

TNBS로 유도된 흰쥐의 大腸炎에 대한 露蜂房 藥鍼의 효과

송정방^{1,2*}, 김재효^{2,3*}, 김유리², 박유리², 안성훈^{2,3}, 손인철^{2,3*}

¹초민한의원, ²원광대학교 한의과대학 경락경혈학교실, ³원광대학교 한국전통의학연구소

Herbal Acupuncture of Nidus Vespae Suppresses c-Fos Expression by TNBS Induced Colitis in Rats

Jeong Bang Song^{1,2}, Jae Hyo Kim^{2,3}, Yu Lee Kim², Yu Ree Park²,
Seong Hun Ahn^{2,3}, In Chul Sohn^{2,3}

¹Cho-min's Korean Medical Clinics,

²Dept. of Meridian & Acupoint, College of Korean Oriental Medicine, Wonkwang University,

³Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

† These two authors contributed equally to this work.

Abstract

Objectives : Transient inflammation has been demonstrated to alter visceral sensory function in animal models and acute mucosal inflammation may precede the manifestation of visceral hyperalgesia. Thus in this study we compared effects of herbal acupuncture of Nidus Vespae (NV) applied to the different acupoints in the acute colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) intracolonic injection in rats.

Methods : In Male Sprague-Dawley rats, weighing 250 ~ 400 g, TNBS (5 mg/kg) was infused intrarectally through a silicon rubber catheter into the anus under isoflurane anaesthesia. Under general anesthesia, acupoints of LI4 (Hapkok), SI25 (Cheonchu), ST36 (Joksamni), BL25 (Daejangsu) were intramuscularly injected by NV. Expressions of cFos protein in the periaqueductal gray (PAG), locus coeruleus (LC), nucleus of solitary tract (Sol), and the 6th lumbar spinal cord (L6 s.c.) were observed at 24 hrs after TNBS induced colitis by immunohistochemistry.

Results : The expression of c-Fos protein in L6 s.c., Sol, LC and PAG increased 24 hrs after TNBS injection into colorectum as compared to normal group. NV herbal acupuncture also inhibited the expression of c-Fos protein in Sol but not L6 s.c., LC, and PAG. NV to ST36 inhibited significantly the c-Fos expression in Sol and PAG. NV to ST25 inhibited the c-Fos protein expression all over the observation area. NV to BL25 showed the inhibitory effects in the areas except LC. Whether or not a role of endogenous opioids, intrathecal injection of naltrexone (30 ug / 30 ul) was applied before the 2nd herbal acupuncture treatment 24 hrs after TNBS-induced colitis in rat. Naltrexone reversed the inhibition of c-Fos protein expression in the spinal cord and brainstem under different conditions such as type of herbal acupuncture compound and choice of acupoint.

Conclusions : In summary, these data show that herbal acupuncture of NV inhibits signal pathways such as spinal cord and brain stem ascending hypersensitivity of colorectum after TNBS induced colitis. This effect may be mediated by acupoints through the endogenous opioid system involving the pain modulation.

Keywords : herbal acupuncture, Nidus Vespae, colitis, rat, c-Fos

1. 서론

炎症性 大腸炎은 장기간에 걸쳐 血便, 설사, 체중감소 등의 증상 등을 말하는 것으로泄瀉, 腹痛, 下痢, 腸癰 등의 범주에 포함되

· 교신저자: 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 경락경혈학교실, Tel : 063-850-6448, Fax : 063-857-6458, E-mail : ichsohn@wku.ac.kr

· This work was supported by the Korean Science and Engineering Foundation (KOSEF) grant funded by the Korean government (MOST) (No. R13-2008-028-01000-0).

· 투고 : 2009/11/25 심사 : 2009/12/17 채택 : 2009/12/22

는데¹⁾ 우리나라에서도 그 빈도가 점차 증가하는 추세이다²⁾. 大腸에 염증을 일으키는 질환인 特發性 炎症性 腸疾患은 임상적 양상과 형태학적 특징을 통해서 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론씨 병(Crohn's disease)으로 구분하고 있으며³⁾, 이들 환자들에서 腸管에 대한 자극에서 통증을 동반한 과민반응이 크게 증가한다⁴⁾.

炎症性 大腸炎의 原因이나 病態生理는 아직 확실히 밝혀져 있지 않은 상태로 만족할 만한 治療法 또한 없는 실정이나²⁾, 근래 들어 炎症性 大腸炎의 치료에 대한 研究가 활발해지고 있다⁵⁾. TNBS 유도 대장염의 점막에서 염증유도 매개물질들인 tachykinins, TNF- α , IL-1 β 등의 발현의 증가는 염증성 장질환의 유도 및 유지에 중요한 역할을 하며⁶⁾, 세포 부착 물질중의 하나인 ICAM-1은 여러 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{4,7-9)}. 또한 장점막의 염증은 이차적으로 중추신경계를 지속적으로 흥분시켜 腸管의 통각과민(hyperalgesia)과 만성적인 통증을 야기한다¹⁰⁾.

한의학에서는 濕熱, 脾胃兩虛, 脾虛, 腎虛, 肝脾不和, 血瘀 등으로 病因을 나뉘며, 清熱利濕을 위주로 健脾益腎, 活血和瘀, 利氣和血을 治療 방향으로 제시하고 있다¹¹⁾. 炎症性 大腸炎에 대한 治療方法은 주로 藥物과 鍼灸治療로 나뉘는데 鍼灸치료에 있어서 足三里를 많이 활용하고 있으며¹¹⁾, TNBS로 야기된 大腸炎에 대하여 혈위에 따른 약침¹²⁾ 또는 전침자극¹⁰⁾ 등이 大腸炎의 증상을 완화하거나 염증을 억제하였다는 결과가 보고되었으며, 艾葉¹²⁾ 등 다양한 약물을 이용

한 藥鍼 자극의 大腸炎에 대한 효과들도 보고 되었다.

露蜂房(Vespae Nidus)은 말벌과(胡蜂科: Vespidae)의 벌집으로 거풍공독(祛風攻毒), 살충지통(殺蟲止痛)을 지닌 약재로, propolis을 포함한 主要成分들이 과산화 지질의 함량변화를 감소시키고, SOD 활성도 및 Catalase 활성도를 증가시켜 항산화 및 消炎鎮痛작용을 나타내었고¹³⁾, 강력한 항산화로 독성산화제를 소거함으로써 세포보호 작용을 촉진¹⁴⁾과 peroxynitrite 제거를 통한 세포의 노화과정 및 노화관련 질환 예방에 효과를 나타낼 것으로 추정하고 있다¹⁵⁾.

