

태충·삼음교의 침 자극이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 신장 손상에 미치는 영향

이초인, 이현종, 이윤규, 임성철, 김재수*

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실



[Abstract]

The Effects of LR₃ and SP₆ Acupuncture on Renal Damage in Streptozotocin-induced Diabetic Mice

Cho In Lee, Hyun Jong Lee, Yun Kyu Lee, Seong Chul Lim and Jae Soo Kim*

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

Objectives : This study was performed to investigate the effects of LR₃ and SP₆ acupuncture on renal damage in streptozotocin(STZ)-induced diabetic mice.

Methods : ICR male mice were stabilized for a week and divided into four groups: a normal mice group(N), no-acupuncture diabetic mice group(Control), LR₃ acupuncture diabetic mice group(LR₃), and SP₆ acupuncture diabetic mice group(SP₆). Diabetes was experimentally induced by intraperitoneal injection of STZ(150 mg/kg) in citrate buffer(pH 4.5). For two weeks, LR₃ and SP₆ acupunctures were administered bilaterally at each point once a day. After two weeks, the animals' weight was measured and they underwent a laparotomy. Serum glucose and blood urea nitrogen(BUN) were measured from the blood taken from the heart. We measured glucose, reactive oxygen species(ROS), peroxyntrite(ONOO⁻) and thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) in the kidney and compared expression levels of superoxide dismutases(SOD), glutathione peroxidase(GPx), nuclear factor-kappa B(NF-kB), cyclooxygenase-2(COX-2), inducible nitric oxide synthase(iNOS) and Interleukin-1 beta(IL-1β).

Results : BUN significantly decreased in LR₃, SP₆ compared to the control group. LR₃ showed significantly decreased glucose compared to the control group. LR₃, SP₆ significantly decreased in ROS and ONOO⁻ compared to the control group. LR₃ significantly decreased in TBARS compared to the control group. SP₆ significantly increased in expressions of SOD-1, catalase, and GPx compared to the control group. LR₃, SP₆ significantly decreased in COX-2 compared to the control group. SP₆ significantly decreased in IL-1β compared to the control group.

Conclusions : This study suggests that LR₃ acupuncture may be effective in controlling glucose and lipid peroxidation and that SP₆ acupuncture may have anti-oxidative and anti-inflammatory effects on renal damage in STZ-induced diabetic mice.

Key words :
 Streptozotocin;
 Renal damage;
 Acupuncture;
 LR₃;
 SP₆

Received : 2015. 07. 31.
 Revised : 2015. 09. 02.
 Accepted : 2015. 09. 09.
 On-line : 2015. 09. 20.

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion, Medicine, Daegu Oriental Hospital of Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea
 Tel : +82-53-770-2112 E-mail : jaice@daum.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

당뇨 환자는 2009년 이래 그 숫자가 다소 감소하는 추세이나 아직도 국내 인구의 10% 대 정도가 당뇨 환자로 조사되고 있다¹⁾. 2013년 주요 사망원인에서도 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 자살에 이어서 다섯 번째로 조사되어 적절한 치료와 예방이 중요시되고 있다²⁾.

특히 당뇨는 고혈당으로 인한 당뇨병성 케톤산 혈증(diabetic ketone acidosis), 비케톤성 고삼투상태(hyperosmolar hyper-glycemic nonketotic syndrome)와 같은 급성 합병증뿐 아니라 망막병증, 신경병증, 신장병증과 같은 미세혈관 합병증, 관상동맥질환, 말초혈관계질환, 뇌혈관계질환과 같은 대혈관 합병증 그리고 위마비(gastro-paralysis), 감염, 피부 변화 등의 비혈관계 합병증을 일으킬 수 있다³⁾.

이중 당뇨로 인한 신병증은 1·2형 당뇨 환자들에게 흔하게 나타나는 합병증으로 전체 당뇨 환자의 20~40% 정도에서 발생한다. 특히 1형 당뇨 환자는 치료하지 않으면 당뇨병 발병 후 80%가 현성 당뇨병성 신증으로 진행하고, 2형 당뇨병은 진단 후 15년 정도 경과 시 20~40% 가량이 당뇨병성 신증으로 진행하게 된다⁴⁾. 이러한 신장 질환은 많은 사회적 비용을 초래하고, 제한된 식이나, 투석 등으로 인한 심한 삶의 질의 저하를 초래하고 있다⁵⁾.

당뇨병은 다양한 경로를 통해 신증을 유발하는 것으로 추정되는데 혈관 내피세포 성장인자, 전환 성장인자와 같은 여러 성장인자와 레닌-안지오텐신-알도스테론계 인자, 산화적 스트레스와 관련된 인자, 비효소적 당화와 관련된 최종당대사산물 등의 요인들이 결합되어 신장 기능의 손실을 가져오게 된다⁶⁾.

그 중 산화적 스트레스에 대한 연구로 국내에서는 streptozotocin(STZ)로 유발된 당뇨쥐에게 본초, 천연물, 한약 처방들이 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 당뇨 유발 쥐에 대해 침 자극이 미치는 영향에 대한 연구는 STZ로 유발된 1형 당뇨쥐에 대한 연구들과⁷⁻¹¹⁾ 고지방 식이로 유발한 고혈당 쥐에 대한 연구¹²⁾가 있다. 이들 논문은 체중 및 혈당 변화와 지질대사, 뇌 신경세포의 산화적 스트레스에 대한 연구이며, 고혈당의 합병증 중 산화적 스트레스로 인한 신장손상에 대한 연구는 없었다.

