

## 八物君子湯 加味方이 雌性생쥐의 생식능력에 미치는 영향

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실

이수근, 김동철

### ABSTRACT

#### The Effect of *Palmulgunjatang gamibang* on the Ovarian Functions in Female Mice

Su-Keun Lee, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetric & Gynecology, college of Oriental Medicine.  
Daegu Haany University

**Purpose:** These experiments were undertaken to evaluate the effect of administration of *Palmulgunjatang gamibang* on ovarian functions in female mice.

**Methods:** We administered the *Palmulgunjatang gamibang* to 6-week-old female CF-1 mice for 4, 8, or 12 days. After administration of *Palmulgunjatang gamibang* with different concentration, the female mice were injected PMSG and hCG for ovarian hyperstimulation. The mice were divided into 3 different groups for each experiment. To compare the differences, we set a control group treated with plain water at the same volume by the same way.

**Results:** In case of 4-day, 8-day, 12-day administration of *Palmulgunjatang gamibang*, the mean number of total ovulated oocytes and the number of morphologically normal oocytes were increased compared with control group.

We were also examined the embryonic developmental competence in vitro. In case of 4-day administration of *Palmulgunjatang gamibang*, the rates of blastocyst formation from 2-cell stages were higher than control group.

**Conclusion:** From our results suggested that the medication of *Palmulgunjatang gamibang* has beneficial effect on reproductive functions of female mice via promotion of cell proliferation.

**Key Words:** *Palmulgunjatang gamibang*(八物君子湯 加味方), Ovarian function, Embryonic development

## I. 서 론

불임이란 약 1년간 정상적인 부부관계가 이루어졌음에도 임신이 되지 않는 상태를 말한다<sup>1)</sup>. 불임의 발생빈도는 가임기 부부의 10-20%로 추정하고 있으며, 우리나라의 경우 가임여성의 13.5%가 불임인 것으로 조사되었다<sup>2)</sup>. 여성불임의 원인은 난관요인, 배란장애, 자궁 및 자궁경부 요인, 원인 불명 등이다<sup>3)</sup>. 서양의 학의 불임치료는 호르몬 요법, 과배란 유도, 보조생식술 등이있는데 많은 프로토콜이 존재하고 많은 임상 의사들이 선택하는 방법은 체외수정술이다<sup>4,5)</sup>. 그러나 체외수정술의 실제 성공률은 5~25% 정도에 그치고 있으며, 착상 후 30%에 이르는 유산과 5%의 자궁외임신이 보고되고 있다<sup>1)</sup>.

최근 여성들의 사회활동이 활발해지면서 임신과 출산이 늦어져 고령의 가임기 여성들이 임신을 시도하는 경우가 늘고 있다. 고령 여성의 임신률 저하에는 난자의 질적 측면과 자궁내막의 노화가 영향을 미치는데, 특히 노화에 따른 이상난자(abnormal oocytes)의 생산이 중요한 요인으로 이해되고 있다<sup>1)</sup>. 따라서 고령여성의 성공적인 임신을 위해서는 난소의 노화억제와 생식능력의 향상이 중요한 요건이 된다고 하겠다<sup>6)</sup>.

한의학에서 여성불임은 주로 求嗣, 種子, 嗣育, 求子門에서 다루어지고 있다<sup>7-9)</sup>. 불임의 원인은 腎虛, 氣血虛, 子宮虛寒, 瘀血, 痰濕, 肝鬱<sup>9-19)</sup>로 구분됨을 알 수 있다.

최근 한의학에서도 불임에 대한 연구가 지속적으로 진행되어 大營煎<sup>20)</sup>, 歸腎

丸<sup>21)</sup> 등이 백서의 배란에 미치는 실험적 연구와 이 등<sup>22)</sup>, 정 등<sup>23)</sup>, 주 등<sup>24)</sup>이 한약 투여를 통하여 Caspase-3, MAPK, MPG 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하여 체외수정율과 생식능력 향상을 위한 실험적 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

八物君子湯은 《東醫壽世保元》<sup>25)</sup>에 수록된 처방이며 少陰人 腎受熱表熱病으로 表陽이 상승하지 못하고 울체되어 형성된 腎陽困熱로 인하여 기운이 원활하게 소통되지 못하는 상황에 사용되는 처방이다.

八物君子湯은 임상에서 비교적 다용되는 처방임에도 부인과적 응용과 관련된 연구가 부족한 실정이다. 다만 자율신경기능에 미치는 영향에 대한 연구<sup>26)</sup>나 양허증에 미치는 영향<sup>27)</sup>, 노화에 미치는 영향<sup>28)</sup>, 발암과정 억제에 미치는 영향<sup>29)</sup>에 대한 연구 등이 있으나 불임에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 八物君子湯 加味方(PGT-gami)의 생식능력 개선효과를 규명하기 위하여 八物君子湯 加味方을 다양한 농도와 다양한 투여기간으로 나누어 가임 능력이 있는 6주령 생쥐에 투여한 후 난소기능과 배아의 체외배발생율을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이 논문을 통해보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 약제와 동물

#### 1) 약 재

사용한 처방은 《東醫壽世保元》<sup>25)</sup>에 수록된 처방으로 약재는 대구한의대학교 부

속한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였으며 1첩의 내용과 분량은 <Table 1>과 같다.

Table 1. Prescription of *Palmulgunjatang-gami(PGT-gami)* used in this study

韓藥名	生藥名	重量(g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	8 g
白 朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	6 g
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	6 g
當 歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	6 g
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4 g
陳 皮	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	4 g
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	4 g
肉 桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4 g
乾 薑	<i>Rhizoma Siccatum</i>	4 g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4 g
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4 g
大 棗	<i>Jujubae Fructus</i>	4 g
Total amount		58 g

2) 동 물

본 연구에서는 가임 능력이 있는 6주령의 자성 CF-1 생쥐를 사용하였다. 모든 실험동물은 21℃±1℃로 점등과 소등이 각각 12시간으로 조절되는 무균 동물 사육실에서 사육하였으며 전 실험기간 동안 물과 사료는 무제한으로 급식하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

八物君子湯 加味方 처방의 6첩 분량 330 g에 증류수 3000 ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 가열하여 탕제 1400 ml를 추출하였다. 추출한 煎湯液을 100 ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 뒤, -70℃ 이하에서 24시간 이상 defreeze 한 후 96시간 동안 완전히

동결건조시켜 74 g의 분말을 얻었다. 동결건조한 八物君子湯 加味方 분말 74 g을 멸균증류수에 1 mg/ml의 농도로 용해하여 검액을 제조하였다.

