

## Anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody를 이용한 랫드 胃와 腸의 분열 상피세포의 분포에 대하여

곽수동 · 박성식 · 강원화  
경상대학교 수의과대학  
(1993년 10월 5일 접수)

### Distributions of proliferative epithelial cells in gastrointestinal tracts by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody

Soo-dong Kwak, Sung-shik Park, Won-hwa Kang  
College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University  
(Received October 5, 1993)

**Abstract** : The purpose of this study was to investigate division cells by *in vivo* bromodeoxyuridine(Brdur) immunohistochemistry for labeling the proliferative epithelial cells in the gastrointestinal tracts of rats.

Rats were administrated intraperitoneally by twice consecutive injections of 24 hr interval with Brdur(0.05 mg/g BW/time) and then were sacrificed at 1 hour after last injection.

The specimens were taken from the stomach, small intestine(ileum), and large intestine(colon).

The well-oriented crypts and villi in the preparations were examined. The crypt columns and villi were divided into 10 segments from crypt base to surface of the lumen or to villis top.

Labeling index(LI) was measured by counting the number of Brdur-positive cells against the total number of crypt column cells in the stomach and large intestine and also against the total numbers of crypt column and it's villi epiterial cells in the small intestine.

1. In the stomach, the LI in each part from segment 1 to segment 10 of the crypt column were 4.2%, 5.0%, 6.6%, 9.0%, 11.3%, 15.3%, 9.3%, 15.6%, 11.3%, 0%, respectively and it's mean LI were 8.7%. The Brdur-positive epithelial cells were predominantly located in the middle regions and middle-upper regions of the crypt columns.

2. In the small intestine, the LI in each part from segment 1 to segment 10 of were 62.4%, 50.9%, 27.8%, 22.5%, 18.6%, 12.1%, 7.5%, 4.3%, 2.5%, 1.4%, respectively and it's mean LI were 21.0%. The Brdur-positive epithelial cells were predominantly located in the lower regions of the crypt columns and tended to be less in the higher regions of the villi than that in the crypt column.

3. In the large intestine, the LI in each part from segment 1 to segment 10 of the crypt column were 19.4%, 29.9%, 34.1%, 41.6%, 41.2%, 32.4%, 25.4%, 15.4%, 10.8%, 1.2%, respectively and it's mean LI were 25.1%. The Brdur-positive epithelial cells were predominantly in the middle and middle-lower regions of the crypt columns.

4. The organs with higher LI were ordered as the large intestine(25.1%), small intestine(21.0%) and stomach(8.7%).

**Key words** : bromodeoxyuridine, gastrointestinal tracts, proliferative cells, immunohistochemistry, rat.

## 서 론

동물의 체내의 대부분의 세포들은 항상 새로운 세포가 생성되어 대체되고 있다. 분열한 새로운 세포의 규명은 과거에는  $^3\text{H}$ -thymidine( $^3\text{H}$ -TdR)을 이용한 방사선 자기법을 가장 많이 이용하여 왔다.<sup>1-15</sup> 이 방법의 원리는 세포가 분열하기 위하여는 間期(휴지기)와 유사분열기를 경과하는데 間期(interphase)에 DNA 複製가 일어난다. 이때 thymine 등 4가지 DNA 구성성분이 필요하다. 방사선 同位元素로 결합시킨 thymine의 일부인  $^3\text{H}$ -thymidine을 투여하면 증식하려는 세포와 흡수 결합하게 되므로 이 세포를 방사선 자기법으로 표지되도록 하여 규명하는 방법이다.

그러나 이 방법은 조직을 장기간(4주 이상) 냉장 暗室에서 感作시키는 문제, 방사능 오염, 취급시설, 조직 내 back ground grains과 fog의 출현 등 개선할 문제점이 많다.

근래에는 이 방사선자기법 외에 면역조직화학적 방법을 이용하여 분열세포를 규명하는 방법이 개발되었다.<sup>16-39</sup> 이 방법은 실험기간을 단축할 수 있어 정상동물에서 세포의 신생과 교체<sup>16-18, 20, 23-25, 27-30</sup>, 조직손상으로 인한 傷處治療, 癌 등 각종 腫瘍진단과 치료<sup>16, 20, 26</sup>, hormone이 영향하는 세포의 규명<sup>19, 21, 22</sup> 등 광범하게 방사선 자기법을 대신하여 발생학, 조직학 및 병리학 등에 연구가 집중되고 있는 현상이다.

