

## 蒼附六君湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향

경원대학교 한의과대학 부인과학교실  
김희주, 김윤상, 임은미

### ABSTRACT

#### Effects of *Changbuyeukgun-Tang* on the Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovaries in Rats

Hee-Ju Kim, Yoon-Sang Kim, Eun-Mee Lim

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

**Purpose:** In this research, we made a plan to investigate the effects of *Changbuyeukgun-Tang*(CET) on the polycystic ovary(PCOS) induced by estradiol valerate(EV) in rats. PCO was induced by single intramuscular injection with EV(4mg) in female rats. Rats(n=8) in normal group were injected with sesame oil and orally administrated distilled water for 8weeks Rats in PCO control group(n=8) were injected with EV and orally administrated distilled water for 8weeks. Rats in CET treated group(n=8) were injected with EV and orally administrated CET for 8weeks.

**Methods:** We measured the weights of the body, the ovary, the uterus and the adrenal gland. And also, we analyzed ovarian histopathology, NGF and CRF immunohistochemistry.

**Results:** The results were as follows

1. the weights(mg) of the ovaries in CET treated group were significantly increased( $p<0.001$ ) compared with PCO control group.
2. the number of the mature follicles in CET treated group were significantly increased( $p<0.01$ ) compared with PCO control.
3. the number of the atresia follicles in CET treated group were significantly decreased( $p<0.01$ ) compared with PCO control.
4. the number of the corpora in CET treated group were significantly increased( $p<0.05$ ) compared with PCO control.
5. the expressions of NGF-immunoreactive cells in the ovarian granulosa cells of rats in CET treated group were less observed than PCO control group.

**Conclusion:** According to these results, we finally concluded that *Changbuyeukgun-Tang*(CET) has the inhibitory effect on the development of EV-induced polycystic ovary. And we deduced that the effect of it may be related to the decreased NGF activities in the ovary.

**Key Words:** *Changbuyeukgun-Tang*(CET), polycystic ovary, estradiol valerate (EV), nerve growth factor(NGF), corticotropin releasing factor(CRF)

## I. 緒 論

다낭성 난소증후군은 가장 흔한 내분비질환 중 하나로 생식기 연령의 여성들 중 약 3-10%에서 발병하는 것으로 알려져 있고, 무배란성 불임증의 가장 큰 원인이다. 1935년 Stein과 Leventhal에 의해 무월경, 다모증, 비만 그리고 경화성 난소의 특징을 가진 것으로 처음 보고된<sup>1)</sup> 이후 1981년에 이르러 많은 연구자들에 의해 다낭성 난소증후군은 만성적인 고안드로젠증, 비만, 그리고 인슐린 저항성으로 인한 보상성 고인슐린혈증의 특성을 가진 질환으로 정립되었다<sup>2)</sup>.

한의학에서는 다낭성 난소증후군에 관한 직접적 언급은 없었지만 不妊, 經閉, 月經不調, 月經後期, 肥滿 등의 병기와 관련하여 나타나는 多毛, 肥滿, 乳房胸脇脹滿, 面部痤瘡, 小腹脹滿拒按, 帶下量多, 四肢倦怠無力<sup>3-6)</sup> 등의 증상들이 다낭성 난소증후군과 상관성이 있다고 볼 수 있다.

蒼附六君湯<sup>7)</sup>은 “形盛, 多痰, 氣虛 至數月而經始行者, 宜服蒼附六君湯...”이라 하여 氣虛의 治療에 사용하는 人蔘, 白朮, 白茯苓 등과 濕痰의 治療에 사용하는 半夏, 陳皮, 蒼朮 등으로 구성되어 肥滿, 氣虛, 痰濕으로 인해 발생하는 數月行經을 治療하는 方劑로 다낭성 난소질환의 치료에 적합하다고 사료된다.

기존에 양 등<sup>8)</sup>, 남 등<sup>9)</sup> 및 유 등<sup>10)</sup>의 한약이 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향에 대한 연구가 있었으나 한의학적인 辨證상 蒼附六君湯도 임상적 가치가 높다고 생각되기에, 본 연구에서는 蒼附六君湯이 다낭성 난소에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, Estradiol Valerate

(EV)로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소 모델을 이용하여 체중변화, 난소, 자궁 및 부신의 무게변화, 난소의 육안적 소견 및 병리학적 조직검사, Nerve Growth Factor(NGF) 및 Corticotropin Releasing Factor(CRF) 발현의 정도를 각각 측정하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 실험동물

체중 190g 내외의 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정된 항온항습 사육장치(대중기기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. 다낭성 난소의 유발

다낭성 난소(Polycystic Ovaries, PCO)는 Brawer 등<sup>11)</sup> 등의 방법에 준하여 유발하였다. Estradiol Valerate(EV)(Sigma, USA)를 0.5ml의 benzyl alcohol(Sigma, USA)에 용해시킨 후 sesame oil(Sigma, USA)에 20mg/ml의 농도로 혼합하고 이 용액 0.2ml 을 1회 둔부 근육에 주사하여 PCO를 유발시켰다.

### 3. 검액의 제조

실험에 사용한 蒼附六君湯<sup>7)</sup>의 약제는 경원대학교부속 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였으며, 처방의 내용과 1첩당 분량은 Table 1과 같다. 蒼附六君湯 4첩 분량인 192g을 2000ml의 증류수에 2시간 동안 침지시킨 후, 2시간 30분

간 전탕하였다. 그 후 전탕액을 원심분리하여 침전된 성분을 제거한 후 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 100ml로 농축시켰다. 이 농축액 1ml을 흰쥐 마리 당 1일 투여량으로 하였으며, 이 용량은 체중 비례로 환산하여 60 kg 성인의 1일 복용량의 약 5배에 해당되는 용량이다.

Table 1. Prescription of *Changbuyeukgun-Tang*

Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight (g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
白 朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
甘草炙	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4
蒼 朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4
香附子 (童便)	<i>Cyperi Rhizoma</i>	4
黃 芩	<i>SCutellariae Radix</i>	4
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
枳 殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4
Total		48

#### 4. 실험군의 분류

실험군은 정상군(Normal Group), 대조군(Control Group) 및 처치군(*Changbuyeukgun-Tang* Treated Group)으로 체중을 고려하여 각 군을 8마리씩 배정하였다.

