



## 심경, 신경의 오수혈 침자가 Mitochondrial Respiratory Chain Complexes에 미치는 영향

최동희\*<sup>ID</sup> · 이유미\*<sup>ID</sup> · 김미래<sup>ID</sup> · 박정혜<sup>ID</sup> · 김혜란<sup>ID</sup> · 나창수<sup>ID</sup> · 윤대환<sup>ID</sup>

동신대학교 한의과대학 경락경혈학교실

## The Effects of Acupuncture at Heart and Kidney Meridian on Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities in Rats

Donghee Choi\*, Yumi Lee\*, Mirae Kim, Jeonghye Park, Hyeran Kim, Changsu Na, Daehwan Youn

Department of Acupoint & Meridian, College of Korean Medicine, Dongshin University

**Objectives :** Mitochondria are typically known as intracellular double membrane-bound structures that supply energy for intracellular metabolism including Krebs cycle and beta-oxidation. Also, acupuncture has been known to stimulate the flow of energy. To explore the effect of acupuncture on the mitochondrial respiratory chain activities in rat's heart and kidneys, the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I to IV were observed. **Methods :** The rats were divided into 11 groups: Normal (no acupuncture treatment and under anesthesia for 10 min), heart meridian five-transport-points (acupuncture treatment at HT9, HT8, HT7, HT4 and HT3 under anesthesia for 10 min), and kidney meridian five-transport-points (acupuncture treatment at KI1, KI2, KI3, KI7 and KI10 under anesthesia for 10 min). All rats were sacrificed and the heart and kidneys were examined for the changes of respiratory chain activities. **Results :** Acupuncture at HT7 increased the activity of succinate dehydrogenase; acupuncture at KI2 increased the activity of ubiquinol cytochrome C oxidoreductase; and acupuncture at HT9, HT8, HT3 and KI1 increased activities of cytochrome C oxidase. **Conclusions :** Acupuncture assists mitochondrial respiratory chain activity via the Cytochrome C oxidase signaling pathway in heart and kidney of rats.

**Key words :** acupuncture, ubiquinol oxidoreductase, succinate dehydrogenase, ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome C oxidase

### 서론

미토콘드리아는 에너지 공급과 생산 외에도 세포의 다양한 기능에 관여하고 다른 소기관과는 달리 자체 DNA를 가지고 있는 세포 소기관이며<sup>1)</sup>, 미토콘드리아의 DNA 진화속도는 nDNA에 비해 빠르고, 모계유전으로 유전자 재조합이 일어나지 않아 종간의 점진적인 변화를 관찰할 수 있어 유전적 다양성 분석에 이용 된다<sup>2)</sup>.

미토콘드리아의 대표적인 기능은 ATP 생성이라고 할 수 있으며, 이에 필요한 산화환원반응은 전자전달계(Complex들)에 의해 이루어진다<sup>3)</sup>. 미토콘드리아의 기능 이상은 활성 산소 생산을 유도하거나 염증조절 이상, ATP 합성 감소 등 만성 질환이나 암까지 나아갈 수 있는 문제로 대두되고 있다<sup>4)</sup>.

경혈은 인체의 장부와 연결된 지점으로 경혈 부위를 자극하면 경맥을 따라 해당 장부에 영향을 미칠 수 있는데, 경혈을 자극하여

Received February 17, 2020 Revised March 17, 2020 Accepted March 17, 2020

Corresponding author: **Daehwan Youn**

Department of Acupoint & Meridian, College of Korean Medicine, Dongshin University, 120-9 Dongsindae-gil, Naju 58245, Korea

Tel: +82-61-330-3257, Fax: +82-61-330-3519, E-mail: 3303527@naver.com

\*These authors contributed equally to this work.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

해당 장기의 미토콘드리아 활성 변화를 통해 경혈 침자극의 효과를 알아보려고 한 연구가 진행되고 있다. 그러나 대부분 손상에 따른 미토콘드리아 활성 변화를 관찰한 것이 많았으며, 침에 의한 미토콘드리아 활성을 관찰한 연구는 미비한 실정이다. 최근 연구로 최 등<sup>5)</sup>은 간경 태충(LR3)에 5분, 10분 동안 자극했을 경우 미토콘드리아의 활성 변화를 관찰하였는데, cytochrome C oxidase에 영향을 주어 병변에 개선 효과를 나타내는 기전으로 해석할 수 있다고 하였으며, 침 자극에 대한 complex 활성에 따른 장부와의 연계성과 조직 내 에너지 대사에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 하였다.

경혈은 각 경맥으로 이어져 장부와 연결되어 있으며 경맥을 따라 배열되는 경혈의 수는 각각 다르게 분포되어 있어 일정한 규칙과 조건을 가지고 각 경맥에 해당되는 실험이 필요할 것으로 사료된다. 오수혈은 그 기원이 자세히 밝혀져 있지 않지만 『靈樞』의 「九鍼十二原」에서 오장육부의 기가 나오는 곳에 대하여 설명되어 지기를 맥기가 나오는 곳을 정혈(井穴), 흐르기 시작하는 곳을 형혈(榮穴), 기가 주입되는 곳을 수혈(俞穴), 기가 행하는 곳을 경혈(經穴), 기가 들어가는 곳을 합혈(合穴)로 구성되어 있다<sup>6)</sup>. 경맥에 배치되어 있는 경혈 중 오장육부의 기가 나오는 혈위들이며, 각 경맥에 동일한 특성으로 명시되고 분포되어 있는 혈위로서, 각 장부와 경맥의 연계성을 관찰하기 위한 경혈 선정의 조건으로 적합하다고 여겨진다.