본 연구에서는 태충과¹³⁻¹⁵⁾ 삼음교의^{16,17)} 침자극이 STZ로 유발된 당뇨쥐의 신장 손상에 미치는 영향을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 체중 30~40 g의 ICR mouse의 6주령 수컷(오리엔트, 대구, 대한민국)을 사용하였다. 동물실 환경은 동물실험 가이드에 따라 온도 24±2℃ 습도 40~60%로 유지하고 cage당 1마리씩 넣어서 사용하였으며, 밤낮을 12시간씩 조절하였다. 실험은 6주령의 쥐를 1주일간 사료(FORMULA M07, 제일사료주식회사, 경기도, 대한민국)와 수분을 공급하며 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리규정을 준수하여 시행하였다(DJUA RB2014-010).

2) 침

침은 스테인레스 호침(직경 0.16 mm 길이 7.0 mm, 행림수지침, 한국)을 사용하였다.

3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare(Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고, Superoxide dismutases(SOD)-1, Glutathione peroxidase(GPx), Nuclear factor-kappa B(NF-κB) p65, Cyclooxygenase(COX)-2, Inducible nitric oxide synthase(iNOS), interleukin-1 beta(IL-1β), catalase, β-actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, enhanced chemiluminescence(ECL) western blotting detection reagents는 GE Healthcare로부터 구입하였다. N-1-naphthylenediamine dihydrochloride, sulphanilamide, phosphoric acid, diethylenetriaminepenta-acetic acid(DTPA)와 dihydrorhodamine 123(DHR-123)는 Sigma Chemical Co(St Louis, MO, USA)에서 구입하였고 glucoses와 4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine(2-thiobarbituric acid, TBA) ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였고 blood urea nitrogen(BUN)은 Kainos Laboratory Inc(Tokyo, Japan)으로부터 구입하였다.

2. 방법

1) 군 분류

1주일간의 적응기를 거친 후 정상군과 1형 당뇨 모델 유발을 위해 STZ를 투여한 군으로 나누었다. STZ를 투여한 군은 다시 침자극을 가하지 않은 대조군, 태충에 침자극을 가한 태충군, 삼음교에 침 자극을 가한 삼음교군으로 나누었으며 STZ 투여 후 1주일 뒤의 체중과 혈당에 따라 비슷한 개체를 선별하여 군을 분류하였다. 실험동물은 각 군별로 4마리씩 총 16마리를 사용하였다.

2) 침 자극

침 자극은 실험동물 표준경혈위치¹⁸⁾에 따라 골도 분촌법으로 혈자리를 정한 후 펜으로 점을 찍고 양쪽 모두 자극하였다. 침 치료군은 태충, 삼음교에 각각 주 7회 자극하였으며, 1회 0.2 mm 깊이로 직자한 후 30초간 유침하였다. 유침시 염전이나 기타 보사법은 시행하지 않았다. 태충과 삼음교의 침 자극 효과는 대조군을 이용하여 비교하였다.

3) STZ 유발 1형 당뇨쥐 모델

1주일간의 적응기를 거친 후 STZ를 투여할 군에 STZ 150 mg/kg을 50 mM citrate buffer(pH 4.5)에 녹여 복강투여 하였으며, 투여 후 1주일 뒤 체중을 재고 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리 후 얻은 혈청으로부터 혈당치를 측정하여 군 분류에 참고하였다. 2주간의 침 자극 최종일에는 12시간 동안 절식시킨 뒤에 에테르로 마취시켜 개복하였으며 심장에서 혈액을 채취한 후 생리식염수로 관류하여 혈청 분석에 사용하였고, 신장을 적출하여 신장조직의 분석에 사용하였다.

4) 체중, 식이 섭취량, 음수량 측정

실험 과정 중 물과 사료는 자유롭게 공급하였으며 체중은 침자극을 시작하기 전과 2주간의 침 자극 후 최종일의 체중을 통해 증가량을 비교하였다. 침 자극을 시작한 뒤부터 식이 섭취량과 음수량은 매일 1회 각각 측정하였다.

5) 혈청 분석

혈중 glucose(Glucose CII-test, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)와 BUN(BUN Kainos, Kainos Laboratory Inc., Tokyo, Japan)은 commercial kit를 사용하여 측정하였다.

6) 신장 조직의 glucose 함량 분석

신장 조직의 glucose 함량 측정을 위해 신장 조직을 얼음에서 0.9 % NaCl buffer로 분쇄하였고, 0.15 M Ba(OH)₂과 5 % ZnSO₄을 이용해 단백질을 제거하였다. 그 다음 1,670×g으로 15분간 원심 분리해서 얻은 상층액을 샘플로 이용해 glucose 함량을 측정하였다. 측정값은 흡광도 기계를 사용하여 산출하여 계산하였다.

7) 신장 조직의 ROS 함량 측정

신장 조직의 reactive oxygen species(ROS)의 생성량의 변화를 확인하기 위해 신장 조직을 얼음에서 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 분쇄하였다. 그 뒤 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계로 매 5분씩 emission wavelength of 485 nm와 excitation wavelength of 530 nm를 이용해 30분간 측정된 산출한 값을 계산하였다.

8) 신장 조직의 ONOO⁻ 함량 측정

신장 조직의 peroxynitrite(ONOO⁻)의 생성량의 변화 확인을 위해 신장 조직을 얼음에서 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 분쇄하였다. 그 후 DHR-123을 첨가한 뒤 형광 광도계로 매 5분씩 emission wavelength of 485 nm와 excitation wavelength of 530 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출한 값을 계산했다.

