

## 小茴香이 雌性생쥐의 생식능력과 Caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현에 미치는 영향

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실

전미혜, 박영선, 김동철

### ABSTRACT

#### Effect of *Foeniculi Fructus* on the Ovarian Function and Gene Expression of Caspase-3, MAPK and MPG in Female Mice

Mi-Hye Jeon, Young-Sun Park, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetric & Gynecology, college of Oriental Medicine, DaeguHaany University

**Purpose:** This study was designed to evaluate the effect of administration of *Foeniculi Fructus* on ovarian functions and differential gene expressions related cell viability such as caspase-3, MAPK and MPG in female mice.

**Methods:** We administered the *Foeniculi Fructus* to 6-week-old female CF-1 mice for 4, 8, 12 days. After administration of *Foeniculi Fructus* with 0.1, 1, 10, 100 mg/ml concentration in the comparison of control group with 0 mg/ml, we observed the mean number of total ovulated oocytes and the number of morphologically normal oocytes. After entosomatic fertilization, we observed the rate of fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage in vitro. Also we chose the caspase-3 for cell apoptosis, MAPK and MPG genes for cell viability and DNA repair by RT-PCR.

#### Results:

1. In case of 4, 8, 12day administration of *Foeniculi Fructus* with 0.1, 1, 10, 100 mg/ml, the mean number of total ovulated oocytes and the number of morphologically normal oocytes were increased in the comparison of control group.
2. In case of 4, 8, 12day administration of *Foeniculi Fructus* with 0.1, 1, 10, 100 mg/ml, the rates of blastocyst formation from 2-cell stages were increased in the comparison of control group.
3. In case of 4, 8, 12day administration of *Foeniculi Fructus* with 0.1, 1, 10, 100 mg/ml, the gene expression of caspase-3, MAPK, MPG didn't show significant result in the comparison of control group.

**Conclusion:** This study shows that *Foeniculi Fructus* has significant effects on the increase of the function on ovulation and embryonic development of female mice. But this results have nothing to do with caspase-3, MAPK and MPG genes. So we need a further study for which genes are related to the activation of reproductive functions of *Foeniculi Fructus*.

**Key Words:** *Foeniculi Fructus*, Ovarian function, Embryonic development, caspase-3, MAPK, MPG

## I. 서 론

불임은 약 1년간 정상적인 부부관계를 했음에도 불구하고, 임신이 되지 않는 경우를 말하는 것으로, 불임의 발생빈도는 가임기 여성의 약 10~15% 정도이며, 우리나라에서는 13.5% 정도의 불임 발생율을 보이고 있다<sup>1-2)</sup>.

여성 불임의 원인은 배란인자, 자궁경부인자, 자궁인자, 난관 및 복막인자 등이 있는데, 그 중 배란인자는 여성 불임의 원인 중 30~40%를 차지하며, 임신이 되려면 반드시 배란이 되어야 하므로 배란 여부는 불임원인에 대해 가장 중요하다<sup>1)</sup>.

한의학 고전에서는 불임을 ‘求嗣’, ‘種子’, ‘子嗣’ 등의 부분에서 다루고 있는데, 불임에 대한 한의학적 변증논치에서 여성에 해당하는 것은 腎虛, 肝鬱, 痰濕, 濕熱, 血瘀 등으로 나뉘어지며, 이 중 腎虛는 불임의 가장 주된 요인이며, 배란인자로 인한 불임과 많은 관련성이 있고, 補腎 작용을 하는 한약들은 배란 및 착상에 많은 도움을 준다<sup>3-5)</sup>.

소회향은 산형과에 속한 다년생 초본인 회향(*Foeniculum vulgare* MILL.)의 성숙한 과실을 건조한 것으로 溫腎, 散寒, 行氣, 止通 작용을 가진 溫裏藥으로 여성들에게는 경행복통, 월경후기 등에 사용된다<sup>6-8)</sup>.

한의학에서 불임과 관련하여 다양한 약물과 방법을 통한 실험적 연구<sup>9-16)</sup>가 진행되어 왔으나, 소회향의 생식기능 개선과 세포 활성을 촉진시키는 유전자 활성화에 대한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 소회향이 농도별, 투여

기간별로 생식 능력 향상에 미치는 효과를 규명하기 위하여, 가임 능력이 있는 6주령 생쥐에 실험액을 투여하여, 난소의 기능과 배아의 체외 배발생을 및 난소와 배란된 난소조직에서의 caspase-3, MAPK, MPG 유전자의 발현 정도를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 실험 재료

#### 1) 약 재

실험에 사용한 소회향은 대구한의대학교부속 대구한방병원 약제과에서 양질의 것을 엄선하여 사용하였다(Table 1).

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

한약명	생약명	학 명
小茴香	<i>Foeniculi Fructus.</i>	<i>Foeniculum vulgare</i> MILL.

#### 2) 동 물

본 연구에서는 가임 능력이 있는 6주령의 자성 CF-1 생쥐, 웅성 CF-1 생쥐를 사용하였다. 모든 실험동물은 21±1℃로 점등과 소등이 각각 12시간으로 조절되는 무균 동물 사육실에서 사육하였으며 전 실험기간 동안 물과 사료는 무제한으로 급식하였다.

#### 3) 검액의 조제

소회향 300 g에 증류수 3000 ml를 첨가하여 2시간 30분 동안 가열하여 탕제 1900 ml를 추출하였다. 추출한 전탕액을 100 ml가 되도록 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 뒤, -70℃ 이하에서

24시간 이상 defreeze한 후 96시간 동안 완전히 동결건조시켜 30 g의 분말을 얻었다. 동결건조한 소회향 분말 30 g을 멸균증류수에 1 mg/ml의 농도로 용해하여 검액을 제조하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 검액의 투여