이 방법의 원리는 cyclin A 또는 B를 투여하면 세포가 增殖하며 複製期前에 있거나 또는 bromodeoxyuridine(Brdur)을 투여하면 세포가 증식하며 합성기에 있을 때 이들 물질과 결합하게 된다. 이 조직에 이들 각 물질에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 發色토록 하여 분열세포를 檢索하는 방법이다.

본 연구는 rat를 대상으로 Brdur을 투여하여 소화기관의 상피세포에서 분열세포의 양상을 면역조직화학적 방법으로 조사코자 한다.

## 재료 및 방법

**공시동물의 처치** : 공시동물은 rat 수컷 4수(Sprague-Dawley, 25일령)에 Brdur(Sigma)을 saline에 희석하여 체중 g당 0.05mg씩 24시간 간격으로 2회 복강내 주입하고 2회째 주입 1시간 후 ether로 마취하여 4% neutral buffer paraformaldehyde로 관류고정하고 각 장기를 10% 중성 formalin에 48시간 재고정하였다. 대조군은 saline만을 주입하여 동일한 방법으로 실시하였다.

**면역조직화학적 방법** : 胃, 小腸(회장 부위) 및 大腸

(결장 부위)으로 paraffin조직을 만들어 Vectabond reagent(Vector Lab)로 coating한 slide glass에 부착하여 탈paraffin한 후에 0.1M phosphate-buffer(PBS, pH 7.4)에 수세하였고, 0.3% 과산화수소수 PBS에 30분간 처리한 후 2N HCl에 1시간동안 처리하고 0.1M PBS에 5분씩 3번 수세하고, 0.1% proteinase에 10분간 처리하여 1차 항체로써 Phosphate buffer goat serum Triton X-100(PB-GT)에 1:100~1:200으로 희석한 anti-Brdur mouse IgG(Oncogene Sci)에 overnight 처리한 후 0.1M PBS에 5분씩 3번 수세하였다. 그리고 2차 항체로써 anti-mouse IgG를 PBGT에 1:100~1:250으로 희석한 용액에 1시간 처리한 후 다시 0.1M PBS에 5분씩 3회 수세하였다. 다음 3차 항체인 mouse peroxidase anti-peroxidase(sigma) complex를 PBGT에 1:100~1:300으로 희석하여 1시간 실온에서 반응시킨 다음, PBS에 5분간 3회 수세한 후 0.5% 과산화수소수 Tris buffered saline(TBS 0.05 M/L, pH 7.6)용액에 0.005% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)를 희석하여 5~10분간 발색시키고 증류수에 수세하여 마운팅하고 腺體를 형성하는 세포중에 黃赤色으로 核이 發色되는 세포를 분열하는 상피세포로 간주하였다. 대조염색은 hematoxylin으로 하였으며 면역염색은 수분증발을 막기 위해 wet chamber 내에서 실시하였고, 대조군은 1차 및 2차 항체 대신 PBGT로 반응시킨 조직과 항원주입을 하지 않은 조직을 비교 관찰하였다.

## 결 과

rat에 Brdur를 투여한 후 monoclonal anti-Brdur antibody를 이용하여 면역조직화학적으로 소화기관의 상피세포가 발색되어 분열세포로 표지된 세포(이하 표지된 세포)의 분포비율과 분포부위를 조사하였는데 먼저 小腸에서는 腺體(Crypt column)의 기저부에서 용모의 침부까지 전체 길이가 나타나는 선체를 대상으로 하고 胃와 大腸은 선체의 기저부에서 표면 管腔까지 전체 길이가 나타나는 腺體를 대상으로 하여 선의 기저부에서부터 제1부위에서 제10부위로 10등분하고 전체의 세포중에 核이 黃赤色으로 發色되어 표지된 세포의 비율을 위치별로 구분하여 분류하였다.

