

赤何首烏 藥針의 AAPH처리된 흰쥐에 대한 항산화작용

林樂哲*

Abstract

Antioxidant activity of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra in rats treated with AAPH

Nak-Chul, Lim

This study was done to elucidate the antioxidant activities of Polygoni Radix rubra(赤何首烏) by way of aqua-acupuncture methods.

After 10% & 20% concentrations of liquid extract of Polygoni Radix rubra(PRR) were acupunctured on Joksamri(足三里) of rats with acute and chronic experimental oxidation by AAPH(2, 2'-azobis (aminoinopropane), hydrochloride), various kinds of experiments were performed.

The results were obtained as follows:

1. In acute oxidant experiment, the amount of TBARS was significantly increased from 0.5 hr to 1.5 hr after AAPH treatment
2. In acute oxidant experiment by AAPH, uric acid was significantly increased while the others didn't show any difference such as total protein, albumin, bilirubin.
3. In chronic oxidant experiment by AAPH, PRR significantly increased the body weight in comparison with control group, whereas liver and spleen tended to increase, lung and kidneys tended to decrease.
4. In chronic oxidant experiment by AAPH, PRR significantly decreased the GPT, hemolysis of erythrocytes, TBA and BUN, where GOT was significantly reduced in 20% PRR treated group, and TG was significantly in 10% PRR treated group.

These results suggest that PRR has potent antioxidant activity and needs more studies on microsomal fraction of liver and kidney.

* 大田大學校 附屬韓方病院

I. 緒 論

藥鍼療法은 各種 藥物을 一定한 方法으로 製造하여 有關한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 精製한 各種藥物을 選擇하여 注入함으로써 刺鍼刺戟과 藥理作用을 통해 各種 疾病을 治療하는 新鍼療法^{1,2)}이다. 最近에는 한약을 이용한 약침요법이 盛行한데 郭³⁾과 南⁴⁾은 藥鍼療法이 各種疾患에 應用될 수 있음을 提示하였다.

韓醫學에서 老化는 모든 萬物이 生·長·化·收·藏의 陰陽 五行的 規律에 의해 變化하는 過程으로 認識함으로써 女子 7歲에 腎氣가 盛하여 發育하고 35歲에 陽明脈이 衰해지면서 女子의 老化가 始作된다고 하였고, 男子는 8歲에 腎氣가 實하게 되어 發育하고 40歲에 腎氣가 衰해지면서 老化가 始作된다고 하여 人間의 出生, 發育, 成長, 成熟, 老化의 過程을 腎氣의 盛衰로 說明하였다⁵⁾.

西醫學에서 老化의 發生 原因은 遺傳學說, Error 破滅說, 體細胞 突然變異說, 遊離基說, 代謝產物蓄積說 등 多樣하지만 가장 認定되고 있는 理論은 自由遊離基說(free radical theory)로서 그 內容은 環境因子와 內的因子들로 인해 體內에 過酸化脂質이 많이 發生하고 抗酸化劑의 體內減少로 인해 老化가 促進된다고 알려져 왔다⁶⁾. 老化의 防止를 위하여 最近에는 抗酸化作用을 나타내는 物質을 찾는 實驗研究가 있는데 金⁷⁾은 胡挑藥鍼液의 抗酸化 效果에 對한 研究를, 鄭⁸⁾은 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性增加 效果에 對한 研究를 報告한 바가 있으며, 최근 李 등⁹⁾은 백하수오 藥침의 항산화작용을, Wang 등¹⁰⁾은 백하수오의 動脈硬化에 대한 效果를 보고하고 Xiao 등¹¹⁻¹²⁾은 老化抑制作用에 대해서 보고하고 또한 Iversen 등¹³⁾은 老化에 따른 記憶力減退 防止藥으로 보고한 바가 있고 Ohta 등¹⁴⁾은 백하수오와같은 천연약재가 肝損傷을 막는데 效果의 이라고 보고하고 있지만, 血分에 들어가 “補

益精血”하는 效能¹⁵⁾을 나타내는 赤何首烏를 藥鍼液으로 製造하여 抗酸化作用을 검토한 研究는 아직 없었다.

이에 著者는 적하수오의 항산화작용을 입증하고자 赤何首烏 藥鍼液 10%와 20% 溶液을 만들어 free radical 유도물질인 AAPH (2,2'-azobis (2-aminodinopropane) hydrochloride)를 복강으로 투여하여 급성산화를 유발시키기전 1회투여하여 단기간 산화 예방효과를 살펴보고, AAPH 처리후 2주간 흰쥐의 足三里¹⁰⁾에 藥鍼하고 血清內에서 TBA 反應性物質含量, uric acid, bililubin 및 total protein, GOT,GPT, BUN, creatinine, triglyceride,cholestrerol 등을 測定하였던 바 유의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動 物

동물은 4週齡의 180~250g 雄性 Sprague Dawley系(한국화학연구소) 白鼠를 使用하였는데, 사육조건은 實驗室 環境(溫度 23±2℃, 相對濕度 50±10%, 照明時間 12時間(07:00~19:00), 照度 150~300Lux)에 2週日間 適應시켜 體重變化가 一定하고 健康한 動物만을 選別하여 實驗에 使用하였다. 飼料는 固形飼料(粗蛋白質 22.1% 이상, 粗脂肪 8.0% 이하, 粗纖維 5.0% 이하, 粗灰分 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사 配合飼料 Co.)를, 食水는 精製水를 自由로 攝取케 하였다.

2) 藥 物

本 實驗에 使用한 藥材는 <本草綱目>¹⁶⁾에 收載된 赤何首烏(Polygonum multiflorum THUNB.)를 藥鍼液으로 제조하여 실험에 使用하였다.