정상군은 sesame oil 만을 1회 둔부 근육에 주사하고, 8주간 증류수 1ml을 경구투여 하였다. 대조군과 처치군은 PCO를 유발시키기 위해 EV를 둔부 근육에 주사한 후, 대조군은 증류수 1ml을, 처치

군은 蒼附六君湯 감압농축액 1ml을 8주간 매일 1회 경구투여 하였다.

#### 5. 검사 항목 및 방법

1) 체중, 난소, 자궁 및 부신의 무게측정  
실험개시일, 실험 후 2주, 4주, 6주 및 8주에 체중을 측정하였다. 실험종료일에 흰쥐를 ether로 마취하고, 전혈을 심장을 통해 채혈한 후 4% paraformaldehyde액으로 관류고정 하였다. 고정 한 뒤 양측 난소, 자궁 및 부신을 적출하여 정밀화학저울(AND GR-202, Japan)로 무게를 측정하였다.

2) 난소의 육안적 관찰  
부검하여 적출된 양측 난소를 육안으로 관찰한 후 군별로 모든 난소를 사진촬영 하였다.

3) 난소의 병리조직학적 관찰과 난소 및 황체 수의 측정  
개체 당 한쪽 난소를 일반적인 조직처리과정을 거쳐서 파라핀 포매하고, 5 $\mu$ m의 박절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색한 뒤 광학현미경하에서 일반적인 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

또한, 각 난소조직에서의 난포 수와 황체 수를 계수하였다. 난포의 수는 난모세포가 관찰되는 난포만을 대상으로 계수하였으며, 난포막이 형성되고 과립막세포가 중층으로 증식된 2차 난포, 난포동이 형성된 성숙난포, 난모세포의 변성 또는 과립막 세포의 고사가 관찰되는 폐쇄 난포를 각각 구분하여 계수하였다. 황체는 외난포막으로 뚜렷하게 둘러싸인 것 만을 계수 하였으며, 황체의 경계가 불분명한 퇴화 중인 것은 계수에서 제외하였다.

#### 4) Nerve Growth Factor(NGF) 면역조직화학적 검사

뇌, 뇌하수체, 부신 및 난소를 적출하여 picric acid가 포함된 Zamboni액에 12시간 고정하였다. 고정된 조직을 일반적인 처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5  $\mu\text{m}$  두께의 박절편을 제작하였다. 탈파라핀 및 합수 과정을 거친 조직을 citrate buffer(pH 6.0)에 넣어 500W 출력의 microwave로 5분간 3회 처리하여 항원성을 부활시키고, 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액에 1시간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit(Vector Lab., USA)를 이용하여 NGF 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 일차항체인 rabbit anti-mouse nerve growth factor(Chemicon International Inc., USA)를 1,000배 희석하여 4°C에서 72시간 반응시키고, 상온에서 biotin이 부착된 2차 항체를 30분간 반응시킨 후 ABC reagent를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05M PBS buffer(pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였다. 반응이 종료된 절편을 DAB(Roche, Germany)로 5분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 NGF 양성반응의 정도를 확인하였다.

NGF 양성반응의 정도는 NGF에 염색된 세포의 수 및 염색강도를 기준으로 하였으며, 양성반응이 관찰되지 않을 경우를 -, 미약한 양성 반응을 +, 중등도의 양성반응을 ++, 강한 양성반응을 +++로 표시하였다.

#### 5) Corticotropin Releasing Factor(CRF) 면역조직화학적 검사

뇌를 적출하여 picric acid가 포함된 Zamboni액에 12시간 고정하였다. 고정된 뇌조직의 정중융기(median eminence)

부위의 시상단면을 만들어 일반적인 처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하고, 5  $\mu\text{m}$  두께의 박절편을 제작하였다. 탈파라핀 및 합수 과정을 거친 조직을 proteinase K (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Roche, Germany)에 20분간 처리하여 항원성을 부활시키고, 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액에 1시간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit(Vector Lab., USA)를 이용하여 CRF 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 일차항체인 rabbit anti-human CRF(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 200배 희석하여 4°C에서 72시간 반응시키고, 상온에서 biotin이 부착된 2차 항체를 30분간 반응시킨 후 ABC reagent를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05M PBS buffer(pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였고, 반응이 종료된 절편을 DAB(Roche, Germany)로 5분간 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 CRF 양성반응의 정도를 확인하였다.

칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 정중융기에서 CRF 양성 반응의 강도를 측정하였고, 정중융기에서 CRF에 염색된 부위의 광선 투과도를 측정하였으며, 정상군에서 측정된 투과도의 평균을 100%로 기준하여 대조군과 처치군의 투과도를 환산하여 양성반응의 정도를 표시하였다.

#### 6) 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 10.0 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였고, 유의수준은  $p < 0.05$  이하로 하였다.

### III. 結 果

#### 1. 체 중

대조군은 정상군에 비해 실험 2주부터 실험 종료일까지 유의성 있는 체중의 감

소를 보였고, 蒼附六君湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 실험 4주부터 실험 종료일까지 유의성 있는 증가를 보였다(Table 2).

Table 2. Effects of *Changbuyeukgun-Tang* Treatment on the Body Weights of Rats with EV-induced Polycystic Ovaries

Group	Body Weights(g)				
	0	2	4	6	8 weeks
Normal(n=8)	216±8	245±9	260±10	277±14	289±13
Control(n=8)	216±8	233±5*	234±6***	241±4***	253±8***
Treated(n=8)	215±8	238±5	242±6 <sup>##</sup>	256±5 <sup>##</sup>	266±8 <sup>##</sup>

Each data expressed as Mean±S.D.

Normal group : sesame oil injected and treated with distilled water

Control group : EV injected and treated with distilled water

Treated group : EV injected and treated with *Changbuyeukgun-Tang*

\* : Statistically significant compared with normal group(\* : p<0.05. \*\*\* : p<0.001)

# : Statistically significant compared with control group(## : p<0.01)

#### 2. 난소의 육안적 소견

육안적으로 정상군의 난소는 다양한 크기의 난포 및 황체가 잘 발달되어 있었으며, 정상적인 크기를 유지하고 있었다(Fig. 1).

