

去勢가 숫 흰쥐 腦下垂體 LH細胞에 미치는 免疫組織化學的 研究

Immunohistochemical Studies on the LH cells of Pituitary Glands in Castrated Male Rats

서울대학교 醫科大學 解剖學教室

沈 載 道 · 白 相 豪

序 論

視床下部—腦下垂體—標의腺은 하나의 機能軸(functional axis)을 이루고 있어 이 가운데 어느 한 器官의 變化는 곧 나머지 두 器官에 變化를 가져오게 한다. 그것은 生理的인 되먹이기機轉(feed back mechanism)에 의해 生體內에서 恒常 일어나고 있는 相互間的 調整에서 부터 病的狀態인 變性에 이르기까지 廣範하게 볼 수 있는 現象이다. 程度의 差異面에서 볼때에도 여기에는 化學的 組成成分의 變化에서부터 形態的인 變化에 까지 여러 現象이 일어날 수가 있다.

腦下垂體前葉에서 分泌되는 hormone 中的 하나인 黃體形成[호르몬](luteinizing hormone, LH)은 男性에서는 辜丸의 間質細胞(interstitial cell, Leydig cell)에 作用하는 것으로 알려져 있다. 따라서 標의腺인 辜丸의 變化에 따라 機能軸을 이루는 두 器官의 變化, 特別히 腦下垂體前葉의 變化를 觀察하려는 많은 試圖中의 하나는 腦下垂體前葉細胞中 LH 分泌細胞에 미치는 影響을 對象으로 하고 있으며 그 結果에 따라 LH 分泌細胞의 態度, 性質을 究明하려는 窮極的인 目的을 두고 있다.

이러한 目的을 爲해 많은 研究報告들(Addison 1917, Hellbaum 等 1940, Catchpole 1949, Yoshimura 等 1965, 1969, Ishikawa 等 1968)이 나와 있으나 그들은 모두가 腦下垂體組織切片上에서 많은 種類의 細胞中 LH 分泌細胞를 鑑別해내는 方法으로서 從來의 組織化學的 染色反應의 結果에 依存해 왔다. 그러나 두 種類의 Gonadotropic hormone 인 LH 와 FSH 를 鑑別할 수 있는 特異的인 方法이 從來의 組織化學的反應으로는 아직까지 얻어질 수 없다는 事實로 미루어 보아 그들의 研究結果

에 많은 疑問點을 남겨주고 있으며 Farquhar 等(1954)도 去勢한 흰쥐 腦下垂體의 電子顯微鏡學的 研究에서 特異的 組織化學反應을 併行시켜야만 細胞의 分類가 可能할 것이라고 結論짓고 있다.

本論文은 이러한 點에 特別히 留意하여 LH 細胞를 가장 特異的으로 染色할 수 있는 方法으로서 Nakane 및 Pierce(1966)가 開發한 酵素標識抗體法(enzyme-labeled antibody method)을 適用하여 去勢한 숫 흰쥐의 腦下垂體組織의 切片上에서 LH 分泌細胞를 免疫組織化學的으로 染色하여 觀察하려는 目的을 둔 것이다.

材料 및 方法

動物: 體重 約 150~160gm 의 숫 흰쥐(Sprague-Dawley 系) 105마리를 다음과 같은 實驗群으로 나누어 使用하였다.

第Ⅰ群(去勢群): 35마리

第Ⅱ群(去勢後 投藥群): 35마리

第Ⅲ群(對照群): 35마리

第Ⅰ群의 흰쥐들은 ether 麻醉下에 開腹하여 辜丸 및 副辜丸을 摘出한 後 腹壁를 다시 縫合하였으며 去勢日로부터 起算하여 第7日, 第14日, 第30日, 第60日, 第90日, 第120日 및 第150日에 該當되는 날에 各各 5마리씩 屠殺하였다.

第Ⅱ群의 흰쥐들도 同一한 方法으로 去勢한 後 第10日에 testosterone propionate 2mg 및 testosterone cyclopentylpropionate 2mg 을 各各 筋肉內注射로 投與하였고 그後 每 10日마다 testosterone cyclopentylpropionate 10mg 씩을 筋肉內注射로 投與하였다. 第Ⅱ群의 흰쥐 亦是 第Ⅰ群의 境遇와 마찬가지로 去勢後 第

7일부터 第150일에 이르기까지 間隔을 두고 5마리씩 屠殺하였다.

第Ⅲ群은 正常對照群으로서 아무런 處置도 加하지 않고 第Ⅰ, Ⅱ群과 同一한 時間間隔으로 5마리씩 屠殺하였다.

組織處理: 各實驗動物들은 斷頭로서 犧牲시켰으며 即時 腦下垂體를 摘出하여 Bouin's solution 에 4~5時間 固定한 後 固定液成分中の 하나인 picric acid 의 黃色이 消失될 때까지 約 3日間 70% alcohol로 하루 2회씩 新鮮한 液으로 交換하여 濯洗 洗滌하였다. 그 以後는 通常方法에 따라 paraffin 包埋를 하고 6 μ 두께의 水平 連續切片을 만들었다.

抗體: 第1抗體인 Rabbit anti-Human Chorionic Gonadotropin(以下 anti-HCG 로 略記)는 Rat LH와 特異적으로 交叉反應을 하는(Midgley 1963) HCG를 抗原으로 토끼에 免疫을 하여 얻은 抗血清으로서 이 抗血清은 1:50 稀釋液에서도 抗原인 LH와 特異적으로 結合할 수 있는 力價를 지녔음은 이미 Baik 등(1969)에 依해 報告되었고 本實驗에서도 同一한 抗體液으로 組織切片上의 LH와 結合하고 있음을 豫備實驗을 通하여 確認하였다.

第2抗體인 Sheep anti-Rabbit Gamma Globulin(以下 anti-RGG 로 略記)은 精製한 rabbit gamma globulin을 抗原으로 羊에 免疫을 하여 얻은 抗血清에서 抽出하였다. Ammonium sulfate 鹽析法에 依해 gamma globulin을 分劃하여 精製한 後 lyophilizer에 걸어 凍結乾燥시킨 粉末을 使用時까지 密封하여 -40°C에 保管하여 두었다. 이 anti-RGG에 다시 horseradish peroxidase, type Ⅱ(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)를 化學적으로 結合시켰으며 이때 抗體蛋白과 酵素는 bifunctional reagent인 FNPS(p, p'-difluorom, m'-dinitrodiphenyl sulfone)를 使用하여 結合시켰다. 酵素標識抗體液에서 標識되지 않은 遊離酵素 및 變性된 標識抗體를 除去하기 爲하여 다시 鹽析法으로 精製한 後 透析을 거쳐 少量씩 分瓶하여 -40°C에 使用時까지 保管하였다.

組織化學反應過程: Nakane 및 Pierce(1966, 1967)가 開發한 酵素標識抗體(enzyme-labeled antibody)를 利用한 免疫組織化學的方法(immunohistochemical method)으로 腦下垂體前葉의 luteinizing hormone을 간직한 細胞들을 特異적으로 染色하였다.

