

오수유 투여가 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실
이자영, 김동철

ABSTRACT

Effect of *Evodiae Fructus* on the ovarian function and gene expression of caspase-3, MAP kinase and MPG in female mice

Ja-Young Lee, Dong-Chul Kim

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

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

Methods: We administered the *Evodiae Fructus* to 6-week-old female ICR mice for 4, 8, or 12 days. With different concentration of *Evodiae Fructus*, the female mice were injected PMSG and hCG for ovarian hyperstimulation. The mice divided into 3 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 *Evodiae Fructus*, 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 also examined the differential expression of cell viability related genes, caspase-3, MAPK and MPG according to concentration and duration of *Evodiae Fructus* administration. MPG gene expressions for cell viability and DNA repair were increased in dose dependent manner than that of control group in 4-day administration group.

Conclusion: It is suggested that the medication of *Evodiae Fructus* has beneficial effect on reproductive functions of female mice via promotion of cell proliferation.

Key Words: *Evodiae Fructus*, Ovarian Function, Caspase-3, MAPK, MPG

I. 서 론

불임은 약 12개월간 피임을 하지 않고 정상적인 성생활을 했음에도 임신이 되지 않는 경우를 말하는 것으로, 현재 우리나라 부부의 불임발생율은 13.5%에 이르고 있다¹⁻³⁾.

최근에는 불임의 원인 중 배란장애와 더불어 난관인자나 기타 다른 원인에 의한 불임이 증가하는 추세이며 불임의 치료에 있어서도 기존의 인공수정에서 수정후 자궁내로 주입하는 체외수정의 시술이 늘어나고 있다⁴⁻⁵⁾. 체외수정술의 경우 임신의 성공률을 높이기 위하여 여러 개의 배아를 이식한 결과, 다태 임신의 빈도가 높아져 착상 후 30%에 이르는 유산과 5%의 자궁외임신이 보고되고 있어⁶⁻⁷⁾ 체외수정의 성공률을 높이기 위한 한양방적인 연구가 활발히 진행중이다⁸⁻¹⁰⁾.

여성은 素體陽虛하여 寒冷에 상하기 쉬우며, 子宮虛冷은 자궁내 水, 濕, 痰의 정체를 조장하여 血의 순환장애를 일으켜 난자의 배란뿐 아니라 수정 및 착상 후 임신 유지를 어렵게 만들어 불임, 유산 등을 초래하므로, 원활한 임신과 임신 유지를 위해서는 자궁내 환경이 중요하며 이는 불임의 치료에서 우선적으로 다루어야 할 요인으로 여겨 지고 있다¹¹⁻¹²⁾.

吳茱萸는 운향과에 속한 吳茱萸의 미성숙한 과실을 건조한 것으로 溫中, 健胃, 止痛, 理氣, 燥濕 작용을 가진 溫裏之劑이다¹³⁾. 吳茱萸의 약리작용으로는 강압, 건위¹⁴⁾, 항균¹⁵⁻¹⁶⁾, 소염¹⁷⁾, 항암작용¹⁸⁾과 자궁경부암 HeLa 세포주에 대한 세포막수축효과, 조망소체의 특정 DNA

에 대한 억제 작용¹⁹⁾이 있는 것으로 보고되고 있으며, 자궁 흥분작용, 자궁근의 수축, 이완 효과가 있다고 알려져 있다²⁰⁾.

한의학에서 불임과 관련된 실험적 연구로서 난소기능에 미치는 영향²¹⁻²³⁾, 노화생쥐의 생식능력에 미치는 영향²⁴⁻²⁶⁾에 대한 연구가 있었으나, 吳茱萸의 생식기능 개선과 세포 활성을 촉진시키는 유전자 활성화에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 吳茱萸가 농도별, 투여기간별로 생식 능력 향상에 미치는 효과를 규명하기 위하여, 가임 능력이 있는 6주령 생쥐에 실험액을 투여하여, 난소기능과 배아의 체외 배발생율 및 난소조직에서의 Caspase-3, MAPK, MPG 유전자의 발현 정도를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 실험 재료

1) 약 재

실험에 사용한 吳茱萸는 대구한의대학교부속 대구한방병원 약제과에서 양질의 것을 엄선하여 사용하였다.

Table 1. The Name of *Evodia Fructus* used in this study

한약명	생약명	학명
吳茱萸	<i>Evodia Fructus.</i>	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) BENTH.

2) 동 물

본 연구에서는 가임 능력이 있는 6주령의 자성 CF-1 생쥐를 사용하였다. 모든 실험동물은 21°C±1°C로 점등과 소등

이 각각 12시간으로 조절되는 무균 동물 사육실에서 사육하였으며 전 실험기간 동안 물과 사료는 무제한으로 급식하였다.

3) 검액의 조제

吳茱萸 300 g에 증류수 3000 ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 가열하여 탕제 1700 ml를 추출하였다. 추출한 煎湯液을 100 ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 뒤, -70°C 이하에서 24시간 이상 defreeze 한 후 96시간 동안 완전히 동결건조시켜 71g의 분말을 얻었다. 동결건조한 吳茱萸 분말 71 g을 멸균 증류수에 1 mg/ml의 농도로 용해하여 검액을 제조하였다.

2. 실험 방법

1) 검액의 투여

준비된 검액을 0.3 ml씩 각각 농도가 0, 0.1 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg으로 조정되도록 준비한 다음 이를 생쥐의 생리주기인 4일, 8일 및 12일간 각각 존테를 사용하여 구강 투여하였다. 서로 다른 투여 농도에 따른 자성생쥐의 난소반응 실험에서는 대조군과 실험군의 마리수를 각각 10마리로 통일하였다.

2) 투여된 생쥐의 다배란 유도 및 배란된 난자수 비교

상이한 투여농도와 투여기간으로 조정된 CF-1 생쥐는 투여 종료후 5IU의 PMSG(Pregnant mare serum gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내 주사한 후 48시간 후에 5IU의 hCG(human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내 주사함으로써 다배란(superovulation)을 유도하였다. hCG 투여후 13시간째에 경추분리법(cervical dislocation method)으

로 희생시킨 다음 외과적 방법으로 난소(ovary)와 난관(fallopian duct)을 적출하였다. 적출된 난소는 RNA 추출을 위하여 채취 즉시 주변의 조직과 혈액을 제거한 다음 -196°C 의 liquid nitrogen(MVE; USA)에 넣어 보관하였고 난관은 PBS(phosphate buffered saline; Gibco, USA)용액이 함유된 petridish(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.

