

## 임신 관련 3종 한약 처방 물 추출물과 목단피 에탄올 추출물이 자궁내막과 태반세포에 미치는 영향

<sup>1</sup>산부인과, 건양대학교 의과대학, <sup>2</sup>한의학과학연구부, 한국한의학연구원  
<sup>3</sup>명곡의과학연구소, 건양대학교 의과대학  
박서예<sup>1</sup>, 노의정<sup>1</sup>, 서창섭<sup>2</sup>, 이성기<sup>1,3</sup>, 신현규<sup>2</sup>

### ABSTRACT

#### The Effects of Pregnancy-Related Water Extract of 3 Types Herbal Medicines and Ethanol Extract of *Moutan Radicis Cortex* on the Endometrial and Placental Cells

Seo-Ye Park<sup>1</sup>, Eui-Jeong Noh<sup>1</sup>, Chang-Seob Seo<sup>2</sup>, Sung-Ki Lee<sup>1,3</sup>, Hyeun-Kyoo Shin<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Dep. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konyang University  
<sup>2</sup>KM Science Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine  
<sup>3</sup>Myunggok Medical Research Institute, College of Medicine, Konyang University

**Objectives:** This study was performed to investigate the effects of pregnancy-related four herbal medicines (*Samul-tang*, *Onkyung-tang*, *Chokyungjongok-tang* and *Moutan Radicis Cortex*) on the endometrial and placental cells.

**Methods:** In this study, we examined viability and decidualization of telomerase immortalized human endometrial stromal cell lines (T-HESCs) and viability and invasion ability of human first trimester trophoblast cell lines Sw.71 by four herbal medicines (*Samul-tang*, *Onkyung-tang*, *Chokyungjongok-tang* and *Moutan Radicis Cortex*)

**Results:** In the study, we showed that *Samul-tang*, *Onkyung-tang*, *Chokyungjongok-tang* increased decidualization marker prolactin (PRL) and insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) in T-HESCs. *Moutan Radicis Cortex* decreased the mRNA level of PRL and IGFBP1, and the protein level of PRL and IGFBP1 had no significant effect. Moreover, four herbal medicines reduced invasion ability of Sw.71 cells.

**Conclusions:** These results suggest that *Samul-tang*, *Onkyung-tang*, and *Chokyungjongok-tang* have beneficial effects on successful embryo implantation and pregnancy maintenance by increasing decidualization markers such as PRL and IGFBP1. *Moutan Radicis Cortex* reduces the mRNA levels of PRL and IGFBP1, which may adversely affect pregnancy. Further investigations are needed to elucidate the significance of the decreased invasive ability of Sw.71 cells induced by four herbal medications.

**Key Words:** Endometrial Stromal Cell, Decidualization, Trophoblast, Invasion, Herbal Medicines, *Samul-tang*, *Onkyung-tang*, *Chokyungjongok-tang*, *Moutan Radicis Cortex*

“본 연구는 한국한의학연구원 기관고유 사업인 한방의료기관 한약처방 안전성·유효성 구축 사업(KSN2021310), 한국연구재단 기초연구사업(NRF-2017R1A6A1A03015713), 및 보건복지부(HI17C1238)으로 부터 지원 받았음.”

Corresponding author(Sung-Ki Lee) : Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konyang University, 58 Gwanjeodong-ro, Seo-gu, Daejeon  
Tel : 042-600-8646 E-mail : sklee@kyuh.ac.kr

Corresponding author(Hyeun-Kyoo Shin) : Korean Medicine Science Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon  
Tel : 042-868-9464 E-mail : hkshin@kiom.re.kr

## I. 서 론

2010년과 2020년 우리나라 가임여성 1명당 합계출산율 및 출생아 수를 비교해보면, 출산율은 1.15명에서 0.84명으로 출생아 수는 470,200명에서 272,300명으로 줄어, 이미 저출산 국가로 진입했다<sup>1)</sup>. 저출산을 극복하기 위해 다양한 해결 방안이 있겠지만, 이중 불임 여성에 대한 사회적 지지와 치료 또한 중요한 역할이라고 할 수 있다. 국민건강보험 자료에 의하면 불임으로 진단된 여성의 약 55%는 최종적으로 분만에 성공하였지만, 인구통계적으로 30~39세, 사회 환경적으로 저소득 계층, 질병으로는 당뇨병이 있는 여성들의 분만이 낮아 여성 불임 치료를 위해서 종합적인 지원이 필요하다<sup>2)</sup>. 이 중 의료계에서는 특정 질병인 당뇨병이 외에도 환자의 심신에 의한 다양한 불임 원인을 치료하여 임신 출산율을 높이는 방법을 찾는 연구가 필요하다고 본다.

임신은 착상, 탈락막화, 태반형성, 분만의 과정을 포함하는 복잡한 과정으로 각 단계의 성공은 다음 단계로 나아가는데 필수적이다<sup>3)</sup>. 착상 중에 일어나는 생리학 및 분자적 과정은 복잡하지만 고도로 조직화되어 있으며, 착상 전후의 결합은 임신기간 동안 부정적인 효과를 나타낼 수 있다<sup>3)</sup>. 상실된 임신의 주된 요소는 착상 실패로 인한 것으로 간주되고 있으므로 배아 착상에서부터 임신 초기에 발생하는 자궁 내 다양한 문제를 적절히 조절할 수 있다면 더 나은 임신결과에 기여할 수 있을 것이다<sup>4)</sup>.

인간 자궁내막은 배반포 착상에 적합한 미세 환경을 구축하기 위해 동적 리

모델링을 겪는 복잡한 다세포 조직이며<sup>5)</sup>, 성 스테로이드 호르몬의 주기적인 변동에 반응하여 증식, 분화(탈락막화) 및 리모델링의 반복적인 주기를 거친다<sup>6)</sup>. 인간 자궁내막의 탈락막화(decidualization)는 인간 자궁내막간질세포의 극적인 형태학적 및 기능적 분화를 포함하는 과정으로 난소 스테로이드 호르몬인 프로게스테론(P4) 및 에스트라디올(E2)의 수치가 높아짐에 따라 발생한다<sup>5)</sup>. 탈락막화는 인간 자궁내막간질세포가 탈락막간질세포로 변형되는 것이 특징이며<sup>7)</sup>, 프로게스테론, 에스트로겐 및 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)에 의해서 시간 의존적 방식으로 유도되고 조절된다<sup>8)</sup>. 월경 주기의 분비 단계에서 간질 세포가 탈락막 세포로 분화하는 데는 생체 내에서 최소 10일이 소요된다<sup>8)</sup>. 탈락막간질세포는 일반적으로 탈락막화의 마커로 사용되는 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 1(Insulin-like growth factor-binding protein 1, IGFBP1) 및 프로락틴(prolactin, PRL)을 생성하며, 영양막의 증식 및 침입을 조절하고 자가 분비에 의해 인간 자궁내막간질세포의 탈락막 분화를 유도하는 기능을 한다<sup>7)</sup>. 탈락막화 결함은 조기 임신 실패 및 심한 출혈과 같은 월경 관련 장애를 포함한 임신 장애와 관련이 있다<sup>6)</sup>. 따라서 임신 초기 성공적인 배아 착상과 임신 유지를 위해서는 탈락막화가 필수적이다<sup>7)</sup>.

