

원저

蜂毒藥鍼이 白鼠 大腿動脈의 血管攣縮에 미치는 影響

김재수* · 김형환** · 최호영** · 김창환*

*경희대학교 한의과대학 침구학교실

**경희대학교 한의과대학 본초학교실

Abstract

Effect of Bee Venom Therapy in a Rat Femoral Artery Model induced Vasospasm

Kim Jae-soo*, Kim Hyung-hwan**, Choi Ho-young** and Kim Chang-hwan*

*Department of Acupuncture and Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

**Department of Herbology, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University

In order to study the effect of Bee Venom(BV) on the subarachnoid hemorrhage animal model, the autologous whole blood was applied to the vicinity of the sprague dawley rat right femoral artery. Following periarterial application of autologous whole blood(PAB) and intraperitoneal injection of BV(1:5,000 and 1:500), the vasomotor responses to BV(from 1:500,000 to 1:500) were identified and the histological changes, neovascularized blood vessel were observed.

We have shown that alterations in vasomotor and histological findings are elicited following application of periarterial blood and i.p. injection of BV(1:5,000 and 1:500) induced heavy vasospasm and neovascularization on the subarachnoid hemorrhage like model from peripheral artery.

Key words : Bee Venom, vasospasm, SAH

- 접수 : 2002년 12월 3일 · 수정 : 2002년 12월 27일 · 채택 : 2003년 1월 18일
· 교신저자 : 김형환, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 본초학교실
Tel. 016-599-6461 E-mail : hiherb@lycos.co.kr

I. 서론

혈관연축은 지속되는 혈관 수축증상으로 혈관벽이 두꺼워져 직경과 혈류가 감소하는 상태를 말하며 증풍이나 뇌손상에서 회복을 둔화시키거나 악화시키는 요인이 된다¹⁾. 특히 뇌동맥류 파열시 가장 문제가 되는 것은 직접적인 뇌손상보다 혈관 연축이다²⁾.

지주막하출혈이 발생한 후 7~10일 경과하여 나타나는 지연성 혈관연축은 뇌혈관의 혈관운동성을 현저하게 저하시키는데 이는 혈관내피에 있는 혈관수축인자의 증가와 혈관이완인자의 감소로 발생하는 것으로 보고되고 있다³⁾.

그러나 지연성 혈관연축의 발생 기전에 대하여서는 아직까지 명확하지 않지만 혈관연축이 야기된 혈관벽에 염증세포가 증가하고⁴⁾, 혈관연축이 야기될 때에 혈장과 혈관벽에 면역글로불린과 보체가 증가한다⁵⁾는 점에서 혈관연축을 염증반응으로 설명하기도 한다. 혈관신생은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 것으로 염증과 같은 질병과 연관될 경우에는 진행속도가 빠르고 지속적으로 나타난다⁶⁾.

봉독의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 그 효능은 祛風除濕, 止疼痛, 解癥平喘, 消腫強壓하므로 류마티스, 급만성관절염, 좌골신경통, 통풍, 근육통, 편두통, 기관지천식, 과민성비염, 결절성홍반, 담마진, 갑상선기능항진 및 고혈압 등에 효과⁷⁾가 있으며 소염진통⁸⁾, 면역⁹⁾과 항암¹⁰⁾, 알러지¹¹⁾ 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 봉독약침은 혈관 평활근에 대하여 수축작용이 나타난다고 보고^{12),13)} 되었으므로 심혈관질환의 사용에 신중을 기하여야 될 것으로 사려되지만^{14),15)}, 봉독약침의 금기증이나 주의사항에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자는 봉독약침이 혈관연축에 미치는 영향을 알아보기 위하여 백서 대퇴동맥의 혈관연축모델을 이용하여 봉독약침이 지연성 혈관연축시 발생하는 혈관의 운동성, 형태조직학적 및 면역조직학적 변화와 혈관신생에 미치는 영향을 비교, 관찰한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료와 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

280~320g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(대한실험동물, 한국)를 고형사료(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 시약 및 기기

Bee Venom(Cat. #: V3125), Chloral hydrate, NaCl, KCl, NaH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaHCO₃, glucose, Acetylcholine은 Sigma(Sigma Chemical, U.S.A) 제품을, Triton X-100, Bovine serum albumin, Goat serum, Chloroform, Ethanol, Xylene, Endothelin-1 monoclonal antibody는 Sigma(Sigma Chemical, U.S.A) 제품을 사용하였고, Hydrogen peroxide는 Junsei Chemical(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo) 제품을, Horse anti-mouse IgG, Avidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex(Vectastatin Elite ABC kit)는 Vector Laboratories(Vector Laboratories, Inc., CA, U.S.A) 제품을, Optimal Cutting Temperature Compound는 Sakura Fine-

tek(Sakura Finetek, Inc., CA, U.S.A) 제품을, malinol은 Muto Pure Chemicals(Muto Pure Chemicals Ltd., Tokyo, JAPAN) 제품을 사용하였다.

pH meter(HANNA-8417, U.S.A), Deep freezer(REVCO, U.S.A), Water bath(DUKSAN, KO REA), Force-displacement transducer가 장착된 Polygraph(Grass instrument co., U.S.A), Peristaltic pump(REVCO, U.S.A), Silicone tube(Cole-Palmer Instrument Company, Illinois, U.S.A), Freezing microtome(REVCO, U.S.A), Stereoscope(REVCO, U.S.A) 등이었다.

2. 실험방법

1) 봉독약침 및 시약조제

봉독 4g을 생리식염수에 녹여 1:500,000부터 1:500까지의 봉독약침액으로 제조하여 실험에 사용하였다. 혈관운동성 측정시에는 1:500,000, 3×(1:500,000), 1:50,000, 3×(1:50,000), 1:5,000, 3×(1:5,000)과 1:500 봉독약침액을 사용하였고, 대퇴동맥의 혈관연축모델에는 1:5,000과 1:500 봉독약침액을 1 μ l/g씩 매일 고¹⁵⁾의 취혈법에 따라 氣海(CV6)에 약침자극하였다.

모든 시약들은 증류수에 녹였으며 10-2M stock 용액을 만들어 냉동(-4°C) 보관하였다가 매 실험시 희석하여 사용하였다.

2) 대퇴동맥 주위에 혈액처치

흰쥐(Sprague-Dawley)를 chloral hydrate(400 mg/kg)로 복강내 주사하여 마취시킨 다음 우측 대퇴부 내측을 절개한 후, 무균상태의 수술로 우측 근위부의 대퇴정맥과 신경을 박리하고, 대퇴동맥을 2 cm 길이로 노출시켰다.

멸균된 실리콘 관을 박리된 대퇴동맥 주위에 압박을 주지 않도록 관을 씌우고, 대퇴정맥을 통하여 채

취한 0.1ml의 신선한 자가전혈을 대퇴동맥의 외피층과 관 사이에 조심스럽게 채웠다. 혈액이 응고될 때까지 5분 정도 기다린 후 절개부위를 봉합하여 혈관연축모델을 만들었다.

대조군은 동일한 방법으로 좌측 대퇴동맥을 박리한 후 실리콘 관과 혈관사이에 0.9% 생리식염수를 같은 방법으로 처치하고 피부를 봉합한 군으로 하였다.

