

歸腎丸이 白鼠의 排卵과 卵巢에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
안규환, 이승준, 최창민, 유심근

ABSTRACT

Effects of *Guisinhwan* on the Ovulation and Ovary in Rats

Kyu-Hwan Ahn, Seung-Jun Lee, Chang-Min Choi, Sim-Keun Yoo

Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
College of Oriental Medicine, Wonkwang university

Purpose : This study is to examine what are the effects of the *Guisinhwan*(*GSH*) on the ovulation and ovary in rats.

Methods : 4weeks Female Sprague-Dawley 12 rats of weighting 160-180g, were divided into three groups including the *GSH* oral administration(4ml/kg) groups(4heads) and *GSH* oral administration(8ml/kg) groups(4heads). Then we observed changes in the serum concentrations of FSH, LH, and estradiol(E_2) and the histological changes of ovary and the immunohistochemical staining for progesterone receptor in ovary of rats.

Results :

1. *GSH* didn't make a difference as compared with control group in serum FSH level.
2. *GSH* didn't make a difference as compared with control group in serum LH level.
3. *GSH* significantly increased serum E_2 level.
4. *GSH* significantly increased ovulation in histological observations of ovary.
5. *GSH* tended to decrease immunohistochemical staining score (ISS) of atretic follicles in immunohistochemical staining for progesterone receptor in ovary.

Conclusion : *GSH* influences ovary to increase the ovulation of rats.

Key words : *Guisinhwan*(*GSH*), estradiol(E_2), ovary, ovulation.

I. 緒 論

歸腎丸은 明代 張¹⁾의 《景岳全書》에 “治腎水眞陰不足 精衰血少 腰痠脚軟 形容憔悴 遺泄陽衰等證”이라고 最初로 記載된 이래 腎虛로 因한 月經不調, 不妊症, 産後腰痛 등을 治療하기 위하여 應用되어 왔다²⁻¹¹⁾.

腎虛는 옛날부터 不妊의 가장 主된 原因으로 認識되어 왔다. 不妊治療를 위한 辨證에서 여러 學者들이 腎虛型을 제일 먼저 分類하고 있으며, 腎虛, 腎陽虛寒, 腎虛宮寒으로 辨證하였고 學者에 따라 腎陽虛와 腎陰虛를 나누기도 하였으며, 深¹²⁾이 《聖濟總錄》에서 “女子所以無子由衝任不足 腎氣虛寒故也”라고 한 말을 引用하여 腎氣가 虛弱하면 精血不足하고 衝任脈虛, 胞脈失養하여 妊娠하기 어렵다고 하였으며, 錢¹³⁾은 先天不足하여 腎氣가 不充하므로 衝·任脈이 虛해서 宮寒不孕이 된다고 하였는데, 腎虛型 不妊의 診斷根據가 되는 症狀이 經行後期, 月經稀發이나 閉經, 經行量少, 色淡質稀로 나타난 것으로 보아서도 腎虛型 不妊이라 함은 대개가 腎氣虛, 腎陽虛寒한 경우를 가리키는 것으로 생각된다¹⁴⁾.

Progesterone은 女性 生殖器 組織의 機能과 成長 및 分化뿐만 아니라 排卵¹⁵⁻¹⁷⁾과 黃體化^{18,19)}에서도 重要한 役割을 遂行하는 것으로 알려져 있다. 最近의 研究結果에 의하면 progesterone 受容體가 缺乏된 생쥐(progesterone receptor null mice)는 多樣한 外部의 호르몬 刺戟에도 不拘하고 排卵을 하지 않아 progesterone이 卵巢의 排卵過程에서 매우 重要한 役割을 하고 있음을 보여 주었다²⁰⁾.

最近 韓醫學界에서도 排卵과 關聯된

實驗的 研究가 활발히 進行되어지고 있으나 卵巢에 存在하는 progesterone 受容體(progesterone receptor, 以下 PR)에 관한 研究는 없으며, 歸腎丸에 관한 實驗的 研究도 金²¹⁾의 研究 외에 報告된 바 없다.

이에 本 著者는 歸腎丸이 排卵과 卵巢에 미치는 影響에 關하여 實驗的으로 究明하고자 歸腎丸을 白鼠에 經口投與하여 排卵과 關聯된 卵胞刺戟호르몬(follicle stimulating hormone, 以下 FSH), 黃體形成호르몬(luteinizing hormone, 以下 LH), estradiol(E₂)의 血中 濃度를 測定하고, 卵巢를 摘出하여 組織學的 檢索을 통해 卵胞의 發達을 觀察하였으며, 또한 卵巢에서의 PR의 組織學的 發現部位를 알아보고, 歸腎丸과 卵巢에서의 PR과의 聯關性을 알아보고자 免疫組織化學的 染色을 施行하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

動物은 同一한 環境에서 飼育한 4週齡의 Sprague-Dawley系 雌性白鼠 12마리를 韓國化學研究所(Korea Research Institute of Chemical Technology)에서 購入하여 充分한 營養供給과 함께 1週日間 實驗室에 適應시킨 후, 體重 160-180g이 되었을 때 實驗에 利用하였다.

2) 藥物

本 實驗에 使用된 藥材들은 圓光大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院에서 購入하여 良質의 것을 精選하여 使用하였으며, 處方構成은 張¹⁾의 《景岳全書》에 準하였다.

Prescription of *Guisinhwan*(GSH)

藥物名	生藥名	重量 (g)	備考
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	16	
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8	
山茱萸	Corni Fructus	8	肉
茯苓	Poria	8	
枸杞子	Lycii Fructus	8	
杜沖	Eucommiae Cortex	8	鹽水炒
菟絲子	Cuscutae Semen	8	製
當歸	Angelicae sinensis Radix	6	
Total amount		70	

2. 方法

1) 檢液의 製造

歸腎丸 10貼 分量인 700g을 환저플라스크에 蒸溜水 5,000ml와 함께 넣은 다음, 2時間동안 電熱器로 煎湯시킨 후, 濾過하여 4,300ml를 얻어 3,000rpm으로 10分間 遠心分離하였다. 이 때에 上澄液 4,250ml를 얻어 30℃에서 減壓乾燥器로 24時間 乾燥시켜 600ml의 褐色濃縮液을 얻었다. 이것을 原液으로 삼아 4℃ 冷藏庫에 保管하여 實驗에 使用하였다.