2) 검액의 투여

상기 전술한 바대로 준비된 검액을 0.3 ml당 각각 농도가 0, 0.1, 10, 100 mg으로 조정되도록 준비한 다음, 이를 생쥐의 생리주기인 4일, 8일 및 12일간 각각 존데를 사용하여 경구 투여하였다. 서로 다른 투여 농도에 따른 자성생쥐의 난소반응 실험에서는 대조군과 실험군의 마리수를 각각 10마리로 통일하였다.

3. 투여된 생쥐의 다배란 유도과 배란된 난자수의 비교

서로 다른 투여농도와 투여기간으로 조정된 CF-1 생쥐는 투여 종료 후 5 IU의 PMSG(Pregnant mare serum gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내 주사한 후 48시간 후에 5 IU의 hCG(human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내 주사함으로써 다배란(superovulation)을 유도하였다. hCG 투여후 13시간째에 경추분리법(cervical dislocation method)으로 도살한 다음 외과적 방법으로 난소(ovary)와 난관(fallopian tube)을 적출하였다. 적출된 난소는 RNA 추출을 위하여 채취 즉시 주변의 조직과 혈액을 제거한 다음 -196℃의 liquid nitrogen(MVE; USA)에 넣어 보관하였고 난관은 PBS(phosphate buffered saline; gibco, USA)용액이 함유된 petri dish(Nunc; Denmark)로 옮긴 다음 해부현미경(Nikon, Japan)하에서 난관팽대부(ampular region of fallopian tube)에 배란된 난구-난자세포 복합체(cumulus-oocyte complex)를

회수하였다. 회수된 난구-난자복합체는 pasteur pipette(Corning, USA)을 이용하여 0.1 mg/ml 농도로 조정된 hyaluronidase (Sigma, USA)용액으로 옮겨 5분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 이어 해부 현미경하에서 배란된 모든 난자만을 분리하였으며, 신선한 M2 배양액(Sigma, USA)으로 3회 세척한 다음 배란된 난자의 총수와 정상적 형태를 나타내는 난자의 수를 측정하였다. 균일한 난세포질(ooplasm)과 제1극체(1st polar body)의 방출여부 및 투명대의 존재가 확인된 난자만을 정상 난자로 판단하였으며 난세포질이 균일하지 않거나 제1극체의 소실 또는 투명대의 이상이 관찰된 난자는 비정상 난자로 판단하였다.

#### 4. 투여농도 및 투여기간에 따른 2-세포기 배아의 체외발생능 비교

투여농도와 투여기간이 서로 다른 검액이 투여된 생쥐에 대하여 다배란을 유도하기 위해 hCG 투여 후 생식능력이 확인된 웅성 CF-1 생쥐와 1:1의 비율로 합사하여 교미를 유도하였다. 익일 아침 자성생쥐를 관찰하여 질전(vaginal plug)이 확인된 개체를 교미된 것으로 판정한다. 다음 hCG 투여 후 36시간째에 도살하여 난관팽대부를 적출하고 해부현미경하에서 난관팽대부를 30 gauge needle이 부착된 주사기를 이용하여 M2 배양액을 관류하여 수정된 2-세포기 배아를 회수하였다. 회수된 2-세포기 배아는 신선한 M16 배양액에 3 mg/ml 농도의 BSA(bovine serum albumin; Sgma, USA)가 함유된 배양액으로 3회 세척한 다음 이를 paraffin oil(Sigma, USA)에 덩혀진 50  $\mu$ l의 M16 배양액 소적(microdrop)으로 옮긴 다음

37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air 상태의 배양기(Forma, USA)에서 4일간 배양하면서 착상직전 단계인 배란포(blastocyst) 배아로의 발생율을 관찰하였다(Fig. 1).

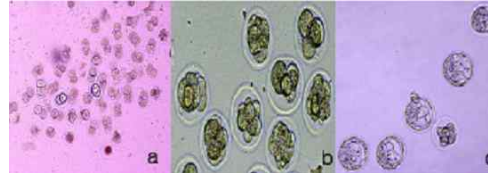


Fig. 1. Development of 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administrated mice  
 a. 2-cell embryos after induction of multi-ovulation  
 b. 4 to 8-cell embryos after 48-hour-culture.  
 c. blastocyst after 96-hour-culture.

#### 5. 통계분석

실험결과의 통계 분석에는 SPSS ver 10.0을 이용하였고, 각 군간의 차이는 Mann-Whitney-Wilcoxon test(M-W test)로 분석하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

### III. 성 적

#### 1. 검액의 투여농도 및 기간에 따른 자성 생쥐의 난소반응

1) 4일간 투여한 후 배란난자의 변화

八物君子湯 加味方 검액을 서로 다른 농도에서 4일간 투여한 결과, 평균 총 배란 난자수는 대조군에서 12.9개, 정상 형태의 배란 난자수는 10.7개였다.

실험군에서는 0.1 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 17.4개, 정상 형태의 배란 난자수는 14개였으며, 1 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 22.1개, 정상

형태의 배란 난자수는 17.8개였다. 10 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 13.9개, 정상 형태의 배란 난자수는 11.9개였으며, 100 mg 농도 하에서 평균 총 배란 난자수는 15.9개, 정상 형태의 배란 난자수는 11.4개였다.

