

## 內分泌變調에 따른 흰쥐 腦下垂體 卵胞刺戟호르몬 細胞의 變化

### Studies on the FSH Granules of Rat Adenohypophysis under Various Conditions of Altered Hormonal status

서울대학교 醫科大學 解剖學教室

朴 台 圭 · 白 相 豪

#### 序 論

腦下垂體 前葉의 性腺刺戟호르몬(gonadotropic hormone, gonadotropin)은 鹽基好性細胞(basophils)에서 生成·分泌되고 있는 것으로 알려져 있다. 그것은 變染性을 利用하여 染色·觀察한 Herlant(1943)에 의해 強力히 主張되었고 그後 Pearse(1948, 1949, 1950, 1953), Catchpole(1949), Hotchkiss(1943) 등은 PAS(periodic acid Schiff)反應을 通하여 鹽基好性細胞는 性腺刺戟호르몬인 FSH(follicle stimulating hormone 卵胞刺戟호르몬), LH(luteinizing hormone 黃體形成호르몬) 뿐만 아니라 TSH(thyroid stimulating hormone 甲狀腺刺戟호르몬)와도 關聯이 있음을 立證하였다. 많은 研究者들은 鹽基好性細胞中에서 各各의 호르몬을 生成分泌하는 細胞들을 鑑別하기 위한 努力으로서 組織化學的反應을 通하여(Purves and Griesbach 1951, 1954, Halmi 1950, 1952, Barnett 등 1956, Herlant 1960, Vanha-Perttula 1966) 免疫組織化學反應을 通하여(Midgley 1963, Robyn 등 1964, Della Corte and Biondi 1964, Koffler and Fogel 1964, Fogel and Koffler 1964, Pomerantz and Simmons 1963, Bain and Ezrin 1970, Herlant and Ectors 1970) 또는 自記放射法을 利用하여(Ducommun 1965, Kobayashi 등 1967) 觀察하였으나 明確한 結論은 내려지지 않고 있다.

두 種類의 性腺刺戟호르몬細胞를 鑑別하기 爲한 또 하나의 試圖로서 많은 研究者들은 生理的인 內分泌變調 卽 性週期에 따른 狀態와 人爲的으로 誘發시킨 內分泌變調 狀態下에서의 腦下垂體를 調査한 바 있다. Barnes

(1962), Hunt and Hunt(1955), Caligaris 등(1967), Roos(1969) 및 Monroe 등(1969)은 estrous cycle을 正確히 把握하여 各週期的 細胞 또는 호르몬의 變化를 報告하였고 Ramirez and McCann(1963), Barnes(1963), Herlant(1964), Foncin and LeBeau(1966), Dekker(1967), Kurosumi and Oota(1963)는 去勢(性腺摘出)한 뒤의 腦下垂體 組織像을 發表한바 있다.

이들의 業績을 綜合해 볼때 變調된 狀態下에서의 호르몬의 濃度(血中 또는 腦下垂體內)는 放射免疫檢定(radioimmunoassay)의 開發로 相當한 進歩를 보았으나 同一狀況下에서의 腦下垂體組織像을 各 호르몬에 따라 區分하여 特異染色으로 觀察한 報告는 없다.

이에 著者は 實驗動物을 使用하여 여러 變調된 內分泌狀態를 誘發시켜 그 腦下垂體 切片에서 免疫組織化學的으로 特異染色한 FSH顆粒 및 FSH分泌細胞를 細密하게 觀察하였는바 이에 그 結果를 要約 報告하는 바이다.

#### 材料 및 方法

動物: Sprague-Dawley 系의 흰 쥐를 使用하였다. 環境要因의 內分泌系에 미치는 影響을 可能な 限 排除하기 爲하여 飼育室의 溫度 및 濕度の 急激한 差異를 避하도록 하였고 人工照明으로 밤낮의 길이(낮 14時間, 밤 10時間)를 一定하게 한 가운데 動物들을 約 1個月間 飼育시킨後 使用하였다. 그중에서 性週期 調査를 위한 암 흰쥐들은 每日 午前 10時에 陰塗沫標本을 觀察함으로써 性週期를 判別하였고 最少 2回以上의 一定한 週期를 나타낸 動物단을 選擇하여 實驗에 使用하였다. 去

Table 1. Status of animals

Group	No. of rats	Sex	Status of rats
I	5	M	14 days after castration
II	5	M	30 days after castration
III	5	M	90 days after castration
IV	5	M	150 days after castration
V	5	F	estradiol 0.2ml/day for 10days
VI	5	F	estradiol 0.2ml/day for 30days
VII	5	F	proestrus
VIII	5	F	estrus
IX	5	F	diestrus
X	5	M	1 day after birth
XI	5	F	pregnancy 6 days
XII	5	F	pregnancy 21 days

勢群의 動物은 모두 숫 흰쥐를 使用하였는데 이들은 ether 麻酔下에 開腹, 兩側 睪丸 및 副睪丸을 摘出하였고 腹壁를 縫合한 後 通常方法에 따라 飼育을 繼續하였다. Estradiol 注射群은 每日 2회에 걸쳐 一定時間에 estradiol benzoate(Sam II Pharm. Co.) 0.1ml(1,000 I. U.)씩을 皮下로 注射하였다. 使用動物의 群別, 性別 및 變調狀態를 第1表에 要約하였다.

組織處理過程: 各各 豫定日에 斷頭로 犧牲시켜 即時 腦下垂體를 摘出하여 Bouin 氏液에 4~5時間 固定하였다. 그後 70% ethanol로 10餘回에 걸쳐 液을 交換하여 洗滌하였는데 固定液成分中の 하나인 picric acid의 黃色이 完全 消失되기 까지는 通常 4~5일이 所要되었다. Proestrus, estrus 및 diestrus 期에 있는 쥐들은 午前 10時에 各各 屠殺하였다. 固定과 洗滌이 끝난 組織切片들은 脫水過程을 거쳐 通常方法에 따라 paraffin에 包埋하였고, 6 $\mu$  두께의 連續切片을 製作하였다.

使用抗體: 免疫組織化學反應에 使用한 두 種類의 抗體는 다음과 같은 順序로 製作하였다. 第1抗體인 rabbit anti-ovine follicle stimulating hormone(以下 anti-FSH로 略記)은 精製한 ovine FSH를 complete Freund adjuvant와 함께 토끼에 反復 注射함으로써 얻은 免疫血清으로서 rat FSH와 特異的인 交叉反應을 나타내음을 確認하였고 組織切片內의 FSH 顆粒과는 1:50稀釋液으로도 充分히 免疫學的으로 結合됨이 立證되어 全實驗過程中 1:50稀釋液을 反應에 使用하였다.