한편 태반을 형성하는 영양막세포는<sup>9)</sup> 착상 초기 모체의 자궁내막에 존재하는 탈락막세포와의 상호작용을 통하여 자궁내막층으로 침윤하여 성공적인 착상을 유도함으로써 임신 유지와 태아의 발달에 중요한 역할을 한다<sup>10)</sup>. 영양막세포는 세포외 기질 단백질을 분해하여 세포 이

동을 촉진하는 반면, 임신기간 동안 자궁내막은 탈락막으로 발전하며 이 탈락막은 영양막세포 침입을 제어하는 다양한 억제 단백질을 발현한다<sup>9)</sup>. 결과적으로 영양막세포는 혈관 확장을 유도하며 태아의 성장과 발달을 위한 영양분과 산소를 공급한다<sup>11)</sup>. 모체-태아 경계면에서 영양막세포의 이동은 착상 및 태반형성의 핵심 과정이므로 성공적인 임신 결과에 필수적이다<sup>9)</sup>. 따라서 미세하게 통제되는 영양막세포 침윤 과정의 조절 장애는 광범위한 임신 이상으로 이어질 수 있다<sup>12)</sup>.

본 실험을 위해 선정된 사물탕은 각종 여성 질환 및 임신 처방의 기본 처방으로 심혈관, 혈액 순환 및 빈혈 개선, 뇌 조직 및 신경보호 효과, 면역 활성화, 항암 효과 등에 대한 세포 및 동물 연구 결과가 보고되었다<sup>13,14)</sup>. 또 임신에 유효한 임상 처방으로 온경탕<sup>15-7)</sup>과 조경종육탕<sup>18)</sup> 및 한의서에 임신 금기약으로 기록된 목단피<sup>19)</sup>가 이 두 처방에 공통으로 들어 있어, 이를 포함하여 총 4종 한약에 대한 자궁내막의 탈락막화와 영양막세포의 침윤능력을 확인하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 한 약

#### 1) 실험 한약

사물탕(동의보감), 온경탕(동의보감) 및 조경종육탕(방약합편)을 구성하는 각각의 한약들과 목단피는 광명당제약(Ulsan, Korea)으로부터 구매하여 본초학 전문가인 한국한의학연구원 최고야 박사(Naju, Korea)로부터 형태학적 감정을 받은 후 실험에

사용하였다. 사물탕, 온경탕 및 조경종육탕과 목단피에 대한 표본들은 한국한의학연구원에 보관하였다.

#### 2) 추출물 제조

사물탕, 온경탕 및 조경종육탕 등 3종의 한약 처방 추출물은 이전에 보고된 추출 프로토콜에 따라 제조하였다<sup>20)</sup>. 즉, 사물탕(2.0 kg), 온경탕(5.0 kg) 및 조경종육탕(5.0 kg) 등 3종의 전통 한약 처방에 대하여 Table 1과 같이 각각의 구성한약을 무게 비율로 배합한 후 20.0 L, 50.0 L 및 50.0 L의 증류수를 각각 추가하였다. 배합된 시료들은 초고속 진공 저온 추출기(COSMOS-660, Kyungseo E&P, Incheon, Korea)를 이용하여 100℃에서 2시간 동안 가압 추출한 후 270 mesh의 표준체(체눈 크기 53 μm)로 여과하였다. 각각의 여과액은 IlShinBioBase사의 PVTFD100 동결건조기(Yangju, Korea)로 동결 건조하였으며, 그 결과 667.3 g, 1530.0 g 및 1201.0 g의 동결건조 시료를 제조하였다. 목단피(700.0 g)는 70% 에탄올을 7.0 L 추가한 후 Branson-8510 ultrasonicator (Denbury, CT, USA)를 이용하여 3회 초음파 추출하였다. 추출액을 Whatman 여과지(No. 2, 150 mm Ø, Maidstone, Kent, UK)로 감압 하에서 여과한 후 Büchi R-210 rotary evaporator(Flawil, Switzerland)로 유기용매를 제거하였다. 유기용매가 제거되고 남은 추출액에 증류수 1 L를 넣어 현탁시킨 후 IlshinBioBase사의 FD-5525L 동결건조기(Yangju, Korea)로 동결 건조하여 147.0 g의 시료를 얻었다. 제조된 4종의 추출물은 모두 사용 전까지 냉장(4℃) 보관하였다.

## 2. 세 포

### 1) 세포 배양

자궁내막간질세포의 세포주 T-HESC는 ATCC에서 구입하여 사용하였고 태반세포인 영양막세포의 세포주 Sw.71 cell은 Wayne State University의 Gil Mor 교수에게서 분양받아서 사용하였다. telomerase immortalized human endometrial stromal cell lines(T-HESCs)는 10% fetal bovine serum(FBS; Corning, Virginia, USA)과 100 U/mL penicillin/streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% insulin-transferrin-selenium(ITS)+Premix(Corning, Bedford, MA, USA), 1 mM sodium pyruvate(Welgene, Gyeongsan, Korea), L-glutamine(Gibco, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 phenol red 없는 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham(DMEM/F12; Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 농도 조건으로 배양 하였다. Sw.71 cell은 10% FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES; Welgene, Gyeongsan, Korea), 0.1 mM non-essential amino acids(MEM; Welgene, Gyeongsan, Korea), 1 mM sodium pyruvate(Welgene, Gyeongsan, Korea)가 포함되어 있는 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양 하였다.

### 2) 세포독성 측정

4종의 한약 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 WST assay kit(Cyto X; LPS solution, Daejeon, Korea)를 사용하였다. T-HESC는 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well 씩 분주하였고 24시간 배양 후 2% FBS 배지로 교체한 후 10 nM estradiol, 1 μM

progesterone, 500 μM cyclic adenosine monophosphate(cAMP)와 함께 한약 추출물을 농도별로 처리하여 5일 동안 배양하였고 3일째 되는 날에 동일한 조건의 새로운 배지로 교체하였다.

