

人蔘이 생쥐의 남성 생식세포 GC-1 Spermatogonia의 항산화에 미치는 영향

심경준¹, 강지웅¹, 최봉재¹, 박수연², 장문석¹, 박성규^{1*}

1: 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실
2: 경희대학교 체육과학연구소

Antioxidant Effects of *Panax ginseng* in Mouse GC-1 Spermatogonia Cells

Kyung Jun Shim¹, Ji Ung Kang¹, Bong-Jae Choi¹, Soo Yeon Park²,
Mun Seog Chang¹, Seong Kyu Park^{1*}

1: Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University
2: Research Institute of Physical Education, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : Previously we reported that the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) increased sperm count and motility, also induced spermatogenesis via cAMP-responsive element modulator(CREM) activation in rat testes. In this study, for the first step of spermatogenesis in germ cell lines, the antioxidant activity of *Panax ginseng* were examined in mouse GC-1 spermatogonia cells.

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

Results : The results showed that the extract scavenged DPPH radical with the IC₅₀ being 0.631 mg/ml. The extract at concentrations of 5, and 10, 50, 100, 250 µg/ml increased GC-1 cell viability significantly ($p < 0.05$, and $p < 0.01$). Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity (73.8%, $p < 0.01$) was blocked by the extract at concentrations of 50, and 100, 250, 500 µg/ml significantly ($p < 0.05$, and $p < 0.01$). The extract at concentrations of 10, and 50 µg/ml decreased the MDA formation on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation.

Conclusions : In conclusion, the extract of *Panax ginseng* has potent antioxidant activity and increases the survival rate of GC-1 spg cells against H₂O₂-induced cytotoxicity.

Key words : *Panax ginseng*, GC-1 cells, MTT assay, hydrogen peroxide(H₂O₂), lipid peroxidation (LPO)

서론

人蔘은 五加科(Araliaceae)에 속한 다년생 초본인 인삼 *Panax ginseng* C.A. Mey의 뿌리를 건조한 것이다¹⁾. 人蔘은 味가 甘微苦하고, 性은 微溫, 無毒하며, 肺·脾·心·腎經으로 歸經한다²⁾. 大補元氣, 補脾益肺, 生津止渴, 安

神益智의 효능으로 氣虛欲脫, 脈微欲絕, 脾虛倦怠乏力, 肺虛氣短咳, 咳嗽, 氣虛津傷口渴 등의 一切氣血津液不足之症을 치료하며, 腎虛陽痿 증상에도 사용하여 《本草綱目》에 “治男婦一切虛症” 및 《本草再新》에 “聰耳明目固精滋水”라 기재되어 있다³⁾.

인삼의 주요 유효성분은 ginsenoside로 알려져 있으며

* 교신저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실
· Tel : 02-961-0330, · E-mail : comskp@khu.ac.kr
· 접수 : 2009년 5월 30일 · 수정 : 2009년 6월 22일 · 채택 : 2009년 6월 22일

이 외에 여러 종의 아미노산과 polysaccharide인 panaxan A-U, 인삼의 독특한 향미를 내는 β -elemene과 vitamin, flavonoids류를 함유하고 있다⁴⁾.

인삼의 약리작용은 중추신경계에 작용하여 흥분 및益智작용, 면역증강작용, 강심작용, 항허혈작용이 있으며 내분비계에 작용하여 시상하부, 뇌하수체, 부신피질, 성선에 대해 흥분작용 등이 알려져 있고³⁾, 이외에도 항스트레스작용⁵⁾, 항노화작용⁶⁾, 항산화작용⁷⁾ 및 성기능 활성화작용⁸⁾ 등에 대한 보고가 있다. 또한 본 연구팀은 인삼이 동물 모델에서 정자의 수와 운동성을 증가시키며, 정자형성 과정의 초기 단계에서 중요한 역할을 하는 cAMP-responsive element modulator (CREM)의 발현을 높이는 기전을 통하여 정자형성에 기여함을 보고한 바 있다⁹⁾.

