대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.18, NO.1 : 142 - 155 (2005)

濃度別 淫羊藿 投藥이 수컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響

慶熙大學校 韓醫科大學 婦人科學敎室
李昌勳, 曺禎焄, 張峻福, 李京燮

ABSTRACT

Dose Dependent Effects of Epimedii Herba on the Reproductive Function in the Mice

Chang Hoon Lee, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Objective: This study was undertaken to evaluate the dose dependent effects of *Epimedii Herba* extract solution on the spermatogenic abilities such as concentration, motility and morphological normality of sperm from the testis, and the activities of sperm hyaluronidase and antioxidants.

Materials and Method: We choose the 2-month-old mice, and administered the extract powder of *Epimedii Herba* in the different concentration once in a day for 60 days. The control group was administered to normal water in the same way and duration. We examined the total, motile and normal sperm from the cauda epididymis, the activities of sperm hyaluronidase, peroxidase and catalase in the isolated testis tissue. Also we observed changes of isolated testis at the before and after administration of *Epimedii Herba* extracts in the mice. And we compared to the testicular tissue especially seminiferous tubules between control and treated group by histochemical methods.

Results: The significant dose dependent differences were observed in the concentration of total sperm, the motility and normality of spermatozoa of the *Epimedii Herba* extract administered groups compared than that of control group, respectively. In the histological analysis of the testicular tissues, the enlargement of testicular lobe diameter and apparant vasculogenesis between testicular lobes were observed in the *Epimedii Herba* extract administered groups than control group, respectively. Also, the activity hyaluronidase was significantly increased in the *Epimedii Herba* extract administered groups than that of the control group. In case of antioxidant activity analysis, the activity of peroxidase and catalase were significantly increased in the *Epimedii Herba* extract administered groups than that of control group, respectively.

Conclusion: This study shows that *Epimedii Herba* can effect the count and motility of sperm, the important factor in male fertility and also promote the activity of antioxidants, catalase and peroxidase, which is the important factor in spermatogenesis.

Key Words: *Epimedii Herba*, morphology and motility of sperm, sperm hyaluronidase, testicular peroxidase, testicular catalase

교신저자(이창훈) : 서울시 강남구 대치2동 994-5 강남경희한방병원 항노화센터
전화 : 02-3457-9070 이메일 : lchgdsl@hanmail.net

Ⅰ. 緖 論

임신은 피임을 하지 않는 부부의 80-85%가 1년 안에 정상적으로 이루어지므로 불임의 발생빈도는 가임 부부의 약 15%정도로 볼 수 있다[1]. 불임 원인의 약 30%는 남성의 단독적인 요인에 의한 것이고, 약 20%는 남성과 여성이 공동 요인이므로 약 50%에서 남성 불임이 나타나고 있다[2]. 성인 남성의 경우 약 6%가 불임으로 추정되며, 정계정맥류, 정자의 이동 혹은 사정 장애 등과 같은 명확한 해부학적인 문제로 발생되기도 하지만, 약 40% 이상은 원인 불명으로 정자생산 이상으로 발생된다[1].

세계적으로 남성의 精子數는 물론 정자의 운동성이 줄어들고 있는데[3], 이는 정자의 질을 나쁘게 하는 환경적인 요인인 화학물질이나 열, 방사성물질 및 중금속에 노출되는 경우와 영양학적인 요인이 제기되어[4,5], 비타민 C나 E와 같은 항산화제와 영양제 등이 치료에 사용되고 있다[6].

남성 불임의 한의학적 원인은 腎陰陽虛, 肝氣鬱結, 脾腎陽虛, 濕熱下注, 痰濁凝滯, 氣滯血瘀 등으로 분류되는데, 그 중 腎虛, 특히 腎陽虛가 가장 중요한 원인으로 알려져 있다[7-9].

淫羊藿은 補陽藥으로 性溫 無毒하고, 味辛甘하여, 補腎壯陽, 祛風除濕하는 효능이 있어 陽萎不擧, 小便淋瀝, 半身不隨 등을 치료한다[10,11]. 藥理學的으로 淫羊藿은 남성 호르몬양 작용이 증명되었고, 미생물에 대한 작용, 鎭咳, 祛痰, 平喘作用 등이 밝혀져 있다[11]. 또한 淫羊藿의 抗酸化 成分에 대한 硏究[12,13]와, 신경계 손상에 대한 항산화 작용 연구[14], 항고혈압작용[15]과 간의 대사계에 대한 연구[16], 淫羊藿의 flavonoid 성분에 대한 연구[17,18] 및 흰쥐 精子의 운동성에 미치는 영향에 대한 연 구[19] 등이 보고되고 있으나, 濃度別 유효성에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 著者는 濃度別 淫羊藿 投藥이 수컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響을 알아보고자, 相異한 濃度의 淫羊藿 檢液을 投藥한 후 總 精子數, 活動 精子數, 正常形態 精子數, 睾丸組織의 變化, 精子尖體 活性 및 抗酸化酵素 중 testicular peroxidase와 testicular catalase의 활성을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 藥材와 動物

1) 藥材

小蘗科 (매자나무과: Berberidaceae)에 속한 다년생 초목인 Epimedium Koreanum Nakai (生藥名: Epimedii Herba)의 全草를 건조한 淫羊藿을 경희의료원 약제과에서 구입하여 사용하였다.

