

人蔘 Saponin이 Prolactin 分泌에 미치는 效果

白 德 禹 · 李 叙 潤 · 池 亨 浚
國立保健研究院 藥品部 · 圓光大學校 藥學大學 · 서울大學校 生藥研究所

The Effects of Ginseng Saponin on Prolactin Secretion in Rats

Duck Woo BAIK, Soe Yun LEE and Hyung Joon CHI
National Institute of Health, Wonkwang University and Seoul National University

The present study is involved with the prolactin secretion from anterior pituitary gland by ginseng saponin since it was handled down by tradition that ginseng might influence the milk secretion when it was given to nursing mother. To investigate the effect of saponin on the prolactin production or release from the anterior pituitary gland, cell culture study and whole animal studies were carried out. For the cell culture study, enzymatically dispersed anterior pituitary cells of rat anterior pituitary gland in HEPES buffers containing trypsin were used. Ginseng saponin was added to the culture media and the amount of prolactin produced in the cell culture media was determined by radioimmunoassay(RIA) technique. Dose-dependent increases of prolactin with ginseng saponin were observed, whereas, no change was observed without ginseng treatment. For the whole animal study, normal and castrated rats which previously cannulated into the heart via the right juglar vein were used. The prolactin concentration in plasma were determined by using the technique of RIA. In normal rats, prolactin concentration in plasma were elevated dramatically after 1 hour of ginseng saponin administration, whereas, instantaneous increases were observed in castrated rats. For prolactin assay by RIA, NIAMDD Rat Prolactin Kit and NIAMDD Rat Prolactin RP-1 were used as standard. The results indicate that ginseng saponins increase the release of prolactin from the anterior pituitary gland and production of prolactin from the cell in rats.

서 론

人蔘은 古來로 漢醫書에 記載되어 健康增進과 各種 疾病의 治療目的으로 單一 또는 複合劑製로 供用되고 있는 生藥이다.

人蔘을 授乳婦에게 投與하면 乳汁分泌에 影響을 미친다고 傳來되고 있으며, 漢醫書의 人蔘効用項에도 內分泌器官과 關聯지을 수 있는 文句가 있다.

人蔘은 各種 漢醫書에^{1,2)} 主治에 對하여 「補五臟……補元氣 調榮衛 止渴生津液……」等の 記載

가 있어 漢醫學의인 症과 現代醫學의인 症侯를 直接的으로 結付시키기는 困難하나 臟器 또는 內分泌器管에 人蔘이 어떠한 生理活性을 가질 可能性은 排除할 수 없다.

또한 「……少陰人の 產母가 服用하면 乳汁이 많이 分泌되나 萬一 少陽人の 產母가 服用하면 乳汁의 分泌가 減少된다」고 叙述하고 있는 點으로 보아 人蔘은 授乳婦에 對하여 乳汁生成 및 乳汁射出에 어떠한 作用이 있을 것이라 推定할 수 있다.

人蔘成分의 藥理學的³⁾ 및 生理學的研究⁴⁾는 各種溶媒에 依한 分劃과 各種成分의 純品을 供用하여 物質代謝, 血液, 組織, 器官 및 生體抵抗機能에 미치는 影響等을 實驗하고 있으며 이들 中 內分泌器官에 關한 研究는 畢丸에 있어서 DNA 및 蛋白生成에 關與하는 酵素에 對한 實驗과 副腎組織의 DNA는 人蔘投與로 顯著히 增加된다는 報告가 있을 뿐이다⁵⁻⁸⁾.

著者는 人蔘의 主成分인 saponin이 乳腺發育과 乳汁分泌에 直接的으로 作用하는 prolactin生成에 미치는 效果를 內分泌學的으로 究明하기 위하여 *in vitro*에서 白鼠의 腦下垂體前葉細胞를 Dulbecco modified Eagles medium(DMEM)에서 細胞培養하여 各種濃度의 人蔘 saponin溶液을 投與하여 細胞培養液中에 生成遊離되는 prolactin量을 radioimmunoassay에 依하여 比較測定하였으며 또한 人蔘 saponin이 *in vitro*에서 乳汁分泌에 關與하는 各種 hormone 共存時에 prolactin의 生成遊離에 미치는 影響을 檢討하였다.