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

### 2) 투여된 생쥐의 다배란 유도와 배란된 난자 수 비교

상이한 투여농도와 기간으로 조정된 CF-1 생쥐는 투여 종료후 5 IU의 PMSG (pregnant mare serum gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내 주사한 후 48시간 후에 5 IU의 hCG(human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 복강내 주사함으로써 다배란을 유도하였다. hCG 투여 후 13시간째에 경추분리법으로 도살한 다음 외과적 방법으로 난소와 난관을 적출하였다. 적출된 난소는 RNA 추출을 위하여 채취 즉시 주변의 조직과 혈액을 제거한 다음 -196 °C의 액체질소에 넣어 보관하였고 난관은 PBS(phosphate buffered saline; Gibco, USA)용액이 함유된 petridish(Nunc; Denmark)로 옮긴 다음 해부현미경(Nikon, Japan)하에서 난관팽대부에 배란된 난구-난자세포 복합체를 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 해부현미경 하에서 배란된 모든 난자만을 분리하였으며 신선 M2 배양액(Sigma, USA)으로 3회 세척한 다음 배란된 난자의 총수와 정상적 형태를 나타내는 난자의 수를 측정하였다. 균일한 난세포질과 제1극체의 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 투여기간 및 농도로 조정된 CF-1 생쥐에 대하여 다배란을 유도한 다음 hCG 투약 후 생식능력이 확인된 음성 CF-1 마우스와 1:1의 비율로 합사하여 교미를 유도하였다. 익일 아침 자성생쥐를 관찰하여 질전이 확인된 개체를 교미된 것으로 판정한 다음 hCG 투여 후 36시간째에 도살하여 난관팽대부를 적출하고 해부현미경하에서 난관팽대부를 30 gauge needle이 부착된 주사기를 이용하여 M2 배양액을 관류함으로써 수정된 2-세포기 배아(2-cell stage embryo)를 회수하였다. 회수된 2-세포기 배아는 신선한 M16 배양액에 3 mg/ml의 BSA (bovine serum albumin; Sigma, USA)가 함유된 배양액으로 3회 세척한 다음 이를 parafin oil(Sigma, USA)에 덮혀진 50 µl의 M16 배양액 소적으로 옮긴 다음 37 °C, 5 %, CO<sub>2</sub> in air 상태의 배양기 (Forma, USA)에서 4일간 배양하면서 착상직전 단계인 배반포 배아로의 발달

율을 관찰하였다.

4) 난소 조직 내에서 세포사멸 및 활성 관련 유전자의 발현양상 비교  
 상이한 기간과 농도로 투약된 CF-1 마우스를 투약 종료 후 도살한 다음 난소를 적출한 다음 이들 조직 내의 유전자 발현정도를 RT-PCR 방법을 이용하여 분석하였다. 본 연구를 위해 세포사멸 관련 유전자로 caspase-3, 세포의 활성화와 관련된 유전자로는 MAPK, 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 ℃, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리를 실시하였다. 이를 isopropyl alcohol(Sigma, USA)에 침전 (12,000 rpm/15 min/4 ℃)시키고, 70 % ethanol(Merck, Germany)로 세척(12,000 rpm/15 min/4 ℃)한 후, DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수에 녹였다. Spectrophotometer(BioRad, USA)로 분리된 total RNA의 양을 산출하여 각 Sample group별로 1 µg의 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'	1min	53℃	1min	72℃	1min	20sec	30cycle	450bp	
	Reverse 5'-AAGTACAGTTCTTTCGTGAG-3'									
MAPK	Forward 5'-CGCCTACGGCATGGTGTG-3'	1min	58℃	1min	72℃	1min	20sec	30cycle	586bp	
	Reverse 5'-CCCTGGAAAGATGGGCCTG-3'									
MPG	Forward 5'-GCCGACGGATGGGGCAAAG-3'	20sec	55℃	30sec	70℃	1min	35cycle	310bp	94℃	
	Reverse 5'-CTGTCCCAGAAATGCCCTGGGC-3'									
GAPDH	Forward 5'-CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-3'	30sec	55℃	30sec	72℃	1min	24cycle	369bp		
	Reverse 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'									
Pre-denaturation		94℃	5min							
Final-extension		72℃	10min							

① Apoptosis 관련 caspase-3 유전자의 발현

Apoptosis와 관련된 apoptosis-related cysteine protease의 정량적 분석은 caspase-3 5'primer(5'-TAGAGCACCTGGTTACT ATT-3')와 caspase-3 3'primer(5'-AAG TACAGTTCTTTTCGTGAG-3')를 이용한 PCR로 apoptosis-related cysteine protease gene의 일부분 중 450 bp를 증폭하였다. caspase-3 5'primer와 caspase-3 3'primer 20 pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25  $\mu$ l를 맞추후 first denature 94  $^{\circ}$ C 5분, 30 cycle로 denature 94  $^{\circ}$ C 1분, anealing 53  $^{\circ}$ C 1분, extension 72  $^{\circ}$ C 1분 20초, final extension 72  $^{\circ}$ C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2 % agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio-rad quantity-one을 이용하여 각 Sample group별로 농도를 결정하였다.

② 세포활성 관련 MAPK 유전자의 발현

Proliferation과 관련된 MAPK의 정량적 분석은 MAPK 5'primer (5'-CGCCTAC GGCATGGTGTG-3')와 MAPK 3'primer (5'-CCCTGGAAAGATGGGCCTG-3')를 이용한 PCR로 MAPK gene의 일부분 중 586 bp를 증폭하였다.

MAPK 5'primer와 MAPK 3'primer 20 pmol과 멸균수, template cDNA를 premix로 final volume 25  $\mu$ l를 맞추 후 first denature 94  $^{\circ}$ C 5분, 30 cycle로 denature 94  $^{\circ}$ C 1분, anealing 58  $^{\circ}$ C 1분, extension 72  $^{\circ}$ C 1분 20초, final extension 72  $^{\circ}$ C 10분으로 PCR을 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물을 1.2 % agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동을 한 후 Bio-rad

quantity-one을 이용하여 각 sample 별로 농도를 결정하였다.

③ DNA복구 관련 MPG 유전자의 발현  
각 total RNA의 RT은 1 uM oligo dT primer를 이용하여 10 mM dNTP(Ambion, USA), 5 X buffer, 0.1 M DTT, 200 unit superscript(Invitrogen, USA) 및 5 % DMSO(Sigma, USA)에서 20  $\mu$ l reaction volume으로 4  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 실시하였고, 70  $^{\circ}$ C에서 15분의 extension interval을 주었다. RT reaction 후, 난소조직의 MPG 유전자를 detection하기 위해, 2  $\mu$ l의 RT product, 25 pmol의 forward (5'-GCCGACGGATGGGGCAAAG-3'), reverse primer (5'-CTGTCCCAGAAATGCCCTGGGC-3'), 5 % DMSO, premix (Kisan Biotech, Korea)을 25  $\mu$ l volume으로 94  $^{\circ}$ C/5 min에서 DNA denaturation 하였다. 이후 94  $^{\circ}$ C/20 sec에서 DNA denaturation, 55  $^{\circ}$ C/30 sec에서 primer annealing과 70  $^{\circ}$ C/1 min DNA extension을 35 cycle 반복하였고, 72  $^{\circ}$ C에서 15분의 extension interval을 주었다.

RT-PCR을 통해 detection된 product를 1.5 % agarose gel에서 전기영동하여 분리한 후, 각 band의 density를 multi-imager system으로 측정하였으며, Microsoft Excel program으로 semi-quantitation을 하였다.

5) 통계분석

실험결과의 통계 분석에는 SPSS ver 10.0을 이용하였고, 각 군 간의 차이는 Mann-Whitney-Wilcoxon test로 분석하였으며, P-value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. 투여 기간 및 농도에 따른 자성 생쥐의 난소반응

1) 4일간 투여한 후 배란난자의 변화  
 소회향 검액을 상이한 농도에서 4일간 투여시 총 배란된 평균 난자의 수에서 대조군의 경우 14.2개, 소회향 투여군의

경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 21.2, 22.3, 28.7, 24.8개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다( $P < 0.01$ ). 배란된 난자 중 정상형태의 난자의 수는 대조군의 경우 평균 11.9개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 16.9, 18.6, 21.5, 20.3개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다( $P < 0.01$ )(Table 3, Fig. 1).

