

원 저

수컷 생쥐 生殖能力에 대한 巴戟의 投藥期間別 效果

오재성, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭

경희대학교 한의과대학 부인과학교실

Administration Duration Dependent Effects of *Morindae Radix* Extract Solution on Reproductive Capacities in Mice

Jae-Sung Oh, Chang-hun Lee,
Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Objective: These studies were undertaken to evaluate the effects of the different administration duration of *Morindae Radix* extract solution on spermatogenic abilities such as concentration, motility and morphological normality of sperm from the testes and the activities of sperm hyaluronidase.

Materials and Method: We used 8-week-old ICR mice and administered 0.3mg/g extract solution of *Morindae Radix* once a day for 30, 60, 90 and 120 days. The control group was administered normal saline in the same way and duration. We examined the number of total, motile and normal sperm from the cauda epididymis. We also compared the testicular tissue, especially seminiferous tubules, between the control and treated groups by histochemical methods. Finally, we observed the difference of sperm hyaluronidase activities between the control and treated groups.

Results: Significant administration duration-dependent differences were observed in the concentration of total sperm, motility and normality of spermatozoa of the *Morindae Radix* extract solution administered groups compared to the control group. 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 Radix* extract solution administered groups compared to the control group. Also, the activity of hyaluronidase was significantly increased in the *Morindae Radix* extract solution administered groups compared to the control group.

Conclusions: This study shows that the beneficial effect of *Morindae Radix* extract solution on the concentration, motility and morphology of sperm, the testicular tissues and the activities of sperm hyaluronidase increased the greater the duration the mice were administered it. We suggest that *Morindae Radix* may be useful for the treatment of male sexual dysfunction and infertility.

Key Words: *Morindae Radix*, mice, infertility, sperm hyaluronidase activity, sperm (atozoa)

緒 論

· 접수 : 2006년 8월 10일 · 논문심사 : 2006년 8월 12일
· 채택 : 2006년 8월 22일
· 교신저자 : 조정훈, 서울시 동대문구 회기동 경희대학교
부속한방병원 한방부인과
(Tel: 02-958-9166, Fax: 02-958-9165
E-mail: moxa@dreamwiz.com)

정상적인 부부생활에도 불구하고 1년 이내에 임신을 못하는 경우로 정의되는 불임은 전체 부부의 약 15%에서 나타난다¹⁾. 그 중 약 50%는 남성 측 요인이며²⁾, 최근 남성의 생식능력 저하 경향으로 인해 증가 추세에 있다^{3,4)}.

남성 불임의 원인은 정자 생성 과정의 장애를 야기하는 특발성이 대부분으로¹⁾, 술, 담배를 포함한 각종 화학물질, 약물, 대기오염 및 스트레스 등이 성선독소 (gonadotoxin)로 작용하여 정자의 생성, 형태 및 운동성을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다^{5,6)}.

한의학에서 불임은 不育, 絶子, 無子 및 無嗣라 칭하였으며, 남성불임의 病理는 氣衰, 精清, 早洩 및 精寒으로 구분된다⁷⁾. 남성불임의 원인은 腎陽虛, 腎陰虛, 肝鬱氣滯, 痰濕內蘊, 氣血兩虛, 氣滯血鬱 및 脾腎兩虛 등으로 분류하나, 腎陽虛가 주된 원인으로 補腎壯陽의 치법이 빈용된다^{8,9)}.

補腎陽의 대표적 약물인 巴戟은 甘辛微溫無毒하고 肝, 腎經으로 들어가 補腎助陽, 祛風除濕의 효능이 있어 陽痿遺精, 宮冷不孕, 少腹冷痛, 小便不禁, 風濕痺痛, 腰膝痠痛 및 筋骨痿軟 등을 치료한다^{10,11)}.

여성 생식기능에 대하여 巴戟은 수정란 발생을, FSH 및 progesterone 증가 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다¹²⁾. 또한 남성 생식능력에 대하여 崔 등¹³⁾은 巴戟이 부고환의 무게, 정모세포의 수, 총 정자수, 정자 운동성 및 정상 정자 비율을 증가시켰음을 보고하였고, 許 등¹⁴⁾은 巴戟의 투여가 항산화효소의 활성 증가, 정소엽간의 혈관 형성증가를 보고하면서 특히 총 정자수, 정자 운동성 및 정상 정자 비율이 농도의존적으로 증가함을 보고한 바 있으나, 남성 생식능력에 대한 巴戟의 投藥期間別 효과에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

이에 著者는 수컷 생쥐의 정상 정자 생성기간인 60일을 기준으로 30일, 60일, 90일 및 120일간 巴戟 檢液을 投與한 후 投與期間別 總 精子數, 活動 精子數, 正常形態 精子數, 睪丸組織의 變化 및 精子尖體 活性을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 藥材와 動物

1) 藥材

茜草科 (꼭두서니과: Rubiaceae)에 속한 多年生

藤本植物인 巴戟天 *Morindae officinalis* How.의 뿌리를 건조한 巴戟 (*Morindae Radix*)을 경희의료원 약제과에서 구입하여 사용하였다.

2) 動物

평균 체중 31.40±1.49g의 8주령 ICR 계통 수컷 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 가해 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 동결건조기 (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 performance liquid chromatography

(Water 996 Photodiode Array Detector)를 시행하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같았다.

