4(2) : 49-56.
15. Lee BH, Park SY, Lee JH et al. Duration pattern of the effect of acupuncture at HT_7 in morphine self-administration. The Acupuncture. 2010 ; 27(4) : 55-65.
16. 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.
17. Jung TK. The effects of acupuncture on *Zhubin* K_9 for reducing alcohol craving in patients with alcohol dependence. J Oriental Rehabilitation Medicine. 2004 ; 14(4) : 75-88.
18. 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.
19. Lee BH, Lim SC, Kim JS et al. A short review on the acupoints used in cocaine studies. The Acupuncture. 2013 ; 30(3) : 145-50.
20. Park JS, Youn DH, Na CS et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of acupuncture techniques of tonification or sedation at LR_3 on focal brain ischemic injury induced by intraluminal filament insertion in rats. Korean J Meridian & Acupoint. 2006 ; 23(3) : 81-98.
21. Youn DH, Na CS. Hepatoprotective effects of electro-acupuncture at *Taechung*(LR_3) and *Yangji*(TE_4) on experimental liver injury in rats. Korean J Meridian & Acupoint. 2006 ; 23(2) : 167-76.
22. 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.
23. Park IK, Lim JK. Effects of moxibustion at the meridian points *Sinsu*(BL_{23}) and *Wisu*(BL_{21}) on the renal function in spontaneously hypertensive rats. The Acupuncture. 1995 ; 11(2) : 1-25.
24. Lee YW. Food contamination caused by water pollution, air pollution and soil pollution. J National Nutrition. 1986 ; 10 : 23-6.
25. Perry HM, Yunice A. Acute pressor of intra-arterial cadmium and mercuric ions in anesthetized rats. Pros Soc Exp Bio Med. 1965 ; 120(3) : 805-8.
26. Essing HG, Schaller KH, Szadkowski et al. Common cadmium intake through food stuffs and beverages. Arch Hyg Baktenol. 1969 ; 153(6) : 490-4.
27. Kazantzis G, FV Flynn, JS Spowag et al. Renal tubular malfunction and pulmonary emphysema in cadmium pigment workers. Quari J Med. 1963 ; 32 : 165-92.
28. Schroeder HA. Cadmium as a factor in hypertention. J Chron Dis. 1965 ; 18(7) : 647-56.
29. Kowel NE, Johnson DE, Kraemer DF et al. Normal levels of cadmium in diet, urine blood and tissues inhabitants of the United States. J Toxical Environ Health. 1979 ; 5(6) : 995-1014.
30. 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.
31. Sen CK. Oxidative and antioxidants in exercise. J Appl Physiol. 1995 ; 79(3) : 675-86.
32. Crap JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. Int J Mol Med. 2001 ;

7(1) : 13.
33. 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.
34. Straus DS, Pascual G, Li M et al. 15-Deoxy-Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 ; 97(9) : 4844-9.
35. Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. Photodermatology. 2000 ; 16 : 195-201.
36. Kondoh M, Araragi S, Sato K et al. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60cells. Toxicology. 2002 ; 170(1-2) : 111-7.
37. The Part of Acupuncture & Moxibusion in the National College of Oriental Medicine. Acupuncture & Moxibusion. Seoul : Jipmundang. 2005 : 489, 667.
38. Juhlshamn K, Utne F, Bracckan 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.
39. Kim HI, Bae KH, Lee HJ et al. Effect of hesperidin extracted from tangerine peel on Cd and lipid metabolism, and antioxidative capacity in rats. Korean J Nutrition. 1999 ; 32(2) : 137-49.