대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.25 NO.2 : 043-065 (2012)

血府逐瘀湯이 Estradiol Valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소 및 수태에 미치는 영향

세명대학교 한의과대학 부인과학교실
배상진, 김형준, 이동녕

ABSTRACT

Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* on the Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovaries and the Conception of Rats

Sang-Jin Bae, Hyung-Jun Kim, Dong-Nyung Lee
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

Objectives: This study was designed to investigate the effects of *Hyeolbuchukeo-tang*(HCT) on the Estradiol Valerate(EV) induced Polycystic Ovaries and the Implantation of rats.

Methods: PCO was induced by single intramuscular(IM) injection with EV in female rats. Normal group(n=8) were injected with sesame oil and orally administrated distilled water for 60 days. Control group(n=8) were injected with EV and orally administrated distilled water for 60 days. HCT treated group(n=8) were injected with EV and orally administrated HCT for 60 days. At the end day of experiment, we measured weights of body, ovaries, adrenal glands, uterus and contents of serum LH, FSH, ADD. The histomorphometrical changes of ovaries were also evaluated. And we observed the NGF and CRF expression by immunohistochemistry. Also we observed the mating and count the number of implantation.

Results:
- The weights(㎎) of ovaries in HCT treated group(58.9±6.5) were significantly increased ($p<0.01$) compared with control group (42.3±8.5).
- The number of mature follicles in HCT treated group(9.8±2.6) was significantly increased ($p<0.01$) compared with control group(6.1±2.1).
- The number of cystic follicles in HCT treated group(1.6±1.2) was significantly decreased ($p<0.01$) compared with control group(3.8±1.5).
- The value of serum FSH(mIU/㎖) in HCT treated group(3.870±2.151) was significantly decreased($p<0.05$) compared with control group(10.476± 6.294).
- The expression of NGF-immunoreactive cells in the ovarian cells in HCT treated group was lesser observed than control group.
- The number of implantation in HCT treated group(7.4±1.8) was significantly increased ($p<0.05$) compared with control group(3.1±4.4).

Conclusions: *Hyeolbuchukeo-tang*(HCT) is effect on polycystic ovaries and the implantation of rats by EV-induced.

Key Words: *Hyeolbuchukeo-tang*, polycystic ovaries(PCO), polycystic ovarian syndrome (PCOS), Estradiol Valerate(EV), Conception, Implantation

교신저자(이동녕) : 충북 충주시 봉방동 세명대학교 충주한방병원 부인과
전화 : 041-841-1733 팩스 : 043-856-1731 이메일 : handr88@korea.com

Ⅰ. 서 론

다낭성 난소 증후군(polycystic ovarian syndrome, PCOS)은 무배란이나 무월경, 희발월경 등의 증상과 함께 불임증, 다모증 등을 일으키며, 초음파상 다낭성 난소소견과 고안드로겐혈증이 나타나는 내분비 질환이다[1]. 정확한 유병율은 알 수 없지만, 일반적으로 생식 연령 여성의 10%에서 발생한다고 추정하고 있으며, 최근 들어 식생활과 생활환경 등의 변화로 증가하고 있는 추세이다[2].

PCOS는 1935년 Stein과 Leventhal에 의해서 처음 보고된 이후[3], 지금까지 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나, 혈중 LH증가, testosterone, androstenedione (ADD), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) 및 유리형의 남성호르몬 증가, 인슐린과 유즙분비호르몬 증가 등과 같은 대사 이상을 나타내는 혈액검사소견을 보이는 경우가 흔하다[14]. 또 PCOS에서는 난포 발달에 앞서 난소를 자극하는 교감신경이 활성화되어 난소의 신경성장인자(nerve growth factor, NGF) 분비가 증가한다는 보고가 있고[4], 스트레스와 연관된 peptide인 corticotrophin releasing factor(CRF)가 생리학적 행동의 변화를 일으켜 스트레스로 유발된 무배란과 같은 생식기능의 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다[5].

서양의학에서는 항안드로겐제, 경구피임약, 클로미펜, 인슐린 감수성 개선제 등의 약물을 사용하고 있으나, 이는 대증치료이며, 각각의 방법에 따라 부작용 등의 문제가 있다[6].

한의학에서 다낭성 난소 증후군은 증상에 따라 “經閉”, “月經不調”, “無子”, “面疱”, “肥胖不孕” “多毛” 등의 범주에서 찾아볼 수 있고[7], 氣滯血瘀, 肝鬱, 腎虛, 痰濕阻滯 등을 원인으로 인식하고 있으며[8] 각 원인에 따라 활용되는 처방들의 효능을 검증하기 위한 실험적 연구가 진행되고 있으나[36-42] 瘀血과 관련된 연구가 부족했다.

이에 저자들은 부인과 질환중 瘀血을 치료하는 대표 처방인 血府逐瘀湯[9]을 이용해 PCOS에 대한 효과를 실험적으로 규명하기 위해 Estradiol Valerate(EV)를 흰쥐에 근육주사 하여 다낭성 난소를 유발시켰다. 이후 血府逐瘀湯 투여에 따른 체중 및 난소, 자궁, 부신의 무게, 난소의 육안 및 병리조직학적 소견을 비교하고, 혈청 FSH와 LH, androstenedione (ADD), nerve growth factor(NGF) 및 corticotrophin releasing factor(CRF)의 발현 정도를 비교하여, 다낭성 난소에 대한 血府逐瘀湯의 효과를 확인하였다. 또한 血府逐瘀湯 투여가 임신에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 군 간의 착상 및 수태율을 비교하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 血府逐瘀湯 농축액의 제조

1) 실험동물

체중 170 g 내외의 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(오리엔트바이오, 한국)를 구입하여 세명대학교 청정동물 사육실에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 청정동물실의 사육환경은 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 12시간 주기의 명암을 유지하였다. 교배 및 수태율을 확인하기 위해서 암컷과 동일한 계통의 12주령 수

컷을 교배 1주일 전에 구입하여 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 음수는 자유 섭취케 하였다. 본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecae 10-07-01)을 받아 시행하였다.

2) 血府逐瘀湯 농축액의 제조

실험에 사용한 血府逐瘀湯은 『醫林改錯』[9]에 의거하였으며, 약재는 세명대학교 한방병원에서 구입하였다. 처방 내용과 1첩 분량은 Table 1과 같다.

血府逐瘀湯 4첩 분량(392 g)을 2000 ㎖의 증류수에 2시간 동안 담가서 수분을 충분하게 흡수하게 한 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 원심분리하여 침전된 성분을 제거하고 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)를 이용하여 100 ㎖로 농축시켰다. 이 농축액 1 ㎖를 흰쥐 마리 당 1일 투여량으로 하였다. 이 투여량은 체중 비례로 환산하여 60 kg 성인의 1일 복용량의 약 5배에 해당되는 용량이다.

Table 1. Prescription of *Hyeolbuchukeo-tang*

Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight (g)
桃 仁	*Persicae Semen*	16
紅 花	*Carthami Flos*	12
牛 膝	*Achyranthis Bidentatae Radix*	12
當 歸	*Angelicae Gigantis Radix*	12
生地黃	*Rehmanniae Radix*	12
赤芍藥	*Paeoniae Radix Rubra*	8
烏 藥	*Linderae Radix*	8
桔 梗	*Platycodi Radix*	6
川 芎	*Cnidii Rhizoma*	4
紫 胡	*Bupleuri Radix*	4
甘 草	*Glycyrrhizae Radix*	4
Total		98

2. 다낭성 난소 병태동물

다낭성 난소 병태동물은 Brawer 등[10]의 방법에 준하여 작성하였다. Estradiol valerate(Sigma Co., USA)를 0.5 ㎖의 benzyl alcohol(Sigma Co., USA)에 용해시킨 후 sesame oil(Sigma, USA)을 이용하여 20 ㎎/㎖의 농도로 혼합하고 이 용액 0.2 ㎖ 을 1회 엉덩근육에 주사하여 다낭성 난소를 유발시켰다.