3) 試藥 및 機器

Thiobarbituric acid(TBA), Malonaldehyde bis(diethyl acetatal) 등은 Sigma社 製品을,

2,2'-Azobis(2-amidinopropane)HIC(AAPH)는 Polyscience社 製品을 使用하였고, 그의 試藥들은 特級 및 一級을 使用하였다. 本 研究에 使用된 機器는 Spectrophotometer(Shimadzu, Japan), 원심분리기(Bechmann, USA), Bio-freezer(sanyo, Japan), Ice-maker(비전과학) 및 Homogenizer(OMNI,U.S.A) 등을 使用하였다.

2. 實驗 方法

1) 藥鍼液의 製造

적하수오 275g을 粗末로 하여 圓形 flask에 넣고 蒸溜水 2000ml을 加하여 3時間 水浴에서 流出하고 濾過하였다. 이 濾過液을 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 全量을 200ml로 하였다. 室溫까지 冷却하고 95% ethyl alcohol 100ml을 加하여 室溫에서 攪拌한 後 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 85% ethyl alcohol 100ml을 加하여 잠시 攪拌하고 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고 다시 濾液을 75% ethyl alcohol 100ml를 加한 後 같은 操作을 2回 反復한 다음 濾液中 ethyl alcohol을 減壓留去하여 殘渣全量을 100g이 되게하여 여기에 生理食鹽水 1,000ml를 加하고 3% 鹽酸으로 pH6.7로 調節하여 低溫에서 12時間 放置한 後 微量의 浮遊液을 濾別한 後 高壓滅菌하여 藥鍼液으로 使用하였다.(Scheme 1)

2) AAPH에 의한 급성산화실험

(1) AAPH에 의한 TBA反應 測定

S.D 흰쥐는 各各 10마리씩 正常群, 對照群, 實驗群으로 區分하여 對照群과 實驗群에 AAPH(50mg/kg)을 복강에 注射하였고, 實驗群에는 AAPH처리 1時間前에 20% 적하수오 藥鍼群과 10% 적하수오 藥鍼群으로 區分하여 처리하였고, 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 注入하였다. 흰쥐는 AAPH처리 후 0.5, 1, 1.5, 3, 6時間 後에 致

死시켜 직접 심장 採血法으로 5ml의 血液을 포집하였다. TBA測定은 Suematsu등의 方法에 따라 clean test tube에 血清 200ul를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225ul를 加하고 5 초동안 vortex mixer로 mixing하였다. 20% acetic acid 1.5ml을 加하고 그리고 75ul 蒸溜水를 넣고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing하였다. 1.2% thiobarbituric acid 용액을 各各 1ml씩 tube에 넣고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 後, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 室溫에서 30분간 cooling한 後에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 上層液을 實驗에 使用하였다. 532nm에서 흡광도를 測定하였다.

(2) AAPH에 의한 혈청의 변화

實驗群에는 AAPH처리 1時間前에 10% 적하수오 藥鍼液을 投與하고, AAPH처리 1시간 後에 처사시켜 직접 심장채혈법으로 5ml의 혈액을 포집하였다. 5ml의 血液은 centrifuge tube에 넣은 다음 遠心分離器(Hettich Universal,U.S.A)에서 3,000 rpm으로 15分間 遠心分離시켜 上層의 血清을 Serum Separator(녹십자)에 取하여 Total protein, Albumin, Uric acid 그리고 T-Bilirubin의 含量 측정을 550Express (CIBA-CORNING,U.S.A)를 사용하여 計算에 使用하였다.

3) AAPH에 의한 만성산화실험

(1) 實驗 動物 및 取穴

實驗 動物은 各各 10마리씩 正常群, 對照群, 實驗群으로 區分하여 對照群과 實驗群에 AAPH(50mg/kg)을 1日 1回 5日間 복강에 注射하였고 對照群에는 同量의 生理食鹽水를 注入하였다. 그리고 實驗群은 20% 적하수오 藥鍼群과 10% 적하수오 藥鍼群으로 區分하여 AAPH 注射 후 2주간 1日 1回 足三里穴에 取穴하였다.