인체에서 기기(氣機)가 승강(昇降)하는 원리를 말할 때 위, 아래로는 심신(心腎), 좌우로는 간폐(肝肺)가 종횡으로 양대 축을 이루고 있는데, 종축(縱軸)에 속하는 심화(心火)는 군화(君火)이고, 심은 군주지관(君主之官)으로 오장대로(五臟大路)를 통솔하고 있으며, 신(腎)은 인체에서 정(精)을 저장하는 기능을 갖고 있고 선천의 근본이 된다하여 심과 신의 상호관계를 잘 살피는 것은 인체의 기기(氣機)를 연구하는데 아주 중요하다고 하였다<sup>7)</sup>.

이<sup>8)</sup>와 같이 심실근세포에서의 미토콘드리아 에너지 대사와 칼슘 조절기전을 보거나 조 등<sup>9)</sup>과 같이 카드뮴이 신장의 미토콘드리아 호흡에 미치는 영향을 관찰하는 등 장기의 미토콘드리아 활성에 대한 연구가 있고, 침자극에 따른 심전도 변화를 보거나<sup>10)</sup>, 침자극으로 카드뮴으로 손상된 신장 보호 효과를 보는 등<sup>11)</sup> 침자극에 따른 장기 변화나 손상에 대한 회복 정도를 보는 연구는 많이 진행되었다.

그러나 저자는 경혈 침자극의 효과에 대하여 침자시 경혈과 경맥에 따라 장기에 분포되는 미토콘드리아 발현이 영향을 미칠 것이라는 가설하에, 장기에 어떠한 변수도 주어지지 않은 상태에서 침자극을 주었을 때 각 경맥에 해당하는 장기에서 일어나는

미토콘드리아 활성 변화에 대한 실험 연구를 살펴본 바, 질병 모델에서 수행된 것이 대부분이며, 정상체에서의 경혈 침자극이 mitochondria 대사에 미치는 영향에 대한 연구는 현재까지 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 수소음심경(手少陰心經)과 족소음신경(足少陰腎經)의 오수혈 침자시 각 장부의 미토콘드리아 분포 및 활성을 관찰하여 ATP 에너지 변화에 따른 장부와 경맥의 연계성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

**1) 실험동물:** 실험동물은 동신대학교 실험동물위원회 승인(2018-02-02)을 받은 7주령 260 g의 Sprague Dawley계의 수컷 백서(Samtaco, Korea)를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 23±1°C, 습도 60±5%)내에서 일주일동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 적응기간 동안 고휘사료(pellet, samtako, Korea)와 물을 충분히 공급하면서 자유롭게 섭취하였다.

**2) 침자:** 침자에 사용된 일회용 침은 호침(0.20×15 mm, Dong-bang, Korea)을 사용하였다.

### 2. 실험 방법

**1) 군분리 및 시술:** 실험동물은 침자 시술 전에 isoflurane (Hana, Korea)과 O<sub>2</sub>로 혼합된 가스 마취를 시행하였으며, 가스 마취는 3% isoflurane으로 흡입마취를 유도한 후, 2% isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다.

실험동물들은 흡입마취 상태에서 아무런 처치를 하지 않은 10분 정상군(n=4), 흡입마취 상태에서 각 경맥(심, 신)에 해당하는 10개 오수혈 침자 시술을 한 10분 침자군(n=4)으로 총 11개 군으로 분리하였다.

**2) 취혈 및 침자:** 수소음심경에 해당하는 소충(HT9), 소부(HT8), 신문(HT7), 영도(HT4), 소해(HT3)와 족소음신경에 해당하는 용천(KI1), 연곡(KI2), 태계(KI3), 부류(KI7), 음곡(KI10)으로 실험동물 표준경혈위치<sup>12)</sup>에 따라 골도분촌법으로 취혈하였으며, 4일간(1회/1일) 총 4회 침자하고 정상군은 4일간 동일하게 흡입마취를 하였다. 침자시 침자 직후, 유침 5분 후, 유침 10분 후에 각 27회씩 시계방향의 염전으로 수기자극을 시행하였다.