3) 투여기간 및 농도에 따른 2-세포기 배아의 체외 배발생을 비교

상이한 투여농도와 투여기간으로 조정된 CF-1 생쥐에 대하여 다배란을 유도한 다음 hCG 투여후 생식능력이 확인된 음성 CF-1 생쥐와 1:1의 비율로 합사하여 교미를 유도하였다. 익일 아침 자성생쥐를 관찰하여 질전(vaginal plug)이 확인된 개체를 교미된 것으로 판정한다

음 hCG 투여 후 36시간째에 희생시켜 난관 팽대부를 적출하고 해부현미경하에서 난관 팽대부를 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 3 mg/ml의 BSA(bovine serum albumin; Sigma, USA)가 함유된 배양액으로 3회 세척한 다음 이를 parafin oil (Sigma, USA)에 덮혀진 50 \square 의 M16 배양액 소적(microdrop)으로 옮긴 다음 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ in air 상태의 배양기 (Forma, USA)에서 4일간 배양하면서 착상 직전 단계인 배반포(blastocyst) 배아로의 발달을 관찰하였다(Fig. 1).

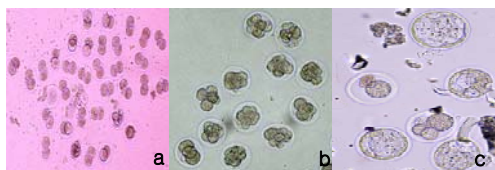


Fig. 1. Development of 2-cell embryos to blastocyst stage from *Evodiae Fructus* administrated mice

- a. 2-cell embryos after induction of multi-ovulation
- b. 4 to 8-cell embryos after 48-hour-culture
- c. blastocyst after 96-hour-culture

4) 난소 조직내에서 세포사멸 및 활성화 관련 유전자의 발현양상 비교

상이한 투여농도와 투여기간으로 조정된 CF-1 생쥐를 투여 종료 후 희생시킨 다음 난소를 적출한 다음 이들 조직내의

유전자 발현정도를 RT-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 분석하였다. 본 연구를 위해 세포사멸관련 유전자로 caspase-3를 세포의 활성화도와 관련된 유전자로는 MAPK를 그리고 DNA 복구 관련 유전자로는 MPG 유전자를 선택하여 분석하였다.

(1) Total RNA의 분리

생쥐의 난소조직을 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 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리(Sorval, USA)를 실시하였다. 이를 isopropyl alcohol (Sigma, USA)에 침전(12,000rpm/15min/4 $^{\circ}$ C)시키고, 70% ethanol (Merck, Germany)로 세척(12,000rpm/15min/4 $^{\circ}$ C)한 후, DEPC 처리된 증류수에 녹였다. Spectrophotometer (BioRad, USA)로 분리된 total RNA의 양을 산출하여 각 Sample group별로 1 μ 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 같았다.

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'-TAGAGCACCTGGTACTATT-3'	94°C	53°C	72°C	30cycle	450bp
	Reverse 5'-AAGTACAGTTCTTTCGTGAG-3'					
MAPK	Forward 5'-CGCCTACGGCATGGTGTG-3'	94°C	58°C	72°C	30cycle	586bp
	Reverse 5'-CCCTGGA AAGATGGGCCTG-3'					
MPG	Forward 5'-GCCGACGGATGGGGCAAAAG-3'	94°C	55°C	70°C	35cycle	310bp
	Reverse 5'-CTGTCCAGAAATG CCCTGGGC-3'					
GAPDH	Forward 5'-CAAGGGTAAATTCATTGGCTTGG-3'	94°C	55°C	72°C	24cycle	369bp
	Reverse 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'					

① Apoptosis 관련 Caspase-3 유전자의 발현

Apoptosis와 관련된 apoptosis-related cysteine protease의 정량적 분석은 Caspase-3 5'primer (5'-TAGAGCACCTGGTACTATT-3')와 Caspase-3 3'primer (5'-AAGTACAGTTCTTTCGTGAG-3')를 이용한 PCR로 apoptosis-related cysteine protease gene의 일부분 중 450bp를 증폭하였다.

Caspase-3 5'primer와 Caspase-3 3'primer 20pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25µl를 맞춘후 first denature 94°C 5분, 30cycle로 denature 94°C 1분, anealing 53°C 1분, extension 72°C 1분 20초, final extension 72°C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio-rad quantity-one을 이용하여 각 Sample group 별로 농도를 결정하였다.

② 세포활성 관련 MAPK 유전자의 발현

Proliferation과 관련된 MAP kinase의 정량적 분석은 MAP kinase 5'primer (5'-CGCCTACGGCATGGTGTG-3')와

MAP kinase 3'primer (5'-CCCTGGA AAGATGGGCCTG-3')를 이용한 PCR로 MAP kinase gene의 일부분 중 586bp를 증폭하였다.

MAP kinase 5'primer와 MAP kinase 3'primer 20pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25µl를 맞춘 후 first denature 94°C 5분, 30cycle로 denature 94°C 1분, anealing 58°C 1분, extension 72°C 1분 20초, final extension 72°C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio-rad quantity-one을 이용하여 각 sample 별로 농도를 결정하였다.

③ DNA복구 관련 MPG 유전자의 발현
 각 total RNA의 reverse transcription (이하 RT)은 1uM oligo dT primer를 이용하여 10 mM 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 extention interval을 주었다. RT reaction 후, 난소조직의 MPG 유전자를 detection하기 위해, 2µl의 RT product,

25pmol의 forward (5'-GCCGACGGATG GGGCAAAG-3'), reverse primer (5'-C TGTCCCAGAAATG CCCTGGGC-3'), 5% DMSO, premix(Kisan Biotech, Korea) 을 25 μ l volume으로 94 $^{\circ}$ C/5min에서 DNA denaturation하였다. 이후 94 $^{\circ}$ C/20sec에서 DNA denaturation, 55 $^{\circ}$ C/30sec에서 primer annealing과 70 $^{\circ}$ C/1min DNA extension 을 35cycle 반복하였고, 72 $^{\circ}$ C에서 15분의 extension interval을 주었다.

RT-PCR을 통해 detection된 product 를 1.5% agarose gel에서 전기영동(BioRad, USA)하여 분리한 후, 각 band의 density 를 multi-Imager system (BioRad, USA) 으로 측정하였으며, Microsoft Excel program 으로 semi- quantitation을 하였다.

5) 통계분석

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

III. 결 과

1. 투여 기간 및 농도에 따른 자성 생 쥐의 난소반응

1) 4일간 투여한 후 배란 난자의 변화
 吳茱萸 浸액을 상이한 농도에서 4일간 투여시 대조군에 비해 유의하게 높은 난자생산능력을 보였다. 평균 총 배란 난자수는 투여군의 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(p<0.05). 배란된 난자 중 정상형태의 난자수는 대조군에 비해 투여군이 0.1, 1.0, 10mg에서는 유의성 있게 증가하였으나(p<0.01) 100mg의 농도에서는 유의성이 없었다 (Table 3, Fig. 2).

