



Review Article / 총설

한약을 이용한 성조숙증에 대한 비임상 연구 보고 고찰

손효은^{1†}, 김영식^{1†}, 김용빈¹, 나선태², 김홍준^{2*}

¹우석대학교 한의과대학 본초학교실

²우석대학교 한의과대학 방제학교실

Review of non-clinical experimental studies on precocious puberty using herbal medicine

Hyo-Eun Son^{1†}, Young-Sik Kim^{1†}, YongBin Kim¹, SeonTae Na², HongJun Kim^{2*}

¹Department of Herbology, College of Korean Medicine, Woosuk University,

²Department of Formula Science, College of Korean Medicine,

Woosuk University

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to provide basic data for research by investigating non-clinical experimental studies on herbal medicines and its compounds for precocious puberty.

Methods : A search was conducted for all literature until October 2023 using combinations of keywords such as precocious puberty, puberty, and chinese medicine in three databases (Pubmed, OASIS, and ScienceON).

Results :

1. In animal experiments, studies were mainly conducted using a model that induced precocious puberty by subcutaneously administering danazol to SD rats on the 5th day after birth, and in cell experiments, precocious puberty was induced by treating GT1-7 cells with kisspeptin 10 or estradiol.
2. Anemarrhenae Rhizoma, Phellodendri Cortex, and Prunellae Spica were mainly used as herbal medicine to evaluate their efficacy on precocious puberty in non-clinical experiments.
3. Macroscopic observation, hematological analysis, histological analysis, and genetic analysis were performed as methods to analyze the experimental results.

Conclusions : In this study, the effects of herbal medicine on precocious puberty and non-clinical research methods were confirmed. Based on the results of this study, it is expected that non-clinical effectiveness and mechanism research on materials that are clinically effective in Traditional Korean Medicine will be revitalized.

Key-words : Traditional Korean medicine, Precocious puberty, central precocious puberty

I. 서론

성조숙증은 평균의 2-2.5 표준편차보다 빠른 나이에 이차성징이 일어나는 것으로 정의되며, 임상적으로는 여아 만 8세 이전, 남아 만 9세 이전에 2차 성징이 나타나 사춘기가 시작되는 것으로 정의된다¹⁻³, 크게 중추성(진성) 성조숙증(central precocious puberty)과 말초성(가성) 성조숙증(peripheral precocious puberty), 정상 사춘기 발달의 변이형(normal variant puberty)으로 분류된다⁴. 국내 성조숙증 환자 수는 2017년 95,524명에서 2021년 166,645명으로 보고되어, 연평균 증가율 15.3%로 단기간에 환자 수가 급격하게 증가하고 있어 주목되고 있다⁵. 국외의 경우 미국 백인 여아의 10%, 흑인 여아의 23%가 7세에 사춘기가 시작되었다고 보고하였으며, 유럽의 경우 5% 정도의 여아에서 8세 이전에 유방 발달이 시작된 것으로 보고되었다⁶. 이처럼 성조숙증 유병률은 남아에 비해 여아에서 높게 나타나는 것으로 보고되어 있으며, 국내에서도 2021년 기준 입원·외래 총 환자 수 기준 여아가 84%, 남아가 16% 정도로 여아의 성조숙증이 높은 것으로 나타났다⁵. 여아 성조숙증의 90% 가량의 대다수는 특발성 중추성 성조숙증으로 보고되어 있다⁷.

성조숙증은 2차 성징의 조기 발현과 호르몬 분비의 증가로 인해 어린이와 보호자의 심리 상태에 영향을 줄 수 있으며, 중추성 성조숙증에서는 신경계 종양, 시상하부 과오종 및 뇌하수체 선종 등이 나타나는 경우도 보고되어 있다. 또한 이른 골성숙으로 인해 최종 성인이 가 작아질 수 있어 어린이의 신체적, 정신적 건강을 위협할 수 있다⁸. 따라서 조기 진단과 치료가 필요하며 성조숙증의 대다수를 차지하고 있는 중추성 성조숙증의 치료는 성선자극호르몬방출호르몬작용제(gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRHa)의 주사이며, 주목적은 정상 사춘기 발달 나이인 여아 역연령 11세, 남아 12세까지 성성숙을 억제하고, 골성숙을 지연시켜 최종 성인키의 감소를 막는 것이다. 따라서 성장속도가 심하

게 감소한 경우 성장호르몬 치료를 병행하고 있다. 하지만 성장호르몬 치료를 병행하는 경우 주사로 인한 환자의 스트레스와 부모의 비용부담으로 인해 충분한 속고가 필요하며², 일부에서는 키성장을 위해 오남용되어 사회적 문제가 되기도 한다^{9,10}.

한의 의료기관에서도 성조숙증 치료에 대한 다양한 형태의 접근이 이뤄지고 있다. 調胃升清湯으로 성조숙증 여아를 치료한 임상보고¹¹ 이습지연탕으로 특발성 중추성 성조숙증 환자를 치료한 사례¹², 調經成長湯으로 특발성 성조숙증 환자를 치료한 사례¹³ 등 주로 한약을 이용한 임상 치험례가 주를 이루고 있다. 이러한 치험례에서 한약은 성조숙증 환자의 조기 성성숙, 최종 키의 감소를 억제하는데 효과적인 것으로 보고되어 있으나, 이에 대한 학술적 근거가 부족한 상태이다. 이처럼 한약이 성조숙증 치료에 사용되고 있으며 국내·외에서 한약재를 이용한 성조숙 예방 및 치료와 관련한 여러 연구가 발표되고 있으나 아직 구성 한약재 및 그 성분과 성조숙증에 대한 실험적 연구는 부족한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 한약재와 구성 성분의 성조숙증에 대한 효과와 기전을 탐색할 수 있는 비임상 모델의 연구 사례를 조사하고 정리하여 한약재의 성조숙증 예방 및 치료 연구에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

본 연구에서는 국내 학술정보 데이터베이스 중 한국과학기술정보연구원에서 운영하는 ScienceON과 한국한의학연구원에서 제공하는 OASIS를 이용하였으며, 국외 데이터베이스로는 미국 국립의학도서관에서 설립한 Pubmed를 이용하여 관련 문헌을 검색하였다.

검색 키워드로는 국내 데이터베이스의 경우 '성조숙', '성조숙증', 'precocious puberty'를 주제로 검색하여 2023년 10월 16일까지 데이터베이스의 모든 학술 논문을 검색하였으며, pubmed의 경우 "Puberty, Precocious/drug therapy"[MAJR], 'precocious puberty AND (herb OR

† These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author : HongJun Kim, Department of Formula Science, College of Korean Medicine, Woosuk University, 61, Seonneomeo 3-gil, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54986, Republic of Korea.

