

八珍益母丸이 白鼠의 排卵과 卵巢에 미치는 영향

정우석 · 강영금 · 최창민 · 김송백 · 유심근*

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

Effects of Paljinickmohwan on the Ovulation and Ovary in Rats

Woo Suk Jung, Young Keum Kang, Chang Min Choi, Song Baeg Kim, Sim Keun Yoo*

Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Paljinickmohwan(PJIMH: 八珍益母丸) is used in female infertility, especially due to deficiency of qi and blood or Qihyulyanghe(氣血兩虛). An attempt was made to evaluate the influences of PJIMH on the serum concentrations of FSH, LH, and estradiol(E2), the histological changes of ovary and the immunohistochemical staining for AT2 receptor in ovary of rats. The results of the study were as follows : Blood FSH level significantly increased in experimental group as compared with control group. In blood LH level, experimental group as compared with control group showed no efficacy. Blood E2 level significantly increased in experimental group as compared with control group. In histological observations of ovary, ovulation increased in experimental group as compared control group, which showed no efficacy. In observations of immunohistochemical staining for AT2 receptor in ovary, there is no difference between control group and experimental group. According to these results, it can be concluded that PJIMH influences ovary to increase the ovulation of rats.

Key words : Paljinickmohwan(八珍益母丸), Blood FSH level

서론

八珍益母丸은 明代 張의 《景岳全書》¹⁾에 “治氣血兩虛 脾胃 并弱 飲食少思 四肢無力 月經不調 或腰痠腹脹 或斷或續 赤白帶 下 身作寒熱 罔不獲效 服一月之後即可受胎 虛甚者 用藥一劑 必能受子”라 최초로 기재된 이래 여러 의서²⁻¹²⁾에서 氣血兩虛로 인한 月經不調, 不孕, 帶下病 등을 치료하기 위하여 임상에서 널리 應用되어 왔다. 八珍益母丸은 八珍湯에 益母草를 加하여 만든 것으로 活血祛瘀하는 益母草와 八珍湯을 결합하여 氣血을 補하여 經行을 다시 정상화하여 쉽게 임태케 함에 있다¹³⁾.

여성 불임증은 정상적인 성생활을 하면서 일년내에 임신이 안되는 경우를 말하며 불임증의 빈도는 보고자에 따라 차이가 있으나 흔히 모든 부부의 10-15% 정도로 보고되어 있으며, 특히 排卵障礙(ovulation disorder)는 불임증을 유발하는 중요한 원인으로 전체 여성불임의 30-40%(모든 불임부부의 약 15%)를 차지한다

¹⁴⁾ 排卵障礙는 지속적으로 排卵이 안되는 無排卵(anovulation)과 間歇的으로 排卵이 되는 稀少排卵(oligo-ovulation)으로 나눌 수 있으며¹⁵⁾, 이 경우에 排卵誘導劑를 사용하면 임신의 성공률을 높일 수 있다. 또한, 원인불명의 불임환자에서도 過排卵誘導를 통해 임신을 시도하고 있다

최근의 연구결과에 의하면 혈압과 電解質 調節에 關與하는 것으로 알려진 레닌-안지오텐신 體系(renin-angiotensin system, 以下 RAS)가 哺乳類의 卵巢에서도 독립적으로 존재하여 胎兒卵巢의 발달과 성장 및 卵巢의 기능에 작용하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. RAS 連續段階에 關여하는 모든 성분들이 돼지의 卵巢에서 확인되었고, prorenin 뿐 아니라 renin이 돼지의 卵胞液(follicular fluid)에 존재한다는 것이 알려졌다^{19,20)}. 그러나 RAS에서 기본이 되는 생물학적 활성물질은 안지오텐신 II(angiotensin II)로 AT1(angiotensin receptor subtype 1)과 AT2(angiotensin receptor subtype 2)의 두개의 특이적 수용체를 경유하여 그 작용을 나타낸다^{21,22)}. 또한 哺乳類의 卵巢에서도 AT1과 AT2 수용체가 독립적으로 존재하여 排卵에 關여할 것으로 생각되나 두가지 수용체의 분포와 작용에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 요즘 한의학계에서도 排卵과 關連된 실험적 연구

* 교신저자 : 유심근, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원
· E-mail : rumpie@hanmail.net, · Tel : 063-850-2113
· 접수 : 2004/08/23 · 수정 : 2004/09/14 · 채택 : 2004/10/05

가 활발히 진행되어지고 있으나 卵巢에 존재하는 RAS에 관한 연구 및 氣血兩虛로 인한 月經不調, 不孕, 帶下病 등의 치료에 사용되는 八珍益母丸에 관한 실험적 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자는 八珍益母丸이 排卵과 卵巢에 미치는 영향에 관하여 실험적으로 구명하고자 八珍益母丸을 白鼠에 경구투여하여 排卵과 관련된 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone, 이하 FSH), 황체형성호르몬(luteinizing hormone, 이하 LH), estradiol(E2)의 혈중 농도를 측정하고, 卵巢를 적출하여 조직학적 검사를 통해 卵胞의 발달을 관찰하였으며, 또한 八珍益母丸과 卵巢에 존재하는 RAS와의 연관성을 알아보고, 白鼠 卵巢에서의 AT2의 분포를 알아보고자 면역조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동남

동물은 동일한 환경에서 사육한 3주령의 Sprague-Dawley계 雌性白鼠 15마리를 한국화학연구소(Korea Research Institute of Chemical Technology)에서 구입하여 충분한 영양공급과 함께 1주일간 실험실에 적응시킨 후, 체중 160-180g이 되었을 때 실험에 이용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용된 약재들은 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 양질의 것을 정선하여 사용하였으며, 처방 구성은 장의 《景岳全書》¹⁾에 준하였다.