3. 다낭성 난소에 미치는 영향에 관한 연구

1) 실험군의 분류

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

정상군(Normal Group)은 sesame oil 0.2 ㎖ 만을 1회 엉덩근육에 주사하고 60일간 매일 1회 증류수 1 ㎖을 경구투여 하였다.

대조군(Control Group)은 다낭성 난소를 유발시키기 위해 EV를 엉덩근육에 주사하고 60일간 매일 1회 증류수 1 ㎖을 경구투여 하였다.

血府逐瘀湯투여군(*Hyeolbuchukeo-tang* Treated Group)은 다낭성난소를 유발시키기 위해 EV를 엉덩근육에 주사하고 60일간 매일 1회 血府逐瘀湯 농축액 1 ㎖을 경구투여 하였다.

2) 검사 항목 및 방법

(1) 체중의 측정

실험 개시일, 실험 후 2, 4, 6, 8 주에 체중을 측정하였다.

(2) 난소, 부신 및 자궁 중량 측정

EV 접종 후 60일에 흰쥐를 에테르로 마취하고 전혈을 심장을 통해서 채혈하

였다. 채혈 후 심장을 통해서 0.05 M PBS(pH 7.5)로 2분간 관류하고 이어서 4% paraformaldehyde 액으로 5분간 관류고정 하였다. 고정 후 양측 난소, 부신 및 자궁을 적출하였으며, 장기 주위의 결합조직을 세밀하게 제거한 후 정밀화학저울(A&D GR-202, Japan)로 무게를 측정하였다.

(3) 난소의 육안 관찰

부검하여 적출된 난소를 육안으로 관찰하고 군별로 모든 난소를 사진촬영하였다.

(4) 난소의 병리조직학적 관찰과 난포 및 황체 수의 측정

개체당 한쪽 난소를 자동조직처리기(Shandon Lipshaw, Citadel 2000, USA)를 이용하여 통상적인 조직처리를 한 후 파라핀에 포매하였다. 조직절편기(Leica, RM2125, Germany)로 5 ㎛ 두께의 난소 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색하고 광학현미경하에서 일반적인 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

또한 각 난소 절편에서 관찰된 난포 및 황체의 수를 계수하였다. 난포의 수는 난모세포가 관찰되는 난포만을 대상으로 다음과 같이 구분하였다. 난포막이 형성되고 과립막세포가 중층으로 증식된 난포를 2차 난포로, 난포동이 형성된 난포를 성숙난포로, 난모세포의 변성 또는 과립막 세포의 고사(apoptosis)가 관찰되는 난포를 폐쇄 난포로, 난포의 대부분이 낭으로 구성된 난포를 낭성 난포로 판정하여 계수하였다. 다만 낭성 난포는 난모세포가 관찰되지 않더라도 계수하였다. 황체는 외난포막으로 뚜렷하게 둘러싸인 것만 계수 하였으며, 황체의 경계가 불분명한 퇴화 중인 것은 계수에서 제외 하였다.

(5) 혈중 luteinizing hormone(LH), follicular stimulating hormone (FSH), androstenedione(ADD) 함량 측정

실험종료일에 채혈한 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심하여 혈청을 분리하고, 분리된 혈청은 분석 전까지 -60℃에 보관하였다.

혈중 LH 함량측정은 Rat LH Detect ELISA kit(INRA, France)를 이용하였으며, 혈중 FSH 함량측정은 Rat FSH ELISA kit(IDS, Belgium)를 이용하였고, 혈중 ADD 함량측정은 Androstenedione EIA kit(DSL, USA)를 이용하였다. 사용자 매뉴얼에 따라 혈청을 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular devices, Spectra Max 190, USA)로 판독하였다.

(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 통상적인 처리를 한 후 파라핀에 포매하고, 조직절편기(Leica, RM2125, Germany)로 5 ㎛ 두께의 박절편을 만들고, poly-L-lysine을 처리한 슬라이드(Marienfeld, Histobond, Germany)에 부착하였다. 탈파라핀 및 함수 과정을 거친 조직을 citrate buffer(pH 6.0)에 넣어 500W 출력의 microwave로 5분간 3회 처리하여 항원성을 부활시키고, 1% H_2O_2 용액에 1시간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit(Vector Lab., USA)를 이용하여 NGF 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 일차항체인 rabbit anti-mouse

nerve growth factor(Chemicon International Inc., USA)를 400배 희석하여 4℃에서 24시간 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 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 정중융기(median eminence) 부위의 시상단면을 만들어자동조직처리기(Shandon Lipshaw, Citadel 2000, USA)를 이용하여 통상적인 처리를 한 후 파라핀에 포매하고, 조직절편기(Leica, RM2125, Germany)로 5 ㎛ 두께의 박절편을 만들고, poly-L-lysine을 처리한 슬라이드(Marienfeld, Histobond, Germany)에 부착하였다. 탈파라핀 및 함수 과정을 거친 조직을 protinase K(10 ㎍/㎖, Roche, Germany)에 20분간 처리하여 항원성을 부활시키고, 1% H_2O_2 용액에 1시간 처리하여 내인성 과산화 반응을 억제한 후 ABC kit(Vector Lab., USA)를 이용하여 CRF 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 일차항체인 rabbit anti-human CRF(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 200배 희석하여 4℃에서 24시간 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 정중융기에서 CRF 양성 반응의 강도를 측정하였다. 정중융기에서 CRF에 염색된 부위의 투과도를 측정하고, 정상군에서 측정된 투과도의 평균을 100%로 기준하여 대조군과 血府逐瘀湯투여군의 투과도를 환산하여 양성반응의 정도를 표시하였다.

4. 수태에 미치는 영향에 관한 연구

1) 실험군의 분류, 수컷의 합사 및 교배 확인

정상군(Normal Group)은 sesame oil만을 1회 엉덩근육에 주사하고 60일간 증류수 1 ㎖을 경구투여 한 후, 아무런 처치를 하지 않은 13주령의 수컷과 1:1 합사하였다.

대조군(Control Group)은 EV를 엉덩근육에 주사하고 60일간 매일 1회 증류수 1 ㎖을 경구투여 한 후, 아무런 처치를 하지 않은 13주령의 수컷과 1:1 합사하였다.

血府逐瘀湯투여군(*Hyeolbuchukeo-tang* Treated Group)은 EV를 엉덩근육에 주

사하고 60일간 매일 1회 血府逐瘀湯 감압농축액 1 ㎖을 경구투여 한 후, 아무런 처치를 하지 않은 13주령의 수컷과 1:1 합사하였다.

합사 후 5일간 매일 오전 7시에 질도 말표본을 만들고 현미경으로 정자를 확인하여 교배유무를 판단하였다. 교배가 확인되면 수컷을 암컷에서 분리시켰다. 5일간의 합사기간에 교배가 확인되지 않은 경우에는 다른 수컷과 1:1 합사시켰다. 현미경으로 교배를 확인하는 기간은 총 10일로 하였으며, 각 군당 암컷 수는 8마리를 배정하였다. 교배가 성립된 개체는 1점, 교배하지 않은 개체는 0점으로 부여하여 계수화 하였다.

2) 착상 수의 관찰

교배가 확인된 개체는 교배일로부터 10일 후에, 교배가 확인되지 않은 개체는 최초 합사 후 15일에 부검하여 육안적으로 확인되는 착상 수를 계수하였다.

5. 통계처리

실험Ⅰ 및 실험Ⅱ 에서 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 2주부터 실험 종료일까지 유의성 있게 체중이 낮았다. 血府逐瘀湯투여군의 체중은 전 실험기간 동안 대조군에 비해서 다소 높았으나 유의한 차이는 없었다(Table 2).

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

Group	Body Weights(g)				
	0	2	4	6	8 wks
Normal (n=8)	199 ±6[a)]	239 ±7	268 ±6	270 ±9	280 ±10
Control (n=8)	199 ±6	218 ±9***	244 ±12***	254 ±10**	259 ±9**
Treated (n=8)	199 ±6	225 ±5	241 ±6	259 ±9	262 ±8

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 *Hyeolbuchukeo-tang*
* : Statistically significant compared with normal group(** :p<0.01, *** :p<0.001)

2. 난소의 육안 소견

정상군에서는 모든 난소에서 다양한 크기의 성숙난포 및 황체가 표면으로 돌출되어 있었다(Fig. 1).

