

## 溫胞飲이 자성생쥐의 생식능력과 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현에 미치는 영향

\*대구한의대학교 부인과교실, \*\*오드리여성한의원, \*\*\*대구한의대학교 원전외사학교실  
박영선\*, 김동철\*, 백승희\*\*, 김은하\*\*\*

### ABSTRACT

The Effect of *Onpoeum* on the Ovarian Functions and Differential Gene Expression of Caspase-3, MAPK and MPG in Female Mice

Young-Sun Park\*, Dong-Chul Kim\*, Seung-Hee Baek\*\*, Eun-Ha Kim\*\*\*

\*Dept. of OB&GY, Oriental Medicine, Daeguhaany University

\*\*Odri Women's Traditional Korean Medical Clinic

\*\*\*Dept. of Original Text and Medical History,  
Oriental Medicine, Daeguhaany University

**Purpose:** These experiments were undertaken to evaluate the effect of *Onpoeum* on ovarian functions and differential gene expressions related with cell viabilities caspase-3, MAPK and MPG in female mice.

**Methods:** We administered the *Onpoeum* to 6-week-old female ICR mice for 4, 8, or 12 days. With different concentration of *Onpoeum*, the female mice were injected PMSG and hCG for ovarian hyperstimulation. The mice divided into 3 different groups for each experiment. We chose the Caspase-3 for cell apoptosis, MAPK and MPG genes for cell viability and DNA repair.

**Results:** In case of 4, 8, 12 day of *Onpoeum*, we were examined the mean number of total ovulated oocytes and the number of morphologically normal oocytes. We were also examined the embryonic developmental competence in vitro. In addition we were examined the differential expression of cell apoptosis, viability and DNA repair related genes, Caspase-3, MAPK and MPG according to concentration and duration of *Onpoeum*. From these results showed that the administration of *Onpoeum* played a role of prevention of cell apoptosis and DNA damages and also increased cell proliferation resulted in ovarian functions.

**Conclusion:** It is suggested that the medication of *Onpoeum* may have beneficial effect on reproductive functions of female mice via prevention of cell apoptosis and DNA damaging and promotion of cell proliferation.

**Key Words:** *Onpoeum*, Ovarian function, Caspase-3, MAPK, MPG

## I. 緒 論

불임은 가임여성이 정상적인 성생활을 지속하여 만 1년이 지나도록 임신이 되지 않는 경우를 뜻하는데 전체 생식연령 부부의 약 10~15% 정도가 해당된다<sup>1)</sup>.

불임치료는 호르몬 요법, 과배란 유도, 자궁내 인공수정, 체외수정기술, 생식세포 난관내 이식 등의 보조생식술이 시행되는데 가장 흔히 사용되는 것은 체외수정술이다<sup>2)</sup>. 그러나 자궁환경에 대한 인공 수정된 배아의 적응력 실패로 인해 실제 성공률은 5~25% 정도에 그치고 있으며 착상 후 30%에 이르는 유산과 5%의 자궁외임신이 보고되는 바 체외수정의 성공률을 높이기 위한 노력이 다각도로 진행되고 있다<sup>3)</sup>.

최근 여성들의 사회활동이 활발해지면서 고령의 가임기 여성들이 임신을 시도하는 경우가 늘고 있다. 고령 여성의 임신을 저하에는 난자의 질적 측면과 자궁내막의 노화가 영향을 미치는데 특히 노화에 따른 이상난자(abnormal oocytes)의 생산이 중요한 요인으로 이해되고 있다<sup>3)</sup>. 따라서 고령여성의 성공적인 임신을 위해서는 난소의 노화억제와 생식능력의 향상이 중요한 요건이 된다고 하겠다.

최근 한의학에서도 불임에 대한 연구가 지속적으로 진행되어 調經種玉湯<sup>4)</sup>, 毓麟珠<sup>5)</sup>, 調經散<sup>6)</sup>, 附益地黃丸<sup>7)</sup> 등이 백서의 배란에 미치는 실험적 연구와 강<sup>8)</sup>, 송<sup>9)</sup>, 김<sup>10)</sup>, 박<sup>11)</sup> 등이 한약 투여를 통하여 Caspase-3, MAP kinase, MPG 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하여 체

외수정율과 생식능력 향상을 위한 실험적 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

溫胞飲은 《傳青主男女科》<sup>12)</sup>에서 溫胞散이란 명칭으로 부인의 下部水冷으로 인한 불임을 치료하는 방제로 수록된 이래 溫胞散<sup>12-13)</sup>, 溫胞飲<sup>14-19)</sup>, 溫胞湯<sup>20-21)</sup>의 다양한 방명으로 활용되고 있다. 溫胞散에 대한 최근의 실험 연구<sup>22-23)</sup>에서 본 처방이 난소의 기능에 미치는 영향은 확인 되었으나 생식조직 내에서의 유전자 발현에 미치는 영향은 아직 연구된 바가 없었다.

본 연구에서는 송<sup>15)</sup>의 《韓方婦人科學》에 기재되어 있는 溫胞飲을 다양한 농도로 서로 다른 기간 동안 6주령의 자성생쥐에게 투여한 후 난소기능과 체외 배발생능 및 난소 조직에서의 세포사멸과 세포활성에 관련된 유전자의 발현정도를 분석하였다. 이에 배란난자의 변화, 배발생율의 비교, Caspase-3, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), MPG 유전자의 발현을 통해 溫胞飲의 생식능력 개선효과를 검증하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 藥材와 動物

#### 1) 實驗藥材

실험에 사용한 溫胞飲은 《傳青主男女科》<sup>12)</sup>에 수록된 溫胞散 처방으로 약재는 대구한의대 부속한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였으며 1첩의 내용과 분량은 송<sup>15)</sup>의 처방에 근거하였으며 그 내용은 <Table 1>과 같다.

Table 1. Composition of *Onpoeum* used in this study.

韓藥名	生藥名	學名	重量(g)
白朮(土炒)	<i>Atractylodes Rhizoma alba</i>	<i>Atractylodes japonica</i>	40.0
巴戟(鹽水炒)	<i>Moridae Radix</i>	<i>Morinda officinalis</i> How	40.0
人參	<i>Ginseng Radix</i>	<i>Panax ginseng</i>	12.0
山藥	<i>Dioscoreae Radix</i>	<i>Discorea batatas</i> Decaisne	12.0
芡仁(炒)	<i>Euryale Feroxi Semen</i>	<i>Euryale ferax</i> Salisbury	12.0
杜沖(炒)	<i>Eucommiae Cortex</i>	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	12.0
菟絲子(炒)	<i>Cuscutae Semen</i>	<i>Cuscuta australis</i> R.Brown	12.0
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	<i>Cinnamomi cassia</i> Blume	8.0
補骨脂(鹽水炒)	<i>Psoraliae Semen</i>	<i>Psiralea corylifoliac</i>	8.0
炮附子	<i>Aconiti Tuber</i>	<i>Aconitium carmichaeli</i> Debeaux	1.2
Total amount			157.2

2) 實驗動物

본 연구를 위한 실험동물은 가임능력이 있는 6주령의 자성 CF1 마우스를 공시하였다. 모든 실험동물은 21±1℃로 점등과 소등이 각각 12시간으로 조절되는 무균 동물 사육실에서 사육하였으며 전 실험기간 동안 물과 사료는 무제한으로 급식하였다.

2. 方法

1) 검액의 조제

溫胞飲 2첩 분량 314.4g에 증류수 3000cc를 첨가하여 2시간 동안 가열하여 탕제 750 ml를 추출하였다. 추출한 煎湯液을 100ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 뒤, -70℃ 이하에서 24시간 이상 defreeze 한 후 96시간 동안 완전히 동결건조시켜 38.6g의 분말을 얻었다. 동결건조한 溫胞飲 분말 38.6g을 멸균 증류수에 1mg/ml의 농도로 용해하여 검액을 제조하였다.

2) 검액의 투여

준비된 검액을 0.3ml당 각각 농도가 0, 0.1mg, 1mg, 10mg, 100mg으로 조정되도록 준비한 다음 이를 마우스의 생리주기인

4일, 8일 및 12일간 각각 존데를 사용하여 구강 투여하였다. 각 실험군과 대조군의 수는 각각 10마리로 통일하였다.

3. 다배란 유도과 배란된 난자수의 비교

상이한 투여 농도와 투여 기간으로 조정된 CF1 마우스는 溫胞飲 검액 투여 종료 후 5 IU의 PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내에 주사하고, 48시간 후에 5 IU의 hCG (human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 다시 복강내에 주사하여 다배란(superovulation)을 유도하였다.

hCG 투여 후 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 보관 하였고, 난관은 PBS (phosphate buffered saline; Gibco, USA) 용액이 함유된 petri dish (Nunc; Denmark)로 옮긴 다음 해부현미경(Nikon, Japan) 하에서 난관팽대부(ampullar 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 처리함으로써 난구세포를 제거하였다. 이어 해부현미경하에서 배란된 모든 난자만을 분리하였으며 신선 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. 농도 및 기간에 따른 2-세포기 배아의 체외 배발생능 비교

농도와 기간이 상이하게 溫胞飲 검액을 투여한 생쥐에 대하여 다배란을 유도하기 위하여 hCG 투여 후 생식능력이 확인된 12주령 이상의 웅성 CF-1 마우스와 1:1의 비율로 합사하여 교미를 유도하였다. 익일 아침 자성생쥐를 관찰하여 질전(vaginal plug)이 확인된 개체를 교미된 것으로 판정한 다음 hCG 투여 후 36시간째에 도살하여 난관팽대부를 적출하고 해부현미경하에서 난관팽대부를 30 gauge needle이 부착된 주사기를 이용하여 M2 배양액을 관류함으로써 수정된 2-세포기 배아(2-cell stage embryo)를 회수하였다. 회수된 2-세포기 배아는 신선한 M16 배양액에 3mg/ml의 BSA (bovine serum albumin; Sigma, USA)가

함유된 배양액으로 3회 세척한 다음 이를 paraffin oil (Sigma, USA)에 덮혀진 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 배반포(blastocyst) 배아로의 발생율을 관찰하였다.