3) 대퇴동맥 혈관운동성 측정

가) 혈관조직 절편 제작

자가전혈 처치 후 2일과 7일째 흰쥐 대퇴동맥을 적출하여 산소(95% O₂-5% CO₂)가 포화된 차가운(4°C) 생리영양액(Physiological Salt Solution, PSS)에 담았다. 산소를 계속 공급하면서 주위 지방조직과 결합조직을 깨끗이 제거한 후 약 1.5~2mm의 길이가 되도록 횡으로 절단하여 고리절편을 만들었다.

나) 생리영양액 제조

혈관평활근의 정상적인 유지를 위한 생리영양액의 조성(mM)은 NaCl 130, KCl 4.7, NaH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.17, CaCl₂ 1.6, NaHCO₃ 14.9 그리고 glucose 5.5이고, pH는 7.38로 유지하였다.

다) 등장성수축 측정

산소(95% O₂-5% CO₂)로 포화되고, 욕조(water bath)에 의해 37°C가 유지되고 있는 PSS를 근실(organ chamber)에 5ml를 넣고, 근실의 바닥에 장치된 고리(hook)에 적출혈관의 한쪽 부분을 걸고 다른쪽 부분은 force-displacement transducer에 매달아 등장력을 측정하여 그 결과를 polygraph에 기록하였다. 약물실험 하기 전에 대퇴동맥은 1.5g의 기저 긴장도(resting tension)를 부하하고 매 20분마다 신선한 PSS를 바꿔주면서 90분간 평형을 유지시켰다. 일정한 기저선(baseline)이 유지되면 KCl 100mM이 함유된 PSS를 투여하여 수축의 크기를

확인하였다. Acetylcholine($1\mu\text{M}$)을 근살내에 투여하여 내피세포의 유무를 파악하였다. 이때 acetylcholine에 의한 이완이 KCl에 의한 수축의 50% 이상을 넘을 때는 내피세포가 손상받지 않았다고 판정하였다. KCl 100mM의 수축실험이 끝나면 PSS로 15분씩 2번 씻어내고, 봉독약침액에 대한 실험을 시작하였다. 봉독약침액에 대한 혈관운동성은 용량-축적 방법으로 관찰하였다. 봉독약침액의 수축력은 우선 100mM KCl에 의한 최대 수축력을 구하고, 이 값에 대한 상대적인 수축력으로 계산하였다.

4) 조직학적 검사를 위한 혈관절편 제작 및 관찰

혈액을 처치하고 일정 기간(1, 2, 5일과 7일)이 경과한 후, chloral hydrate(400mg/kg)을 복강내에 주사하여 실험동물을 마취시켰다. 복강과 흉곽의 중앙부분을 절개하고 펌프(peristaltic pump)에 연결된 주사바늘을 심침에 꽂고 0.02M phosphate-buffered saline(PBS, 4°C, pH 7.38) 100ml을 약 100 mmHg 동맥압으로 심장의 좌심실을 통해 대동맥내로 주입하고, 심장의 우심방을 절개하여 혈액이 흘러나올 수 있게 하였다. 이러한 방법으로 충분히 혈관내를 깨끗이 한 후 대퇴부를 절개하고 실리콘판으로 둘러싸인 양쪽 대퇴동맥을 조심스럽게 적출하였다.

입체현미경(stereoscope) 아래에서 미세한 수술가위를 이용하여 절단한 조직 일부는 10% normal buffered formalin에 고정시킨 후 파라핀에 포매하여 $10\mu\text{m}$ 의 크기로 절편을 만들고 hematoxylin-eosin(H-E)으로 염색하였다. 나머지 조직은 Optimal Cutting Temperature Compound에 넣어 드라이아이스를 녹인 차가운(-20°C) acetone에서 동결시킨 후 면역조직화학을 위한 동결 건조 절편을 만들었다. H-E 염색을 한 조직은 내피세포, 내탄력판(internal elastic lamina, IEL) 및 외탄력판(external elastic lamina, EEL), 그리고 중피층 평활근

세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

5) 두께, 횡단면도, 면적 및 혈관수 측정

H-E로 염색된 슬라이드를 WinVisionPro 2.1 NTSC를 사용하여 컴퓨터 이미지 영상을 잡고 이들의 이미지를 분석하였다. 영상에서 원하는 부위를 그린 후 혈관내강(mm^2), 혈관벽의 면적(mm^2)과 혈관벽의 두께(mm)를 정확히 측정하였다. 400배로 확대된 광학현미경 영상에서 혈관주위에 신생된 혈관수를 측정하였다.

6) 면역조직화학적 방법

동결시킨 혈관은 조직절편 제작시까지 -70°C 에 보관하였다. 동결 마이크로톰(freezing microtome)을 이용하여 -23°C 에서 $10\mu\text{m}$ 의 두께로 평행하게 절편을 만들 후 poly-L-lysine 용액으로 코팅한 슬라이드 글라스 위에 부착시켰다. 24시간 동안 충분히 건조시킨 다음 차가운(-20°C) acetone에 15분간 담가 조직을 고정시켰고, 1시간 이상 더 건조시켰다.

슬라이드를 0.05M PBS에 담가 수화시킨 후 0.6% hydrogen peroxide 용액을 20분간 처치하여 내인성 과산화효소를 억제시켰다. 이차항체의 숙주와 동일한 동물의 정상 혈청을 10% 농도로 사용하여(blocking antibody) 30분간 humidified chamber(37°C)에서 incubation시킨 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 정상 혈청을 떨어낸 후 내피세포와 반응하는 mouse ET-1 단클론성(monoclonal) 항체(1:500)를 희석용 완충액(3% 정상 혈청을 포함한 PBS)으로 희석시킨 용액에 4°C 에서 하룻밤 동안 incubation시킨 다음 PBS로 5분씩 3번 씻어내었다. 그 후 이차항체인 biotinylated, horse anti-mouse IgG(1:100)에 90분간 실온에서 incubation시킨 후 PBS로 씻어내었다.

Avidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex에 60분간 incubation

시킨 후 PBS로 5분씩 3번 씻어내고 니켈을 첨가한 diaminobenzidine(DAB) substrate kit를 이용하여 흑회색으로 발색시켰다.

PBS로 5분씩 3번 씻어내고 발색을 확인한 후 malinol을 사용하여 커버글라스를 붙여서 말린 후 보관하였다.

3. 통계처리

실험성적은 평균치±표준오차(Mean±SEM)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test와 oneway Analysis of Variance(ANOVA)로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 자가전혈 처치 후 연속된 혈관의 형태학 및 조직학적 변화

자가전혈을 처치한 후 2일째 혈관은 대조군의 혈관과 비교할 때 광학현미경 소견상에서는 차이가 나타나지 않았다. 혈관 내탄력판의 굴곡과 중피층에 존재하는 탄력판들이 규칙적으로 배열되어 있었다. 중피층과 외피층 사이에 존재하는 외탄력판도 형태의 변화가 거의 없었으며 자가전혈을 처치한 혈관주위에도 형태학적 변화는 나타나지 않았다(Fig. 2, A, B). 7일째 혈관에서는 혈관의 형태학적 변화가 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 1, A, B, C).

