

人蔘이 수컷 생쥐의 정자 수와 CatSper3, 4 단백질 발현에 미치는 영향

박은화, 김도림, 박성규, 장문석*

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

Effects of Ginseng Radix on sperm count and CatSper3, 4 proteins expression in Male Mice

Eun Hwa Park, Do Rim Kim, Seong Kyu Park and Mun Seog Chang*

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

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the reproductive effect of Ginseng radix on male mice.

Methods : Male C57BL/6J mice were divided into four groups ; normal group (vehicle-treated, n=8), Ginseng radix treatment group (100, 500, 1000 mg/kg, n=8). Ginseng radix extract was treated for 5 weeks. After treatment each group was examined for assessment of sperm count and CatSper protein expression using computer assisted semen analysis (CASA) system and the immunofluorescence.

Results : Sperm count of normal and Ginseng radix extract treated group were 287,57 vs. 371,62, 364,83, 343,29 x10⁶, respectively. The CatSper3, 4 proteins expression of Ginseng radix treated group were significantly increased than that of normal group.

Conclusions : These findings suggest that the Ginseng radix improves male reproductive function by increasing sperm count and CatSper protein expression.

Key words : Ginseng radix, Sperm count, Cation channel of Sperm (CatSper)

서론

불임이란 피임을 하지 않고 1년 이상 정상적인 부부생활을 하면서 임신하지 못하는 것으로, 불임부부는 전체 부부의 10-20%를 차지하고 있다. 불임의 원인은 여성에게만 있는 경우가 약 40%, 남성에게만 있는 경우가 약 40%, 남성과 여성 양쪽 모두에게 있는 경우가 약 10%, 원인불명인 경우가 약 10%로 나타내며, 결과적으로 그 원인의 절반은 남성요인이라 할 수 있다^{1,2)}. 최근 남성불임은 잦은 음주, 흡연, 환경오염, 영양섭취, 과도한 약물복용, 환경독소에서의 노출, 지나친 성교, 피로, 스트레스 등으로 증가하는 추세이며, 이로 인해 정상적인 남성에게 있어서도 정자의 운동성, 정자 수 감소 등이 나타나고 있다³⁾.

남성불임의 원인으로 무정자증, 정자질의 장애, 정자형성장애, 정자의 운동성 감소 등이 주요한 원인으로 파악된다²⁾. 정자형성장애에는 고환에서의 생성된 후 정자수가 적게 만들어지는 감정자증 (oligozoospermia), 정자의 활동성이 약한 약

정자증 (asthenozoospermia)이 있다³⁾.

韓醫學에서는 남성불임을 男性不育證이라 하며, 그 病理는 氣衰不育, 精清不育, 早泄不育 및 精寒不育으로 분류하고, 治法으로는 氣衰不育은 保陽補氣法, 精清不育은 滋陰益水法, 早泄不育은 澁精秘氣法, 精寒不育은 溫腎補精法을 응용한다⁴⁾.

정자의 운동성과 관련하여, 고환에서 생성된 정자 (spermatozoa)는 운동성을 갖지 못한 미성숙 상태로 존재한다. 그 후 정자는 부고환으로 이동되어 성숙과정을 거치고 직진 운동성을 갖게 되어 수정시킬 수 있는 능력을 획득한다. 사정이 되기 전까지 정자는 거의 활동을 하지 않는 상태로 있다가, 사정이 된 정자는 여성의 자궁을 거치면서 수정능획득을 시작하게 되고, 난관협부를 거치면서 hyperactivation 운동성과 첨체반응을 유도하게 된다⁵⁾. 정자의 hyperactivation 운동성은 난자를 둘러싼 세포층인 cumulus cell과 투명대를 뚫고 zona pellucida를 통과하는데 필수적인 요소이다⁶⁾.

정자 특이적 양이온 채널인 CatSper는 Cation channel of Sperm에서 유래한 것으로 CatSper family는 CatSper1,

*교신저자 : 장문석, 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실.