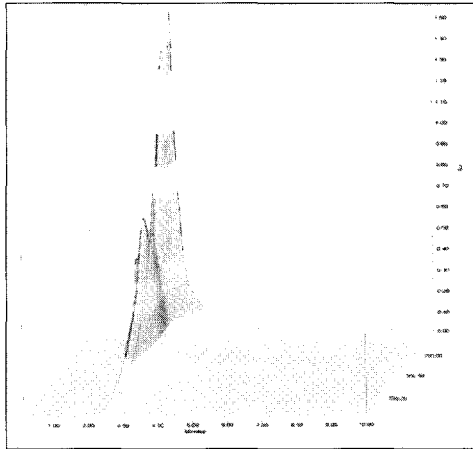


Fig. 1. HPLC result of *Morinda Radix*

3) 實驗群 設定과 檢液 投與

실험군은 투여기간별로 30일간 (실험군 A), 60일간 (생쥐 정상 정자생성기간, 실험군 B), 90일간 (실험군 C) 및 120일간 (실험군 D) 투여군으로 설정하고, 생쥐 40마리를 각 군당 10마리씩 무작위 배정한 후, 巴戟 檢液을 1일 1회 0.3mg/g으로 경구 투여하였고, 대조군은 20마리의 생쥐를 각 군당 5마리씩 무작위 배정한 후, 상응하는 실험군과 동일한 양의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.

4) 精子塊 分離

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

7) 辜丸組織 觀察

도살한 생쥐의 고환을 10% formalin (Junsei, Japan)에 고정하고 水洗한 후 ethanol (Merck, USA)로 저농도에서 고농도 순으로 각 단계별 1시간이 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 0.1mm 두께로 절단하였다. 탈과라핀 작업을 거친 뒤 hematoxylin-cosin (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 0.1ml acetate buffer (0.3mol/l, containing 0.45mol/l sodium chloride)와 0.1ml hyaluronic acid substrate (4mg hyaluronic acid was dissolved in 1 l water)를 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.

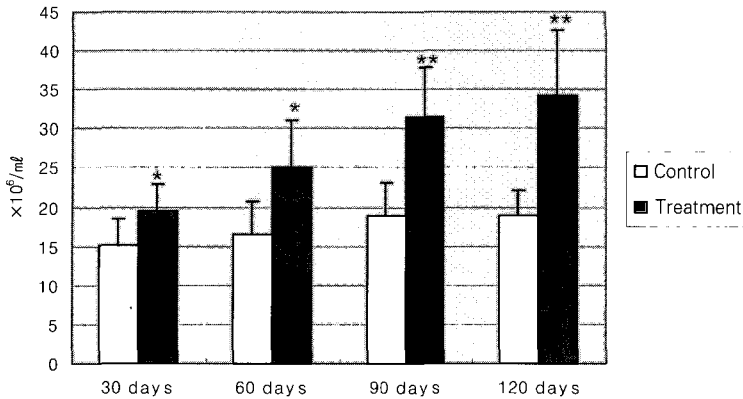


Fig. 2. Changes of the total sperm count in the mice administered *Morindae Radix* extract solution (*; p<0.05, **; p<0.01)

배양후 즉시 1500×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 582nm spectrophotometer (Beckman, Germany)에서 hyaluronidase의 optical density (이하 OD) 값을 측정하였다.

9) 統計處理

통계는 SPSS ver 11.5를 이용하여 실험군과 대조군간 비교는 Mann-Whitney U test로, 실험군간 비교는 ANOVA test로 통계적 유의성을 검증하였으며, post-hoc test는 Tukey B method를 실시하였고, 모든 결과는 p<0.05인 경우를 통계적 유의

성이 있는 것으로 판단하였다.

結果

1. 總精子數에 미치는 影響

總精子數는 실험군 A가 19.5±3.4×10⁶개/ml, 실험군 B가 25.0±6.1×10⁶개/ml로 각 대조군 15.2±3.3×10⁶개/ml와 16.6±4.2×10⁶개/ml에 비하여 유의한 증가 (p<0.05)를 나타내었으며, 실험군 C는 31.4±6.5×10⁶개/ml, 실험군 D는 34.3±8.4×10⁶개/ml

Table 1. Effect of *Morindae Radix* extract solution on the total sperm count in mice (×10⁶/ml)

Group	Control (n=5)	Treatment (n=10)	p-value ¹⁾
A	15.2±3.3 ²⁾	19.5±3.4 ³⁾	p<0.05
B	16.6±4.2	25.0±6.1 ^{a,b}	p<0.05
C	19.0±4.0	31.4±6.5 ^{b,c}	p<0.01
D	19.0±3.2	34.3±8.4 ^c	p<0.01

1) Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test between Control and Treatment in each group.
 2) Mean ± standard deviation
 3) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey B multiple comparison test.
 A: Mice administered for 30 days
 B: Mice administered for 60 days
 C: Mice administered for 90 days
 D: Mice administered for 120 days
 Control: Mice administered normal saline
 Treatment: Mice administered 0.3mg/g/day *Morindae Radix* extract solution

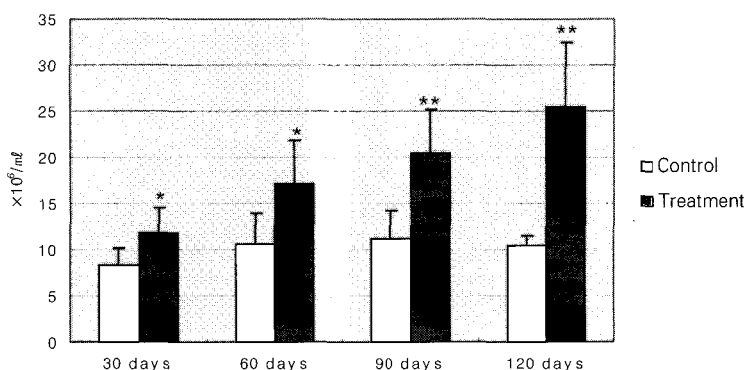


Fig. 3. Changes of the motile sperm count in the mice administered *Morindae Radix* extract solution (; p<0.05, **; p<0.01)

로 각 대조군 $19.0 \pm 4.0 \times 10^6$ 개/ml와 $19.0 \pm 3.2 \times 10^6$ 개/ml에 비하여 유의한 증가 ($p < 0.01$)를 나타내었다. 실험군 간 비교에서는 巴戟 檢液 투여기간이 길어질수록 통계적으로 유의한 ($p < 0.05$) 총 정자 수 증가를 나타내었다 (Table 1, Fig. 2).

