

開鬱二陳湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소 발달에 미치는 영향

세명대학교 한의과대학 한방부인과교실

윤문희, 이동녕, 서일복, 김형준

ABSTRACT

Effects of *Gaeullijin-Tang* on the Progression of the Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovaries in Rats

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

Purpose: This study was designed to investigate the effects of *Gaeullijin-Tang*(GIT) on the progression of the estradiol valerate(EV)-induced polycystic ovaries(PCO) in rats.

Methods: PCO was induced by single intramuscular injection with estradiol valerate(EV)(4mg) in female rats. Normal group(n=8) were injected with sesame oil and orally administrated distilled water for sixty days. PCO control group (n=8) were injected with EV and orally administrated distilled water for sixty days. GIT treated group(n=8) were injected with EV and orally administrated GIT for same duration. At the end day of experiment, we measured weights of body, ovaries, adrenal glands, uterus and contents of serum androstenedione (ADD) and total estrogen. The histomorphometrical changes of ovaries were also evaluated. And we observed the NGF and CRF expression by immunohistochemistry.

Results: The results were as follows

- The weights(mg) of ovaries in GIT treated group(75.5±4.3) were significantly increased(p<0.001) compared with PCO control group(54.3±4.5).
- The numbers of mature follicles in GIT treated group(5.3±1.2) were significantly increased(p<0.05) compared with PCO control group(3.5±1.2).
- The numbers of corpora lutea in GIT treated group(1.8±1.3) were significantly increased(p<0.05) compared with PCO control group(0.3±0.7).

Conclusion: From the above results, we concluded that *Gaeullijin-Tang*(GIT) contributes to stimulating normally ovulation by decreasing ovarian NGF concentrations.

Key Words: *Gaeullijin-Tang*, Polycystic Ovaries(PCO), Estradiol Valerate(EV), Nerve Growth Factor(NGF), Ovarian Histopathology

I. 서 론

다낭성 난소 증후군이란 무배란이나 희발배란이 있는 여성에서 다낭성 난소의 초음파 소견이나 고안드로젠 혈증이 있고, 이를 유발할 만한 다른 질환이 없는 경우에 성립하는 진단명이다. 생식 가능한 연령의 여성에서 흔하게 나타나는 내분비 질환 중 하나이며 발생률은 약 6~10% 정도로 알려져 있다¹⁾. 다낭성 난소 증후군을 유발하는 병인으로는 생식샘자극호르몬분비호르몬 분비체계 이상, 부신의 안드로젠 생산 이상, 난소자체의 안드로젠 합성의 이상, 인슐린저항성 등 여러 가지 가설이 제기되어 있으나 아직 정확하게 밝혀진 바는 없으며²⁾, 김³⁾은 다낭성 난소 증후군 환자에서 혈중 LH 증가, testosterone, androstenedione (ADD), dehydroepi-androsterone sulfate (DHEAS) 및 유리형의 남성호르몬 증가, 인슐린과 유즙분비호르몬 증가 등과 같은 대사 이상을 시사하는 혈액검사소견을 보이는 경우가 매우 흔하고, 이와 같은 대사 이상이 다낭성 난소 증후군의 다양한 임상 양상을 유발하게 된다고 하였다.

서양의학에서는 안드로젠 과다의 조절과 자궁내막의 보호 및 배란 기능의 회복, 내분비 및 대사 장애의 교정을 통한 심혈관계 질환이나 당뇨 등과 같은 후유증의 예방 등을 치료 목적으로 한다. 항안드로젠제, 경구피임약, 클로미펜, 인슐린 감수성 개선제 등의 약물을 사용하고, 체중감량, 수술적 요법 등으로 증상을 개선할 수 있으나 이는 근본적인 치료가 아니며, 각각의 방법에 따른 부작용 또한 문제가 되고 있다^{4,5)}.

한의학에서 다낭성 난소 증후군은 증

상에 따라 “經閉”, “月經不調”, “無子”, “面癍”, “肥胖不孕” “多毛” 등의 범주에서 찾아볼 수 있으며⁵⁾, 여러 문헌적 연구에 의하면 氣滯血瘀, 肝鬱, 腎虛, 痰濕阻滯등을 다낭성 난소 증후군의 한의학적 발생 원인으로 인식하고 있다^{6,7)}. 특히 최근 연구에서 氣滯血瘀, 肝鬱, 氣鬱과 관련된 스트레스가 내분비계의 교란을 유발하고 다양한 질병을 일으키는 많은 원인 중 하나로 지목되고 있으며 다양한 호르몬 분비 이상을 보이는 다낭성 난소 증후군과 스트레스는 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 따라서 氣鬱에 의한 月經不調를 치료하는 처방인 開鬱二陳湯⁸⁾이 다낭성 난소 증후군 치료에 효과가 있을 것으로 사료되나 이와 관련된 실험적 연구가 없는 실정이다.

이에 저자는 흰쥐에 estradiol valerate로 유발된 다낭성 난소 모델에서 開鬱二陳湯 투여에 따른 체중 및 난소를 비롯한 주요 관련 장기의 무게 차이와 난소의 육안 및 병리조직학적 소견을 비교하고, 혈청 androstenedione(ADD) 및 total estrogen 함량차이와 nerve growth factor (NGF) 및 corticotrophin releasing factor (CRF) 발현 정도를 비교하여 다낭성 난소에 대한 開鬱二陳湯의 효과를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 개울이진탕 농축액의 제조

1) 실험동물

체중 180g 내외의 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐(오리엔트바이오, 한국)를 구입하여 온도 23±1℃, 습도 55±5%로 조정

된 세명대학교 청정동물사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다. 본 동물실험 계획은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecae09-05-01)을 받았다.

2) 개울이진탕 농축액의 제조

실험에 사용한 開鬱二陳湯은 《萬氏婦人科》⁸⁾에 의거하였으며, 약재는 세명대학교 한방병원에서 엄선하여 구입한 후 사용하였다. 처방의 내용과 1첩당 분량은 Table 1과 같다.

開鬱二陳湯 4첩 분량(281.6g)을 2000ml의 증류수에 2시간 동안 담가서 수분을 충분히 흡수케 한 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 원심하여 침전된 성분을 제거하고 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 100ml로 농축시켰다. 이 농축액 1ml을 흰쥐 마리 당 1일 투여량으로 하였다. 이 투여량은 체중 비례로 환산하여 60kg 성인의 1일 복용량의 약 5배에 해당되는 용량이다.