대조군에서는 7예의 난소가 현저히 위축되어 있었고, 성숙 난포 및 황체의 형성이 드물게 관찰되었다. 또한 맑은 액을 함유한 낭성 난포가 표면으로 돌출되어 있었다(Fig. 2).

血府逐瘀湯투여군의 난소 중 3예는 정상군과 유사한 정도의 크기를 보였으며, 성숙난포 및 황체의 발달도 뚜렷이 관찰되었다. 나머지 5예도 대조군에 비해서 성숙 난포 및 황체의 발달이 보다 뚜렷하였으며 크기도 커져 있었다(Fig. 3).

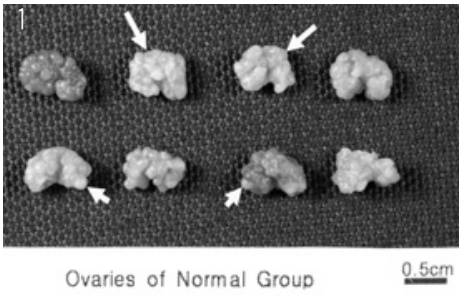

Fig. 1. Gross structure of ovaries from normal group.
Note well developed mature follicles(long arrows) and corpora lutea(short arrows).

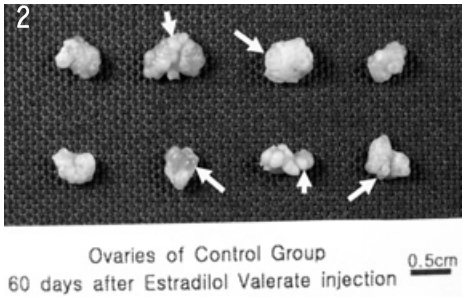

Fig. 2. Gross structure of ovaries from control group.
Seven of eight ovaries are decrease in size. A few of corpora lutea(small arrows) and small cystic follicles(long arrows) are observed.

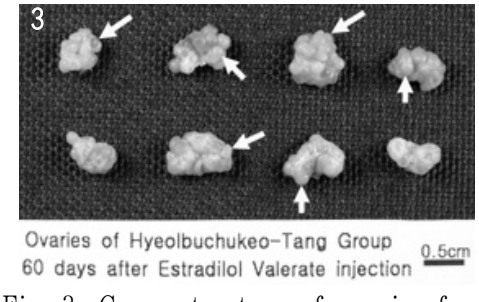

Fig. 3. Gross structure of ovaries from *Hyeolbuchukeo-tang* treated group.
Generally the sizes are increased than those of control group. Note well developed corpora lutea(short arrows) and follicles(long arrows). Compare with Fig. 1 and Fig. 2.

3. 난소 중량

대조군의 난소 중량은 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 血府逐瘀湯투여군의 난소 중량은 대조군에 비해서 유의성 있게 높았다(Table 3).

Table 3. Effects of *Hyeolbuchukeo-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)	76.5±13.2[a)]
Control(n=8)	42.3±8.5***
Treated(n=8)	58.9±6.5##

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 *Hyeolbuchukeo-tang*
* : Statistically significant compared with normal group(*** : $p<0.001$)
# : Statistically significant compared with control group(## : $p<0.01$)

4. 부신 및 자궁 중량

부신 중량은 대조군이 정상군보다 다소 높았고, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 다소 높았으나 모든 군간에 유의한 차이는 없었다.

자궁 중량은 대조군이 정상군에 비해서 낮았으며, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서는 높았으나 모든 군간에 유의한 차이는 없었다(Table 4).

Table 4. Effects of Hyeolbuchukeo-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)	59.0±3.8[a)]	592.8±162.2
Control(n=8)	61.7±3.8	498.4±58.6
Treated(n=8)	64.7±8.2	546.9±122.9

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 *Hyeolbuchukeo-tang*

5. 혈중 Luteinizing Hormone(LH) 함량

혈중 LH 함량은 대조군이 정상군에 비해서 낮았으나 유의성 있는 차이는 없었다. 血府逐瘀湯투여군은 대조군보다 높았으나 유의성 있은 차이는 없었다(Table 5).

Table 5. Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* Treatment on the Serum Luteinizing Hormone Values in Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

Group	Luteinizing Hormone (mIU/ml)
Normal(n=8)	0.819±0.469[a)]
Control(n=8)	0.475±0.235
Treated(n=8)	0.553±0.425

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 *Hyeolbuchukeo-tang*

6. 혈중 Follicular Stimulating Hormone (FSH) 함량

혈중 FSH 함량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 높았으며, 血府逐瘀湯투여군은 대조군보다 유의성 있게 낮았다(Table 6).

Table 6. Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* Treatment on the Serum Follicular Stimulating Hormone Values in Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

Group	Follicular Stimulating Hormone (mIU/ml)
Normal(n=8)	2.228±0.971[a)]
Control(n=8)	10.476±6.294**
Treated(n=8)	3.870±2.151[#]

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 *Hyeolbuchukeo-tang*
* : Statistically significant compared with normal group(** : $p<0.01$)
# : Statistically significant compared with control group(# : $p<0.05$)

7. 혈중 Androstenedione(ADD) 함량

혈중 ADD 함량은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 낮았으며, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해 높았으나 유의성 있는 차이는 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* Treatment on the Serum Androstenedione Values in Rats with Estradiol Valerate (EV)-induced Polycystic Ovaries

Group	Androstenedione(pg/㎖)
Normal(n=8)	0.239±0.139[a)]
Control(n=8)	0.116±0.073*
Treated(n=8)	0.168±0.109

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 *Hyeolbuchukeo-tang*
* : Statistically significant compared with normal group(* : $p<0.05$)

8. 난소의 병리조직학적 소견

정상군에서는 난소의 표면상피층이 잘 유지되어 있었으며 원시난포에서 성숙난포에 이르기 까지 다양한 발달 단계의 난포가 잘 형성되어 있었다(Fig. 4). 또한 피질부위에는 뚜렷한 경계를 지닌 많은 수의 황체가 형성되어 있었으며, 8예 중 2예에서는 많은 수의 적체가 형성되어 있었다. 낭성 난포는 대부분의 난소에서 관찰되지 않았으며, 폐쇄 난포는 개체에 많은 차이가 있었다.

대조군에서는 난소가 현저히 위축되어 있었으며, 난소의 표면상피층은 여러 부위에서 탈락되어 있었다. 액을 함유한 큰 낭성 난포가 여러 개 표면으로 돌출되어 있었고, 성숙 난포의 수는 정상군에 비해서 드물게 관찰되었으며, 체액으로 찬 커다란 낭성 낭포가 다수 관찰되었다(Fig. 5). 대조군 8예 중 3예에서는 윤곽이 뚜렷한 황체는 관찰되지 않았으며 5예에서는 비교적 뚜렷한 황체가 관찰되었다. 낭성 난포는 2~3 층의 얇은 세포층의 과립막세포로 둘러싸여 있었으며 강내에 변성된 탈락세포들이 산재해 있었다. 또한 난포 과립막세포의 변성 및 괴사가 매우 빈번하게 관찰되었다(Fig. 6).

血府逐瘀湯투여군에서는 난소의 크기가 대조군에 비해서 커져 있었으며, 피질에는 다양한 발달 단계의 난포가 대조군에 비해서 보다 빈번하게 관찰되었으며, 경계가 분명한 황체는 8예 중 7예에서 관찰되었다(Fig. 7).

