

濃度別 巴戟 投藥이 숫컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響

慶熙大學校 韓醫科大學 婦人科教室
許智源, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮

ABSTRACT

Dose Dependent Effects of *Morindae officinalis Radix* Extract Solution on the Reproductive Capacities in the Mice

Ji-Won Heo, Jung-Hoon Cho, Jun-Bok Jang, Kyung-Sub Lee
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University

Purpose : These studies were undertaken to evaluate the effects of the administration of different concentrated *Morindae officinalis Radix* extract solution on the spermatogenic abilities such as concentration, motility and morphological normality of sperm from the testis and the activities of sperm hyaluronidase, testicular peroxidase and testicular catalase.

Methods : We used the 2-month-old mice and administered the extract solution of *Morindae officinalis Radix* in the different concentration once a day for 60 days. The control group was administered the normal saline in the same way and duration. We examined the number of total, motile and normal sperm from the cauda epididymis, the activities of sperm hyaluronidase, testicular peroxidase and testicular catalase. Also we observed changes of isolated testis before and after administration of *Morindae officinalis Radix* extract solutions in the mice. And we compared to the testicular tissue especially seminiferous tubules between control and treated group by histochemical methods.

Results : The significant dose-dependent differences were observed in the concentration of total sperm, the motility and normality of spermatozoa of the *Morindae officinalis Radix* extract solution administered groups compared to the control group, respectively. In the histological analysis of the testicular tissues, the enlargement of testicular lobe diameter and apparent vasculogenesis between testicular lobes were observed in the *Morindae officinalis Radix* extract solution administered groups compared to the control group, respectively. Also, the activity of hyaluronidase was significantly increased in the *Morindae officinalis Radix* extract solution administered groups compared to the control group. In the antioxidant activity analysis, the activity of testicular peroxidase was significantly increased in the *Morindae officinalis Radix* extract solution administered groups compared to the control group, respectively.

Conclusion : This study shows that *Morindae officinalis Radix* has the beneficial effect on the concentration, morphology and motility of sperm, the activities of sperm hyaluronidase and testicular peroxidase. We can suggest that *Morindae officinalis Radix* extract solution be useful for the treatment of male sexual dysfunctions and infertility.

Key words : *Morindae officinalis Radix*, morphology and motility of sperm, sperm hyaluronidase, testicular peroxidase, infertility

I. 緒 論

불임은 정상적인 부부생활에도 불구하고 1년 이내에 임신을 못하는 것으로¹⁾, 그 중 약 50%를 차지하는 남성불임은 남성의 생식 능력 저하 경향으로 인해 증가 추세에 있다^{2,3)}. 체외수정, 미세조작술 등 보조생식술의 발달로 불임의 진단 및 치료에서 남성 불임은 종종 무시되어 왔으나⁴⁾, 유전적인 결함이 자손까지 그대로 전달될 수 있다는 우려와 과도한 비용 및 정상 여성의 동반 치료가 불가피하다는 점에서 남성 불임의 치료가 점차 중요해지고 있다^{5,6)}.

한의학에서 남성불임은 絶子⁷⁾, 無子⁸⁾, 無嗣⁸⁾ 등으로 칭하였으며, 五勞, 七傷, 虛羸 등의 虛勞症狀 및 陽痿, 遺精, 早洩, 白濁 등을 포괄하는 개념^{7,9)}으로 인식되어 왔다. 남성불임의 원인은 腎陽虛, 腎陰虛, 肝鬱氣滯, 痰濕內蘊, 氣血兩虛, 氣滯血鬱, 脾腎兩虛 등으로 분류되었으며, 그 중 腎陽虛가 주된 원인이다^{9,11)}.

補腎陽시키는 대표적인 약물인 巴戟은 <神農本草經>¹²⁾ 上品에 '巴戟天 味辛微溫 主大風邪氣 陰痿不起 強筋骨 安五藏 補中 增志益氣'라 수록된 후 陽虛有寒濕으로 인한 男性의 陽痿, 尿頻 등과 女性의 宮冷不孕, 月經不調 등에 널리 응용되어 왔다¹²⁻¹⁵⁾.

葉¹⁶⁾은 남성불임을 腎陽虛, 腎陰虛의 병리로 파악하여 溫補腎陽, 補腎益精하는 無比山藥丸, 固本健陽丸, 毓麟珠, 贊育丹, 還少丹 등의 처방에서 巴戟을 주로 사용하였으며, 七子散^{7,17)}, 保眞丸¹⁸⁾, 忘憂散¹⁹⁾, 固本健陽丹⁸⁾, 景岳贊育丹²⁰⁾, 還少丹²¹⁾ 등의 남성불임 치료 처방에도 巴戟이 사용되었다.

巴戟에 대한 실험 연구로는 기관지평활근 수축력 억제작용 및 자궁근 수축력 증가 작용²²⁾, 골다공증 개선 효과²³⁾, 수정란 발생율, FSH 및 progesterone 증가 효과²⁴⁾, 정자 수, 정자 운동성 및 정상 정자 비율 증가 효과²⁵⁾

등이 보고되었으나, 巴戟의 농도별 투약에 따른 효과 연구는 보고된 바 없다.

이에 著者は 濃度別 巴戟 投藥이 숫컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響을 알아보고자, 상이한 농도의 巴戟 檢液을 投與한 후 總精子數, 活動精子數, 正常形態精子數, 辜丸組織의 變化, 精子尖體 活性 및 抗酸化酵素 중 testicular peroxidase와 testicular catalase의 活性을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 藥材와 動物

1) 藥材

茜草科 (꼭두서니과 : Rubiaceae)에 속한 多年生 藤本植物인 *Morinda officinalis* How의 뿌리를 건조한 巴戟을 경희의료원 약제과에서 구입하여 사용하였다.

2) 動物

평균 체중 31.42±1.57g의 8주령 ICR 계통 숫컷 생쥐를 사용하였고, 12시간 소등과 점등 및 23℃ 조건의 사육실에서 사육하면서 물과 사료는 충분히 공급하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

巴戟 400g을 3차 증류수 (Ultrapure water systems, Milli-Q, USA) 1ℓ와 함께 용기 (Low density polyethylene)에 넣어 48시간 동안 60℃에서 전탕한 후 ultrasonic cleaners (Branson Model 5510, USA)로 60분간 물리적 자극을 가하여 용해를 촉진하였다. 추출한 시료는 여과지 (Whatman No. 5, USA)로 여과하여 1차 추출액을 얻었으며, 고상시료에는 추가적으로 3차 증류수 1ℓ를 가

해 ultrasonic cleaners로 30분간 물리적 자극을 가하고 여과지로 여과하여 2차 추출액을 얻은 후 1차 추출액과 합하였다. 최종 추출액은 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 감압 농축 (온도 60℃이하, 저압)하였다. 농축 시료는 -60℃에서 48시간 저온 냉각 (Temphold, Hanil, Korea)하고 동결 건조기 (CleanVac 8S, Hanil, Korea)에서 72시간 동안 동결 건조하여 최종 추출물 27.2g을 얻었다.

