

태충혈과 삼음교혈의 침 자극이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 간 손상에 미치는 영향

김성진, 이윤규, 이현종, 김재수*

대구한의대학교 한의과대학 침구의학과



[Abstract]

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

Sung Jin Kim, Yun Kyu Lee, Hyun Jong Lee and Jae Soo Kim*

Dept. of Acupuncture & Moxibustion medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effect of LR3 and SP6 acupuncture on liver damage of streptozotocin-induced diabetic mice.

Methods : Male ICR mice were divided into four groups, consisting of the normal mice group(N), acupuncture-free diabetic mice group(Con), LR3-acupuncture diabetic mice group(LR3) and SP6-acupuncture diabetic mice group(SP6). The following measurements were taken: Body weight, food intake and water intake for 2 weeks; liver weight, and glucose levels in the serum and liver; ALT and AST in the serum; reactive oxygen species(ROS), reduced glutathione(GSH) and oxidized glutathione(GSSG) in the liver; and lastly, receptor for advanced glycation end-products(RAGE), N ϵ -carboxymethyl lysine(CML), N ϵ -carboxyethyl lysine(CEL), phosphorylation of inhibitory kappa B alpha(p-I κ B α), nuclear factor-kappa B(NF- κ B), activator protein-1(AP-1), cyclooxygenase-2(COX-2), inducible nitric oxide synthase(iNOS), tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), β -actin, cytochrome c and caspase in the liver.

Results : The liver weight and GSH/GSSG ratio were significantly increased in SP6 compared to Con. The glucose levels in the liver were significantly decreased in LR3 compared to Con. The generation of ROS and GSSG were significantly decreased in SP6 compared to Con. The expressions of RAGE, CML, AP-1, TNF- α , cytochrome c and caspase 3 were significantly decreased in LR3 compared to Con. The expressions of p-I κ B α , NF- κ B, AP-1, COX-2, iNOS and caspase 3 were significantly decreased in SP6 compared to Con.

Conclusion : It is predicted that LR3 acupuncture is related to reduced glucose levels in the liver and expressions of AGE, and that, SP6 acupuncture is related to reduced oxidative stress-related transcription factors and inflammation-related proteins. Therefore, we suggest that LR3 and SP6 acupuncture have protective effects on the liver of streptozotocin-induced diabetic mice by preventing apoptosis.

Key words :

LR3;
SP6;
Acupuncture;
Streptozotocin;
Liver damage;
Oxidative stress

Received : 2016. 07. 25.
Revised : 2016. 09. 05.
Accepted : 2016. 09. 08.
On-line : 2016. 09. 20.

* Corresponding author : Deptment 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

I. 서론

당뇨병은 인슐린 생성 분비장애와 말초조직에 대한 인슐린 저항에 의해 탄수화물, 지방 및 단백질 등의 생체 내 대사 기능의 이상을 초래하는 만성적인 대사성 질환이다. 1형 당뇨병은 자가 면역 기전에 의해 췌장 β 세포에 국소염증이 발생하고 이에 의해 β 세포의 선택적 파괴가 발생하여 인슐린 결핍을 특징으로 하는 질병이다. 2형 당뇨병은 인슐린 비의존성 당뇨병으로 인슐린 저항성과 이에 따른 인슐린의 상대적인 결핍이 원인으로 알려져 있다²⁾.

2013년 국민건강 영양조사에 따르면 만 30세 이상 연령의 당뇨병 유병률은 11%이며 70세 이상 연령의 남성은 22.5%, 여성은 31.3%가 당뇨병을 이환하는 것으로 나타났다³⁾. 유병률의 증가 원인은 노령인구의 증가, 소아비만, 서구화된 생활습관, 조기검진의 보편화 등으로 여겨진다⁴⁾.

당뇨병은 消渴, 皮膚癢癢, 燥, 風痺, 痿, 二陽病, 癰疽, 眼昏, 癩痛 등의 범주에 속하며, 이중 가장 근접한 병증은 消渴이다. 消渴은 인체 내부의 조절에서 기인된 소모성 만성질환으로 파악되었고, 다갈, 다식, 다뇨를 주 증상으로 제시하고 있는 병증으로 당뇨병을 포괄하고 있는 넓은 범위의 병증으로 이해할 수 있다^{5,6)}.

당뇨병에 대한 침치료 연구는 양지혈과 태백혈⁷⁾, 태백혈과 척중혈⁸⁾, 중원혈과 족삼리혈⁹⁾, 대포혈¹⁰⁾ 등이 있으며 혈당 강하와 장기 조직을 보호하는 효능이 있는 것으로 보고되어 있지만, 조직 세포를 보호하는 기전에 대한 생화학적 분석을 언급하는 연구는 적은 편이다¹¹⁾.

이에 본 연구에서는 당뇨병 및 합병증으로 유발되는 간손상에 대한 침 자극의 효과를 알아보기 위해 Streptozotocin(STZ)으로 유발한 제1형 당뇨쥐를 대상으로 태중혈과 삼음교혈에 2주간 침 자극을 시행한 후 체중, 사료 및 수분섭취량, 간 무게, 혈액 분석, 간 조직 내의 glucose, oxidative stress 관련 지표 및 전사인자, inflammation 관련 단백질, apoptosis 관련 단백질을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 ICR mice계의 수컷 6주령(효창 사이언스, 대구, 대한민국)을 사용하였다. 동물실 환경은 동물실험 가이드에 따라 온도 24 ± 2 °C, 습도 40~60%로 유지하고 밤낮을 12시간씩 조절하였다. 실험은 6주령의 쥐를 1주일간 사료(FORMULA M07, 제일 사료 주식회사, 경기도, 대한민국)와 수분을 공급하며 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리규정을 준수하여 시행하였다(DHU2014-036).

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, NF- κ B(NF- κ Bp65), AP-1으로 c-Jun을 사용하였다. iNOS, COX-2, TNF- α , cytochrome c, p-I κ B α , RAGE, histone, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, CML, CEL 항체는 COSMO BIO CO. Ltd.(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. Glucose, ALT, AST kit로는 Transaminase CII-Test를 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. Protease inhibitor mixture DMSO, solution ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), GSH와 GSSG는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.로부터 구입하여 사용하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Molecular Probes(Eugene, OR, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 군 분류

1주일간의 적응기를 거친 후 정상군(N)과 제 1형 당뇨병 모델을 유발하기 위해 STZ를 투여한 군으로 나누었다. STZ를 투여한 군은 다시 침 자극을 가하지 않은 대조군(Con), 태충혈에 침 자극을 가한 태충혈 침 자극군(LR3), 삼음교혈에 침 자극을 가한 삼음교혈 침 자극군(SP3)으로 나누었으며 STZ 투여 후 1주일 뒤의 체중과 혈당을 측정하여 비슷한 개체를 선별하여 군을 분류하였다. 실험동물은 각 군 별로 5마리씩 총 20마리를 사용하였다.

2) 침 자극

침 자극은 동물 아틀라스¹²⁾에 해당되는 경혈점을 찾아 펜으로 점을 찍고 양쪽 모두 자극하였다. 침 자극은 태충혈과 삼음교혈에 2주간 1일 1회 자극하였으며, 1회 0.2 mm 직자로 30초간 자극하였다. 자극 시 염전이나 기타 보사법은 시행하지 않았다. 태충혈과 삼음교혈의 침 자극 효과는 Con을 이용하여 비교하였다.

