대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.20. No.1 : 061-083 (2007)

膈下逐瘀湯이 실험적으로 유발된 흰쥐의 자궁내막증에 미치는 영향

세명대학교 한의과대학 부인과학교실
김철수, 이동녕, 서일복, 김형준

ABSTRACT

Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Development of Experimentally-induced Endometriosis in Rats

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

Purpose: This study was performed to investigate the effects of *Keukhachukeo-Tang* (KCT) on the development of experimentally-induced endometriosis in rats.

Methods: Endometriosis was induced in rats by autotransplanting uterine tissue to the peritoneum and devided them into three groups: (1) sham-operated group (n=8), (2) surgically induced endometriosis and untreated control group (n=8), (3) surgically induced endometriosis and KCT treated group. KCT (1.200 ㎎/head) was orally administrated for 15 days after operation. Then we measured the body weight, the volumes of endometriotic implants. The weight (body, left uterus and ovaries) and concentrations of cytokines (MCP-1, TNF-α, IL-1β) in serum and peritoneal fluid were also measured. Histopathology, immunohistochemistry for COX-2, and histochemistry for mast cells in transplanted uterine tissue were performed.

Results:
- The volumes(㎣) of endometriotic implants in KCT-treated group (107±66) were significantly decreased ($p<0.05$) compared with control group (405±318).
- The contents(pg/㎖) of MCP-1 in peritoneal fluid in KCT-treated group (6,940±893) were significantly decreased ($p<0.01$) compared with control group (8,632±1,245).
- The contents(pg/㎖) of TNF-α in peritoneal fluid in KCT-treated group (847±330) were significantly decreased ($p<0.05$) compared with control group (1,245±362).
- The percentages(%) of positive epithelial layers for COX-2 in KCT-treated group (31±10) were significantly decreased ($p<0.01$) compared with control group (50±8).
- The numbers of mast cells in adjacent tissue of transplanted uterine tissue in KCT-treated group (69±18) were significantly decreased ($p<0.01$) compared with control group (109±30).
- The numbers of mast cells in stroma of transplanted uterine tissue in KCT-treated group (16±5) were significantly decreased ($p<0.01$) compared with control group (26±8).
- Histopathologically, proliferation of endometriotic epithelia and stroma, and infiltration of inflammatory cells in transplanted uterine tissue of KCT-treated group were weakly observed than those of control group.

Conclusion: From the above results, *Keukhachukeo-Tang* (KCT) have inhibiting effects on the development of transplanted uterine tissue. And these effects are related to the decreased concentration of MCP-1 and TNF-α, decreased expression of COX-2, and decreased infiltration of mast cells by administration of *Keukhachukeo-Tang*.

Key Words: Endometriosis, *Keukhachukeo-Tang*, MCP-1, TNF-α, COX-2, Mast cell.

교신저자(김형준) : 충북 제천시 신월동 세명대학교 부속 한방병원 부인과
전화 : 043-649-1906 이메일 : khjoongy@hanmail.net

Ⅰ. 서 론

자궁내막증은 자궁이외의 다른 복강조직에 자궁내막조직이 존재하는 질환으로 골반통, 생리불순, 생리통 및 불임 등의 다양한 증상을 나타내는 부인과 질환이다[1].

자궁내막증은 가임기 여성에서만 발생하는 것이 아니라 거의 모든 연령, 인종, 그리고 사회 경제적 계층에서 발생할 수 있으며 점점 증가되는 추세로 알려져 있다[2,3].

자궁내막증의 병인론 및 병태 생리에 대해서는 명확히 밝혀지지는 않았지만 가장 널리 받아들어지는 가설로는 생리시 자궁내막조직이 역류한 후 복강 내에 착상, 성장한다는 것이다[4]. 그 이유에 대해서는 환자의 유전적인 요인이나, 호르몬에 의한 자궁내막 세포의 착상, 증식이 관련된 것이라고 하였다[5]. 최근에는 이와 더불어 면역학적 요인이 자궁내막증의 주요 원인 인자로 대두되어 몇몇 연구는 IL-1등과 같은 염증 cytokine이 자궁내막증 환자의 복수에서 증가되어 있다고 보고하였으며[6,7], 정상적으로 제거되어야할 역류된 자궁내막조직이 제거되지 않고 복강 내에 착상하는 과정에 염증인자가 연관되어있을 것으로 추정하고 있다[4].

韓醫學 文獻에서는 자궁내막증에 일치되는 병명을 찾을 수는 없으나 이 질환에서 나타나는 특징적인 증상들로 미루어 보아 痛經, 少腹痛, 崩漏, 不孕, 經行吐衄, 經行血咳 등의 범주에 속하는 것으로 인식할 수 있다[1,8]. 특히 자궁내막증에 의한 골반통은 寒凝血瘀, 氣滯血瘀, 氣虛血瘀, 熱鬱血瘀 등 주로 瘀血로 辨證하여 치료하였다[1]. 그러므로 이전의 자궁내막증과 관련된 실험연구들도 김 등[9]의 자궁내막증에 대한 치험 보고, 오 등[10]의 血府逐瘀湯이 자궁내막증 白鼠에 미치는 영향 등 活血化瘀하는 처방을 이용한 연구가 많다.

膈下逐瘀湯은 活血化瘀의 대표적인 方劑[11,12]로 王淸任의 ≪醫林改錯≫[13]에 최초로 수록되어 있으며 "治瘀在膈下 形成積塊 或是小兒積塊 痛不移處 臥則陰墮"라 하여 下焦氣滯瘀血로 인한 질환과 瘀血內結로 인한 積聚 등의 병증을 치료한다 하였다.

膈下逐瘀湯을 이용한 연구로는 김[14]의 자궁근종세포의 증식에 대한 연구, 최[15]의 진통, 소염 및 췌장에 대한 연구, 권 등[16]의 암세포의 증식에 대한 연구 등이 있으나 자궁내막증과 관련한 연구는 찾아볼 수 없었다.

이에 본 연구에서는 膈下逐瘀湯의 자궁내막증에 대한 치료효과를 확인해 보고자, 자궁 자가이식법으로 유발된 자궁내막증 흰쥐를 대조군과 본 처방을 투여한 처치군으로 분류하여, 각 군의 체중 및 이식 자궁조직의 체적 측정과 병리조직학적 검사를 실시하였다. 그리고 혈청과 복수의 MCP-1, TNF-α, IL-1β 함량을 측정하고 이식 자궁조직에 대한 COX-2 면역조직화학 및 비만세포 조직화학을 실시하여 膈下逐瘀湯이 자궁내막증 발생억제에 미치는 기전을 확인하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물

체중 200 g 내외의 암컷 Sparque-Dawley Rat(샘타코, 한국)를 구입하여 세명대학교 청정동물사육실(온도 23±1℃, 습도 55±5%)에서 일주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험기간동안 사료(제일제당, 한국)와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 처방 및 검액의 제조

실험에 사용한 膈下逐瘀湯의 처방은 ≪醫林改錯≫13)에 의거하였으며, 약재는 세명대학교 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다. 처방의 내용과 분량은 Table 1과 같다. 膈下逐瘀湯 10첩(750 g)을 2,000 ㎖의 증류수에 3시간 동안 침지한 후 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 3,000 rpm에서 5분간 원심하여 부유 입자를 제거하고 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)로 200 ㎖로 농축시켰다. 농축액을 동결건조기(LABCONCO, USA)로 동결건조하여 건조분말 74 g을 회수하였다.

Table 1. Prescription of *Keukhachukeo-Tang* per Pack

Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight (g)
桃 仁	*Persicae Semen*	12
紅 花	*Carthami Flos*	12
當 歸	*Angelicae gigantis Radix*	12
甘 草	*Glycyrrhizae Radix*	3
五靈脂	*Pteropi Stercus*	4
川 芎	*Cnidii Rhizoma*	4
牧丹皮	*Moutan Cortex Radicis*	4
赤芍藥	*Paeoniae Radix*	4
烏 藥	*Linderae Radix*	4
香附子	*Cyperi Rhizoma*	6
枳 殼	*Ponciri Fructus*	6
玄胡索	*Corydalis Tuber*	4
Total		75

3. 자궁내막증의 유발

자궁내막증은 Vernon and Wilson의 방법[17]에 준하여 자궁의 자가이식법으로 유발하였다. 실험개시일 오전에 질 도말표본(vaginal smear)을 Giemsa 염색하여 유핵상피세포가 주로 관찰되는 발정전기인 개체를 선별하였다(Fig. 1).

Pentobarbital sodium(Sigma, USA)을 100 ㎎/㎏ 농도로 복강주사하여 마취한 후 개복수술하고 우측 자궁의 일부를 결찰하여(Fig. 2) 적출하였다. 적출된 자궁조직을 37℃ Creb's solution에 담근 상태에서 4 × 4 ㎜ 크기의 절편을 만든 후, 자궁내막이 복강으로 향하도록 좌측복벽에 catgut(B. Braun Surgical Sdn. Bhd., Malaysia)으로 자궁조직의 중앙부위를 1회 결찰하여 고정시켜(Fig. 3) 자궁내막증을 유발하였다.