2) 8일간 투여한 후 배란 난자의 변화
 吳茱萸 浸액을 상이한 농도에서 8일간 투여시 평균 총 배란 난자수는 투여군의 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(p<0.05). 배란된 난자 중 정상형태의 난자수도 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(p<0.01, Table 4, Fig. 3).

Table 3. Comparison of ovuational functions between different dose of *Evodiae Fructus* 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	139 (13.9) ^a	112 (11.2) ^c
<i>Evodiae Fructus</i>	0.1 mg	10	234 (23.4) ^b	185 (18.5) ^d
	1 mg	10	233 (23.3) ^b	194 (19.4) ^d
	10 mg	10	224 (22.4) ^b	181 (18.1) ^d
	100 mg	10	164 (16.4) ^b	128 (12.8) ^c

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

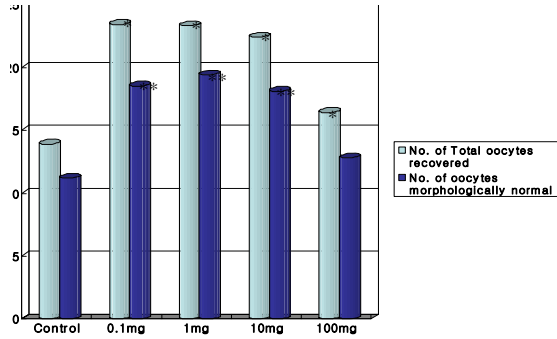


Fig. 2. Comparison of ovulation functions between different dose of *Evodiae Fructus* extract administration for 4 days.(*: p<0.05, **: p<0.01)

Table 4. Comparison of ovulation functions between different dose of *Evodiae Fructus* 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	132 (13.2) ^a	95 (9.5) ^c
<i>Evodiae Fructus</i>	0.1 mg	10	182 (18.2) ^b	147 (14.7) ^d
	1 mg	10	201 (20.1) ^b	135 (13.5) ^d
	10 mg	10	217 (21.7) ^b	160 (16.0) ^d
	100 mg	10	207 (20.7) ^b	163 (16.3) ^d

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

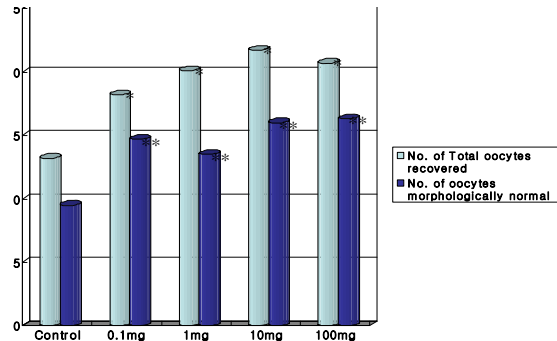


Fig. 3. Comparison of ovulation functions between different dose of *Evodiae Fructus* extract administration for 8 days.(*: p<0.05, **: p<0.01)

3) 12일간 투여한 후 배란 난자의 변화 및 茺菑黃 검액을 상이한 농도에서 12일간 투여시 4일, 8일 투여군에 비해 가장 많은 난자가 배란되었다. 평균 총 배란

난자수는 대조군에 비하여 투여군의 모든 농도에서 유의하게 증가하였으며(p<0.05), 배란된 난자 중 정상 형태의 난자 수는 모든 농도의 투여군에서 유의하게 증가

하였다(p<0.01, Table 5, Fig. 4).

Table 5. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Evodiae Fructus* extract administration for 12 days

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
<i>Evodiae Fructus</i>	Control	10	139 (13.9) ^a	121 (12.1) ^c
	0.1 mg	10	226 (22.6) ^b	182 (18.2) ^d
	1 mg	10	258 (25.8) ^b	190 (19.0) ^d
	10 mg	10	260 (26.0) ^b	222 (22.2) ^d
	100 mg	10	279 (27.9) ^b	243 (24.3) ^d

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

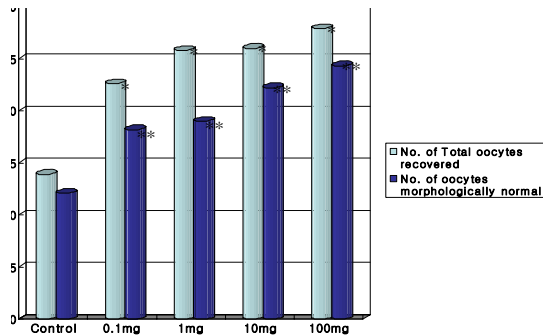


Fig. 4. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Evodiae Fructus* extract administration for 12 days.(*: p<0.05, **: p<0.01)

2. 투여 기간 및 농도에 따른 체내 수정된 배아의 체외 배발생을 비교

1) 4일간 투여한 후 체외 배발생을 비교
 吳茱萸 煎액을 상이한 농도로 4일간 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된 2-세포기 배아의 배반포 발생율을 비교

하였다. 2-세포기 배아의 수는 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고(p<0.05), 배반포 발생율은 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(p<0.01, Table 6, Fig. 5).

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

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro	% of blastocyst developed in vitro
Control	0	10	115 ^a	41 ^c	35.7 ^c
	0.1 mg	10	192 ^b	81 ^d	42.2 ^d
<i>Evodiae Fructus</i>	1 mg	10	189 ^b	86 ^d	45.5 ^d
	10 mg	10	168 ^b	88 ^d	52.4 ^d
	100 mg	10	144 ^b	73 ^d	50.7 ^d

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

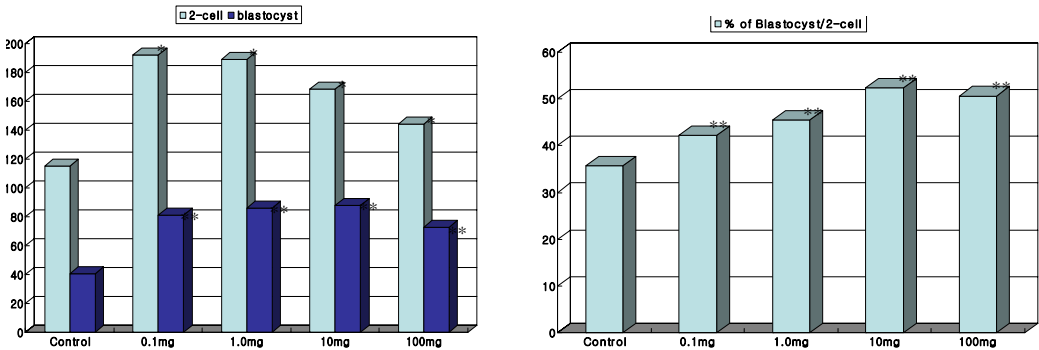


Fig. 5. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Evodiae Fructus* administrated mice for 4 days. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

2) 8일간 투여한 후 체외 배발생을 비교
 吳茱萸 검액을 상이한 농도로 8일간
 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된
 2-세포기 배아의 배반포 발생율을 비교
 하였다. 2-세포기 배아의 수는 모든 농

도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의
 하게 증가하였고($p < 0.05$), 배반포 발생율
 도 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비
 하여 유의하게 증가하였다($p < 0.01$, Table
 7, Fig. 6).