2) 實驗群의 設定과 檢液의 投與

白鼠의 月經週期가 約 3-4日인 點을 勘案하여 檢液의 投與 始作 3日전에 estradiol(E₂) 1mg/kg을 臀部에 皮下注射하여 性週期를 一定하게 調節하고 實驗에 使用하였다.

各 1群마다 4마리씩 配定하여 實驗群과 對照群으로 나누었으며 實驗群은 estradiol(E₂) 投與 3日後부터 14日 동안 歸腎丸 4ml/kg를 每日 1回(10:00) 經口投與한 群과 每日 8ml/kg의 歸腎丸을 經口投與한 2개의 實驗群으로 定하였다. 對照群은 同一한 條件下에서 歸腎丸 대신 同量의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

3) 採血

血液의 採取는 歸腎丸 投與 15日째 되는 날에 白鼠를 ether로 痲醉하고 胸腔과 腹腔을 切開한 뒤, 4ml 注射器를 利用하여 下大靜脈에서 全血을 採血하였다. 血液은 抗凝固劑가 含有된 tube에 넣은 후, 室溫에서 30分間 放置한 다음에 3,000rpm으로 15分間 遠心分離하고 上層에 모아진 血清을 취하여 FSH, LH, estradiol(E₂)의 濃度를 測定하였다.

4) 血中 호르몬 含量의 測定

(1) FSH 含量

血中 FSH의 含量은 ¹²⁵I immunoradiometric assay法으로 測定하였다. 遠心分離하여 얻은 血清 200μl에 100μl의 ¹²⁵I FSH(DPC, USA)를 添加하여 rack shaker에서 60分間 反應시킨 후 2.0ml의 buffered wash solution으로 두 차례 水洗한 후 檢體 內의 放射能을 gamma counter(Packard, USA)에서 1分間 測定하였다.

(2) LH 含量

血中 LH의 含量은 ¹²⁵I immunoradiometric assay法으로 測定하였다. 遠心分離하여 얻은 血清 200μl에 100μl의 ¹²⁵I LH(DPC, USA)를 添加하여 rack shaker에서 60分間 反應시킨 후 2.0ml의 buffered wash solution으로 두 차례 水洗한 후 檢體 內의 放射能을 gamma counter(Packard, USA)에서 1分間 測定하였다.

(3) Estradiol(E₂) 含量

血中 E₂의 含量은 Estradiol Maia kit(Adaltis, Italy)를 使用한 ¹²⁵I radioimmunoassay法으로 測定하였다. 遠心分離하여 얻은 血清 50μl에 100μl의 [¹²⁵I]로 標識된 Estradiol Maia tracer와 100μl

의 Estradiol Maia antiserum을 添加한 후 37°C 恒溫 水槽 內에서 60分間 反應시켰다. 1.0ml의 Estradiol Maia separation reagent를 添加한 후 室溫에서 10分間 放置시킨 후 上層液을 버리고 檢體 內의 放射能을 gamma counter (Packard, USA)에서 1分間 測定하였다.

5) 卵巢의 組織學的 檢索

歸腎丸 投與 15日째 되는 날에 實驗에 利用된 모든 白鼠에서 兩側 卵巢를 摘出した 후 兩側 卵巢를 10% 中性포르말린 溶液으로 12時間 동안 固定시킨 다음, 通常의인 方法으로 파라핀 블록을 만들고 4 μ m 두께로 切片하여 hematoxylin-eosin 染色을 施行하였다. 製作된 슬라이드는 光學顯微鏡으로 檢鏡하였으며 卵巢 內의 二次卵胞(secondary follicle)와 成熟卵胞(mature or graafian follicle) 및 黃體(corpus luteum)의 數를 세었다.

6) PR의 免疫組織化學的 染色

免疫組織化學的 染色은 파라핀 포매된 兩側 卵巢의 블록을 4 μ m 두께로 박절한 組織切片을 얻어 PR(Santa cruz Biotechnology, C-19, sc-538)에 대한 다클론항체를 免疫染色用 一次抗體로 使用하였다. 全 過程을 간단히 記述하면 probe on Plus Slide(Fisher Scientific, Pittsburg, USA)에 4 μ m 두께의 組織切片을 58°C 오븐에서 12時間 동안 부치시킨 후 Xylene과 Histo-clear(National diagnostics; Manvill, NJ.)를 1:3의 比率로 混合한 溶液을 利用하여 5分씩 3차례 反復하여 탈파라핀하였다. 室溫에서 100%, 95%, 80%, 70% 알코올로 차례대로 處理하여 脫水시킨 후 蒸溜水로 含水시켰다. 이후 組織切片을 전자렌지에서 5分間 끓인 후 常溫에서 20分間

식히고 TBST(Tris-buffered Saline with 0.1% Tween-20, DAKO)로 水洗하였다. 一次抗體의 非特異的 染色을 減少시키기 위하여 mouse & human 血清과 10分間 反應시킨 후 1:50으로 稀釋한 一次抗體를 室溫에서 2時間 동안 부치시킨 후 TBST로 水洗하였다. 비오틴이 附着된 二次抗體에 30分間 反應시키고 水洗한 후 스트렙타비딘 過酸化酵素(peroxidase-labelled streptavidine)에 30分間 反應시키고 TBST로 水洗하였다. Chromogen(concentrated 3-amino-9-ethylcarbazol)으로 15分間 發色시키고 Meyer's hematoxylin으로 對照染色한 후 crystal mount(Biomedica)로 封入한 후 檢鏡하였다.

7) 統計處理

實驗結果의 統計學的 檢證을 위해서 one-way ANOVA test를 使用하였고, 多重比較方法으로 Tukey test와 Dunn's method를 使用하였으며, P value가 0.05 以下인 경우에 有意한 差로 判定하였다.