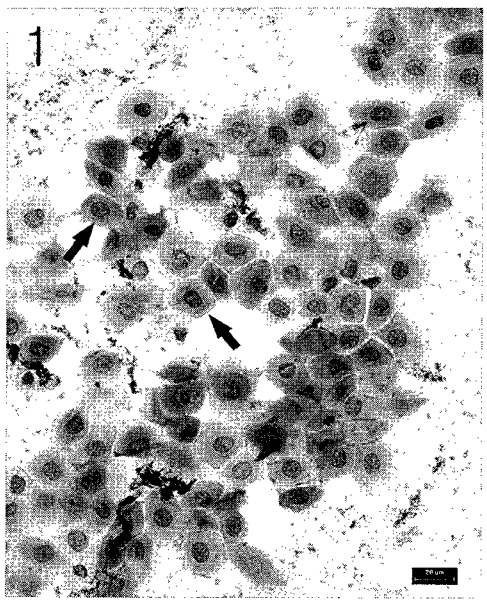


Fig. 1. Cytology of vaginal smear of rat.
Most of exfoliated cells are nucleated epithelia(arrows) at proestrus stage. Giemsa's stain, bar = 20 ㎛.

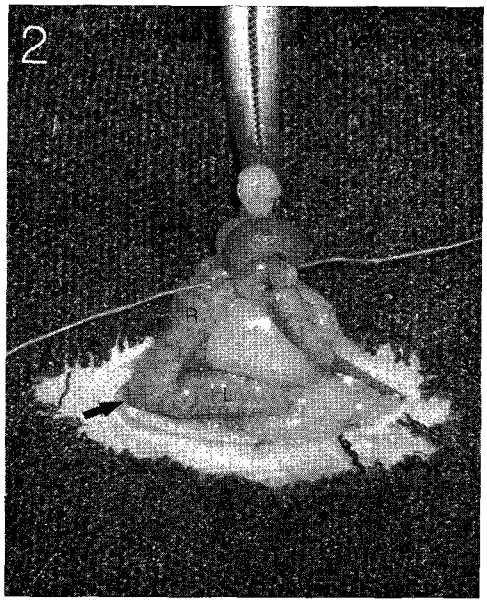


Fig. 2. Surgical procedure of partial right uterectomy.
Right uterine horn(R) was ligated and taked out. L:left uterine horn, arrow: uterine body.

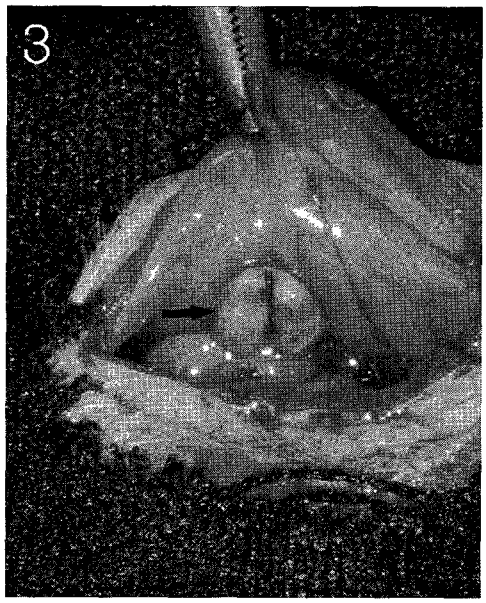


Fig. 3. Surgical procedure of auto-transplantation of uterus.
Fragment (4×4 mm) of ectomized right uterus(arrow) was transplanted to left abdominal wall by single tie of catgut suture.

4. 실험군의 분류

아래와 같이 실험군을 분류하고 각 군당 8마리의 흰쥐를 배정하였다. 음성대조군 및 대조군에는 증류수 2 ml를, 처치군에는 膈下逐瘀湯 동결건조분말 1.200 mg을 2 ml의 증류수에 녹여 15일간 경구투여하였다.

음성대조군(sham group)

- 우측 자궁의 일부를 적출하고, 이식술은 실시하지 않은 군

대조군(control group)

- 자궁의 자가 이식술을 실시하여 자궁내막증을 유발한 군

처치군(treated group)

- 자궁의 자가 이식술을 실시하고 15일간 膈下逐瘀湯을 경구투여한 군

5. 체중의 측정

모든 개체에 대해서 실험 개시일(0일), 5일, 10일, 종료일(15일)에 체중을 측정하였다.

6. 이식 자궁조직의 체적(volume) 측정

예비실험에서 이식 자궁조직은 모두 구형의 덩어리로 성장되어 있었기에, 이식 자궁조직의 크기 변화는 그 체적으로 평가하였다. 실험종료일에 부검하여 이식 자궁조직 및 주변의 복벽을 넓게 적출하여 이식 자궁조직의 크기를 digital calipper(Mitutoyo, CD-15CP, Japan)로 장경 및 단경을 측정하고 아래와 같은 공식으로 그 체적을 구하였다.

$$\text{체적}(volume) = \frac{\text{장경} \times \text{단경} \times \text{단경}}{2}$$

7. 자궁 및 난소 중량의 측정

실험종료일에 부검하여 좌측 자궁 및 양측 난소를 적출하고 주변 결합조직을 세밀하게 분리한 후 중량을 측정하였다.

8. 혈청 및 복수내 cytokines 함량 측정

실험종료일에 흰쥐를 가볍게 ether로 마취하고 심장을 통해서 전혈을 채취하였다. 혈액을 혈청분리관에 분주하고 3,000 rpm에서 10분간 원심하여 혈청을 분리하였으며 검사 전까지 -70℃에 보관하였다.

전혈을 채취한 후 복강을 노출시키고 흡입관을 이용하여 복수 50 ㎕ 이상을 채취하였으며, 채취된 복수 50 ㎕를 주사용 생리식염수 200 ㎕가 첨가된 용기에 넣어 검사 전까지 -70℃에 보관하였다.

1) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 함량 측정

혈청 및 복수내 MCP-1 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) kit(Endogen, Rat MCP-1, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 1시간, biotinylated antibody reagent는 1시간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시켰다. ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

8단계의 MCP-1 표준액(1,500, 750, 375, 187, 94, 47, 24, 0 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로부터 회귀방정식 {MCP-1 함량 = (488 × 흡광도) - 38} 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 MCP-1의 함량을 구하였다. 복수내 MCP-1 함량은 측정된 함량에 희석배율 5를 곱하였다.

2) Tumor Necrosis Factor-α(TNF-α) 함량 측정

혈청 및 복수내 TNF-α 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) kit(Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 1시간, biotinylated antibody reagent는 1시간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

8단계의 TNF-α 표준액(2,500, 833, 416, 208, 104, 52, 26, 0 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로부터 다음과 같은 4-parameter 방정식을 구하였으며, ELISA reader의 프로그램을 이용하여 TNF-α의 함량을 구하였다. 복수내 TNF-α 함량은 측정된 함량에 희석배율 5를 곱하였다.

$$Y(\text{흡광도}) = ((A-D)/(1+(\text{TNF-}\alpha\text{의 함량}/C)\hat{}B)) + D$$

(A:0.036, B:0.798, C:14552.43, D:8.72, R^2 :0.998)

3) Interleukin-1β(IL-1β) 함량 측정

혈청 및 복수내 IL-1β 함량은 ELISA kit(Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 2시간, biotinylated antibody reagent는 30분간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader로 450 nm의 파장에서 흡광도를

측정하였다.

7단계의 IL-1β 표준액(2,500, 1,000, 400, 160, 26, 10.4, 0 pg/ml)에서 측정된 흡광도로부터 아래의 4-parameter 방정식을 구하였으며, ELISA reader의 프로그램을 이용하여 IL-1β의 농도를 구하였다. 복수내 IL-1β 함량은 측정된 함량에 희석배율 5를 곱하였다.

Y(흡광도) = ((A-D)/(1+(IL-1β 함량/C)^B)) + D

(A:-0.007, B:0.926, C:1926.569, D:2.3, R^2 :0.997)

9. 병리조직학적 검사

실험 종료일에 모든 개체를 부검하여 얻은 좌측 자궁, 좌측 난소, 이식 자궁조직을 10% 중성 포르말린액에 2일간 고정하였다. 고정된 조직을 일반적인 조직처리과정을 거쳐서 파라핀 포매하고 5 ㎛의 박절편을 제작하였다. 제작된 박절편을 Hematoxylin-Eosin 염색하여 광학현미경으로 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

10. Cyclooxygenase-2(COX-2) 면역조직화학적 검사

이식 자궁조직의 박절편을 poly-L-lysine (Sigma, USA)으로 처리된 슬라이드에 부착하여 ABC 법으로 COX-2 면역조직화학 염색을 다음과 같이 실시하였다.