Table 1. Prescription of *Gaeullijin-Tang*

Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight (g)
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	8
白茯苓	<i>Poria</i>	8
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	8
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	8
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	8
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	5.6
青皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	5.6
莪朮	<i>Zedoariae Rhizoma</i>	5.6
檳榔	<i>Arecae Semen</i>	5.6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	4
Total		70.4

2. 다낭성 난소 병태동물의 작성

다낭성 난소(polycystic ovaries, PCO) 병태동물은 Brawer 등^{9,10)}의 방법에 준하여 작성하였다. Estradiol valerate(EV) (Sigma Co., USA)를 0.5ml의 benzyl alcohol (Sigma Co., USA)에 용해시킨 후 sesame oil(Sigma, USA)을 이용하여 20mg/ml의 농도로 혼합하고 이 용액 0.2ml 을 1회 엉덩근육에 주사하여 PCO를 유발시켰다.

3. 실험군의 분류

실험개시일(EV 접종일)에 아래와 같이 군을 분류하고 처치하였으며, 각 군당 체중이 유사하도록 8마리씩을 배정하였다.

정상군(Normal Group)은 sesame oil만을 1회 엉덩근육에 주사하고 60일간 증류수 1ml을 경구투여 하였다.

대조군(Control Group)은 PCO를 유발시키기 위해 EV를 엉덩근육에 주사하고 60일간 매일 1회 증류수 1ml을 경구투여 하였다.

開鬱二陳湯 처치군(*Gaeullijin-Tang* Treated Group)은 PCO를 유발시키기 위해 EV를 엉덩근육에 주사하고 60일간 매일 1회 開鬱二陳湯 감압농축액 1ml을 경구투여 하였다.

4. 검사 항목 및 방법

1) 체중의 측정

실험개시일, 실험 후 20일, 40일, 50일 및 60일에 체중을 측정하였다.

2) 난소, 부신 및 자궁 중량 측정

실험종료일에 흰쥐를 에테르로 마취하고 전혈을 심장을 통해서 채혈한 후 4% paraformaldehyde 액으로 관류고정 하였다. 고정 후 양측 난소, 부신 및 자궁을 적출하였으며, 장기 주위의 결합조직을

세밀하게 제거한 후 정밀화학저울(AND GR-202, Japan)로 무게를 측정하였다.

3) 난소의 육안 관찰

부검하여 적출된 난소를 육안으로 관찰하고 균별로 모든 난소를 사진촬영 하였다.

4) 난소의 병리조직학적 관찰과 난소 및 황체 수의 측정

개체 당 한 쪽 난소를 자동조직처리기(Shandon Lipshaw, Citadel 2000, USA)를 이용하여 처리 한 후 파라핀에 포매하였다. 조직절편기(Leica, RM2125, Germany)로 5 μ m 두께의 박질편을 만들어 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색하고 광학현미경하에서 일반적인 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

또한 각 난소조직에서의 난포 및 황체의 수를 계수하였다. 난포의 수는 난모세포가 관찰되는 난포만을 대상으로 계수하였으며, 난포막이 형성되고 과립막세포가 중층으로 증식된 2차 난포, 난포동이 형성된 성숙난포, 난모세포의 변성 또는 과립막 세포의 고사(apoptosis)가 관찰되는 폐쇄난포를 각 각 구분하여 계수하였다. 황체는 외난포막으로 뚜렷하게 둘러싸인 것만을 계수하였으며, 황체의 경계가 불분명한 퇴화 중인 것은 계수에서 제외하였다.

5) 혈중 androsteredione(ADD) 및 total estrogen 함량 측정

실험종료일에 채혈한 혈액을 혈청분리관에 분주하여 3,000 rpm에서 10분간 원심하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -60 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

혈중 ADD는 androsteredione ELISA kit(ABL international GMBH, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 혈중 total estrogen 함량은 Total-Estrogens Kit(ICN,

USA)를 이용하여 radioimmunoassy 법으로 gamma counter(Packard, COBRA-II, USA)를 이용하여 측정하였다.

6) nerve growth factor(NGF) 면역조직화학적 검사

부신 및 난소를 적출하여 picric acid가 포함된 Bouin 액에 24시간 고정하였다. 고정된 조직을 자동조직처리기(Shandon Lipshaw, Citadel 2000, USA)를 이용하여 처리한 후 파라핀에 포매하고, 조직절편기(Leica, RM2125, Germany)로 5 μ m 두께의 박질편을 만들고, poly-L-lysine을 처리한 슬라이드(Marienfeld, Histobond, Germany)에 부착하였다. 탈파라핀 및 합수 과정을 거친 조직을 citrate buffer (pH 6.0)에 넣어 500W 출력의 microwave로 5분간 3회 처리하여 항원성을 부활시키고, 1% H₂O₂ 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 $^{\circ}$ C에서 48시간 반응시키고, 상온에서 biotin이 부착된 anti-rabbit IgG 를 30분간 반응시킨 후, ABC reagent를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05M PBS butter(pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였다. 반응이 종료된 절편을 DAB(Roche, Germany)로 10분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 NGF 양성반응의 정도를 확인하였다.

난소의 간질세포(stromal cells) 및 난포막세포(theca cells)에서 관찰되는 NGF에 염색된 세포의 수 및 염색강도를 기준으로 하여, 양성반응이 관찰되지 않을

경우를 -, 미약한 양성 반응을 +, 중정도의 양성반응을 ++, 강한 양성반응을 +++로 표시하였다.

7) corticotropin releasing factor(CRF) 면역조직화학적 검사

뇌를 적출하여 picric acid가 포함된 Bouin 액에 24시간 고정하였다. 고정된 뇌조직의 정중용기(median eminence) 부위의 시상단면을 만들어자동조직처리기(Shandon Lipshaw, Citadel 2000, USA)를 이용하여 처리 한 후 파라핀에 포매하고, 조직절편기(Leica, RM2125, Germany)로 5µm 두께의 박절편을 만들고, poly-L-lysine을 처리한 슬라이드(Marienfeld, Histobond, Germany)에 부착하였다. 탈파라핀 및 함유 과정을 거친 조직을 protinase K(10µg/ml, Roche, Germany)에 20분간 처리하여 항원성을 부활시키고, 1% H₂O₂ 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℃에서 72시간 반응시키고, 상온에서 biotin이 부착된 anti-rabbit IgG 를 30분간 반응시킨 후, ABC reagent를 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이에는 0.05M 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 부위

의 투과도를 측정하고, 정상군에서 측정된 투과도의 평균을 100%로 기준하여 대조군과 처치군의 투과도를 환산하여 양성반응의 정도를 표시하였다.