Table 1. Prescription of Paljinickmohwan(PJIMH)

藥物名	生藥名	重量(g)	備考
益母草	<i>Leonuri Herba</i>	8	
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4	酒洗
熟地黃	<i>Berrianniae Radix Preparat</i>	4	酒洗
人參	<i>Ginseng Radix</i>	2	
白朮	<i>Atractylodis macrocephalae Rhizoma</i>	2	土炒
茯苓	<i>Poria</i>	2	
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2	
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2	醋炒
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1	炙
Total amount:		27	

2. 방법

1) 검액의 제조

八珍益母丸 10첩 분량인 270g을 환저플라스크에 증류수 3,000ml와 함께 넣은 다음, 2시간동안 전열기로 전탕시킨 후, 여과하여 2,380ml를 얻어 3,000rpm으로 원심분리하였다. 이 때에 상침액 2,290ml를 얻어 30℃에서 감압건조기로 24시간 건조시켜 600ml의 갈색농축액을 얻었다. 이것을 원액으로 삼아 4℃ 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 실험군의 설정과 검액의 투여

백서의 월경주기가 약 3-4일인 점을 감안하여 검액의 투여 시작 3일전에 estradiol(E2) 1mg/kg을 둔부에 피하주사하여 性週

期를 일정하게 조절하고 실험에 사용하였다. 각 1군마다 5마리씩 배정하여 실험군과 대조군으로 나누었으며 실험군은 estradiol (E2) 투여 3일후부터 八珍益母丸 2ml/kg를 존대를 통하여 매일 1회(15:00) 경구투여한 군과 매일 8ml/kg의 八珍益母丸을 경구투여한 2개의 실험군으로 정하였다. 대조군은 동일한 조건하에서 八珍益母丸 대신 동량의 생리식염수를 경구투여하였다.

3) 채혈

혈액의 채취는 八珍益母丸 투여 8일째 되는 날에 백서를 ether로 마취하고 흉강과 복강을 절개한 뒤, 4ml 주사기를 이용하여 하대정맥에서 전혈을 채혈하였다. 혈액은 항응고제가 함유된 tube에 넣은 후, 실온에서 30분간 방치한 다음에 3,000rpm으로 15분간 원심분리하고 상층에 모아진 혈청을 취하여 FSH, LH, estradiol(E2)의 농도를 측정하였다.

4) 혈중 호르몬 함량의 측정

(1) FSH 함량

혈중 FSH의 함량은 double antibody 125I radioimmunoassay 법으로 측정하였다. 원심분리하여(1,000×g, 15분) 얻은 혈청 500 μl를 FSH 항체와 결합하여 37℃ 항온 수조내에서 120분간 반응시킨 후 [125I]로 표식된 FSH를 가하고 다시 4℃로 냉각한 polyethylene glycol precipitating 용액 1ml를 가하여 이를 15분간 원심분리하여서 침전물 내의 방사능을 gamma counter (COBRA 5010 II, DPC, USA)를 이용하여 측정하였다. FSH의 최소 측정치는 0.01mIU/ml였다.

(2) LH 함량

혈중 LH의 함량은 double antibody 125I radioimmunoassay 법으로 측정하였다. 원심분리하여(1,000×g, 15분) 얻은 혈청 500 μl를 LH 항체와 결합하여 37℃ 항온 수조내에서 120분간 반응시킨 후 [125I]로 표식된 LH를 가하고 다시 4℃로 냉각한 polyethylene glycol precipitating 용액 1ml를 가하여 이를 15분간 원심분리하여서 침전물 내의 방사능을 gamma counter (COBRA 5010 II, DPC, USA)를 이용하여 측정하였다. LH의 최소 측정치는 0.01mIU/ml였다.

(3) Estradiol(E2) 함량

혈중 E2의 함량은 double antibody 125I radioimmunoassay 법으로 측정하였다. 원심분리하여(1,000×g, 15분) 얻은 혈청 500 μl를 E2 항체와 결합하여 37℃ 항온 수조내에서 120분간 반응시킨 후 [125I]로 표식된 estrogen을 가하고 다시 4℃로 냉각한 polyethylene glycol precipitating 용액 1ml를 가하여 이를 15분간 원심분리하여서 침전물 내의 방사능을 gamma counter (COBRA 5010 II, DPC, USA)를 이용하여 측정하였다. E2의 최소 측정치는 0.01pg/ml였다.

5) 난소의 조직화학적 검색

八珍益母丸 투여 8일째 되는 날에 실험에 이용된 모든 백서에서 좌측 난소를 적출한 후 좌측 난소를 10% 중성포르말린 용액으로 12시간동안 고정시킨 다음, 통상적인 방법으로 파라핀 블록을 만들고 4μm 두께로 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 제작된 슬라이드는 광학현미경으로 검경하였으며 난소내의 제2차난포(secondary follicle)와 성숙난포(mature or

graafian follicle) 및 황체(corpus luteum)의 수를 세었다.

6) 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색은 파라핀 포매된 좌측 난소의 블록을 4 μ m 두께로 박절한 조직절편을 얻어 AT2 (Santa cruz Biotechnology, H-143, sc-9040)에 대한 다클론항체를 면역염색용 일차항체로 사용하였다. 전 과정을 간단히 기술하면 probe on Plus Slide (Fisher Scientific, Pittsburg, USA)에 4 μ m 두께의 조직절편을 58 $^{\circ}$ C 오븐에서 12시간 동안 부치시킨 후 Xylene과 Histiclear (National diagnostics; Manvill, NJ.)를 1:3의 비율로 혼합한 용액을 이용하여 5분씩 3차례 반복하여 탈파라핀 하였다. 실온에서 100%, 95%, 80%, 70% 알코올로 차례대로 처리하여 탈수시킨 후 증류수로 함수시켰다. 이후 조직절편을 전자렌지에서 5분간 끓인 후 상온에서 20분간 식히고 TBST(Tris-buffered Saline with 0.1% Tween-20, DAKO)로 수세하였다. 일차항체의 비특이적 염색을 감소시키기 위하여 mouse & human 혈청과 10분간 반응시킨 TBST로 수세하였다. 비오틴이 부착된 이차항체에 30분간 반응시키고 TBST로 수세하였다. Chromogen (concentrated 3-amino-9-ethylcarbazon)으로 15분간 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색한 후 crystal mount (Biomeda)로 봉입한 후 검경하였다.

7) 통계처리

실험결과와 통계처리는 ANOVA test에 의하였으며, P value가 0.05이하인 경우에 유의한 차로 판정하였다.