脫paraffin한 切片들은 水洗한뒤 4°C의 0.05M phosphate buffered saline(以下 PBS로 略記) pH 7.4로 15分間 洗滌하고 抗體液으로 處理하였다.

Table 1. Effect of castration on body weight of rats.

Days after castration	Castrated	Castrated & hormone treated	Control
0	154.0 \pm 1.3*	150.8 \pm 3.3	164.2 \pm 2.0
7	162.4 \pm 1.6	163.9 \pm 1.5	175.0 \pm 1.2
14	174.1 \pm 1.7	176.4 \pm 4.2	188.7 \pm 1.2
30	214.8 \pm 2.1	231.5 \pm 1.8	288.8 \pm 2.4
60	261.0 \pm 2.7	261.7 \pm 2.3	311.0 \pm 2.2
90	282.3 \pm 3.0	280.0 \pm 2.6	348.2 \pm 2.5
120	285.0 \pm 3.6	315.2 \pm 3.0	367.2 \pm 4.4
150	305.0 \pm 5.5	312.0 \pm 4.7	395.0 \pm 6.7

*Mean and S. D., gm

Table 2. Effect of castration on hypophyseal weight of rats

Days after castration	Castrated	Castrated & hormone treated	Control
7	9.8 \pm 0.3*	9.5 \pm 0.2	9.6 \pm 0.3
14	10.0 \pm 1.1	9.9 \pm 1.6	9.4 \pm 1.2
30	10.4 \pm 2.5	9.6 \pm 0.2	9.9 \pm 0.8
60	10.2 \pm 2.1	9.0 \pm 0.2	9.8 \pm 1.4
90	10.8 \pm 2.0	8.3 \pm 0.1	10.2 \pm 1.1
120	11.8 \pm 1.5	8.4 \pm 0.2	10.5 \pm 1.3
150	12.2 \pm 3.4	8.2 \pm 1.6	10.6 \pm 1.7

*Mean and S. D., mg

第1抗體인 anti-HCG液 몇방울을 組織切片 위에 滴고 室溫에서 30分間 反應시켰다. 이때 乾燥되면서 抗體液의 濃縮이 일어날 可能性에 對備하여 시계접시로 slide glass全體를 덮었으며 濕度를 維持시키기 爲해 젖은 濾過紙를 slide glass의 바닥에 깔아 놓았다. 反應後에는 다시 4°C의 PBS로 約 30分間 洗滌하였으며 이때 3회에 걸쳐 新鮮한 PBS를 交換해 줌으로써 切片上에 剩餘抗體가 남아있지 않도록 하였다.

第2抗體인 anti-RGG-peroxidase도 第1抗體와 같은 要領으로 反應시켰으며 PBS로 洗滌을 한뒤 標識된 酵素인 horseradish peroxidase에 對하여 組織化學的 染色反應을 施行하였다. 0.05M, pH 7.6의 tris buffer에 3,3'-diaminobenzidine을 飽和시키고 H₂O₂를 0.001%가

되게끔 가한 基質液에 30~40分間 切片을 浸漬시키고 蒸溜水로 洗滌을 한뒤 1% osmium tetroxide 로 呈色強化와 後固定이 되도록 하였다. 充分한 水洗後 脫水過程을 거쳐 xylene 을 通過시킨뒤 balsam 으로 封入하여 檢鏡에 提供하였다.

觀察: 動物들의 體重은 飼育期間中 繼續 測定記錄하였고 屠殺時에 腦下垂體의 重量을 化學天秤을 利用하여 測定記錄하였다. 屍體의 腦下垂體는 左右幅이 더 긴 隋圓型이므로 同一한 位置와 方向으로 包埋하여 連續切片을 만든뒤 모든 組織에서 同一한 level의 代表的인 20個 切片을 選擇하여 免疫組織化學의 染色反應을 施行하였고 그 밖에도 H & E, Mallory-Azan 染色, PAS 反應등을 併行하여 一般的인 檢鏡에 參考가 되도록 하였다.

LH 細胞의 數는 450倍의 高倍率顯微鏡下에서 100個 視野에 나타나는 모든 細胞를 計數한 總數로 表示하였고 그 中에서 去勢細胞(castration cell)와 正常細胞(normal cell)의 두 type 을 鑑別計數하였다.

體重, 腦下垂體의 重量等은 計數를 統計處理하였으며 觀察은 誤差를 最少限으로 줄이기 爲해 熟練된 同一人에 依해 모든 切片을 觀察計數토록 하였다.

成 績

1. 體重的 變化

去勢群의 平均體重은 去勢後 150日에는 305.0gm 으로서 去勢前에 比해 151.0gm의 增加를 보였으며 去勢 및 投藥群은 去勢前平均體重 150.8gm에서 150日間에 161.2gm이 增加한 312.0gm을 보여준 反面 對照群은 150日間에 平均體重大이 230.8gm이 增加한 395.0gm으로

Table 3. Ratio of hypophyseal weight to body weight of rats

Days after castration	Castrated	Castrated & hormone treated	Control
7	6.03	5.80	5.49
14	5.74	5.61	4.98
30	4.84	4.15	3.43
60	3.91	3.44	3.15
90	3.83	2.96	2.93
120	4.14	2.69	2.86
150	4.00	2.63	2.68

나타났다(Table 1). 全般的인 體重增加의 變化를 볼때 去勢群과 去勢後投藥群은 對照群에 比해 若干 낮았으며 去勢한 두 群 사이에는 別差異가 없었다(Fig. 1).

2. 腦下垂體의 重量變化

去勢에 따른 腦下垂體의 重量變化는 各群間에 差異를 보이고 있다. 即 正常對照群에서는 第7日의 平均重量 9.6mg에서 第150日에는 1.0mg이 增加된 平均 10.6mg을 보여준데 比해 去勢群에서는 第7日의 9.8mg에서 第150日에는 2.4mg이 增加한 平均重量 12.2mg을 나타내고 있었으며 去勢後 投藥群에서는 第7日의 9.5mg에서, 第150日에는 1.3mg이 減少된 平均 8.2mg을 나타냈다(Table 2). 去勢群의 腦下垂體重量增加는 第60日 부터 더욱 顯著하였으며 去勢後投藥群은 第14日까지는 增加되다가 그後로는 繼續 減少되는 傾向을 보이고 있다(Fig. 2).