Tel : +82-63-290-9028, Fax : +82-63-291-9312, E-mail : kimboncho@woosuk.ac.kr

•Received : October 25, 2023 / Revised : November 8, 2023 / Accepted : November 12, 2023

extract OR natural OR "chinese medicine"), '(danazol) AND (puberty)' 등의 검색어를 이용해 검색하였다. 통합 검색 기준일은 2023년 10월 16일이며, 검색일 이전까지의 모든 문헌을 대상으로 검색을 진행하였다. 포함된 논문은 한약, 천연물 또는 그 유래 성분을 소재로 연구되었으며, 동물 및 세포주를 기반으로 실험한 모든 논문을 포함하였고, 임상 연구는 제외하였다.

Ⅲ. 결과

1. 자료 추출 결과

검색 결과 Pubmed에서 1028건의 논문이 검색되었으며, ScienceON에서 91건, OASIS에서 11건의 문헌이 검색되었다. 이후 검색된 논문의 제목, 초록을 확인하고 비임상 문헌 중 천연물이 성조숙증에 미치는 영향에 대한 연구 문헌을 기준으로 재정리하여 Pubmed에서 12건을 선정하였으며, ScienceON과 OASIS에서는 해당하는 문헌을 찾지 못하여 최종적으로 총 12건의 논문을 분석 대상으로 선정하였다(Fig. 1).

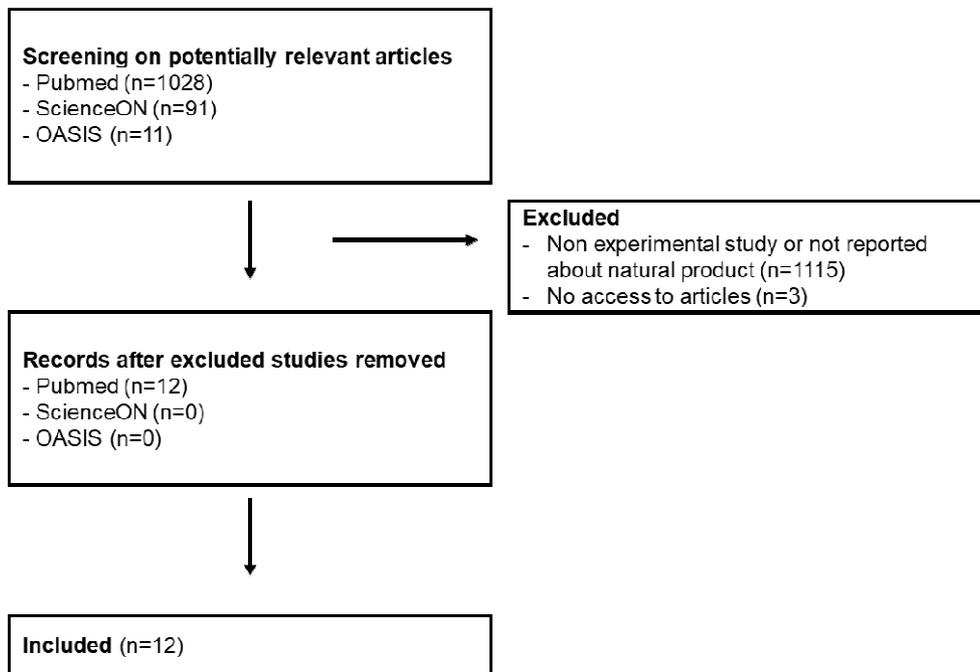


Figure 1. Flow chart of study selection process

2. 출판 연도별 분류

본 연구에서 최종 선정된 논문 12편의 출판 연도를 분석한 결과, 2020년 3편, 2021, 2022년 각각 2편, 그

리고 2005, 2009, 2017, 2018, 2023년에 각각 1편씩의 논문이 출판되었다(Fig. 2).

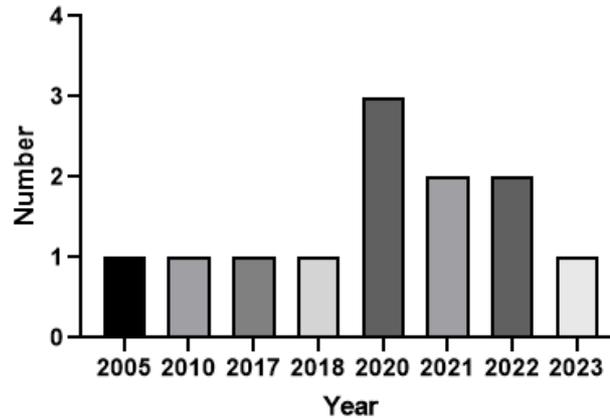


Figure 2. Number of publications per year of research

3. 학술지별 분류

최종 선정 논문 12편을 학술지별로 분류한 결과는 다음과 같다(Table 1). Evidence-based complementary and alternative medicine에서 4편, Frontiers in pharmacology에서 2편, 그리고 Acta biochimica

Polonica., Journal of clinical research in pediatric endocrinology, Plants, Reproductive biology and endocrinology, Integrative Medicine Research, Journal of ethnopharmacology에서 각각 1편이 발표되었다.

Table 1. Classification of Academic Journals

No.	Journals	Number
1	Evidence-based complementary and alternative medicine	4
2	Frontiers in pharmacology	2
3	Acta biochimica Polonica.	1
4	Journal of clinical research in pediatric endocrinology	1
5	Plants	1
6	Reproductive biology and endocrinology	1
7	Integrative Medicine Research	1
8	Journal of ethnopharmacology	1
Total		12

4. 연구 국가별 분류

최종 선정된 논문 12편을 나라별로 분류한 결과, 중

국이 8편으로 가장 많은 연구가 보고되었으며, 다음으로 한국 3편, 튀르키예 1편이 각각 발표되었다(Fig. 3).

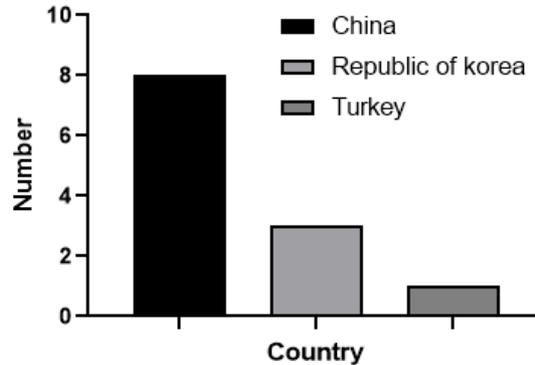


Figure 3. Number of publications per country of research

5. 실험모델 분석

최종 선정된 논문에서 실험 동물을 이용한 문헌은 총 11편, 세포를 이용한 실험은 4편이 있었으며, 동물과 세포를 모두 사용한 논문은 3편이 있었다. 그중 rat을 이용한 논문은 10편으로 사용된 주요 계통으로는 Spargue-Dawley (SD)를 대상으로 한 논문이 9편, Wistar를 대상으로 한 논문이 1편으로 나타났다. mouse를 이용한 1편은 C57BL/6 계통을 이용하였다. 사용된 실험 동물의 연령은 rat의 경우 주령을 기재하지 않은 2편을 제외하고, 7편의 논문에서 생후 5일 된

SD rat을 주로 사용하였으며, Wistar rat을 이용한 1편의 논문에서 21일령을 사용하였다. Mouse는 생후 20일 된 암컷을 사용하였다. 수집한 모든 논문의 동물실험에서 암컷을 사용하였다.