Sw.71 cell은 48 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주한 세포를 2% FBS 배지로 교체 후 한약 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 WST assay kit 용액을 넣어주고 1시간 동안 배양한 후 microplate reader(Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

### 3) 자궁내막간질세포의 탈락막 표시인자 측정

T-HESC를 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cell이 되도록 넣어준 후 하루 동안 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교체하고 탈락막화 과정에 필요한 호르몬 10 nM estradiol, 1 μM progesterone, 500 μM cAMP을 넣어주고 4종 한약을 각각 농도 별로 5일 동안 처리하였고 3일째 되는 날에는 새로운 배지로 교체해 주었다. 수거된 세포와 상층액에서 LightCycler 96 System real-time PCR machine(Roche, Basel, Switzerland)과 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 PRL과 IGFBP1의 발현량을 측정하였다.

### 4) 영양막세포의 침윤 능력 확인

영양막세포의 침윤능력을 확인하기 위해 48-well Boyden chamber(Neuro Probe, Gaithersburg, MD)를 사용하였고 Diff-Quik kit(Sysmex, Kobe, Japan)를 이용하여

결과를 확인하였다. 멤브레인에 혈청이 없는 배지로 희석한 matrigel을 10 mL 넣어준 후 4°C에서 24시간 동안 코팅해 주었다. 코팅된 멤브레인은 24시간 동안 건조시킨 후 사용하였다. 혈청이 없는 배지로 교환한 영양막세포를  $4 \times 10^5$  cells/well 농도로 Boyden chamber의 위쪽 챔버에 넣어주고 10% FBS 배지로 농도별로 희석한 한약을 아래쪽 챔버에 넣어주었다. 24시간 후 멤브레인을 Diff-Quick kit로

염색시켜 침윤된 세포를 현미경으로 관찰하였다.

### 3. 통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준 편차(SD)로 표시하였으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism 버전 5.00(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하였고 각 실험군 간의 차이는  $P < 0.05$ 일 경우에 유의한 차이가 있다고 하였다.

Table 1. Composition of the 3 Herbal Medicine Formulas

Herbs	Latin name	Scientific name	Weight (g/%)			
			<i>Samul-tang</i>	<i>Onkyung-tang</i>	<i>Chokyungjongok-tang</i>	<i>Moutan Radicis Cortex</i>
당귀 (當歸)	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	<i>Angelica gigas Nakai</i>	500 (25)	625 (12.5)	410 (8.20)	
천궁 (川芎)	<i>Cindii Rhizoma</i>	<i>Cnidium officinale Mak.</i>	500 (25)	417 (8.34)	410 (8.20)	
작약 (芍藥)	<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeonia lactiflora Pall.</i>	500 (25)	417 (8.34)	328 (6.56)	
숙지황 (熟地黃)	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	<i>Rehmannia glutinosa Liboschitz ex Steudel</i>	500 (25)		614 (12.2)	
맥문동 (麥門冬)	<i>Liriopsis seu Ophiopogonis Tuber</i>	<i>Liriope platyphylla Wang et Tang</i>		833 (16.6)		
인삼 (人蔘)	<i>Ginseng Radix</i>	<i>Panax ginseng C. A. Meyer</i>		417 (8.34)		
반하 (半夏)	<i>Pinelliae Tuber</i>	<i>Pinellia ternata Breit.</i>		417 (8.34)		
목단피 (牡丹皮)	<i>Moutan Radicis Cortex</i>	<i>Paeonia suffruticosa Andr.</i>		417 (8.34)	328 (6.56)	700 (100)
아교 (阿膠)	<i>Asini Corii Colla</i>	<i>Equus asinus L.</i>		312 (6.24)		
자감초 (炙甘草)	<i>Glycyrrhizae Radix Praeparata</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>		312 (6.24)		

오수유 (吳茱萸)	<i>Evodiae Fructus</i>	<i>Evodia rutaecarpa Benth.</i>	208 (4.16)	410 (8.20)
육계 (肉桂)	<i>Cinnamomi Cortex</i>	<i>Cinnamomum cassia Presl</i>	208 (4.16)	205 (4.10)
생강 (生薑)	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	417 (8.34)	164 (3.28)
향부자 (香附子)	<i>Cyperi Rhizoma</i>	<i>Cyperus rotundus L.</i>		614 (12.2)
복령 (茯苓)	<i>Poria Sclerotium</i>	<i>Poria cocos Wolf</i>		328 (6.56)
진피 (陳皮)	<i>Citri Unshius Pericarpium</i>	<i>Citrus unshiu Mark.</i>		328 (6.56)
현호색 (玄胡索)	<i>Corydalis Tuber</i>	<i>Corydalis ternata Nakai</i>		328 (6.56)
건강 (乾薑)	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	<i>Zingiber officinale Rosc.</i>		328 (6.56)
에엽 (艾葉)	<i>Artemisiae Argyi Folium</i>	<i>Artemisia argyi Lev. et Vant.</i>		205 (4.10)
Mixed total weight (g)			2,000	5,000
Yield of extract (%)			33.3	30.6
			5,000	700
			24.0	21.0

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 4종 한약의 자궁내막간질세포에 대한 세포독성 확인

이전 실험에서 T-HESC에 10 nM estradiol, 1  $\mu$ M progesterone 그리고 cAMP를 농도별로 처리하여 탈락막화 지표로 사용되는 PRL이 생성되는 농도를 확인하였

고 cAMP 농도를 500  $\mu$ M로 결정하였다<sup>20)</sup>. 세포독성을 측정하기 위해 WST assay를 수행하였고 T-HESC에 5일 동안 10 nM estradiol, 1  $\mu$ M progesterone, 500  $\mu$ M cAMP 및 4종 한약을 농도별로 처리하였다. 결과적으로 모든 조건에서 세포독성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