胃의 腺體에서는 Table 1과 같이 제1부위에서 제10부위까지 표지된 세포의 비율이 각각 4.2%, 5.0%, 6.6%, 9.0%, 11.3%, 15.3%, 9.3%, 15.6%, 11.3%, 0%였고 그 평균은 8.7%였다. 이와같이 위내강의 표면에 노출되는 부위인 제10부위를 제외한 전부위에서 분포하고 있었으며 제5부위에서 제9부위 까지는 각각 11% 이상으로 높게 분포하여 선체의 중부와 중상부위

**Table 1.** Distribution(%) of labeled epithelial cells on crypt segments in rat stomach

Specimens	Segments of crypt column										Means
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0	0	0	0	0.1	7.0	11.0	38.0	32.0	0	8.8
2	3.3	3.3	4.0	8.0	13.0	19.0	10.0	5.0	0.1	0	6.6
3	9.3	12.0	16.0	19.0	20.0	20.0	7.0	4.0	2.0	0	10.9
Means	4.2	5.0	6.6	9.0	11.3	15.3	9.3	15.6	11.3	0	8.7

**Table 2.** Distribution(%) of labeled epithelial cells on crypt segments in rat small intestine.

Specimens	Segments of crypt column										Means
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	58.1	34.2	10.8	9.1	5.0	4.8	2.5	1.5	1.1	0.9	12.8
2	77.3	74.5	64.3	58.0	51.0	31.5	20.2	11.5	6.5	3.5	39.8
3	52.0	44.0	8.5	0.4	0	0	0	0	0	0	10.5
Means	62.4	50.9	27.8	22.5	18.5	12.1	7.5	4.3	2.5	1.4	21.0

**Table 3.** Distribution(%) of labeled epithelial cells on crypt segments in rat large intestine

Specimens	Segments of crypt column										Means
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	30.8	48.7	48.7	51.2	42.5	31.2	22.5	16.2	15.0	1.2	30.8
2	18.3	23.7	27.5	35.0	33.7	23.7	26.2	17.5	10.0	1.2	21.7
3	9.2	17.5	26.2	38.7	47.5	42.5	27.5	12.5	7.5	1.2	23.0
Means	19.4	29.9	34.1	41.6	41.2	32.4	25.4	15.4	10.8	1.2	25.1

에 분포가 많았다(Fig 1, 2, 3).

小腸에서는 Table 2와 같이 제1부위에서 제10부위까지 표지된 세포의 비율이 각각 62.4%, 50.9%, 27.8%, 22.5%, 18.6%, 12.1%, 7.5%, 4.3%, 2.5%, 1.4%였고 그 평균은 21.0%였다. 이와같이 腺體의 하부인 제1~5부위에 표지된 세포의 분포가 많았고 기저부에서 용모의 침부로 갈수록 점차 감소되었다(Fig 4, 5).

大腸에서는 Table 3과 같이 제1부위에서 제10부위까지 표지되는 세포의 비율이 각각 19.4%, 29.9%, 34.1%, 41.6%, 41.2%, 32.4%, 25.4%, 15.4%, 10.8%, 1.2%였고 그 평균은 25.1%였다. 대장은 중부와 중하부인 제 2부위에서 제 6부위에 각각 30%이상으로 분포가 많았다(Fig 6, 7).

臟器別로 표지된 세포의 비율은 大腸 25.1%, 小腸 21.0%, 胃 8.7%의 순으로 높았고 각 장기의 부위별로는 소장은 제 1~4부위로 가장 아래쪽에서 분포되어 있었고 그 다음은 위가 제 2~6부위, 대장은 3~7부위로 높은 부위에 분포하고 있었다.

## 고 찰

세포증식에 관한 조사는  $^3\text{H-TdR}$ 를 이용한 방사선 자기법<sup>1~15</sup>을 이용하여 왔으나 근래에 Brd<sub>u</sub>r를 이용한 면역조직화학적법을 이용<sup>16~30</sup>하고 있고 또 두 방법을 상

호 비교하고 있다.