2) 動物

평균체중 29±2.12 g의 8주령 ICR계 생쥐를 사용하였고, 12시간 소등과 점등 및 24 ℃ 조건의 사육실에서 사육하면서 물과 사료는 충분히 공급하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

淫羊藿 600g과 3차 증류수 (Ultrapure water systems, Milli-Q, USA) 1 ℓ를 용기(Low density polyethylene)에 넣어 48시간 동안 60℃에서 진탕한 후 ultrasonic cleaners (Branson Model 5510, USA)로 60분간 물리적 자극을 가하여 용해를 촉진하였다. 추출한 시료는 여과지 (Whatman No. 5, USA)로 여과하여 1차 추출액을 얻었으며, 고상시료에는 추가적으로 3차 증류수 1 ℓ를 가해 초음파추출기로 30분간 물리적 자극을 가하고 여과지로 여과하여 2

차 추출액을 얻은 후 1차 추출액과 합하였다. 최종 추출액은 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 60 ℃ 이하 저압에서 감압 농축하였다. 농축 시료는 -60 ℃에서 48시간 저온 냉각 (Temphold, Hanil, Korea)하고 동결건조기 (CleanVac 8S, Hanil, Korea)에서 72시간 동안 동결 건조하여 최종 抽出物 11.6 g을 얻었다.

2) 檢液의 HPLC 분석

최종 抽出物의 有效成分을 확인하기 위하여 淫羊藿 抽出物 500 ㎎에 50% 에탄올 50 ㎖를 가하여 1시간 진탕 혼합하여 원심분리하고 잔사에 다시 50% 에탄올 50 ㎖를 가하여 15분간 초음파추출을 2 회 반복하고, 모든 액을 합하여 감압농축하여 얻은 乾固物에 50% 에탄올 50 ㎖를 가하여, 0.1 M H3PO4: CH3CN (72:28, v/v)을 이동상으로 Waters Spherisorb ODS1 column (40×250 ㎜)을 이용하여 254 ㎚에서 high preformace liquid chromatography (Water 996 Photodiode Array Detector)를 시행하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같았다.

3) 實驗群 設定과 檢液 投與

ICR계통 생쥐 25마리를 각 군 당 5마리씩 5군으로 무작위 배정하였다. 實驗群은 淫羊藿의 濃度에 따라 0.1 ㎎/㎖ (이하 Sample A), 1 ㎎/㎖ (이하 Sample B), 10 ㎎/㎖ (이하 Sample C), 100 ㎎/㎖ (이하 Sample D) 군으로 구분하고, 1일 1회 60일 (생쥐 정상 정자생성기간)동안 0.2 ㎖씩 경구투여하였고, 對照群은 동일한 양의 생리식염수를 동일 기간 투여하였다.

4) 精液 採取

검액 투여 종료 후 1일에 경추분리법으로 도살하고, 외과적으로 精巢上體尾部를 적출하여 해부현미경 (Nikon, Japan)하에서 미세주사침을 이용하여 精子塊를 분리하였다.

5) 總 精子數와 活動 精子數 測定

채취한 精子塊 10 ㎕를 M2 배양액에 滴下하여 CO2 배양기 (Forma, USA)에서 1시간 동안 浮游한 후, 浮游液 5 ㎕를 Makler sperm counting chamber (Sofi, Israel)에 滴下하여 200배 현미경 하에서 총 정자수와 활동 정자수를 측정하였다.

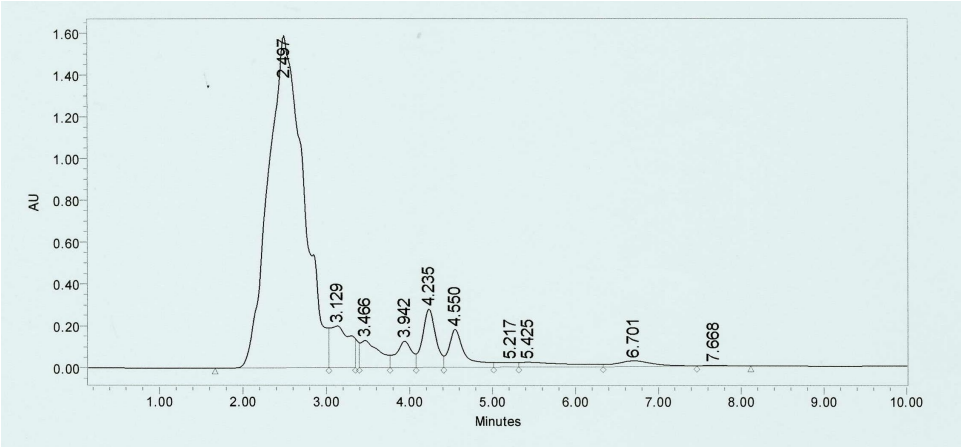


Fig. 1. HPLC result of *Epimedii Herba*

6) 精子形態 觀察

정자 浮游液 10 ㎕를 70% ethanol로 세척한 slide glass (Fisher, U.S.A)에 滴下한 후 cover slip (Fisher, U.S.A)으로 도말하고, Diff-Quick Kit (國際試藥, 日本)의 fixative로 15초간 고정, Solution Ⅰ에 10초, Solution Ⅱ에 5초간 도말 후, 공기건조시켜 200배 및 400배 현미경하에서 정자의 형태를 관찰하였다. 총 400개 정자를 관찰하여 정자의 두부, 중편부 및 미부가 정상인 정자의 수를 측정하였다.

7) 睾丸組織 觀察

도살한 생쥐의 고환을 10% formalin (Junsei, Japan)에 고정하고 水洗한 후 ethanol (Merck, USA)로 低濃度에서 高濃度 순으로 각 단계별 한 시간이 넘지 않도록 탈수를 시행하였다. 추가적으로 100% ethanol에서 1시간씩 2회 탈수 후 xylene (Junsei chemical, Japan)으로 over-night cleaning하였다. 다음날 경질 paraffin wax (Oxford, USA)에 단계별로 2시간씩 mount-ing후 회전 박절기 (Reichert-Jung Co., Germa-ny)를 이용하여 0.1 ㎜두께로 절단하였다. 탈파라핀 작업을 거친 뒤 hematoxylin-eosin (Sig-ma, USA)으로 염색하고, canada balsam (Junsei chemical, Japan)으로 봉입 후 광학 현미경 (Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

8) 精子尖體 活性 測定

정자 浮游液을 0.14 M sodium chloride 용액으로 5배 희석하여, 희석액 1 ㎖에 0.1 ㎖ acetate buffer (0.3 ㏖/ℓ, containing 0.45 ㏖/ℓ sodium chloride)와 0.1 ㎖ hyaluronic acid substrate를 첨가하여 37 ℃에서 24시간 배양하였다.

