

원저

## 중완(中腕) 및 관원(關元)에 시술한 천문동약침이 항암 및 면역작용에 미치는 영향

장석근 · 강재희 · 임윤경 · 이현 · 이병렬

대전대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

## Influence on the Anti-cancer and Immune response improvement of Herbal-acupuncture with Asparagus cochinchinensis infusion solution put into Chung-wan(CV12) and Kwanwon(CV4)

Jang Suk-geun, Kang Jae-hui, Yim Yun-kyoung, Lee Hyun and Lee Byung-ryul

Department of Acupuncture & Moxibustion,  
College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

**Objective:** To study on the anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement effects of Herbal-acupuncture with Asparagus cochinchinensis infusion solution.

**Methods:** we put into Chung-wan(CV12) and Kwanwon(CV4) of C57bl/6 which are corresponding to human body with Asparagus coc hinchinensis infusion solution. We observed the effect on the expres sion of MMP-9, the expression of cytokine gene, number of pulmon ary colony, histological analysis on tissue metastasis of lung and liver, the expression of cytokine gene on PBMC, the number of CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD 3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> cell.

**Results:** The results were obtained as follows

1) The effect on expression of MMP-9, the expression of cytokine gen e was inhibited significantly in all the sample groups, compared with control group.

- 접수 : 2003년 9월 14일 · 수정 : 2003년 9월 18일 · 채택 : 2003년 9월 20일  
· 교신저자 : 장석근, 충남 천안시 구성동 476-8 대전대 부속천안한방병원  
Tel. 041-560-8790 E-mail : sk0804@hanmail.net

2) In pulmonary colony, sample groups were decreased significantly, compared with control group. especially, the group put into Chung-wan(CV12) was decreased significantly.

3) Histological analysis of sample groups inhibited significantly in all the sample groups compared with that control groups in both of lung and liver. especially, the group put into Chung-wan(CV12) was inhibited significantly.

4) The effect on cytokine gene expression on PBMC of all the sample groups were increased significantly, compared with control group.

5) In flow cytometry, CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> cell in sample groups were increased compared with control group.

*Key words*: Chung-wan(CV12), Kwanwon(CV4), anti-cancer, anti-me tastasis,

## I. 緒 論

약침요법은 경락요법과 약물요법의 원리를 바탕으로 연구된 신침치료 중의 하나이다. 질병과 유관한 부위인 경혈, 아시혈 등의 陽性 反應點에 정제한 각종 한약물을 선택 주입함으로써 경혈과 약물이 질병에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하여 질병을 예방하고 치료하는 방법이다<sup>1)</sup>. 약침요법이 면역계 질환의 예방 및 치료 등에 유효하다는 보고가 최근에 많이 있으며, 임상에서도 각종 질환에 널리 응용되고 있다<sup>2)</sup>.

종양은 조직의 자율적인 過剩 成長으로<sup>3)</sup> 임상 및 병리상태적인 소견에 의하여 양성종양과 악성종양으로 구분하며, 일반적으로 종양이라 하면 대개 악성종양인 癌을 뜻한다<sup>4)</sup>.

한의학에서 종양은 厥疔<sup>5)-7)</sup>, 石癭<sup>5)-8)</sup>, 息賁<sup>5)-8)</sup>, 伏梁<sup>5)-7)</sup>, 積聚<sup>5)-9)</sup>, 腸覃<sup>5)-9)</sup> 등의 범위에 포함되어 유사하게 인식되었고, 원인으로는 六淫外邪의 外因과 七情內傷의 內因, 飲食失調와 過勞, 房勞過度의 不內外因 등으로 구분<sup>10)</sup>되었으며, 그 치료법은 益

氣 健脾, 滋陰補血, 養血生津, 溫補脾腎 하는 扶正法과 行氣理氣, 軟堅散結, 活血化瘀, 通絡解毒, 疏氣濕熱 등의 祛邪法 및 扶正法에 祛邪法을 加味하는 扶正祛邪法 등으로 분류하여 활용하고 있다<sup>11)-14)</sup>.

抗腫瘍 및 免疫效果에 대하여 한약의 투약 및 침구 등 다양한 방법으로 많은 연구가 보고<sup>15)-18)</sup>되었고, 그중 약침요법을 이용한 실험연구로는 人蔘<sup>19)</sup>, 魚腥草<sup>20)</sup>, 熊膽牛黃<sup>21)</sup>, 薏苡仁<sup>22)</sup>, 金銀花<sup>23)</sup>, 苦參<sup>24)</sup>, 豬苓<sup>25)</sup>, 瓦松<sup>26)</sup> 등<sup>27)-29)</sup>으로 약침하여 抗腫瘍 및 免疫機能 증진효과가 있다고 보고되었으나, 歷代의 本草文獻에 天門冬은 扶正法에 해당하는 효능을 가지고 있음에도 불구하고 天門冬藥針에 대한 연구는 아직 접할 수 없었다.