실험성적

1. 혈중 호르몬 농도에 미치는 영향

1) FSH 농도에 미치는 영향

혈중 FSH 농도는 대조군 모두에서 최소 측정치인 0.01mIU/ml였다. 2ml/kg의 팔진익모환을 7일 동안 투여한 실험군에서 4마리에서는 최소 측정치인 0.01 mIU/ml였고, 1마리에서 0.03mIU/ml의 FSH 혈중 농도를 보였다. 8ml/kg의 팔진익모환을 7일 동안 투여한 실험군에서, 한 마리는 최소 측정치인 0.01mIU/ml였고, 다른 실험동물에서는 각각 0.03, 0.17, 0.08 및 0.22mIU/ml였으며, 평균과 표준편차는 0.10 \pm 0.09mIU/ml였다. 대조군과 2ml/kg과 8ml/kg의 팔진익모환을 7일 동안 투여한 실험군 사이에서 혈중 FSH 농도에서는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다(P=0.025)(Table 1).

Table 1. Level of FSH in rats treated with PJIMH

Groups	Number of Animals	FSH (mIU/ml)	P value
Control	5	0.01 \pm 0	0.025
2ml/kg PJIMH	5	0.01 \pm 0	
8ml/kg PJIMH	5	0.10 \pm 0.09	

Mean \pm SD. Control: Same-treated group after pretreatment of estradiol. 2ml/kg PJIMH: 2 ml/kg of PJIMH-treated group after pretreatment of estradiol. 8ml/kg PJIMH: 8ml/kg of PJIMH-treated group after pretreatment of estradiol

2) LH 농도에 미치는 영향

혈중 LH 농도는 실험군과 대조군 모두에서 최소 측정치인 0.01mIU/ml를 보여 실험군과 대조군 사이에서 차이를 보이지

않았다.

3) Estradiol(E2) 농도에 미치는 영향

혈중 E2 농도는 대조군에서 38.82 \pm 11.60pg/ml였고 2ml/kg과 8ml/kg의 팔진익모환을 7일 동안 투여한 실험군에서는 각각 73.06 \pm 22.72pg/ml와 41.34 \pm 14.95pg/ml였으며, 대조군과 2개의 실험군 사이에서 혈중 E2 농도는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다(P=0.014)(Table 2).

Table 2. Level of E2 in rats treated with PJIMH

Groups	Number of Animals	E2 (pg/ml)	P value
Control	5	38.82 \pm 11.60	0.014
2ml/kg PJIMH	5	73.06 \pm 22.72	
8ml/kg PJIMH	5	41.34 \pm 14.95	

Mean \pm SD. Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol. 2ml/kg PJIMH: 2 ml/kg of PJIMH-treated group after pretreatment of estradiol. 8ml/kg PJIMH: 8ml/kg of PJIMH-treated group after pretreatment of estradiol

2. 난소에 미치는 영향

1) 난소의 조직조건

좌측 난소에서 제2차난포(secocondary follicle)와 성숙난포(mature or graafian follicle) 및 황체(corpus luteum)의 수를 세어 본 결과, 대조군에서는 14.8 \pm 4.92개였고 2ml/kg과 8ml/kg의 팔진익모환을 7일 동안 투여한 실험군에서는 각각 18.8 \pm 4.76개와 19.6 \pm 5.41개였다. 2개의 실험군에서 난소 난포 수는 대조군에 비해 증가된 소견을 보였으나 통계학적으로 의미있는 차이는 없었다(P=0.308)(Table 3)(Fig. 1).

Table 3. Number of secondary, graafian follicles and corpus luteum in left ovary

Groups	Number of Animals	Number of follicles	P value
Control	5	14.8 \pm 4.92	0.308
2ml/kg PJIMH	5	18.8 \pm 4.76	
8ml/kg PJIMH	5	19.6 \pm 5.41	

Mean \pm SD. Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol. 2ml/kg PJIMH: 2 ml/kg of PJIMH-treated group after pretreatment of estradiol. 8ml/kg PJIMH: 8ml/kg of PJIMH-treated group after pretreatment of estradiol

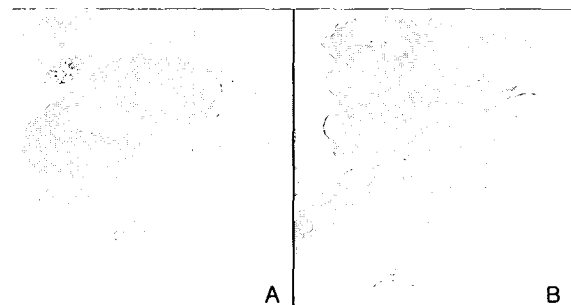


Fig. 1. More many ovarian follicles and corpus luteum are identified in the ovary of the 2ml/kg of PJIMH-treated rat for 7 days(B) than control(A).

2) 면역조직화학적 염색 소견

면역조직화학적 염색의 정도는 전혀 염색이 되지 않은 경우를 음성(-)으로 하였고, 염색의 강도에 따라 약양성(+), 중등도양성(++), 강양성(+++)으로 구분하였다. 실험군과 대조군사이에서 염색상의 차이는 없었다. 일차난포와 이차난포 및 성숙난포의 과

립세포는 AT2에 대한 중등도 또는 강양성의 반응을 보였고, 원시난포는 약양성 또는 중등도양성의 반응을 보였다. 난포액과 황체의 과립층 황체세포는 약양성의 반응을 보였다. 반면에 난소의 기질세포나 난포막 세포는 음성반응을 보였다(Table 4)(Fig. 2).

