

## 歸脾湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향

세명대학교 한의과대학 한방부인과교실

이연경, 서일복, 이동녕, 김형준

### ABSTRACT

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

Yeon-Kyeong Lee, Il-Bock Seo, Dong-Nyung Lee, Hyung-Jun Kim  
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

**Purpose:** This study was designed to investigate the effects of *Gwibi-Tang*(GBT) on the polycystic ovary(PCO) induced by estradiol valerate(EV) in rats.

**Methods:** PCO was induced by single intramuscular injection with EV(4mg) in female rats. Normal group(n=8) were injected with sesame oil and orally administrated distilled water for eight weeks. PCO control group(n=8) were injected with EV and orally administrated distilled water for eight weeks. GBT treated group(n=8) were injected with EV and orally administrated GBT for eight weeks. Then we measured weight of body, ovaries, adrenal glands, and uterus of rats. The histopathology changes of ovaries were also evaluated. The expression of nerve growth factor(NGF) was analyzed in the central nervous system, adrenal glands and ovaries by immunohistochemistry. And also CRF expression in median eminence of Rats were analyzed.

**Results:**

1. The weight(g) of rats in GBT treated group(275±14) was significantly increased(p<0.01) compared with control group(253±8).
2. The weight(mg) of ovaries in GBT treated group(75.8±16.7) was significantly increased(p<0.001) compared with control group(37.4±6.7).
3. The number of mature follicles in GBT treated group(3.6±1.2) was significantly increased(p<0.01) compared with control group(1.5±1.5).
4. The number of atretic follicles in GBT treated group(8.0±3.1) was significantly decreased(p<0.01) compared with control group(18.6±6.0).
5. The number of cystic follicles in GBT treated group(0.5±0.5) was significantly increased(p<0.01) compared with control group(2.3±1.3).
6. The number of corpora lutea in GBT treated group(6.1±3.9) was significantly increased(p<0.01) compared with control group(1.6±2.3).
7. The expression of NGF-immunoreactive cells in the ovarian granulosa cells in GBT treated group was lesser observed than control group.

**Conclusion:** From the above results, we concluded that *Gwibi-Tang* has inhibitory effect on the development of EV-induced polycystic ovary. And it's effect may be related with decreased NGF activities in the ovary.

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

## I. 緒 論

다낭성 난소 증후군(polycystic ovarian syndrome, PCOS)은 가임기 여성에서 가장 흔하게 발생하는 내분비 질환으로 임상증상은 희소월경이나 무월경과 같은 월경장애와 다모증, 여드름 등의 안드로젠과다증 뿐 아니라 비만, 고지혈증, 내당능 장애, 고혈압 등의 대사 이상이 동반되는 등 매우 다양하다<sup>1-3)</sup>. 현재까지의 많은 연구에도 불구하고 다낭성 난소 증후군의 원인과 병태 생리는 아직 완전히 밝혀지지 못하고 있으나, 복합적인 유전자 형질과 연관이 있으며 고인슐린혈증과 고안드로젠혈증에 의한 호르몬 불균형으로 난소의 기능적 이상이 초래되는 것으로 이해되고 있다<sup>1,2,4)</sup>.

한의학 문헌에서는 다낭성 난소 증후군과 일치하는 병명은 없지만 증상에 따라 經閉, 月經不調, 無子, 肥胖, 不妊, 多毛 등의 범주로 볼 수 있으며, 주요 변증으로 實證인 痰濕阻滯, 肝鬱化火, 氣滯血瘀와 虛證인 氣血兩虛, 腎虛, 脾腎陽虛 등으로 분류하고 있다<sup>5-10)</sup>.

그동안의 다낭성 난소 증후군과 관련된 실험 연구는 양 등<sup>11)</sup>의 蒼附導痰湯, 유 등<sup>12)</sup>의 腎氣丸合蒼附導痰湯, 남 등<sup>13)</sup>의 定經湯에 관한 연구로, 각 처방들은 痰濕, 腎虛挾痰, 腎虛肝鬱에 효능이 있다고 알려져 있다.

이에 저자는 虛證의 氣血兩虛에 응용할 수 있는 歸脾湯이 다낭성 난소 증후군에 미치는 효과를 알아보고자 Estradiol Valerate(EV)를 흰쥐에 근육주사하여 다낭성 난소를 유발시킨 후 난소와 부신 및 자궁의 중량, 난소의 육안관찰 및 병리조직학적 관찰, 난소 및 황체 수의 측

정, 뇌, 뇌하수체, 부신 및 난소의 신경성장인자(NGF) 발현 차이와 corticotropin releasing factor(CRF) 면역조직화학적 검사를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 실험동물

체중 190 g 내외의 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(샘타코, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정된 세명대학교 청정동물사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다.

### 2. 다낭성 난소의 유발

다낭성 난소(polycytic ovaries, PCO)는 Brawer 등<sup>14)</sup>의 방법에 준하여 유발하였다. Estradiol valerate(EV)(Sigma, USA)를 0.5 ml의 benzyl alcohol(Sigma, USA)에 용해시킨 후 sesame oil(Sigma, USA)에 20 mg/ml의 농도로 혼합하고 이 용액 0.2 ml를 1회 둔부 근육에 주사하여 PCO를 유발시켰다.