III. 實驗成績

1. 血中 호르몬 濃도에 미치는 影響

1) FSH 濃도에 미치는 影響

血中 FSH 濃度는 對照群에서는 0.700 ± 0.419 mIU/ml였고, 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 0.777 ± 0.473 mIU/ml와 0.245 ± 0.177 mIU/ml의 FSH 血中 濃度を 보였다. 對照群과 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群 사이에서 血中 FSH 濃度는 統計學的으로 意味있는 差異가 없었다($P=0.155$)(Table 1).

Table 1. Level of FSH in rats treated with GSH

Groups	Number of Animals	FSH (mIU/ml)	P value
Control	4	0.700±0.419	
4ml/kg GSH	4	0.777±0.473	0.155
8ml/kg GSH	4	0.245±0.177	

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

Table 2. Level of LH in rats treated with GSH

Groups	Number of Animals	LH (mIU/ml)	P value
Control	4	0.135±0.0843	
4ml/kg GSH	4	0.180±0.0668	0.661
8ml/kg GSH	4	0.140±0.0726	

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

2) LH 濃도에 미치는 影響

血中 LH 濃度は 對照群에서는 0.135±0.0843mIU/ml였고, 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 0.180±0.0668mIU/ml와 0.140±0.0726mIU/ml의 LH 血中 濃도를 보였다. 對照群과 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群 사이에서 血中 LH 濃度は 統計學的으로 意味있는 差異가 없었다(P=0.661)(Table 2).

3) Estradiol(E₂) 濃도에 미치는 影響

血中 E₂ 濃度は 對照群에서 16.15±14.00pg/ml였고 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 27.10±19.75pg/ml와 17.35±14.45pg/ml였으며, 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 血中 E₂ 濃度は 統計學的으로 意味있는 差異를 보였고(P=0.033), 특히 對照群에 비해 4ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서 統計學的으로 意味있는 增加를 나타냈다(P<0.05)(Table 3).

Table 3. Level of E₂ in rats treated with GSH

Groups	Number of Animals	E ₂ (pg/ml)	P value	Multiple comparison procedures [†]
Control ¹	4	16.15±14.00		
4ml/kg GSH ²	4	27.10±19.75	0.033	1 2 3
8ml/kg GSH ³	4	17.35±14.45		

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

[†] ; by the one-way ANOVA and Dunn's method

2. 卵巢에 미치는 影響

1) 卵巢의 組織所見

兩側 卵巢에서 二次卵胞(secocondary follicle)와 成熟卵胞(mature or graafian follicle) 및 黃體(corpus luteum)의 數를 세어 본 結果, 對照群에서는 37.5±10.4개였고 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 48.0±7.1

개와 61.8±11.5개였다. 2개의 實驗群에서 卵巢 卵胞 數는 對照群에 비해 有意性있게 增加된 所見을 보였고(P=0.021), 특히 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群은 對照群에 비해서 統計學的으로 意味있는 差異를 나타냈다(P<0.05)(Table 4)(Fig. 1).

Table 4. Number of secondary, mature follicles and corpus luteum in both ovary

Groups	Number of Animals	Number of follicles	P value	Multiple comparison procedures [†]
Control ¹	4	37.5±10.4		
4ml/kg GSH ²	4	48.0±7.1	0.021	1 2 3
8ml/kg GSH ³	4	61.8±11.5		

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

[†] ; by the one-way ANOVA and Tukey test

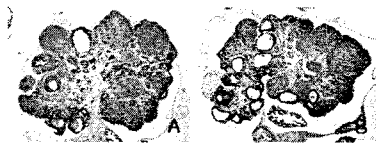


Figure 1. More ovarian follicles and corpus luteum are identified in the ovary of the 8ml/kg of GSH-treated rat for 14 days(B) than control(A).

2) PR의 免疫組織化學的 染色所見

免疫組織化學的 染色의 定度는 전혀 染色이 되지 않은 경우를 음성(-)으로 하였고, 染色의 強度에 따라 약양성(+), 중등도양성(++), 강양성(+++)으로 區分하였다. 對照群과 2개의 實驗群에서 免疫組織化學的 染色上 PR의 發現樣相은 二次卵胞와 成熟卵胞의 顆粒膜細胞(granulosa cell) 와 卵母細胞(oocyte)에서는 약양성에

서 강양성의 정도로 發現되었고, 黃體와 卵胞膜細胞(theca cell)에서는 약양성의 發現을 보였다. 또한 成熟卵胞에서는 少數의 閉鎖卵胞(atretic follicle) 및 卵管의 平滑筋(smooth muscle)에서 약양성에서 강양성의 정도로 發現되었으며, 以外の 卵巢 上皮細胞(ovarian epithelial cell), 卵巢 機質細胞 및 卵管 上皮細胞에서는 PR의 發現이 없었다(Fig. 2, 3).

PR에 대한 免疫組織化學的 染色에 있어서 二次卵胞와 成熟卵胞 그리고 閉鎖卵胞에서 染色된 정도를 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 比較하기 위하여 아래와 같이 計算하였다.

* 免疫染色指數(immunohistochemical staining score, ISS) = (약양성인 卵胞의 數 X 1) + (중등도양성인 卵胞의 數 X 2) + (강양성인 卵胞의 數 X 3)

二次卵胞와 成熟卵胞에서의 免疫染色指數는 對照群에서 7.205±4.646였고 4 ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 13.250±9.878와 5.250±2.217였으며, 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 統計學的으로 意味있는 差

異는 없었다(P=0.241)(Table 5).

閉鎖卵胞에서의 免疫染色指數는 對照群에서 47.750±20.320였고 4ml/kg과 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 32.750±22.500와 31.500±14.271였다. 비록 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 統計學的으로 意味있는 差異를 보이지는 않았으나 對照群에 비해서 2개의 實驗群의 PR에 대한 免疫染色指數는 減少하는 傾向을 보였다(P=0.450)(Table 6).

또한 卵管의 平滑筋에서 PR의 發現을 살펴본 結果, 對照群에 비해서 歸腎丸을 投與한 實驗群에서 PR이 強하게 發現되는 傾向을 보였다(Table 7).