소장과 대장의 상피세포의 새로운 세포로 대치는 선체의 기저부에서 상피세포의 기원인 stem cells이 분화 증식하게 되어 상부로 이동한 후 탈락한다고 하였으나 상피세포의 존속기간에 대하여서는 동물에 따라, 보고자에 따라 16.6 시간에서 8.2일까지 차이가 많고 어떤 세포는 23.3일간 지속한다고 보고된 바도 있다.<sup>2,4-6,9,12</sup> 세포의 존속기간은 같은 종류의 전체 세포중에 분열이 표지된 세포의 비율이 낮을수록 세포의 존속기간이 길고 높을수록 짧다. 본 조사는 24시간 간격으로 Brd<sub>u</sub>r를 2회 주입하였으므로 처음 주입후 시간이 경과되어 표지된 세포의 비율과 부위의 변화가 다소 있으리라고 생각되나 곽<sup>12</sup>의 보고에 의하면 1일 이내는 거의 차이가 없었다. 이는 분열기간은 짧으나 DNA 복제기간은 길었기 때문으로 생각된다.

표지된 세포의 비율은 일정기간내는 시간이 경과할수록 증가하므로 표지물질의 주입 즉시인 2시간 이내의 결과를 조사한 바를 보면 다음과 같다.

Bom et al<sup>1</sup>은 사람의 위 유분부를  $^3\text{H-TdR}$ 와 Brd<sub>u</sub>r를 이용한 바 각각 19.4%, 18.0%이었다고 하였고, Gutierrez et al<sup>4</sup>는 사람의 위저부에서  $^3\text{H-TdR}$ 를 이용한 바 crypt 3부중에 저부와 중간부 순으로 많고 상부는 관찰되지 않았고 그 평균은  $19.3 \pm 1.9\%$ 이었다고 하였다. 본

조사는 rat 胃에서는 8.7%로 사람의 보고 보다는 월등히 낮았으나 사람에서 보다는 다르게 선체의 중간부위와 중상부에 다소 많은 편이고 하부에도 관찰되었으므로 제10부위를 제외하고는 모든 부위에 분포하고 있었다.

小腸에서  $^3\text{H-TdR}$ 를 이용한 바  $\text{K}^{12}$ 은 mouse 소장 소와와 용모에서 각각 98.7%와 1.3%, Inokuchi et al<sup>5</sup>는 rat 십이지장에서 17.9%, Cheng<sup>2</sup>은 mouse에서 십이지장은 42.9±6.0%, 공장은 30.4±8.4%, 회장은 25.9±8.8%였고 이들 용모에서는 관찰되지 않았다고 하였다.

본 조사에서는 小腸은 제1부위에서 제10부위까지 62.4%, 50.9%, 27.8%, 22.5%, 18.6%, 12.1%, 7.5%, 4.3%, 2.5%, 1.4%로 그 평균은 21.0%였고, 선체의 기저부에 분포율이 높았고, 용모의 침부에도 소수 분포하고 있었다.

大腸에서  $^3\text{H-TdR}$ 를 이용한 바 McGarity et al<sup>6</sup>은 rat의 결장 원위부는 crypt 3등분의 아래 부위에 53.2±1.4%, 근위부는 중간부위에 64.3±5.2%, Richards<sup>7,8</sup>는 rat에서 결장의 crypt를 10부 위로 구분한 바 제1부위에서 제 3부위 까지가 rat는 25%이상, mouse는 30%이상 이었고, 다음부위 부터는 현저히 낮아지기 시작하여 그 평균이 rat는 9.7%~5%, mouse는 12.9%~15.2%였다고 하였으며, rat는 제 9와 10부위는 관찰되지 않는다고 하였다. Terpstra et al<sup>10</sup>은 사람의 결장 절제 조직편의 배양액에서  $^3\text{H-TdR}$ 을 가한 바 표지된 세포의 비율이 4~5%, Sato와 Ahnen<sup>9</sup>는 rat에서 방사선 자기법외에 면역조직화학법을 이용한 BrdU를 주사후 48시간째 結腸에서 stem cells의 위치를 관찰한 바 결장의 원위부에는 기저부에, 근위부에는 중간부에 많이 관찰되었다고 하였다. 본 조사에서는 대장의 장선체의 제1부위에서 그 비율은 각각 19.4%, 29.9%, 34.1%, 41.6%, 41.2%, 32.4%, 25.4%, 15.4%, 10.8%, 1.2%로 그 평균은 25.1%로서 crypt의 중간부위와 중하부위에 분포가 높고 상부가 낮은 상호 유사하였으나 표지된 세포의 비율은 본 조사는 물론 보고자에 따라 차이가 많았다.