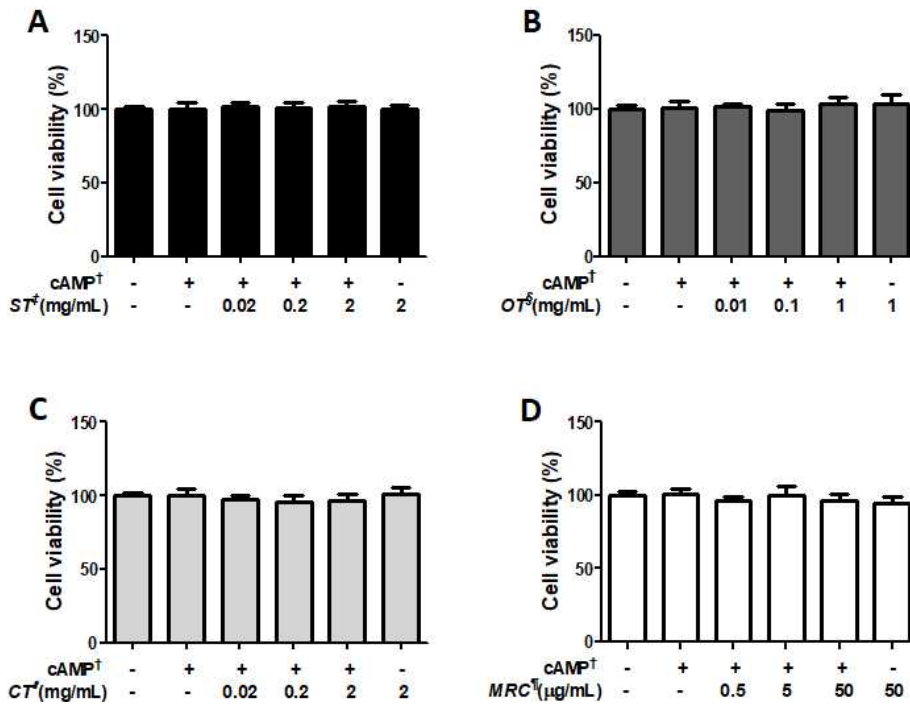


Fig. 1. Effects of 4 types herbal medicines on cytotoxicity of endometrial stromal cells. Treatment with 10 nM estradiol, 1 µM progesterone, 500 µM cAMP and indicated concentration of 4 types herbal medicines for 5 days resulted in no significant effect on the viability of T-HESCs. Cell viability was measured by WST assay. († ; cyclic adenosine monophosphate, ‡ ; *Samul-tang*, § ; *Onkyung-tang*, || ; *Chokyungjongok-tang*, ¶ ; *Moutan Radicis Cortex*)

## 2. mRNA 수준에서 4종 한약의 농도에 따른 자궁내막간질세포의 탈락막화 확인

탈락막화 지표로 사용되는 PRL과 IGFBP1의 발현 정도를 확인하기 위해 T-HESC에 5일 동안 10 nM estradiol, 1 µM progesterone, 500 µM cAMP 및 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕, 목단피 4종

한약을 농도별로 처리하여 real-time PCR로 확인하였다. 그 결과 cAMP를 단독으로 처리하였을 때 보다 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕을 함께 처리하였을 때 mRNA 수준에서 PRL과 IGFBP1의 발현이 유의성 있게 증가하였고 목단피는 유의적으로 감소하였다(\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001) (Fig. 2).

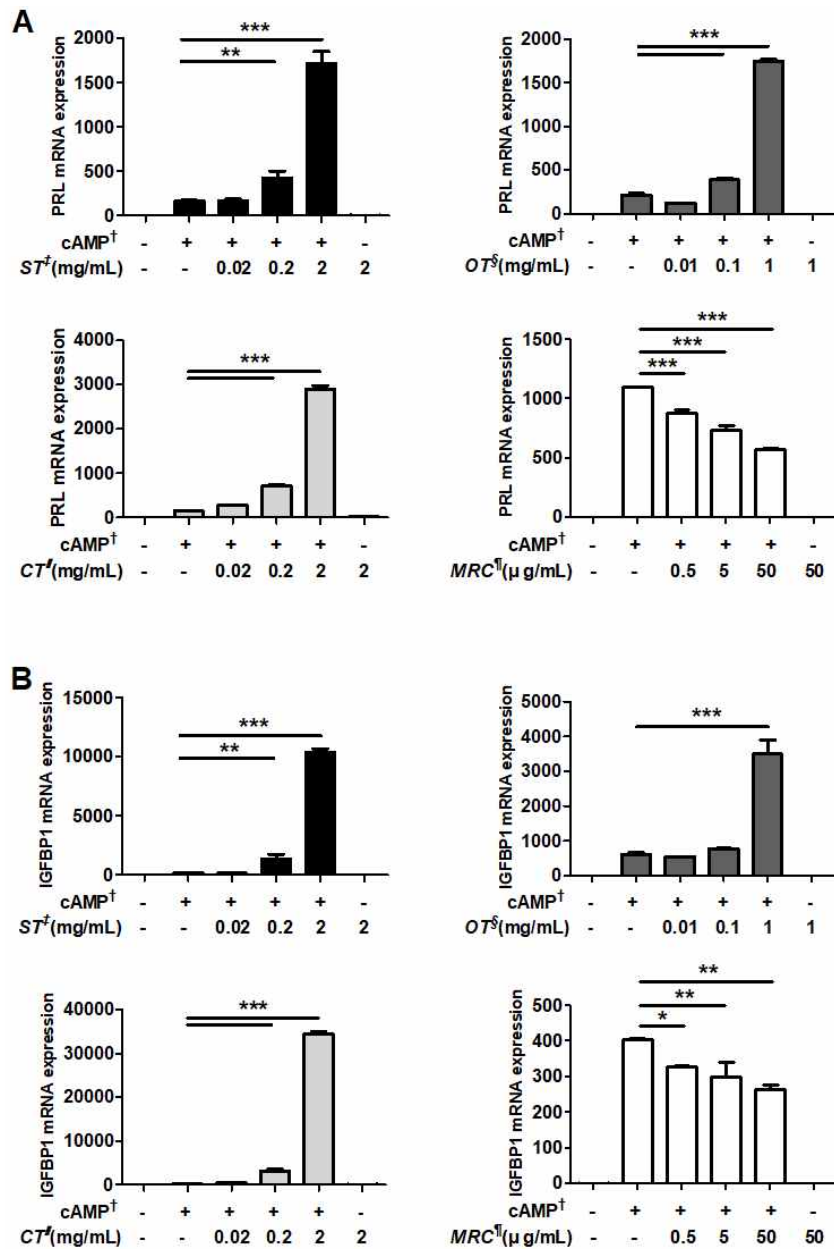


Fig. 2. Effects of 4 types herbal medicines on decidualization of endometrial stromal cells at the mRNA level.

The T-HESCs were treated with 10 nM estradiol, 1 μM progesterone, 500 μM cAMP and 4 types herbal medicines of indicated concentrations for 5 days. PRL and IGFBP1 expression of mRNA level were measured by real-time PCR. (A) PRL, (B) IGFBP1 (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, † : cyclic adenosine monophosphate, ‡ : *Samul-tang*, § : *Onkyung-tang*, || : *Chokyungjongok-tang*, ¶ : *Moutan Radicis Cortex*)

### 3. 단백질 수준에서 4종 한약의 농도에 따른 자궁내막간질세포의 탈락막화 확인

10 nM estradiol, 1 μM progesterone, 500 μM cAMP 및 사물탕, 온경탕, 조경

종옥탕, 목단피 4종 한약을 농도별로 5일 동안 처리한 T-HESC에서 PRL과 IGFBP1의 발현량을 ELISA로 확인하였다. 그 결과 단백질 수준에서 PRL과 IGFBP1의



발현은 cAMP를 단독으로 처리하였을 때 보다 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕을 함께 처리하였을 때 유의적으로 증가하였고

목단피는 유의적인 차이가 나지 않았다 (\*P<0.05, \*\*\*P<0.001)(Fig. 3).