실험재료 및 방법

I. 人蔘 Saponin의 製造

錦山産 白蔘을 粗末로 하여 生藥 1g에 對하여 10ml의 methanol을 써서 數時間씩 3回 溫浸한 抽出液을 合하여 減壓濃縮하였다. 濃縮液을 다시 生藥試料 1g에 對하여 10ml의 常水에 溶解시킨後 同量의 ethylether로 1回 振盪抽出하여 脂溶性物質을 除去하고 여기에 同量의 水胞和 *n*-butanol을 써서 3回 振盪抽出하였다. *n*-Butanol

抽出液을 合하여 減壓濃縮한 殘渣를 總 saponin으로 하여 試料로 하였다⁹⁾.

II. 腦下垂體前葉細胞培養에 依한 Prolactin의 生成

腦下垂體前葉細胞의 調製: 體重 200~250g의 雄性白鼠를 斷頭即時 腦下垂體前葉을 摘出하여 4等分하고 HEPES buffer로 數回 洗滌한다음 3% BSA와 0.45% trypsin을 含有한 HEPES buffer 10ml가 들어 있는 50ml의 teflon beaker에 넣은後 回轉數 100rpm으로 攪拌하여 가면서 37°C에서 45分間 培養하였다. 培養後 siliconized 된 pasteur pipette로 plastic製 遠心分離管에 옮겨서 2分間 遠心分離하여 上澄液을 버리고 다시 0.25% trypsin을 含有한 HEPES buffer 10ml에 다시 浮游시켜서 15~30分間 同一條件에서 2次 培養을 하였다.

培養終了後 浮游된 腦下垂體前葉細胞를 遠心分離하여 取하였다^{10,11)}.

腦下垂體細胞의 培養: 遠心分離하여 取한 腦下垂體前葉細胞를 10% horse serum, 2.5% fetal calf serum, 0.1mM glutamine, 1% Gibco neo-essential amino acids($\times 100$)을 含有한 3.0ml의 DMEM에 再浮游시켜서 遠心分離와 浮游操作을 6回 反復하여 洗滌한後 DMEM(plus serum) 3.0ml에 細胞數가 $1\sim 5 \times 10^5$ 個가 되도록 浮游液을 調製하였다^{10,11)}.

腦下垂體前葉細胞浮游液을 tissue culture dish (60 \times 15mm, Falcon Plastics, #3002)에 各各 3.0ml씩 注加하고 培養器는 water jacketed incubator內에서 水分을 飽和시킨 炭酸 gas 10%, 空氣 90% 比率의 氣流를 通해주면서 37°C에서 3日間 靜置培養하였다^{10,11)}.

腦下垂體前葉細胞의 Prolactin分泌實驗: 細胞培養後 3日이 되면 培養前에 球形이었던 細胞가 長橢圓形이 되며 大部分이 器底에 附着된다. DMEM으로 細胞를 3~4回洗滌하고 人蔘 saponin을 DMEM(without serum) 3.0ml에 對하여 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} g/ml濃度가 되도록 調製한 試料를 加하였다.

各種濃度の人蔘 saponin溶液에 對하여서 各各 5個의 培地를 使用하였다.

培養液中的 Prolactin 定量: 人蔘 saponin을 加한 培養器를 同一條件에서 約 4時間 培養한 후 1個의 培地液에서 100 μ l씩 3個의 試料를 分取하여 NIAMDD Rat Prolactin RIA Kit와 NIAMDD Rat Prolactin RP-1을 標準으로 하여 RIA에 依하여 prolactin含量을 測定하였다¹²⁻¹⁶.

Ⅲ. 白鼠血漿內 Prolactin의 濃度

實驗動物의 條件: 實驗 2~4週日前에 購入한 雄性白鼠(Sprague-Dawley rats)를 室溫 25°C \pm 1°C와 一定한 濕度를 維持하는 飼育室에서 1日의 照明時間을 14時間(6:00~20:00)으로 調節하고 purina飼料과 水道水를 給與하여 飼育하였다.

實驗動物의 去勢는 3週日前에 常法에 依하여 雄性白鼠의 睪丸을 切除後 結締 縫合하였다.

實驗動物의 去勢 및 estradiol 移植은 實驗 4週日前 常法에 따라 雄性白鼠의 睪丸을 除去하고 estradiol(Sigma Chemical Co.)을 約 70mg씩 silastic tube(0.062 inch. ID \times 0.125 inch OD, Dow Corning Corporation)에 充填하고 polymerizing elastomer(Dow Corning Corporation)으로 封한 길이 約 2cm의 capsule을 白鼠背面皮下에 插入後 縫合하였다.