장기별로 표지된 세포의 비율이 높은 것은 대장 25.1%, 소장 21.0%, 위 8.7%의 순이었는데 표지된 세포의 비율이 높을수록 상피세포의 교체기간이 짧은 것으로 간주되고 있다.

## 결 론

rat에 bromodeoxyuridine을 주입한 후 anti-bromodeoxyuridine antibody를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 胃, 小腸, 大腸의 전체 상피세포중에 분열되는 세포의 비율과 분열이 이루어지는 부위를 조사하기 위하여 위

와 대장은 선체의 기저부에서 管腔에 노출되는 침부까지, 소장은 선체의 기저부에서 용모 침부까지를 각각 제 1부위에서 10부위로 10등분 하여 핵이 황적색으로 발색되어 표지가 되어진 세포(이하 표지된 세포)를 관찰하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 胃는 제1부위에서 제10부위까지 표지된 세포의 비율이 각각 4.2%, 5.0%, 6.6%, 9.0%, 11.3%, 15.3%, 9.3%, 15.6%, 11.3%, 0%였고, 이 평균은 8.7%로서 선체의 중간부위와 중상부위에 분포가 많았다.

2. 小腸은 제1부위에서 제10부위까지 표지된 세포의 비율이 각각 62.4%, 50.9%, 27.8%, 22.5%, 18.6%, 12.1%, 7.5%, 4.3%, 2.5%, 1.4%였고, 이 평균은 21.0%로서 腺體의 하부위에 분포가 많았고 용모의 침부도 갈수록 점차 감소되었다.

3. 大腸은 제 1부위에서 제10부위까지 표지된 세포의 비율이 각각 19.4%, 29.9%, 34.1%, 41.6%, 41.2%, 32.4%, 25.4%, 15.4%, 10.8%, 1.2%였고, 이 평균은 25.1%로서 선체의 중간부위와 중하부위에 분포가 많았다.

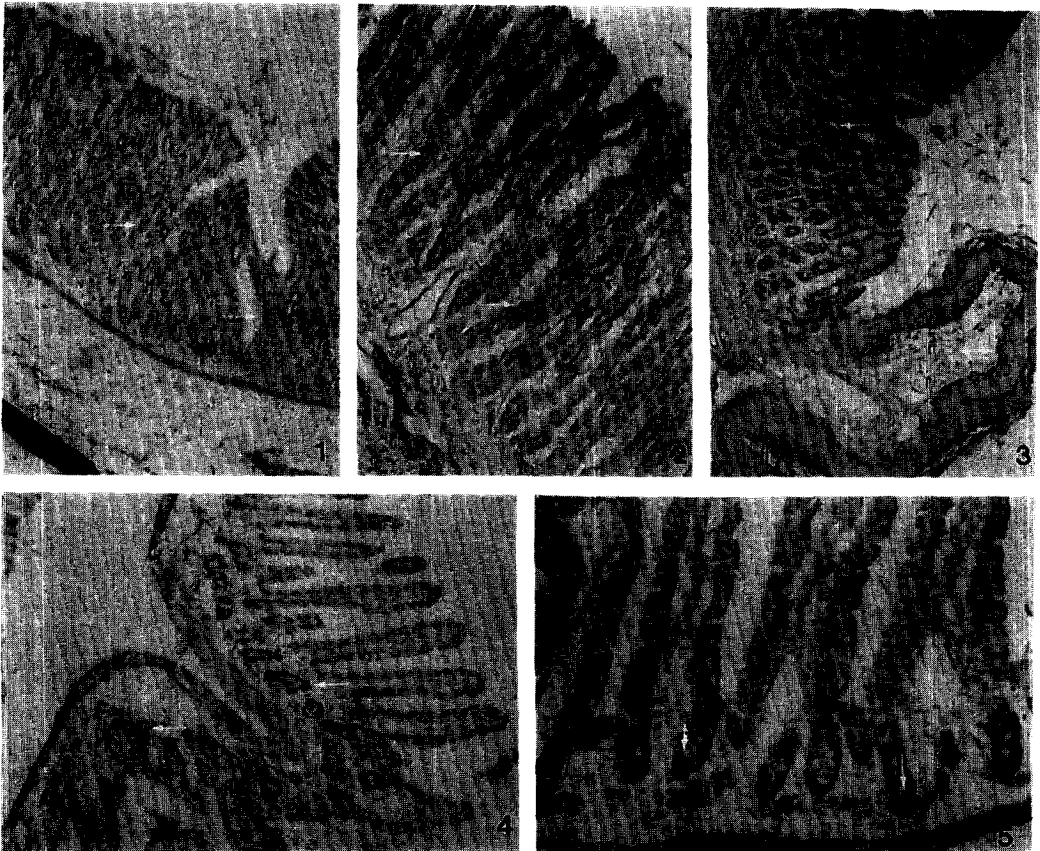
4. 장기별로는 대장(25.1%), 소장(21.0%), 위(8.7%)의 순으로 높았다.