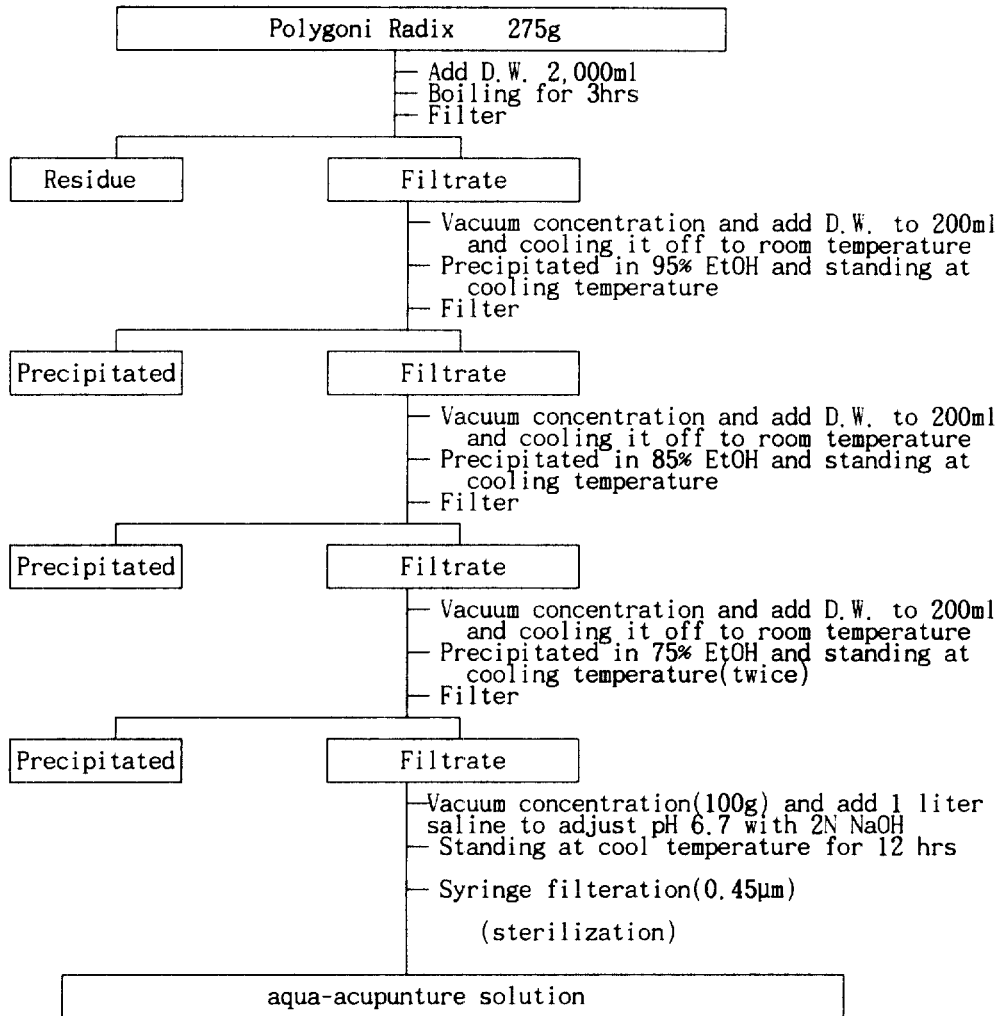
(2) 흰쥐의 發育에 미치는 影響

1) 生理的 變化의 觀察

흰쥐의 成長이 AAPH와 적하수오 藥鍼液에 의 하여 影響을 받는지 確認하기 위하여 生後 4주부터 회생시킬 때까지 體重의 變化를 調査하였다.

2) 各 장기 무게 測定

흰쥐의 나이가 8주가 되었을 때 各各 회생시키



Scheme 1. Manufacturing procedure of aqua-acupuncture solution by water-alcohol method

고, 심장, 폐, 간, 비장, 신장등 각종 장기를 적출하여 무게를 측정 한 후 -70 °C에 보관하면서 여러 가지 생체 성분을 분석하였다.

(3) 혈액의 성분 변화 측정

1) 혈액 성분의 변화.

흰쥐에 AAPH주사후 적하수오 수침액을 2주간 取穴한 다음 직접 심장 채혈법으로 10ml의 혈액을 포집하였다. 그 중 2ml는 CBC bottle(녹십자)에 넣었고, 나머지 8ml의 혈액은 centrifuge tube에 넣은 다음 遠心分離器(Hettich Universal,U.S.A)

에서 3,000 rpm으로 15分間 遠心分離시켜 上層의 血清을 Serum Separator(녹십자)에 取하여 total protein, cholesterol, creatinine, triglyceride, BUN의 含量 測定에 550Express (CIBA-CORNING,U.S.A) 使用하였고, CBC bottle의 血液은 血小板數, 白血球數, 赤血球數, 헤모글로빈數의 含量 計算에 使用하였다.

2) 적혈구 막의 활성 산소에 대한 내성 비교

NIKI등의 방법에 따라 8주가 된 흰쥐의 혈액을 Heparin으로 항응고 시킨 후 Hematology를 측정

하였다. 그리고 이 혈액을 시험관에 다시 넣고 10mM potassium phosphate buffered saline(pH7.4, PBS)용액을 첨가하여 원심 분리 (3,000 r.p.m, 10분)하였다. 3회 반복하여 혈액을 세척한 다음 20% RBC용액 1ml를 넣고 50mM AAPH용액 1ml를 첨가하여 37 °C에서 3시간 incubation하였다. 이 용액을 50ul를 취하여 2ml saline 용액에 넣은 것을 A용액이라 하고, 또 50ul를 취하여 2ml 증류수에 넣은 것을 B용액이라 하였다. 각각의 두 용액을 잘 혼합한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 A용액의 흡광도/B용액의 흡광도 x 100을 %hemolysis value로 계산하였다.

3) 혈청 TBA 반응성 물질 함량 측정

Suematsu등의 방법에 따라 clean test tube에 혈청 200ul를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225ul를 가하고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing하였다. 20% acetic acid 1.5ml를 가하고 그리고 75ul 증류수를 넣고 5sec. 동안 vortex mixer로 mixing하였다. 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1ml씩 tube에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 후, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리 상층액을 실험에 사용하였다. 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Effect of 10% Polygoni Radix rubra on the changes of thiobarbituric acid(TBA) reactive substances according to time course

Time after AAPH treatment(hrs)	% of Dosage	Thiobarbituric acid (Absor. at 532nm)	Control(%)
0	Non-treated	0.016 ± 0.004 ^{a)}	0
0.5	10	0.032 ± 0.007 ^{***}	200
1	10	0.028 ± 0.004 ^{**}	175
1.5	10	0.029 ± 0.006 ^{**}	181
3	10	0.024 ± 0.005	150
6	10	0.024 ± 0.003	150

a): Mean ± Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

***:p<0.001, **: p<0.01, *:p<0.05

II. 實驗成績

1.적하수오 약침이 시간경과에 따라 TBA변화에 미치는 영향

적하수오 약침액 10%를 free radical inducer인 AAPH를 처리하고 532nm에서 TBA를 정량하였더니 0.016 ± 0.004이었으나 30분후에는 0.032 ± 0.007로, 1시간후에는 0.028 ± 0.004으로, 1시간 30분후에는 0.029 ± 0.006으로 유의성있게 증가하였는데 그후는 유의성이 인정되지 않았다(Table 1).

2. 적하수오 약침이 급성산화에 미치는 영향

AAPH를 처리하기전 1시간전에 적하수오 약침 10%를 주사하고 혈청 및 TBA를 측정하였더니 Uric acid는 대조군이 1.36±0.07이었는데, 실험군은 1.68±0.05로 유의성 있게 증가하였으며, Total protein은 대조군 4.59±0.03, 실험군 4.74±0.03로 증가, Bilirubin은 대조군 0.29±0.04, 실험군 0.26 ± 0.05로 감소, Albumin은 대조군 2.50±0.003, 실험군 2.52±0.02으로 증가, TBARS는 대조군 0.03 ± 0.0009이었으나 실험군은 0.021 ± 0.003로 감소하였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 2).