2) 檢液의 HPLC 分析

최종 抽出物의 有效成分을 확인하기

위하여 巴戟 抽出物 500mg에 50% 에탄올 50ml를 가하여 1시간 진탕 혼합하여 원심분리하고 잔사에 다시 50% 에탄올 50ml를 가하여 15분간 초음파추출을 2회 반복하고, 모든 액을 합하여 감압농축하여 얻은 乾固物에 50% 에탄올 50ml를 가하여, 0.1M H₃PO₄: CH₃CN (72:28, v/v) 을 이동상으로 Waters Spheisorb ODS1 column (40×250mm)을 이용하여 254nm에서 high preformance liquid chromatography (Water 996 Photodiode Array Detector)를 시행하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같았다.

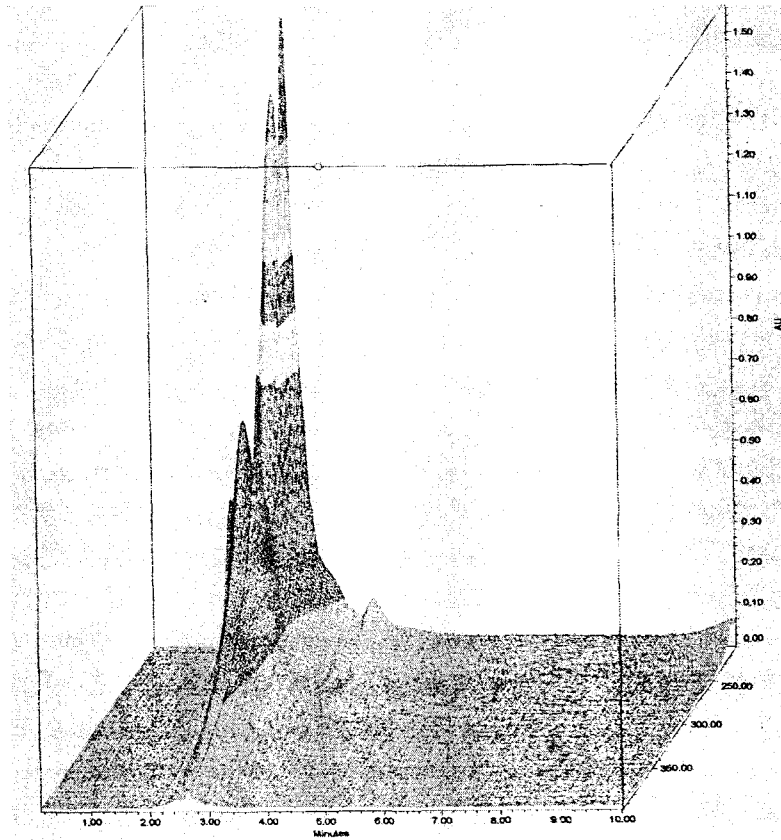


Fig. 1. HPLC result of *Morindae officinalis* How

3) 實驗群 設定과 檢液 投與

생쥐 25마리를 각 군 당 5마리씩 5군으로 무작위 배정하였다. 실험군은 巴戟의 농도에 따라 0.1mg/ml (이하 Sample A), 1 mg/ml (이하 Sample B), 10mg/ml (이하 Sample C), 100mg/ml (이하 Sample D)로 구분하여 파극 추출물을 1일 1회 60일 (생쥐 정상 정자생성기간)동안 0.2ml씩 경구 투여하였고, 대조군은 동일한 양의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.

4) 精液 採取

투약 종료후 1일에 경추분리법으로 생쥐를 도살하고, 외과적으로 精巢上體尾部를 적출하여 해부현미경 (Nikon, Japan) 하에서 미세주사침을 이용하여 精巢上體尾部의 精子塊를 분리하였다.

5) 總 精子數와 活動 精子數 測定

채취한 精子塊 10 μ l를 M2 배양액에滴下하여 CO₂ 배양기 (Forma, USA)에서 1시간 동안 浮游한 후, 부유액 5 μ l를 makler sperm counting chamber (Sofi, Israel)에滴下하여 200배 현미경 하에서 總 精子數와 活動 精子數를 측정하였다.

6) 精子의 形態 觀察

정자 부유액 10 μ l를 70% ethanol로 세척한 slide glass (Fisher, USA)에滴下한 후 cover slip (Fisher, USA)으로 도말하고, diff-quick kit (國際試藥, 日本)의 fixative로 15초간 고정, solution I에 10초, solution II에 5초간 도말 후, 공기건조시켜 200배 및 400배 현미경하에서 정자의 형태를 관찰하였다. 총 400개 정자를 관찰하여 정자의 두부, 중편부 및 미부가 정상인 정자의 수를 측정하고 총정자수에

대한 비율로 정자의 정상율을 측정하였다.

7) 睪丸組織 觀察

도살한 생쥐의 고환을 10% formalin (Junsei, Japan)에 고정하고 水洗한 후 ethanol (Merck, USA)로 저농도에서 고농도 순으로 각 단계별 한시간이 넘지 않도록 탈수를 시행하였다. 추가적으로 100% ethanol에서 1시간씩 2회 탈수 후 xylene (Junsei, Japan)으로 overnight cleaning하였다. 다음날 경질 paraffin wax (Oxford, USA)에 단계별로 2시간씩 mounting 후 회전 박절기 (Reichert-Jung Co., Germany)를 이용하여 0.1mm두께로 절단하였다. 탈파라핀 작업을 거친 뒤 hematoxylin-eosin (Sigma, USA)으로 염색하고, canada balsam (Junsei, Japan)으로 봉입 후 광학 현미경 (Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

8) 精子尖體 活性測定

정자 부유액을 0.14M sodium chloride 용액으로 5배 희석하여, 희석액 1ml에 0.1 ml acetate buffer (0.3mol/l, containing 0.45mol/l sodium chloride)와 0.1ml hyaluronic acid substrate를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다. 배양액에 60 μ l potassium tetraborate (0.8mol/l in water, pH10)를 첨가하고 100 $^{\circ}$ C heating block (Fisher, USA)에서 5분간 반응시켰다. 이를 얼음으로 냉각시킨 후 p-dimethylaminobenzaldehyde 2ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C water bath에서 20분간 배양하였다. 배양후 즉시 1500 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 582nm spectrophotometer (Beckman, Germany)

에서 hyaluronidase의 OD (optical density) 값을 측정하였다.