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

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro	% of blastocyst developed in vitro
Control	0	10	102 ^a	34 ^c	33.3 ^c
	0.1 mg	10	152 ^b	79 ^d	52.0 ^d
<i>Evodiae Fructus</i>	1 mg	10	149 ^b	84 ^d	56.4 ^d
	10 mg	10	172 ^b	78 ^d	45.3 ^d
	100 mg	10	181 ^b	86 ^d	47.5 ^d

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

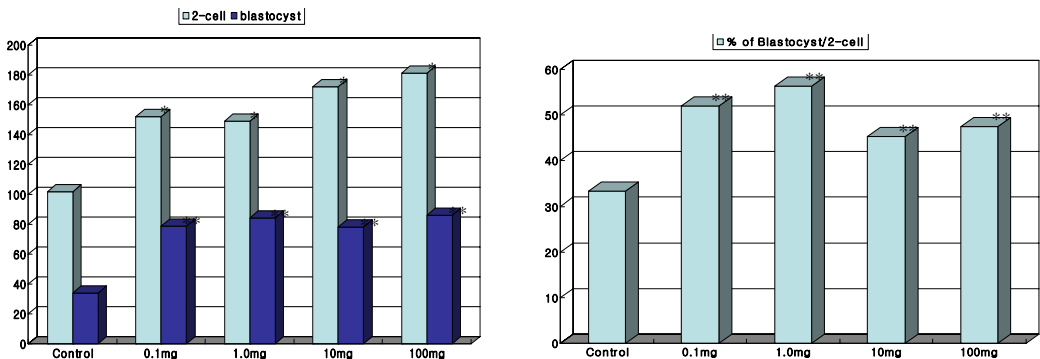


Fig. 6. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Evodiae Fructus* administrated mice for 8 days. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

3) 12일간 투여한 후 체외 배발생율 비교
 吳茱萸 검액을 12일간 투여한 후 2-세포기 배아의 수는 모든 농도의

투여군에서 대조군에 유의하게 증가하였고(p<0.05), 배반포 발생율도 모든 농도의 투여군에서 유의하게 증가하였다(p<0.01, Table 8, Fig. 7).

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

Subjects	Dose	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro	% of blastocyst developed in vitro
Control	0	10	113 ^a	39 ^c	34.5 ^c
	0.1 mg	10	177 ^b	83 ^d	46.9 ^d
<i>Evodiae Fructus</i>	1 mg	10	201 ^b	99 ^d	49.3 ^d
	10 mg	10	234 ^b	119 ^d	50.9 ^d
	100 mg	10	238 ^b	112 ^d	47.1 ^d

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

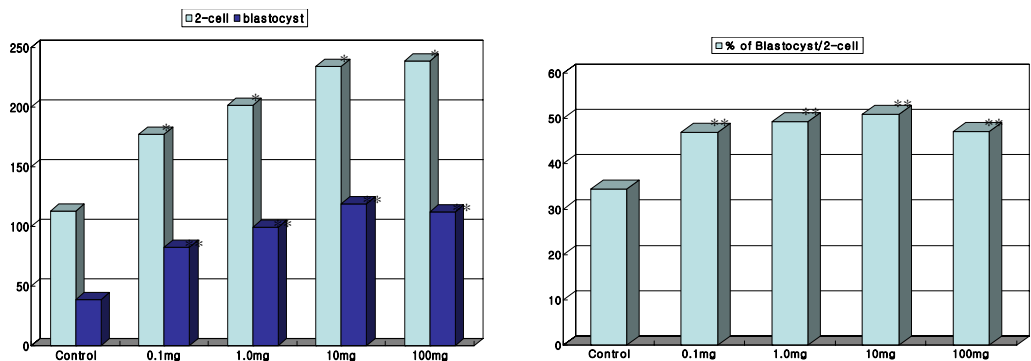
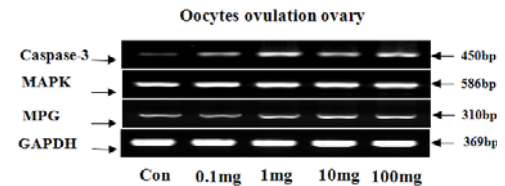


Fig. 7. Comparison of developmental competence on in vivo fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Evodiae Fructus* administrated mice for 12 days. (*: p<0.05, **: p<0.01)

3. 투여 기간 및 농도에 따른 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현의 비교 분석

1) 4일간 투여한 후 유전자 발현비교
 吳茱萸 검액을 4일간 투여한 후 Caspase-3의 발현은 대조군에 비하여 투여군에서 유의한 증가를 보였다(p<0.05). MAPK의 발현은 대조군과 투여군 사이의 유의한 차이가 없었다. MPG의 발현은 대조군에 비하여 투여군에서 증가되는 경향

을 나타냈으나 유의성은 없었다(Fig. 8, Fig. 9).



Concentration of *Evodiae Fructus*
 Fig. 8. Expression of genes from *Evodiae Fructus* oral administrated mice for 4 days.

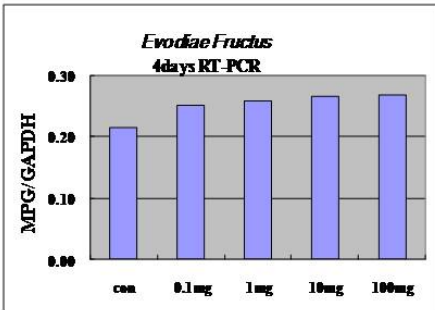
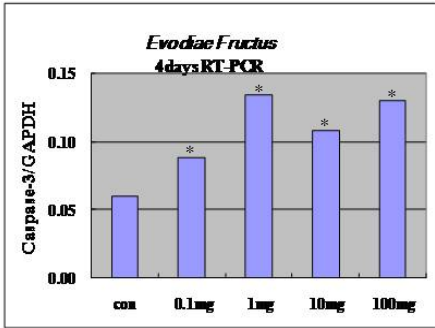
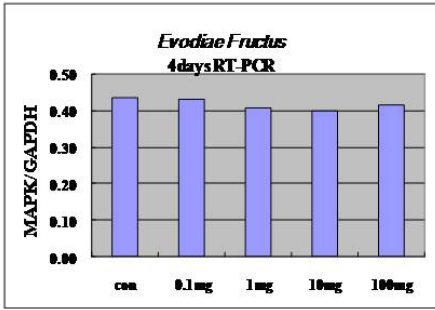
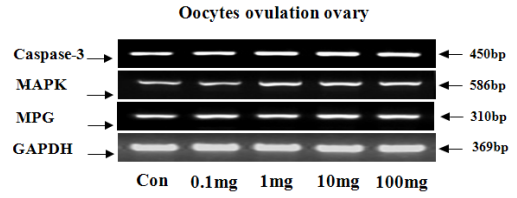