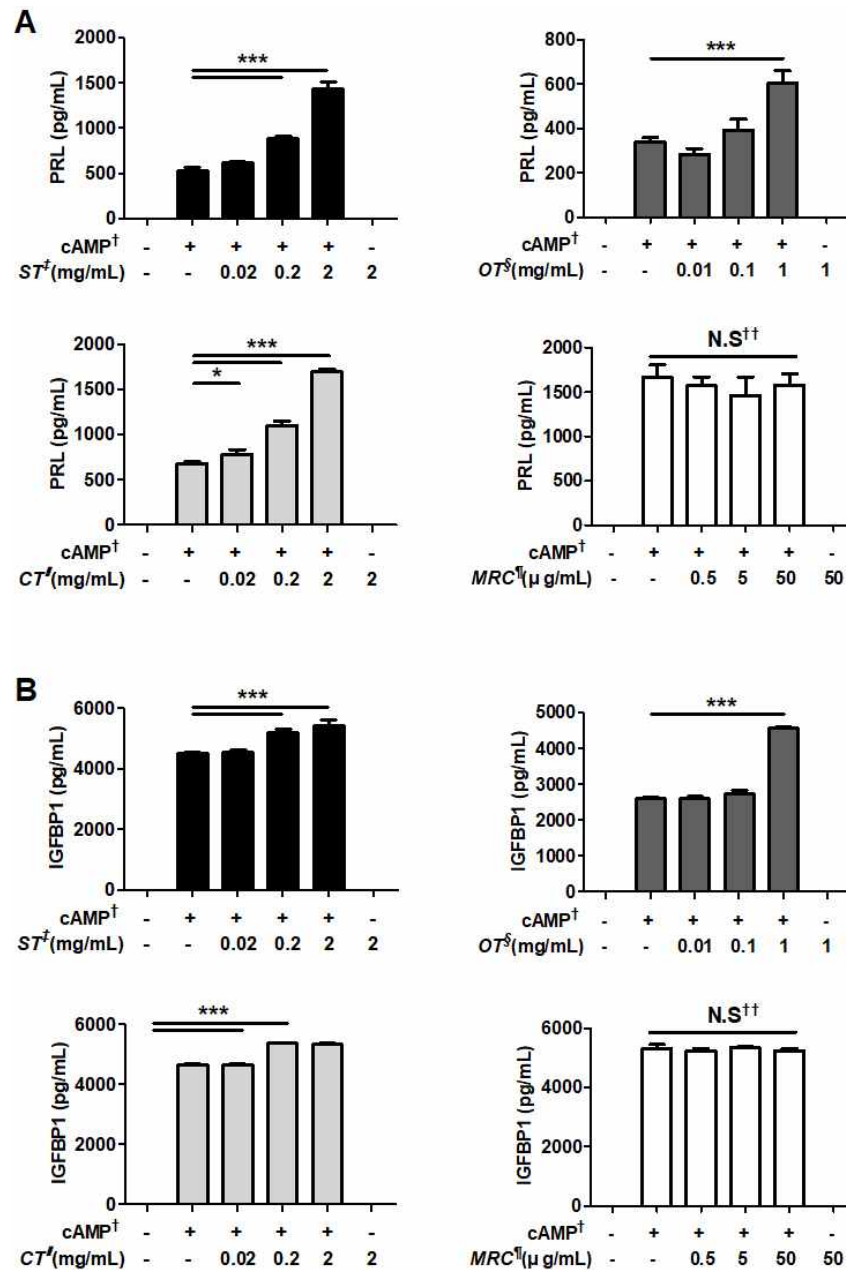


Fig. 3. Effects of 4 types herbal medicines on decidualization of endometrial stromal cells at the protein level.

The T-HESCs were treated with 10 nM estradiol, 1 μM progesterone, 500 μM cAMP and 4 types herbal medicines of indicated concentrations for 5 days. PRL and IGFBP1 expression of protein level were measured by ELISA. (A) PRL, (B) IGFBP1 (\*P<0.05, \*\*\*P<0.001, † ; cyclic adenosine monophosphate, ‡ ; *Samul-tang*, § ; *Onkyung-tang*, || ; *Chokyungjongok-tang*, ¶ ; *Moutan Radicis Cortex*, †† ; not significant)

#### 4. 4종 한약의 영양막세포에 대한 세포 독성 확인

세포독성을 측정하기 위해 WST assay를 수행하였고 Sw.71 cell에 24시간 동안 4종 한약을 농도별로 처리하여 결과를 확인하였다. 그 결과 사물탕과 온경탕은 5 mg/mL까지 세포독성이 나타나지 않았고 10 mg/mL부터는 세포독성이 나타

났다. 조경종옥탕은 2 mg/mL까지 세포독성이 나타나지 않았고 5 mg/mL부터는 세포독성이 나타났다. 목단피는 50 µg/mL까지 독성이 나타나지 않았고 100 µg/mL부터 세포독성을 나타내었다. 따라서 이후 실험은 독성이 없는 농도 범위에서 수행하였다(\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)(Fig. 4).

