

熟地黃이 남성생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향

장문석, 양응모, 유태원, 김도림, 박은화, 고은빛, 최문정, 김휴영, 오지훈, 심경준, 윤지원,
박성규*

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

Antioxidant Effects of Rehmanniae Radix Preparat in GC-1 Cells

Mun Seog Chang, Woong Mo Yang, Tae Weon Yu, Do rim Kim, Eun Hwa Park, Eun Bit Ko, Moon Jung Choi, Hyu Young Kim, Ji Hoon Oh, Kyung Jun Shim, Jiwon Yoon, and Seong Kyu Park*

Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to examine the antioxidant activity in the germ cells of the extract of Rehmanniae Radix Preparat (RR).

Methods : The extract was studied for diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, GC-1 cell viability by a modified MTT assay, the effects on H₂O₂-induced cytotoxicity by MTT assay and lipid peroxidation by malondialdehyde (MDA) formation, respectively.

Results : The results showed that the extract scavenged DPPH radical in a dose-dependent manner by up to 43.1%. The extract at concentrations of 100 µg/ml showed peak level of 136.5% in growth of GC-1 cell. The hydrogen peroxide-induced cytotoxicity was blocked by the extract at concentrations of 10, 50 and 100 µg/ml. The extract (50 and 100 µg/ml) also displayed a dose-dependent reduction of MDA formation on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation.

Conclusions : In conclusion, the extract of Rehmanniae Radix Preparat has strong antioxidant activity.

Key words : Rehmanniae Radix Preparat (RR), diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), MTT assay, hydrogen peroxide (H₂O₂), cytotoxicity, lipid peroxidation (LPO), GC-1 cells

서 론

熟地黃은 현삼과 (Scrophulariaceae)에 속한 다년생 초본인 지황 *Rehmannia glutinosa* (GAERTNER) LIBOSCH. 또는 懷慶地黃 *R. glutinosa* LIBOSCH. *hueichingensis* (CHAO et SCHIH) HSIA. 의 근경을 가공한 것이다¹⁾. 熟地黃은 補血滋陰, 益精填髓하는 效能으로 血虛萎黃, 眩暈心悸, 月經不調, 崩漏不止, 肝腎陰虧, 潮熱盜汗, 腰膝酸軟, 耳鳴耳聾, 頭目昏花, 鬚髮早白, 消渴, 腎虛喘促 뿐만 아니라 遺精陽痿, 不育不孕 증상을 치료한다²⁾.

숙지황의 약리작용으로 항노화작용과 관련하여 혈청 glutathione peroxidase의 활성을 뚜렷하게 증가시키고 혈청 과산화지질의 함량을 감소시켜 혈중 super-oxide dismutase (SOD)의 활성을 높인다는 연구가 발표되었다³⁾. 또한 숙지황이 君藥으로 배합된 六味地黃丸은 동물 모델에서 cAMP-reponsive element modulator (CREM) 유전자의 발현을 증가시켜 남성불임증을 치료하는 기전이 보고되었다⁴⁾. 그러나 熟地黃이 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포 (spermatogonia) 및 sertoli 세포 등 생식세포에 미치는 산화 스트레스의 영향에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 補血滋陰, 益精填髓의 효능으로 활용되고 있는 熟地黃이 남성불임에 미치는 기전을 확인하기 위해 생식세포의 일종인 GC-1 spg cell에 미치는 항산화 작용을 DPPH radical 소거활성, GC-1 spg cell에 대한 MTT assay, hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 변화에 대한 실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료 및 기기

1) 약재

본 실험에서 사용된 熟地黃은 숙지황 *Rehmannia glutinosa* LIBOSCH. 한국산으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 보관하였다.

2) 시료의 조제

숙지황 50 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 환류 추출기에 1차 증류수 1,000 ml와 함께 넣은 뒤 10 0°C 가까이 온도가 상승하여 탕액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 27.9 g을 얻었으며, 수율은 55.9% 이었다.

2. Cell culture

1) 세포주 및 시약

실험에 사용된 세포주는 생쥐의 Spermatogonia (GC-1 spg)로서 ATCC (America)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal Bovine Serum (FBS) 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL사 (USA)에서 구입되어 사용되었으며, 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), ethanol (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), hydrogen peroxide (Sigma, USA), sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-thiobarbituric acid (TBA), malondialdehyde (MDA), n-butanol, pyridine 등이 Sigma (USA)에서 구입되어 사용되었다.