· Tel : 02-961-9443, · Fax : 02-961-0536, · E-mail : mschang@khu.ac.kr,

· 접수 : 2012년 2월 9일 · 수정 : 2012년 3월 3일 · 채택 : 2012년 3월 16일

2, 3, 4로 구성되었다. CatSper는 정자의 hyperactivation 과정에서 Ca^{2+} 유입을 조절하는 채널로서 세포내 pH와 cAMP 농도조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CatSper는 인간과 생쥐 등의 고환 내에서 단독적이며 특이적으로 발현이 되는 양상을 보여주며, 면역형광 염색법을 통하여 CatSper가 정자의 tail 부위에 있는 principal piece에 위치하고 있음이 밝혀졌다^{7,8)}.

人蔘은 五加科 (Araliaceae)에 속한 다년생 초본인 *Panax ginseng* C. A. Meyer의 뿌리를 건조한 것이다⁹⁾. 人蔘의 性味는 甘微苦, 微溫하며 大補元氣, 補脾益肺, 生津止渴, 安神, 益智의 효능을 가지고 있다¹⁰⁾. 人蔘은 『本草蒙筌』에서 “滋補元陽”, 『本草再新』에서 “固精滋水”라 하여 남성불임 치료와 관련하여 언급되어 있으며¹¹⁾, 男性不育에 활용된 처방으로 『東醫寶鑑』에서 固本健陽丹, 瓊玉膏, 延年益壽不老丹, 延齡固本丹, 固真飲子 등 남성의 精을 보하는 효능에 人蔘이 사용되었다¹²⁾.

본 연구팀은 인삼이 흰쥐에서 정자의 수를 증가시키는 것이 CREM 유전자 발현을 향상시키는 기전과 관련되어 있음과 정자의 전체 운동성을 높여주는 것을 보고하였다¹³⁾. 그러나 인삼이 정자와 난자의 수정에 주요한 역할을 하는 수정능획득에 관여하는 인자로서 hyperactivation 운동성에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 수컷 생쥐에 인삼을 투여하여 computer assisted semen analysis (CASA) 장치를 이용하여 정자수를 분석하였으며, 정자의 hyperactivation 운동성과 관련된 지표인 CatSper3와 CatSper4의 단백질 발현을 면역형광 염색법으로 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료 및 시약

1) 약재

본 실험에서 사용된 인삼은 6년 근 국내산으로 농협중앙회 인삼검사소 (한국)를 통하여 구입하였으며, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 보관하였다.

2) 시료의 조제

인삼 300 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 1차 증류수 6,000 ml와 함께 넣어 90분 동안 냉침하고, 환류추출기를 이용하여 100℃ 가까이 온도가 상승하여 탱액이 끓는 시점으로부터 90분 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 76.6 g을 얻었으며, 수율은 25.5% 이었다.

3) 시약

Sperm washing medium (GIBCO, USA), 2X-CEL disposable sperm analysis chambers (in depths of 80 μ m) (Hamilton Thorne, USA), Urethane (Sigma Chemical Co., USA), Bouin's solution (Sigma Chemical Co., USA), Ethanol (Sigma Chemical Co., USA),

Saponin (Sigma Chemical Co., USA), Gelatin (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다.

2. 방법

1) 실험동물

본 연구에 사용된 동물은 5주령 된 C57BL/6J 수컷 생쥐를 중앙동물 (Japan)로부터 분양받아 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10-18 회/h, light/dark 12 h, 조도 150-300 Lux의 사육환경에서 사육하였다. 1주일간 동물실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 시험군의 구성 및 투여량

각 시험군은 8마리로 하였으며, 대조군과 인삼 투여군으로 나누었다. 인삼 투여군은 투여 용량에 따라 100 mg/kg, 500 mg/kg, 1,000 mg/kg로 나누어 1일 1회 5주간 경구투여 하였다. 대조군의 동물에는 증류수만을 투여하였다.

3) 정자 수의 측정

실험동물은 CO_2 를 흡입하여 질식사킨 후 경추 탈구하여 처사시켰다. 생쥐의 부고환에서 cauda 부분을 적출하여 sperm washing medium 내에서 충분히 자른 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 90분간 배양한 후 10 μ l를 취하여 CASA (Hamilton Thorne, USA) 장치를 이용하여 정자 수를 측정하였다.