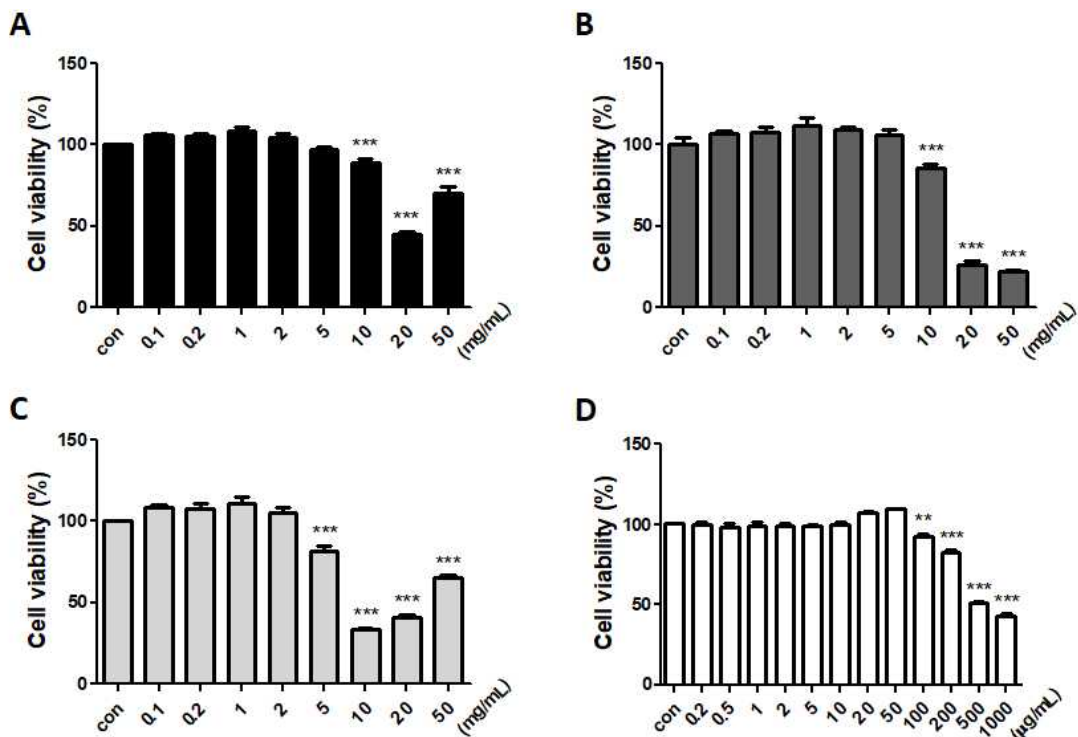


Fig. 4. Effects of 4 types herbal medicines on cytotoxicity of trophoblast cells. Treatment with various concentration of 4 types herbal medicines for 24 hr resulted in no significant effect on the viability of Sw.71 cell. Cell viability was measured by WST assay. (A) *Samul-tang*, (B) *Onkyung-tang*, (C) *Chokyungjongok-tang*, (D) *Moutan Radicis Cortex* (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)

#### 5. 4종 한약의 농도에 따른 영양막세포의 침윤능력 조절 확인

한약에 따른 영양막세포의 침윤 변화를 확인하기 위해서 Sw.71 cell에 24시간 동안 4종 한약을 농도 별로 처리하여 invasion

assay를 수행하였다. 그 결과 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕 3종 한약처방은 영양막세포의 침윤능력이 유의성 있게 감소하였고 목단피는 유의적인 차이가 없었다 (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)(Fig. 5).

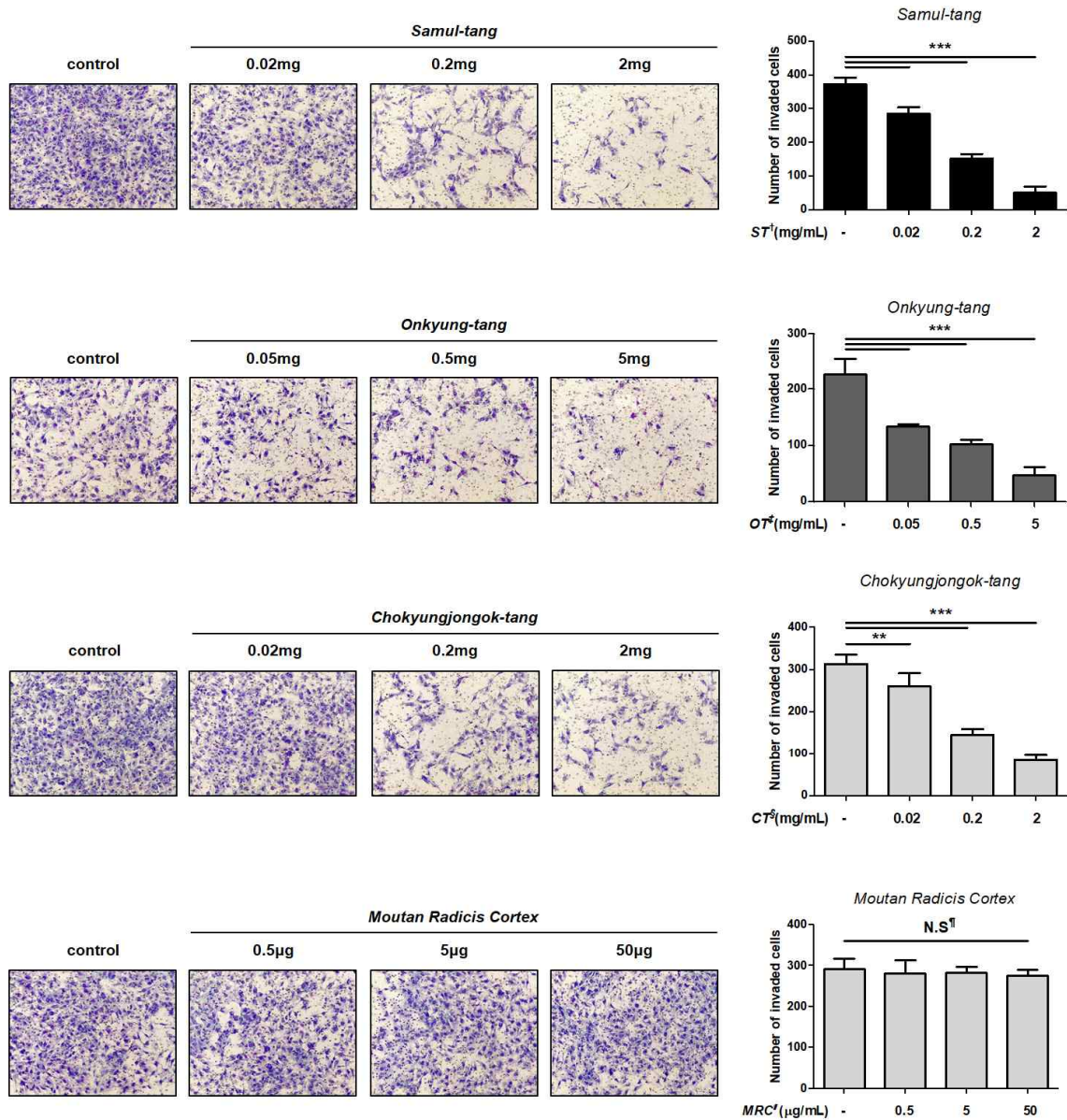


Fig. 5. Effects of 4 types herbal medicines on invasion abilities of trophoblast cells. Sw.71 cells were treated with four herbal medicines with different concentrations for 24 hours, and invasion assay was performed to confirm the change in invasion of trophoblast cells according to the herbal medicines. (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, † ; *Samul-tang*, ‡ ; *Onkyung-tang*, § ; *Chokyungjongok-tang*, || ; *Moutan Radicis Cortex*, ¶ ; not significant)

#### IV. 고 찰

본 연구는 임신과 관련된 3종 한약 처방과 1종 한약재가 착상과 임신유지에 있어서 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 자궁내막의 탈락막화와 영양막세포

의 침윤능력을 확인하였다. 이를 위해 선정된 4종 한약들은 이미 임신과 관련된 세포 및 조직에 대한 연구 결과가 보고되어 있다.