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

Subjects	Dose(mg)	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
Control	0	10	142 (14.2)	119 (11.9)
<i>Foeniculi Fructus</i>	0.1	10	212 (21.2)*	169 (16.9)#
	1	10	223 (22.3)*	186 (18.6)#
	10	10	287 (28.7)*	215 (21.5)#
	100	10	248 (24.8)*	203 (20.3)#

\*;  $P < 0.01$  compared with control group, #;  $P < 0.01$  compared with control group

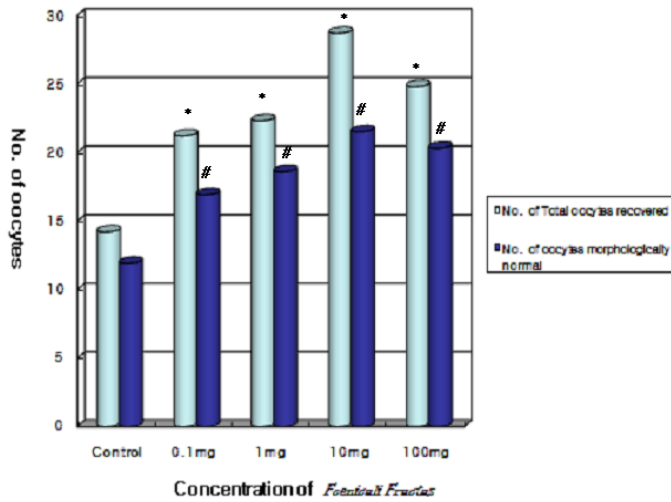


Fig. 1. Comparison of ovulatory functions between different dose of *Foeniculi Fructus* extract administration for 4 days(\*;  $P < 0.01$  compared with control group, #;  $P < 0.01$  compared with control group).

2) 8일간 투여한 후 배란 난자의 변화  
 소회향 검액을 상이한 농도에서 8일간

투여시 총 배란된 평균 난자의 수에서 대조군의 경우 20.0개, 소회향 투여군의

경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 33.0, 35.7, 30.3, 29.4개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다( $P<0.01$ ). 배란된 난자 중 정상형태의 난자의 수는 대조군의 경

우 평균 18.2개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 26.6, 29.5, 22.5, 19.0개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다( $P<0.01$ )(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Comparison of ovulational functions between different dose of *Foeniculi Fructus* extract administration for 8 days.

Subjects	Dose(mg)	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
Control	0	10	200 (20.0)	182 (18.2)
<i>Foeniculi Fructus</i>	0.1	10	330 (33.0)*	266 (26.6)#
	1	10	357 (35.7)*	295 (29.5)#
	10	10	303 (30.3)*	225 (22.5)#
	100	10	294 (29.4)*	190 (19.0)#

\*;  $P<0.01$  compared with control group, #;  $P<0.01$  compared with control group

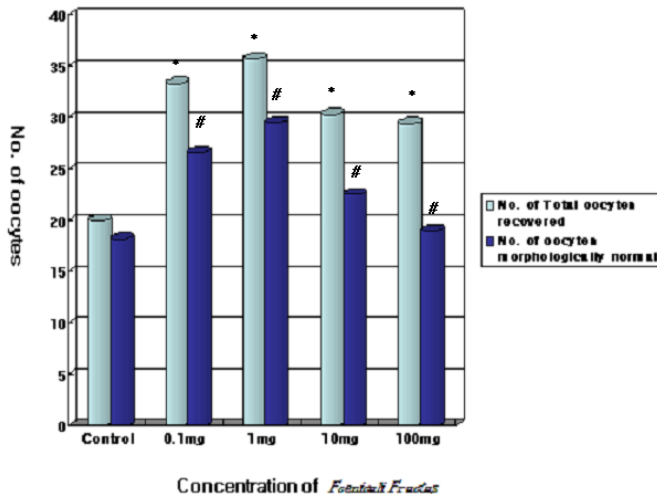


Fig. 2. Comparison of ovulational functions between different dose of *Foeniculi Fructus* extract administration for 8 days(\*;  $P<0.01$  compared with control group, #;  $P<0.01$  compared with control group)

3) 12일간 투여한 후 배란 난자의 변화 소회향 검액을 상이한 농도에서 12일간 투여시 총 배란된 평균 난자의 수에서 대조군의 경우 12.2개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 36.4, 38.1, 29.5, 38.0개로 배란되었으며,

유의성이 확인되었다( $P<0.01$ ). 배란된 난자 중 정상형태의 난자의 수는 대조군의 경우 평균 8.8개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 20.0, 30.2, 23.8, 31.0개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다( $P<0.01$ )(Table 5, Fig. 3).

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

Subjects	Dose(mg)	No. of mice examined	No. of oocytes ovulated (mean)	No. of oocytes morphologically normal (mean)
Control	0	10	122 (12.2)	88 ( 8.8)
<i>Foeniculi Fructus</i>	0.1	10	364 (36.4)*	200 (20.0)#
	1	10	381 (38.1)*	302 (30.2)#
	10	10	295 (29.5)*	238 (23.8)#
	100	10	380 (38.0)*	310 (31.0)#

\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group

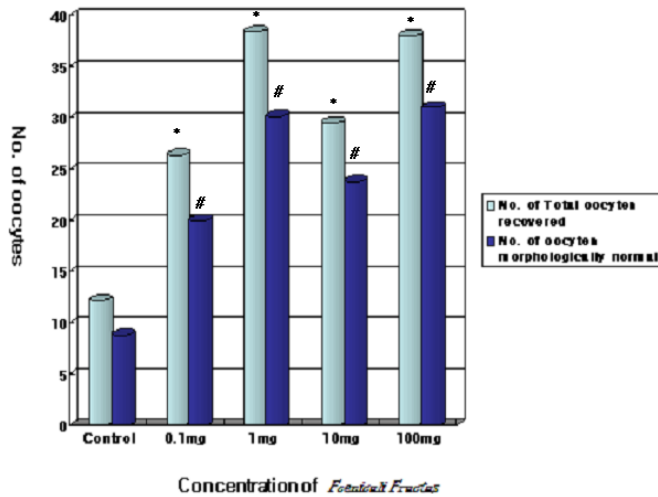


Fig. 3. Comparison of ovulational functions between different dose of *Foeniculi Fructus* extract administration for 12 days(\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group).

## 2. 투여기간 및 농도에 따른 2-세포기 배아의 체외 배발생을 비교

1) 4일간 투여한 후 체외 배발생을 비교  
 소회향 검액을 상이한 농도로 4일간 투여한 결과 2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 48개, 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 188, 185, 219, 230

개로 유의하게 증가되었다(p<0.01).