대조군의 모든 난소는 현저히 위축되어 있었고, 장액으로 채워진 낭속에 매몰되어 있었으며(Fig. 2), 위축된 난소의 표면에 많은 수의 낭이 돌출되어 있거나 또는 파열되어 있었다(Fig. 3).

蒼附六君湯을 투여한 처치군의 난소는 8예 중 3예는 정상군의 난소와 비슷한 정도의 크기를 지니고 있었고, 다양한 크기의 난포 및 황체가 형성되어 있었으며, 나머지 5예도 대조군에 비해서 크기가 커져 있었다(Fig. 4).

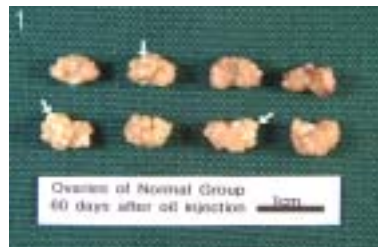


Fig. 1. Gross Structure of Ovaries of Normal Group.

Note well Developed Follicles and Corpora Lutea (arrows).



Fig. 2. Gross Structure of Representative Ovary of Control Group.

Note Serous Fluid-Filled Cyst Contained Atrophic Ovary(arrow).



Fig. 3. Gross Structure of Ovaries of Control Group.

Generally the Sizes are decreased. Note Variable Size of Cystic Follicles(long arrows) and Ruptured Cyst(short arrow).



Fig. 4. Gross Structure of Ovaries of Treated Group.

Generally the Sizes are increased than those of Control Group. Note well Developed Corpora Lutea(arrows). Compare with Fig. 3.

### 3. 난소 중량

난소 중량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 감소하였으며, 蒼附六君湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다(Table 3).

### 4. 부신 및 자궁 중량

부신 중량은 모든 군에서 유사한 정도로 측정되었고, 자궁 중량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 蒼附六君湯을 투여한 처치군은 대조군과 유사한 정도로 측정되었다(Table 4).

Table 3. Effects of *Changbuyeukgun-Tang* Treatment on the Weights of Paired Ovaries of Rats with EV-induced Polycystic Ovaries

Group	Paired Ovarian Weight(mg)
Normal (n=8)	103.4±10.8
Control (n=8)	37.4±6.7***
Treated (n=8)	54.3±9.1 <sup>#</sup>

Each data expressed as Mean±S.D.

Normal group : sesame oil injected and treated with distilled water

Control group : EV injected and treated with distilled water

Treated group : EV injected and treated with *Changbuyeukgun-Tang*

\* : Statistically significant compared with normal group(\*\*\*) : p<0.001)

# : Statistically significant compared with control group(# : p<0.01)

Table 4. Effects of *Changbuyeukgun-Tang* Treatment on the Weights of Paired Adrenal Glands and Uterus of Rats with EV-induced Polycystic Ovaries

Group	Weight(mg)	
	Paired Adrenal Glands	Uterus
Normal(n=8)	71.1±5.1	504.3±53.5
Control(n=8)	71.4±12.4	561.3±48.3*
Treated(n=8)	73.9±6.8	564.1±86.6

Each data expressed as Mean±S.D.

Normal group : sesame oil injected and treated with distilled water

Control group : EV injected and treated with distilled water

Treated group : EV injected and treated with *Changbuyeukgun-Tang*

\* : Statistically significant compared with normal group(\* : p<0.05)

### 5. 난소의 병리조직학적 소견

정상군은 난소의 표면상피층이 잘 유지되어 있었고, 다양한 크기의 1차 난포, 2차 난포 및 성숙 난포가 정상적으로 발달되어 있었으며, 다양한 크기의 윤곽이 뚜렷한 많은 수의 황체가 형성되어 있었

는데, 낭성 난포 및 폐쇄 난포는 매우 드물게 관찰되었다(Fig. 5).

대조군은 난소가 현저히 위축되어 있었으며, 난소의 표면상피층이 많은 부위에서 탈락되어 있었다. 장액을 함유한 다양한 크기의 낭성 난포가 표면으로 돌출되어 있었고, 성숙 난포의 수는 드물게 관찰되었다(Fig. 6). 대조군 8예 중 6예에서는 윤곽이 뚜렷한 황체는 형성되어 있지 않았고, 낭성 난포의 벽은 1층 또는 2층의 얇은 세포로 둘러싸여 있었으며, 강 내에 변성된 탈락세포들이 산재해 있었다.

또한, 난포 과립막 세포의 고사가 진행된 폐쇄 난포의 소견이 빈번하게 관찰되었으며, 많은 부위에 난모세포의 변성이 동반된 폐쇄된 난포들이 집단을 이루고 있는 소견이 모든 예에서 관찰되었다(Fig. 7).

蒼附六君湯을 투여한 처치군은 8예 중 3예에서만 표면상피세포층의 탈락이 관찰되었으며, 성숙 난포가 대조군에 비해서 잘 발달되어 있었다. 처치군 8예 중 7예에서 경계가 분명한 황체가 형성되어 있었으며, 대조군에 비해서 과립막세포의 집락으로 인한 결절의 형성은 드물게 관찰되었다(Fig. 8).

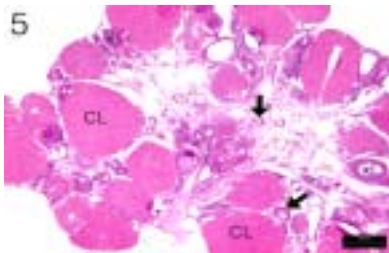


Fig. 5. Microscopic Structure of Ovary of Normal Group.

Note well Developed 2nd Follicles(arrows), Matured Follicels(asterisk) and Corpora lutea (CL). H&E Stain, Bar=0.5mm

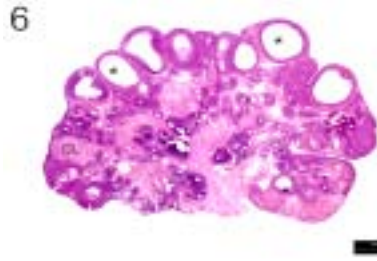


Fig. 6. Microscopic Structure of Ovary of Control Group.