**3) 조직 준비:** 실험동물들은 mitochondria 분리를 위해서 각 실험동물들에서 심장의 심방 좌우 각 50 mg과 신장 좌우 각 50 mg

장기를 적출하였다. 장기는  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

**4) Mitochondria 분리 및 측정:** Tissue mitochondria분리를 위해 mitochondria isolation kit (Thermofisher, USA)를 사용하였다. Tissue 100 mg을 PBS에 wash한 후 BSA/Reagent A solution (4 mg/ml) 800  $\mu\text{l}$ 를 넣고 homogenization (precellys 24, Bertin technologies, France)한 후, reagent C 800  $\mu\text{l}$ 를 넣고 tube를 여러번 흔들어 주었다.  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 700 g로 10분간 원심분리 (Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant를 분리하였다.  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 3,000 g로 15분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant를 버리고 mitochondrial pellet만 남겼으며, mitochondrial pellet에 wash buffer (Reagent C : dw) 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 12,000 g로 5분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant를 버리고 mitochondrial pellet만 남겼다. Mitochondrial pellet은 2% CHAPS in TBS 1000  $\mu\text{l}$ 에 녹인 mitochondrial protein은  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. Mitochondria 측정은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermoscientific, USA)를 사용하여 96 well plate에 BCA 용액(A:B=50:1) 200  $\mu\text{l}$ 을 넣고 mitochondrial protein 25  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 incubation시킨 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 562 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였으며, standard curve를 만들어 sample의 mitochondria를 assay하였다.

**5) Ubiquinon Oxidoreductase (complex I) 측정:** Ubiquinon oxidoreductase 측정을 위해 complex I enzyme activity microplate assay kit (abcam, UK)를 사용하였다. Microplate well에 Control (200  $\mu\text{l}$  incubation buffer), mitochondrial protein (100  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ) 200  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 room temperature에서 3시간 incubation 시켰다. 1X buffer 300  $\mu\text{l}$ 를 넣고 2회 wash 한 후 assay solution (8 Well : 1X buffer 1.645 ml/20X NADH 87.5  $\mu\text{l}/100\text{X Dye } 17.5 \mu\text{l}$ ) 200  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 kinetic program (room temperature, 1분 간격, 30분)을 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였으며, sample의 activity는 rate (mOD/min=Absorbance 1 - Absorbance 2/Time)를 계산하였다.

**6) Succinate Dehydrogenase (complex II) 측정:** Succinate dehydrogenase측정을 위해 complex II enzyme activity microplate assay kit (abcam, UK)를 사용하였다. Microplate well에 control (50  $\mu\text{l}$  incubation buffer), mitochondrial protein (10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) 50  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 room temperature에서 2시간 incubation시켰으며, 1X buffer 300  $\mu\text{l}$ 를 넣고 2회 wash한 후

lipid mix 40  $\mu\text{l}$ 를 넣어 room temperature에서 30분 incubation 시켰다. Activity solution (8 Well: Ubiquinone 5  $\mu\text{l}/$  Succinate 42  $\mu\text{l}/$ DCPIP 21  $\mu\text{l}/$ Complex II Activity Buffer 2.1 ml) 200  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 kinetic program (room temperature, 20 초 간격, 60분)을 600 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였으며, sample의 activity는 rate (mOD/min=Absorbance 1 - Absorbance 2/Time)를 계산하였다.

**7) Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase (Complex III) 측정:** Ubiquinol cytochrome C oxidoreductase 측정을 위해 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Biomatik, USA)를 사용하였다. Microplate well에 standard, mitochondrial protein (100  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 1시간 incubation하였으며, incubation이 끝난 후 microplate는 wash없이 시약만 버리고, detection reagent A 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 1시간 incubation 시켰다. Wash buffer 350  $\mu\text{l}$ 로 3회 washing 한 후, detection reagent B 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 30분간 incubation 시켰으며, wash buffer 350  $\mu\text{l}$ 로 5회 washing한 후, substrate solution 90  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 20분간 incubation (dark 상태)하였다. Stop solution 50  $\mu\text{l}$ 를 microplate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였으며, standard curve를 만들어 sample의 ubiquinol cytochrome C oxidoreductase를 assay 하였다.

**8) Cytochrome C oxidase (complex IV) 측정:** Cytochrome C oxidase 측정을 위해 rat cytochrome C oxidase elisa kit (Biomatik, USA)를 사용하였다. Microplate well에 standard, mitochondrial protein (10  $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ ) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 2시간 incubation 하였으며, incubation이 끝난 후 plate는 wash 없이 시약만 버리고, biotin-antibody (1X) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 1시간 incubation시켰다. Wash buffer 400  $\mu\text{l}$ 로 3회 washing한 후, HRP-avidin (1X) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 1시간 incubation 시켰으며, wash buffer 400  $\mu\text{l}$ 로 5회 washing한 후, TMB Substrate 90  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 30분간 incubation (dark 상태)하였다. Stop solution 50  $\mu\text{l}$ 를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였으며, standard curve를 만들어 sample의 cytochrome C oxidase를 assay하였다.