八物君子湯 加味方 검액을 4일간 투여한 후, 평균 총 배란 난자수는 검액 투여군의 모든 농도에서 대조군에 비해 유의

한 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 특히 1 mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수가 가장 증가하였다. 배란된 난자 중 정상 형태의 난자의 수에서도 모든 농도의 실험군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ), 특히 1 mg의 농도에서 가장 많은 증가를 보였다( $p < 0.01$ )(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Comparison of ovulational functions between different dose of *PGT-gami* extract administration for 4 days

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
<i>PGT-gami</i>	Control	0	129 (12.9) <sup>a</sup>	107 (10.7) <sup>d</sup>
	0.1 mg	10	174 (17.4) <sup>b</sup>	140 (14.0) <sup>e</sup>
	1 mg	10	221 (22.1) <sup>b</sup>	178 (17.8) <sup>e</sup>
	10 mg	10	139 (13.9) <sup>c</sup>	119 (11.9) <sup>f</sup>
	100 mg	10	159 (15.9) <sup>c</sup>	114 (11.4) <sup>f</sup>

d&e;  $P < 0.01$ , a&b, a&c, d&f;  $P < 0.05$  : Statistically significant as compared with control group

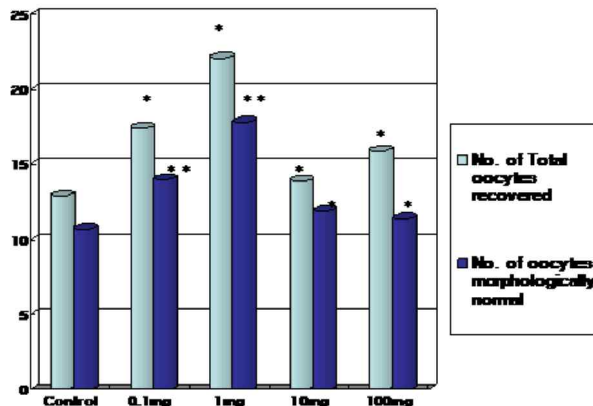


Fig. 2. Comparison of ovulational functions between different dose of *PGT-gami* extract administration for 4 days (\*\*: $P < 0.01$ , \*: $P < 0.05$ )

2) 8일간 투여한 후 배란난자의 변화

八物君子湯 加味方 검액을 서로 다른 농도에서 8일간 투여한 결과, 평균 총 배란 난자수는 대조군에서 14.3개, 정상 형

태의 배란 난자수는 8.7개였다.

실험군에서는 0.1 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 17.3개, 정상 형태의 배란 난자수는 12.5개였으며, 1 mg 농도

에서 평균 총 배란 난자수는 23개, 정상 형태의 배란 난자수는 16.5개였다. 10 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 16.1개, 정상 형태의 배란 난자수는 11.2개였으며, 100 mg 농도 하에서 평균 총 배란 난자수는 21.9개, 정상 형태의 배란 난자수는 16.7개였다.

八物君子湯 加味方 검액을 8일간 투여 하였을 때, 모든 농도의 실험군에서 총

배란 난자수가 유의하게 증가 되었다 ( $p < 0.05$ ). 특히 1 mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수가 가장 많이 증가하였다. 배란된 난자 중 정상 형태의 난자의 수에서도 모든 농도의 실험군에서 대조군에 비하여 증가를 보였으며 ( $p < 0.05$ ) 특히 100mg 농도에서 가장 높은 증가를 보였다 ( $p < 0.01$ ) (Table 3, Fig. 3).

Table 3. Comparison of ovulational functions between different dose of *PGT-gami* extract administration for 8 days

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
<i>PGT-gami</i>	Control	0	143 (14.3) <sup>a</sup>	87 (8.7) <sup>d</sup>
	0.1 mg	10	173 (17.3) <sup>b</sup>	125 (12.5) <sup>e</sup>
	1 mg	10	230 (23.0) <sup>b</sup>	165 (16.5) <sup>e</sup>
	10 mg	10	161 (16.1) <sup>c</sup>	112 (11.2) <sup>f</sup>
	100 mg	10	219 (21.9) <sup>b</sup>	167 (16.7) <sup>e</sup>

d&e;  $P < 0.01$ , a&b, a&c, d&f;  $P < 0.05$  : Statistically significant as compared with control group

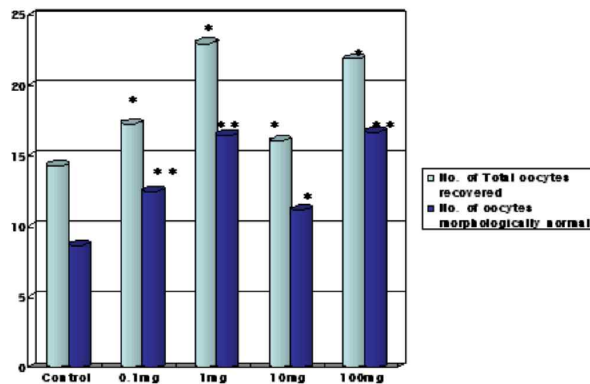


Fig. 3. Comparison of ovulational functions between different dose of *PGT-gami* extract administration for 8 days (\*\*: $P < 0.01$ , \*: $P < 0.05$ )

3) 12일간 투여한 후 배란난자의 변화  
八物君子湯 加味方 검액을 서로 다른 농도에서 12일간 투여한 결과, 평균 총 배란 난자수는 대조군에서 15.7개, 정상 형태의 배란 난자수는 11.2개였다.

실험군에서는 0.1 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 26.9개, 정상 형태의 배란 난자수는 22.7개였으며, 1 mg 농도에서 평균 총 배란 난자수는 32개, 정상 형태의 배란 난자수는 24.2개였다. 10 mg

농도에서 평균 총 배란 난자수는 34.6개, 정상 형태의 배란 난자수는 26.8개였으며, 100 mg 농도 하에서 평균 총 배란 난자수는 22.8개, 정상 형태의 배란 난자수는 16.8개였다.