Variable Sizes of Fluid Filled Cystic Follicles(CF) are developed. And Corpus Luteum(CL) is developed. H&E Stain, Bar=0.5mm

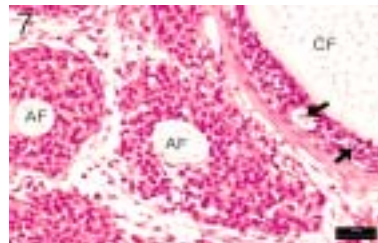


Fig. 7. Higher Magnification of Fig. 5. Note Apoptotic Granulosa Cells(arrows) and Atresic follicles(AF) with Degenerated Oocytes. H&E Stain, Bar=50 $\mu$ m

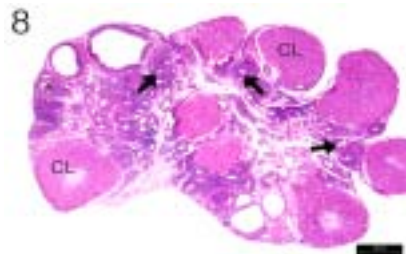


Fig. 8. Microscopic Structure of Ovary of Treated Group.

Note well Developed 2nd Follicles(asterisks) and Corpora Lutea(CL). Compared with Fig. 6. H&E Stain, Bar=0.5mm

## 6. 난포 및 황체 수

대조군은 정상군에 비해서 2차 난포, 성숙 난포 및 황체 수가 유의성 있게 감소되었으며, 폐쇄 난포 및 낭성 난포는 유의성 있게 증가되었다.

蒼附六君湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 성숙 난포 및 황체 수가 유의성 있게 증가되었으며, 폐쇄 난포 수는

유의성 있게 감소되었다. 처치군의 낭성 난포는 대조군에 감소되었으나 유의성은 없었다(Table 5).

Table 5. Effects of *Changbuyeukgun-Tang* Treatment on the Numbers of Variable Stage of Follicles and Corpora Lutea in Rats with EV-induced Polycystic Ovaries

Group	Secondary Follicle	Mature Follicle	Atresia Follicle	Cystic Follicle	Corpus Luteum
Normal(n=8)	6.4±2.4	5.3±2.5	2.6±1.4	0.5±0.5	13.4±5.1
Control(n=8)	2.5±1.4**	1.5±1.5**	18.6±6.0***	2.3±1.3**	1.6±2.3***
Treated(n=8)	3.8±1.0*	4.3±1.7 <sup>#</sup>	8.8±4.6 <sup>#</sup>	1.1±1.0	5.3±3.9 <sup>#</sup>

Each data expressed as Mean±S.D.

Normal group : sesame oil injected and treated with distilled water

Control group : EV injected and treated with distilled water

Treated group : EV injected and treated with *Changbuyeukgun-Tang*

\* : Statistically significant compared with normal group(\*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001)

# : Statistically significant compared with control group(# : p<0.05, ## : p<0.01)

### 7. 난소 조직 내 NGF 발현

정상군의 간질에서는 모든 예에서 NGF 양성 세포가 드물게 산재되어 있었고, 난포막, 과립막 및 황체에서의 NGF 양성세포는 몇 예에서만 미약하게 관찰되었다.

대조군에서는 많은 수의 간질세포, 난포막 및 과립막에서 강한 NGF 양성 반응이 확인되었고(Fig. 9, 10), 퇴화 중인 황체에서도 중 정도의 양성 반응이 확인되었다(Fig. 11).

蒼附六君湯을 투여한 처치군은 대조군과 같은 부위에서 NGF 양성 반응이 확인되었으나, 과립막, 난포막 및 황체에서의 양성 반응은 대조군에 비해서 반응의 강도가 약하게 확인되었다(Fig. 12).

정상군, 대조군 및 蒼附六君湯을 투여한 처치군의 각 개체별 난소 조직내 NGF 양성반응의 정도는 Table 6과 같다.

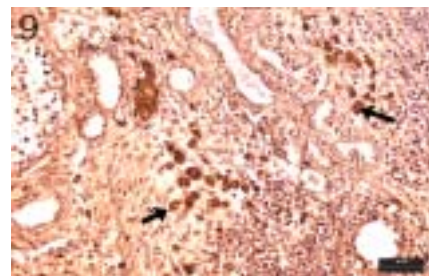


Fig. 9. NGF Positive Reaction in Ovarian Stromal Cells(arrows) from Control Group. ABC Immunohistochemical Stain, Bar=40µm

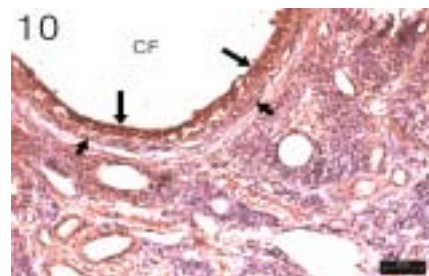


Fig. 10. NGF Positive Reaction in Granulosa Cell Layers(long arrows) and Surrounding Theca Layer(short arrows) from Control Group. CF; Cystic Follicle. ABC Immunohistochemical Stain, Bar=40µm



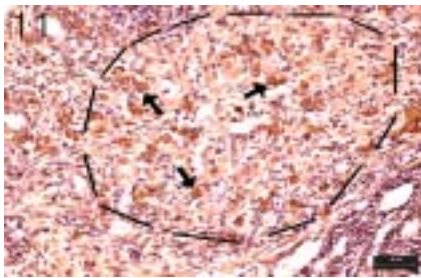


Fig. 11. NGF Positive Reaction in Cells (arrows) of Regressing Corpus Luteum (circled area) from Control Group. ABC Immunohistochemical Stain, Bar=40µm

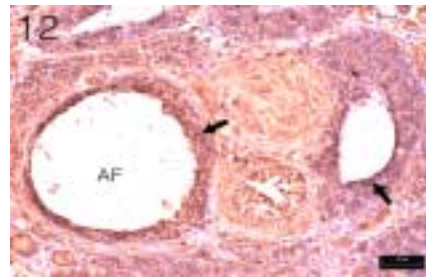


Fig. 12. NGF Positive Reaction in Granular Cell Layers(arrows) from Treated Group. The Activities of Reaction were decreased Compared with Control Group. AF; Atresic Follicle. ABC Immunohistochemical Stain, Bar=40µm

Table 6. Effects of *Changbuyeuk-Tang* Treatment on NGF Expression in Ovaries of Rats with EV-induced Polycystic Ovaries