4) CatSper3 단백질과 CatSper4 단백질의 면역형광 염색법

면역형광 염색법을 시행하기 위해 생쥐의 고환을 적출하였다. Bouin's solution에서 24시간 동안 고정된 고환을 70, 80, 95, 100% ethanol과 xylene에서 탈수시킨 다음 파라핀으로 포매하였다. 포매된 고환은 7 μ m 두께로 절단하여 고환 조직을 만들어 xylene과 100, 95, 80, 70% ethanol에서 탈파라핀화 과정을 진행하였다. 고환 조직을 3% H_2O_2 가 포함된 PBS 용액에서 20분간 배양한 후 PBS로 3회 씻어주고, saponin 0.5 mg과 gelatin 2 mg/ml로 1시간 동안 처리하여 nonspecific 한 binding site를 차단하였다. 고환 조직은 각각 1차 antibody로서 CatSper3 또는 CatSper4와 함께 상온에서 24시간 배양한 후 PBS로 3회 씻어주었다. 2차 antibody (Cy3-conjugated anti-rabbit 1:500, Cy3-conjugated anti-biotin 1:500)와 함께 1시간 동안 배양한 후 PBS로 3회 씻어주었다.

5) 통계처리

실험성적은 평균치 \pm 표준편차 (Mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 시험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 검정하여 $p < 0.05$ 일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 인삼이 정자 수에 미치는 영향

인삼이 정자 수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 인삼을

100, 500, 1,000 mg/kg 농도로 5주간 경구 투여한 후 정자 수를 측정하였다. 정자 수는 대조군에서 287.57×10^6 이었으며, 인삼 투여군 100, 500, 1,000 mg/kg에서는 각각 371.62, 364.83, 343.29 $\times 10^6$ 으로 모두 유의성 있게 정자 수가 증가하였다 ($p < 0.05$, Fig. 1).

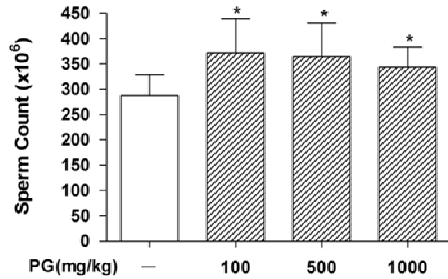


Fig. 1. Effect of Ginseng radix (PG) treatments on sperm count. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 8). * significantly different from the normal value (* : $p < 0.05$).

2. 인삼이 CatSper3 단백질 발현에 미치는 영향

고환 조직의 형태는 대조군과 인삼 투여군 모두 유사하였으며, CatSper3 단백질이 붉은 반점으로 염색되었다. 대조군에 비하여 인삼 투여군 100, 500, 1,000 mg/kg에서는 붉은 반점으로 염색된 CatSper3 단백질의 밝기가 현저하게 증가하였으며 CatSper3 단백질의 염색층은 인삼 투여군의 농도에 비례하여 두껍게 증가하는 경향을 나타내어, 인삼이 CarSper3 단백질의 발현을 증가시켰음이 관찰되었다 (Fig. 2).

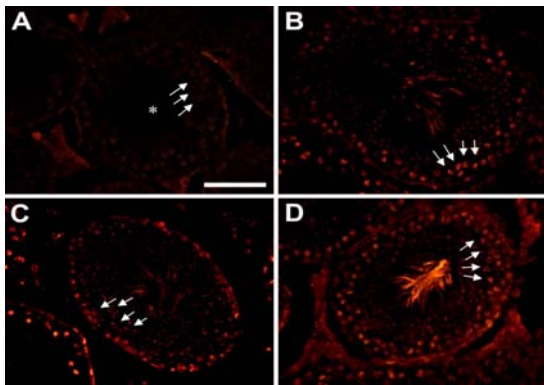


Fig. 2. Expressions and localizations of CatSper3 protein by Ginseng radix treatment in mouse testes. A : normal, B : 100 mg/kg, C : 500 mg/kg, D : 1,000 mg/kg of Ginseng radix treated groups. Images were obtained at low magnification of x40. Scale bars = 50 μ m. Arrow indicates CatSper3 protein expression of normal and Ginseng radix treated group, respectively.