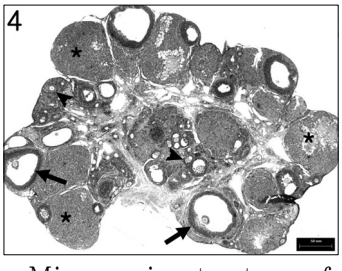

Fig. 4. Microscopic structure of ovary from normal group.
Note well developed 2nd follicles(arrow heads), matured follicles(arrows) and corpora lutea(*). H&E stain, bar=0.5 ㎜

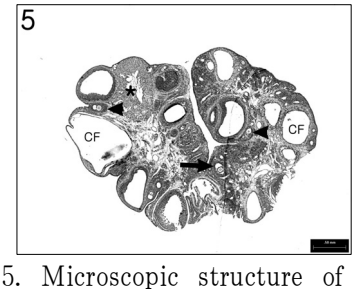

Fig. 5. Microscopic structure of ovary from control group.
Variable sizes of fluid filled cystic follicles (CF) are developed. One corpus luteum(*) is observed. The numbers of 2nd follicles (arrow heads) are decreased. And only one matured follicle(arrow) is observed. H&E stain, bar=0.5 ㎜

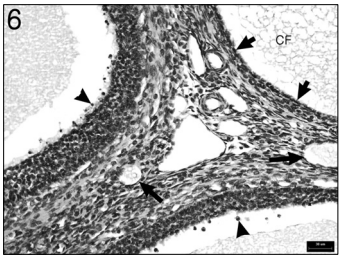

Fig. 6. Higher magnification of Fig. 5. Desquamation of necrotic granular cells(short arrows), 2 or 3 granular cell layers of cystic follicles(short arrows), and undergoing atresic follicles(long arrows) are observed. H&E stain, bar = 50 ㎛

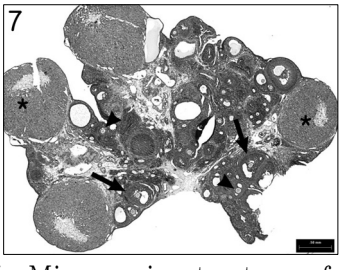

Fig. 7. Microscopic structure of ovary from *Hyeolbuchukeo-tang* treated group. Note well developed matured follicels(long arrows), corpora lutea(*) and 2nd follicles (arrow heads). Compare with Fig. 5. H&E stain, bar = 0.5 ㎜

9. 난포 및 황체 수

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

血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 성숙 난포가 유의성 있게 많았으며, 낭성 난포는 유의성 있게 적었다. 이차 난포 및 황체 수는 血府逐瘀湯투여군이 대조군에 비해서 비교적 많았으나 유의성은 없었다. 또한 폐쇄 난포 수는 血府逐瘀湯투여군이 대조군에 비해서 적었으나 유의한 차이는 없었다(Table 8).

Table 8. Effects of *Hyeolbuchukeo-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)	12.0±2.8[a)]	14.0±3.3	6.9±2.5	0.5±0.8	8.8±2.3
Control(n = 8)	6.5±2.6**	6.1±2.1***	10.4±3.5*	3.8±1.5***	2.4±2.9***
Treated(n = 8)	8.4±3.6	9.8±2.6##	9.0±2.7	1.6±1.2##	4.6±2.6

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 *Hyeolbuchukeo-tang*
* : Statistically significant compared with normal group(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)
# : Statistically significant compared with control group(## : $p<0.01$)

10. 난소 및 부신에서의 Nerve Growth Factor(NGF) 발현

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

대조군의 간질세포에서 NGF 양성반응은 정상군에 비해서 보다 강하게 발현되었으며, 또한 양성반응을 보인 간질세포의 수가 보다 많게 관찰되었다. 대조군의 난포막에서의 NGF 양성반응도 정

상군에 비해서 강하게 발현되었다(Fig. 8). 대조군에서 뚜렷한 황체가 관찰된 5예의 황체에서 NGF 발현 정도는 정상군과 유사한 정도로 관찰되었다. 대조군의 부신 피질에서의 NGF 양성반응은 정상군과 유사한 정도로 관찰되었다.

血府逐瘀湯투여군의 간질세포 및 난포막에서의 NGF 양성 반응은 대조군에 비해강도 및 빈도가 미약하게 관찰되었으며(Fig. 9), 부신 피질에서의 NGF 양성 반응은 대조군과 유사하게 관찰되었다.

정상군, 대조군 및 血府逐瘀湯투여군의 각 개체별 난소 및 부신피질에서의 NGF 양성반응의 정도는 Table 9와 같다.

Fig. 8. Nerve growth factor(NGF) expression in ovarian stromal cells(arrows) and theca cells(arrow heads) from control group. Note the numbers of positive cells and intensity of NGF expression. ABC immunohistochemical stain, bar = 30 ㎛

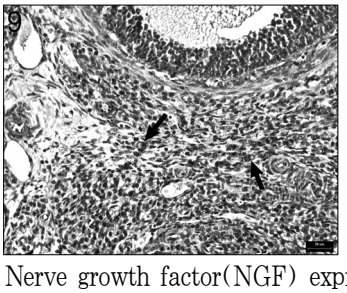

Fig. 9. Nerve growth factor(NGF) expression in ovarian stromal cells(arrow) from *Hyeolbuchukeo-tang* treated group. The numbers of positive cells and the intensity of expression are decreased compared with control group. ABC immunohistochemical stain, bar = 30 ㎛

Table 9. Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* Treatment on the Nerve Growth Factor(NGF) Expression in Ovary and Adrenal Cortex of Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

Group-Identification 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 *Hyeolbuchukeo-tang*
− : negative , + : mild positive, ++ : moderate positive, +++ : strong positive

11. 정중융기에서 Corticotrophin Releasing Factor(CRF) 발현

모든 군에서 CRF 양성 반응은 제3뇌실 하면의 정중융기(median eminence)에서 관찰되었다. 양성반응은 정중융기 신경망(neurophil)에 미세한 알갱이가 물결모양 또는 덩어리 형태로 관찰되었다(Fig. 10, 11).

칼라영상분석기를 이용하여 CRF 양성 반응의 정도를 측정한 결과, 대조군의 CRF 발현 정도는 정상군에 비해서 다소 높았으나 유의성은 없었다. 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 다소 낮았으나 유의성은 없었다(Table 10).

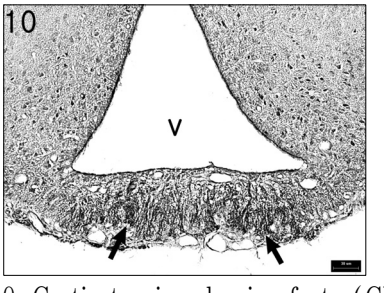

Fig. 10. Corticotropin releasing factor(CRF) expression(arrows) in median eminence from control group.
V; 3rd ventricle. ABC immunohistochemical stain, bar = 30 ㎛

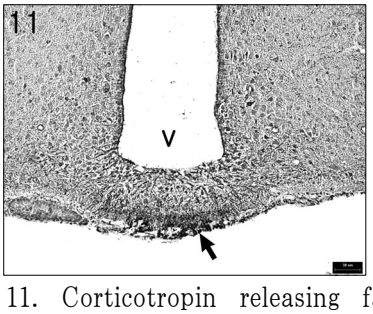

Fig. 11. Corticotropin releasing factor (CRF) expression(arrow) in median eminence from *Hyeolbuchukeo-tang* treated group.
V; 3rd ventricle. CRF expression ratio is lesser than control group. But statistically significant is not shown. ABC immunohistochemical stain, bar = 30 ㎛

Table 10. Effects of *Hyeolbuchukeo-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)	110.4±21.7
Treated(n = 8)	106.8±17.4

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 *Hyeolbuchukeo-tang*

12. 교배율 및 착상수 차이

교배율은 정상군, 대조군 및 血府逐瘀湯투여군 모두에서 교배가 100% 확인되었다.

착상여부를 살펴보면, 정상군은 교배한 8마리 모두에서 착상이 확인되었고(Fig. 12), 대조군은 교배한 8마리 중 3마리에서만 착상이 확인되었다(Fig. 13). 血府逐瘀湯투여군은 교배한 8마리 모두에서 착상이 확인되었다(Fig. 14).

착상된 숫자를 살펴보면, 정상군이 대조군에 비해서 유의성 있게 많았으며, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 유의성 있게 많았다(Table 11).