배반포로의 발생율은 대조군에서는 14 개(29.2 %), 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 84(44.7 %), 92(49.7 %), 95(43.4 %), 102개(44.3 %)로 유의하게 증가되었다(p<0.01)(Table 6, Fig. 4).



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

Subjects	Dose(mg)	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro(developmental ratio)
Control	0	10	48	14 (29.2)
<i>Foeniculi Fructus</i>	0.1	10	188*	84 (44.7) <sup>#</sup>
	1	10	185*	92 (49.7) <sup>#</sup>
	10	10	219*	95 (43.4) <sup>#</sup>
	100	10	230*	102 (44.3) <sup>#</sup>

\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group

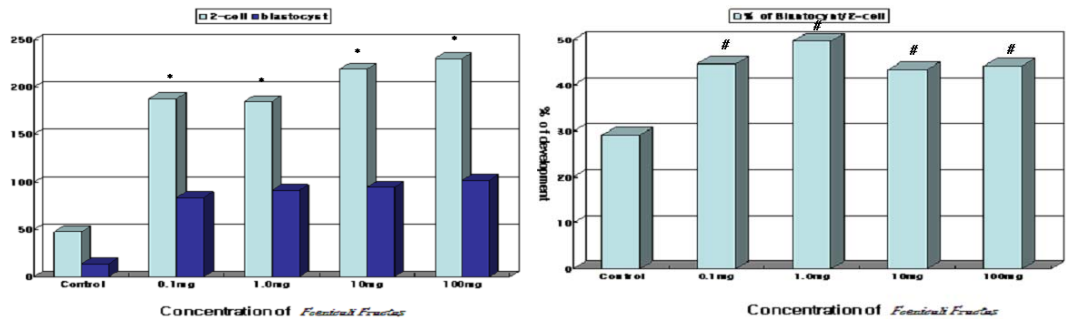


Fig. 4. Comparison of developmental competence on in vitro fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Foeniculi Fructus* administrated mice for 4 days(\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group)

2) 8일간 투여한 후 체외 배발생을 비교 소회향 검액을 상이한 농도로 8일간 투여한 결과 2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 163개, 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 199, 247, 256, 218개로 유의하게 증가되었다(p<0.01).

배반포로의 발생율은 대조군에서는 48개(29.4%), 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 77(38.7%), 103(41.7%), 111(43.4%), 103개(47.2%)로 유의하게 증가되었다(p<0.01)(Table 7, Fig. 5).

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

Subjects	Dose(mg)	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro(developmental ratio)
Control	0	10	163	48 (29.4)
<i>Foeniculi Fructus</i>	0.1	10	199*	77 (38.7) <sup>#</sup>
	1	10	247*	103 (41.7) <sup>#</sup>
	10	10	256*	111 (43.4) <sup>#</sup>
	100	10	218*	103 (47.2) <sup>#</sup>

\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group

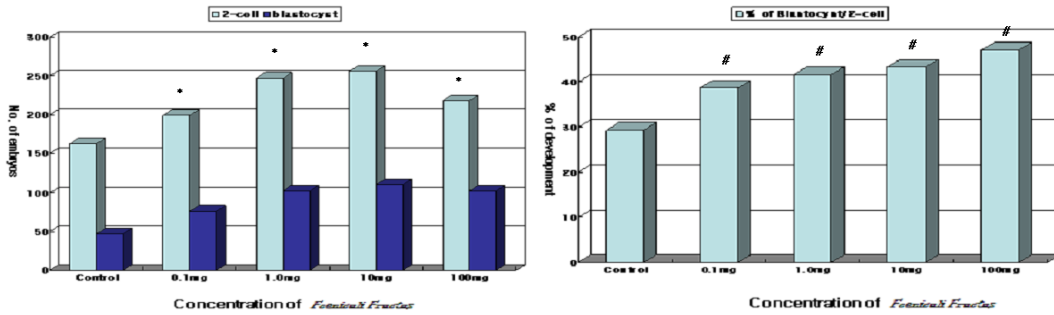


Fig. 5. Comparison of developmental competence on in vitro fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Foeniculi Fructus* administrated mice for 8 days(\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group).

3) 12일간 투여한 후 체외 배발생을 비교

소회향 검액을 상이한 농도로 12일간 투여한 결과 2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 117개, 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 183, 296, 207, 311

개로 유의하게 증가되었다(p<0.01).

배반포로의 발생율은 대조군에서는 36개(30.8%), 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 92(50.3%), 133(44.9%), 91(44.0%), 146개(46.9%)로 유의하게 증가되었다(p<0.01)(Table 8, Fig. 6).

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

Subjects	Dose(mg)	No. of mice examined	No. of 2-cell embryos cultured	No. of blastocyst developed in vitro(developmental ratio)
Control	0	10	117	36 (30.8)
<i>Foeniculi Fructus</i>	0.1	10	183*	92 (50.3)#
	1	10	296*	133 (44.9)#
	10	10	207*	91 (44.0)#
	100	10	311*	146 (46.9)#

\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group

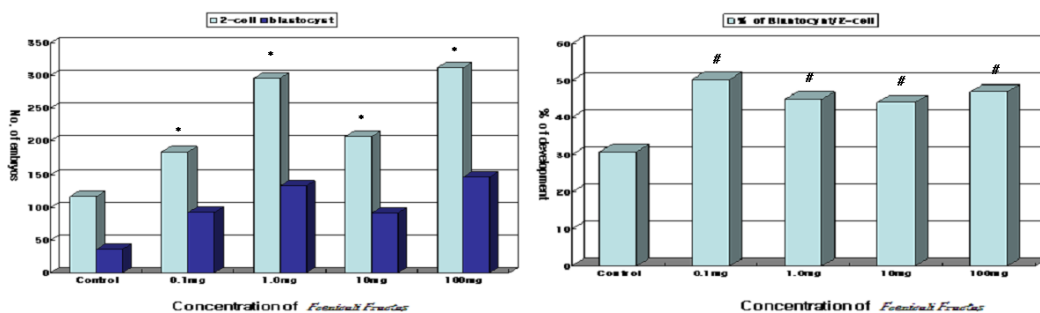


Fig. 6. Comparison of developmental competence on in vitro fertilized 2-cell embryos to blastocyst stage from *Foeniculi Fructus* administrated mice for 12 days(\*; P<0.01 compared with control group, #; P<0.01 compared with control group).

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

1) 4일간 투여한 후 유전자 발현 비교

Caspase-3 유전자를 검액 투여 후 도살한 난소조직과 다배란유도한 다음 채취한 난소조직으로 구분하여 분석한 결과 4일간 소회향 검액 투여 후 caspase-3의 발현은 증가된 양상이 나타나지 않았으며, 통계적 유의성이 없었다.

MAPK의 발현은 감소되는 경향이 있었으나, 통계적 유의성이 없었다.

MPG의 발현은 통계적으로 유의한 변화가 없었다(Fig. 7, Fig. 8).