3) STZ 유발 1형 당뇨병 모델

1주일간의 적응기를 거친 후 STZ를 투여할 군에 STZ를 50 mM citrate buffer에 녹여 pH 4.5를 맞춘 뒤 150 mg/kg의 농도로 0.1 mg/kg을 복강 투여하였다. 투여 후 1주일 뒤 체중을 재고 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈청으로부터 혈당치를 측정하여 군 분류에 참고하였다.

4) 체중, 사료섭취량, 수분섭취량 및 장기 무게 측정

실험 과정 중 물과 사료는 자유롭게 공급하였으며, 침 자극을 시작한 뒤부터 체중과 사료섭취량, 수분섭취량은 매일 1회 각각 측정하였다. 2주간의 침 자극 후 최종일에는 12 시간 동안 절식시킨 뒤에 에테르로 마취시켜 개복하였으며 심장에서 혈액을 채취한 후 생리식염수로 관류하였다. 그 다음 간 조직을 적출하여 무게를 측정하였으며, 간의 무게(g)를 체중(100 g)으로 나눈 값을 사용하였다. 측정 후 간 조직을 생리식염수에 세척하고 수분을 제거한 후, 액체 질소에 바로 동결시켜 -80°C deep freezer에 보관하였다.

5) 혈청 분석

심장에서 채혈한 혈액을 3,000 rpm 원심분리하여 혈청을 얻었다. Glucose assay kit는 제작사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)의 프로토콜에 따라 측정하

였다. 간 기능을 측정하는 ALT와 AST는 제작사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)의 kit를 사용하여 측정하였다.

6) 간 조직 내의 glucose 함량 측정

간에 있어서 glucose의 축적 정도를 측정하기 위해 간 조직을 0.9 % NaCl buffer를 이용하여 분쇄한 후 0.15 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 과 5 % ZnSO_4 를 사용하여 단백질을 제거하며 $1,670 \times \text{g}$ 으로 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 샘플로 이용하며 glucose kit를 사용하여 측정하며, 측정값은 흡광도 기계를 사용하여 산출하여 계산하였다.

7) 간 조직 내의 ROS 생성량 측정

침 자극군의 ROS 변화를 확인하기 위해 ICR mice에 2주일간 침 자극 후 간 조직을 적출하였다. 간 조직의 ROS 측정은 조직을 1 mM EDTA -50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 분쇄한 후 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후 형광 광도계를 이용하여 매 10분씩 emission wavelength of 486 nm와 excitation wavelength of 53 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출값을 계산하였다.

8) 간 조직 내의 GSH, GSSG 생성량 측정

간 조직을 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 분쇄한 후 25 % metaphosphoric acid를 혼합하였다. 혼합액을 4°C , 16,000 rpm, 30분 원심분리하여 얻은 상층액으로 GSH, GSSG를 측정하였다. GSH assay는 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가 후 o-phthalaldehyde를 넣었다. 실온에 20분 동안 incubation 후 형광 광도계를 이용하여 excitation wavelength 360 nm, emission wavelength 460 nm를 이용하여 측정하였다. GSSG assay는 NEM을 넣고 20분 동안 실온에서 incubation 하였다. 0.1M NaOH와 o-phthalaldehyde를 첨가하였다. 실온에 20분 동안 incubation 후 형광 광도계를 이용하여 excitation wavelength 360 nm, emission wavelength 460 nm를 이용하여 측정하였다.

9) Cytosol extract

간 조직을 100 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 homogenate buffer에 얼음으로 차갑게 하여 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 미토콘

드리아 침전물을 얻기 위해 4 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 얻어 -80 °C에서 냉동 보관하였다.

10) Nuclear extract

간 조직을 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 cocktail을 첨가한 500 μ l hypotonic buffer A에 넣어 차가운 상태에서 tissue grinder(Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 10 % NP-40 용액 62.5 μ l를 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 pelleted nuclei를 10 % NP-40가 더해진 buffer A에 한 번 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, 10 % glycerol)를 첨가해 재부유시킨 뒤 10분마다 vortex을 3번 한 후 4 °C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 핵단백질을 포함한 상층액을 얻어 -80 °C에서 냉동 보관하였다.

11) Western blot analysis

간 조직 Cytosol fraction의 RAGE, CML, CEL, p-I κ B α , NF- κ Bp65, AP-1, COX-2, iNOS, TNF- α , β -actin, cytochrome c, Nuclear fraction Histone 단백질의 발현을 측정하기 위해 10 μ g의 단백질을 8~15 % 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 1시간 동안 blocking처리한 후 TBS-T로 5분마다 5회 세척하였다. 준비된 membrane에 각각의 1차 항체를 처리하여 4 °C에서 overnight시킨 다음 TBS-T로 10분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체(TBS-T로 1 : 5000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 30분간 반응시킨 후, TBS-T로 10분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액을 GE Healthcare(Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후 Sensi-Q2000 Chemidoc(Lugen Sci Co., Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Den-sitograph Software(ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

12) 통계처리

실험결과는 평균과 표준오차(mean \pm S.E.)로 표기하

였으며, SPSS 18.0 for Windows program을 사용하여 one-way analysis of variance(ANOVA)로 유의수준 p -value < 0.05에서 검정한 후에 사후검정을 Dunnett test로 하였다.

III. 결과

1. 체중 변화

Con은 N에 비해 유의성 있게 낮았으며(## p < 0.01), LR3과 SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Table 1).

2. 사료섭취량

Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(# p < 0.05), LR3과 SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Table 1).

3. 수분섭취량

Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(## p < 0.01), LR3과 SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Table 1).

4. 간 무게 분석

실험 후 장기 적출을 통해 간의 무게를 측정한 결과, N은 6.02 \pm 0.29 g/100 g, Con은 4.95 \pm 0.27 g/100 g, LR3 5.86 \pm 0.66 g/100 g, SP6은 6.41 \pm 0.49 g/100 g으로 나타났다.

Con은 N에 비해 유의성 있게 감소하였고(# p < 0.05), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 증가하였다(* p < 0.05)(Table 2).

5. 혈액 생화학적 분석

실험 후 혈청 내 glucose는 N은 93.6 \pm 0.6 mg/dl, Con

Table 1. The Amount of Body Weight, Food Intake and Water intake for Two Weeks

Group	Body weight(g)		Food intake(g)		Water intake(g)	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
N	38.41 ±	38.99 ±	5.64 ±	5.68 ±	8.67 ±	8.02 ±
	0.75	0.74	0.25	0.22	0.49	0.72
Con	33.09 ±	33.71 ±	12.65 ±	10.83 ±	57.72 ±	48.65 ±
	1.56 ^{##}	1.10 ^{##}	0.82 [#]	0.62 [#]	3.48 ^{##}	2.13 ^{##}
LR3	32.74 ±	32.39 ±	10.77 ±	9.18 ±	51.83 ±	43.97 ±
	0.38	0.61	8.21	0.85	2.89	2.26
SP6	32.83 ±	32.83 ±	14.89 ±	12.35 ±	56.67 ±	50.35 ±
	0.47	0.51	2.23	2.07	4.34	2.42

