

## 성 hormone이 rat 자궁 발달에 미치는 영향에 대한 proliferating cell nuclear antigen 항체의 면역조직학적 응용

고 필 옥 · 궤 수 동

경상대학교 수의과대학  
(1997년 3월 20일 접수)

### Immunohistochemical application of anti-proliferating cell nuclear antigen antibody on the development of uterus following sex hormone administration in rats

Phil-ok Koh, Soo-dong Kwak

*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*  
(Received Mar 20, 1997)

**Abstract** : The study was designed to investigate the effects of progesterone and estrogen on the uterus of rats by immunohistochemical methods using Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) antibody. Eighteen female rats(Wistar), weighing initially about 300g, were ovariectomized. These rats were divided into four groups, progesterone-treated group, estrogen-treated group, estrogen+progesterone-treated group, and control group, progesterone-treated group was injected with 1mg of progesterone per rat per day for 2 days and estrogen-treated group with 20 $\mu$ g of 17 $\beta$ -estradiol for 3 days and estrogen+progesterone-treated group with 17 $\beta$ -estradiol for 3 days and then with progesterone for 2 days as above.

In gross findings, the uteri were markedly hypertrophied by estrogen treatment but were not affect in size by progesterone treatment.

Immunohistochemical investigation was performed on the cell types with higher appearance of PCNA positive reaction cells in four groups. The groups with higher appearance of the stromal cells were ordered as estrogen-treated group, progesterone-treated group, estrogen+progesterone-treated group, and control group. The muscle cells were ordered as progesterone-treated group, estrogen-treated group, estrogen+progesterone-treated group, and control group. Positive reaction cells of the stromal cells were total 4.6 times higher than those of muscle cells. Therefore, the affect of the hypertrophy on the uterus by estrogen was larger than those of progesterone and affect on the uterus by stromal cells were larger than those of muscle cells. The group with more PCNA positive reaction cells of luminal epithelial cells were ordered as control group,

progesterone-treated group, estrogen+progesterone-treated group, and estrogen-treated group, and glandular epithelial cells were ordered as estrogen+progesterone-treated group, progesterone-treated group, control group, and estrogen-treated group.

It was suggested that estrogen and progesterone did not affect on the proliferating cells of luminal epithelial cells and affection of progesterone on the development of glandular epithelial cell was larger than that of estrogen.

**Key words** : Immunohistochemistry, progesterone,  $17\beta$ -estradiol, PCNA, rat.

## 서 론

암컷의 생리적 주기는 시상하부 뇌하수체 및 난소 등에서 분비하는 hormones의 상호조절 작용에 의하는데 그 중에서 progesterone과 estrogen은 생식기의 발달, 태아의 착상과 발달 등에 상호협동과 억제작용을 한다. 특히 progesterone은 임신을 유지하고 estrogen과  $PGF_{2\alpha}$ 의 분비를 억제하는 반면 cortisol에 의하여는 분비감소가 일어난다<sup>1,2</sup>. 그리고 estrogen은 progesterone의 분비를 억제하며 progesterone receptor를 증가시킨다<sup>1,3-10</sup>.

이들 hormone이 생식기 기능의 조화를 유지하고 또 여러 목적에 이용될 수 있는 것은 생식기관의 여러 부위에서 이들 hormone의 작용을 받아들일 수 있는 receptor를 보유한 target cells이 있기 때문이다<sup>4,5,9-15</sup>.

동물의 체내는 신경세포를 제외한 모든 세포는 일정한 주기적으로 분열하여 새로운 세포로 대체되고 있다. 분열세포의 조직학적 규명은 세포핵내 복제되는 DNA의 성분인 thymine에 동위원소를 결합시킨  $^3H$ -thymidine( $^3H$ -TdR)을 미리 생체에 주입하여 분열세포와 결합하게 하여 방사선자기법으로서 검색하거나 세포들이 증식할 때 세포핵의 nucleotides의 구성성분인 bromodeoxyuridine (Brdur)를 미리 투여하여 면역조직화학적 방법으로 분열세포를 검색하게 되며 이러한 방법을 이용하여 소화기관과 생식기관 등에 상피의 재생에 관한 연구, 암의 악성과 양성의 구별 및 예후추정, 상처치유 등의 연구에 활용하여 왔다<sup>11-26</sup>.