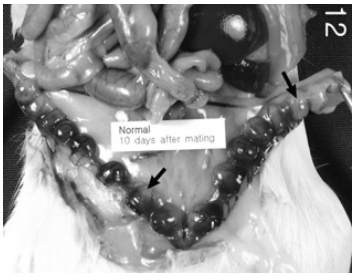

Fig. 12. Gross view of uterus from normal group at 10 days after mating.
Fifteen embryos(arrows) are developed.

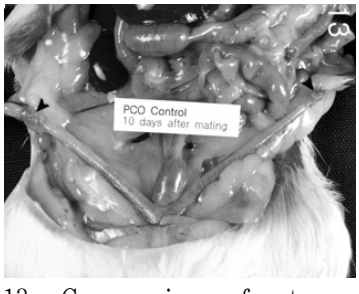

Fig. 13. Gross view of uterus from control group at 10 days after mating.
Any of embryo is not implanted. Note atropic and cystic ovaries(arrow heads).

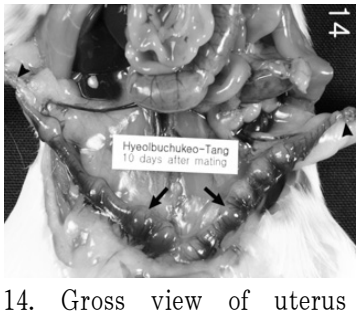

Fig. 14. Gross view of uterus from *Hyeolbuchukeo-tang* treated group at 10 days after mating.
Nine embryos(arrows) are developed.

Table 11. Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* Treatment on the mating and on the Number of Implantation in Rats with Estradiol Valerate(EV)-induced Polycystic Ovaries

Group-identification No.	Mating	Number of Implantation
Normal-1	+	14
Normal-2	+	17
Normal-3	+	16
Normal-4	+	16
Normal-5	+	15
Normal-6	+	15
Normal-7	+	12
Normal-8	+	13
Normal Mean		14.8±1.7[a)]
Control-1	+	10
Control-2	+	0
Control-3	+	0
Control-4	+	0
Control-5	+	8
Control-6	+	0
Control-7	+	0
Control-8	+	7
Control Mean		3.1±4.4***
Treated-1	+	5
Treated-2	+	9
Treated-3	+	7
Treated-4	+	7
Treated-5	+	9
Treated-6	+	6
Treated-7	+	6
Treated-8	+	10
Treated Mean		7.4±1.8[#]

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 *Hyeolbuchukeo-tang*
* : Statistically significant compared with normal group(*** : $p<0.001$)
# : Statistically significant compared with control group(# : $p<0.05$)

Ⅲ. 고 찰

다낭성 난소 증후군(polycystic ovarian syndrome, PCOS)은 배란 장애, 복부 비만, 고안드로겐혈증, 고혈압, 인슐린 저항성등의 증상을 보이는 내분비이상과 대사이상을 나타내는 증후군으로[11], 초음파 상 2~9 ㎜ 정도의 작은 난포들이 난소 주변으로 10~12개 이상 보이면서 난소 중앙의 간질이 증가되어 보이는 소견이 나타난다[12]. 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 있다[13].

PCOS의 임상양상은 매우 다양하고 광범위해서 비만, 고안드로겐증, 월경 장애 및 불임증을 모두 동반하는 전형적인 환자에서부터, 초음파 검사상 특징적인 다낭성난소의 소견과 혈중 testosterone 농도 증가 정도의 검사 소견 외엔 전혀 다른 증상이 없는 환자까지 모두 포함된다. 특히 희발배란(oligo-ovulation), 무배란(anovulation)과 같은 배란 장애는 PCOS의 중요한 특징적 증상들 중 하나이다. 반복되는 무배란의 결과로 다모증·탈모증·여드름 등과 고안드로겐증, 무월경, 기능부전성 자궁출혈 등 다양한 월경 장애를 보인다. 또한 자연유산의 위험이 높은 불임증과 자궁내막증식증 및 자궁내막암, 심혈관질환의 위험도가 증가하고, 인슐린저항성을 가진 환자의 경우 제2형 당뇨병의 위험도도 증가한다[14].

PCOS의 발생 원인으로 부신피질과 난소에서 효소계의 기능장애, 시상하부 기능부전, 성장호르몬의 이상, 생식샘자극호르몬 분비호르몬 분비체계 이상, 부신의 안드로겐 생산 이상, 난소자체의 안드로겐 합성 이상, 인슐린 저항성 등 여러 가설이 있으나, 다양한 요소들이 복합적으로 작용하여 나타나는 기능적 이상으로 이해되고 있으며, 그중에서도 주목받고 있는 것은, PCOS가 인슐린 저항성과 대사이상으로 인해 발병된다는 것으로, 다낭성 난소 증후군에서 대사증후군이 46%, 포도당 내성 이상이 16~35%, Ⅱ형 당뇨병이 2.5~7.7%정도로 정상 여성들에 비해 모두 높게 나타나고 있다는 것이다[1,13,15]. 인슐린의 혈중 농도가 높으면 높을수록 다낭성 난소 증후군의 임상증상이 더욱 심해지는데, 인슐린은 난소의 인슐린 수용체를 직접 자극하여 LH의 활동성을 강화하는 작용을 하기도 하고, 간접적으로는 혈청 LH pulse amplitude를 증가시켜 안드로겐 합성을 증가시키기도 하는 것으로 추정된다[16].

PCOS는 병인에 대한 기전이 분명하지 않고, 표현형 또한 매우 다양하며 아직 그 진단기준에도 논란이 많은 실정이다. 1990년 NIH에서는, 다른 원인을 배제한 고안드로겐혈증이나, 임상적 고안드로겐증이 있으면서 만성 무배란이 있는 경우, PCOS를 진단할 수 있다고 하였고[17], 2003년 ESHRE/ASRM에서는 희소배란 혹은 무배란, 고안드로겐증의 임상적 또는 생화학적 징후, 다낭성 난소 소견 등의 3가지 중 2가지 이상을 포함하는 경우로, 다낭성 난소 소견은 2~9 ㎜인 난포가 12개 이상이거나 난소의 용적이 10 ㎖를 넘는 경우로 정의 하였다[18]. 하지만 기준에 제시된 것 이외에도 비만증[19], 인슐린 저항성이나 고인

슐린증[20], LH/FSH 비가 2~3이상으로 높게 나타나기도 하는 증상[21] 등이 포함되어 있지 않아 부족하다는 지적이 있다. 최근 PCOS의 원인에 대해 유전학적으로 접근하려는 시도도 있는데, 스테로이드 합성 및 작용에 관련된 유전적 요인으로 CYP11α 유전자중 5region에서의 (TTTA)n다형성10[22]과, 인슐린 유전자의 이상과 관련된 대표적인 것으로 5region에서의 VNTR allele14[23], 안드로겐의 생산을 증가시키는 CYP17 유전자의 다형성[24], 그리고 ADRA1A, LIFR-alpha, 결합조직성장인자(CTGF)와 MDR1 등[25]이 PCOS과 연관이 있다는 보고가 있다.

서양의학에서 PCOS의 치료 목표는 내분비 및 대사 장애를 교정하여 심혈관계 질환이나 당뇨 등과 같은 후유증을 예방하고, 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[63]. 이에 따라 생활 습관 변화 및 체중 감량을 유도하며, 인슐린 반응개선제을 사용하고, 임신을 원하는 다낭성 난소 증후군 환자에서는 배란 유도를 목적으로 클로미펜, 방향효소 억제제, 성선자극호르몬 등을 쓰고 있다[26].