5. 통계처리

실험에서 측정된 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 10.1 for Windows, USA)를 이용하여 student's t-test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 체 중

EV를 접종한 대조군은 정상군에 비해서 실험 20일부터 실험 종료일까지 유의성 있게 체중이 낮았다. 開鬱二陳湯을 투여한 처치군의 체중은 실험 50일부터 대조군에 비해서 다소 높았으나 유의성 있는 차이는 없었다(Table 2).

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

Group	Body Weights(g)				
	0	20	40	50	60 days
Normal (n=8)	232 ±11 ^{a)}	271 ±7	301 ±16	298 ±18	312 ±19
Control (n=8)	231 ±9	239 ±7***	269 ±13**	273 ±18*	280 ±15**
Treated (n=8)	229 ±9	234 ±12	269 ±13	277 ±19	291 ±20

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 *Gaeullijin-Tang*
 * : Statistically significant compared with normal group(*:p<0.01, **:p<0.05, ***:p<0.001)

2. 난소의 육안 소견

육안적으로 정상군의 난소는 여러 발달 단계에 있는 난포가 형성되어 있었고 뚜렷한 크기의 황체도 다수 형성 되어 있었다(Fig. 1).

대조군에서는 8예의 난소 모두가 현저히 위축되어 있었고, 난포의 발달 및 황체의 형성이 미약하여 표면이 비교적 매끄럽게 관찰되었다. 표면에서 작은 낭을 지닌 난포가 소수 관찰되었다(Fig. 2).

開鬱二陳湯을 투여한 처치군의 난소 8예 중 3예는 정상군과 유사한 정도의 크기를 지니고 있었으며, 난포 및 황체의 발달도 뚜렷이 확인되었다. 나머지 5예도 난포 및 황체의 발달을 확인할 수 있었으며, 대조군에 비해서도 크기가 커져 있었다(Fig. 3).

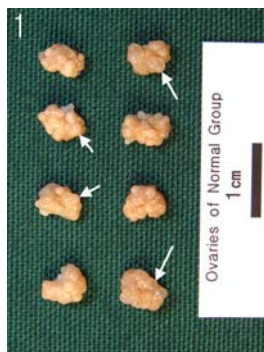


Fig. 1. Gross structure of ovaries from normal group. Note well developed mature follicles(long arrows) and corpora lutea(short arrows).

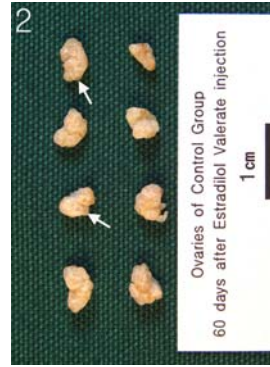


Fig. 2. Gross structure of ovaries from control group. Distinct corpora lutea are not observed, and small cystic follicles(arrows) are developed.



Fig. 3. Gross structure of ovaries from *Gaeullijin-Tang* treated group. Generally the sizes are increased than those of control group. Note well developed corpora lutea(short arrows) and follicles(long arrows). Compare with Fig. 1 and Fig. 2.

3. 난소 중량

실험 60일에 측정된 난소 중량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 높았다(Table 3).

4. 부신 및 자궁 중량

부신 중량은 대조군에서 가장 높았으며, 정상군 및 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 낮았으나 각 군간 유의성 있는 차이는 없었다.

자궁 중량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서는 높았으나 유의성 있는 차이는 없었다(Table 4).

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

Group	Paired Ovarian Weight(mg)
Normal(n=8)	81.0±6.0 ^{a)}
Control(n=8)	54.3±4.5***
Treated(n=8)	75.5±4.3 ^{##}

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 *Gaeullijin-Tang*
 * : Statistically significant compared with normal group(***:p<0.001)
 # : Statistically significant compared with control group(##:p<0.001)

Table 4. Effects of *Gaeullijin-Tang* Treatment on the Weights 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)	62.1±6.2 ^{a)}	613.6±70.8
Control(n=8)	65.9±8.1	535.8±49.1*
Treated(n=8)	60.8±6.4	576.5±78.0

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 *Gaeullijin-Tang*
 * : Statistically significant compared with normal group(*:p<0.05)

5. 혈중 androsternedione(ADD) 함량

혈중 ADD 함량은 대조군이 정상군에

비해서 낮았으나 유의성 있는 차이는 없었다. 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 높았다(Table 5).

Table 5. Effects of *Gaeullijin-Tang* Treatment on the Serum Androsternedione Values in Rats with Estradiol Valerate (EV)-induced Polycystic Ovaries

Group	Androsternedione Values(pg/ml)
Normal(n=8)	24.0±12.5 ^{a)}
Control(n=8)	18.1±3.1
Treated(n=8)	21.9±3.2 [#]

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 *Gaeullijin-Tang*
 # : Statistically significant compared with control group(#:p<0.05)

6. 혈중 total estrogen 함량

혈중 total estrogen 함량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 높았다. 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 낮았으나 유의성은 없었다(Table 6).

Table 6. Effects of *Gaeullijin-Tang* Treatment on the Serum Total Estrogen Values in Rats with Estradiol Valerate (EV)-induced Polycystic Ovaries

Group	Total Estrogen Values(pg/ml)
Normal(n=8)	192.6±37.5 ^{a)}
Control(n=8)	262.3±48.9**
Treated(n=8)	243.7±43.3

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 *Gaeullijin-Tang*
 * : Statistically significant compared with normal group(**:p<0.01)

7. 난소의 병리조직학적 소견

정상군에서는 난소의 표면상피층이 잘 유지되어 있었으며 발달과정에 있는 다양한 단계의 난포가 잘 발달되어 있었으며 주위와 경계가 분명한 많은 수의 황체가 형성되어 있었다(Fig. 4). 정상군에서 남성 난포는 드물게 관찰되었으며, 폐쇄 난포는 개체에 따라서 다양한 정도로 관찰되었다.

대조군에서는 난소가 현저히 위축되어 있었으며 난소 실질보다는 간질 성분이 보다 풍부하게 관찰되었다. 난소의 표면상피층은 여러 부위에서 탈락되어 있었다. 액을 함유한 큰 남성 난포가 표면으로 돌출되어 있었고, 변성되지 않은 성숙 난포의 수는 드물게 관찰되었다(Fig. 5). 대조군 8예 중 7예에서는 윤곽이 뚜렷한 황체는 형성되어 있지 않았으며, 1예에서만 3개의 황체가 관찰되었다. 남성 난포는 2~3 층의 얇은 세포층의 과립막세포로 둘러싸여 있었으며 강 내에 변성된 탈락세포들이 산재해 있었다. 또한 난포 과립막세포의 변성 및 괴사가 매우 빈번하게 관찰되었다. 난소 수질 부위에서는 난모세포의 변성이 동반된 폐쇄 난포들이 집단을 이루고 있는 소견(Fig. 6)이 대조군 8예 중 6예에서 관찰되었다.