Table 4. Immunohistochemical staining for AT2 receptor in the ovary of the rat (-; negative, +; weakly positive, ++; moderately positive, +++; strong positive)

Follicle status	Ovarian structure	Staining intensity
Primordial follicle	Oocyte	+
	Follicular cell	+
Unilaminar primary follicle	Oocyte	+
	Zona pellucida	-
	Granulosa cell	++ or +++
	Theca cell	-
Multilaminar primary follicle	Oocyte	+
	Zona pellucida	-
	Granulosa cell	+++
	Theca cell	-
Secondary follicle	Oocyte	+
	Zona pellucida	-
	Granulosa cell	+++
	Theca cell	-
Graafian follicle	Oocyte	+
	Zona pellucida	-
	Granulosa cell	+++
	Theca cell	-
Corpus uteri	Granulosa uteri cell	+
Atretic follicle	Granulosa cell	+++

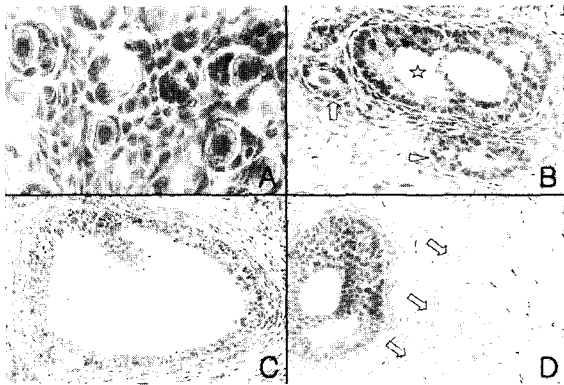


Fig. 2. A) Weakly positive reaction for AT2 in the oocyte and follicle cells of the primordial follicle. B) Strong positive reaction is recognized in the granulosa cells of the unilaminar primary follicle (arrow), multilaminar primary follicle (arrow head) and secondary follicle (star). Oocyte shows weakly positive reaction. Otherhand, theca cells show no immunoreactivity. C) Granulosa cells of the graafian follicle show strong positive reaction. D) Granulosa uteri cells of the corpus uteri (arrow) show weakly positive reaction compared to the granulosa cells of the secondary follicle (left).

고찰

불임이란 약 1년간 정상적인 부부 생활을 하였음에도 불구하고 임신이 되지 않는 상태를 말한다. 그 중에서 과거에 한번도 임신을 해본 적이 없는 상태로 계속 임신이 되지 않는 것을 원발성 불임증이라 하고, 임신경험이 있는 부부가 유산 또는 분만 후 부월경이 끝난 뒤부터 만 1년이 지나도 임신이 되지 않는 경우를 속발성 불임증이라고 한다. 서양의학에서는 불임증의 원인을 남

성인자에 의한 불임, 排卵因子, 卵管 및 骨盤因子, 子宮頸部因子, 기타인자에 속하는 자궁의 비정상, 면역학적 인자, 감염 등으로 나누고 있는데, 특히 排卵因子는 모든 불임요인들 가운데 가장 진단하기 쉬운 뿐 아니라 가장 치료가 잘 되며, 여성불임요인의 약 30-40%를 차지한다^{15,23}. 규칙적인 월경주기(30±4日)를 갖는 여성, 특히 반복적인 월경통이나 월경전증상을 갖는 여성의 95% 이상이 排卵性 주기로 볼 수 있다. 排卵이 안되거나 불규칙하게 일어나는 경우에는 월경주기에 문제가 생기므로 무월경을 포함하여 稀少月經 혹은 불규칙적인 자궁출혈 등의 양상을 보인다¹⁴. 따라서, 이와 같은 소견을 보이는 여성에서는 우선적으로 排卵이 일어나는지 여부를 검사하여야 한다. 일반적으로 排卵을 豫測할 수 있는 방법으로는 基礎體溫測定, 子宮頸管 粘液指數의 月經週期에 따른 변화, 子宮內膜 組織檢査上 分泌期의 存在有無, 臍細胞塗抹檢査에서의 核濃縮指數(karyopyknotic index), 末梢血液內의 스테로이드호르몬의 농도변화, 尿中의 estrogen치, 尿나 血中 LH surge 등이 이용되어 왔으며, 近來에는 成熟卵胞의 지수로서 혈중 E2치 등의 卵胞호르몬치와 LH같은 뇌하수체호르몬치는 過排卵 유도주기에서 호르몬치를 평가하는 경우에 여러 가지 문제점들이 있기 때문에 초음파를 통한 卵胞의 直徑과 형태학적인 변화를 관찰하고 있다^{24,25}.

역대 한의학 문헌에서의 불임에 대한 기록은 《素問·上古天眞論》²⁶에 “女子七歲 腎氣盛 齒更髮長 二七而天癸至 任脈通 太衝脈盛 月事以時下 故有子……七七 任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故有刑壞而無子”, “五臟皆衰 筋骨解墮 天癸盡矣而無子耳”와 《素問·骨空論》²⁶에 “其女子不孕……督脈生病”이라 한 것이 最初이며 以後 無子²⁷, 全不產·斷緒·斷續²⁸, 絕嗣·無嗣²⁹, 不子³⁰, 不孕³¹, 石女·五不女³² 등으로 언급되어져 왔다. 불임의 원인에 대하여서는 唐代 巢³³가 “婦人挾疾無子 皆有勞傷血氣 冷熱不調 以受風寒 客於子宮 故無子也”라고 하여 불임의 원인에 관한 연구가 체계화되기 시작하였고, 金·元代를 지나 明代에 이르는 동안 이론이 정립되어 武³⁴는 血瘀, 宮冷, 痰塞, 婢妾不孕으로, 葉³⁵은 虛弱, 臟寒, 形肥, 素弱, 相火盛, 脾胃寒, 氣鬱, 血滯, 經亂, 不孕으로, 陳³⁶은 胞胎冷, 脾胃寒, 帶脈急, 肝氣鬱, 痰氣盛, 相火盛, 腎氣衰, 任督脈病, 膀胱氣化不行, 氣血虛而不能攝으로 분류하여 세분화하였고, 최근에 夏³⁷ 등^{8,15,38-42}은 주로 변증논치에 의거하여 불임을 腎虛(腎陽虛·腎陰虛), 血虛, 肝鬱, 濕痰, 血瘀 등으로 분류하였다. 특히 腎虛, 肝鬱, 濕痰, 氣血虛弱등의 변증유형은 서양의학의 불임원인중 排卵要因, 子宮頸部要因 등과 관련성이 많은 것으로 보고 있다¹⁵.