Table 5. Immunohistochemical staining score (ISS) for PR in the secondary and mature follicles of the ovary

Groups	Number of Animals	ISS	P value
Control	4	7.205±4.646	0.241
4ml/kg GSH	4	13.250±9.878	
8ml/kg GSH	4	5.250±2.217	

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

Table 6. Immunohistochemical staining score (ISS) for PR in the atretic follicles of the ovary

Groups	Number of Animals	ISS	P value
Control	4	47.750±20.320	0.450
4ml/kg GSH	4	32.750±22.500	
8ml/kg GSH	4	31.500±14.271	

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

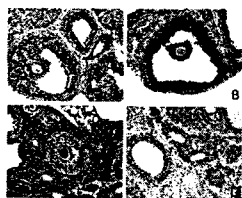


Figure 2. A, B) Granulosa cells of the secondary and mature follicles show strong positive immunoreactivity for PR. Corpus luteum and theca cells show weakly positive reaction. (A: 4ml/kg of GSH-treated rat, B: 8ml/kg of GSH-treated rat) C) Atretic follicles of the control show strong positive immunoreactivity for PR. D) Otherwise, atretic follicles of the 8ml/kg of GSH-treated rat show weakly positive reaction.

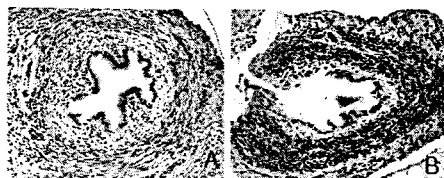


Figure 3. A) Smooth muscle of the fallopian tube of the control shows negative immunoreactivity for PR. B) Smooth muscle of the fallopian tube of the 4ml/kg of GSH-treated rat shows strong positive immunoreactivity for PR.

Table 7. Immunohistochemical staining for PR in the smooth muscle of the fallopian tube (-; negative, +; weakly positive, ++; moderately positive, +++; strong positive)

Groups	Immunohistochemical staining intensity
Control	1 -
	2 +
	3 ++
	4 +
4ml/kg GSH	1 ++
	2 +++
	3 ++
	4 ++
8ml/kg GSH	1 +
	2 ++
	3 ++
	4 ++

Mean±SD

Control: Saline-treated group after pretreatment of estradiol

4ml/kg GSH: 4ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

8ml/kg GSH: 8ml/kg of GSH-treated group after pretreatment of estradiol

IV. 考察

不妊이란 約 1年間 正常的인 夫婦 生活을 하였음에도 불구하고 妊娠이 되지 않는 狀態를 말한다. 그 中에서 과거에 한번도 妊娠을 해본 적이 없는 狀態로 계속 妊娠이 되지 않는 것을 原發性 不妊症이라 하고, 妊娠經驗이 있는 夫婦가 流産 또는 分娩 후 無月經이 끝난 뒤부터 萬 1年이 지나도 妊娠이 되지 않는 경우를 續發性 不妊症이라고 한다. 西洋醫學에서는 不妊症의 原因을 男性因子에 의한 不妊, 排卵因子, 卵管 및 骨盤因子, 子宮頸部因子, 其他因子에 屬하는 子宮의 非正常, 免疫學的 因子, 感染 등으로 나누고 있는데, 특히 排卵因子는 모든 不妊要因들 가운데 가장 診斷하기 쉬운 뿐 아니라 가장 治療가 잘 되며, 女性不妊要因의 約 30-40%를 차지한다^{10,22)}.

歷代 韓醫學 文獻에서의 不妊에 대한 記錄은 《素問·上古天真論》²³⁾에 “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 故有形壞而無子”, “五臟皆衰 筋骨解墮 天癸盡矣而無子耳”와 《素問·骨空論》²³⁾에 “其女子不孕……督脈生病”이라 한 것이 最初이며 以後 無子²⁴⁾, 全不產·斷緒·斷續²⁵⁾, 絕嗣·無嗣²⁶⁾, 不子²⁷⁾, 不孕²⁸⁾, 石女·五不女²⁹⁾ 등으로 言及되어져 왔다.

不妊의 原因에 대하여서는 唐代 巢³⁰⁾가 “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 不妊의 原因에 관한 研究가 體系化되기 始作하여 金·元代를 지나 明代에 이르는 동안 理論이 定立되어 武³¹⁾는 血瘀, 宮冷, 痰塞, 婢妾不孕으로, 葉³²⁾은 虛弱, 臟寒, 形肥, 素弱, 相火盛, 脾胃寒, 氣鬱, 血滯, 經亂不孕으로, 陳³³⁾은 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 分類하여 細分化하였고, 最近에 夏 등³⁴⁻³⁹⁾은 주로 辨證論治에 依據하여 不妊을 腎虛(腎陽虛·腎陰虛), 血虛, 肝鬱, 痰濕, 血瘀 등으로 分類하였다.

不妊의 治療에 있어서 調經의 意味는 傅⁴⁰⁾에 의하면 “무릇 求嗣의 道는 調經을 先行하여야 하니 婦人이 無子함은 經水不調에 起因하는 일이 많기 때문이다”라고 하였다. 이렇듯 月經不調는 不妊의 가장 基本的인 原因이 되므로 그 治療는 마땅히 먼저 調經을 하여야 하며 이는 곧 排卵을 돕는다는 意味이니 調經을 통하여 卵子의 成熟과 排卵을 돕는다는 뜻이다⁴¹⁾.

韓醫學에서의 腎臟은 性徵의 發達과 衰退 그리고 生殖에 필요한 機能을 發揮하는 臟器로 五臟六腑의 精을 간직하고

있다고 설명하고 있다. 腎은 人體 各 臟腑에 滋養作用을 하는 根本物質인 “腎精·腎陰”과 人體陽氣의 根本이자 先天의 眞火로서 人體 熱에너지의 根源이 되어 溫煦 및 推動作用을 하는 “腎氣·腎陽”으로 나뉘어진다. 腎陰과 腎陽은 相互制約과 相互依存의 關係를 通하여 人體生理上의 相對的 平衡을 維持하고 있다⁴²⁾.