본 연구는 실험동물에서 TNBS 주입으로 야기된 大腸炎에 의해 중추신경계에서 발현되는 c-Fos 단백질의 변화를 바탕으로 露蜂房 藥鍼을 이용한 穴位에 따른 효과를 비교 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 250 ~ 400 g의 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐(샘타코, 한국)를 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 온도 22 ± 1 °C, 상대습도 55 ± 10 %의 조건에서 실험실 환경에 적응할 수 있도록 하여 stress 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화하였다. 실험하기 전 및 실험 기간에 동물들은 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

2. 동물마취

모든 수술 또는 刺戟 동안 실험동물은 3 % isoflurane(중외제약, 한국)과 95 % 산소(O₂)를 포함한 혼합가스를 2 l/min로 마취하였으며, 마취가 이루어진 뒤 0.5 ~ 1 % isoflurane과 95 % 산소의 혼합가스로 마취를 유지하였다.

3. 급성 대장염의 유발

실험동물의 대장염 유발 전날부터 금식시킨 후, 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 mg/kg과 50 % Ethanol을 각각 일대일로 혼합한 용액 0.8 ml을 준비하였다. 백서를 isoflurane으로 마취시킨 후 외경 0.2 cm, 길이 8 cm의 polyethylene catheter를 흰쥐 항문으로 삽입하여 5 mg/kg TNBS/ 50 % ethanol 혼합용액 0.8 ml을 1회 주입하여 대장염을 유발시켰다.

4. 약침액 제조

露蜂房은 충북 영동군 추풍면 지봉리에서 채취한 자연산 말벌집을 건조한 직경 약 10 cm의 크기로 대한약침학회에 증류약침으로 제조의뢰 하여 공급 받아 사용하였고, 증류약침의 제조 과정¹⁶⁾은 다음과 같다. ① 약재 처방 및 세척: 약재를 채반에 담아 3차 증류수(Ultra Pure 900, USA)에 세척한다. ② 약재의 침출: 반응조 하부에 약재 400 g과 3차 증류수 2500 ml을 60분 동안 실온상태에 두어 약재를 침출한다. ③ 전탕: 약재 침출 후 105 °C에서 120분간 전탕을 한다. ④ 추출: 107 °C에서 발생하는 수증기

를 증류 냉각관을 통해 냉각 추출한다(냉각 추출시간 약 3시간). ⑤ 무기 염류의 침강: 추출이 끝나고 1리터 Pyrex용기에 받아진 약침액은 무기염류를 침강시키기 위해서 하루 동안 냉장 보관한다. ⑥ 등장액 및 pH 조절: 상층액을 분리하여 pH 7.25~7.35 (Na₃PO₄, 락산) 조절, NaCl을 첨가하여 0.9 % 등장액이 되게 한다. ⑦ 여과: 0.45 μm → 0.2 μm → 0.1 μm (whatman cellulose) 순서로 여과하고, 소분, capping 및 멸균을 통해 약침액을 완성한다.

5. 取穴

실험동물을 isoflurane (중외제약, 한국)과 95 % 산소(O₂)를 포함한 혼합가스로 마취한 상태에서 兩側 合谷(LL₄)과 足三里(ST₃₆), 天樞(ST₂₅)와 大腸俞(BL₂₅)를 각각 取穴하였다¹⁷⁾. 合谷(LL₄)의 위치는 인체의 "손등에서 첫 번째 손 허리뼈(중수골 metacarpal bone)와 두 번째 손 허리뼈 사이로서 두 번째 손 허리뼈(요골측) 가운데 점"을 근거로 하여 흰쥐에 상응하는 앞발에서 취혈 하였다. 天樞(ST₂₅)의 위치는 인체의 "배꼽 양쪽 2寸"을 근거로, 흰쥐 腹部에서 치골결합(symphysis pubis)과 칼 돌기(xiphoid process) 끝단을 연결한 선을 12등분하여, 아래에서 5/12에 해당하는 곳을 神闕(CV₈)로 정하였고 神闕의 수직선상과 유두의 수직선상의 중간점을 天樞로 취혈 하였다. 足三里(ST₃₆)는 "犢鼻(ST₃₅) 아래 3寸으로 무릎을 'ㄱ'자로 굽혔을 때 정강뼈 거친 면(경골조면 tuberosity of tibia)과 종아리뼈머리(비골소두 head of fibula) 사이로서 정강뼈 거친 면(경골조면

tuberosity of tibia) 쪽의 앞 정강 근(전 경골 근 tibialis anterior) 안쪽"을 근거로 흰쥐 하지 경골조면 선상과 앞 정강 근 사이에서 取穴하였다. 위치는 犢鼻와 발목관절 앞쪽을 연결한 선상에서 대략 1/5에 해당하는 곳으로 정하였고, 大腸俞(BL₂₅)는 흰쥐의 3-4요추 간에서 양쪽으로 1.5수에 해당되는 곳으로 요추간에서 요추부 끝단을 10등분하여 요추 간에서 1/10과 2/10의 중간 부위를 取穴하였다.

6. 藥物 및 藥鍼 과 拮抗劑 주입

흰쥐를 하루 동안 금식시킨 후 다음 날 50 % ethanol에 녹인 TNBS를 5 mg/kg 농도로 0.8 ml를 대장으로 1회 주입하였다. 藥鍼의 효과를 살펴보기 위해서 전신마취상태에서 兩側 合谷(LL₄), 天樞(ST₂₅), 足三里(ST₃₆)와 大腸俞(BL₂₅)에 해당하는 상응부위의 혈위에 露蜂房 藥鍼 용액 0.2 ml를 하루에 한번씩 2일에 걸쳐 총 2회 시술하였다. 약침 효과의 기전을 확인하기 위하여 내재 진통 물질인 opiates의 길항제인 naltrexone hydrochloride (30 ug / 30 ul; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 대장염 유발 후 다음날에 약침 투여 30분 전에 척수강(intrathecal injection)으로 주입하였다. 실험동물은 대장염 유발군(TNBS)과 대장염 유발 후 노봉방 약침군(NV)으로 나누어 관찰하였다(Fig. 1).

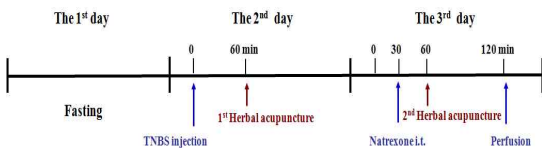


Fig. 1. Schematic drawings to show the experimental schedule.