2. 活動 精子數에 미치는 影響

活動 精子數는 실험군 A가 $11.8 \pm 2.8 \times 10^6$ 개/ml, 실험군 B가 $17.1 \pm 4.7 \times 10^6$ 개/ml로 각 대조군 $8.4 \pm 1.8 \times 10^6$ 개/ml와 $10.6 \pm 3.4 \times 10^6$ 개/ml에 비하여 유의한 증가 ($p < 0.05$)를 나타내었으며, 실험군 C는

$20.4 \pm 4.7 \times 10^6$ 개/ml, 실험군 D는 $25.5 \pm 7.0 \times 10^6$ 개/ml로 각 대조군 $11.2 \pm 3.0 \times 10^6$ 개/ml와 $10.4 \pm 1.1 \times 10^6$ 개/ml에 비하여 유의한 증가 ($p < 0.01$)를 나타내었다. 실험군 간 비교에서는 巴戟 檢液 투여기간이 길어질수록 통계적으로 유의한 ($p < 0.05$) 활동 정자 수 증가를 나타내었다 (Table 2, Fig. 3).

3. 正常形態 精子數에 미치는 影響

正常形態 精子數는 실험군 A가 14.5 ± 2.4 개, 실험군 B가 20.1 ± 4.8 개, 실험군 C가 25.1 ± 5.3 개, 실험군 D가 27.6 ± 6.3 개로 각 대조군 8.4 ± 2.1 개, 11.8

Table 2. Effect of *Morindae Radix* extract solution on the motile sperm count in mice ($\times 10^6$ /ml)

Group	Control (n=5)	Treatment (n=10)	p-value ¹⁾
A	$8.4 \pm 1.8^2)$	$11.8 \pm 2.8^{a3)}$	$p < 0.05$
B	10.6 ± 3.4	$17.1 \pm 4.7^{a,b}$	$p < 0.05$
C	11.2 ± 3.0	$20.4 \pm 4.7^{b,c}$	$p < 0.01$
D	10.4 ± 1.1	25.5 ± 7.0^c	$p < 0.01$

1) Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test between Control and Treatment in each group.

2) Mean \pm standard deviation

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

A: Mice administered for 30 days

B: Mice administered for 60 days

C: Mice administered for 90 days

D: Mice administered for 120 days

Control: Mice administered normal saline

Treatment: Mice administered 0.3mg/g/day *Morindae Radix* extract solution

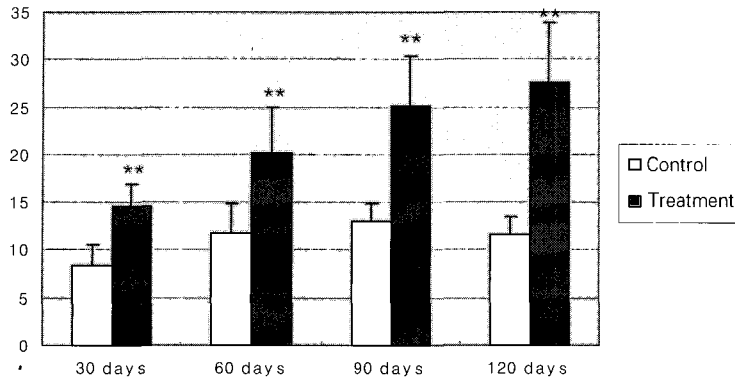


Fig. 4. Changes of the normal sperm count in the mice administered *Morindae Radix* extract solution (**; p<0.01)

±3.0개, 13.0±1.9개와 11.6±1.8개에 비하여 유의한 증가 (p<0.01)를 나타내었다. 실험군 간 비교에서는 巴戟 檢液 투여기간이 길어질수록 통계적으로 유의한 (p<0.05) 정상형태 정자수 증가를 나타내었다 (Table 3, Fig. 4, Fig. 5).

4. 睪丸組織에 미치는 影響

고환조직을 해부 현미경 하에서 관찰한 결과 모든 巴戟 投與群에서 고환조직내 정소엽 (testicular lobe) 직경이 대체로 크게 관찰되었으며 특히 정소엽 간의 혈관형성이 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig.

6, Fig. 7).

5. 精子尖體 活性에 미치는 影響

Hyaluronidase의 OD는 실험군 A가 0.2184 ±0.0078, 실험군 B가 0.2156±0.0036, 실험군 C가 0.2062±0.0156 및 실험군 D가 0.1916±0.0407로 각 대조군 0.1048±0.0080, 0.1068±0.0036, 0.1106 ±0.0095 및 0.1086±0.0032에 비하여 유의한 증가 (p<0.01)를 나타내었다. 실험군 간 비교에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 4, Fig. 8).

Table 3. Effect of *Morindae Radix* extract solution on the normal sperm count in mice

Group	Control (n=5)	Treatment (n=10)	p-value ¹⁾
A	8.4±2.1 ²⁾	14.5±2.4 ³⁾	p<0.01
B	11.8±3.0	20.1±4.8 ^{a,b}	p<0.01
C	13.0±1.9	25.1±5.3 ^{b,c}	p<0.01
D	11.6±1.8	27.6±6.3 ^c	p<0.01

1) Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test between Control and Treatment in each group.

