태충 침자가 간 미토콘드리아 내 Complex IV에 미치는 영향

최동희*^{ID} · 이유미*^{ID} · 김미래^{ID} · 박정혜^{ID} · 김혜란^{ID} · 나창수^{ID} · 윤대환^{ID}

동신대학교 한의과대학 경락경혈학교실

The Effects of Acupuncture at LR3 Acupoint on Mitochondrial Complex IV Oxidase activity in Liver

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 : The liver is rich in mitochondria and it plays a key role in whole-body energy homeostasis. Mitochondria is double membrane-bound organelle that supplies energy for intracellular metabolism including Krebs cycle and beta-oxidation. Acupuncture is known to stimulate and regulate the flow of energy. To explore the effect of acupuncture on the mitochondrial respiratory chain activity in the rats' livers, the activity of mitochondrial respiratory chain complexes I to IV was observed. **Methods :** The rats were divided into 4 groups: Normal 1 (no acupuncture treatment and anesthesia for 5 min), Normal 2 (no acupuncture treatment and anesthesia for 10 min), MA1 (acupuncture treatment at bilateral LR3 under anesthesia for 5 min), and MA2 (acupuncture treatment at bilateral LR3 under anesthesia for 10 min). All rats were sacrificed and the livers were examined for respiratory chain change. **Results :** There was no difference in ubiquinol oxidoreductase, succinate dehydrogenase, and ubiquinol cytochrome C oxidoreductase after acupuncture at LR3. Acupuncture at LR3 for 10 min increased the activity of cytochrome C oxidase compared with no acupuncture groups. **Conclusions :** Acupuncture at LR3 mediated mitochondrial respiratory chain activity via the cytochrome C oxidase signaling pathway in the livers of rats.

Key words : LR3 acupoint, ubiquinol oxidoreductase, succinate dehydrogenase, ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome C oxidase

서론

미토콘드리아는 세포 내의 주요 기능을 주관하는 세포 소기관(organelle)으로 신진대사, 신호전달, 세포자살, 세포주기조절, 분화, ATP (Adenosine triphosphate) 생산 등의 역할을 한다¹⁾. 그 중에서도 생물의 생존에 필수적인 세포의 에너지원인 ATP는 미토콘드리아 내막에 존재하는 전자전달계에서 호흡에 의해 생산된다²⁾.

세포호흡(mitochondrial respiration)은 미토콘드리아에서 나온 전자를 산소에 전달하여 산소를 물로 환원시키는 산화·환원반응을 하는 것이며, 산화·환원반응에서 방출된 에너지가 ATP를 생성하는 것이다³⁾. 산화·환원반응은 미토콘드리아 Complex들에 의해 이루어지며, 이렇게 연결된 Complex들을 전자전달계라 한다. 전자전달계는 Ubiquinol oxidoreductase (Complex I), Succinate dehydrogenase (Complex II), Ubiquinol Cytochrome C

Received August 18, 2019, Revised September 26, 2019, Accepted September 26, 2019

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: +82-061-330-3519, E-mail: 3303527@naver.com

*These authors contributed equally to this work as co-first author.

This research was supported by the Dongshin University research grants.

© 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.

Oxidoreductase (Complex III), Cytochrome C oxidase (Complex IV)로 구성되어 있으며, 서로 연결된 Complex들을 거쳐 최종적으로 ATP가 생성된다.

인간의 건강에서 미토콘드리아의 역할에 대하여 미토콘드리아에서 파생된 요인들이 만성 질환의 근간으로 알려진 염증성 및 병리학적 과정을 촉발할 수 있다는 것에 대해 중요하게 여겨지고 있으나, 미토콘드리아가 여러 가지 조건에서 염증을 일으키는 주요 동인으로 작용하는지 여부는 아직 규명되지 않고 있다⁴⁾. 미토콘드리아 에너지 대사는 한의학의 치료방법 중 경혈에 대한 침자극의 효과를 해석할 수 있는 접근 방법들 중의 하나일 가능성이 있으며, 한의학적으로 이와 관련된 연구로는 심 등⁵⁾이 863명을 대상으로 태음인의 경우, 미토콘드리아 에너지 생산기능이 타체질에 비해 상대적으로 취약하다는 가설을 검증하기도 하였다.