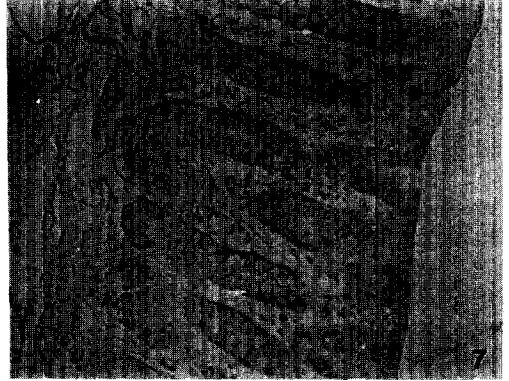
## 참 고 문 헌

1. Bom HS, Yoon CM, et al. Autoradiographic and immunohistochemical study on the proliferative kinetics of intestinal metaplasia. *Korean J Internal Medicine* 1991 ; 6(1) : 8~15.
2. Cheng, H. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells. *Am J Anat* 1974 ; 141 : 481~50.2
3. Goodlad RA, Madgwick AJ, et al. Effects of misoprostol on cell migration and transit in the dog stomach. *Gastroenterology* 1990 ; 98(1) : 90~95.
4. Gutierrez O, Lehy T, et al. Epithelial cell proliferation in human fundic and antral mucosae : Influence of superselective vagotomy and relationship with gastritis. *Digestive Disease and Science* 1985 ; 30 : 1034~1042.
5. Inokuchi H, Fujimoto S, et al. Tritiated thymidine radioautographic study on the origin and renewal of secretin cells in the rat duodenum. *Gastroenterology* 1985 ; 89 : 1014~1020.
6. McGarity TJ, Peiffer LP, Colony C. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1. 2-

### Legends for figures

- Fig 1. The bromodeoxyuridine(Brdur)-positive cells(arrows) were predominantly located in the middle and middle-upper regions of the crypt columns of the stomach. Immunohistochemical staining.  $\times 50$ .
- Fig 2. Higher magnification of Fig 1. Many Brdur-positive cells were seen in the middle and middle-upper regions. Immunohistochemical staining.  $\times 100$ .
- Fig 3. The Brdur-positive cells were predominatly located in the middle and middle-upper regions of the crypt column of stomach, and also in the basal layer of the epithelium in the esophagus-stomach junction. Immunohistochemical staining.  $\times 50$ .
- Fig 4. The Brdur-positive cells were predominantly located in the lower regions of the crypt columns and were decreased at the villi top of the small intestine. Immunohistochemical staining.  $\times 50$ .
- Fig 5. The Brdur-positive cells predominantely located in the crypt base region of small intestine. Immunohistochemical staining.  $\times 100$ .
- Fig 6. The Brdur-positive cells were predominantly located in middle and middle-lower regions of the crypt columns of the large intestine. Immunohistochemical staining.  $\times 50$ .
- Fig 7. Higher magnification of Fig 6. The Brdur-positive cells were seen in the middle regions of the large intestine. Immunohistochemical staining.  $\times 100$ .





- diamethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Gastroenterology* 1988 ; 95 : 343~348.
7. Richards TC. Early changes in the dynamic of crypt cell population in mouse colon following administration of 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer Research* 1977 ; 37 : 1680~1685.
  8. Richards TH. The effects of the carcinogen, 1, 2-dimethylhydrazine, of turnover of  $^3\text{H}$ -thymidine labeled cells from mucosal glands of mouse colon. *Anat Rec* 1981 ; 200 : 299~308.
  9. Sato M, Ahnen DJ. Regional variability of colonic cell growth and differentiation in the rat. *Anat Rec* 1992 ; 233 : 409~414.
  10. Terpstra OT, et al. Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with colon adenoma or cancer. *Gastroenterology* 1987 ; 92 : 704~708.
  11. Uribe A, Rubio C, Johansson C. Cell kinetics of rat gastrointestinal mucosa. Autoradiographic study after treatment with 15(R)15-methyl-prostaglandin E<sub>2</sub>. *Gastroenterology* 1986 ; 21 : 246~252.
  12. 광수동. 家畜 및 實驗動物 消化管腺의 構造에 관한 연구. II. 哺乳 mouse 腸粘膜의 細 再生週期에 대하여. 대한수의학회지 1992 ; 32(1) : 1~6.
  13. 광수동. 腦 神經膠細胞 集團의 發生과 移動에 대한 放射線 自記法的 관찰. I. 설치류 腦에 外胚葉性 神經膠細胞 集團의 出現에 대하여. 대한수의학회지 1992 ; 32(4) : 481~487.
  14. 광수동. 腦 神經膠細胞 集團의 發生과 移動에 대한 放射線 自記法的 관찰. II. 腦 外胚葉性 神經膠細胞 集團의 分裂과 移動에 대하여. 대한수의학회지 1992 ; 32(4) : 489~496.
  15. 이차수. 태반형성(Golen hamater)에 있어서 Autoradiography에 의한 분열세포의 소장. 대한수의학회지 1983 ; 23(1) : 1~8.
  16. DeFazio A, Leary JA, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cells *in vivo*. *J Histochem Cytochem* 1987 ; 35 : 571~577.
  17. Dombrowicz D, Delahaut P, et al. Detection of cell proliferation in pig testis and intestine sections using monoclonal anti-bromodeoxyuridine antibody and immunogold silver staining. *Histochemistry* 1988 ; 90(1) : 31~35.
  18. Harms G, et al. Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromo-deoxyuridine in frozen and plastic embedded sections. *Histochemistry* 1986 ; 85 : 139~143.
  19. Haslam SZ, Shyamala G. Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship with lactation *Biochem J* 1979 ; 182 : 127~131.
  20. Hayashi Y, Koike M, et al. Effects of fixation time and enzymatic digestion on immunohistochemical demonstration of bromodioxuridine in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1988 ; 36 : 511~514.
  21. Hild-Petito S, Verhage HG, et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progestin receptors in the Baboon(*Papio anubis*) uterus during implantation and pregnancy. *Endocrinology* 1992 ; 130 : 2343

- ~2353.
22. Hild-Petito S, Stouffer RL, Brenner RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1988 ; 123 : 2896 ~ 2905.
  23. Labrecque C, Huard J, et al. *In vitro* bromodeoxyuridine labeling of nuclei : Application to myotube hybridization. *J Histochem Cytochem* 1991 ; 39 (10) : 1421~1426.
  24. Lacy ER, Kuwayama H, et al. A rapid, accurate, immunohistochemical method to label proliferating cells in the digestive tract. *Gastroenterology* 1991 ; 100 ~262.
  25. Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodioxuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 1988 ; 57 : 44~52.
  26. Morstyn G, Hsu SM, et al. Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *The Journal of Clinical Investigation* 1983 ; 72 : 1844~1850.
  27. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, et al. Measurement of *in vivo* proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* 1992 ; 33 : 71~78.
  28. Raza A, Spiridonidis C, et al. Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. *Cancer Research* 1985 ; 45 : 2283~2287.
  29. Risio M, Coverlizza S, et al. Immunohistochemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the large bowel. *Gastroenterology* 1988 ; 94 : 899~906
  30. Schutt B, Reynders MMJ, et al. Studies with anti-bromodeoxyuridine antibody : Simultaneous immunohistochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 1987 ; 35 (3) : 371 ~ 374.
-