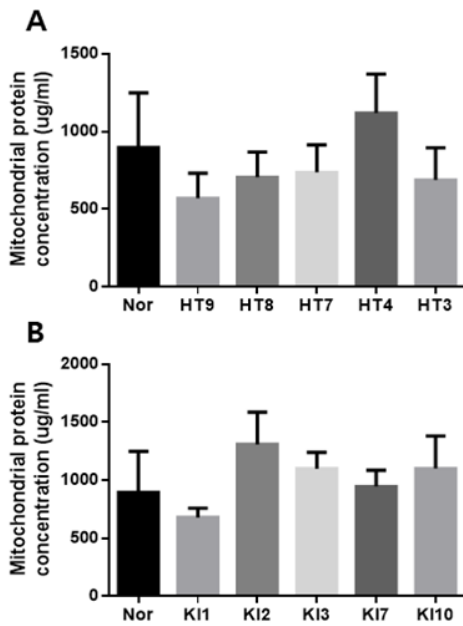


Fig. 1. Effect of acupuncture at five transport points of Heart and Kidney meridian on mitochondrial protein concentration in rat's (A) Heart and (B) Kidneys.

Each acupuncture group was treated with acupuncture at acupoints HT9, HT8, HT7, HT4, HT3, KI1, KI2, KI3, KI7 and KI10 for each 10 min in rats. Normal1; No acupuncture treatment and under anesthesia for 10 min. HT9~KI10; Acupuncture treatment at acupoint HT9~KI10 under anesthesia for 10 min. Values are expressed as Mean±SD.

### 3. 통계처리

모든 측정값은 Excel statistic program (Microsoft, USA)을 이용하여 평균치와 표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Graph Pad Prism (Ver. 6.01 for Window, USA)과 SPSS (Ver. 21 for Window, USA)를 사용하여 비모수적 통계 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 실험군은 대조군에 비하여  $\alpha=0.05$  수준( $p<0.05$ )과  $\alpha=0.01$  수준( $p<0.01$ )이하에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. Mitochondrial protein concentration 변화

Mitochondrial protein concentration에 대한 심경과 신경의 오수혈별 발현 변화를 조직에서 관찰한 결과, 심경의 경우 normal군에서  $896.62 \pm 352.14 \mu\text{g/ml}$ , HT9군에서  $570.00 \pm 161.64 \mu\text{g/ml}$ , HT8군에서  $705.03 \pm 163.02 \mu\text{g/ml}$ , HT7군에서  $737.45 \pm 176.70 \mu\text{g/ml}$ , HT4군에서  $1119.73 \pm 249.17 \mu\text{g/ml}$ ,

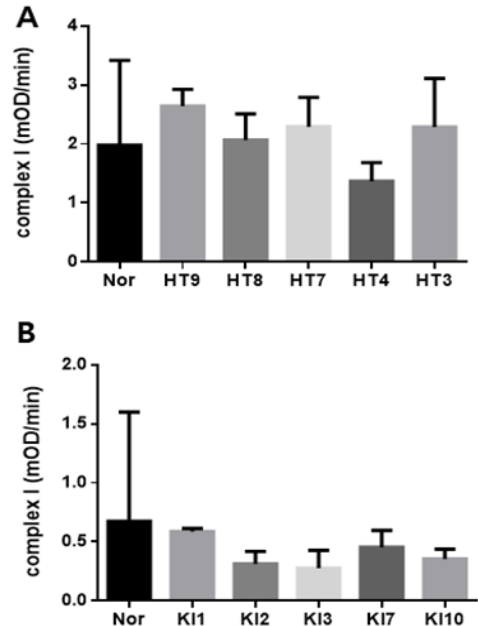


Fig. 2. Effect of acupuncture at five transport points of Heart and Kidney meridian on Ubiquinon Oxidoreductase (complex I) in rat's (A) Heart and (B) Kidneys.

Refer to Fig. 1 for groups. Values are expressed as Mean±SD.

HT3군에서  $687.99 \pm 207.69 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었으며, 신경의 경우 normal군에서  $896.62 \pm 352.14 \mu\text{g/ml}$ , KI1군에서  $679.62 \pm 78.97 \mu\text{g/ml}$ , KI2군에서  $1309.97 \pm 276.87 \mu\text{g/ml}$ , KI3군에서  $1099.81 \pm 141.76 \mu\text{g/ml}$ , KI7군에서  $946.24 \pm 138.77 \mu\text{g/ml}$ , KI10군에서  $1100.08 \pm 280.03 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

Normal군에 비하여 각 각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

### 2. Ubiquinon oxidoreductase (complex I) 변화

Complex I에 대한 심경과 신경의 오수혈별 발현 변화를 조직에서 관찰한 결과, 심경의 경우 normal군에서  $1.98 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ , HT9군에서  $2.64 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ , HT8군에서  $2.07 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ , HT7군에서  $2.29 \pm 0.50 \mu\text{g/ml}$ , HT4군에서  $1.37 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$ , HT3군에서  $2.28 \pm 0.70 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었으며, 신경의 경우 normal군에서  $0.67 \pm 0.93 \mu\text{g/ml}$ , KI1군에서  $0.59 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ , KI2군에서  $0.31 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ , KI3군에서  $0.28 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ , KI7군에서  $0.45 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ , KI10군에서  $0.35 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