경맥이란 인체의 에너지흐름인 기와 혈이 운행하는 주요 통로며 안으로는 장부와 밖으로는 사지관절을 유기적으로 연결하는 계통이며, 경혈은 이러한 경맥의 기가 체표로 드러나는 위치이다. 경맥의 주요 작용은 물질, 에너지, 정보 등의 전달이라고 할 수 있으며, 이는 운수작용, 반응작용, 전도작용을 통하여 장부의 음양변화를 전신의 생명현상과 유기적으로 연계시키는 역할을 담당한다. 한의학에서 기라는 개념은 추동, 오후, 고섭, 방어, 기화 작용으로 설명되고 있으며, 이는 체내 온도와 밀접한 관련성이 있다.

간은 인체 내에서 물질대사가 왕성하게 이루어지는 가장 주요한 장기이다. 간 세포의 소기관인 미토콘드리아는 외부에서 들어오는 영양소들을 집중적으로 산화·환원하여 인체가 필요로 한 물질들을 생성할 뿐 아니라 인체의 대사에 필요한 에너지를 생성하여 세포에 에너지를 직접 제공하는 주요한 소기관이다⁶⁾.

간 기능에 밀접한 영향을 주는 태충(LR3)은 《靈樞·九鍼十二原論》⁷⁾에 언급한 바와 같이 족결을 간경의 수혈(俞穴)로써 경락의 기가 왕성하게 오가는 혈위이며, 양맥기(兩脈氣)가 상합(相合)하여 성대(盛大)하다는 의미를 갖는다. 침자요법은 혈위의 자극을 통해 경맥 장부의 유여 및 부족의 불균형 상태를 조절함으로써 생체 균형을 조절한다. 태충에 관한 최근 연구로는 박 등⁸⁾은 보사침법을 이용하여 뇌허혈 신경보호효과에 관한 연구, 윤 등⁹⁾은 태충·양지혈의 전침이 간 기능과 지질대사에서 간 손상에 대한 예방효과에 관한 연구, 김 등¹⁰⁾은 태충·삼음교혈의 당뇨쥐의 간 손상에 관한 연구 등을 보고하였다. 이러한 선행 연구들에 대한 기전 연구로 뇌 에너지 대사의 미토콘드리아 기능장애는 급성 및 만성 간 기능저하와 그에 따른 간성뇌증의 주요 합병증이라는 연구에 착안하여¹¹⁾, 자극된 경혈의 장부 조절 기전에 관한 미토콘드리아의 활성 변화 관찰을 통해 체내 에너지원인 미토콘드리아의 연구가 진행된

다면, 침자 자극에 따른 체내 생리학적 변화에 대한 과학적 접근이 가능할 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 태충(LR3)침자와 비혈위의 간장(肝臟) 미토콘드리아 분포 및 활성을 관찰하여 ATP 에너지 변화에 따른 관련 장부와 경맥의 연계성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험 동물: 실험동물은 동신대학교 실험동물위원회에서 승인(2018-02-02) 받은 7주령 260 g의 Sprague Dawley계의 수컷 백서(Samtaco, Korea)를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 23±1℃, 습도 60±5%) 내에서 일주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 적응기간 동안 물과 고형사료(pellet, 동아원, Korea)를 공급하면서 자유롭게 섭취하였다.

2) 침자: 침자에 사용된 일회용 침은 호침(0.25×15 mm, Dongbang, Korea)을 사용하였다.

2. 방법

1) 군분리 및 시술: 실험동물은 침자 시술 전에 isoflurane (Hana, Korea)과 O₂로 혼합된 가스 마취를 하였고, 가스 마취는 3% isoflurane으로 흡입 마취를 한 후, 2% isoflurane으로 가스 마취를 유지시켰다.

실험동물들은 흡입 마취 상태에서 무처치 5분 정상군(Normal1, n=5), 흡입 마취 상태에서 무처치 10분 정상군(Normal2, n=5), 흡입 마취 상태에서 태충(LR3) 혈위에 양측 침자 시술을 한 5분 침자군(MA1, n=5), 흡입 마취 상태에서 태충(LR3) 혈위에 양측 침자 시술을 한 10분 침자군(MA2, n=5)으로 분리하였다.

2) 취혈 및 침자: 간경에 해당하는 태충(LR3) 혈위는 백서의 좌측 하지의 제1지(趾)와 제2지 기골(肢骨)사이의 본절후(本節後)로 인체에 상응하는 부위로 취하였다. MA1군은 해당 경혈에 5분간, MA2군은 해당 경혈에 10분간 피부와 직각으로 1 mm 침자하였다. 침자 직후, 5분후, 10분후 각각 시계 방향으로 36회 유침 자극을 시행하였다.

3) 채혈 및 Plasma 분리: 실험이 끝난 동물은 심장 천자하여 5 ml의 혈액을 채혈하였다. 혈액은 원심분리기(VS 6000CFL, Vision, Korea)에서 20분간 3,000 rpm으로 혈청을 분리하였고, 혈청은 AST (u/l), ALT (u/l), Total Protein (g/dl)을 Dri-chem 4000I (Fujifilm, Japan)로 측정하였다.