그러나 人蔘이 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포(spermatogonia) 및 sertoli 세포 등 생식세포(germ cell)에 미치는 산화 스트레스에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 滋養強壯의 要藥으로 사용되어 온 人蔘이 DPPH에 의한 radical 소거활성, 생식세포의 일종인 GC-1 spg cell에 대한 생존율, hydrogen peroxide에 의해 유발된 산화 스트레스에 대한 항산화효과 및 lipidperoxide(LPO) 함량에 미치는 변화에 대한 실험을 수행하여 보고하는 바이다.

실 험

1. 약재 및 시료의 조제

1) 약재

본 실험에서 사용된 人蔘은 *Panax ginseng* C.A. MEY.로서 금산산 6년근으로 농업협동조합중앙회를 통하여 구입하여, 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실에서 외부형태를 비교 확인한 후 사용하였고 일부는 보관하였다.

2) 시료의 조제

인삼 50 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤 환류추출기에 1차 증류수 1,000 ml와 함께 넣은 뒤 100°C 가까이 온도가 상승하여 탕액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기(Eyela, Japan)를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 15.6 g을 얻었으며, 수율은 31.1%이었다.

2. Cell culture

1) 세포주 및 시약

실험에 사용된 세포주는 GC-1 spg (spermatogonia, mouse)로서 America Tissue Cell Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM)과 fetal bovine serum (FBS) 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL (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 등도 Sigma(USA)에서 구입하여 사용되었다.

2) 세포 배양

GC-1 spg cell line은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 ug/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, USA) 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 배양용기에 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 동결건조된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 ug/ml의 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 30분간 방치한 후 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다. DPPH radical scavenging activity (%) = [(AB-AT)/AB] × 100, AB-absorbance of blank sample, AT-absorbance of tested extract solution.

4. GC-1에 대한 cell viability 측정

인삼이 GC-1의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 96 well plate에 1×10⁵ cells/well의 cell을 100 ul씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어 주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml을 각 well에 처리하고 24시간 동안

배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 μ l씩 각 well에 처리한 후 알루미늄 호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μ l 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(%) = AT/AC \times 100, 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 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 cell을 100 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 50 μ M H₂O₂을 각각의 well에 처리하였다. 4시간 동안 배양한 후에 PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250, 500 μ g/ml와 동량의 media를 처리 후 20시간 동안 배양하였다. PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20 μ l와 FBS free DMEM 200 μ l을 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광 후 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. DMSO를 200 μ l 처리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향 측정

시료의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 6 well plate (Corning, USA)에 2×10^4 cells/well의 cell을 5 ml 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간 동안 배양한 후 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250 μ g/ml와 FBS free DMEM에 녹인 25 μ M H₂O₂을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 PBS 500 μ l를 넣고 끌어내어 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 15,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 potassium phosphate buffer (PPB)를 첨가하였다. 부유된 cell을 -70°C에서 5분간, 37°C에서 5분간 방치 후 freezing-thawing의 방법으로 cell를 lysis시켰다. 원심분리하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 μ l를 취해 Bradford's method로 단백질을 정량하였다¹⁰⁾. 15 ml conical tube에 각 농도별 시료를 넣고 0.1 M PPB (pH 7.5), 8.1% sodium dodecyl sulfate,

20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8% TBA를 처리하였다. 95°C에서 1시간 동안 incubation시킨 후 running water에서 식혔다. n-butanol:pyridine (15:1)의 혼합액을 넣고 vortexing 한 후 1,500 \times g에서 20분간 원심분리하였다. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

7. 통계처리

실험성적은 평균치 \pm 표준오차(Mean \pm 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 결과

인삼의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정 한 결과 ascorbic acid와 인삼은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 인삼은 50 μ g/ml의 농도에서 11.2%의 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100, 500, 1000 μ g/ml의 농도에서 각각 20.4, 43.6, 58.0%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도(IC50)는 ascorbic acid는 0.006 mg/ml, 인삼은 0.631 mg/ml이었다(Fig. 1).