9) 신장 조직의 지질과산화 함량 측정

신장 조직의 지질과산화의 생성량 변화를 확인하기 위해 신장 조직을 얼음에서 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 분쇄하였다. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 수치는 Mihara와 Uchiyama방법¹⁹⁾으로 측정하였다.

10) 세포질 추출

신장 조직을 0.1M Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 homogenate buffer를 첨가하여 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 미토콘드리아 침전물을 얻기 위해서 4°C에서 30분간 반응시켰으며 12,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 침전물을 제거한 상층액을 사용하였다.

11) 핵 추출

신장 조직을 500 μ l hypotonic buffer A[100 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail]에 넣어 얼음으로 차갑게 하여 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 이후 10 % NP-40 용액 62.5 μ l를 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 pelleted nuclei를 10 % NP-40가 더해진 buffer A에 한 번 헹구어 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 파쇄시킨 뒤 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 얻은 핵단백질을 포함한 상층액은 -80°C에서 냉동 보관하였다.

12) Western blot analysis

신장 조직의 SOD-1, catalase, GPx, COX-2, iNOS, IL-1 β , catalase 및 β -actin 단백질 발현을 측정하기 위해 세포질 추출물 10 μ g의 단백질 사용과 NF- κ B p65 및 histone 단백질 발현을 측정하기 위해 핵 추출물 10 μ g의 단백질을 10~14 % SDS-polyacrylamide gel로 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Amersham GE Healthcare, Little, Chalfont, UK)으로 이동시켰다. 이후 5 % skim milk를 함유한 PBS-T (0.5 % Tween 20 in PBS)에 담귀 1시간 동안 blocking 처리 후 PBS-T로 5분마다 5회 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리해 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 10분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체와 사용된 2차 항체(PBS-T로 1 : 5,000으로 희석해서 사용)를 사용해서 상온에서 1시간 동안 반응시켜 PBS-T로 10분마다 5회 세척하였다. 그리고 ECL 용액에 노출시켰다. 이후 암실에서 농도계 분석을 실시하여 단백질 발현 정도를 분석하였다.

13) 통계처리

실험 결과는 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 표기하였고, SPSS 18.0 for Windows program을 사용해 one way ANOVA로 유의수준 p -value<0.05에서 검정하고 사후 분석으로 Dunnett 검정법을 사용하였다.

III. 결 과

1. 체중, 식이 섭취량, 음수량에 미치는 영향

침자극 기간의 체중 변화량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였다. 태충군과 삼음교군은 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. 식이 섭취량과 음수량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 태충군과 삼음교군은 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다(Table 1).

Table 1. The Body Weight Change, Food and Water Intake

Group	Body weight change (g / 14 days)	Food intake (g / day)	Water intake (ml / day)
Normal	3.39 \pm 0.56	5.87 \pm 0.15	8.63 \pm 0.55
Control	0.89 \pm 0.32 [#]	11.25 \pm 0.46 ^{##}	50.04 \pm 1.62 ^{##}
LR ₃	0.85 \pm 0.06	9.55 \pm 1.33	44.50 \pm 3.81
SP ₆	0.98 \pm 0.20	13.14 \pm 3.32	52.34 \pm 2.38

All values were showed mean \pm SD.

: p <0.05, ## : p <0.01 compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test.

2. 혈당과 신장 기능에 미치는 영향

혈중 glucose 수치는 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 태충군과 삼음교군은 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. BUN 수치는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, 태충군과 삼음교군은 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Table 2).

Table 2. The Hematological Analyses

Group	glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)
Normal	94.1 \pm 0.7	27.2 \pm 1.0
Control	260.7 \pm 85.6 [#]	93.9 \pm 0.8 ^{##}
LR ₃	151.9 \pm 41.4	88.7 \pm 0.4 ^{***}
SP ₆	289.8 \pm 5.2	86.2 \pm 0.6 ^{***}

All values were showed mean \pm SD.

: p <0.05, ### : p <0.001 compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test.

*** : p <0.001 compared to control group by ANOVA followed by Dunnett's test.

3. 신장 조직 내 glucose 함량의 변화

신장 조직 내 glucose 함량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 삼음교군은 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

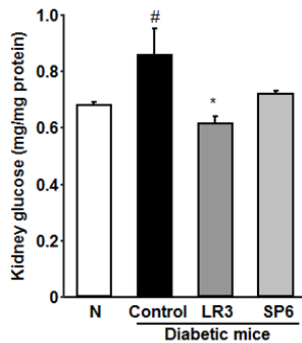


Fig. 1. The concentrations of glucose in the kidney

: $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test.

* : $p < 0.05$ compared to control group by ANOVA followed by Dunnett's test.