4) 조직 준비: 조직은 혈액을 채혈한 후 mitochondria 분리를 위해서 각 실험동물들에서 liver tissue를 적출하였다. Liver tissue는 0.1M PBS로 2회 세척한 후 급속 냉동하여 -80°C 에 냉동 보관하였다.

5) Mitochondria 분리 및 측정: Tissue mitochondria 분리를 위해 mitochondria isolation kit (Thermofisher, USA)를 사용하였다. Liver tissue 100 mg을 PBS에 wash 후 BSA/Reagent A solution (4 mg/ml) 800 μl 를 넣고 homogenization (precellys 24, Bertin technologies, France)한 후, reagent C 800 μl 를 넣고 tube를 여러번 흔들어 주었다. 4°C 에서 700 g로 10분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant을 분리하였다. 4°C 에서 3,000 g로 15분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant을 버리고 mitochondrial pellet만 남기고, Mitochondrial Pellet에 wash buffer (Reagent C:DW) 500 μl 를 넣고 4°C 에서 12,000 g로 5분간 원심분리(Centrifuge 5415R, Germany)하여 supernatant을 버리고 mitochondrial pellet만 남겼다. Mitochondrial pellet을 2% CHAPS (in TBS) 1000 μl 에 녹인 mitochondrial protein은 -80°C 에 보관하였다.

Mitochondrial protein concentration 측정은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermoscientific, USA)를 사용하여 96 well plate에 BCA 용액(A:B=50:1) 200 μl 를 넣고 mitochondrial protein 25 μl 를 넣은 후 37°C 에서 30분 동안 incubation 시킨 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 562 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 활용하여 sample의 mitochondrial protein concentration를 assay하였다.

6) Ubiquinon oxidoreductase (Complex I) 측정: Ubiquinon oxidoreductase 측정을 위해 Complex I enzyme activity microplate assay kit (abcam, UK)를 사용하였다. Microplate well에 control (200 μl incubation buffer), 100 ug의 mitochondrial protein이 포함된 200 μl 를 넣은 후 room temperature에서 3시간 incubation 시켰다. 1X buffer 300 μl 를 넣고 2회 wash 한 후 assay solution (8 Well : 1X buffer 1.645 ml/20X NADH 87.5 μl /100X Dye 17.5 μl) 200 μl 를 넣은 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 kinetic program (room temperature, 1분 간격, 30분)으로 측정하였다. Sample의 ubiquinon oxidoreductase activity는 rate ($\text{mOD}/\text{min}=(\text{Absorbance1}-\text{Absorbance2})/\text{Time}$)를 계산하여 측정하였다.

7) Succinate dehydrogenase (Complex II) 측정: Succinate

dehydrogenase 측정을 위해 Complex II enzyme activity microplate assay kit (abcam, UK)를 사용하였다. Microplate well에 control (50 μl incubation buffer), 10 ug의 mitochondrial protein이 포함된 용액 50 μl 를 넣은 후 room temperature에서 2시간 incubation 시켰다. 1X buffer 300 μl 를 넣고 2회 Wash 한 후 Lipid Mix 40 μl 를 넣어 room temperature에서 30분 incubation 시켰다. Activity solution (8 Well: Ubiquinone 5 μl /Succinate 42 μl /DCPIP 21 μl /Complex II Activity Buffer 2.1 ml) 200 μl 를 넣은 후 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 600 nm에서 OD (Optical density)를 kinetic program (room temperature, 20초 간격, 60분)으로 측정하였다. Sample의 succinate dehydrogenase activity는 rate ($\text{mOD}/\text{min}=(\text{Absorbance1}-\text{Absorbance2})/\text{Time}$)를 계산하여 측정하였다.

8) 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, 100 ug의 mitochondrial protein이 포함된 100 μl 를 넣고 37°C 에 1시간 incubation 하였다. Microplate는 wash 생략 후 시약만 버리고, Detection Reagent A 100 μl 를 넣고 37°C 에 1시간 incubation 시켰다. Wash buffer 350 μl 로 3회 washing 후, detection reagent B 100 μl 를 넣고 37°C 에 30분간 incubation 시켰다. Wash buffer 350 μl 로 5회 washing을 하고, substrate solution 90 μl 를 첨가하고 37°C 에 20분간 dark한 상태에서 incubation하였다. Microplate에 stop solution 50 μl 를 넣고 반응을 중지시키고 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 활용하여 sample의 ubiquinol cytochrome C oxidoreductase를 assay하였다.