2) 세포 배양

GC-1 spg cell line은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. GC-1은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양 용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3. DPPH에 의한 radical 소거 작용의 측정

DPPH에 의한 radical scavenging activity를 알아보기 위하여 동결건조 된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시액을 조제하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였고 시료와 같은 농도로 조제하였다. 96 well microplate (Corning, USA)에 동량의 ethanol에 녹인 0.1 mM DPPH와 각 농도의 시액을 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준 후, 실온에서 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다⁵⁾. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다. DPPH radical scavenging activity (%) = $[(AB-AT)/ AB] \times 100$, AB- absorbance of blank sample, AT- absorbance of tested extract solution.

4. GC-1에 대한 cell viability 측정

숙지황이 GC-1의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann(1983), Kotnik(1990) 등의 방법을 응용하였다⁶⁾. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 cell을 100 μL 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 20 μL 씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μL 처리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다. Cell viability (%) = $100 \times AT/ AC$, AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution.

5. Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity에 대한 항산화효과 측정

시료의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann(1

983), Kotnik(1990) 등의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다⁶⁾. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 cell을 100 μL 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 동량의 media를 처리 후 18시간동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200 μM H₂O₂을 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 5 mg/mL PBS에 녹인 MTT (Sigma, USA)를 20 μL 씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광 후 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μL 처리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Hydrogen Peroxide에 의한 Lipidperoxide (LPO) 생성에 관한 영향 측정

시료의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다⁷⁾. 6 well plate (Corning, USA)에 1×10^5 cells/well의 cell을 5 mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 동량의 media를 처리 후 18시간동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200 μM H₂O₂ 5 mL을 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 PBS로 2회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 PBS 500 μL 를 넣고 긁어냈다. 이것을 1.5 mL의 eppendorf tube에 담아 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 제거한 후 potassium phosphate buffer (PPB)를 첨가하여 cell을 풀어주었다. 부유된 cell을 -70°C에서 5분간, 37°C에서 5분간 방치 후 vortexing하는 과정을 4번 반복하는 freezing-thawing의 방법으로 cell를 lysis시켰다. 그 후 cell을 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 μL 를 취해 Bradford's Method⁸⁾로 단백질을 정량하였다. 15 mL conical tube에 각 농도별 시료를 넣고 0.1M PPB (pH 7.5), 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8%

2-thiobarbituric acid (TBA)를 처리하였다. 95°C에서 1시간 동안 incubation시킨 후 running water에서 식혔다. n-butanol:pyridine (15:1)의 혼합액을 가한 후 vortexing 한 후 3,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하였다. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. malondiadehyde (MDA) 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

7. 통계처리

실험성적은 평균치±표준오차 (Mean ± SE)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 검정하여 p값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. DPPH에 의한 radical 소거 활성 측정

숙지황의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과 ascorbic acid와 숙지황은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 숙지황은 50 µg/ml의 농도에서 20.0%의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100, 500, 1000 µg/ml의 농도에서 각각 31.2, 37.2, 43.1%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 1).

Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는 ascorbic acid는 0.006 mg/ml, 숙지황은 1.51 mg/ml이었다.

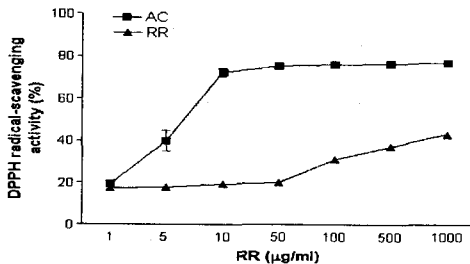


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and aqueous extract from *Rehmanniae Radix Preparat* (RR). Values indicate the mean ± S.E. of three replications. DPPH radical scavenging activity (%) = [(AB-AT)/AB]×100, AB: absorbance of blank sample, AT: absorbance of tested extract solution.

2. 숙지황이 GC-1 cell의 cell viability에 미치는 영향

숙지황이 GC-1 cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 숙지황의 농도는 5, 10, 50, 100 µg/ml의 범위에 대하여 측정하였다. 숙지황의 5, 10, 50, 100 µg/ml의 농도에서 GC-1 spg cell의 생존율은 각각 109.4, 117.3, 130.8, 136.5%로 유의성 있게 증가하였다. 숙지황 100 µg/ml의 농도에서 GC-1 spg cell의 생존율은 136.5%로서 가장 높았다 (Fig. 2).