사물탕을 살펴보면, 생쥐의 체외수정 능력 평가에서 배란율 및 수정란 체외

발달률은 증가하였으나, 수정란 생산율 및 체외 배양에 미치는 영향은 감소하였고, hormone 변화에서 Luteinizing hormone (LH), Estradiol 17- $\beta$ (E2)는 변화가 없었으나, Follicle stimulating hormone(FSH)와 progesterone은 증가하였다<sup>21)</sup>.

온경탕은 난소 적출 쥐 모델에 투여한 결과, 자궁내막 표면상피, 자궁내막 및 자궁근층 두께가 증가되었고, 자궁 상피 세포 및 지질세포의 c-jun 발현 및 선상피세포 ER- $\alpha$  발현이 증가하여 난소기능 저하에 의한 자궁질환에 응용할 수 있을 것으로 보고하였다<sup>22)</sup>.

불임증 대표 처방인 조경종옥탕을 prostaglandin F2 $\alpha$ (PGF 2 $\alpha$ )로 배란을 억제시킨 쥐에 투여한 결과, 배란수, 난소여포(ovarian follicle) 수 및 estrogen 수치는 증가하였으나, FSH 및 LH 수치 변화는 없었다<sup>23)</sup>. 또 임신 쥐에 투약 한 후, 배란착상수가 무처치 대조군에 비해 증가하였고, 위임신한 가토에 PGF2 $\alpha$ 로 배란 억제시킨 후 투여 시 progesterone 수치 및 배란수가 증가되었다<sup>24)</sup>. 또 암소의 자궁 조직내막기질세포에 처리한 결과 세포 증식을 향상시켰으며, 미성숙난포란에서는 성숙을 증가 및 배 발생을 촉진시키는 작용이 있었다<sup>25)</sup>. 한편 임신 중독에 대한 영향을 살펴보고자 임신한 쥐에 조경종옥탕을 투여한 연구에서는, 무처치군에 비하여 증체량 및 생식지수로 착상수, 생존 태아수, 착상 후 배아폐사를 변화가 없었고, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase(AST), alkaline phosphatase(ALP), Blood Urea Nitrogen(BUN), creatine 및 혈청 progesterone 수치 변화도 없었다<sup>26)</sup>.

불임을 치료하고 임신을 도와주는 온

경탕과 조경종옥탕에는 한의서에서 임신 금기 한약 중 하나인 목단피가 공통으로 들어 있다. 이미 학계에서는 목단피의 임신 투여 금기에 대한 연구가 있어 왔다. 목단피가 수정란 착상에 관여하는 자궁 내막 cytokine인 백혈병억제인자(leukemia inhibitory factor, LIF) 발현 증가로 착상에 유리함에도 불구하고, 자궁 내막세포주와 영양막세포주와의 결합은 저해시키는 경향이 있어 임신 저해 작용이 밝혀졌다<sup>27)</sup>. 한편 임신 쥐에 목단피를 투여 시, 난착상수를 억제하는 경향이 있으나 통계적 유의성은 없으며, 위임신된 가토에서는 progesterone 수치가 감소하였으나, ALP, AST, ALT, BUN, creatine 수치는 무처치군과 같이 변화가 없었다<sup>19)</sup>.

자궁내막 기질 세포(ESC)의 탈락막화는 월경 주기의 분비 단계에서 시작되며 세포의 형태학적, 분자생물학적 분화를 수반하는 과정으로, 탈락막으로 분화된 자궁내막 세포는 프로락틴(PRL), 릴렉신(relaxin), 레닌(renin), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 1(IGFBP1) 등의 탈락막 특이적 인자들을 발현한다<sup>28,29)</sup>. 이 과정에서의 문제는 불임, 반복유산을 포함한 다양한 임신 장애를 초래할 수 있다<sup>5)</sup>. 영양막세포가 자궁내막 기질과 자궁내막 내부 1/3로 침범하는 것은 인간의 최종 모체-태아 순환의 발달과 임신 성공을 위한 필수적인 과정이다. 영양막세포의 침윤은 배아 착상 직후 시작되며 신호 전달에 의해 정밀하게 조절된다. 영양막 침윤 과정의 조절 장애는 광범위한 임신 이상을 초래할 수 있다. 지나치게 얇은 침윤은 유산, 자간전증, 자궁내 성장 제한, 태반박리 및 자궁내 사망을 포함한 산과 합병증을 유발할 수 있다. 대

조적으로 너무 과도한 침윤은 비정상적으로 깊은 자궁 태반 침윤을 초래하여 태반유착증후군을 일으킬 수 있다. 적절한 영양막 침범은 산모의 건강과 태아의 적절한 성장 및 발달에 가장 중요하다<sup>12)</sup>.

먼저 자궁내막간질세포와 영양막세포의 세포주를 이용하여 4종 한약에 대한 세포독성을 확인하였고 자궁내막 탈락막화의 지표로 사용되는 PRL과 IGFBP1의 발현량 변화와 영양막세포의 침윤 능력 변화를 확인하였다. 자궁내막간질세포와 영양막세포에서 4종 한약을 농도별로 처리하여 세포독성을 보이지 않는 농도를 선정하였다.

사물탕, 온경탕, 조경종옥탕을 자궁내막간질세포에 농도별로 처리하였을 때 mRNA 수준과 단백질 수준에서 PRL과 IGFBP1이 유의하게 증가하였다(Fig. 2, 3). 자궁내막간질세포에 목단피를 처리하였을 때는 PRL과 IGFBP1이 mRNA 수준에서는 유의적으로 감소하였고(Fig. 2) 단백질 수준에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 이는 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕은 PRL과 IGFBP1을 증가시켜 탈락막화를 촉진하고 목단피는 PRL과 IGFBP1을 감소시켜 탈락막화를 억제하는 효과가 있음을 시사한다. 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕에 의한 탈락막화의 촉진은 배아 착상과 임신 유지에 있어서 긍정적인 효과가 있을 것으로 판단된다.

영양막세포에 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕을 처리하였을 때 침윤 능력이 유의하게 감소하였고 목단피를 처리하였을 때는 유의한 차이가 없었다(Fig. 5). 일반적으로 태반 침윤이 적절히 일어날 때 앞에서 언급한 산과적 합병증이 감소한

다. 태반 침윤은 탈락막세포 외에 다른 요소에 의해서도 조절된다. 예를 들어 자궁 내 자연살해세포는 자궁내막으로의 이동 및 침입을 허용하는 인테그린을 발현하여 태반 침윤을 촉진시킨다<sup>30)</sup>.

열수추출물인 온경탕과 조경종옥탕에는 목단피가 각각 3.75 g/첩(전체 처방의 8.34%), 3.0 g/첩(전체 처방의 6.56%)이 포함되어 있고, 단일 목단피는 에탄올 추출물(100%)이어서 추출 용매와 투여량이 달라 비교 평가에 한계가 있었다. 다만 두 세포주 실험에서는 목단피가 포함된 복합 한약처방 효과와 단일 추출물 목단피는 다르게 나타나므로, 향후 열수 추출물 목단피와 한약처방 구성 속 목단피를 용량별 차등에 따른 동시 연구가 필요하다고 본다.