9) Cytochrome C oxidase (complex IV) 측정: Cytochrome C oxidase 측정을 위해 rat cytochrome C oxidase elisa kit (Biomatik, USA)를 사용하였다. Microplate well에 standard, 10 ug의 mitochondrial protein이 포함된 100 μl 를 넣고 37°C 에 2시간 incubation하였다. Microplate는 wash 생략 후 시약만 버리고, Biotin-antibody (1X) 100 μl 를 넣고 37°C 에 1시간 incubation 시켰다. Wash buffer 400 μl 로 3회 washing 후, HRP-avidin (1X) 100 μl 를 넣고 37°C 에 1시간 incubation 시켰다. Wash buffer 400 μl 로 5회 washing 후, TMB Substrate 90 μl 를 첨가하고 37°C 에 30분간 어두운 환경에서 incubation하였다.

Microplate에 stop solution 50 μ l를 넣고 반응을 중지시키고 microplate spectrophotometer (EZ Read 400, Biochrom, UK)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였으며, standard curve를 활용해 sample의 cytochrome C oxidase를 assay하였다.

3. 통계처리

모든 측정치는 excel statistic program (Microsoft, USA)을 사용하여 평균치와 표준오차(mean $\pm$ standard error)를 표시하였고, 각 실험군들 사이의 통계 분석은 window용 SPSS (SPSS, USA)를 활용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 실시하였다. 각 실험군들은 대조군에 대하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 확인하였다.

결 과

1. Liver to body weight 변화

Liver to body weight에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 0.033 ± 0.0009 g/g, Normal2에서 0.034 ± 0.0021 g/g, MA1군에서 0.033 ± 0.0015 g/g, MA2군에서 0.032 ± 0.001 g/g을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

Fig. 1. Effect of acupuncture at acupoints LR3 on liver to body weight in rat.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at acupoint LR3 for each 5 min and 10 min in rat. Normal1, No acupuncture treatment and under anesthesia for 5 min. Normal2, No acupuncture treatment under anesthesia for 10 min. MA1, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 5 min. MA2, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 10 min. Values are expressed Mean $\pm$ SE; Mann-Whitney U test.

2. Mitochondrial protein concentration 변화

Mitochondrial protein concentration에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 903.2 ± 53.37 μ g/ml, Normal2에서 927.3 ± 44.6 μ g/ml, MA1군에서 1012.5 ± 69.99 μ g/ml, MA2군에서 1056.8 ± 51.21 μ g/ml을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

3. Complex I, II, III, IV 변화

Complex I에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 0.44 ± 0.052 mOD/min, Normal2에서 0.4 ± 0.021 mOD/min, MA1군에서 0.35 ± 0.028 mOD/min, MA2군에서 0.44 ± 0.041 mOD/min을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3A).

Complex II에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 0.12 ± 0.021 mOD/min, Normal2에서 0.11 ± 0.024 mOD/min, MA1군에서 0.12 ± 0.019 mOD/min, MA2군에서 0.09 ± 0.035 mOD/min을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B).

Complex III에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 0.7 ± 0.01 mOD/min, Normal2에서 0.74 ± 0.04 mOD/min

Fig. 2. Effect of acupuncture at acupoints LR3 on mitochondrial protein concentration in rat's liver.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at acupoint LR3 for each 5 min and 10 min in rat. Normal1, No acupuncture treatment and under anesthesia for 5 min. Normal2, No acupuncture treatment under anesthesia for 10 min. MA1, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 5 min. MA2, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 10 min. Values are expressed Mean $\pm$ SE; Mann-Whitney U test.

Fig. 3. Effect of acupuncture at acupoints LR3 on ubiquinon oxidoreductase (complex I), uccinate dehydrogenase (complex II), ubiquinol cytochrome C oxidoreductase (Complex III), cytochrome C oxidase (complex IV) in rat's liver.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at acupoint LR3 for each 5 min and 10 min in rat. Normal1, No acupuncture treatment and under anesthesia for 5 min. Normal2, No acupuncture treatment under anesthesia for 10 min. MA1, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 5 min. MA2, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 10 min. Values are expressed Mean $\pm$ SE; Mann-Whitney U test. #, *, $\neq$, $p < 0.05$ compared with Normal1, Normal2, MA1.

min, MA1군에서 0.72 ± 0.029 mOD/min, MA2군에서 0.75 ± 0.023 mOD/min을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3C).