實驗動物의 製作: 正常雄性白鼠 또는 前處置한 體重 300 \pm 30g의 白鼠에 pentobarbital, USP (Harer-Lockhary Lab.) 45mg/kg을 腹腔內에 注射하여 麻醉시키고 右頸靜脈을 露出하여 길이 15cm의 silastic tubing(0.015 inch ID \times 0.047 inch OD, Dow Corning Corporation)을 右頸靜脈을 通하여 右心房에 徐徐히 插入하였다. silastic tubing의 한쪽은 皮下隧道腔을 만들어 後部로 빼내어 頸筋肉에 縫合하여 固定시켰다. silastic tubing이 縫合部位에서 癒着되는 것을 防止하기 위하여 縫合部位는 polymerizing elastomer(Dow Corning Corporation)로 補強하였다. 插入된 silastic tubing에는 50 unit/ml heparin(Porcine intestinal mucosa, Grade II, Sigma Chemical Co.)이 含有된 生理食鹽水에 polyvinylpyrrolid-

one(PVP) K-90(Nutritional Biochemicals)가 10~15%되게 溶解한 粘稠液으로 充填하여 血液의 流出 및 凝固를 豫防하였다¹⁷.

Cannula를 插入한 動物은 한마리씩 分離하여 飼育箱子에서 1日 以上 飼育 管理하여 正常의 인 狀態에 到達된 것만을 實驗에 使用하였다.

藥物의 投與: 血液試料의 採取는 通常 午前10時부터 始作하였으며 藥物投與前 20~30分間에 걸쳐 10~15個의 試料를 採取한 後 人蔘 saponin 30mg/kg을 生理食鹽水에 溶解하여 cannula를 通하여 約 2分間에 걸쳐 徐徐히 注入하였다.

血液試料의 採取: 實驗 1日前に 動物을 試料 採取用 箱子(22cm \times 11cm \times 11cm)에 옮기고 이것을 one way observation glass를 裝置한 箱子에 넣어 白鼠가 周圍環境에 充分히 適應되도록 飼育 管理하였다.

實驗 1時間前에 cannula의 PVP溶液을 除去하고 500unit/ml heparin 生理食鹽水 1ml를 cannula를 通하여 心臟에 注入하고 silastic tubing의 끝을 polyethylene tubing(PE 60, Intramedia, 0.030 inch ID \times 0.048 inch OD, Clay Adams)으로 連結 延長하여 心臟의 搏出力과 落差를 利用하여 採血하였다. 血液試料는 每2分間隔으로 Microhematocrit capillary tube(Rad, Fisher Scientific Co.)에 約 70 μ l씩 採取하여 毛細管의 한쪽 끝을 Cristoseal(Sherwood Medical Industries)로 封하였다. 血液採取管의 總容量은 140~250 μ l이며 길이는 20~35cm이다¹⁸.

血漿內 Prolactin의 定量: 採血한 毛細管은 約 4°C의 冷凍室에서 Microhematocrit centrifuge (IEC Model ME)를 써서 10分間 11,500rpm으로 遠心分離하여 血漿과 血球를 分離하고 毛細管을 切斷하여 血漿만을 試料로 採取하였다.

血漿試料 1個에서 10 μ l씩 3個의 試料를 分取하여 NIAMDD Rat Prolactin RIA Kit와 NIAMDD Rat Prolactin RP-1을 基準으로 使用하여 RIA에 依하여 prolactin含量을 測定하였다.

Ⅳ. 放射線免疫分析法

Prolactin의 放射能 標識: NIAMDD에서 供給받은 prolactin vial(50 μ g)에 0.5M PBS (PH

7.5) 30 μ l를 加하여 均等히 溶解시키고 1mC에 該當하는 NaI¹²⁵를 取하여 滴加하고 chloramin T(3mg/ml, 0.05 M PBS, PH 7.5) 10 μ l를 加하여 正確히 2分間 反應시켰다. 2分間 反應後 sodium metabisulfite(2.5mg/ml, 0.05M PBS, PH 7.5) 50 μ l를 加하여 反應을 終結시키고 rinse solution 100 μ l로 反應液을 씻어 모아 미리 準備한 Sephadex G-75 column(10ml glass serological pipette, high Ca 10cm)에서 PBS-5% BSA (PH 7.0)으로 溶離하였다. 溶離液은 미리 PBS-5% BSA를 100 μ l씩 넣어둔 小試驗管에 各各 10滴씩 모아 各分劃을 Scintillation counter로 測定하여 specific activity가 강한 分劃만을 舍하고 PBS-1% BSA로 100,000cpm/100 μ l가 되게 稀釋하여 凍結 貯藏하였다.