한의학에서 다낭성 난소 증후군이라는 명칭이 기재되지는 않았으나 증상에 따라 “經閉”, “月經不調”, “無子”, “面疱”, “肥胖不孕” “多毛” 등의 범주에서 찾아볼 수 있으며[7], 痰濕과 腎虛를 기본으로 腎虛, 肝鬱化火, 痰濕阻滯, 氣滯血瘀, 陰虛內熱의 다섯 가지로 분류하고, 滋腎壯陽, 淸肝瀉火, 化痰通絡, 活血化瘀의 치법을 사용하여, 虛實이 挍雜된 병기로 인식해야 한다[7]고 하였고, 윤 등[27]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 실험 모델을 이용한 연구로는 전침[28-30], 삼음교-자궁혈 전침[31], 운동으로 교감신경활성 저하를 통한 NGF감소[32], 香附子[33], 皂角子[34], 홍삼추출물[35] 등이 유효한 효과를 나타낸다고 보고되어 그 임상적 적용가능성이 제시되어 왔다. 그리고 PCOS와 관련된 한의학적 원인에 따른 대표적 처방의 효능을 실험적으로 규명하기 위해 蒼附導痰湯[36], 腎氣丸合蒼附導痰湯[37], 定經湯[38], 蒼附六君湯[39], 歸脾湯[40], 開鬱二陳湯[41], 五積散[42] 등에 대한 실험을 실시하여 그 효능을 증명하였다. 그러나 지금까지 연구는 痰濕, 腎虛, 氣滯 등에 초점이 맞춰져서, PCOS의 중요 원인중 하나인 瘀血에 관한 연구는 없는 실정이다. 瘀血이란, 離經之血이나 運行 不暢으로 經脈臟腑에 阻滯된 血液이 정체된 것으로, 병리적 산물임과 동시에 중요한 발병인자가 된다[43]. 婦人은 월경, 임신, 출산이라는 고유한 생리적 특징을 가지고 있으며[44], 이로 인해 婦人病證의 대강을 이루고 있는 月經病, 性器病, 姙娠病, 產後病 등에서 瘀血이 病因으로서 차지하는 중요성은 크다[45].

본 연구는 PCOS의 한의학적 발생 원인중 하나인 瘀血을 치료하면, PCOS를 치료할 수 있을 것으로 가정하고, 어혈을 치료하는 대표적 처방인 血府逐瘀湯

[9]을 선택하여 PCOS 치료효능을 실험적으로 규명하였다.

血府逐瘀湯은 活血化瘀시키는 桃紅四物湯과 疏肝理氣시키는 四逆散, 胸膈의 結氣를 열어주는 桔梗과 瘀血을 下行시키는 牛膝로 조성되어 一切 氣滯血瘀證을 치료하는 처방이다[58]. 血府逐瘀湯에 관한 기존 연구로는 항염증 작용[48], 항혈전 작용[49], 자궁근종세포의 증식억제 작용[50] 등에 관한 연구가 보고되었고, 면역기능에 미치는 영향[51], 혈전생성관여인자에 미치는 영향[52], 스트레스[53], 고지혈증[54], 간기능[55], 암전이 억제[56], 자궁내막증[57]에 대한 효과가 발표된 바 있다.

다낭성 난소를 유발하는 동물실험은 현재까지 두 가지 모델이 개발되어 있는데, 첫 번째는 암컷 흰쥐에 estradiol valerate (EV)를 주사하여 퇴화된 난포동 난포, 잘 발달된 난포막층을 갖고 있는 난포낭, 감소된 과립세포, 황체화된 낭 등을 유발하는 방법이고[10], 두 번째는 미성숙한 암컷 흰쥐에 dehydroepiandrosterone (DHEA)를 15일간 피하주사하여 고안드로겐에 의한 다낭성난소를 유발하는 방법이다[59]. DHEA는 사춘기 직전에 급격히 상승하는 첫 안드로겐 중의 하나이며, 사춘기 동안 높게 유지된다. 본 실험에서는 EV를 주사하여 다낭성 난소를 유발하였으며, 실험 종료 후 육안적으로 난소를 관찰 한 결과 EV를 처치한 대조군에서 난소가 현저히 위축되어 있고, 난포의 발달 및 황체의 형성이 미약한 것으로 보아 다낭성 난소가 성공적으로 유발되었음을 알 수 있다.

실험 종료 후 체중 변화에 있어서, EV를 접종한 대조군은 정상군에 비해서 실험 2주부터 실험 종료일까지 유의성 있게 체중이 낮았다. 血府逐瘀湯투여군의 체중은 전 실험기간 동안 대조군에 비해서 유의한 차이는 없었으나 다소 높았다. EV로 유발된 동물모델에서 월경불순과 다낭성 난소 등은 유발되나, 인간의 PCOS에서 흔히 수반되는 비만과 같은 질환은 유발되지 않으며[60], 오히려 EV 투여 후 체중은 감소하는 경향을 보이는 것으로 알려져 있다[61]. Stener 등은 동물실험에서 EV를 주사한 결과, 부신에서 glucocorticoid 생산이 증가되어 지방분해활동을 통한 체중감소가 일어난다고 설명하였다[11]. 본 연구에서 EV 투여군인 대조군은 정상군에 비하여 유의한 수준으로 체중이 줄었으며, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해 전 실험기간 동안 유의성 있는 정도는 아니지만 다소 높은 것으로 보아, 血府逐瘀湯이 EV로 인한 체중감소를 어느 정도 정상화 시키는 것으로 보인다.

자궁 중량은 대조군이 정상군에 비해서 낮았으며, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서는 높았으나 모든 군 간에 유의한 차이는 없었다. 부신 중량은 대조군이 정상군보다 다소 높았고, 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 다소 높았으나 모든 군 간에 유의한 차이는 없었다.

PCOS에서 혈중 LH는 상승하고 FSH는 정상 또는 감소하여 대략 그 비율이 LH:FSH=3:1 정도로 LH가 상승한다. PCOS에서 인슐린은 난소의 인슐린 수용체를 직접 자극하여 LH의 활동성을 강화하는 작용을 하고, 간접적으로 혈청 LH pulse amplitude를 증가시켜 안드로겐 합성을 증가시키는 것으로 추정된다.

이는 인슐린 과다혈증이 GnRH에 대한 뇌하수체의 반응을 증가시켜 LH 분비를 상승시키고, PCOS에서 증가된 ADD가 E1(estron)을 상승시키며, 다시 E1이 GnRH의 박동성 분비를 증가시켜 LH를 상승시키는 것으로 알려져 있다[62]. 그러나 본 실험에서 LH와 FSH의 비율은 인체에서 관찰되는 PCOS와 차이가 있었는데, 이는 EV를 이용해 실험적으로 유발한 대조군의 다낭성 난소는, 인체에서 발생하는 PCOS와는 다르게, 인슐린 과다혈증이나 난소의 인히빈에 의한 억제 작용이 일어나지 않았기 때문으로 보인다.

혈중 LH의 함량을 조사한 결과, 통계상 각 군 간에 유의미한 차이는 없었지만, 대조군의 LH가 정상군에 비해 낮게 나타났다. 이는 EV 투여로 줄어든 난소 크기로 인해 ADD 함량이 낮아져, LH가 낮아진 것으로 보인다. 하지만 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 LH의 함량이 증가한 것으로 나타났는데, 이는 血府逐瘀湯이 LH의 분비기능을 정상군에 가깝게 개선시키는 것으로 보인다.

본 실험에서 FSH혈중 용량은 대조군이 정상군에 비해 크게 증가된 것으로 나타났다. 정상 월경 주기에서 estradiol은 inhibin과 함께 FSH의 분비를 억제한다. 그러나 본 실험에서 다낭성 난소 유발을 위해 많은 양의 estradiol이 투여됨으로써, 양성 되먹이기 기전이 작용되어 FSH가 증가한 것으로 보이며, 이로 인해 과도하게 난포가 발달하여 다낭성 난소가 유발된 것으로 보인다. 실제 인체에서 estradiol농도가 250~540 pg/㎖ 이상인 상태가 50시간 정도 유지되면, estradiol의 양성 되먹이기 기전이 활성화 되어 FSH의 분비를 급격히 증가시키기도 한다[63]. FSH의 농도가 올라가면 다수의 난포가 자극받아 여러 개의 낭포를 형성한다. 본 실험의 대조군에서 크게 증가한 FSH는, 혈부축어탕투여군에서 유의성있게 감소함으로써 정상군에 가까운 농도를 나타내었다. 이로서 EV로 유발된 대조군에서 비정상적으로 높아진 FSH를, 혈부축어탕이 정상상태에 가깝게 회복시키는 것을 알 수 있다.