배양액에 60 ㎕ potassium tetraborate (0.8 ㏖/ℓ in water, pH 10)를 첨가하고 100 ℃ heating block (Fisher, USA)에서 5분간 반응시켰다. 이를 얼음으로 냉각시킨 후 p-dimethyl-aminobenzaldehyde 2 ㎖를 첨가하여 37 ℃ water bath에서 20분간 배양하였다.

배양 후 즉시 1500×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 582 nm spectropho-tometer (Beckman, Germany)에서 hyaluroni-dase의 optical density 값을 측정하였다.

9) 抗酸化酵素 分析

(1) Testicular peroxidase activity 分析

Cold buffer (50 mM potassium phosphate containing 1 mM EDTA, pH 7.0)에 적출 고환조직을 10 ㎎/㎖ 濃度로 넣고 homogenizer로 30초간 파쇄한 후 13,000 rpm, 4 ℃에서 15분간 원심분리 하였다.

Luminescent용 96-well white plate (Griner, USA)에 standard diluent를 넣고 sample buffer를 50 ㎕ 넣은 후 원심분리된 상층액 50 ㎕와 substrate 50 ㎕를 넣은 다음 10초간 tapping하였다. Hydrogen peroxide trigger buffer를 50 ㎕ 넣고 chemiluminescent hydro-gen peroxide detection kit (Assay Design, Inc., USA)로 chemiluminometer (Tecan, USA)를 사용하여 5초간 peroxidase activity를 측정하였으며 모든 sample은 2회씩 측정하였다.

(2) Testicular catalase activity 分析

ELISA용 96-well plate (Nunc, Denmark)에 assay buffer 100 ㎕, methanol 30 ㎕, formal-dehyde standard와 sample 20 ㎕ 및 hydro-gen peroxide 20 ㎕를 넣은 후 실온에서 20분간 shaking하였다. 이후 30 ㎕ potassium hydroxide와 chromagen 30 ㎕를 넣고 실온에서 10분간 shaking한 후, 10 ㎕의 potassium periodate를 넣고 실온에서 5분간 shaking하고 catalase assay kit (Cayman Chemical, USA)로 ELISA reader (Tecan, USA)를 사용하여 540 nm 파장에서 catalase activity를 측정하였으며 모든 sample은 2회씩 측정하였다.

10) 統計處理

통계는 SPSS 11.5를 이용하여 ANOVA test를 실시하여 통계적 유의성 ($p<0.05$)을 검증하였다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 경우 그 차이를 세부적으로 알아보기 위해 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 總 精子數, 運動 및 正常形態에 미치는 影響

總 精子數는 Sample A가 72.4±12.3×106 개/㎖, Sample B가 71.8±18.1×106 개/㎖, Sample C가 68.8±6.7×106 개/㎖, Sample D가 70.4±11.3×106 개/㎖로, 對照群의 37.0±3.5×106 개/㎖에 비하여 유의한 증가 ($p<0.01$)를 보였으나, 濃度別 차이는 나타나지 않았다.

活動 精子數는 Sample A가 64.0±11.0×106 개/㎖, Sample B가 63.4±16.1×106 개/㎖, Sample C가 61.8±7.9×106 개/㎖, Sample D가 60.4±8.4×106 개/㎖로, 對照群의 24.4±3.3×106 개/㎖에 비하여 유의한 증가 ($p<0.01$)를 보였으나, 濃度別 차이는 관찰되지 않았다.

正常形態 精子數는 Sample A가 64.8±13.8×106 개/㎖, Sample B가 63.2±16.0×106개/㎖, Sample C가 58.8±7.8×106 개/㎖, Sample D가 59.2±8.8×106 개/㎖로, 對照群의 24.8±3.7×106 개/㎖에 비하여 유의한 증가 ($p<0.01$)를 보였으나, 濃度別 차이는 관찰되지 않았다 (Table Ⅰ, Fig. 2, Fig. 3).

Table 1. Effect of ***Epimedii Herba*** Extract Solution on the Epididymal Sperm Parameters in the Mice

Groups	No. of mouse	Sperm parameters		
		Total count ($\times10^6$/㎖)	Motile sperm ($\times10^6$/㎖)	Normal sperm ($\times10^6$/㎖)
Control	5	37.0±3.5 [1)a2)]	24.4±3.3 [1)a2)]	24.8±3.7 [1)a2)]
Sample A	5	72.4±12.3 [b]	64.0±11.0 [b]	64.8±13.8 [b]
Sample B	5	78±18.1 [b]	63.4±16.1 [b]	63.2±16.0 [b]
Sample C	5	68.8±6.7 [b]	61.8±7.9 [b]	58.8±7.8 [b]
Sample D	5	70.4±11.3 [b]	60.4±8.4 [b]	59.2±8.8 [b]

1) Data are mean±standard deviation of the sperm parameters.
2) The means with same letter in column is not significantly different (Duncan's multiple range test $\alpha=0.05$).
Control: Mice administered by normal saline
Sample A: Mice administered with 0.1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample B: Mice administered with 1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample C: Mice administered with 10㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample D: Mice administered with 100㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution

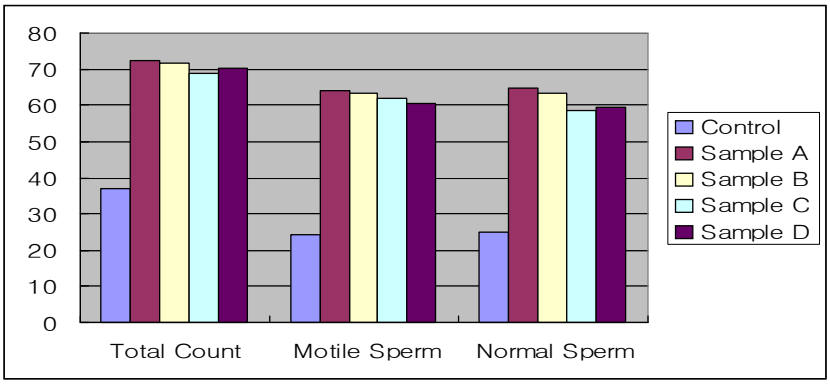
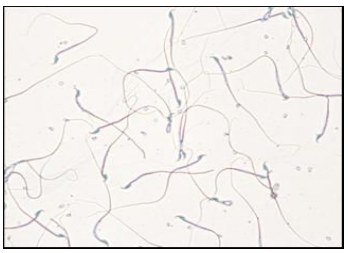
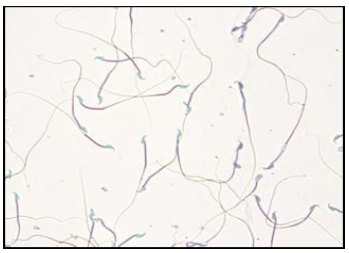


Fig. 2. Changes of the epididymal sperm parameters in the mice administered by ***Epimedii Herba*** extract solution

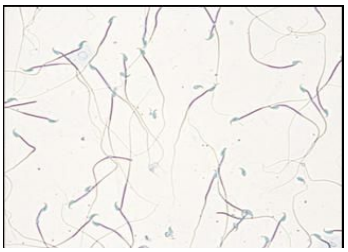
Control



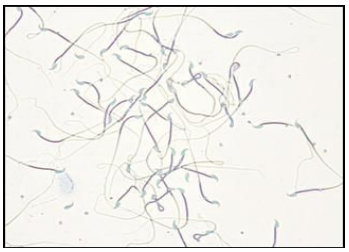
Sample A (0.1 ㎎/㎖)



Sample B (1 ㎎/㎖)



Sample C (10 ㎎/㎖)

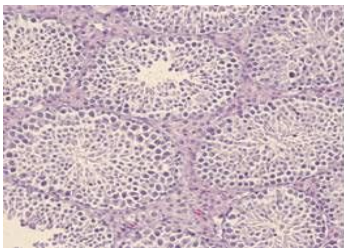


Sample D (100 ㎎/㎖)

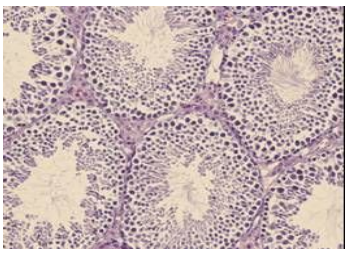
Fig. 3. Changes of the epididymal sperm morphology in the testis of mice administered by ***Epimedii Herba*** extract solution

2. 睾丸組織에 미치는 影響

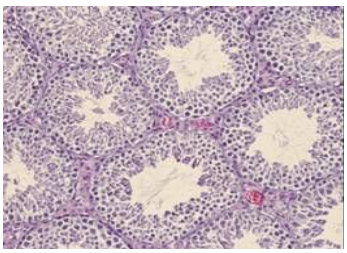
淫羊藿 投藥群의 睾丸組織을 채취하여 관찰한 결과 對照群에 비해 모든 濃度의 淫羊藿 投藥群에서 睾丸組織內 精巢葉 (testicular lobe)의 직경이 대체로 크게 관찰 되었으며 특히 精巢葉 사이의 혈관형성이 뚜렷하게 관찰 되었다 (Fig. 4, Fig. 5).



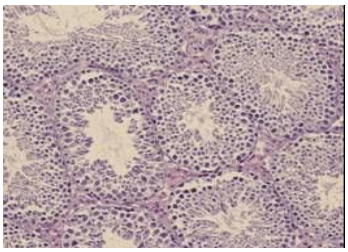
Control



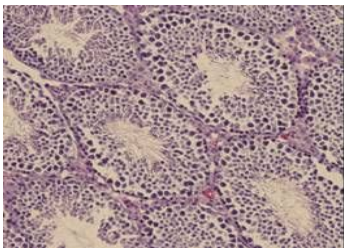
Sample A (0.1 ㎎/㎖)



Sample B (1 ㎎/㎖)

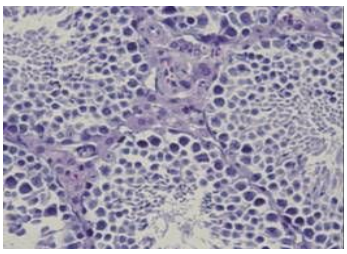


Sample C (10 ㎎/㎖)

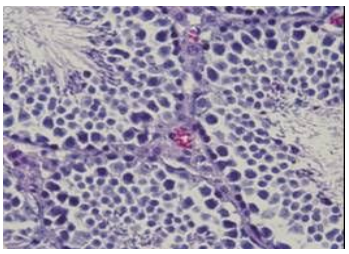


Sample D (100 ㎎/㎖)

Fig. 4. Changes of tissue in the testis of mice administered by ***Epimedii Herba*** extract solution (×200)



Sample C (10 ㎎/㎖)



Sample D (100 ㎎/㎖)

Fig. 5. Changes of tissue in the testis of mice administered by ***Epimedii Herba*** extract solution (×400)

3. 精子尖體 活性에 미치는 影響

Hyaluronidase 活性은 Sample A가 0.2603±0.0027 μmol/NAG/min/ℓ, Sample B가 0.2267±0.0028 μmol/NAG/min/ℓ, Sample C가 0.2680±0.0024 μmol/NAG/min/ℓ, Sample D가 0.2663±0.0036 μmol/NAG/min/ℓ로 對照群의 0.0400±0.0011 μmol/NAG/min/ℓ에 비하여 유의한 증가 ($p<0.01$)를 나타내었으나 濃度別 차이는 나타나지 않았다 (Table 2, Fig. 6).