탈파리핀과 함수과정을 거친 이식 자궁조직 절편을 0.1 M sodium citrate buffer(pH 6.0)에 담가 700 W 출력의 초단파로 5분간 처리하고 상온에서 식힌 후 다시 280 W 출력의 초단파로 10분간 처리하여 조직 내 항원을 노출시켰다. 내인성 과산화 반응을 억제하기 위해서 3% H_2O_2 용액에 30분간 처리한 후 0.5 M PBS(pH 7.5)로 3회 세척하였다. 비특이 반응을 억제하기 위해서 0.3% Triton-X100, 1% BSA 및 3% normal goat serum이 함유된 PBS로 30분간 처리한 후 1:300으로 희석된 polyclonal anti-COX-2(Cayman Chemical, USA)를 냉장상태에서 12시간 반응시켰다. 조직을 PBS로 3회 세척 후 biotinylated anti-rabbit antibody 및 avidin-biotin peroxidase complex(Vector Laboratories, USA)를 각각 차례로 1시간씩 반응시킨 후 diaminobenzidine(Sigma, USA)으로 발색시켜 광학현미경으로 관찰하였다.

COX-2에 염색된 자궁점막 상피세포의 비율은 표면 자궁점막 상피세포층 만을 대상으로 하였으며 자궁선을 구성하는 상피세포층은 평가에서 제외하였다. 또한 대조군에서 비교적 고르게 강한 양성반응을 나타내는 부위의 발색강도를 100%로 하여 발색강도가 50%이하로 측정되는 부위는 음성반응으로 평가하였다. 자궁점막상피세포에서의 COX-2 양성반응은 전체 표면 상피세포층중 COX-2 양성반응이 나타난 상피세포층의 비율로 평가하였다. COX-2 양성반응의 발색강도 및 양성 상피세포층의 비율은 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 측정하였다.

11. 비만세포 수의 측정

탈파라핀과 함수과정을 거친 이식 자궁조직 절편을 Giemsa 염색법으로 비만세포를 표지하여 100배 시야의 광학현미경하에서 비만세포 수를 계수하였다. 이

식 자궁조직에서는 자궁조직 기질내에서 관찰되는 비만세포 수와 자궁조직을 둘러싸는 결합조직에서 관찰되는 비만세포 수를 구분하여 계수하였다.

12. 통계 처리

측정된 항목의 결과에 대한 통계 처리는 SPSS(SPSS ver. 9.0 for Windows, U.S.A.)를 이용하였다. 각 실험군간 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test를 실시하여 p 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체 중

음성대조군에서는 실험 5일까지는 체중의 증가가 없다가 실험 10일부터 다소간 증가되었다. 대조군은 실험 5일부터 실험종료일까지 음성대조군에 비해서 체중의 증가가 있었으나 유의성있는 차이는 실험 5일에서만 관찰되었다. 처치군에서는 전 실험기간 동안 음성대조군에 비해서 다소 감소되는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 처치군은 대조군에 비해서 실험 5일부터 실험 종료일까지 유의성있는 체중의 감소가 나타났다(Table 2).

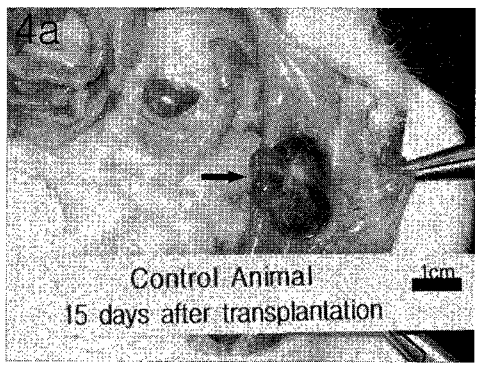
Table 2. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Body Weight of Experimentally-induced Endometriosis in Rats

Group	Body Weight(g)			
	0	5	10	15 days
Sham (n=8)	233±6[a)]	233±3	242±12	245±13
Control (n=8)	233±8	243±11*	248±12	256±12
Treated (n=8)	230±8	229±7##	235±8#	241±10#

a) : data expressed as Mean±S.D.
Sham : right partial uterectomy and treated with distilled water
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1,200 ㎎/head)
* : Statistically significant compared with sham group(*:$p < 0.05$)
# : Statistically significant compared with control group(#:$p < 0.05$, ##:$p<0.01$)

2. 이식 자궁조직의 육안 소견

대조군 및 처치군의 모든 예에서 육안적으로 확인할 수 있는 크기의 이식 자궁조직이 복벽에 형성되어 있었다. 대조군의 8례 중 5례는 맑은 장액성 물질이 차있는 여러 개의 낭포상 구조(Fig. 4a)를 하고 있었으며 8례 중 3례는 비교적 치밀한 형태의 원형으로 증식되어 있었다(Fig. 4b). 처치군의 이식 자궁조직은 대조군에 비해서 현저히 작게 관찰되었으며(Fig. 5a) 3례는 장액성 물질이 차있는 낭포상의 구조를 하고 있었으며, 5례는 비교적 치밀한 형태의 원형의 조직으로 증식되어 있었다(Fig. 5b).



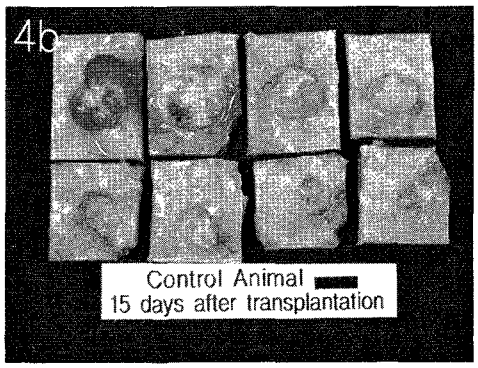


Fig. 4. Gross structure of transplanted uterine tissue of control group.
(4a) : Presentative case, (4b) : All cases(formalin fixed) of control group. Note cystic development of the transplanted tissues. bar = 1 cm

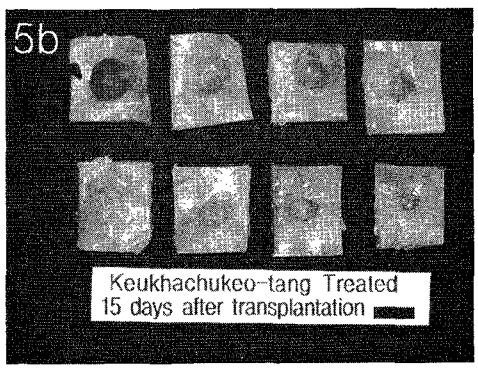


Fig. 5. Gross structure of transplanted uterine tissue of *Keukhachukeo-Tang* treated group.
(5a) : Presentative case, (5b) : All cases(formalin fixed) of treated group, the sizes of transplanted uterine tissue were decreased than those of the control group. Compaire with the size of Fig. 4. bar = 1 cm

3. 이식 자궁조직의 체적(volume)

실험 종료일에 측정한 이식 자궁조직의 체적은 처치군이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었다(Table 3).

Table 3. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Volume of Transplantated Uterine Tissue in Rats

Group	Volume of Transplanted Uterine Tissue(㎣)
Control (n = 8)	405±318[a)]
Treated (n = 8)	107±66[#]

a) : data expressed as Mean±S.D.
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1,200 ㎎/head)
: Statistically significant compared with control group(# : $p < 0.05$)

4. 자궁 및 난소의 중량

부분 적출술을 실시하지 않은 좌측 자궁의 중량은 처치군이 음성대조군 및 대조군에 비해서 증가되기는 하였으나, 모든 군간에 유의성 있는 차이는 없었다.

우측 난소의 중량은 모든 군간에 유의성 있는 차이는 없었으나, 좌측 난소의 중량은 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 난소의 평균 중량도 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다. 처치군과 대조군간에는 좌측 난소 중량 및 평균 중량 모두에서 유의성 있는 차이는 없었다(Table 4).

Table 4. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Weight of Left Uterus and Ovaries of Experimentally-induced Endometriosis in Rats

Group	Left Uterus(mg)	Ovary(mg)		
		Right	Left	Mean
Sham (n=8)	197±20[a)]	64±7	63±3	63±4
Control (n=8)	189±36	64±5	74±5***	69±3**
Treated (n=8)	214±26	69±6	74±6***	72±3***

a) : data expressed as Mean±S.D.
Sham : right partial uterectomy and treated with distilled water
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1.200 mg/head)
* : Statistically significant compared with sham group(**:$p < 0.01$, ***:$p < 0.001$)

5. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 함량

실험 종료일에 측정한 혈청중 MCP-1의 함량은 모든 군간에 유의성있는 차이는 없었다.

복수내 MCP-1의 함량은 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가하였으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성있게 감소하였다(Table 5).

Table 5. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Monocyte Chemoattractant Protein-1 Values of Serums and Peritoneal Fluids of Experimentally-induced Endometriosis in Rats

Group	Serum (pg/ml)	Peritoneal Fluid (pg/ml)
Sham (n=8)	1,700±98[a)]	3,202±1082
Control (n=8)	1,512±349	8,632±1245***
Treated (n=8)	1,495±249	6,940±893***,##

a) : data expressed as Mean±S.D.
Sham : right partial uterectomy and treated with distilled water
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1.200 mg/head)
* : Statistically significant compared with sham group(***:$p < 0.001$)
# : Statistically significant compared with control group(##:$p < 0.01$)

6. Tumor Necrosis Factor-α(TNF-α) 함량

실험 종료일에 측정한 혈청 중 TNF-α의 함량은 대조군 및 처치군이 모두 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다.