4. 신장에서 산화적 스트레스 억제 효과

1) 신장 조직의 ROS 생성량

신장 조직의 ROS 생성량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

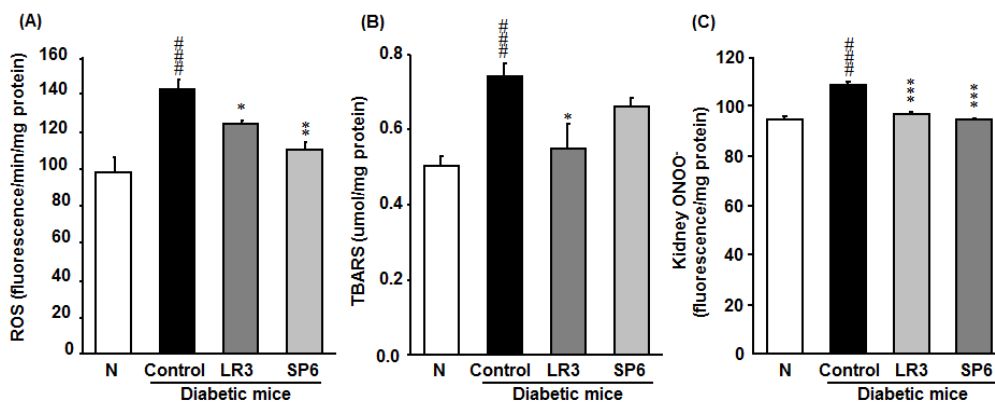


Fig. 2. The concentrations of ROS, TBARS, ONOO⁻ production in the kidney

(A) reactive oxygen species(ROS). (B) thiobarbituric acid reactive substances(TBARS). (C) peroxynitrite(ONOO⁻).

: $p < 0.01$ compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control group by ANOVA followed by Dunnett's test.

2) 신장 조직의 TBARS 생성량

신장 조직의 TBARS 생성량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 삼음교군은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

3) 신장 조직의 ONOO⁻ 생성량

신장 조직의 ONOO⁻ 생성량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

5. 신장 조직에서 항산화 효소계에 미치는 영향

1) 신장 조직에서 SOD-1 발현량에 미치는 영향

신장 조직에서 SOD-1 발현량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으며, 태충군은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었고, 삼음교군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

2) 신장 조직에서 catalase 발현량에 미치는 영향

신장 조직에서 catalase 발현량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으며, 태충군은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었고, 삼음교군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

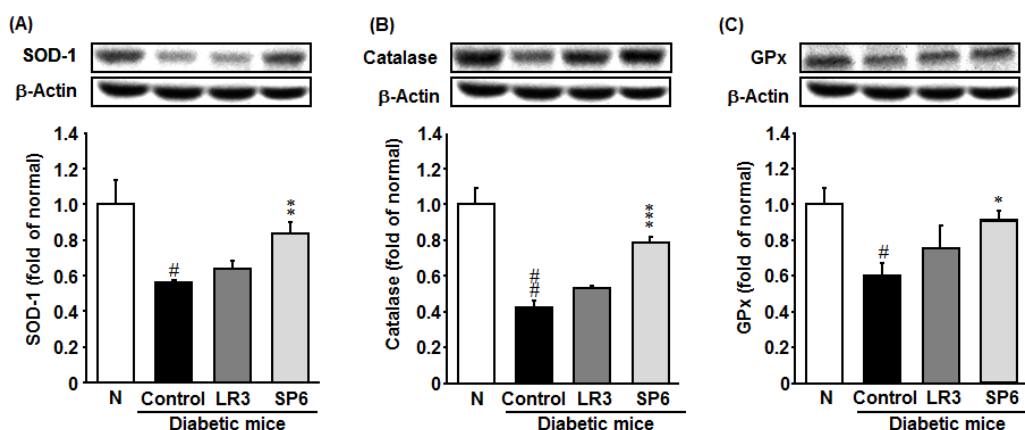


Fig. 3. The expression of antioxidant enzymes-related protein in the kidney

(A) superoxide dismutase(SOD), (B) catalase, (C) glutathion peroxidase(GPx).

: $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$ compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test, * $p < 0.05$,

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control group by ANOVA followed by Dunnett's test.

3) 신장 조직에서 GPx 발현량에 미치는 영향

신장 조직에서 GPx 발현량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으며, 태충군은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었고, 삼음교군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

6. 신장 조직에서 산화 스트레스 관련 단백질 발현에 미치는 영향

신장 조직에서 NF- κ B p65 발현량은 대조군이 정상군

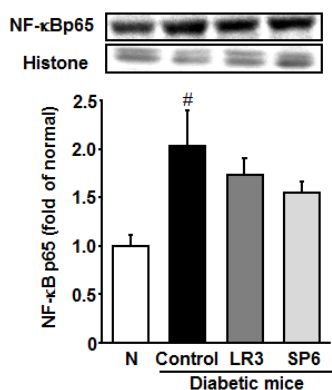


Fig. 4. The NF- κ B p65 expressions in the kidney

: $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test.

에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

7. 신장 조직에서 염증 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

1) 신장 조직에서 COX-2 발현량에 미치는 영향

신장 조직에서 COX-2 발현량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

2) 신장 조직에서 iNOS 발현량에 미치는 영향

신장 조직에서 iNOS 발현량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다(Fig. 5).