이에 저자는 滋陰潤燥, 清熱化痰, 鎮咳, 利尿, 通便, 殺蟲, 潤五臟의 效能<sup>30)-34)</sup>을 가진 天門冬으로 藥針液을 조제한 후 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 調昇降, 寬中하는 中腕(CV12)<sup>35)-38)</sup>, 培腎固本, 補氣回陽, 分別清濁, 保健防病, 溫調血室精宮, 調元散邪하는 關元(CV4)<sup>35)-38)</sup>에 약침하여 抗癌, 抗轉移作用 및 免疫增進效果에 대해 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

동물은 雌性인 4~5週齡의 C57BL/6 생쥐를 대한 실험센터에서 공급받아 실험 당일까지 固型飼料(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 室溫 22±2℃를 유지하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 藥 材

실험에 사용된 天門冬<sup>30)-34)</sup> (Asparagus cochinchinensis)은 대전대학교 부속 한방병원 약제과에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 試 藥

試 藥	製 造 會 社	製 造 國
RPMI 1640 medium	Sigma	U.S.A.
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco BRL	U.S.A.
Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)	Sigma	U.S.A.
Fetal bovine serum(FBS)	Gibco BRL	U.S.A.
RNAzolB	Tel-Test	U.S.A.
Taq polymerase	TaKaRa	Japan

### 2. 方法

#### 1) 藥 液의 製 造

天門冬<sup>30)-34)</sup> 55g을 조말하여 원형 flask에 넣고 증류수 400ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 流出하고 여과한 다음, 이 沈澱物을 3회 濾別(3M paper)한 후 rotary evaporator로 減壓濃

縮하였다. 이 침전물을 40ml까지 농축한 다음 95% ethyl alcohol 20ml를 가하여 室溫에서 攪拌한 후 방치하여 생성된 침전물을 濾別하였다. 濾液에 다시 85% ethyl alcohol 20ml를 가하여 잠시 攪拌하고 방치하여 생성된 침전물을 濾別하고 다시 濾液에 75% ethyl alcohol 20ml를 가한 후 같은 조작을 2회 반복한 다음 濾液 중 ethyl alcohol을 減壓留去하여 殘渣全量을 20g이 되게 하여 여기에 생리식염수 200ml를 가하고 1N NaOH로 PH 6.8이 되게 조절하여 저온에서 12시간 방치한 다음 미량의 부유액을 濾別한 후 高壓滅菌하여 약침액으로 사용하였다.

#### 2) 癌細胞株 培養

암세포주인 생쥐의 melanoma인 B16-F10[American Type Collection Cell(ATCC) Cell Repository Lines(CRL)-6475] Lines(CCL)-121]을 실험에 사용하였다. B16-F10의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's 배지(Hepes 包含), 10% FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100µg/ml) 및 L-glutamine에서 1주일 이상 繼代培養하였다. 그리고 75cm<sup>2</sup> culture flask에 B16-F10이 monolayer 상태로 70~80%를 차지하고 있을 때 실험을 실시하였다.

#### 3) 天門冬에 의한 B16-F10 및 PBMC의 mR NA 遺傳子 發顯 調節

##### (1) B16-F10 癌細胞株의 培養 및 藥物處理

B16-F10 癌細胞株를 trypsin-EDTA 溶液으로 single cell이 되도록 떼어내고, 2.0×10<sup>5</sup>個의 細胞를 24-well plate에 分株하여 배양기에서 48시간 배양하였다. 冷凍保管된 天門冬粉末을 배양액에 용해시켜 각각 100, 10, 1µg/ml로 稀釋하여 細胞 分株 2시간 후 24-well에 처리한 다음 48시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후에 培養液을 버리고 D-PBS로 2회 水洗하였다.

##### (2) PBMC 細胞分離 및 藥物處理

① PBMC(peripheral blood mononuclear cells) 細胞分離

C57BL/6 생쥐를 cervical dislocation으로 致死시킨 후 脾臟을 적출하고 적출한 脾臟을 100 mesh (Sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 粉碎하였다. 15ml conical tube (Becton dickinson)에 옮겨 약 5분간 방치하여 조직 덩어리를 沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83% NH<sub>4</sub>Cl 溶液을 넣고 5분간 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고, Hipaque-1077(Sigma)로 2000rpm에서 20분간 遠心分離하여 buffy coat 부분을 얻어 실험에 사용하였다.

② 細胞培養 및 藥物處理

PBMC 세포를 24 well plate에  $1 \times 10^6$  세포로 각 well에 분주하고, 天門冬藥針液 抽出物(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml) 및 陽性對照群(PWM, 10 $\mu$ g/ml)을 각각 처리하고 4시간 동안 배양한 후 D-PBS로 水洗하여 total RNA를 분리하였다.

(3) mRNA 遺傳子 分析

① Total RNA의 抽出

배양 종료 후 24-well plate의 上層液을 제거한 후 RNAzol<sup>B</sup>(Tel-Test, U.S.A.)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC(Diethyl Pyrocarbonate)를 처리한 20 $\mu$ l의 蒸溜水에 溶解시켜 정량하고, RNA를 確認하기 위하여 RNA 4 $\mu$ g을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10分間 denaturation시킨 후, formaldehyde를 넣은 1.5% agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 양을 確認하였다. 確認한 RNA는 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

② cDNA 合成

逆轉寫 반응은 준비된 total RNA 3 $\mu$ g에 해당하는 양을 75 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 $\mu$ g에 2.5 $\mu$ l의 10mM

dNTPs, 1 $\mu$ l의 random sequence hexanucleotides (25pmole/25 $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1 $\mu$ l의 RNasin (20 U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l의 100 mM DTT 및 4 $\mu$ l의 5 $\times$ RT buffer(250mM Tris-Cl, pH8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 혼합한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT(200 U/ $\mu$ l)를 添加한 뒤 DEPC 처리된 蒸溜水를 더하여 최종부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 遠心分離하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 水槽에서 60分 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10分 동안 방치하여 M-MLV RT를 不活性化시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

③ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1 $\mu$ l의 first-strand cDNA를 主型으로 사용하였으며, 主型에 대한  $\beta$ -actin, MMP-9, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-18, 그리고 NOS-II에 대한 primer는 아래와 같으며, sense primer(20 mole/ $\mu$ l)와 antisense primer(20pmole/ $\mu$ l)를 혼합하여 1 $\mu$ l를 가하고, 다시 3 $\mu$ l 2.5mM dNTPs, 3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18  $\mu$ l Taqpolymerase(5U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 $\mu$ l 되도록 滅菌蒸溜水를 가하고 predenaturation ; 95 $^{\circ}$ C, 5分, denaturati on ; 95 $^{\circ}$ C, annealing ; 55 $^{\circ}$ C, 1分, elongation ; 72 $^{\circ}$ C, 1分을 25cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3分 동안의 조건으로 PCR 을 수행하였다. 각 PCR products는 20 $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

#### 4) 天門冬에 의한 PBMC의 流細胞 螢光 分析

##### (1) 細胞培養 및 藥物處理

PBMC 세포를 12 well plate에  $5 \times 10^6$  세포로 각 well에 분주하고, 天門冬藥針液 추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 그리고  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 각각 처리하고 48시간 동안 동시 배양하였다.

##### (2) 免疫螢光細胞 分析

배양종료 후 각각  $4^\circ\text{C}$ 에서 免疫 螢光染色(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, FITC-anti-N.K(2B4)를 넣고 30분 4°C 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 收稅한 후 流細胞 螢光分析機(flow cytometer, Becton dickinson, USA)로 免疫活性 細胞를 분석하였다. 骨髓細胞分析은 CellQuest 프로그램을 이용하여  $\text{CD}3\text{e}^+/\text{CD}4^+$ ,  $\text{CD}3\text{e}^+/\text{CD}8^+$  그리고  $\text{CD}3\text{e}^+/\text{N.K}^+(2\text{B}4)$ 의 比率(gated, %)을 산출한다.

#### 5) In vivo 實驗

##### (1) B16-F10 癌細胞株 移植

B16-F10(ATCC, CRL-6475)을 C57BL/6 생쥐의 皮下에 繼代培養하였고 실험 전에 형성된 종양 조직 부위를 분리하여 종양조직 1g에 10ml의 cold D-PBS( $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Mg}^{2+}$ -free, Sigma)가 되게 조절한 후 100mesh (Sigma)로 종양조직을 粉碎한 후 遠心分離( $1,500 \text{ r.p.m.}$ , 5min.)하였다. 이 pellet에 collagenase( $1,700 \text{ U}/\text{mg}$ , Type-XI Sigma)를 B16-F10  $0.1 \text{ g}/\text{ml}$ 에 처리하여 30분간 water bath( $37^\circ\text{C}$ )에서 배양시킨 후 遠心分離( $1,300 \text{ r.p.m.}$ , 5min.)하였다. 上騰液을 제거한 다음  $0.85\% \text{ NH}_4\text{Cl}$ 을 넣어 잘 섞은 것을  $37^\circ\text{C}$  배양기에서 5분간 방치하여 적혈구를 파괴시킨 후 遠心分離하여 B16-F10을 분리하였다. B16-F10 癌細胞株( $2 \times 10^5$  cells/마리)를 각각 尾靜脈에 이식하였다.

##### (2) 實驗群의 分類

실험군은 다음과 같이 분류하였다.

정상군(Normal) : 處置하지 않은 군.

대조군-1(Control-1) : B16-F10 癌細胞株가 이식된 군.

대조군-2(Control-2) : B16-F10 癌細胞株를 이식한 후 14日 동안 腧穴에 생리식염수를 약침한 군.

실험군(sample) : B16-F10 癌細胞株를 이식한 후 14日 동안 經穴別로 天門冬藥針液을 약침한 군.

Sample A : 中腕에 약침한 군.

Sample B : 關元에 약침한 군.

##### (3) 取穴

인체의 中腕에 상응하는 실험동물의 체표면의 털을 제거한 후 骨度分寸法에 依據하여 經穴探知器(D-J3型, 耳電鍼器 上海醫療器)를 사용하여 取穴하였다.

##### (4) 藥鍼

약침주입기로 1ml의 주사기를 사용하여 실험시작 2일부터 15일까지 각각의 실험군에 따라 중완, 관원에 0.1ml씩, 1일 1회, 총 14일간 약침하였다.

##### (5) Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 이식 후 天門冬藥鍼液을 주입한 C57BL/6 생쥐에서 癌細胞株 이식 후 15일에 colony assay를 실시하였다. Pulmonary colonization assay는 肺臟의 외부에 나타난 黑色의 colony 수를 顯微鏡(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

##### (6) 病理組織檢査

B16-F10 癌細胞株를 이식하고 15일 후에 각 군에서 간과 폐를 분리하여 10% formaldehyde 溶液에 고정한 후 精切하여 흐르는 물에 8시간 동안 水洗한 다음 포매한다. 이것을 microtome으로 切片을 만들어 Hematoxylin & Eosin 染色을 하였다.

#### 3. 統計處理

통계는 student's t-test에 의해 처리하였다.

### III. 성 적

#### 1. 抗癌에 관한 實驗

##### 1) MMP-9 과 Cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 影響

B16-F10 癌株에서 Ht값은 대조군에서 IL-1 $\beta$  140, TNF- $\alpha$  133, NOS-II 135, MMP-9 62로 나타난데 반하여, 100( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 天門冬藥針液의 실험군에서는 IL-1 $\beta$  15, TNF- $\alpha$  71, NOS-II 11, MMP-9 31로 나타났고, 10( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 IL-1 $\beta$  77, TNF- $\alpha$  58, NOS-II 51, MMP-9 38로 1( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 IL-1 $\beta$  126, TNF- $\alpha$  131, NOS-II 128, MMP-9 61로 나타나 실험군이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났다<Table. 1>.