2) Mean ± standard deviation

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

A: Mice administered for 30 days

B: Mice administered for 60 days

C: Mice administered for 90 days

D: Mice administered for 120 days

Control: Mice administered normal saline

Treatment: Mice administered 0.3mg/g/day *Morindae Radix* extract solution

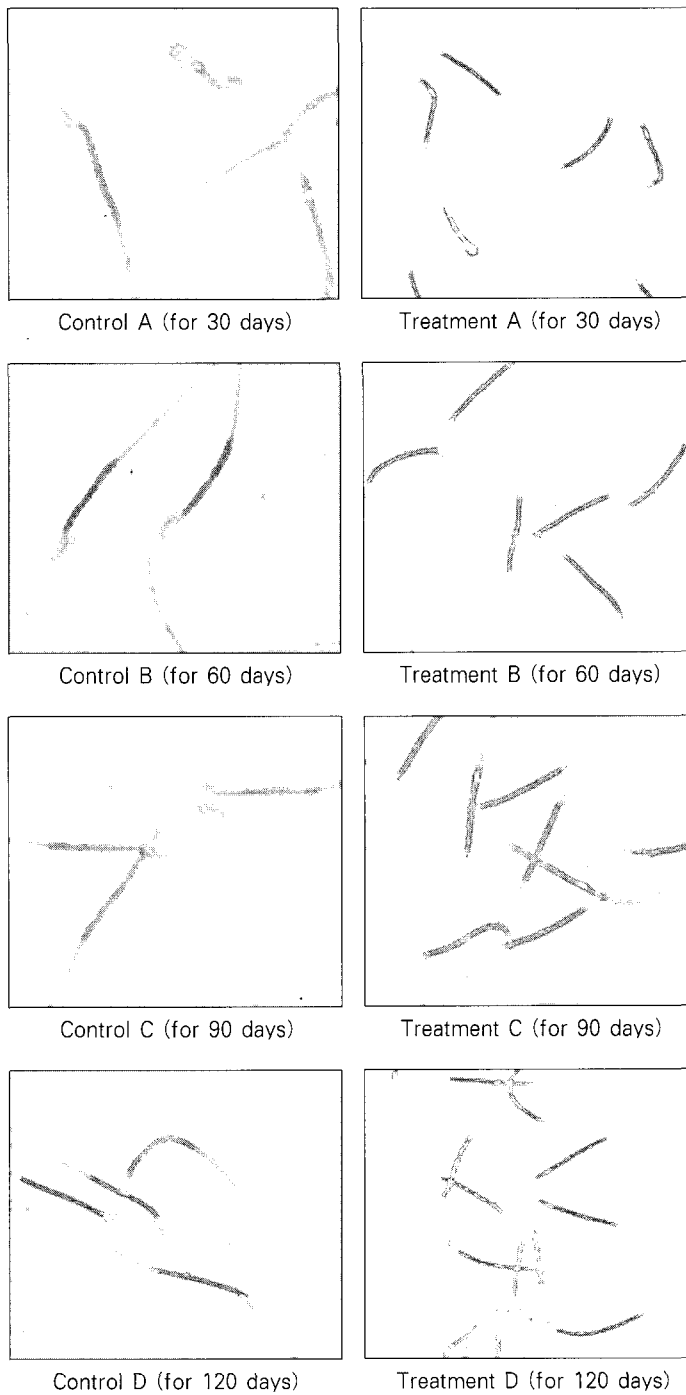


Fig. 5. Changes of the sperm count and morphology in the testis of mice administered *Morindae Radix* extract solution

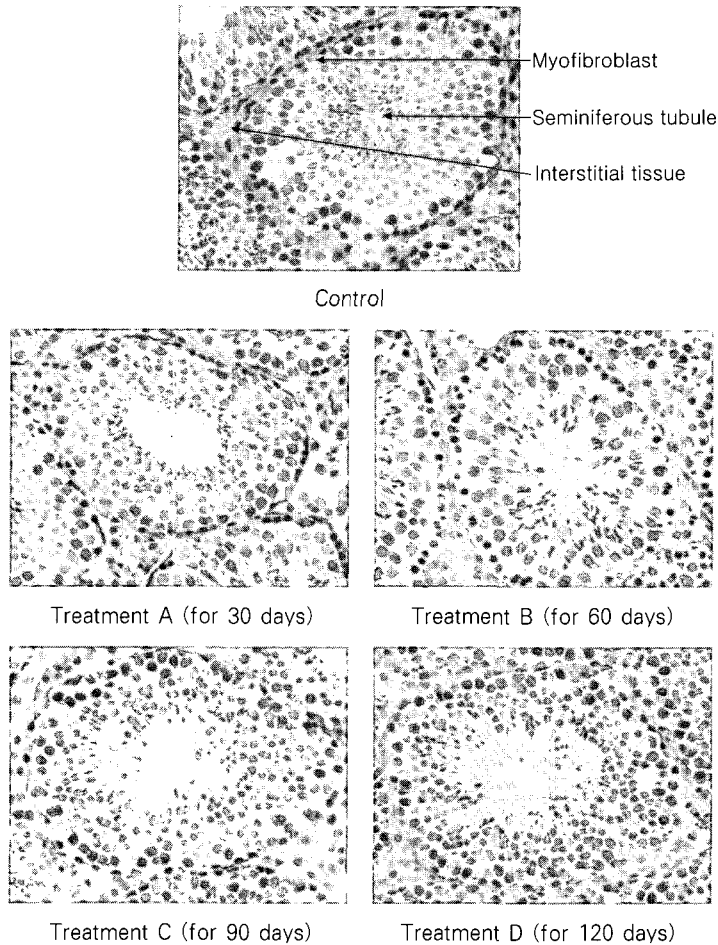


Fig. 6. Changes of tissue in the testis of mice administered *Morindae Radix* extract solution ($\times 200$)