내탄력판이 규칙적인 배열을 보이지 않고 내강쪽으로 뾰족하게 나가거나 굴곡이 완만해졌고 내피세포의 형태학적 변화가 나타나기 시작하였다. 중피층은 불규칙적으로 형태가 변화되었고, 외탄력판도 굴

곡이 완만해지는 배열을 보였다. 혈관외피에는 신생된 혈관들이 관찰되었고, 혈관주위조직이 밀집된 형

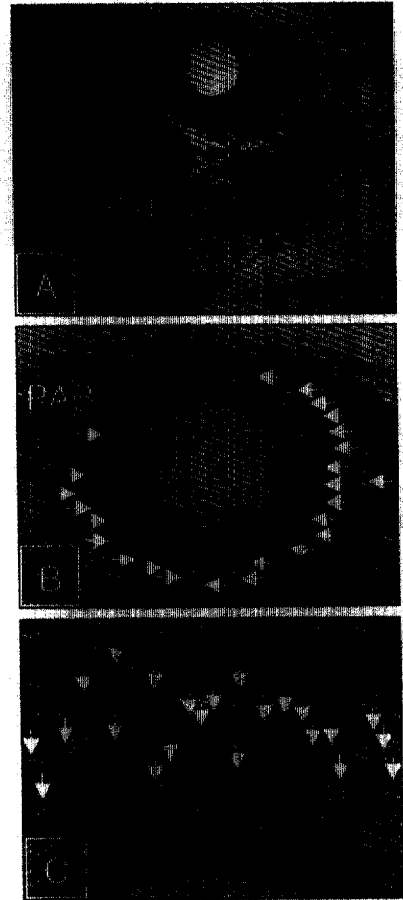


Fig 1. Light photomicrographs of rat femoral arteries 7 days after application of periarterial whole blood(PAB) with silicon tube. In the artery exposed to whole blood for 7-days, endothelial cells appeared to be distorted by con-volutions of the adjacent internal elastic lamina and protruded into the lumen.

Characteristically, a lot of newly generated vessels with numerous inflammatory cells are observed in the periphery of the vessel wall. Arrows indicates neo-vascularized blood vessels. Hematoxylin and eosin stain ; A : ×40, B : ×200, C : ×400.

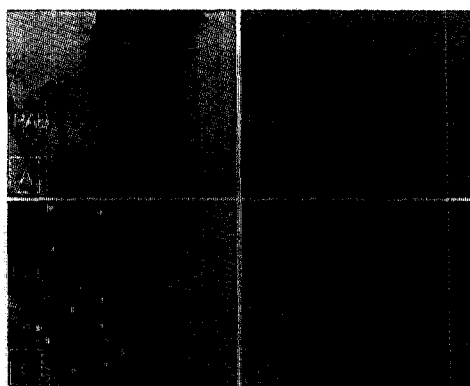


Fig. 2. Representative photomicrographs of rat right femoral artery sections stained for Hematoxylin and Eosin.

A and C, blood exposure to vein autologous whole blood for 2 and 7 days. B and D, the vessel exposed to whole blood for 2 and 7 days showed lower expression of ET-1 (ET-1 immunohistochemical staining, $\times 400$). Arrows indicates neovascularized blood vessels.

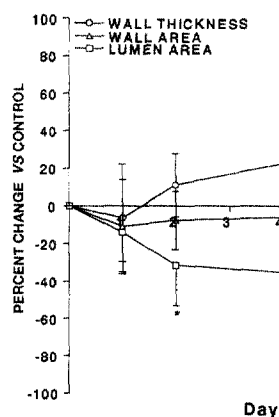


Fig- 3. Time course of changes in measured radial wall thickness and cross-sectional of lumen and vessel wall area in rat femoral arteries exposed to autologous whole blood.

Data are expressed as the mean percentage of change as compared with matched control. *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$. vs Control. $n = 4$.

Table 1. Time course of changes in measured radial wall thickness and cross-sectional areas of lumen and vessel wall in rat femoral arteries exposed to autologous whole blood and Bee Venom (1 : 5,000 and 1 : 500) for 1, 2, 5 and 7 days.

		Time after application of autologous whole blood			
		1 D	2 D	5 D	7 D
Lumen Area (mm ²)	Control	0.410 ± 0.032	0.402 ± 0.023	0.388 ± 0.018	0.385 ± 0.028
	PAB	0.353 ± 0.027	0.276 ± 0.018**	0.244 ± 0.024**	0.245 ± 0.036**
	PAB+BVI	.	.	0.164 ± 0.018***	0.142 ± 0.015***
	PAB+BVII	.	.	0.125 ± 0.021***	0.108 ± 0.018***
Wall Area (mm ²)	Control	0.082 ± 0.012	0.080 ± 0.013	0.077 ± 0.011	0.076 ± 0.010
	PAB	0.073 ± 0.015	0.074 ± 0.011	0.073 ± 0.013	0.073 ± 0.008
	PAB+BVI	.	.	0.081 ± 0.009	0.071 ± 0.011
	PAB+BVII	.	.	0.069 ± 0.005	0.072 ± 0.006
Wall Thickness (mm)	Control	0.048 ± 0.014	0.045 ± 0.012	0.043 ± 0.008	0.042 ± 0.007
	PAB	0.045 ± 0.010	0.050 ± 0.010	0.055 ± 0.009	0.066 ± 0.006*
	PAB+BVI	.	.	0.068 ± 0.004*	0.069 ± 0.003*
	PAB+BVII	.	.	0.070 ± 0.006*	0.071 ± 0.005*

Data are expressed as the mean ± SEM. BVI ; Bee Venom(1 : 5,000), BVII ; Bee Venom(1 : 500). * ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.001$ vs Control. $n = 4$.

태가 관찰되었다(Fig. 2, C, D).

자가전혈 처치 후 5일째와 7일째의 혈관내강은 각각 $0.244 \pm 0.024 \text{mm}^2$ 와 $0.245 \pm 0.036 \text{mm}^2$ 로 측정되어 대조군의 혈관내강($0.388 \pm 0.018 \text{mm}^2$, $0.385 \pm 0.028 \text{mm}^2$)에 비하여 유의하게 감소($P < 0.01$) 하였다.

혈관벽의 내피층과 중피층을 합한 면적은 대조군과 비교할 때 큰 변화가 나타나지 않았다. 자가전혈 처치후 5일째와 7일째 혈관벽의 두께는 각각 $0.055 \pm 0.009 \text{mm}$ 와 $0.066 \pm 0.006 \text{mm}$ 로 측정되어 대조군의 5일째와 7일째의 혈관벽의 두께($0.043 \pm 0.008 \text{mm}$ 와 $0.042 \pm 0.007 \text{mm}$)에 비하여 증가하였으며 특히 7일째는 유의하게 증가($P < 0.05$)하였다(Table 1). 대조군과의 상대적인 백분율 비교에서도 5일과 7일째에 혈관내강과 혈관벽 두께의 변화가 관찰되었다(Fig. 3).

2. 혈관연축에 대한 봉독약침의 효과

자가전혈을 5일간 처치한 혈관과 봉독약침을 시술한 혈관을 비교한 결과 5일간 자가전혈만을 처치한 경우와 1 : 5,000과 1 : 500 봉독약침을 시술한 혈관들의 형태학적인 변화는 우선 혈관내강의 심한 감소가 관찰되었다.