歸腎丸은 明代 張¹⁾의 《景岳全書》에 最初로 收載되었으며, 그 構成藥物은 熟地 八兩, 山藥, 山茱萸(肉), 茯苓 各四兩, 當歸 三兩, 枸杞, 杜冲(鹽水炒), 菟絲子(製) 各四兩이다. 그 主治는 “治腎水眞陰不足 精衰血少 腰痠脚軟 形容憔悴 遺泄陽衰等證”이라고 하여 腎虛로 因한 月經不調, 不妊症, 産後腰痛 등의 治療에 使用되어온 處方이다¹⁻¹¹⁾.

歸腎丸의 構成藥物 各各의 性味와 歸經 및 效能을 살펴보면 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, 山藥은 味甘하고 性溫하며 脾·肺·腎經에 歸經하고 健脾·補肺·固腎·益精하며, 山茱萸는 味酸·澀하고 性微溫하며 肝·腎經에 歸經하고 補益肝腎·澀精固脫하며, 茯苓은 味甘·淡하고 性平하며 心·脾·肺經에 歸經하고 利水滲濕·健脾寧心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, 枸杞子는 味甘하고 性寒하며 肝·腎經에 歸經하고 滋腎·潤肺·補肝·明目하며, 杜冲은 味甘·微辛하고 性溫하며 肝·腎經에 歸經하고 補肝腎·強筋骨·安胎하며, 菟絲子는 味辛·甘하고 性溫하며 肝·腎·脾經에 歸經하고 補肝腎·益精髓·明目·止瀉한다⁴³⁾.

歸腎丸은 六味地黃丸 加減方으로 熟地

黃은 滋補精血하여 養陰生髓하고, 山茱萸, 枸杞子是 滋養肝腎, 補益精血하니 熟地黃을 도와 補陰填精하는 效果가 強해지며, 杜沖, 菟絲子是 補益腎氣하여 腰膝을 強하게 하고, 上藥과 同用하여 補腎陰하여 填精하고 또한 補腎氣하여 助陽한다. 山藥, 茯苓은 健脾和中하는데 山藥은 益腎固精의 效果도 있다. 當歸는 養血調經한다. 모든 藥物은 合用하면 補腎填精을 爲主로 하고 兼하여 補肝脾하니 衝任得養, 陰陽協助하면 經行이 正常이 된다¹¹⁾.

腎虛로 因한 不妊은 不妊과 함께 月經紊亂하여 週期가 當겨지거나 늦춰지는 것이 一定하지 않다. 月經量은 적고 色은 軟하며 간혹 無月經이나 稀發月經의 樣相을 나타내기도 한다. 腰脊痠痛, 頭暈目眩, 神疲乏力, 耳鳴, 眼眶黯黑, 舌淡紅, 苔薄白, 脈細軟하다. 陽虛에 偏重된 경우에는 形寒肢冷, 四肢不溫, 少腹寒冷하고 간혹 尿頻便溏하다. 舌淡胖, 苔薄白, 脈細軟하다. 陰虛에 偏重된 경우에는 咽乾口燥, 五心煩熱, 便溏, 舌紅, 苔薄或少苔, 脈細數하다. 基礎體溫은 單相을 나타내는 경우가 많은데 간혹 二相을 나타내더라도 黃體期가 短縮되는 등의 所見을 나타내는 경우가 많다. 子宮發育不全이나 排卵障礙, 稀發月經, 無月經 등이 兼한 不妊症에서 많이 나타나는 辨證類型이다⁹⁾.

生殖現象은 視床下部-腦下垂體-卵巢軸이 精巧하게 作用하여 維持된다. 外部刺戟에 의해 中樞神經系에서 神經傳達物質이 分泌되면 視床下部에서는 GnRH가 分泌되고 視床下部-腦下垂體 門脈血을 통하여 腦下垂體 前葉으로 移動되어 性腺刺戟호르몬 分泌細胞에 作用하여 FSH와 LH 등의 性腺刺戟호르몬을 分泌시키고

이들은 卵巢와 睪丸 등 性腺에 作用하여 스테로이드 生合成과 生殖細胞의 形成을 促進한다. 性腺에서 生成된 호르몬은 腦下垂體와 視床下部에 陰性피드백(Negative feedback) 機轉으로 性腺刺戟호르몬의 分泌 및 合成을 調節한다. 卵胞의 形成 및 初期 發展段階에서는 性腺刺戟호르몬이 直接的인 影響을 미치지 않으며, 卵胞의 成熟이 進行되면서 이러한 호르몬의 影響下에 들어간다²²⁾. 腦下垂體에서 分泌되는 FSH와 LH는 卵巢에 作用하여 週期的 變化를 誘導하는 바, 卵巢의 卵胞가 FSH의 作用을 받으면 顆粒膜細胞(granulosa cell)가 增殖되고 卵胞液이 貯留되며, 空洞이 形成되고 卵胞가 成熟하여 卵子가 發育하게 된다. 卵胞가 完熟段階에 이르면 卵胞에서 estrogen分泌가 增加되어 排卵 前日에 最高值에 이른다. 增加된 estrogen은 視床下部에 作用하여 LHRH의 分泌를 일으키고 이에 따라 LH의 分泌가 旺盛해지므로써 排卵이 誘發된다⁴⁴⁻⁴⁶⁾. 따라서 이들 호르몬은 妊娠에 있어서 대단히 重要的 意味를 갖는다.

本 實驗에서는 腎虛로 因한 不妊症에 活用되고 있는 歸腎丸을 白鼠에 經口投與하고 排卵과 關聯된 FSH, LH, E₂의 血中 濃度를 測定하여 그 作用機轉을 알아 보고자 하였으며, 또한 兩側 卵巢를 摘出した 후 組織學的 檢索을 통해 이들 호르몬의 變化가 卵巢에 어떠한 影響을 미치는지 究明하고자 하였다.