근래에는 사전 생체에 어떤 물질을 주입하지 않고 분열세포를 규명하는 새로운 방법이 개발되었다. 이 원리는 세포가 증식하기 전에 휴지기에 DNA 이중나선이 풀

림과 동시에 각 사슬이 복제되는 과정에 나타나는 여러 중합효소중 leading strand에 관여하는 DNA polymerase  $\delta$ 의 옆에 위치하여 중합효소를 보조해주는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 대한 단크론 항체를 이용한 분열세포를 규명하는 방법으로서 Brdur의 단크론 항체를 이용한 방법은 복제기에 있는 세포에만 검색되지만 PCNA는 DNA 복제전기의 말기, 복제기, 복제후기의 초기에 세포도 검색할 수 있어 분열세포의 범위가 넓고 출현하는 세포수가 많다고 한다<sup>11,19,27-29</sup>.

본 연구는 난소를 적출한 rat에서 estrogen제제인  $17\beta$ -estradiol과 progesterone의 사전 투여가 자궁의 발달에 어떤 영향을 미치는지를 PCNA를 이용한 면역조직화학적 방법에 의해 조사한 결과를 보고하여 이들 hormone의 작용부위와 작용하는 세포에 대하여 조사코자 한다.

## 재료 및 방법

**실험동물의 정상 발정주기의 확인** : 성숙한 rat(Wistar) 암컷 체중 300g 내외를 매일 오후 일정시간에 vaginal smear를 실시하여 Giemsa 염색을 실시한 후, 정상적인 발정주기가 연속됨을 10일 이상 확인한 후에 실험동물의 자체에서 일어나는 성 hormone의 기원과 성 hormone의 영향을 제거하기 위하여 난소절제 수술을 실시하였다.

**난소절제술** : Rat는 마리당 Ketamine(함량 50mg/ml, 유한양행) 0.4ml와 Rompun(함량 20mg/ml Bayer Co) 0.1ml를, 근육주사하여 마취한 후에 결박하여 고정하고 등쪽 정중선 부위에 털을 깎은후, alcohol과 iodine 용액으로 수술부위를 소독하고 2-3cm 정도 길이로 피부를 절개하고 복벽은 좌측과 우측의 겹부의 복벽근육을 각각 절개

한 후 해당측의 난관과 난소를 복강외로 노출시켜 난소의 부착부위의 지방조직 등을 제거한 다음 지혈을 위하여 소작(cauterization)하여 난소를 절제한 후 다시 자궁을 복강내 원위치로 환원하고 2차 감염을 방지하고 습윤을 유지하기 위하여 항생제(Baytril, Bayer Co)를 생리식염수에 희석하여 2~3ml씩 복강내에 주입한 후, 복벽과 피부를 차례로 봉합하고 술야를 다시 povidone iodine으로 소독하고 2~3일간 항생제를 주사한 후에 4주 이상 사육하여 완전 회복시켰다.

#### Hormone의 주입 및 조직고정 :

Progesterone 투여군 : 김과 한<sup>30)</sup>의 방법에 따라 rat에 progesterone (Sigma)을 ethanol, propyleneglycol, 증류수의 순서로 그 용량 비율을 1:4.5:4.5의 비율로 용해하여 1일 수당 progesterone 1mg 함유량(1ml)를 1회씩 2일간 근육주사하고 3일째는 오전 8시경에 ether로 마취하고 개복하여 4% neutral buffer paraformaldehyde로 관류고정하고 육안적인 관찰을 한후 각 장기를 채취하여 10% 중성 formalin액에 재고정하였다.

Estrogen 투여군 : rat에 17 $\beta$ -Estradiol (Sigma)을 progesterone 투여군과 같은 비율로 희석하여 1일 17 $\beta$ -Estradiol 20 $\mu$ g 되는 양을 3일간 근육주사한 후, 제 4일째는 위와 같이 마취하고 고정하였다.