내탄력판, 중피층, 외피층 모두 불규칙적인 배열 상태로 변화였다. 봉독약침군은 혈관벽의 바깥쪽 영역으로 혈관주위세포와 조직들이 밀집하고, 혈관주위에서부터 혈관형성이 바깥쪽으로 시작되었고, 혈관형성과 비례하여 자가전혈을 처치한 영역이 점차 줄어드는 조직형태를 보였다(Fig. 4, A, B, C).

자가전혈 후 5일째 1 : 5,000 봉독약침군과 1 : 500 봉독약침군의 혈관내강은 각각 $0.164 \pm 0.018 \text{mm}^2$ 와 $0.125 \pm 0.021 \text{mm}^2$ 로 측정되어 대조군에 비하여 유의하게 감소($P < 0.001$)되었다. 혈관벽의 내피층과 중피층을 합한 면적은 봉독약침군과 대조군 및 자가전혈 처치군을 비교한 결과 유의한 변화

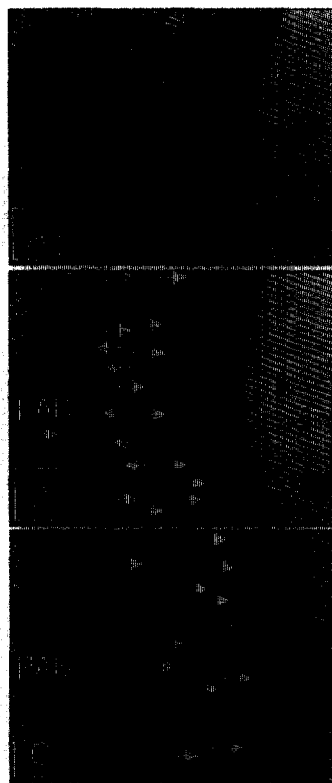


Fig 4. Representative photomicrographs of femoral artery sections.

A ; PAB, B; PAB plus Bee Venom(1 : 5,000) and C ; PAB plus Bee Venom(1 : 500). The vessel exposed to whole blood for 5 days showed over expression of angiogenesis prominently in the vessel wall areas (Hematoxylin and Eosin. $\times 400$). Arrows indicates neovascularized blood vessels.

가 나타나지 않았다. 1 : 5,000 봉독약침군과 1 : 500 봉독 유의하게 증가($P < 0.05$)되었다(Fig. 5).

대조군과 상대적인 백분율 비교에서도 봉독약침군의 경우 자가전혈 후 5일째 혈관내강과 혈관벽 두께의 변화는 현저하게 나타났다(Fig. 6).

자가전혈후 7일째 1 : 5,000 봉독약침군과 1 : 500 봉독약침군의 혈관내강은 각각 $0.142 \pm 0.015 \text{mm}^2$ 와 $0.108 \pm 0.018 \text{mm}^2$ 로 측정되어 대조군에

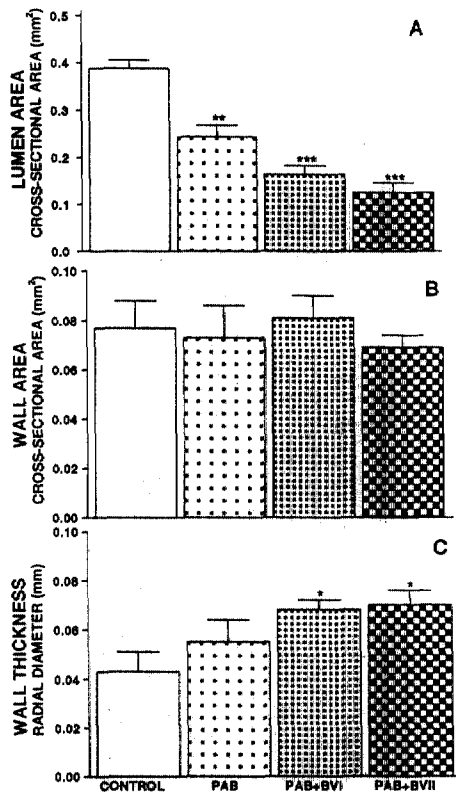


Fig 5. Morphometric analysis in rat femoral arteries exposed for 5 days to periarterial autologous whole blood(PAB), PAB plus Bee Venom(1 : 5,000, PAB+BVI), PAB plus Bee Venom(1 : 500, PAB+BVII).

A, cross-sectional area of lumen ; B, cross-sectional area of vessel wall ; C, radial wall thickness.

*, P<0.05 ; **, P<0.01 ; ***, P<0.001 vs Control. n=4

비하여 유의하게 감소(P<0.001)되었다. 혈관벽의 내피층과 중피층을 합한 면적은 봉독약침군과 대조군 및 자가전혈 처치군을 비교한 결과 유의한 변화가 나타나지 않았다. 1 : 5,000 봉독약침군과 1 : 500 봉독약침 군의 혈관벽 두께는 각각 0.069 ± 0.003mm과 0.071 ± 0.005mm로 측정되

어 대조군에 비하여 유의하게 증가(P<0.05)되었다 <Table 1>.

3. 자가전혈에 의해 연축된 혈관에 대한 봉독약침액의 수축반응

생리식염수를 2일간 처치한 대조군 혈관절편의 KCl(100mM)의 최대수축력(1.72g)과 비교할 때 자가전혈 처치군의 수축력은 17.4%(1.42g) 감소하였다. 7일째 대조군 혈관의 최대수축력(1.59g)에 대하여 자가전혈 처치군은 29.6%(1.12g)의 감소를 보였다(Fig. 7, A).

KCl에 대한 상대적인 봉독약침액의 혈관운동성은 1 : 500,000부터 1 : 500까지의 혈관수축반응이 용량과 농도-의존적으로 나타났다. 1 : 5,000과 1 : 500 봉독약침액은 2일째 혈관수축력에 비하여 17%와 12%의 감소를 보인 반면 7일째 혈관수축력은 50%와 49.4%로 현저한 감소를 보였다(Fig. 7, B).

4. 혈관연축과 혈관신생과의 관계

혈관연축은 자가전혈 처치 후 시간이 경과함에 따라 진행되었고, 혈관형태의 변화가 관찰되었지만 대조군은 7일이 경과되어도 신생된 혈관은 관찰되지 않았다. 대조군과 달리 자가전혈을 처치하고 혈관연축을 인위적으로 유발시킨 후 5일째 이후부터 신생혈관들이 관찰되기 시작하였다(Table 2). 자가전혈을 처치한 후 5일째(7.6 ± 0.8)의 신생혈관의 숫자를 비교할 때 1 : 5,000 봉독약침을 시술한 후 5일째(15.4 ± 1.43, P<0.001)와 1 : 500 봉독약침을 시술한 후 5일째(21.4 ± 2.17, P<0.001)에서는 현저한 증가가 관찰되었다. 7일째의 신생혈관의 숫자는 자가전혈 처치군(10.1 ± 0.98)에 비교할 때 1 : 5,000 봉독약침 시술군(29.8 ± 2.11)과 1 : 500 봉독약침 시술군(37.2 ± 1.58) 모두 현저히 증가(P<0.001)하였다(Fig. 8).