第2抗體인 sheep anti-rabbit gamma globulin(以下 anti-RGG로 略記)은 精製한 토끼의 gamma globulin

을 亦是 complete Freund adjuvant에 섞어 緬羊에 反復 注射함으로써 얻은 抗血清이다. 이 血清을 다시 低温(4°C)에서 ammonium sulfate 鹽析法으로 數次에 걸쳐 分割하여 gamma globulin을 얻었고, 透析과 凍結 乾燥를 거쳐 粉末로 만들어 -40°C에 密封保管하였다. 이 anti-RGG에 다시 horseradish peroxidase type II (Sigma Chem. Co., St Louis, Mo.)를 bifunctional reagent인 FNPS(p, p'-difluoro-m, m'-dinitrodiphenyl sulfone)를 使用하여 化學的으로 結合시켰다. 이렇게하여 얻은 horseradish peroxidase labeled sheep anti-rabbit gamma globulin(以下 anti-RGG-peroxidase로 略記)에서 標識되지 않은 遊離酵素 및 變性된 標識抗體, 剩餘 FNPS를 除去하기 爲하여 다시 飽和 ammonium sulfate로 分割 精製한 後 透析을 거쳐 少量씩 分瓶하여 使用時까지 -40°C에 保管하였다. 이 anti-RGG-peroxidase 亦是 1:50稀釋液으로도 rabbit gamma globulin과 充分히 免疫學的 結合을 할 수 있는 力價를 지녔음이 證明되어 本實驗에서는 始終 上記한 比率의 稀釋液을 使用하였다.

그밖에도 第2抗體는 附隨될 수 있는 組織自體와의 非特異的反應을 最少限으로 줄이기 爲하여 acetone으로 乾燥시킨 흰쥐 肝臟粉末로 使用 直前 2회에 걸쳐 吸着시킨바 있다.

免疫組織化學反應過程: Nakane等(1966, 1967<sup>1)</sup>, 1967<sup>2)</sup>)이 開發한 酵素標識抗體法(enzyme labeled antibody method)을 利用하여 腦下垂體 前葉의 組織切片上에서 FSH 顆粒을 가진 細胞들을 特異的으로 染色하였다.

Paraffin을 除去한 切片들을 充分히 水洗한뒤 4°C의 pH 7.4, 0.05M phosphate buffered saline(以下 PBS로 略記)으로 15分間 洗滌하고 抗體液으로 處理하였다. 第1抗體인 anti-FSH로 切片이 덮이게 한뒤 室溫에서 30分間 反應시켰다. 이때 乾燥되던서 抗體濃度의 變化가 있을 可能性에 對備하여 시계정시로 slide glass全體를 덮었으며 濕度를 繼續 維持시키기 爲하여 젖은 濾過紙를 바닥에 깔아 놓았다. 反應이 끝난 뒤에는 다시 4°C의 PBS로 約 30分間 세차레에 걸쳐 新鮮한 液으로 交換해 줌으로써 切片上에 剩餘抗體가 남아있지 않도록 하였다. 이어서 第2抗體인 anti-RGG-peroxidase도 같은 方法으로 反應시켰으며 PBS로 洗滌을 한뒤 標識된 酵素인 horseradish peroxidase에 對하여 組織化學的 反應을 施行하였다.

Karnovsky의 方法에 따라 0.05M, pH7.6의 tris buffer에 3,3'-diaminobenzidine을 飽和시키고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

를 0.001%가 되도록 강한 基質液을 만들어 抗體反應을 끝낸 切片을 30~40分間 浸漬시켰다.

그後 蒸溜水로 充分히 洗滌을 한뒤 1% osmium tetroxide 로 棕色強化와 後固定을 兼하여 施行하였다. 反應이 完全히 끝난 切片들은 水洗, 脫水를 거쳐 xylene 을 通過한뒤 balsam 으로 封入하였다. 모든 切片들은 反應程度의 誤差를 줄이기 위해 同時에 染色하였다.

**檢鏡基準:** 同一群의 腦下垂體는 모두 水平位置로 同時에 包埋하여 水平斷으로 連續切片을 만들었기 때문에 同一水準의 每 10枚의 切片들을 選擇하여 檢鏡을 하였고, 細胞의 計數는 450倍로 擴大된 光學顯微鏡下에서 施行하였다. 또한 細胞質內 顆粒의 染色度 및 顆粒의 充滿 또는 放出된 程度는 觀察者가 定한 基準에 따라 그 多寡, 高低 및 濃淡等을 各各 符號로 表示함으로써 그 程度를 比較하였다.

## 成 績

### 1. FSH 細胞의 確認

特異抗體를 使用한 免疫組織化學反應의 結果는 特定 細胞의 顆粒단이 褐色으로 나타나 顆粒을 가지고는 있으나 抗體와 結合되지 않은 其他 分泌細胞들과는 棕色 反應단으로도 明白한 對照를 이루고 있었다. 非特異的背景(nonspecific background)은 淡黃色이었으므로 特異細胞와는 低倍率의 顯微鏡下에서도 쉽게 鑑別이 되었고 高倍率下에서는 더욱 明確하였다. 細胞의 機能狀態에 따라 分泌가 많이 된 境遇나 顆粒自體가 微細하고 濃도가 짙지 않은 境遇等에서는 棕色狀態가 여러 程度를 나타내었으나 細胞自體의 形態와 殘餘 顆粒의 性狀으로 判斷하여 區別이 困難한 點은 없었다. 觀察에 參考가 되게 하기 爲하여 施行한 一般組織化學染色에서는 FSH 細胞를 選擇적으로 區別하기 어려웠으나 PAS 反應에서는 다른 鹽基好性細胞와 함께 陽性을 띠었으며 Masson의 三重染色에서도 aniline blue 에 染色되었음을 觀察할 수 있었다.

FSH 細胞는 흰쥐의 境遇, 腦下垂體 前葉의 細胞中 比較的 큰 細胞에 該當되며 그 數도 比較的 많은 便이었다. 細胞의 輪廓은 大概의 境遇 中 便이었으며 間或 卵圓形, 長橢圓形을 나타내는 것도 있었다. 顆粒은 다른 種類의 細胞들에 비해 微細한 便이었고 細胞들은 大體로 洞樣血管 周邊에 單獨으로 또는 集團을 이루며 位置하고 있는 境遇가 많았다. FSH 細胞에 흔히 出現된다고 알려져 있는 large amorphous body 는 드물게 觀察되었으며 아마도 이것은 光學顯微鏡의 낮은 解像力

에 起因된 것으로 보인다. 몇몇 細胞에서는 「골지」裝置의 陰影像을 볼 수 있었으며 그밖의 細胞小器官 및 包含物은 觀察되지 않았다.

### 2. 여러變調된 內分泌狀態下에서의 體重變化

去勢群의 吮乳後 體重은 去勢前의 體重平均値인 166.7 gm 에서 去勢後 14日에는 185.3gm, 30日에는 226.1 gm, 90日에는 303.9gm, 그리고 150日에는 319.8gm 으로 增加하였다. 이것은 第Ⅲ群과 同一한 年齡의 正常對照群의 體重平均値인 365.3gm 에 比하던 모두 正常的인 體重增加를 보이지 못한 것이다.