All datum are expressed as means ± S.E.
[#]*p* < 0.05, ^{##}*p* < 0.01 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.
 N: Normal mice group.
 Con: No acupuncture diabetic mice group.
 LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.
 SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

Table 2. The Liver Weight

Liver weight	N	Diabetic mice		
		Con	LR3	SP6
Liver weight (g/100 g B.W.)	6.02 ± 0.29	4.95 ± 0.27 [#]	5.86 ± 0.66	6.41 ± 0.49 [*]

All datum are expressed as means ± S.E.
[#]*p* < 0.05 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.
^{*}*p* < 0.05 compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.
 N: Normal mice group.
 Con: No acupuncture diabetic mice group.
 LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.
 SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

Table 3. The Hematological Analyses

Group	Glucose(mg/dl)		ALT(IU/l)	AST(IU/l)
	Initial	Final		
N	80.2 ± 6.3	93.6 ± 0.6	15.95 ± 1.04	77.10 ± 5.54
Con	275.0 ± 16.1 ^{##}	295.7 ± 78.1 ^{##}	347.50 ± 90.79 [#]	947.88 ± 179.10 ^{##}
LR3	276.0 ± 2.89	178.2 ± 29.5	233.47 ± 18.29	872.82 ± 87.42
SP6	274.8 ± 9.7	283.8 ± 0.5	248.94 ± 67.40	822.80 ± 323.35

All datum are expressed as means ± S.E.
[#]*p* < 0.05, ^{##}*p* < 0.01 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.
 N: Normal mice group.
 Con: No acupuncture diabetic mice group.
 LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.
 SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

은 295.7 ± 78.1 mg/dl, LR3은 178.2 ± 29.5 mg/dl, SP6
 은 283.8 ± 0.5 mg/dl로 나타났다. Con은 N에 비해 glu-

cose가 유의성 있게 증가하였다(^{##}*p* < 0.01). LR3과 SP6
 은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Table 3).

Table 4. The effects of glucose levels in liver

Liver weight	N	Diabetic mice		
		Con	LR3	SP6
Liver weight (mg/mg protein.)	2.00 ± 0.09	3.95 ± 0.79 ^{##}	1.93 ± 0.09 [*]	3.36 ± 0.50

All datum are expressed as means ± S.E.

^{##}*p* < 0.01 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.

^{*}*p* < 0.05 compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.

혈청 내 ALT는 N은 15.95 ± 1.04 IU/l Con은 347.50 ± 90.79 IU/l, LR3은 233.47 ± 18.29 IU/l, SP6은 248.94 ± 67.40 IU/l로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*#p* < 0.05), LR3과 SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다.(Table 3).

혈청 내 AST는 N은 77.10 ± 5.54 IU/l, Con은 947.88 ± 179.10 IU/l, LR3은 872.82 ± 87.42 IU/l, SP6은 822.80 ± 323.35 IU/l로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*##p* < 0.01), LR3과 SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Table. 3).

6. 간 조직 내의 glucose 함량 측정

N은 2.00 ± 0.09, Con은 3.95 ± 0.79, LR3은 1.93 ± 0.09, SP6은 3.36 ± 0.50으로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*##p* < 0.01), LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(**p* < 0.05). SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Table 4).

7. 간 조직 내의 oxidative stress 관련 지표 생성량

1) ROS 생성량

N은 244.90 ± 6.20 nmol/ml, Con은 405.74 ± 25.82 nmol/ml, LR3은 357.05 ± 24.32 nmol/ml, SP6은 338.8 ± 15.38 nmol/ml로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*###p* < 0.001) SP6은 Con에 비해서 유의성 있게 감소하였다(**p* < 0.05)(Fig. 1).

2) GSH 생성량

N은 16.65 ± 0.19 μ mol/mg, Con은 14.79 ± 0.99 μ mol/mg, LR3은 17.38 ± 0.94 μ mol/mg, SP6은 16.58 ± 0.28 μ mol/mg로 나타났다 네 군 사이에는 유의성 있는 차이는 없

었다(Fig. 1).

3) GSSG 생성량

N은 3.16 ± 0.09 μ mol/mg, Con은 8.59 ± 0.44 μ mol/mg, LR3은 7.91 ± 1.71 μ mol/mg, SP6은 4.65 ± 0.37 μ mol/mg로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*###p* < 0.001) SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(****p* < 0.001)(Fig. 1).

4) GSH/GSSG ratio

N은 5.28 ± 0.13, Con은 1.72 ± 0.07, LR3은 2.70 ± 0.47, SP6은 3.64 ± 0.32로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 감소하였고(*###p* < 0.001), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 증가하였다(***p* < 0.01)(Fig. 1).

8. 간 조직 내의 최종 당화 산물 관련 단백질의 발현량

1) RAGE 발현량

N은 1.00 ± 0.00, Con은 1.19 ± 0.04, LR3은 0.96 ± 0.04, SP6은 1.17 ± 0.10으로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*##p* < 0.01) LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(***p* < 0.01). SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 2).

2) CML 발현량

N은 1.00 ± 0.23, Con은 2.82 ± 0.60, LR3은 1.14 ± 0.30, SP6은 1.59 ± 0.21로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(*#p* < 0.05), LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(**p* < 0.05). SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 2).

3) CEL 발현량

N은 1.00 ± 0.22, Con은 1.56 ± 0.20, LR3은 1.23 ± 0.09, SP6은 1.63 ± 0.08로 나타났다. Con은 N에 비해 증

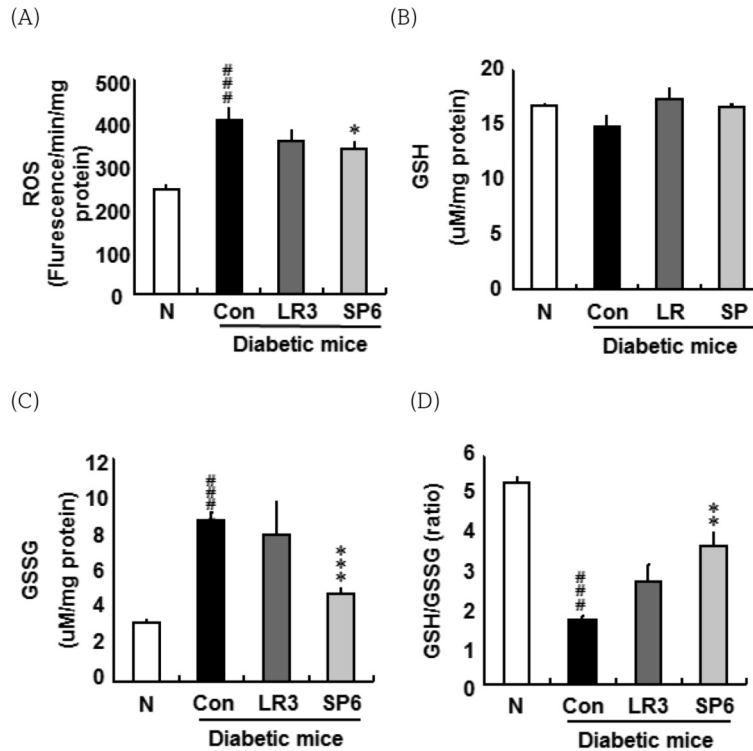


Fig. 1. The generation of oxidative stress-related indicator in the liver

(A) reactive oxygen species(ROS), (B) reduced glutathione(GSH), (C) oxidized glutathione(GSSG), (D) GSH / GSSG ratio.