八珍益母丸은 明代 張의 《景岳全書》¹⁾에 최초로 수재되었으며, 그 主治는 “治血氣兩虛 脾胃并弱 飲食少思 四肢無力 月經不調 或腰痠腹脹 或斷或續 赤白帶下 身作寒熱 罔不獲效 服一月之後即可受胎 虛甚者 用藥一觔 必能受子”라고 하여 氣血兩虛로 인한 月經不調, 不孕, 帶下病 등의 치료에 사용되어온 처방이다¹⁻¹³. 八珍益母丸의 약물구성의 성미와 歸經 및 효능을 살펴보면 益母草는 味苦·辛하고 性微寒하며 心·肝·膀胱經에 歸經하고 活血調經·利水退腫하며, 當歸는 味甘·辛하고 性溫하며 心·肝·脾經에 歸經하고 補血和血·調經止痛·潤燥滑腸하며, 熟地

黃은 味甘하고 性微溫하며 肝·腎經에 歸經하고 滋陰補血·益精填髓하며, 人蔘은 味甘·微苦하고 性微溫하며 脾·肺·心經에 歸經하고 大補元氣·固脫生津·安神하며, 白朮은 味苦·甘하며 性溫하고 脾·胃經에 歸經하고 補脾·益胃·燥濕·和中하며, 茯苓은 味甘·淡하며 性平하고 心·脾·肺經에 歸經하고 利水滲濕·健脾寧心하며, 川芎은 味辛하며 性溫하고 肝·膽·心包經에 歸經하고 活血行氣·祛風止痛하며, 白芍藥은 味苦·酸하며 性微寒하고 肝·脾經에 歸經하고 養血柔肝·緩中止痛하며, 甘草는 味甘하며 性平하고 心·肺·脾·胃經에 歸經하고 和中緩急·潤肺·解毒·調和諸藥한다^{43,44}. 이를 종합하여 보면, 益母草, 川芎은 活血祛瘀藥에, 當歸, 熟地黃, 白芍藥은 補血藥에, 人蔘, 白朮, 甘草는 補氣藥에, 茯苓은 利水滲濕藥에 각각 속하며 이들의 약성은 전체적으로 溫·平·微寒의 順이며, 味는 甘·苦·辛·이 많고 歸經은 대부분 脾經에 入하는 것이 많고, 다음으로 心經·肝經 등의 順으로 빈도가 높다. 효능은 주로 補益氣血·調理衝任하여 氣血兩虧로 인한 불임의 치료에 주로 활용된다^{13,43}.

八珍益母丸은 八珍湯에 益母草를 加하여 만든 것으로 人蔘, 白朮, 茯苓, 炙甘草는 補中益氣하여 氣血生化의 根源을 滋養하고, 當歸, 熟地黃, 白芍藥, 川芎은 補血養肝·調理衝任하여 血海의 根本을 充養하고, 益母草 一味를 重用함에 그 묘미가 있으니 그 뜻은 活血祛瘀하는 益母草와 八珍湯을 결합하여 氣血을 補하여 經行을 다시 正常化하여 쉽게 孕胎케 함에 있다¹³. 氣血은 인체의 생명활동 물질과 동력을 유지하는 것으로, 경락을 통하여 주신을 운행한다. 쉬지 않고 순환함으로써 기체 내의 정상적인 생리활동의 수요를 유지하고 있다. 여성은 血이 本이며, 血은 다만 氣行에 의지하고 있다. 가령 기혈이 充沛되어 서로 협조가 되면 五臟은 安和하고 經脈은 通暢한다. 衝任脈도 充盛하여 經·孕·產·乳는 정상화된다. 만약 氣血이 虛衰하면 任脈은 虛하여지고 太衝脈도 衰少하여져서 經·帶·胎·產에 이상이 생겨 諸疾이 발생한다. 그러므로 氣血의 補益은 부인과에서 상용되는 중요한 치법이다^{45,46}. 또한 血虛로 辨證되는 不妊症의 病機를 살펴보면, 기혈은 월경의 물질적 기초가 되는데 평소에 신체가 허약하거나 久病大病으로 失血傷精하거나 脾胃의 運化기능의 실조로 生化之源이 부족하면 기혈이 虧損되고 衝任이 공허하여 胞脈이 失養하게 되어 精을 맞아들일 수가 없게 되어 임신할 수 없게 된다¹⁵. 생식현상은 視床下部·腦下垂體·卵巢軸이 정교하게 작용하여 유지된다. 외부자극에 의해 중추신경계에서 신경전달물질이 분비되면 시상하부에서는 GnRH가 분비되고 視床下部·뇌하수체 門脈血을 통하여 뇌하수체 전엽으로 이동되어 성선자극호르몬 분비세포에 작용하여 FSH와 LH 등의 성선자극호르몬을 분비시키고 이들은 卵巢와 睪丸 등 性腺에 작용하여 스테로이드 생합성과 생식세포의 형성을 촉진한다. 性腺에서 생성된 호르몬은 뇌하수체와 시상하부에 陰性되먹임(Negative feedback) 기전으로 성선자극호르몬의 분비 및 합성을 조절한다. 卵胞의 형성 및 초기 발달단계에서는 성선자극호르몬이 직접적인 영향을 미치지 않으며, 卵胞의 성숙이 진행되면서 이러한 호르몬의 영향하에 들어간다²³. 뇌하수체에서 분비되는 FSH와 LH는 난소에 작용하여 주기적 변화를 유도하는 바, 난소의 난포가 FSH의 작용을 받으면 과립막세포

(granulosa)가 증식되고 난포액이 저류되며, 공동이 형성되고 난포가 성숙하여 난자가 발육하게 된다. 난포가 완숙단계에 이르면 난포에서 estrogen분비가 증가되어 배란 전일에 최고치에 이른다. 증가된 estrogen은 시상하부에 작용하여 LHRH의 분비를 일으키고 이에 따라 LH의 분비가 왕성해지므로써 배란이 유발된다^{47,49}. 따라서 이들 호르몬은 임신에 있어서 대단히 중요한 의미를 갖는다.