#### 5. 난소 조직내에서 세포사멸 및 활성화 관련 유전자의 발현 비교

상이한 기간과 농도로 검액을 투여한 CF-1 마우스를 투여 종료 후 도살하여 난소를 적출한 후 조직내에서의 유전자 발현 정도를 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)방법을 이용하여 분석하였다. 본 연구를 위해 세포사멸과 관련된 유전자로는 Caspase-3, 세포활성도와 관련된 유전자로는 MAPK, 그리고 DNA repair와 관련된 유전자로는 MPG 유전자를 선택하여 분석하였다.

##### 1) Total RNA의 분리

마우스의 난소 조직을 무균적으로 적출하여 액체질소에 넣은 다음 homogenizer (Barnstard, UK)를 사용하여 분쇄하였다. Total RNA를 분리하기 위하여 trizol (Invitrogen, USA)과 chloroform (Sigma, USA)이 5:1로 혼합된 용액에 넣고 4°C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리(Sorval, USA)를 실시하였다. 이를 isopropyl alcohol (Sigma, USA)에 침전(12,000rpm/15min/4°C)시키고, 70% ethanol (Merck, Germany)로 세척(12,000rpm/15min/4°C)한 후, DEPC 처리된 증류수에 녹였다. Spectrophotometer (BioRad, USA)로 분리된 Total RNA의 양을 산출하여 각 Sample group별로 1 $\mu$ g의 total RNA를

이용하여 각종 유전자 발현을 분석하였다.

2) PCR primer의 제작 및 반응조건  
본 연구에 사용된 Caspase-3, MAPK,

MPG 유전자와 대조군으로 사용된 house keeping gene인 GAPDH의 primer sequence 및 RT-PCR 조건은 <Table 2>에서 보는 바와 같다.

Table 2. The primers used for RT-PCR

GENE		Sequence of primer	Denaturation		Annealing		Extension		Number of PCR Cycle	PCR Product
			Temp-	Time	Temp-	Time	Temp-	Time		
Caspase-3	Forward	5'-GCAGCAGGCAACC TGGTG-3'	94°C	30sec	64°C	30sec	72°C	30sec	29cycle	199bp
	Reverse	5'-TGATGGTCTTTGG CAGCC-3'								
MAPK	Forward	5'-AGGTGTAGCTCAG GACTTCA-3'		1min	61°C	45sec	72°C	1min	30cycle	589bp
	Reverse	5'-AGGAGGCTATAAA GGACACC-3'								
MPG	Forward	5'-TCACATGTCCTAC CCAGG-3'		1min	58°C	1min	72°C	80sec	28cycle	310bp
	Reverse	5'-ATTTTTCAGGATG CTCCC-3'								
GAPDH	Forward	5'-CAAGGGTAAATTC ATTGGGCTTGG-3'		30sec	55°C	30sec	72°C	1min	24cycle	369bp
	Reverse	5'-GCTCGTTCGTCGAC AACGGCTC-3'								

Pre-denaturation 95°C 5min / Final-extension 72°C 10min

(1) Apoptosis 관련 Caspase-3 유전자의 발현

Apoptosis와 관련된 apoptosis-related cysteine protease의 정량적 분석은 Caspase-3 5'primer (5'-GCAGCAGGCAACCTGGTG-3')와 Caspase-3 3'primer (5'-TGATGGTCTTTGGC AGCC-3')를 이용한 PCR로 apoptosis-related cysteine protease gene의 일부분 중 199bp를 증폭하였다.

Caspase-3 5'primer와 Caspase-3 3'primer 20pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25µl를 맞춘 후 first denature 95°C 5분, 29 cycle로 denature 94°C 30초, anealing 64°C 30초, extension 72°C 30초, final extension 7

2°C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio Rad quantity one®을 이용하여 각 Sample group별로 농도를 결정하였다.

(2) 세포활성 관련 MAPK 유전자의 발현

Proliferation과 관련된 MAPK의 정량적 분석은 MAPK 5'primer (5'-AGGTGTAGCTCAGGACTTCA-3')와 MAPK 3'primer (5'-AGGAGGCTATAAAGGACACC-3')를 이용한 PCR로 MAPK의 일부분 중 589bp를 증폭하였다.

MAPK 5'primer와 MAPK 3'primer 20pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25µl를 맞춘 후

first denature 95°C 5분, 30cycle로 denature 94°C 1분, annealing 61°C 45초, extension 72°C 1분, final extension 72°C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio Rad quantity one<sup>®</sup>을 이용하여 각 sample 별로 농도를 결정하였다.

### (3) DNA 복구 관련 MPG 유전자의 발현

각 Total RNA의 reverse transcription (이하 RT)은 1μM oligo dT primer를 이용하여 10mM dNTP (Ambion, USA), 5X buffer, 0.1M DTT, 200 unit superscript (Invitrogen, USA) 및 5% DMSO (Sigma USA)에서 20μl reaction volume으로 4°C에서 1시간 동안 실시하였고, 70°C에서 15분의 extension interval을 주었다. RT reaction 후, 난소조직의 MPG 유전자를 detection하기 위해, 2μl의 RT product, 25 pmol의 forward (5'-TCACATGTCCTACCCAGG-3'), reverse primer (5'-ATTTTTCAGGATGCTCCC-3'), 5% DMSO, premix (Kisan Biotech, Korea)을 25μl volume으로 95°C 5분 DNA denaturation 하였다. 이후 94°C 1분 DNA denaturation, 58°C 1분 primer annealing과 72°C 1분 20초 DNA extension을 28 cycle 반복하였고, 72°C에서 10분의 extension interval을 주었다. RT-PCR을 통해 detection된 product를 1.5% agarose gel에서 전기영

동(BioRad, USA)하여 분리한 후, 각 band의 density를 multiImager system (BioRad, USA)으로 측정하였으며, Microsoft Excel program으로 semi-quantitation을 하였다.

### 6. 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. 結 果

### 1. 투여 기간 및 농도에 따른 자성생쥐의 난소반응

#### 1) 溫胞飲 검액을 4일간 투여한 후 배란 난자의 변화

溫胞飲 검액을 4일간 투여하였을 때, 평균 총 배란 난자수는 모든 농도의 실험군에서 유의성 높은 증가를 보였으며 ( $p < 0.01$ ), 대조군에 비해 각 농도별 비교에서도 유의성 높은 차이를 보였다 ( $p < 0.01$ ). 정상 형태의 배란 난자수는 모든 농도의 실험군에서 유의성 있는 증가를 보였는데 ( $p < 0.05$ ), 특히 대조군에 비해 10mg와 100mg의 농도에서 가장 유의성 높은 증가를 보였다 ( $p < 0.01$ ) (Table 3, Fig. 1).

Table 3. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Onpoeum* extract administration for 4 days.

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
Control	0	10	182 (18.2) <sup>a</sup>	158 (15.8) <sup>d</sup>
<i>Onpoeum</i>	0.1 mg	10	262 (26.2) <sup>b</sup>	230 (23.0) <sup>f</sup>
	1 mg	10	222 (22.2) <sup>b</sup>	192 (19.2) <sup>f</sup>
	10 mg	10	350 (35.0) <sup>c</sup>	280 (28.0) <sup>e</sup>
	100 mg	10	310 (31.0) <sup>c</sup>	272 (27.2) <sup>e</sup>

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

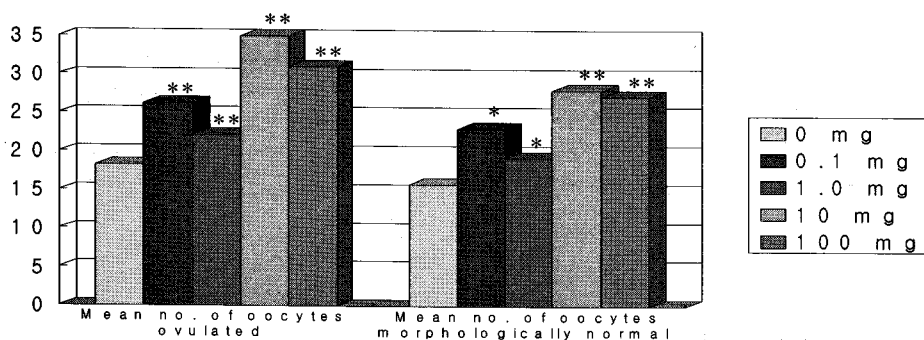


Fig. 1. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Onpoeum* extract administered for 4 days in the mice. (\*\*: p<0.01, \*: p<0.05)

2) 溫胞飲 검액을 8일간 투여한 후 배란 난자의 변화

溫胞飲 검액을 8일간 투여하였을 때, 평균 총 배란 난자수는 모든 농도의 실험군에서 유의성 높은 증가를 보였으며 (p<0.01), 정상 형태의 배란 난자수는 1

mg과 10mg 농도에서 유의성 높은 증가를 보였다(p<0.01). 특히 1mg의 농도에서 평균 총 배란 난자수와 정상 형태의 배란 난자수는 대조군과 다른 농도의 실험군에 비해서 유의성 높은 증가를 보였다 (p<0.01)(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Onpoeum* extract administration for 8 days.