放射能을 標識한 prolactin hormone은 分析操作時 25,000~35,000cpm/100 μ l가 되게 PBS-1% BSA로 稀釋하여 使用하였다¹⁹⁻²¹).

Prolactin의 測定操作: NIAMDD Rat Prolactin RP-1을 PBS-1% BSA로 稀釋하여 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0ng/100 μ l의 標準 prolactin溶液을 調製하여 凍結貯藏하였던것을 使用하였다. 小試驗管(10 \times 75mm)에 一連番號를 記入하고 試驗管臺에 꽂아 PBS-1% BSA를 No. 1~30까지는 各各 300 μ l씩 分注하고 No. 31로부터 끝까지는 400 μ l씩 分注하였다.

試驗管의 No. 4~6은 PBS-EDTA-NRS 100 μ l No. 7~9는 Rat Anti-prolactin PBS-EDTA-NRS 100 μ l씩을 Eppendorf pipett로 加하고 No. 10~30까지는 7種濃度의 標準 prolactin溶液을 1種의 標準液을 3個의 試驗管에 分注하였다. 試驗管 No. 31로부터 끝까지는 各血漿試料를 10 μ l씩 3個의 試驗管에 分劃하여 加하였다.

放射能을 標識한 prolactin hormone을 PBS-2% BSA로 25,000~35,000cpm/100 μ l가 되게 稀釋하여 No. 1로부터 끝까지 注加하고 Vortex Genie shaker로 充分히 攪拌하여 4°C에서 48時間 反應시켰다(第1段階反應).

第一段階反應이 끝난 後 Goat or Sheep anti-rabbit gamma globulin antiserum을 PBS-1% BSA로 되게 稀釋(B/F=50)한 것을 各各 100 μ l

씩 No. 4로부터 끝까지 加하고 48時間 4°C에서 反應시켰다(第2段階反應).

第1段階反應과 第2段階反應이 끝나면 生成된 抗原抗體結合物을 遠心分離하여 上澄液을 水流 pump로 操心스럽게 吸入 除去하며 器底에 附着된 沈澱物을 얻었다.

各 試驗管의 沈澱物을 順序的으로 Scintillation counter에 넣어 放射能을 測定하여 標準 prolactin의 測定으로 얻은 標準曲線에 따라 prolactin量을 換算하여 1個 血漿試料에 對한 3等分試料의 測定值를 平均한 數值를 取하였다^{19,22-26}).

실험결과 및 고찰

Prolactin은 直接的으로 乳房에 作用하여 乳汁分泌에 主要役割을 할 뿐만 아니라 黃體에 作用하여 progesterone을 遊離시키며, LH와 FSH에 依하여 卵胞에서 遊離된 estrogen과 腦下垂體前葉에서 生成된 ACTH, TSH, GH等과 協同的으로 作用하여 乳汁生成에 必須的인 役割을 하는 hormone이다^{27,28}).

Prolactin의 遊離는 運動, 外科的刺戟에 依하여 增加되며 局所的으로는 乳頭와 子宮에 刺戟을 加하므로써 增加된다.

또한 血漿內의 prolactin濃度는 睡眠中에 上昇되며 妊娠期間中은 非妊娠時보다 높고 특히 分娩直後에는 最高濃度에 達하였다가 約 1週日後에는 非妊娠期의 量으로 되돌아오며²⁹⁻³⁴), 正常人的 血漿內 prolactin濃度는 男女의 差異없이 5~10ng/ml이나 女性이 男性보다 若干 높다고도 한다³³⁻³⁵).

Pasteels等에³⁶⁻³⁹) 依하면 腦下垂體前葉을 *in vitro*에서 培養하였을 때 prolactin은 數週間에 걸쳐 生成이 持續되나 餘他 hormone들은 數日內에 그 生成이 消失된다고 報告하고 있으며, 또한 prolactin은 trypsin에 依하여 活性이 減少되지 않으며 organ culture system에 있어서 estradiol에 依하여 遊離되며 ergot drugs는 腦下垂體에서 prolactin의 遊離를 抑制시키는 結果로 腦下垂體의 prolactin貯藏量이 增加된다고 한다.