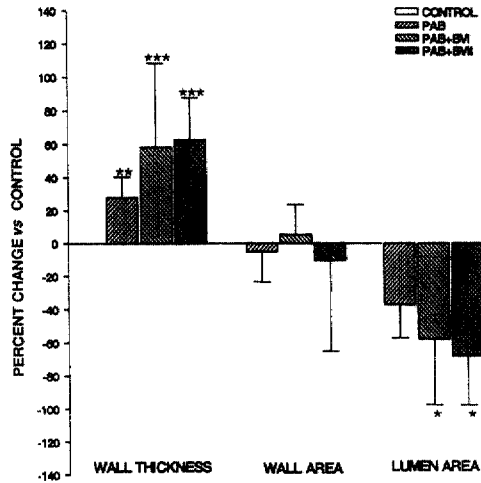


Fig. 6. Time course of changes in measured radial wall thickness and cross-sectional of lumen and vessel wall area in rat femoral arteries exposed for 5 days to autologous whole blood.

Data are expressed as the mean percentage of change as compared with matched control.
 *, P<0.05 ; **, P<0.01 ; ***, P<0.001.
 vs Control. n=4.

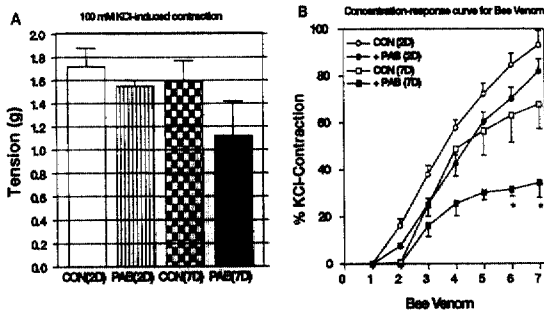


Fig. 7. Contraction-response curves of the femoral artery segments to 100 mM KCl (A) and Bee Venom (B). Results are expressed as mean ± SEM. CON ; Control, PAB ; periarterial application of whole blood.

1 represents Bee Venom solution 1 : 500,000,
 2 = 3 × (1 : 500,000), 3 = 1 : 50,000,
 4 = 3 × (1 : 50,000), 5 = 1 : 5,000,
 6 = 3 × (1 : 5,000), 7 = 1 : 500. *, P<0.05. n=4.

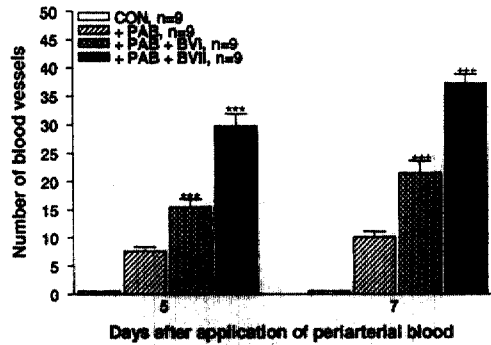


Fig. 8. Number of neovascularized blood vessels after blood exposure to vein autologous whole blood for 5 and 7 days. Control, sections was taken from the saline-exposed vessel for 5 and 7 days.

CON ; control, PAB ; blood-exposed vessel for 5 and 7 days,
 PAB plus BVI ; blood plus Bee Venom(BVI, 1 : 5,000)-exposed vessel for 5 and 7 days,
 PAB plus BVII; blood plus Bee Venom(BVII, 1 : 500)-exposed vessel for 5 and 7 days. ×400.
 ***, P<0.001 vs PAB,
 +++, P<0.001 vs PAB. n=9.

Table 2. Number of neovascularized blood vessels after blood exposure to vein autologous whole blood for 1, 2, 5 and 7 days.

	Time after application of autologous whole blood			
	1D	2D	5D	7D
Control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
PAB	0.0±0.0	0.0±0.0	7.6±0.80	10.1±0.98
PAB+BVI	0.0±0.0	0.0±0.0	15.4±1.43***	21.4±2.17***
PAB+BVII	0.0±0.0	0.0±0.0	29.8±2.11***	37.2±1.58***

Control ; saline-exposed vessel for 1, 2, 5 and 7 days.
 PAB ; blood-exposed vessel, BVI ; Bee Venom (1 : 5,000), BVII ; Bee Venom (1 : 500). ×400.
 ***, P<0.001 vs PAB.
 +++, P<0.001 vs PAB. n=9.

5. 봉독약침 시술후의 연속혈관에 대한 면역조직화학적 분석

ET-1 단클론성 항체를 이용하여 혈관내피의 ET-1 발현정도를 비교한 결과 대조군에 비하여 자가전혈을 투여한 경우에도 2일, 5일과 7일의 시간

경과에 대하여 혈관내피의 ET-1은 약하게 발현되었다(Fig. 2, B, D, Fig. 9. A). 반면에 자가전혈만 처치한 군과 달리 1 : 5,000 봉독약침과 1 : 500 봉독약침 시술군에서는 혈관연축 정도에 비례하여 혈관내피의 ET-1의 발현정도가 현저하게 증가하였다.(Fig. 9. B, C).

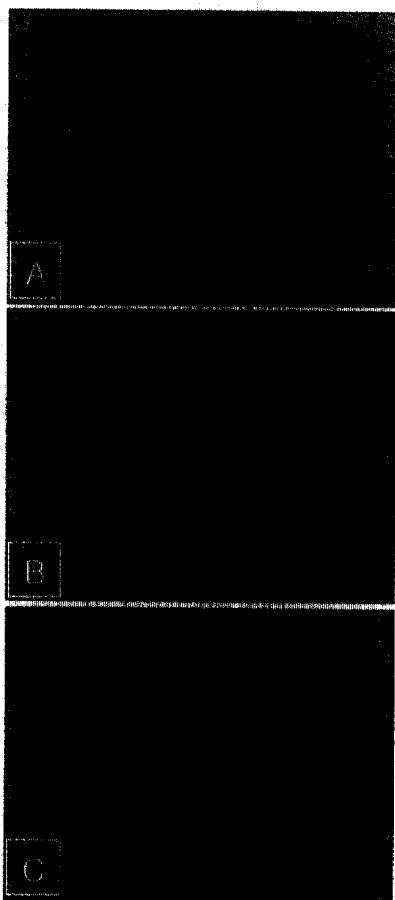


Fig 9. Photomicrographs of endothelial cell ET-1 expression from an animal after blood exposure to vein autologous whole blood for 5 days.

A, sections was taken from the blood-exposed vessel for 5 days. B, blood plus Bee Venom(1 : 5,000)-exposed vessel, C, blood plus Bee Venom(1 : 500)-exposed vessel. ×400.

IV. 고찰

봉독이란 기원전 2000년경의 이집트의 파피루스 문서나 중국에서 발견된 기원전 168년 馬王堆醫書 이후부터 각종 동통 및 염증성 질환에 응용되어온 치료법¹⁶⁾으로서 꿀벌의 독낭에 들어있는 봉독을 추출 가공하여 경혈 및 일정 부위에 자입함으로써 자침 및 봉독의 화학적 효과를 통하여 인체의 기능을 조정하고 질병상태를 개선하여 질병을 치료하고 예방하는 신침요법의 일종이다¹⁴⁾.