3) 신장 조직에서 IL-1 β 발현량에 미치는 영향

신장 조직에서 IL-1 β 발현량은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 태충군은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었고, 삼음교군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

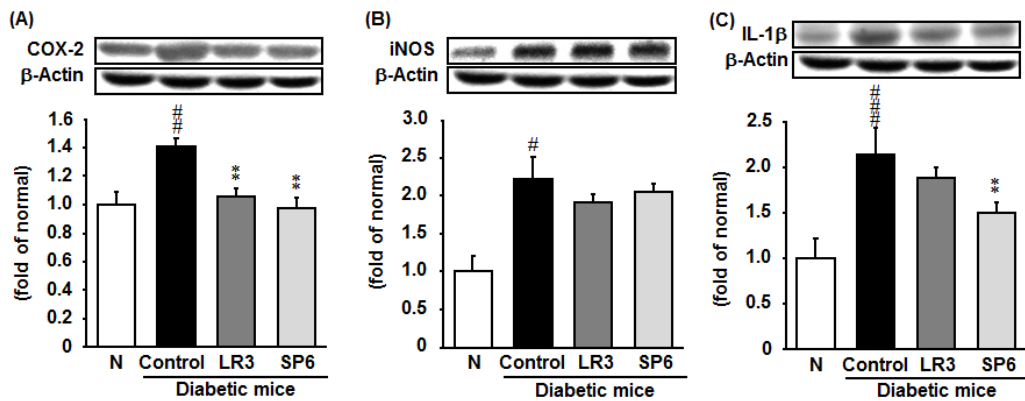


Fig. 5. The expressions inflammation-related protein in the kidney (A) cyclooxygenase-2(COX-2), (B) inducible nitric oxide synthase(iNOS), (C) Interleukin-1 beta(IL-1β). # : $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$, ### : $p < 0.001$ compared to normal group by ANOVA followed by Dunnett's test, ** : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA followed by Dunnett's test.

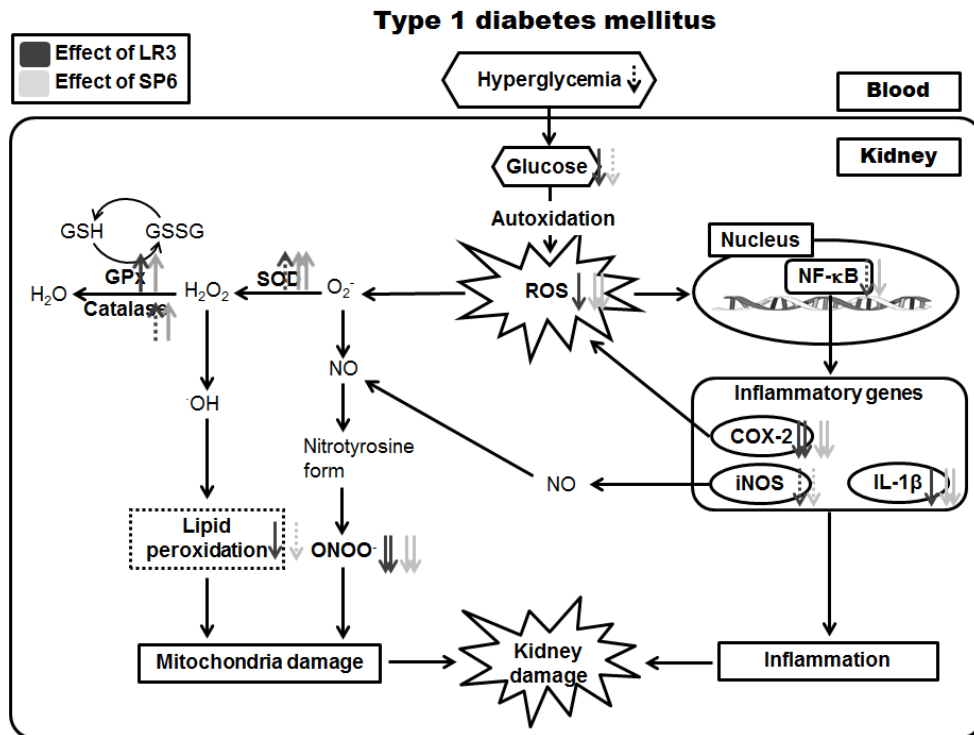


Fig. 6. The effects and mechanisms of LR₃ and SP₆ acupuncture on renal protection against hyperglycemic-induced oxidative stress at the kidney

IV. 고찰

당뇨의 여러 합병증 중 가장 대표적인 것이 당뇨병성 신증이다. 당뇨병성 신증으로 진행되는 과정은 여러 가지 기

전이 관여하는 것으로 추정되고 있다.

첫째로 사구체와 요세관간질, 혈관 등의 다양한 구조에서 일어나는 구조적 변화로 고혈당이 지속되면 혈관간질(mesangium)이 확장되고, 사구체 기저막이 비후되고, 교원질이 침착되어 사구체 경화증 또는 사구체병증을 야기하

게 된다²⁰⁾.

두 번째는 혈액학적 변화로 산화질소(nitric oxide), 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor), 전환성장인자(transforming growth factor)- β , prostanoids, 레닌-안지오텐신-알도스테론계 등이 관여하고 있다. 이러한 과정 중에 생기는 단백질은 세뇨관에서 내포 작용을 통해 흡수되는 단백질을 증가시켜 근위세뇨관의 리소좀 안에 축적되어 세포손상을 일으키게 된다²¹⁾.

세 번째는 고혈당으로 야기되는 대사적 요인으로 비효소 당화(nonenzymatic glycosylation)작용을 통해 생성된 최종 당화산물(advanced glycosylation end products)기전^{22,23)}과 protein kinase C의 활성화기전²⁴⁾, 고혈당 시 세포 내에서 인산화를 거치지 않는 알도스 환원효소(aldose reductase)에 의해 소르비톨로 전환되는 폴리올 기전(polyol pathway) 등이 있다^{25,26)}.