Table 2. Effect of 10% Polygoni Radix rubra on the changes of uric acid, total protein, bilirubin, albumin and TRARS

Group	Normal	AAPH Control (60min after)	AAPH & 10%PRR (60min after)	P-value
Uric acid	1.96±0.04	1.36±0.07	1.68±0.05 ^{a)}	p<0.01
Total protein	5.24±0.04	4.59±0.03	4.74±0.03	-
Bilirubin	0.21±0.01	0.29±0.04	0.26±0.05	-
Albumin	2.58±0.03	2.50±0.003	2.52±0.02	-
TBARS	0.015±0.0006	0.03±0.0009	0.021±0.003	-

a): Mean ± Standard Error.

3. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 장기체중변화에 미치는 영향

AAPH(50mg/kg)을 1일 1회 5日間 복강에注射하고 實驗群은 20% 적하수오 藥鍼群과 10% 적하수오 藥鍼群으로 區分하여 AAPH 注射 후 2주간 1日 1回 足三里穴에 약침하였다. 대조군의 체중은 246g±3.6이었으나, 적하수오 약침20% 처치군은 272±4.7으로 유의성 있게 증가하였으며,

liver와 spleen은 대조군에 비해 증가, heart, lung 및 kidney는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 3).

4. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 WBC변화에 미치는 영향

WBC는 정상군에서 8.7 ± 0.10이었으나 대조군은 14.3 ± 0.32로 정상군에 비해 유의성있게 증

Table 3. Effect of 20% & 10% Polygoni Radix rubra on the changes of organ weight

Group	No. of Animals	Organ weight(g)					
		Body weight	Heart	Liver	Lung	Spleen	Kidney
Normal	10	277±5.5	0.8±0.01	9.5±0.07	1.27±0.04	0.43±0.02	1.57±0.02 ^{a)}
Control	10	246±3.6	1.05±0.04	9.23±0.24	1.75±0.09	0.58±0.03	2.05±0.05
20%PRR	10	272±4.7 ^{***}	1.03±0.03	9.45±0.53	1.38±0.04	0.58±0.04	1.80±0.09
10%PRR	10	249±6.1	0.85±0.02	8.4±0.20	1.35±0.05	0.60±0.03	1.58±0.03

a): Mean ± Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

***:p<0.001, **: p<0.01, *:p<0.05

Table 4. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra on the White Blood Cells(WBC) in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	White Blood Cell (x10 ³ /mm ³)	P-value ^{a)}
Normal	8	8.7 ± 0.10 ^{a)}	
Control	8	14.3 ± 0.32	
20% PRR	8	13.3 ± 0.58	-
10% PRR	8	11.9 ± 0.28	-

a) : Mean ± Standard Error.

Table 5. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Red Blood Cell(RBC) in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Red Blood Cell (x10 ⁴ /mm ³)	P-value ^{a)}
Normal	8	6.66 ± 0.12 ^{a)}	
Control	8	7.79 ± 0.09	
20% PRR	8	7.34 ± 0.09	
10% PRR	8	7.01 ± 0.06	-

^{a)} : Mean ± Standard Error.

가하였으나 적하수오 藥鍼群에서는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 4).

5. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 RBC변화에 미치는 영향

RBC는 정상군에서 6.66 ± 0.12이었으나 대조군은 7.79 ± 0.09로 정상군에 비해 유의성있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群에서는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 5).

6. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 Hematocrit변화에 미치는 영향

Hematocrit은 정상군에서 31.6 ± 0.26이었으나 대조군은 34.9 ± 0.32로 정상군에 비해 유의성있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群에서는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 6).

7. 하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 Hemoglobin변화에 미치는 영향

Hemoglobin은 정상군에서 13.0 ± 0.10이었으나 대조군은 14.9 ± 0.11로 정상군에 비해 유의성있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群에서는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 7).

Table 6. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Hematocrit in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Hematocrit(%)	P-value ^{a)}
Normal	8	31.6 ± 0.26 ^{a)}	
Control	8	34.9 ± 0.32	
20% PRR	8	32.4 ± 0.43	
10% PRR	8	30.4 ± 0.38	-

^{a)} : Mean ± Standard Error.

Table 7. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Hemoglobin in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Hemoglobin(g/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	13.0 ± 0.10 ^{a)}	
Control	8	14.9 ± 0.11	
20% PRR	8	13.8 ± 0.23	
10% PRR	8	13.0 ± 0.11	-

^{a)} : Mean ± Standard Error.

8. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 platelet 변화에 미치는 영향

Hemoglobin은 정상군에서 82.4 ± 2.80 이었으나 대조군은 75.5 ± 4.35 로 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다(Table 8).

Table 8. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Platelet in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Platelet ($\times 10^4/mm^3$)	P-value ^{a)}
Normal	8	$82.4 \pm 2.80^{a)}$	
Control	8	75.5 ± 4.35	
20% PRR	8	88.5 ± 1.77	p<0.01
10% PRR	8	88.1 ± 1.90	p<0.01

^{a)} : Mean \pm Standard Error

* : Statistically significant value compared with control data by T test

9. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 total protein 변화에 미치는 영향

Total protein은 정상군에서 5.71 ± 0.09 이었으나 대조군은 5.01 ± 0.06 로 정상군에 비해 감소하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 증가하는 경향이었지만 유의성이 없었다(Table 9).

Table 9. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Total protein in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Total protein (g/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	$5.71 \pm 0.09^{a)}$	
Control	8	5.01 ± 0.06	
20% PRR	8	5.38 ± 0.11	
10% PRR	8	5.37 ± 0.04	

^{a)} : Mean \pm Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

10. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 Creatinine 변화에 미치는 영향

Creatinine은 정상군에서 0.51 ± 0.019 이었으나 대조군은 0.43 ± 0.007 로 정상군에 비해 감소하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 증가하는 경향이었지만 유의성이 없었다(Table 10).