八物君子湯 加味方 검액을 12일간 투여하였을 때 모든 농도의 실험군에서 총 배란 난자수는 유의하게 증가되었으며

( $p < 0.05$ ) 특히 10 mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수가 가장 많이 증가 하였다. 그리고 배란된 난자 중 정상 형태의 난자 수가 모든 농도의 투여군에서 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 특히 10 mg의 농도에서 가장 많이 증가하였다. 그러나 12일간 투여시 투여군 간의 농도별 차이는 통계적 유의성이 없었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Comparison of ovulation functions between different dose of *PGT-gami* extract administration for 12 days

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
Control	0	10	157 (15.7) <sup>a</sup>	112 (11.2) <sup>c</sup>
<i>PGT-gami</i>	0.1 mg	10	269 (26.9) <sup>b</sup>	227 (22.7) <sup>d</sup>
	1 mg	10	320 (32.0) <sup>b</sup>	242 (24.2) <sup>d</sup>
	10 mg	10	346 (34.6) <sup>b</sup>	268 (26.8) <sup>d</sup>
	100 mg	10	228 (22.8) <sup>b</sup>	168 (16.8) <sup>d</sup>

c&d;  $P < 0.01$ , a&b;  $P < 0.05$  : Statistically significant as compared with control group

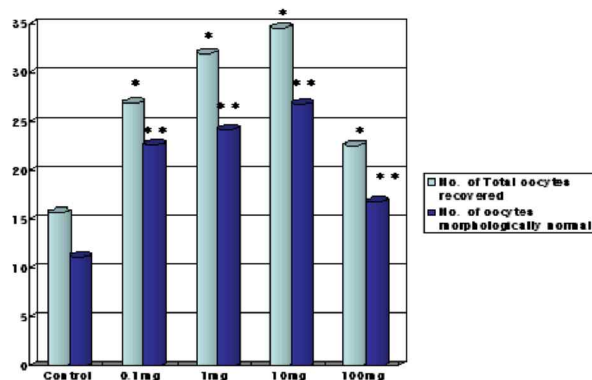


Fig. 4. Comparison of ovulation functions between different dose of *PGT-gami* extract administration for 12 days(\*\*: $P < 0.01$ , \*: $P < 0.05$ )

## 2. 검액의 투여농도 및 기간에 따른 배 발생율의 비교분석

1) 4일간 투여한 후 체외 배발생율 비교  
八物君子湯 加味方 검액을 4일간 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된 2-세포기 배아의 배반포 발생율을 비교하였

다.

2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 87개인데 비해 투여군에서는 0.1 mg 농도에서 121개, 1 mg 농도에서 182개, 10 mg 농도에서 107개, 100 mg 농도에서 117개가 생산되었다.

배반포 발생율은 대조군이 29개(33.3%)인데 비해 투여군에서는 0.1 mg 농도에서 61개(50.4%), 1 mg 농도에서 82개(45.1%), 10 mg 농도에서 46개(43.0%), 100 mg 농도에서 51개(43.6%)로 나타났다.

검액을 4일간 투여한 후 교미유도한 다음 2-세포기 배아의 수는 모든 농도의 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 증

가하였으며( $p < 0.05$ ) 특히 1 mg의 농도에서 가장 많이 증가하였다. 또한 2-세포기 배아의 배반포로의 발생율은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 검액의 투여농도가 0.1 mg이었을 때 가장 많이 증가하였다. 그러나 검액 투여군 사이의 통계적 차이는 유의성이 없었다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administrated mice for 4 days.

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro
<i>PGT-gami</i>	Control	10	87 <sup>a</sup>	29 (33.3) <sup>c</sup>
	0.1 mg	10	121 <sup>b</sup>	61 (50.4) <sup>d</sup>
	1 mg	10	182 <sup>b</sup>	82 (45.1) <sup>d</sup>
	10 mg	10	107 <sup>b</sup>	46 (43.0) <sup>d</sup>
	100 mg	10	117 <sup>b</sup>	51 (43.6) <sup>d</sup>

c&d;  $P < 0.01$ , a&b;  $P < 0.05$  : Statistically significant as compared with control group

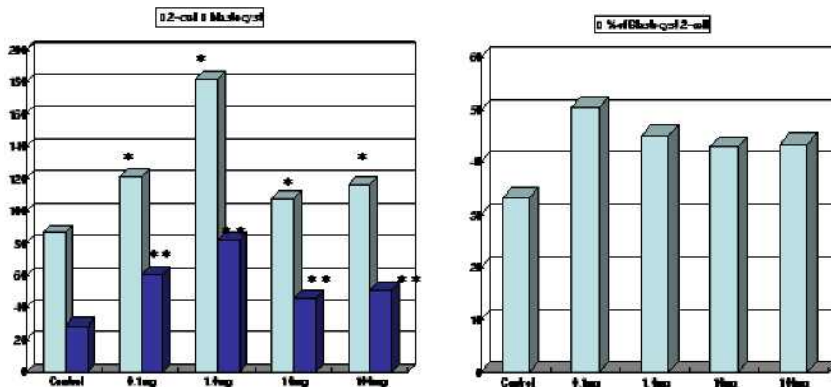


Fig. 5. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administrated mice for 4 days.(\*\*: $P < 0.01$ , \*: $P < 0.05$ )

2) 8일간 투여한 후 체외 배발생을 비교 八物君子湯 加味方 검액을 8일간 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된 2-세포기 배아의 배반포 발생율을 비교하였다.

2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 90개인데 비해 투여군에서는 0.1 mg 농도에서 129개, 1 mg 농도에서 153개, 10 mg 농도에서 103개, 100 mg 농도에서 157개가 생산되었다.



배반포 발생율은 대조군에서 34개(37.8%) 인데 비해 투여군에서는 0.1 mg 농도에서 56개(43.4%), 1 mg 농도에서 76개(49.7%), 10 mg 농도에서 45개(43.7%), 100 mg 농도에서 75개(47.8%)로 나타났다.