Table 1.

Group	Dose	Cytokines mRNA expression(Ht)				
		IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	NOS-II	MMP-9	$\beta$ -actin
Control	0	140	133	135	62	236
ACC-	100	15	71	11	31	234
AAS	10	77	58	51	38	231
( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1	126	131	128	61	234

B16-F10 melanome cells are activated with RPMI 1640 medium and *AspACCgus cochinchinensis* aqua-acupuncture solution(ACC-AAS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 48hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 $\mu\text{l}$  reaction volume containing with 3 $\mu\text{g}$  total RNA. And 3 $\mu\text{l}$  of resulting products were analyzed by RT-PCR analysis. Ampligied RT-PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NOS-II, MMP-9, mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin).

#### 2. 抗轉移에 관한 實驗

##### 1) Pulmonary colonization assay

B16-F10 癌細胞株 이식 후 14일간 天門冬藥針을 中脛, 關元에 실시한 C57BL/6 생쥐에 colony assay를 실시한 결과에서 실험군은 대조군보다 유의성 있게 감소하였다<Fig. 1>.

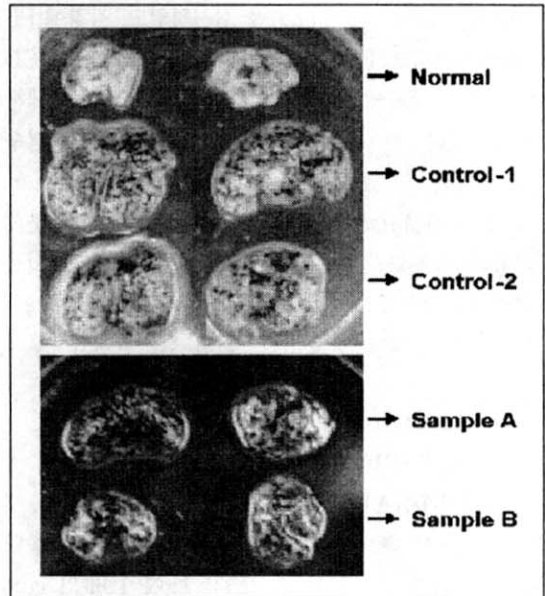


Fig. 1. The effect of Amomum amarum Lourerio infusion solution on inhibition of pulmonary colony number in C57BL/6 mice intravenously injected with B16-F10.

Normal : non-treated group.

Control-1 : injection of B16-F10 in C57BL/6 mice.

Control-2 : treatment of normal saline on random acupuncture for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6 mice.

Sample A : treatment of 10% Asparagus cochinchinensis infusion solution on 中脛 for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6 mice.

Sample B : treatment of 10% Asparagus cochinchinensis infusionsolution on 關元 for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6 mice.

2) 組織檢査

(1) 肝

B16-F10 癌細胞株를 주입하고 肝組織 전이에 대한 조직검사 결과, 대조군에서는 4+, 20~40% 天門冬藥針을 실시한 실험군에서 Sample A에서는 2+, 5~10%, Sample B에서는 3+, 10~20%로 나타나 전이가 억제됨을 알 수 있었다<Table. 2>.

Table. 2. Histological Analysis of Liver Tissue Metastasis in B16-F10 Melanoma in C57BL/6 Mice

Group	No. of injected cell	Histological analysis of tissue metastatic tumors
Normal	0	0
Control-1	2×10 <sup>5</sup>	++++
Control-2	2×10 <sup>5</sup>	++++
Sample A	2×10 <sup>5</sup>	++
Sample B	2×10 <sup>5</sup>	+++

Normal : non-treated group.

Control-1 : injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Control-2 : treatment of normal saline on random acupuncture for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Sample A : treatment of 10% Asparagus cochinchinensis infusion solution on 中脘 for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Sample B : treatment of 10% Asparagus cochinchinensis infusion solution on 關元 for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Tissue metastasis was scored

0 : no metastasis

+ : small degree of metastasis(5%)

(rare scattered nodules of metastatic cells)

++ : medium degree of metastasis(5~10%)

(occasional nodules with expansion of metastatic cells)

+++ : severe degree of metastasis(10~20%)

(frequent nodules with coalescence metastatic cells)

++++ : severe degree of metastasis(20~40%)

(frequent sheets of metastatic cells)

+++++ : severe degree of metastasis(over 70%)

(diffuses sheet of metastatic cells)

(2) 肺

B16-F10 癌細胞株를 주입하고 肺組織 전이에 대한 조직검사 결과, 대조군에서는 5+, 70% 이상을 나타내었고, 天門冬藥針을 실시한 실험군에서 Sample A에서는 2+, 5~10%, Sample B에서는 4+, 20~40%로 나타나 전이가 억제됨을 알 수 있었다<Table. 3>.