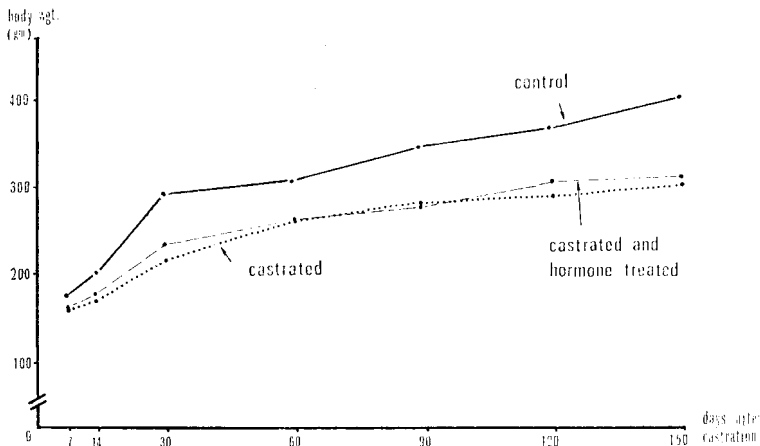


Fig. 1. Changes of body weight of rats after castration

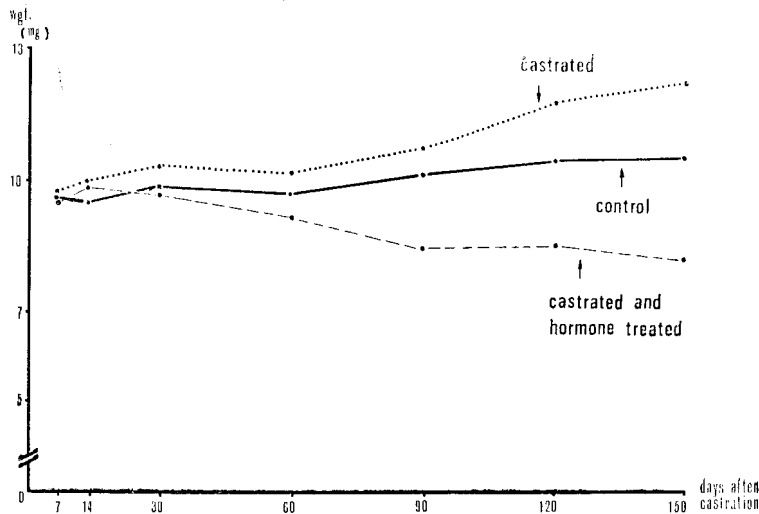


Fig. 2. Changes of hypophyseal weight of rats after castration

腦下垂體重量의 體重에 對比한 率은 去勢後投藥群과 對照群에서는 各各 5.80(第7日)에서 2.63(第150日) 및 5.49(第7日)에서 2.68(第150日)로 變化하여 體重的 增加에 따른 腦下垂體의 重量增加가 併行하지 못하고 있음을 보여주었으나 去勢群에서는 6.03(第7日)에서 4.00(第150日)으로 變化하여 腦下垂體重量이 體重增加率에 亦是 미치지 못하고 있지만 前記한 두 群의 境遇보다는 去勢直後와 去勢後 時間經過에 다른 對比에 差異가 적음을 보여주었다(Table 3).

3. LH細胞의 變化

去勢後 第7日: 第I群의 計數한 總細胞數는 4,985였으며 이中 大部分의 細胞(99.5%)가 正常形이었고 23細胞(0.5%)만이 空胞를 가진 細胞였다. 그러나 이 空胞를 가진 去勢細胞와 같은 細胞들은 正常對照群에서도 0.1~0.3%가 나타났음을 堪案할때 去勢群에 나타

난 것이 去勢細胞라고 하기는 어렵다. 第II群에서도 總細胞數 4,551中 正常形은 99.5%에 該當하는 4,531이었으며 空胞를 가진 것은 0.5%(20細胞)로서 第III群의 正常形 99.8%(3,937細胞), 空胞形 0.2%(8細胞)와 더불어 第I群과 거의 差異가 없었다(Table 4 및 5, Fig. 3 및 4).

去勢後 第14日: 第I群의 細胞總數가 5,459로서 第II群의 5,333, 第III群의 4,090과 比較할때 第I, II群에서는 第III群의 細胞數보다 若干 많음을 보여 주었으나 正常形 및 空胞形의 比率은 第I群만이 99.3% 對 0.7%이고 나머지 두群은 99.7% 對 0.3%이었다.

去勢後 第30日: 3個의 實驗群들이 各各 顯著한 差異를 보이기 始作한 時期로서 第I群에서는 總數가 6,329細胞로 늘어났음에 反해 第II群에서는 2,893細胞로 오히려 줄어들기 시작하였고 第III群에서는 4,726細胞로서

Table 4. Changes of LH cell of rats after castration (Number of cells/100 high power visual fields)

Days after castration	Castrated			Castr. & horm. tr.			Control		
	Total	Normal cells	Castr. cells	Total	Normal cells	Castr. cells	Total	Normal cells	Castr. cells*
7	4,985	4,962	23	4,551	4,531	20	3,945	3,937	8
14	5,459	5,421	38	5,333	5,318	15	4,090	4,078	12
30	6,329	6,263	66	2,893	2,881	12	4,726	4,719	7
60	6,974	6,303	671	1,916	1,908	8	4,958	4,943	15
90	7,759	6,171	1,588	1,798	1,798	0	4,568	4,560	8
120	9,440	6,962	2,478	1,325	1,325	0	3,974	3,969	5
150	8,726	6,109	2,617	1,296	1,296	0	3,684	3,672	12

*Not real castration cells but cells resembling castration cells.

Table 5. Changes in percentage of normal and castration cells of rats

Days after castration	Castrated			Cast. & horm. tr.			Control		
	Total	Normal cells	Castr. cells	Total	Normal cells	Castr. cells	Total	Normal cells	Castr. cells
7	100*	99.5	0.5	100	99.5	0.5	100	99.8	0.2
14	100	99.3	0.7	100	99.7	0.3	100	99.7	0.4
30	100	99.0	1.0	100	99.6	0.4	100	99.9	0.1
60	100	90.4	9.6	100	99.6	0.4	100	99.7	0.3
90	100	79.5	20.5	100	100.0	0.0	100	99.8	0.2
120	100	73.8	26.2	100	100.0	0.0	100	99.9	0.1
150	100	70.0	30.0	100	100.0	0.0	100	99.7	0.3

*Percent.