白鼠를 利用한 動物實驗에서 測定한 호르몬인 LH는 FSH와 함께 卵胞를 成熟시키고 estrogen의 生成과 分泌를 促進하며 黃體의 形成을 刺戟하여 progesterone의 生成과 分泌를 促進한다. FSH는 卵胞 호르몬과 함께 作用하여 FSH의 受容體를

增加시키고 卵胞의 成長을 促進시키며, LH와 같이 estrogen의 分泌를 더욱 높인다. Estradiol(E₂)은 estrogen의 一種으로 卵巢에서 分泌되고 LH, FSH의 刺戟을 받아 分泌됨과 同時에 되먹임(feedback)의 機轉으로 刺戟호르몬의 分泌와 調節에 關與하고, 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 反映한다^{22,47,48}).

本 實驗의 血中 FSH 濃度는 對照群에서는 $0.700 \pm 0.419 \text{ mIU/ml}$ 였고, 4 ml/kg 과 8 ml/kg 의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 $0.777 \pm 0.473 \text{ mIU/ml}$ 와 $0.245 \pm 0.177 \text{ mIU/ml}$ 였으며, 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 血中 FSH 濃度는 統計學的으로 意味있는 差異가 없었다 ($P=0.155$). 血中 LH 濃度는 對照群에서는 $0.135 \pm 0.0843 \text{ mIU/ml}$ 였고, 4 ml/kg 과 8 ml/kg 의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 $0.180 \pm 0.0668 \text{ mIU/ml}$ 와 $0.140 \pm 0.0726 \text{ mIU/ml}$ 였으며, 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 血中 LH 濃度는 統計學的으로 意味있는 差異가 없었다 ($P=0.661$). 血中 E₂ 濃度는 對照群에서 $16.15 \pm 14.00 \text{ pg/ml}$ 였고 4 ml/kg 과 8 ml/kg 의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 $27.10 \pm 19.75 \text{ pg/ml}$ 와 $17.35 \pm 14.45 \text{ pg/ml}$ 였으며, 對照群과 2개의 實驗群 사이에서 血中 E₂ 濃度는 統計學的으로 意味있는 差異를 보였고($P=0.033$), 특히 對照群과 4 ml/kg 의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群 사이에서 統計學的으로 意味있는 增加를 나타냈다($P<0.05$).

卵胞의 成長過程을 살펴보면 follicle의 成熟은 luteal phase에서 始作하여 다음 follicular stage까지 進行되며 primordial follicle에서 primary follicle, secondary

follicle(preantral follicle), tertiary follicle(antral follicle)을 거쳐 成熟한 graafian follicle까지 成長한다. 이 段階中에서 preantral follicle이 生成되는 時期까지는 gonadotrophin의 影響을 받지 않고 自然的으로 일어나며, 그 以後 段階에서부터 gonadotrophin의 影響을 받는다. Folliculogenesis過程과 호르몬과의 關係를 보면, 每 週期마다 FSH가 上升하면서 顆粒膜細胞의 aromatase enzyme system을 刺戟하여 卵胞들이 4 mm 以上 成長하며, 이 中 하나의 卵胞가 生理週期 5-7日에 다른 卵胞들에 비해 優越하여 優性卵胞가 되며 成長을 持續하게 된다⁴⁹⁻⁵¹. 다른 卵胞들은 消滅하게 되는데, 이는 成長卵胞에 의해 estrogen과 inhibin, 기타 여러 要因들에 의해 腦下垂體의 性腺刺戟호르몬 分泌의 抑制가 오기 때문이고 이들 卵胞들은 卵巢에서 atretic follicle로 觀察된다^{52,53}. 優性卵胞에서는 顆粒膜細胞가 分裂增殖하면서 E₂를 分泌하고 血中 高濃度의 E₂는 LH surge를 誘導하고 LH surge가 일어나며 28-32時間만에 排卵이 일어나게 된다⁵⁴. 排卵後 follicle은 corpus luteum으로 변하게 되고 受精이 안될 경우, 8-9日째 involution이 始作된다.

本 實驗에서는 白鼠에 歸腎丸을 經口 投與한 후에 卵巢의 組織檢査를 통해 兩側 卵巢에서 二次卵胞(secocondary follicle)와 成熟卵胞(mature or graafian follicle) 및 黃體(corpus luteum)의 數를 세어 본 結果, 對照群에서는 37.5 ± 10.4 개였고 4 ml/kg 과 8 ml/kg 의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群에서는 各各 48.0 ± 7.1 개와 61.8 ± 11.5 개였다. 2개의 實驗群에서 卵巢 卵胞 數는 對照群에 비해 有意性있

게 增加된 所見을 보였고($P=0.021$), 특히 8ml/kg의 歸腎丸을 14日 동안 投與한 實驗群은 對照群에 比해서 統計學的으로 意味있는 差異를 나타냈다($P<0.05$).

本 研究結果에 의하면 歸腎丸을 投與한 群이 對照群에 比해서 E_2 의 血中 濃度가 統計學的으로 意味있는 增加를 보이고 또한 組織學的으로 確認한 二次卵胞(secondary follicle)와 成熟卵胞(mature or graafian follicle) 및 黃體(corpus luteum)의 數가 統計學的으로 意味있게 增加함을 보여주고 있어 歸腎丸이 白鼠의 卵巢에서 排卵과 卵胞의 成長을 促進할 것으로 思料된다.

Progesterone은 estrogen과 같이 卵巢 호르몬으로 哺乳類의 性週期 및 妊娠維持에 關係하는 스테로이드 호르몬이며 視床下部와 腦下垂體 前葉의 影響 하에 있다. estrogen은 卵胞에서 分泌되어 子宮, 膾, 乳腺 등의 生殖系統을 發達시키나, progesterone은 黃體에서 주로 分泌되고 그 外 胎盤, 副腎皮質에서도 分泌되며 그 機能은 受精卵의 着床, 子宮收縮의 抑制, 妊娠의 持續, 胎兒의 發達, 새로운 排卵의 抑制 및 乳腺發達 등에 作用한다.