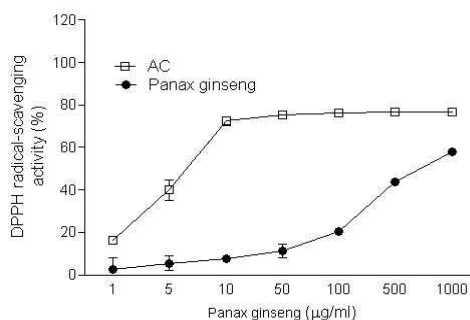


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid(AC) and *Panax ginseng* extract

Values indicate the mean \pm SE of three replications. DPPH radical scavenging activity(%) = [(AB-AT)/AB] \times 100, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

2. 인삼이 GC-1 spg cell의 cell viability 측정 결과

인삼 5, 10, 50, 100, 250 μ g/ml의 농도에서 GC-1 spg cell의 생존율은 각각 122.9, 127.9, 134.6, 126.1, 122.0%로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2).

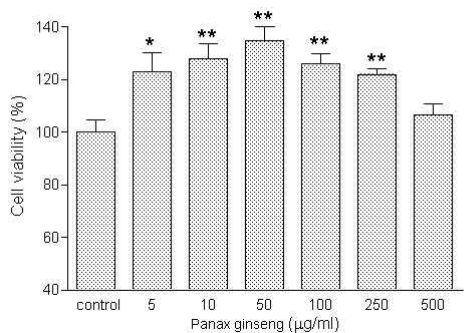


Fig. 2. Effect of *Panax ginseng* extract on GC-1 spg cells
GC-1 spg cells were treated with *Panax ginseng* extract at 37°C for 24 h. Response to *Panax ginseng* extract was maximum on 50 µg/ml. Each column or point represents the mean ± SE (n=6). * Significantly different from the control (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

3. Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화효과

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 spg cell은 정상군에 비하여 73.8%로 유의하게 cell viability가 감소하였다($p < 0.01$). 인삼처리군은 50, 100, 250, 500 µg/ml의 농도에서 각각 96.9, 103.3, 110.4, 106.9%로 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 3).

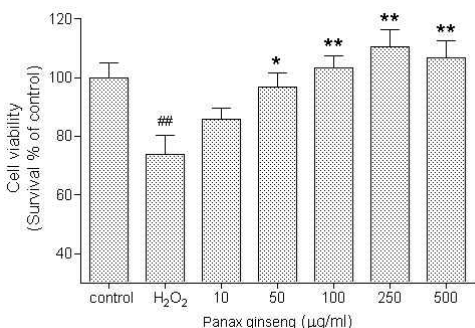


Fig. 3. Protective effect of *Panax ginseng* extract on H₂O₂-induced cytotoxicity
GC-1 spg cells treated with *Panax ginseng* extract were incubated in the presence or absence of 50 µM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean ± SE (n=6). # Significantly different from the normal value (## : $p < 0.01$) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

4. Hydrogen peroxide에 의한 LPO 함량 변화

MDA 함량은 정상군(6.67 nmol/mg protein)에 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 11.12 nmol/mg protein으로 유의성 있게 과산화지질이 증가하였다($p < 0.05$). 인삼처리군은 10, 50 µg/ml의 농도에서 8.69, 6.13 nmol/mg protein으로 대조군에 비하여 MDA 함량이 감소하였다(Fig. 4).

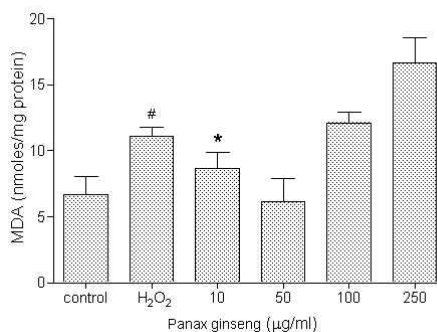


Fig. 4. Protective effect of *Panax ginseng* extract on H₂O₂-induced lipid peroxidation
GC-1 spg cells treated with *Panax ginseng* extract were incubated in the presence or absence of 25 µM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for MDA formation. Each column or point represents the mean ± SE (n=6). # Significantly different from the normal value (# : $p < 0.05$) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (* : $p < 0.05$).