開鬱二陳湯을 투여한 처치군에서는 다양한 발달 단계의 난포가 대조군에 비해서 잘 관찰되었으며, 경계가 분명한 황체(Fig. 7)는 8예 중 7예에서 관찰되었다.

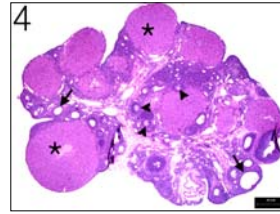


Fig. 4. Microscopic structure of ovary from normal group. Note well developed 2nd follicles (arrow heads), matured follicles (arrows) and corpora lutea (asterisks). H&E stain, bar=0.5mm

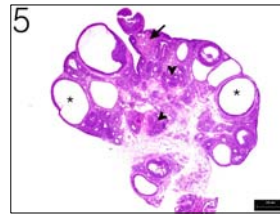


Fig. 5. Microscopic structure of ovary from control group. Variable sizes of fluid filled cystic follicles (asterisks) are developed. One regressed corpus luteum (arrow) is observed. And many of follicles (arrow heads) are undergoing atresia. H&E stain, bar=0.5

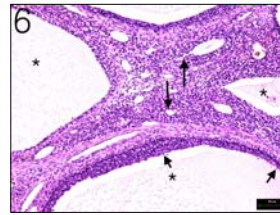


Fig. 6. Higher magnification of Fig. 5. Note necrotic granular cells (short arrows) of cystic follicles (asterisks), and atresic follicles (long arrows). H&E stain, bar=50 μ m

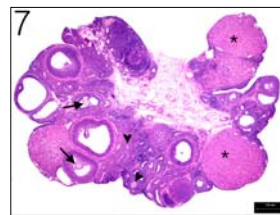


Fig. 7. Microscopic structure of ovary from *Gaeullijin-Tang* treated group. Note well developed matured follicles (arrows), corpora lutea (*) and 2nd follicles (arrow heads). Compare with Fig. 5. H&E stain, bar=0.5mm

8. 난포 및 황체 수

대조군은 정상군에 비해서 2차 난포, 성숙 난포 및 황체 수는 유의성 있게 적었으며, 폐쇄 난포 및 낭성 난포는 유의성 있게 많았다.

開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 성숙 난포 및 황체 수가 유의성 있게 많았다. 이차 난포, 폐쇄 난포 및 낭성 난포 수는 대조군에 비해서 적었으나 유의한 차이는 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of *Gaeullijin-Tang* Treatment on the Numbers 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)	8.0±2.5 ^{a)}	11.1±3.2	4.9±2.5	1.8±1.0	8.9±1.5
Control(n=8)	5.0±1.7*	3.5±1.2***	13.4±3.8***	6.0±2.0***	0.3±0.7***
Treated(n=8)	4.5±1.5	5.3±1.2 [#]	9.9±2.6	4.4±1.3	1.8±1.3 [#]

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 *Gaeullijin-Tang*

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

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

9. 난소 및 부신에서의 nerve growth factor(NGF) 발현 정도

정상군의 난소에서 NGF 양성반응은 간질세포, 난포막 및 황체에서 미약한 정도로 발현되었으며, 부신에서는 피질의 망상대(zona reticularis)에서 미약한 반응이 확인되었다.

대조군의 간질세포에서는 NGF 양성반응이 정상군에 비해서 보다 강하게 발현되었으며, 또한 양성반응을 보인 간질세포의 수가 보다 많게 관찰되었다. 난포막에서의 발현 빈도 및 강도도 정상군에 비해서 강하게 발현되었다(Fig. 8). 다만 대조군의 대부분의 예에서 황체가 관찰되지 않았기에 황체에서의 NGF 발현 정도는 비교할 수 없었다. 그러나 퇴화 중인 황체에서는 비교적 강한 NGF 양성반응이 관찰되었다(Fig. 8). 대조군

의 부신에서는 피질의 망상대에 분포된 많은 세포에서 강한 반응이 관찰되었다(Fig. 10).

開鬱二陳湯을 투여한 처치군의 간질세포 및 난포막에서의 NGF 양성 반응은 대조군에 비해 강도 및 빈도가 미약하게 관찰되었으나(Fig. 9), 부신 피질에서의 반응은 대조군과 유사한 정도로 관찰되었다(Fig. 11).

정상군, 대조군 및 開鬱二陳湯을 투여한 처치군의 각 개체별 난소 및 부신피질에서의 NGF 양성반응의 정도는 Table 8과 같다.

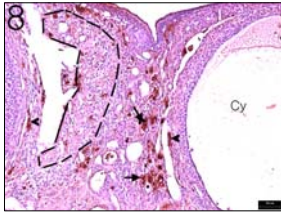


Fig. 8. Nerve growth factor(NGF) expression in ovarian stromal cells(arrows), theca cells(arrow heads), and in regressive corpus luteum(circled area) from control group. Cy : cystic follicle. ABC immunohistochemical stain, bar=30µm

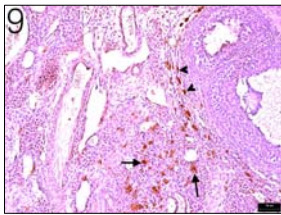


Fig. 9. Nerve growth factor(NGF) expression in ovarian stromal cells(arrow) from *Gaeullijin-Tang* treated group. The activities of reaction are decreased compared with control group. ABC immunohistochemical stain, bar=30µm

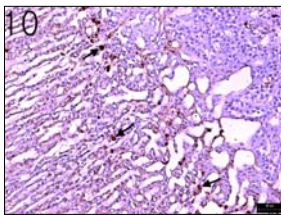


Fig. 10. Nerve growth factor(NGF) positive reaction in zona reticularis of adrenal cortex from control group. arrows : NGF expressed cells. ABC immunohistochemical stain, bar=50µm

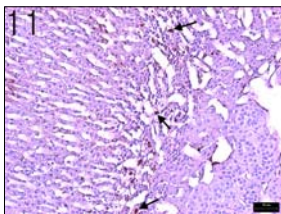


Fig. 11. Nerve growth factor(NGF) positive

reaction in in zona reticularis of adrenal cortex from *Gaeullijin-Tang* treated group. The numbers of positive cells (arrows) are similar with control group, but the activities are decreased. ABC immunohistochemical stain, bar=50µm

Table 8. Effects of *Gaeullijin-Tang* Treatment on the Nerve Growth Factor (NGF) Expression in Ovary and Adrenal Cortex of Rats with Estradiol Valerate (EV)-induced Polycystic Ovaries

Group- Individual No.	Ovary		Adrenal Cortex
	Stromal Cells	Theca 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 *Gaeullijin-Tang*

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

10. 정중융기에서 corticotrophin releasing factor(CRF) 발현

뇌조직에서 CRF 양성 반응은 정중융기에서 관찰되었다. 제3뇌실 하면의 정중융기 중앙에 갈색의 양성반응이 물결 모양의 형태로 나타났다(Fig. 12, 13).