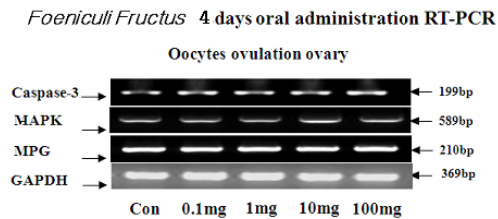


Fig. 7. Expression of genes from *Foeniculi Fructus* oral administrated mice for 4 days.

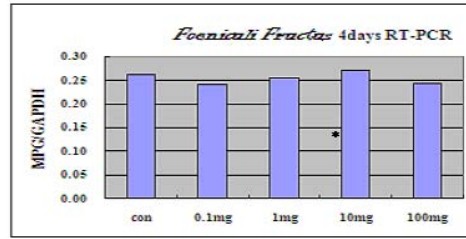
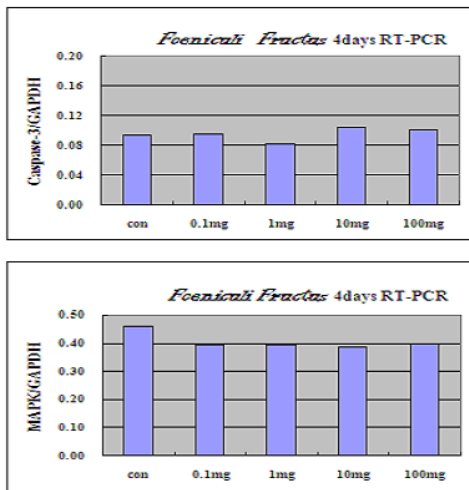


Fig. 8. Comparison of gene expression (caspase-3, MAPK and MPG) between different dose of in *Foeniculi Fructus* administered mice for 4 days.

2) 8일간 투여한 후 유전자 발현 비교  
소회향 검액을 8일간 투여한 후 caspase-3의 발현양은 통계적으로 유의한 변화가 없었다.

MAPK 발현양은 대조군에 비해 모든 농도에서 증가되는 양상을 나타내었으나, 통계적으로 유의한 변화는 없었다.

MPG의 발현은 통계적으로 유의한 변화가 없었다(Fig. 9, Fig. 10).

3) 12일간 투여한 후 유전자 발현 비교  
소회향 검액을 12일간 투여한 후 caspase-3의 발현양은 증가되는 양상을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다.

MAPK 발현은 통계적 유의성은 없었다.

MPG의 발현은 통계적으로 유의한 변화는 없었다(Fig. 11, Fig. 12).

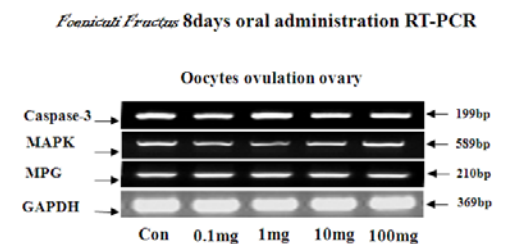


Fig. 9. Expression of genes from *Foeniculi Fructus* oral administrated mice for 8 days.

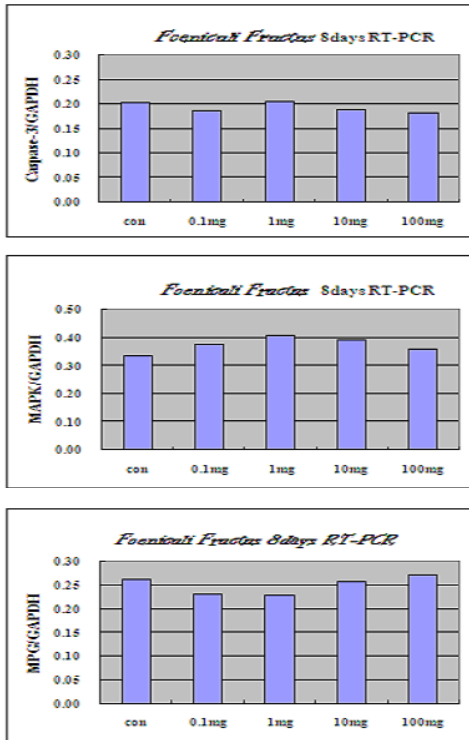


Fig. 10. Comparison of gene expression (caspase-3, MAPK and MPG) between different dose of in *Foeniculi Fructus* administered mice for 8 days.

*Foeniculi Fructus* 12days oral administration RT-PCR

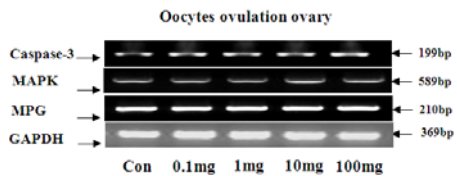


Fig. 11. Expression of genes from *Foeniculi Fructus* oral administrated mice for 12 days.

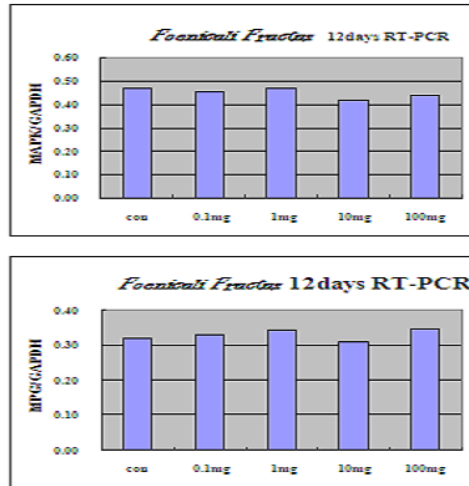
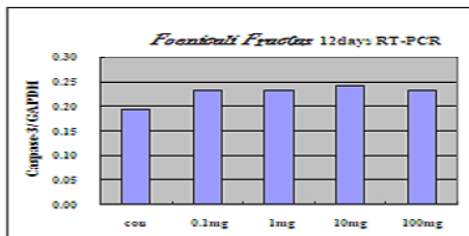


Fig. 12. Comparison of gene expression (caspase-3, MAPK and MPG) between different dose of in *Foeniculi Fructus* administered mice for 12 days.

#### IV. 고 찰

최근 여성의 사회적 진출이 늘고, 임신 시도하고자 하는 나이가 증가함에 따라 불임환자들이 자신의 문제점과 치료에 대한 인식을 새롭게 함으로써 수태능을 증가시키기 위한 노력들이 증가하고 있다<sup>1-2)</sup>.

수태능은 한 번의 임신주기 동안에 임신을 할 수 있는 확률을 말하며, 정상적인 한 부부의 수태능은 약 20~25% 정도이다. 불임이란 약 1년 간 정상적인 부부 생활을 하였음에도 불구하고 임신이 되지 않는 상태를 말하는 것으로, 과거에 한번도 임신을 해본 적이 없는 상태로 계속 임신이 되지 않는 경우를 일차성 불임이라고 하고, 과거에 임신을 해본 기왕력이 있는 상태로 유산, 또는 분만 후 무월경이 끝난 뒤부터 만 1년이 지나도록 임신이 되지 않는 경우를 이차성 불임이라고 한다<sup>1-3)</sup>.