복수내 TNF-α의 함량은 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었다(Table 6).

Table 6. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Tumor Necrosis Factor-α Values of Serums and Peritoneal Fluids of Experimentally-induced Endometriosis in Rats

Group	Serum (pg/ml)	Peritoneal Fluid (pg/ml)
Sham (n=8)	46±23[a)]	239±127
Control (n=8)	147±78[**]	1,245±362[***]
Treated (n=8)	95±21[*]	847±330[***,#]

a) : data expressed as Mean±S.D.
Sham : right partial uterectomy and treated with distilled water
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1,200 mg/head)
* : Statistically significant compared with sham group(*:p <0.05, **:p < 0.01, ***:p < 0.001)
# : Statistically significant compared with control group(# :p < 0.05)

7. Interleukin-1β(IL-1β) 함량

실험 종료일에 측정한 혈청중 IL-1β의 함량은 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다.

복수내 TNF-α의 함량은 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Interleukin-1β Values of Serums and Peritoneal Fluids of Experimentally-induced Endometriosis in Rats

Group	Serum (pg/ml)	Peritoneal Fluid (pg/ml)
Sham (n=8)	18±10[a)]	24±14
Control (n=8)	75±42[**]	243±141[**]
Treated (n=8)	60±22[***]	188±99[***]

a) : data expressed as Mean±S.D.
Sham : right partial uterectomy and treated with distilled water
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1,200 mg/head)
* : Statistically significant compared with sham group(**:p < 0.01, ***:p < 0.001)

8. 병리조직학적 소견

1) 이식 자궁조직

대조군에서 이식 자궁조직은 몇 개의 낭을 형성하면서 증식되어 있었고, 내막 및 중막이 모두 발달되어 있었으며 점막상피는 단층 또는 중층으로 구성되어 있었다. 부위에 따라서는 내막의 기질내로 증식된 자궁선도 관찰되었다. 이식조직과 복벽사이의 유착부위에서는 많은 결합조직세포의 증식과 신생모세혈관의 증식이 두드러지게 관찰되었으며, 이 부위에는 다량의 대식세포, 림프구 및 형질세포가 침윤되었다. 여러 부위에서 이식 자궁조직의 외막이 복벽의 근층까지 침윤 증식되어 있었다. 때때로 낭내에는 탈락 점막상피세포 및 호중구가 차 있었으며, 부위에 따라서는 낭내에 호산성의 균질한 액이 가득차 있었다(Fig. 6a,b).

처치군에서도 이식 자궁조직은 대조군에서와 같이 내막 및 중막의 구조를 모두 유지하고 있었으나 대조군에 비해서 자궁 점막상피세포 및 자궁선의 발달은

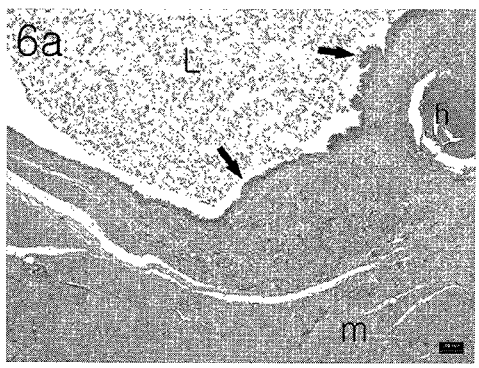
미약하였다. 대조군에 비해서 내막의 기질에는 기질세포의 증식이 미약한 반면 세포외물질(extracellular matrix)이 풍부한 상태로 관찰되었으며, 이식조직의 외막이 복벽의 근층까지 증식되어 있는 경우는 관찰할 수 없었다. 이식조직 주위에서 증식된 결합조직의 양도 대조군에 비해서 미약하였으며 대식세포, 림프구 및 형질세포의 침윤과 신생 모세혈관의 증식도 드물게 관찰되었다(Fig. 7a,b).

음성대조군, 대조군 및 처치군 모두의 좌측자궁에서는 많은 호산구 침윤이 관찰된 반면, 대조군 및 처치군의 복벽에 이식된 자궁조직에서는 호산구의 침윤을 관찰할 수 없었다.

2) 자궁 및 난소

음성대조군, 대조군 및 처치군의 모든 군에서 자궁점막은 발정전기 또는 발정기의 활발한 증식상태의 소견을 나타내었다. 다만 모든 군에서 자궁내막의 기질내에 많은 수의 호산구의 침윤이 두드러지게 관찰되었다.

난소도 모든 군에서 다양한 단계의 난포 및 황체가 발달되고 있는 정상범위의 소견만이 관찰되었다.



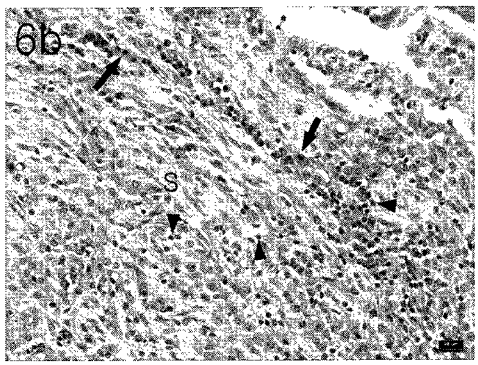
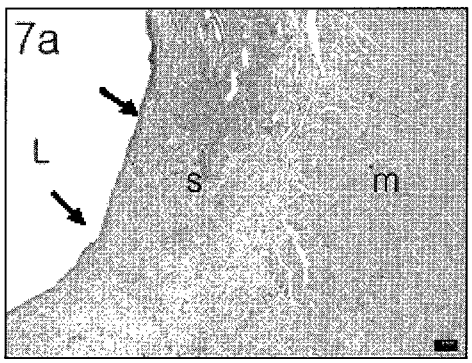


Fig. 6. Histological structure of transplanted uterine tissue of control group.
(6a) : The histological structure of uterine epithelia(arrows) of transplanted tissue was same as the intact left uterine tissue. But stromal hyperplasia and cysts with hyaline material(h) were observed. L:lumen of uterine tissue. m:abdominal muscle. H&E stain. bar=0.1 ㎜
(6b) : Higher magnification of Fig. 6a. Note high cellular proliferation of connective tissue(s) and infiltration of plasma cells(arrows) and lymphocytes(arrow heads). H&E stain. bar=20 ㎛



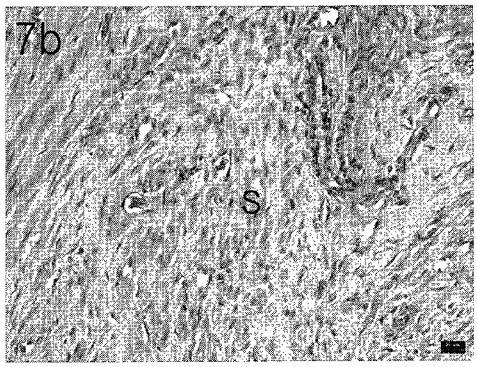


Fig. 7. Histological structure of transplanted uterine tissue of treated group.
(7a) : The uterine epithelia(arrows) of transplanted tissue was poorly developed. Compare with Fig. 6a and note the thick stroma(s) and poorly proliferated connective tissue at the adherent region of abdominal wall(m). L:lumen of uterine tissue. H&E stain. bar=0.1 ㎜
(7b) : Higher magnification of Fig. 7a. Note fibrous proliferation of connective tissue(s). Infiltration of plasma cells and lymphocytes were not prominent. H&E stain. bar=20 ㎛

9. COX-2 발현 양상

이식 자궁조직에서 COX-2 양성반응은 점막상피세포 및 호중구의 세포질에서 강하게 나타났으며, 기질내 침윤된 대식세포 및 형질세포의 세포질에서도 중등도 정도로 관찰되었다. 대조군에서는 양성반응을 보이는 점막상피세포층의 비율 및 강도가 높게 확인되었으며(Fig. 8), 처치군에서는 대조군에 비해서 비율 및 강도가 감소되어 관찰되었다(Fig. 9).

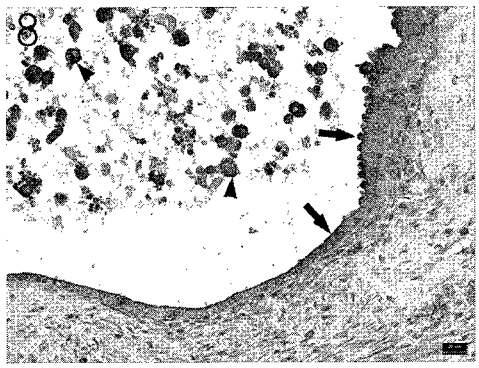


Fig. 8. COX-2 immunohistochemistry in transplanted uterine tissue of control group.
Strong positive reaction of COX-2 were expressed in cytoplasms of transplanted uterine epithelia(arrows) and desquamated epithelia(arrow heads). ABC immunohistochemical stain. bar=20 ㎛

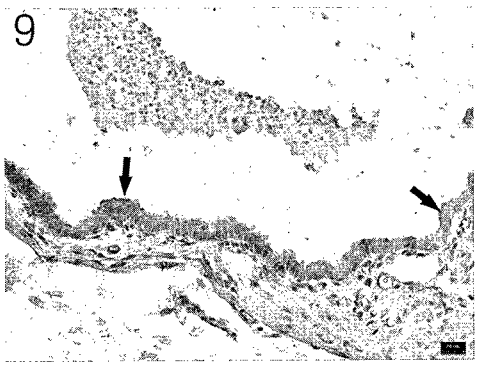


Fig. 9. COX-2 immunohistochemistry in transplanted uterine tissue of treated group.
Activties and incidence of positive reaction of COX-2 were decreased. Compare with Fig. 8. ABC immunohistochemical stain. bar=20 ㎛

10. COX-2 발현 비율

이식 자궁조직의 점막상피세포층에서의 COX-2 양성 반응 비율은 처치군이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었다(Table 8).