성조숙을 유발한 방법으로는 Danazol (DNZ)을 이용한 논문이 7편으로 가장 많았으며, leptin, N-methyl-DL-aspartic acid (NMA)로 유발한 모델이 각각 1편씩 이었고, 성조숙을 유발하지 않은 논문이 1편, 시험물질이 성조숙에 사용된 논문이 1편이었다 (Table 2).

Table 2. Summary of animal model in studies

*F; Female, NMA; N-methyl-DL-aspartic acid, SD; Spargue-Dawley

Ref.	First author	Year	Strain	Age (Weight)	Sex	Method of induction
14	Lili Zhou	2023	C57BL6	21 day	F	leptin
15	Kyeong Ri Kim	2022	SD	5 day	F	danazol
16	Guo-ling Bai	2021	SD	5 day	F	danazol
17	Kaili Hu	2020	SD	5 day	F	danazol
18	Seung Chan Park	2020	SD	5 day	F	danazol
19	Weiping Yin	2020	SD	(70 g)	F	NMA
20	selin elmaoullar	2020	Wistar	21 day	F	5-Hydroxymethylfurfural
21	Yuanyuan He	2018	SD	5 day	F	danazol
22	Tuy an trinh	2017	SD	(110 g)	F	Normal
23	Yan Sun	2010	SD	5 day	F	danazol
24	Zhanzhuang Tian	2005	SD	5 day	F	danazol

세포실험을 진행한 논문은 총 3편으로 모두 GT1-7 세포를 이용하여 실험을 수행하였다. 세포실험에서 성조숙을 유도하기 위해서는 Estradiol (E₂), Kisspeptin 10

이 각각 1편의 문헌에서 사용되었으며, 세포독성에 대한 확인 목적으로 성조숙을 유도하지 않은 논문이 1편 있었다(Table 3).

Table 3. Summary of cell line in studies

Ref.	First author	Year	Cell line	Method of induction
25	Yi Zhang	2022	GT1-7	Estradiol
15	Kyeong Ri Kim	2022	GT1-7	
16	Guo-ling Bai	2021	GT1-7	Kisspeptin 10

6. 증재 내용 분석

최종 선정 연구에서 사용된 증재는 한약 및 한약에서 유래한 성분이었으며, 침, 뜸의 치료법은 사용되지 않았다. 그중 7편은 한약 혼합물을 이용한 논문이었으며, 단일성분을 이용한 논문은 3편이었다(Table 4). 가장 많이 사용된 약재는 知母, 黃柏, 夏枯草로 각각 4편의 논문에서 공통으로 사용되었으며, 地黃, 牡丹皮, 麥芽, 玄

參, 龍膽, 澤瀉가 각각 3편, 龜板, 薏苡仁, 茵陳蒿가 2편의 논문에서 공통으로 사용되었다(Table 5). 한약 유래 성분으로는 知母에서 분리한 timosaponin AIII, sarsasapogenin 등 두 성분이 각각의 논문에서 실험에 사용되었다. 이외에 식품의 가공과정에서 발생하는 5-hydroxymethylfufural이 사용된 논문이 1건 있었다 (Table 4).

Table 4. Summary of Intervention in study

Ref.	Compound/ Mixture	Material	Extraction method
14	Compound	Timosaponin AIII	-
15	Mixture	Anemarrhenae Rhizoma, Phellodendri Cortex	80% methanol at 25°C
18	Mixture	Estrogen inhibition formula herbal mixture Coicis Semen, Zedoariae Rhizoma, Artemisiae Capillaris Herba, Curcuma Longae Rhizoma, Citri Unshius Pericarpium, Polyporus, Forsythiae Fructus, Agastachis Herba, Perillae Herba, Ponciri Fructus Immaturus, Zizyphi Semen, Atractylodis Rhizoma	Boiling with distilled water at 100°C for 4h
16	Mixture	Fuyou formula Rehmanniae Radix, Anemarrhenae Rhizoma, Trionycis Carapax, Prunellae Spica, Moutan Radicis Cortex, Hordei Fructus Germinatus; each of Scrophulariae Radix, Lycii Radicis Cortex, Gentianae Scabrae Radix et Rhizoma, and Alismatis Rhizoma; Phellodendri Cortex)	Distilled water for 1h
17	Compound	Sarsasapogenin	-
19	Mixture	Bupleuri Radix, Angelicae Sinensis Radix, Paeoniae Radix Alba, Poria Sclerotium, Atractylodis macrocephalae Rhizoma, peppermint, Ecliptae herba, Ligustri Fructus, Prunellae Spica, Glycyrrhizae Radix Preparata	Boiling with distilled water for 30 min
20	Compound	5-hydroxymethylfufural	-
21	Mixture	Nourishing “Yin” and purging “Fire” TCM mixture Rehmanniae Radix, Scrophulariae Radix, Anemarrhenae	Decoct the crude drug with water for 40 min

		Rhizoma, Phellodendri Cortex, Moutan Radicis Cortex, Alismatis Rhizoma, Prunellae Spica, Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax, Hordei Fructus Germinatus, Gentianae Scabrae Radix et Rhizoma	at 100°C twice. Add EtOH to make 60% EtOH, incubate for 72 hours at 4°C, remove EtOH with evaporator
22	Mixture	Coicis Semen, Artemisiae Capillaris Herba	Ethanollic extract
23	Mixture	The nourishing “Yin”-removing “Fire” Chinese herbal mixture/ Rehmanniae Radix, Scrophulariae Radix, Anemarrhenae Rhizoma, Phellodendri Cortex, Moutan Radicis Cortex, Alismatis Rhizoma, Prunellae Spica, Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax, Hordei Fructus Germinatus, Gentianae Scabrae Radix et Rhizoma	Boiling with water for 40 min
24	Mixture	Nourishing Yin-Removing "Fire" Chinese herb mixture	-