Estradiol 을 10日間 繼續 注射한 第Ⅴ群은 體重이 221.4gm 으로 나타났고 30日間 繼續 注射한 群의 動物들은 298.3gm 의 體重平均値를 나타내어 注射前 體重平均인 195.3gm 및 第Ⅶ群과 同一年齡인 正常對照動物의 平均體重 270.0gm 에 比較해 볼 때 年齡增加에 따른 自然增加보다 若干 上廻하고 있음을 보이고 있다.

生理的性週期에 있는 正常 흰쥐들은 그 體重平均値가 203.1gm(proestrus), 212.4gm(estrus), 209.7gm(diestrus)으로 나타나 서로間에 別다른 差異가 없음을 보여 주었다. 出生後 1日째의 흰쥐는 平均體重이 6.3gm 이었다.

임신 第6日 및 第21日의 흰쥐들은 그 平均體重値가 各各 262.6gm 및 320.5gm 을 나타냈는데 이것은 임신 하지 않은 正常對照動物의 同一期間中の 自然增加値(219.3gm 에서 252.8gm 으로 增加)와 比較할때 모두 더 높은 平均値인 것이다. 各群의 體重變化를 第2表 및 第1圖에 表示하였다.

### 3. 腦下垂體重量變化

腦下垂體의 重量은 去勢後 14日의 第Ⅰ群이 10.0mg, 去勢後 30日의 第Ⅱ群이 10.4mg, 去勢後 90日의 第Ⅲ群이 12.8mg, 去勢後 150日의 第Ⅳ群이 13.2mg 을 나타냈다.

Estradiol 을 10日間 注射한 第Ⅴ群의 腦下垂體 平均重量은 10.5mg, 30日間 注射한 第Ⅶ群의 平均重量은 10.5mg 으로서 同一하였고 proestrus 期の 흰쥐는 10.3 mg, estrus 期の 흰쥐는 10.1mg, diestrus 期の 흰쥐는 10.2mg 의 腦下垂體重量을 各各 나타냈다. 生後 1日의 흰쥐 腦下垂體는 3.8mg 의 重量을 나타냈고 임신 6日 및 21日에는 各各 10.6mg 및 10.9mg 의 腦下垂體重量을 나타냈다.

正常 흰쥐의 腦下垂體重量平均値(雄性 및 雌性, 體重 150~300gm)는 9.6mg~10.5mg 이었으며 이 範疇보다

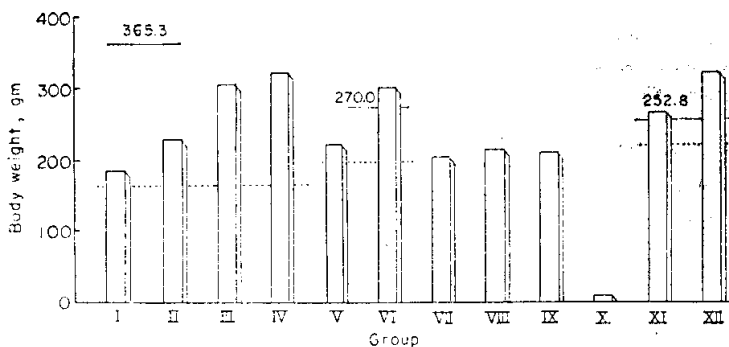


Fig. 1. Changes of body weight of rats under the status of various hormonal alteration (dotted horizontal line indicate the level of average body weight of rats before castration, injection and gestation respectively and the solid horizontal line indicate the level of average body weight of control rats of same age to the groups, V and VI)

Table 2. Body weight and hypophyseal weight of rats under various hormonal status (M±S. D.)

Group	Status of rats	Sex	Body wgt., gm	Hypoph. wgt., mg	Remarks
I	14 days after castration	M	185.3±16.5	10.0±2.6	Mean of body weight before castration was 166.7±15.5
II	30 days after castration	M	226.1±19.7	10.4±2.6	
III	90 days after castration	M	303.9±25.8	12.8±2.8	
IV	150 days after castration	M	319.8±28.4	13.2±3.3	
V	Estradiol inj. for 10 days	F	221.4±18.2	10.5±2.0	Mean of body weight before injection was 195.3±10.8
VI	Estradiol inj. for 30 days	F	298.3±15.6	10.5±2.2	
VII	Proestrus	F	203.1±16.8	10.3±2.7	
VIII	Estrus	F	212.4±19.6	10.1±2.1	
IX	Diestrus	F	209.7±18.8	10.2±2.3	
X	1 day after birth	M	6.3±1.7	3.8±1.6	
XI	Pregnancy 6 days	F	262.6±20.2	10.6±2.3	Mean of body weight before gestation was 219.3±20.3
XII	Pregnancy 21 days	F	320.5±42.8	10.9±2.8	

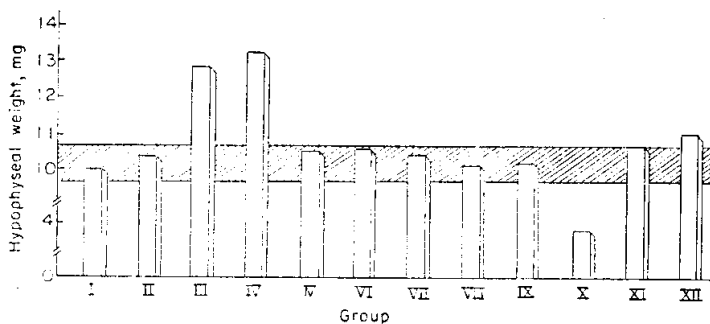


Fig. 2. Changes of hypophyseal weight of rats under the status of various hormonal alteration (shaded area indicates the normal range of hypophyseal weight from control rats)

**Table 3.** Ratio of hypophyseal weight to body weight of rats under various hormonal status

Group	Status of rats	Ratio
I	14 days after castration	5.40
II	30 days after castration	4.60
III	90 days after castration	3.72
IV	150 days after castration	4.13
V	Estradiol inj. for 10 days	4.74
VI	Estradiol inj. for 30 days	3.52
VII	Proestrus	5.07
VIII	Estrus	4.75
IX	Diestrus	4.86
X	1 day after birth	55.88
XI	Pregnancy 6 days	4.04
XII	Pregnancy 21 days	3.40

더 높은 重量을 나타낸 것은 去勢後 90日 및 150日群이었고 임신 第21日의 흰쥐가 正常의 最高值보다 若干 높았다. 生後 1日의 腦下垂體 重量平均値가 낮은 것은 當然한 結果이다.

各群別 平均値를 第2表 및 第2圖에 要約하여 表示하였고 腦下垂體의 對體重比를 第3表에 나타냈다.