Normal군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

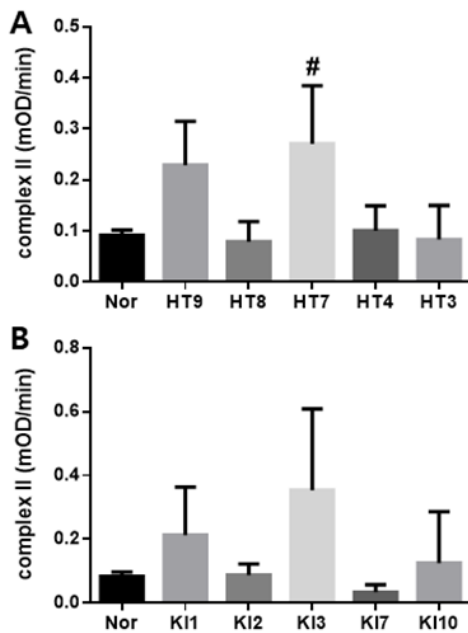


Fig. 3. Effect of acupuncture at five transport points of Heart and Kidney meridian on Succinate Dehydrogenase (complex II) in rat's (A) Heart and (B) Kidneys.

Refer to Fig. 1 for groups. Values are expressed as Mean±SD. #*p*<0.05 compared with normal group.

### 3. Succinate Dehydrogenase (complex II) 변화

Complex II에 대한 심경과 신경의 오수혈별 발현 변화를 조직에서 관찰한 결과, 심경의 경우 normal군에서  $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ , HT9군에서  $0.23 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ , HT8군에서  $0.08 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ , HT7군에서  $0.27 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$  (*p*<0.05), HT4군에서  $0.10 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ , HT3군에서  $0.08 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었으며, 신경의 경우 normal군에서  $0.08 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ , KI1군에서  $0.21 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ , KI2군에서  $0.09 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ , KI3군에서  $0.35 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ , KI7군에서  $0.03 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ , KI10군에서  $0.13 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

심장 조직에서 normal군에 비하여 HT7군(*p*<0.05)이 유의한 증가를 나타내었으며, 신장 조직에선 normal군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 3).

### 4. Ubiquinol cytochrome C oxidoreductase (complex III) 변화

Complex III에 대한 심경과 신경의 오수혈별 발현 변화를 조직에서 관찰한 결과, 심경의 경우 normal군에서  $0.42 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ , HT9군에서  $0.41 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ , HT8군에서  $0.39 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ , HT7군에서  $0.39 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ , HT4군에서  $0.41 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ ,

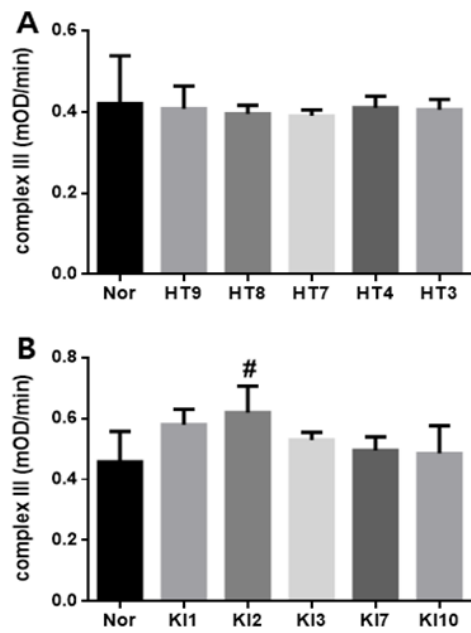


Fig. 4. Effect of acupuncture at five transport points of Heart and Kidney meridian on Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase (Complex III) in rat's (A) Heart and (B) Kidneys.

Refer to Fig. 1 for groups. Values are expressed as Mean±SD. #*p*<0.05 compared with normal group.

HT3군에서  $0.40 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었으며, 신경의 경우 normal군에서  $0.46 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ , KI1군에서  $0.58 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ , KI2군에서  $0.62 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$  (*p*<0.05), KI3군에서  $0.53 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ , KI7군에서  $0.50 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ , KI10군에서  $0.49 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

심장 조직에서 normal군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으며, 신장 조직에선 normal군에 비하여 KI2 (*p*<0.05)군이 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 4).

### 5. Cytochrome C oxidase (complex IV) 변화

Complex IV에 대한 심경과 신경의 오수혈별 발현 변화를 조직에서 관찰한 결과, 심경의 경우 normal군에서  $0.46 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ , HT9군에서  $0.70 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$  (*p*<0.0001), HT8군에서  $0.67 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$  (*p*<0.0001), HT7군에서  $0.54 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ , HT4군에서  $0.51 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ , HT3군에서  $0.60 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$  (*p*<0.01)을 나타내었으며, 신경의 경우 normal군에서  $1.24 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ , KI1군에서  $2.54 \pm 0.30 \mu\text{g/ml}$  (*p*<0.001), KI2군에서  $1.76 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ , KI3군에서  $1.24 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ , KI7군에서  $1.33 \pm 0.30 \mu\text{g/ml}$ , KI10군에서  $1.29 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다.