임상에서 일반적인 PCOS 환자의 ADD는 증가되어 있지만, 본 실험에서 혈중 ADD 함량은 정상군이 높고, 다낭성 난소를 유발한 대조군이 가장 낮은 결과를 보였다. ADD는 테스토스테론의 전구물질로서, 다모증, 무배란 등의 PCOS관련 증상을 일으키지만, 정상 상태에서는 근육성장, 성기능 성숙 등의 효과가 있다[46]. ADD는 부신에서 50%, 난소에서 50% 정도 분비되는데 본 실험에서 대조군의 난소 중량은 정상군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였고, 조직학적으로도 현저히 위축되어 있었다. 부신 중량의 차이가 크지 않은 것에 비하여, 난소의 중량 차이와 조직학적 차이가 크므로, 혈중 ADD의 농도 차이는 난소 중량과 난소 실질의 감소로 인한 것으로 보인다. 血府逐瘀湯투여군의 ADD 함량은 유의성은 없을지라도, 대조군보다 높게 관찰되었다. 이는 다낭성 난소가 유발된 대조군 난소에서 발생한 ADD 감소와 같은 난소기능 저하를 血府逐瘀湯이 어느 정도 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

난소의 병리조직학적 소견에서, 대조군은 난소가 현저히 위축되어 난소 중량이 적었고, 액을 함유한 큰 낭성 난포와

난포 과립막 세포의 변성 및 괴사가 빈번하게 관찰되었으며, 2차 난포와 성숙 난포 및 황체 수가 유의성 있게 적었고, 폐쇄 난포 및 낭성 난포는 유의성 있게 많았다. 이는 실험적으로 EV에 의해 다낭성 난소가 잘 발현된 것으로 볼 수 있다. 血府逐瘀湯투여군은 대조군에 비해서 난소 중량이 증가했으며, 성숙 난포가 유의성 있게 많았으며, 낭성 난포는 유의성 있게 적었다. 이차 난포 및 황체 수는 血府逐瘀湯투여군이 대조군에 비해서 유의성은 없었으나 비교적 많았다. 폐쇄 난포 수도 유의한 차이는 없었으나, 血府逐瘀湯투여군이 대조군에 비해서 적었다. 이는 血府逐瘀湯이 다낭성 난소에서 난포의 정상적인 발달에 효과적이라고 말할 수 있다.

Nerve growth factor(NGF)는 감각신경과 교감신경의 신경세포 발달 및 유지에 관여하는 neurotrophic protein이다. NGF의 과도한 활성은 난소의 androgen을 증가시키는데, 직접적으로는 난포막 세포로부터 androgen 생산을 증가시키고, 간접적으로는 norepinephrine의 작용을 통해 난소의 androgen 분비를 자극한다[64]. 난소에서 androstenedione과 testosterone이 과다 생성되면 estrogen으로 전환되어 estrone(E1)이 과다 분비되고, 이는 시상하부와 뇌하수체에 되먹임 기전을 통해서 LH를 증가시키고 FSH는 감소시켜 결과적으로 estrogen과 androgen 과다분비의 악순환을 일으키게 된다[65]. 본 실험에서 정상군 난소의 NGF 양성반응은 전체적으로 미약한 정도로 발현되었으나, 대조군에서는 정상군에 비해 강하게 발현된 것을 볼 수 있다. EV에 의해 난소의 NGF 농도가 비정상적으로 상승되면 무배란, 낭성난포 등을 유발할 수 있다[66]. 따라서 본 실험은 EV로 인해 난소의 NGF 농도가 증가하고 이에 따라 교감신경이 활성화되어 다낭성 난소가 유발되었다고 볼 수 있다. 血府逐瘀湯투여군의 NGF 양성반응은 대조군보다 미약하게 발현되어 정상군과 비슷한 정도였다. 이러한 결과는 血府逐瘀湯이 난소의 NGF 발현을 억제시켜, 난포의 발달, 성장, 에스트로겐 분비저하, 배란주기 회복 등의 기전으로 다낭성 난소의 생성을 제한하는 것으로 생각할 수 있다.

血府逐瘀湯투여군의 간질세포 및 난포막에서의 NGF 양성 반응은, 대조군에 비해 강도 및 빈도가 미약하게 관찰되었으나, 부신 피질에서의 반응은 각 군간에 유의미한 차이가 없었다. 이는 血府逐瘀湯이 난소의 NGF 발현을 감소시켜 난포 및 황체의 성숙에는 효과가 있으나, 부신 피질에는 크게 작용하지 않는 것으로 보인다.

CRF는 스트레스와 연관된 peptide로, 시상하부에서 만들어진 후 뇌하수체-부신축으로 퍼져 스트레스와 관련된 생리학적, 신경내분비적 변화를 일으켜 무배란과 같은 생식기능의 병리적 변화를 초래한다[47]. 스트레스 상황 하에서는 뇌간부위의 카테콜아민이 증가하여 CRH 분비를 자극하므로, CRF 발현 정도가 높을수록 심한 스트레스 상황으로 볼 수 있다. 본 실험에서 뇌조직 정중융기의 CRF 양성 반응의 정도를 측정한 결과, 각 군 간에 유의성 있는 차이는 없었으나, 대조군이 정상군에 비해 약간 상승하였고, 血府逐瘀湯투여군은 대조군보다 낮은 값을 보이는 것으로 보아 다낭성 난소 유발로 생긴 스트레스를 血府逐瘀

湯이 낮춰주는 효과가 있는 것으로 보인다.

마지막으로, 血府逐瘀湯이 PCOS에서 임신에 미치는 영향을 알아보기 위해 착상수를 계수하였다. 정상군에서는 100%가 착상되고(8개체 모두), 개체별로도 많은 착상수(12~17)를 보이고 있는 데 반해, 다낭성 난소를 유발한 대조군은 37.5%의 착상율을 보이고(8개체 중 3개체만 착상), 개체별 착상수도 정상군에 비해 현저히 낮았다(7~10). 血府逐瘀湯 투여군의 개체별 착상수는 정상군에 비해 적었지만(5~10), 8개체 모두에서 착상에 성공하여, 100%의 착상율을 보였다. 이러한 결과는 PCOS와 관련된 불임증에서, 血府逐瘀湯 투여가 착상율을 높여 불임치료에 도움이 될 수 있음을 알 수 있다.

결론적으로 血府逐瘀湯을 투여한 군에서는 난소 중량, 성숙 난포, 낭성난포, 난소 조직 내 NGF 양성반응에서 의미있는 변화가 관찰되었으며, 착상율을 높일 수 있었다. 이상의 실험결과를 볼 때 血府逐瘀湯은 임상적으로 PCOS 환자의 배란장애를 개선하고, 수정 및 착상율을 높여 불임치료에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅳ. 결 론

血府逐瘀湯이 흰쥐의 다낭성 난소와 임신에 미치는 영향을 확인하기 위해, 정상군, 대조군, 血府逐瘀湯투여군 간의 난소, 부신 및 자궁 중량 측정, 난소의 육안 및 병리조직학적 검사, 난포 및 황체 수의 측정, 혈중 LH, FSH 및 ADD 호르몬 분석, nerve growth factor(NGF) 및 corticotropin releasing factor(CRF) 면역조직화학적 검사를 실시하였다. 또, 임신에 미치는 영향을 알아보기 위해 교배유무를 확인하였으며, 교배 확인 후 10일 째, 또는 합사 후 15일 째에 부검하여 착상된 수를 확인하였다.

1. 난소 중량은 血府逐瘀湯투여군이 대조군보다 유의성 있게 높았다.
2. 성숙 난포 수는 血府逐瘀湯투여군이 대조군 보다 유의성 있게 많았다.
3. 낭성 난포 수는 血府逐瘀湯투여군이 대조군보다 유의성 있게 적었다.
4. 혈중 FSH 함량은 血府逐瘀湯투여군이 대조군보다 유의성 있게 낮았다.
5. 난소조직에서의 NGF 양성반응은 血府逐瘀湯투여군이 대조군에 비해서 미약하게 발현되었다.
6. 착상 수는 血府逐瘀湯투여군이 대조군보다 유의성 있게 많았다.