540nm 파장에서 catalase activity를 측정하였으며, 모든 sample은 2회씩 측정하였다.

9) 抗酸化酵素 分析

(1) Testicular peroxidase activity 分析
Cold buffer (50mM potassium phosphate containing 1mM EDTA, pH 7.0)에 적출 고환조직을 10mg/ml 농도로 넣고 homogenizer로 30초간 파쇄한 후 13,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다.

Luminescent용 96-well white plate (Griner, USA)에 standard diluent를 넣고 sample buffer를 50 μ l 넣은 후 원심분리된 상층액 50 μ l와 substrate 50 μ l를 넣은 다음 10초간 tapping하였다. Hydrogen peroxide trigger buffer를 50 μ l 넣고 chemiluminescent hydrogen peroxide detection kit (Assay Design, Inc., USA)로 chemiluminometer (Tecan, USA)를 사용하여 5초간 peroxidase activity를 측정하였으며 모든 sample은 2회씩 측정하였다.

(2) Testicular catalase activity 分析

ELISA용 96-well plate (Nunc, Denmark)에 assay buffer 100 μ l, methanol 30 μ l, formaldehyde standard와 sample 20 μ l 및 hydrogen peroxide 20 μ l를 넣은 후 실온에서 20분간 shaking하였다. 이후 30 μ l potassium hydroxide와 chromagen 30 μ l를 넣고 실온에서 10분간 shaking한 후, 10 μ l의 potassium periodate를 넣고 실온에서 5분간 shaking하고 catalase assay kit (Cayman Chemical, USA)로 ELISA reader (Tecan, USA)를 사용하여

10) 統計處理

통계는 SPSS ver 11.5를 이용하여 ANOVA test로 통계적 유의성을 검증하였으며, p<0.05인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였고, Tukey B로 multiple comparison test를 실시하였다.

III. 結果

1. 總 精子數, 活動 精子數 및 正常形態 精子數에 미치는 影響

總 精子數는 Sample A가 66.8 \pm 7.7 \times 10⁶ 개/ml, Sample B가 72.4 \pm 4.6 \times 10⁶개/ml, Sample C가 74.6 \pm 5.7 \times 10⁶개/ml, Sample D가 82.2 \pm 6.1 \times 10⁶개/ml로, 대조군의 42.6 \pm 4.9 \times 10⁶개/ml에 비하여 농도 의존적으로 유의한 증가 (p<0.01)를 보였다.

活動 精子數는 Sample A가 57.0 \pm 5.8 \times 10⁶개/ml, Sample B가 59.4 \pm 3.8 \times 10⁶ 개/ml, Sample C가 64.8 \pm 9.7 \times 10⁶개/ml, Sample D가 69.2 \pm 5.8 \times 10⁶개/ml로, 대조군의 27.2 \pm 5.9 \times 10⁶개/ml에 비하여 농도 의존적으로 유의한 증가 (p<0.01)를 보였다.

正常形態 精子數는 Sample A가 56.2 \pm 4.8 \times 10⁶개/ml, Sample B가 58.6 \pm 6.0 \times 10⁶ 개/ml, Sample C가 62.6 \pm 8.2 \times 10⁶개/ml, Sample D가 70.0 \pm 1.2 \times 10⁶개/ml로, 대조군의 25.4 \pm 4.3 \times 10⁶개/ml에 비하여 농도 의존적으로 유의한 증가 (p<0.01)를 보였다 (Table I, Fig. 2, Fig. 3).

Table 1. Effect of *Morindae officinalis Radix* Extract Solution on the Epididymal Sperm Parameters in the Mice

Groups	Sperm Parameters		
	Total Count ($\times 10^6/\text{mL}$)	Motile Sperm ($\times 10^6/\text{mL}$)	Normal Sperm ($\times 10^6/\text{mL}$)
Control (n=5)	42.6 \pm 4.9 ^{1)a2)}	27.2 \pm 5.9 ^a	25.4 \pm 4.3 ^a
Sample A (n=5)	66.8 \pm 7.7 ^b	57.0 \pm 5.8 ^b	56.2 \pm 4.8 ^b
Sample B (n=5)	72.4 \pm 4.6 ^{b,c}	59.4 \pm 3.8 ^{b,c}	58.6 \pm 6.0 ^b
Sample C (n=5)	74.6 \pm 5.7 ^{b,c}	64.8 \pm 9.7 ^{b,c}	62.6 \pm 8.2 ^{b,c}
Sample D (n=5)	82.2 \pm 6.1 ^c	69.2 \pm 5.8 ^c	70.0 \pm 1.2 ^c

1) Mean \pm standard deviation

2) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey B multiple comparison test.

Control: Mice administered normal saline

Sample A: Mice administered 0.1mg/mL *Morindae officinalis Radix* extract solution

Sample B: Mice administered 1mg/mL *Morindae officinalis Radix* extract solution

Sample C: Mice administered 10mg/mL *Morindae officinalis Radix* extract solution

Sample D: Mice administered 100mg/mL *Morindae officinalis Radix* extract solution

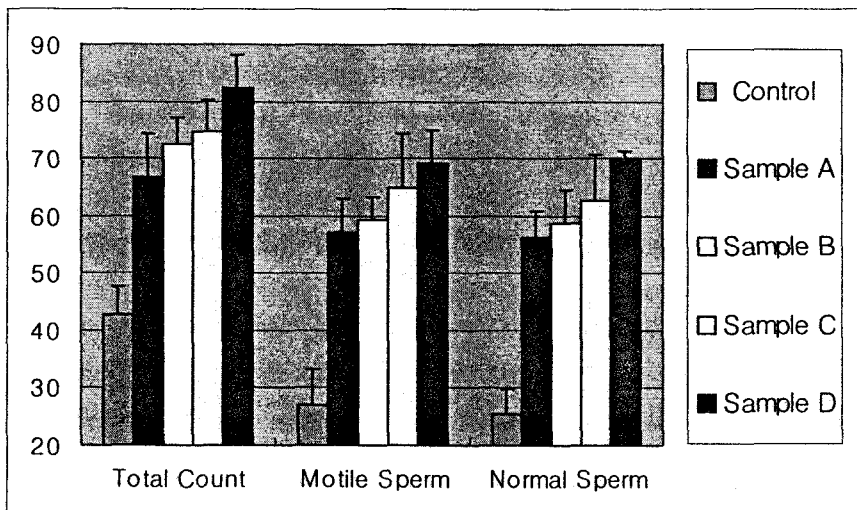


Fig. 2. Changes of the epididymal sperm parameters in the mice administered *Morindae officinalis Radix* extract solution