Group-Individual No.	Stromal Cells	Theca Cells	Granulosa Cells	Luteal Cells
Normal-1	+	+	-	-
Normal-2	+	-	-	-
Normal-3	++	+	+	-
Normal-4	+	-	+	+
Normal-5	+	-	-	-
Normal-6	+	-	-	-
Normal-7	+	-	-	+
Normal-8	+	-+	+	-
Control-1	+	++	+++	+++
Control-2	++	+	+++	++
Control-3	+	++	+++	-
Control-4	+++	++	++	+
Control-5	+++	+++	+	++
Control-6	++	+	+	-
Control-7	++	++	++	+++
Control-8	++	++	++	+
Treated-1	+++	++	++	+++
Treated-2	++	++	++	+
Treated-3	+	++	+	+
Treated-4	++	+	+	++
Treated-5	++	+	++	-
Treated-6	+	+	+	+
Treated-7	+	+	+	+
Treated-8	++	+	+	+

Normal group : sesame oil injected and treated with distilled water

Control group : EV injected and treated with distilled water

Treated group : EV injected and treated with *Changbuyeuk-Tang*

- : negative , + : mild positive, ++ : moderate positive, +++ : strong positive

### 8. 뇌, 뇌하수체 및 부신 조직 내 NGF 발현

정상군, 대조군 및 蒼附六君湯을 투여한 처치군에서 뇌의 해마, 뇌하수체의 신경엽, 부신 피질에서는 NGF 양성 반응이 미약하고, 드물게 관찰되었으며, 부신 수질에서는 중등도의 양성반응이 확인되었다. 그러나 군 간의 양성 반응의 빈도 및 강도에는 차이가 없었다.

### 9. 뇌 정중융기에서 CRF 발현

정중융기에서 CRF 양성 반응은 미세한 갈색의 과립이 물결모양의 형태로 나타났다(Fig. 13).

컬러영상분석기를 이용하여 반응의 정도를 측정한 결과, 대조군의 CRF 발현 비율은 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었고, 蒼附六君湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of *Changbuyeuk-Tang* Treatment on the CRF Expression in Median Eminance of Rats with EV-induced Polycystic

Group	CRF Expression (%)
Normal(n=8)	100±13
Control(n=8)	122±14**
Treated(n=8)	108±18

Each data expressed as Mean±S.D.

Normal group : sesame oil injected and treated with distilled water

Control group : EV injected and treated with distilled water

Treated group : EV injected and treated with *Changbuyeukgun-Tang*

\* : Statistically significant compared with normal group(\*\* : p<0.01)

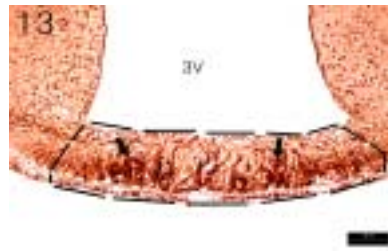


Fig. 13. CRF Positive Reactions(arrows) in Median Eminence(inside of interrupted lines) from Control Group. 3V; 3rd Ventricle. ABC Immunohistochemical Stain, Bar=40µm



Fig. 14. CRF Positive Reactions(arrows) in Median Eminence(inside of interrupted lines) from Treated Group. 3V; 3rd Ventricle. CRF Expression Ratio was less than Control Group. But Statistically Significant was not shown. ABC Immunohistochemical Stain, Bar=40µm

## IV. 考 察

일반적으로 다낭성 난소증후군의 가장 일차적인 원인은 비만으로 여겨지며, 비만에 의해 유발된 인슐린 저항성과 estrone의 과다생성이 이차적인 병인으로 작용한다<sup>12)</sup>. 그동안 다낭성 난소증후군을 진단하기 위한 기준에 대해서 학자들 간에 이견이 있었는데, 유럽에서는 난포의 수적 증가와 목걸이 형태의 난포 배열 그리고 난소 용적의 증가를 보이는 초음파소견을 중요한 진단 기준으로 삼는 데 비해, 북미지역에서는 초음파 소견보다는 hyperandrogenism이나 난소 기능부전

을 나타내는 호르몬 농도를 중요시하였다<sup>13)</sup>. 특히, 북미지역의 학자들은 초음파상 특징적인 소견은 다낭성 난소증후군 외에도 정상적으로 배란을 잘하고, 전혀 호르몬 이상 소견이 없는 여성 8-25%에서도 나타날 수 있으며<sup>14)</sup>, 그 외에 피임 약제를 복용하고 있는 경우에도 14% 정도 나타날 수 있는 것을 그 근거로 제시하였다<sup>15)</sup>. 그러나 2003년에 고안된 진단 기준<sup>16)</sup>에 따르면, 첫째 임상적으로 만성 무배란 증상을 나타내는 무월경이나 희발월경이 있는 경우, 둘째 임상적 혹은 생화학적으로 hyperandrogenism을 나타내는 경우, 셋째 초음파 검사에서 다낭성 난소의 특징적인 소견을 나타내는 경우 중 2개 이상의 소견이 있으면 다낭성 난소증후군으로 진단할 수 있다고 하였다. 물론, 다낭성 난소증후군과 유사한 증상을 보이는 androgen 분비 증양, Cushing 증후군 및 선천성 부신 과형성증과 같은 질환은 제외시키는 것은 필수적이며<sup>16)</sup>, 최근까지의 이 이론에 근거하여 다낭성 난소증후군을 진단하는 것이 일반적이다.

한편, 한의학에서는 다낭성 난소증후군에 정확히 일치되는 病名이나 辨證名을 찾을 수는 없지만, 不妊, 經閉, 月經不調, 月經後期, 肥滿 등의 辨證 범주에서 수반되어 나타나는 多毛, 肥滿, 乳房胸脇脹滿, 面部痤瘡, 小腹脹滿拒按, 帶下量多, 四肢倦怠無力<sup>3-6)</sup> 등의 증상들이 진단기준에 있어서 유사하다고 볼 수 있다.

이 관점에서 보면 沈은 근본적인 원인을 本虛表實한 것으로 인식하였는데, 本虛는 腎虛를 말하는 것으로 월경의 이상이 月經後期, 經少, 나아가 무월경 및 不妊으로 나타나는 것을 의미한다고 보았

다. 또, 表實은 氣滯血瘀의 표현인 胸脇脹滿, 乳房脹痛, 精神抑鬱, 煩燥, 易怒, 小腹脹滿 등의 증상과 痰濕의 표현인 肥滿, 多毛, 帶下量多, 四肢倦怠無力, 舌質淡胖苔多膩, 脈沈細或活 등의 증상으로 구분하여 제시하였다<sup>17)</sup>.