### 3. 검액의 제조

실험에 사용한 歸脾湯은 《方劑學》<sup>15)</sup>에 의거하였으며, 약재는 세명대학교 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다. 처방의 내용과 1첩당 분량은 Table 1과 같다.

歸脾湯 4첩 분량(218 g)을 2,000 ml의 증류수에 2시간 동안 침지시킨 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 원심하

여 침천된 성분을 제거한 후 감압농축기 (EYELA, NE-1001, Japan)로 100 ml로 농축시켰다. 이 농축액 1 ml를 흰쥐 마리당 1일 투여량으로 하였으며, 이 용량은 체중 비례로 환산하여 60 kg 성인의 1일 복용량의 약 5배에 해당되는 용량이다.

Table 1. Prescription of *Gwibi-Tang* Per Pack

| 韓藥名   | 生藥名                                 | 用量(g) |
|-------|-------------------------------------|-------|
| 當歸    | <i>Angelicae Gigantis Radix</i>     | 4     |
| 龍眼肉   | <i>Longanae Arillus</i>             | 4     |
| 酸棗仁   | <i>Zizyphi Spinosa Semen</i>        | 4     |
| 人蔘    | <i>Ginseng Radix</i>                | 4     |
| 黃芪    | <i>Astragale Radix Atractylodis</i> | 4     |
| 白朮    | <i>Macrocephalae Rhizoma</i>        | 4     |
| 白茯苓   | <i>Hoelen Alba</i>                  | 4     |
| 遠志    | <i>Polygalae Radix</i>              | 2     |
| 木香    | <i>Aucklandiae Radix</i>            | 2     |
| 甘草    | <i>Glycyrrhizae Radix</i>           | 1.5   |
| 生薑    | <i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>    | 15    |
| 大棗    | <i>Jujubae Fructus</i>              | 6     |
| Total |                                     | 54.5  |

#### 4. 실험군의 분류

EV 접종일에 아래와 같이 군을 분류하고 처치하였으며, 각 군당 체중이 유사하도록 8마리씩 배정하였다.

정상군(Normal Group): Sesame oil만을 1회 둔부 근육에 주사하고 8주간 증류수 1 ml를 경구투여한 군

대조군(Control Group): EV를 둔부 근육에 주사하고 8주간 매일 1회 증류수 1 ml를 경구투여한 PCO 유발군

처치군(Treated Group): EV를 둔부 근육에 주사하고 8주간 매일 1회 歸脾湯

감압농축액 1 ml를 경구투여한 처치군

#### 5. 검사 항목 및 방법

##### 1) 체중의 측정

실험개시일, 실험 후 2주, 4주, 6주 및 8주에 체중을 측정하였다.

##### 2) 난소, 부신 및 자궁 중량 측정

실험종료일에 흰쥐를 ether로 마취하고 전혈을 심장을 통해서 채혈한 후 4% paraformaldehyde 액으로 관류고정 하였다. 고정 후 양측 난소, 부신 및 자궁을 적출하여 정밀화학저울(AND GR-202, Japan)로 무게를 측정하였다.

##### 3) 난소의 육안 관찰

부검하여 적출된 양측 난소를 육안으로 관찰하고 군별로 모든 난소를 사진촬영 하였다.

##### 4) 난소의 병리조직학적 관찰과 난소 및 황체 수의 측정

개체 당 한 쪽 난소를 일반적인 조직처리과정을 거쳐서 파라핀 포매하고 5 μm의 박절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색하여 광학현미경하에서 일반적인 병리조직학적 소견을 관찰하였다. 또한 각 난소조직에서의 난포 수 및 황체의 수를 계수하였다. 난포의 수는 난모세포가 관찰되는 난포만을 대상으로 계수하였으며, 난포막이 형성되고 과립막세포가 증충으로 증식된 2차 난포, 난포동이 형성된 성숙난포, 난모세포의 변성 또는 과립막 세포의 고사(apoptosis)가 관찰되는 폐쇄 난포를 각 각 구분하여 계수하였다. 황체는 외난포막으로 뚜렷하게 둘러싸인 것만을 계수 하였으며, 황체의 경계가 불분명한 퇴화 중인 것은 계수에서 제외하였다.

##### 5) Nerve Growth Factor(NGF) 면역

조직화학적 검사

뇌, 뇌하수체, 부신 및 난소를 적출하여 picric acid가 포함된 Zamboni 액에 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 500 W 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. 일차 항체인 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 0.05 M PBS butter(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 +, 중정도의 양성반응을 ++, 강한 양성반응을 +++로 표시하였다.

6) Corticotropin Releasing Factor(CRF)

면역조직화학적 검사

뇌를 적출하여 picric acid가 포함된 Zamboni 액에 12시간 고정하였다. 고정된 뇌조직의 정중용기(median eminence) 부위의 시상단면을 만들어 일반적인 처

리 과정을 거쳐 파라핀 포매하고 5  $\mu\text{m}$  두께의 박절편을 제작하였다. 탈파라핀 및 합수 과정을 거친 조직을 protinase 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. 일차 항체인 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 0.05 M PBS butter(pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였다. 반응이 종료된 절편을 DAB(Roche, Germany)로 5분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 CRF 양성반응의 정도를 확인하였다.

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

7) 통계처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 10.0 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 검증하였다.