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
Control	0	10	165 (16.5) <sup>a</sup>	140 (14.0) <sup>d</sup>
<i>Onpoeum</i>	0.1 mg	10	227 (22.7) <sup>b</sup>	207 (20.7) <sup>f</sup>
	1 mg	10	307 (30.7) <sup>c</sup>	290 (29.0) <sup>e</sup>
	10 mg	10	210 (21.0) <sup>b</sup>	203 (20.3) <sup>e</sup>
	100 mg	10	203 (20.3) <sup>b</sup>	190 (19.0) <sup>f</sup>

a&b, a&c, b&c, d&e, e&f; p<0.01 : Statistically significant as compared with control group.

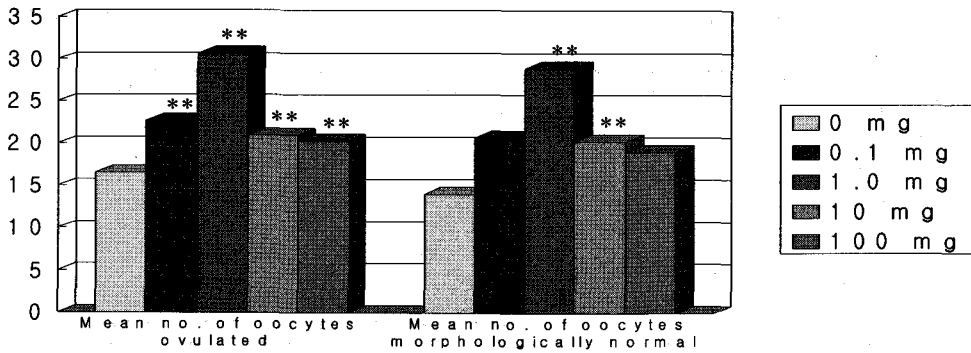


Fig. 2. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Onpoeum* extract administered for 8 days in the mice. (\*\*:  $p < 0.01$ )

3) 溫胞飲 검액을 12일간 투여한 후 배란 난자의 변화  
 溫胞飲 검액을 12일간 투여하였을 때, 평균 총 배란 난자수와 정상 형태의 배란 난자수는 대조군에 비해 모든 농도의

실험군에서 유의성 높은 증가를 보였다 ( $p < 0.01$ ). 특히 정상 형태의 배란 난자수는 1mg과 10mg 농도에서 다른 농도에 비해 유의성 있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ ) (Table 5, Fig. 3).

Table 5. Comparison of ovulational functions between different dose of *Onpoeum* 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	170 (17.0) <sup>a</sup>	153 (15.3) <sup>c</sup>
<i>Onpoeum</i>	0.1 mg	10	295 (29.5) <sup>b</sup>	260 (26.0) <sup>e</sup>
	1 mg	10	366 (36.6) <sup>b</sup>	345 (34.5) <sup>d</sup>
	10 mg	10	365 (36.5) <sup>b</sup>	333 (33.3) <sup>d</sup>
	100 mg	10	322 (32.2) <sup>b</sup>	270 (27.0) <sup>e</sup>

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

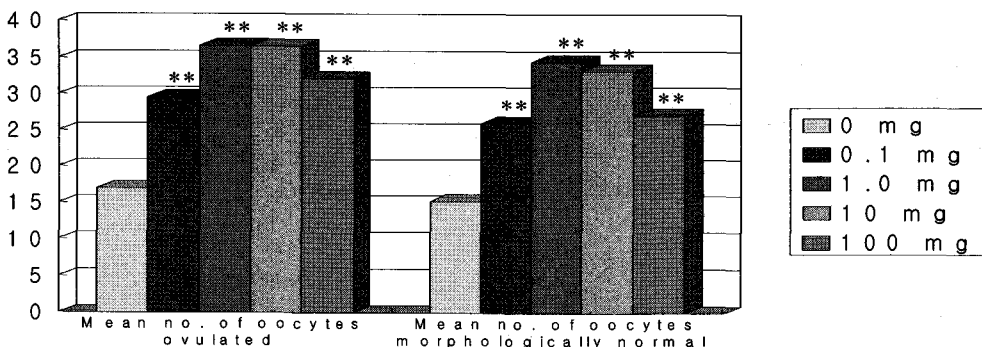


Fig. 3. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Onpoeum* extract administered for 12 days in the mice. (\*\*:  $p < 0.01$ )



2. 투여 기간 및 농도에 따른 배아의 체외 배발생능 비교

1) 溫胞飲 검액을 4일간 투여한 후 체외 배발생능 비교

4일간 투여한 후 2-세포기 배아의 수는 1mg 농도를 제외한 모든 농도의 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가

하였다( $p < 0.01$ ). 배반포로의 발생율은 모든 농도의 실험군에서 유의성 있는 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ), 특히 10mg과 100mg 농도일 때 배반포로의 배발생율이 가장 유의성 높은 증가를 보였다( $p < 0.01$ )(Table 6, Fig. 4).

Table 6. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Onpoeum* administrated mice for 4 days.

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro(%)
<i>Onpoeum</i>	Control	0	136 <sup>a</sup>	58 (42.6) <sup>d</sup>
	0.1 mg	10	201 <sup>c</sup>	96 (47.8) <sup>f</sup>
	1 mg	10	182 <sup>a</sup>	93 (51.1) <sup>f</sup>
	10 mg	10	334 <sup>b</sup>	175 (52.4) <sup>e</sup>
	100 mg	10	295 <sup>b</sup>	146 (49.5) <sup>e</sup>

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

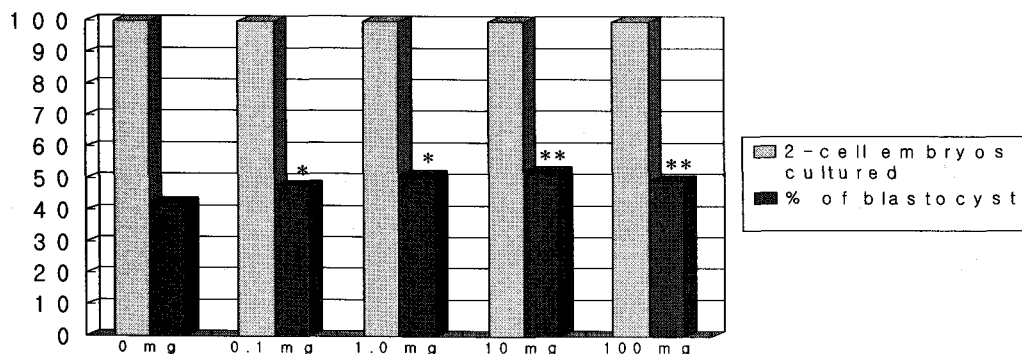


Fig. 4. Comparison of developmental competence on in vitro fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Onpoeum* administered mice for 4 days. (\*\*: $p < 0.01$ , \*: $p < 0.05$ )

2) 溫胞飲 검액을 8일간 투여한 후 체외 배발생능 비교

8일간 투여한 후 2-세포기 배아의 수는 모든 투여 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였는데( $p < 0.05$ ), 1mg 농도에서 가장 유의성 높은 증가를 보였

다( $p < 0.01$ ). 배반포로의 배발생율도 역시 모든 투여 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였는데( $p < 0.05$ ), 특히 1mg 농도에서 배반포로의 배발생율이 가장 유의성 높은 증가를 보였다( $p < 0.01$ )(Table 7, Fig. 5).

Table 7. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Onpoeum* administrated mice for 8 days.

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro(%)	
<i>Onpoeum</i>	Control	0	10	142 <sup>a</sup>	52 (36.6) <sup>d</sup>
	0.1 mg	10	198 <sup>c</sup>	85 (42.9) <sup>f</sup>	
	1 mg	10	285 <sup>b</sup>	159 (55.8) <sup>e</sup>	
	10 mg	10	202 <sup>c</sup>	110 (54.5) <sup>f</sup>	
	100 mg	10	199 <sup>c</sup>	106 (53.3) <sup>f</sup>	

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

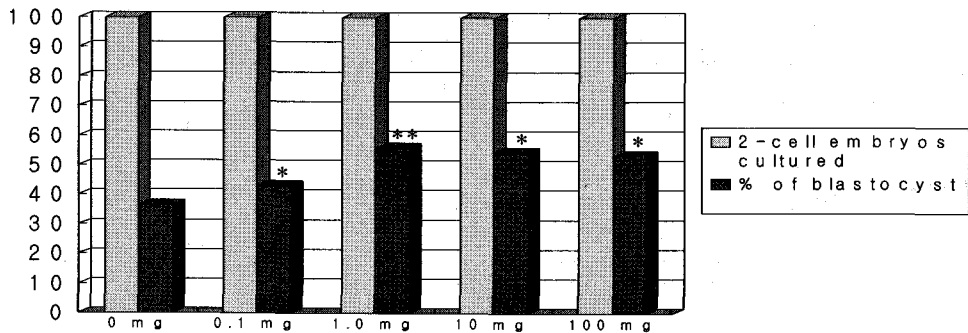


Fig. 5. Comparison of developmental competence on in vitro fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Onpoeum* administered mice for 8 days. (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ )

3) 溫胞飲 검액을 12일간 투여한 후 체외 배발생을 비교  
12일간 투여한 후 2-세포기 배아의 수는 대조군에 비해 모든 농도의 실험군에서 유의성 높은 증가를 보였다

( $p < 0.01$ ). 배반포로의 배발생을 역시 대조군에 비해 모든 농도의 실험군에서 유의성 높은 증가를 보였다 ( $p < 0.01$ )(Table 8, Fig. 6).