8일간 투여한 후 2-세포기 배아의 수는 모든 투여 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 특히

1 mg의 농도에서 가장 많이 증가하였다. 또한 2-세포기 배아의 배반포로의 배발생율도 역시 모든 투여 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 특히 1 mg의 농도에서 가장 많이 증가하였다. 그러나 투여 농도에 따른 배반포 발생율의 통계적 차이는 인정되지 않았다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administrated mice for 8 days

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro
<i>PGT-gami</i>	Control	10	90 <sup>a</sup>	34 (37.8) <sup>c</sup>
	0.1 mg	10	129 <sup>b</sup>	56 (43.4) <sup>d</sup>
	1 mg	10	153 <sup>b</sup>	76 (49.7) <sup>d</sup>
	10 mg	10	103 <sup>b</sup>	45 (43.7) <sup>d</sup>
	100 mg	10	157 <sup>b</sup>	75 (47.8) <sup>d</sup>

c&d;  $P < 0.01$ , a&b;  $P < 0.05$  : Statistically significant as compared with control group

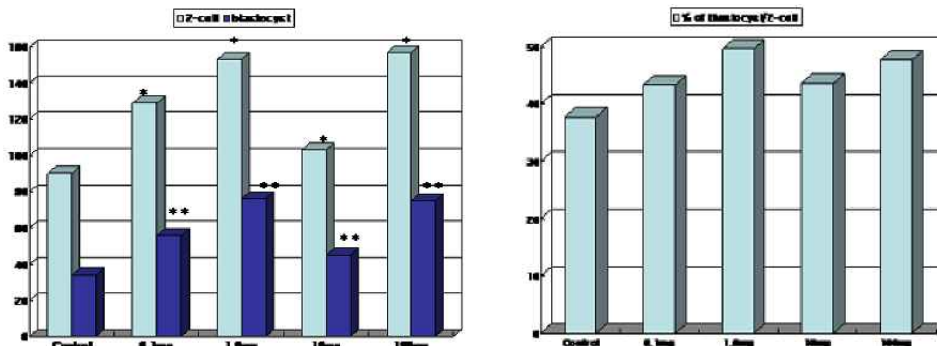


Fig. 6. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administered mice for 8 days. (\*\*: $P < 0.01$ , \*: $P < 0.05$ )

3) 12일간 투여한 후 체외 배발생율 비교

八物君子湯 加味方 검약을 12일간 투여한 후, 교미를 유도한 다음 회수된 2-세포기 배아의 배반포 발생율을 비교하였다.

2-세포기 배아의 수가 대조군에서는

99개인데 비해 투여군에서는 0.1 mg 농도에서 183개, 1 mg 농도에서 188개, 10 mg 농도에서 172개, 100 mg 농도에서 143개가 생산되었다

배반포 발생율은 대조군에서 32개(32.3%)인데 비해 0.1 mg 농도에서는 111개(51.2%), 1 mg 농도에서는 118개(50.6%), 10 mg 농

도에서는 110개(47.6%), 100 mg 농도에서는 84개(47.5%)로 나타났다.

12일간 투여한 후 2-세포기 배아의 수는 모든 농도의 실험군에서 유의하게 증가하였으며(p<0.05), 특히 1 mg 농도에서 가장 많이 증가하였다. 또한 2-세포기

배아의 배반포로의 발생율도 모든 농도의 실험군에서 유의하게 증가하였으며(p<0.01), 특히 0.1 mg 농도에서 가장 많이 증가하였다. 그러나 투여 농도에 따른 배반포 발생율의 통계적 차이는 인정되지 않았다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administrated mice for 12 days

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro
<i>PGT-gami</i>	0	10	99 <sup>a</sup>	32 (32.3) <sup>c</sup>
	0.1 mg	10	183 <sup>b</sup>	111 (51.2) <sup>d</sup>
	1 mg	10	188 <sup>b</sup>	118 (50.6) <sup>d</sup>
	10 mg	10	172 <sup>b</sup>	110 (47.6) <sup>d</sup>
	100 mg	10	143 <sup>b</sup>	84 (47.5) <sup>d</sup>

c&d; P<0.01, a&b; P<0.05 : Statistically significant as compared with control group

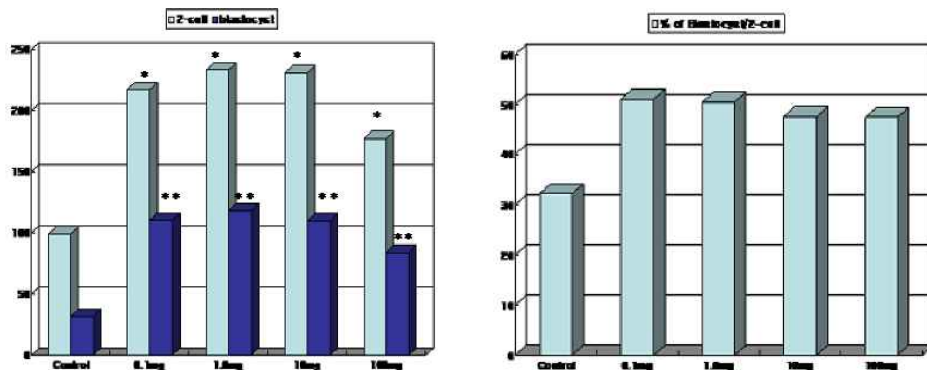


Fig. 7. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *PGT-gami* administrated mice for 12 days.(\*\* :P<0.01, \* :P<0.05)

#### IV. 고 찰

우리나라의 불임 발생율은 부부의 13.5%이며<sup>2)</sup>, 불임을 초래할 수 있는 원인은 다양하게 존재한다. 여성의 원인만을 보면 배란장애(30-40%), 난관 및 복막 요인(30-40%), 기타 원인(10-15%), 그리고 원인을 알 수 없는 경우가 10-15%를

차지하며 불임 부부를 대상으로 하였을 경우 여성 요인이 40-55%, 남성 요인이 25-40%를 차지하며 부부 양측 요인이 10%, 그리고 원인 불명이 10%를 차지한다고 알려져 있다<sup>3)</sup>.