考 察

전체 부부의 약 15%로 알려졌던 불임환자의 발생율이 최근 연간 0.5~1.0%정도씩 서서히 증가하고 있다. 특히 불임환자의 약 50%를 차지하는 남성 불임은 생식능력의 저하로 인해 증가하고 있으며, 최근에는 정상 성인의 정액검사에서도 정자농도의 감소와 함께 정자의 운동성 감소 및 정자의 형태학적 이상 빈도가 증가되는 것으로 보고되고 있다⁴⁾.

국내 남성 불임환자의 원인을 분석한 보고에서

는 원인 미상의 특발성 원인이 가장 많았고¹⁵⁾, 정계정맥류, 정로폐색, 성염색체 이상, 감염질환, 외상, 정류고환, 기타 고프로락틴혈증 및 역행성 사정 순으로 그 원인이 보고되었다^{16,17)}. 이와 같은 남성 생식능력의 전반적 감소 원인은 심리적 요인, 주변 환경에서 비롯된 내분비 교란 물질에 대한 노출¹⁸⁾, 전립선염 등의 생식기계의 감염과 염증반응, 염색체 이상^{19,20)} 및 활성산소²¹⁾ 등이 제시되고 있다.

남성 불임환자는 치료 가능 여부, 보조생식술 시행 가능성, 유전자 이상 유무 및 전체적인 건강

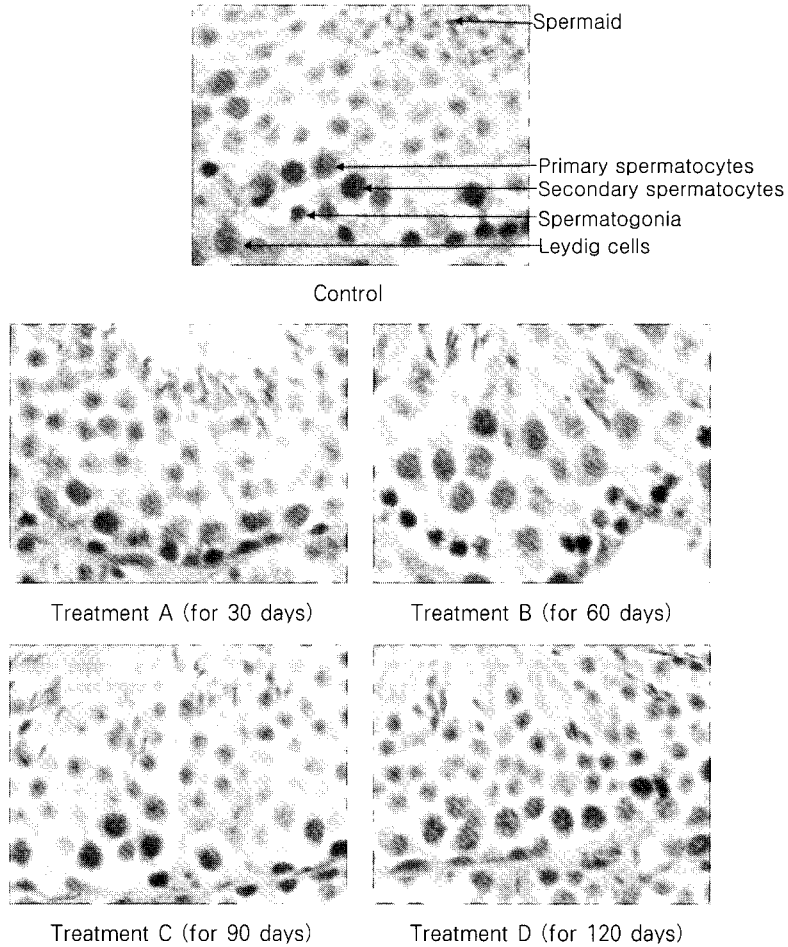


Fig. 7. Changes of tissue in the testis of mice administered *Morindae Radix* extract solution (×400)

상의 문제를 평가하기 위해 먼저 과거력 청취와 정액검사가 시행된다. 이 두 가지 중 한 가지에서 이상이 있으면 이학적 검사, 전면적인 과거력 청취와 2번 이상의 정액검사가 시행되며²²⁾, 정액검사 소견상 정액 용적은 2.0ml 이상, 총 정자수는 2×10^7 ml 이상, 운동성은 전방진행 50% 이상 또는 급속진행 25% 이상, 정상형태의 정자는 30% 이상이 정상범위로 간주된다²⁾.

남성 불임에 대한 치료는 내과적 치료, 외과적 치료 및 보조생식술로 나뉜다^{23,24)}, 대부분 체외수정, 미세조작술 등의 보조생식술에 의존하고 있

며, 정계 정맥류와 같이 수술로 확실히 치료할 수 있는 경우 외에는 스테로이드 제제, 항생제, 호르몬 치료 및 항에스트로겐 제제 등의 내과적 치료가 이루어지나, 그 효과는 낮은 것으로 보고되고 있다¹⁶⁾.