봉독의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 그 효능은 祛風除濕, 止疼痛, 解癢平喘, 消腫強壓하며 적응증으로는 류마티스, 급만성관절염, 좌골신경통, 통풍, 근육통, 편두통, 기관지천식, 과민성비염, 결절성홍반, 담마진, 갑상선기능항진 및 고혈압 등에 효과가 있다⁷⁾.

봉독약침 치료의 적응증은 침구요법의 적응증에 모두 사용 가능하나 치료과정에서 깊은 주의가 요망되고 allergy 반응으로 인한 불편 등을 감수해야 하므로 비교적 일반 치료로 잘 회복되지 않는 중증의 질환에 사용하는 것이 좋으며 특히 면역계, 근골격계, 신경계 질환 중 통증이 수반된 병증에 치료율이 좋다¹⁴⁾.

봉독에 관한 연구는 국내에서는 소염진통⁸⁾, 관절염¹⁷⁾, 치사량 및 독성¹⁸⁾, 항경련¹⁹⁾, 면역⁹⁾과 항암¹⁰⁾에 대한 연구가 진행되었으며 임상적으로 는

류마티스²⁰⁾, 퇴행성 관절염²¹⁾, 발열²²⁾, 요통²³⁾, 염좌²⁴⁾, ALS²⁵⁾, 근이영양증²⁶⁾, 전신성홍반성낭창²⁷⁾, 중풍 후 견비통²⁸⁾ 등에 대한 효과가 보고되고 있으며 특히 황²⁹⁾은 봉독약침 후 발생하는 anaphylaxis에 대해서 보고하였으며 최근에는 진통, 면역과 항암에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

국외에서는 봉독과 알러지¹¹⁾ 및 면역과의 관계⁹⁾가 진행되고 있으며 특히 주성분을 이루고 있는 melitin, apamin, phospholipase A2에 관한 근골격계 및 혈관에 미치는 작용 또는 생리기전에 관한 연구³⁰⁾가 활발히 진행되고 있다.

특히 혈관 평활근에서는 Chand 등¹²⁾은 평활근으로 이루어진 기도와 기관지가 봉독에 의해 수축작용을 일으키는 것을 보고하였고 Cerne 등¹³⁾은 봉독이 용량 의존적으로 관상동맥의 수축작용이 있으며 lacidipine이 이를 감소시킨다고 하였다.

봉독은 봉독약침에 대해 심한 알러지의 과거력을 경험한 환자나 심혈관질환, 신장질환, 결핵, 매독, 임질, 인슐린 의존성 당뇨병, 월경중 출혈이 많은 경우, 임신부에는 주의해서 사용하여야 하며¹⁴⁾ 특히 심혈관 질환에서는 봉독의 혈관 평활근의 수축작용이 보고^{12),13)}된바 더욱더 신중을 기해야 한다고 사려된다.

봉독약침을 주입하는 氣海穴(CV6)은 臍下 1寸 5分에 위치하며 元氣之海로 調氣益元, 培腎補虛, 和營血理經帶, 溫下焦, 祛濕鎮陽固精하는 작용이 있어 高血壓, 中風脫證, 不眠, 不安, 神經衰弱, 虛脫, 四肢無力, 四肢厥冷, 遺精, 遺尿, 無月經, 月經困難, 帶下, 癥瘕, 陰痿, 腸炎, 胃炎 등에 사용된다³¹⁾.

혈관연축은 지속되는 혈관 수축증상으로 혈관벽이 두꺼워져 직경과 혈류가 감소하는 상태를 말하며 중풍이나 뇌손상에서 회복을 둔화하거나 악화시키는 요인이 된다¹⁾. 특히 뇌동맥류 파열시 직접적인 뇌손상보다도 가장 문제가 되고 있는 것이 혈관연축이다²⁾.

지주막하 출혈(subarachnoid hemorrhage; SAH)은 뇌의 지주막하 공간내로 출혈이 일어나는 것으로서 허혈성 손상을 유발하고 사망에 이르게 하는 주된 원인으로 알려져 있으며³²⁾, 혈관의 형태학적인 변화 뿐만 아니라 혈관 운동성에도 변동이 일어나며, 일반적으로 7~10일 경과 후에 지연성 혈관연축(delayed arterial vasospasm)을 동반함을 특징으로 한다³³⁾.

Sasaki 등³⁴⁾에 의하면 두개내 출혈 후 주로 7~10일경에 혈관경련이 초래된다고 하였고, Okada 등³⁵⁾은 대퇴동맥 주위 혈액처리 후 7일째 가장 현저한 혈관벽의 두께의 증가를 관찰하였으므로 본 연구에서도 7일을 기준으로 관찰하였다.

지연성 혈관연축의 발생기전에 대하여서는 아직 뚜렷하게 밝혀진 바가 적으나 개나 원숭이의 적출 뇌혈관에 대하여 oxyhemoglobin이 뇌혈관의 수축과 연축작용에 주로 관여된다고 보고되고 있다³⁶⁾. 연축이 야기된 혈관벽에 염중세포가 증가하고⁴⁾, 혈관경련이 야기될 때에 혈장과 혈관벽에 면역글로블린과 보체가 증가한다⁵⁾는 점에서 이들 결과들이 비록 간접적인 증거이기는 하나 염증반응으로 설명되기도 한다.

뇌혈관은 내피 투과성, 효현제에 대한 혈관 수축성 및 외피의 특성 등에서와 같이 두개의 혈관(extracranial vessel)과는 다소 다르다³⁷⁾고 하나, SAH를 비롯한 여러 손상들에 대한 반응은 이들 혈관에서 나타나는 반응과 비슷한 것으로 보고된 바 있다³⁸⁾.

뇌혈관 연축에 대한 기전을 연구함에 있어서 뇌혈관을 이용하는 것은 당연하겠으나, 지연성 혈관연축은 혈관 외피주위의 혈액에 의한 여러 동맥들의 공통적인 반응이라는 보편성에 입각하여, 본 연구에서는 뇌저동맥의 주위에 혈액을 주입하는 대신 많이 대응해서 사용되고 있는 말초동맥인 대퇴동맥모델을 이용하였다.

실제 대퇴동맥과 뇌동맥은 같지가 않지만 내피세

포의 투과성, 혈관신생과의 관련성, 효현제에 대한 반응성, 외피의 기질이나 두께 등의 혈관 형태학적인 연구를 쉽게 할 수 있도록 해주는 이점을 가지고 있기 때문에 본 모델을 연구에 사용하였다.

SAH의 경우에는 뇌지주막하의 혈관벽에 작용한 혈액량이 매우 중요하다는 보고³⁹⁾가 있었고, 실제로 유출된 혈액량을 측정하는 것이 매우 어렵기 때문에 본 연구에서는 혈액량을 자가전혈 0.1cc로 균일하게 하였다. 혈액이 실리콘 관 밖으로 유실되는 것을 막기 위하여 실리콘 관속에서 혈액을 5분간 응고시키는 과정을 가졌으며 또한 혈액노출 기간이 혈관연축의 정도를 결정하는데 중요한 인자가 된다는 보고⁴⁰⁾에 근거하여 수술 후 2, 5와 7일의 시간 간격을 두었다.