### III. 結 果

#### 1. 체 중

대조군은 정상군에 비해서 실험 2주부

터 실험 종료일까지 유의성 있는 체중의 감소를 보였다. 처치군은 대조군에 비해서 실험 4주부터 실험 종료일까지 유의성 있는 증가를 보였다(Table 2).

Table 2. Effects of *Guibi-Tang* Treatment on the Body Weight of Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

| Group        | Body Weight(g)      |        |                      |                      |                      |
|--------------|---------------------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
|              | 0                   | 2      | 4                    | 6                    | 8 weeks              |
| Normal(n=8)  | 216±8 <sup>a)</sup> | 245±9  | 260±10               | 277±14               | 289±13               |
| Control(n=8) | 216±8               | 233±5* | 234±6***             | 241±4***             | 253±8***             |
| Treated(n=8) | 216±8               | 239±10 | 251±13 <sup>##</sup> | 258±13 <sup>##</sup> | 275±14 <sup>##</sup> |

a) : data expressed as Mean±S.D.

Normal : sesame oil injected and treated with distilled water

Control : EV injected and treated with distilled water

Treated : EV injected and treated with *Guibi-Tang*

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

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

#### 2. 난소의 육안 소견

육안적으로 정상군의 난소는 다양한 크기의 난포 및 황체가 잘 발달되어 있었으며 정상적인 크기를 유지하고 있었다(Fig. 1). 대조군 8예 모두의 난소는 현저히 위축되어 있었으며 장액으로 채워진 낭속에 매몰되어 있었다(Fig. 2). 위축된 난소의 표면에 많은 수의 낭이 돌출되어 있거나 또는 파열되어 있었다(Fig. 3). 처치군의 난소는 8예 중 5예는 정상군의 난소와 비슷한 정도의 크기를 지니고 있었으며 다양한 크기의 난포 및 황체가 형성되어 있었고, 나머지 3예도 대조군에 비해서 크기가 커져 있었다(Fig. 4).

다(Table 3).



Fig. 1. Gross structure of ovaries of normal group. Note well developed follicles and corpora lutea(arrow).

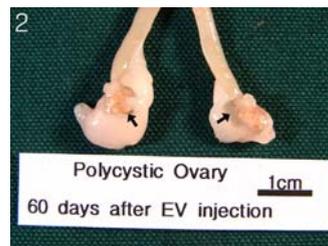


Fig. 2. Gross structure of representative ovaries of control group. Note serous fluid-filled cysts contained atrophic ovaries (arrows)

#### 3. 난소 중량

난소 중량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 감소하였으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었



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.

Table 3. Effects of *Gwibi-Tang* Treatment on the Weight of Paired Ovaries of Rats with Estradiol Valerate (EV)-induced Polycystic Ovaries

| Group        | Paired Ovarian Weight(mg) |
|--------------|---------------------------|
| Normal(n=8)  | 103.4±10.8 <sup>a)</sup>  |
| Control(n=8) | 37.4±6.7 <sup>***</sup>   |
| Treated(n=8) | 75.8±16.7 <sup>###</sup>  |

a) : data expressed as Mean±S.D.  
 Normal : sesame oil injected and treated with distilled water  
 Control : EV injected and treated with distilled water  
 Treated : EV injected and treated with *Gwibi-Tang*  
 \* : Statistically significant compared with normal group(\*\*\*:p<0.001)  
 # : Statistically significant compared with control group(###:p<0.001)

#### 4. 자궁 및 부신 중량

자궁 중량은 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해 감소되었으나 유의성 있는 차이는 없었다(Table 4).

부신 중량은 모든 군에서 유사한 정도로 측정되었다.

Table 4. Effects of *Gwibi-Tang* Treatment on the Weight of Paired Adrenal Glands and Uterus of Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

| Group         | Weight(mg)             |             |
|---------------|------------------------|-------------|
|               | Paired Adrenal Glands  | Uterus      |
| Normal (n=8)  | 71.1±5.1 <sup>a)</sup> | 504.3±53.5  |
| Control (n=8) | 71.4±12.4              | 561.3±48.3* |
| Treated (n=8) | 71.8±8.3               | 546.4±69.4  |

a) : data expressed as Mean±S.D.  
 Normal : sesame oil injected and treated with distilled water  
 Control : EV injected and treated with distilled water  
 Treated : EV injected and treated with *Gwibi-Tang*  
 \* : Statistically significant compared with normal group(\*:p<0.05)

#### 5. 난소의 병리조직학적 소견

정상군에서는 난소의 표면상피층이 잘 유지되어 있었고, 다양한 크기의 일차 난포, 2차 난포 및 성숙난포가 정상적으로 발달되어 있었으며 다양한 크기의 윤곽이 뚜렷한 많은 수의 황체가 형성되어 있었다(Fig. 5). 정상군에서는 남성 난포 및 폐쇄 난포는 매우 드물게 관찰되었다.