Table 5. Frequency of Herbal Materials for precocious puberty

No.	Frequency	Herbal material
1	4	Anemarrhenae Rhizoma
2	4	Phellodendri Cortex
3	4	Prunellae Spica
4	3	Rehmanniae Radix
5	3	Moutan Radicis Cortex
6	3	Hordei Fructus Germinatus
7	3	Scrophulariae Radix
8	3	Gentianae Scabrae Radix et Rhizoma
9	3	Alismatis Rhizoma
10	2	Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax
11	2	Coicis Semen
12	2	Artemisiae Capillaris Herba
13	1	Trionycis Carapax
14	1	Lycii Radicis Cortex
15	1	Bupleuri Radix
16	1	Angelicae Sinensis Radix
17	1	Paeoniae Radix Alba
18	1	Poria Sclerotium
19	1	Atractylodis macrocephalae rhizoma
20	1	peppermint
21	1	Ecliptae Herba
22	1	Ligustri Fructus
23	1	Glycyrrhizae Radix Preparata
24	1	Zedoariae Rhizoma
25	1	Curcumae Longae Rhizoma
26	1	Citri Unshius Pericarpium,
27	1	Polyporus
28	1	Forsythiae Fructus
29	1	Agastachis Herba
30	1	Perillae Herba
31	1	Ponciri Fructus Immaturus,
32	1	Zizyphi Semen
33	1	Atractylodis Rhizoma

7. 실험결과 분석 방법, 평가 지표 및 결과

동물 모델 논문 9편을 대상으로 실험 결과 분석 방법인 육안적 관찰 (Macroscopy, M), 혈액학적 분석 (Hematological analysis, He), 조직학적 분석 (Histological analysis, Hi), 유전자 분석 (Genetic

analysis, G) 으로 나누어 분류하였다 (Fig. 4). 육안적 관찰과 혈액학적 분석이 모든 연구에서 수행되었으며, 추가로 조직학적 분석과 유전자 분석을 함께 진행한 논문이 7편, 조직학적 분석을 진행한 논문이 1편이었다 (Table 6, Fig. 5).

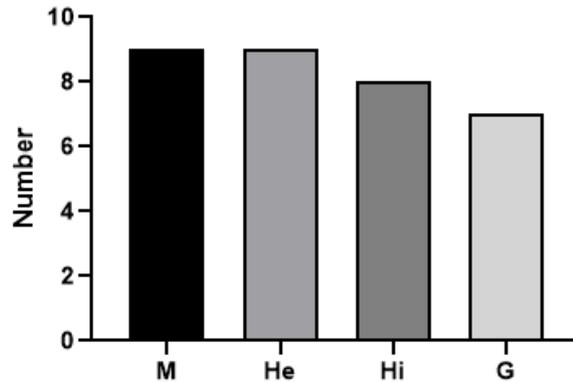


Figure 4. Number of overall analysis method of animal model research

*M; Macroscopy, He; Hematological analysis, Hi; Histological analysis, G; Genetic analysis

세부 분석 방법으로 육안적 관찰에는 Vaginal opening (VO; 10편, 21.28%), Body weight (BW; 8 편, 17.02%), (OW; 9편, 19.15%), Uterus weight (UW; 9편, 19.15%), Body length (Bl; 2편, 4.26%), Pituitary weight (PW; 3편, 6.38%), Hypothalamus weight (HW; 2편, 4.26%), 그 외에 Food Intake (FI; 1편), Uterus length (Ul; 2편), other organ weight (OOW; 1편) 등이 분석에 사용되었다 (Fig. 5, right upper).

혈액학적 분석에서는 Estradiol (E2; 10편, 25.00%), Luteinizing hormone (LH; 9편, 22.50%), Follicle-stimulating hormone (FSH; 9편, 22.50%), Alkaline Phosphatase (ALP; 3편, 7.50%) Progesterone (2편, 5.00%), 그 외 Prolactin (PRL; 1편), Calcium (1편), Glucose (1편), Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3; 1편), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1; 1편), Osteocalcin (1편), total cholesterol (1편) 등이 분석에 사용되었다 (Fig.

5, right under).

조직학적 분석에서는 Estrous cycle (EC)이 가장 많은 7편(41.18%)에서 사용되었고, H&E staining 3편 (17.65%), Immunohistochemistry (IHC), Uterus wall thickness (UWT), Bone densitometry가 각각 2편 (11.76%)에서 사용되었으며, follicle counts가 1편에서 사용되었다(Fig. 5, left under). 마지막으로 유전적 분석에서는 Western blot과 qPCR을 함께 수행한 논문이 2 편 있었으며, qPCR만 수행한 논문이 5편으로 qPCR로 확인한 논문은 총 9편 (81.82%)으로 가장 높게 나타났다 (Fig. 5, left upper). qPCR (Real-time PCR)로 확인한 mRNA는 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)이 가장 많았으며, G-protein coupled receptor (GPR) 54, Kiss1, GnRH receptor (GnRHR)가 다음으로 많이 확인되었다. Western blot으로 확인한 단백질은 GnRH와 GnRHR이 가장 많았으며, 다음으로 Kiss1, GPR54, Leptin, Estrogen receptor alpha (ERa), GPR30이 사용되었다 (Table 6).

Table 6. Summary of Animal Experiment

Ref.	Macroscopy (M)	Hematological analysis (He)	Histological analysis (Hi)	Gene analysis (qPCR)	Protein analysis (Western blot)
14	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight • Vaginal opening ↑ • Ovarian weight ↓ • Uterus weight ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrogen (E2) ↓ • Luteinizing hormone (LH) ↓ • Follicle-stimulating hormone (FSH) ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle ↑ • Bone densitometry ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • GnRHR ↓ • Kiss1 ↓ • GPR54 ↓ • Leptin ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • GnRHR ↓ • Kiss1 ↓ • GPR54 ↓ • Leptin ↓
15	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight • Vaginal opening ↑ • Uterus weight • Body length (29D-,39D ↓) • pituitary weight (29D-,39D ↓) • hypothalamus weight - 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 • LH (29D ↓, 39D-) • FSH • Alkaline Phosphatase (ALP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH • Netrin-1 • UNC5C ↓ 	
18	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight - • Uterus weight ↓ • Vaginal opening ↑ • Ovarian weight ↓ • Pituitary weight - 	<ul style="list-style-type: none"> • ALP ↓ • E2 ↓ • FSH ↓ • LH ↓ 		<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • Netrin-1 ↓ • UNC5C ↓ 	
16	<ul style="list-style-type: none"> • Vaginal opening ↓ • Ovarian weight ↓ • Uterus weight ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 ↓ • LH ↓ • FSH ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Uterine wall thickness ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • Kiss1 ↓ • GPR54 ↓ 	
17	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight ↑ • Vaginal opening ↑ • Ovarian weight ↓ • Uterus weight ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 ↓ • LH ↓ • FSH ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle • Hematoxylin& Eosin (H&E) • Uterine wall thickness ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • GnRHR ↓ • Kiss1 ↓ • GPR54 	
19	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight • Vaginal opening • Ovarian weight ↓ • Uterus weight ↓ • pituitary weight ↓ • hypothalamus weight ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 ↓ • LH ↓ • FSH ↓ • prolactin ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle • H&E • IHC 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH • GnRHR • ERa • GPR30 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH • GnRHR • ERa • GPR30
20	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight (PND 26, 33, 40 ↓, 44 -) • Vaginal opening • Ovarian weight • Uterus weight 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 ↑ • LH ↑ • FSH • Progesterone 	<ul style="list-style-type: none"> • H&E • Follicle counts ↑ 		
21	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight • Vaginal opening • Ovarian weight • Uterus weight 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 • LH (4w ↑, 5w ↓) • FSH • Progesterone (4w ↑) 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle 	<ul style="list-style-type: none"> • Lin28a • Lin28b (4w ↑) • mir-let7a • mir-let7b • U6 	