본 실험에서는 기혈량화로 인한 불임증에 활용되고 있는 八珍益母丸을 白鼠에 경구투여하고 排卵과 관련된 FSH, LH, E2의 혈중 농도를 측정하여 그 작용기전을 알아보고자 하였으며, 또한 좌측 卵巢를 적출한 후 조직학적 검사를 통해 이들 호르몬의 변화가 卵巢에 어떠한 영향을 미치는지 구명하고자 하였다. 白鼠를 이용한 동물실험에서 측정된 호르몬인 LH는 FSH와 함께 卵胞를 성숙시키고 estrogen의 생성과 분비를 촉진하며 황체의 형성을 자극하여 progesterone의 생성과 분비를 촉진한다. FSH는 卵胞호르몬과 함께 작용하여 FSH의 수용체를 증가시키고 卵胞의 성장을 촉진시키며, LH와 같이 estrogen의 분비를 더욱 높인다. Estradiol(E2)은 estrogen의 일종으로 卵巢에서 분비되고 LH, FSH의 자극을 받아 분비됨과 동시에 되먹임(feedback)의 기전으로 자극호르몬의 분비와 조절에 관여하고, 이는 卵巢機能 특히 卵胞發育狀態의 把握과 妊娠中の 胎盤機能 등을 반영한다^{14,23,50}.

본 실험의 혈중 FSH 농도는 대조군 모두에서 최소 측정치인 0.01mIU/ml였다. 2mℓ/kg의 八珍益母丸을 7일 동안 투여한 실험군에서는 4마리에서 최소 측정치인 0.01mIU/ml였고, 1마리에서 0.03mIU/ml의 FSH 혈중 농도를 보였다. 8mℓ/kg의 八珍益母丸을 7일 동안 투여한 실험군에서는 1마리에서 최소 측정치인 0.01mIU/ml였고, 다른 실험동물에서는 각각 0.03, 0.17, 0.08 및 0.22mIU/ml였으며, 평균과 표준편차는 0.10±0.09mIU/ml였다. 대조군과 2mℓ/kg과 8mℓ/kg의 八珍益母丸을 7일 동안 투여한 실험군 사이에서 혈중 FSH 농도에서는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다(P=0.025). 혈중 LH 농도는 실험군과 대조군 모두에서 최소 측정치인 0.01mIU/ml를 보여 실험군과 대조군 사이에서 차이를 보이지 않았다. 혈중 E2 농도는 대조군에서 38.82±11.60pg/ml였고 2mℓ/kg, 8mℓ/kg의 八珍益母丸을 7일 동안 투여한 실험군에서는 각각 73.06±22.72pg/ml와 41.34±14.95pg/ml였으며, 대조군과 2개의 실험군 사이에서 혈중 E2 농도는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다(P=0.014). 卵胞의 성장과정을 살펴보면 follicle의 성숙은 luteal phase에서 시작하여 다음 follicular stage까지 진행되며 primordial follicle에서 primary follicle, sec-ondary follicle(preantral follicle), tertiary follicle(antral follicle)을 거쳐 성숙한 graafian follicle까지 성장한다. 이 단계중에서 preantral follicle이 생성되는 시기까지는 gonadotrophin의 영향을 받지 않고 자연적으로 일어나며, 그 이후 단계에서부터 gonadotrophin의 영향을 받는다. Folliculogenesis과정과 호르몬과의 관계를 보면, 매 주기마다 FSH가 상승하면서 과립막세포의 aromatase enzyme system을 자극하여 난포들이 4mm이상 성장하며, 이 중 하나의 난포가 생리 주기 5-7일에 다른 난포들에 비해 우월하여 優性卵胞가 되며 성

장을 지속하게 된다⁵¹⁻⁵³). 다른 卵胞들은 소멸하게 되는데, 이는 성장판포에 의해 *estrogen*과 *inhibin*, 기타 여러 요인들에 의해 뇌하수체의 성선자극호르몬 분비의 역제가 오기 때문이고 이들 卵胞들은 卵巢에서 *atretic follicle*로 관찰된다^{54,55}). 優性卵胞에서는 과립세포가 분열증식하면서 E2를 분비하고 혈중 고농도의 E2는 LH surge를 유도하고 LH surge가 일어나며 28-32시간만에 배란이 일어나게 된다⁵⁶). 배란후 follicle은 *corpus luteum*으로 변하게 되고 수정이 안될 경우, 8-9일째 *involution*이 시작된다.

본 실험에서는 백서에 八珍益母丸을 경구투여한 후에 난소의 조직검사를 통해 좌측 난소에서 제2차 난포(*secocondary follicle*)와 성숙난포(*mature or graafian follicle*) 및 황체(*corpus luteum*)의 수를 세어 본 결과, 대조군에서는 14.8±4.92개였고 2 ml/kg과 8ml/kg의 八珍益母丸을 7日 동안 투여한 실험군에서는 각각 18.8±4.76개와 19.6±5.41개였다. 2개의 실험군에서 난소 난포 수는 대조군에 비해 증가된 소견을 보였으나 통계학적으로 의미있는 차이는 없었다(P=0.308).

본 연구결과에 의하면 八珍益母丸을 투여한 군이 대조군에 비해서 FSH와 E2의 혈중 농도가 통계학적으로 의미있는 증가를 보여 八珍益母丸이 백서 난소의 배란에 관여할 것으로 사료된다. 비록 실험군과 대조군 사이에서 조직학적으로 확인한 제2차난포(*secondary follicle*)와 성숙난포(*mature or graafian follicle*) 및 황체(*corpus luteum*)의 수가 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지는 않았지만 팔진익모환의 투여량을 증가시키에 따라 난포 및 황체의 수가 증가하는 경향을 보인 점은 팔진익모환이 백서의 배란에 관여할 것을 시사하는 것으로 사료되며, 향후 더 많은 수의 실험군에서 장기적으로 약물을 투여하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 반면 혈중 LH 농도에 있어서는 대조군과 실험군 모두에서 최소 측정치로 나와 八珍益母丸이 LH의 분비에 미치는 영향에 대해서는 알 수 없었다. *Renin-angiotensin system*은 혈압의 조절과 전해질 조절 등에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. *Renin*은 腎臟에서 합성되는 것으로 알려져 왔으나 최근 腎臟 이외에도 RAS가 존재하는 것으로 알려져 있다. 그 예로 동물에서는 腦, 腦下垂體, 副腎皮質, 顎下腺 및 睪丸에서 그 존재가 증명되었다. 또한 인간 난소의 RAS가 알려지기 시작한 것은 1985年 Sealey 등이 월경주기중 LH surge 때 혈중 *prorenin*이 갑자기 상승한다는 사실을 발표한 이후였다. 1986年 *Glorioso* 등은 인간 난포액 내에서 높은 농도의 *prorenin*을 검출하였다. 난소의 RAS의 작용에 대해서는 아직 알려져 있지 않으나 난자의 성숙과 성호르몬 합성에 관여할 것으로 추측된다⁵⁷). 이전의 보고들에 의하면 난소에서 AT2를 발현하는 세포들의 위치와 분포는 種間(*inter-species*)에 서로 다르고 난소의 발생단계에 따라 다르다고 알려져 있다. *Yoshimura* 등⁵⁸)에 의하면 토끼 난소에서 AT2는 주로 배란전기 난포(*preovulatory follicle*)의 과립세포에서 발현되고 난포막세포나 난소기질에서는 나타나지 않는다고 하였다. *Shuttleworth* 등⁵⁹)은 돼지의 난소에서 AT1과 AT2의 분포를 살펴본 연구에서 胎生期에서는 *primordial germ cell*과 *pregranulo-sa cell*에서 AT2의 발현이 관찰되었고, 사춘기 이전의 난소에서는 과립막세포와, 난모세포 및 투명층에서 약하