The GSH / GSSG ratio were calculated with the formula(= GSH/GSSG × 1).

###*p* < 0.001 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.

p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.

N: Normal mice group.

Con: No acupuncture diabetic mice group.

LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.

SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

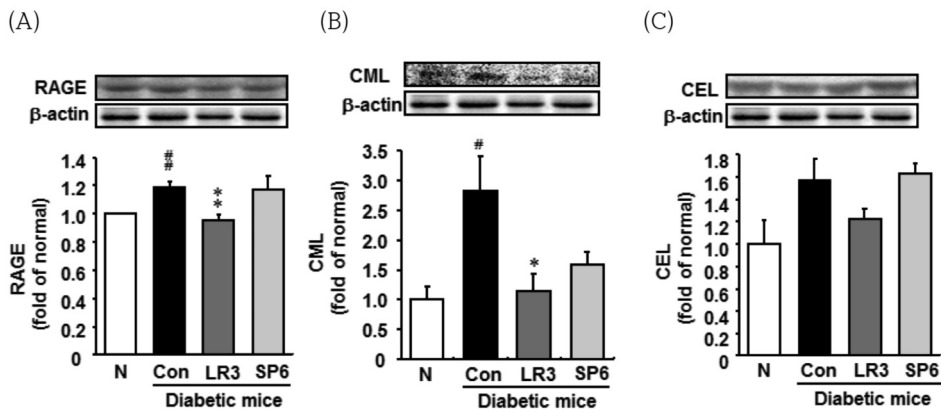


Fig. 2. The expression of advanced glycation endproducts(AGE)-related protein in the liver

(A) receptor for advanced glycation endproducts(RAGE), (B) Nε-(carboxymethyl) lysine(CML), (C) Nε-(carboxyethyl) lysine(CEL).

#*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.

p* < 0.05, *p* < 0.01 compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.

N: Normal mice group.

Con: No acupuncture diabetic mice group.

LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.

SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

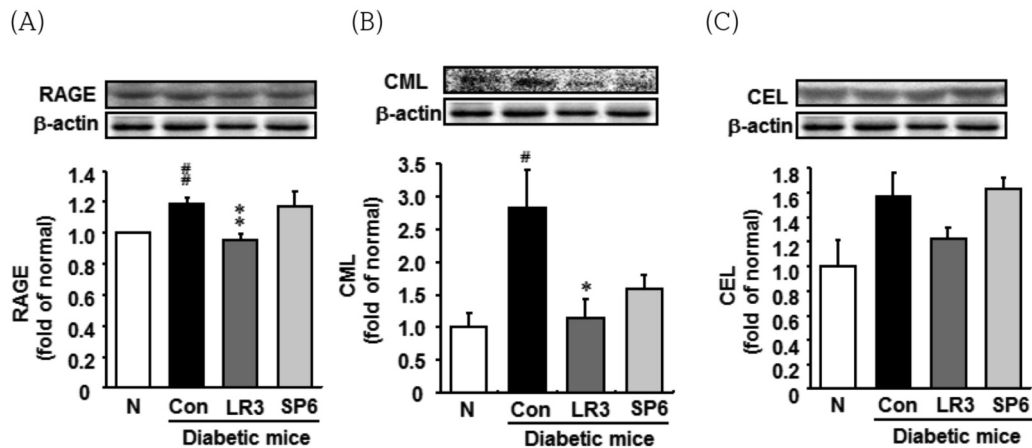


Fig. 3. The expression of inflammation-related transcription factor in the liver

(A) phosphorylation of inhibitory kappa B alpha (p-I κ B α), (B) nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ B p65), (C) activator protein 1 (AP-1).
$p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.

N: Normal mice group.

Con: No acupuncture diabetic mice group.

LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.

SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

가하였으나 유의성은 없었다. LR3과 SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 2).

9. 간 조직 내의 oxidative stress 관련 전사인자 발현량

1) p-I κ B α 발현량

N은 1.00 ± 0.10 , Con은 1.88 ± 0.10 , LR3은 1.71 ± 0.05 , SP6은 0.95 ± 0.22 로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(### $p < 0.001$), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(* $p < 0.05$). LR3은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 3).

2) NF- κ B 발현량

N은 1.00 ± 0.06 , Con은 1.47 ± 0.11 , LR3은 1.37 ± 0.03 , SP6은 1.04 ± 0.05 로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(## $p < 0.01$), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(* $p < 0.05$). LR3은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 3).

3) AP-1 발현량

N은 1.00 ± 0.15 , Con은 1.69 ± 0.03 , LR3은 $1.06 \pm$

0.06 , SP6은 1.40 ± 0.03 로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(## $p < 0.01$), LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였으며(** $p < 0.001$), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(** $p < 0.001$)(Fig. 3).

10. 간 조직 내의 염증 관련 단백질 발현량

1) COX-2 발현량

N은 1.00 ± 0.18 , Con은 1.81 ± 0.08 , LR3은 1.62 ± 0.16 , SP6은 1.43 ± 0.00 로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(## $p < 0.01$), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(** $p < 0.01$). LR3은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 4).

2) iNOS 발현량

N은 1.00 ± 0.04 , Con은 2.46 ± 0.47 , LR3은 1.68 ± 0.39 , SP6은 0.97 ± 0.17 로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(# $p < 0.05$), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(* $p < 0.05$). LR3은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 4).

3) TNF- α 발현량

N은 1.00 ± 0.12 , Con은 1.63 ± 0.12 , LR3은 $1.03 \pm$

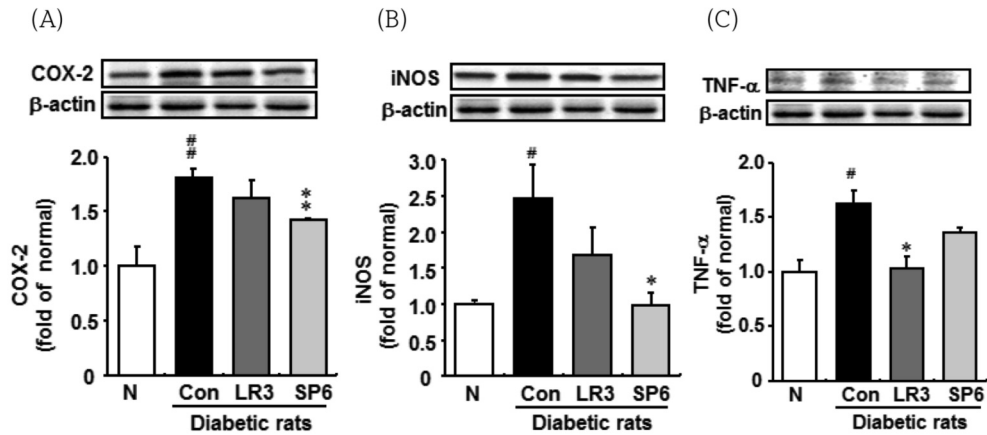


Fig. 4. The expression of inflammation-related protein in the liver

(A) cyclooxygenase-2(COX-2), (B) inducible nitric oxide synthase(iNOS), (C) interleukin-1 beta(IL-1β).