22	<ul style="list-style-type: none"> • Body weight ↑ • Ovarian weight ↓ • Body length ↑ • Food intake • liver weight • kidney weight • spleen weight 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 • LH • FSH ↓ • ALP • Calcium • glucose • IGF-1 • IGFBP-3 • Osteocalcin • total cholesterol - 	<ul style="list-style-type: none"> • Bone densitometry 	
23	<ul style="list-style-type: none"> • Vaginal opening ↑ • Ovarian weight ↓ • Uterus weight ↓ 		<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> • Kiss1 • GnRH
24	<ul style="list-style-type: none"> • Vaginal opening ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> • E2 ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Estrous cycle ↑ • IHC 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓

*IGF; insulin-like growth factor, IGFBP; IGF binding protein, H&E; Hematoxylin&Eosin, IHC; Immunohistochemistry

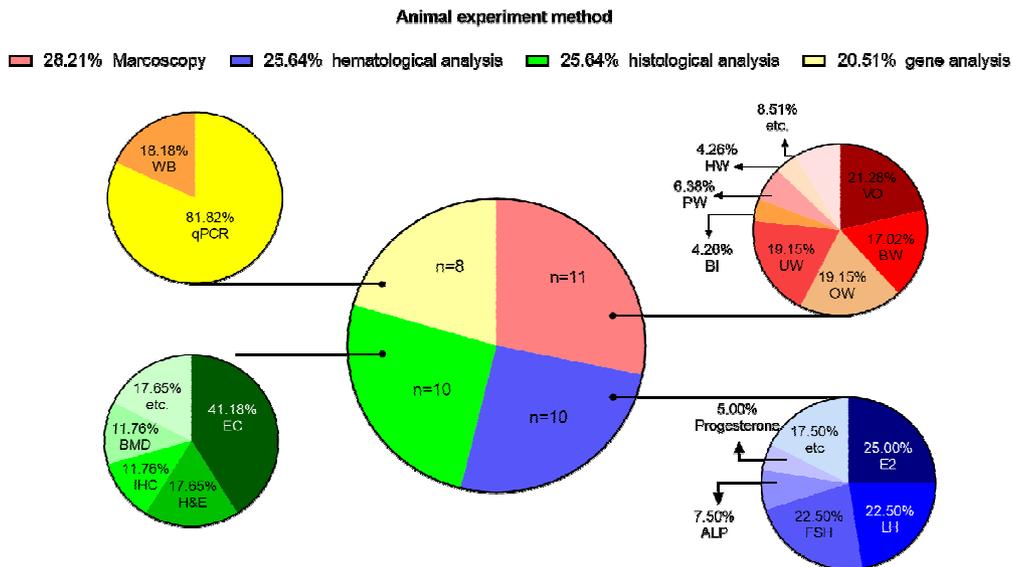


Figure 5. Percentage of Animal Experiment Method

* VO; Vaginal opening, BW; Body weight, OW; Ovarian weight, UW; Uterus weight, BI; Body length, PW; Pituitary weight, HW; Hypothalamus weight, E2, Estrogen, LH; Luteinizing hormone, FSH; Follicle-stimulating hormone, ALP; Alkaline phosphatase, EC; Estrous cycle, H&E; Hematoxylin & Eosin staining, IHC; Immunohistochemistry, BMD; Bone densitometry, WB; Western blot

GT1-7 세포를 이용한 논문 3편의 분석 방법은 CCK-8 (cell counting kit-8), ELISA (Enzyme-linked

immunosorbent assay), qPCR (quantitative polymerase chain reaction)이 25.00%로 가장 많이 사용되었으며,

Western blot과 MTT는 각각 12.50% 사용되었다 (Table 7, Fig. 6). 혈액 내 GnRH 농도를 확인하기 위해 ELISA kit가 이용되었으며, GnRH, GPR54 등 조직

내 유전자 및 단백질 발현 확인을 위해 qPCR과 Western blot이 사용되었다 (Table 7).

Table 7. Summary of cell Experiment

Ref.	Analysis	ELISA	Gene analysis (qPCR)	Protein analysis (Western blot)
25	<ul style="list-style-type: none"> • CCK-8 • ELISA • qPCR 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • GnRHR ↓ • Kiss1 ↓ • GPR54 ↓ • IGF-1 ↓ • IGF-1R ↓ • ERa ↓ 	
15	<ul style="list-style-type: none"> • MTT 			
16	<ul style="list-style-type: none"> • CCK-8 • ELISA • qPCR • Western blot 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • GPR54 ↓ • ERa ↓ • ERb ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH ↓ • GPR54 ↓ • PKC ↓ • HSP90 • p-ERK ↓ • t-ERP

*CCK-8; cell counting kit-8, ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay, qPCR; quantitative polymerase chain reaction, GnRH; gonadotropin-releasing hormone, GPR54; G-protein coupled receptor 54, GnRHR; GnRH receptor, IGF; Insulin-like growth factor-1, IGF-1R; IGF-1 receptor, ERa; Estrogen receptor alpha, ERb; ER beta, PKC; protein kinase C, HSP90; heat shock protein 90, ERK; extracellular signal-regulated kinases

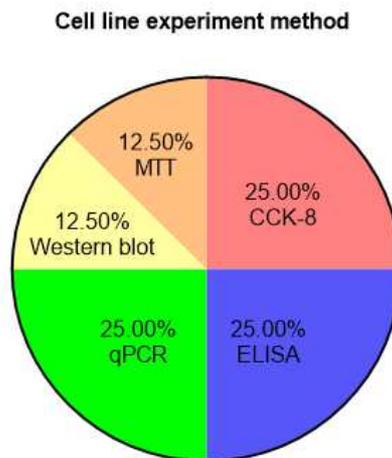


Figure 6. Percentage of Cell line Experiment Method

*CCK-8; cell counting kit-8, ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay, qPCR; quantitative polymerase chain reaction

IV. 고찰

본 연구에서는 한약재와 그 유래 성분의 성조속증 예방 및 치료를 평가하기 위한 비임상 연구논문 12편을 확인하고 분석하여 비임상에서 한의학적 성조속 치료의 연구 방법을 확인하고자 하였다.