Table 8. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Onpoeum* administrated mice for 12 days.

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro(%)	
<i>Onpoeum</i>	Control	0	10	155 <sup>a</sup>	60 (38.7) <sup>c</sup>
	0.1 mg	10	288 <sup>b</sup>	140 (48.6) <sup>d</sup>	
	1 mg	10	340 <sup>b</sup>	170 (50.0) <sup>d</sup>	
	10 mg	10	351 <sup>b</sup>	203 (57.8) <sup>d</sup>	
	100 mg	10	307 <sup>b</sup>	156 (50.8) <sup>d</sup>	

a&b, c&d:  $p < 0.01$  : Statistically significant as compared with control group.

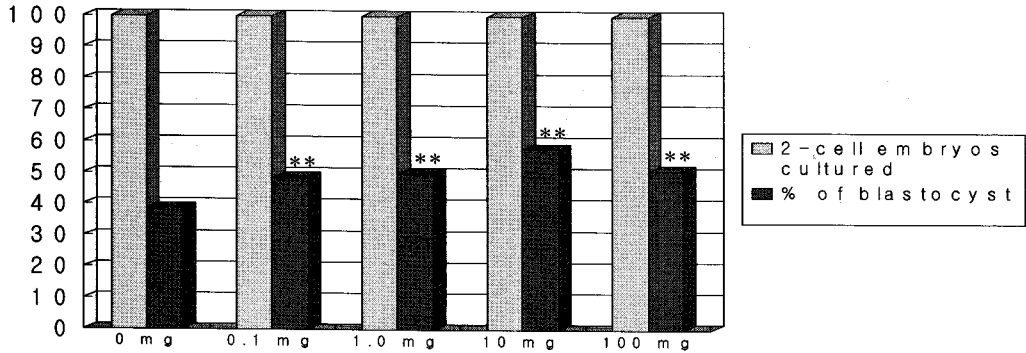


Fig. 6. Comparison of developmental competence on in vitro fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Onpoeum* administered mice for 12 days. (\*\*:  $p < 0.01$ )

### 3. 투여 기간 및 농도에 따른 유전자 발현의 비교분석

1) 溫胞飲 검액을 4일간 투여한 후 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현 비교

溫胞飲 검액을 4일간 투여한 경우 Caspase-3의 발현은 투여 직후 채취된 난소 조직에서는 농도에 의존적으로 증가되는 양상으로 나타났다. 특히 10mg과 100mg 농도에서 유의한 증가를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 한편, 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서 Caspase-3의 발현양상은 대조군 및 실험군 모두에서 차이가 관찰되지 않았다.

MAPK의 발현은 4일간 투여한 경우 투여 직후나 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서 대조군과 실험군 사이의 유의한 차이가 없었다. 다만 투여 직후 채취된 난소 조직에서 투여 농도가 100mg일 때 유의하게 발현이 감소되었다( $p < 0.01$ ).

MPG의 발현은 4일간 투여한 경우 투여 직후 채취된 난소 조직에서 대조군에 비해 실험군에서 농도가 증가됨에 따라 발현이 증가하였으며, 투여 농도 10mg에서 유의성 있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서는 대조군과 실험군 사이의 유의한 차이가 없었다(Fig. 7, Fig. 8).

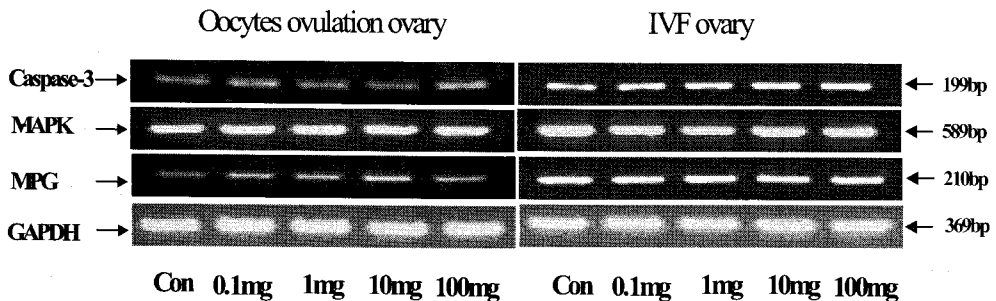


Fig. 7. Expression of Genes from *Onpoeum* oral administrated mice for 4 days.

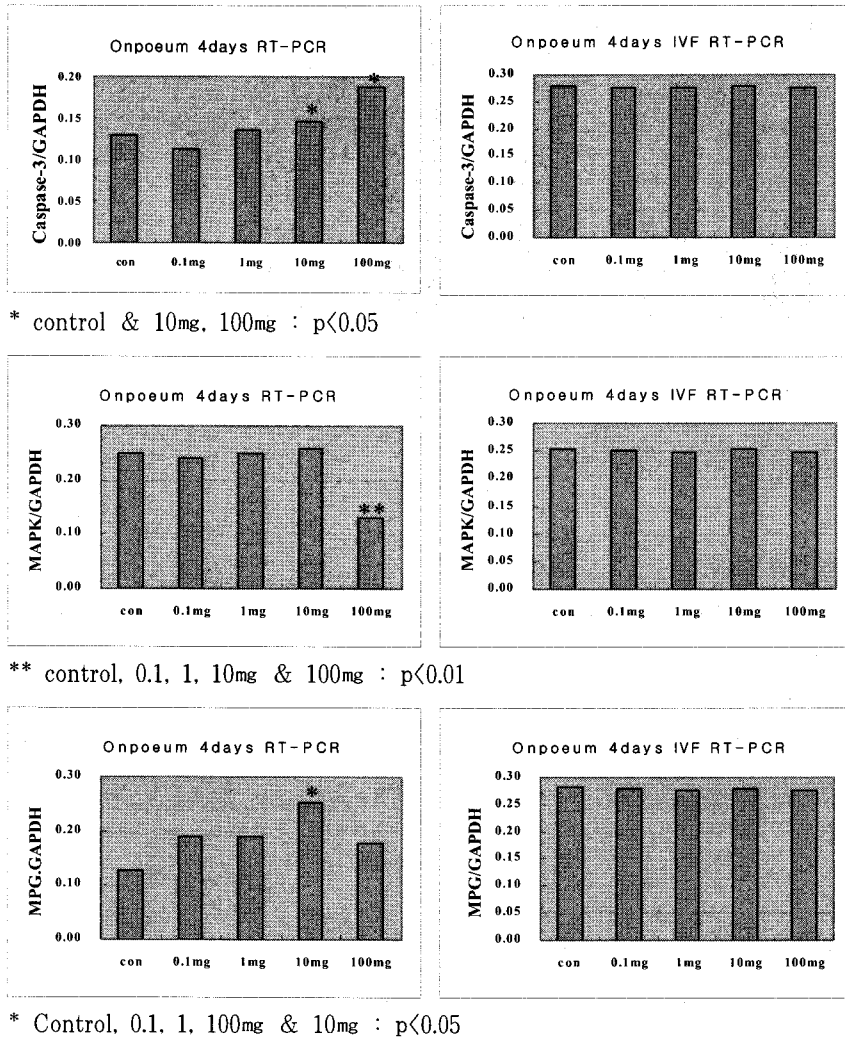


Fig. 8. Comparison of gene expression between different dose of Caspase-3, MAPK and MPG in *Onpoeum* administered mice for 4 days. (\*\*: p<0.01, \*: p<0.05)

2) 溫胞飲 검액을 8일간 투여한 후 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현비교

溫胞飲 검액을 8일간 투여한 경우는 투여 직후 채취한 난소 조직에서 대조군에 비해 실험군에서 Caspase-3의 발현양이 같거나 감소하는 경향을 나타내었는데, 투여 농도에 따른 차이는 유의성이 인정되지 않았다. 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서도 Caspase-3의 발현양

이 같거나 감소하였는데, 투여 농도에 따른 차이는 유의성이 인정되지 않았다.

MAPK의 발현은 8일간 투여한 경우 투여 직후 또는 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서 대조군과 실험군을 비교할 때 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

MPG의 발현은 8일간 투여한 경우 투여 직후 채취한 난소 조직에서 대조군보다 실험군에서 약간 발현의 증가를 보이나, 투여 직후와 다배란 유도 후 채취된 난소조직에

서 대조군과 실험군 사이의 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다(Fig. 9, Fig. 10).