吳 등은 이 질환을 腎虛, 肝鬱化火, 痰濕阻滯, 氣滯血瘀, 陰虛內熱의 5가지 유형으로 분류하여 인식하였고<sup>18)</sup>, 蔡는 丹溪心法에서 “軀脂滿, 經閉者, 以導痰湯加黃連川芎”이라 한 것에 착안하여 다낭성 난소증후군에 의한 무월경의 기존적인 病機는 痰濕으로 인식하였다<sup>6)</sup>.

서양의학에서는 다낭성 난소증후군 환자의 치료 목표로 증상의 관리에 우선적 역점을 두고 있는데, 고인슐린혈증을 개선하여 심혈관계 질환을 예방하고, 혈중 androgen과 estrone의 조절을 위해 주기적으로 progesterone을 보충해 주며, 불임의 개선을 위해 과배란 요법을 사용하면서, 체중이 증가된 환자에게는 체중 조절을 중요시하고 있다<sup>2)</sup>.

한의학에서는 다낭성 난소증후군에 관련된 辨證에 따라 다양한 치료법을 제시하고 있는데, 본 연구는 傅<sup>19)</sup>가 傅靑註女科 種字門의 肥滿不妊에서 “...又因痰多愈加其濕, 脾不能受熱, 必浸潤於胞宮, 日積月累, 則胞胎竟變爲汪洋之水窟矣. 此肥滿之婦人肉必萬, 遮隔子宮不能授精...”이라 제시한 氣虛와 痰濕으로 인해 유발된 不妊의 치료법에 근거하여 다낭성 난소증후군에 대한 辨證治療의 유효성을 확인하고자 하였다.

蒼附六君湯<sup>7)</sup>은 “形盛, 多痰, 氣虛 至數月而經始行者, 宜服蒼附六君湯...”하여 數月行經, 形肥痰多인 경우에 사용되었는데, 그 구성약물 각각의 효능을 보면, 人

蓼은 大補元氣, 固脫生津, 白朮은 補裨, 益胃, 燥濕, 和中, 白茯苓은 利水滲濕, 健脾寧心, 甘草 炙는 和中緩急, 潤肺, 半夏는 燥濕化痰, 降逆止嘔, 香附子 童便은 理氣解鬱, 止痛調經, 蒼朮은 燥濕健脾, 祛風散寒 黃芩은 瀉實火, 除濕熱, 止血, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛, 當歸는 補血, 活血止痛, 陳皮는 理氣調中, 燥濕化痰, 枳殼은 破氣, 行痰, 消積의 작용 등이 있다<sup>20</sup>. 그리고, 이 處方은 방제학적으로 보면 補氣祛痰하는 六君子湯에 蒼朮, 黃芩의 祛濕作用과 香附子, 枳殼, 當歸 및 川芎의 行氣活血하는 기능을 함께 가지고 있는 것으로 볼 수 있으므로 氣虛와 痰濕으로 유발된 다낭성 난소증후군을 치료하는 의미를 찾을 수 있다.

다낭성 난소증후군에 관한 기존 연구로는 김 등<sup>21</sup>의 문헌적 고찰, 윤 등<sup>22</sup>과 이<sup>23</sup>의 한방 치료에 대한 임상적 고찰, 양 등<sup>8</sup>, 남 등<sup>9</sup> 및 유 등<sup>10</sup> 등의 다낭성 난소에 미치는 한약의 효과 및 권 등<sup>24</sup>과 Stener 등<sup>25</sup>의 다낭성 난소에 대한 전침의 효과 등이 있다.

본 연구에서는 蒼附六君湯의 다낭성 난소에 유효성을 확인하고자 EV를 흰쥐에 근육 주사하여 다낭성 난소를 유발시킨 후 한약을 경구 투여하여 흰쥐의 체중변화, 난소, 자궁 및 부신의 무게변화, 난소의 육안적 소견 및 병리학적 조직검사, NGF 및 GRF 발현의 정도를 각각 측정하였다.

다낭성 난소증후군의 중심 기관인 난소는 형태학적 및 기능적인 발달에 여러 가지 내분비가 관여하고 있으며 교감신경에 의해서 조절되고 있다. 난소의 교감신경 분포는 난소의 분비기능에 영향을 줄 뿐 아니라 난포의 발달에도 역할

을 담당하고 있는데<sup>26</sup>, 난소 교감 신경분포의 발달과 기능은 난포벽 세포에서 합성되는 NGF와 관련이 있다<sup>27,28</sup>. 그러나 NGF의 과도한 활성은 난소의 androgen을 직간접적으로 증가시키는데, 직접적으로는 난포막 세포로부터 androgen 생산을 증가시키고, 간접적으로는 norepinephrine의 작용을 통해 난소의 androgen분비를 자극하는 것이다. 난소에서 androstenedione과 testosterone이 과다생성 되면 estrone으로 전환되어 estrone이 과다분비 되고 이는 시상하부와 뇌하수체에 되먹임 기전을 통해서 LH를 증가시키고 FSH는 감소시켜서 결과적으로 estrogen과 androgen이 과다분비 되고 이는 시상하부와 뇌하수체에 되먹임 기전을 통해서 LH를 증가시키고 FSH는 감소시켜서 결과적으로 estrogen과 androgen 과다 분비의 악순환을 일으키게 된다. androgen이 과다 분비 되면 난포 성장이 억제되어 무배란이 유발되고, 다모증 역시 androgen 과잉에 의해 발생하게 되며, estrogen이 과다분비 되면 월경 불순이 유발되어 다낭성 난소 증후군의 주된 증상들이 발생하게 된다<sup>29-32</sup>.

이러한 사실은 신생 흰쥐에 NGF의 항체를 형성시켜 난소 신경의 발달을 저해했을 때 난포의 발달 장애, 성 성숙지연, estrone 분비 저하, 배란주기의 뚜렷한 불규칙성이 발생한다는 연구로 확인된 바 있고<sup>33</sup>, 이에 蒼附六君湯이 흰쥐의 다낭성 난소의 발생을 억제하는 기전을 확인하고자 NGF의 발현 정도를 난소, 해마, 뇌하수체 그리고 부신에서 관찰하였다.