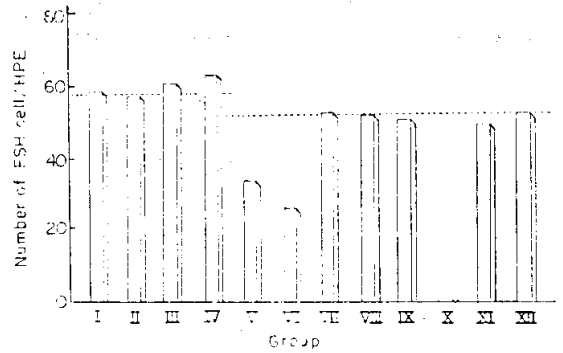
腦下垂體의 對體重比는 第I群이 5.40, 第II群이 4.60 第III群이 3.72, 第IV群이 4.13, 第V群이 4.74, 第VI群이 3.52, 第VII群이 5.07, 第VIII群이 4.75, 第IX群이 4.86, 第X群은 55.88, 第XI群이 4.04, 第XII群이 3.40을 各各 나타냈다.

#### 4. FSH 細胞數의 變化

去勢後 14日, 30日, 90日 및 150日에 屠殺한 흰쥐 腦下垂體組織切片에서 計數한 FSH(卵胞刺戟호르몬) 細胞數는 視野當 平均値가 各各  $58.7 \pm 12.3$ ,  $56.9 \pm 15.4$ ,  $60.1 \pm 14.8$ ,  $62.3 \pm 18.6$ 으로 去勢後 時間經過에 따른 큰 變動이 없음을 나타냈다. 이 數值들은 正常 未妊의 FSH 細胞平均計數인  $57.3 \pm 13.9$ 와 比較할때 去勢가 細胞數에 變化를 일으켰다고 보기는 어렵다.

Estradiol을 投與한 實驗群에서는 10日間 投與한 第V群이  $32.8 \pm 9.2$ , 30日間 投與한 第VI群이  $25.5 \pm 7.3$ 으로서 비슷한 體重과 年齡의 正常인 未妊의 FSH 細胞平均値인  $50.9 \pm 15.4$ 와 比較할때 細胞數에 많은 減少가 있었음을 나타내고 있다.

各生理的性週期에 屠殺한 흰쥐에서 計數한 FSH 細胞數는 proestrus에 있는 動物이  $52.0 \pm 13.3$ , estrus에



**Fig. 3.** Number of FSH-cells of rat hypophysis under the status of various hormonal alteration (dotted lines indicate the level of average FSH-cell counts from control rats)

있는 動物이  $50.6 \pm 16.7$ , diestrus에 있는 動物이  $49.9 \pm 15.1$ 로서 各週期間의 差異를 發見하기 어려웠고 正常 對照群의 FSH 細胞數의 平均値인  $50.9 \pm 15.4$ 와는 비슷한 水準에 있었다.

生後 1日의 흰쥐 腦下垂體前葉에서는 FSH 細胞를 發見할 수가 없었다. 그것은 設或 FSH 細胞가 存在했다 하더라도 酵素抗體法에 의해 나타날만한 顆粒을 안가졌을 境遇에는 다찬가지가 된다. 本實驗에서는 그것이 前者에 屬하는지 後者に 屬하는지를 判斷하기가 쉽지 않았다.

妊娠 第6日 및 第21日의 腦下垂體 FSH 細胞의 平均値는  $48.9 \pm 12.0$  및  $51.3 \pm 13.8$ 을 各各 나타냈으며 이것은 正常對照群의 平均細胞數인  $50.9 \pm 15.4$ 와 比較할때 큰 差가 없는 것이다. (第4表 및 第3圖 參照)

即 全實驗群을 通해 낮은 FSH 細胞數는 estradiol 長期間 投與群에서만 나타났다.

#### 5. FSH 顆粒의 變化

卵胞刺戟호르몬細胞의 分泌顆粒은 여러가지 變調된 內分泌狀態下에서 各各 다른 染色度(陽性反應의 強度)를 나타내는가 하던 顆粒의 細胞質內 充滿度도 各各 相異한 樣相을 띠었다. (第5表 參照)

即 去勢後 14日이 經過된 第I群 動物의 腦下垂體 卵胞刺戟호르몬의 顆粒은 강한 陽性反應을 나타냈고 細胞內에 中等度로 充滿되어 있었으나 去勢後 30日에는 매우 강한 陽性反應을 보여 顆粒은 benzidine의 褐色을 지나 거의 黑褐色을 나타내었다. 顆粒은 細胞안에 매우 주밀하게 차 있었다. 그러나 去勢後 90日(第III群)에는 陽性度는 如前히 매우 強하였으나 顆粒은 細胞質內에

Table 4. FSH-cell counts from pituitary gland of rats under various status of altered hormone

Group	Status of rats	Sex	No. of cells/HPF (M±S. D)	Remarks
I	14 days after castration	M	58.7±12.3	
II	30 days after castration	M	56.9±15.4	Average of FSH-cells of
III	90 days after castration	M	60.1±14.8	male rats(control) was 57.3±13.9
IV	150 days after castration	M	62.3±18.6	
V	Estradiol inj. for 10 days	F	32.8± 9.2	
VI	Estradiol inj. for 30 days	F	25.5± 7.3	
VII	Proestrus	F	52.0±13.3	Average of FSH-cells of
VIII	Estrus	F	50.6±16.7	female rats(control) was 50.9±15.4
IX	Diestrus	F	49.9±15.1	
X	1 day after birth	M	no FSH cells were reacted	
XI	Pregnancy 6 days	F	48.9±12.0	
XII	Pregnancy 21 days	F	51.3±13.8	

Table 5. Effects of hormonal alterations on the FSH granules of rat pituitary glands

Group	Status of rats	Sex	Intensity of reaction*	Status of granules
I	14 days after castration	M	++	moderately granulated
II	30 days after castration	M	##	well granulated
III	90 days after castration	M	##	moderately granulated
IV	150 days after castration	M	##	moderately granulated
V	Estradiol inj. for 10 days	F	+	less granulated
VI	Estradiol inj. for 30 days	F	+	less granulated
VII	Proestrus	F	++	well granulated
VIII	Estrus	F	±	less granulated
IX	Diestrus	F	+	moderately granulated
X	1 day after birth	M	no FSH granules were reacted	
XI	Pregnancy 6 days	F	++	moderately granulated
XII	Pregnancy 21 days	F	++	moderately granulated

\*##: very intense, ++: intense, +: moderate, ±: weak

中等度로 차 있었고 이 상태는 去勢後 150日(第IV群)에도 同一하게 나타났다. 顆粒은 去勢後 經過日數가 길어짐에 따라 一般적으로 더욱 粗大해 지고 있었음을 觀察할 수 있었다.

Estradiol을 投與한 第V群과 第VI群 動物에서는 投與日數에 差異가 없이 모두 中等度の 陽性 反應을 보였고 顆粒은 매우 성글게 細胞內에 차 있었다. 去勢群들의 境遇와는 對照의으로 顆粒은 매우 微細한 便이었다.