Table 2. Effect of ***Epimedii Herba*** Extract Solution on the Sperm Hyaluronidase Activity in the Mice

Group	No. of mouse	Sperm hyaluronidase activity (μmol/NAG/min/ℓ)
Control	5	0.0400±0.0011 [1)a2)]
Sample A	5	0.2603±0.0027 [b]
Sample B	5	0.2267±0.0028 [b]
Sample C	5	0.2680±0.0024 [b]
Sample D	5	0.2663±0.0036 [b]

1) Data are mean±standard deviation of the sperm hyaluronidase activity.
2) The means with same letter in column is not significantly different (Duncan's multiple range test α=0.05).

Control: Mice administered by normal saline
Sample A: Mice administered with 0.1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample B: Mice administered with 1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample C: Mice administered with 10㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample D: Mice administered with 100㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution

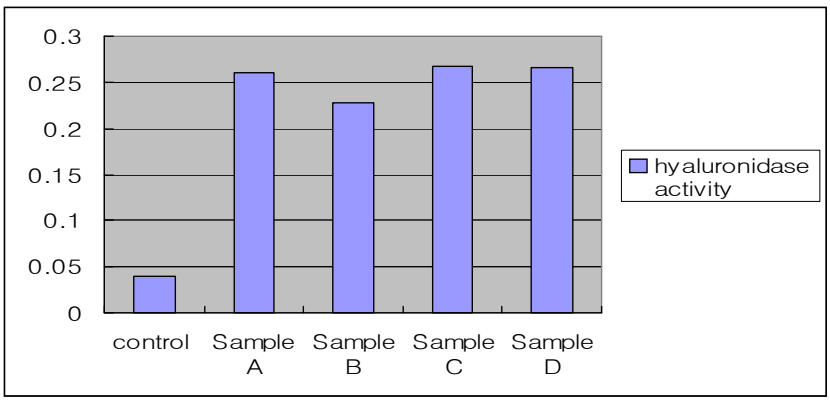


Fig. 6. Changes of the hyaluronidase activity in the mice administered by ***Epimedii Herba*** extract solution

4. 抗酸化酵素에 미치는 影響

1) Testicular peroxidase activity에 미치는 影響

Testicular peroxidase 활성도는 Sample A가 26.29±0.9789 nmol/min/㎖, Sample B가 27.48±1.2689 nmol/min/㎖, Sample C가 28.51±0.6478 nmol/min/㎖, Sample D가 26.44±0.7336 nmol/min/㎖로, 對照群의 15.39±1.3951 nmol/min/㎖에 비하여 각각 유의한 증가 ($p<0.01$)를 나타내었고, Sample C가 다른 實驗群에 비하여 유의한 차이를 나타내었다 (Table 3).

2) Testicular catalase activity에 미치는 影響

Testicular catalase 활성도는 Sample A가 0.4322±0.0689 nmol/min/㎖, Sample B가 0.3321±0.0354 nmol/min/㎖Sample, C가 0.5576±0.0466 nmol/min/㎖, Sample D가 0.4582±0.0175 nmol/min/㎖로, 對照群의 0.3100±0.0983 nmol/min/㎖에 비하여 각각 유의한 증가 ($p<0.01$)를 나타내었고, Sample C가 다른 實驗群에 비해 유의한 차이를 나타내었다 (Table 4).

Table 3. Effect of ***Epimedii Herba*** Extract Solution on the Testicular Peroxidase Activity in the Testis of the Mice

Group	No. of mouse	Testicular peroxidase activity (nmol/min/㎖)
Control	5	15.39±1.3951 [1)a2)]
Sample A	5	26.29±0.9789 [b]
Sample B	5	27.48±1.2689 [b]
Sample C	5	28.51±0.6478 [c]
Sample D	5	26.44±0.7336 [bc]

1) Data are mean±standard deviation of the testicular peroxidase activity.
2) The means with same letter in column is not significantly different (Duncan's multiple range test α=0.05).

Control: Mice administered by normal saline
Sample A: Mice administered with 0.1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample B: Mice administered with 1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample C: Mice administered with 10㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample D: Mice administered with 100㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution

Table 4. Effect of ***Epimedii Herba*** Extract Solution on the Testicular Catalase Activity in the Testis of the Mice

Group	No. of mouse	Testicular catalase activity (nmol/min/㎖)
Control	5	0.3100±0.0983 [1)a2)]
Sample A	5	0.4322±0.0689 [bc]
Sample B	5	0.3321±0.0354 [ab]
Sample C	5	0.5576±0.0466 [d]
Sample D	5	0.4582±0.0175 [cd]

1) Data are mean±standard deviation of the testicular catalase activity.
2) The means with same letter in column is not significantly different (Duncan's multiple range test α=0.05).

Control: Mice administered by normal saline
Sample A: Mice administered with 0.1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample B: Mice administered with 1 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample C: Mice administered with 10 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution
Sample D Mice administered with 100 ㎎/㎖ ***Epimedii Herba*** extract solution

Ⅳ. 考 察

불임은 1년 동안의 정상적인 부부관계 후에도 임신이 되지 않는 것[1]으로, 불임을 야기하는 의학적인 장애요인은 난소요인, 경관요인, 자궁내막요인, 난관요인, 복강요인 등 여성 단독 요인, 30% 정도는 남성 단독적인 요인, 20%는 남성과 여성이 공동 요인이므로 약 50%에서 남성원인에 의한 불임이 나타나고 있다[2].