고찰 및 결론

人蔘은 《神農本草》에 처음 기재되어 “主補五臟 久服輕身延年”의 효능으로 사용되어왔다³⁾. 《東醫寶鑑》에서 남자의 陽脫, 痿弱, 精冷과 精薄 증상을 치료하는 固本健陽丹, 續嗣丹 등의 처방에 인삼이 포함되었으며, 瓊玉膏, 延年益壽不老丹, 延齡固本丹, 固真飲子 등의 처방에서 남성의 精을 보충하기 위해 인삼이 활용되었다¹¹⁾.

정자는 정세관에서 정모세포의 감수분열에 의하여 형성되게 된다. 정세관(seminiferous tubule)은 정소 중격(septula testis)에 의해 구분된 수개의 소엽(lobule)내에 나선형으로 배치되어 있고 정세관 사이에는 결합조직으로 채워져 있으며 여기에 leydig 세포가 집단으로 분포하고 정세관은 기저막(basement membrane)에 의하여 결합조직과 정세관의 생식상피(germinal epithelium)로 구분된다. 생식상피의 기저막에 따라 분포된 정원세포(spermatogonia)가 1 또는 2층으로 구성되고 그 위에 제1정모세포(primary spermatocyte), 제2정모세포(second spermatocyte), 정자세포(spermatid) 및 정자(spermatozoon)로 구성되어 있으며 이들 세포 사이에 지지 및 영양공급 기능을 하는 sertoli 세포로 구성되어 있다. 이러한 정세관의 생식상피 내 정모세포는 감수분열에 의하여 정자가 형성되게 되며, 정조세포에서 정자로 분화 성숙되는 기간을 정자 형성기간(duration of spermatogenesis)이라 한다¹²⁾.

세포 내 항산화성 능력과 redox potential은 oxidative stress로부터 세포를 보호하는데 필수적임을 알 수 있는데, 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포 및 sertoli 세포 등 생식세포들도 산화 스트레스에 민감한 반응을 보이며, 심각한 경우 불임까지 초래 할 수 있다는 보고가 있고¹³⁾, 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 고농도의

reactive oxygen species (ROS)가 관찰되었다. 전립선염이나 다른 감염질환 등은 염증을 초래하게 되는데¹⁴⁾, 특히 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자형성장애의 원인이 될 수 있다¹⁵⁾. 이러한 요인들은 정자의 운동성 및 acrosome membranes에 손상을 가져 오며, 몇몇 환자의 경우는 seminal plasma에서 antioxidant scavengers가 결핍되어 있는 것으로 보고되었다¹³⁾.

人蔘이 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포(spermatogonia) 및 sertoli 세포 등 생식세포에 미치는 산화 스트레스의 영향에 대한 연구는 보고되지 않았다. 이에 산화 스트레스에 의해 유발된 정원세포의 불임에 미치는 人蔘의 남성불임의 치료 효과를 연구하기 위하여, mouse로부터 유래한 생식세포(germ cell, GC-1) spermatogonia를 대상으로 다음과 같은 실험을 수행하였다.

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다¹⁶⁾. 인삼 추출물의 농도별 희석액이 DPPH radical 소거 효과가 있는지의 여부를 관찰하기 위하여 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 인삼의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 비교하였다. 인삼은 50, 100, 500, 1000 µg/ml의 농도에서 각각 11.2, 20.4, 43.6, 58.0%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, ascorbic acid와 인삼의 IC₅₀은 각각 6 µg/ml, 631 µg/ml이었다. 실험 결과 ascorbic acid와 인삼은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으나, 인삼은 ascorbic acid에 비하여 DPPH radical 소거 활성이 현저히 미약하였으며 기존 보고된 산수유의 IC₅₀ 200 µg/ml¹⁷⁾, 보골지의 IC₅₀ 427 µg/ml¹⁸⁾에 비하여 DPPH radical 소거 활성이 저하되었음을 알 수 있었다.

인삼이 GC-1 spg cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정할 결과 인삼 추출물은 5, 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml의 모든 농도에 대하여 GC-1 spg cell의 생존율을 증가시켰음이 관찰되었다. 특히 인삼 50 µg/ml의 농도에서 GC-1 spg cell의 생존율은 134.6%로서 가장 높았다.