生理的 性週期 即 proestrus, estrus 및 diestrus 에 있는 環玆의 腦下垂體에서는 다른 어느 實驗群들 보다

變化가 많았다. 即 proestrus 에 있는 第VII群 動物들은 다른 두群(estrus, diestrus)의 境遇와 달리 強한 陽性 反應을 보이는 顆粒들이 比較的 主密하고 FSH 細胞內에 充滿되어 있었고 顆粒 크기도 매우 微細하였다. 그러나 estrus 期에 있는 第VIII群 動物에서는 FSH 顆粒이 全實驗群中 가장 弱한 陽性反應을 보였을뿐 아니라 顆粒數도 적어 매우 성글게 細胞內에 殘存해 있었다. Diestrus 에 있는 第IX群 動物의 腦下垂體에서는 FSH 顆粒의 陽性反應은 中等度로 나타났으나 顆粒은 다시 蓄積되기 시작하여 中等度の 充滿을 보였다.

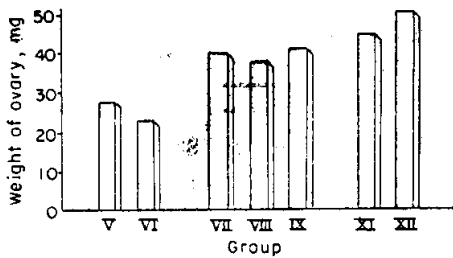


Fig. 4. Weight of ovary of the rats

Table 6. Weight of ovary of the rats under various hormonal status(M±S.D)

Group	Status of rats	Wgt. of ovary, mg
V	Estradiol inj for 10 days	27.3± 4.8
VI	Estradiol inj for 30 days	23.2± 5.1
VII	Proestrus	33.4± 7.6
VIII	Estrus	36.6±10.4
IX	Diestrus	39.5± 9.9
XI	Pregnancy 6 days	43.8±10.2
XII	Pregnancy 21 days	49.0±12.7

生後 1일의 動物에서는 陽性으로 反應하는 顆粒을 觀察할 수 없었다.

임신 후 6일째 되는 흰쥐인 第Ⅸ群의 腦下垂體에서는 強한 陽性反應을 나타내는 粗大한 顆粒이 中等度로 充滿되어 있었고 이 現象은 임신 제21일째의 흰쥐에서도 마찬가지였다.

### 6. 卵巢의 重量變化

變調된 여러 內分泌狀態下的 흰쥐 卵巢의 平均重量은 第6表와 第4圖에 表示하였듯이 差異가 많았다. 即 estradiol 을 10日間 注射한 第Ⅴ群의 境遇 卵巢重量은 平均 27.3mg 이었으며 30日間 繼續 投與한 第Ⅵ群의 動物은 23.2mg 이었다. 한편 proestrus, estrus, diestrus 期에 있는 흰쥐들의 境遇 卵巢重量의 平均値는 各各 33.4mg, 36.6mg, 39.5mg 이었고 임신 第6日과 第21日에 있는 흰쥐의 卵巢는 各各 43.8mg 과 49.0mg 의 平均重量을 나타냈다.

## 考 察

### FSH 細胞染色의 特異性

免疫組織化學反應에서 가장 重要한 것은 그 反應의

特異性이다. 本實驗에서 使用한 抗體는 精製된 抗原으로 免疫하여 얻었으며 抗原과 抗體사이의 反應은 Ouchtalony 의 agar diffusion method 로 特異沈降線을 나타냈음이 證明되어 있어 이 抗體液을 使用한 反應結果에 對하여는 信憑性이 높다고 본다.

抗原이 存在하는 部位는 anti-OFSH 및 horseradish peroxidase 를 標識한 anti-RGG 에 依해 結合되었고 그 酵素는 基質液속의 diaminobenzidine 을 酸化시킴으로써 可視化할 수 있는 褐色色素를 沈着시켰음은 酵素의 活性이 높았음을 意味함으로써 그것은 곧 抗原 即 FSH 의 所在을 말해 주는 것이다.

### 去勢後變化

視床下部—腦下垂體—性腺은 하나의 機能軸을 이루고 있어 비록 各器官 사이에 形態學的인 連結은 없다고 하더라도 機能上으로는 매우 密接한 關係를 가지고 있어 어느 한 器官의 變化는 곧 나머지 器官의 機能에 影響을 미치고甚하면 形態的인 變化까지도 招來한다. 이러한 生理的現象은 “피먹이기機轉”(feedback mechanism)에 依하여 充分히 說明이 된다. 이에 따라 Bahn 等(1953)은 사람에 있어서 卵巢機能이 低下된 閉經期以後의 女性에서는 腦下垂體의 FSH 對 LH 의 比率이 3:1 이던 이것은 正常的인 卵巢機能을 가진 女性의 比率 1:1과는 큰 差異가 있어 이것은 性腺摘出時의 境遇와 비슷함을 報告한 바 있다. 그러나 흰쥐를 對象으로 한 實驗에서는 見解가 若干 달라 調整되지 않고 있다. Paesi 等(1955)은 去勢後 FSH 및 LH 를 測定한 結果 性腺摘出 3個月後에 암흰쥐腦下垂體에서는 FSH 가 5倍以上 增加되었으나 수흰쥐에서는 뚜렷한 變化가 없고 LH 는 兩性에서 모두 增加했음을 報告하였다. 한편 gonadotroph 에 關한 組織學的인 研究로서는 Rokhlina(1940) Farquhar 等(1954) Purves(1955), Yoshimura 等(1965), 沈等(1972)의 業績이 있다.

Rokhlina 는 副腎摘出과 性腺摘出을 同時에 施行한지 30日까지는 腦下垂體의 gonadotroph 에 거의 아무 變化가 없었음을 報告하였으며 Farquhar 等은 去勢後 흰쥐 腦下垂體前葉을 電子顯微鏡으로 觀察하면서 去勢型細胞의 出現을 報告하였으나 特異反應이 併行되어야만 細胞의 分類가 可能할것이라고 하였다. Purves 는 흰쥐에서 腦下垂體前葉의 周邊部에는 FSH 細胞가 中心部에는 LH 細胞가 分布되어 있으며 去勢後 反應은 兩者 모두에서 일어남을 報告하였고 Yoshimura 等은 흰쥐에서 去勢後 gonadotroph 가 增加했음을 觀察하였으나 그것이 FSH 인지 LH 인지 아니면 兩者 모두인지는 區分하지 않았

다. 沈等은 免疫抗體法으로 anti-HCG(human chorionic gonadotropin)를 利用하여 LH 細胞를 去勢한 흰 쥐 腦下垂體에서 特異적으로 染色하여 去勢後 60日頃에 LH 細胞가 가장 많이 增加함을 發表하였다. Costoff (1973)는 去勢로 因하여 FSH 細胞가 變化되지는 않았으며 이 所見은 手術後에서 去勢後 LH 濃度は 增加하였으나 FSH 濃度は 變함없었다는 parlaw(1968)의 實驗結果와 一致됨을 報告하였다. 그以前에 Bogdanove 等 (1934)은 手術後에서 去勢後 49日間은 FSH의 量에 變化가 없었으나 LH는 8倍로 늘었음을 報告한 바 있다. Costoff는 그러나 去勢後 初期에는 FSH 細胞에 變함이 없었어도 長期間後에는 變하여 特異 顆粒의 變化가 細胞自體의 變化보다 앞선다고 하였다.