Table 10. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum Creatinine in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Creatinine (mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	$0.51 \pm 0.019^{a)}$	
Control	8	0.43 ± 0.007	
20% PRR	8	0.45 ± 0.011	
10% PRR	8	0.46 ± 0.015	

^{a)} : Mean \pm Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

11. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 BUN 변화에 미치는 영향

BUN은 정상군에서 14.0 ± 0.45 이었으나 대조군은 19.9 ± 0.91 로 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 11).

Table 11. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum BUN in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	BUN(mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	$14.0 \pm 0.45^{a)}$	
Control	8	19.9 ± 0.91	
20% PRR	8	16.4 ± 0.62	P<0.01
10% PRR	8	15.9 ± 0.71	P<0.01

^{a)} : Mean \pm Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

12. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 cholesterol 변화에 미치는 영향

Cholesterol은 정상군에서 55.4 ± 2.93 이었으나 대조군은 47.0 ± 1.91 로 정상군에 비해 감소하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였지만 유의성은 없었다(Table 12).

Table 12. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum Cholesterol in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Cholesterol (mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	$55.4 \pm 2.93^{a)}$	
Control	8	47.0 ± 1.91	
20% PRR	8	50.1 ± 2.26	-
10% PRR	8	49.8 ± 1.97	

a) : Mean \pm Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

13. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 cholesterol 변화에 미치는 영향

Triglyceride는 정상군에서 50.5 ± 2.20 이었으나 대조군은 108.8 ± 12.9 로 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였지만 적하수오 10%군에서만 유의성이 있었다(Table 13).

Table 13. Effect of aquaacupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum Triglyceride in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	Triglyceride (mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	$50.5 \pm 2.20^{a)}$	
Control	8	108.8 ± 12.9	
20% PRR	8	89.4 ± 14.1	
10% PRR	8	61.1 ± 4.48	p<0.01

a) : Mean \pm Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

14. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 GOT 변화에 미치는 영향

GOT는 정상군에서 148.9 ± 6.77 이었으나 대조군은 244.2 ± 3.96 로 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였지만 적하수오 20%군에서만 유의성이 있었다(Table 14).

Table 14. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum Glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT) in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	GOT(mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	$148.9 \pm 6.77^{a)}$	
Control	8	244.2 ± 3.96	
20% PRR	8	108.3 ± 2.76	p<0.001
10% PRR	8	163.2 ± 9.26	

a) : Mean \pm Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

15. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 GPT 변화에 미치는 영향

GPT는 정상군에서 48.2 ± 2.51 이었으나 대조군은 63.3 ± 6.21 로 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였지만 적하수오 20%군에서만 유의성이 있었다(Table 15).

Table 15. Effect of aquacupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum Glutamate-pyruvate transaminase(GPT) in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	GPT(mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	48.2 ± 2.51 ^{a)}	
Control	8	63.3 ± 6.21	
20% PRR	8	49.9 ± 3.75	P<0.05
10% PRR	8	47.6 ± 3.10	P<0.05

^{a)} : Mean ± Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

16. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 LDH 변화에 미치는 영향

LDH는 정상군에서 938 ± 45.8이었으나 대조군은 1253 ± 150.6으로 정상군에 비해 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였지만 유의성이 없었다(Table 16).

Table 16. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the Serum Lactate dehydrogenase(LDH) in Rats Induced by AAPH

Group	No. of Animals	LDH(mg/dL)	P-value ^{a)}
Normal	8	938 ± 45.8 ^{a)}	
Control	8	1253 ± 150.6	
20% PRR	8	1058 ± 41.4	
10% PRR	8	1130 ± 37.9	

^{a)} : Mean ± Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

17. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 적혈구내성에 미치는 영향

적혈구내성은 정상군에서 33.8 ± 0.47이었으나 대조군은 39.3 ± 0.44으로 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조

군에 비해 유의성 있는 감소효과를 나타냈다 (Table 17).

Table 17. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the hemolysis of erythrocytes in Rats induced by 50mM AAPH for 3 hours incubation at 37 °C

Group	No. of Animals	Erythrocytes hemolysis (%)	P-value ^{a)}
Normal	8	33.8 ± 0.47 ^{a)}	
Control	8	39.3 ± 0.44	
20% PRR	8	34.8 ± 0.98	P<0.001
10% PRR	8	36.2 ± 0.54	P<0.001

^{a)} : Mean ± Standard Error

* : Statistically significant value compared with control data by T test

18. 적하수오 약침이 AAPH에 의한 만성산화 유발시 TBARS에 미치는 영향

TBA는 정상군에서 0.038 ± 0.005이었으나 대조군은 0.077 ± 0.004으로 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 적하수오 藥鍼群은 모두 대조군에 비해 유의성 있는 감소효과를 나타냈다 (Table 18).

Table 18. Effect of aqua-acupuncture of Polygoni Radix rubra drug on the thiobarbituric acid(TBA) reactive substances in serum in Rats induced by AAPH

Group	No. of Animals	Thiobarbituric acid (Absor. at 532nm)	P-value ^{a)}
Normal	8	0.038 ± 0.005 ^{a)}	
Control	8	0.077 ± 0.004	
20% PRR	8	0.061 ± 0.004	P<0.01
10% PRR	8	0.067 ± 0.002	P<0.01

^{a)} : Mean ± Standard Error.

* : Statistically significant value compared with control data by T test

IV. 考 察

老化란 몸안에서 漸次的이고 法則的으로 이루어지는 機能形態學的變化的 生物學的過程¹⁾으로, 老化란 生物學的인 普遍的 自然現象으로서 漸次的인 臟腑組織의 衰退와 變質 및 老衰와 더불어 進行性으로 나타나는 現狀이라 規定하였다¹⁷⁾.