칼라영상분석기를 이용하여 CRF 양성 반응의 정도를 측정 한 결과, 대조군의 CRF 발현 정도는 정상군에 비해서 다소 높았으나 유의성은 없었다. 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 다소 낮았으나 유의성은 없었다(Table 9).

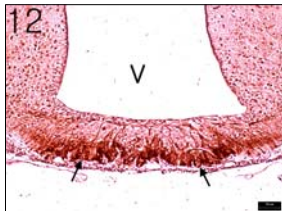


Fig. 12. Corticotropin releasing factor(CRF) expression(arrows) in median eminence from control group. V; 3rd ventricle. ABC immunohistochemical stain, bar=30µm

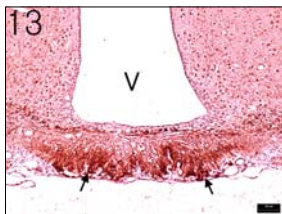


Fig. 13. Corticotropin releasing factor(CRF) expression(arrows) in median eminence from Gaeullijin-Tang treated group. V; 3rd ventricle. The intensity of CRF expression is similar with control group. ABC immunohistochemical stain, bar=30µm

Table 9. Effects of Gaeullijin-Tang Treatment on the Corticotropin Releasing Factor(CRF) Expression in Median Eminence of Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic ovaries

Group	CRF Expression (%)
Normal(n=8)	100.0±17.5 ^{a)}
Control(n=8)	117.9±28.7
Treated(n=8)	105.1±20.1

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 Gaeullijin-Tang

IV. 고 찰

다낭성 난소 증후군(polycystic ovarian syndrome, PCOS)은 배란 장애, 복부 비만, 고안드로겐혈증, 고혈압, 인슐린 저항성과 연관된 복잡한 내분비와 대사 이상을 나타내는 증후군으로¹¹⁾, 초음파 상 2~9 mm 정도의 작은 난포들이 난소의 주변으로 10~12개 이상 보이면서 난소 중앙의 간질이 증가되어 보이는 소견이 나타난다^{12,13)}. 다낭성 난소만을 가지고 있는 여성은 생리도 규칙적이며 배란기능이나 혈중 androgen 수치도 정상이지만 인슐린 저항성 및 비만 등의 자극을 받게 되면 다낭성 난소 증후군이 표현되는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾.

다낭성 난소의 발생 원인은 아직도 명확하게 밝혀지지 않고 있으며, 최근의 연구를 종합하면 여러 가지의 다양한 요소들이 복합적으로 작용하면서 나타나는 기능적 이상으로 이해되고 있다¹⁵⁾. 그 중에서도 주목받고 있는 것은 다낭성 난소 증후군이 인슐린 저항성과 대사이상

으로 인해 발병된다는 것으로 다낭성 난소 증후군에서 대사증후군이 46%, 포도당 내성 이상이 16~35%, 2형 당뇨병이 2.5~7.7%정도로 정상 여성들에 비해 모두 높게 나타나고 있다¹⁶⁾. Conway 등¹⁷⁾은 인슐린의 혈중 농도가 높으면 높을수록 다낭성 난소 증후군의 임상 증상이 더욱 심해진다고 보고하였다. 인슐린은 난소의 인슐린 수용체를 직접 자극하여 LH의 활동성을 강화하는 작용을 하기도 하고, 간접적으로는 혈청 LH pulse amplitude를 증가시켜 안드로겐 합성을 증가시키기도 하는 것으로 추정된다¹⁸⁾.

PCOS는 병인에 대한 기전이 분명하지 않고, 표현형 또한 매우 다양하며 아직 그 진단기준에도 논란이 많은 실정이다. 지금까지 3가지 기준이 제안되었으나¹⁹⁻²²⁾ 기준에 제시된 것 이외에도 비만증²³⁻²⁶⁾, 인슐린 저항성이나 고인슐린증²⁷⁻²⁹⁾, LH/FSH 비가 2~3이상으로 높게 나타나기도 하는 증상 등이 포함되어 있지 않아 부족하다는 지적이 있다³⁰⁻³⁵⁾.

서양의학에서 다낭성 난소 증후군의 치료 목표는 내분비 및 대사 장애의 교정을 통한 심혈관계 질환이나 당뇨 등과 같은 후유증의 예방, 에스트로겐에 의한 지속적인 자극으로부터 자궁내막 보호, 기능부전성 자궁출혈의 조절과 같은 대증적 치료, 여드름, 다모증의 개선 및 정상 체중으로의 복귀를 통한 미용 효과, 불임증을 동반한 다낭성 난소 증후군 환자에서 임신을 위한 배란 유도 등이다. 이에 따라 생활 습관 변화 및 체중 감량, 인슐린 반응개선제, 임신을 원하는 다낭성 난소 증후군 환자에서는 배란 유도를 목적으로 클로미펜, 방향효소 억제제, 성선자극호르몬 등이 쓰이고 있다³⁾.

한의학에서는 다낭성 난소 증후군이라는 명칭이 기재되지 않았으나 증상에 따라 “經閉”, “月經不調”, “無子”, “面疱”, “肥胖不孕” “多毛” 등의 범주에서 찾아볼 수 있으며 김 등⁵⁾의 연구에서 多囊性卵巢症候群의 韓醫學 病機로 痰濕, 腎虛를 기본으로 하여 腎虛, 肝鬱化火 痰濕阻滯, 氣滯血瘀, 陰虛內熱의 다섯 가지로 분류하고 虛實이 交雜된 병기로 인식해야 한다고 하였고, 윤 등³⁶⁾의 연구에서는 腎虛, 血虛, 肝氣鬱結, 濕痰, 瘀血停滯 등으로 나누고 그 중 血虛와 腎虛가 가장 높은 빈도를 보인다고 하였다.