대조군에서는 난소가 현저히 위축되어 있었으며, 난소의 표면상피층이 많은 부

위에서 탈락되어 있었다. 장액을 함유한 다양한 크기의 낭성 난포가 표면으로 돌출되어 있었고, 성숙 난포의 수는 드물게 관찰되었다(Fig. 6). 대조군 8예중 6예에서는 윤곽이 뚜렷한 황체는 형성되어 있지 않았다. 낭성 난포의 벽은 1층 또는 2층의 얇은 세포로 둘러싸여 있었으며 강내에 변성된 탈락세포들이 산재해 있었다. 또한 난포 과립막 세포의 고사(apoptosis)가 진행된 폐쇄 난포의 소견이 빈번하게 관찰되었으며, 많은 부위에 난모세포의 변성이 동반된 폐쇄된 난포들이 집단을 이루고 있는 소견이 모든 예에서 관찰되었다(Fig. 7).

처치군에서는 8예중 2예에서만 표면상 피세포층의 탈락이 관찰되었으며, 성숙 난포가 대조군에 비해서 잘 발달되어 있었고, 처치군 8예 모두에서 경계가 분명한 황체가 형성되어 있었다(Fig. 8).

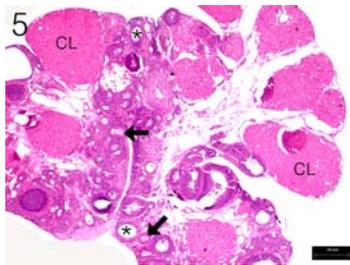


Fig. 5. Microscopic structure of ovary of normal group. Note well developed 2nd follicles(arrows), matured follicles(asterisks) and corpora lutea(CL). H&E stain, bar=0.5 mm

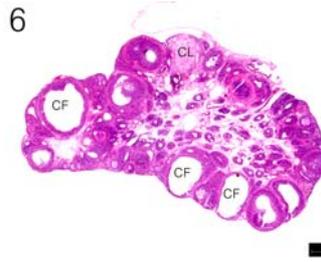


Fig. 6. Microscopic structure of ovary of control group. Variable sizes of fluid filled cystic follicles(CF) are developed. One corpus luteum(CL) is developed. H&E stain, bar=0.5 mm

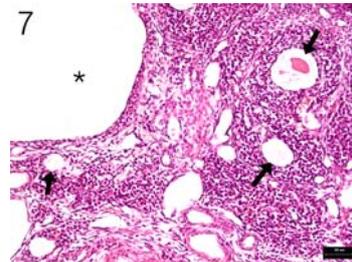


Fig. 7. Higher magnification of Fig. 6. Note thin layer of the cystic follicular walls(\*) and atresic follicles(arrows). H&E stain, bar=50 μm

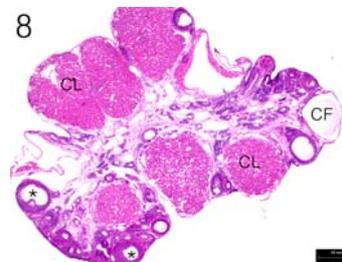


Fig. 8. Microscopic structure of ovary of treated group. Note well developed matured follicles (asterisks) and corpora lutea(CL). CF; cystic follicles. Compare with Fig. 6. H&E stain, bar=0.5 mm

### 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.

처치군은 대조군에 비해서 성숙 난포 및 황체 수가 유의성 있게 증가되었으며,

폐쇄 난포 및 낭성 난포는 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Table 5).

Table 5. Effects of *Gwibi-Tang* Treatment on the Number of Variable Stage of Follicles and Corpora Lutea in Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

| Group        | Secondary Follicle    | Mature Follicle       | Atresic Follicle      | Cystic Follicle       | Corpus Luteum         |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Normal(n=8)  | 6.4±2.4 <sup>a)</sup> | 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) | 4.3±1.8               | 3.6±1.2 <sup>##</sup> | 8.0±3.1 <sup>##</sup> | 0.5±0.5 <sup>##</sup> | 6.1±3.9 <sup>##</sup> |

a) : data expressed as Mean±S.D.

Normal : sesame oil injected and treated with distilled water

Control : EV injected and treated with distilled water

Treated : EV injected and treated with *Gwibi-Tang*

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

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

### 7. 난소 조직내 Nerve Growth Factor (NGF) 발현

정상군의 간질에서는 8예 모두에서 NGF 양성 세포가 드물게 산재되어 있었고, 난포막, 과립막 및 황체에서는 몇 예에서만 NGF 양성 반응이 관찰되었다.

대조군에서는 많은 수의 간질세포, 난포막과 과립막에서 강한 NGF 양성 반응이 확인되었다(Fig. 9 & 10). 또한 퇴화 중인 황체에서도 중 정도의 양성 반응이 확인되었다(Fig. 11).

처치군은 대조군과 같은 부위에서 NGF 양성 반응이 확인되었으나 과립막, 난포막 및 황체에서의 양성 반응은 대조군에 비해서 양성 반응의 강도가 약하게 관찰되었다(Fig. 12).

정상군, 대조군 및 처치군의 각 개체별 난소 조직내 NGF 양성반응의 정도는 Table 6과 같다.