서양의학에서 불임의 치료는 호르몬 요법, 과배란유도, 체외수정술 등이 있다. 이 중 많이 시도되고 있는 체외수정술은 인간난자의 체외수정에 이은 배아

의 자궁내 이식술에 의해서 임신이 성립된다는 간단한 개념에도 불구하고 실제 임신성립에는 여러 가지 어려움이 있다<sup>30)</sup>. 또한 여성의 연령은 임신율에 영향을 끼칠 수 있는 중요한 요인으로 폐경 전이라 하더라도 30세 중반 전후에서 나타나는 난소의 질적 변화가 임상적으로 가지는 의의가 크다. 난소에 존재하는 난자 수의 감소는 apoptosis라는 기전을 통해 일어나며, 생식 능력의 저하는 난자 수의 감소보다는 난자의 질적, 기능적 변화와 더 큰 관련이 있다<sup>31)</sup>.

한의학에서는 불임증을 腎虛, 肝鬱, 痰濕, 氣血虛弱, 瘀血, 濕熱 등으로 변증하여 치료한다<sup>3)</sup>. 《黃帝內經 素問 骨空論》<sup>32)</sup>에서 “督脈生病 其女子不孕”이라 하여 불임증의 병기에 관하여 기술하였으며 그 이후 많은 문헌에서 ‘求嗣’, ‘種子’, ‘嗣育’, ‘求子’, ‘子嗣’ 등으로 다루어 졌으며<sup>33)</sup> 각 원인, 즉 腎虛, 肝鬱, 痰濕, 氣血虛弱, 瘀血, 濕熱 등으로 구분하여 변증 치료하여 왔다. 腎虛의 경우 선천적인 稟賦의 부족, 무절제한 성생활, 만성 질환 등으로 유발되며 毓麟珠가 대표적인 처방이다. 肝鬱의 경우 肝血이 부족하거나 七情이 손상되어 肝이 疏泄기능을 잃게 되어 유발되며 開鬱種玉湯, 調經種玉湯 등이 대표적인 처방이다. 痰濕의 경우는 寒濕이 밖에서 들어오거나 勞倦 內傷 등으로 脾胃 기능이 약해지면 濕이 쌓여서 痰이 되어 생기며 導痰湯 류의 처방을 쓴다. 濕熱의 경우 수술, 산후, 월경 기간의 부주의로 邪氣가 침입하여 熱이 발생하여 유발되며 解毒四物湯, 銀花瀉肝湯 등을 쓴다. 血瘀의 경우 七情 손상으로 氣滯가 되거나 산후 餘血이 있는데 외부에서 邪氣가 침입하여 血이 凝結되어 유

발되며 小腹逐瘀湯, 血府逐瘀湯 등이 대표적인 처방이다. 血虛의 경우 평소 허약하거나 久病大病으로 血虛하게 되거나 脾胃 運化기능이 부족하여 유발되며 溫土毓麟湯이 대표적인 처방이다<sup>3,33)</sup>.

불임과 관련된 기존의 실험 연구를 살펴보면 肉蓯蓉과 紫河車가 노화 백서의 배란 능력을 높이고<sup>34,35)</sup>와 十全濟陰丸이 백서의 초기 배발생에 유효하며<sup>36)</sup>, 毓麟珠와 四物湯이 체외수정에 효과가 있으며<sup>37,38)</sup>, 배란 관련 호르몬에 대해서는 坐藥廣嗣丸이 유효함을 보고하였다<sup>39)</sup>.

八物君子湯은 李濟馬의 《東醫壽世保元 第 2券 新定少陰人病應用要藥二十四方中》<sup>25)</sup>에 수록된 處方으로 그 構成內容은 人蔘 二錢, 黃芪, 白朮, 白芍藥, 當歸, 川芎, 陳皮, 炙甘草 各一錢, 生薑 三片, 大棗 二枚로 되어 있으며 少陰人의 鬱狂證에 쓰는 처방이다. 草本卷의 八珍湯은 李濟馬가 변형시킨 四君子湯(人蔘, 白朮, 炙甘草, 白何首烏)과 四物湯(當歸, 川芎, 白芍藥, 砂仁)을 合方한 것이다. 舊本의 八物湯은 草本의 八珍湯에서 白何首烏를 黃芪로, 砂仁을 官桂로 바꾼 것인데, 八物君子湯은 八物湯의 官桂를 陳皮로 바꾼 처방이다. 八物君子湯은 少陰人이 腎受熱表熱病으로 表陽이 상승하지 못하고 울체되어 형성된 腎陽困熱로 인하여 기운이 원활하게 소통되지 못하는 상황에 사용되는 처방이다<sup>25)</sup>. 실제 임상에서 鬱狂證은 氣血不足, 神經症을 동반한 虛勞證에서 관찰되며 邪氣가 表에 있는 상황을 포괄하며 少陰人의 正氣를 복구하고 전체적인 順氣를 도와야 할 병증이다. 본 연구에서 사용한 八物君子湯 加味方은 《四象醫學 性理臨床論》<sup>43)</sup>에 수록된 처방으로 八物君子湯<sup>25)</sup> 原方에서 白朮,

白芍藥, 當歸를 각각 一錢半으로 증량하고, 肉桂와 乾薑을 각 一錢씩 가미한 처방이다<sup>43)</sup>. 본 방의 구성원리는 少陰人氣鬱과 氣血虛弱에서 비롯된 不妊을 목표로 하는데 子宮을 더욱 따뜻하게 할 목적으로 乾薑, 肉桂를 加하였고, 下焦血分에 작용하여 자궁으로의 순환대사를 촉진시키도록 當歸, 白芍藥의 양을 더 늘리고, 脾胃의 운화 장애를 고려해 白朮을 좀 더 增量하였다<sup>44)</sup>.