Complex IV에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 0.67 ± 0.035 mOD/min, Normal2에서 0.76 ± 0.066 mOD/min, MA1군에서 0.88 ± 0.072 mOD/min, MA2군에서 1.15 ± 0.036 mOD/min을 나타내었다.

Normal1군, Normal2군, MA1군에 비하여 MA2군에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 3D).

4. AST, ALT 변화

Aspartate aminotransferase (AST)에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 95.2 ± 15.1 μ /l, Normal2에서

86.4 ± 3.06 μ /l, MA1군에서 59.6 ± 2.87 μ /l, MA2군에서 81.6 ± 6.74 μ /l을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A).

Alanine aminotransferase (ALT)에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 42.4 ± 3.23 μ /l, Normal2에서 43.4 ± 4.04 μ /l, MA1군에서 33.2 ± 2.29 μ /l, MA2군에서 39.8 ± 4.41 μ /l을 나타내었다.

Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4B).

5. Total protein 변화

Total protein에 대한 변화를 침자 시간별로 관찰한 결과, Normal1군에서 5.4 ± 0.04 g/dl, Normal2에서 5.6 ± 0.07 g/dl,

Fig. 4. Effect of acupuncture at acupoints LR3 on aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) in rat's plasma. Each acupuncture groups were treated acupuncture at acupoint LR3 for each 5 min and 10 min in rat. Normal1, No acupuncture treatment and under anesthesia for 5 min. Normal2, No acupuncture treatment under anesthesia for 10 min. MA1, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 5 min. MA2, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 10 min. Values are expressed Mean ± SE; Mann-Whitney U test.

Fig. 5. Effect of acupuncture at acupoints total protein in rat's plasma.

Each acupuncture groups were treated acupuncture at acupoint LR3 for each 5 min and 10 min in rat. Normal1, No acupuncture treatment and under anesthesia for 5 min. Normal2, No acupuncture treatment under anesthesia for 10 min. MA1, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 5 min. MA2, Acupuncture treatment at acupoint LR3 under anesthesia for 10 min. Values are expressed Mean ± SE; Mann-Whitney U test. #, * $p < 0.05$ compared with Normal1, Normal2, MA1.

MA1군에서 5.7 ± 0.09 g/dl, MA2군에서 5.5 ± 0.05 g/dl을 나타내었다.

Normal1군에 비하여 Normal2군과 MA1군에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 5).

고찰

최근 만성질환의 근원과 병리현상을 설명하고 해결할 수 있는 새로운 패러다임의 중요성이 의학계 내부에서도 널리 제기되고 있으며, 미토콘드리아 의학(mitochondria medicine)이 대표적인 것 중 하나로 연구되고 있다¹²⁾. 세포 내 소기관인 미토콘드리아의 기능부전이 만성질환과 포괄적 연계성이 있다고 볼 수 있으며, 이는 생명의 핵심중의 하나인 생체 에너지의 대사의 기능부전으로 인하여, 인체 체온 유지, 호흡 및 신체활동의 기능부전으로 인한 질환 발생을 유발 시킨다고 볼 수 있다. 생체 에너지의 근원이라고 할 수 있는 모든 세포 내에 실존하는 미토콘드리아는 생체에 필요한 대부분의 에너지는 크기가 1~2나노미터에 불과한 이 세포 내 소기관에서 만들어진다¹³⁾.

세포질에서 형성된 NADH와, 미토콘드리아에서 Krebs cycle과 β -Oxidation에서 생성된 NADH와 FADH₂에 함유된 전자들은 전자전달계라는 전자 전달 시스템을 통해 산소에 전달되면서 에너지가 생성된다. 그리고, 인체에 필요한 에너지는 전자전달계와 연결된 산화적 부인산 반응을 통하여 생성되므로 아주 중요한 대사적 의미를 지닌다. 그러나, 이 과정에서 산소는 전자전달계를 이탈하여 O₂⁻와 같은 중간물질로 전환되며, 라디칼이 생성된다¹⁴⁾. 대부분의 라디칼은 매우 불안정하고, 에너지 단위가 높아 생리학적인 조직 손상을 비롯하여 산화적 스트레스 등을 유발한다^{15,16)}.

크렘스 회로(Krebs cycle)란 미토콘드리아의 기질에서 일어나는 산소를 이용한 세포 호흡의 두 번째 과정으로 TCA 회로(tricarboxylic acid cycle)를 일컬으며, 산소 호흡의 첫 번째 과정

인 해당 단계를 통해 만들어진 대사물들을 산화시켜 그 에너지 중 일부는 ATP에 저장하고, 나머지는 전자전달계로 전달되는 과정을 말한다. 2개 분자의 pyruvic acid는 크렘스 회로를 한 번 돌게 되면 2개의 QH_2 , 2개의 GTP, 8개의 NADH가 만들어지는데 이는 총 25개의 ATP가 만들어지는 것을 의미하며, 한개 분자의 glucose는 해당과정과 Krebs cycle을 거치게 되면 총 32개의 ATP가 생성되며, 여기에서 산화·환원 반응을 통해 에너지를 생성하고, 전자전달계를 위해서 환원력을 제공함으로써 생물은 살아가는 데 필요로 한 에너지를 생산한다¹⁷⁾.