한의학에서는 남성 생식능력의 변화에 대하여 <黃帝內經>²⁵⁾에서는 腎氣가 쇠약해지면 精血이 부족해짐으로 인해 衝任脈이 허약해지고 天癸가 고갈되어 남성의 생식능력이 감소한다고 하였고, 이후 대부분의 역대의가²⁶⁻²⁹⁾들은 남성 불임의 주된 원인을 虛勞로 보았다³⁰⁾. 남성 불임의 病因은

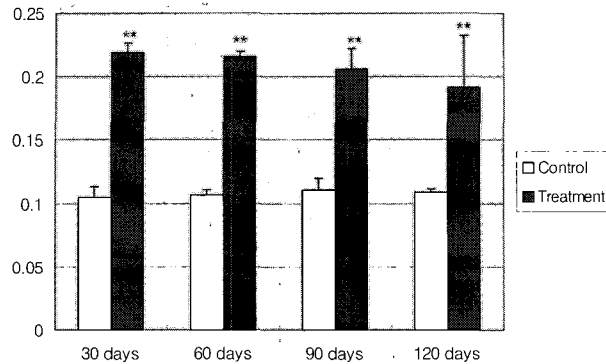


Fig. 8. Changes of the sperm hyaluronidase activity in the mice administered *Morindae Radix* extract solution (**; p<0.01)

腎陰陽虛, 肝氣鬱結, 脾腎兩虛, 濕熱下注, 痰濁凝滯 및 氣滯血瘀 등으로 각각 溫補腎陽, 滋陰補腎, 疎肝解鬱, 補益脾腎, 燥濕化痰, 補益氣血 및 活血化瘀 등의 治法를 사용하며⁹⁾, 그 중 腎陽虛가 차지하는 비중이 가장 높다^{8,30)}.

따라서 한의학에서는 남성 불임의 주된 치료 원칙을 益腎生精으로 보며³⁰⁾, 또한 寡慾, 節勞, 息怒, 戒酒 및 愼味の 생활규범과 導引術을 통한 養精法을 강조하였다⁷⁾. 특히 腎陽虛로 인한 男性不育에 대한 치료에는 補腎陽 약물인 肉蓯蓉, 附子, 韭子, 肉桂, 鹿角, 淫羊藿 및 巴戟 등이 자주 사용

되었다⁷⁾.

한약의 남성 생식능력에 대한 실험적 연구로는 黃芪³¹⁾와 山茱萸³²⁾의 정자 운동성 향상, 人蔘의 발기능력 향상과 다이옥신으로 인한 고환조직 손상 예방³³⁾, 厚朴의 지질 산화에 대한 정자의 운동성 보호³⁴⁾ 및 菟絲子³⁵⁾, 鹿茸³⁶⁾, 紫河車³⁷⁾ 및 淫羊藿³⁸⁾이 총 정자수, 활동 정자수 및 정상형태의 정자수를 향상시킨다는 연구가 보고된 바 있다. 또한 침치료를 통해 정자의 수와 운동성을 높였다는 보고^{18,39)}와 少腹逐瘀湯의 복용이 정자의 운동성과 침체 활동을 향상시킨다는 연구 결과가 있다⁴⁰⁾.

Table 4. Effect of *Morindae Radix* extract solution on the sperm hyaluronidase activity in mice

Group	Control (n=5)	Treatment (n=5)	p-value ¹⁾
A	0.1048±0.0080 ²⁾	0.2184±0.0078 ^{a,3)}	p<0.01
B	0.1068±0.0036	0.2156±0.0036 ^a	p<0.01
C	0.1106±0.0095	0.2062±0.0156 ^a	p<0.01
D	0.1086±0.0032	0.1916±0.0407 ^a	p<0.01

1) Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test between Control and Treatment in each group.

2) Mean ± standard deviation

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

A: Mice administered for 30 days

B: Mice administered for 60 days

C: Mice administered for 90 days

D: Mice administered for 120 days

Control: Mice administered normal saline

Treatment: Mice administered 0.3mg/g/day *Morindae Radix* extract solution

그 중 巴戟은 無比山藥丸, 固本健陽丸, 毓麟珠, 贊育丹 및 還少丹 등의 求嗣 목적의 처방에 주로 사용되었고⁴¹⁾, <神農本草經>⁴²⁾에서는 ‘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’이라 하여, 陽虛有寒濕證에 응용하는 補腎助陽의 대표적인 약물이다¹⁰⁾. 巴戟에 대한 약리 실험에서는 기관지평활근 수축력 억제 작용과 자궁근 수축력 증가 작용⁴³⁾, 골다공증 개선 효과⁴⁴⁾ 및 여성 생식기능 개선 효과¹²⁾ 등이 보고된 바 있다.

또한 남성 생식능력에 대하여 崔 등¹³⁾은 巴戟이 부고환의 무게, 정모세포의 수, 총 정자수, 정자 운동성 및 정상 정자 비율을 증가시켰음을 보고하였고, 許 등¹⁴⁾은 巴戟의 투여가 항산화효소의 활성 증가, 정소엽간의 혈관 형성증가를 보고하면서 특히 총 정자수, 정자 운동성 및 정상 정자 비율이 농도의존적으로 증가함을 보고한 바 있으나, 남성 생식능력에 대한 巴戟의 投藥期間別 效果에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

이에 著者는 수컷 생쥐의 정상 정자 생성기간인 60일을 기준으로 30일, 60일, 90일 및 120일간 巴戟 檢液을 投與한 후 投與期間別 總 精子數, 活動 精子數, 正常形態 精子數, 睪丸組織의 變化 및 精子尖體 活性을 관찰하였다.

정액검사상 정자수가 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 이하이거나 20% 미만의 운동성을 보일 경우 불임을 초래하는 것으로 알려져 있지만 정자의 형태, 정자 운동의 양상 및 정자 속도 등의 평가가 임신에 후에 더 많은 영향을 미친다²⁾.