#*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.

p* < 0.05, *p* < 0.01 compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.

N: Normal mice group.

Con: No acupuncture diabetic mice group.

LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.

SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

0.12, SP6은 1.37 ± 0.05로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(#*p* < 0.05), LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(**p* < 0.05). SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 4).

11. 간 조직 내의 apoptosis 관련 단백질 발현량

1) cytochrome c 발현량

N은 1.00 ± 0.03, Con은 1.40 ± 0.11, LR3은 1.07 ± 0.00, SP6은 1.16 ± 0.08로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(**p* < 0.05), LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(**p* < 0.05). SP6은 Con에 비해 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 5).

2) caspase 3 발현량

N은 1.00 ± 0.03, Con은 1.78 ± 0.30, LR3은 0.90 ± 0.07, SP6은 1.12 ± 0.02로 나타났다. Con은 N에 비해 유의성 있게 증가하였고(**p* < 0.05). LR3은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였으며(**p* < 0.05), SP6은 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다(**p* < 0.05) (Fig. 5).

IV. 고찰

당뇨병은 가장 흔한 대사성 질환으로 인체 내 인슐린의 절대량이 부족하거나 기능이 떨어지면 고혈당 상태가 지속되고 신부전, 케톤산증, 심장질환, 뇌혈관질환 등의 심각한 합병증들을 유발할 수 있다^{4,13}.

당뇨병의 대사 특징으로 인하여 세포 내로 흡수되지 못한 포도당은 체내에 고혈당을 유발하게 된다. 포도당이 신장에서 재흡수되지 못하고 소변으로 배출되는데, 체내수분을 같이 끌고 체외로 배출되기 때문에 소변량이 증가하여 다뇨 증상이 나타난다. 이로 인해 체내 수분의 손실이 증가하면, 이를 보상하기 위해 수분섭취량이 증가한다. 그리고 혈액 내 혈당은 높지만 세포 내에서는 이용하지 못하여 에너지 부족현상이 초래되고 이로 인해 다식한다^{4,15}.

한의학에서 당뇨병은 消渴의 범주에 해당하며 진행 단계에 따라 上消, 中消, 下消로 나눈다. 上消는 肺, 心의 질환으로 胃와 肺의 津液이 부족하여 나타나는 것으로 보고 표적 장부의 津液을 보충하는 것으로 標治, 脾의 津液 공급과 기능의 정상화 및 腎陰을 회복시키는 것을 치료의 기본으로 한다. 中消는 肝의 疏泄 기능과 脾의 運化 기능이 감소하였기 때문에 胃熱을 내리고 肝, 脾의 기능을 정상화하는 것을 목표로 한다. 下消는 腎의 明門火가 쇠하여 기화작용이 상실되고 腎陰이 허하여 肝의 疏泄 기능이 상실

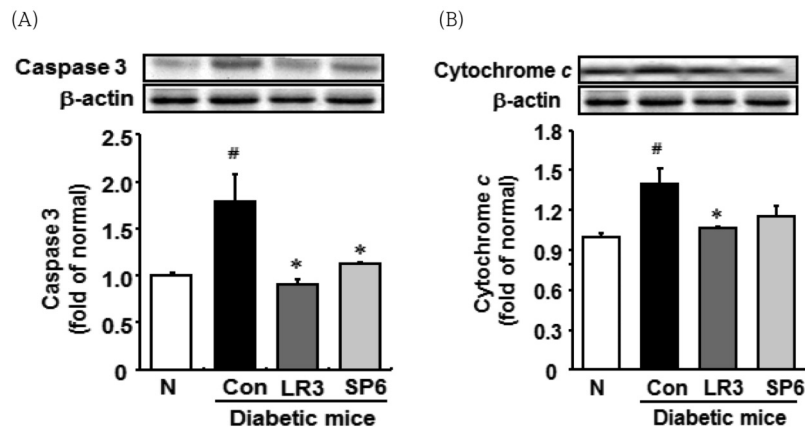


Fig. 5. The expression of apoptosis-related protein in the liver

(A) caspase, 3 (B) cytochrome c.
[#]*p* < 0.05 compared to N by ANOVA followed by Dunnett's test.
^{*}*p* < 0.05 compared to Con by ANOVA followed by Dunnett's test.
 N: Normal mice group.
 Con: No acupuncture diabetic mice group.
 LR3: LR3-acupuncture diabetic mice group.
 SP6: SP6-acupuncture diabetic mice group.

된 것이다. 치료는 肝腎陰과 明門火를 회복하여 腎의 기능을 회복한다^{4,11,15}.

당뇨병의 침치료혈에는 태충혈, 삼음교혈을 비롯하여 족삼리혈, 비수혈, 위수혈, 중완혈, 신수혈, 수구혈 등이 활용되고 있으며, 태충혈¹⁶은 足厥陰肝經의 原穴로 肝經은 屬肝하고, 疏泄下焦濕熱, 通絡活血, 舒肝理氣의 穴性이 있다. 태충혈에 대한 연구는 간독성으로 인한 간 손상에 대한 보호효과¹⁷, 파킨슨 환자에 대한 효과¹⁸ 등이 있다. 삼음교혈¹⁶은 足太陰脾經의 經혈로 足太陰經, 足少陰經, 足厥陰經이 交會하고, 補脾土, 調運化, 通氣滯, 疏下焦, 祛經絡風濕의 穴性이 있다. 삼음교혈에 대한 연구는 자궁운동에 대한 영향¹⁹ 등이 있다.

당뇨병과 합병증에 대한 침치료 연구를 구체적으로 살펴보면 Shi L 등²⁰은 족삼리혈의 전침 자극이 당뇨쥐에서 NF-κ B의 활성을 억제하는 효과가 있다고 하였다. Jiang YL 등²⁰은 간수혈, 비수혈, 신수혈의 침 자극이 지질과산화물을 감소시켜 당뇨쥐에 대한 보호효과가 있다고 하였다. Cornejo-Garrido J 등²²은 당뇨쥐에서 비수혈에 대한 레이저 침 자극이, Lee YC 등²³은 족삼리혈에 대한 전침 자극이 혈당 강하 효과가 있다고 하였다. Nakamura H 등²⁴은 2형 당뇨쥐에 대하여 중완혈, 기해혈, 천추혈, 간수혈, 비수혈, 신수혈의 침 자극이 혈당 강하 효과가 있다고 하였다. 이 등⁷은 STZ로 유발한 당뇨 모델 쥐에서 양지혈이 혈당 조절에 유의한 효과가 있으며 양지혈과 태백혈의 자침

이 간 조직에 형태적인 변화를 유발했다고 보고하였다. 김⁸은 STZ로 유발한 흰쥐 모델에서 태백혈과 척중혈에 침 자극을 하는 연구에서 혈당 및 지질 억제 효과, 췌장 및 간세포의 보호 및 재생에 대한 효과를 보고하였다. 강 등⁹은 2형 당뇨 모델 흰쥐에서 중완혈과 족삼리혈의 자침이 손상된 β세포를 회복하고 인슐린 분비를 촉진하여 혈당을 강하시키는 효과가 있다고 보고하였다. 박 등¹⁰은 대포혈에 대한 침 자극이 당뇨병 환자의 혈당에 미치는 영향에 대한 연구를 진행하였다. 하지만 상기한 연구들에서 혈당 강화와 세포 보호 효과에 대한 기전 연구는 부족하였다.