호르몬이 어떤 器官에 作用하는 것은 그 器官의 細胞 中에 이들 호르몬을 받아들이는 receptor가 있기 때문이며 이들 receptor에서 호르몬의 刺戟을 받으면 細胞의 機能이 活成化되고, 특히 週期的 組織變化가 있는 生殖器 系統에서는 細胞의 肥大, 增殖이 일어나게 된다⁵⁵⁾.

Progesterone이 作用을 나타내기 위해서는 標的細胞에 存在하는 受容體와 일단 結合하여야 生物學的 反應을 나타내게 되므로 이러한 호르몬의 特性과 作用을 理解하기 위해서는 호르몬의 濃度뿐

만 아니라 受容體의 變化樣相을 觀察하는 것도 臨床的 意義가 크다고 하겠다. 호르몬 受容體의 有無를 알 수 있는 方法들은 生化學的分析法(cytosol assay), 免疫螢光法 및 免疫組織化學의 方法들이 代表的인 것이다. 生化學的分析法은 受容體의 起源 및 測定된 蛋白質의 起源을 糾明할 수 없다는 問題點이 있으며, 免疫螢光法을 利用하면 標本을 永久保存할 수 없으며 凍結切片을 利用해야만 하며 逆行的 研究(retrospective study)가 不可能하다는 短點이 惹起된다. 上記 記述한 두 가지 方法의 問題點들을 排除하고 좋은 結果를 얻을 수 있는 것이 免疫組織化學的 染色法이다⁵⁶⁾.

本 實驗에서 살펴본 白鼠 卵巢에서 PR에 대한 免疫組織化學的 染色의 結果는 비록 統計學的으로 意味있는 差異를 보이지는 않았지만 對照群에 比해서 歸腎丸을 投與한 實驗群에서 PR이 發現하는 閉鎖卵胞에 대한 免疫染色指數가 減少하는 傾向을 보인 點에 비추어 보았을 때 歸腎丸은 卵胞의 發達과 成長 및 閉鎖의 過程에서 卵胞閉鎖를 抑制하는 役割을 하고 있을 可能性을 提示하고 있다. 以前의 研究結果^{57,58)}에 의하면 progesterone이 卵巢細胞의 枯死(apoptosis)에도 關與할 것으로 생각되어지고 있는데 本 研究 結果에서도 PR은 다른 成長卵胞에서보다 閉鎖卵胞에서 均一하게 發現하는 傾向을 보였다. 이는 PR이 卵胞의 閉鎖過程에 參與할 수 있다는 點을 示唆하고 있으며 歸腎丸이 이를 抑制하고 있을 可能性이 있음을 示唆한다. 또한 以前의 研究結果⁵⁹⁾에 의하면 progesterone은 卵巢 上皮細胞의 枯死에 關與함으로써 卵巢 上皮腫瘍 發生을 抑制하는데 關與할 것으로 생

각하였으나 本 研究에 의하면 卵巢 上皮 細胞에서 PR의 發現은 전혀 觀察되지 않았다. 향후 보다 細密하고 持續的인 研究를 通하여 歸腎丸과 PR 發現과의 關係를 明確히 究明해야 할 것이며, PR의 卵巢 上皮細胞 枯死에 關聯해서도 追加的인 研究가 必要할 것으로 思料된다.

V. 結 論

腎虛로 인한 不妊症에 活用되는 歸腎丸의 排卵과 關聯된 效能을 알아보기 위해 歸腎丸을 正常 白鼠에 經口投與한 후, 血中 FSH, LH, estradiol(E₂) 濃度の 測定과 卵巢의 組織學的 檢索 및 PR의 免疫組織化學的 染色所見을 통해 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 血中 FSH 濃度は 對照群과 實驗群에서 有意性있는 差異가 없었다.
2. 血中 LH 濃度は 對照群과 實驗群에서 有意性있는 差異가 없었다.
3. 血中 E₂ 濃度は 對照群에 비해 實驗群에서 有意性있는 增加를 나타냈다.
4. 卵巢의 組織所見은 對照群에 비해 實驗群에서 排卵이 有意性있게 增加한 所見을 보였다.
5. 卵巢에서 PR의 免疫組織化學的 染色所見은 對照群에 비해 實驗群에서 閉鎖卵胞에 대한 免疫染色指數가 減少하는 傾向을 보였으나, 有意性은 없었다.

以上の 結果로 보아, 歸腎丸은 白鼠의 卵巢에 作用하여 排卵을 向上시키는 效果가 있을 것으로 思料되며, 卵巢에 存在하는 PR과 關聯하여서는 向後 持續的인 研究를 통해 그 分布와 役割에 대해서

좀 더 明確히 糾明하는 것이 必要할 것으로 思料된다.

- 투 고 일 : 2005년 04월 29일
- 심 사 일 : 2005년 05월 02일
- 심사완료일 : 2005년 05월 10일

參考文獻

1. 張介賓. 景岳全書. 서울: 大星文化社. 1992; 423.
2. 羅元愷. 中醫婦人科學. 서울: 保健新聞社. 1997; 154, 186.
3. 尙志大學校 韓醫科大學 第2期 卒業準備委員會. 國譯 葉天士女科. 서울: 大星文化社. 1995; 354-355.
4. 李鍾華. 漢方婦人科 臨床診療. 서울: 癸丑文化社. 1982; 684-687.
5. 崔達永 등. 景岳全書 新方八陣의 새로운 이해. 서울: 法仁文化社. 2004; 127-129.
6. 夏桂成. 中醫臨床婦科學. 北京: 人民衛生出版社. 1996; 147.
7. 夏桂成. 實用婦科方劑學. 北京: 人民衛生出版社. 1997; 75-76.
8. 趙順南. 實用婦產科學. 서울: 成輔社. 1996; 147.
9. 이태균, 김동일. 한방부인과학 강의록. 동국대학교 부인과학교실. 1999; 142-143, 338-339.
10. 韓醫婦人科學 編纂委員會. 韓醫婦人科學. 서울: 도서출판 정담. 2001; 33-44, 121, 138, 144, 150, 245-255.
11. 大田大學校 第12期 卒業準備委員會. 婦人科方劑學. 서울: 木과 土. 2000; 35.
12. 沈建平. 不孕症診治經驗瑣談. 遙寧中醫