대부분 老化現狀의 과정으로는 40대 以後부터 始作된다고 할 수 있는데, 50대까지는 輕微하여 生理的인 老化現狀 程度로 取扱되고 있으나, 69-70歲에 가서는 老化가 增加되어 老化現狀과 疾病과의 區分이 明確하지 않을 수 있게 되고, 70歲 이후는 老化自體로서도 生體에 憂患을 發生시킬 수 있으며, 80歲 이상의 高齡에서는 老化에 의하여 臟器가 成熟期의 半程度로 減退된다고 보고 있다¹⁸⁾.

또한 臨床에서 老衰現狀은 눈의 水晶體 不透明, 最高 筋力의 減少, 血壓上昇, 生殖機能의 衰退 등으로 血管系, 神經系, 結合組織, 皮膚, 筋肉 등에서 잘 나타나는데, 이는 각 組織의 細胞가 破壞되는 必然性이 있다는 것이 밝혀진 바가 있다¹⁹⁾. 生體의 老化나 癌, 心筋梗塞, rheumatism, 炎症 등 현재 우리나라에서 많은 死亡率을 점하고 있는 여러 種類의 成人病 및 難治病은 相互 聯關이 있으며, 이는 生體에 吸入되어진 酸素의 일부가 superoxide, H₂O₂ 및 hydroxy radical 등과 같은 活性酸素 free radical로 變換되면 脂質의 過酸化反應이 進行되고, 脂質의 酸化가 誘導되면 細胞膜의 破壞, 細胞의 老化, 細胞의 壞死 등으로 나타나는 것으로 보고 있다²⁰⁾.

現在 이러한 理論의 背景으로 過酸化脂質의 生成을 抑制하기 위한 抗酸化劑 및 이들 活性酸素를 除去시킬 수 있는 superoxide dismutase에 관한 研究²¹⁾가 進行되고 있으나, 化學的으로 安定하고 새로운 醫藥品의 開發에는 많은 어려움이 따르고 있다.

韓醫學에서는 老化에 대하여 《素問》⁵⁾<上古天眞論>에서는 “女子七歲 腎氣盛 齒更髮長, 二七而

天癸至 任脈通 太冲脈盛 月事以時下 故有子, 三七 腎氣平均 故眞牙生而長極, 四七 筋骨堅 髮長極 身體盛壯, 五七 陽明脈衰 面始焦 髮始墮”라 하여 비로소 35歲에 陽明脈이 衰해지면서 女子의 老化가 시작된다고 하였고, “丈夫八歲 腎氣實 髮長齒更, 二八 腎氣盛 天癸至 精氣溢寫 陰陽和 故能有子, 三八 腎氣平均 筋骨勁強 故眞牙生而長極, 四八 筋骨隆盛 肌肉滿壯, 五八 腎氣衰 髮墮齒槁”라 하여 男子는 40세에 腎氣가 衰해지면서 老化가 始作된다고 하였으며, <陰陽應象大論>에서는 “年五十體重 耳目不聰明矣 年六十陰痿氣天衰 九竅不利 …”라 하여 老化에 따른 各 器官의 構造的 機能的 變化를 言及하였고, 《靈樞》⁵⁾<天年篇>에서는 “五十歲 肝氣始衰 肝葉始薄 膽汁始減 目視不明” “六十歲 心氣始衰 喜憂悲血氣解惰 故好臥” “七十歲 脾氣虛 皮膚枯” “八十歲 肺氣衰…” “九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛” “百歲五藏皆虛 腎氣皆怯…”이라 하여 五十歲엔 肝氣가, 六十歲엔 心氣가, 七十歲엔 脾氣가, 八十歲엔 肺氣가, 九十歲엔 腎氣가 虛衰하게 되어 百歲엔 五臟이 다 虛하게 됨으로 生命을 다하였다고 하였으며, <營衛生會篇>에 “老子之氣血衰 其肌肉枯 氣道澁…”이라 하여 氣血變化에 의한 身體的 變化를 言及하였으며, 杜⁶⁾는 老化의 原因을 先天不足, 後天失調, 精神失調과 하였는데 先天不足이란 稟賦先天腎氣不足을 말하며 先天之氣가 強하면 身體壯盛 精力充滿 不易變老하나 先天之氣가 弱하면 身體憔悴 精神萎憊하여 老化가 쉽게 되거나 加速되어 壽命이 短縮된다고 하였으며, 後天失調는 脾胃虛損, 臟腑虛弱, 起居無節 및 妄于勞作하는 것에 의하여 오는 것으로 氣候와 地域의 影響을 받는다고 하였으며, 精神失調는 精神의 思考方向에 따라 肉體의 健康이 支配를 받게 되어 老化가 加速된다고 하였다.

이와같이 한의학에서는 老化를 陰陽의 變化, 臟腑, 氣血, 經絡 및 精神의 變化로 나누어 說明하고 있으며, 특히 老化의 症狀이 腎臟과 相生 關係에 있는 肝臟의 機能虛衰로 인한 것이 많아 五藏中 두 臟器가 老化에 直接的인 影響을 미치는 것으로 보고 있다²²⁾.

따라서 老化의 豫防을 위해 多樣한 養生 方法이

紹介되어 왔으며, 氣血과 腎精을 補하는 延年益壽之劑가 老化防止를 위해 使用되어왔다.

本 實驗에서 使用된 藥鍼療法은 經絡學說과 藥物療法의 原理를 바탕으로 各種 藥物을 一定한 方法으로 製造하여 有關한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 精製한 各種 藥物을 選擇하여 注入함으로써 藥物의 效能을 통해 各種 疾病을 治療하는 新鍼療法¹²⁾으로 현재 臨床에서 널리 應用되고 있으며, 最近에는 多様な 病症에 대한 藥鍼液을 開發할 目的으로 實驗動物의 研究로서는 肝損傷²³⁾, 鎮痛²⁴⁾, 血壓²⁵⁾, 血栓²⁶⁾, 免疫²⁷⁾, 糖尿²⁸⁾, 抗痙攣²⁹⁾, 腫瘍³⁰⁾, 膽石³¹⁾ 등의 實驗研究가 활발히 報告되고 있다.