이와 같이 GC-1 spg cell에 대한 안전한 cell viability 결과에 근거하여 인삼이 GC-1 spg cell의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 관찰하기 위하여, hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 spg cell은 정상군에 비하여 73.8%의 cytotoxicity를 나타내었으며, 인삼 처리군은 50, 100, 250, 500 µg/ml의 농도에서 각각 96.9, 103.3, 110.4, 106.9%로 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 유의성 있게 증가되었다. 특히 인삼 250 µg/ml의 농도처리군에서 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

LPO는 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물로서, LPO 함량은 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용된다. LPO 억제 활성을 측정하기 위하여 지질과산화물인 MDA를 생성하는 GC-1 spg cell의 protein을 분리하여 사용하였다.

GC-1 spg cell의 MDA 함량은 6.67 nmol/mg protein인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 11.12 nmol/mg protein으로 과산화지질이 유의성 있게 증가되었음을 확인하였다. 인삼처리군은 50 µg/ml의 농도에서 MDA 함량을 6.13 nmol/mg protein으로 유의성 있게 감소시켜 LPO 생성 억제효과를 나타내었다.

위에서 살펴본 바와 같이 인삼이 정자형성에 미치는 기전을 확인하기 위하여 생식세포(germ cell)에 미치는 산화 스트레스에 대한 실험을 수행하였다. 실험 결과 인삼은 DPPH radical 소거활성과 GC-1 spg cell에 대한 생존율을 증가하는 효과가 있으며, hydrogen peroxide에 의해 유발된 GC-1 spg cell의 cytotoxicity에 대한 세포 보호 및 지질과산화물의 생성 억제효과를 통하여 항산화 효과가 있음이 입증되었다.

감사의 글

본 연구는 경희대학교 대학원의 2008학년도 우수연구 논문 장학금 지원을 받아 연구되었음

참고문헌

1. 安德均. 韓國本草圖鑑. 서울 : 도서출판 교학사. 1998 : 644-5.
2. 全國韓醫科大學 本草學共同教材編纂委員會. 本草學. 서울 : 영림사. 1998 : 531-3.
3. 國家中醫藥管理局 《中華本草》編委會. 中華本草. 上海 : 上海科學技術出版社. 1999 : 805-24.
4. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. 2001 : 422-27.
5. 김락두, 김명혜, 진창배. 人蔘의 抗스트레스作用에 關한 研究. Kor J Pharmacog. 1979 ; 10(2) : 61-7.
6. 최진호, 오성기. 高麗人蔘의 老化抑制作用에 關한 研究. Korean J Food Sci Technol. 1985 ; 17(6) : 506-15.
7. Liu ZQ, Wang ZC, Sun YX et al. In vitro study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. J Agric Food Chem. 2003 ; 51 : 2555-8.

8. 홍성렬, 주충노. 인삼 사포닌이 쥐의 정소에서의 Androgen 생합성에 미치는 영향. *Korean J Ginseng Sci.* 1985 ; 9(2) : 213-20.
9. 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). *Fertil Steril.* 2007 ; 88(4) : 1000-2.
10. 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 : 248-54.
11. 허준. *東醫寶鑑*. 서울 : 법인문화사. 1999 : 152-3.
12. Reddi PP, Shore AN, Acharya KK, Herr JC. Transcriptional regulation of spermiogenesis: insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J Reprod Immunol.* 2002 ; 53(1-2) : 25-36.
13. Smith R, Vatman D, Ponce J. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Biology of Reproduction.* 1984 ; 30 : 323-32.
14. Ludwig M, Dimitrakov J, Diemer T. Prostatitis syndrome. Changes in the ejaculate and effects on fertility. *Der Urologe A.* 2001 ; 40 : 18-23.
15. Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology.* 2000 ; 55(6) : 881-5.
16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature.* 1958 ; 181 : 1199-200.
17. 오명숙, 김도림, 성은진, 장문석, 박성규. 山茱萸가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2005 ; 19(6) : 1541-5.
18. 오명숙, 김도림, 김소연, 장문석, 박성규. 補骨脂가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2005 ; 19(1) : 81-6.