스트레스로 유발된 신경내분비 시스템의 변화는 무배란과 같은 생식기능의 병리적 변화를 초래한다. CRF는 스트레스

와 연관된 peptide이고, 시상하부 부신피질에서 만들어지며, 시상하부-뇌하수체-부신의 축으로 퍼진다. CRF는 또 난소를 포함한 여러 개의 말초조직에서 발견되는데, 이 CRF의 생식능력저해효과는 스트레스에서 방출되는 내부생성 opioid의 생식능력저해효과와 마찬가지로 최근 시상하부-뇌하수체-부신의 다양한 축과 시상하부-뇌하수체-생식선의 축에 집중적으로 연구되어지고 있다. Stein 등은 뇌와 부신, 그리고 난소에서 CRF 섬유의 농도를 연구하였고, 실험적으로 무배란과 연관된 PCO를 일으킨 흰쥐에게서 전침의 효과를 또한 연구하였으며<sup>34)</sup>, 이에 본 실험에서도 다낭성 난소증후군과 연관된 생식능력 저해효과를 일으키는 CRF의 농도를 분석하였다.

먼저, 실험기간 중 흰쥐의 체중의 변화를 보면, 실험이 끝난 후 EV로 다낭성 난소가 유발된 대조군(253±8g)과 蒼附六君湯을 투여한 처치군(266±8g)은 정상군(289±13g)에 비해 다소 체중이 감소하는 경향이 있었다. 이는 다낭성 난소증후군 환자의 약 50% 정도에서 나타나는 비만<sup>27)</sup>과도 비교되는 사항으로, EV로 유발된 다낭성 난소를 가진 흰쥐의 병태학적 증상인지 또는, 실험이 진행되는 동안의 스트레스 및 다른 요인에 영향을 받은 결과인지 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

실험 종료 후 대조군의 난소 무게(37.4±6.7mg)는 정상군의 난소 무게(103.4±10.8mg)와 비교하여 현저하게 줄었는데, 이와 같은 결과는 다른 연구 보고<sup>25,35)</sup> 들에서 추론한 것과 같이 2차 난포와 황체의 수적 감소가 난소의 무게를 감소시킨 것으로 생각되어진다. 즉, 대조

군(37.4±6.7mg)에 비하여 처치군의 난소의 무게(54.3±9.1mg)가 증가한 것과 대조군에 비하여 처치군이 형태학적으로 2차 난포와 황체 수를 증가시킨 것은 蒼附六君湯이 다낭성 난소의 회복에 유의성이 있음을 입증하는 것이다.

자궁과 부신의 무게변화는 대조군이나 처치군에서 정상군에 비해 자궁과 부신의 무게가 다소 증가되었으나 모두 유의성은 없었다.

난소에 대한 육안적 소견은 정상군의 난소는 다양한 크기의 난포 및 황체가 잘 발달되어 있었으며 정상적인 크기를 유지하고 있었던 반면에 대조군의 모든 난소는 현저히 위축되어 있었고, 장액으로 채워진 낭속에 매몰되어 있었으며, 위축된 난소의 표면에 많은 수의 낭이 돌출되어 있거나 또는 파열되어 있었다. 또한 처치군에서는 8예 중 3예는 정상군의 난소와 비슷한 정도의 크기를 지니고 있었으며, 다양한 크기의 난포 및 황체가 형성되어 있었고, 나머지 5예도 대조군에 비해서 크기가 커져 있었다.

난소에 대한 병리학적 조직검사 결과는 다양한 크기의 1차 난포, 2차 난포, 성숙 난포 및 황체가 발달되고, 낭성 난포와 폐쇄 난포는 매우 드물게 관찰된 정상군에 비해 대조군에서는 난소의 표면상피층이 많은 부위에서 탈락되어 있었고, 성숙 난포의 수는 드물게 관찰되어 잘 발현된 다낭성 난소가 유발되었다. 그러나 처치군에서는 8예 중 3예에서만 표면상피세포층의 탈락이 관찰되었으며, 성숙 난포가 대조군에 비해 잘 발달되어 있었다. 또한, 처치군 8예 중 7예에서 경계가 분명한 황체가 형성되어 있었으며, 대조군에 비해서 과립막세포의

집락으로 인한 결절의 형성은 드물게 관찰되어 다낭성 난소의 현저한 감소를 나타내었다. 그리고, 난포 및 황체 수에 있어서도, 대조군은 성숙 난포( $1.5 \pm 1.5$ ) 및 황체 수( $1.6 \pm 2.3$ )가 정상군의 성숙 난포( $5.3 \pm 2.5$ ) 및 황체 수( $13.4 \pm 5.1$ )에 비해서 유의성 있게 감소되었으며, 폐쇄 난포( $18.6 \pm 6.0$ ) 및 낭성 난포( $2.3 \pm 1.3$ )의 수는 정상군의 폐쇄 난포( $2.6 \pm 1.4$ ) 및 낭성 난포( $0.5 \pm 0.5$ )에 비해 유의성 있게 증가되었다. 그러나 처치군은 대조군에 비해서 성숙 난포( $4.3 \pm 1.7$ ) 및 황체 수( $5.3 \pm 3.9$ )가 유의성 있게 증가되었으며, 폐쇄 난포( $8.8 \pm 4.6$ ) 및 낭성 난포( $1.1 \pm 1.0$ ) 수는 유의성 있게 감소되어 다낭성 난소의 현저한 감소가 증명되었다.

난소조직에서 NGF의 발현 결과를 보면, 대조군이 정상군에 비해 NGF의 발현이 뚜렷이 상승되었으며, 이는 EV에 의해 난소에서 NGF가 과잉 생산되고, 교감신경이 과도하게 활성화됨으로써 난포 발달을 억제하여 다낭성 난소가 형성되었음을 의미한다. 처치군에서는 정상군에 비해 NGF의 발현이 다소 높았지만, 대조군에 비해 NGF 발현이 상당히 감소되었는데, 뇌, 뇌하수체 및 부신피질 등에서는 蒼附六君湯의 투여에 거의 영향을 받지 않은 것으로 보아 蒼附六君湯의 NGF 발현 조절은 중추보다는 말초 영역이라는 것을 시사한다. 또한 蒼附六君湯이 난소의 NGF의 발현을 감소시킴으로써 난포의 발달, 성장, estrogen 분비 저하, 및 배란주기 회복 등에 긍정적인 역할을 하는 것으로 사료된다.