성조속증 환자 수는 최근 10년간 급격하게 증가하고 있어 사회적 관심도도 지속적으로 증가하고 있다⁵⁾. 따라서 이에 대한 예방 및 치료도 중요한 사항이나 의학계에서는 여러 임상 가이드라인이 발표되어 GnRH agonist를 기본으로 한 치료법이 보편적으로 이용되고 있지만^{2,26)}. 한의학계에서는 이에 대한 체계적 접근이 부족한 상태이다. 하지만 한의학계에서도 성조속증에 대한 여러 임상적 시도가 진행되어 오고 있으며, 일부 효과적인 결과도 보고되고 있다. 하지만 이런 결과들의 대부분은 임상 사례 보고가 대부분으로 전임상에서의 기전 및 효능에 대한 연구는 부족한 상태이다^{12,13,27)}. 따라서 본 연구팀은 임상에서 효과적인 한약의 기전 연구, 성조속에 효과있는 한약제제 도출을 위한 비임상시험 방법 확인을 위해 문헌을 조사하였다.

조사 결과, 천연물의 성조속증을 주제로 진행된 비임상 연구는 동물실험과 세포실험으로 진행되었으며, 동물을 이용한 연구가 총 12편 중 11편으로 큰 비중을 차지하였다. 세포실험 단독으로 진행된 연구는 단 1편으로 관련 연구가 다소 부족함을 알 수 있었다. 성조속 동물 모델로는 danazol을 이용한 성조속 논문이 7편으로 가장 많이 사용되었으며, 모두 생후 5일령 SD rat에 300 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ 또는 30 μL danazol (ethylene glycol: ethanol 1:1, v/v)을 1회 피하주사하는 방식으로 성조속을 유도하였다. 이외에 C57BL/6 mice에 leptin을 피하주사하거나 SD rat에 NMA를 피하주사하는 방식으로 성조속을 유도하였다. Danazol은 17 α -ethinyl testosterone의 isoxazole 유도체로 rat에 피하주사를 통해 시상하부에서 GnRH의 분비를 증가시켜 HPG 축을 활성화하고 성적 발달의 시작을 가속화하며, 자궁, 난소의 무게를 증가시켜 결과적으로 성조속을 촉진하는 것으로 알려져 있어 다수의 성조속 동물모델 연구에서 사용되고 있다¹⁶⁾.

조사된 연구들에서 주로 사용된 한약재는 知母, 黃柏, 夏枯草였으며, 각각 본초의 효능분류에 따라 知母, 夏枯草는 淸熱瀉火藥, 黃柏은 淸熱燥濕藥으로 분류되었다. 이러한 사용 빈도는 한의학에서 성조속증의 원인

및 증후로 陰虛火旺, 肝鬱化火, 痰濕壅滯를 언급하고 그 치법으로 滋陰降火, 疏肝解鬱, 化痰散結을 사용하는 것과 관계되는 것으로 판단된다²⁷⁾. 또 중의 의료기관에서 성조속증 치료에 사용된 처방을 조사한 연구에서 知母, 黃柏을 主藥으로 포함하고 있는 知栢地黃丸의 사용빈도가 크게 높았던 것과 본 연구에서 3편의 논문에서 사용된 滋陰瀉火方도 빈도에 영향을 준 것으로 파악되었다^{28,29)}. 특히 지모에서 분리된 성분을 주제로 연구한 논문도 2편으로 지모에 대한 연구가 특히 활발하게 진행되고 있음을 알 수 있었다.

연구에서 사용된 소재 중 Fuyou formula는 중의학에서 성조속증 치료에 사용되는 처방으로 Danazol로 유도된 성조속 모델에서 자궁 및 난소무게를 감소시키고, 질개구를 지연시켰으며, E2, LH, FSH 등 혈중 호르몬의 증가와 관련 유전자(Kiss1, GPR54, GnRH) 발현을 억제하였다. 이러한 효과는 시상하부 GT1-7 세포에서 kisspeptin 10으로 유도된 GnRH 발현 증가를 억제함을 확인하여 검증되었다¹⁶⁾. Fuyou formula를 이용한 또 다른 연구에서는 GT1-7세포에 E2를 처리하여 성조속을 유도하고 Fuyou formula의 구성성분인 luteolin, quercetin, apigenin을 처리하여 GnRH, Kiss1, GPR54 유전자 발현의 감소를 확인함으로써 성조속증 완화에 관여하는 성분임을 확인하였다²⁵⁾.

다른 소재로 nourishing “Yin”-removing “Fire” chinese herb mixture는 중의학에서 滋陰瀉火方이라는 명칭의 처방으로 성조속증 치료에 사용되고 있다²⁹⁾. 이 처방은 2005년 Danazol로 유도한 성조속 모델에서 GnRH 발현을 현저하게 감소시키며 성적 발달을 지연시켰음이 보고²⁴⁾되었으며, 2010년 연구에서는 kiss-1 과 kisspeptin 발현을 하향 조절함이 보고되었다²³⁾. 이후 2018년 연구에서는 쥐의 질개구일이 성조속 유발군에 비해 늦어짐을 확인하였다. 또한 Caenorhabditis elegans에서 처음 발견된 Lin28 유전자는 C. elegans 발달 조절에 관여하는 RNA 결합 단백질로 본 처방에 의해 발현이 조절되었다. Lin28의 과발현은 쥐의 질개구 시기를 빠르게 하는 것으로 나타나 처방이 Lin28의 발현 조절을 통해 사춘기 조절에 관여함을 확인할 수 있었다²¹⁾.

허브 혼합물 에스트로겐 억제 포뮬러(herbal mixture estrogen inhibition formula: EIF)는 薏苡仁을 주요 구성 약재로 하는 처방으로 danazol 투여로 유도된 성조속증 모델에서 질개구를 지연시키고, 혈중 ALP, E2, LH, FSH

의 증가를 억제하고, 시상하부 조직에서 GnRH, UNC5C, netrin-1의 발현을 억제하여 성조숙증 치료 효과를 확인하였다¹⁸⁾.

그 밖에 薏苡仁과 茵陳蒿의 복합물은 SD rat에서 대조군에 비해 난소 무게를 감소시켰으며, 혈중 FSH 농도를 감소시킴을 확인할 수 있었다²²⁾.

Shugan Xiehuo formula (SXF)는 중의학에서 疏肝 泻火方으로 사용되는 한약 처방으로, 중추성 성조숙증 환자의 치료제로 보고되어 있다. 이 복합물은 NMA로 유도된 성조숙 SD rat에서 대조군에 비해 FSH, LH, PRL, E2의 증가를 억제시켰고, 시상하부 조직에서 GnRH, GnRHR, ERa 등 성성숙에 관계되는 유전자 발현도 감소시켰다¹⁹⁾.

知母와 黃柏은 성조숙 치료 다빈도 한약재로 두 약재의 복합물은 danazol 유도 성조숙 모델에서 질개구를 지연시키고 혈중 LH 수준을 감소시켰으며, 시상하부 조직에서 GnRH, netrin-1 등 유전자 발현을 하향 조절하여 성조숙증을 지연시키는 효과가 보고되었다¹⁵⁾.