3. 免疫機能 增進에 關한 實驗

1) PBMC에서 Cytokine 遺傳子 發顯에 미치는 迎香

天門冬藥針液이 PBMC에서의 Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, IL-4, IL-12, IL-18, IFN-γ 에서 Ht값이 대조군은 각각 38, 32, 57, 28로 나타났으며, 100(μg/ml)의 天門冬藥針

Table. 3. Histological Analysis of Lung Tissue Metastasis in B16-F10 Melanoma in C57BL/6 Mice

Group	No. of injected cell	Histological analysis of tissue metastatic tumors
Normal	0	0
Control-1	2×10 <sup>5</sup>	+++++
Control-2	2×10 <sup>5</sup>	++++
Sample A	2×10 <sup>5</sup>	++
Sample B	2×10 <sup>5</sup>	++++

Normal : non-treated group

Control-1 : injection of B16-F10 in C57BL/6mice

Control-2 : treatment of normal saline on random acupuncture for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Sample A : treatment of 10% Asparagus cochinchinensis infusion solution on 中脘 for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Sample B : treatment of 10% Asparagus cochinchinensis infusion solution on 關元 for 14 days after injection of B16-F10 in C57BL/6mice.

Table 4. Effects of ACC-HAS on cytokines gene expression in mouse peripheral blood mononuclear cells(PBMCs).

Group	Dose	Cytokines mRNA expression(Ht)				
		IL-4	IL-12	IL-18	IFN- $\gamma$	$\beta$ -actin
Control	0	38	32	57	28	240
ACC-	10	224	144	230	162	238
AAS	100	205	102	133	36	237
( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	10	52	94	120	51	239

C57BL/6 mouse PBMCs( $1 \times 10^6$  cell/ml)s are activated with RPMI1640 medium and ACC-AHAS( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 4hrs. Reverse transcription reactions were carried out  $20\mu\text{l}$  reaction volume containing with  $3\mu\text{g}$  total RNA. And  $3\mu\text{l}$  of resulting products were analyzed by RT-PCR analysis. Amplified RT-PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed IL-4, IL-12p35, IL-18, IFN- $\gamma$ , mRNA expression and internal control( $\beta$ -actin).

Table 5. Effects of ACC-HAS on the percentage of CE3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> cells in mouse PBMCs.

Group	Dose	CD3e <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)	CD3e <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (%)	NK <sup>+</sup> cells (%)
Control	0	12.5	13.5	3.43
ACC-A	100	14.1	16.0	6.76
AS	10	15.4	18.7	6.67
( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				

C57BL/6 mouse PBMCs( $1 \times 10^6$  cell/ml)s are activated with RPMI1640 medium and ACC-AHAS( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,) for 48hrs. The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Two group treated with ACC-HAS showed increased number of CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells and natural killer(NK<sup>+</sup>) cells.

액의 실험군에서는 각각 205, 102, 133, 36으로, 10( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 각각 52, 94, 120, 51로 나타나 실험군

이 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났다<Table. 4>.

## 2)PBMC의 流細胞 分析

### (1) CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 細胞數

PBMC에서의 流細胞 분석을 통해 天門冬藥針液의 CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향을 살펴보면, 대조군에서는 비율이 12.5%로 나타났고, 100( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 天門冬藥針液의 실험군에서는 14.1%, 10( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 15.4%로 나타나 실험군이 대조군에 비해 증가함을 증가하였다<Table. 5>.

### (2) CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 細胞數

PBMC에서의 流細胞 분석을 통해 天門冬藥針液의 CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향을 살펴보면, 대조군에서는 비율이 13.5%로 나타났고, 100( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 天門冬藥針液의 실험군에서는 16%, 10( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 18.7%로 나타나 실험군이 대조군에 비해 증가하였다<Table. 5>.

### (3) NK<sup>+</sup> 細胞數

PBMC에서의 流細胞 분석을 통해 天門冬藥針液의 NK<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향을 살펴보면, 대조군에서는 비율이 3.43%로 나타났고, 100( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 天門冬藥針液의 실험군에서는 6.76%, 10( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 6.67%로 나타나 실험군이 대조군에 비해 증가하였다<Table. 5>.

## IV. 考 察

天門冬(Asparagus cochinchinensis)은 百合科(나리과, Lilaceae)에 屬한 다년생 본초인 天門冬의 槐根을 건조한 것<sup>31)~32)</sup>으로 神農本草經<sup>33)</sup>의 上品에 “天門冬 味甘平 主諸暴風濕偏痺 强骨髓 殺三蟲 去伏尸 久服輕身 益氣延年”으로 처음 수록되고, 方藥合編<sup>30)</sup>에서는 한글명으로 “호라지쫘”으로 기록되



어 있다.

天門冬의 性은 寒, 大寒, 平의 순으로 寒性이 비교적 강함을 볼 수 있고, 味는 甘, 苦味가 주로 많으며, 歸經은 주로 手太陰肺經과 足少陰腎經으로 入하고 드물게 手少陰心經으로도 入한다<sup>31)-34)</sup>.

그러므로 天門冬은 性寒, 味苦로서 清熱作用과 潤肺, 生津止渴作用을 하며, 또한 味甘하여 滋養作用과 함께 肺, 腎經으로 入하여 止咳化痰, 滋腎하게 되어 滋陰潤肺, 清熱化痰, 清金降火, 滋腎의 要藥으로 咳嗽, 燥咳, 肺痿, 吐膿, 口渴, 咯血, 陰虛內熱, 遺精, 滑精, 虛勞骨蒸 등을 치료하는 약물이다<sup>32,34)</sup>.

中脘은 “太倉, 胃脘, 上記, 中管, 胃募, 中胃, 胃中”이라고도 하며<sup>35)</sup>, 任脈에 屬하고, 足陽明胃經의 募穴이며, 八會穴 중 腑會이고, 手太陽, 少陽, 足陽明의 發生하는 곳이며, 小腸經, 三焦經, 胃經, 任脈의 總會地點임과 동시에 肺經의 發源處, 肝經의 終結點으로<sup>35)-38)</sup> 腸癰, 寒癖, 蕁麻疹, 心積 등에도 활용될 뿐만 아니라, 調理中焦, 健脾化濕, 和胃降逆, 和胃利濕, 寬中の 작용으로 胃痛, 腹部膨滿, 腹鳴, 嘔吐, 下痢, 赤痢, 消化不良, 黃疸, 胃腸虛弱을 치료하며<sup>35)-38)</sup>, 腫瘍治療穴로 응용<sup>39)</sup>되기도 하였다.