남성불임을 일으키는 원인은 정계정맥류 혹은 정관의 폐색, 혹은 사정 장애와 같은 명확한 해부학적인 원인이 있지만, 약 40%이상이 원인이 밝혀지지 않은 불충분한 정자의 생성 및 정자의 활동성 감소에 의한 것이다[1]. 기타 요인으로는 영양 대사장애, 만성소모성질환, 부부의 혈액형 부적합, 항정자 면역이상, 심인성 등이 있다[20].

세계적으로 남성의 정자수가 줄어들고 있으며 정자 수 뿐 아니라 운동성이 생물학적으로 줄어들고 있어[3], 최근 남성 불임환자가 증가하는 것으로 조사되고 있다. Carlsen[21] 등은 1938년부터 1991년까지 정자의 밀도와 정액의 양에 대한 61개의 연구 논문을 분석한 결과 정자의 밀도가 1940년에서 113×106/㎖, 1990년에서 66×106/㎖로 감소되었고, 정액의 양은 평균 3.40 ㎖에서 2.75㎖로 감소했다고 보고하였다. 그 원인은 심리적 요인, 주변 환경으로부터 내분비 교란 물질에 대한 노출 등 매우 다양한 원인으로 여러 호르몬 체계의 영향으로 인한 남성 생식계 질환의 발병율 상승[6]과 전립선염 등으로 인한 생식기계의 감염과 염증반응, 염색체 이상 등[22-24]과 활성산소에 의한 원인을 제시하고 있다[25].

남성불임증에 대한 치료는 불임의 원인이 대부분 알 수 없는 정자의 생성 및 활동의 저

하로 인한 경우가 많기 때문에 적정한 치료법이 없어 큰 효과를 거두지 못하고 있으며[1] 그로 인해 아연, 셀레늄, 알기닌, 비타민 B12, 비타민 C, 비타민 E 등을 이용하여 남성불임을 치료하려는 대체요법이 보고 되고 있다[6]. 또한 선천성 고환결손, 정자 생성관의 손상으로 인한 남성불임증은 적절한 치료방법이 없어 보조생식술이 이용되고 있다[20].

黃帝內經c에서는 나이가 들면서 五臟衰하고 天癸가 渴하는 등 생리적인 변화에 의한 無子를 언급하였고, 대부분의 역대의가[27-30]들은 남성불임의 원인을 虛勞로 보아 남성불임의 치료는 益腎生精의 原則을 밝혔으나 무엇보다도 偏倚된 바를 補正해 주는 것이 治法의 大意라고 보고, 養精하기 위한 생활규범으로 寡慾, 淸心을 언급하여 攝生의 중요성을 강조하였다[7].

남성불임의 病因은 腎陽虛, 腎陰虛, 肝鬱氣滯, 痰濕內蘊, 氣血陽虛, 氣滯血鬱, 脾腎陽虛 등으로 구분되고, 病因에 따라 滋陰補腎, 疏肝解鬱, 燥濕化痰, 活血化瘀 등의 治法을 사용하는데, 그 중 腎陽虛가 차지하는 비중이 가장 높다. 治療는 枸杞子, 杜冲, 巴戟, 附子, 蛇床子, 肉桂, 覆盆子, 兎絲子, 五味子, 車前子, 山藥, 淫羊藿, 當歸, 鹿角 등 溫補腎陽 하는 약물을 위주로 하였다[7-9].

남성생식능력에 대한 연구로는 침치료가 정자의 수와 정자의 운동성을 높였다는 보고[6,31] 少府逐瘀湯이 남성 정자의 운동성과 항산화 효소를 증가 시킨다는 보고[32] 人蔘, 黃芪, 淫羊藿의 효과에 대한 연구가 보고[6,19,33,34,35] 되었다. 淫羊藿이 흰쥐 精子의 운동성에 미치는 영향에 대한 연구[19]는 보고되었으나, 濃度別 유효성에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 著者는 濃度別 淫羊藿 投藥이 수컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 영향을 알아보고자, 相異한 濃度의 淫羊藿 檢液을 投藥한 후 總 精子數, 活動 精子數, 正常形態 精子數, 睾丸組織의 變化, 精子尖體 활성 및 抗酸化酵素 중 testicular peroxidase와 testicular catalase의 활성을 관찰하였다.

남성 불임환자는 정액검사를 통하여 정액의 상태로 生殖能力을 판단한다[5]. 정액검사에서 정상정액의 진단기준은 1 ㎖당 2천만 이상의 精子數, 정액의 양은 2.5 ㎖이상의 부피를 가져야 하고, 채취 4시간이내 운동성이 60%이상을 유지하여야 하고, 비정상정자를 25%이하를 유지하여야 한다[20]. 정자의 운동성에 대하여 caffein과 theophylline[36], nitric oxide와 peroxynite[37], tumor necrosis factor-alpha[38] 등이 영향을 미친다고 보고 되었다. 박 등[39]은 정자 濃度가 낮을수록 정자의 운동성도 낮은 경향을 보인다고 하였으며, Dahlberg[40]는 정자의 운동성이 남성의 생식능력과 정자의 생존시간과 상관관계가 있다고 보고 하였다.

淫羊藿 投藥이 總 精子數, 運動 및 正常形態에 미치는 영향을 살펴본 결과 對照群에 비해 상이한 濃度의 淫羊藿 檢液群 모두 유의하게 증가되었으나 濃度에 따른 변화는 나타나지 않았다. 이 결과 淫羊藿 檢液의 投與는 수컷생쥐 고환의 정자생산능력을 향상시키는 것으로 판단되나, 濃度에 따른 변화는 관찰되지 않았다.