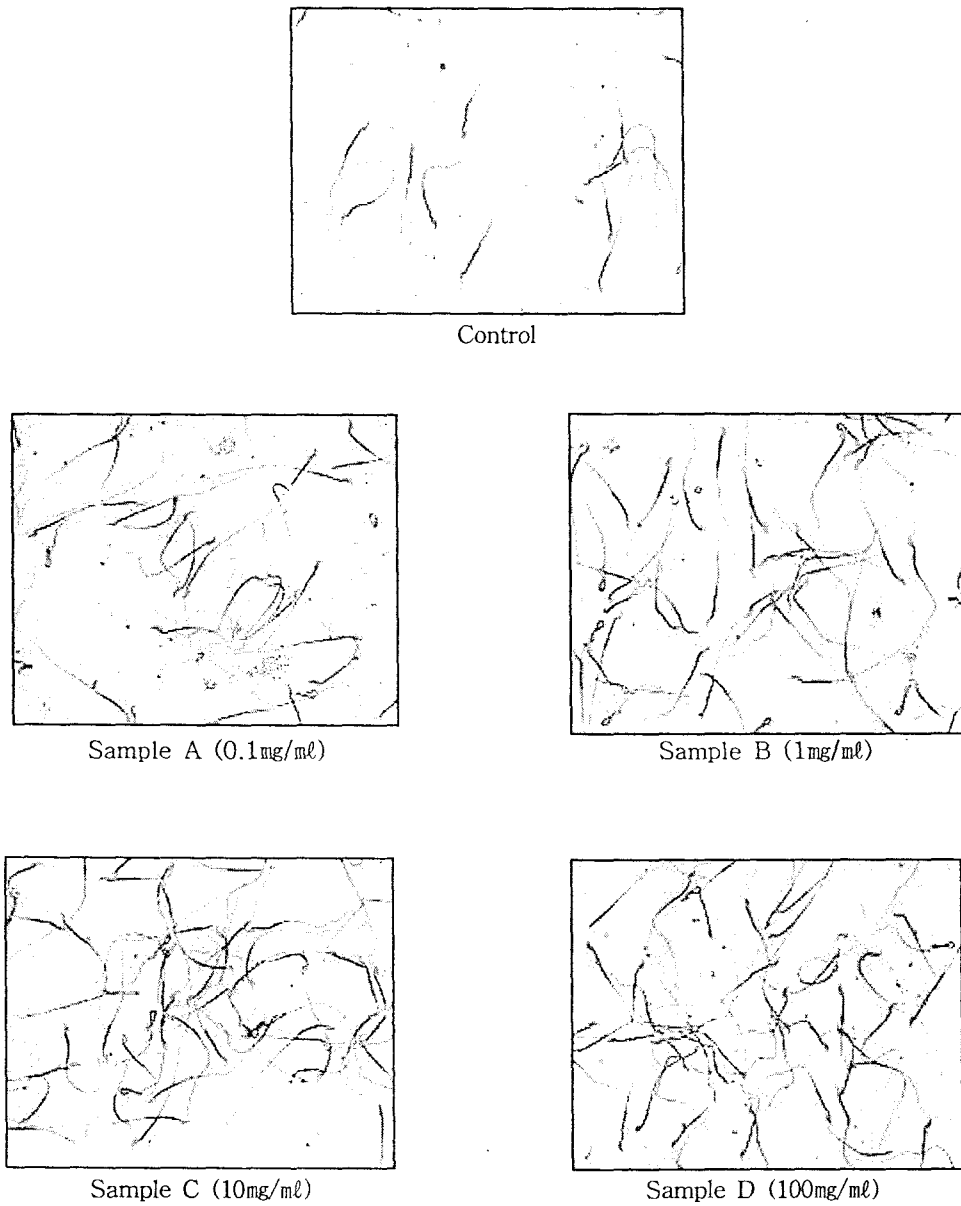


Fig. 3. Changes of the sperm count and morphology in the testis of mice administered *Morinda officinalis Radix* extract solution

2. 辜丸組織에 미치는 影響

고환조직을 해부현미경 (Nikon, Japan) 하에서 관찰한 결과 巴戟 投藥群은 고환조직내 정소엽 (testicular lobe)의 직

경이 대체로 크게 관찰되었으며 특히 정소엽 간의 혈관형성이 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 4, Fig. 5).