최근 oxidative stress는 당뇨병과 합병증이 발생하는 근본적인 원인으로 가장 주목받고 있으며 STZ로 유발한 동물 모델을 통해 연구가 진행되고 있다. oxidative stress는 free radical에 의해서 나타나는 반응으로 free radical은 glucose의 autoxidation, 효소 당화 산물, 비효소 당화 산물 등에 의해 증가된다. oxidative stress와 free radical이 증가하면서 항산화 방어능이 감소되고, 지속적으로 진행되면 간의 섬유화, 간경화 등의 손상을 일으키는 것으로 연구되고 있다²⁵⁻²⁸.

한방에서도 oxidative stress와 염증 관련 지표를 사용하여 염증발현과 조직 보호 효과를 분석하는 경향이 나타나고 있으나, 보고된 연구 수가 적다. 따라서 당뇨병 상태의 간 조직에서 태충혈과 삼음교혈의 침 자극에 따른 간 보호 효과를 oxidative stress 기전을 중심으로 조사하였다.

실험군과 대조군을 STZ로 유발하고 실험군은 각각 태충혈과 삼음교혈에 침 자극을 시행하였다.

2주간의 실험 후 ICR mice의 체중, 사료섭취량, 수분섭취량을 분석한 결과, 태충혈과 삼음교혈의 침 자극이 다식, 다음 등의 기본적인 증상에 대한 개선 효과는 없는 것으로 추정된다.

간 무게를 분석한 결과, 삼음교혈 침 자극은 간 조직에 대한 보호 효과가 있을 것으로 추정된다.

간 조직 내의 혈당 강화 효과를 알아보기 위해 간 조직 내의 glucose를 측정된 결과, 태충혈 침 자극은 간 조직 내의 혈당을 강하하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

간 조직 내의 oxidative stress 정도를 측정하기 위해 ROS, GSH, GSSG, GSG / GSSG ratio를 측정하였다. 고혈당 상태는 단백질과 지질의 당화를 증가시키는 주요 원인으로 이는 차례로 ROS를 증가시킨다. ROS는 각종 free radical을 총칭하며 정상적인 세포대사 과정에서 생성되고 일반적인 상태에서는 GSH, superoxide 등의 인체의 항산화 방어 물질에 의해 조절된다. 하지만 당뇨병에서는 ROS가 쉽게 증가하고 항산화 방어기전이 손상되어 oxidative stress가 증가하며, 이는 세포 손상을 일으킬 수 있다^{26,29,30}.

GSH는 세포 내의 oxidative stress에 대한 방어작용을 하며 주로 간에서 합성되어 전신에 널리 분포한다. GSH는 glutathione peroxidase에 의해 free radical의 하나인 과산화수소를 대사하면서 산화형 glutathione인 GSSG로 전환되고 GSSG는 glutathione reductase에 의하여 다시 GSH로 환원되어 free radical로부터 세포를 보호한다. GSSG의 형성은 free radical 생성의 유용한 정량적 지표가 되며 지질과산화 정도나 조직 손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있다. 따라서 GSH / GSSG ratio는 조직 세포 내의 산화환원반응과 해독작용 상태의 평가에 중요하다^{26,27,30}.

간 조직 내의 ROS, GSH, GSSG, GSG / GSSG ratio를 분석한 결과, 삼음교혈 침 자극은 간 조직 내의 항산화 기전을 상승시키고, oxidative stress를 감소시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

간 조직 내의 AGE와 관련된 단백질을 분석하기 위해서 RAGE, CML, CEL을 측정하였다. Glucose와 같은 환원당은 비효소적으로 단백질의 아미노기에 작용하여 당화를 일으키며, 재배열과 상호작용을 거치면서 최종 당화 산물인 AGE가 생성된다. AGE는 RAGE와 상호작용하여 ROS를 증가시키고 oxidative stress를 유발한다. CML은 AGE의 대표적 물질로서 AGE를 측정하는 지표로 사용되며 CEL은 CML과 화학적으로 동종의 물질로서 사용된

다^{29,32,33}.

간 조직 내의 RAGE, CML, CEL을 분석한 결과, 태충혈 침 자극은 AGE의 생성을 감소시키고 AGE와 RAGE의 상호작용을 감소하는 효과가 있을 것으로 나타났다. 이는 태충혈 침 자극이 간 조직 내의 혈당을 강하하는 효과와 연관이 있을 것으로 사료된다.

간 조직 내의 oxidative stress와 관련된 전사인자를 분석하기 위해 p-I κ B α , NF- κ B, AP-1를 측정하였다. NF- κ B는 염증, 면역, apoptosis 등에 관련된 여러 단백질들의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. NF- κ B는 I κ B α 에 결합된 상태로 세포질에 격리되어 있으나 세포 자극에 의해서 I κ B α 는 급격히 인산화되며 NF- κ B는 자유기 상태로 세포핵으로 전좌되어 다양한 유전자의 발현을 조절한다. ROS를 비롯하여 다양한 free radical이 oxidative stress를 증가시키고 NF- κ B를 활성화시키는 대표적인 유발 요인이다^{34,35}.

간 조직 내의 p-I κ B α , NF- κ B를 분석한 결과, 삼음교혈 침 자극은 항산화 기전을 상승시키고 oxidative stress를 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 I κ B α 의 인산화를 감소시켜서 NF- κ B의 활성화를 억제하는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.

AP-1은 Fos, Jun, Fra로 구성된 동형이량체 또는 이형이량체로서 세포 내의 oxidative stress, 산화 환원 정도와 연관되어 있으며, TNF- α , iNOS 등을 포함한 유전자의 표현과 연관되어 조절을 하는 전사인자이다. AGE와 RAGE의 상호작용으로 인해 JNK가 활성화되며, 활성화된 JNK는 AP-1을 활성화한다^{36,37}.

간 조직 내의 AP-1을 분석한 결과, 태충혈 침 자극이 AGE의 생성을 감소시키고 RAGE와 AGE의 상호작용을 억제하여 JNK의 활성화를 감소시키는 것으로 사료된다.

간 조직 내의 염증 관련 단백질을 분석하기 위해 iNOS, COX-2, TNF- α 를 측정하였다. COX-2와 iNOS는 염증을 촉진하는 물질로 잘 알려져 있으며 NF- κ B에 의해서 발현된다. COX-2는 염증반응을 조절하는 주요 인자로 다양한 조직에서 발현되고 염증반응을 확장시키는 역할을 한다. iNOS는 nitric oxide를 다량 생성하며 nitric oxide는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 유발시켜 조직의 손상을 유발한다³⁶.