여성 불임의 원인은 자궁경부인자, 자궁인자, 난관 및 복막인자, 배란인자, 면역학적 인자 등으로 분류된다. 이중 배란인자는 난소에서 성숙난포가 파열되면서 난자가 배출되어 일어나는 배란현상의 장애로 인한 불임으로 불임부부의 약 15%~40%에서 보고되고 있다<sup>1,17)</sup>.

일반적으로 무월경과 희발월경 같은 월경불순에는 배란장애가 흔히 동반되며<sup>1)</sup>, 여성의 연령이 증가할수록 난자가 노화되어 난자의 수 및 질이 저하되고, 수정율을 감소되므로<sup>18-20)</sup>, 배란장애에 대한 치료는 불임치료에 중요한 부분을 차지한다. 배란 장애로 인한 불임의 치료는 서양의학적으로 배란 유도제를 사용하여 치료하며, 모든 불임치료 중에서 가장 좋은 임신 성공률을 나타낸다<sup>1)</sup>.

한의학에서 여성불임은 求嗣, 種子, 嗣育, 求子, 子嗣門에서 다루고 있으며<sup>3,21-24)</sup>, 불임의 원인은 腎虛型, 肝鬱型, 痰濕型, 濕熱型, 血瘀型, 血虛型으로 구분할 수 있으며, 腎虛, 肝鬱, 濕痰, 氣血虛弱 등은 배란 요인, 자궁 경부 요인, 영양 및 대사성 요인 등과 관련이 많은 것으로 보고, 瘀血, 濕熱은 난관 및 복막 요인과 자궁 요인등과 관련성이 높은 것으로 볼 수 있다<sup>3)</sup>. 김<sup>25)</sup>은 역대 한의학 문헌을 고찰한 연구에서 子宮虛寒을 여성불임의 가장 많은 원인으로 제시되고 있으며, 조<sup>26)</sup>는 한방진단시스템(DSOM)에 의하여 腎虛와 유관하다고 하였다.

한의학에서 불임과 관련된 최근의 실험적 연구를 살펴보면 백서의 배란과 난소에 미치는 영향으로는 귀신환<sup>5)</sup>, 대영전<sup>9)</sup>, 가미교감단<sup>10)</sup> 등에 관한 연구가 있었으며, 雌性생쥐의 생식능력과 세포 활성을 촉진시키는 유전자 활성화에 미치는

영향으로는 팔물탕<sup>11)</sup>, 오수유<sup>12)</sup>, 육린주<sup>13)</sup> 등에 대한 연구가 있다.

본 연구에 사용된 소회향은 산형과에 속한 다년생 초본인 茴香*Foeniculum vulgare* MILL. 의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 味辛하고 性溫하며, 肝, 腎, 脾, 胃經에 入하고, 溫陽散寒, 行氣止痛하여<sup>6-8,27-30)</sup>, 月經을 조절하고 月經時 疼痛을 감소시키고, 催産시키는 효과 등이 입증되어 있다<sup>31-33)</sup>.

이에 저자는 소회향이 난소의 기능과 배발생율에 미치는 영향과 생식조직 내에서의 유전자 활성화에 미치는 영향을 알아보고자 소회향 투여후 배란과 체외 배발생율의 변화, caspase-3, MAPK, MPG 유전자의 발현에 관하여 실험하였다.

먼저 소회향 검액을 무처치대조군과 0.1, 1, 10, 100 mg의 상이한 농도로 투여한 결과, 4일간 투여 시 소회향 투여군의 경우 대조군에 비해 유의하게 높은 난자생산능력을 나타내었으며, 투여 농도별로 비교할 때에는 10 mg 투여군에서 가장 높은 결과를 나타내었다. 총 배란된 평균 난자의 수에서 대조군의 경우 14.2개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 21.2, 22.3, 28.7, 24.8개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다(P<0.01). 배란된 난자 중 정상형태의 난자의 수는 대조군의 경우 평균 11.9개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 16.9, 18.6, 21.5, 20.3개로 배란되었으며, 유의성이 확인되었다(P<0.01). 이러한 결과를 볼 때 소회향이 난소의 배란기능을 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

8일간 투여시 평균 총 배란 난자수가 대조군은 20.0개, 소회향 투여군은 0.1,

1.0, 10, 100 mg 농도에서 각각 33.0, 35.7, 30.3, 29.4개로 나타나고, 정상 형태의 배란 난자수가 대조군은 평균 18.2개, 소회향 투여군은 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 26.6, 29.5, 22.5, 19.0개로 유의성있는 증가를 보였으며( $P<0.01$ ), 1 mg 투여시 가장 우수한 효능이 있었다. 이러한 결과로 볼 때 소회향이 난소의 배란기능을 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

12일간 투여시 평균 총 배란 난자수가 대조군은 12.2개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 36.4, 38.1, 29.5, 38.0개로 배란되고, 배란된 난자 중 정상형태의 난자의 수는 대조군의 경우 평균 8.8개, 소회향 투여군의 경우 0.1, 1, 10, 100 mg의 경우 각각 20.0, 30.2, 23.8, 31.0개로 배란되어, 유의성있는 증가를 보였다( $P<0.01$ ). 12일간 투여군 역시 난소의 배란기능의 향상이 유의성있게 관찰되었고, 투여농도에 따른 차이는 1 mg에서 가장 높은 배란기능을 나타냄을 확인할 수 있었다( $P<0.01$ ).

소회향 검액을 투여 후 투여 기간과 투여 농도에 따른 배란난자수를 비교하였을 때, 투여기간을 8일, 12일로 하여 투여기간이 길수록 양호한 배란기능을 보였으며, 4일간 투여시에는 10 mg 투여군에서, 8일과 12일간 투여시에는 1 mg 투여군에서 가장 높은 배란결과를 나타내었다. 이는 단기간에 비하여 장기간 사용 시 양호한 효과를 볼 수 있으리라 생각된다.

다음으로 소회향 검액을 투여한 후 교미를 유도한 다음 회수된 2-세포기 배아(2-cell embryo)의 배반포(blastocyst)로의 발생율을 비교하여 투여 농도와 기간

에 따른 배아의 체외 배발생율을 살펴보았다.

4일간 투여한 경우 2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 48개인데 비하여, 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 188, 185, 219, 230개로 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며( $p<0.01$ ), 배반포로의 발생율은 대조군은 14개(29.2%), 투여군은 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 84(44.7%), 92(49.7%), 95(43.4%), 102개(44.3%)로 투여군이 대조군에 비해 유의성있게 증가되는 경향이 관찰되었다( $P<0.01$ ). 이러한 결과를 볼 때 소회향이 난소의 배란기능을 향상시키는 것으로 사료된다.