Fig. 9. Comparison of gene expression between different dose of Caspase-3, MAPK and MPG in *Evodiae Fructus* administered mice for 4 days. (*: $p < 0.05$)

2) 8일간 투여한 후 유전자 발현비교

吳茱萸 煎액을 8일간 투여한 후 Caspase-3의 발현은 대조군에 비하여 투여군에서 증가하는 경향을 보였으나, 유의성은 없었다. MAPK의 발현은 대조군과 투여군 사이의 유의한 차이가 없었고, MPG의 발현은 대조군에 비하여 투여군에서 감소하는 경향을 보였으나, 유의성은 없었다(Fig. 10, Fig. 11).



Concentration of *Evodiae Fructus*

Fig. 10. Expression of genes from *Evodiae Fructus* oral administrated mice for 8 days.

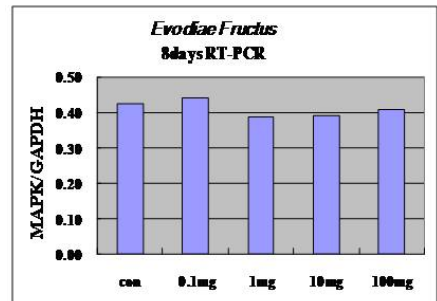
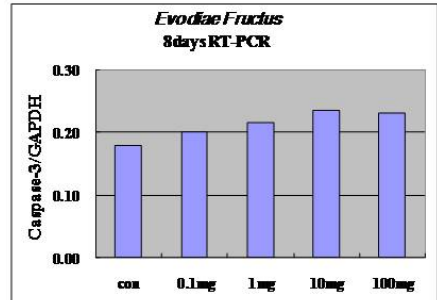
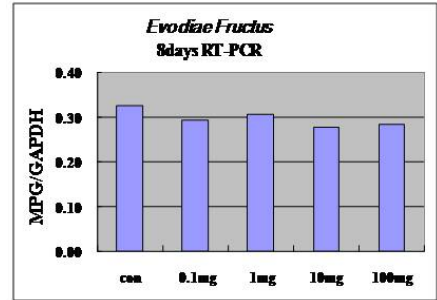
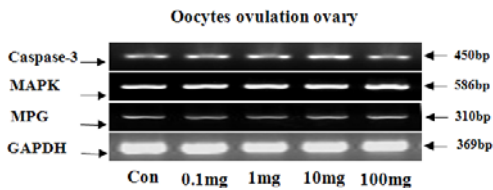


Fig. 11. Comparison of gene expression between different dose of Caspase-3, MAPK and MPG in *Evodiae Fructus* administered mice for 8 days.

3) 12일간 투여한 후 유전자 발현 비교

吳茱萸 검액을 12일간 투여한 후 Caspase-3의 발현은 대조군에 비해 투여군에서 같거나 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. MAPK의 발현은 대조군과 투여군사이의 유의한 차이가 없었다. 吳茱萸 검액을 12일간 투여한 후 MPG의 발현은 투여군에서 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 12, Fig. 13).



Concentration of *Evodiae Fructus*

Fig. 12. Expression of genes from *Evodiae Fructus* oral administrated mice for 12 days

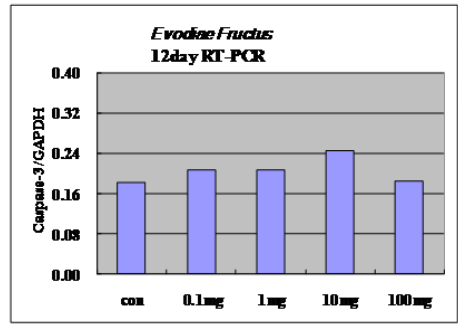
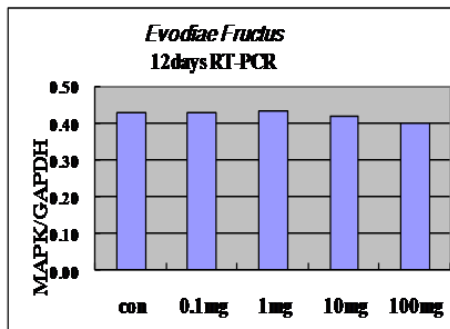
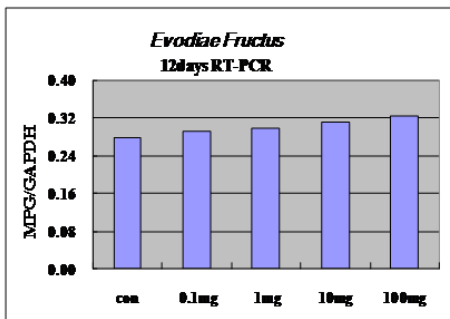


Fig. 13. Comparison of gene expression between different dose of Caspase-3, MAPK and MPG in *Evodiae Fructus* administered mice for 12 days.

IV. 고 찰

최근 여성들의 사회진출로 인한 만혼의 경향과 지연출산, 재혼의 증가 등의 사회적 변화로 임신을 시도하는 연령이 증가하면서 35세 이상의 초임부 및 불임 여성의 증가는 사회적 문제로 대두되고 있다. 이에 따라 2006년부터는 불임부부 지원사업으로 저소득층에 대한 체외수정 시술시 시술비의 일부를 지원하는 정책이 시행되고 있다²⁾.

연령증가가 불임에 미치는 영향은 난소와 자궁내막의 노화로 인한 수용성의 감소이다. 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 된다²⁷⁻³⁰⁾.

불임치료는 그 원인에 따라 치료방법을 결정하는 것이 가장 효율적이나, 최근 불임증의 치료에 있어서 많이 시도되고 있는 보조생식술은 체외수정시술이다³¹⁾. 체외수정시술은 인간난자를 체외수정하여 얻은 배아를 자궁내 이식을 통해

임신이 성립되게 한다는 간단한 개념에도 불구하고 실제 임신성립에는 여러 가지 어려움이 있다³¹⁾. 체외수정시술시 성공 여부에 관여하는 것은 첫째 난자수 및 이식 배아수, 둘째 이식된 배아의 질, 셋째는 자궁내막상태이다. 그러나 이식이 성공한 후에도 자궁환경에 대한 배아의 적응력 실패로 실제 성공률은 5~25%정도에 그치고 있으며 착상 후 30%에 이르는 유산과 5%의 자궁외임신이 보고되고 있어 체외수정의 성공률을 높이기 위한 노력이 다각도로 진행되고 있다¹⁰⁾.