7. Immunohistochemistry

대장염을 유발시킨 후 24시간째에 실험동물을 urethane으로 과량 마취하여 깊은 마취 상태를 유발한 뒤에 250 ml의 0.1 M phosphate buffer (PB) 용액으로 심장을 관류하여 혈액을 제거하였으며, 다시 0.1 M PB 용액으로 희석한 500 ml 의 4 % paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌와 척수를 박리하였다. 박리된 뇌와 척수는 4 % paraformaldehyde로 4시간 동안 실온에서 고정된 후 30 % sucrose에서 2일 이상 방치하였다. 조직은 냉동 절편기(Cryostat, Leica Microsystems GmbH, Germany)를 이용하여 40 μm의 두께로 조직 절편을 만들어서 세포내 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 10 % H₂O₂용액에서 20분 동안 진탕하고, 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척하고 0.5 % Triton-X 100으로 20분간 진탕한 후 PBS로 2회 이상 세척하였다. 그 후 다원일차항체(cFos, Oncogene Sci, USA, 1:1000)를 4 °C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그 후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit)를 90분간 처리하여 PB로 세척한 뒤 chromogen인 0.05 % diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간 동안 세척한 후 광학 현미경 하에서 진갈색의 cFos 양성 세포를 화상 자동분석 시스템(Image-Pro Plus, USA)을 이용하여 cFos 단백질 양성 세

포 숫자를 측정하였다. c-Fos 양성 세포들은 뇌수도관 중심 부위(periaqueductal gray, PAG), 청반핵(locus coeruleus, LC), 고립로핵(nucleus of solitary tract, Sol)과 여섯 번째 요척수 후각(6th lumbar spinal cord, L6 s.c.)에서 측정하였다.

8. 統計

컴퓨터 통계프로그램인 Sigma Stat 3.0 (SPSS Inc., USA)을 이용하였으며, 실험결과는 means ± S.D.로 나타내었고, 통계검사는 unpaired student t-test로 하였다. p값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 실험결과

1. 穴位別 露蜂房 藥鍼이 대장염에 따른 c-Fos 단백질 발현에 미치는 영향

정상 흰쥐의 경우 뇌수도관 중심 부위(periaqueductal gray, PAG), 청반핵(locus coeruleus, LC), 고립로핵(nucleus of solitary tract, Sol)과 6번째 요척수 후각(6th lumbar spinal cord, L6 s.c.)에서 c-Fos 단백질 발현 세포가 관찰 되지 않았다. TNBS 대장내 주입 후 24시간이 경과하였을 때, 6번째 요척수(L6 s.c.), 고립로핵(Sol), 청반점핵(LC) 및 뇌수도관 주위(PAG) 영역에서의 c-Fos 단백질 발현 세포수가 크게 증가하였으며, 습곡(LL4) 露蜂房 藥鍼(NV)을 시술하였을 경우 영역에 따라 현저하게 c-Fos 단백질 발현 세포수가 감소

되었다(Fig. 2, 6).

습곡(LL4)의 露蜂房 藥鍼은 c-Fos 단백질 발현 세포수의 감소가 TNBS의 대장 내 주입 군 보다 19.5 ± 7.6 개($P < 0.05$)정도 감소하였다. 고립로핵에서는 대장염에서 발현된 c-Fos 단백질 발현 세포수(45.2 ± 10.2 개)보다 露蜂房 藥鍼의 경우 27.1 ± 8.8 개($P < 0.05$)로 유의하게 감소하였고, 청반핵에서는 露蜂房 藥鍼이 c-Fos 단백질 발현을 억제하지 못하였다. 뇌수도관 주위에서는 TNBS의 대장 내 주입 군에서 c-Fos 단백질 발현 세포(46.3 ± 12.3 개)에 비하여 露蜂房 藥鍼의 경우에는 유의하게 감소되지 않았다.

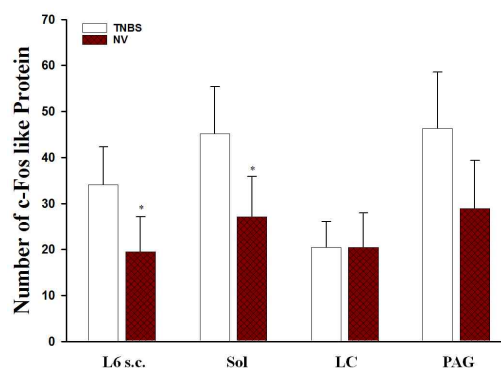


Fig. 2. Effects of NV herbal acupuncture to bilateral LI4 acupoint on the expression of c-Fos like protein in the L6 s.c., Sol, LC, and PAG 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

TNBS, 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of a 1:1 mixture (0.8ml) of TNBS 5 mg/kg and 50% ethanol; NV, volatile Nidus Vaspae herbal acupuncture. All data are expressed as mean ± S.D. n = 5 in each group. * indicates statistical significant differences (* P < 0.05).

대장염 유발 후 제 6번째 요척수(L6 s.c.), 고립로핵(Sol), 청반점핵(LC) 및 뇌수도관

주위(PAG) 영역에서의 c-Fos 단백질 발현이 크게 증가됨을 볼 수 있으며, 足三里(ST₃₆) 露蜂房 藥鍼(NV)은 영역에 따라 현저하게 c-Fos 단백질 발현 세포가 감소되고 있는 것이 관찰 되었다(Fig. 3, 6). 제 6 요척수에서 露蜂房 藥鍼은 c-Fos 단백질 발현 세포수(26.5 ± 8.2 개)가 유의하게 감소되지 못하였다. 고립로핵에서 露蜂房 藥鍼은 c-Fos 단백질 발현 세포수가 22.1 ± 6.4 개(P<0.01)로 감소되었다. 청반핵에서는 c-Fos 단백질 발현이 유의하게 억제되지 않았으며(16.2 ± 8.5 개), 뇌수도관 주위에서 c-Fos 단백질 발현 세포수가 10.5 ± 8.5 개(P<0.001)로 유의하게 감소되었다.

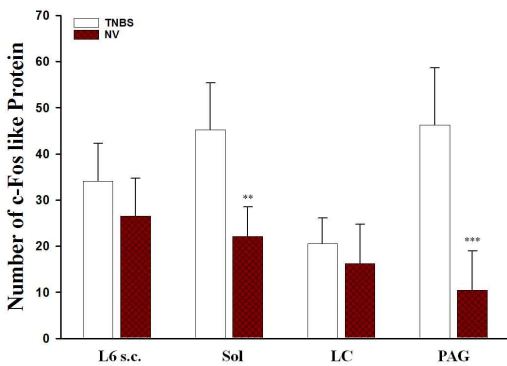


Fig. 3. Effects of NV herbal acupunctures to bilateral ST36 acupoint on the expression of c-Fos like protein in the L6 s.c., Sol, LC, and PAG 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

Notations are the same as the previous figures. n = 5 in each group. * indicates statistical significant differences (** P < 0.01; *** P < 0.001).

TNBS의 대장 내 주입 군에서 天樞(ST₂₅)에 대한 露蜂房 藥鍼 시술에 따른 c-Fos 단백질 발현 양상을 살펴보았다(Fig. 4, 6). 제

6 요척수에서 10.5 ± 5.9 개(P<0.001)로 유의하게 감소되었고, 고립로핵에서도 18.5 ± 5.9 개(P<0.01)로 유의하게 감소되었다. 청반핵에서는 露蜂房 藥鍼에서 3.0 ± 9.5 개(P<0.05)로 감소되었고, 뇌수도관 주위에서 c-Fos 단백질 발현은 露蜂房 藥鍼(18.1 ± 9.4 개, P<0.01)으로 뚜렷하게 감소되었다.