Table 8. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Percentage of Positive Epithelial Layers for COX-2 in Transplanted Uterine Tissue in Rats

Group	Positive Epithelial Layers for COX-2(%)
Control (n=8)	50±8[a)]
Treated (n=8)	31±10[##]

a) : data expressed as Mean±S.D.
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1.200 ㎎/head)
: Statistically significant compared with control group(##:$p<0.01$)

11. 비만세포 분포 양상

대조군의 이식 자궁조직에서는 기질내 및 자궁조직 주위 결합조직에서 많은 수의 비만세포가 확인되었으며(Fig. 10a, b), 처치군에서는 대조군에 비해서 감소되어 관찰되었다(Fig. 11a, b).

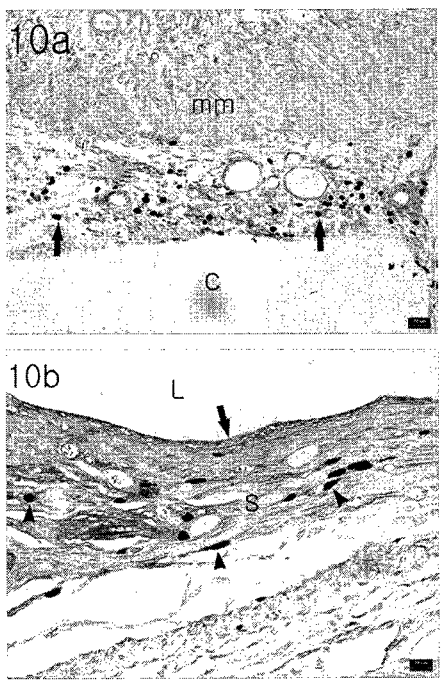


Fig. 10. Mast cells in transplanted uterine tissue of control group.
(10a) : Mast cells(arrows) observed abundantly in adjacent tissue of transplanted uterine tissue. mm: myometrium. c: abdominal cavity. Giemsa's stain. bar=20 ㎛
(10b) : Many mast cells(arrow heads) observed in stroma(s) of transplanted uterine tissue. arrow: uterine epithelium. L: lumen of uterine tissue. Giemsa's stain. bar=20 ㎛

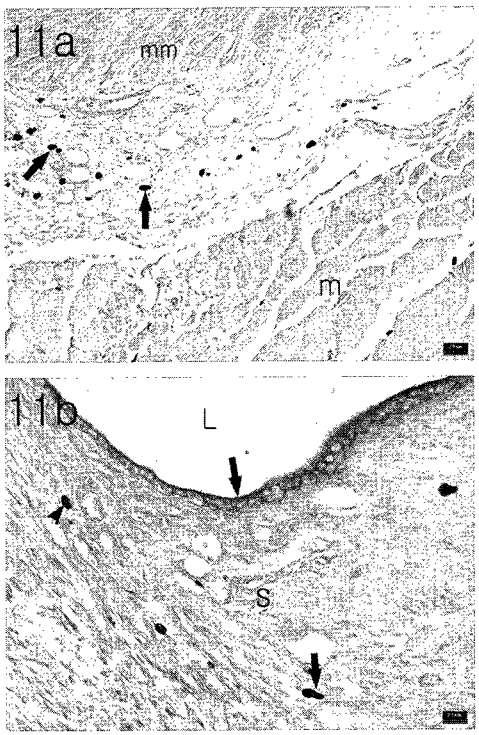


Fig. 11. Mast cells in transplanted uterine tissue of treated group.
(11a) : A small numbers of mast cells(arrows) observed in adjacent tissue of transplanted uterine tissue. Compare with Fig. 10a. mm:myometrium. m: abdominal wall. Giemsa's stain. bar=20 ㎛
(11b) : A small numbers of mast cells(arrow heads) observed in stroma(s) of transplanted uterine tissue. Compare with Fig. 10b. arrow: uterine epithelium. L: lumen of uterine tissue. Giemsa's stain. bar=20 ㎛

12. 비만세포 수

이식 자궁조직 주변의 결합조직에 침

윤된 비만세포 수는 처치군이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었으며, 이식 자궁조직의 기질에 침윤된 비만세포 수도 처치군이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었다(Table 9).

Table 9. Effects of *Keukhachukeo-Tang* on the Number of Mast Cells in Periphery and Stroma of Transplanted Uterine Tissue in Rats

Group	No. of Mast Cells in Periphery	No. of Mast Cells in Stroma
Control (n=8)	109±30[a)]	26±8
Treated (n=8)	69±18[##]	16±5[##]

a) : data expressed as Mean±S.D.
Control : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with distilled water
Treated : right partial uterectomy and uterine autotransplantation and treated with *Keukhachukeo-Tang*(1.200 mg/head)
: Statistically significant compared with control group(##:$p<0.01$)

Ⅳ. 고 찰

자궁내막증은 자궁내막조직이 자궁 이외의 부위에 존재하며 매 월경주기에 따라 정상 자궁내막조직과 동일하게 성장, 분비, 탈락하는 질환으로 가임기의 여성에서 월경통, 골반동통, 성교통 및 불임증을 유발하는 만성적 부인과 질환이다[18].

자궁내막증의 병인설에는 자궁내막 이식설(Endometrial implantation theory), 체강상피 화생설(Coelomic epitherium metaplasia theory), 혈행 및 림프성 전이설(Lymphatic or Hematogenous dissemination theory) 등 여러 이론들이 제시되었지만 어느 한 가지도 자궁내막증의 다양한 증상과 불임증과의 관계를 충분히 설명하고 있지 못하다. 이중 월경혈의 역류와 이로 인한 내막조직의 파종이 골반 자궁내막증 발생의 주요 원인임은 의심할 바 없다. 역류성 월경은 소통된 난관을 가진 여성에서는 일반적으로 발생하는 사실이며 월경의 역류로 인해서 골반강 내로 자궁내막조직이 전파된다. 그러나 월경의 역류가 있는 모든 경우에서 자궁내막증이 발생되지는 않는다. 이것은 아마도 여성 개개인마다 자궁내막증에 대한 감수성에 영양을 미치는 유전적 또는 면역학적 요인이 존재하기 때문으로 생각된다[18,19].

자궁내막증의 임상증상은 다양하여 생리통, 하복부 동통, 부정 질출혈, 요통, 월경시 배변곤란, 성교통, 불임, 습관성 유산 등이 있는데 이 질환의 진행정도와 병소의 크기는 증상과 잘 비례하지 않는 것으로 알려져 있다[20]. 이중 생리통은 Douglas 소낭 부위의 유착이 심할 때 주로 발생하며, 성교통은 자궁 천골 인대에 자궁내막증 병변이 광범위하게 있는 경우, 그리고 골반통은 유착된 골반조직의 긴장, 이완된 난소 또는 자궁 골반인대의 압박에 의한 것으로 알려졌다[21].

자궁내막증의 치료는 환자의 연령, 임신을 원하는 지의 여부, 질환의 진행정도, 발생장소, 병발질환 그리고 증상의 정도에 따라 결정되는데 치료법으로는 내과적 약물요법, 수술요법, 약물요법과 수술요법의 병용요법 그리고 기대요법 등이 있다[22,23]. 내과적 약물요법으로는 estrogen, progesterone, androgen, GnRH agonist, RU 486, gossypol, clomiphene, tamoxifen 과 prostaglandin 합성 억제제

등이 사용되고 있다. 그 중 Danazol을 사용할 경우 가성폐경상태를 유발시킴으로 자궁내막증 병소를 위축시켜 증상의 호전을 얻을 수 있으나 그 치료 효과가 일정치 못하고 체중증가와 다모증, 여드름 등과 같은 남성화 현상이 부작용으로 나타나 사용에 제한이 따랐다[24].

GnRH agonist를 사용하는 경우에는 이를 장기간 투여하게 되면 뇌하수체 GnRH 수용체에 대한 down regulation 기전에 의한 탈감작 현상이 일어나 뇌하수체에서의 LH와 FSH의 분비능력이 소실된 저성선자극호르몬 기능부전상태가 되어 자궁내막증을 치료하게 되는데 안면홍조, 성욕감퇴, 질건조감, 감정변화, 골질감소 등의 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다[25,26].