赤何首烏는 색이 적색을 띠고 있어 血分에 작용하는 한약으로 微溫無毒하고 味는 苦甘하며 瀟하고, 補肝腎益陰, 收斂精氣, 強筋益髓, 養血祛風, 烏鬚髮하는 效能이 있다¹⁶⁾고 보고 되고 있으나, 주로 연구가 백하수를 이용한 연구가 주이며 적하수 오 약침액을 이용한 연구가 거의 없는 실정이다.

이에 著者는 補肝腎 藥물인 적하수 오 약침액의 抗老化作用을 實驗적으로 立證하고, 이를 藥鍼液으로 開發하고자 實驗的 急性酸化症을 誘導 하기 위하여 酸化誘發物質인 AAPH 를 腹腔에(50 μ g/kg) 1회 投與하고 10% PRR 藥鍼 施術 후 30min, 1h, 1.5h, 3h, 6h 후에 致死시켜 血清을 取하여 TBA 反應性物質, 生化學的 檢査(uric acid, total protein, bililubin, albumin)을 測定하여 急性酸化症 變化를 觀察하였다.

急性酸化實驗에서는 酸化的 損傷의 指標로 使用되는 TBA 反應性物質(TBARS)의 含量과 여러가지 生理 變化를 豫見할 수 있으며, 生化學的으로 좋은 指標로 이용되고 있는 血液成分 檢査를 實施하였다.

먼저 free radical 반응에 의한 酸化的 損傷의 指標로서 血清中에 存在하는 TBA 反應性物質(TBARS)의 含量을 測定 比較하였는데, TBA는 脂質過酸化物 뿐만아니라 蛋白質의 酸化物과도 反應하여 complex를 형성하기 때문에 生體內의 全體의 oxidative stress에 대한 結果³²⁾으로 볼 수

있다. 本 實驗은 AAPH를 처리 1 時間前 10% PRR를 처리하여 5개의 時間群의 TBARS含量을 測定하였는데 1시간 30분까지는 正常群의 181-200%까지 增加된 狀態에서 不規則한 增減을 나타냈으나, 3 時間 以後에는 150% 정도로 점차 낮은 값을 나타냈다(Table 1). 酸化誘發物質인 AAPH로 誘發 후 1 시간 후 實施한 血清檢査에 선 uric acid만이 대조군에 비해 有意성 있는 증가를 나타냈으나 기타 total protein, albumin, bilirubin은 有意한 差異를 나타내지 않았다(Table 2). 이는 短期的으로 實施한 急性酸化實驗 結果로 10% PRR은 抗酸化作用이 강하지 않음을 시사하였다.

慢性酸化에서 一次的으로 나타난 效果的인 抗酸化作用에 관한 實驗 結果에 따라서 二次的으로 좀더 持續的인 效果를 觀察하기 위하여 10%, 20% PRR溶液으로 만들어 AAPH(50 μ g/kg) 投藥을 5日間 施行하여 2週間 PRR를 10%, 20%로 稀釋시켜 足三里에 藥鍼을 施術하여 血液에서 RBC, WBC, platelet, hematocrit, 血液에서는 TBA反應性物質 生化學的 活性變化를 調查하여 PRR의 抗酸化效果를 觀察하였다.

生體의 正常的인 發育과 成長에 대한 指標인 體重變化에서는 대조군에 비해 적하수 오 약침20% 처치군은 有意성 있게 증가하였으나, liver와 spleen은 대조군에 비해 증가, heart, lung 및 kidney는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였지만 有意성을 인정할 수 없었다(Table 3).

血液學的 變化에서는 血球細胞의 變化, 血清成分의 變化, 血清酵素의 活性度變化, 赤血球膜의 酵素活性에 대한 耐性, 血清 TBA 反應性物質 含量比較등을 測定하였는데 血球細胞의 變化에서는 白血球數, 血小板數, 赤血球數, 헤모글로빈, hematocrit 등은 모두 對照群에 비해 有意性 있는 變化를 나타내지 않았다(Table 4-8).

血清成分의 變化에서는 total protein과 creatinine 含量은 대조군에 비해 有意한 變化가 없었지만, BUN치는 모두 對照群에 비해 有意性 있는 減少를 나타내었으며(Table 9, 10, 12), 특히 老化와 더불어 增加되는 代表的인 指標成分이며³³⁾,

退行性疾患의 發生과 密接한 關聯이 있는 cholesterol 含量은 모든 실험군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성이 없었고, triglyceride의 含量은 10% PRR群만이 有意性있는 減少를 나타냈다(Table 11-13).

血清中에 存在하는 여러가지 酵素들의 活性度の 變化에서는 肝機能의 指標³³⁾가 되는 glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT), Glutamate-pyruvate trans aminase(GPT), Lactate dehydrogenase(LDH)의 活性을 測定하였는데 GPT는 적하수오 모든 농도에서, GOT 活性은 적하수오 20% 농도에서 有의한 감소를(Table 14,15), Lactate dehydro-genase의 活性은 큰 變化가 인정되지 않았다(Table 16).

赤血球膜의 活性酸素들의 攻撃에 대한 抵抗性을 測定하는 赤血球膜의 酵素活性에 對한 耐性實驗에서는 실험쥐에서 얻은 赤血球에 peroxy radical generator인 AAPH를 가하여 溶血되는 정도를 測定하였는데, 實驗群 모두 對照群에 比하여 有의性 있는 減少가 나타냈다(Table 17).

血清 TBA 反應性物質 含量比較에서는 rat 血清에서 TBA 反應性 物質 含量의 吸光度를 測定하였는데 實驗群 모두에서 有의性 있는 減少가 나타냈다(Table 18).

以上の 結果를 종합하면 赤何首烏 藥鍼液은 抗酸化作用이 있는 것으로 보이나, 간과 신장 등의 장기조직에 대한 항산화 효과의 보충연구의 필요성이 제기된다.