성분 중에는 지모에서 유래한 Timosaponin AIII가 Leptin 유도 성조숙 동물 모델에서 Kiss1, GPR54, GnRH 등의 발현을 감소시키고 혈청의 LH, FSH 농도를 감소시킴으로써 성조숙증을 지연시키는 효과가 있었다¹⁴⁾. 또다른 지모 유래 성분인 sarsasapogenin은 Kiss-1/GPR54를 통해 GnRH의 발현을 하향조절하고 혈청 내 호르몬 수치를 감소시켜 생식선 발달의 억제를 통해 성조숙 지연 효과를 나타내는 것으로 확인되었다¹⁷⁾.

대부분의 소재가 성조숙증의 치료의 연구에 사용된 반면 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)는 가공식품 등에 존재하는 유기 화합물로 사춘기 전,후로 5-HMF에 노출 시 성조숙증이 발생하고 항물리 호르몬(anti-mullerian hormone; AMH) 수준이 감소한다고 보고되었다²⁰⁾.

in vivo 연구들에서 활용된 평가 지표로는 총 12편의 논문 중 9편이 육안적 관찰(M), 혈액학적 분석(He)을 수행하였다 (Table 6, Fig. 5). 육안적 관찰에서는 Vaginal opening, Body weight, Ovarian weight, Uterus weight가 다빈도로 평가되었다. Vaginal opening (VO)은 2차 성장을 확인하는 대표적인 지표로 연구에 사용되었으며¹⁴⁻²⁴⁾, 한약재가 VO 시기에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다. 혈액학적 분석으로는 ELISA kit를 이용해 혈청에서 인자를 확인하는 방식으로 진행되었으며 대표적인 인자로는 estrogen^{14-22,24)} 10

편으로 가장 많았고, 다음으로 LH¹⁴⁻²²⁾와 FSH¹⁴⁻²²⁾가 각각 9편으로 많이 확인하는 것으로 나타났다. 비임상 연구와 유사하게 임상에서 성조숙증 진단 시 내분비 검사를 통해 혈중 estradiol, LH, FSH의 농도 검사가 수행되고 있으며 호르몬의 농도가 정상에 비해 다소 높게 나타날 수 있다고 보고되어 있다³⁰⁾.

다음으로 확인된 평가 지표로는 조직학적 분석으로 VO 확인 시점부터 estrous cycle (41.18%)을 확인하는 방법을 가장 많이 이용되었으며^{14,15,17,19,21,23,24)}, 희생된 동물의 조직을 이용하여 H&E staining (17.65%)^{17,19,20)}, IHC (11.76%)^{19,20)}, BMD (11.76%)^{14,22)}을 확인하는 것으로 나타났다. 마지막으로 유전자 분석으로는 qPCR과 western blot을 이용하여 유전자 및 단백질 발현을 확인하였으며, 주로 확인하는 마커로는 GnRH, GnRHR, Kiss1, GPR54 등이 있었다^{14-19,21,23,24)}.

in vitro 연구 3편에서는 마우스 시상하부에서 유래한 GT1-7를 이용한 실험을 진행하였다^{15,16,25)}. 세포 독성을 평가하기 위해 MTT 또는 CCK-8 분석을 수행하였다. 2편은 ELISA 분석을 통해 GnRH 농도를 확인하고 qPCR을 이용해 GnRH, GPR54, ERa의 유전자 발현을 확인하여 성조숙증 치료 및 예방 효과를 확인하였다^{16,25)}.

사춘기는 시상하부-뇌하수체-생식선 축의 활성화에 의해 촉발된다. 이 시기에 시상하부의 GnRH 수치의 증가로 LH, FSH의 분비가 유도되어 난소 및 고환에서 estradiol 또는 testosterone을 분비하게 된다고 알려져 있다³¹⁾. Estradiol은 어린이들의 뼈와 뇌성숙에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 사춘기 시기에 골단을 닫아 성장을 억제한다고 알려져 있다^{31,32)}. Kiss1 유전자는 kisspeptin을 암호화하며, 그 수용체인 GRP54의 결핍은 성선 기능 저하증 (hypogonadotropic hypogonadism)을 유발한다고 알려져 사춘기에 중요한 지표로 이용되고 있다³³⁻³⁵⁾. 이와 같은 보고를 토대로 estrogen, LH, FSH, GnRH, Kiss1, GPR54 등이 비임상 성조숙 약리학 실험의 지표로 사용되고 있음을 확인할 수 있었다.

V. 결론

한약재의 성조숙증 예방 및 치료에 관한 비임상 연구 문헌을 조사, 분석하여 주된 연구방법을 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 동물 실험에서는 생후 5일차 SD rat에 danazol을 투

- 여하여 성조숙증을 유도하는 모델을 이용한 연구가 주로 진행되었으며, 세포 실험에서는 mouse 시상하부 유래 GT1-7 세포에 KP 또는 E2를 처리하여 성조숙을 유도하는 모델을 이용해 연구가 진행되었다.
- 비임상 실험에서 성조숙증 예방 및 치료를 평가하기 위한 한약재로 知母, 黃柏, 夏枯草가 주로 사용되었다.
 - 실험분석 방법으로 육안적 관찰, 혈액학적 분석, 조직학적 분석, 유전자적 분석을 수행하였으며, 아래와 같은 평가 지표가 사용되었다.
 - 1) 육안적 관찰 : VO 확인, 무게 측정
 - 2) 혈액학적 분석 : ELISA kit를 이용한 혈중 GnRH 농도 확인
 - 3) 조직학적 분석 : Estrous cycle 확인, H&E staining으로 Follicles와 자궁벽 두께 확인
 - 4) 유전자적 분석 : qPCR과 Western blot을 통한 GnRH, GPR54, ERα 발현 확인

본 연구를 통해 한약재를 이용한 성조숙증 비임상 연구의 대강을 확인할 수 있었다. 이를 토대로 국내외 비임상 연구에서 성조숙증 예방 및 치료에 대한 효과가 보고된 한약재 및 복합물을 임상에 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 성조숙증 연구에 활용되는 비임상 모델을 기반으로 국내 한의학계 임상에서 유효한 소재들의 유효성, 기전 확인 연구가 활성화 될 것으로 기대한다.

감사의 글(acknowledgements)

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: HF22C0109).