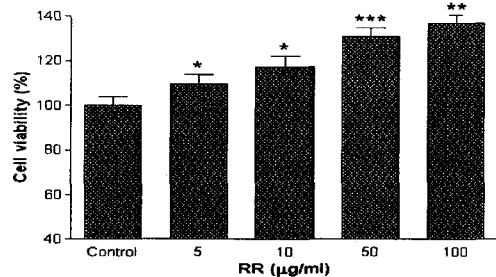


Fig. 2. Effect of aqueous extract from *Rehmanniae Radix Preparat* (RR) on GC-1 spg cells. GC-1 spg cells were treated with RR at 37°C for 24 h. Response to aqueous extract from RR was dose-dependent up to 100 µg/ml. Each column or point represents the mean ± S.E. (n=6). * Significantly different from the normal (*: p < 0.05, **: p < 0.01 and ***: p < 0.001).

3. Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화효과

GC-1 spg cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. 숙지황의 농도는 10, 50, 100 µg/ml의 범위에 대하여 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 spg cell은 정상군에 비하여 60.6%로 유의하게 cell viability가 감소하였다 (p < 0.01). Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 spg cell에 대하여 숙지황 처리군은 10, 50, 100 µg/ml의 농도에서 각각 84.1, 90.3, 91.5%로 H2O2-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 농도 의존적으로 증가되었다. 특히 숙지황 100 µg/ml의 농도처리군에서 H2O2-induced cytotoxicity에 대하여 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다 (p < 0.01, Fig. 3).

고찰 및 결론

남성불임은 최근 증가하는 추세에 있으며, 심리적 요인, 생식기의 감염, 주변환경으로부터 내분비 교란 물질에 대한 노출, 유전적 요인 등으로 매우 다양한 요인이 남성불임을 유발하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 정자의 농도가 낮거나 정자의 운동성이 떨어지거나 형태적인 이상이 발견되며, 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 고농도의 reactive oxygen species (ROS)가 관찰된다¹⁰⁾. 특히 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자형성장애의 원인이 될 수 있다¹¹⁾. 이러한 요인들은 정자의 운동성 및 acrosome membranes에 손상을 가져 오며, 몇몇의 환자의 경우는 seminal plasma 에서 antioxidant scavengers가 결핍되어 있는 것으로 보고되었다¹²⁾.

腎陰虛證의 대표적인 처방인 六味地黃丸은 陰虛陽亢과 陽強易舉하여 나타나는 性機能의 虛弱性 興奮으로 인한 遺精 증상의 치료에 사용되어왔다¹³⁾. 六味地黃丸의 君藥으로서 용량이 가장 많은 구성 약물이며 滋陰補腎, 填精益髓하는 效能으로 遺精陽痿, 不育不孕의 치료에 활용되어 온 熟地黃이 남성불임에 미치는 기전을 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 숙지황 추출물의 농도별 희석액이 DPPH radical 소거 효과가 있는지의 여부를 관찰하기 위하여 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 숙지황의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 비교하였다. Ascorbic acid와 숙지황은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC50)는 ascorbic acid는 0.006 mg/ml, 숙지황은 1.51 mg/ml이었다.

숙지황이 GC-1 spg cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정한 결과 숙지황 추출물은 GC-1 spg cell에 대하여 농도 의존적으로 생존율을 증가시켰음이 관찰되었다. 숙지황의 5, 10, 50, 100 µg/ml의 농도에서 GC-1 spg cell의 생존율은 각각 109.4, 117.3, 130.8, 136.5%로 유의성 있게 증가하였다.

GC-1 spg cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여 숙지황이 GC-1 spg cell의 산화적 손상을 보호할 수 있는가를 관찰하기 위하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 spg cell은 정상군에 비하여 60.6%로 유의하게 cell viability가 감소하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 spg cell에 대하여 숙지황 처리군은 H2O2-induced

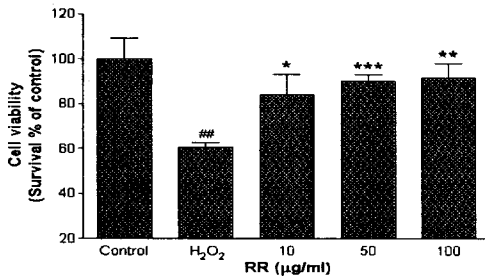


Fig. 3. Protective effect of aqueous extract from *Rehmannia Radix Preparat* (RR) on H₂O₂-induced cytotoxicity. GC-1 spg cells treated with RR were incubated in the presence or absence of 25 µM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean ± S.E. (n = 6). # Significantly different from the control (###: p < 0.01) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*: p < 0.05, **: p < 0.01 and ***: p < 0.001).

4. Hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향

GC-1 spg cell에 대하여 정상군의 MDA 함량은 5.86 nmol/mg protein 인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 7.53 nmol/mg protein으로 유의성 있게 과산화지질이 증가하였음을 확인하였다 (p < 0.05). Hydrogen peroxide와 숙지황의 동시처리군은 50, 100 µg/ml의 농도에서 MDA가 각각 6.30, 5.55 nmol/mg protein으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (p < 0.05, Fig. 4).

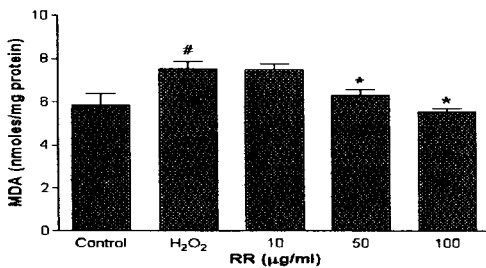


Fig. 4. Protective effect of aqueous extract from *Rehmannia Radix Preparat* (RR) on H₂O₂-induced lipid peroxidation. GC-1 spg cells treated with RR were incubated in the presence or absence of 25 µM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for MDA formation. Each column or point represents the mean ± S.E. (n = 3). Significantly different from the normal value (#: p < 0.05) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*: p < 0.05).

cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 농도의존적으로 증가되었으며, 특히 숙지황 100 µg/ml의 농도처리군에서 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

LPO는 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이며, 이러한 LPO 함량은 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용되어진다. 지질과산화 억제 활성을 측정하기 위하여 hydrogen peroxide에 의하여 산화가 용이하게 일어나 지질과산화물인 MDA를 잘 생성하는 GC-1 cell의 protein을 분리하여 사용하였다. GC-1 cell에 대한 hydrogen peroxide에 의해 유도된 LPO의 지표물질인 MDA 함량을 측정한 결과 숙지황에 의해 농도 의존적으로 MDA 함량이 감소하였으며, 특히 숙지황 100 µg/ml의 농도 처리군에서 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

이상의 실험결과 熟地黃은 GC-1 cell에 대한 생존율을 증가하는 효과가 있으며, DPPH radical 소거 활성과 hydrogen peroxide에 의해 유발된 GC-1 cell의 산화 스트레스에 대한 항산화효과에서 유의한 결과가 나타났으며, hydrogen peroxide에 의한 LPO 함량에 미치는 변화에서 지질과산화물의 생성을 억제하였다. 이로써 熟地黃은 산화물질로부터 남성 생식세포를 보호하는 기전을 통하여, 남성 불임의 치료에 응용될 수 있는 약물임이 확인되었다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學教授共編著. 本草學. 서울:永林社. 1991:190-192, 580-581
2. 國家中醫藥管理局 中華本草編委會. 中華本草. 北京:上海科學技術出版社. 1999:7, 384-388
3. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. 2001:467-469
4. Oh MS, Chang MS, Park W, Kim DR, Bae H, Huh Y, Park SK. Yukmijihwang-tang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Reproductive toxicology*. 2007;24(3-4):365-70
5. 강순아, 오명숙, 김도림, 강지웅, 김원남, 박은화, 장문석, 박성규. 當歸와 黃芪의 배합 변화가 DPPH 자유기 소거에 미치는 영향 연구. 대한본초학회지. 2006;21(1):17-24
6. 오명숙, 김도림, 양응모, 장문석, 박수연, 강순아, 박성규. Hydrogen Peroxide에 의해 유도된 남성 생식세포의 세포독성에 미치는 鎖陽의 효과. 대한한의학방제학회지. 2004;12(2):155-162
7. 오명숙, 김도림, 성은진, 장문석, 박성규. 山茱萸가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(6):1541-1454
8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254
9. 오명숙, 김도림, 김소연, 장문석, 박성규. 補骨脂가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(1):81-86
10. 장문석, 오명숙, 이병희, 양응모, 김원남, 김도림, 김향미, 박은화, 박완수, 김윤경, 박성규. 山藥이 정자 운동성 저하에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2006;14(1):168-175
11. Park WH, Chang MS, Yang WM, Bae H, Kim NI, Park SK. Cytoprotective effect of Panax ginseng on gallic acid-induced toxicity in TM3 mouse Leydig cells. *Fitoterapia*. 2007;78:577-579
12. Park WS, Shin DY, Kim DR, Yang WM, Chang MS, Park SK. Korean ginseng induces spermatogenesis in rats through the activation of cAMP-responsive element modulator (CREM). *Fertility and Sterility*. 2007;88(4):1000-1002
13. 박성규, 김윤경, 오명숙. 처방제형학. 서울:영림사. 2006:210-212