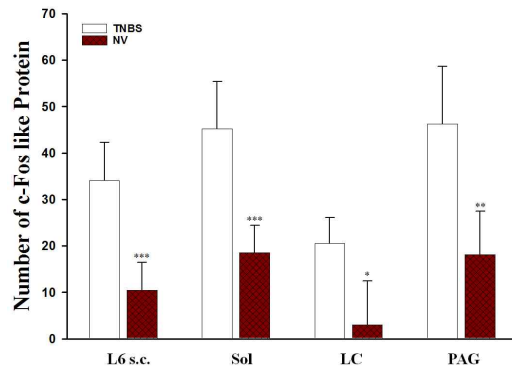


Fig. 4. Effects of NV herbal acupunctures to bilateral ST25 acupoint on the expression of c-Fos like protein in the L6 s.c., Sol, LC, and PAG 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

Notations are the same as the previous figures. n = 5 in each group. * indicates statistical significant differences (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

TNBS의 대장 내 주입 후 24시간이 경과한 후 중추신경계의 c-Fos 단백질 발현 양상에 대하여 大腸俞(BL₂₅)의 露蜂房 藥鍼 시술의 효과를 비교하였다(Fig. 5, 6). 제 6 요척수에서 露蜂房 藥鍼은 TNBS의 대장 내 주입 군에 비하여 c-Fos 단백질 발현 세포수가 5.1 ± 7.5 개(P<0.001)로 유의하게 감소되었다. 고립로핵에서 TNBS의 대장 내 주입 군에 비하여 c-Fos 단백질 발현 세포

가 24.6 ± 10.9 개($P < 0.05$)로 감소되었으나, 청반핵에서는 유의성이 없었다. 뇌수도관 주위에서 TNBS의 대장 내 주입군에 비하여 露蜂房 藥鍼은 20.5 ± 11 개($P < 0.01$)로 감소되었다.

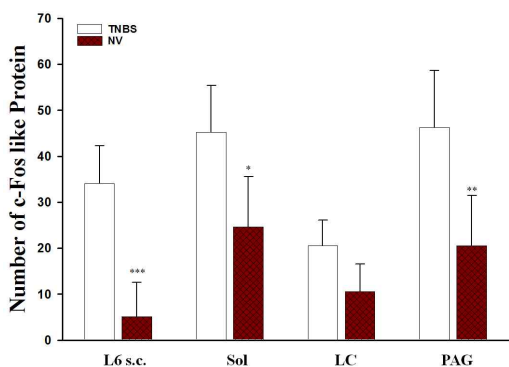


Fig. 5. Effects of NV herbal acupunctures to bilateral BL25 acupoint on the expression of c-Fos like protein in the L6 s.c., Sol, LC, and PAG 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

Notations are the same as the previous figures. $n = 5$ in each group. * indicates statistical significant differences ($* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P < 0.001$).

이상의 결과를 穴位별로 비교하면, 척수후각에서는 大腸愈에 대한 자극에서 효과가 뛰어났으며, 고립로핵에서는 露蜂房 藥鍼은 대부분의 穴位에서 효과를 보였는데, 특히 天樞에서 효과가 뚜렷하였다. 청반점핵에서는 露蜂房 藥鍼은 天樞를 자극할 때 유효한 효과를 나타내었다. 뇌수도관 중심 영역에서의 c-Fos 단백질 발현은 足三里의 자극에서 가장 뚜렷한 효과를 보였다.

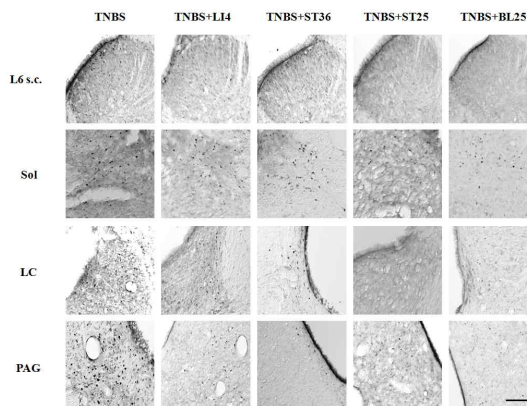


Fig. 6. Representative photographs illustrating the effects of NV herbal acupunctures on the expression of c-Fos like protein in the L6 s.c., Sol, LC, and PAG 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

Horizontal solid bar, 100 μ m.

2. 露蜂房 藥鍼의 효과에 대한 내재진통제의 영향

TNBS의 대장 내 주입으로 유도된 급성 대장염에서 c-Fos 단백질 발현 억제효과가 중추신경계의 중요 신경조절물질로 알려진 opioid와 관련이 있는지를 찾고자, TNBS의 대장 내 주입으로 급성 대장염을 유발 후 opioid 길항제인 naltrexone 30 ug / 30 ul을 약침 시술 30분 전에 척수강(intrathecal injection)으로 주입하였다.

Naltrexone 전처치와 TNBS 주입 대장염 유발후 c-Fos 단백질 발현 세포수가 증가하였으며, 合谷(LL4) 露蜂房 藥鍼은 TNBS의 대장 내 주입군에 비해서는 12 ± 4.4 개로 억제되어 나타나 naltrexone 처치가 c-Fos 단백질 발현 감소에 영향을 주지 못하였다. 고립로핵에서 露蜂房 藥鍼은 37 ± 9.6 개

($P < 0.001$)로 naltrexone 전처치로 증가한 c-Fos 단백질 발현을 억제하였다. 청반핵에서는 naltrexone 전처치 후 露蜂房 藥鍼을 시술한 경우 c-Fos 단백질 발현을 억제하지 못하였다. 뇌수도관 주위에서 露蜂房 藥鍼에서는 33.1 ± 8.6 개($P < 0.05$)로 c-Fos 단백질 발현이 감소되어 naltrexone의 전처치에 의하여 약침효과가 차단되지 않았다. 이상에서 보는 바와 같이 露蜂房 藥鍼은 요척수 및 뇌수도관 주위에서 c-Fos 단백질 발현이 억제되었다.