I. 腦下垂體前葉細胞培養에 의한 Prolactin의生成에 미치는 人蔘 Saponin의 效果

正常白鼠의 腦下垂體前葉를 摘出하여 細胞培養하였을 때 prolactin의 濃度는 160ng/ml였으며 人蔘 saponin의 添加로 因하여 prolactin의 濃度가 增加되었다. 即 3×10^{-6} g/ml의 人蔘 saponin 濃度에서 257ng/ml로 prolactin의 生成이 增大되며 3×10^{-5} g/ml에 있어서는 正常濃度の 2倍로 增加하고 10^{-3} g/ml의 人蔘 Saponin添加時에는 約 4倍로 增加하였다. 이와같이 人蔘 saponin을 腦下垂體前葉細胞培養液에 添加하면 prolactin의 生成이 增加되는 것으로 보아 人蔘 saponin은 培養細胞에 對하여 prolactin의 生成을 促進시키는 作用이 있고 腦下垂體前葉細胞 培養時 prolactin은 數週日間 生成이 持續된다는 것이 알려져 있으므로³⁶⁻³⁹⁾ 이와 같은 現象은 腦下垂體前葉細胞에 人蔘 saponin이 直接的으로 作用한다고 思料된다(Fig. 1).

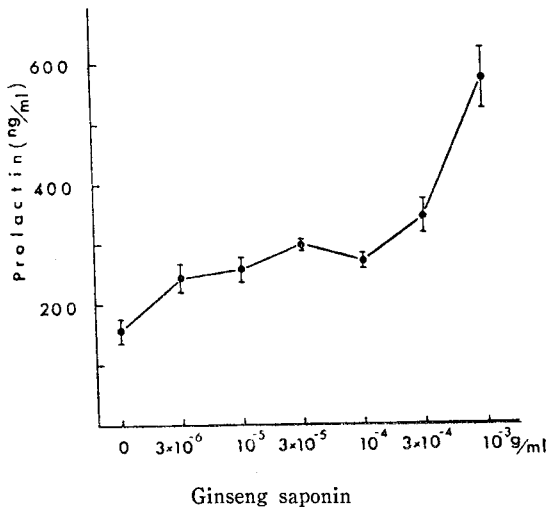


Fig. 1. The dose response of ginseng saponin in the enzymatically dispersed anterior pituitary cell cultures.

II. 白鼠血漿內 Prolactin 濃度에 미치는 人蔘 Saponin의 效果

正常白鼠에 있어서 血漿內의 prolactin濃度는 5~10ng/ml이며 生理食鹽水를 cannula를 通하여 注入하여도 血漿內 prolactin量에 거의 變化가 없

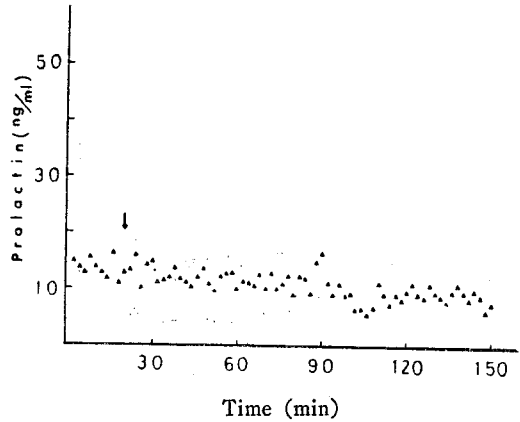


Fig. 2. The effect of saline (1ml/rat) on plasma prolactin levels in the normal male rat (Control).

었다(Fig. 2).

人蔘 saponin을 正常 雄性白鼠에 30mg/kg 投與하였을 때 約 1時間後 投與前 10ng/ml에서 47ng/ml로 prolactin濃度가 上昇하였다가 곧 正常值로 復歸하였다. 이 現象은 人蔘 saponin의 作用이 正常動物體에 對하여서는 腦下垂體前葉이나 視床下部에 直接 作用하여 prolactin의 遊離를 即時的으로 促進시키지 않고 持延的으로 作用한다고 推定할 수 있다(Fig. 3).