著者들의 成績에서는 去勢에 따른 FSH 細胞數의 增加는 거의 認定할 수 없었고 去勢後 顆粒의 染色度增加와 顆粒의 粗大化가 顯著하였다. 體重은 正常的인 發育을 한 對照群의 흰 쥐들 보다 가벼웠으며 이는 辜丸摘出自體로 因한 負擔이 아닌자 보여진다. 腦下垂體 重量은 去勢後 長期間 經過한 쥐에서는 顯著히 增加하였음을 認定할 수 있었다. 이것으로 미루어 보아 著者의 成績은 沈等이 報告한 去勢한 흰 쥐의 LH 變化 樣相과는 달랐음을 나타내고 있다.

#### Estradiol 注射에 따른 變化

卵巢호르몬의 하나인 estrogen을 投與한 흰 쥐에서 腦下垂體 gonadotropin의 分泌가 顯著히 減少하며 그것은 大略 投與한지 3-4日後에 일어난다고 한 Bradbury (1947)의 實驗結果는 Purves 等(未發表)에 依해 確認되었고 그것은 1에서 100ug 까지 사이의 어떤 量을 주어도 投與한지 2日以內에는 그러한 現象이 오지 않음을 證明한 것이다.

著者의 實驗結果 FSH 細胞는 顯著한 數的減少를 나타냈고 그것은 沈等の 實驗에서 testosterone의 長期間 投與에 따른 LH의 變화와 매우 비슷한 結果였다. 顆粒 역시 매우 弱한 陽性度를 보였고 매우 辜丸 充滿도를 보인 것은 繼續的인 estrogen 投與로 視床下部에서 FRF(FSH releasing factor)가 放出되지 못하고 따라서 漸次的인 萎縮이 큰 것으로 보인다. Estradiol 投與로 卵巢亦是 影響을 받아 그 重量이 正常보다 減少되어 있었음이 前記한 腦下垂體-性腺-視床下部의 機能軸에 順次的인 影響이 미쳐졌음을 말해준다.

#### 性週기에 따른 變化

生理的週기에 따라 gonadotropin의 量이 變함은 오래前부터 研究되어 왔다. 흰 쥐에 對해서는 Everett

(1948), Catchpole(1949) 및 Purves 等 (1951)이 많은 研究을 하였고 Dempsey(1937, 1939)는 guinea pig를 對象으로 Simpson 等 (1956)은 원숭이를 對象으로, Midgley 等(1963)은 사람을 對象으로 各各 週期마다 LH 및 FSH를 調査하였다.

흰 쥐에 關한 Roos(1968)의 研究報告는 diestrus의 中間에 顆粒의 放出된 FSH 細胞를 보았고 또한 proestrus의 午後에도 顆粒은 放出된다고 하였다. 이것을 前記한 研究者들의 結論과 綜合하여 分析해 볼때 흰 쥐에서는 發情期에 FSH의 血中濃度は 높아지고 間期에는 低下함을 말한다. 그러나 血中濃도와 腦下垂體內의 細胞顆粒相이 반드시 平行하는 增減狀態를 보이는 것은 아니다. 이것은 Catchpole 및 Purves 等 많은 研究者들이 主張한바 오히려 間期の 腦下垂體에 特異顆粒은 蓄積된다고 하는 事實과 이 보다 앞선 Wolfe의 研究結果 即 發情期에는 顆粒으로 차있는 鹽基好性細胞의 比率이 가장 낮고 間期에는 오히려 FSH 顆粒이 增加되었다는 事實과를 對照해 볼때 血中濃도와 腦下垂體內 顆粒充滿도와는 오히려 反對의 相을 反復하고 있는 것 같다.

著者의 觀察結果는 FSH 細胞의 意義있는 數的變化는 없었으나 期에 따른 顆粒의 染色強度와 充滿도의 差異는 甚하였다. proestrus에서는 放出以前이므로 顆粒이 強한 陽性反應을 보이고 細胞內에 充滿되어 있음은 많은 研究者들의 血中호르몬 濃도의 消長狀況과 一致하고 있다고 볼 수 있다. 이러한 所見은 estrus 期の 弱한 陽性도와 放出로 因한 辜丸 充滿도로 더욱 明白하다.

#### 生後齡 및 妊娠에 따른 變化

흰 쥐의 生後齡에 따른 gonadotropin 또는 性腺刺戟호르몬細胞에 關한 Clark(1935), McQueen-Williams (1935) 및 Stein(1935)의 研究結果는 生後 2週末이 되어야 비로서 檢定可能한 量의 gonadotropin이 出現되고 그에 따라 性腺은 처음으로 反應한다고 하였으며 또한 生後 3週에는 비록 性的인 成熟은 아직 되지 않았어도 急激한 gonadotropin의 上昇을 보인다고 結論지으면서 同一齡에서는 手術後에 암컷보다 더 높은 gonadotropin 值를 나타낸다고 하였다. Bahn 等(1953 a~d)은 사람의 腦下垂體를 乳兒期, 幼年期, 成年期 및 老年期로 나누어 FSH 및 LH 量을 檢定한 結果를 報告하면서 사람에서는 4歲에 비로서 檢定할 수 있는 最少量이 出現된다고 指摘하였다.

著者의 境遇 生後 1日의 흰 쥐 腦下垂體는 크기도 微細할뿐 아니라 酵素抗體法에 依한 反應은 全혀 陰性인 것으로 보아 gonadotropin의 顆粒은 아직 生成되지 않은



것으로 볼수 밖에 없다.

妊娠에 따른 FSH의 變化를 觀察한 著者の 觀察成績으로는 性週期の 境遇와 마찬가지로 FSH細胞數의 意義 있는 變化는 없었으나 顆粒이 多少 강한 陽性度를 나타냈을 뿐이다. 妊娠中の 쥐에서는 gonadotropin의 上昇과 함께 腦下垂體細胞內 glycoprotein의 增加가 顯著하다는 報告들(Evans and Simpson 1929, Zeiner 1952)과 比較하여 理論上 矛盾이 없는 것으로 看做된다.