제 6 요척수에서 TNBS로 급성 대장염 유발 후 naltrexone 처치한 경우에 足三里(ST₃₆) 露蜂房 藥鍼은 증가한 c-Fos 단백질 발현을 억제하지 못한 것으로 나타났다. 고립로핵에서 TNBS의 대장 내 주입 군에 naltrexone 처치한 경우 c-Fos 단백질 발현 세포가 73.5 ± 21.4 개로 증가하였고 露蜂房 藥鍼은 TNBS의 대장 내 주입 후 naltrexone 처치한 군에 대하여 c-Fos 단백질 발현 세포를 44 ± 11.1 개($P < 0.05$) 정도로 유의하게 억제하였다. 청반핵에서는 naltrexone이 전처치된 상태에서 c-Fos 단백질 발현이 억제되지 못하였다. 뇌수도관 주위에서 露蜂房 藥鍼은 naltrexone 처치 군에 대하여 c-Fos 단백질 발현이 유의하게 억제되었다. 足三里(ST₃₆)에 대한 露蜂房 藥鍼은 c-Fos 단백질 발현이 여전히 억제되었지만, 고립로핵과 뇌수도관 주위에서 부분적으로 naltrexone 처리에 의하여 억제 정도가 영향을 받고 있었다.

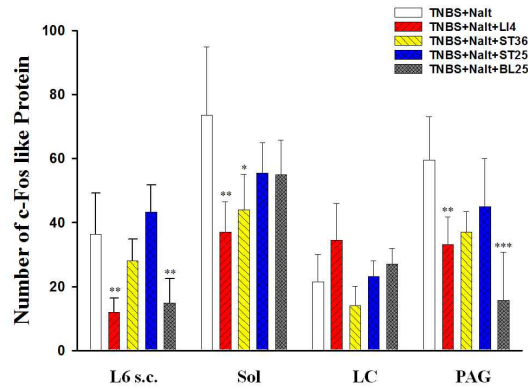


Fig. 7. The antagonizing role of endogenous opioid to the effect of NV herbal acupunctures on the expression of c-Fos like protein in L6 s.c., Sol, LC, and PAG 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

Nalt, Naltrexone ($30 \mu\text{g} / 30 \mu\text{l}$) was intrathecally administered 30 min before herbal acupuncture treatment. Notations are the same as the previous figures. $n = 5$ in each group. * indicates statistical significant differences ($* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P < 0.001$).

天樞(ST₂₅)에 대한 露蜂房 藥鍼은 naltrexone 처리 후, 요척수, 고립로핵, 청반핵, 뇌수도관 주위 모두에서 c-Fos 단백질 발현 억제가 차단되었고, 모든 영역에서 c-Fos 단백질 발현 억제가 사라졌다. 이는 天樞(ST₂₅)혈에 대한 露蜂房 藥鍼 시술 효과가 전적으로 약물과 상관없이 穴位자극에 의한 opioid 의존성으로 효과를 발휘하고 있음을 의미하는 것으로 보여 진다.

Naltrexone 처리 후에 大腸俞(BL₂₅)에 대한 露蜂房 藥鍼 효과에 대한 영향을 살펴보면, 제 6 요척수에서 露蜂房 藥鍼의 大腸俞에 대한 시술은 naltrexone 전처치에도 불구하고 c-Fos 단백질 발현 세포가 14.9 ± 7.5 개($P < 0.05$)로 유의하게 감소되었다. 고립로핵에서는 露蜂房 藥鍼 c-Fos 단백질 발현이

naltrexone 전처치에 의하여 억제되지 못했으며, 청반핵에서도 露蜂房 藥鍼이 c-Fos 단백질 발현 세포수를 억제하지 못하였다. 뇌수도관 주위에서 naltrexone 전처치 후 露蜂房 藥鍼은 급성대장염 유발군과 naltrexone 처치 실험군에 비해 c-Fos 단백질 발현 세포가 15.6 ± 15.1 개($P < 0.001$)로 억제되었다.

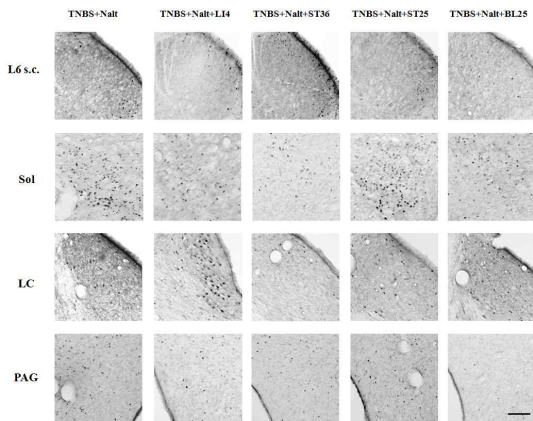


Fig. 8. Representative photographs illustrating the role of endogenous opioid to the effect of herbal acupunctures on the expression of c-Fos like protein 1 day after colorectal administration of a single colorectal administration of TNBS.

Nalt, Naltrexone ($30 \mu\text{g} / 30 \mu\text{l}$) was intrathecally administered 30 min before herbal acupuncture treatment. Notations are the same as the previous figures. Horizontal solid bar, $100\mu\text{m}$.

IV. 고찰

炎症性 大腸炎에 흔하게 나타날 수 있는泄瀉란 여러 刺戟으로 腸管의 유동 운동이異常亢進하고 腸管終末部の 通過가 促進되어 수분의 흡수가 불완전하게 되므로 體液 내지 粥狀의 糞便排泄이 있고 排便회수가 증가 하는 것이다¹⁸⁾. 이에 《醫門寶鑑》에

“大便不調而注下”를泄瀉라 하여 形態와 原因에 따라 각각 胃泄, 脾泄, 大腸泄, 小腸泄, 大瘕泄 등의 다른 명칭으로 구분해서 불렀다¹⁹⁾.泄瀉의 病因病機에 대해 《內經》에 “濕勝則濡泄”이라 하여 外因에서 濕邪의 侵入이 가장 밀접한 관계가 있다고 보았으며, 《景岳全書》²⁰⁾에 “泄瀉之本 無不由於脾胃”라 하여 脾胃臟腑 功能障礙가 밀접한 관계에 있고, 病變의 關聯臟腑는 脾胃와 大·小腸에 있다 하였다²¹⁾. 또한 炎症性 大腸炎에 동반되는 증상 중 腹痛은 《難經》²²⁾에 “大腸泄者 食已窘迫 大便色白 腸鳴切痛, 小腸泄者 溲而便膿血 小腹痛, 大瘕泄者 裏急後重...”이라 하였고, 항문 및 직장출혈로 인식되는 腸癖은 음식을 調節하지 않고 起居가 適宜하지 않아서 胃氣를 손상하면 위로 오르는 精微한 氣가 도리어 下降하여 殞泄이 되니 오래되면 太陰이 少陰에 전한 것이라 하여 그 症狀으로 大便으로 下血하는 것이니 清血하며 色鮮한 경우의 腸風과 血濁하며 色黯한 경우의 腸毒症이라 하여 血便을 보는 것이다.