전자전달계는 Complex I (NADH-ubiquinone reductase), Complex II (succinate-ubiquinone reductase), Complex III (ubiquinol-cytochrome c reductase), Complex IV (cytochrome c oxidase) 4가지 복합체들로 구성되어 있고¹⁸⁾, 해당 과정과 크렘스 회로에서 떨어져 나온 수소와 전자가 FADH_2 와 NADH의 형태로 전자전달효소를 거치게 되면서 산화·환원 과정을 통하여 ATP가 생성되는 과정이다. 이때 1 분자의 NADH로부터 3 ATP가, 1 분자의 FADH_2 로부터 2 ATP가 생성된다¹⁷⁾.

인체에서의 에너지 생성은 전자가 전자전달계를 거치는 과정과 밀접한 관계를 갖고 있는데, 안정 상태에는 에너지의 요구와 충족이 균형을 이뤄 전자전달계를 통한 전자의 흐름도 매우 안정적이지만, 운동 상태와 같이 에너지의 요구가 커지고 체온이 높게 상승할 경우에는 산소와 ADP 공급 등이 원활하지 하지 않아 에너지 생성이 힘들어지게 된다. 따라서 전자가 전자전달계를 이탈하고 유해 산소로 방출하게 되는 경우가 증가하게 된다. 이렇게 방출된 유해 산소는 인체 내의 항산화 시스템에 의해 제거되지만, 일부는 세포에서 지질과산화물을 일으키고, 세포를 손상시키게 되어 심한 운동 후에는 근손상과 부상의 원인이 되기도 한다¹⁸⁾.

약 1500개의 단백질로 이루어진 미토콘드리아는 세포의 에너지 항상성을 유지하는 중요한 기관으로서, 이중에서 13개의 단백질만 미토콘드리아 DNA에 의해 생성되고 남은 99% 이상은 핵에서 형성된다^{19,20)}. Cytochrome C는 정상적인 상태에서는 전자전달계 Complex III과 IV 사이에서 전자를 운반하는 역할을 하지만 과도한 superoxide가 생성되면 Complex IV는 세포질로 방출되어 세포사멸을 일으켜 미토콘드리아의 기능 이상을 나타내는 것으로 알려져 있다^{19,21-25)}.

미토콘드리아는 ROS (reactive oxygen species)의 주요 원천이며, 그로 인해 전자 누출 및 ROS 생성을 촉진시킬 수 있다. 두뇌 Mitochondrial Respiratory Chain enzymes 특히 Complex I, Complex II and Complex IV는 뇌 허혈성 손상에 취약하며 ROS 생성을 담당한다²⁰⁾. Complex II는 활성이 Complex I, Complex

II의 막힘은 ROS 생성을 촉진시킨다^{27,28)}. BCCAO (bilateral common carotid arteries occlusion) 실험동물연구에서, Complex IV의 활성 및 단백질 발현은 H_2O_2 생성의 증가와 함께 감소하는 것으로 관찰되었으며²⁹⁾, H_2O_2 생성은 산소 농도에 선형적으로 의존하며, 저산소 상태에서 미토콘드리아 ROS 생성이 정상 산소보다 낮은 것으로 관찰되었다³⁰⁾. 허혈/재관류 손상을 가진 실험동물 연구에서는, Complex I 및 Complex IV 활성의 감소가 또한 관찰되었으며³¹⁾, 침자 치료 후 대뇌 Mitochondrial Respiratory Complex enzymes (complex I, II, IV) 활동의 감소를 보였다³²⁾. 침자 치료는 Respiratory Complex enzymes (complex I, II, IV) 활동 및 COX IV 발현을 복원하여 ROS 생성을 억제했다. 또한, 침술은 RCR (respiratory control rate) 및 MMP (mitochondrial membrane potential) 수준을 상향 조절함으로써 미토콘드리아 생물 에너지의 결핍을 개선하는 것으로 관찰되었다. 이러한 연구에서 침자 치료가 BCCAO에 의해 유발된 해마의 미토콘드리아 기능 장애를 향상시켰음이 관찰되었으며, 미토콘드리아 호흡 조절 속도 및 미토콘드리아 생물 에너지 매개 변수를 향상시키는 것에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 또한 Li 등의 연구에서 침자 치료가 hippocampal mitochondrial respiratory complex enzymes (complex I, II, IV) 활성과 Cytochrome C Oxidase IV 발현을 유의하게 증가시키며, hippocampal ROS 생성을 감소시킨다고 보고하였으며³³⁾, Yang 등은 high fat diet로 유발된 동물 모델에서 미토콘드리아의 기능장애는 비알콜성 지방간 질환의 중요한 기전으로 작용함을 보고하였다³⁴⁾. 이러한 선행 연구들은 침자가 미토콘드리아 내 ATP의 생성 및 신경 활동에 일정한 영향을 줄 수 있다는 것을 보고하고 있다.