3. 인삼이 CatSper4 단백질 발현에 미치는 영향

고환 조직의 형태는 대조군과 인삼 투여군 모두 유사하였으며, CatSper4 단백질이 붉은 반점으로 염색되었다. 대조군에 비하여 인삼 투여군 100, 500, 1,000 mg/kg에서는 붉은 반점으로 염색된 CatSper4 단백질이 밝게 나타났으며 CatSper4 단백질의 염색층이 인삼 투여군의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 나타내어, 인삼이 CarSper4 단백질의 발현을 증가시켰음이 관찰되었다 (Fig. 3).

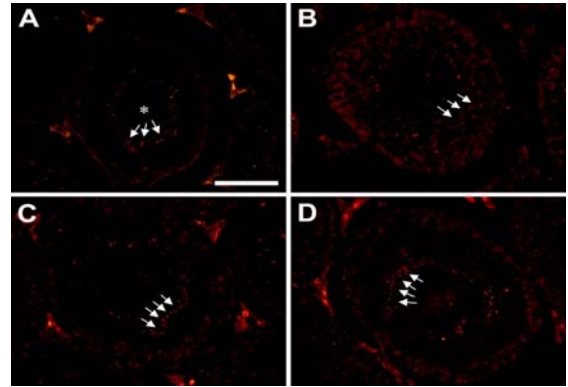


Fig.3. Expressions and localizations of CatSper4 protein by Ginseng radix treatment in mouse testes. A : normal, B : 100 mg/kg, C : 500 mg/kg, D : 1,000 mg/kg of Ginseng radix treated groups. Images were obtained at low magnification of x40. Scale bars = 50 μ m. Arrow indicates CatSper4 protein expression of normal and Ginseng radix treated group, respectively.

고찰

남성불임이란 정자가 생성되고 수송되어 사정에 의하여 배출된 후 난자와 결합하는 과정에서 어느 한 부분이라도 문제가 있을 경우 불임으로 이어지고, 현대 남성에게 있어 정자의 생성 및 상태, 정자형성장애 그리고 정자의 운동성에 관한 부분이 가장 문제가 되고 있다¹⁴.

정자형성과정의 장애는 남성 불임 중 가장 많은 비중을 차지하고 있는데, 이는 주로 시상하부, 뇌하수체, 고환으로 이어지는 호르몬 분비의 이상, 유전적 인자, 고환의 발육부전, 잠복고환, 정맥류, 고온에 노출된 경우 등의 원인으로 정자의 형성이 정상적으로 이루어지지 않거나 기형적 정자의 생성 비율이 높은 경우를 말한다².

정자의 운동성은 난자와 결합하여 수정이 이루어지는 과정에서 필수적인 요소이다⁶. 정자의 운동성은 여성의 자궁을 거치면서 수정능획득을 시작하게 되고, hyperactivation 운동성과 침체반응을 유도하게 된다⁵. 수정의 과정에서 난자의 zona pellucida를 통과하기 위해 정자의 꼬리부분은 hyperactivation 운동성이 필요하다¹⁵.

Hyperactivation 운동성은 정자의 꼬리부분에서 비대칭적인 채찍모양의 움직임이 증가하여 principal piece의 운동이 증폭되는 것이 특징이다¹⁶. Hyperactivation 운동의 기전은 Ca^{2+} 농도와 연관되어 시작되고 유지된다¹⁷. 난자의 zona pellucida를 통과하기 위하여 정자의 꼬리부위에서 Ca^{2+} 의 증가가 수반되어야 정자의 hyperactivation 운동이 유도된다¹⁸.

CatSper는 특유한 Ca 채널 단백질로서 정상적인 정자 운동에도 필요할 뿐 아니라 정자가 zona pellucida를 통과하기 위해 반드시 필요한 요소이다⁷. CatSper1-4 단백질은 고환 내에서만 발견되었으며, 정자의 내부에서 CatSper는 principal piece에 분포하고 있다¹⁵. 생쥐에서 CatSper1 유전자는 생쥐의 chromosome 19에 위치하며, CatSper2는 생쥐의 chromosome 2에 포함되어 있다¹⁹. CatSper3는 생쥐의 chromosome 13에, CatSper4는 chromosome 4에 각각 위치하고 있다²⁰.