炎症性 大腸炎의 原因이나 病態生理 및 治療의 연구를 위한 동물 모델로 4~10%의 acetic acid 나 50% ethanol에 녹인 TNBS를 흰쥐의 항문에 주입 했을 때 급성 및 만성 염증성 대장염이 유발이 있다^{5,23)}. 이는 인체 염증성 대장염과 유사성 때문에 acetic acid와 TNBS가 가장 널리 이용되었는데 최근에는 acetic acid보다 TNBS가 사람의 염증성 대장염에 가까운 병변을 일으킨다고 보고되고 있다^{5,23)}. TNBS를 1회 주입 2시간 후에 이미 점막 상피세포의 미란

이 발생한다고 알려져 있으며 주입 후 48시간 후에 이미 급성 궤양의 육안적 소견이 발견되고 약 2주 후에 만성 염증으로 이행하는 정도가 심하였다²⁴⁾. 이는 궤양성 대장염보다는 Crohn씨 대장염에서 흔히 관찰되는 전벽성 궤양 등의 심한 병변을 유발할 수 있고 염증성 대장염의 유발 원인으로 면역기전과 감염요인이 알려져 있는데, TNBS는 면역기전을 유발 시킬 수 있는 hapten으로 작용한다는 점과 급성 점막손상이 사라진 후에도 만성 염증을 지속시켜 주입 후 8주까지 그 염증이 지속된다²⁵⁾. 또 염증성 대장염의 점막염증을 유발하고 지속시킬 수 있는 화학적 매개자로 prostaglandin E2 (PGE₂)인 cyclooxygenase²⁶⁾과 leukotriene B4 (LTB₄)의 상승이 급성에서 만성염증으로 넘어가는 시점인 2주 후에 특히 높아 매개자로 중요한 역할을 한다고 보고하였다²⁾.

이러한 염증성 대장염에 대한 한의학적治療方法은 주로 藥物과 鍼灸治療法으로 대별되며, 침구치료에 있어서도 鍼, 灸와 藥鍼 치료로 나눌 수 있는데 治療에 많이 사용되는 經穴로는 合谷(LL₄)과 足三里(ST₃₆), 天樞(ST₂₅), 大腸俞(BL₂₅) 등이 있다. 이에 본 연구에서는 露蜂房 藥鍼이 염증성 대장질환의 炎症 및 痛症에 치료에 대한 효과를 검증하기 위해 TNBS로 염증성 대장염을 유발한 후 合谷(LL₄), 足三里(ST₃₆), 天樞(ST₂₅), 大腸俞(BL₂₅)를 선택하여 본 실험을 진행하였다.

手陽明大腸經의 合谷(LL₄)은 發表解熱, 疏散風邪, 清泄肺氣, 通腸強胃한 효능을 통해 眼疾一切와 血壓亢進, 衄血, 頭痛, 齒痛, 偏

正頭痛, 傷寒大渴, 中風口噤, 口眼喎斜, 熱病汗不出, 多汗 등을 治하며¹⁷⁾, 大腸의 原氣가 經過하고 留止하는 經穴인 原穴이다. 이것은 原穴이 原氣와 관계가 있으며, 原氣는 三焦를 통해서 밖으로 散布되는바, 그 氣가 유지하는 부위가 原穴이 되며 五臟六腑의 병이 있을 때에는 原穴을 取穴 한다고 밝히고 있어 炎症性 大腸炎의 治療穴로 合谷(LL₄)이 타당함을 뒷받침하고 있다.

足陽明胃經의 合土穴 및 六腑下合穴인 足三里(ST₃₆)는 理脾胃 調中氣 補虛弱 和胃健脾 通腑化痰 升降氣機하는 효능을 통해 急性胃腸炎, 腹痛등의 胃腸疾患과 脚氣 虛弱 體質 貧血 高血壓 등을 포함한 急性胃腸病, 腹脹, 泄瀉, 食慾不振 등 소화기계의 각종 질환에 활용되고 있다²⁷⁾. 또한 《靈樞·本輸》에서는 大腸과 小腸의 病變을 모두 足陽明胃經에서 치료할 수 있음을 설명하였으며, 《靈樞·四時氣》에서는 腹中不便의 병증에 足三里를 사용하였다²⁸⁾.

足陽明胃經의 天樞(ST₂₅)는 大腸의 募穴로 疏阻大腸 調中和胃하며, 腸疾患, 泄瀉, 便秘, 痢疾, 慢性胃腸病, 癰亂, 腹冷痛, 臍疝繞臍痛, 食不下, 久瀉不止 등을 치료한다²⁹⁾. 《甲乙經》에 처음 기재되었는데 그 내용은 “腹脹腸鳴, 不能久立, 腹中痛 濯濯, 冬日重感于寒即泄. 天樞主之”라 하였다. 《備急千金要方 卷三十·心腹第二》³⁰⁾에서는 “大便不節 小便赤黃 腸鳴泄注..... 大便泄數 病灸天樞”이라 했으며, 《千金翼方》에서는 “冷及夫人, 癖腸鳴瀉利, 絞痛, 灸天樞百壯, 三報之”라 하였다. 《類經圖翼·十一卷·諸症灸法要穴》³¹⁾에서도 “大瘦泄 裏急後重 天樞 水分

上 各灸三七壯”이라 언급된 經穴로 急·慢性 大腸炎에 多用되었다¹⁷⁾.

足太陽膀胱經의 大腸俞(BL₂₅)는 疏調二腸, 理氣化滯한 효능을 통해 腸炎, 腸痙攣, 腸出血, 泄瀉, 腹痛, 腸鳴腹脹, 臍部激痛 등의 大腸疾患과 大小便不利 등을 主治한다고 알려져 있다²⁹⁾. 《類經圖翼 · 十一卷·諸症灸法要穴》³¹⁾에서 “大腸泄色白 大腸俞.....灸三七壯”이라 하였으며, 《鍼灸大成》³²⁾에서 洞泄에 大腸俞를 활용하였다. 臟腑와 經脈의 氣가 흘러나오는 부위이므로 背俞穴과 臟腑는 특수한 관계가 있으며 임상에서 五臟六腑의 虛實과 盛衰를 가장 잘 반영하게 되므로 炎症性 大腸炎의 治療穴로 大腸俞(BL₂₅)가 妥當함을 뒷받침하고 있다.