본 연구에서는 태충(LR3)에 시술한 침자가 해당 肝臟 Mitochondrial Respiratory Chain 변화에 미치는 영향을 관찰하여 Liver to body weight, Mitochondrial protein concentration, Complex I, II, III, AST, ALT에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 하지만, Complex IV에서는 Normal1군, Normal2군, MA1군에 비하여 MA2군에서 유의한 증가를 보였으며, Total protein 변화에서는 Normal1군에 비하여 Normal2군과 MA1군에서 유의한 증가를 보였다.

위 결과로 보아, 태충에 대한 침의 자극이 간의 미토콘드리아의 대사 중 Complex IV의 활성을 증가시켜 해당 장기의 단백질 대사를 활성화 시키는 데 영향을 주는 것을 알 수 있으며, 이는 Li³³⁾ 논문의 결과와 일치되는 결과이다. 또한 태충은 족궤음간경의 수토혈(輸土穴) 및 원혈(原穴)로서 “病在陰之陰者, 刺陰之榮輸” 및 “治

臟者, 治其輸”에 근거하여 임상에서는 간장병(肝臟病), 기화병(氣化病)등 주로 기기울체(氣機鬱滯)등의 에너지 울결과 관련된 병증 치료에 이용되는데, 위의 연구 결과를 근거로 태충 침자후 염전 수기법을 사용할 경우, 해당 경락이 유주하는 간 조직내의 미토콘드리아의 Cytochrome C oxidase (complex IV)에 영향을 주어 간 병변에 일정한 개선 효과를 보이는 기전으로 해석될 수가 있다.

향후 침 자극에 대한 전달 기전 및 Cytochrome C oxidase의 활성에 따른 조직내 에너지대사와 타 장부와의 연계성에 대한 심도 있는 추후 연구가 필요하리라고 사료된다.

결 론

족궐을 간경의 태충(LR3)에 시술한 침자가 해당 간장(肝臟) Mitochondrial Respiratory Chain 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Liver to body weight에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
2. Mitochondrial protein concentration에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
3. Ubiquinol Oxidoreductase (complex I)에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
4. Succinate Dehydrogenase (complex II)에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
5. Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase (Complex III)에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
6. Cytochrome C oxidase (complex IV)에서는 Normal1군, Normal2군, MA1군에 비하여 MA2군에서 유의한 증가를 보였다.
7. Aspartate aminotransferase (AST)에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
8. Alanine aminotransferase (ALT)에서는 Normal1군과 Normal2군에 비하여 각각 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.
9. Total protein 변화에서는 Normal1군에 비하여 Normal2군과 MA1군에서 유의한 증가를 보였다.

Acknowledgement

This research was supported by the Dongshin University research grants.

Funding

None.

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001 ; 33(6) : 1065-89.
2. Csordás G, Hajnóczky G. Sorting of calcium signals at the junctions of endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 2001 ; 29(4) : 249-62.
3. Park SY, Jo JH. Effect of Membrane Lipid Peroxidation on Liver Mitochondrial Functions. *The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine*. 2001 ; 25(1) : 34-40.
4. Picard M, Wallace DC, Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 2016 ; 30 : 105-16.
5. Shim EB, Lee SW, Kim SJ, Leem CH, Kwon YK, Baik YS, et al. Mitochondria Hypothesis on the Obesity-Prone Tendency in Tae-Eum People. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2009 ; 23(6) : 1241-6.
6. Park SY, Jo JH. Effect of Vitamin A on Hepatic Mitochondrial