8일간 투여군의 경우 2-세포기 배아의 수가 대조군은 163개, 투여군에서는 0.1, 1.0, 10, 10 mg 농도에서 각각 199, 247, 256, 218개가 생산되어, 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며( $p<0.01$ ), 특히 10 mg의 농도에서 가장 많이 증가하였다. 배반포로의 발생율은 대조군은 48개(29.4%), 투여군은 0.1, 1.0, 10, 100mg 농도에서 77(38.7%), 103(41.7%), 111(43.4%), 103개(47.2%)로 모든 농도의 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 소회향이 난소의 배란기능을 향상시키는 것으로 사료된다.

12일간 투여군의 경우 2-세포기 배아의 수가 대조군에서는 117개, 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 183, 296, 207, 311개가 생산되었고, 배반포로의 발생율은 대조군에서는 36개(30.8%), 투여군에서는 0.1, 1, 10, 100 mg 농도에서 각각 92(50.3%), 133(44.9%), 91(44.0%), 146개(46.9%)로 발생되어, 2-세포기 배

아의 수와 배반포 발생을 모두 유의성있는 증가가 관찰되었으며, 투여농도에 따른 차이는 인정되지 않았다( $p < 0.01$ ).

이상의 결과로 볼 때 소회향의 투여는 배란된 난자의 수정 후 배반포로의 발생에 효과적이라는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 소회향이 수정란의 착상율을 높이는 데 효과적으로 기여할 수 있으리라 생각된다.

앞선 실험에서 소회향 검액의 투여가 자성생쥐의 배란과 배발생에 효과적임을 확인하였으므로 소회향 검액을 투여한 자성생쥐의 난소 조직을 RT-PCR 방법을 이용하여 유전자 발현 정도를 분석하였다. 본 연구에서는 세포사멸과 관련된 유전자로는 caspase-3, 세포 활성화와 관련된 유전자로는 MAPK, 그리고 DNA 복구와 관련된 유전자로는 MPG 유전자를 선택하여 분석하였다.

Apoptosis는 necrosis와는 다르게 생리적이고, 능동적인 세포 사멸을 일컫는 말로<sup>34)</sup>, 다세포생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리 현상의 하나인 계획된 죽음(programmed cell death)을 말한다<sup>35)</sup>. 생체 내에서는 이러한 apoptosis가 일어나서 세포의 수가 조절되고, 유지되며, 개체의 발생, 성장, 호르몬에 의한 조직의 발달과 위축 등의 다양한 생리현상이 발현된다<sup>34)</sup>.

난포는 난자와 과립막세포로 이루어져 있고, 성선자극호르몬에 의해 자극이 되어 수정을 위한 성숙한 난자를 배란하게 된다. 생식 내분비계의 조절 기전 중 난소는 특히 배란 난포가 성장하여, 85~90%의 생식세포가 난소 내에서 apoptosis 과정을 거쳐 사멸하게 되고, 우성난포가

선택되어 배란에 이르고, 나머지 난포는 퇴화하는 역동적인 조직으로 apoptosis의 본보기로, Bcl-2에 의하여 억제되고 Apaf-1 유전자가 조정자 역할을 한다<sup>34-39)</sup>. 최근 체외수정과 관련하여서는 apoptosis가 덜 일어난 난포로부터 얻은 난자를 체외수정기술에 이용하는 것이 임신에 유리하다는 실험결과가 있다<sup>34)</sup>.

Caspase는 세포사멸이 유도될 때 활성화되는 시스틴 단백질 분해효소로 pro-caspase로 합성되어 있다가 자극이 오면 pL(large subunit)와 pS(small subunit)로 절단되고, (pL/pS)<sub>2</sub>의 tetramer를 형성하여 활성화되며, 활성화된 caspase는 PARP를 포함한 중요한 기질들을 분해하여, oligonucleotide DNA fragmentation에 관여한다. Bcl-2 family에 속하며 apoptosis를 촉진하는 기능을 가진 Bid는 세포막에서 시작하는 caspase 활성화 경로와 미토콘드리아에서 시작하는 caspase 활성화 경로를 연결시키는 신호전달인자로 작용한다<sup>40,41)</sup>.

MAPK는 유전자 발현, 세포의 성장, 증식, 분화 및 세포 자연사 등을 조절하는 기능을 수행하는 단백질 인산화 효소로서, 외부자극이 세포를 활성화시키면 신호는 3개의 protein kinase들로 구성된 MAPK 중에 하나의 경로로 전달된다<sup>42)</sup>. 배란 전 난포에서 황체호르몬의 작용에 MAPK가 필요하고, 난소 내의 난포 형성 과정에서 마지막 단계인 성숙과정에 MAPK가 관여한다. 따라서 난소 및 자궁조직의 감수분열작용과 활성화에 MAPK가 영향을 미치게 된다<sup>43-47)</sup>.

MPG유전자는 세포내에서 DNA가 복제될 때 손상이 있는 DNA의 사슬을 복구하는데 관여하는 효소로서, DNA 회복 과정을 수반한다<sup>48-50)</sup>.

Washington<sup>51)</sup> 등은 MPG mRNA가 난소와 정소 조직에서 매우 높은 발현을 보인다고 보고하였는데, 이는 생식기관에서의 세포분열 및 증식이 다른 조직보다 더 활발하게 일어나기 때문으로 여겨진다. 이런 이유로 생식기관에서의 MPG 유전자의 역할은 상당히 중요하게 인식된다.<sup>49)</sup>

본 연구에서 caspase-3 유전자의 발현을 살펴보기 위하여 4, 8, 12일간 소회향 검액을 투여한 결과 검액 투여 농도에 따른 난소조직에서 caspase-3의 발현양상은 유의성이 나타나지 않았으며, 이는 소회향 검액의 투여가 난소기능의 향상에 미치는 영향이 caspase-3 pathway와는 무관한 것으로 사료된다.

MAPK의 발현을 살펴보기 위하여 4, 8, 12일간 소회향 검액을 투여한 결과 난소조직내의 MAPK의 발현은 투여 직후 또는 다배란 유도 후에 거의 변화가 없었다. 이는 소회향 검액의 투여가 난소기능의 향상에 미치는 영향이 MAPK의 활성화와는 무관한 것으로 사료된다.

MPG 유전자의 발현을 살펴보기 위하여 4, 8, 12일간 소회향 검액을 투여한 결과 8일 투여군의 경우 대조군에 비해 100 mg 투여군에서 다소 증가되는 양상을 나타내었으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

추후 소회향 검액이 난소 조직 내에서 MPG 유전자의 발현에 미치는 영향에 대한 정밀한 연구가 보충되어야 할 것으로 사료되며, 이는 소회향이 배란율을 높이고 배발생율을 촉진하는 것이 MPG 유전자의 발현과는 다른 기전에 의해 조절된다는 것을 의미한다.

본 실험의 결과로 보아 소회향 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 소회향의 난소기능 촉진 기전은 세포사멸 방지와는 다른 기전으로 추측된다. 즉, 세포사멸사의 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.