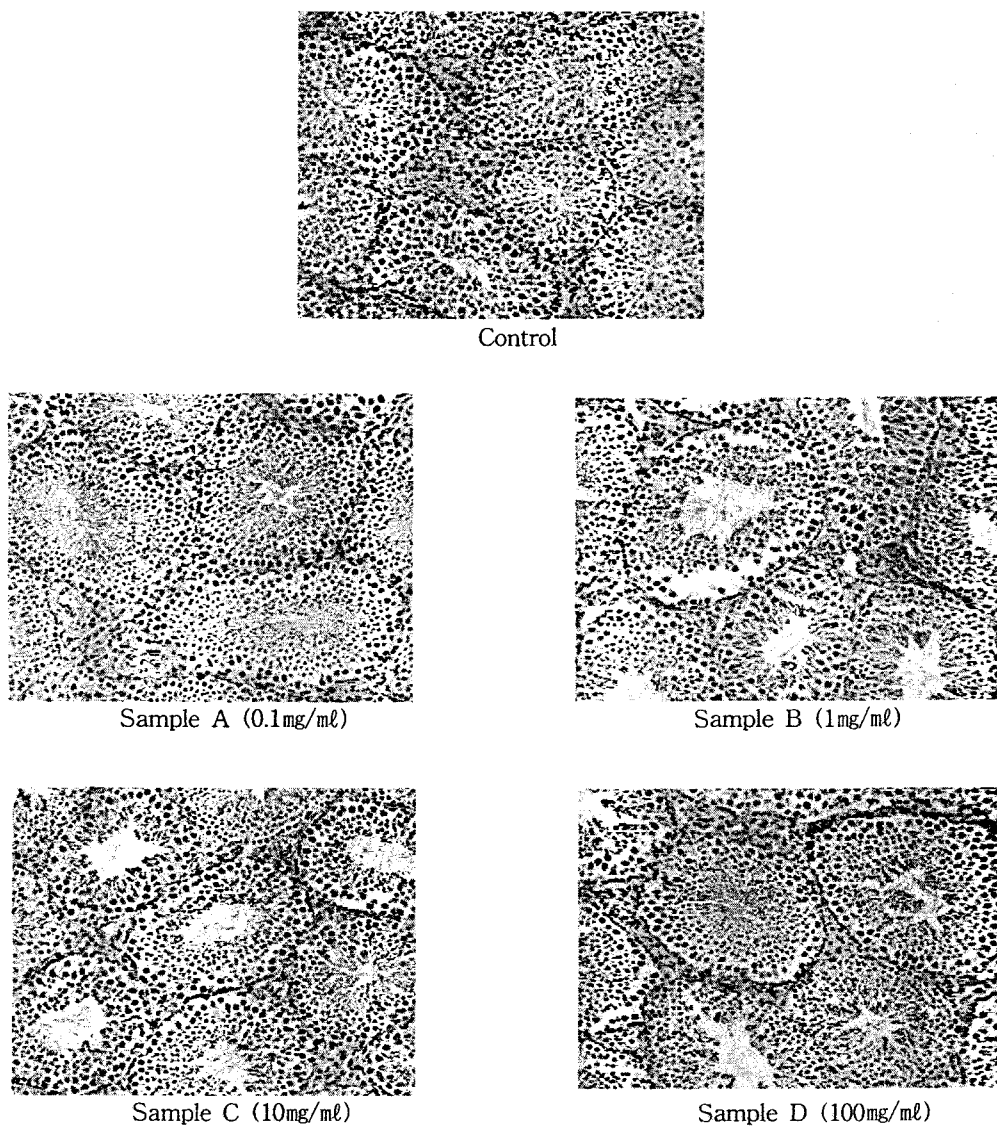


Fig. 4. Changes of tissue in the testis of mice administered *Morindae officinalis radix* extract solution ($\times 200$)

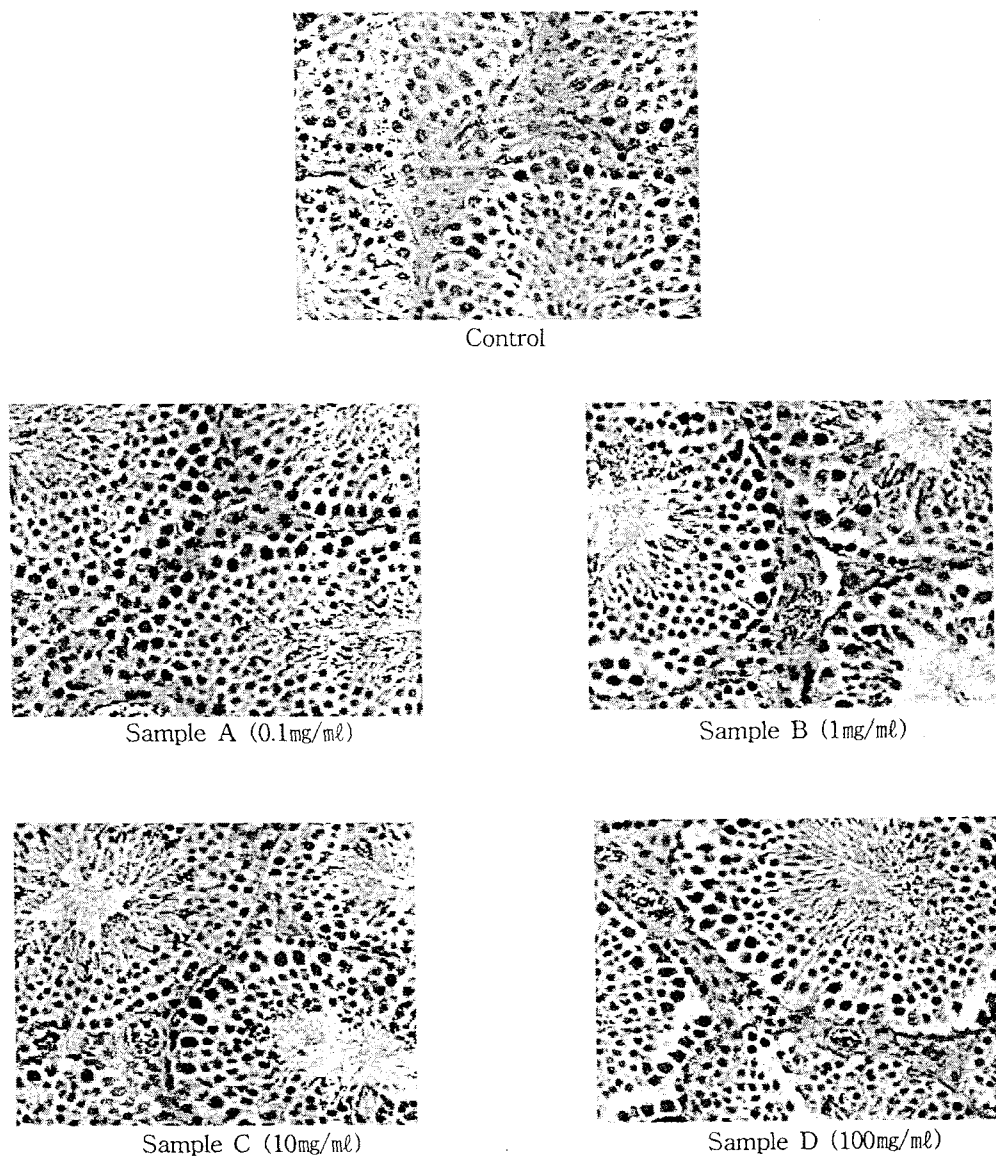


Fig. 5. Changes of tissue in the testis of mice administered *Morinda officinalis radix* extract solution ($\times 400$)

3. 精子尖體 活性에 미치는 影響

Hyaluronidase의 흡광도는 Sample A가 0.2500±0.0031μmol/NAG/min/ℓ, Sample B가 0.2540±0.0026μmol/NAG/min/ℓ, Sample C가 0.2400±0.0038μmol/NAG/min/ℓ, Sample D가 0.2380±0.0028μmol/NAG/min/ℓ로, 대조군의 0.0403±0.0016μmol/NAG/min/ℓ에 비하여 유의한 증가 (p<0.01)를 보였으나, 巴戟 投藥 群 간의 차이는 없었다 (Table II).