한의학에서 여성불임은 求嗣, 種子, 嗣育, 求子門에서 다루고 있으며³²⁻³⁵⁾ 《聖濟總錄³²⁾》 “婦人所以無子, 由衝任不足, 腎氣虛寒故也.” 《素問·上古天真論³⁵⁾》 “女子 二七 天癸至 任脈通 太衝脈盛 月事以時下 故有子”라 하여 여성의 임신에 있어 腎氣와 衝任脈의 중요성을 인식하고 있다.

불임의 원인은 腎虛를 근본으로 하여 氣血虛弱, 子宮虛寒, 瘀血, 肝鬱, 痰濕 등으로 유발된다 하였으며 역대 한의학 문헌을 고찰한 연구¹²⁾에서 子宮虛寒이 여성불임의 가장 많은 원인으로 제시되고 있다. 《女科經綸³³⁾》에서는 女子의 胞는 腎과 心包絡에 연결되어 있으며 모두 陰藏으로 虛하면 風寒이 틈을 타고 쉽게 자궁으로 침습하여 子宮虛寒을 야기하므로 온난한 약물로 풍한을 없애고 임신을 할 수 있게 자양하는 것이 묘책이라고 밝히고 있다. 또한 辛溫한 약물을 사용할 때는 引經藥을 가미하여 下焦까지 이르게 하고 腎과 心包로 그 기운이 미치게 하여 풍한을 흩어주고 子宮을 따뜻하게 하는 것이 요체가 된다고 하였다. 子

宮虛寒은 자궁내 水, 濕, 痰의 정체를 조장하여 血의 응결과 凝滯不通을 일으키므로 불임과 임신유지를 위한 치료시 子宮虛寒에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 吳茱萸는 芸香科 (Rutaceae)에 속한 낙엽관목 혹은 소고목인 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa*(Juss.). Benth.의 미성숙과실로 溫中, 止痛, 利氣, 燥濕하는 효능이 있어 口逆吞酸, 厥陰頭痛, 臟寒吐瀉, 脘腹脹痛 등을 치료하고, 下焦를 溫하게 하여 暖厥陰해서 寒疝을 治하고 助腎陽하여 寒邪를 다스리고 營血을 溫하게 하여 經閉를 치료한다¹³⁾.

《本草綱目³⁸⁾》에서는 “吳茱萸 溫中下氣, 止痛, 除濕血痺, 逐風邪”, “茱萸辛熱, 能散能溫, 苦熱, 能燥能堅. 故其所治之症, 皆聚氣散寒溫中, 燥濕解鬱之功而已.”라 하여 辛熱로 능히 散하고 溫하며, 苦熱로 능히 燥하고 堅하게 하여 그 治하는 症은 모두 散寒溫中하고, 燥濕解鬱한다는 吳茱萸의 온리작용에 대하여 상세하게 설명하고 있다.

실험연구에서 吳茱萸의 성분 중 Isoevodianine은 토끼의 적출자궁에 대하여 흥분작용을 나타냈고, Rutaecarpine은 생쥐의 자궁에 uterotonic 활성을 유도하였다. Synephrine이 없는 吳茱萸 alkaline 분획은 생쥐의 자궁근의 수축을 유도했고, Synephrin은 생쥐의 자궁근을 이완시키는 효과를 보였다²⁰⁾.

이에 저자는 吳茱萸가 난소의 기능과 배발생에 미치는 영향과 생식조직 내에서의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보고자 吳茱萸 투여 후 배란과 배발생의 변화, Caspase-3, MAPK, MPG 유전자의 발현에 관하여 실험하였다.

먼저, 吳茱萸 검액을 투여하여 기간과 농도에 따른 자성생쥐의 배란 난자수의 변화를 살펴보았다.

검액을 4일간 상이한 농도로 투여하였을 때 평균 총 배란 난자수는 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였으나($p < 0.05$), 농도가 증가할수록 평균 총 배란 난자수는 감소하는 양상을 보였다. 정상 형태의 난자수는 0.1, 1, 10 mg 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였으나($p < 0.01$), 100 mg 농도에서는 유의성이 없었다.

8일간 상이한 농도로 투여하였을 때 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 평균 총 배란 난자수는 10 mg 농도에서 가장 높은 증가를 보였고, 정상 형태의 난자수는 100 mg 농도에서 가장 높은 증가를 보였다.

12일간 상이한 농도로 투여하였을 때 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 평균 총 배란 난자수와 정상 형태의 난자수 모두 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였다.

吳茱萸 검액을 투여하여 투여 기간과 투여 농도에 따른 배란난자수를 비교하였을 때, 吳茱萸는 배란난자수를 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 생쥐의 난소기능을 향상시켜 배란율을 증가시키는 효과가 있는 것으로 사료되며 단기간에 비하여 장기간 사용시, 투여 농도가 높을수록 양호한 효과를 볼 수 있으리라 생각된다.

다음으로 吳茱萸 검액을 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된 2-세포기 배아(2-cell embryo)의 배반포(blastocyst)로

의 발생율을 비교하여 투여 농도와 기간에 따른 배아의 체외 배발생율을 살펴보았다.

4일간, 8일간, 12일간 상이한 농도로 투여하였을 때 2-세포기 배아의 수와 배반포로의 발생율은 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 특히 12일간에서 2-세포기 배아의 수는 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, 배반포로의 발생율은 4, 8, 12 일간에서 각각 10, 1, 10 mg 농도에서 가장 높은 증가를 보였다.

吳茱萸 검액을 투여하여 배란된 난자의 배반포 발생율을 투여 기간과 투여 농도별로 비교하였을 때, 吳茱萸는 배란된 난자의 수정후 배반포로의 발생율을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 吳茱萸가 수정란의 착상율을 높이는 데 효과적으로 기여할 수 있으리라 생각된다.

이상에서 吳茱萸 검액의 투여가 자성생쥐의 배란과 배발생율에 효과적임을 확인하였으므로 吳茱萸 검액을 투여한 자성생쥐의 난소 조직을 RT-PCR(reverse transcription- polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 유전자 발현 정도를 분석하였다. 본 연구에서는 세포사멸과 관련된 유전자로는 Caspase-3, 세포 활성화와 관련된 유전자로는 MAPK, 그리고 DNA복구와 관련된 유전자로는 MPG 유전자를 선택하여 분석하였다.