CatSper3와 4 유전자는 고환 내에서 정자세포 형성 후기 단계 (spermatids)에 발생되며, CatSper 2 유전자는 정자 형성의 초기 단계 (panchytenes spermatocytes)에 발생한다¹⁹.

CatSper1-4 유전자를 제거한 생쥐에서 고환의 조직 및 부고환의 정자 수와 정자 형태학적 변화에 영향을 미치지 않았으므로 CatSper 유전자는 정자 형성에는 관여하지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한 체중, 수명, 크기, 행동 발달, 교미 행동에서 이상이 관찰되지 않았다. 그러나 CatSper1-4 유전자를 제거한 생쥐는 완전히 남성 불임이었다²¹⁾. 즉, CatSper3와 4 유전자를 제거한 생쥐는 정상 생쥐에 비하여 정자의 운동이 급격하게 감소하였다. 정상 생쥐의 정자는 hyperactivation 운동성을 보였으나, CatSper3와 4 유전자를 제거한 생쥐에서는 hyperactivation 운동성을 가진 정자가 관찰되지 않았다. 따라서 수정능획득에 필요한 정자의 hyperactivation 운동성에서 CatSper3와 4는 반드시 필요한 요소이다²⁰⁾.

한의학 문헌으로 『黃帝內經上古天真論』에서 남자는 腎氣가 旺盛해지면서 생식능력을 가지게 되고 腎을 비롯한 五臟이 쇠약해지면 생식능력을 잃게 된다고 하였다²²⁾. 『景岳全書 婦人規』에서 남성불임은 精滑, 精清, 精冷 등의 精不足과 발기부전, 사정장애, 과도한 성교로 인한 陰虛證 등이 원인이 된다고 하였으며²³⁾, 또한 『石室秘錄論子嗣』에서 精寒, 氣衰, 痰多, 相火盛, 精少, 氣鬱 등이 남성불임의 원인이 된다고 하였다²⁴⁾.

정자의 운동성과 관련하여 『東醫寶鑑婦人門』에서 “男子의 陽精이 微薄하면 성교를 하여도 血海가 虛하여 精液이 子宮에 착상하지 못하여 임신이 불가능하다” 라 하였다²⁵⁾. 人蔘이 男性不育에 사용된 예를 살펴보면, 無子를 치료하는 固本健陽丹과 續嗣丹에 人蔘이 사용되었다²⁵⁾.

인삼의 주요 유효성분은 ginsenoside로 알려진 사포닌이며 그 구조에 따라 세 가지로 나눈다. Panaxadiol계의 ginsenoside로 20(S)-protopanaxadiol이 sapogenin이 되는 인삼 saponin이다. Ginsenoside-Ra1, -Ra2, -Ra3, -Rb1, -Rb2, -Rb3, -Rc, -Rd, -Rg3, Rh2, R1, Rs1, Rs2 등이다. Panaxatriol계로서 20(S)-protopanaxatriol이 sapogenin으로 되는 인삼 saponin이다. ginsenoside -Re, -Rf, Rg1, Rg2, Rh1, 20-glucoginsenoside-Rf, 및 notoginsenoside R1 등이다. Oleanolic acid가 sapogenin이 되는 ginsenoside Ro이다. 이 외에 여러 종의 아미노산과 polysaccharide인 panaxan A-U, 인삼 고유의 향기성분인 panacene과 vitamin, flavonoids 류를 함유하고 있으며, 또한 마그네슘, 인, 칼륨, 철분 등의 무기물질을 함유하고 있다²⁶⁾.