한의학에서는 자궁내막증에 일치되는 병명을 찾을 수 없으나 주요 증상을 미루어보면 "痛經", "癥瘕", "月經不調", "經行吐衄", "經行血咳", "血癥" 의 범주에 속한다고 할 수 있다[27,28]. 張[29]은 血癥은 瘀血이 留滯하여 형성된 것으로 여성에만 있는 질환이며, 월경시나 산후에 여러 원인으로 血이 완전히 빠져나가지 못하고 거슬러 올라감으로써 이것이 날로 쌓여서 癥을 형성하게 된다고 보았다. 이는 자궁내막증의 월경혈 역류설과 유사하며 기존 韓醫學에서 "離經之血" 즉 瘀血病機와도 일맥 상통한다[28].

자궁내막증과 관련한 한의학계의 실험연구로는 血府逐瘀湯[30], 內膜Ⅰ號丸[31]이 白鼠에 유발된 자궁내막증에서 모두 자궁내막이식편을 축소 내지 소실시킴을 밝혔으며, 이 등[32]은 內膜Ⅱ號丸의 phospholipase A_2 활성 억제능에 관한 실험연구를 통해 자궁내막증의 疼痛에 대한 內膜Ⅱ號丸의 효과를 증명하였다. 그리고 임상연구로는 자궁내막증의 치료에 蟠蔥散, 桂朴湯 등을 이용한 김 등[33]의 연구, 엄 등[34]이 자궁내막증을 瘀血로 변증하고 理氣活血 약물위주로 치료한 자궁내막증 치험례, 그리고 活血化瘀藥物인 桂枝茯苓丸을 이용한 자궁내막증의 치료[35] 등에 관한 연구가 보고되고 있다.

따라서 자궁내막증의 주요 病機는 瘀血로 볼 수 있으며, 그 기본 치료법은 活血化瘀法을 위주로 하여 桂枝茯苓丸, 血府逐瘀湯 등과 같은 活血化瘀하는 처방을 많이 활용하고 있다[1].

膈下逐瘀湯은 王淸任의 ≪醫林改錯≫[13]에 瘀血이 膈下에 있게 됨으로써 積塊를 형성하고 이 積塊의 통증이 이동하지 않을 때 사용한다고 최초로 收錄된 이래 戴[36]는 瘀血內結로 인한 積聚 즉, 腹部積塊가 뚜렷하고 硬痛이 이동하지 않을 때 應用한다고 하였고, 尹[37]은 胸腹에 있는 積塊와 腹痛이 일정하게 발생될 때 사용할 수 있다고 하였으며, 康[11]은 活血消瘀, 理氣止痛하는 效能이 있기 때문에 痞塊를 없애주면서 氣滯血瘀를 다스린다고 하였다. 또한 申[38]은 本方에 活血化瘀之劑인 牧丹皮, 五靈脂와 理氣止痛之劑인 烏藥, 香附子, 玄胡索 등이 加味되어 血府逐瘀湯의 變方이면서 血瘀를 강력히 개선하고 腹部의 腫塊나 疼痛을 輕減시키는데 사용될 수 있다고 하였고, 余[12]는 行血逐瘀藥으로 구성되어있어 下焦氣滯瘀停疾患에 有效하다 하였으며, 高[39]는 下焦瘀血疾患인 癥瘕, 痃癖에 사용할 수 있다고 설명하였다.

膈下逐瘀湯을 구성하는 약재들의 效能을 살펴보면 五靈脂는 散瘀止痛, 通利血

脈하는 效能이 있어 血滯經閉腹部疼痛에 활용되고, 當歸는 補血和血, 活血止痛하는 效能이 있어 血虛經閉, 寒疝腹中痛에, 川芎은 活血行氣, 開鬱하는 效能이 있어 氣鬱로 인한 瘡瘍腫痛에, 桃仁은 破血祛瘀하면서 潤燥滑腸하는 作用이 있어 瘀血阻滯腹痛, 癥瘕積聚血滯作用에, 牧丹皮는 活血祛瘀, 淸血凉血하는 作用된다. 赤芍藥은 凉血活血, 消癰散腫하는 效能이 있어 壅腫疼痛, 產後瘀血積聚에, 烏藥은 順氣止痛하는 效能이 있어 寒疝腹痛, 七情鬱結에, 玄胡索은 活血祛瘀, 理氣止痛하는 效能이 있어 疝痛, 血滯腹痛, 胸腹諸痛에, 甘草는 下氣通經, 消腫紅의 效能이 있어 壅疽腫毒에, 香附子는 理氣解鬱, 調經止痛하는 效能이 있어 經痛, 小腹脹痛, 消飮食積聚에, 紅花는 活血經痛, 祛瘀止痛하는 效能이 있어 腹中血氣刺痛, 瘡壅腫毒, 瘀血疼痛에, 枳殼은 堅積을 攻下하는 效能이 있어 脹痛, 胸膈痞結에 사용된다[40-43].

膈下逐瘀湯과 관련된 연구로는 권 등[16]은 膈下逐瘀湯이 암세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 보고하였고, 김[14]은 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다.

이상의 연구들로 보아 膈下逐瘀湯이 瘀血을 기본 病機로 하는 자궁내막증에 효과가 있을 것으로 추정되나 아직 실험적으로 연구된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 膈下逐瘀湯이 자궁내막증에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

본 실험결과, 대조군의 체중은 음성대조군에 비해 실험 5일째 유의성있게 증가하였고, 실험 10일, 15일에 체중이 증가하였으나 유의성은 없었으며, 처치군과 비교하여서는 실험 5일째부터 유의성있게 증가하였다. 그리고 처치군의 체중은 음성대조군에 비해 감소되었으나 유의성은 없었고, 대조군의 체중에 비해서는 유의성있게 감소하였다. 이러한 결과로 보아 活血化瘀하는 효능이 있는 膈下逐瘀湯이 실험적으로 유발된 자궁내막증 白鼠의 증가된 체중을 감소시키는 효능이 있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 대조군과 처치군의 모든 예에서 육안으로 확인할 수 있는 크기의 이식 자궁조직이 복벽에 형성되어 있었으며, 처치군의 이식 자궁조직은 대조군에 비해서 현저히 작게 관찰되었으며, 이식 자궁조직의 체적(㎣)은 처치군 106.50±66.43이 대조군 404.50±317.68에 비해서 유의성있게 감소되었다.

또한 좌측 자궁과 우측 난소의 중량은 모든 군간에 유의성있는 변화는 없었고, 좌측 난소의 중량은 대조군 및 처치군 모두 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가되었으나, 처치군과 대조군 간에는 유의성있는 변화는 없었다.

이러한 결과는 자궁내막증의 유발이 성공적으로 수행되었으며, 膈下逐瘀湯이 이식 자궁조직의 발달을 억제하는 것을 육안으로 확인 할 수 있었다. 또 자궁의 부분적출 및 이식이 좌측 자궁 및 양측 난소에 영향을 미치고는 있지만 처치군과 대조군 간에 유의성있는 변화가 없는 것으로 보아 膈下逐瘀湯의 투여가 잔존시킨 좌측 자궁 및 양측 난소에 악영향을 미치지는 않음을 알 수 있었다. 이를 확인하기 위하여 좌측 자궁 및 양측 난소에 대한 병리조직학적 검사를 실시하였는데, 음성대조군, 대조군 및 처치군의 모든 군에서 자궁점막은 발정전기 또는 발정기의 활발한 증식상태의 소견을 나

타내었고, 난소도 모든 군에서 다양한 단계의 난포 및 황체가 발달되고 있는 정상범위의 소견만이 관찰되었다. 따라서 膈下逐瘀湯은 자궁 및 난소의 정상적인 기능에는 악영향을 미치지 않았다고 사료된다.

이식 자궁조직에 대한 병리조직학적 검사결과, 처치군의 이식 자궁조직은 내막 및 중막의 구조가 대조군과 같이 모두 유지되고 있었으나, 자궁 점막상피세포 및 자궁선의 발달은 대조군보다 미약하였고, 대식세포, 림프구 및 형질세포의 침윤과 신생 모세혈관의 증식도 대조군에 비해 드물게 관찰되었다. 이러한 결과로 膈下逐瘀湯이 이식 자궁내막조직의 발달과 성장을 억제하고, 이식자궁조직내의 면역학적인 반응에도 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

복강액을 이루는 세포의 조성은 대식세포가 90%를 이루고, 림프구가 8% 그리고 다형핵백혈구가 2%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다[44]. 자궁내막증에서 처음으로 나타나는 면역체계의 변화는 복강내로 대식세포의 유입과 활성화이며, 이런 대식세포의 유입을 유도하는 물질로 monocyte chemotactic protein-1(MCP-1) 이 있다고 알려져 있다[45]. MCP-1은 말초 혈액의 단구세포와 복강액의 대식세포의 유입과 활성화를 일으키는 중요한 인자로 내피세포, 섬유모세포, 백혈구 등에서 분비되고, IL-1, TNF-α, PDGF (platelet-derived growth factor), IFN-γ에 의해 조절 된다[46]. 자궁내막증을 가진 환자의 복수에서 증가된 IL-1ß와 TNF-α에 반응하여 자궁내막세포와 이소성 자궁내막세포는 MCP-1을 동시에 분비하게 되고 활성화된 단핵세포와 대식세포는 자궁내막세포와 다양한 염증세포 전구체의 증식을 유도하는 많은 맥관형성인자나 또는 다른 성장인자 등을 분비한다. 이러한 MCP-1의 활성은 자궁내막증을 가진 환자의 복강액에서 증가됨이 확인되었다[5].