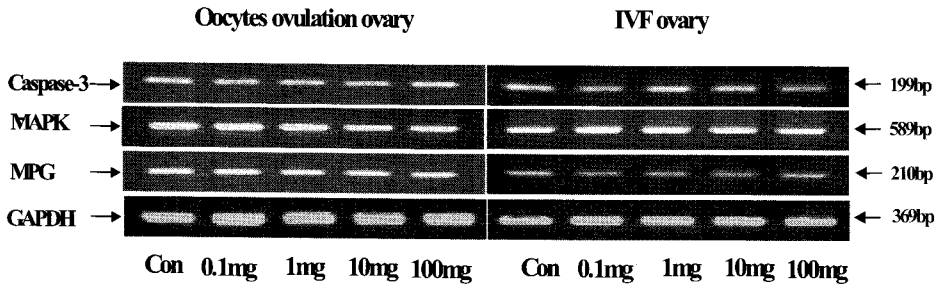


Fig. 9. Expression of Genes from *Onpoeum* oral administrated mice for 8 days.

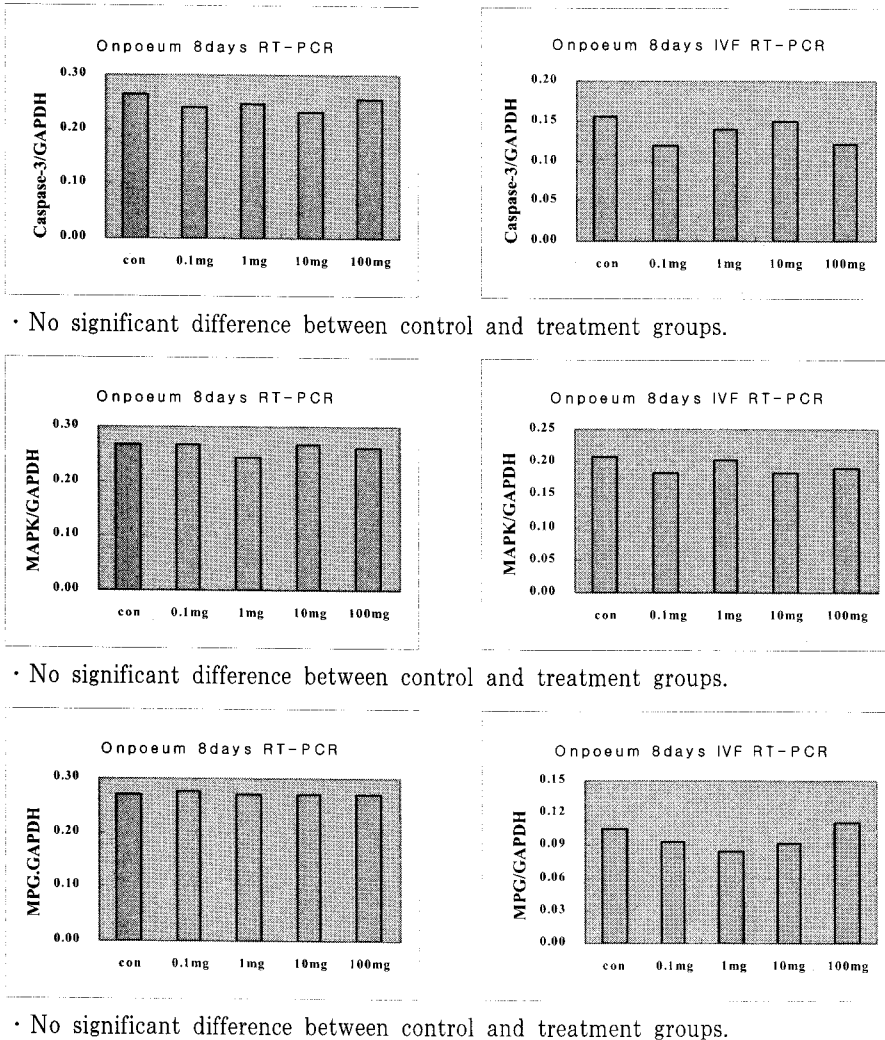


Fig. 10. Comparison of gene expression between different dose of Caspase-3, MAPK and MPG in *Onpoeum* administered mice for 8 days.

3) 溫胞飲 검액을 12일간 투여한 후 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현비교

溫胞飲 검액을 12일간 투여한 경우 Caspase-3의 발현은 투여 직후 채취된 난소 조직에서 대조군에 비해 실험군에서 발현이 같거나 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다. 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서는 투여 농도가 0.1mg일 때 Caspase-3의 발현이 증가되었다가 다시 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다. MAPK의 발현은 12일간 투여한 경우

투여 직후 또는 다배란 유도후 채취된 난소 조직에서 대조군에 비해 실험군에서 발현이 약간 증가되는 경향이 나타났으나 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

MPG의 발현은 12일간 투여한 경우 투여 직후 채취한 난소 조직에서 투여 농도가 0.1mg일 때 대조군과 다른 농도의 실험군에 비해 유의성 있는 증가가 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 다배란 유도 후 채취된 난소조직에서는 전반적으로 실험군에서 발현의 증가를 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 11, Fig. 12).

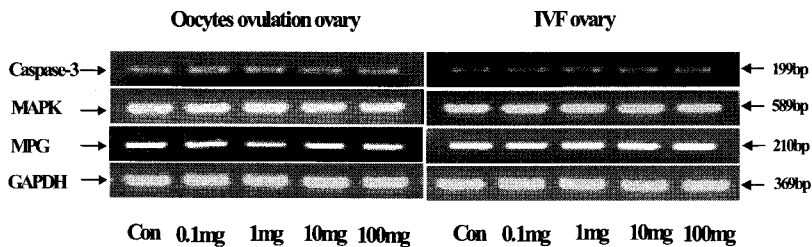
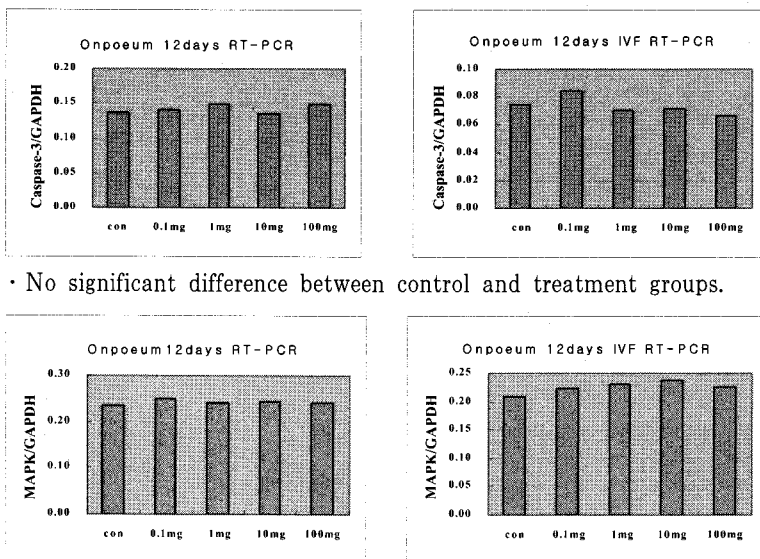
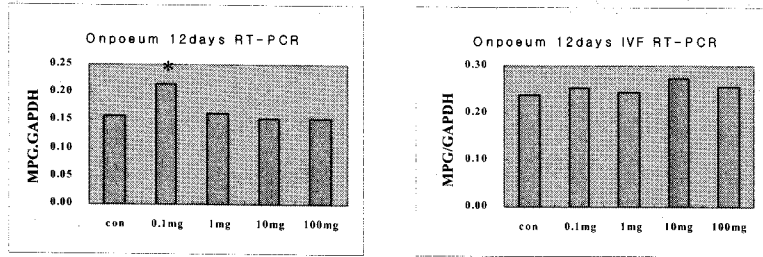


Fig. 11. Expression of Genes from *Onpoeum* oral administrated mice for 12 days.



• No significant difference between control and treatment groups.

• No significant difference between control and treatment groups.



\* control, 1, 10, 100mg & 0.1mg : p<0.05

Fig. 12. Comparison of gene expression between different dose of Caspase-3, MAPK and MPG in *Onpoeum* administered mice for 12 days. (\*: p<0.05)

#### IV. 考 察

불임이란 약 1년간 정상적인 부부생활을 하였음에도 불구하고, 임신이 되지 않는 상태를 말한다. 불임증의 원인은 남성인자, 자궁경부 및 자궁인자, 난관 및 복막인자, 배란인자, 면역학적 인자, 영양 및 대사성 인자 등으로 분류되며, 발생빈도는 가임기 여성의 10~15%로 보고되고 있다<sup>1,3)</sup>.

최근 여성들의 사회활동이 활발해지고 초혼연령이 증가함에 따라 아이를 늦게 출산하는 경향이 있어 35세 이상의 초임부 및 불임 여성의 빈도 증가로 연령과 임신과의 관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>3)</sup>. 연령증가가 불임에 미치는 영향으로는 난자인자로 난소의 노화현상과 자궁인자로 자궁내막의 노화화에 따른 수용성의 감소 두 가지로 생각할 수 있다. 이 중 난소의 노화는 난소의 반응도, 난자의 수 및 질의 저하, 난자핵의 발달 저하와 염색체의 이상을 일으켜 수정율의 감소와 자연 유산율의 증가를 가져오는 주된 이유가 된다<sup>24-27)</sup>.