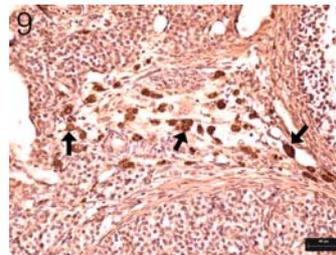


Fig. 9. Nerve growth factor(NGF) positive reaction in ovarian stromal cells(arrows) from control group. ABC immunohistochemical stain, bar=40 μm

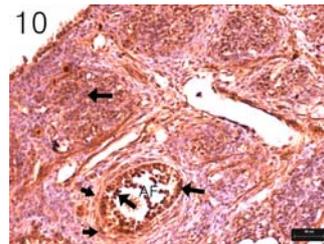


Fig. 10. Nerve growth factor(NGF) positive reaction in granular cell layers (large arrows) and surrounding theca layer(small arrows) from control group. AF; atresic follicle. ABC immunohistochemical stain, bar=40 μm

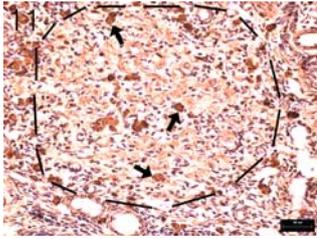


Fig. 11. Nerve growth factor(NGF) positive reaction in cells(arrows) of regressing corpus luteum (circled area) from control group. ABC immunohistochemical stain, bar=40  $\mu$ m

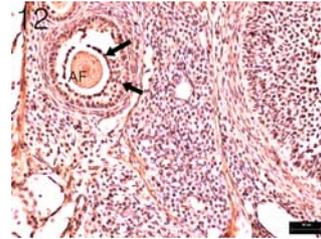


Fig. 12. Nerve growth factor(NGF) positive reaction in granular cell layer (arrows) from treated group. The activities of reaction were decreased compared with control group. AF; atresic follicle. ABC immunohistochemical stain, bar=40  $\mu$ m

Table 6. Effects of *Gwibi-Tang* Treatment on the Nerve Growth Factor(NGF) Expression in Ovaries of Rats with Estradiol Valerate(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 : sesame oil injected and treated with distilled water

Control : EV injected and treated with distilled water

Treated : EV injected and treated with *Gwibi-Tang*

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

8. 뇌, 뇌하수체 및 부신 조직내 NGF 발현

정상군, 대조군 및 처치군에서 뇌의 해마, 뇌하수체의 신경엽, 부신 피질에서는 NGF 양성 반응이 미약하고 드물게 관찰되었으며, 부신 수질에서는 중 정도의 양성반응이 확인되었다. 그러나 모든 군 간에 양성 반응의 빈도 및 강도에는 차이가 없었다.

9. 정중용기에서 Corticotropin Releasing Factor(CRF) 발현

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

칼라영상분석기를 이용하여 반응의 정도를 측정된 결과, 대조군의 CRF 발현 비율은 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 14)(Table 7).

Table 7. Effects of *Gwibi-Tang* Treatment on the Corticotropin Releasing Factor(CRF) Expression in Median Eminence of Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic

| Group        | CRF Expression (%)   |
|--------------|----------------------|
| Normal(n=8)  | 100±13 <sup>a)</sup> |
| Control(n=8) | 122±14**             |
| Treated(n=8) | 108±15               |

a) : data expressed as Mean±S.D.  
 Normal : sesame oil injected and treated with distilled water  
 Control : EV injected and treated with distilled water  
 Treated : EV injected and treated with *Gwibi-Tang*  
 \* : Statistically significant compared with normal group(\*\*:p<0.01)

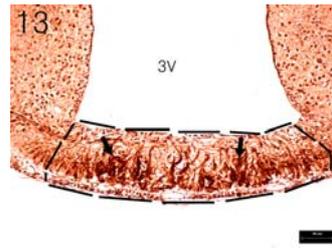


Fig. 13. Corticotropin releasing factor (CRF) positive reactions (arrows) in median eminence(inside of interrupted lines) from control group. 3V; 3rd ventricle. ABC immunohistochemical stain, bar=40 μm

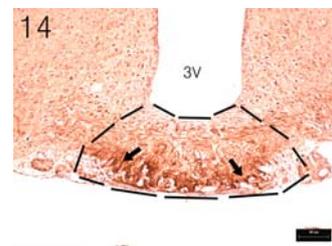


Fig. 14. Corticotropin releasing factor (CRF) positive reactions (arrows) in median eminence(inside of interrupted lines) from treated group. 3V; 3rd ventricle. CRF expression ratio was lesser than control group. But statistically significant was not shown. ABC immunohistochemical stain, bar=40 μm

IV. 考 察

다낭성 난소 증후군은 1935년 Stein과 Leventhal이 무월경, 다모증, 비만의 일련의 증후군을 보고한 후 이를 다낭성 난소 증후군(Polycystic ovarian syndrome: PCOS) 혹은 다낭성 난소 질환(Polycystic ovarian disease: PCOD) 등으로 지칭되어 왔다<sup>16,17)</sup>.

이 질환은 가임기 연령의 여성들 중 약 5~15% 정도의 발병률을 보이는데 무배란성 불임환자의 73%가 이 질환을

가지고 있으며 다모증이 있는 경우는 약 85%, 이차성 무월경 환자의 경우는 75% 정도가 이 질환이 원인인 것으로 조사되어 있다<sup>1)</sup>.