V. 結 論

赤何首烏藥鍼의 抗老化作用을 實驗的로 立證하기 위하여 赤何首烏 藥鍼液 10%와 20% 溶液을 試料로 하여 酸化誘發物質인 AAPH(2,2'-azobis(2-aminodino propane)hydrochloride)를 腹腔에 注射하여 實驗的 急慢性酸化症을 誘發시켜 血清學的 檢査, 肝組織中의 酵素活性測定 등의 실험을 실시하여 다음과 結論을 얻었다.

1. 急性 酸化實驗에서 TBA 反應性物質

(TBARS)의 含量은 實驗群에서 30분에서 1時間 30분까지는 正常群에 比하여 有의性 있게 증가되었다.

2. 急性 酸化實驗中 血清檢査에선 uric acid만이 有의性 있는 증가를 나타냈고, total protein, albumin 및 bilirubin 등은 有의性 있는 變化를 나타내지 않았다.

3. 慢性 酸化實驗에서 대조군에 비해 적하수오 약침20% 처치군은 有의性 있게 증가하였으나, liver와 spleen은 대조군에 비해 증가, heart, lung 및 kidney는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였지만 有의性을 인정할 수 없었다.

4. 慢性 酸化實驗에서 적하수오 10%와 20% 처치군은 모두 BUN, 赤血球耐性, GPT, TBARS 등을 有의性 있게 감소시켰으나, GOT는 20% 적하수오, TG는 10%적하수오 약침에서만 有의性 있는 감소효과를 나타냈다.

以上の 結果로 보아 赤何首烏 藥鍼液은 抗酸化作用이 있는 것으로 보이나, 간과 신장 등의 장기조직에 대한 항산화 효과의 보충연구의 필요성이 제기된다.

參 考 文 獻

1. 崔容泰 外 : 鍼灸學, 서울, 集文堂, pp.382-384, pp.1457-1458, 1991.
2. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室, 鍼灸學(上), 서울, 集文堂, pp.382~384,
3. 郭同經 : 穴位注射用法, 香港, 商務印書館, p.9, pp.32~171, 1975.
4. 南相千 : 經絡, 서울, 宇宙經絡社, 第2卷, pp.43~99, 1967.
5. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院, p.11, 19-20, 246, 301, 1981.
6. Harman, D. : Free radical theory of aging : Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease process. Free Radicals, Aging and Degenerative Disease(ed.

- Johnson, J.E. et al.), Alan R.Liss. inc., New York, pp.3-49, 1986.
7. 金永海 外 1人: 胡桃藥鍼液의 抗酸化 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):9-18, 1996.
 8. 鄭智天: 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):21-31, 1996.
 9. 이종현, 김성훈, 성락기: 백하수오약침의 항산화작용연구, 대한한의학회지, 18(1), 278-298, 1994
 10. Wang W: Effect of alcoholic extract of prepared radix Polygoni multiflori on preventing atherosclerosis in japanese quail, Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih, Dec:4(12):78-50, 1984.
 11. Xiao PG, Xing ST, Wang LW: Immunological aspects of Chinese medical plants as antiaging drugs, J Ethnopharmacol, Mar:38(2-3):167-75, 1993.
 12. Chen K, Li C: Recent advances in studies on traditional chinese anti-aging materia medica, J Tradit Chin Med, Sep:13(3):223-6, contd, 1993.
 13. Iversen T, Fiirgaard KM, Schriver P, Rasmussen O, Andreasen F: The effect of NaO Li Su on memory functions and blood chemistry in elderly people, J Ethnopharmacology, Apr:56(2):109-16, 1997.
 14. Ohta S, Sato N, Tu SH, Shinoda M: Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries, Yakugaku Zasshi Dec:113(12):870-80, 1993
 15. 顏正華: 중약학, 인민위생출판사, 818-820, 1985
 16. 李時珍: 本草綱目, 고문사, 746-748, 1975
 17. 최진호: 老化의 메카니즘과 研究方向, 生化學뉴스, 韓國生化學會, 5(3): 39-53, 1985.
 18. 徐舜圭: 成人病·老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-13, 1992.
 19. 田金洲 外: 中醫老年病學, 天津科學技術出版社, p.17,60, 1994.
 20. 張文彭 外: 老年腎虛證血漿過氧化脂質, 高密度脂蛋白, 膽固醇及基亞組分水平變化, 中醫雜誌, 30(2): 43-46, 1989.
 21. 許沛虎: 中藥研究中有關自由基研究近況, 中西醫結合雜誌, 15(3):185-188, 1995.
 22. 王其飛 外: 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, p.50,53,54, 1989.
 23. 徐範錫: 丹蔘水鍼이 CCl4中毒 白鼠 損傷肝에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1989.
 24. 趙州掌: 白屈菜水鍼이 鎮痛效果에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1990.
 25. 崔鍾鎬: 夏枯草水鍼이 自發性高血壓 흰쥐의 血壓과 血清에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1991.
 26. 朴恩熟: 紅花水鍼이 endotoxin에 의한 白鼠 血栓症에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 10(1):265-288, 1993.
 27. 朴鎮雄: 濃度差에 따른 黃耆水鍼이 methrotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):67-82, 1994.
 28. 文炳宇: 人蔘水鍼이 糖尿 白鼠의 血管 收縮과 弛緩, 構造 및 血液에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1992.
 29. 張逸鎮: 天麻와 白僵蠶水鍼이 鎮痙作用에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 11:175-182, 1988.
 30. 朴祥鎔: 薏苡仁水鍼이 腫瘍에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1994.
 31. 安垌珣: Lithogenic diet로 誘發된 膽石생쥐에 미치는 草龍膽水鍼의 效果, 慶熙大學校 大學院, 1990.
 32. N.A.Punchard and F.J.Kelly: Free radicals, 133, 1996
 33. 이귀녕, 이종순: 임상병리과일, 의학문화사, 1125-1129, 1990