게 AT2가 발현한 반면 사춘기이후 난소에서는 과립막세포와 난포세포 모두에서 AT2의 발현을 확인할 수 없다고 하였다. 반면 *Pucell* 등⁶⁰)과 *Obermüller* 등⁶¹)에 의하면 백서의 난소에서는 전적으로 폐쇄(*atresia*)의 징후를 보이는 큰 방성여포(*antral follicle*)에서만 관찰되고, 건강해 보이는 난포에서는 AT2의 발현이 없다고 하였다. 또한 이들은 난소의 건강한 부위에서는 AT2의 발현이 없는 반면 난소의 건강한 부위에서는 AT1의 발현만이 관찰되어 백서의 배란과정에서는 AT1과 관련된 과정이 더욱 중요하다고 하였다. 그러나 본 실험의 AT2에 대한 면역조직화학적 염색의 결과는 이전의 연구와는 다르게 나타났다. 본 실험에서 원시난포에서는 AT2의 발현은 뚜렷하지는 않았으나 성장난포 단계의 모든 난포, 즉 單層版 一次卵胞, 多層版 一次卵胞, 二次卵胞 및 성숙난포의 과립막세포 모두에서 중등도 이상의 AT2 발현을 확인하였다. 또한 내난포막의 세포와 황체의 과립층 황체세포에서도 약한 정도의 AT2 발현을 보였다. 반면 난소기질과 난소 내 소혈관의 내피세포에서는 AT2의 발현을 확인할 수 없었다. RAS가 난소의 성숙 및 배란과 밀접한 관련이 있다는 많은 연구 결과에 비추어 보았을 때 AT2의 분포와 역할에 대해서 명확히 규명하는 것은 매우 중요한 것으로 생각되며 향후 추가적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

氣血兩虛로 인한 불임증에 사용되는 八珍益母丸의 효능을 알아보기 위해 八珍益母丸을 정상 백서에 경구투여한 후, 혈중 FSH, LH, *estradiol*(E2) 농도의 측정과 卵巢의 조직학적 검색 및 면역조직화학적 염색소견을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

血中 FSH 농도는 대조군에 비해 실험군에서 유의성있는 증가를 나타냈다. 혈중 LH 농도는 대조군과 실험군 모두 최소 측정치를 보여 유의성이 없었다. 혈중 E2 농도는 대조군에 비해 실험군에서 유의성있는 증가를 나타냈다. 난소의 조직소견은 대조군에 비해 실험군에서 배란이 증가한 소견을 보였으나 유의성은 없었다. 면역조직화학적 염색소견은 대조군과 실험군에서 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아, 八珍益母丸은 백서의 난소에 작용하여 배란을 향상시키는 효과가 있을 것으로 사료되며, 난소에 존재하는 RAS와 관련하여서는 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 연구됨

참고문헌

1. 張介賓, 景岳全書, p.754, 大星文化社, 서울, 1992.
2. 孫久齡, 婦科證治, p.176, 醫聖堂, 서울, 1994.
3. 郭志強, 張宗芳, 中醫臨床大系·中醫婦科治療大成, p.252, 河北