Apoptosis란 세포의 분해를 위하여 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음기작이다. 난소는 특히 매달 난포의 성장, 우성난포의 선택, 배란, 난포의 퇴화, 황체의 퇴화를 겪는 역동적인 조직으로 apoptosis의 본보기로, bcl-2

에 의하여 억제되고 Apaf-1 유전자가 조정자 역할을 한다고 보고되었다³⁹⁻⁴⁰⁾. Apoptosis는 세포사망을 유도함으로써 성숙한 조직의 유지와 배아 발생 모두에게 중요한 역할을 하는 과정으로 최근 체외수정과 관련하여서는 apoptosis가 덜 일어난 난포로부터 얻은 난자를 체외수정기술에 이용하는 것이 임신에 유리하다는 실험결과가 있다⁴¹⁾.

Caspase는 apoptosis를 실행하는 분자적 기작 중, 시스틴 단백질 분해효소로 caspase의 활성화는 caspase의 N-말단에 존재하는 단백질-단백질 결합을 통하여 세포사멸신호를 전달하여 활성화되며, 활성화된 caspase는 특정 기질단백질의 분해를 통하여 세포사멸을 일으킨다⁴²⁾. 현재까지 14종류의 caspase isoform들이 보고 되었는데, Caspase-3는 다양한 apoptosis 자극에 의해서 공통적으로 활성화될 수 있으며, 활성화된 Caspase-3는 여러 종류의 세포내 단백질들을 절단할 수 있다⁴³⁾.

MAPK는 mitogen activated protein kinase의 약자로 유전자 발현, 세포의 성장, 증식, 분화 및 세포 자연사 등을 조절하는 기능을 수행한다⁴⁴⁾. MAPK pathway는 세포가 외부의 환경 변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보들을 세포질 및 세포핵 내부로 전달하여 gene expression을 조절하는 과정에 관여하는 대표적인 신호 전달계이다⁴⁵⁾. 이 경로의 중심은 단백질-세린/트레오닌 인산화 효소로 세포내 유전자 발현의 조절기전 과정에서 필수적 역할을 하며, 전사인자의 활성화는 단백질 인산화 과정을 통하여 조절되게 된다. MAPK는 배란 전 난포에서 LH의 작용에 필요하고, 난소내의 난포형성과정에서 마지막 단계인 성숙과정

meiotic maturation에 MAPK가 관여한다는 보고가 있다⁴⁶⁻⁴⁷⁾. 따라서 MAPK는 감수분열과정과 난소 및 자궁조직의 활성화에 영향을 끼치는 것을 알 수 있다⁴⁸⁾.

MPG(N-Methylpurine-DNA Glycosylase)는 DNA에서 N-methylpurine과 다른 손상된 purine기를 제거하는 DNA 회복 효소로서, 세포내에서 DNA가 복제될 때 손상이 있는 DNA의 사슬을 복구하는데 관여하는 효소이다. 손상 후 일련의 DNA 회복 시스템이 제대로 작동하지 않는다면 DNA는 돌연변이, 염색체 이상 등의 유전적인 질병을 초래하게 되며 이런 이유로 생식기관에서의 MPG 유전자의 역할은 상당히 중요하다⁴⁹⁻⁵⁰⁾.

본 연구에서 吳茱萸 검액 투여 후 채취된 난소조직을 분석하여 투여 기간과 농도에 따른 Caspase-3, MAPK, MPG 유전자 발현을 살펴보았다.

Caspase-3의 발현은 4일간 상이한 농도로 투여하였을 때 투여군의 경우 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며 ($p < 0.05$), 특히 1 mg 농도에서 가장 높은 발현을 나타내었다. 그러나 8일, 12일간 투여시에는 유의성이 없었다.

MAPK, MPG의 발현은 4, 8, 12일간 상이한 농도로 투여하였을 때 투여군과 대조군사이의 유의한 차이가 없었다.

吳茱萸 검액의 투여 기간과 농도별로 투여 후의 난소 조직의 유전자 발현을 비교한 결과, Caspase-3의 발현은 단기간 투여 시 증가하나, 투여 기간이 증가할수록 정상화되는 것으로 나타나 吳茱萸 검액이 난소 조직 내에서 세포 사멸에 미치는 영향에 대하여 투여 농도간의 유의성에 대한 정밀한 연구가 보충되어야 할 것으로 사료된다. 吳茱萸 검액이

난소 조직 내에서 세포활성에 관여하는 MAPK에 미치는 유의한 영향은 확인할 수 없었다. 이는 吳茱萸가 배란율을 높이고 배발생율을 촉진하는 것이 MAPK 활성화와는 다른 기전에 의해 조절된다는 것을 의미한다.

이상의 결과로 보아 吳茱萸 투여는 배란 총 난자수와 정상 형태의 난자수를 증가시키며 체내수정 후 배발생율을 증가시켜 생식능력을 높이는 효능이 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 유전자 발현과 관련하여 난소 조직 내에서 세포의 활성화에 관여하는 MAPK와 DNA복구유전자인 MPG 유전자의 발현에는 관여하지 않은 것으로 나타나 吳茱萸가 난소 기능을 촉진시키는 기전은 세포사멸 방지와는 다른 기전에 의한 것으로 추측된다. 즉, 세포자멸사의 방지나 DNA 복구와는 직접적인 관련이 없다 하더라도 시상하부-뇌하수체-난소축(H-P-O축)의 기능을 활성화시킨다거나 난소 조직의 호르몬 분비의 변화를 일으킨다거나 하는 가능성을 생각해 볼 수 있다. 향후 吳茱萸 검액이 LH, FSH, total estrogen, progesterone등의 성호르몬과 total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride등의 지질 함량에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다 사료된다.

吳茱萸는 난소 기능을 향상시켜 난자의 배란 수를 증가시키며 체내 수정 이후에도 배발생율을 높이므로, 임상에서 배란 장애로 인한 불임과 체외수정시술 시 본 약재를 활용한다면 좋은 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

吳茱萸가 자성 생쥐의 생식 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 吳茱萸 검액을 4, 8, 12일간 0, 0.1, 1, 10, 100 mg의 농도로 경구 투여하여 배란난자의 변화, 체내수정 후 배발생율, Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자의 발현 정도를 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 吳茱萸 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 자성 생쥐의 평균 총 난자수는 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 정상 형태의 난자 수는 4일간 100 mg의 농도를 제외한 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
2. 吳茱萸 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 자성생쥐의 체내 수정 후 2-세포기 배아에서 배반포 발생율은 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
3. 吳茱萸 검액을 4, 8, 12일간 투여한 후 자성생쥐의 난소조직에서 유전자 발현을 분석한 결과, Caspase-3는 대조군에 비하여 4일간의 투여군에서는 발현의 증가가 나타났으나 8, 12일간의 투여군에서는 발현이 같거나 감소하였다.
4. MAPK의 발현은 모든 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.
5. MPG의 발현은 4일간 투여군에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나, 모든 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 실험 결과로 보아 吳茱萸는 배란 난자수와 정상 난자수를 증가시키며 체내수정 후 배발생율을 증가시켜 생식능력을 향상시키므로 체외수정 시술시 병용하여 임신성공률을 높이는데 기여할 수 있다고 생각된다.