간 조직 내의 COX-2와 iNOS를 분석한 결과, 삼음교혈 침 자극은 NF- κ B의 활성화를 억제하여 COX-2와 iNOS의 활성을 감소시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

TNF- α 는 염증에 관련되어 광범위한 활성을 나타내는 대표적인 cytokine으로 각종 염증, apoptosis의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 류

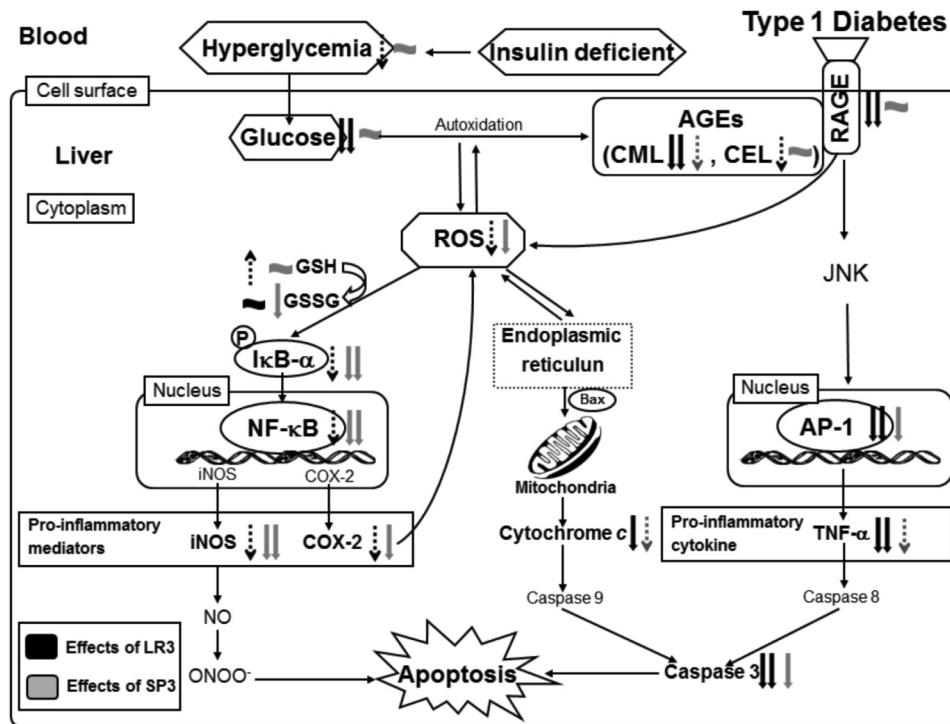


Fig. 6. The protective effects and mechanisms of LR3 and SP6 acupuncture on liver damage

마토이드 질환 등 자가면역질환에 있어서 염증의 개시와 유지에 핵심 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{35,36}.

간 조직 내의 TNF- α 를 분석한 결과, 태충혈 침 자극은 cytokine으로 유발되는 염증반응을 억제하고 apoptosis에 영향을 끼쳐서 간 조직을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

간 조직 내의 apoptosis 관련 단백질을 분석하기 위해 cytochrome c와 caspase 3을 측정하였다. caspase는 시스테인 단백질 분해 효소로서 apoptosis에서 중요한 역할을 한다. apoptosis의 일반적인 두 가지 경로는 내인성 경로와 외인성 경로이다. 외인성 경로는 caspase 8이 활성화되고 다시금 caspase 3이 활성화되어 apoptosis를 유도한다. 특히 TNF- α 는 직접적으로 caspase 8을 활성화할 수 있다고 알려져 있다. caspase 3을 활성화시키는 다른 경로는 미토콘드리아에 의한 내인성 apoptosis 경로이다. oxidative stress가 증가하면 미토콘드리아의 내막에 손상이 발생하고 Bax는 미토콘드리아의 내막에서 cytochrome c의 분비를 증가시킨다. 세포질 밖으로 방출된 cytochrome c는 apoptosis를 매개하는 caspase 9를 활성화하고 caspase 9는 caspase 3을 활성화한다. 이러한 경로는 고혈당 상태의 mesangial cell에서 활성화되는 것

으로 알려져 있다³⁸⁻⁴⁰.

간 조직 내의 cytochrome c, caspase 3을 분석한 결과, 태충혈 침 자극은 AP-1과 TNF- α 의 분석 결과와 연관해서 TNF- α 에서 caspase 3으로 이어지는 외인성 apoptosis 경로에 작용하는 것으로 사료된다. 또한 미토콘드리아에 의한 내인성 apoptosis에 대해서도 방어 효과가 있는 것으로 사료된다. 삼음교혈 침 자극도 caspase 3에 의한 apoptosis를 억제하는 효과가 있을 것으로 사료되지만 cytochrome c 및 TNF- α 의 분석 결과에서 유의성이 없었기 때문에 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과로 태충혈과 삼음교혈의 침 자극이 STZ로 유발된 당뇨쥐에 미치는 영향을 살펴본 결과 태충혈 침 자극은 간 조직 내의 glucose를 강하시키는 효능이 있고, AGE 생성을 감소시키고 RAGE와의 작용을 감소시켜서 AP-1, TNF- α , cytochrome c, caspase 3의 활성화를 억제한다. 따라서 태충혈은 간 조직의 apoptosis를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다. 삼음교혈 침 자극은 고혈당 상태에서 oxidative stress와 관련된 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제하고 oxidative stress를 감소시켜 항산화 방어기전을 상승시키는 효과가 있다. 따라서 삼음

교혈은 간 조직 내의 inflammation의 생성을 낮춰서 세포의 손상 및 apoptosis를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다(Fig. 6).

사인자와 염증 관련 단백질을 감소시키고 oxidative stress의 생성을 감소시켜, 간 조직의 세포 손상 및 apoptosis를 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 결론

태충혈과 삼음교혈이 STZ으로 유발한 당뇨쥐의 간 손상에 대한 영향을 알아보기 위해 N, Con, LR3, SP6로 나누어 2주간 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 간 무게 분석 결과, Con은 N에 비해 유의성 있게 감소하였고 SP6은 Con에 비해 유의성 있게 증가하였다.
2. 간 조직 내의 glucose 분석 결과, LR3이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다.
3. 간 조직 내의 ROS와 GSSG는 SP6이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였으며 GSH / GSSG ratio는 SP6이 Con에 비해 유의성 있게 증가하였다.
4. 간 조직 내의 RAGE와 CML은 LR3이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다.
5. 간 조직 내의 p-I κ B α 와 NF- κ B는 SP6이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다. AP-1은 LR3과 SP6이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였으며 LR3에서 더 많이 감소하였다.
6. 간 조직 내의 COX-2와 iNOS는 SP6이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다. TNF- α 는 LR3이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다.
7. 간 조직 내의 cytochrome c는 LR3이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였다. caspase 3은 LR3과 SP6이 Con에 비해 유의성 있게 감소하였으며 LR3에서 더 많이 감소하였다.