대부분의 정상적인 혈관의 혈관운동성은 수축과 이완이 원활히 잘 일어나는 형태를 보이고 있다. 본 연구에서 자가전혈 처치 후 2일째의 혈관운동성은 감소하지 않았으나 자가전혈을 처치한 후 7일이 경과한 후의 혈관운동성은 현저히 떨어졌다. 이때 혈관조직을 검사한 결과 혈관연축이 심하게 진행된 것이 관찰되었고, 실제 혈관운동성은 혈관연축의 정도와 비례하는 양상으로 볼 때 혈관연축의 정도에 따라 혈관운동성이 결정되었다.

혈관의 형태조직학적 변화는 2일째에는 큰 변화가 없었고, 5일째부터 관찰되었으며, 7일째에는 현저한 변화를 보였다. 혈관내강은 5일째부터 감소하기 시작하였고, 혈관벽의 면적과 두께는 큰 변화가 없었다. 7일째의 혈관내강은 현저히 감소하였고, 혈관벽의 두께가 증가하였다. 이런 변화는 대조군이나 자가전혈을 처치한 혈관보다 봉독약침의 처치군에서 강하게 나타났다.

혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 것을 의미하며, 정상적인 성장과정 뿐만 아니라 병태생리학적인 상태에서 많이 발생된다. 배발생, 자궁내막재생 및 상처치유 등

과 같은 생리적 조건하에서 혈관신생은 일시적인 현상으로 야기되지만 염증과 같이 각종 질병과 연관된 혈관신생은 빠른 속도로 진행될 뿐만 아니라 지속적으로 야기된다. 성인에 있어서 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증, 동맥경화증, 건선 및 악성종양 등과 혈관신생은 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다^{6),41)}.

본 연구에서는 대퇴동맥의 외피에 자가전혈을 처치하고 5일과 7일에 대퇴동맥을 적출하여 동맥혈관주위에 새롭게 신생된 혈관을 관찰하였는데 대조군에서는 혈관신생이 전혀 관찰되지 않은 반면 봉독약침을 주입한 혈관에서는 자가전혈 처치군보다 많은 신생된 혈관을 관찰할 수 있었다.

실제로 혈관운동성에 관련된 연구^{3),4),36)}에서 혈관수축력과 혈관이완력이 강한 물질들은 혈관신생과 밀접한 연관성을 보였다. 대표적인 내인성 수축물질인 endothelin-1(ET-1) 등이 혈관신생을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다⁴¹⁾.

이와 다른 견해로 Iglarz M 등⁴²⁾은 endothelin 수용체인 ETA와 ETB를 지속적으로 차단하면 쥐의 대퇴 동맥을 차단함으로써 생긴 허혈로 유도된 혈관신생을 증가시킨다는 보고를 하였다. 이는 허혈시에는 endothelin 수용체를 차단한 경우에 혈관신생을 유발한다는 사실을 보고한 경우이다.

하지만 본 연구에서는 대퇴동맥에 혈관연축을 유발한 경우에 ET-1에 대한 발현정도를 면역조직화학법으로 확인해 본 결과 혈관연축의 정도와 비례하여 혈관내피에 ET-1 발현이 현저히 증가되었고, 강력하게 혈관신생을 유도시키는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 항암 활성을 보이고 있는 봉독약침¹⁰⁾을 혈관신생을 억제효과를 관찰하고자 했으나 혈관연축 상황에서는 봉독약침이 혈관신생을 유도하지만 혈관의 연축이 너무 빠르게 진행되었다.

물론 이것에 대한 정확한 기전에 대해서는 아직

밝혀진 것이 없는 실정이고, 혈관연축이 왔을 때 장기적인 봉독의 치료에 대해서는 아직 관찰하지 못했다. Tomohisa 등³⁵⁾에 의하면 실제로 SAH 유발 후 20일에는 혈관내강이 다시 SAH 전과 거의 유사한 크기로 다시 회복되는 양상을 보였고, 혈관의 두께도 감소하였다. 이와 같이 장기적인 봉독 약침의 효과를 비교해 보는 것도 앞으로 필요할 것이다.

혈관연축 상황에서 혈관신생이 일어나는 것은 이러한 염증반응에 의한 것일 수도 있고, 혈액속의 혈관생성인자들의 발현 등에 의한 것일 수도 있지만 아직 구체적으로 밝혀진 사실은 없다.

봉독약침 시술군의 혈관의 형태학적인 변형과 혈관내피에서의 ET-1의 발현에서 보는 바와 같이 혈관신생의 증가는 주위조직들의 충진을 도와주고 혈관조직 주위를 밀집된 형태로 변화시켰는데 이런 현상은 혈관의 전체적인 수축을 증가시키고 혈관연축이 빠르게 진행되는 방향으로 나아가게 하는 것으로 보인다.

혈관연축이 왔을 때 혈관신생이 유도된다는 점은 허혈성 상태가 오는 것을 차단하기 위하여 영양분과 산소공급을 원활하게 하기 위한 보상기전이라고 생각되지만 봉독약침을 시술한 경우는 더욱 빠르게 진행된다는 사실은 대퇴동맥 모델에서만 일어나는 상황이 아니라 뇌혈관에서도 같은 경향성을 나타낼 것으로 보인다.

이상의 결과에서 봉독약침은 자가전혈로 유발된 혈관연축에 대하여 형태학 및 조직학적인 면에서 많은 변화를 일으켰고, 혈관주위에는 혈관신생이 유도되었으며, 혈관내피에 ET-1의 발현이 현저하게 증가되는 것을 관찰하였다.

그러므로 향후 지주막하 출혈을 비롯한 뇌혈관 질환 환자에게 대해서는 봉독약침을 신중하게 사용하여야 할 것으로 보이며 봉독약침과 혈관연축에 대한 기전 연구가 지속되어야 할 것으로 사

려 된다.

V. 결 론

봉독약침이 혈관연축에 미치는 영향을 알아보기 위하여 백서 대퇴동맥의 혈관연축모델을 이용하여 봉독약침이 지연성 혈관연축시 발생하는 혈관의 운동성, 형태조직학적 및 면역조직학적 변화와 혈관신생에 미치는 영향을 비교, 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대퇴동맥 혈관연축모델에서 봉독약침에 의한 혈관수축 반응은 봉독약침에 대하여 용량 및 농도-의존적인 것으로 나타났다.

2. 대퇴동맥 혈관연축모델에서 봉독약침의 혈관수축반응은 시간의 경과에 따라 혈관운동성이 감소하였다.

3. 대퇴동맥의 혈관연축에 대한 형태학적, 조직학적 검사상에서 대조군과 자가전혈 처치군에 비하여 자가전혈 처치 후 5일째부터 1:5,000 봉독약침군, 1:500 봉독약침군의 혈관내강의 감소와 혈관벽 두께의 증가가 유의성 있게 관찰되었다.

4. 자가전혈 처치 후 5일째부터 대퇴동맥의 혈관주위에는 1:5,000 봉독약침군, 1:500 봉독약침군의 경우 혈관신생이 대조군과 자가전혈 처치군에 비하여 현저한 증가를 나타내었다.

5. 자가전혈 처치 후 혈관내피에서 발현되는 ET-1의 정도는 봉독약침군의 경우 혈관연축과 함께 강하게 나타났다.