- Activity. The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine. 2003 ; 27(1) : 53-8.
7. Gwak AC. Emperor Inner Circumstance Chuigu Stone. Tianjin : Tianjin Science and Technology Publishing House. 1989 : 369.
8. Park JS, Youn DH, Na CS, Jo MR, Jeong YJ, Jeong JY, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of acupuncture techniques of tonification or sedation at LR3 on focal brain ischemic injury induced by intraluminal filament insertion in rats. Korean Journal of Acupuncture. 2006 ; 23(3) : 81-98.
9. Youn DH, Na CS. Hepatoprotective effects of Electro-Acupuncture at Taechung (LR3) and Yangji (TE4) on experimental Liver injury in rats. Korean Journal of Acupuncture. 2006 ; 23(2) : 167-76.
10. Kim SJ, Lee YG, Lee HJ, Kim JS. The Effects of LR3 and SP6 Acupuncture on Liver Damage of Streptozotocin-induced Diabetic Mice. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. 2016 ; 3(3) : 29-43.
11. Rama Rao KV, Norenberg MD. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. Neurochem. Int. 2012 ; 60(7) : 697-706.
12. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu Review of Genetics. 2005 ; 39 : 359-407.
13. Sim EB. Mitochondria Medicine and its Research Trend. Journal of Biomedical Engineering Research. 2009 ; 30(5) : 355-61.
14. Powers SK, Hamilton K. Antioxidant and exercise. Clinics in Sports Medicine. 1999 ; 18(3) : 525-36.
15. Ji LL. Exercise and oxidative stress : role of the cellular antioxidant systems. Exercise and Sport Sciences Reviews. 1995 ; 23(1) : 135-66.
16. Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Geibig R, Hollander J, et al. Oxidative stress and aging. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998 ; 20(854) : 102-17.
17. Charlottle WP, Kathleen C. Essential Biochemistry. 2nd ed. Wiley. 2011 : 360-79.
18. Baek IY. The Effect of Artificial Inhibition of Mitochondrial ETC and Aerobic Training on Antioxidant System, and Energy Metabolism. Exercise Science. 2002 ; 11(2) : 315-34.
19. Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. New England Journal of medicine. 1995 : 333-638.
20. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, et al. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. Nature Genetics. 2006 ; 38(5) : 576-82.
21. Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J, et al. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. The FASEB Journal. 2005 ; 19(6) : 597-8.
22. Jiang X, Xiaodong W. Cytochrome C-Mediated Apoptosis. Annual Review of Biochemistry. 2004 ; 73 : 87-106.
23. Koo JH, Cho JY. The effects of treadmill exercise on cognitive performance and PGC-1 α , cytochrome-c expression in the brain mitochondrial in NSE/PS2m-transgenic mice of Alzheimer's Disease. Sports Science. 2013 ; 30(2) : 1-10.
24. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. Human Molecular Genetics. 2009 ; 18(R2) : 169-76.
25. Koo JH. The Effect of Treadmill Exercise on α -synuclein and Mitochondrial Dynamic in The Mouse Model of Parkinson's Disease. Korean Society of Exercise Physiology. 2016 : 256-64.
26. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochemical Journal. 2009 ; 417(1) : 1-13.
27. Votyakova TV, Reynolds IJ. Ca²⁺-induced permeabilization promotes free radical release from rat brain mitochondria with partially inhibited complex I. Journal of Neurochemistry. 2005 ; 93(3) : 526-37.
28. Siebels I, Drose S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 2013 ; 1827(10) : 1156-64.
29. Du J, Ma M, Zhao Q, Fang L, Chang J, Wang Y, et al. Mitochondrial bioenergetic deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia. Neuroscience. 2013 ; 231 : 345-52.
30. Anna S, Csaba K, Giovanni M, Vadim T, Alexander G. Reactive oxygen species production by brain mitochondria depends linearly on oxygen level. Free Radical Biology and Medicine. 2018 ; 120(1) : 136.
31. Yang Y, Wang J, Li Y, Fan C, Jiang S, Zhao L, et al. HO-1 : Signaling activation by pterostilbene treatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by cerebral ischemia reperfusion injury. Molecular Neurobiology. 2016 ; 53(4) : 2339-53.

32. Zhang X, Wu B, Nie K, Jia Y, Yu J. Effects of acupuncture on declined cerebral blood flow, impaired mitochondrial respiratory function and oxidative stress in multi-infarct dementia rats. *Neurochemistry International*. 2014 ; 65 : 23-9.
33. Li H, Liu Y, Lin LT, Wang XR, Du SQ, Yan CQ, et al. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats. *Neurochemistry International*. 2016 ; (92) : 35-42.
34. Yang XX, Wang X, Shi TT, Dong JC, Li FJ, Zeng LX, et al. Mitochondrial dysfunction in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease: The alleviating effect and its mechanism of *Polygonatum kingianum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019 ; 117 : 109083.