본 연구에서 측정한 복수내 MCP-1의 함량도 대조군이 정상군에 비해서 증가된 것으로 보아 자궁내막증 발현에 MCP-1이 관여함을 확인할 수 있었으며 처치군이 대조군에 비해서 유의성있게 감소된 것으로 보아 膈下逐瘀湯이 MCP-1 분비를 감소시켜 이식된 자궁내막조직의 발달과 성장을 억제하였던 것으로 사료된다.

TNF-α는 염증매개인자의 하나로서 염증부위에 모여든 단핵세포들에 의해서 생산되어 미생물 감염이나 종양세포에 대한 숙주의 저항을 높이는 이로운 작용이 있다. 그러나 만성 감염질환시에는 cachectin을 생산하고 그람음성균 감염시에는 다량 생산되어 septic shock을 일으키기도 하며 자가면역질환과 이식조직에 대한 숙주반응에도 관여한다[47]. 한편 자궁내막증 환자에서 TNF-α의 증가가 확인되었으며[48], TNF-α는 이소성 자궁 내막조직의 유착 및 혈관형성에도 관여하며[49], 불임여성에서 TNF-α의 농도가 증가되어있음[50]으로 보아 자궁내막증 발생과 불임에도 TNF-α가 일정정도 관련됨이 시사되고 있다.

본 연구에서 혈청 및 복수내 TNF-α의 함량은 대조군이 음성대조군에 비해서 유의성있게 증가되었으며, 복수내 TNF-α의 함량은 처치군이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었다. 이러한 결과로 보아 膈下逐瘀湯이 대식세포의 활

성억제를 통하여 TNF-α의 분비를 감소시킴으로써 이식 자궁내막조직의 혈관형성을 억제시켜 이식 자궁내막조직이 복벽에 유착하여 증식되는 것을 억제한 것으로 생각된다. 이는 본 연구의 병리조직학적 소견에서 처치군의 모세혈관 신생과 염증세포 침윤이 감소된 소견과 관련되는 결과라고 생각된다. 또한 膈下逐瘀湯의 TNF-α 분비억제 효과는 자궁내막증으로 인한 불임 여성에게도 일정한 효과가 있을 것으로 생각된다.

IL-1β는 염증매개인자중의 하나로 다른 cytokine의 합성을 유도하여 염증을 파급시키는 master cytokine이다[51]. 자궁내막증이 있는 여성에서의 복강액내 T-임파구에서 분비되는 cytokine을 분석한 결과 IL-1β와 TNF-α의 농도가 증가했다가 GnRH 치료 후 감소되는 것[52]으로 보아 이러한 cytokines이 자궁내막증의 발현에 밀접한 관련이 있음이 확인되고 있다. Hudelist 등[53]은 자궁내막증이 있는 환자 37명에서 자궁내막증 병변과 정상자궁내막조직에서의 IL-1과 기질 금속단백분해효소의 발현정도를 비환자 37명과 비교했을 때 자궁내막증병변의 샘세포와 간질세포 모두에서 비환자군보다 발현정도가 증가되어 있었으나 정상자궁내막조직에서의 발현정도는 큰 차이가 없는 것으로 보고한 바가 있다.

본 연구에서 실험 종료일에 측정한 혈청 및 복수내 IL-1β의 함량이 음성대조군에 비해서 대조군 및 처치군 모두 유의성있게 증가되었으며, 처치군이 비록 대조군에 비해서 감소되었으나 통계적 유의성은 없었다. 이러한 소견으로 자궁내막증의 병리 발생에 IL-1β가 관여함을 확인할 수 있었으나 膈下逐瘀湯이 IL-1β 활성 억제에는 크게 영향을 주지 못하였던 것으로 생각된다.

COX는 세포막의 arachidonic acid가 분해되어 prostaglandin 생산에 작용하는 효소로서 COX-1은 생체내 많은 조직에 분포하는 내재성 효소인 반면, COX-2는 내분비적 자극에 의해서 유도되는 유도성 효소의 특징을 가지고 있다[54]. 자궁내막증 환자에 있어서는 증가된 복강내 대식세포가 IL, VEGF, TNF 등을 포함한 여러 가지 cytokine의 증가를 초래한다고 알려져 있다[55]. 특히 IL-1과 VEGF는 COX 발현의 조절인자들로서 자궁내막의 기질세포 및 상피세포에서 COX-1 및 COX-2의 발현을 증가시킨다[56-58]. 자궁내막증의 진행 및 성장에는 혈관형성이 필수적이며[59], 최근의 실험연구에서 COX-2가 혈관생성을 조절한다고 하였고[60], Matsuzaki 등[61]은 이소성 자궁내막조직의 발달 및 성장에 COX-2가 관련되며 COX-2는 혈관 신생을 통한 자궁내막조직의 초기 발달과 관련이 있다고 보고한 바가 있다.

본 연구에서 이식자궁 점막상피세포에서의 COX-2 면역조직화학 염색 결과, 대조군에서는 양성반응을 보이는 점막상피세포층의 비율이 높게 확인되었으나, 처치군은 대조군에 비해서 양성반응의 비율이 유의성있게 감소되었다. 따라서 膈下逐瘀湯이 이식 자궁조직에서 COX-2의 발현을 억제하여 이식조직 내 혈관형성을 억제함으로서 이식 자궁조직의 발달 및 성장을 억제한 것으로 생각된다. 이는 이식 자궁조직을 병리조직학적으로 관찰한 소견에서 膈下逐瘀湯 처치군이 대조군에 비해 혈관의 형성이 미약한 것으로도 확인 할 수 있었다.

비만세포는 결합조직에 광범위하게 분포하고 있고 특히 소혈관 주위에 많이 분포하고 있으며 세포질 내에 굵은 과립이 충만되어 있는 현미경적 모양이 특징이고[62], 피부, 장점막, 호흡기점막과 같은 외부에 노출된 부위에 많다[63]. 비만세포는 histamine, heparin, acidophil chemotactic factor, glucosaminidase, esterase 등 화학적 매개인자를 함유하고 있으며 여러 가지 염증반응을 유발한다고 알려져있다[64]. 자궁내에서 비만세포는 월경생리와 월경교란에 관여하며 사람의 복강내 자궁내막증에서 비만세포가 침윤되어있음이 확인되었다[65].

본 연구에서도 이식 자궁조직의 기질내와 주위 결합조직에서 많은 수의 비만세포가 확인되었으며 이로써 자궁내막증의 병리발생에서 비만세포의 침윤이 관련된 점과 자궁내막증 흰쥐 모델이 사람의 자궁내막증과 병리발생학적으로 많은 유사점이 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 膈下逐瘀湯 처치군에서는 대조군에 비해서 비만세포의 침윤이 유의하게 감소된 것으로 보아, 膈下逐瘀湯을 투어하면 비만세포의 침윤이 제한되고 추가적인 면역반응이 억제됨으로 이식 자궁조직이 억제된 것으로 생각된다.

이상의 결과로 종합해 보면 膈下逐瘀湯은 정상 자궁조직이나 난소의 기능에는 영향을 미치지 않고 이식 자궁조직의 복벽유착 및 성장을 억제하는 효과가 있으며, 이는 MCP-1 및 TNF-α 생성 억제, COX-2 발현 억제, 비만세포 침윤 제한 등의 결과와 관련된 것으로 추정된다.

V. 결 론

膈下逐瘀湯이 자궁내막증의 발생에 미치는 영향을 확인하기 위해서 자궁 자가이식법으로 유발된 자궁내막증 흰쥐를 대조군과 膈下逐瘀湯(1,200 ㎎/head)을 15일간 경구투여한 처치군으로 분류하였다. 대조군 및 처치군의 체중, 이식 자궁조직의 체적, 혈청 및 복수내 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), tumor necrosis factor-α(TNF-α) 및 interleukin-1β(IL-1β) 함량을 측정하였으며, 이식자궁조직에 대한 병리조직학적 검사, COX-2 면역조직화학 및 비만세포 조직화학을 실시하였다.

이식 자궁조직의 체적(㎣)은 처치군이 대조군에 비해서 유의성($p<0.05$) 있게 감소하였다. 복수내 MCP-1 함량(pg/㎖)은 처치군이 대조군에 비해서 유의성($p<0.01$) 있게 감소하였고, 복수내 TNF-α 함량(pg/㎖)은 처치군이 대조군에 비해서 유의성($p<0.05$) 있게 감소하였다.

병리조직학적으로 처치군은 점막상피세포의 발달, 점막기질의 증식, 염증세포의 침윤 및 모세혈관의 신생이 대조군에 비해서 미약하게 관찰되었다.

COX-2 발현 점막상피세포층 비율(%)은 처치군이 대조군에 비해서 유의성($p<0.01$) 있게 감소하였다.