藥鍼에 사용된 露蜂房(Vespae Nidus)은 胡蜂과(말벌과; Vespidae)에 속한 昆蟲인 大黃蜂(Polistes olivaceous Degeer), 果馬蜂(Polistes olivaceous Degeer), 日本長脚胡蜂(P. japonicus Saussure) 혹은 異腹胡蜂(Parapolybia varia Fabricius)의 벌집을 채취하여 曬乾하거나 약간 삶은 후 죽은 벌이나 번데기를 除去하고 乾燥하여 使用하는 本草를 말한다³³⁾. 우리나라에는 胡蜂科(왕통이 속)의 참 왕통이(말벌(Polistes mandarinus saussure))와 土蜂科(맹비속)의 土蜂(땅벌(Discolia vittifrous Sch 혹은 P. hebraeus Fabricius))의 蜂巢(벌집)를 사용한다³⁴⁾. 文獻의으로 《神農本草經》의 中品에 “一名 蜂腸이라 하여 味苦平, 驚癇, 瘰癧, 寒熱邪氣, 癩疾, 虫毒, 腸痔를 主治 한다”라고 記載된 이래 現在까지 露蜂房의 氣味는 甘平 有毒하며 歸經은 胃, 肝, 肺, 腎經이며,

露蜂房의 成分은 蠟과 樹脂, 蛋白質 등을 含有하고 있으며 有毒性分으로서 揮發性 기름인 벌집기름과 Ca, Fe를 含有하고 있다^{33,34)}. 露蜂房의 抽出物의 主要成分인 propolis는 말벌들이 그들의 生存과 繁殖을 위하여, 잎, 꽃, 열매 및 새싹을 보호하기위하여 分泌된 抗菌性과 防水性, 絶緣性을 가진 植物의 樹脂化合物과 벌들의 唾液酵素가 混合되어 만들어진 黃褐色 또는 暗褐色의 物質이다⁷⁶⁾. 露蜂房의 효능으로 《鄉藥集成方》에는 “驚癇, 瘰癧, 癩疾, 鬼精, 腸痔 등에 쓰인다” 하였으며⁷⁷⁾, 《蟲類中藥與效方》³⁷⁾에는 抗癌, 抗炎, 鎮痛, 解熱 효과를 기술하였다. 또한 《東醫寶鑑, 湯液編》³⁸⁾에는 “性平 味苦鹹 無毒 一云微毒 主驚癇瘰癧 療癰腫不消 及乳癰 齒痛 惡瘡”이라 하여 예로부터 각종 질환에 널리 사용되었음을 알 수 있다. 최근 研究가 進行되면서 露蜂房의 抽出物이 활성산소 및 활성질소를 소거하고 생성을 억제하는 항산화 효과에 의해서 염증인자들을 억제 시킨다고 보고하고 있으며, 露蜂房의 抽出物인 propolis가 抗菌, 抗炎症, 抗腫瘍 등의 다양한 약효를 나타낸다고 보고하고 있다^{13,14,39)}.

이상에서 살펴본 바와 같이 露蜂房藥鍼 消炎작용 및 鎮痛작용이 있으므로 TNBS로 유도된 炎症性 大腸炎의 炎症과 疼痛에 대하여 中추신경계의 c-Fos 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 효과를 검증하기 위해 본 실험을 진행하였다. TNBS의 大腸 내 주입군 에서 穴位별 露蜂房 藥鍼이 中추신경계의 c-Fos 단백질 발현에 미치는 영향에서 혈위 별로 비교해보면, 여섯

번째 요척수 후각에서는 露蜂房 藥鍼이 大腸俞(BL₂₅)에서 억제효과가 뛰어났으며, 고립로핵에서 露蜂房 藥鍼은 대부분의 혈위에서 억제효과를 보였는데 天樞(ST₂₅)에서 억제효과가 컸다. 청반핵에서는 露蜂房 藥鍼은 天樞(ST₂₅)에서 유효한 억제효과를 나타내었고, 뇌수도관 중심 부위에서의 c-Fos 단백질 발현은 露蜂房 藥鍼이 足三里(ST₃₆)에서 가장 뚜렷한 억제효과를 보였다. 露蜂房 藥鍼의 효과와 신경조절물질로 알려진 opioid와 관련성에 대해서는 TNBS의 대장내 주입으로 유도된 급성대장염에서 c-Fos 단백질 발현 억제효과가 중추신경계의 중요 신경조절물질로 알려진 opioid와 관련이 있는지를 찾고자, TNBS의 대장내 주입군에 다시 naltrexone을 藥鍼투여 30분 전에 척수강으로 주입한 결과, naltrexone 처치된 급성대장염 실험군에서 c-Fos 단백질 발현은 증가되는 양상을 보였으며 大腸俞(BL₂₅)에 대한 露蜂房 藥鍼은 naltrexone 처리 후에도 여섯 번째 요척수 후각 및 뇌수도관 중심 부위에서 c-Fos 단백질 발현이 크게 억제된 경향을 보여주었고 여섯 번째 요척수 후각, 고립로핵, 청반핵 및 뇌수도관 중심 부위의 모든 영역에서 전반적으로 naltrexone 처리는 露蜂房 藥鍼에 c-Fos 단백질 발현 영역별로 naltrexone에 의하여 영향을 받기도 하지만, 合谷(LL₄) 과 大腸俞(BL₂₅)를 중심으로 naltrexone에 의한 영향을 받지 않고 있었다.

이러한 결과에서 炎症性 大腸炎의 炎症과 疼痛에 관련하여 혈위에 따라 露蜂房 藥鍼이 중추신경계의 c-Fos 단백질 발현을 억제

하였고, 부분적으로 내재 진통계와 관련없이 c-Fos 단백질 발현을 억제하기도 하였다. 그러나 藥鍼요법이 약효성분에 의한 자극과 경혈에 대한 물리적 자극이라는 두가지 측면이 존재함을 고려할 때, 본 연구에서 동일한 약침에 대하여 穴位에 따른 효과의 차이는 대장염에 대한 經穴의 특이성이 존재함을 추정해 볼 수 있다고 사료된다. 그러나 이번 실험에서 약효성분에 의한 자극 조건을 배제한 대조군에 대한 실험이 이뤄지지 못한 점은 향후 추가로 검토해야 할 것으로 판단한다. 그럼에도 露蜂房藥鍼이 消炎作用 및 鎮痛作用과 관련하여 炎症性 大腸炎 치료방법이 될 수 있을 것으로 기대하며, 향후 임상에서의 치료법을 적용하기 위해서는 露蜂房 藥鍼의 독성에 대한 안전성 검사와 함께 이상에서 언급하지 못한 추가적인 연구가 필요 할 것으로 사료 된다.

V. 결론

흰쥐에서 TNBS의 직장내 주입으로 야기된 대장염에서 중추신경계의 c-Fos 단백질 발현 변화를 관찰하여 穴位에 따른 露蜂房 藥鍼의 효과를 살펴보고자 하였다.

1. 露蜂房 藥鍼 穴位別 시술 결과, 合谷은 고립로핵에서 억제하였고, 足三里는 고립로핵로 및 뇌수도관주위에서 유의한 효과를 나타냈으며, 天樞는 관찰 영역 전체에서 발현을 억제하였고, 大腸俞는 청반핵을 제외한 나머지 영역에서의 c-Fos 단백질 발현을 억제하였다.