- 雜誌. 1992; 30.
13. 錢平. 辨證分型治療不孕症40例. 湖南中醫雜誌. 1991; 4; 43.
 14. 이인선. 주기요법과 변증논치에 의한 여성불임증 치료에 대한 고찰. 대한한방부인과학회지. 1996; 9(1); 127-153.
 15. Rondell P. Role of steroid synthesis in the process of ovulation. Biol Reprod. 1974; 10: 199-215.
 16. Mori T. et al. Inhibition of ovulation in immature rats by anti-progesterone antiserum. J Endocrinol. 1977; 73: 185-186.
 17. Kohda H. et al. A progesterone-dependent step in ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in immature rats primed with pregnant mare serum gonadotrophin. J Endocrinol. 1980; 87: 105-107.
 18. Park OK, Mayo KE. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. Mol Endocrinol. 1991; 5: 967-978.
 19. Natraj U, Richards JS. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. Endocrinology. 1993; 133: 761-769.
 20. Lydon JP. et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes Dev. 1995; 9(18): 2266-2278.
 21. 金泰希. 歸腎丸이 卵巢摘出 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院. 2003.
 22. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학(제3판). 서울: 칼빈서적. 1997; 64-68, 91-115, 389-391, 421-425, 648-667.
 23. 楊維傑. 黃帝內經素問譯解. 臺北: 臺聯國風出版社. 1971; 4-6, 395-396.
 24. 王叔和. 王叔和脈經. 臺北: 文光圖書有限公司. 1970; 209-210.
 25. 孫思邈. 備急千金要方. 서울: 大星文化社. 1984; 16-17.
 26. 陳士鐸. 增補百病辨證錄. 서울: 書苑堂. 1981; 479.
 27. 吳謙. 醫宗金鑑·婦科心法要訣. 서울: 大星文化社. 1983; 421.
 28. 楊維傑. 黃帝內經素問語解. 臺北: 樂群出版社. 1976; 444.
 29. 萬全. 廣嗣紀要(醫部全錄卷九). 北京: 人民衛生出版社. 1983; 86-91.
 30. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 北京: 人民衛生出版社. 1982; 208-209.
 31. 武之望. 濟陰綱目. 臺北: 旋風出版社. 1972; 180-203.
 32. 葉桂. 葉天士女科. 서울: 大星文化社. 1984; 333-351.
 33. 陳士鐸. 石室秘錄. 서울: 杏林書院. 1982; 162-163.
 34. 夏桂成. 不孕不育與月經週期調理. 北京: 人民衛生出版社. 2000; 161-176.
 35. 洪家鐵. 中西醫臨床婦科學. 北京: 中國中醫藥出版社. 1996; 448-457.
 36. 李淑敏. 現代中醫婦科臨床. 北京: 中醫古籍出版社. 1997; 314-315.
 37. 羅元愷. 實用中醫婦科學. 上海: 上海科學技術出版社. 1994; 13.
 38. 載德英, 楊炳初. 一百天學中醫婦科. 上海: 上海科學技術出版社. 2000; 391-39

- 6.
39. 王愛芹, 曹慧娟. 實用中西醫結合婦科學. 北京: 北京出版社. 1996; 1025-1032.
40. 傅青主. 新編傅青註男女科. 서울: 大星文化社. 1989; 102-109.
41. 김상찬 등. 卵巢機能失調性 不妊과 輸卵管阻塞性 不妊의 中醫治療. 경산대학교 부설 제한동의학술원 논문집. 1999; 4(1): 341-351.
42. 柳道坤. 東醫生理學. 圓光大學校 生理學敎室. 1995; 101-104.
43. 全國韓醫科大學本草學敎授. 本草學. 서울: 永林社. 1994; 302-304, 537-538, 556-557, 568-569, 578-581, 596-597, 626-627.
44. 고건일 등. 인체생리학. 서울: 探求堂. 1993; 599-608.
45. Matthew G, Colin H, Robin C. Gynecology illustrated(2nd edit.). Hong Kong. Churchill Livingstone. 1978; 49-64.
46. Owens PC, Smith R. pioid peptides in blood and cerebrospinal fluid during acute stress. Bailliers Clin Endocrinol Metab. 1987; 1(2): 415-437.
47. 구병삼. 임상부인과 내분비학. 서울: 고려서적. 1997; 265-348.
48. 성호경, 김기환. 생리학. 서울: 의학문화사. 1997; 365, 396-400.
49. McNatty KP. Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans. Clin Endocrinol Metab. 1978; 7: 577-600.
50. Shima K, Kitayama S, Nakano R. Gonadotrophin binding sites in human ovarian follicles & corpora lutea during the menstrual cycle. Obstet Gynecol. 1978; 69: 800-806.
51. Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. Fertil Steril. 1982; 38: 281-286.
52. Fritz MA, Speroff L. The endocrinology of the menstrual cycle in the interaction of folliculogenesis & neuroendocrine mechanisms. Fertil Steril. 1982; 38: 509-529.
53. 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. 1989; 68: 1078-1085.
54. 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. pro bit Analysis. Am J Obstet Gynecol. 1980; 138(4): 383-390.
55. 박성식, 광수동. Progesterone이 rat 자궁과 난소의 증식세포 분포에 미치는 영향에 대한 면역조직화학적 연구. 大韓獸醫學會誌. 1995; 35(2): 217-228.
56. 성석용 등. 유선질환에서 Estrogen 및 Progesterone 수용체에 관한 면역조직화학적 연구. 外科學會誌. 1991; 41(1): 29-36.
57. Peluso JJ. et al. Expression pattern and role of a 60-kilodalton progesterone binding protein in regulating granulosa cell apoptosis: involvement of the mitogen-activated protein kinase cascade. Biol Reprod. 2003; 68: 122

-128.

58. Chaffin CL, Stouffer RL. Local role of progesterone in the ovary during the periovulatory interval. *rev Endocr Metab Disord.* 2002; 3: 65-72.
59. Rodriguez GC. et al. Progestin-induced apoptosis in the macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor- β . *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 50-60.