Table II. Effect of *Morindae officinalis Radix* Extract Solution on the Sperm Hyaluronidase Activity in the Mice

Groups	Sperm hyaluronidase activity (μmol/NAG/min/ℓ)
Control (n=5)	0.0403±0.0016 ^{1)a2)}
Sample A (n=5)	0.2500±0.0031 ^b
Sample B (n=5)	0.2540±0.0026 ^b
Sample C (n=5)	0.2400±0.0038 ^b
Sample D (n=5)	0.2380±0.0028 ^b

- 1) Mean±standard deviation
- 2) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey B multiple comparison test.
- Control: Mice administered normal saline
- Sample A: Mice administered 0.1mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution
- Sample B: Mice administered 1mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution
- Sample C: Mice administered 10mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution
- Sample D: Mice administered 100mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution

4. 抗酸化酵素에 미치는 影響

1) Testicular peroxidase activity

Testicular peroxidase 활성도는 Sample A가 23.07±2.3763nmol/min/ml, Sample B가 24.38±1.5197nmol/min/ml, Sample C가 18.65±1.9280nmol/min/ml, Sample D가 21.69±0.3398nmol/min/ml로, 대조군의 14.86±

0.2685nmol/min/ml에 비하여 유의한 증가 (p<0.01)를 보였다. 投藥群 간의 testicular peroxidase activity를 비교하여 본 결과 Sample B가 타 군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 (Table III).

Table III. Effect of *Morindae officinalis Radix* Extract Solution on the Activity of Testicular Peroxidase in the Testis of the Mice

Groups	Testicular peroxidase (nmol/min/ml)
Control (n=5)	14.86±0.2685 ^{1)a2)}
Sample A (n=5)	23.07±2.3763 ^b
Sample B (n=5)	24.38±1.5197 ^{b,c}
Sample C (n=5)	18.65±1.9280 ^c
Sample D (n=5)	21.69±0.3398 ^c

- 1) Mean±standard deviation
- 2) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey B multiple comparison test.
- Control: Mice administered normal saline
- Sample A: Mice administered 0.1mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution
- Sample B: Mice administered 1mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution
- Sample C: Mice administered 10mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution
- Sample D: Mice administered 100mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution

2) Testicular catalase activity

Testicular catalase 활성도는 Sample A가 0.4513±0.0457nmol/min/ml, Sample B가 0.4472±0.1005nmol/min/ml, Sample C가 0.3819±0.0210nmol/min/ml, Sample D가 0.3585±0.0532nmol/min/ml로, 대조군의 0.3224±0.0298nmol/min/ml에 비하여 유의한 변화는 나타나지 않았다 (Table IV).

Table IV. Effect of *Morindae officinalis Radix* Extract Solution on the Activity of Testicular Catalase in the Testis of the Mice

Groups	Testicular catalase (nmol/min/ml)
Control (n=5)	0.3224±0.0298 ¹⁾
Sample A (n=5)	0.4513±0.0457
Sample B (n=5)	0.4472±0.1005
Sample C (n=5)	0.3819±0.0210
Sample D (n=5)	0.3585±0.0532

1) Mean±standard deviation

Control: Mice administered normal saline

Sample A: Mice administered 0.1mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution

Sample B: Mice administered 1mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution

Sample C: Mice administered 10mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution

Sample D: Mice administered 100mg/ml *Morindae officinalis Radix* extract solution

IV. 考察

남성의 생식능력이 감소하는 추세에 있으며, 정상적인 남성에서도 연령과 무관하게 정자의 수, 운동성 및 정상 정자 비율의 감소 경향이 보고되었다^{2,5)}. 그 유발요인은 고환암, 요도하열, 잠복고환 등 생식기 질환과 기형, 생식기의 감염, 주변환경으로부터 estrogen 또는 anti-androgen 유사작용을 하는 내분비 교란물질 (endocrine disrupting compound)에 대한 노출 등으로 알려져 있다^{2,3,5)}.

남성불임은 발생기전에 따라 정자형성장애, 정자수송로폐쇄, 정액성분이상, 성교이상, 정자성숙부전, 내분비기능이상 및 특발성으로 구분되어지며^{9,11)}, 국내 남성불

임의 원인별 빈도는 원인미상의 특발성이 가장 많았고^{5,11,26)}, 정계정맥류, 정로폐쇄, 성염색체이상, 감염질환, 외상, 정류고환 및 기타 고프로락틴혈증 및 역행성 사정순으로 보고되었다²⁷⁾. 특발성 남성불임은 Y염색체 미세결실 등 유전적 요인⁵⁾, 정자의 운동성, 결합능 및 수정능 감소를 야기하는 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 증가^{28,29)}, 난자 투명대를 투과하는 침체효소의 이상^{30,31)} 등이 원인이다.

남성 불임에 대한 치료는 내과적 치료, 외과적 수술 및 보조생식술로 대별되나⁶⁾, 정계 정맥류와 같이 수술로 교정할 수 있는 경우와 성선자극 호르몬 이상과 같은 호르몬제의 투여로 교정할 수 있는 경우 외에는 대부분 적절한 치료법 없이 성선자극호르몬제, 남성호르몬제, 항여성호르몬제 등의 경험적 요법을 시도하고 있으나 그 효과는 미미한 실정이며, 주로 체외수정, 미세조작술 등의 생식보조술에 의존하고 있는 실정이다^{6,26)}.

남성불임의 한의학적 원인으로 《靈樞·經筋》³²⁾에서는 寒熱로 인한 陽痿, 巢³³⁾, 張²⁰⁾, 王¹⁸⁾, 林³⁴⁾, 陳³⁵⁾은 精液異常, 張³⁶⁾, 葉¹⁶⁾은 腎虛, 孫⁷⁾과 陳¹⁷⁾은 五勞, 七傷 등의 虛勞로 보았으며, 近來의 醫書를 聚合하여 病因 病機를 구분하여 보면 腎陽虛, 腎陰虛, 肝鬱氣滯, 痰濕內蘊, 氣血兩虛, 氣滯血鬱, 脾腎兩虛 등으로 분류된다⁹⁾.