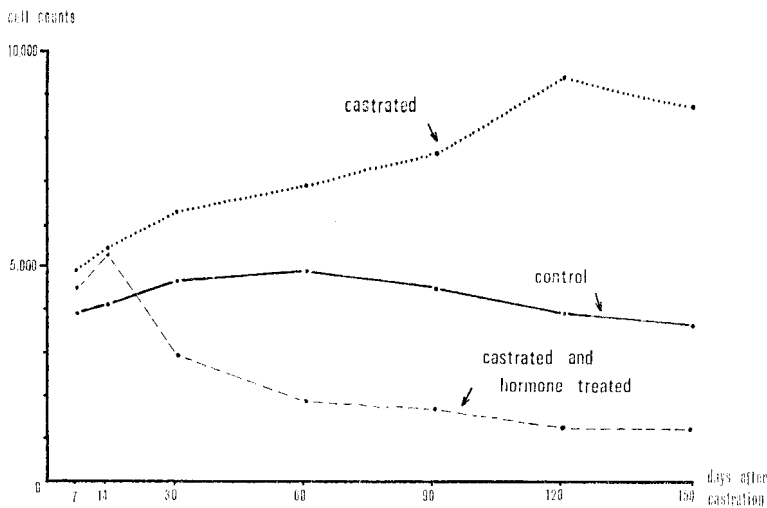


Fig. 3. Changes of LH cell counts (Castrated rats have a tendency to increase while hormone treated castrated rats showed gradual decrease in comparison with control rats)

第7日, 第14日에 비해 별變動이 없었다. 正常形 및 空胞形의 比率도 第Ⅰ群에서는 99.0% 對 1.0%로서 第Ⅱ群의 99.6% 對 0.4% 및 第Ⅲ群의 99.9% 對 0.1%에 比할때 空胞形細胞의 뚜렷한 增加를 보여 비로서 去勢細胞의 出現을 認定할만큼 變化되었다. 第Ⅰ群에서 LH細胞가 主로 中心部에 새로이 보이기 시작하는 것도 이 時期였다.

去勢後 第60日: 第Ⅰ群에서 總細胞數는 6,974細胞가 計數되었고 그中 正常形이 6,303細胞, 去勢細胞가 671細胞로서 比率는 90.4% 對 9.6%였으며 全體細胞의 數的인 增加와 去勢細胞의 比率의 增加가 顯著하였다 (Fig. 5-④). 한편 第Ⅱ群의 細胞數는 더욱 減少되어 1,916細胞였으나 空胞形이 0.4%(8細胞), 正常形이 99.6%로 그 比率는 第30日과 비슷하였다. 第Ⅲ群(對照群)의 總數는 4,958細胞였고 正常形對 空胞形의 比率도 99.7%

對 0.3%로서 第7日에서 第60日에 이르기까지 큰 變動이 없었다.

去勢後 第90日: 第Ⅰ群에서 總細胞數의 增加는 7,759細胞로 늘어났고 그中 正常形이 6,171細胞(79.5%), 去勢細胞形이 1,588細胞로 20.5%를 차지해 去勢細胞의 增加率이 가장 높은 時期임을 보여주었다. 第Ⅱ群에서는 數的인 減少는 多少 鈍化되어 總數가 1,798細胞로 計數되었으나 空胞形은 전혀 觀察되지 않았다. 正常形의 細胞도 그것이 空胞가 없을 따름이고 形態面에서도 一見하여 크기가 줄어든것 같으며 染色反應은 第60日以後 매우 弱化되었다(Fig. 5-⑤). 第Ⅲ群에서는 如前히 큰 變化가 없었다.

去勢後 第120日: 第Ⅰ群에서 總細胞數는 9,440細胞로 計數되었고 그中 6,962細胞가 正常形(73.8%), 2,478細胞가 去勢細胞形(26.2%)이었다. 去勢細胞의 모양과 分

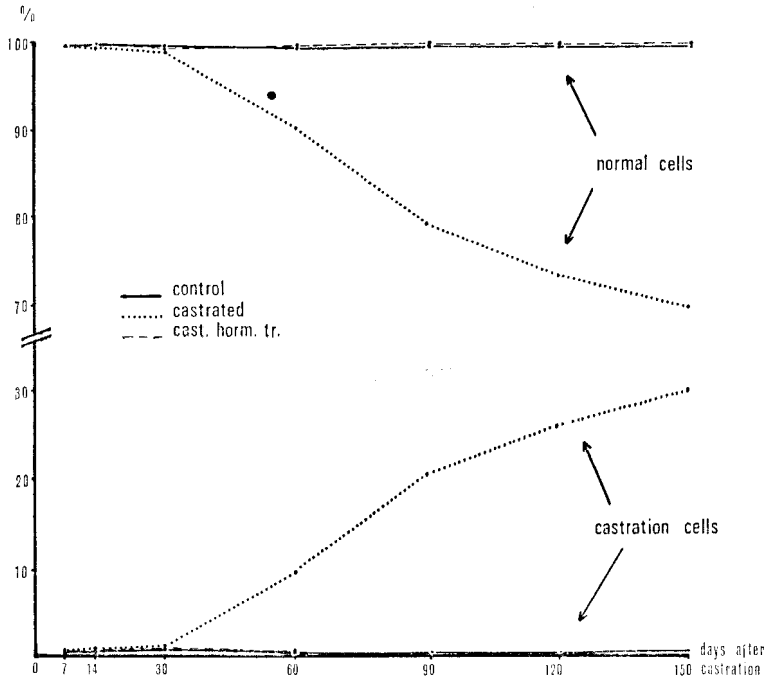


Fig. 4. Changes in percentage of LH cells (Castration cells begin to appear at 30 days in castrated rats while the other groups remain constant)

泌顆粒의 染色反應程度에는 特記할 만한 關聯性이 없었고 正常形의 細胞中에서도 오히려 보다 진하게 染色된 顆粒을 가진 細胞와 같은 크기에서도 좀 흐리게 染色된 顆粒의 細胞가 있었다. 이러한 差異는 正常對照群이나 第Ⅰ群의 去勢後 初期에서도 共通의으로 觀察된 것이며 아마도 各細胞의 分泌物放出時期의 差異에서 온 것으로 보인다(Fig. 6-③). 第Ⅱ群에서는 總數 1,325細胞였고 對照群에서는 總數 3,974細胞였다.

去勢後 第150日: 總細胞數가 第Ⅰ群에서는 8,726細胞 第Ⅱ群에서는 1,296細胞, 第Ⅲ群에서는 3,684細胞가 計數되었다. 其中 去勢細胞가 第一群에서는 30%나 되는 2,617細胞였고(Fig. 6-④), 第Ⅱ群에서는 第90日以後 全히 觀察되지 않았으며 第Ⅲ群에서는 0.3%를 나타냈다. 第Ⅰ群의 去勢細胞는 細胞質의 거의 全部가 空胞로써 메꾸어져 있었으며 細胞의 周邊 特히 核이 있는 部位에 多少 分泌顆粒이 모여 있었을 뿐이며 典型的인 Signet ring cell의 모양을 보여 주었다.

考 察

去勢한 흰쥐의 腦下垂體의 組織切片에서 正常細胞의 모양과는 다른 커다란 細胞가 나타남을 最初로 觀察한 것은 Zacherl(1913)이었으나 그는 이것을 acidophils가 變形된 것으로 잘못 解釋하였다. 그後 Schleidt(1914)

는 去勢에 따라 나타나는 空胞를 가진 이들 細胞를 Signet ring cell이란 名稱으로 처음 呼稱하였으나 이것이 basophils가 커진 細胞임을 發表한 것은 Addison(1917)에 의한 業績이 最初이었고 그後 여러 사람에 의해 그 事實은 確證이 되었다. 去勢細胞에 나타나는 分泌顆粒이 化學的으로 glycoprotein임을 그보다 훨씬 後인 1949년에 Catchpole에 의해 밝혀졌다.