關元은 丹田, 三結交, 次門, 下紀, 上氣海, 下育, 育原, 太中極, 大中極이라고도 하며<sup>35),36)</sup>, 任脈에 屬하고, 手太陽小腸經의 募穴이며, 足三陰脈과 任脈이 回하는 곳이며, 三焦之氣의 所生處일 뿐만 아니라<sup>35)-38)</sup>, 培腎固本, 補氣回陽, 分別清濁, 保健防病, 溫調血室精宮, 調元散邪의 穴性으로 陽痿, 遺精, 子宮病, 子宮出血, 月經不調, 帶下, 小便不通, 尿急, 辜丸炎, 下腹痛, 腹痛, 胃炎, 精神疾患, 霍亂, 泄瀉, 神經衰弱 등을 치료하며<sup>35)-38)</sup>, 주로 질병에 대한 抵抗力과 免疫力을 증강시키는 것으로 인식되고 있다<sup>22),39)</sup>.

약침요법은 穴位注射療法이라고도 하며, 이것은 東西醫結合의 일종인 신침법으로 환자의 질병을 근거로 穴位의 經絡작용과 약물의 약리작용을 살핀 다

음, 상응하는 俞穴과 약물이 질병에 대해 종합적인 작용을 충분히 발휘하게 하여 질병을 치료하는 방법<sup>1)</sup>이다.

질병에 따라 선택된 약물의 藥液을 經絡학설에 의하여 有關한 穴位 혹은 壓痛點에 주입하여 침과 약물의 병합된 효과를 통하여 生體의 기능을 조정하고 병리형태를 변화시켜 鎮痛, 腫瘍誘發抑制 등의 치료효과가 있는 것으로, 약물의 흡수가 빠르고, 경구투여가 불가능한 경우에 처치할 수 있으며, 환처에 처치할 수 있는 등의 장점이 있다<sup>35),40)</sup>.

종양은 자율성을 가진 조직의 過剩 發育으로 정의되며, 세포학적으로 비정상적인 세포의 과다증식으로 인하여 實質臟器, 有腔臟器 및 骨格, 皮膚組織 등에 비정상적인 조직을 형성하는 질환이다. 이는 개체에 대하여 의의가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대하여 파괴적인 것을 말하는 것이다<sup>3)</sup>.

약침요법을 이용한 抗腫瘍 및 免疫效果에 대한 실험적 연구로 金<sup>19)</sup>은 人蔘, 林<sup>20)</sup>은 魚腥草, 車<sup>21)</sup>는 熊膽, 牛黃, 朴<sup>22)</sup>은 薏苡仁, 金<sup>23)</sup>은 金銀花, 崔<sup>24)</sup>는 苦蔘, 徐<sup>25)</sup>는 猪苓, 李<sup>26)</sup>는 瓦松藥針이 抗腫瘍에 각각 유효함을 보고하였고, 金<sup>27)-29)</sup> 등은 人蔘, 金<sup>27),29)</sup> 등은 鹿茸, 金<sup>27)</sup>은 靈芝가 각각 免疫機能에 효과가 있다고 하였으며, 이들 연구의 결과는 腫瘍治療 및 免疫增強에 유효한 방법으로 제시되고 있으나 滋陰潤燥, 清熱化痰, 鎮咳, 利尿, 通便, 殺蟲, 潤五臟의 效能을<sup>30)-34)</sup> 가진 天門冬을 이용하여 종양에 대한 실험을 한 약침 보고는 접하지 못하였다.

이에 저자는 天門冬을 藥針液으로 調製한 후 실험동물에 약침하여 腫瘍 및 免疫機能에 미치는 영향을 실험적으로 究明하고자, 和胃氣, 和濕滯, 理中焦, 調昇降, 寬中하는 中脘(CV12)<sup>35)-38)</sup>과 培腎固本, 補氣回陽, 分別清濁, 保健防病, 溫調血室精宮, 調元散邪하는 關元(CV4)<sup>35)-38)</sup>을 선택하여 抗癌實驗으로 *in vitro*에서 MMP-9과 Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보고, 抗轉移實驗으로 *in vivo*에서는

B16-F10 癌細胞株 移植 Pulmonary Colonization Assay를 관찰하였으며, 肝과 肺의 조직검사를 하였다. 免疫增進效果에 대하여서는 PBMC에서 Cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였을 뿐만 아니라, PBMC의 流細胞 분석하여 CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 세포수, CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포수, NK<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향 등을 관찰하였다.

실험 결과, B16-F10 癌株에서 Ht값은 대조군에서 IL-1β 140, TNF-α 133, NOS-II 135, MMP-9 62, β-actin 236으로 나타났고, 100(μg/ml) 天門冬藥鍼液 실험군에서는 IL-1β 15, TNF-α 71, NOS-II 11, MMP-9 31, β-actin 236이었으며, 10(μg/ml)에서는 IL-1β 77, TNF-α 58, NOS-II 51, MMP-9 38, β-actin 236으로 1(μg/ml)에서는 IL-1β 126, TNF-α 131, NOS-II 128, MMP-9 61, β-actin 236으로 나타나 天門冬藥鍼液 실험군이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났다<Table 1, Fig. 1>.