그 임상 증후군과 검사 소견은 다양한 형태로 나타나는데 가장 많이 사용되는 진단기준은 1990년에 NIH에서 결정한 것과 2003년에 ESHRE 및 ASRM에서 정한 것이다. 1990년 NIH의 진단기준은 (1) 고안드로겐증 혹은 고안드로겐혈증 (2) 만성적인 무배란 (3) 고프로락틴혈증, 갑상샘질환, 선천부신증식증 등의 관련 질환 감별 등으로 구성된다. 2003년 ASRM/ESHRE Rotterdam consensus를 통하여 설정된 “PCOS diagnostic criteria”는 다음 3가지 중 2가지 이상을 만족해야 한다. (1) 희발성 배란 또는 무배란 (2) 고안드로겐증의 임상적 그리고/또는 생화학적 증거 (3) 다낭성 난소. 이와 동시에 선천성 부신 증식증, 안드로겐-분비 증양, Cushing 증후군 등과 같은 다른 원인을 제외해야 한다<sup>2,3)</sup>.

다낭성 난소 증후군의 병인은 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만 GnRH의 분비체계 이상, 부신의 안드로겐 생산 이상, 난소 자체의 안드로겐 합성의 이상, 인슐린 저항성 등 여러 가지 가설이 제기되고 있다<sup>18,19)</sup>.

서양의학에서의 다낭성 난소 증후군의 치료는 다모증, 여드름과 같은 고안드로겐증의 증상을 최소화하고, 배란장애(월경불순, 불임)를 개선하고, 제2형 당뇨병, 심혈관 질환 등과 같은 만성 합병증을 예방하고자 하는 여러 목적을 가지고 이루어진다. 이에 따라 경구 피임약, clomiphene, 항안드로겐제 등의 치료뿐 아니라 안드로겐 생산을 증가시키는 고

인슐린혈증과 인슐린 저항성 완화를 위해 인슐린 감작제와 같은 새로운 치료가 시도되고 있다<sup>2,4,19)</sup>.

한의학에서는 본 증후군이 표현하는 증상에 따라 經閉, 月經不調, 無子, 肥胖, 不妊, 多毛 등의 범주로 인식하여 치료해 왔다<sup>20,21)</sup>. 그 변증에 있어 吳<sup>8)</sup> 등은 腎虛, 肝鬱化火, 痰濕阻滯, 氣滯血瘀, 陰虛內熱로 분류하여 치료하였고 金<sup>9)</sup>은 腎虛痰實, 肝鬱化火, 腎虧血瘀로, 施<sup>10)</sup>는 氣血陽虛, 脾腎陽虛, 肝火로 인식하여 치료하였다.

다낭성 난소 증후군에 관한 연구로는 김 등<sup>22)</sup>의 문헌적 고찰과 윤 등<sup>23)</sup>의 한방 치료에 대한 임상적 고찰과 같은 문헌적 연구와 함께 실험적 연구인 양 등<sup>11)</sup>의 蒼附導痰湯, 유 등<sup>12)</sup>의 腎氣丸合蒼附導痰湯, 남 등<sup>13)</sup>의 定經湯, 권 등<sup>20)</sup>과 Stener 등<sup>21)</sup>의 전침의 효과에 대한 연구들이 있다.

歸脾湯은 宋代 嚴<sup>24)</sup>의 《濟生方》에 최초로 기재된 처방으로 補脾益氣 養血安神하여 心脾兩虛로 발생하는 健忘, 怔忡 등을 치료하고 免疫力을 증진하는 효능이 있다고 알려져 있으며<sup>15,25,26)</sup>, 부인과에서는 주로 月經不調, 帶下, 血崩, 胎漏, 갱년기증후군 등의 질환에 활용하고 있다<sup>17-19)</sup>. 月經不調의 치료효능이 있는 본 처방을 施<sup>12)</sup>는 氣血兩虛로 발생하는 다낭성 난소질환에 응용할 수 있다고 언급하였다.

이에 저자는 기존의 다낭성 난소 증후군과 관련된 실험 논문들이 實證, 또는 虛實挾雜의 처방들을 활용한 연구였으며, 虛證으로 발생할 수 있는 다낭성 난소질환에 활용할 수 있는 처방에 관한 실험이 없었기에 氣血兩虛의 대표적인

처방인 歸脾湯이 다낭성 난소 증후군에 유의한 효과가 있는지 확인하고자 본 실험을 실시하였다.

현재까지 사람의 다낭성 난소 증후군과 같은 모든 비정상적인 병리 상태가 유발되는 동물 모델은 없지만, EV를 흰쥐에 주사하면 병리조직학적으로 퇴화된 난포동 난포(atretic antral follicles)와 잘 발달된 난포막층(theca cell layer)을 갖고 있는 난포낭(follicular cysts), 감소된 과립막 세포(granulosa cells), 황체화된 낭(luteinized cysts) 등 사람의 다낭성 난소와 유사한 병변이 유발된다<sup>14,27)</sup>.

실험 종료 후 대조군은 심하게 위축되어 있는 난소와 많은 수의 낭이 육안적으로 관찰되었고, 병리조직학적으로도 다양한 크기의 낭성 난포와 비정상적인 황체 및 난포가 확인되었으며, 2차 난포, 성숙 난포 및 황체 수도 유의성 있는 감소를 보였다. 이러한 결과는 EV의 투여로 흰쥐의 다낭성 난소가 성공적으로 유발되었음을 의미한다.