淫羊藿 投藥群의 睾丸組織 절편을 HE 염색하여 해부 현미경 하에서 관찰한 결과 상이한 농도의 淫羊藿 投藥群 모두 對照群에 비해 睾丸組織內 精巢葉의 직경이 대체로 크게 관찰 되었으며 특히 精巢葉 사이의 혈관형성이 뚜렷하게 관찰 되었다. 이는 淫羊藿 檢液의 濃度에 관계없이 고환조직의 성숙과 발달이 촉진되었으며 혈관형성의 촉진으로 인해 고환 내 정자형성이 촉진되었음을 밝혀주는 결과라 하겠다.

精子頭部의 주요 enzyme의 하나인 hyaluronidase activity를 측정하여 精子尖體 活性을 알아본 결과 淫羊藿 投藥群이 對照群에

비하여 유의한 증가를 나타내었으나 濃度別 차이는 나타나지 않았다. Yang 등[32]은 少府逐瘀湯을 이용하여 정자의 acrocin activity를 측정한 결과 유의한 증가를 나타냈다고 보고 하였다.

적당량의 항산화 효소는 활성산소 작용을 억제하여 적당한 활성 산소가 항균작용과 면역체계 조절 세포성장의 조절등 각종 생체현상에 유익한 역할을 담당한다[41]. 그러나 활성산소가 과도하게 증가되면 정상적인 조직에 유해한 영향을 미치게 된다[42,43]. 활성산소와 불임의 관계에 대한 연구로 Iwasaki 등[44]은 약 40%의 불임환자의 정액에서 활성산소가 발견된 데 비해 무정자증이나 가임력이 있는 사람의 정액에서는 활성산소를 발견 할 수 없었다고 보고했고, 또 정액의 활성산소는 백혈구 또는 정자에 의해 발생하며 특히 정자는 생리적 조건에서 정상운동성을 지닐 때는 활성산소를 생성하지 않으나 형태학적 이상이 있거나 잔여세포질이 있는 기형정자는 활성산소의 생성이 일어난다는 보고가 있다[45].

이러한 손상으로부터 정자를 보호하기 위해서는 항산화작용이 필요하게 되는데 인체는 superoxide dismutase나 catalase, glutathione peroxidase와 같은 몸 안의 抗酸化酵素의 힘에 의지하게 된다. GPX/GRD enzymes들은 정자의 산화에 의한 손상을 대비하는 역할을 하게 된다[42,43].

淫羊藿 投藥이 抗酸化酵素에 미치는 影響을 살펴본 결과 testicular catalase 활성도는 淫羊藿 投藥群이 對照群에 비하여 유의하게 증가 하였고, Sample C가 다른 實驗群에 비하여 유의한 차이를 나타내었다. testicular peroxidase 활성도는 淫羊藿 投藥群이 對照群에 비하여 유의하게 증가 하였고, Sample C가 다른 實驗群에 비하여 유의한 차이를 나타내었다. Yang 등[32]은 少府逐瘀湯이 고환조직내의 항산화 효소의 생성을 촉진하여 정자의 생성을 촉진하며 정자의 기능을 높여 정자의 질을 높이고 운동성을 증진시킨다고 보고하였다.

이상의 結果를 綜合해보면 相異한 濃度의 淫羊藿을 投藥한 수컷 생쥐의 생식능력은 總精子數의 增加, 活動力 增加, 기형율의 저하를 보여주고, 고환 조직내 정자형성 및 혈관형성등의 결과를 미루어 볼 때 고환 내 정자 생산 능력을 향상시키고, 精子尖體反應을 활성화시키며 고환조직의 抗酸化酵素인 catalase activity와 peroxidase activity를 증가시킴으로 정자의 기능을 활성화시키는 것으로 판단되나, 농도에 따른 변화는 항산화효소의 활성에만 유의한 차이가 관찰되었다.

향후 淫羊藿을 남성불임의 임상에서 활용하기 위해서는 淫羊藿의 適正 投與 濃度에 관한 연구와 임상연구 및 유효성분 분석에 관한 연구가 필요할 것으로 사려된다.

Ⅴ. 結 論

濃度別 淫羊藿 投藥이 수컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響을 알아보고자, 相異한 濃度의 淫羊藿 檢液을 投藥한 후 總 精子數, 活動 精子數, 正常 形態 精子數, 睾丸組織의 變化, 精子尖體 活性 및 抗酸化酵素 중 testicular peroxidase와 testicular catalase의 활성을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 淫羊藿 投藥群은 總 精子數, 活動 精子數 및 正常形態의 精子에 대하여 對照群에 비하여 유의하게 증가되었다.
2. 淫羊藿 投藥群은 睾丸組織內 精巢葉의 直徑이 증가하였으며, 특히 血管形成이 뚜렷하게 관찰되었다.
3. 淫羊藿 投藥群은 sperm hyaluronidase activity에 대하여 對照群에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

4. 淫羊藿 投藥群은 睾丸組織의 peroxidase activity와 catalase activity에 대하여 對照群에 비하여 각각 유의한 증가를 나타내었고, 그 중 10 ㎎/㎖ 投藥群의 활성도가 다른 投藥群에 비하여 유의한 차이를 나타내었다.