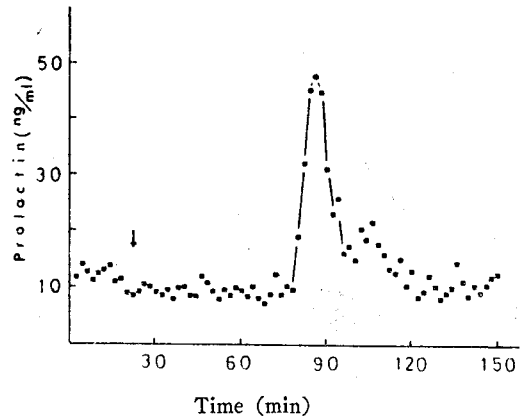


Fig. 3. The effect of ginseng saponin (30mg/kg) on plasma prolactin levels in the normal rat.

이와같은 事實은 去勢雄性白鼠에 同量의 人蔘 saponin을 投與하면 即刻的으로 血漿內 prolactin量이 上昇되며 投與後 7分만에 45ng/ml를 이루었다가 다시 下降되고 42分만에 再次 43ng/ml로 上昇되며 人蔘 saponin 投與後 約 1時間 사이에 2회에 걸쳐서 最高值에 達하였다가 平常值

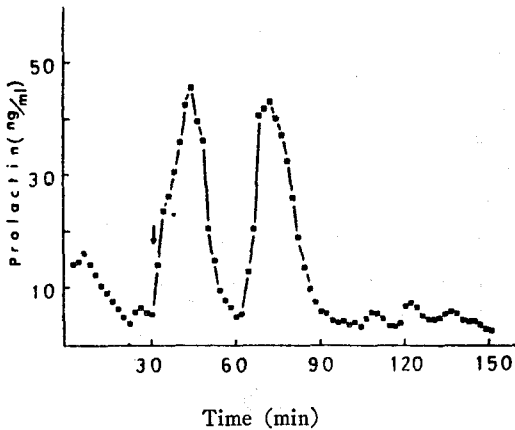


Fig. 4. The effect of ginseng saponin (30mg/kg) on plasma prolactin levels in the castrated male rat.

로 復歸하는 現象으로 說明할 수 있다(Fig. 4). 따라서 正常 雄性白鼠에는 去勢 雄性白鼠의 約 20배에 達하는 testosterone이 血漿內에 遊離되어 있음으로 人蔘 saponin은 正常的인 testosterone濃度에서는 即刻的인 血漿內 prolactin 遊離를 增加시키지 않으나 非正常的인 去勢動物에 있어서는 投與即時 血漿內의 prolactin遊離를 急激히 增加시키는 것으로 보아 人蔘 saponin은 去勢雄性動物에 있어서는 腦下垂體前葉이나 視床下部에 直接的으로 作用하여 prolactin遊離를 增加시키는 作用이 있다고 思料된다.

결 론

1. 白鼠의 腦下垂體前葉細胞培養에 있어서 人蔘 saponin $3 \times 10^{-6} \sim 10^{-5}$ g/ml 投與群에서 prolactin遊離가 增加되기 始作하며 3×10^{-5} g/ml에서는 約 2배, 10^{-3} g/ml의 人蔘 saponin 投與에 있어서는 prolactin의 遊離가 約 4배로 增大되었다.
2. 正常 雄性白鼠에 人蔘 saponin 30mg/kg을 投與하면 約 1時間後에 平常値의 約 5倍 以上으로 血漿內에 prolactin의 遊離가 增加되나 約 10分後에 平常値로 復歸되었다.
3. 去勢 雄性白鼠에 人蔘 saponin 30mg/kg을 投與하면 即刻的으로 血漿內에 prolactin의 遊離가 增大되며 이는 約 1時間 持續되었다가 平常値로 復歸되었다.

감 사

이 研究를 進行하는데 있어서 協助하여주신 Queen's大學校 醫科大學 申善鎬博士와 서울大學校 藥學大學 金洛斗博士에게 感謝하며, prolactin 分析에 있어서 標準品을 보내주신 Harbor General Hospital의 Albert F. Parlow博士에게 謝意를 表한다.