위에서 언급한 과정들은 대부분 ROS를 증가시키며 여러 조직에서 산화스트레스를 증가시킨다. 당뇨병에서 생성되는 대부분의 ROS 생성 기전은 미토콘드리아의 전자전달계의 산화 인산화 과정에서 생겨나는 O_2^- (superoxide radical)의 생성이다. O_2^- 는 diacylglycerol의 합성증가와 protein kinase C 활성화를 일으키며 미토콘드리아 내의 다른 반응성 유기기이자 강력한 산화 물질인 ONOO⁻의 주된 제공자 역할을 한다. 보통 산소는 NADH/NADPH oxidase를 거치며 에너지전자인 H⁺를 내어놓고 O_2^- 로 되는데, 이런 활성 산소는 세포독성을 가지기 때문에 O_2^- 는 SOD에 의해 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환되고 catalase와 GPx는 이렇게 생성된 과산화수소를 물로 전환시켜 산화적 스트레스를 방어하게 된다^{27,28)}.

이러한 ROS는 신호 전달에 있어서도 여러 역할을 하는데 특히 NF- κ B는 산화-환원 의존성 전사인자로 신장 손상을 일으키는 혈관간질(mesangial cell)이 비후되는 데에 중요한 역할을 한다. 평소 NF- κ B는 세포질에서 억제 단백질인 I κ B와 결합되어 있고, 다양한 자극에 세포가 노출되면 NF- κ B dimer가 유리되어 세포핵으로 이동하게 된다. 이렇게 이동한 NF- κ B는 염증이나 면역과 관련된 다양한 유전자의 발현을 증가시킨다. 이러한 NF- κ B는 염증 매개반응에도 중요한 역할을 하는데, 면역학적 반응이나 염증 매개 반응에 관련된 COX-2와 iNOS 발현과 연관이 있어 염증반응을 일으켜서 세포사멸을 유발하게 된다²⁹⁻³²⁾.

한의학에서는 당뇨병을 消渴의 범주에서 찾아볼 수 있는데, 外感, 飮食不節, 藥物腹用, 飮酒, 情神過度, 勞役, 體虛, 失血 등의 원인으로 진액이 손상되어 陰津虧損하여 燥熱内生하므로 발생한다고 보았다. 이런 消渴과 관련된 증상으로 消穀善飢, 渴而多飮, 四肢痿弱, 手足麻木, 浮腫, 尿濁, 失明,

腫滿, 陰痿, 頻尿, 癰疽 등의 증상을 언급하고 있으며 이는 현대 당뇨병의 합병증과 유사한 맥락에서 살펴볼 수 있다³²⁾.

당뇨의 치료혈에는 足三里(ST₃₆)·胃俞(BL₂₁)·脾俞(BL₂₀)·然谷(KI₂)·太衝(LR₈)·三陰交(SP₆) 등이 사용되는데⁹⁾ 이중 태충은 足厥陰肝經의 原穴 및 兪土穴이며 기존의 연구들에서는 항산화, 항염증 및 기타 만성 질환들에 효과가 있다고 보고되었으며¹³⁻¹⁵⁾, 삼음교는 足太陰脾經의 陰陽二總穴로 足太陰脾經·足厥陰肝經·足少陰腎經의 세 陰經이 교차하며 陰經을 주관하는 혈자리로 국내 연구는 부인과의 출산과 진통에 관련된 연구에 많이 사용되었으며, 부교감신경의 방광분지에 작용하고, 항산화능이 있다고도 알려져 있다^{16,17)}.

당뇨에 대한 침치료의 효과에 대해서는 몇 연구가 있었는데 Kim et al⁷⁾, Kim et al⁹⁾, Lee et al¹⁰⁾은 STZ로 유발된 당뇨쥐의 뇌의 신경세포의 산화질소합성 효소인 neuronal nitric oxide synthase(nNOS) 활성도가 증가함을 보고하였고, Park et al⁸⁾, Lee et al¹²⁾은 각각 STZ 유발 당뇨쥐와 고지방식이 유발 당뇨쥐에서 혈당강화와 혈중지질 감소 효과가 있음을 보고하였다. Hur et al¹¹⁾은 STZ 유발 당뇨쥐의 혈당 농도가 감소함을 보고하였고, 세포독성에 대한 이자의 베타세포 보호 효과가 있음을 보고하였다. 이상의 연구에서 침 자극이 당뇨쥐의 혈당 및 지질수치 개선과 뇌신경세포에 영향을 미치는 것을 보고하였으나 침 자극이 STZ 유발 당뇨쥐의 산화적 스트레스와 관련된 신장 손상에 대해 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

보통 당뇨 유발 쥐의 경우 공통적으로 체중감소의 경향과 식이 섭취량 및 음수량의 증가를 보이는데, 본 연구에서도 대조군의 체중 변화량은 정상군의 1/3 정도의 체중 증가 소견을 보이고 식이 섭취량과 음수량은 정상군에 비해 5배 이상의 증가를 보여 정상군과 유의성 있는 차이를 나타내 STZ로 유발된 당뇨병의 양상을 잘 파악할 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의한 변화를 확인할 수 없었다.

혈중 glucose는 대조군이 정상군에 비해 2배 이상 유의하게 증가하였다. 그러나 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의한 감소를 확인할 수 없었다.