□ 투 고 일 : 2005년 01월 20일
□ 심 사 일 : 2005년 01월 28일
□ 심사완료일 : 2005년 02월 03일

參考文獻

1. 김동선, 조재흥, 최황 외. 비뇨기과학(3판). 서울: 고려의학 2001;507-522
2. 구병삼. 임상 부인과 내분비학. 서울: 고려의학 2001;461-476
3. Jouannet P, Kold-Jensen T, Auger J et al. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. APMIS. 2001;109:333-344
4. Thonneau P, Multigner L, Mieusset R et al. Occupational heat exposure and male fertility: a review. Hum Reprod. 1998;13:2122-2125
5. Jarow JP, Overstreet JW, Sadovsky R et al. Best practice policies for male infertility. J Urology. 2002;167:2138-2144
6. Sinclair S. Male infertility: nutritional and environmental consideration. Altern Med Rev. 2000;5(1):28-38
7. 朴民豪, 曺東鉉, 杜鎬京 외 男性不育에 關한 文獻的 考察. 慶熙韓醫大論文集. 1995;18(2):81-92
8. 金吉燮, 徐雲敎, 鄭智天. 男性不妊症의 治療에 대한 文獻的 考察. 韓醫學硏究所論文集. 1994;3:151-162
9. 洪律惠, 姜允皓. 男性不妊症 治療에 관한 考察. 韓醫學硏究所論文集. 1994;3:397-403
10. 康秉秀, 李棣熙, 朱榮丞 외. 本草學. 서울: 永林社 1994;553-554
11. 김창민, 이경순, 안덕균 외 譯. 中藥大辭典. 서울: 도서출판 정담 1998;4400-4406
12. 김성렬, 김진환, 김승겸. 음양곽 추출물 중의 항산화성분의 분리 및 성질. Korean J Food Sci Technol. 1992;24(6):535-540
13. 이종원, 도재호, 이성계. 음양곽의 항산화 활성. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2000;29(4):732-736
14. 朴承澤, 田炳熏, 朴炳林. 배양 희소돌기아교세포에 있어서 산소자유기의 神經毒性에 대한 淫羊藿의 效果. 대한동의병리학회지. 1997;11(2):58-62
15. 최형일, 안덕균, 김호철 외. 淫羊藿의 항고혈압작용에 관한 연구. 大韓本草學會誌. 1997;12(1):35-44
16. 이영구, 이동욱, 임홍빈 외. 음양곽의 추출물이 노화에 따른 흰쥐 간의 이물질대사 효소계에 미치는 영향. Korean J Med Crop Sci. 2002;10(1):29-36
17. 강삼식, 정순간, 조의환 외. 음양곽의 flavonoid 성분에 관한 연구. 생약학회지. 1988;19(2):93-96
18. Kim JH, Lee SW, Woo WH et al. Effects of aqueous extract of Epidemii Herba on the induction of oral tolerance in mice. Biol Pharm Bull. 2002;25(8):1000-1005
19. 金承賢, 張俊福, 李京燮 외. 淫羊藿이 흰쥐 정자의 운동성에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌 2004;17(2):52-63
20. 최유덕. 새임상 부인과학(2판). 서울: 고려의학 2001;157-186
21. Carlsen E, Keiding N, Skakkebaek NE et al. Evidence for decreaseng quality of semen during past 50 years. BMJ. 1992;305:609-613
22. 이혁준, 박남철. 남성불임증에서 염색체 이상의 분석. 대한비뇨기과학회지. 1998;39(4):396-402
23. Iammarrone E, Gillott C, Grudzinskas JG et al. Male infertility. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2003;17(2):211-229
24. 이경호, 이정민, 이건수. 남성불임의 유전적 요인 및 불임연구자 연구 현황. 대한내분비학회지. 2001;16(6):550-561

25. 백재승. 남성불임과 활성산소. 대한남성과학회지. 2003;21(1):1-11
26. 洪元植 校合. 精校 黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究員出版部. 1981;11
27. 張介賓. 景岳全書 婦人規. 서울: 법인문화사 1999;222-250
28. 孫思邈. 備急千金要方. 北京: 人民衛生出版社. 1982;16-17
29. 陣言. 三因極一病證方論. 서울: 一中社. 1992;234
30. 陣自明. 婦人大全良方 北京: 人民衛生出版社. 1985;286-297
31. Siterman S, Lederman H, Bartoov B et al. Does acupuncture treatment affect sperm density in males with very low sperm count? A pilot study. Andrologia. 2000;32:31-39
32. Yang CC, Chen YS, Chung JG et al. Effects of Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang on motility of human sperm. Am J Chin Med. 2003;31(4):573-579
33. 김영찬, 성도환, 최형기 외. 남성 갱년기 성기능 장애에서 홍삼이 성기능과 혈중 지질농도에 미치는 효과. Korean J Ginseng Sci. 1996;20(2):125-132
34. Kang JK, Kim YB, Nam SY et al. Ginseng intestinal metabolite- I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. Reprod Toxicol. 2002;16(3):291-298
35. 임종설, 강윤석, 서준규. 사포닌 분획이 흰쥐의 음경발기에 미치는 효과. 대한비뇨기과학회지. 2000;41(12):1445-1450
36. 김태철, 계명찬, 김문규 외. 생쥐 정자의 운동성에 미치는 Theophylline과 Caffeine의 영향에 관한 연구. J Natural Sciences. 1993;12:287-293
37. 정헌영, 서기석, 임정식. 정자 운동성에 대한 Nitric Oxide와 Peroxynitrite의 효과. 대한비뇨기과학회지. 1998;39(9):896-902
38. 송은섭, 임영구, 송윤섭. Tumor necrosis factor-Alpha가 정자운동성에 미치는 직접 영향의 부족. 대한불임학회잡지. 1999;26(1):97-101
39. 박남철, 정문기, 윤종병 외. 남성불임: 최근 10년간의 임상통계학적 분석. 대한비뇨기과학회지. 1996;37(8):939-946
40. Dahlberg B. Sperm motility in fertile men and males in infertile units: in vitro test. Arch Androl. 1988;20:31-34
41. Zini A, Phang D, Jarvi K et al. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. Urol Res. 2002;30(5):321-323
42. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 1997;3(3):203-213
43. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and avnormal sperm function. Front Biosci. 1996;1(1):78-86
44. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile paients. Fertil Steril. 1992;57(2):409-416
45. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. 2003;79(4):829-843