이상의 결과로 STZ로 유발된 당뇨쥐에서 태충혈 침 자극은 간 조직 내의 혈당을 강하하고 당화산물의 생성을 억제하여 간 조직의 apoptosis를 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 삼음교혈 침 자극은 oxidative stress 관련 전

VI. References

1. Nokoff N, Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 ; 1(1) : 1-15.
2. Seo SH, Kim YS, Han YH. The effects of Hirudo on streptozotocin-induced diabetic nephropathic rats. *Korean J Oriental Med.* 2008 ; 29(4) : 133-45.
3. Statics Korean. Korea national health and nutrition examination survey. 2013. [cited 2014 Sep 25] Available from: URL: https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_04.do
4. Moon S, Jin WJ, Kim HY, Yang CH, Kim MR. The recent research trends of acupuncture for the treatment of diabetes mellitus. *Korean J East-West Med.* 2013 ; 38(2) : 13-20.
5. Yu DJ, Yoon GM, Kang SB. Effects of Hwangryungeehwang-tang Aqueous extracts on streptozotocin-induced diabetic rat. *Korean J Orient Int Med.* 2011 ; 32(2) : 288-300.
6. Lee YK, Kang SB. The effects of Gamioryung-san extracts on streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. *Korean J Orient Int Med.* 2012 ; 33(4) : 367-86.
7. Lee MO, Na CS, Youn DH, Cho MR. Effect of acupuncture at TE4, SP3 and TE4+SP3 in hyperglycemia rats induced by streptozotocin. *Korean J Acupuncture.* 2007 ; 24(1) : 95-111.
8. Park HJ, Kim JS. Effects of SP3 and GV6 acupuncture on the STZ-treated rats for induction of diabetes. *Korean J Electron Microscopy.* 2006 ; 36(4) : 279-89.
9. Kang MK, Nam SS, Lee YH, Kim YS. Effects of CV12 and ST36 acupuncture on glucose metabolism and protection of pancreatic beta cells in neonatal-streptozotocin model. *The Acupunct.*

- 2008 ; 25(2) : 91–103.
10. Park JY, Yoo CK, Han JS, Kim HS, Lee YH, Park HS. The effects of acupuncture at Taepo(SP21) on serum glucose and urine glucose in diabetic patient. *The Acupunct.* 2002 ; 19(1) : 1–10.
 11. Oh TW, Kang SY, Park YK. Histological analysis of five organs in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Herbology.* 2013 ; 28(6) : 39–45.
 12. Koo ST, Kim SK, Kim EH et al. Acupuncture Point Locations for Experimental Animal Studies in Rats and Mice. *Korean J Acupuncture.* 2010 ; 27(3) : 67–78.
 13. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011 ; 91(1) : 79–118.
 14. Han YK, Park YK. The comparisons of Lycii Radicis Cortex and Corni Fructus water extract effects on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Korean J Herbology.* 2013 ; 28(6) : 71–7.
 15. Oh TW, Kang SY, Kim KH, Song MY, Park YK. Anti-diabetic effect of medicinal plants used for lower wasting-thirst in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Herbology.* 2013 ; 28(5) : 53–60.
 16. Korean Meridians&Acupoints society teaching material editing committee. Details of Meridians&Acupoints:A guidebook for college student the first. Wonju : Uibang. 2009 : 282,918.
 17. Youn DH, Na CS. Hepatoprotective effects of electro-acupuncture at taechung(LR3) and Yangji(TE4) on experimental liver injury in rats. *Korean J Acupuncture.* 2006 ; 23(2) : 167–76.
 18. Jung JC, Kim KH, Park YC et al. The study on the effect of acupuncture on UPDRS and heart rate variability in the patients with idiopathic parkinson's disease. *The Acupunct.* 2006 ; 23(3) : 143–53.
 19. Lee BC, Lee HS, Kim KS et al. Effects of hapKok(LI-4), samUmGyo(SP-6) acupuncture on uterine motility and cyclooxygenase - 2 manifestation in rats. *The Acupunct.* 2000 ; (2) : 187–208.
 20. Shi L, Zhang HH, Xiao Y, Hu J, Xu GY. Electroacupuncture suppresses mechanical allodynia and nuclear factor κ B signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. *CNS Neurosci Ther.* 2013 ; 19(2) : 83–90.
 21. Jiang YL, Ning Y, Liu YY et al. Effects of preventive acupuncture on streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *J Endocrinol Invest.* 2011 ; 34(10) : 355–61.
 22. Cornejo-Garrido J, Becerril-Chavez F, Carlin-Vargas G et al. Antihyperglycaemic effect of laser acupuncture treatment at BL20 in diabetic rats. *Acupunct Med.* 2014 ; 32(6) : 486–94.
 23. Lee YC, Li TM, Tzeng CY, et al. Electroacupuncture-induced cholinergic nerve activation enhances the hypoglycemic effect of exogenous insulin in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2011 ; 10(1) : 1–7.
 24. Nakamura H, Ishigami T, Kawase Y et al. Effects of acupuncture stimulation on blood glucose concentration in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, an animal model for type-2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014 ; 20 : 70–5.
 25. Ahmed D, Kumar V, Verma A et al. Antidiabetic, renal/hepatic/pancreas/cardiac protective and antioxidant potential of methanol/dichloromethane extract of Albizzia Lebbeck Benth. stem bark (ALEx) on streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med.* 2014 ; 14 : 243
 26. Kim OG, Jeong JC. Effects of the Mori folium Extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Orient Int.* 2006 ; 27(4) : 811–21.
 27. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003 ; 17(1) : 24–38.
 28. Adeyemi DO, Ukwenya VO, Obuotor EM, Adewole SO. Anti-hepatotoxic activities of Hibiscus sabdariffa L. in animal model of streptozotocin diabetes-induced liver damage. *BMC Complement Altern Med.* 2014 ; 14 : 277.
 29. Al-Malki AL, Sayed AA, El Rabey HA. Proanthocyanidin attenuation of oxidative stress

- and NF- κ B protects apolipoprotein E-deficient mice against diabetic nephropathy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013 ; 1(1) : 1-8.
30. Kim OK, Leem HJ, Je JM, Lee GM. The effect of *Melaleuca toosendan* fructus ethanol extract on blood glucose, lipid metabolism, carbohydrate metabolism related enzyme activities and antioxidant effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Oil Chemists' Soc.* 2014 ; 31(2) : 227-84.
 31. Ko IH. Effect of glutathione(GSH/GSSG) contents of fermented Ginseng on the γ -irradiated liver of mice. *Kor J. Radiation Therapy.* 2006 ; 18(1) : 29-34.
 32. Hull GL, Woodside JV, Ames JM, Cuskelly GJ. Validation study to compare effects of processing protocols on measured N (ϵ)-(carboxymethyl)lysine and N (ϵ)-(carboxyethyl)lysine in blood. 2013 ; 53 (3) : 129-33.
 33. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 ; 3(2) : 101-8.
 34. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006 ; 72(11) : 1493-505.
 35. Kang WS, Kim YC, Lee JH, Woo HJ. The effects of Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) on TNF- α signal transmission system in HepG2 cell. *Korean J Orient Int.* 2004 ; 25(1) : 28-45.
 36. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol.* 2003 ; 139(1) : 11-20.
 37. Esposito G, Scuderi C, Lu J et al. S100B induces tau protein hyperphosphorylation via Dickkopf-1 up-regulation and disrupts the Wnt pathway in human neural stem cells. *J Cell Mol Med.* 2008 ; 12(3) : 914-27.
 38. Nilufer Yonguc G, Dodurga Y, Kurtulus A, Boz B, Acar K. Caspase 1, Caspase 3, TNF- α , p53, and Hif1- α gene expression status of the brain tissues and hippocampal neuron loss in short-term dichlorvos exposed rats. *Mol Biol Rep.* 2012 ; 39(12) : 10355-60.
 39. Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, et al. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 ; 296(4) : F700-8.
 40. Daniel E Frances, Paola I Ingaramo, Maria T Ronco, Cristina E Carnovale. Diabetes, an inflammatory process: Oxidative Stress and TNF- α involved in hepatic complication. *J. Biomedical Science and Engineering.* 2013 ; 6 : 645-53.