References

- Muir A: Precocious puberty. *Pediatr Rev* 2006;27(10):373-81.
- Kim SJ, Kim JH, Hong YH, Chung IH, Lee EB, Kang E, et al. 2022 Clinical practice guidelines for central precocious puberty of Korean children and adolescents. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2023;28(3):168-77.
- Bradley SH, Lawrence N, Steele C, Mohamed Z. Precocious puberty. *BMJ* 2020;368:l6597.
- Lee K, Kim C, Kim H, Shin C, Yang S, Lym J. The Korean Society of Pediatric Endocrinology's clinical guidelines. Seoul: The Korean Society of Pediatric Endocrinology 2011:1-32.
- Health Insurance Review & Assessment Service. Healthcare Bigdata Hub. 2015 [cited 2023 Oct 13]. Available from: URL : <http://opendata.hira.or.kr/>
- Biro FM, Galvez MP, Greenspan LC, Succop PA, Vangeepuram N, Pinney SM, et al. Pubertal assessment method and baseline characteristics in a mixed longitudinal study of girls. *Pediatrics* 2010;126(3):e583-e90.
- Elders MJ, Scott CR, Frindik JP, Kemp SF. Clinical workup for precocious puberty. *The Lancet* 1997;350(9076):457-58.
- Choi HS, Kim H-S, Chae HW. Diagnosis and Treatment of Central Precocious Puberty. *The Ewha Medical Journal* 2021;44(4):117-21.
- Hyerim H. Rapid puberty? Controversy over overtreatment due to rapid increase in patients with precocious puberty. In.: KBS news; 2023.
- Hong HR, Rapid puberty? Controversy over overtreatment due to rapid increase in patients with precocious puberty, KBS news. 2023 [cited 2023. Oct 10] Available from: URL : <https://news.kbs.co.kr/news/pc/view/view.do?ncd=7778855>
- Kim JE, Yang SJ, Cho SH, Park KM. A Report on the Effect of Jowisengchung-tang in 2 Cases of precocious puberty. *J Korean obstet Gynecol* 2013;26(2):178-87.
- Nam S LC, Tang Y, Liu Y, Kim K, Chun S, Yeom Y, et al. A Case Report of Efficacy of Growth Height and Peak-Luteinizing Hormone Level Suppression on Idiopathic Gonadotropin-Dependent Precocious Puberty Patient Using Herbal Remedy. *J Korean Med* 2015;36(4):150-55.
- Lee HL YH, Park SC. A Case Report of Idiopathic Precocious Puberty in Two Children. *J*



- Pediatr Korean Med 2017;31(1):74–81.
14. Zhou L, Ren Y, Li D, Zhou W, Li C, Wang Q, et al. Timosaponin AIII attenuates precocious puberty in mice through downregulating the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. *Acta Biochim Pol* 2023;70(1): 183–90.
 15. Kim KR, Trinh TA, Baek JY, Lee D, Lim S, Kim J, et al. Preventive Effect of Anemarrhenae rhizome and Phellodendri cortex on Danazol-Induced in Precocious Puberty in Female Rats and Network Pharmacological Analysis of Active Compounds. *Plants (Basel)* 2021;11(1):23.
 16. Bai GL, Hu KL, Huan Y, Wang X, Lei L, Zhang M, et al. The Traditional Chinese Medicine Fuyou Formula Alleviates Precocious Puberty by Inhibiting GPR54/GnRH in the Hypothalamus. *Front Pharmacol* 2020;11: 596525.
 17. Hu K, Sun W, Li Y, Zhang B, Zhang M, Guo C, et al. Study on the Mechanism of Sarsasapogenin in Treating Precocious Puberty by Regulating the HPG Axis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020;2020:1978043.
 18. Park SC, Trinh TA, Lee WY, Baek JY, Lee S, Choi K, et al. Effects of estrogen inhibition formula herbal mixture for danazol-induced precocious puberty in female rats: an experimental study with network pharmacology. *Integr Med Res* 2021;10(3):100708.
 19. Yin W, Li S, Zhang K, Xu Y, Ma D, Shi T, et al. The Therapeutic Effect of Shugan Xiehuo Formula in the Female Rat Model with Central Precocious Puberty. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020;2020:5916168.
 20. Elmaogullari S, Kadan E, Anadol E, Gokceoglu A, Cetinkaya S, Yarim GF, et al. Effects of 5-Hydroxymethylfurfural on Pubertal Development of Female Wistar Rats. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2020;12(1):79–85.
 21. He Y, Han X, Sun W, Yu J, Tamadon A. Precocious Puberty and the Lin28/Let7 Pathway: The Therapeutic Effect of the Nourishing "Yin" and Purging "Fire" Traditional Chinese Medicine Mixture in a Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018;2018:4868045.
 22. Trinh TA, Park SC, Oh J, Kim CE, Kang KS, Yoo HS, et al. Preventive Effect and Safety of a Follicle Stimulating Hormone Inhibitory Formulation Containing a Mixture of Coicis Semen and Artemisia capillaris for Precocious Puberty: A Preliminary Experimental Study Using Female Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017;2017:2906014.
 23. Sun Y, Perry GN, Yu J, Chen B, Tian Z. Effect of nourishing "Yin"–removing "Fire" Chinese herbal mixture on hypothalamic kisspeptin expression in female precocious rats. *J Ethnopharmacol* 2010;127(2):274–9.
 24. Tian Z, Zhao H, Sun Y, Cai D, Chen B. Evaluation of the true precocious puberty rats induced by neonatal administration of Danazol: therapeutic effects of nourishing "Yin"–Removing "Fire" Chinese herb mixture. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:38.
 25. Zhang Y, Sun N, Zhang M, Ding Q, Wang Q, Liang Y, et al. Effects of Fuyou Formula on GnRH Secretion and Related Gene Expression in Treating Precocious Puberty. *Front Pharmacol* 2022;13:852550.
 26. SY K, Kim SY. Etiology and treatment of central precocious puberty. *J Korean Med Assoc* 2018;61(10):591–98.
 27. Guo C ZM, Liu J, Bai G, Zhao L. Study on medication rule of traditional Chinese medicine in treating precocious puberty of girls based on literature. *CHINA MEDICAL HERALD* 2021;18(15):167–70.
 28. Yu CH, L PH, Van YH, Lien A SY, Huang TP, Yen HR. Traditional Chinese medicine for idiopathic precocious puberty: A hospital-based retrospective observational study. *Complementary Therapies in Medicine* 2014; 22(2):258–65.
 29. Cai DP, Chen BY, Zhang W, Li P. Effects of

- Chinese herbal medicine on modulating the course of puberty development in children with precocious puberty. *Zhong xi yi jie he xue bao= Journal of Chinese Integrative Medicine* 2006;4(2):166-74.
30. Kim HS. Update of Precocious puberty. *Endocrinol Metab (seoul)* 2008;23(3):165-73.
 31. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans –a review. *Med Sci Monit* 2009;15(6):RA137-45.
 32. Aksglaede L, Juul A, Leffers H, Skakkebaek LE, Andersson AM. The sensitivity of the child to exogenous estrogens. *Hum Reprod Update* 2006;12(4) 341-9.
 33. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG et al. Mutations of the Kiss1 gene in Disorders of Puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5)2276-80.
 34. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19)1097-6.
 35. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JR JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17)1614-27.