혈중 BUN은 신장 손상 정도를 살펴보기 위해 측정하였는데 대조군은 정상군에 비해 BUN 수치가 3배 이상 유의하게 증가하여 고혈당으로 인한 신장 손상이 일어난 것을 확인하였다. 태충군과 삼음교군은 대조군에 비해 유의하게 BUN 수치가 감소하였는데 이 결과로 미루어 볼 때 태충과 삼음교는 모두 신장을 보호하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

신장 조직의 glucose 함량은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였는데, 대조군에 비해 태충군은 유의하게

신장 조직의 glucose 함량이 감소하였으나, 삼음교군에서는 유의한 변화가 없었다. 이 결과로 미루어 볼 때 태충은 삼음교에 비해 신장 조직의 glucose 함량을 감소시키는 데 효과가 있을 것으로 사료된다.

신장 조직의 조직손상을 유발하는 ROS 생성량은 대조군에서 정상군에 비해 1.5배 이상 유의하게 증가하였다. 이에 반해 태충군과 삼음교군은 모두 대조군에 비해 유의하게 ROS 생성량을 감소시켜 산화적 스트레스에 대한 방어 효과를 나타내었는데 삼음교가 조금 더 유의한 결과를 나타내었다.

생체 조직의 과산화적 손상의 지표로 알려진 TBARS의 수치는 대조군이 정상군에 비해 1.5배 가량 유의하게 증가하였다. 이에 반해 태충군은 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며, 삼음교군은 유의한 차이를 나타내지 않아 태충이 삼음교에 비해 지질 과산화작용에 대한 보호 효과가 있을 것으로 사료된다.

ONOO⁻의 경우 미토콘드리아 안에서 생성되는 대표적인 ROS인 O²⁻ 생성과 관련되어 있는데 대조군은 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 이에 반해 태충군과 삼음교군은 모두 대조군에 비해 ONOO⁻의 유의한 감소를 보여 ONOO⁻ 생성 기전에도 효과가 있는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 신장 조직 안에서 발생한 O²⁻를 제거하는 SOD, 이후 생긴 H₂O₂를 제거하는 catalase와 GPx를 측정하였는데 대조군은 정상군에 비해 효소 발현이 유의하게 감소하여 고혈당으로 인해 신장 조직 내의 ROS 생성량이 증가되어 SOD, catalase, GPx의 소모량이 증가하였음을 알 수 있다. 태충군은 대조군에 비해 유의한 변화가 없었고, 삼음교군은 대조군에 비해 유의한 증가를 보였는데 이를 통해 삼음교군은 태충군보다 조직 내 ROS를 제거하는 기전을 활성화시킴을 짐작해 볼 수 있다.

NF-κB는 조직 내의 산화적 스트레스에 의해 활성화되어 조직 내의 염증성 반응과 관련된 단백질의 활성화에 영향을 미치는데 대조군은 정상군에 비해 유의하게 NF-κB p65 발현량이 증가하였으며, 태충군과 삼음교군은 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다.

세포 내에서 염증과 관련된 기전을 일으키는 COX-2, iNOS, IL-1β의 발현량에서는 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 태충군과 삼음교군은 대조군에 비해 COX-2 발현량은 유의하게 감소하여 항염증작용을 보였고, 삼음교군은 대조군에 비해 IL-1β의 발현량을 유의하게 감소시켜 항염증작용을 보였다. iNOS의 발현량은 두 군 모두 유의한 차이는 없었다.

본 실험에서 STZ로 유발된 당뇨쥐의 신장 손상에 대하여 칩 치료군은 모두 BUN 수치를 대조군에 비해 유의하게

감소시켜 신장 보호 효과를 보였다. 태충은 삼음교에 비해 조직 내 glucose 강하 작용, TBARS와 같은 지질과산화물의 감소에 효과를 보이며 신장 보호 효과를 보였다. 이를 통해 태충은 최종당화산물과 같은 glucose 대사과정에서 만들어지는 산화인자를 조절하여 신장 손상을 억제하는 것으로 짐작해 볼 수 있다. 이에 반해 삼음교는 혈당 강하작용은 없었으나 조직 항산화 효과와, 항염증 효과에 있어 더욱 뛰어난 효과를 보여 조직 내의 항산화 작용에 관여하며 신장을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 결 론

STZ로 유발된 당뇨쥐의 신장 손상에 대한 태충과 삼음교의 칩 자극이 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈청 내 glucose는 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다. 혈청 내 BUN 수치에서는 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 모두 유의한 감소를 보였다.
2. 신장 조직의 glucose 생성량은 대조군에 비해 태충군이 유의하게 감소하였고 삼음교군은 유의한 변화가 없었다.
3. 신장 조직의 ROS 생성량은 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 신장 조직의 TBARS 생성량은 태충군만 유의하게 감소하였다. 신장 조직의 ONOO⁻ 생성량은 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
4. 신장 조직의 항산화 효소인 SOD-1, catalase, GPx 발현량은 삼음교군에서 대조군에 비해 유의하게 높았고 태충군에서는 유의한 차이가 없었다.
5. 신장 조직의 산화적 스트레스와 관련된 단백질인 NF-κB p65의 발현에서는 태충군과 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다.
6. 신장 조직 내의 염증과 관련된 인자인 COX-2, iNOS, IL-1β 발현량은 COX-2 발현량에서는 태충군 삼음교군 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, IL-1β 발현량에서는 삼음교이 대조군에 비해 유의하게 감소를 보였으며, iNOS 발현량에서는 유의한 차이는 없었다.

따라서 STZ로 유발된 고혈당 쥐의 신장 손상에 대하여

태충은 조직 내 혈당강하 작용, 지질과산화물의 감소에 있어서 유의한 효과를 보였고, 이에 반해 삼음교는 조직 항산화 작용과, 항염증 작용에 유의한 효과를 보였다.