처치군에서는 난소의 크기가 정상군과 비슷하거나 대조군에 비해 커져있었고 병리조직학적 소견에서도 성숙난포와 황체가 대조군보다 잘 발달되어 있었다. 또한 성숙 난포와 황체 수는 대조군과 비교하여 유의성 있는 증가를 보였으며, 폐쇄 난포와 낭성 난포의 수는 유의성 있게 감소되었다. 이는 歸脾湯이 흰쥐의 다낭성 난소 발달을 억제하며 난소의 성장 발달에 유의한 영향을 미친 것임을 시사한다.

EV를 접종한 대조군과 처치군은 정상군에 비해 실험 2주부터 유의성 있는 체중의 감소를 보였다. 대조군은 실험 종료일까지 유의성 있는 체중의 감소를 보

였으나 처치군은 대조군에 비해 실험 4주부터 실험 종료일까지 유의성 있는 증가를 보였다. 이는 유 등<sup>12)</sup>의 연구에서와 같은 결과로, 사람의 다낭성 난소 증후군에서는 약 50% 정도에서 비만이 나타나는 현상<sup>1)</sup>과 비교되는 점으로 이에 대해서는 보다 정밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

부신의 무게는 모든 군에서 유사한 정도로 측정되어 EV 및 歸脾湯이 부신에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며, 이는 선행된 연구<sup>12)</sup>와 같은 결과이다.

자궁의 무게는 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 이는 자궁내막의 증식과 밀접한 연관이 있는 난포호르몬의 일종인 EV로 인해 자궁내막이 증식한 결과로 생각된다<sup>28)</sup>. 처치군의 자궁 무게는 대조군보다 감소되었으나 유의성은 없었다. 이로 보아 歸脾湯은 자궁내막의 증식에는 뚜렷한 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

난소는 그 형태학적, 기능적 발달에 여러 가지 내분비가 관여하는데 이는 교감신경에 의해서 조절된다<sup>29)</sup>. 난소의 교감신경분포의 발달과 기능은 전적으로 말초교감신경계의 발달에 필요한 NGF(Nerve growth factor)에 달려있다<sup>30)</sup>. 이 NGF는 주로 난포벽 세포에서 합성되고, NGF의 과도한 활성화는 직간접적으로 난소에서 androgen의 과다 생성을 촉진 및 유발시킨다<sup>31)</sup>. 이로 인해 난포의 성장이 억제되어 무배란이 유발되고 다모증이 발생하고 월경 불순이 유발되어 다낭성 난소 증후군의 주된 증상들이 발생하게 된다<sup>32,33)</sup>.

본 연구 결과 난소 조직내에서 NGF

양성 반응이 정상군에서는 드물게 보였고 대조군에서는 모든 부위에서 뚜렷한 양성 반응을 보였다. 이는 다른 연구들<sup>11-13,22)</sup>과 일치되는 소견으로 EV가 난소 조직내의 NGF 과잉 생산에 의한 다낭성 난소 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 처치군에서는 대조군과 같은 부위에서 NGF 양성 반응이 확인되었으나 과립막, 난포막 및 황체에서의 양성 반응이 대조군에 비해 강도가 약하게 관찰되었다. 이는 歸脾湯이 난소의 과립막, 난포막, 황체에서 NGF의 생산을 억제함으로써 난소낭종의 형성을 감소시키는 역할을 한다는 것을 의미한다.

뇌, 뇌하수체 및 부신 조직내에서는 NGF의 양성반응이 미약하고 모든 군간의 차이가 없었다. 이는 앞선 연구들과 같은 결과로<sup>12,13)</sup> 다낭성 난소 증후군에 있어 NGF의 발현은 중추보다는 말초영역에 작용을 하고, 歸脾湯의 효과 역시 말초신경 영역에 작용한다는 것을 의미한다.

CRF(Corticotropin Releasing Factor)는 시상하부내에 존재하는 호르몬으로 중추신경계에 작용하며 스트레스와 관련된 생리학적 및 행동의 변화를 일으킨다. 이것은 뇌실주위핵(PVN)에 많이 존재하며 정중융기에서 잘 확인된다고 알려져 있다<sup>34,35)</sup>.

본 실험에서 정중융기의 CRF 양성 반응은 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 이는 EV에 의한 흰쥐의 다낭성 난소 형성에 스트레스가 관련이 있다는 것을 시사한다. 한편 처치군에서의 CRF 양성 반응은 대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었다. 이로 보아 歸脾湯은 알려진 바와는 달리 스트

레스적인 면에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 보면, 歸脾湯은 EV로 다낭성 난소를 유도한 흰쥐에서 난소의 NGF 발현을 줄임으로써 난포 및 황체의 성숙에 유의한 효과를 보였으며, 따라서 다낭성 난소 증후군의 치료에도 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

歸脾湯이 흰쥐의 다낭성 난소(polycystic ovaries, PCO)에 미치는 영향을 확인하기 위해서 체중 190 g 내외의 암컷 흰쥐에 4 mg의 estradiol valerate(EV)를 근육주사한 대조군, EV 주사와 더불어 歸脾湯 농축액을 8주간 경구 투여한 처치군으로 분류하였다. EV 주사 8주 후에 부검하여 난소, 부신 및 자궁 중량 측정, 난소의 육안 및 병리조직학적 검사, 난포 및 황체 수의 측정, nerve growth factor(NGF) 및 corticotropin releasing factor(CRF) 면역조직화학적 검사를 실시하였다.