인삼의 약리작용은 다양하게 연구되었으며, 그중 생식기능과 관련된 작용으로 인삼은 부신피질, 성선에 대한 흥분작용이 있어서 guinea pig 암컷의 성기능 성숙을 촉진시켜서 자궁과 난소의 중량을 증가시키고, 수컷에서는 정자 수를 증가시키고 활동력을 증강시키며 고환과 부고환의 중량을 증가시키며²⁷⁾, 인삼 사포닌 중 ginsenoside Rb2와 Rc는 사람에서 남성 정자의 질 개선에 효과가 있음이 알려져 있다²⁶⁾. 인삼은 원인불명의 정자결핍증 환자군과 특발성 정맥류를 가진 정자결핍증 환자군 모두에서 정자 수 및 정자운동성의 현저한 증가를 보였으며, 정상인에 대해서도 유의한 증가를 보였다²⁸⁾. 또한, 인삼을 투여한 흰쥐에서 정자의 수의 증가는 정자형성에 관여하는 cAMP-responsive element modulator (CREM) 유전자의 발현이 증가하는 것과 관련이 있는 것으로 나타났다¹³⁾.

그러나 정자의 운동성 중에서도 정자의 hyperactivation 운동성에 특이적으로 작용하는 CatSper 유전자에 미치는 인삼의 효과는 보고되지 않았다.

인삼이 흰쥐에서 정자 수를 증가시키는 효과는 현미경상에서 육안적인 관찰을 통하여 보고된 바 있으나, 컴퓨터 분석을 통한 인삼의 정자 수 증가효과는 아직 보고되지 않았다. 컴퓨터 분석 프로그램으로 개발된 computer assisted semen analysis (CASA) system은 빠르게 이동하는 정자 수와 정자 운동성의 다양한 특성을 정확하게 측정할 수 있는 장점이 있다.

본 실험에서는 CASA 장치를 사용하여 정자 수를 측정할 결과, 인삼을 농도별 (100, 500, 1,000 mg/kg)로 5 주간 경구 투여한 후 생쥐의 정자 수는 대조군에 비하여 각각 129.23, 126.87, 119.38%로 증가하였다. 이는 선행 연구를 통하여 현미경상에서 육안적으로 측정하여 보고한 바 있는 인삼 투여군이 대조군에 비하여 흰쥐의 정자 수가 161.53% 증가한 결과와 유사한 경향을 나타낸 것이며, 생쥐 또는 흰쥐의 동물 종에 관계없이 인삼이 정자 수의 증가에 효과가 있음이 입증되었다.

인삼 투여군이 CatSper 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 인삼을 5 주간 경구 투여한 후 생쥐의 고환 조직에 대하여 면역형광 염색법을 실시하여 CatSper3, 4 단백질 발현을 비교하였다. 고환 조직의 seminiferous tubule에 분포하는 정자에 대하여 CatSper3, 4 단백질들은 각각 붉은 색으로 염색되었다 염색된 CatSper3, 4 단백질들은 대조군에 비하여 인삼 투여군에서 비교적 밝게 염색되었을 뿐 아니라, CatSper3, 4 단백질의 분포 양을 나타내는 염색층이 두껍게 증가하는 경향을 보였다. 위의 면역형광 염색법의 결과는 CatSper3, 4의 유전형질을 제거한 생쥐에 비하여 정상 생쥐의 principal piece와 acrosome 부위에서 강하게 염색 반응이 있음을 보여준 기존의 연구 결과와 일치하였다²⁹⁾. 이는 인삼이 생쥐의 고환 조직 내에서 CatSper3, 4 단백질의 발현을 증가시켰음을 확인할 수 있는 지표인 것이다. CatSper3, 4의 발현은 정자의 hyperactivation 운동성을 증가시켜 난자와의 결합을 가능하게 유도하는 역할을 하므로, 인삼이 정자의 hyperactivation 운동성 개선에 관여함을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 인삼은 정자의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, CatSper 단백질의 발현을 증가시켜 정자의 hyperactivation 운동성과 관련된 남성불임에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

인삼이 정자 수와 정자운동성에 미치는 영향을 알아보기 위해, C57BL/6 생쥐에 인삼을 5 주간 경구 투여하여 정자 분석과 유전자 발현정도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Computer assisted semen analysis (CASA) system에 의한 정자 분석 결과, 인삼투여군은 대조군에 비해 정자 수를 유의하게 증가시켰다.
2. 면역형광 염색법으로 인삼 투여군이 대조군에 비해 CatSper3 단백질의 발현을 증가시켰음이 관찰되었다
3. 면역형광 염색법으로 인삼 투여군이 대조군에 비해 CatSper4 단백질의 발현을 증가시켰음이 관찰되었다

이상의 결과 인삼은 정자의 수를 증가시켰을 뿐 아니라, CatSper3, 4 단백질의 발현을 증가시켜 정자의 운동성 개선에 효과가 있음이 밝혀졌다.