巴戟 검액을 투여한 후 수컷 생쥐의 總 精子數, 活動 精子數 및 正常形態 精子數는 모든 투여군이 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 투여기간이 길어질수록 總 精子數, 活動 精子數 및 正常形態 精子數가 유의하게 증가하였다. 이는 巴戟 檢液을 30일간 투여한 崔 등¹³⁾의 연구와 60일간 투여한 許 등¹⁴⁾의 연구 결과와 일치하는 것이다. 특히 120일간 투여군에서의 유의한 증가는 투여기간이 길어질수록 남성 생식기능을 향상시킬 수 있음을

의미하는 것으로, 향후 120일 이상의 투여에 따른 연구가 필요할 것으로 사료된다.

고환기능 평가에 쓰이는 고환의 무게 측정⁴⁵⁾외 고환조직검사는 남성불임, 고환의 상피내암 및 급성 림프구성 백혈병 등의 진단에 주관적이며 비정량적인 검사로 이용되어 왔지만, 최근 이를 통해 생식상피의 정자 형성을 객관적으로 평가할 수 있는 정량적 미세측정법이 개발 활용되고 있다⁴⁶⁾.

해부 현미경 하에서 고환 조직내 정자 형성 변화를 관찰한 결과 30일간, 60일간, 90일간 및 120일간 巴戟 檢液을 투여한 군이 대조군에 비하여 세정관 (seminiferous tubule) 사이 간격이 넓어져, 이는 정자 형성 촉진에 필요한 영양분과 호르몬을 분비하는 혈관, 림프관 및 Leydig cell 형성이 촉진되었다는 것을 의미한다. 이 사실은 紫河車³⁷⁾, 巴戟^{13,14)} 및 淫羊藿^{38,47)} 등의 한약재를 투여 후 동일하게 관찰된 소견으로 향후 분자생물학적 또는 면역학적 방법을 통한 구체적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

정자의 침체반응은 정자 수정능 획득 (capacitation), 투명대 (zona pellucida)와의 접촉에 따른 침체반응 (acrosome reaction) 및 투명대와 난황막 (oolemma) 침입 후 남성전핵 (male pronucleus) 형성과 같은 일련의 수정과정 중 일부분이다⁴⁸⁾. 침체반응을 일으키는 hyaluronidase는 정자두부에서 분비되는 효소로 수정시 난자의 투명대를 뚫는 역할로, 그 낮은 활성은 정자의 수정 효율을 감소시킨다¹⁾. 최근에는 투명대 통과 및 난황막과의 융합에 필수적인 정자의 침체반응 정도가 정자의 수정능과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다^{49,52)}.

巴戟 검액 투여후 hyaluronidase activity를 측정 한 결과, 모든 투여군이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나 투여기간 차이는 나타나지 않았다. 이는 許 등¹⁴⁾의 농도별 巴戟 투약에서의 결과와 동일한 결과로, 巴戟은 최소농도와 최소투약기간만으로도 hyaluronidase activity를 증가시키는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면, 巴戟 檢液은 투여기간이 길어짐에 따라 수컷 생쥐의 總 精子數, 活動 精子數 및 正常形態 精子數를 증가시키고, 睪丸組織의 세정관 사이 간격과 혈관 증식 및 精子尖體 酵素인 hyaluronidase activity를 증가시켜, 수컷 생쥐의 생식능력을 향상시킴을 알 수 있었다.

結 論

수컷 생쥐의 정상 정자 생성기간인 60일을 기준으로 30일, 60일, 90일 및 120일간 巴戟 檢液을 投與한 후 投與期間別 總 精子數, 活動 精子數, 正常形態 精子數, 睪丸組織의 變化 및 精子尖體 活性을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 總 精子數는 모든 巴戟 投與群에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 投與期間이 길어질수록 유의하게 증가하였다.
2. 活動 精子數는 모든 巴戟 投與群에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 投與期間이 길어질수록 유의하게 증가하였다.
3. 正常形態 精子數는 모든 巴戟 投與群에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 投與期間이 길어질수록 유의하게 증가하였다.
4. 睪丸組織은 모든 巴戟 投與群에서 세정관 사이의 간격이 커졌고, 그 사이의 혈관 형성이 뚜렷하게 관찰되었다.
5. Hyaluronidase activity는 모든 巴戟 投與群에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.

參考文獻

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학(제3판). 서울:칼빈서적. 1997;598-647.
2. 구병삼. 임상 부인과 내분비학. 서울:고려의학. 1997;425-441.
3. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men

- in Paris during the past 20 years. N Engl J Med. 1995;332(5):281-285.
4. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ. 1992;305:609-613.
5. 안태영, 홍범식, 박태한. Solvent 5200에 의한 가역적 정자형성장애. 대한비뇨기과학회지. 1998 ;39(2):182-187.
6. 박남철, 김민수, 윤종병. 정장액내의 금속성분이 정액지표 및 가임능에 미치는 영향. 대한불임학회잡지. 1997;24(1):67-81.
7. 宋炳基. 漢方婦人科學. 서울:杏林出版. 1998 ;278-282.
8. 金吉燮, 徐雲叢, 鄭智天. 男性不妊症의 治療에 對한 文獻의 考察. 韓醫學研究所論文集. 1994 ;3:151-162.
9. 杜鎬京. 臨床腎系學研究. 서울:成輔社. 1995 ;461-471.
10. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:永林社. 1994;549-550.
11. 陳貴廷. 本草綱目通釋. 北京:學苑出版社. 1992 ;514-515.
12. 尹熙靜, 張峻福, 李京燮, 宋炳基. 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.
13. Choi EM, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Effects of Morindae officinalis Radix on the Spermatogenesis and Antioxident Activities in the SD Rat. J Kor Oriental Med Soc. 2005;26(4) :31-38.
14. 許智源, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮. 濃度別 巴戟 投藥이 수컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2005;18(3):17-31.
15. 김하영, 이희영. 男性不妊症: IX. 男子不妊症의 臨床的 考察. 대한비뇨기과학회지. 1980 ;21(3):221-229.
16. 서울대학교 의과대학. 생식의학 및 가족계획.