〈1978. 1. 20. 接受〉

문 헌

1. 申信求, 申氏本草學, 壽文社, 서울 1973.
2. 許浚, 東醫寶鑑, 1956.
3. Hong, S.A. and Cho, H.Y.: Korea Ginseng Science Symposium, 113 (1974).
4. Hahn, D.R.: Korean Ginseng Science Symposium, 141 (1974).
5. Petkov, W. and Stanea-Staicheva D.: *Arzneim. forsch.* 13, 1078 (1963).
6. Ahn, K.H.: *Kor. Choongang Uihak*, 3, 251 (1962).
7. Lee, S.H.: *Katorik Taehak Uihakpu, Nonmunjip* 19, 69 (1970).
8. Park, C.W. and Kim, M.S.: *Korean J. Pharmacol.*, 10, 1 (1974).
9. Ando, T., Tanaka, C. and Shibata, S.: *Syoyakugaku Zasshi*, 25, 28 (1971).
10. Vale, W., Grant, G., Amoss, M. Blackwell, R. and Guillemin, R.: *Endocrinol.* 91, 562 (1972).
11. Good, N., Winget, G., Minter, W., Connolly, T., Izawa, S. and Guillemin, R.: *Biochemistry*, 5, 467 (1966).
12. Jr. Amoss, M.S. and Guillemin, R.: *Gonadotropins Geron-X*, Los. Altos, Calif., p-313 1968.
13. Gala, R.R.: *J. Endocr.*, 50, 637 (1971).
14. Kuo, E.Y. and Gala, R.R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 462 (1972).
15. Kwa, H.G., Vander Gugten, A.A. and Verhfsstad, F.: *Europ. J. Cancer*, 5, 571 (1969).
16. Kwa, H.G. and Verhfsstad, F.: *Biochim. Biophys.*

- Acta, 133, 186 (1967).
17. Krause, R.: *Acta Endocrinologica*, 78, 417 (1975).
 18. Brown, M.R. and Hedge, G.A.: *Neuroendocrinology*, 9, 158 (1972).
 19. Berson, S.A., Yalow, R.S., Glick, S.M. and Roth, J.: *Metabolism*, 13, 1135 (1964).
 20. Jr. Midgley, A.R.: *Endocrinology*, 79, 10 (1966); *J. Clin. Endocrin. Metab.* 27, 295 (1967).
 21. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S.: *Biochem. J.* 89, 114 (1963).
 22. Cheever, E.V., Seavey, B.K. and Lewis, U.J.: *Endocrinol.* 85, 695 (1969).
 23. Dilley, D.A.: *U.S. Air Force Aerospace Med. Res. Lab.*, 1 (1966).
 24. Selby, Y.M., Lewis, F.W. and Vanderlaan, W.P.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, 36, 509 (1973).
 25. Frisen, H.G.: *Metabolism*, 22, 1039 (1973).
 26. Shino, M. and Rennels, E.G.: *Amer. J. Anat.* 144, 399 (1975).
 27. McCarty, K.S. and McCarty, K.S. Jr.: *J. Dairy Sci.*, 58, 1022 (1975).
 28. Anderson, R.R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 283 (1975).
 29. Akikusa, Y.: *Endocrinol. Jap.*, 18, 411 (1971).
 30. Dunn, J.D., Arimura, A. and Scheving, L.E.: *Endocrinology*, 90, 29 (1972).
 31. Grosvenor, C.E.: *Endocrinology*, 76, 340 (1965), 77, 1037 (1966), 80, 195 (1967).
 32. Grosvenor, C.E., Krulich, L. and MaCann, S.M.: *Endocrinology*, 82, 617 (1968).
 33. Vekemans, M. and Robyn, C.: *Brit. Med. J.*, 4, 738 (1975).
 34. Malarkey, W.B. and Beck, P.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40, 708 (1975).
 35. Snyder, P.J., Jacobs, L.S., Rabello, M.M., Sterling P.H., Share, R.N., Utiger, R.D. and Daug Haday W.H.: *Itne Ann.rn. Med*, 81, 751 (1974).
 36. Pasteels, J.L., Brauman, H. and Brauman, J.: *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 256, 2031 (1963).
 37. Pasteels, J.L., Danguy, A. Frerotte, M. and Ectors, F.: *Ann. d'Endocrinol.* 32, 188 (1971).
 38. Pasteels, J.L. and Ectors, F.: *Ann. Endocr. (paris)*, 29, 663 (1968).
 39. Pasteels, J.L. and Ectors, F.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 186, 195 (1970).