八物君子湯 加味方이 난소의 기능과 배발생율에 미치는 영향을 알아보기로 八物君子湯 加味方 투여 후 배란과 배발생율의 변화를 관찰하여 유전자 활성도를 실험하였다.

본 실험연구에서는 가임 능력이 있는 6주령 자성생쥐를 사용하였으며, 八物君子湯 加味方 검액의 투여 기간은 쥐의 난소 주기를 기준으로 4일, 8일, 12일로 하였고, 투여 농도는 각각 0, 0.1mg, 1mg, 10mg, 100mg으로 하여 서로 다른 투여 기간과 투여 농도에 따른 변화를 관찰하였다.

八物君子湯 加味方 검액을 서로 다른 농도에서 4일간 투여한 결과, 평균 총 배란 난자수는 투여군의 경우 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 특히 1mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수가 가장 많이 증가하였다. 배란된 난자 중 정상 형태의 난자의 수에서도 대조군에 비해 검액 투여군이 유의적으로 높은 수를 나타내었으며( $p < 0.05$ ), 특히 1 mg 농도에서 가장 많이 증가하였다( $p < 0.01$ ).

8일간 투여했을 때에도 대조군에 비해 투여군이 양호한 결과를 나타내었다. 8일간 투여했을 때 대조군에 비해 투여군에서 총 배란 난자수와 정상 형태의 배

란 난자수가 증가되었다( $p < 0.05$ ). 특히 1 mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수가 가장 많이 증가하였다. 배란된 난자 중 정상 형태의 난자의 수에서도 모든 농도의 실험군에서 대조군에 비해 많은 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ), 특히 100 mg 농도에서 가장 높은 증가를 보였다( $p < 0.01$ ).

12일간 투여했을 때에도 역시 투여군에서 난소의 배란기능 향상이 관찰되었다. 모든 농도의 실험군에서 총 배란 난자수와 정상 형태의 배란 난자수는 유의하게 증가되었으며( $p < 0.05$ ), 특히 10mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수가 가장 많이 증가하였다. 그리고 배란된 난자 중 정상 형태의 난자 수가 모든 농도의 투여군에서 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 특히 10mg의 농도에서 가장 많이 증가하였다. 그러나 12일간 투여시 투여군 간의 농도별 차이는 통계적 유의성이 없었다.

八物君子湯 加味方 검액을 투여하여 투여 기간과 투여 농도에 따른 평균 총 배란 난자수를 비교하였을 때, 4일간 투여하였을 때와 8일간 투여하였을 때는 1 mg 농도에서, 12일간 투여하였을 때는 10 mg 농도에서 가장 우수한 결과를 나타내었다. 배란된 난자 중 정상 형태의 난자수는 4일간 투여했을 때는 1mg 농도에서, 8일간 투여했을 때는 100mg 농도에서 가장 유의성 있는 결과를 나타내었으나 12일간 투여했을 때는 농도에 따른 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 팔물군 자탕의 투여기간에 따른 차이를 비교할 경우 4일과 8일간 투여에 비해 12일간 투여시 배란기능의 향상은 뚜렷하게 나타남을 확인할 수 있었다.

다음으로 八物君子湯 加味方 검액을 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된

2-세포기 배아(2-cell embryo)의 배반포(blastocyst)로의 발생율을 비교하여 투여 기간과 농도에 따른 배아의 체내수정 후 배발생율을 살펴보았다.

4일간 투여한 경우 배반포 발생율은 대조군이 33.3%인데 비해 투여군에서는 0.1mg 농도에서 50.4%, 1mg 농도에서 45.1%, 10mg 농도에서 43%, 100mg 농도에서 43.6%로 나타났다. 투여군이 대조군(33.3%)에 비해 유의성 있게 증가하는 경향이 있었으며 검액의 투여농도가 0.1mg이었을 때 가장 우수한 결과를 나타내었다( $p < 0.01$ ). 그러나 검액의 투여 농도에 따른 투여군 간의 차이는 통계적으로 유의성이 없었다.

8일간 투여한 경우 배반포 발생율은 대조군이 37.8%인데 비해, 투여군은 0.1mg 농도에서는 43.4%, 1mg 농도에서는 49.7%, 10mg 농도에서는 43.7%, 100mg 농도에서는 47.8%로 나타났다. 대조군에 비해 투여군에서 배발생율이 유의성 있게 증가되었다( $p < 0.01$ ). 그러나 투여군 간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

12일간 투여한 경우에서도 대조군에서는 배반포 발생율이 32.3%인데 비해, 0.1mg 농도에서는 51.2%, 1mg 농도에서는 50.6%, 10mg 농도에서는 47.6%, 100mg 농도에서는 47.5%로 나타났다. 역시 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 배발생율의 증가가 있었다( $p < 0.01$ ). 그러나 투여군 간의 통계적으로 유의성 있는 차이는 없었다.

八物君子湯 加味方 검액을 투여하여 배란된 난자의 배반포 발생율을 투여 기간과 투여 농도별로 비교하였을 때, 전체적으로 대조군에 비해 투여군에서 발생율이 더 높게 나타났으며 이로 보아

八物君子湯 加味方の 투여가 배란된 난자의 수정 후 배반포 발생율의 증가에 보다 효과적으로 기여할 수 있으리라 판단되었다.

이상의 결과에서 八物君子湯 加味方은 배란 난자수와 정상 형태의 난자수를 증가시키며 체내수정 후 배발생율을 증가시켜 생식능력을 높이는 효능이 있다는 것을 알 수 있었다.