□ 투 고 일 : 2009년 4월 19일

□ 심 사 일 : 2009년 4월 29일

□ 심사완료일 : 2009년 5월 10일

參考文獻

1. 한의부인과학 편찬회. 한방여성의학 (I). 서울:정담. 2007:267-81.
2. 최영민 등. 불임부부지원사업 보고. 대한산부인과학회 학술대회. 2007;93:122.
3. 황나미. 우리나라 불임 및 불임관련 의료이용실태와 문제해결을 위한 연구. 한국보건사회연구원. 2003:262.
4. 이희상, 정진홍. 대전대학교 부속 한방부인과 불임증 환자에 대한 분석 통계. 서울:해화의학. 1997;6(1):74-89.
5. 이우식. 불임치료의 최신지견. 대한산부인과학회지. 2005;48(5):1106-29.
6. 서울대학교 병원. 전공의 편람-산부인과. 서울:의학출판사. 1994:144.
7. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1997:598-697.
8. 이향아 등. 체외수정시술을 위한 과배란 유도시 유전자 재조합에 의하여 생산된 사람용모생식샘자극호르몬제의 임상적 효용성에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 2007;50(4):645-52.
9. 이정호. 불임 치료에서 난자공여술. 대

한산부인과학회지. 2006;49(6):1188-95.

10. 문현주, 강명자. 체외수정 시술시 한약투여에 관한 임상적 고찰. 대한한방부인과학회지. 2001;14(3):127-35.
11. 배경미 등. 부인과 환자의 냉증과의 관계에 대한 조사연구. 대한한방부인과 학회지. 2002;15(2):101-13.
12. 김철원 등. 여성불임의 원인분류에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과 학회지. 1991;4(1):43-56.
13. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1999:337-8.
14. Rho TC et al. Anti-helicobacter pylori activity of quinolone alkaloids from *Evodiae fructus*. Biol pharm Bull. 1999;22:114-23.
15. Choi YH et al. Anti-inflammatory pterinyls from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cellular action mechanism. Arch Pharm Res. 2006;29(4):293-7.
16. Ko HC et al. Anti-inflammatory effects and mechanism of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cell. EurJ pharmacol. 2007;555(2-3):211-7.
17. 윤현정 등. 생쥐 대식세포 및 사람 혈관 내피세포에서 吳茱萸 메탄올 추출물의 항염증 효과. 대한본초학회지. 2008;23(1):29-38.
18. Lee TJ et al. Caspase-dependent and caspase-independent apoptosis induced by evodiamine in human leukemic U937 cells. Mol Cancer Ther. 2006;5(9):2398-407.
19. 崔嵐 等. 吳茱萸鹼藥理作用研究進展.

- 中國醫藥信息雜誌. 2005;12(6):108-10.
20. 한방약리학 교재편찬위원회 저. 한방약리학. 서울:신일상사. 2005:591-4.
 21. 조정훈 등. 육미지황탕 약침이 생쥐의 난소기능 및 임신과 분만에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(1):1-14.
 22. 이수정 등. 大營煎이 백서의 배란과 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(4):108-18.
 23. 안규환 등. 歸腎丸이 白鼠의 배란과 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):1-18.
 24. 김로사 등. 자하거가 노화생쥐의 생식능력에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):56-69.
 25. 허지원 등. 육중용이 생쥐의 생식능력에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):70-8.
 26. 김인중 등. Effects of Cervi Pantotrichum Cornu on the Ovulation and in vitro Developmental Competence of Aged mice. The 11th International Congress of Oriental medicine Abstracts. 2001:55-6.
 27. David R. Meldrum, MD. Female reproductive aging—ovarian and uterine factors. Fertility and Sterility. 1993;59(1):1-5.
 28. 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):1375-7.
 29. 김석현. 난자 세포질내 정자주입술을 이용한 체외수정시술시 연령이 임신율에 미치는 영향에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1998;41(7):1811-9.
 30. 이명섭. 시험관 아기 시술에서 여성의 연령이 수정란의 결과 다태임신 발생에 미치는 영향. 대한불임학회지. 2000;27(3):261-5.
 31. 구병삼. 부인과 내분비학. 서울:고려의학. 2001:303-428.
 32. 趙佶. 聖濟總錄. 江蘇:人民衛生出版社. 1982:2524-6.
 33. 蕭埏. 女科經綸. 江蘇:江藥科學技術出版社. 1986:58-9.
 34. 李梴. 醫學入門. 서울:남산당. 1974:548.
 35. 楊維傑. 黃帝內經素問譯解. 臺北:臺聯國風出版社. 1971:4-6.
 36. 김은섭, 유동렬. 여성불임의 원인에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교한의학연구소 논문집. 2000;9(1):267-86.
 37. 한의과대학 방제학교수 공편저. 방제학. 서울:영림사. 1988:419-22.
 38. 李時珍. 本草綱目. 北京:華夏出版社. 1993:1248-52.
 39. 한국유전자학회. 유전 제2권. 서울:도서출판 월드사이언스. 1998:77-128.
 40. 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):405-13.
 41. 지병철 등. 체외수정시술시 유세포분석을 이용한 과립막세포내 아포프토시스의 정량적 측정. 대한산부인과학회지. 2000;43(1):58-64.
 42. 김정희, 성차경. Apoptosis의 조절기전. J Korean Soc Hyperthermia Oncol. 2000;5(1):1-11.
 43. 엄홍덕. 산화성 스트레스에 의한 세포사멸의 조절. Biochemistry News. 1999;19(4):253-59.

44. 정병갑. 분자세포생물학. 서울:도서출판 한우리. 2002:49.
45. 최의주. Regulation of the stress Activated MAPK. 제3회 한국응용 약물학회 추계심포지움. 1995;1:23-7.
46. 김선행. 체외수정시술 주기에서 자궁 내막발달과 착상에 관한 연구. 대한불임학회지. 1993;20(2):117-23.
47. Posadq J, Cooper JA. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocyte. *Science*. 1992;255(5041):212-5.
48. 김진희, 백승희. 桂枝茯苓丸이 子宮筋腫細胞의 成長抑制와 MAPK 活性에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2001;14(2):85-101.
49. 손태중 등. 생쥐 태아 및 성체조직에서의 N-methylpurine-DNA glycosylase 유전자의 발현. 발생과 생식. 1999;3(1):101-5.
50. Spatial expression of a DNA repair gene, N-methylpurinr-DNA Glycosylase (MPG) during development in mice. *Anticancer Res*. 2000;20(5A):3037-43.