### 結 論

去勢와 卵巢호르몬의 大量 長期間의 投與等으로 變調시킨 內分泌狀態와 性週期 및 妊娠期等 生理的變調下에 있는 卵胞刺戟호르몬細胞의 變化를 觀察하기 爲하여 흰쥐를 材料로 腦下垂體 切片上에서 免疫組織化學적으로 FSH顆粒을 特異染色한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 卵胞刺戟호르몬細胞는 그 數가 去勢, 性週期 및 妊娠에 의해 意義있는 變化를 가져오지 않았으나 卵巢호르몬(estradiol)의 長期投與에 依해서는 顯著히 減少하였다.
2. 卵胞刺戟호르몬顆粒의 가장 강한 陽性反應은 去勢群에서 나타났으며 가장 弱한 反應은 estrus 期에 있는 動物에서 나타났다.
3. 가장 稠密하게 充滿된 顆粒은 去勢後 30日群과 proestrus 期에 있는 群에서 나타났으며 가장 성근 顆粒狀態는 estradiol 30日投與群과 estrus 期에 있는 흰쥐群에서 나타났다.
4. 腦下垂體의 重量은 FSH細胞의 變化에도 不拘하고 모두가 正常範圍안에 있었으나 去勢後 長期間 經過된 群에서만은 腦下垂體自體의 肥大가 있었다.
5. 去勢는 體重의 正常增加率을 鈍化시키고 長期間의 estradiol 投與는 體重增加에 促進的으로 影響을 주는 것 같다.
6. 生後 1日의 흰쥐 腦下垂體에서는 FSH細胞를 觀察할수 없었다.

### ABSTRACT

#### Studies on the FSH Granules of Rat Adenohypophysis under Various Conditions of Altered Hormonal Status

Tae kyu Park and Sang Ho Baik

Department of Anatomy, College of Medicine  
Seoul National University

Follicle stimulating hormone cells and its granules of rat adenohypophysis under various status of hormonal alteration have been studied.

To induce the alteration of endocrine condition, gonadectomy or long term administration of estradiol has been carried out before sacrifice. Pituitary glands from the rats of estrous cycle and in gestation were also studied.

Tissue sections of the glands were reacted with specific rabbit antiserum to the ovine FSH and followed by anti-rabbit gamma globulin labeled with horseradish peroxidase. The enzyme was localized histochemically with diaminobenzidine.

Number of FSH cells was reduced after long term administration of estradiol while castration, estrous cycle and gestation did not affect significantly. The most intense reactions of granules were observed in the pituitary glands of castrated group and the least intense reactions from the rats in estrus. Rats from thirty days after gonadectomy and rats in proestrus revealed well granulated FSH cells while the rats in estrus revealed poor granulation. Only the castrated rats showed increase of hypophyseal weight. No FSH granules could be observed in the adenohypophysis of new born rats.

### REFERENCES

1. Bahn, R. C., Lorenz, N., Bennett, W. A. and Albert A.: *Gonadotropins of the pituitary gland and the urine of the adult human female. Endocrinology* 52:135, 1953a
2. Bahn, R. C., Lorenz, N., Bennett, W. A. and Albert, A.: *Gonadotropins of the pituitary gland during infancy and early childhood. Endocrinology* 52:605, 1953b
3. Bahn, R. C., Lorenz, N., Bennett, W. A. and Albert, A.: *Gonadotropins of the pituitary of postmenopausal women. Endocrinology* 53:455, 1953c
4. Bahn, R. C., Lorenz, N., Bennett, W. A. and Albert, A.: *Gonadotropins of the pituitary gland and urine of the adult human male. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82:777, 1953d
5. Bain, J., and Ezrin, C.: *Immunofluorescent localization of the LH cell of human adenohypophysis. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30:181, 1970
6. Barnes, B. G.: *Electron microscopic studies on the cytology of the mouse anterior pituitary.*

7. Barnes, B.G.: *The fine structure of the mouse adenohypophysis in various physiological states.* In "Cytologie de l'Adenohypophyse" Editions du Centre National de La Recherche Scientifique, Paris, 1963
8. Barnett, R.H., Ladman, A.J., McAllaster, N.J. and Siperstein, E.R.: *The localization of glycoprotein hormones in the anterior pituitary glands of rats investigated by differential protein solubilities, histological stains and bioassay.* *Endocrinology* 59:398, 1956
9. Bogdanove, E.M., Parlow, A.F., Bogdanove, J.N., Bhargava, I., and Crabill, E.V.: *Specific LH and FSH bioassays in rats with hypothalamic lesions and accessory sex gland hypertrophy.* 44: 114, 1964
10. Bradbury, J.T.: *Ovarian influence on the response of the anterior pituitary to estrogens.* *Endocrinology* 41:501, 1947
11. Caligaris, L., Astrada J.J., Taleisnik, S.: *Pituitary FSH concentration in the rat during the estrous cycle.* *Endocrinology* 81:1261, 1967
12. Catchpole, H.R.: *Distribution of glycoprotein hormones in the anterior pituitary gland of the rat.* *J. Endocrinol.* 6:218, 1949
13. Clark, H.M.: *A prepubertal reversal of the sex difference in the gonadotropic hormone content of the pituitary gland of the rat.* *Anat. Rec.* 61:175, 1935
14. Costoff, A.: *Ultrastructure of rat adenohypophysis. Correlation with function.* Academic Press, New York, 1973
15. Dekker, A.: *Pituitary basophils of the Syrian hamster: An electron microscopic investigation.* *Anat. Rec.* 158:351, 1967
16. Della Corte, F., and Biondi, A.: *Riv. Biol.* 57:369, 1964 (Cited by Costoff)
17. Dempsey, E.W.: *Follicular growth rate and ovulation after various experimental procedures in guinea pig.* *Am. J. Physiol.* 120:126, 1937
18. Dempsey, E.W.: *Relationship between central nervous system and reproductive cycle in female guinea pig.* *Am. J. Physiol.* 126:758, 1939
19. Ducommun, S.: *Etude autoradiographique de l'incorporation de la proline tritise par les cellules basophiles de l'adenohypophyse du rat.* *Ann. Endocrinol.* 26:385, 1965 (Cited by Costoff)
20. Evans, H.M., and Simpson, M.E.: *A comparison of anterior hypophyseal implants from normal gonadectomized animals with reference to their capacity to stimulate the immature ovary.* *Amer. J. Physiol.* 89:371, 1929
21. Everett, J.W.: *Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat.* *Endocrinology* 43:389, 1948
22. Farquhar, M.G., and Rinehart, J.F.: *Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats.* *Endocrinology* 54:516, 1954
23. Fogel, M., and Koffler, D.: *Immunofluorescent localization of LH and FSH of fresh, frozen and formalin fixed sections of the human anterior pituitary.* *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 23:411, 1964
24. Foncin, J., and LeBeau, J.: *Cellule de castration et cellules FSH dans l'hypophyse humaine vues au microscope electronique.* *J. Microsc. (Paris)* 5:523, 1966 (Cited by Costoff)
25. Halmi, N.S.: *Two types of basophils in the anterior pituitary of the rat and their respective cytophysiological significance.* *Endocrinology* 47: 289, 1950
26. Halmi, N.S.: *Two types of basophils in the rat pituitary: Thyrotropes and gonadotropes vs. beta and delta cells.* *Endocrinology* 50:140, 1952
27. Herlant, M.: *Recherches sur la localisation histologique des hormones gonadotropes femelles au niveau de l'hypophyse anterieure.* *Arch. Biol.* 54:225, 1943
28. Herlant, M.: *Etude critique de deux techniques nouvelles destinees a mettre en evidence les differentes categories cellulaires presents dans la glande pituitaire.* *Bull. Microsc. Appl.* 10:37, 1960 (Cited by Costoff)
29. Herlant, M.: *The cells of the adenohypophysis and their functional significance.* *Int. Rev. Cytol.* 17:299, 1964
30. Herlant, M., and Ectors, F.: *Identification des cellules LH du porc en microscopie optie, microscope electronique et par immunofluorescence.* *C. R. Acad. Sci.* 269, 368,
31. Hotchkiss, R. D.: *A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations.* *Arch. Biochem.* 16:131, 1948
32. Hunt, T.E., and Hunt, E.A.: *A radioautographic study of the proliferative activity of adrenocortical and hypophyseal cells of the rat at*