Hellbaum等(1940)은 去勢後 4週의 腦下垂體의 組織學的變化와 gonadotropic potency의 檢定을 併行한 實驗에서 去勢後 15日頃부터의 腦下垂體는 卵巢에 黃體形成을 시킬수 있는 能力(luteinizing potency)이 있었고 그後 約 9個月間은 腦下垂體를 摘出した 암흰쥐의 卵巢에 黃體形成을 繼續시킬수 있었으나 그以後로는 黃體形成能力은 떨어져 卵胞刺激能力(follicle stimulating potency)만이 남았음을 報告하면서 腦下垂體의 周邊部의 細胞들은 主로 FSH의 分泌와 關聯이 깊으며 內部 即 中心部의 細胞들은 主로 LH의 分泌와 깊은 關聯性을 가지고 있다고 結論을 지었다.

Purves等(1955)은 비슷한 實驗結果에서 Hellbaum의 報告를 認定하면서 去勢後 腦下垂體前葉에 나타난 많은 數의 basophils는 周邊部의 細胞와 中心部의 細胞들의 두 型으로 나눌수가 있고 去勢에 따라 細胞의 密度가 달라지는 것이 gonadotropic potency와 併行됨을 指摘

하면서 亦是 周邊部의 FSH 細胞, 中心部의 LH 細胞說 (Purves 等 1951, 1954)을 支持하였다.

한편 Yoshimura 等(1965)은 去勢한 컷 흰쥐의 腦下垂體에서 電子顯微鏡學的 觀察報告를 한 後 1968年 (Ishikawa 等)에는 亦是 去勢한 컷 흰쥐 腦下垂體에서 gonadotroph 와 thyrotroph 를 鑑別計數한 結果 gonadotroph 는 徐徐히 그 數가 增加되었고 한편 thyrotroph 는 反對로 그 數가 漸次 減少되어 가고 있음을 指摘하며 減少된 thyrotroph 가 gonadotroph 로 變形, 轉換된 것이 아닌가 하는 暗示를 준다고 結論하였으며 兩者가 根本的으로는 獨立된 다른 種類의 細胞가 아닐 것이라 함을 主張하였고 다시 Yoshimura 等(1969)은 甲狀腺을 摘出した 흰쥐 腦下垂體에서 thyroidectomy cell 이 增加하는 한편 gonadotroph 가 처음에는 減少하다가 摘出後 120日 乃至 300日頃에는 未熟한 gonadotroph 가 增加함을 指摘하면서 長期間에 걸친 甲狀腺摘出 狀態에서는 thyrotroph 가 gonadotroph 로 變形되어 가는 것으로 보아 TSH 分泌細胞와 LH 分泌細胞는 根本的으로는 同一型에 屬하지 않나 하는 說을 主張하고 있다.

以上の 모든 結果들을 綜合해 볼때 性腺의 摘出이 腦下垂體의 basophils 의 數를 增加시키는 것은 共通的인 見解로 提示되었으나 그들이 適用한 染色反應이 한결같이 PAS(periodic acid Schiff)反應, Mallory 의 三重染色 또는 通常的인 H-E 染色이란 點에서 가장 類似性이 많은 LH 와 FSH 의 識別은 많은 組織化學的 染色反應(Wilson 等 1954, Adams 等 1958, Swettenham 1960, Pearse 等 1963, Swoye 等 1970)으로도 認定하기 어려우며 더우기 Yoshimura 等의 TSH 細胞와 LH 細胞의 同一型說은 理解하기 어려운 點이 많다.

本實驗에서 使用한 免疫組織化學的 染色反應(Nakane 等 1966, 1967)은 그러한 短點을 補完할 수 있는 매우 높은 特異性을 지닌 方法으로서(Baker, 1970) 免疫學的인 抗原·抗體의 特異的인 結合理論을 그 基礎로 하고 있어 腦下垂體前葉細胞의 分類(Nakane 1970)뿐 아니라 同一切片上에서 두 種類의 다른 細胞들을 同時에 特異的으로 染色할 수 있음이 證明되고 있다(Nakane, 1968). 여기에서 使用된 第一抗體는 組織切片上에 固定으로서 保存된 抗原 即 LH 顆粒과 特異的으로 交叉反應을 할수 있는(Midgley 等 1961, Midgley 1963, 1966, Monroe 等 1966, Baik 等 1969) anti-HCG 를 使用하였고 第二抗體로는 이 토끼血清과 特異的結合을 할수 있는 sheep anti-RGG 에 horseradish peroxidase 를 標識한 것을 使用하였다. 이들 抗體는 各各 1:50, 1:25의 稀釋液으로도 充分히 免疫學的結合能力을 가지고 있음은 이

미 報告한바 있다(Baik 等 1969, Rha 等 1970, Shim 等 1970).

去勢한 實驗群의 體重增加가 正常群에 비해 多少 抑制되어 있음은 去勢手術을 받는데 起因되는것이 아닌가 볼수 있으며 다른 報告들(Ishikawa, 1968)의 境遇와도 큰 差異가 있는것 같았다. 腦下垂體 重量의 變化는 第 I, II, III 群이 모두 달랐음을 보여 주었는데 第 I 群의 境遇 LH 細胞 아닌 其他 細胞들의 計數를 하지 않아 斷言하기는 어려우나 LH 細胞의 增加와 함께 全體重量의 增加가 있음은 其他 腺組織의 代價的인 增殖이 있지 않았나하는 것을 暗示해 주고 있다. 第 II 群 即 去勢後 過剩量의 testosterone 을 投與한 흰쥐들의 腦下垂體는 全般的으로 時間이 지남에 따라 重量이 減少한 것은 第 I 群의 境遇와는 反對로 血中の 過剩 testosterone 濃度때문에 LRF(LH releasing factor)가 減少되고 따라서 腦下垂體에서는 LH 細胞가 漸次 그 數도 줄고 分泌顆粒의 濃度も 흐려져 있다는 事實과 testosterone 의 投與效果가 있기 以前인 去勢後 第14日까지는 第 I 群과 마찬가지로 增加하고 있었다는 事實로 미루어 當然한 結果가 아닌가 생각된다.

去勢한 第 I 群의 腦下垂體에서 所謂 去勢細胞(castration cell)가 顯著히 增加하기 始作하는 第30日은 Hellbaum 等(1940) 및 Purves 等(1955)이 觀察한 第56日에 比해서는 이르지만 Ishikawa 等(1968)의 第15日보다는 늦은 것이다. 이러한 差異는 多分히 使用된 動物들의 去勢當時의 年齡에 關係되는것이 아닌가 하는것이 그 첫째이고 둘째로는 正常的인 飼育을 받은 對照群에서도 나타나는 恰似 去勢細胞와 같은 모양의 空胞를 지닌 細胞들을 考慮에 넣지 않은데서 오는 差異가 아닌가 보여진다. 去勢細胞數의 增加해가는 率은 거의 均等하였으며 第150日에 이르기까지 比較的 直線的인 增加氣勢를 보였다.