- 科學技術出版社, 河北, 1997.
4. 柯新嬌, 新編婦科秘方大全, p.212, 北京醫科大學·中國協和醫科大學聯合出版社, 北京, 1993.
 5. 鄭其國, 實用臨床月經病學, pp.107-8, 中國中醫藥出版社, 北京, 1996.
 6. 夏桂成, 中醫臨床婦科學, p.148, 人民衛生出版社, 北京, 1996.
 7. 程涇主, 實用中西醫結合不孕不育診斷學, p.674, 中國中醫藥出版社, 北京, 1999.
 8. 宋炳基, 漢方婦人科學, p.618, pp.282-6, 杏林出版, 서울, 1995.
 9. 江克明, 包明蕙, 校正方劑大辭典, p.34, 醫聖堂, 서울, 1991.
 10. 中醫大辭典編輯委員會, 中醫大辭典·方劑分冊, p.28, 人民衛生出版社, 北京, 1983.
 11. 游士勳, 張錦清, 實用中醫方劑學, pp.394-5, 樂群出版事業有限公司, 台北, 1972.
 12. 한의학대사전편찬위원회, 한의학대사전, p.1674, 도서출판 정담, 서울, 1998.
 13. 大田大學校 第12期 卒業準備委員會, 婦人科方劑學, pp.147-8, 木과 土, 서울, 2000.
 14. 구병삼, 임상부인과 내분비학, pp.265-348, 고려서적, 서울, 1997.
 15. 韓醫婦人科學 編纂委員會, 韓醫婦人科學, pp.33-44, 245-55, 도서출판 정담, 서울, 2001.
 16. Levy BI, The potential role of angiotensin II in the vasculature, *J. Hum. Hypertens*, 12, 283-7, 1998.
 17. Robertson JIS, Renin and angiotensin; a historical review, In; *The renin angiotensin system-Biochemistry, Physiology, Pathophysiology and Therapeutics*, Vol. 1(eds Robertson JIS, Nicholls MG.), London: Gower Medical Publishers, 1.1-1.18.
 18. Nielsen AH et al, Regulation of angiotensin II receptor expression in ovarian follicles; a review, *Adv. Exp. Med. Biol*, 377, 407-10, 1995.
 19. Vinson GP et al, Tissue renin-angiotensin systems and reproduction, *Human Reprod*, 12, 651-62, 1997.
 20. Hagemann A et al, Measurement and identification of prorenin and renin in ovarian follicular fluid from cattle and pig, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 19, 267-73, 1992.
 21. Chiu AT et al, Identification of angiotensin II receptor subtypes, *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 165:196-203, 1989.
 22. Timmermans PBMWM et al, Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, *Pharmacol. Rev*, 45, 205-51, 1993.
 23. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회, 부인과학(제3판), pp.64-8, 91-115, 389-91, 421-5, 648-67, 칼빈서적, 서울, 1997.
 24. Garcia JE, Jones GS, Wright GL, Prediction of the time of ovulation, *Fertil Steril*, 36, 308-15, 1981.
 25. Moghissi KS, Prediction & detection of ovulation, *Fertil Steril*, 34, 89, 1980.
 26. 楊維傑, 黃帝內經素問譯解, pp.4-6, 395-6, 臺聯國風出版社, 臺北, 1971.
 27. 王叔和, 王叔和脈經, 臺北, pp.209-10, 文光圖書有限公司, 1970.
 28. 孫思邈, 備急千金要方, pp.16-7, 大星文化社, 서울, 1984.
 29. 陳士鐸, 增補百病辨證錄, p.479, 書苑堂, 서울, 1981.
 30. 吳謙, 醫宗金鑑·婦科心法要訣, p.421, 大星文化社, 서울, 1983.
 31. 楊維傑, 黃帝內經素問語解, p.444, 樂群出版社, 臺北, 1976.
 32. 萬全, 廣嗣紀要(醫部全錄卷九), p.86-91, 人民衛生出版社, 北京, 1983.
 33. 巢元方, 巢氏諸病源候論, pp.208-9, 人民衛生出版社, 北京, 1982.
 34. 武之望, 濟陰綱目, pp.180-203, 旋風出版社, 臺北, 1972.
 35. 葉桂, 葉天士女科, pp.333-51, 大星文化社, 서울, 1984.
 36. 陳士鐸, 石室秘錄, pp.162-3, 杏林書院, 서울, 1982.
 37. 夏桂成, 不孕不育與月經週期調理, pp.161-76, 人民衛生出版社, 北京, 2000.
 38. 洪家鐵, 中西醫臨床婦科學, pp.448-57, 中國中醫藥出版社, 北京, 1996.
 39. 李淑敏, 現代中醫婦科臨床, pp.314-5, 中醫古籍出版社, 北京, 1997.
 40. 羅元愷, 實用中醫婦科學, p.13, 上海科學技術出版社, 上海, 1994.
 41. 戴德英, 楊炳初, 一百天學中醫婦科, pp.391-6, 上海科學技術出版社, 上海, 2000.
 42. 王愛芹, 曹慧娟, 實用中西醫結合婦科學, pp.1025-32, 北京出版社, 北京, 1996.
 43. 全國韓醫科大學本草學教授, 本草學, pp.302-4, 409-10, 422-3, 531-3, 536-7, 540-1, 578-83, 永林社, 서울, 1994.
 44. 辛民教, 臨床本草學, pp.166-7, 172-3, 175-7, 219, 221-4, 249-52, 355-67, 永林社, 서울, 1997.
 45. 羅元愷, 中醫婦人科學, p.104, 保健新聞社, 서울, 1997.
 46. 馬寶璋, 中醫婦科學, pp.41-3, 中國中醫藥出版社, 北京, 1995.
 47. 고건일 등, 인체생리학, pp.599-608, 探求堂, 서울, 1993.
 48. Matthew G, Colin H, Robin C, *Gynecology illustrated*(2nd edit.), Churchill Livingstone, Hong Kong, 49-64, 1978.
 49. Owens PC and Smith R, Opioid peptides in blood and cerebrospinal fluid during acute stress, *Bailliers Clin. Endocr., Metabol*, 1, 415-37, 1987.
 50. 성호경, 김기환, 생리학, p.365,396-400, 의학문화사, 서울, 1997.
 51. McNatty KP, Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans, *Clin Endocrinol Metab*, 7:577-600, 1978.
 52. Shima K, Kitayama S, Nakano R, Gonadotrophin binding sites in human ovarian follicles & corpora lutea during the menstrual cycle, *Obstet Gynecol*, 69, 800-6, 1978.
 53. Hodgen GD, The dominant ovarian follicle, *Fertil Steril*, 38, 281-6, 1982.
 54. Fritz MA, Speroff L, The endocrinology of the menstrual cycle; in the interaction of folliculogenesis & neuroendocrine mechanisms, *Fertil Steril*, 38, 509-29, 1982.
 55. McLachlan RI, Cohen NL, Vale WW, The importance of luteinizing hormone in the control of inhibin & progesterone secretion by the human corpus luteum, *J Clin Endocrinol Metab*, 68, 1078-85, 1989.

56. World Health organization Task Force, Temporal relationships between ovulation & defined changes in the concentration of plasma estradiol-17 β , luteinizing hormone, follicle stimulating hormone & progesterone, I, probit Analysis, Am J Obstet Gynecol, 138, 383-90, 1980.
57. 박원일 등, 난소의 Renin-Angiotensin System과 성호르몬 합성과의 관계, 大韓産婦人科學會誌, 37(7), 1375-80, 1994.
58. Yoshimura Y et al, Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype, Endocrinology, 137, 1204-11, 1996.
59. Shuttleworth G et al, Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor subtype 1 and 2 in the porcine fetal, prepubertal and postpubertal ovary, J. Anat, 201,267-74, 2002.
60. Pucell AG et al, Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor, Endocrinology, 128, 1947-59, 1991.
61. Obermüller N et al, Localization of the mRNA for the angiotensin II receptor subtype 2(AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by radioactive in situ hybridization, J. Histochem. Cytochem, 46, 865-70, 1998.