이상의 결과로 보아 소회향은 난소기능을 향상시켜 난자의 배란 수를 증가시키며 체내수정 이후에도 배발생율을 높이므로, 임상에서 배란 장애로 인한 불임과 체외수정시술시 본 약재를 활용한다면 좋은 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

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

1. 소회향 검액을 4, 8, 12일간 투여하였을 때 평균 총 난자수와 정상 형태의



- 난자 수는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
2. 체내 수정 후 2-세포기 배아에서 배반포로의 발생율은 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.
  3. Caspase-3의 발현양상은 대조군 및 투여군에서 차이가 관찰되지 않았다.
  4. MAPK의 발현은 대조군과 투여군 간의 통계적 유의성이 인정되지 않았다.
  5. MPG의 발현은 대조군과 투여군 간의 통계적 유의성이 인정되지 않았다.

□ 투 고 일 : 2010년 4월 28일

□ 심 사 일 : 2010년 5월 4일

□ 심사완료일 : 2010년 5월 12일

## 참고문헌

1. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1997:598-639.
2. 이우식. 불임치료의 최신지견. 대한산부인과학회지. 2005;48(5):1106-29.
3. 한의부인과학 편찬회. 한방여성의학( I ). 서울:정담. 2007:267-74.
4. 羅元愷. 中醫婦科學. 北京:人民衛生出版社. 1996:215.
5. 안규환 등. 歸腎丸이 白鼠의 배란과 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2005;18(3):1-18.
6. 전국한의학대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:永林社. 1994:344-5.
7. 張延模 主編. 中華臨床中藥學(上卷). 北京:人民衛生出版社. 1998:934-7.
8. 임은미. 여성본초학. 경가:전국의학. 2005:386-7.
9. 이수정 등. 大營煎이 白鼠의 排卵과 卵巢에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2005;18(4):108-18.
10. 이승준 등. 加味交感丹이 白鼠의 排卵과 卵巢에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2004;17(2):41-51.
11. 주진만, 김동철, 백승희 등. 八物湯이 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(3):91-110.
12. 이자영, 김동철. 오수유 투여가 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(2):60-78.
13. 김규섭, 백승희. 毓麟珠가 雌性생쥐의 生殖能力과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(1):43-56.
14. 이형곤 등. 調經散이 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(2):1-24.
15. 박영선, 김동철, 백승희 등. 溫胞飲이 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(4):1-23.
16. 정연철, 김동철, 백승희 등. 歸脾湯이 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(3):13-34.
17. W.D. Mosher, W.F. Pratt. Fecundity and infertility in the United states: incidence and trends. Fertil Steril. 1991;56:192-3.
18. 이보연. 난소의 노화. 대한폐경학회지. 1995;5(2):129-34.

19. 이도근 등. 여성의 연령이 체외수정 시술의 예후에 미치는 영향에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1996;39(8):1496-8.
20. 김석현. 난자 세포질내 정자주입술을 이용한 체외수정시술시 연령이 임신율에 미치는 영향에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1998;41(7):1811-9.
21. 許浚. 東醫寶鑑. 경남:동의보감출판사. 2005;1745-51.
22. 朱震亨 原著, 方廣 編註. 新編丹溪心法附餘. 서울:대성문화사. 1993;797-801.
23. 張介賓. 婦人規. 서울:법인문화사. 2004:222-64.
24. 武之望. 濟陰綱目. 서울:일중사. 1992:179-208.
25. 김은섭, 유동렬. 여성불임의 원인에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2000.
26. 조혜숙. 한방진단시스템을 이용한 女性不妊의 한의학적 因子 연구. 동의대학교 대학원. 2007.
27. 王清任. 醫林改錯. 북경:中國中醫藥出版社. 1995:53.
28. 今關和泉, 北畠芳子. 정유 및 정유성분이 생쥐 적출 소장에 미치는 작용에 대하여. 藥學雜誌. 1962;82:1326-8.
29. 반상석. 鎮痛, 消炎效果 및 關節炎에 미치는 小茴香과 蒔蘿子の 효능 비교 연구. 경산대학교 대학원. 2002.
30. 김철원. 부인과에 활용되고 있는 소복축어탕에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 1998;11(2):315-29.
31. Malini T et al. Effect of *Foeniculum vulgare* Mill. seed extract on the genital organs of male and female rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1985;29(1):21-6.
32. M Albert-Puleo. Fennel and anise as estrogenic agents. 1980;2(4):337-44.
33. V Modares Nejad, M Asadipour. Comparison of the effectiveness of fennel and mefenamic acid on pain intensity in dysmenorrhoea. *East Mediterr Health J.* 2006;12(3-4):423-7.
34. 지병철 등. 체외수정시술시 유세포분석을 이용한 과립막세포내 아포프토시스의 정량적 측정. 대한산부인과학회지. 2000;43(1):58-64.
35. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol.* 1993;14:126-30.
36. 한국유전자학회. 유전 제2권. 서울:도서출판 월드사이언스. 1998:77-128.
37. 김미란 등. 난소의 생식세포Apoptosis에 대한 JNK1과 JNK2의 역할. 대한폐경회지. 2007;13(3):173-83.
38. 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.
39. 권동진 등. 사람 난포의 성숙 정도와 Fas, Fas-ligand, Bcl-2, Bad의 발현. 대한산부인과학회지. 2003;46(1):55-61.
40. 양일호. 아포프토시스의 조절인자. *Korea J BRM.* 1996;6(1):9-22.
41. 이수재. *Cell Cycle. Cell Death and Apoptosis.* 제23차 대한핵의학회 연수교육. 2002:57-69.
42. 정광철. MAP kinase signaling pathways. *biochemistry news.* 1997;17(3):116-25.
43. 김선행. 체외수정시술 주기에서 자궁내막발달과 착상에 관한 연구. 대한

- 불임학회잡지. 1993;20(2):117-23.
44. 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.
45. Choi T et al. Mos/mitrogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(10):4730-5.
46. Posasa J, Cooper JA. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocyte. *Science.* 1992;255(5041):212-5.
47. T Choi, K Fukasawa, R Zhoo et al. The Mos/mitrogen-activated protein kinase pathway regulates the size and degradation of first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(14):7032-5.
48. M Tatsuka et al. Structural Organization of the Mouse DNA repair gene, N-methylpurine-DNA Glycosylase. *DNA and Cell Biology.* 1995;14(1):37-45.
49. Nam Keun Kim, Sook Hwan Lee, Tae Jong Sohn et al. Spatial expression of a DNA repair gene, N-methylpurine-DNA Glycosylase(MPG) during development in mice. *Anticancer Res.* 2000;20(5A):3037-43.
50. 손태중, 김남근, 이숙환, 한세열, 고정재, 박찬 등. 생쥐 태아 및 성체 조직에서의 N-methylpurine-DNA glycosylase 유전자의 발현. 발생과 생식. 1999;3(1):101-5.
51. Washington WJ et al. Age-dependent modulation of tissue-specific repair activities for 3-methyladenine and O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA in inbred mice. *Mech Aging Dev.* 1989;48:43-52.