감사의 글

This research was supported in part by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2010-0013296).

참고문헌

1. Korean society for Sexual Medicine and Andrology. Namseonggwahak. Seoul : Gunjachulpansa, 2003 : 5-54, 161-3.
2. The Korean Urological Association. Textbook of Urology. 3rd, Seoul : Goryeouihak, 2001 : 507-22.
3. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility : from research bench to clinical practice. *J Androl*. 2002 ; 23 : 737-52.
4. Song BK. Hanbangbuingwahak. Seoul : Haengnimchulpansa, 1994 : 278-82.
5. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P., Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001 ; 345 : 1388-93.
6. Tienthai P. sperm capacitation in the porcine ovidut. *Anim Reprod Sci*. 2004 ; 80 : 131-46.
7. Ren D. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001 ; 413 : 603-9.
8. Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ, Clapham DE. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol*. 2008 ; 52 : 607-13 .
9. Ahn DK. Illerstrated Book of Korean Medicinal Herb. Seoul : Kyo-Hak Publishing Co. 1998 : 644-6.
10. The whole country a college of Oriental medicine. The joint textbook publish commission compilation. Herbalogy. Seoul : Younglimsa, 1998 : 531-3.
11. Gukgajunguiyakgwalliguk 《Junghwaboncho》 Pyeonwihoepyeon. Junghwaboncho. Sanghae : Sanghaegwahakgisulchulpansa, 1999 : 805-24.
12. Heo J. Donguibogam. Seoul : Namsandang. 2004 : 85, 603.
13. Park WS, Shin DY, Kim DR, Yang YM, 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.
14. Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J. Semen quality and male reproductive health : the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS*. 2001 ; 109(3) : 333-44.
15. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 ; 100 : 14869-74.
16. Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod*. 1992 ; 46 : 779-85.
17. Carlson AE, Quill TA, Westenbroek RE, Schuh SM, Hille B, Babcock DF. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J Biol Chem*. 2005 ; 280(37) : 32238-44.
18. Lindemann CB, and Goltz JS. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100-extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1988 ; 10 : 420-31.
19. Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 ; 98 : 12527-31.
20. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod*. 2007 ; 77 : 37-44.
21. Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattan D, Pariente A, Thulliez M, Borot N, Moati L, Barthelme A, Shalmon L, Krasnov T, Ben-Asher E, Olender T, Khen M, Yaniv I, Zaizov R, Shalev H, Delaunay J, Fellous M, Lancet D, Beckmann JS. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet*. 2003 ; 11(7) : 497-502.
22. Lee GU. Pyeonjuyeokae Hwangjenaegyongsomun. Seoul : Yeogangchulpansa, 2004 : 31-8
23. Chang GB. Gyeongakjeonseo. Seoul : Beobinmunhwasa, 2007 : 681.
24. Jin ST. Seoksilbirok. Seoul : Daeseongmunhwasa, 1993 : 225-6.
25. Heo J. Gugyeokjeungbodonguibogam. Seoul : Beobinmunhwasa, 1991 : 152-3, 1584-5.
26. Chen JC, Chen LD, Tsauer W, Tsai CC, Chen BC, Chen YJ. Effects of Ginsenoside Rb2 and Rc on inferior human sperm motility in vitro. *Am J Chin Med*. 2001 ; 29(1) : 155-60.
27. Hwang SY, Kim WJ, Wee JJ, Choi JS, Kim SK. Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *B J U Int*. 2004 ; 94(4) : 663-8.
28. Salvati G, Genovesi G, Marcellini P, De Nuccio L, Pepe M, Re M. Effects of Panax Ginseng C. A. Meyer saponins in male fertility. *Panminerva Med*. 1996 ; 38(4) : 249-54.
29. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod*. 2007 ; 77(1) : 37-44.