남성불임의 치료적 접근에 있어 《神農本草經》¹²⁾에서 남성불임을 치료하는 藥材로 陽起石을 언급하였고, 《金匱要略》³⁶⁾에서 失精家에 桂枝加龍骨牡蠣湯으로 主한다는 외에 唐代的 孫⁷⁾이 최초로 “男服七子散”이라 하여 남성불임의 治療處方を 제시한 이후로, 五子衍宗丸, 保真丸, 聚精

丸¹⁸⁾, 七子散, 慶雲散^{7,17)}, 忘憂散¹⁹⁾, 五子衍宗丸³⁷⁾, 固本健陽丹, 六味地黃丸⁸⁾, 景岳贊育丹²⁰⁾, 還少丹, 金鎖思仙丹²¹⁾ 등의 治療處方이 제시되어 溫補腎陽, 滋陰補腎, 疏肝解鬱, 燥濕化痰, 補益氣血, 活血化瘀, 補益脾腎의 治療를 하되, 腎陽虛로 인한 不妊이 위주가 된다고 할 수 있다⁹⁾.

남성불임 治療에는 肉蓯蓉, 附子, 韭子, 肉桂, 鹿角, 淫羊藿, 巴戟 등의 補腎陽 藥物이 頻用되며³⁸⁾ 이 중 巴戟은 甘辛微溫無毒하고 肝, 腎經으로 들어가서 補腎助陽, 祛風除濕의 효능이 있어 腎陽虛와, 腎陽虛에 기인한 風寒濕痺를 主治하며, 陽痿遺精, 宮冷不孕, 少腹冷痛, 小便不禁, 風濕痺痛, 腰膝痠痛, 筋骨痿軟 등의 下焦虛寒症을 治療한다^{13,14)}. 巴戟은 腎陽虛로 인한 男性不育의 治療 處方인 七子散^{7,17)}, 保眞丸¹⁸⁾, 忘憂散¹⁹⁾, 固本健陽丹⁸⁾, 景岳贊育丹²⁰⁾, 還少丹²¹⁾ 등에 사용되고 있다.

한약을 이용한 남성불임 연구로는 환경호르몬으로 알려진 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin로 유발된 고환손상 治療^{39,40)}, 정액이상에 의한 남성불임에 대한 홍삼추출물의 효과⁴¹⁾, 少腹逐瘀湯의 acrosin activity 활성화³⁰⁾ 및 免絲子⁴²⁾, 紫河車⁴³⁾, 淫羊藿⁴⁴⁾ 투약이 숫컷 생쥐의 정자수, 운동성, 정상정자 비율을 증가시켰다는 보고가 있었다.

최²⁵⁾는 巴戟 投藥이 숫컷 생쥐의 정자수, 운동성, 정상정자 비율 및 항산화효소 중 testicular catalase와 testicular peroxidase의 활성에 미치는 영향을 보고한 바 있으나, 濃度別 投藥에 대한 효과는 보고된 바 없다.

이에 著者는 濃度別 巴戟 投藥이 숫컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響을 알아보고자, 상이한 농도의 巴戟 檢液을 投與한

후 總 精子數, 活動 精子數, 正常形態 精子數, 睪丸組織의 變化, 精子尖體 活性 및 抗酸化酵素 중 testicular peroxidase와 testicular catalase의 活性을 관찰하였다.

總 精子數, 活動 精子數 및 正常形態 精子數에 대하여 巴戟 投藥群은 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의한 증가를 나타내었다.

巴戟 檢液 投與후 고환조직을 관찰한 결과 고환조직내 정소엽의 직경이 대체로 크게 관찰되었으며, 특히 정소엽 간의 혈관형성이 뚜렷하게 관찰되었다. 이는 巴戟 檢液 投與로 고환조직의 성숙과 발달이 촉진되었음을 의미하며, 혈관형성의 촉진으로 인해 고환내 정자 형성이 증가되었음을 유추할 수 있었다.

Hyaluronidase는 침체활동 동안 정자두부에서 분비되는 효소로, 수정시 난자의 투명대를 뚫는 역할을 하며, hyaluronic acid는 난포막 세포의 extracellular matrix에 존재하며 hyaluronidase에 의하여 분해된다¹⁾. Hyaluronidase의 낮은 활성은 정자의 수정 효율을 감소시키므로, 최근 불임 분야에서는 sperm motility와 morphology 외에도 semen hyaluronidase activity와 sperm characteristics의 관계에 관하여 연구가 진행중이다^{30,31)}.

巴戟 檢液 投與후 hyaluronidase activity를 측정된 결과에서는 巴戟 投藥群 전체가 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가된 활성도를 나타내었으나, 巴戟 抽出物 投藥濃度와는 무관하였다.

산소분자는 전자를 획득하여 환원되는 과정에서 더욱 활발한 반응을 할 수 있는 superoxide이온, 수산화기, hypochlorite radical 등의 불안정한 산소기를 가진 ROS를 형성한다^{28,29)}. ROS는 정자 세포막 불포

화지방산을 공격하여 과산화시킴으로 인해 세포막 이상, 정자 운동성 감소, 정자첨체 반응 이상, 수정률 저하를 야기하는 것으로 알려져 있다^{28,29,45)}.

활성산소를 조절하기 위해 생체 내에는 다양한 항산화기전이 존재하며, 정자기능에 연관된 항산화제로는 superoxide dismutase, catalase, peroxidase가 있다. Catalase는 백혈구에서 발생한 O₂를 제거하며 생식기의 염증 시에 정자를 보호하는 역할을 하며, peroxidase는 지질과산화의 억제에 의한 운동성의 호전과 정자핵의 응축에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁴⁵⁾.

巴戟 檢液 投與가 고환조직내 항산화제인 testicular peroxidase와 testicular catalase의 활성에 미치는 영향을 실험한 결과, testicular peroxidase 활성만 巴戟 投藥群 전체에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였으나, testicular catalase 활성은 유의한 차이가 나타나지 않았다.

이상의 실험 결과를 통해 종합해 보면, 巴戟 檢液은 濃度別로 숫컷 생쥐의 總精子數, 活動精子數, 正常形態精子數를 증가시켰고, 睪丸組織의 정소엽 간의 혈관증식, 정소엽의 크기를 증가시켰으며, 精子尖體 酵素인 hyaluronidase activity를 증가시켰고, testicular peroxidase의 활성을 증가시켰으므로 숫컷 생쥐의 생식능력 개선에 유효함을 확인할 수 있었다.