VI. References

1. Statistics Korea, Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Available from : URL : http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=117&tblId=DT_11702_N102&conn_path=I2
2. Statics Korea. Annual report on the cause of death statistics 2013. Available from : URL : http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=1012
3. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Harrison's principles of internal medicine : 17th edition, Korea : Mc Graw Hill Medical, 2008 ; 2282-96.
4. Suma Dronavalli, Irena Duka, George L Bakris. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Endocrinol*, 2008 ; 4(8) : 444-52.
5. Lee JJ, Kim JM, Kim YR. Association of diet-related quality of life with dietary regimen practice, health-related quality of life, and gastrointestinal symptoms in end-stage renal disease patients with hemodialysis. *Korean J Nutr*, 2013 ; 46(2) : 137-46.
6. Kim MK. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Diabetes Metab J*, 2013 ; 14(1) : 15-8.
7. Kim EH, Hwang DY, Lee EY et al. Effects of acupuncture on nNOS-positive neurons in cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *The Acupuncture*, 2001 ; 18(5) : 155-63.
8. Park HJ, Kim JS. Effects of SP₃ and GV₆ acupuncture on the STZ-treated rats for induction of diabetes. *Korean J Microscopy*, 2006 ; 36(4) : 279-89.
9. Kim EH. Effects of manual acupuncture and herb-acupuncture on cell proliferation of hippocampus in streptozotocin-induced diabetes rat. [dissertation], Chung Cheong Province : Se-myung University, 2003. Korean.
10. Lee KY, Lee EY. Effects of acupuncture on NADPH-d-positive neurons in cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Acupunct*, 2001 ; 18(2) : 138-40.
11. Hur KW, Kang SG, Kim YS. A study on serum glucose levels and the pancreatic beta-cell protective effect of acupuncture on streptozotocin-treated rats by subcutaneous implantation of osmotic pump. *The Acupuncture*, 2007 ; 24(4) : 115-24.
12. Lee JM, Lee SH. Effects of *Jungwan*(CV₁₂) and *Bisu*(BL₂₀) acupuncture on serum glucose concentration and lipid composition in high fat diet induced diabetic rat. *Korean J Acupunct*, 2004 ; 21(1) : 95-102.
13. Yu YP, Ju WP, Li ZG, Wang DZ, Wang YC, Xie AM. Acupuncture inhibits oxidative stress and rotational behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Brain Res*, 2010 ; 1336 : 58-65.
14. Kang JM, Park HJ, Choi YG et al. Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. *Brain Res*, 2007 ; 1131 : 211-9.
15. Kang DH, Yun YC, Kim JS, Kim WJ, Na CS. The effect of LR₃ acupuncture on blood pressure and C-fos expression in hypertensive rat induced by 2K1C. *Korean J Acupunct*, 2002 ; 19(1) : 47-57.
16. Song JK, Lee BR, Yang GY, Jeon JH, Yim YK. Anti-oxidative and immune-regulative effects of electro-acupuncture at SP₆ in aged rats. *Korean J Acupunct*, 2010 ; 27(1) : 87-106.
17. Park CH, Yoon YC, Na CS. Neurologic study of SP₆ acupuncture on bladder parasympathetic nerve, tibial nerve and blood pressure in rats. *The Acupuncture*, 2002 ; 19(1) : 175-88.
18. Koo ST, Kim SK, Kim EH et al. ACupuncture point locations for experimental animal studies in rats and mice. *Korean J Acupunct*, 2010 ; 27(3) : 67-78.
19. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 1978 ; 86(1) : 271-8.
20. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr*

- Diabetes Rev. 2008 ; 4(1) : 39-45.
21. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Puggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2005 ; 68(Supplement 99S) : S57-65.
 22. Kalia K, Sharma S, Mistry K. Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy. *Clinica Chinica Acta.* 2004 ; 347(1-2) : 169-76.
 23. Shimoike T, Inoguchi T, Umeda F, Nawata H, Kawano K, Ochi H. The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism.* 2000 ; 49(8) : 1030-5.
 24. Evcimen ND, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res.* 2007 ; 55(6) : 498-510.
 25. Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 2003 ; 17(3) : 417-25.
 26. Jeong HC, Jeong JC. Effects of *Gamigukihwan-dong-hawn* on renal function, oxidative stress and polyol pathway in diabetic nephropathy rats. *KJOMPP.* 2007 ; 21(3) : 671-8.
 27. Kim SS, Son SM. Oxidative stress and cell dysfunction in diabetes : role of ROS produced by mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Diabetes Metab J.* 2008 ; 32(5) : 389-98.
 28. Lim DG. Oxidative stress: reactive oxygen species and nitric oxide. *KJCCM.* 2004 ; 19(2) : 81-5.
 29. Kim BH, Son SM. Mechanism of developing diabetic vascular complication by oxidative stress. *Endocrinol Metab.* 2006 ; 21(6) : 448-59.
 30. Schoonbroodt S, Pette J. Oxidative stress interference with the nuclear factor κ B activation pathways. *Biochem Pharmacol.* 2000 ; 60(8) : 1075-81.
 31. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther.* 2012 ; 30(1) : 49-59.
 32. Jang TS, Jung HC, Ryu BH. A comparative study on the symptoms and complications between diabetes-mellitus and *So-gal*. *Korean J Orient Int Med.* 1985 ; 2(1) : 61-9.