다낭성 난소 증후군의 치료에 관한 연구로는 진침^{37,38)}, 침³⁹⁾, 운동⁴⁰⁾, 蒼附導痰湯⁴¹⁾, 腎氣丸, 合蒼附導痰湯⁴²⁾, 定經湯⁴³⁾, 蒼附六君湯⁴⁴⁾, 歸脾湯⁴⁵⁾ 등이 유효한 효과를 나타낸다고 보고되어 그 임상적 적용가능성이 제시되어 왔다.

開鬱二陳湯은 《萬氏婦人科》⁸⁾에서 처음 나온 처방으로 “因氣鬱血閉不行者, 用開鬱二陳湯主之”라 하여 無月經 중 痰濕阻滯型에 쓰이는 처방이다⁴⁶⁾. 通治痰飲하는 二陳湯에 香附子, 青皮, 木香의 理氣 작용, 川芎, 莪朮의 活血行氣 작용, 半夏, 檳榔의 散結작용을 더한 것으로 볼 수 있다^{47,48)}.

최근의 연구에서 내분비계의 교란을 일으키는 많은 원인 중 하나로 스트레스가 지목되고 있다. 스트레스는 크게 교감신경-부신수질(sympathetic-adrenal medullary, SAM)과 시상하부-뇌하수체-부신피질(hypothalamo-pituitary-adrenal, HPA)에 의해 증재된다. HPA 축의 활성화는 adrenocorticotropin hormone(ACTH)의 분비를 증가시켜 부신피질로부터 glucocorticoid를 분비하게 한다. SAM 축

의 활성화는 부신 수질에서 epinephrine과 norepinephrine(NE)의 방출을 증가시키고, NE의 증가를 통하여 교감신경을 자극한다¹¹⁾. 이와 같은 반응으로 gonadotropin releasing hormone(GnRH)이 억제되어 무배란 또는 무월경이 발생하게 된다¹¹⁾. Barb 등⁴⁹⁾은 암컷 돼지에서 발정기에 고용량의 ACTH를 투여하면 발정기의 시작이 지연되고, 낭성 난포가 발달된다고 보고하였다. 이상에서 본 바와 같이 스트레스는 난포의 성숙과 정상 배란을 방해하는 주요인자가 된다.

한의학에서 스트레스는 七情, 氣鬱, 火, 痰, 血虛 등과 연관시킬 수 있다⁵⁰⁾. 《東醫寶鑑》⁴⁸⁾에 “因勞心 心火上行 月事不來者 胞脉閉也 此上焦心肝肺熱結也”라 하여 勞心이 무월경을 유발할 수 있다고 하였다. 따라서 氣鬱에 의한 月經不調를 치료하는 처방인 開鬱二陳湯이 스트레스로 인한 월경이상에 효과가 있을 것으로 사료된다.

PCO의 동물실험에서 현재까지 두 가지 동물모델이 개발되어 있는데 첫 번째는 암컷 흰쥐에 estradiol valerate(EV)를 주사하여 퇴화된 난포동 난포, 잘 발달된 난포막층을 갖고 있는 난포낭, 감소된 과립세포, 황체화 된 낭 등을 유발하는 방법이고^{9,10)}, 두 번째는 미성숙한 암컷 흰쥐에 dehydroepiandrosterone(DHEA)를 주사하여 고안드로겐에 의한 PCO를 유발하는 방법이다⁵¹⁾. 본 실험에서는 EV를 주사하여 PCO를 유발하였는데 실험 종료 후 육안적으로 난소를 관찰 한 결과 EV를 처치한 대조군에서 난소가 현저히 위축되어 있고, 난포의 발달 및 황체의 형성이 미약한 것으로 보아 다낭성 난소의 유발이 성공적으로 수행되었다는

것을 알 수 있다.

실험 종료 후 흰쥐의 체중은 정상군-開鬱二陳湯을 투여한 처치군-대조군의 순서로 낮아지는 결과를 보였는데, 이는 이전 4례의 실험논문에서도 같은 결과를 보였다. 이에 대해 Stener 등¹¹⁾은 EV를 주사한 결과 부신에서 glucocorticoid 생산이 증가되어 지방분해활동을 통한 체중감소가 일어난 것이라고 설명하였다. 본 실험에서는 특히, 실험 시작 후 20일간 체중변화에서 정상군에 비하여 대조군과 처치군의 체중증가가 비교적 큰 차이가 있어 실험 시작 후 스트레스 및 다른 요인에 의한 영향이 더 있는지 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 스트레스에 의하여 분비가 증가되는 CRF는 식욕을 억제하는 작용이 알려져 있는데^{52,53)} 본 실험에서 측정된 CRF 농도는 대조군이 가장 높고, 開鬱二陳湯을 투여한 처치군, 정상군 순서로 낮으므로 추후연구에서는 식욕 억제 작용으로 인하여 음식섭취가 감소되어 체중이 낮은 것인지에 대해 각 군별로 섭취한 음식 양을 측정해 보는 것이 필요하다고 생각된다.

자궁 중량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 開鬱二陳湯을 투여한 처치군은 대조군에 비해서 높았다. 혈중 total estrogen 함량이 대조군에서 가장 높았음에도 불구하고 자궁 중량이 가장 낮은 것은 고농도의 estrogen에 의해 정상 배란이 되지 않아 오히려 자궁의 증식에 악영향을 미치는 것으로 보인다.

난소의 병리조직학적 소견은 대조군에서 난소가 현저히 위축되어 있었으며 액을 함유한 큰 낭성 난포와 난포 과립막

세포의 변성 및 괴사가 매우 빈번하게 관찰되었다. 이는 실험적으로 EV에 의해 다낭성 난소가 잘 발현된 것으로 볼 수 있다. 開鬱二陳湯 처치군에서는 다양한 발달 단계의 난포가 대조군에 비해서 잘 관찰되었는데, 이는 開鬱二陳湯이 다낭성 난소에서 난포의 정상적인 발달에 효과적이라는 것이라는 시사하는 것으로, 특히 성숙 난포 및 황체의 수가 유의성 있게 많은 것은 다낭성 난소 증후군에서 흔히 나타나는 배란 장애에 대해 효과가 있을 것으로 기대되는 바이다.