八物君子湯 加味方 투여는 난소 기능을 향상시켜 난자의 배란 수를 증가시키며 체내 수정 이후에도 배발생율을 높이므로, 임상에서 배란 장애로 인한 불임에 본 처방을 사용한다면 좋은 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

八物君子湯 加味方이 자성 생쥐의 가임 능력과 caspase-3, MAPK, MPG 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 서로 다른 투여 농도에 따른 자성 생쥐의 난소반응과 서로 다른 투여 기간에 따른 체내 수정된 배아의 체외발생능을 비교하고 투여된 생쥐 난소조직의 유전자 발현을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 八物君子湯 加味方 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 자성 생쥐의 평균 총 난자수와 정상 형태의 난자수는 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 매우 유의한 증가를 나타내었다.
2. 八物君子湯 加味方 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 자성생쥐의 체내수정 후 2-세포기 배아에서 배반포로의

배발생율은 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 매우 유의한 증가를 나타내었다.

- 투 고 일 : 2010년 10월 26일
- 심 사 일 : 2010년 11월 2일
- 심사완료일 : 2010년 11월 9일

## 참고문헌

1. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈 서적. 1997:598-697.
2. 한국보건사회연구원. 우리나라 불임 및 불임관련 의료이용실태와 문제 해결을 위한 연구. 정책보고서. 2003.
3. 한의부인과학 편찬회. 한방여성의학(I). 서울:정담. 2007:267-81.
4. 구병삼. 부인과 내분비학. 서울:고려의학. 2001:303-428.
5. 이우식. 불임치료의 최신지견. 대한산부인과학회지. 2005;48(5):1106-29.
6. 서창석. 불임의 진단과 치료. 가정의학회지. 1999;20(11):1466-76.
7. 吳謙. 醫宗金鑑. 북경:인민위생출판사. 2004:45-51.
8. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:대성문화사. 1984:16.
9. 李梴. 醫學入門. 서울:남산당. 1974:548.
10. 유태성, 고희균, 김창환. 不孕의 침구 치료에 대한 고찰. 대한한방부인과학회지. 1988;2(1):23-33.
11. 김철원, 류심근, 박병렬. 여성불임의 원인분류에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1991;4(1):43-56.
12. 강명자. 불임증에 대한 임상적 고찰. 大韓韓方婦人科學會誌. 1988;2(1):35-42.
13. 이승재 등. 동의보감 중 불임증 치료에 사용된 처방 및 약물에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 1998;11(1):15-22.
14. 윤정선 등. 여성불임의 침치료와 구치료에 대한 문헌적 비교연구. 대한한방부인과학회지. 2000;13(1):531-55.
15. 국제한의학학생회. 東洋醫學叢書 卷七 中醫婦科學. 서울:일중사. 1990:158-61.
16. 민부기. 생쥐난의 체외배양에서 인간 난포액과 표피 생장 인자가 난성숙에 미치는 영향. 대한불임학회지. 1993;20(2):157-60.
17. 武之望. 濟陰綱目. 臺北:旋風出版社. 1972:189-90.
18. 沈堯封. 沈氏女科輯要. 臺北:旋風出版社. 1967:90-1.
19. 張仲景. 金櫃要略方論. 臺北:臺聯國風出版社. 1973:94.
20. 이수정 등. 大營煎이 백서의 배란과 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(4):108-18.
21. 안규환 등. 歸腎丸이 白鼠의 배란과 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):1-18.
22. 이형곤 등. 調經散이 자성 생쥐의 생식능력과 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(2):1-24.
23. 정연철 등. 歸脾湯이 자성 생쥐의 생식능력과 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(3):13-34.
24. 주진만 등. 八物湯이 자성 생쥐의 생식능력과 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(3):91-110.
25. 전국 한의과대학 사상의학교실 엮음.

- 사상의학. 서울:집문당. 2004:204-19, 360-72.
26. 宋正模, 宋一炳, 高炳熙. 太少陰人의 처방이 스트레스 유발 백서의 자율 신경기능에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 1995;7(2):185-96.
27. 김진성. 소음인 八物君子湯과 升陽益氣湯이 Hydrocortisone Acetate로 유발된 양허증에 미치는 실험적 연구. 대한한의학회지. 1987;9(1):42-61.
28. 최예원. 八物君子湯과 十二味寬中湯이 Wistar rat의 노화에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 2004.
29. 류정만, 박성식. 八物君子湯이 Cytochrome P450 효소 활성화에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2005;17(2):64-73.
30. 김석현 등. 체외수정시술시 배아의 보조부화술을 이용한 임신율 향상에 관한 연구. 대한불임학회지. 1997;24(1):119-33.
31. 이보연. 난소의 노화. 대한폐경학회지. 1999;5(2):129-34.
32. 王琦 등. 內經今釋. 貴州:貴州人民衛生出版社. 1981:264.
33. 羅元愷 主編. 中醫婦科學. 북경:인민위생출판사. 1995:385-92.
34. 허지원 등. 肉蓯蓉이 생쥐의 生殖能力에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):70-8.
35. 김로사 등. 紫河車가 老化생쥐의 生殖能力에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):56-69.
36. 張美慶, 李京燮, 宋炳基. 十全濟陰丸이 排卵 및 初期胚發生에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):9-22.
37. 成娟受 등. 體外受精과 關聯한 毓麟珠의 效能에 관한 研究. 대한한방부인과학회지. 1999;12(1):161-83.
38. 曹禎勳, 李京燮, 宋炳基. 생쥐의 體外受精(IVF) 각 段階에 對한 四物湯의 效果. 대한한방부인과학회지. 2000;13(1):94-111.
39. 李吉柱, 柳同烈. 坐藥廣嗣丸이 卵巢摘出白鼠의 성호르몬 및 脂質대사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(1):81-104.
40. 王肯堂. 六科准繩(類方). 서울:한성사. 1982:66-7.
41. 陳師文. 太平惠民和劑局方, 臺北:旋風出版社. 1975:94, 121.
42. 上海中醫學院編. 方劑學. 上海:商務印書館. 1981:225-6.
43. 金洲. 四象醫學性理臨床論. 서울:대성문화사. 1997:159.
44. 전국한의학대학교 본초학교실 공편저. 본초학. 서울:영림사. 2000:334-8, 536-7, 578-83.