- 서울:서울대학교출판부. 1998;125-134.
17. 박남철, 박영수, 황국형, 정문기, 윤중병. 남성불임: 최근 10년간의 임상통계학적 분석. 대한비뇨기과학회지. 1996;37(8):939-946 .
 18. Sinclair S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Altern Med Rev.* 2000;5(1):28-38.
 19. 이혁준, 박남철. 남성불임증에서 염색체이상 의 분석. 대한비뇨기과학회지. 1998; 39(4):396-402.
 20. 이경호, 이정민, 이건수. 남성불임의 유전적 요인 및 불임연구자 연구 현황. 대한내분비 학회지. 2001;16(6):550-561 .
 21. 백재승. 남성불임과 활성산소. 대한남성과학 회지. 2003;21(1):1-11.
 22. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadosky R. Best practice policies for male infertility. *J Urol.* 2002;167(5):2138-2144.
 23. 백재승. 남성불임증 치료의 현재와 미래. 대 한의사협회지. 1996;39(9):1098-1104.
 24. 李京燮. 圖解臨床婦人科學. 서울:書苑堂. 1987 ;408-416.
 25. 王冰. 黃帝內經素問. 서울:一中社. 1993;7-10.
 26. 張介賓. 景岳全書 婦人規. 서울:法仁文化社. 1999 ;222-250.
 27. 孫思邈. 備急千金要方. 北京:人民衛生出版社. 1992;16-17.
 28. 陣言. 三因極一病證方論. 北京:人民衛生出版 社. 1983;234.
 29. 陣自明. 婦人大全良方. 北京:人民衛生出版社. 1985;286-302.
 30. 朴民豪, 安世永, 曹東鉉, 杜鎬京. 男性不育에 관한 文獻的 考察. 慶熙韓醫大論文集. 1995;18(2) :81-92.
 31. Hong CY, Ku J, Wu P. Astragalus Membranaceus stimulates human sperm motility in-vitro. *Am J Chin Med.* 1992;20(3-4):289-294.
 32. Jeng H, Wu CM, Su SJ, Chang WC. A substance isolated from *Cornus officinalis* enhances the motility of human sperm. *Am J Chin Med.* 1997;25(3-4):301-306.
 33. Kim W, Hwang S, Lee H, Song H, Kim S. Panax ginseng protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced testicular damage in guinea pigs. *BJU Int.* 1999;83(7):842-849.
 34. Lin MH, Chao HT, Hong CY. Magnolol protects human sperm motility against lipid peroxidation: a sperm head fixation method. *Arch Androl.* 1995;34(3):151-156.
 35. Han JY, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Effects of *Cuscutae Semen* on the reproductive competence of male mice. *J Oriental OB & GY.* 2003;16(1):136-142.
 36. 吳在晟, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮. 鹿茸이 수컷 생쥐의 生殖과 胚發生에 미치는 影響. 大韓 韓方婦人科學會誌. 2004;17(1):129-137.
 37. 朴大淳, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮. 紫河車가 수 컷생쥐의 生殖能力에 미치는 影響. 大韓韓方 婦人科學會誌. 2004;17(2):1-10.
 38. 金承賢, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮. 淫羊藿이 흰 쥐 정자의 운동성에 미치는 영향. 大韓韓方 婦人科學會誌. 2004;17(2):52-63.
 39. Siterman S, Eltes F, Wolfson V, Lederman H, Bartoov B. Does acupuncture treatment affect sperm density in males with very low sperm count? a pilot study. *Andrologia.* 2000 ;32(1):31-39.
 40. Yang CC, Chen JC, Chen GW, 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.
 41. 葉桂 葉天士女科. 서울: 大星文化社 1992;341-346.

42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Gasinska A, Hill S. The effect of hyperthermia on the mouse testis. *Neoplasma* 1990;37(3):357-366.
46. Skakkebaek NE, Heller CG. Quantification of human seminiferous epithelium. I. histological studies in twenty-one fertile men with normal chromosome complements. *J Reprod Fertil*. 1973;32(3):379-389.
47. 李昌勳, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮. 濃度別 淫羊藿 投藥이 수컷 생쥐의 生殖能力에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2005;18(1):142-155.
48. 문신용, 류범용, 방명결, 오선경, 이재훈, 서창식, 김석현, 최영민, 김정구, 이진용. 남성 불임의 진단 및 체외수정의 예후인자로서 정자 형태의 정밀 분석과 정자 침체반응 및 햄스터 난자 침투 분석의 비교 연구. *대한불임학회지*. 2002;29(1):57-66.
49. Calvo L, Vantman D, Banks SM, Tezon J, Koukoulis GN, Dennison L, Sherins RJ. Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril*. 1989;52(6):1048-1054.
50. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. *J Androl*. 1991;12(2):98-103.
51. Tesarik J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum Reprod*. 1989;4(8):957-961.
52. Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Dorfmann A, Thorsell LP, Bustillo M, Schulman JD, Sherins RJ. Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1994;9(10):1880-1886.