위의 실험에서 天門冬藥鍼을 시술한 실험군 모두에서 대조군에 비해 감소하였는데, 이는 天門冬이 腎經과 肺經으로 들어가서 滋腎陰, 養陰潤肺, 殺蟲의 작용을 함으로써 癌細胞株의 毒性分泌를 감소시킨 결과라고 사료되어진다.

B16-F10 癌細胞株 이식 후 14일간 天門冬藥鍼을 中脛, 關元에 실시한 C57BL/6 생쥐에 pulmonary colony assay를 실시한 결과, 실험군은 대조군보다 억제되었고, 그중에서도 中脛약침군이 關元약침군보다 더 억제되었다.

B16-F10 癌細胞株를 주입하고 肝組織 전이에 대한 조직검사 결과, 대조군에서는 4+, (20~40%) 天門冬藥鍼 실험군에서 각각 2+, (5~10%), 3+, (10~20%)로 전이가 억제되어, 中脛약침군이 關元약침군보다 억제효과가 좋았다<Table. 2>.

肺組織 전이에 대한 조직검사 결과를 살펴보면, 대조군에서는 5+, 70% 이상을 나타내었고, 天門冬

藥鍼 실험군에서 각각 2+, (5~10%), 4+, (20~40%)로 전이가 억제되어 中脛약침군이 關元약침군보다 억제효과가 좋았다<Table. 3>. 위의 결과에서 공통적으로 中脛에 시술한 天門冬藥鍼液이 關元에 시술한 것보다 전이를 억제함에 있어서 양호한 실험결과를 나타내었는데, 이는 中脛의 調理中焦, 健脾化濕하는 穴性으로 인하여 人體의 抵抗力과 免疫力을 증진시킨 결과라고 사료되어진다.

天門冬藥鍼液이 PBMC에서의 Cytokine 遺傳子發顯에 미치는 影響을 살펴보면, IL-4, IL-12, IL-18, IFN-γ에서 Ht값이 對照群은 各各 38, 32, 57, 28로 나타났으며, 100(μg/ml) 天門冬藥鍼 處理群에서는 各各 205, 102, 133, 36으로, 10(μg/ml)에서는 各各 52, 94, 120, 51로 나타나 실험군이 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났다. 다만 β-actin군에서는 天門冬藥鍼 실험군이 오히려 대조군에 비해 줄어든 것으로 나타났다<Table. 4>.

PBMC에서의 流細胞 분석에서 CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 세포수는, 대조군에서 비율이 12.5%로 나타났고, 100(μg/ml) 天門冬藥鍼 실험군에서는 14.1%, 10(μg/ml)에서는 15.4%로 나타나 天門冬藥鍼 실험군이 대조군에 비해 증가하였다<Table. 5>.

PBMC에서의 流細胞 분석을 통해 天門冬藥鍼液의 CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향을 살펴보면, 대조군에서는 비율이 13.5%로 나타났고, 100(μg/ml) 天門冬藥鍼 실험군에서는 16%, 10(μg/ml)에서는 18.7%로 나타나 天門冬藥鍼 실험군이 대조군에 비해 증가하였다<Table. 5>.

PBMC에서의 流細胞 분석을 통해 天門冬藥鍼液의 NK<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향을 살펴보면, 대조군에서는 비율이 3.43%로 나타났고, 100(μg/ml) 天門冬藥鍼 실험군에서는 6.76%, 10(μg/ml)에서는 6.67%로 나타나 실험군이 대조군에 비해 증가하였다<Table. 5>.

이상의 실험결과에서, *in vitro*, *in vivo* 실험 모두에서 天門冬藥鍼液을 시술한 실험군이 시술하지 않

은 대조군에 비해 抗癌, 抗轉移, 免疫作用에 유의한 결과를 나타내었는데, 이는 天門冬의 滋腎陰, 養陰潤肺, 殺蟲의 효능 때문이라고 사료된다. 또한 中脘에 시술한 天門冬藥鍼液이 關元에 시술한 것보다 좋은 결과를 나타내었는데, 이는 中脘의 調理中焦, 健脾化濕의 穴性이 抗癌, 抗轉移, 免疫作用에 영향을 미친 것이라 생각된다.

## V. 結 論

天門冬藥鍼이 抗癌, 抗轉移, 免疫機能에 미치는 영향을 실험적으로 究明하고자, 天門冬藥鍼液이 *in vitro*에서 MMP-9과 Cytokine의 유전자 발현에 미치는 영향과 *in vivo*에서 中脘(CV12)과 關元(CV4)에 天門冬藥鍼을 시술하고 Pulmonary Colonization Assay, 肝과 肺의 조직검사, PBMC에서 Cytokine 유전자 발현, PBMC의 流細胞를 분석하여 CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 세포수, CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포수, NK<sup>+</sup> 세포수에 대한 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MMP-9과 B16-F10 癌株의 Cytokine의 유전자는 전체 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

2. Pulmonary colony는 전체 실험군이 대조군에 비해 전이가 억제되었으며, 특히 中脘藥鍼群이 억제 효과가 좋은 것으로 나타났다.

3. 조직검사에서는 肺와 肝 모두 전체 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 전이가 억제되었으며, 특히 中脘藥鍼群의 억제효과가 좋은 것으로 나타났다.