- different periods of the estrous cycle. *Anat. Rec.* 155:361, 1966
33. Kobayashi, T., Kobayashi, T., Kigawa, T., Mizuno, M., Amenomori, Y. and Watanabe, T.: *Autoradiographic studies on H-leucine uptake by adenohypophyseal cells in vitro.* *Endocrinol. Jap.* 14:69, 1967
  34. Koffler, D., and Fogel, M.: *Immunofluorescent localization of LH and FSH in the human adenohypophysis.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:1080, 1964
  35. Kurosumi, K., and Oota, Y.: *Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary gland of persistent estrus and persistent diestrus rats.* *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 85:34, 1968
  36. Mcqueen-Williams, M.: *Sex comparison of gonadotropic content of anterior hypophysis from rats before and after puberty.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32:1051, 1935
  37. Midgley, A.R., Jr.: *Immunofluorescent localization human pituitary luteinizing hormone.* *Exp. Cell Res.* 32:606, 1963
  38. Midgley, A.R. Jr. and Jaffe, R.B.: *Regulation of gonadotropins. IV. Correlation of serum concentrations of FSH and LH during the menstrual cycle.* *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 28:699, 1968
  39. Monroe, S.E., Rebar, R.W., Gay, V.L., and Midgley, A.R., Jr.: *Radioimmunoassay determination of luteinizing hormones during the estrous cycle of the rat.* *Endocrinology* 85:720, 1969
  40. Nakane, P.K., Sri Ram, J. and Pierce G.B.: *Enzymelabeled antibodies for light and electron-microscopic localization of antigens.* *J. Histochem Cytochem.* 14:789, 1966
  41. Nakane, P.K. and Pierce, G.B.<sup>1)</sup>: *Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens.* *J. Histochem. Cytochem.* 12:929, 1967
  42. Nakane, P.K. and pierce, C.B.<sup>2)</sup>: *Enzymelabeled antibodies for light and electron microscopic localization of tissue antigens.* *J. Cell Biol.* 33:307, 1967
  43. Paesi, F.J.A. Dejongh, S.E., Hoogstra, M.J. and Engelbregt, A.: *The follicle-stimulating hormone content of the hypophysis of the rat as influenced by gonadectomy and estrogen treatment.* *Acta Endocrinol.* 19:49, 1955
  44. Parlow, A.F.: *Species differences in regulation of pituitary gonadotropins.* *Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 27:269, 1968
  45. Pearse, A.G.E.: *Cytochemistry of the gonadotrophic hormones.* *Nature (London)* 162:651, 1948
  46. Pearse, A.G.E.: *The cytochemical demonstration of gonadotropic hormone in the human anterior hypophysis.* *J. Pathol. Bacteriol.* 61:195, 1949
  47. Pearte, A.G.E.: *Differential stain for the human and animal anterior hypophysis.* *Stain Technol.* 25:95, 1950
  48. Pearse, A.G.E.: *Cytological and cytochemical investigations on the foetal and adult hypophysis in various physiological and pathological states.* *J. Pathol. Bacteriol.* 65:355, 1953
  49. Pomerantz, D.E., and Simmons, K.R.: *Immunofluorescent localization of bovine I.H.* *J. Histochem. Cytochem.* 16:205, 1968
  50. Purves, H.D., and Griesbach, W.E.: *The site of thyrotropin and gonadotropin production in the rat pituitary studied by McManus-Hotchkiss staining for glycoprotein.* *Endocrinology* 49:244, 1951
  51. Purves, H.D., and Griesbach, W.E.: *The site of follicle-stimulating and luteinizing hormone production in the rat pituitary glands.* *Endocrinology* 55:785, 1954
  52. Purves, H.D., and Griesbach, W.E.: *Changes in gonadotropes of rat pituitary after gonadectomy.* *Endocrinology* 56:374, 1955
  53. Ramirez, D.V., and McCann, S.M.: *Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats.* *Endocrinology* 72:452, 1963
  54. Robyn, C.Y., Bossaert, P., Hukinout, O., Pasteels, J.L., and Herlant, M.: *C.R. Acad. Sci.* 259:1226, 1964
  55. Rokhlina, M.L.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 27: 504, 1940 (Cited by Costoff)
  56. Roos, J.: *Action exercée par des agents anti-ovulatoires au stade proœstral du cycle ovarien, sur activité gonadotrope excrétrice des cellule  $\beta$  et  $\gamma$  de la pré hypophyse, chez la ratte.* *Z. Zellforsch, Mikrosk. Anat.* 95:347, 1969 (Cited by Costoff)
  57. Simpson, M.E., Van Wagenen, G. and Carter, F.: *Hormone content of anterior pituitary of monkey (Macaca mulatta) with special reference to gonadotropins.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*

- 91:6, 1956
58. Stein, K. F.: *A sex difference in gonadstimulating potency of young gonadectomized rats.* *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 33:95, 1935
59. 沈載道·白相豪: 去勢가 숙원쥐 腦下垂體 LH細胞에 미치는 免疫組織化學的研究, 서울의대잡지 13: 209, 1972.
60. Vanha-Perttula, T: *Esterases of the rat adenohypophysis: Cellular localization and activity in relation to secretory functions.* *Acta Physiol. Scand.* 69, Suppl. 283 104 pp. 1966
61. Yoshimura, F., and Harumiya, K.: *Electron microscopy of the anterior lobe of the pituitary in normal and castrate rats.* *Endocrinol. Jap.* 12:119, 1965
62. Zeiner, F.M.: *Pituitary gonadotrophic fluctuation during pregnancy in the rat.* *Anat. Rec.*, 113, 255, 1952