前述한 報告者들이 指摘한 中心部의 LH 細胞, 周邊部의 FSH 細胞는 本實驗에서의 結果로는 若干 相異한 見解를 가지게 된다. 即 去勢初期에 또는 正常對照群에서는 周邊부에 LH 細胞가 많이 密集되어 있었고 그後 去勢後 時間이 지남에 따라 周邊部の 細胞數는 勿論 中心部에도 많이 나타나기 시작한 것으로 미루어 보아 LH 細胞의 增殖이 일어나는 것은 全般的인 部位에 걸치는 것이라기 보다는 中心部에서 오히려 더욱 늘어나고 있다는 點에서는 同一한 結果이지만 周邊部の 細胞들은 FSH 型의 細胞일 것이라는 主張이나 그들이 中心部의 LH 細胞의 增加에 따라 減少되어가고 있다는 主張은 크게 다른 點이라고 할수 있으며 이것은 아마도 두 種類

의 gonadotroph 卽 LH 細胞와 FSH 細胞가 그들이 施行한 組織化學反應으로는 識別하기 어려웠을 것이라는 데서 온 差異일것으로 解釋된다.

結 論

成熟한 수 阉 割을 去勢한 後 第7日에서 第150日에 이르기까지 여러 時期에 腦下垂體를 摘出하여 腦下垂體重量, 體重과의 對比를 算出하고 酵素標識抗體法을 適用하여 特異적으로 LH 細胞를 染色한 組織切片上에서 LH 細胞數 및 正常形과 空胞形의 鑑別計數를 하였다. 實驗結果 다음과 같은 結論을 얻었으며 그 意義를 考察하였다.

1. LH 細胞의 絕對數 및 腦下垂體의 重量은 去勢後 漸次 增加한다.

2. 所謂 去勢細胞는 去勢後 第30日에서부터 出現되기 시작하여 第60日에서 第90日 사이에 가장 顯著하게 增加한다.

3. 去勢後 過剩量의 testosterone 을 投與한 實驗群의 腦下垂體에서 重量 및 LH 細胞數는 漸次 減少되며 分泌顆粒의 染色性도 弱화된다.

4. LH 細胞는 腦下垂體의 周邊部에 주로 位置하고 있으며 去勢後 增加는 주로 中心部에서 일어난다.

ABSTRACT

Immunohistochemical studies on the LH cells of pituitary glands in castrated male rats

Jae Do Shim, M. D. and Sang Ho Baik, M. D.

Dept. of Anatomy, College of Medicine,
Seoul National University

Pituitary glands of male rats, castrated for varying lengths of time, between 7 and 150 days after operation, have been studied for their histological changes using the peroxidase-labeled antibody method.

Number of LH cells reacted specifically with anti-HCG and anti-RGG-peroxidase were counted from one hundred visual fields of twenty representative level of sections under higher magnification. There was a tendency that the LH cells increase gradually after castration. At the thirty days after castration, castration cells with vacuole begin to appear and reached up to 30% of total cell count at the 150 days after castration. On the other hand the pituitary

glands of castrated rats which were administered testosterone propionate and testosterone cyclopentylpropionate showed marked decrease of LH cells not only in number but in the intensity of staining.

Proliferation of additional LH cells were found mainly in the central zone of pituitary gland, while the LH cells in the peripheral zone remained continuously.

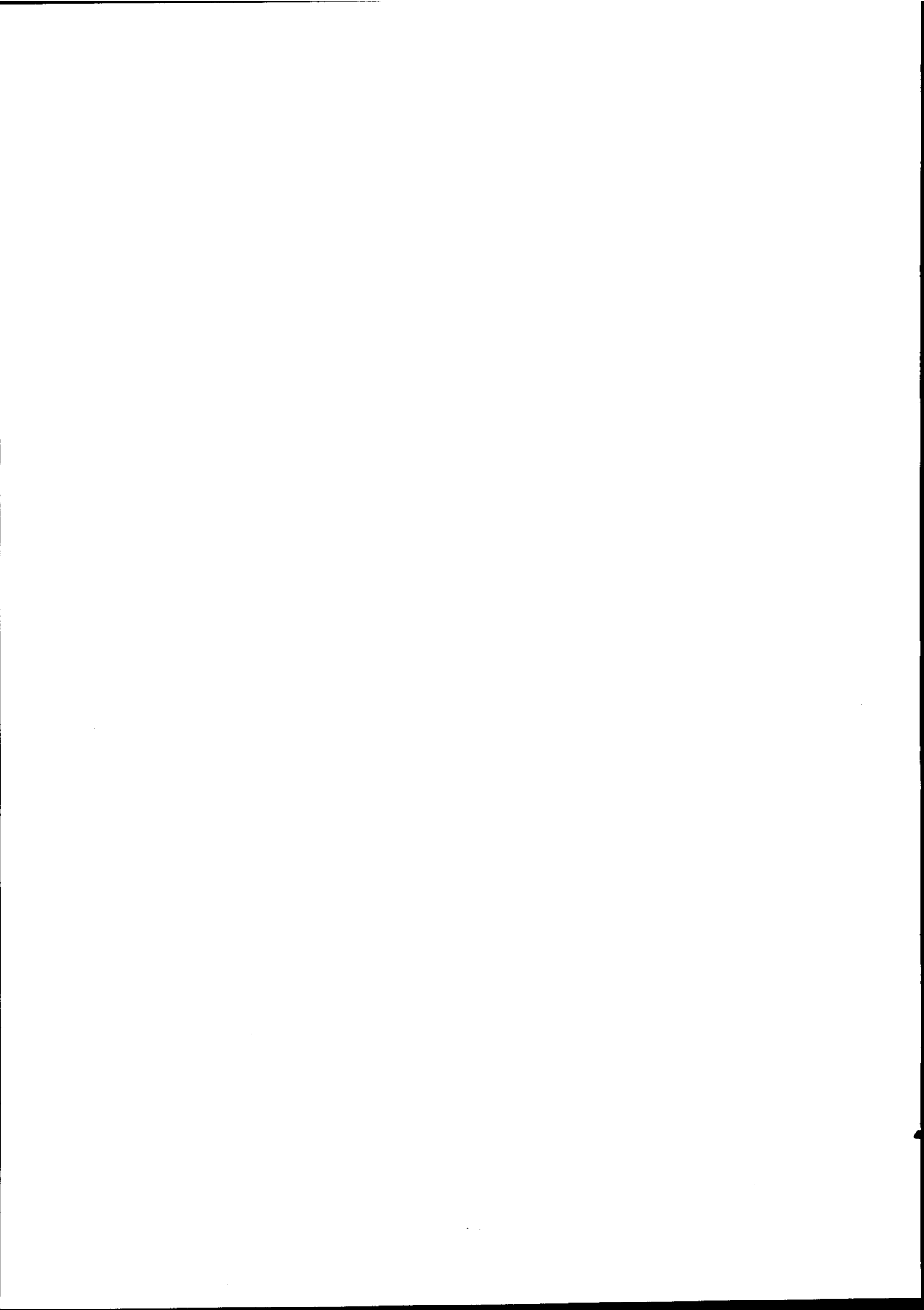
The weight of pituitary glands of castrated rats revealed a tendency of gradual increase while that of the hormone treated castrated rats showed a tendency of gradual decrease.