1. 체중(g)은 처치군(275±14)이 대조군(253±8)보다 유의성(p<0.01) 있게 증가되었다.
2. 난소 중량(mg)은 처치군(75.8±16.7)이 대조군(37.4±6.7)보다 유의성(p<0.001) 있게 증가되었다.
3. 성숙 난포 수는 처치군(3.6±1.2)이 대조군(1.5±1.5)보다 유의성(p<0.01) 있게 증가되었다.
4. 폐쇄 난포 수는 처치군(8.0±3.1)이 대

- 조군(18.6±6.0)보다 유의성(p<0.01) 있게 감소되었다.
5. 남성 난포 수는 처치군(0.5±0.5)이 대조군(2.3±1.3)보다 유의성(p<0.01) 있게 감소되었다.
  6. 황체 수는 처치군(6.1±3.9)이 대조군(1.6±2.3)보다 유의성(p<0.01) 있게 증가되었다.
  7. 난포 조직내 NGF 양성반응은 처치군이 대조군에 비해서 감소되어 나타났다.

이상의 성적을 토대로 할 때 歸脾湯은 EV로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에서 난포의 성숙을 유도하여 정상 배란을 촉진하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 7월 24일
- 심 사 일 : 2008년 7월 29일
- 심사완료일 : 2008년 8월 8일

## 參考文獻

1. 김탁. 다낭성 난소 증후군의 최신지견. 대한산부인과학회. 연수강좌. 2002 ;(31):38-44.
2. 노정현. 다낭성 난소 증후군의 진단과 치료. 대한내분비학회. 연수강좌. 2007 ;58-66.
3. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group: Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2004;81:19-25.
4. 황주연, 이병석. 다낭성 난소 증후군

과 인슐린 저항성. 대한산부인과학회지. 2006;49(6):1179-1187.

5. 陳貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京: 中國醫學科技出版社. 1991;1004-1009.
6. 張鳳嬋, 薛耀. 中醫藥治療多囊卵巢綜合症方法初探. *新中醫*. 1991;1:14-16.
7. 周羽珍, 蔡小蓀. 治療婦科癩疾驗方拾萃. *江蘇中醫*. 1996;17(1):9-10.
8. 吳桂芳, 李祥云. 中醫藥治療多囊卵巢綜合症研究概況. *河南中醫*. 1994;14(2):123-125.
9. 金維新. 不孕症的診斷與中醫治療. 北京: 北京科學出版社. 1992;172-177.
10. 施令義. 中西醫結合研究學術論文編. 婦產科專輯. 1983;10:32.
11. 양승정 등. 蒼附導痰湯이 Estradiol Valerate로 유발된 백서의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):1-11.
12. 유영기 등. 腎氣丸合蒼附導痰湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):84-98.
13. 남은정 등. 定經湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007 ;20(1):99-113.
14. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition(PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod*. 1986;35:647-655.
15. 강순수, 노승현, 이상인. 方劑學. 서울: 계축문화사. 1989;119-120.
16. Stein IF, Levental ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic

- ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181-191.
17. 송영득. 다낭성 난소 증후군과 비만. *대한비만학회지.* 2000;9(1):19-24.
  18. Abboott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome—a hypothesis. *J Endocrinol.* 2002;174:1-5.
  19. 성연아. 다낭성 난소증후군의 내과적 진단과 치료. *대한내과학회지.* 2006;70(4):356-360.
  20. 권세라 등. 三陰交·子宮穴 전침 자극이 백서의 다낭성 난소에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지.* 2003;16(2):76-86.
  21. Stener-Victorin E. 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.
  22. 김동일, 윤종원, 이태균. 다낭성 난소 증후군에 관한 문헌적 고찰. *대한한방부인과학회지.* 1997;10(1):73-91.
  23. 윤소영, 강명자. 다낭성 난소증후군 환자의 한방 치료에 대한 임상적 고찰. *대한한방부인과학회지.* 2000;13(2):437-451.
  24. 嚴用和. 嚴氏濟生方(四庫全書). 서울: 대성문화사. 1995;443-487.
  25. 강순수. *바른방제학.* 서울: 대성문화사. 1996;190-191.
  26. 羅元愷. *中醫婦科學.* 北京: 人民衛生出版社. 1988;62.
  27. Brawer JR. et al. Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive junction in the female rat. *Endocrinology.* 1978;103:501-512.
  28. 최유덕. *새임상부인과학 2판.* 서울: 고려의학. 2001;585-586, 315.
  29. Lara HE. et al. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology.* 1993;133(6):2690-2695.
  30. Nevi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987;237:154-1162.
  31. Dissen GA. et al. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology.* 1996;137(1):198-209.
  32. Dissen GA. et al. Intraovarian excess of nerve growth factor increase androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology.* 2000;141(3):1073-1081.
  33. Dyer CA, Erickson GF. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology.* 1985;116(4):1645-1652.
  34. Hisano S. et al. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1993;620:343-346.
  35. Lenz HJ. et al. Central nervous system effects of corticotropin-releasing factor on gastrointestinal transit in the rat. *Gastroenterology.* 1988;94:598-602.