이상의 결과로 볼 때, 血府逐瘀湯은 EV로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에서 난포의 성숙을 유도하여 정상 배란을 촉진시키고, 수태율을 개선시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

□ 투 고 일 : 2012년 04월 27일
□ 심 사 일 : 2012년 05월 11일
□ 게재확정일 : 2012년 05월 15일

참고문헌

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울:고려의학. 2007:63, 362.

2. Nestler JE. Polycystic ovary syndrome: a disorder for the generalist. Fertil Steri 1998;70:811-2.
3. Stein IF, Levental ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol. 1935; 29:181-91.
4. Lara 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.
5. S Hisano, et al. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Brain Res. 1993;620 :343-6.
6. Krysiak R, et al. Update on the management of PCOS. Pharmacological Reports. 2006;58(5):614-25.
7. 김동일, 윤종원, 이태균. 다낭성 난소 증후군에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1997;10(1):73-91.
8. 吳桂芳, 李祥云. 中醫學治療多囊卵巢綜合症硏究槪況. 河南中醫. 1994;14(2) :123-5.
9. 王淸任. 醫林改錯. 北京:中國中醫藥出版社. 1995:24-8.
10. J R Brawer, M Munoz, R Farookhi. Development of the PCO in the estradiol valerate- treated rat. Biology of Reproduction. 1986;35:647-55.
11. Elisabet Stener-Victorin, et al. Rats with steroid-induced PCO develop HTN and increased sympathetic nervous system activity. Reproductive Biology and Endocrinology. 2005;3:44.
12. Adam H. et al. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. Human Reproduction Update. 2003;9:505-14.
13. 김 탁. 다낭성 난소 증후군의 최신 지견. 대한산부인과학회 연수강좌. 2002; 31:38-44.
14. 김정훈. 다낭성난소증후군 치료의 최신지견. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology. 2005;48(8):1852.
15. Baillargeon JP. Use of insulin sensitizers in polycystic ovarian syndrome. Current Opinion in Investigational Drugs. 2005;6:1012-22.
16. Gerard S. Conway, 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.
17. 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 Publications. 1992;377-84.
18. 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 Steril. 2004;81:19-25.
19. S. Hahn, et al. Clinical and biochemical

characterization of women with PCOS in North Rhine-Westphalia. Hormone and Metabolic Research. 2005;37:438-44.
20. Richard S. Legro, et al. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in PCOS: a prospective, controlled study in 254 affected women. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1999;84:165-9.
21. Ann E. Taylor, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinical defined women woth PCOS. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1997;82:2248-56.
22. Gharani N, et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11α with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. Hum Mol Genet. 1997;6:397-402.
23. Waterworth DM, et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. Lancet 1997;349:986-90.
24. 이지영, 등. 한국인 여성에서 다낭성 난소증후군의 발생 위험도와 CYP17 유전자 다형성과의 관련성에 관한 연구. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology. 2005;48(5):1306.
25. 정철회, 등. Dehydroepiandrosterone로 유도된 흰쥐의 다낭성난소에서 cDNA array를 이용한 유전자발현분석. 대한산부인과학회지. 2004;47(10):1931.
26. 강길전. 여성생식의학. 서울:대관출판사. 1998:219-30.
27. 윤소영, 강명자. 다낭성 난소증후군 환자의 한방 치료에 대한 임상적 고찰. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):437-51.
28. Elisabet Stener-Victorin, et al. Effects of eletro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced PCO. Biology of Reproduction. 2000;63(5):1497-503.
29. E. Stener-Victorin, et al. Effects of electro-acupuncture on corticotropin-releasing factor in rats with experimentally induced polycystic ovaries. Neuropeptides. 2001;35(5&6):227-31.
30. Elisabet Stener-Victorin. Acupuncture in reproductive medicine: Overview and summary of recent studies. International Congress Series. 2002;1238:149-56.
31. 권세라, 등. 삼음교 자궁혈 전침 자극이 백서의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(2):76-86.
32. L. Manni, S. et al. Effects of exrecise on ovarian morphology and expression of nerve growth factor and α1-and β 2-adrenergic receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. Journal of Neuroendocrinology. 2005;17:846-58.
33. 양동선, 등. 향부자가 estradiol valerate로 유발된 백서의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(4):35-46.
34. 구희준, 조성희. 皂角刺가 estradiol

valerate로 유발된 白鼠의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(2):71-84.
35. Sok Cheon Pak, et al. Effect of Korean red ginseng extract in a steroid-induced polycystic ovary murine model. Arch Pharm Res. 2009;32(3):347-52.
36. 양승정, 등. 蒼附導痰湯이 estradiol valerate로 유발된 백서의 다낭성 난소에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):1-11.
37. 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.
38. 남은정, 등. 定經湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):99-113.
39. 김희주, 김윤상, 임은미. 蒼附六君湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2008;21(2):1-16.
40. 이연경, 등. 歸脾湯이 estradiol valerate로 유발된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2008;21(3):60-74.
41. 윤문희, 등. 開鬱二陳湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소 발달에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(2):1-19.
42. 김종대, 등. 五積散이 Estradiol Valerate로 유발된 다낭성 난소 모델에서 난포의 성숙 및 NGF발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2011;24(1):27-41.
43. 전국한의과대학 병리학 교실 編. 동의병리학 서울:一中社. 1999:152-65, 272-4, 424-6.
44. 宋炳基. 韓方婦人科學. 서울:행림출판사. 1995:17-9.
45. 한의부인과학교재편찬위원회. 韓醫婦人科學(上). 서울:도서출판 정담. 2002:61, 101, 190-1.
46. Gary E. Ackerman, et al. Aromatization of Androstenedione by Human Adipose Tissue Stromal Cells in Monolayer Culture. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1981;53(2):412.
47. L.W. Swanson, et al. Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immuno -reactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immuno-histochemical Study. Neuro Endocrinology. 1983;36(3):165-86.
48. 한혜숙, 등. 血府逐瘀湯加味方의 炎症病理因子와 酸化力損傷에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2008;21(1):99-116.
49. 임현정, 등. 血府逐瘀湯加味方의 抗血栓作用에 대한 實驗的硏究. 대한한방부인과학회지. 2008;21(1):117-33.
50. 문나영, 김동철, 백승희. 혈부축어탕이 자궁근종세포의 증식억제와 Apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(2):186-98.
51. 洪喜鐸, 金淳烈, 李泰均. 血府逐瘀湯이 免疫機能에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):177-89.
52. 박종형, 등. 血府逐瘀湯이 血栓生成關與因子에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(5):819-27.
53. 최유경, 등. 血府逐瘀湯이 스트레스

에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;26(3):162-75.
54. 崔順子. 血府逐瘀湯이 STZ 糖尿病 Rat의 高脂血證에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2004.
55. 梁秀光. 血府逐瘀湯이 STZ 유도 糖尿病상태의 肝機能에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2004.
56. 李眞華, 등. 血府逐瘀湯이 癌轉移抑制에 미치는 영향. 대한한방종양의학회지. 1999;5(1):61-75.
57. 馬敏珠. 血府逐瘀湯治療子宮內膜異位症. 上海中醫藥雜誌. 1993;2:16-7.
58. 陳子富. 宋向元治瘀經驗發揮. 北京中醫學院學報. 1986;3:149-17.
59. Anderson E, Lee GY, O'Brien K. PCO condition in 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.
60. Louise Mannerås, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. Endocrinology. 2007;148(8):3781-91.
61. Farookhi R, Hemmings R, Brawer JR. Unilateral ovariectomy restores ovulatory cyclicity in rats with a polycystic ovarian condition. Biol Reprod. 1985;32(3):530-40.
62. 김정훈. PCOS 치료의 최신지견. Korean Journal of Ob & Gy. 2005;48(8):1853.
63. 구병삼. 임상 부인과 내분비학 제2판. 서울:고려의학. 2001:87
64. Levi MR. The nerve growth factor 35 years later. Science. 1987;237:1154-62.
65. G.A. Dissen, et al. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. Endocrinology. 2000;141(3):1073-81.
66. H.E. Lara, 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.