V. 結 論

濃度別 巴戟 投藥이 숫컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響을 알아보고자, 상이한 농도의 巴戟 檢液을 投與한 후 總精子數, 活動精子數, 正常形態精子數, 睪丸組織

의 變化, 精子尖體 活性 및 抗酸化酵素 중 testicular peroxidase와 testicular catalase의 活性을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 總精子數, 活動精子數 및 正常形態精子數에 대하여 巴戟 投藥群은 대조군에 비해 농도 의존적인 증가를 나타내었다.
2. 睪丸組織은 巴戟 投藥 후 정소엽의 직경이 크게 증가하였고, 정소엽 간의 혈관 형성이 뚜렷하게 관찰되었다.
3. Hyaluronidase activity는 巴戟 投藥群에서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으나, 投藥群 간의 차이는 관찰되지 않았다.
4. Testicular peroxidase 활성은 巴戟 投藥群에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과에서 巴戟 投藥은 남성불임 치료에 유의한 효과를 나타내었으므로, 향후 이에 관한 실험 연구와 임상 자료 축적이 필요할 것으로 사료된다.

□ 투 고 일 : 2005년 04월 27일

□ 심 사 일 : 2005년 05월 02일

□ 심사완료일 : 2005년 05월 10일

參考文獻

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학(제 3판). 서울: 칼틴서적. 1997; 598-647.
2. Jouannet P. et al. Semen quality and male reproductive health: the contro

- versy about human sperm concentration decline. *APMIS*. 2001; 109: 333-344.
3. Auger J. et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*. 1995; 332(5): 281-285.
 4. Ben-Chetrit A. et al. In vitro fertilization outcome in the presence of severe male factor infertility. *Fertil Steril*. 1995; 63(5): 1032-1037.
 5. 이경호, 이정민, 이건수. 남성불임의 유전적 요인 및 불임유전자 연구 현황. *대한내분비학회지*. 2001; 16(6): 550-561.
 6. 민현기. 임상 내분비학. 서울: 고려의학. 1990; 457-474.
 7. 孫思邈. 備急千金要方. 서울: 一中社. 1988; 16-18.
 8. 龔廷賢. 增補萬病回春(下). 서울: 一中社. 1991; 98.
 9. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울: 東洋醫學研究院. 1993; 712-726.
 10. 金吉燮, 徐雲教, 鄭智天. 男性不妊症의 治療에 對한 文獻的 考察. *韓醫學研究所論文集*. 1994; 3: 151-162.
 11. 김하영, 이희영. 男性不妊症: IX. 男子不妊症의 臨牀的 考察. *대한비뇨기과학회지*. 1980; 21(3): 221-229.
 12. 徐樹楠, 牛兵占 編. 神農本草經. 河北: 河北科學技術出版社. 1994; 21.
 13. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울: 永林社. 1998; 549-550.
 14. 陳貴廷. 本草綱目通釋. 北京: 學苑出版社. 1992; 515.
 15. 黃宮綉. 本草求真. 北京: 人民衛生出版社. 1971; 44-45.
 16. 葉桂. 葉天士女科. 서울: 大星文化社. 1995; 395-410.
 17. 陳自明. 婦人大全良方. 北京: 人民衛生出版社. 1985; 288, 299.
 18. 王肯堂. 六科準繩. 臺北: 新文豐出版社. 1979; 265.
 19. 陳士鋒. 辨證奇聞. 北京: 中國中醫藥出版社. 1995; 323.
 20. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울: 翰成社. 1983; 731.
 21. 李梴. 編註醫學入門. 서울: 大星文化社. 1989; 460.
 22. 최정화, 홍석, 정현우. 巴戟天의 實驗的 研究(第 1報). *大韓本草學會誌*. 1996; 11(1): 117-125.
 23. 석재욱, 이정훈, 한상원. 巴戟天 藥鍼이 卵巢摘出로 誘發된 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2000; 17(3): 140-150.
 24. 尹熙靜 등. 巴戟이 생쥐의 體外受精 및 생식 호르몬에 미치는 影響. *慶熙韓醫大論文集*. 1998; 21(1): 433-445.
 25. 崔恩美. 巴戟이 白鼠의 精子 形成과 抗酸化酵素에 미치는 影響. *慶熙大學校 大學院 碩士學位論文*. 2004.
 26. 서울대학교 의과대학. 생식의학 및 가족계획. 서울: 서울대학교 출판부. 1998; 125-134.
 27. 박남철 등. 남성불임: 최근 10년간의 임상통계학적 분석. *대한비뇨기과학회지*. 1996; 37(8): 939-946.
 28. 백재승. 남성불임과 활성산소. *대한남성과학회지*. 2003; 21(1): 1-11.
 29. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *J Urol*. 1996; 48(6): 835-850.

30. Yang CC, Chen YS, Chung JG. Effects of Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang on motility of human sperm. *Am J Chin Med.* 2003; 31(4): 573-579.
31. Cui YH, Wang Q, Zhang ZY. Determination of sperm acrosin activity for evaluation of male fertility. *Asian J Androl.* 2000; 2: 229-232.
32. 楊維傑編. 黃帝內經靈樞. 서울: 成輔社. 1980; 49, 167, 271.
33. 丁光迪 主編. 諸病源候論校注. 北京: 人民衛生出版社. 1992; 19.
34. 林珮琴. 類證治裁. 台北: 旋風出版社. 1970; 464-465.
35. 陳士澤. 石室秘錄. 北京: 中國中醫藥出版社. 1984; 162.
36. 張仲景. 金匱要略. 北京: 人民衛生出版社. 1989; 158-159.
37. 朱震亨. 新編丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社. 1999; 323.
38. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울: 杏林出版. 1994; 278-282.
39. W. Kim, S. Hwang, S. Kim. Panax ginseng protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced testicular damage in guinea pigs. *BJU Internationl.* 1999; 83: 842-849.
40. Whang SY, Choi JS, Kim SK. Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *BJU Internationl.* 2004; 94: 663-668.
41. 김용태 등. 홍삼추출물의 남성불임 치료 효과. *대한남성과학회지.* 2002; 20(2): 94-99.
42. Han JY, Jang JB, Lee KS. Effects of *Cuscutae Semen* on the reproductive competence of male mice. *J Oriental OB & GY.* 2003; 16(1): 136-142.
43. 朴大淳 등. 紫河車가 숫컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響. *大韓韓方婦人科學會誌.* 2004; 17(2): 1-10.
44. 金承賢 등. 淫羊藿이 흰쥐 정자의 운동성에 미치는 영향. *大韓韓方婦人科學會誌.* 2004; 17(2): 52-63.
45. 박남철 등. Rebamipide의 사람 정액 내 항산화효과. *대한비뇨기과학회지.* 2002; 43(4): 332-338.