Nerve growth factor (NGF)는 감각신경과 교감신경의 신경세포 발달 및 유지에 관여하는 neurotrophic protein이다⁵⁴⁾. NGF의 과도한 활성화는 난소의 androgen을 직간접적으로 증가시키는데, 직접적으로는 난포막 세포로부터 androgen 생산을 증가시키고, 간접적으로는 norepinephrine의 작용을 통해 난소의 androgen 분비를 자극하는 것이다. 난소에서 androstenedione과 testosterone이 과다생성 되면 estrogen으로 전환되어 estrone이 과다 분비되고 이는 시상하부와 뇌하수체에 되먹임 기전을 통해서 LH를 증가시키고 FSH는 감소시켜 결과적으로 estrogen과 androgen 과다분비의 악순환을 일으키게 된다⁵⁵⁻⁵⁷⁾. 본 실험에서 정상군의 난소에서 NGF 양성반응은 전체적으로 미약한 정도로 발현되었으나 대조군에서는 정상군에 비해서 보다 강하게 발현된 것을 볼 수 있다. EV에 의해 난소의 NGF 농도가 비정상적으로 상승되면 무배란, 낭성난포 등을 유발하는데 기여하게 된다.^{9,58,59)} 따라서 본 실험에서 EV에 의해 난소에서 NGF 농도가 증가하고 이에 따라 교감신경이 활성화되면서 다낭성 난소가 유발되었다

고 볼 수 있다. 그러나 본 실험에서 대조군의 NGF 양성반응이 증가하고, 부신 중량과 뇌조직 중 정중용기에서 관찰한 CRF 양성 반응 역시 대조군이 가장 높은 것에 반해, 혈중 ADD 함량은 대조군이 가장 낮은 결과를 보였다. 이는 Dissen 등⁵⁵⁾의 연구에서 난소 내에 NGF 생성 세포를 이식한 후 혈중 estradiol, progesteron, testosterone, ADD의 농도를 측정된 결과 모두 증가되었고, 그 중 ADD의 농도가 유의성 있게 뚜렷한 증가를 보인 것과 비교하면 상반된 결과이다. ADD는 부신 뿐만 아니라 난소에서도 분비되는데 본 실험에서 EV로 유도된 PCO 대조군의 난소 중량은 정상군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였고, 조직학적으로도 현저히 위축되어 있었다. 부신 중량의 차이가 크지 않은 것에 비하여, 난소의 중량차이와 조직학적 차이가 크므로, 혈중 ADD의 농도 차이는 난소 중량과 난소 실질의 감소로 인한 것으로 보이며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 開鬱二陳湯 처치군의 간질세포 및 난포막에서의 NGF 양성 반응은 대조군에 비해 강도 및 빈도가 미약하게 관찰되었으나, 부신 피질에서의 반응은 대조군과 유사한 정도로 관찰되었다. 이는 開鬱二陳湯이 난소의 NGF 발현을 감소시켜 난포 및 황체의 성숙에 효과가 있으며 부신 피질에는 크게 작용하지 않는 것으로 보인다. 이러한 NGF의 발현 감소를 통하여 난포의 발달, 성장, 에스트로겐 분비저하, 배란주기 회복 등의 효과를 보일 것으로 사료된다.

CRF는 스트레스와 연관된 peptide로 시상하부에서 만들어져 뇌하수체-부신 축으로 퍼져 스트레스와 관련된 생리학

적 및 행동의 변화를 일으킨다³⁸⁾. 스트레스 상황에서는 뇌간부위에서 카테콜아민이 증가하여 CRH 분비를 자극한다¹⁾. 따라서 CRF 발현 정도가 높을수록 심한 스트레스 상황이라고 볼 수 있다. 본 실험에서 정중용기의 CRF 양성 반응의 정도를 측정된 결과, 대조군의 CRF 발현 정도는 정상군에 비해서 다소 높았고, 開鬱二陳湯 처치군은 대조군에 비해서 다소 낮은 결과를 보였다. 평균의 차이가 어느 정도 있음에도 불구하고 유의성이 없는 것은 큰 표준편차에 의한 것으로 사료된다.

결론적으로 開鬱二陳湯을 투여한 처치군에서 난소 중량, 혈중 androsteredione 함량, 성숙 난포, 황체 수, 난소 조직 내 NGF 양성반응에서 유의한 변화가 관찰되었으며, 이상의 실험결과를 볼 때 開鬱二陳湯은 임상적으로 다낭성 난소 증후군 환자의 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

추후의 연구에서는 스트레스 상황에서 다낭성 난소 증후군 환자에게 開鬱二陳湯을 투여하기 전, 투여 후 혈중 estradiol, progesteron, testosteron, ADD의 농도와 NGF, CRF 반응도를 측정하여 보다 직접적으로 스트레스와 다낭성 난소 증후군의 연관성, 開鬱二陳湯의 효과에 대해 연구해 볼 필요가 있다고 생각된다.

V. 결 론

開鬱二陳湯이 흰쥐의 다낭성 난소 (polycystic ovaries, PCO) 발달에 미치는 영향을 확인하기 위해서 체중 230g 내외의 암컷 흰쥐에 4mg의 estradiol valerate

(EV)를 근육주사한 대조군, EV 주사와 더불어 開鬱二陳湯 농축액을 60일간 경구 투여한 처치군으로 분류하였다. EV 주사 60일 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 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 난소 중량(mg)은 開鬱二陳湯을 투여한 처치군(75.5±4.3)이 대조군(54.3±4.5)보다 유의성(p<0.001) 있게 높았다.
2. 성숙 난포 수는 開鬱二陳湯을 투여한 처치군(5.3±1.2)이 대조군(3.5±1.2)보다 유의성(p<0.05) 있게 많았다.
3. 황체 수는 開鬱二陳湯을 투여한 처치군(1.8±1.3)이 대조군(0.3±0.7)보다 유의성(p<0.05) 있게 많았다.
4. 난소 조직내 NGF 양성반응은 開鬱二陳湯을 투여한 처치군이 대조군에 비해서 감소되어 나타났다.
5. 뇌 정중용기에서 CRF 발현 비율은 처치군이 대조군에 비해 감소를 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

이상의 결과로 開鬱二陳湯은 EV로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에서 난포의 성숙을 유도하여 정상 배란을 촉진하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2010년 4월 26일
- 심 사 일 : 2010년 5월 4일
- 심사완료일 : 2010년 5월 12일