결과적으로 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕은 자궁내막간질세포에서 탈락막화 지표가 되는 PRL과 IGFBP1의 생성을 유의하게 증가시켰고 영양막세포의 침윤 능력은 감소시켰다. 목단피는 자궁내막간질세포에서 PRL과 IGFBP1의 생성을 mRNA수준에서 유의하게 감소시켰고 단백질 수준에서는 PRL과 IGFBP1 생성에는 효과가 없었으며, 영양막세포 침윤 능력은 감소시켰다. 따라서 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕은 자궁내막의 탈락막화를 촉진시켜 착상과 초기임신 성립에 긍정적인 작용을 할 것으로 판단된다. 이러한 결과에서 향후 이들 한약에 의한 영양막세포의 탈락막내 침윤 감소가 임신유지에 어떤 영향을 주는지는 동물 실험을 통해 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

1. 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕 등 3종 처방은 자궁내막간질세포에서 PRL과 IGFBP1의 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 유의적으로 증가시켰다.
2. 목단피는 자궁내막간질세포의 mRNA 수준에서는 PRL과 IGFBP1의 생성을 유의하게 감소시켰고 단백질 수준에서는 유의적 차이가 나지 않았다.
3. 사물탕, 온경탕, 조경종옥탕 등 3종 처방은 영양막세포의 침윤 능력을 유의성 있게 감소시켰으나, 목단피는 유의적 차이가 나지 않았다.

□ Received : Oct 15, 2021

□ Revised : Oct 18, 2021

□ Accepted : Nov 26, 2021

## References

1. Statistics KOREA Government Official Work Conference. Number of births and total fertility rate. [cited October 15, 2021]. Available from: URL: <http://www.index.go.kr/potal/main>.
2. Shin J, et al. Socioeconomic Status and Successful Delivery after an Infertility Diagnosis: a Nationwide Health Insurance Cohort Study in Korea Conducted from 2005 to 2013. *J Korean Med Sci.* 2020; 35(39):e341.
3. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 2012;18(12):1754-67.
4. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1400-8.
5. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol.* 2018;17(3):220-7.
6. Gibson DA, et al. Endometrial Intracrinology-generation of an estrogen-dominated microenvironment in the secretory phase of women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):E1802-6.
7. Huang J, et al. Protective role of GPR120 in the maintenance of pregnancy by promoting decidualization via regulation of glucose metabolism. *EBioMedicine.* 2019;39(1):540-51.
8. Logan PC, et al. Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 2013; 19(5):302-12.
9. Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adh Migr.* 2016;10(1-2):88-110.
10. Kim GJ. Role of trophoblast in implantation and placenta development. *Korean J Reprod Med.* 2010;37(3):181-9.
11. Salomon C, et al. The possible role of extravillous trophoblast-derived exosomes on the uterine spiral arterial remodeling under both normal and pathological conditions. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1-10.
12. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH. Regulation

- of trophoblast invasion: The role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol.* 2012;5:e137-43.
13. Kim JH, et al. Analysis of Studies on Samul-tang for Fundamental Establishment of Evidence Based Medicine. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2009;23(4):779-88.
  14. Kim HJ, Lee KS, Song BK. Study on the Tendency of Medicine Used in the Treatment of Infertility. *The Journal of Oriental Gynecology.* 1997; 10(1):19-29.
  15. Ushiroyama T, et al. Unkei-to for correcting luteal phase defects. *Journal of Reproductive Medicine.* 2003;48(9):729-34.
  16. Deng JY. A Randomized Parallel Controlled Study of Jinkui Wenjing Decoction Combined with Progesterone in the Treatment of Luteal Insufficiency and Infertility(金匱温经汤联合黄体酮治疗黄体功能不全不孕随机平行对照研究). *Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine.* 2019;33(3):39-41.
  17. Wei F. Analysis of Clinical Effect of Jinkui Wenjing Decoction on Infertility (金匱温经汤治疗不孕症的临床效果分析). *Research on Chinese and foreign women's health.* 2019;10(19):47-9.
  18. Kim SJ, Lee SI, Koo BH. Dosage Form Study of *Jokyungjongok-Tang* for the Treatment of Infertility. *K. H. Univ. O. Med. J.* 1978;1(1):57-65.
  19. Bae EK, Lee KS, Song BK. Study on the Influences of *Moutan Cortex Radicis* and *Corydalis tuber* on Pregnant Maintenance, Corpus Lutein Functions and Toxic Action of Kidney and Liver during Pregnancy. *K. H. Univ. O. Med. J.* 1995;18(2):1-12.
  20. Park SY, et al. A study on the regulation of endometrial and placental cell function by water extract of 3 type of herbal medicines and ethanol extract on *Scutellariae Radix*. *J Korean Obstet Gynecol.* 2021;34(3):1-14.
  21. Cho JH, Lee KS, Song BK. Study on the effects of *Samul-Tang* for IVF in mice. *The Journal of Oriental Gynecology.* 2000;13(1):94-111.
  22. Kwon CN, Lee IS. The Effect of *Onkyung-tang* on Uterine Changes of Ovariectomized Rats. *The Journal of Oriental Gynecology.* 2001;14(2):56-68.
  23. Seo Yj, et al. Effects of *Jokyungjongok-tang* on the ovulation in rats. *The Journal of Oriental Gynecology.* 1999; 12(2):101-6.
  24. Lee KS, Song BK. Studies on the Effects of *Jokyungjongok-tang* on Ovarian Function. *K. H. Univ. O. Med. J.* 1983;6:139-51.
  25. Lee SJ, et al. Effect of *JokyongJongok-tang* on the fertilization and maturation of immature oocytes in bovine. *The Journal of Oriental Gynecology.* 1999; 12(2):134-47.
  26. Kim DJ, Seo BI. Effect of Carthami Semen and *Jogyongjongok-tang* On Pregnant Rats. *Kor. J. Herbology.* 2013;28(3):33-8.
-

27. Choi HJ, et al. Mechanism Study on Inhibition of Pregnancy by Root Barks of *Paeonia suffruticosa*. *J Physiol & pathol Korean Med.* 2014;28(5):530-6.
28. Lee CS, et al. Role of HOXA Gene in Human Endometrial Decidualization. *Korean J Reprod Med.* 2010;37(3):207-16.
29. Kida N, et al. Exposure to cigarette smoke affects endometrial maturation including angiogenesis and decidualization. *Reprod Med Biol.* 2021;20(1):108-18.
30. Lunghi L, et al. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5(6):1-14.