불임의 치료방법으로는 호르몬 요법, 과배란 유도, 자궁내 인공수정, 체외수정시술, 생식세포 난관내 이식 등의 보조

생식술이 시행되는데 가장 흔히 사용되는 것은 체외수정시술이다<sup>2)</sup>. 체외수정시술의 주요 적응증은 양쪽 난관이 모두 없거나 복원이 불가능하다고 판단한 경우, 남편이 회소정자증이 있는 환자로 운동성이 있는 정자가 어느 정도 있는 경우, 자궁내관의 점액상태가 불량한 경우, 불임의 원인이 밝혀지지 않는 경우, 자궁내막증 치료 후에도 불임의 상태가 계속 되는 경우 등이다<sup>3)</sup>. 이러한 체외수정시술에 있어서 임신을 성공시키는데 중요한 인자는 첫째 난자수 및 이식 배아수, 둘째 이식된 배아의 질, 셋째는 자궁내막상태이다<sup>28)</sup>. 그러나 자궁환경에 대한 인공 수정된 배아의 적응력 실패로 인해 실제 성공률은 5~25% 정도에 그치고 있으며 착상 후 30%에 이르는 유산과 5%의 자궁외임신이 보고되는 바 체외수정의 성공률을 높이기 위한 노력이 다각도로 진행되고 있다<sup>3)</sup>.

한의학에서 여성불임은 주로 求嗣, 種子, 嗣育, 求子門에서 나타나며<sup>29-31)</sup> 《素問·上古天真論》<sup>32)</sup>에서 “女子 七歲 腎氣盛 齒更髮長, 二七 天癸至 任脈通 太衝脈盛 月事以時下 故有子…七七 任脈虛 太衝脈衰小 天癸竭 地道不通 故形壞以無子也”라 하여 여성의 월경과 임신에 있

어 腎氣와 衝任脈의 중요성을 인식하고 있다.

불임의 원인은 腎虛를 근본으로 하여 氣血虛<sup>33)</sup>, 子宮虛寒<sup>34)</sup>, 瘀血<sup>35)</sup>, 痰濕<sup>35)</sup>, 肝鬱<sup>35)</sup> 등의 원인으로 유발되며, 역대 한의학 문헌을 고찰한 최근의 연구<sup>36,37)</sup>에서 子宮虛寒이 여성불임의 가장 많은 원인으로 제시되고 있다. 이는 자궁의 상태가 불임에 직접적인 관계가 있음을 보여주는 것이므로 子宮虛寒으로 인한 불임 치료에 대한 연구의 필요성이 더욱 강조된다 하겠다.

본 연구에 사용된 溫胞飲은 원래 《傳青主男女科》<sup>12)</sup>에서 ‘種子門 下部冰冷不受孕’에 나오는 溫胞散으로 “이 방의 妙는 補心하면 곧 補腎이 되고 補腎하면 곧 溫心해지므로 心腎의 氣가 왕성해지면 心腎의 火가 스스로 생하게 된다. 心腎의 火가 생하면 胞胎의 寒이 저절로 흩어지고 胞胎가 寒한 원인으로 잠시 융합되나 곧 吐하게 되는 것을 지금 胞胎를 熱하게 하면 어찌 不受孕하는 자가 있겠는가? 만약 탕을 환으로 해서 朝夕으로 吞服하면 더욱 攝精할 수 있다. 無兒해서 한탄함에 이르지 않을 것이다.”라 하였다<sup>38)</sup>. 溫胞飲은 역대로 溫胞散<sup>12,13)</sup>, 溫胞飲<sup>14-19)</sup>, 溫胞湯<sup>20,21)</sup> 등의 여러 방명으로 기재되어 활용되고 있는데 子宮虛冷으로 인한 不孕에 다용되는 처방이다.

溫胞飲의 구성을 살펴보면, 원방은 散劑의 용량으로 白朮土炒 一兩, 巴戟鹽水炒 一兩, 人蔘 一兩, 杜冲炒黑 三錢, 菟絲子酒浸炒 三錢, 山藥炒 三錢, 芡實炒 三錢, 肉桂 二錢, 補骨脂鹽水炒 二錢, 附子製 三分으로 구성되어 있는데<sup>12)</sup>, 본 실험연구에서는 송<sup>15)</sup>의 처방내용을 기준

으로 용량을 조절하여 검액을 조제하였다.

溫胞飲의 약물은 補氣健脾하는 白朮, 人蔘, 山藥과 回陽散寒하는 肉桂, 附子와 補肝腎 助陽益精하는 巴戟, 杜冲, 補骨脂, 菟絲子, 芡仁으로 구성되어 있다<sup>22,23,39)</sup>. 이 중 白朮, 人蔘은 補益元氣 健脾하여 일체의 陽氣虛弱을 다스리고, 巴戟은 補腎陽하여 肝腎陽虛를 다스리며, 補骨脂, 杜冲은 補益腎陽하여 下元虛寒으로 인한 精不固를 다스리며, 肉桂, 附子は 回陽散寒하여 命門相火를 補하며, 菟絲子, 山藥, 芡仁은 모두 補血養陰하여 滋陰強壯 하는 효능으로 下元虛冷으로 인한 여자의 月經不調와 子宮冷感을 치료한다<sup>19,22,23,39)</sup>.

최근의 실험 연구에서 巴戟에 대해 윤 등<sup>40)</sup>은 체외수정 및 생식호르몬에 영향을 주며, 菟絲子에 대해서는 조<sup>41)</sup>는 배란과 배발생에 영향을 준다는 보고가 있었다. 또한 溫胞散이 난소 기능에 미치는 영향<sup>22)</sup>과 수정란 생산을 및 배발생에 미치는 영향<sup>23)</sup>을 연구하여 溫胞散이 난자의 배란 증가와 Progesterone, LH의 증가를 확인한 보고가 있었다.

이에 저자는 溫胞飲이 난소의 기능과 배발생에 미치는 영향 뿐 만 아니라 생식조직 내에서의 유전자 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 溫胞飲 투여 후 배란난자와 배발생율의 변화, Caspase-3, MAPK, MPG의 유전자 발현 정도를 실험하여 관찰하였다.

본 실험연구에서는 가임능력이 있는 6주령 자성생쥐를 사용하였으며, 溫胞飲 검액의 투여 기간은 마우스의 생리기간을 기준으로 4일, 8일, 12일로 하였고, 투여 농도는 각각 0, 0.1mg, 1mg, 10mg, 100



mg으로 하여 상이한 투여 기간과 투여 농도에 따른 변화를 관찰하였다.

먼저, 溫胞飲 검액을 투여하여 기간과 농도에 따른 자성생쥐의 배란 난자수의 변화를 살펴보았다.

4일간 투여했을 때 대조군에 비해 실험군이 유의적으로 높은 배란 난자수를 나타내었으며, 투여 농도별로 비교할 때에는 10mg 농도의 실험군이 가장 양호한 결과를 나타내었다. 8일간 투여했을 때에도 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 배란 난자수의 증가를 보였으며, 투여 농도별로 비교한 결과에서는 1mg 농도의 실험군이 가장 우수한 효능이 있는 것으로 나타났다. 12일간 투여했을 때에도 역시 대조군에 비해 실험군에서 유의적으로 높은 배란 난자수의 증가를 보여주었다. 투여 농도별로 비교하였을 때는 1mg 농도의 실험군에서 가장 양호한 결과를 나타내었으나 0.1~100mg 각각의 농도에 따른 차이는 유의성이 없었다. 전체적으로 볼 때 투여 기간을 12일간 한 경우가 4일 또는 8일간 투여한 경우보다 우수한 것으로 판단되었다.

다음으로 溫胞飲 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 배반포로의 발생율은 투여 농도가 10mg이었을 때 가장 우수한 결과가 관찰되었으나 대조군에 비하여 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. 8일간 투여한 경우 배반포로의 발생율은 대조군에 비해 실험군에서 배발생율이 유의성 있게 증가되는 양호한 결과

가 관찰되었으며 1mg 농도에서 가장 우수한 결과가 관찰되었다. 다만 0.1~100mg 각각의 농도별 배반포로의 발생율 차이는 유의성이 인정되지 않았다. 12일간 투여한 경우에서도 역시 실험군이 대조군에 비해 배발생율의 유의성 있는 증가가 관찰되었으며 10mg 농도에서 가장 우수한 결과가 관찰되었다. 역시 0.1~100mg 각각의 농도별 배반포로의 발생율 차이는 유의성이 인정되지 않았다. 전체적으로 대조군에 비해 실험군에서 발생율의 증가가 관찰되었으며 이로 보아 溫胞飲의 투여가 배발생율의 증가에 보다 효과적으로 기여할 수 있으리라 판단되었다.

이상에서 溫胞飲 검액의 투여가 자성생쥐의 배란과 배발생율에 효과적임을 확인하였으므로 溫胞飲 검액을 투여한 자성생쥐의 난소 조직을 RT-PCR 방법을 이용하여 유전자 발현 정도를 분석하였다. 본 연구에서는 세포사멸과 관련된 유전자로는 Caspase-3, 세포 활성화와 관련된 유전자로는 MAPK, 그리고 DNA repair와 관련된 유전자로는 MPG 유전자를 선택하여 분석하였다.