참고문헌

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울:고려의학. 2007;63, 362.
2. 이혜진, 성연아. 다낭난소증후군의 진단과 치료. 대한내분비학회지. 2007; 22(4):252-6.
3. 김정훈. 다낭성난소증후군 치료의 최신지견. 대한산부인과학회지. 2005;48(8):1851-69.
4. Krysiak R et al. Update on the management of polycystic ovary syndrome. Pharmacological Reports. 2006;58(5):614-25.
5. 김동일, 윤종원, 이태균. 다낭성 난소 증후군에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1997;10(1):73-91.
6. 吳桂芳, 李祥云. 中醫學治療多囊卵巢綜合症研究概況. 河南中醫. 1994;14(2):123-5.
7. 金維新. 不孕症的診斷與中醫治療. 北京:科學出版社. 1992:172-7.
8. 萬全. 萬氏婦人科. 湖北省:湖北人民出版社. 1983:9-10.
9. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition(PCO) in the estradiol valerate-treated rat. Biology of Reproduction. 1986;35:647-55.
10. Brawer JR et al. Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. Endocrinology. 1978;103:501-12.
11. Stener VE et al. Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. Reproductive Biology and Endocrinology. 2005;3:44.
12. Polson DW et al. Polycystic ovaries—a common finding in normal women. The Lancet. 1988;1:870-2.
13. Balen AH et al. Ultrasound assessment of the polycystic ovary:international consensus definitions. Human Reproduction Update. 2003;9:505-14.
14. 김 탁. 다낭성 난소 증후군의 최신 지견. 대한산부인과학회 연수강좌. 2002;31:38-44.
15. 민응기. 다낭성 난소 증후군. 대한산부인과학회지. 2008;51(8):805-19.
16. Baillargeon JP. Use of insulin sensitizers in polycystic ovarian syndrome. Current Opinion in Investigational Drugs. 2005;6:1012-22.
17. Conway GS et al. Effects of Luteinizing Hormone, Insulin, Insulin-like Growth Factor- I and Insulin-like Growth Factor Small Binding Protein 1 in the Polycystic Ovary Syndrome. Clinical Endocrinology. 1990;33:596-603.
18. 김세련, 김종욱. 고인슐린 혈증과 다낭성난소증후군의 병태 생리. 관동의 대학술지. 2005;9(1):89-98.
19. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome :towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, editors. Polycystic ovary syndrome. 3rd ed. Boston. Blackwell Scientific Publication. 1992;377-84.
20. 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. *Fertil and Steril*. 2004;81:19-25.
21. 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 (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19:41-7.
 22. Azziz R et al. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91:4237-45.
 23. Azziz R et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89:453-62.
 24. Lergo RS, Kunselman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *The American journal of medicine*. 2001;111:607-13.
 25. Carmina E et al. Difference in body weight between American and Italian women with polycystic ovary syndrome: influence of the diet. *Human Reproduction*. 2003;18:2289-93.
 26. Hahn S et al. Clinical and biochemical characterization of women with polycystic ovary syndrome in North Rhine-Westphalia. *Hormone and Metabolic Research*. 2005;37:438-44.
 27. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil and Steril*. 2005;83:1454-1460.
 28. Lergo RS, Finegood D, Dunaif A. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;93:2694-8.
 29. Lergo RS et al. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84:165-9.
 30. Rebar R et al. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1976;57:1320-9.
 31. Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clinical Endocrinology*. 1989;30:459-70.
 32. Anttila L et al. Clinical features and circulating gonadotropin, insulin, and androgen interactions in women with polycystic ovarian disease. *Fertil and Steril*. 1991;55:1057-61.
 33. Santbrink EJ, Hop WC, Fauser BC. Classification of normogonadotropic infertility: polycystic ovaries diagnosed by ultrasound versus endocrine characteristics of polycystic ovary syndrome. *Fertil and Steril*. 1997;67:452-8.
-

34. Arroyo A et al. Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82:3728-33.
35. Taylor AE et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinical defined women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82:2248-56.
36. 윤소영, 강명자. 다낭성 난소증후군 환자의 한방 치료에 대한 임상적 고찰. *대한한방부인과학회지*. 2000;13(2):437-51.
37. Stener VE et al. Effects of eletro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. *Biology of Reproduction*. 2000;63(5):1497-503.
38. Stener VE et al. Effects of electro-acupuncture on corticotropin-releasing factor in rats with experimentally-induced polycystic ovaries. *Neuropeptides*. 2001;35(5&6):227-31.
39. Stener VE. Acupuncture in reproductive medicine: Overview and summary of recent studies. *International Congress Series*. 2002;1238:149-56.
40. Manni L et al. Effects of exercise on ovarian morphology and expression of nerve growth factor and α_1 - and β_2 -adrenergic receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Journal of Neuroendocrinology*. 2005;17:846-58.
41. 양승정 등. 蒼附導痰湯이 estradiol valerate로 유발된 백서의 다낭성 난소에 미치는 影響. *대한한방부인과학회지*. 2002;15(2):1-11.
42. 유영기 등. 腎氣丸合蒼附導痰湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 2007;20(1):84-98.
43. 남은정 등. 定經湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 2007;20(1):99-113.
44. 김희주, 김윤상, 임은미. 蒼附六君湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 2008;21(2):1-16.
45. 이연경 등. 歸脾湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 2008;21(3):60-74.
46. 한의부인과학 편찬위원회. *한의부인과학(上)*. 서울:정담. 2002:126, 410.
47. *전국한 의과대학본초학교실. 본초학*. 서울:영림사. 2000:290, 303, 348, 349, 353, 355, 379, 409, 417, 448, 541.
48. 허 준. *동의보감*. 서울:법인문화사. 2002;290, 291, 362.
49. Barb CR et al. Inhibition of ovulation and LH secretion in the gilt after treatment with ACTH or hydrocortisone. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1982;64(1):85-92.
50. 김근우, 구병수. 항(抗) Stress 실험에 관한 비교 연구. *동의신경정신과학회지*. 1997;8(1):111-25.
51. Anderson E, Lee GY, O'Brien K. Polycystic ovarian condition in the

- dehydroepiandrosterone-treated rat model: Hyperandrogenism and the resumption of meiosis are major initial events associated with cystogenesis of antral follicles. *Reproductive Biology*. 1998;249(1):44-53.
52. Halaas JL et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995;269(5223):543-6.
53. Levin N et al. Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(4):1726-30.
54. Levi MR. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987;237:1154-62.
55. Dissen GA et al. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology*. 2000;141(3):1073-81.
56. Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*. 1982;110(4):1124-32.
57. Dyer CA, Erickson GF. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology*. 1985;116(4):1645-52.
58. Lala HE et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*. 2000;141:1059-72.
59. Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rat: Spontaneous changes in characteristic endocrine features. *Biology of Reproduction*. 1984;31:587-93.