Those cellular changes are illustrated and their possible significance is discussed.

REFERENCES

- 1) Adams, C. W. M. and Swettenham, K. V.: *The histochemical identification of two types of basophil cell in the normal human adenohypophysis. J. Path. Bact.*, 75:95, 1958.
- 2) Addison, W. H. F.: *J. Comp. Neurol.*, 28:441, 1971. Quoted from Purves(1955).
- 3) Baik, S. H., Lee, K. H., Rha, B. J., Kang J. B. and Chung, B. S.: *Immunohistochemical localization of LH and FSH in the rat pituitary gland. Kor. J. Anat.*, 2:61, 1969.
- 4) Baker, B. L.: *Studies on hormone localization with emphasis on the hypophysis. J. Histochem. Cytochem.*, 18:1, 1970.
- 5) Catchpole, H. R.: *J. Endocrinol.*, 6:218, 1949. Quoted from Purves (1955).
- 6) Farquhar, M. G. and Rinehart, J. F.: *Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrated rats. Endocrinology.* 54:516, 1954.
- 7) Hellbaum, A. A. and Greep, R. O.: *Am. J. Anat.*, 67:287, 1940. Quoted from Purves(1955).
- 8) Ischikawa, H. and Totsuka, S.: *Histological and histometrical studies on the adenohypophyseal cells in castrated male rats, with special emphasis on a contradiction of classifying the gonadotroph and the thyrotroph. Endocrinol. Japon.*, 15:457, 1968.
- 9) Midgley, A. R. Jr., Pierce, G. B. Jr. and Weigle, W. O.: *Immunobiological identification of human chorionic gonadotropin. Proc. Soc. Biol. & Med.*, 108:85, 1961.
- 10) Midgley, A. R. Jr.: *Immunofluorescent locali-*

- zation of human pituitary luteinizing hormone. *Exp. Cell Res.*, 32:606, 1963.
- 11) Midgley, A.R. Jr. : *Human pituitary luteinizing hormone: an immunohistochemical study. J. Histochem. Cytochem.*, 14:159, 1966.
 - 12) Monroe, S.E. and Midgley, A.R. Jr. : *Localization of luteinizing hormone in the rat pituitary gland by a cross-reaction with antibodies to human chorionic gonadotropin. Fed. Proc.*, 25: 315, 1966.
 - 13) Nakane, P.K. and Pierce, G.B. Jr. : *Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem. Cytochem.*, 14:929, 1966.
 - 14) Nakane, P.K. and Pierce, G.B. Jr. : *Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens., J. Cell Biol.*, 33:307, 1967.
 - 15) Nakane, P. K. : *Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat. J. Histochem. Cytochem.* 16: 557, 1968.
 - 16) Nakane, P.K. : *Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. J. Histochem. Cytochem.* 18:9, 1970.
 - 17) Pearse, A.G.E. and van Noorden, S. : *The functional cytology of the human adenohypophysis. Canad. Med. Ass. J.*, 88:462, 1963.
 - 18) 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.
 - 19) Purves, H.D. and Griesbach, W.E. : *The site of follicle stimulating and luteinizing hormone production in the rat pituitary. Endocrinology.* 55: 785, 1954.
 - 20) Purves, H. D. and Griesbach, W.E. : *Changes in the gonadotrophs of the rat pituitary after gonadectomy. Endocrinology.* 56:374, 1955.
 - 21) Rha, B. J., Lee, K. H., Chung, B. S. and Baik, S. H. : *Standardization of enzyme-labeled antibody method. New Med. J.*, 13:497, 1970.
 - 22) Schleidt, J. : *Zentralbl. Physiol.*, 27:1170, 1914. Quoted from Purves(1955).
 - 23) Shim, J. D., Lee, H. S. and Baik, S. H. : *Immunohistochemical staining of human chorionic gonadotropin in the placenta. Kor. J. Anat.*, 3:23, 1970.
 - 24) Swettenham, K. : *The buffered performic acid-alcian blue-periodic acid Schiff method for the differentiation of basophils in the human and rat pituitary. J. Clin. Pathol.*, 13:256, 1960.
 - 25) Swope, A.E., Kahn, R.H. and Conklin, J.L. : *A comparison of alcian blue aldehyde fuchsin and peroxidase-labeled antibody staining techniques in the rat adenohypophysis. J. Histochem. Cytochem.*, 18:450, 1970
 - 26) Wilson, W. D. and Ezrin, C. : *Three types of chromophil cells of the adenohypophysis (demonstrated by a modification of the PAS technique). Am. J. Pathol.*, 30:891, 1954.
 - 27) Yoshimura, F. and Harumiya, K. : *Electron microscopy of the anterior lobe of pituitary in normal and castrated rats. Endocrinol. Japon.*, 12:119, 1965.
 - 28) Yoshimura, F. and Ischikawa, H. : *Identification of the thyrotrophs with the gonadotrophs in the anterior pituitaries of thyroidectomized rats. Endocrinol. Japon.*, 16:69, 1969,
 - 29) Zacherl, H. : Quoted from Purves (1955).