VI. 참고문헌

1. Alexander W Clowes, Michael A Reidy, Monica M Clowew. Mechanisms of stenosis after arterial injury. Laboratory Investigation. 1983 ; 49 : 208-215.
2. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울 : 중앙문화진수출판사. 1996 : 291-292.
3. Tadayoshi Nakagomi, Neal F. Kassell, Tomio Sasaki, Shigeru Fujiwara, R. Michael Lehman, and James C. Torner. Impairment of endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine and adenosine triphosphate following experimental subarachnoid hemorrhage. Stroke. 1987 ; 18 : 482-489.
4. Peterson JW, Kwun BD, Hackett JD, Zervas NT. The role of inflammation in experimental cerebral vasospasm. J Neurosurg. 1990 ; 72 : 767-74.
5. Pelletieri L, Nilsson B, Carlsson CA, Nilsson U. Serum immunocomplexes in patients with subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery. 1986 ; 19 : 767-71.
6. Risau W, Flamme I. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997 ; 386 : 671-674.
7. 朱文峰. 실용중의사전. 陝西 : 陝西科學技術出版社. 1995 : 402.
8. Lee JH, Kwon YB, Han HJ, Mar WC, Lee HJ, Yang IS, Beitz AJ, Kang SK. Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. J Vet Med Sci. 2001 ; 63(3) : 251-259.
9. 권기록, 고흥균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(1) : 169-174.
10. 박찬열, 남상수, 김창환, 이재동, 강성길, 이윤호, 안병철. 약침용 봉독액이 흑색세포에 미치는 항암효과에 대한 분자생물학적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(2) : 169-186.
11. Annala I, Saarinen JV, Nieminen MM, Moilanen E, Hahtola P, Harvima IT. Bee venom induces high histamine or high leukotriene C4 release in skin of sensitized beekeepers. J Investig Allergol Clin Immunol. 2000 ; 10(4) : 223-8.
12. Chand N, DeRoth L. Contraction of guinea-pig trachea and bronchus by honey bee venom. Toxicol. 17(6) : 583-9, 1979.
13. Cerne K, Drevensek G, Budihna MV. Lacidipine decreases the honeybee venom-induced vasoconstriction of the isolated porcine coronary artery. Pflugers Arch. 440(5 Suppl) : R139-40, 2000.
14. 김문호. 봉독요법과 봉침요법. 서울 : 한국교육기획 1992 : 20-37, 144.
15. 고흥균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상용혈위. 대한침구학회지. 1999 ; 16(3) : 115-122.
16. 인창식, 고흥균. 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌 : 마왕퇴의서의 봉독요법 2례. 대한침구학회지. 1998 ; 15(1) : 143-147.
17. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Beitz AJ, Lee JH. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. Pain. 2001 ; 15 ; 90(3) : 271-80.

18. 이종석, 고희균, 김창환. 약침용 봉독액의 급성 독성에 관한 연구. 대한침구학회지. 1994 ; 11 (1) : 177-198.
19. 공현숙, 고희균, 김창환. 봉침독요법이 항경련에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1993 ; 10 (1) : 159-166.
20. 황유진, 이견목, 황우준, 서은미, 장종덕, 양귀비, 이승훈, 이병철. 봉약침을 이용한 류마티드 관절염의 임상적 연구. 대한침구학회지. 2001 ; 18(5) : 33-42.
21. 왕오호, 안규범, 임진강, 장형석. 퇴행성 슬관절염의 봉독약침 치료효과에 대한 임상적 관찰. 대한침구학회지. 2001 ; 18(3) : 35-47.
22. 이종석, 김용석, 고희균. 약침용 봉독액의 항원 성시험 및 발열성시험에 관한 연구. 경희한의 대논문집. 1995 ; 18(1) : 123-134.
23. 김지훈, 이재동. 요추간판탈출증 환자 22예에 대한 봉독약침 치료의 요통 평가지수를 이용한 임상보고. 대한한의학회지. 1999 ; 20 (2) : 200-207.
24. 권기록. 봉약침요법의 염좌에 관한 임상적 연구. 대한약침학회지 1999 ; 2(1) : 1-6.
25. 김영호, 육태한, 송범룡, 이동호. 봉약침을 이용한 진행성 근위축증 환자 1예에 대한 증례보고. 대한약침학회지. 2000 ; 3(1) : 119-140.
26. 유창길, 이진선, 권기록. 진행성 근이영양증 환자 1예에 대한 증례보고. 대한약침학회지. 2000 ; 3(2) : 233-244.
27. 안창식, 강계성, 권기록. 전신성 홍반성 낭창 환자 1예에 대한 증례보고. 대한약침학회지. 2000 ; 3(2) : 245-255.
28. 안창식, 남상수, 김용석, 이재동, 김창환, 고희균. 중풍 편마비환자의 견관절 동통에 대한 봉독약침요법의 효과. 대한약침학회지. 2000 ; 3 (2) : 213-232.
29. 황유진, 이병철. 봉독약침 후 발생한 Anaphylaxis에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000 ; 17(4) : 149-159.
30. Pacakova V, Stulik K. Validation of a method for determination of phospholipase A2 and melittin in bee venom preparations by capillary electrophoresis. J AOAC Int. 2000 ; 83(3) : 549-54.
31. 전국한의과대학 침구경혈학교실. 침구학. 서울 : 집문당. 1991 : 724-5.
32. Kassell NF, Sasaki T, Colohan ART, Nazar G. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke. 1985 ; 16 : 562-572.
33. Heilbrun, MP, Olesen J, Lassen NA. Regional cerebral blood flow studies in subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. 1972 ; 67 : 558-64.
34. Sasaki T, Kassell NF, Colohan RT, Nagar GB. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. In Cerebrovascular Survey Report, ed. by McDowell FH and Caplan LR. Washington DC :NINCDS. 1985 : 109-132.
35. Okada T, Harada T, Bark DH, Mayberg MR. A rat femoral artery model for vasospasm. Neurosurgery, 1990 ; 27 : 349-56.
36. Noboru Toda, Masahisa Kawakami, Kazuhide Yoshida. Constrictor action of oxyhemoglobin in monkey and dog basilar arteries in vivo and in vitro. Am J physio. 1991 ; 260(Heart Circ. Physiol. 29) : H420-425.
37. Rhodin J. Architecture of the vessel wall. In Handbook of Physiology. ed. by Bohr

- D, Somlyo A, Sparks H. Philadelphia : WB Saunders. 1980 : 1-31.
38. Mayberg MR, Okada T, Bark DH. Morphologic changes in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am*. 1990 ; 1 : 417-32.
39. Fisher CM, Roberson GH, Ojemann RG. Cerebral vasospasm with ruptured saccular aneurysm—the clinical manifestations. *Neurosurgery*. 1977 ; 1 : 245-8.
40. Handa Y, Weir BK, Nosko M, Mosewich R, Tsuji T, Grace M. The effect of timing of clot removal on chronic vasospasm in a primate model. *J Neurosurg*. 1987 ; 67 : 558-64.
41. Villaschi S, Nicosia RF. Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab Invest*. 1994 ; 71(2) : 291-9.
42. Iglarz M, Silvestre JS, Duriez M, Henrion D, Levy BI. Chronic blockade of endothelin receptors improves ischemia-induced angiogenesis in rat hindlimbs through activation of vascular endothelial growth factor-nopathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 ; Oct ; 21(10) : 1598-603.