뇌 정중융기에서의 CRF 양성 반응을 컬러영상분석기를 이용하여 반응정도를 측정된 결과 대조군의 CRF 발현 비율

은 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다.

결론적으로 본 연구에서 蒼附六君湯을 투여한 처치군은 체중, 난소 중량, 성숙 난포 수, 폐쇄 난포 수, 황체 수 및 난포 조직 내 NGF 양성반응에서 대조군에 비해 유의한 변화가 관찰되었으며, 이상의 실험결과를 볼 때 蒼附六君湯은 임상적으로 다낭성 난소증후군 환자의 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

蒼附六君湯이 EV로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향을 확인하기 위해 8주 후에 부검하여 난소, 부신 및 자궁 무게 측정, 난소의 육안적 소견 및 병리조직학적 검사, 성숙 난포, 폐쇄 난포 및 황체 수의 측정, NGF와 CRF의 면역조직학적 발현을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 흰쥐의 체중(g)은 처치군이 대조군보다 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 증가되었다.
2. 난소의 무게(mg)는 처치군이 대조군보다 유의성( $p < 0.001$ ) 있게 증가되었다.
3. 성숙 난포 수는 처치군이 대조군보다 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 증가되었다.
4. 폐쇄 난포 수는 처치군이 대조군보다 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 감소되었다.
5. 황체 수는 처치군이 대조군보다 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가되었다.
6. 난포 조직내 NGF 양성반응은 처치군이 대조군에 비해서 감소되어 나타났다.
7. 뇌 정중융기에서 CRF 발현 비율은 처치군은 대조군에 비해 감소를 보였

으나 통계적 유의성은 없었다.

이상의 결과로 蒼附六君湯은 EV로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에서 난포의 성숙을 유도하여 정상 배란을 촉진하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 4월 25일
- 심 사 일 : 2008년 4월 29일
- 심사완료일 : 2008년 5월 10일

### 參考文獻

1. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181-191.
2. 김정훈. 다낭성 난소증후군 치료의 최신지견. *대한산부인과학회지.* 2005;48(8):1851-1869.
3. 陳貴延, 楊思樹. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1991; 1004-1009.
4. 羅元愷. 實用中醫婦科學. 上海:上海科學技術出版社. 1994;262, 271-275.
5. 陳玲, 王明英, 王君. 健脾益腎化痰湯治療多囊卵巢綜合證 30例. *江蘇中醫.* 1997;7:31.
6. 周羽珍. 蔡小蓀治療婦科痼疾驗方拾萃. *江蘇中醫.* 1999;7:31.
7. 葉桂. 葉天士女科. 서울:대성문화사. 1995;14.
8. 양승정 등. 蒼附導痰湯이 Estradiol Valerate 로 유발된 백서의 다낭성 난소에 미치는 影響. *대한한방부인과학회지.* 2002; 15(2):1-11.
9. 남은정 등. 定經湯이 Estradiol Valerate 로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 影響. *대한부인과학회지.* 2007;20(1):99-114.
10. 유영기 등. 腎氣丸合蒼附導痰湯이 Estradiol Valerate 로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 影響. *대한부인과학회지.* 2007;20(1):84-98.
11. Brawer JR et al. Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic accurate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinology.* 1978;103:501-512.
12. 김인주. 다낭성 난소 증후군과 여성 건강. *대한내분비학회지.* 2001;10(3):187-203.
13. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, editors. *Polycystic ovary syndrome.* Oxford, England: Blackwell Scientific. 1992;377-384.
14. Polwon DW et al. Polycystic ovaries: a common finding in normal women. *Lancet.* 1988;1:870-872.
15. Clayton RN et al. How common are polycystic ovaries in normal women and what there significance for the fertility of the Population? *Clin. Endocrinol.* 1992;37:127-134.
16. The Rotterdam ESGRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004 ;81:19-25.

17. 陳貴延, 楊思樹. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京: 中國醫藥科技出版社. 1991;1004-1009.
18. 五桂芳, 李祥云. 中醫藥治療多囊卵巢綜合證研究概況, 河南中醫. 1994;14(2):123-125.
19. 傅靑主. 傅靑註女科. 서울: 대성문화사. 1992;102,106-107.
20. 본초학 교수 공저. 본초학. 서울: 영림사. 1991;178, 289, 302, 347, 351, 531, 536, 540, 578.
21. 김동일, 윤종원, 이태균. 다낭성 난소 증후군에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1997;10(1):73-91.
22. 윤소영, 강명자. 다낭성 난소증후군 환자의 한방치료에 대한 임상적 고찰. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):437-451.
23. 이재성. 다낭성 난소 소견을 동반한 비만여성 불임 치험 1례: 증례 보고. 대한한방부인과학회지. 2005;5(1):157-163.
24. 권세라 등. 三陰交·子宮穴 전침 자극이 백서의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):76-86.
25. Stener-Voctorin et al. Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. Biol Reprod. 2000;63(5):1497-1503.
26. Lara HE et al. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. Endocrinology. 1993;133(6):2690-2695.
27. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. Science. 1987;237(4819):1154-1162.
28. Dissen GA et al. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. Endocrinology. 1996;137(1):198-209.
29. Dissen GA et al. Intraovarin excess of nerve growth factor increase androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. Endocrinology. 2000;141(3):1073-1081.
30. Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. Endocrinology. 1982;110(4):1124-1132.
31. Dyer CA, Erickson GF. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-intestitial cells. Endocrinology. 1985;116(4):1645-1652.
32. 대한내분비학회. 내분비학. 서울: 고려의학. 1999;622-623.
33. Barria A et al. Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovarian syndromes: role of the sympathetic innervation. Endocrinology. 1993;133(6):2696-2703.
34. E. Stener-Voctorin et al. Effects of electro-acupuncture on corticotropin-releasing factor in rats with polycystic ovaries. Neuropeptides. 2001;35(5,6):227-231.
35. 김탁. 다낭성 난소증후군의 최신지견. 대한산부인과학회; 연수강좌. 2002;(31):38-44.