심장 조직에서 normal군에 비하여 HT9군(*p*<0.0001), HT8군

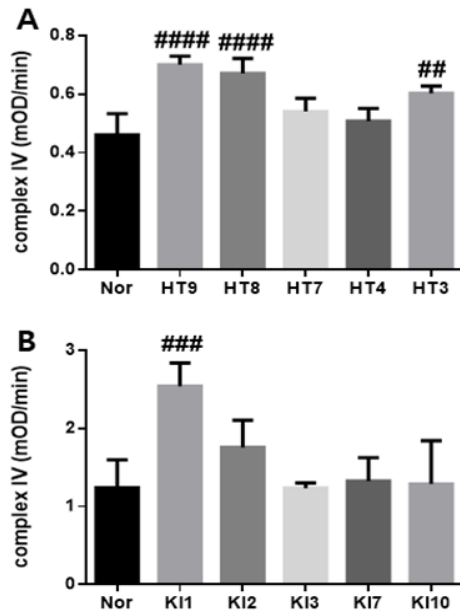


Fig. 5. Effect of acupuncture at five transport points of Heart and Kidney meridian on Cytochrome C oxidase (complex IV) in rat's (A) Heart and (B) Kidneys.

Refer to Fig. 1 for groups. Values are expressed as Mean±SD. ####  $p < 0.0001$ , ###  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$  compared with normal group.

( $p < 0.0001$ ), HT3 ( $p < 0.01$ )군이 유의한 증가를 나타내었으며, 심장 조직에선 normal군에 비하여 KI1 ( $p < 0.001$ )군이 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 5).

## 고찰

미토콘드리아는 세포 생존에 필요한 에너지를 생성하며 이 생체 에너지 대사의 기능 이상, 즉 미토콘드리아의 기능 이상은 질병 발생과 암 악성화에 이르기까지 질병 진행과 상관관계가 있을 것으로 초점하여 미토콘드리아 제어를 통한 치료법 개발을 주제로 많은 연구들이 보고되고 있다<sup>13</sup>. 또, 미토콘드리아는 세포 내 에너지 제공, 세포신호전달, 줄기 세포 분화 등 인체에 필요한 에너지원으로서 가장 중요한 기관이기 때문에<sup>14</sup> 세포 수명에 대해서도 미토콘드리아의 연구는 중요하게 자리잡고 있다. ATP를 생산하는 과정 중 complex I (Ubiquinon Oxidoreductase)과, complex III (Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase)에서 ROS (reactive oxygen species)의 주요 발생처가 되는 superoxide가 생성된다<sup>15</sup>. Cytochrome C는 정상적인 상태에서 전자 전달계 Complex III과 IV (Cytochrome C oxidase) 사이에서 전자를 운반하지만 superoxide가 과도하게 생성되면 세포질로 방출되어 세포사멸을 일으

키고 미토콘드리아의 기능 이상을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>. Superoxide는 미토콘드리아에서 전자전달이 활발할수록 많이 만들어지는데 이로 인해 membrane에 많은 손상이 생기고, 그로 인해 전자전달계로부터 전자 이탈이 가속 되면 더 많은 superoxide가 만들어지는데, 질이 좋은 미토콘드리아는 ATP를 많이 만들고 membrane potential은 높게 유지하면서 ROS는 적게 만든다. 미토콘드리아에 의해 생성된 ROS가 결국 미토콘드리아의 질에 영향을 미치고, 미토콘드리아의 질은 ROS 생성에 영향을 미치기에 세포의 건강에 있어서 좋은 미토콘드리아를 만들고 유지하는 것이 중요하다<sup>17,18</sup>.

Zhang 등<sup>19</sup>은 미토콘드리아가 말초 신경염과 관련이 있고, 정상적인 미토콘드리아 호흡을 통해 신경을 강화하여 염증 및 산화 스트레스를 억제할 수 있을 것이라는 가정 하에 중추신경계의 중요한 기능 중 하나에 미토콘드리아를 유지하는 것이 포함됨으로 전침 자극 이후 활성화된 미토콘드리아를 통해 DSS로 유발된 대장염 개선에 대한 효과를 연구하였으며, Li 등<sup>20</sup>은 2주 간의 침술 치료를 통해 hippocampal mitochondria의 respiratory complex enzymes (complex I, II, IV) 활동과 cytochrome c oxidase IV 발현을 통해 침술을 통한 미토콘드리아 조절 인지결손 예방에 기여할 수 있을 것이라 하였다.

이처럼 경혈 자극은 미토콘드리아 활성화와 관련이 있으며 다양한 질환에 침술을 시행함으로써 개선되는 원인을 미토콘드리아 활성화와 관련하여 알아보는 연구가 증가하고 있다. 그러나 질환이 개입되지 않은 정상적인 상태에서 침자극을 통해 미토콘드리아의 발현이 되는지에 대한 연구는 미비하다.

이에 본 연구에서는 질환이 개입되지 않은 정상적인 상태에서 수소음심경(手少陰心經)과 족소음신경(足少陰腎經)의 오수혈에 침자시, 해당 경맥 장부인 심장과 신장의 mitochondrial respiratory chain mitochondrial protein concentration, complex I (Ubiquinon Oxidoreductase), complex II (Succinate Dehydrogenase), complex III (Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase), complex IV (Cytochrome C oxidase) 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 연구에서 유의성을 나타낸 결과로 complex II (Succinate Dehydrogenase) 변화에서는 심경의 HT7군이 정상군에 비해 증가하였으며, complex III (Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase) 변화에서는 신경의 KI2군이 정상군에 비해 증가하였고, complex IV (Cytochrome C oxidase) 변화에서는 심경의 HT9군, HT8군, HT3군, 신경의 KI1군에서 정상군에 비해 증가함을 관찰하였다.