4. PBMC에서 Cytokine 유전자 발현은 전체 실험

군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

5. PBMC의 流細胞 분석에서 CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> NK<sup>+</sup> 세포수가 전체 실험군에서 대조군보다 증가하였다.

이상에서 天門冬藥鍼液은 B16-F10 癌株에 抗癌 효과가 있는 것으로 나타났으며 中脘과 關元 중 中脘의 약침효과가 우수한 것으로 나타나 향후 他 經穴과의 비교 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

1. 大韓藥針學會 編纂. 藥針製劑와 臨床應用. 大韓針灸學會. 1997 : 1-5.
2. 김대주. 삼종의 제법에 따른 人蔘水鍼이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 경희의학. 1989 : 97-105.
3. 서울대학교 의과대학 편. 腫瘍學. 서울 : 서울대학교출판부. 1996 : 43-93.
4. 박찬열 외 7인. 發癌原因에 대한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16 : 147-1 59.
5. 張中植. 參茸湯이 S-180에 대한 抗腫瘍 효과와 Cyclophosphamide로 誘發된 白鼠의 不作用 減少에 미치는 影響. 大田大學校大學院 碩士學位論文. 1991 : 1-2, 19-21.
6. 金漢燮 外. 岩의 治法 治方 및 治療藥物에 관한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1989 : 162-164.
7. 金尙東 外. 紫苑이 抗癌作用 및 免疫反應에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1983 : 318-324.
8. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究

- 院出版部, 1985 : 211-287.
9. 北京中醫學院, 韓醫學臨床病理, 서울 : 成輔社, 1983 : 563-566.
  10. 田炳旭, 癌腫의 病因病理에 대한 文獻的 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1985 ; 1(1) : 83-101.
  11. 田炳旭, 癌에 대한 韓醫學的 認識 및 實驗的 研究에 대한 考察, 大韓韓方腫瘍學會誌, 1995 ; 1(1) : 29-54.
  12. 崔昇勳, 東醫腫瘍學, 서울 : 杏林書院, 1995 : 13-42.
  13. 錢伯文, 腫瘤의 辨證施治, 上海 : 傷害科學技術出版社, 1980 : 1-10.
  14. 李岩, 腫瘤學, 北京 : 人民衛生出版社, 1982 : 2-8.
  15. 蔡禹錫, 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察, 大韓韓醫學會誌, 1997 ; 11(2) : 1-5.
  16. 郭圭豪, 腫瘍의 化學療法과 放射線療法의 不作用에 대한 韓方藥物療法, 東醫病理學會誌, 1995 ; 9(2) : 45-88.
  17. 하지용, 八物湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 1995 ; 9(2) : 295-316.
  18. 안희덕, 四物湯의 抗癌劑 不作用 抑制에 관한 實驗的 研究, 東醫病理學會誌, 1995 ; 9(2) : 341-360.
  19. 金泰潤, 人蔘水鍼 前處置가 發癌豫防에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1988.
  20. 임사비나, 魚腥草 水鍼의 抗腫瘍에 관한 研究, 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1988.
  21. 車容碩, 熊膽, 牛黃 및 向日葵油 藥針 刺戟이 생쥐 皮膚癌의 免疫機能에 미치는 影響, 大韓針灸學會誌, 1993 ; 14(1) : 9-18.
  22. 朴祥鎔, 薏苡仁水鍼이 腫瘍에 미치는 影響, 大田大學校大學院 碩士學位論文, 1994.
  23. 金重完 外, 金銀花藥針의 抗腫瘍 作用 및 生體 臟器에 대한 影響, 大韓鍼灸學會誌, 1999 ; 16(1) : 255-267.
  24. 최원확, 苦蔘藥針이 抗腫瘍 및 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校大學院 碩士學位論文, 1998.
  25. 徐範錫, 猪苓藥針이 S-180에 대한 抗腫瘍效果와 免疫反應에 미치는 影響, 大田大學校大學院 碩士學位論文, 1995.
  26. 李貞和, 瓦松藥針의 抗癌作用 및 免疫效果에 대한 實驗的 研究, 大田大學校大學院 碩士學位論文, 1999.
  27. 金大洙, 鹿茸, 人蔘 및 靈芝水鍼이 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院 博士學位論文, 1992.
  28. 高敬錫, 人蔘水鍼이 Methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院 博士學位論文, 1988.
  29. 黃慶愛, 人蔘 및 鹿茸水鍼의 時間經過에 따른 免疫效果 研究, 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1988.
  30. 黃道淵, 方藥合編, 서울 : 南山堂, 1978 : 178-205.
  31. 北京 中醫學院中藥教育研究室編, 藥性歌括四百味白活解, 北京 : 人民衛生出版社, 1962 : 10-11.
  32. 載新民, 中國藥材學, 서울 : 啓業書局, 1974 : 693-698.
  33. 蘭 茂, 滇南本草 第2卷, 云南 : 云南人民出版社, 1977 : 21-43.
  34. 周鳳梧, 實用中藥學, 山東城 : 山東科學記述出版社, 1981 : 619-621.
  35. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室, 鍼灸學(上, 下), 서울 : 集文堂, 1991 : 214-234, 699-701, 722-723, 730-732, 1457-1467.

36. 李丁. 鍼灸經穴辭典. 서울 : 成輔社. 1989 : 196-197, 397-398.
37. 安營基. 經穴學叢書. 서울 : 成輔社. 1986 : 694-695.
38. 蔡禹錫. 經穴集成. 서울 : 大星文化社. 1995 : 392-393, 404-405.
39. 朴鍾國. 針灸治療學. 서울 : 集文堂. 1983 : 829-830.
40. 崔旼燮. 水鍼療法에 관한 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(1) : 315-316, 324-326.