Apoptosis란 세포의 분해를 위해 세포 내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음기작으로 단백질 분해효소인 Caspase가 활성화되어 세포사멸을 수행하며, bcl-2에 의하여 억제되고 Apaf-1 유전자가 조정자 역할을 한다고 보고되었다<sup>42,43</sup>). Apoptosis는 세포 사멸을 유도함으로써 성숙한 조직의 유지와 배아 발생 모두에게 중요한 역할을 하는 과정이다<sup>44</sup>).

세포사멸의 신호전달과정을 통한 Caspase의 활성화는 Caspase의 N-말단에 존재

하는 단백질-단백질 결합을 통하여 세포 사멸신호를 전달하여 활성화되며, 활성화된 Caspase는 특정 기질단백질의 분해를 통하여 세포사멸을 일으킨다<sup>42)</sup>. 시스템인계의 단백질분해 효소인 Caspase는 apoptosis 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다<sup>45)</sup>. Caspase들은 고등동물에서 apoptosis를 유도하는 중요한 생리학적 매개체로서, 평상시 apoptosis를 억제하고 있던 단백질들을 분해하여 apoptosis를 진행시키는 역할을 한다<sup>46)</sup>. 현재까지 14종류의 Caspase isoform들이 보고되었는데, 이들 중 Caspase-3가 세포사멸 분야에서 가장 보편적인 관심을 받아왔다. Caspase-3는 다양한 apoptosis 자극에 의해서 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 Caspase-3는 여러 종류의 세포내 단백질들을 절단할 수 있다<sup>47)</sup>. 체외수정과 관련하여 apoptosis가 덜 일어난 난포로부터 얻은 난자를 체외수정 시술에 이용하는 것이 임신에 유리함을 뒷받침하는 실험결과가 보고된 바 있다<sup>48)</sup>.

MAPK는 mitogen activated protein kinase의 약자로 extracellular signal regulating kinase라고 일컬어지며 말 그대로 세포의 성장, 증식, 분화 및 세포자연사 등을 조절하는 기능을 수행한다<sup>49)</sup>. MAPK pathway는 세포 외부로부터의 신호들을 세포핵으로 전달하여 gene expression을 조절하게 된다<sup>50)</sup>. 세포내에서의 유전자 발현의 조절기전 과정에서는 여러 전사인자들이 필수적 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 전사인자의 활성도는 단백질 인산화 과정을 통하여 조절되게 된다<sup>51,52)</sup>. MAPK는 배란전 난포에서 LH의 작용에 필요하

고, 난소내의 난포형성과정에서 마지막 단계인 성숙과정 즉, meiotic maturation에 MAPK가 관여한다는 보고가 있다<sup>53,54)</sup>. 따라서 MAPK는 감수분열 과정과 난소 및 자궁조직의 활성화에 영향을 끼치는 것을 알 수 있다.

MPG는 DNA에서 N-methylpurine과 다른 손상된 purine기를 제거하는 DNA 회복효소로서, 세포내에서 DNA가 복제될 때 손상이 있는 DNA의 사슬을 복구하는 데 관여하는 효소이다<sup>55)</sup>. 손상 후 일련의 DNA 회복 시스템이 제대로 작동하지 않는다면 DNA는 돌연변이, 염색체 이상 등의 유전적인 질병을 초래하게 되며, 기존 연구 결과들은 MPG 유전자의 발현이 노화의 표식 유전자로서 가능성이 있음을 나타내고 있다<sup>55,56)</sup>.

죽음의 원인이 되고, 돌연변이를 일으키는 DNA의 손상은 외부의 물리, 화학 자극뿐만 아니라 자연히 일어나는 화학 반응, 특히 cytokine의 uracil로의 아미노기 이탈과 purine의 자연 발생적인 손실에 의해서도 일어난다<sup>57)</sup>. 이러한 DNA 손상들은 세포와 조직의 기능장애를 일으킬 수 있고, 노화와 관련된 항상성 유지 능력의 축소와 노령에서 암과 다른 질환의 발생력을 높일 수 있다<sup>58)</sup>. 이런 과정은 노화와 관련하여 분자 방어 시스템의 능력이 쇠약해질 때 가속화 되어진다<sup>59)</sup>.

난포내 저산소증으로 인한 DNA와 chromosome의 손상은 초기배발생 혹은 태아발생 단계에서 더욱 심각한 문제를 야기하며<sup>60)</sup>, 손<sup>55)</sup>은 생쥐의 임신 8일 후 태아조직부터 생후 400일까지의 조직들로부터 MPG mRNA 발현을 조사하여 태아형성기동안 많은 양이 발현되었으

며, 증대되는 세포분열과 MPG 유전자 발현은 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. Washington 등<sup>61)</sup>은 마우스의 MPG 활성화는 기관 특이성이 있고, 노화 의존성 경향이 있다고 규정하며, MPG 활성이 자성 생쥐의 간, 폐, 뇌, 난소에서 출생시부터 연령이 증가함에 따라 증가하다가 young adults(7-or 8-week-old) 시기에 최고조에 도달함을 보고하였다. 난소와 정소조직에서 MPG mRNA는 매우 높은 발현을 나타내는데, 이는 생식기관에서의 세포분열 및 증식이 다른 조직들보다 더 활발하게 일어나기 때문으로 이런 이유로 생식기관에서의 MPG 유전자의 역할은 상당히 중요하게 인식된다<sup>62,63)</sup>.

본 연구에서는 세포사멸 관련 유전자인 Caspase-3 유전자 발현을 살펴보기 위하여 溫胞飲 검액 투여 직후 도살한 난소 조직과 다배란 유도 후 채취한 난소 조직으로 구분하여 분석하였다.

그 결과 4일간 투여한 경우 Caspase-3의 발현은 투여 종료 후 채취한 난소 조직의 경우 농도에 의존적으로 증가되는 양상을 나타내었는데, 특히 10mg, 100mg 농도에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 다배란 유도 후 채취된 난소 조직에서는 Caspase-3의 발현양상은 대조군 및 실험군 모두에서 차이가 관찰되지 않았다. 한편 8일간 투여한 경우는 대조군에 비해 실험군에서 Caspase-3의 발현양이 같거나 감소하는 경향을 나타내어 4일간 투여시 증가되는 Caspase-3의 발현이 8일로 투여 기간이 연장될 경우 정상화되는 것이 관찰되었으며, 다배란 유도 후 채취된 난소 조직의 경우에서도 투여 농도에 따른 차이는 유의성이 인정되지

않았다. 12일 투여한 경우 역시 8일간 실험군과 거의 동일한 경향이 관찰되었고 다배란 유도 후 채취된 난소 조직의 경우에서도 투여 농도에 따른 차이는 유의성이 인정되지 않았다.

溫胞飲 검액의 단기적 투여로 난소 조직내의 세포사멸이 일시적으로 증가될 수는 있으나 이는 배란유도 또는 溫胞飲의 투여 기간이 증가할 경우 정상화 되는 양상을 확인할 수 있었다.

MAPK는 대표적인 세포활성을 나타내는 유전자로서 본 실험연구에서 4일간 투여한 후 MAPK의 발현은 투여 직후 또는 다배란 유도 후에 채취한 난소 조직에서 거의 변화가 없었다. 다만 100mg 농도에서 투여 직후 채취된 난소 조직에서의 MAPK의 발현이 유의하게 감소되었는데 이에 대해서는 추후 정밀한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 8일간 투여한 경우에서도 투여 직후 또는 다배란 유도 후 MAPK의 활성화는 대조군에 비해 전체 실험군에서 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 12일간 투여한 경우에서도 역시 투여 직후 또는 다배란 유도 후의 대조군 및 전체 실험군에서 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

결과적으로 溫胞飲 검액을 투여하여 기간과 농도에 따라 투여 직후의 난소 조직과 다배란 유도 후 난소 조직을 비교한 결과, 난소 조직내에서 세포활성에 관여하는 MAPK에 미치는 유의한 영향은 확인할 수 없었다.

DNA 복구유전자인 MPG 유전자의 발현을 살펴보면, 4일간 투여한 경우 MPG의 발현은 농도가 증가됨에 따라 증가하였는데 10mg 농도에서 가장 유의하게 증가하였다. 이는 Caspase-3의 증

가에 따라 세포사멸의 억제하기 위해 MPG의 증가가 이루어진 것으로 판단된다. 투여 농도가 100mg인 경우에는 오히려 MPG의 발현은 감소되지만 대조군에 비해서는 높게 유지되는 것으로 관찰되어 溫胞飲 투여가 난소 조직내의 세포사멸을 억제시킬 수 있는 것으로 생각된다. 8일간 투여한 경우 MPG의 발현은 대조군과 실험군에서 유의한 차이가 인정되지 않았다. 12일간 투여한 경우 MPG의 발현은 0.1mg 농도에서 대조군과 다른 실험군에 비해 유의성 있는 발현 증가가 관찰되었다. 이러한 MPG의 투여 농도에 따른 차이가 어떤 이유인가에 대해서는 추후에 정밀한 검토가 더 필요하리라 생각된다.