두 경맥의 오수혈 중 경혈(井穴)군이 전자전달계 발현 변화에서

서로 비슷한 패턴을 나타내었으며, cytochrome C oxidase에서 유의한 증가를 나타내었는데, 이는 오수혈에 대한 타 연구 중 신 등<sup>21)</sup>의 연구에서 고혈압 치료에 오수혈 중 정혈(井穴)이 여러 지포에서 유의한 효과를 나타낸 것과, 장<sup>22)</sup>의 연구에서 OVA로 유발한 천식 모델에서 다른 혈위를 비롯하여 정혈(井穴)이 염증 완화로 인한 폐 회복에 유의한 효과를 낸 것을 보았을 때, 기가 나오는 곳인 정혈(井穴)에서 세포 내 변화가 시작할 수 있다는 것을 제시할 수 있으며, 전자전달계 중 cytochrome C oxidase에서 가장 많은 유의성은 나타내었는데, 이는 질병 모델을 사용하지 않은 최 등<sup>16)</sup>의 연구와 같은 결과로서 염전 수기법을 사용할 경우 해당 경맥의 장부 조직 내 미토콘드리아의 cytochrome C oxidase에 영향을 주어 미토콘드리아 활성을 일으키며, 이러한 활성은 병변이 있는 경우 일정한 개선 효과를 보이는 기전으로 해석할 수 있다.

즉, 질병 유무와 상관없이 경혈 침자는 해당 경맥의 장부 조직에 선 cytochrome C oxidase 발현의 변화에 영향을 미치는데, 미토콘드리아 대사 변화 중에서도 cytochrome C oxidase이 경맥과 관련이 있으며 경맥을 이루는 경혈 중 기의 시작이라 할 수 있는 정혈(井穴)과의 관계성에 대한 의의를 제시할 수 있다.

경혈의 기전에 대해서 눈으로 보이는 기관이나 라인이 존재하지 않고, 그 효과를 과학적인 방법으로 제시할 수 있는 기준이 없기 때문에 경험 의학으로선 신뢰도가 높지만 이론으로서는 인정하지 않는 의견이 많았지만, 김 등<sup>23)</sup>의 피부에 나타나는 염증 반점을 통해 경혈 지점을 밝히거나, 최 등<sup>16)</sup>과 같이 미토콘드리아의 활성을 통해 경혈의 효과가 나타날 수 있는 방법에 대해 접근하는 등 경혈을 입증하기 위해 많은 연구와 노력이 진행되고 있다.

본 연구에선 오수혈 자극을 통해 혈위 별 해당 장부에 나타나는 미토콘드리아 활성에 관한 관찰을 진행했으며, 경맥 중 정혈(井穴)로부터 세포 내 변화가 시작될 수 있다는 것과, 경혈 자극은 최종적으로 cytochrome C oxidase에 영향을 주어 미토콘드리아 활성을 일으킬 수도 있다는 것을 시사하는 바이다.

그러나 본 연구에서 사용된 개체수를 감안하였을 때 통계적 유의성은 보이지 않았던 mitochondrial protein 농도와 ubiquinon oxidoreductase 대사 변화는 추후 반복 실험을 통해 미토콘드리아 대사 변화에 대한 통계적 유의성은 추가적으로 확보될 수 있을 것이라 생각하며 향후 더 많은 경혈의 반복 실험으로 데이터의 신뢰성을 확보하고, 심경과 신경 각 경맥에 따른 장부 미토콘드리아의 관찰 뿐 아니라 타 장부와의 연계성에 대한 연구로, 한의학 개념 중 하나인 심신상교 관점을 적용하여 침 자극이 심경-신장, 신경-심장 서로의 발현에 영향을 미치는 것과, 각 장부 중 미토콘드리아 활성이 가장 활발하게 일어나는 장기 중 하나인 간 조직에서의 대

사 변화를 함께 관찰함으로써 경혈 침자극에 대한 심층 연구를 진행할 것이며, 장부 조직 뿐 아니라 뇌를 통한 미토콘드리아 대사 연구, 경혈 자극으로 활성화 된 미토콘드리아의 상태를 확인할 수 있는 연구 등 경혈의 기전을 설명할 수 있는 다양한 접근 방법이 필요한 것이라고 생각된다.

## 결론

심경(心經)과 신경(腎經)의 오수혈 침자시 각 심장과 신장 조직의 mitochondrial respiratory chain 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Mitochondrial protein concentration에서는 normal군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
2. Ubiquinon Oxidoreductase (complex I)에서는 normal군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
3. Succinate Dehydrogenase (complex II)에서는 심장조직에서 normal군에 비하여 심경의 HT7군이 정상군에 비해 증가하였다.
4. Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase (complex III)에서는 신장조직에서 normal군에 비하여 신경의 KI2군이 정상군에 비해 증가하였다.
5. Cytochrome C oxidase (complex IV)에서는 심장조직에서 normal군에 비하여 심경의 HT9군, HT8군, HT3군, 신장조직에서 normal군에 비하여 신경의 KI1군이 증가하였다.