이식 자궁조직 주위에 침윤된 비만세포 수는 처치군이 대조군에 비해서 유의성($p<0.01$) 있게 감소하였고, 이식 자궁조직 기질내 침윤된 비만세포 수는 처치군이 대조군에 비해서 유의성($p<0.01$) 있게 감소하였다.

이러한 결과를 종합하면 膈下逐瘀湯은

자궁 자가이식법으로 유발된 흰쥐의 자궁내막증에서 이식 자궁조직의 발달을 억제하는 효과가 있으며, 이는 膈下逐瘀湯으로 인한 MCP-1 및 TNF-α 생성 억제, COX-2 발현 억제, 비만세포 침윤 제한 등의 결과와 관련된 것으로 추정된다.

□ 투 고 일 : 2007년 01월 26일
□ 심 사 일 : 2007년 02월 01일
□ 심사완료일 : 2007년 02월 06일

참고문헌

1. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학. 상권. 서울:도서출판정담. 2002:186-190.
2. Haleh S, Alfred NP. Epidemiology of Endometriosis Among Parous Women. Obestetrics & Gynecology. 1995;85:983-992.
3. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am. 1997;24:235-258.
4. Samson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol. 1927;14:422-469.
5. Jolicoeur C et al. Increased Expression of Monocyte Chemotactic Protein-1 in the Endometrium of Women with Endometriosis. Am J of Pathol. 1998;152:125-133.
6. Arici A et al. Interleukin-8 in the human endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:1783-1787.
7. Larsen CG et al. The neutrophil-activating protein(NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. Science. 1989;243:1464-1466.
8. 김동일, 이동규, 이태균. 자궁내막증의 한의학 치료에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):126-143.
9. 김동일, 이태균. 자궁내막증 및 만성 지속성 간염과 병발한 원발성 불임증 1례에 대한 치험 보고. 대한한의학회지. 1998;19(1):100-108.
10. 오규석, 홍영욱, 이태균. 血府逐瘀湯이 자궁내막증 白鼠에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995;18(2):273-282.
11. 康舜洙. 바른방제학. 서울:대성문화사. 1996:259.
12. 余桂清. 歷代中醫腫瘤案論選. 北京:北京出版社. 1988;1-49.
13. 王清任. 醫林改錯. 서울:일중사. 1992;66-68.
14. 김소연, 백승희. 膈下逐瘀湯이 자궁근종세포의 증식과 MAP kinase 활성 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(4):1-18.
15. 최해휘. 膈下逐瘀湯 煎湯液이 진통, 소염 및 췌장에 미치는 효과. 원광한의학회지. 1991;1(1):185-194.
16. 권성오, 정현우. 膈下逐瘀湯이 암세포의 증식에 미치는 실험적효과. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):148-159.
17. Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. Fertil Steril. 1985;44(5):684-694.
18. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1997;566-591.

19. 최유덕. 새임상 부인과학. 서울:고려의학. 2001:189-208.
20. Howard W et al. *Novaks Textbook of Gynecology. 11th ed., Williams and Wilkins.* 1988:303.
21. Fauconnier A et al. Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltration endometriosis. Fertil Steril. 2002:78:719-726.
22. Kistner RW. *Gynecology, Principle and practice. Chicago, 3rd ed., Year Book Medical Publisher, Inc.,* 1979:447.
23. Greenblatt RB et al. *Clinical studies with an antigonadotropindanazol.* Fertil Steril. 1971:22:102.
24. Canis M et al. Laparoscopic treatment of endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 1989:150:15-20.
25. Nisolle PM, Casanas RF, Donnez J. Histologic study of ovarian endometriosis after hormonal therapy. Fertil Steril. 1988:49(3):423-426.
26. Kauppila A et al. Placebo-controlled study on serum concentrations of CA-125 before and after treatment of endometriosis with danazol or high-dose medroxyprogesterone acetate alone or after surgery. Fertil Steril. 1988:49(1):37-41.
27. 張景岳. 景岳全書. 廣東:廣東科學出版社. 1986:327-362.
28. 이태균. 자궁내막증에 대한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1995:8(1):161-174.
29. 張介賓. 婦人規. 서울:법인문화사. 1999:253-254.
30. 오규석, 홍영욱, 이태균. 혈부축어탕이 자궁내막증 白鼠에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995:18(2):273-282.
31. 권은정, 배한익, 이태균. 內膜Ⅰ號丸의 자궁내막증 白鼠의 治療效果에 대한 硏究. 東國論集. 1996:15:325-342.
32. 이동규 등. 內膜Ⅱ號丸의 phospholipase A_2 활성 억제능에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 1996 :9(1):97-107.
33. 김동일, 이태균. 자궁내막종 환자 2예에 대한 임상적 고찰. 대한한의학회지. 1997:18(2):58-72.
34. 엄은석, 임은미. 속발성 월경통을 한약내복 및 약물보류관장법으로 치료한 치험 2례. 대한한방부인과학회지. 1999:12(1):1-12.
35. 錢靜. 桂枝茯苓丸加味治療子宮內膜異位症的臨床硏究. 楊洲大學醫學院. 1999:170.
36. 戴綿成. 中醫雜病論治. 福州:福建科學技術出版社. 1995:173-174.
37. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:의성당. 1998:200, 513-514.
38. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울:성보사. 1989:442-443.
39. 高光錫 等. 膈下逐瘀湯과 膈下逐瘀湯合四君子湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 관한 실험적 연구. 동의병리학회지. 1994:9(1)21-45.
40. 康秉秀, 金永坂. 臨床配合本草學. 서울:영림사. 1994:151, 154, 203, 273-274, 320-321, 327-329, 333-334, 386-388, 416.

41. 楊思澍. 中醫百症用藥配伍指南. 北京: 中醫古籍出版社. 1990:121, 356, 366, 369, 451, 501, 713, 721, 735, 745.
42. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典. 東京:講談社. 1982:卷(Ⅱ):132-133, 140-141, 144-145, 202-203, 210-211, 卷(Ⅲ):138-139, 274-275.
43. 新文豊出版公司. 新編中藥大辭典. 臺北:新文豊出版公司. 1982:59, 600, 832, 957, 1170, 1308, 1413, 1530, 2782.
44. 김동호 등. 자궁내막증에서 MCP-1의 면역조직화학적 특징. 대한산부인과학회지. 2000:43(12):2140-2145.
45. Arici A et al. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women when endometriosms and its modulation of expression in mesothelial cells. Fereil Steril. 1997:67:1065-1072.
46. Akoum A et al. Cytokine-induced secretion of monocyte chemotactic protein-1 by human endometriotic cells in culture. Am J Obstet Gynecol. 1995:172:594-600.
47. Vilcek J, Lee TH. *Tumor necrosis factor-New insight into the molecular mechanisms of its multiple actions.* J Biol Chem. 1991:266:7313.
48. Halme J, Becker S, Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages : possible role in pathogenesis of endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 1987:156(4):783-789.
49. Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-α. Med Hypotheses. 2003:60(1):84-88.
50. Liang XS, Hu LN, Wu P. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of infertile women with endometriosis and its relation to sperm motility. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 1994:29(9):524-526, 573.
51. Xue ML, Thakur A, Willcox M. Gene expression of proinflammatory cytokines and chemokines in mouse eye infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Experiment Opthalmol. 2002:415:389-395.
52. Ho HN et al. Decrease in interferon gamma production and impairment of T-lymphocyte proliferation in peritoneal fluid of women with endometriosis. Am J Gynecol. 1996:175:1236-1241.
53. Hudelist G et al. Interleukin 1 alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. Hum Reprod. 2005:20:1695-1701.
54. Fletcher BS et al. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. J Biol Chem. 1992:267(7): 4338-4344.
55. Harada T et al. Role of cytokines in progression of endometriosis. Gynecol Obstet Invest. 1999:47(1) :34-40.
56. Bany BM, Kennedy TG. Role of interleukin-1 in the regulation of cyclooxygenase gene expression in

rat endometrial stromal cells. J Reprod Fertil. 1999;115(1):125-131.
57. Huang JC et al. Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 gene expression in cultured endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(2):538-541.
58. Bany BM, Kennedy TG. Regulation of cyclooxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor. Dev Genet. 1997;21(1):109-115.
59. Donnez J et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF) in endometriosis. Hum Reprod. 1998; 13(6):1686-1690.
60. Tsujii M et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell . 1998;93:705-716.
61. Matsuzaki S et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. Fertil Steril. 2004;82 (6):1609-1615.
62. Ehrlich P. Beitrage Zur kinntiss der Anilifarbungen und irer Verwendung der Mikroskopichen Technik. Arch Mikros Anat. 1877;13:263.
63. Goldberg B, Rubinovitch M. Connective tissue, in Cell and Tissue Biology, Ed by Weiss L, 6th Ed, Urban & Schwarzenberg, Munich, 1988:182.
64. Ansten KF, Lewis RA, Stechsxhulte DJ. Degeneration and release of chemical mediators immediate hypersensitivity. Noterdam North Holland Publishing Co,. 1974;61.
65. Matsuzaki S et al. Increased mast cell density in peritoneal endometriosis compared with eutopic endometrium with endometriosis. Am J Reprod Immunol. 1988;40(4):291-294.