2. Naltrexone 전처치에 의한 영향을 살펴본 결과, 습곡의 露蜂房 藥鍼의 c-Fos 단백질 발현 억제 효과는 차단하지 못하였다.
3. 足三里에 대한 露蜂房 藥鍼의 c-Fos 단백질 발현 억제 효과는 naltrexone 전처치에 의하여 차단되었으나, 뇌수도관주위의 c-Fos 단백질 발현 억제는 유지되었다.
4. 天樞에 대한 露蜂房 藥鍼의 c-Fos 단백질 발현 억제 효과는 naltrexone 전처치에 의하여 차단되었다..
5. 大腸俞에 대한 露蜂房 藥鍼은 고립핵과 청반핵에서 c-Fos 단백질 발현 억제 효과가 naltrexone 전처치에 의하여 차단되었다.
3. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in 'non specific' inflammatory bowel disease. N Engl Med. 1982 ; 306 : 775-80.
4. Birder LA, Kiss S, de Groat WC, Lecci A, Maggi CA. Effect of nepadutant, a neurokinin 2 tachykinin receptor antagonist, on immediate-early gene expression after trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 2003 ; 304(1) : 272-6.
5. Yamada T, Marshall S, Specian R, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rat. Gastroenterology. 1992 ; 102 : 1524-34.
6. Tibbles LA, Woodgett JR. The stress activated protein kinase pathways. Cell Mol Life Sci. 1999 ; 55 : 1230.
7. Henninger DD, Panns J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC and Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. J Immunol. 1997 ; 158 : 1825-32.
8. 대한소화기학회. 염증성질환. 서울 : 군자출판사. 1999 : 1-6.
9. 송문영, 박상연, 김재효, 안성훈, 김경식, 손인철. TNBS로 유도된 대장염에서 곡지의 구진약침 효과. 경락경혈학회지. 2008 ; 25(3) : 147-66.
10. 최운영, 안성훈, 권오상, 서상록, 손인철, 김재효. 흰쥐의 TNBS 유발 대장염에서

이상의 결과, 露蜂房 藥鍼은 穴位에 따라 대장염으로 야기된 중추신경계의 c-Fos 단백질 발현을 유의하게 억제하였고, 露蜂房 藥鍼의 효과는 穴位와 중추신경계 부위에 따라 내재신경계와 관련을 맺고 c-Fos 단백질 발현을 억제하였다. 향후 추가 연구를 통하여 c-Fos 단백질 발현 억제에 관련한 기전을 규명할 필요가 제기되었다.

참고문헌

1. 강태희, 원진희. 궤양성 대장염 치료의 한 의학적 접근방식에 관한 연구. 대한성인병 학회지. 1999 ; 5(1) : 137-62.
2. 김우호. 흰쥐에서 TNBS로 유발된 염증성대장염의 병태생리에 관한연구. 대한내과학회지. 1994 : 47(1) : 20-35.

- 전침의 대장 흥분성에 미치는 효과. 경락
경혈학회지. 2009 ; 26(2) : 91-108.
11. 文漢英. 中藥內服加保留灌腸治療慢性結
腸炎 64例. 江西中醫藥. 1998 ; 29(5) :
28.
 12. 변기원, 임용수, 구성태, 김재효, 김경식,
손인철. 합곡에 대한 애엽 약침이 흰쥐
대장염 완화에 미치는 효과. 대한경락경
혈학회지. 2007 ; 24(1) : 79-94.
 13. 박용기. 露蜂房의 抗酸化 作用에 關한
研究. 대한분초학회지. 2002 ; 17(2) :
203-12.
 14. 장재식. 노봉방(露蜂房)이
t-butylhydroperoxide에 의한
Peroxynitrite 생성과 염증성 단백질 발현
에 미치는 영향. 대한동의생리학회. 2007
; 21(6) : 1499-505.
 15. 정지천, 신원용. 노봉방(露蜂房)의
Peroxynitrite 제거 효과. 대한한의학회지.
2006 ; 27(2) : 171-81.
 16. 대한약침학회편저. 약침요법시술지침서.
서울 : 대한약침학회. 2000 : 13, 128-33.
 17. 전국한의과대학·한의학전문대학원 경락
경혈학 교재편찬위원회. 대학경락경혈학
각론. 원주: 의방출판사. 2009 ; 73, 228,
259, 600.
 18. 洪彰義. 臨床小兒科學概論. 서울 : 大韓
教科書株式會社. 1975 : 351-2.
 19. 周命新. 醫門寶鑑. 서울 : 杏林書院. 1971
: 259.
 20. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울 : 翰成社.
1983 : 439-47.
 21. 董黎明. 實用中醫內科學. 上海 : 上海科
學技術出版社. 1988 : 238-43.
 22. 本間祥白著. 難經之研究. 정인출판사인
행. 337-40.
 23. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz
LW, Griswold DE, Fondacaro JD,
Wasserman MA. Inflammatory
mediators of experimental colitis in rats.
Gastroenterology. 1989 ; 97 : 326.
 24. 김나영, 김재준, 송인성, 김정룡, 김우호.
흰쥐에서 TNBS로 유발된 염증성대장염
의 병태생리에 관한 연구. 대한내과학회
지. 1994 ; 47 : 20-35.
 25. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris
GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene
synthesis markedly accelerates healing
in a rat model of inflammatory bowel
disease. Gastroenterology. 1989 ; 96 : 29.
 26. Floman Y, Zor U; Mechanism of
steroid action in inflammation:
Inhibition of prostaglandin synthesis
and release. Prostaglandins. 1976 ; 12 :
403.
 27. 김정제. 최신침구학. 서울 : 정보사. 1995
: 211-3.
 28. 홍원식. 정교 황제내경영추. 서울 : 동양
의학연구원출판부. 1981 : 21, 39, 123,
176.
 29. 林鐘國. 鍼灸治療學. 서울 : 集文堂.
1983 : 226-30, 274, 298, 352, 364, 368,
461, 595.
 30. 孫思邈. 鍼灸醫學典籍大系. 備急千金要
方. 大阪市 : 出版科學統合研究所. 1979;
卷22 : 88-90.

31. 張介賓. 類經圖翼. 北京 : 文光圖書有限公司印行. 225.
32. 楊繼洲. 鍼灸大成. 서울 : 杏林出版社. 1977 : 220-7.
33. 전국한 의과 대학 본초학교수. 本草學. 서울 : 영림사. 1991 ; 647-8.
34. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 대구 : 대성출판사. 1984 : 2406.
35. Monti, M, Berti, E., Carminati, G., and Cusini, M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. Contact Dermatitis. 1983 ; 9 : 163-4.
36. 權探. 俞孝通. 盧重禮. 朴允德 등. 鄉藥集成方. 평양 : 과학백과사전출판사. 1993 ; 5권 : 262.
37. 張金鼎, 鄭治文. 北京 : 中醫古籍出版社. 2002 : 197.
38. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 대성문화사. 1992 : 197.
39. Scheller S, Witczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J, Shani J. Free radical scavenging by ethanol dextract of propolis. Int J Radiat Biol. 1990 ; 57(3) : 461-5.