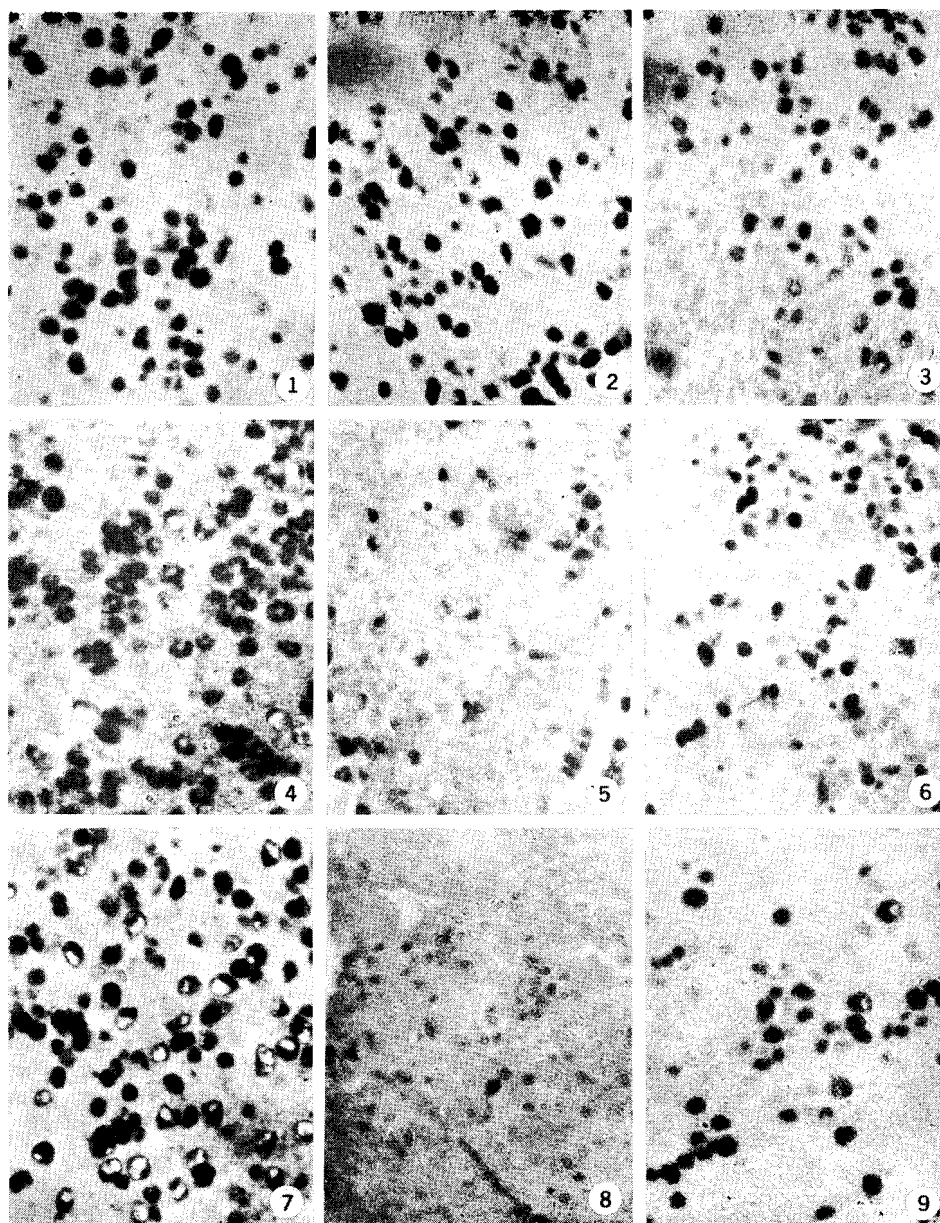


Fig. 5. Photomicrographs of pituitary anterior stained with anti-HCG and anti-RGG-peroxidase. ($\times 100$)

- | | | |
|-----------------------------|--|--------------------|
| ① 7 days after castration | ② 7 days after castration | ③ 7 days control |
| ④ 60 days after castration | ⑤ 60 days after castration, hormone treated | ⑥ 60 days control |
| ⑦ 120 days after castration | ⑧ 120 days after castration, hormone treated | ⑨ 120 days control |

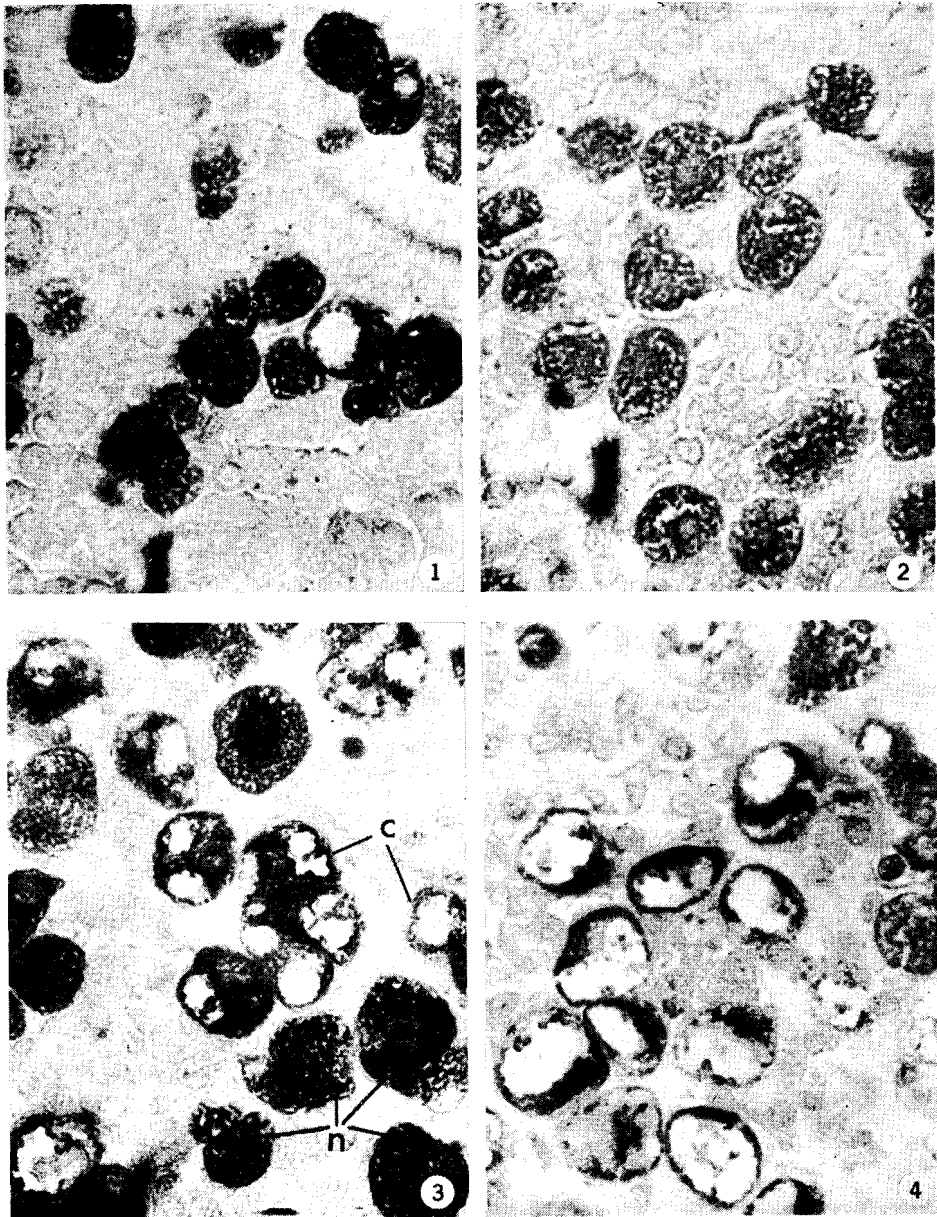


Fig. 6. Photomicrographs of rat LH cells of adenohypophysis stained with anti-HCG and anti-RGG-peroxidase. ($\times 450$)

- ① 7 days after castration
 - ② 30 days after castration
 - ③ 120 days after castration
 - ④ 150 days after castration
- (c: castration cell, n: normal type of cell)