## Acknowledgement

None.

## Funding

This research was supported by the national research Foundation (NRF) of Korea (NRF-2018R1D1A1A02046580).

## Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

## Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

## References

- Han YS, Jegal ME, Kim YJ. Mitochondrial dysfunction and cancer. *J Life Sci.* 2019 ; 29(9) : 1034-46. <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.9.1034>
- Kang JH, Yu KH, Kim SK, Park JY, Kim BS, An CM. Species identification and genetic structure of octopus minor from Korea and China on the basis of partial sequences of mitochondrial Cytochrome Oxidase I. *Korean J Malacol.* 2010 ; 26(4) : 285-90.
- Baek IY. The Effect of Artificial Inhibition of Mitochondrial ETC and Aerobic Training on Antioxidant System, and Energy Metabolism. *Exerc Sci.* 2002 ; 11(2) : 315-24.
- Lee HC, Chang CM, Chi CW. Somatic mutations of mitochondrial DNA in aging and cancer progression. *Ageing Res Rev.* 2010 ; 9 Suppl 1 : S47-58. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.009>
- Choi DH, Lee YM, Kim MR, Park JH, Na CS, Youn DH. The effects of acupuncture at LR3 acupoint on mitochondrial Complex IV oxidase activity in liver. *Korean J Acupunct.* 2019 ; 36(4) : 200-9. <https://doi.org/10.14406/acu.2019.022>
- Ahn CW, Min YK, Ahn CB, Jang KJ, Kim CH, Song CH, et al. A study on fivesu-point in Yingshu, Sumun and Najing. *J Pharmacopunct.* 2008 ; 11(1) : 189-99.
- Lee YS, Youn CY. A study of East-West Medicine on the relationship between heart and kidney. *J Korean Med Classics.* 2005 ; 18(2) : 20-44.
- Lee JH. Characteristics of mitochondrial energy metabolism and calcium regulation in permeabilized single ventricular myocytes. PhD [dissertation]. Ulsan:Ulsan University. 2015.
- Cho HK, Moon JB, Rim SC. Effects of cadmium and cadmium binding protein on the respiration of mitochondria of rat kidney. *Appl Microsc.* 1989 ; 19(2) : 59-73.
- Lee HB. Transfer function model and signal analysis of ECG variation caused by acupuncture stimulus. Master [thesis] Seoul: Kyung Hee University. 2016.
- Shin HW, Lee HJ, Kim JS. The protective effects of acupuncture on oxidative stress caused by cadmium in the kidney. *J Acupunct Res.* 2015 ; 32(1) : 1-11. <https://doi.org/10.13045/acupunct.2015001>
- Koo ST, Kim SK, Kim EH, Kim JH, Youn DH, Lee BH, et al. Acupuncture point locations for experimental animal studies in rats and mice. *Korean J Acupunct.* 2010 ; 27(3) : 67-78.
- Park SY. Roles of mitochondrial dysfunction in tumor malignancy and progression. PhD [dissertation]. Pusan:Pusan University. 2011.
- Verdin E, Hirschev MD, Finley LW, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci.* 2010 ; 35(12) : 669-75. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.003>
- Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* 2013 ; 6 : 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamicsfusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics .* 2009 ; 18(R2) : 169-76.
- Michael PM. REVIEW ARTICLE How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009 ; 417 : 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Bei W. Mitochondrial activity and ROS generation, and their regulation through NAD+/NADH redox. Master [thesis]. Seoul: University of Seoul. 2016.
- Zhang N, Zhang Q, Xie L, Li C, Zhuang Z, Lin S, et al. Electroacupuncture and moxibustion regulate hippocampus glia and mitochondria activation in DSS-induced colitis mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020 ; 2020 : 2530253. <https://doi.org/10.1155/2020/2530253>
- Li H, Liu Y, Lin LT, Wang XR, Du SQ, Yan CQ, et al. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats. *Neurochem Int.* 2016 ; 92 : 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.12.001>
- Shin W, Lee YM, Kim WI, Choi DH, Kim MR, Youn DH, et al.



- Acupuncture of five-transport-points of the heart meridian in L-NAME-induced hypertensive rats. *Korean J Acupunct.* 2017 ; 34(1) : 56-69. <https://doi.org/10.14406/acu.2017.004>
22. Jang HS. The effects of manual acupuncture and laser acupuncture at LU11, LU9, and LU5 on ovalbumin-induced asthma in rats. PhD [dissertation]. Naju:Dongshin University. 2016.
23. Kim DH, Ryu YH, Hahm DH, Sohn BY, Shim IS, Kwon OS, et al. Acupuncture points can be identified as cutaneous neurogenic inflammatory spots. *Sci Rep.* 2017 ; 7(1) : 15214. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14359-z>