## V. 結 論

溫胞飲이 자성생쥐의 생식 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 溫胞飲 검액을 4, 8, 12일간 0, 0.1mg, 1mg, 10mg, 100mg의 농도로 경구 투여하여 배란난자의 변화, 체내수정 후 배발생율, Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자의 발현 정도를 살펴본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 溫胞飲 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 자성생쥐의 평균 총 배란 난자수와 정상 형태의 난자수는 모든 농도의 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
2. 溫胞飲 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 자성생쥐의 체내수정 후 2세포기 배아에서 배반포로의 배발생율은 모든 농도의 실험군에서 대조군에

비하여 유의한 증가를 나타내었다.

3. 溫胞飲 검액을 4, 8, 12일간 투여한 후 자성생쥐의 난소 조직에서 유전자 발현을 분석한 결과, Caspase-3는 대조군에 비해 4일간의 실험군에서는 발현의 증가가 나타났으나 8, 12일간의 실험군에서는 발현이 같거나 감소하였다. MAPK는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며, MPG는 4일간 10mg 농도와 12일간 0.1mg 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 발현의 증가가 관찰되었다.

이상의 실험 결과로 보아 溫胞飲은 자성 생쥐의 생식능력을 향상시킬 뿐만 아니라 세포사멸을 억제하고 세포활성과 DNA 재생을 증가시키는 근거를 가지므로 체외수정 시술시 병용하여 임신 성공률을 높일 가능성이 있다고 생각된다.

- 투 고 일 : 2007년 10월 25일
- 심 사 일 : 2007년 11월 02일
- 심사완료일 : 2007년 11월 06일

## 參 考 文 獻

1. 한의부인과학 편찬회. 韓醫婦人科學(上). 서울: 정담. 2001:245-251.
2. 구병삼. 부인과 내분비학. 서울: 고려의학. 2001:303-428.
3. 대한 산부인과학회 교과서 편찬 위원회. 부인과학. 서울: 칼빈서적. 1997: 598-647.
4. 서용주 등. 調經種玉湯이 백서의 배란에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(2):101-116.
5. 최상순 등. 毓麟珠가 백서의 배란과 난

- 소에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 1999;12(2):117-133.
6. 유심근, 고정민. 調經散이 백서의 배란에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(1):331-342.
  7. 남석원 등. 附益地黃丸이 백서의 배란에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2001;3:490-496.
  8. 강구형, 백승희. 紫河車가雌性 생쥐의 生殖能力과 Caspase-3, MAP kinase 및 MPG 遺傳子 發顯에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2003;16(4):29-49.
  9. 송호림, 백승희. 六味地黃湯이雌性 생쥐의 生殖能力과 Caspase-3, MAP kinase 및 MPG 유전자발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):15-28.
  10. 김규섭, 백승희. 毓麟珠가雌性 생쥐의 生殖能力과 Caspase-3, MAP kinase 및 MPG 遺傳子 發顯에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):43-46.
  11. 박소윌, 백승희. 鹿茸이雌性 생쥐의 生殖能力과 Caspase-3, MAP kinase 및 MPG 遺傳子 發顯에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):1-14.
  12. 傅靑主. 新編 傅靑主男女科 葉天士女科. 서울: 대성문화사. 1984:103-104.
  13. 甘地出版社編輯部. 清宮秘方 辨證奇聞全書. 臺北: 甘地出版社. 1980:427.
  14. 楊家駱. 增補珍本醫書集成. 臺北: 世界書局. 1971:29-30.
  15. 송병기. 韓方婦人科學. 서울: 행림출판. 1978:284-286.
  16. 이동화, 박병렬. 표준 한방부인과. 서울: 의약사. 1979:183.
  17. 傅山, 劉國正. 女科仙方. 서울: 의성당. 1994:38-39.
  18. 오수석. 《傅靑主女科》에 관한 연구-收載된 治方과 이의 臨床運用을 중심으로. 동국대학교 대학원. 1998.
  19. 강명자. 臨床婦產科學. 서울: 성보사. 1989:320.
  20. 황도연. 方藥合編. 서울: 남산당. 1996:335.
  21. 박병근. 增補 韓方臨床四十年. 서울: 대광문화사. 1987:527.
  22. 이명진, 이경섭, 송병기. 溫胞散이 난소기능에 미치는 영향. 경희대학교 논문집. 1995;2: 13-23.
  23. 이진무, 이경섭, 송병기. 溫胞散이 생쥐의 배란과 수정란 생산을 및 발생에 미치는 영향. 경희대학교 논문집. 1999;1:237-249.
  24. David R. Meldrum, M.D. Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertility and Sterility*. 1993;59(1):1-5.
  25. Daniel Navot et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*. 1991;337(8):1375-1377.
  26. 김석현. 난자 세포질내 정자주입술을 이용한 체외수정시술시 연령이 임신율에 미치는 영향에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1998;41(7):1811-1819.
  27. 이명섭. 시험관 아기 시술에서 여성의 연령이 수정란의 결과 다태임신 발생에 미치는 영향. 대한불임학회지. 2000;27(3):261-265.
  28. 성연수 등. 체외수정과 관련된 毓麟珠의 효능에 관한 연구. 대한한방부

- 인과학회지. 1999;12(1):161-183.
29. 吳謙. 醫宗金鑑. 北京: 人民衛生出版社. 1993:45-51.
  30. 孫思邈. 備急千金要方. 서울: 대성문화사. 1984:16.
  31. 李梴. 醫學入門. 서울: 남산당. 1974:548.
  32. 楊維傑. 黃帝內經素問譯解. 臺北: 臺聯國風出版社. 1971:4-6.
  33. 張介賓. 景岳全書. 北京: 人民衛生出版社. 1997:882-883.
  34. 簫瑱. 女科經綸. 江蘇: 江蘇科學技術出版社. 1986:58-62.
  35. 羅元愷. 中醫婦科學. 北京: 人民衛生出版社. 1988:17-19, 391-397.
  36. 김철원, 류심근, 박병렬. 여성불임의 원인분류에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1991;4(1):43-56.
  37. 김은섭, 유동렬. 여성불임의 원인에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2000;9(1):267-285.
  38. 상지대학교 한의과대학 제2기 졸업준비위원회. 國譯 傳靑主男女科 葉天士女科. 서울: 대성문화사. 1995:214-215.
  39. 전국한의과대학 본초학교수 공저. 본초학. 서울: 영림사. 1991:331, 336, 531, 536, 549, 556, 559, 568.
  40. 윤조정 등. 巴戟이 생쥐의 체외수정 및 생식 호르몬에 미치는 영향. 경희대학교 논문집. 1998;21(1):433-445.
  41. 조석기. 菟絲子가 생쥐의 배란과 배발생에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2002.
  42. 한국유전자학회. 유전 제2권. 서울: 도서출판 월드사이언스. 1998:77-128.
  43. Zou H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90(3):405-413.
  44. 서창석, 문신용. 인간 자궁내막에서 apoptosis와 bcl-2 및 bax 유전자 발현에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1999;42(11):2446-2450.
  45. Kamesaki H. Mechanism involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol*. 1998;68(1):29-43.
  46. 정용근. 아포토시스의 실행자: Caspase를 통하여. 유전 1998;2:106-128.
  47. 엄홍덕. 산화성 스트레스에 의한 세포사멸의 조절. *Biochemistry News*. 1999;19(4):253-259.
  48. 지병철 등. 체외수정시술시 유세포분석을 이용한 과립막세포내 아포프토시스의 정량적 측정. 대한산부회지. 2000;43(1):58-64.
  49. 정병갑. 분자세포생물학. 서울: 도서출판 한우리. 2002:49.
  50. 최의주. Regulation of the stress Activated MAP kinase. 제3회 한국응용약물학회 추계심포지움. 1995;1:23-27.
  51. Haccard O et al. In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. *Eur J Biochem*. 1990;192(3):633-642.
  52. Choi T et al. The Mos/mitogen-activated protein kinase pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Nat. Acad Sci*

- USA. 1996;93(14):7032-7035.
53. 김선행. 체외수정시술 주기에서 자궁 내막발달과 착상에 관한 연구. 대한 불임학회잡지. 1993;20(2):117-123.
54. Posada J, Cooper JA. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocyte. *Science*. 1992;255(5041):212-215.
55. 손태중 등. 생쥐 태아 및 성체조직에서의 N-methylpurine-DNA glycosylase 유전자의 발현. 발생과 생식. 1999; 3(1):101-105.
56. 김남근 등. Differential Expression of DNA Repair Gene, N-Methylpurine-DNA Glycosylase during the Development of Balb/c Mice. 발생과 생식. 1997;1(1):37-43.
57. Mitra S, Kaina B. Regulation of repair of alkylaton damage in mammalian genomes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1993;44:109-142.
58. Lindahl T et al. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:133-157.
59. Mullaart E et al. DNA damage metabolism and aging. *Mutat Res*. 1990;237:189-210.
60. M.J. Ashwood-Smith, R.G. Edwards. DNA repair by oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 1996;2(1):46-51.
61. Washington WJ et al. Age-dependent modulation of tissue-specific repair activity for 3-methyladenine and O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA in inbred mice. *Mech Aging Dev*. 1989;48:43-52.
62. Kim NK et al. Spatial expression of a DNA repair gene, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) during development in mice. *Anticancer Res*. 2000;20(5A):3037-3043.
63. Kim NK et al. Altered expression of the DNA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in human gonads. *Anticancer Res*. 2002;22(2A):793-798.