Estrogen + Progesterone 투여군 : rat에 estrogen 투여군과 같이 20 $\mu$ g씩 3일간 근육주사하고 다시 제 4일째는 progesterone 투여군과 같이 progesterone을 수당 1일 1mg씩 2일간 근육주사한 후, 6일째는 위와 같이 마취하고 고정하였다.

대조군 : rat에 성 hormone을 투여하지 않고 일상 상태에서 위와 같이 마취하고 고정하였다.

면역조직화학적 방법 : 자궁 조직을 채취하여 paraffin 조직절편을 만들어 일부는 통상적인 방법과 같이 H-E 염색을 하고, 일부 조직절편은 조직자체의 peroxidase를 제거하기 위해서 과산화수소수가 0.3% 첨가된 methanol에 30분간 처리한 후 2N HCl에 1시간 denature 시키고 0.1M sodium phosphate buffer (0.1M PB)에 5분간 3회 수세하고 1차 항체는 1:50~1:100으로 희석한 PCNA antibody (Oncogene Science)를 실온에서 하루밤 동안 처리한 후, 2차 항체는 1:100~1:200으로 희석한 goat anti-mouse IgG (Sigma)를, 3차 항체는 mouse peroxidase anti-peroxidase complex (Sigma)를 각 1:50~1:100 배액으로 희석하여 사용하거나 또는 1차 항체는 PCNA antibody (Oncogene

Science)를, 2차 항체는 1:200으로 희석한 biotylated anti-mouse IgG (vectastain)에 실온에서 한시간 반응시킨 후, 3차 항체로는 peroxidase가 표지된 ABC 용액에서 한시간 반응시켰다. 각 항체의 희석은 0.1M PB에 1% normal goat serum (sigma)과 0.3% Triton X-100 (sigma)를 혼합하여 사용하였다. 항체 처리시 각 단계의 수세는 0.1M PB로 5분간씩 3회 실시하였다. 발색제는 33'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma)만을 사용하거나 또는 nickel chloride을 가하여 발색토록 한후 hematoxylin이나 neutral red로 대조염색을 하여 황갈색 또는 흑색으로 발색되는 세포를 PCNA 항체의 양성세포로 하여 이들 세포들의 분포와 그 비율을 광학현미경적으로 조사하였다.

Table 1. Experimental design for anti-PCNA antibody

Groups	Number of rats	Treatment	
		Materials	Volume & Duration
P <sup>*</sup> -treated	5	P <sup>*</sup> alone	1mg/rat/day $\times$ 2
E <sup>**</sup> -treated	5	17 $\beta$ -E <sup>#</sup> alone	20 $\mu$ g/rat/day $\times$ 3
E+P-treated	5	17 $\beta$ -E P	20 $\mu$ g/rat/day $\times$ 3 1mg/rat/day $\times$ from 4th day
Control	3	None	

P<sup>\*</sup> : progesterone, E<sup>\*\*</sup> : estrogen, 17 $\beta$ -E<sup>#</sup> : 17 $\beta$ -Estradiol

## 결 과

Rat의 자궁에서 progesterone과 estrogen이 미치는 영향을 PCNA에 대한 항체를 이용하여 조사코자 Table 1과 같이 난소를 절제한 rat를 progesterone을 2일간 투여한 군, estrogen을 3일간 투여한 군, estrogen을 3일간 투여하고 progesterone을 2일간 투여한 군, hormone을 투여하지 않은 대조군 등 4군으로 구분하여 처리한 후, 부검하여 육안적으로 관찰하고 면역조직화학적 방법으로 PCNA 항체 양성 반응세포의 수를 관찰하였다.

육안적으로는 progesterone 투여군과 대조군의 자궁은 위축된 상태였고 estrogen 투여군과 estrogen+progesterone 투여군은 자궁의 크기가 현저히 증대되었으며 두군간의 크기는 거의 차이가 없었고 또 progesterone 투여군과 대조군 간에서도 크기의 차이가 거의 없어 estrogen 투여는 자궁의 크기를 증대시키나 progesterone 투여는 자궁의

증대에 영향이 적었다.

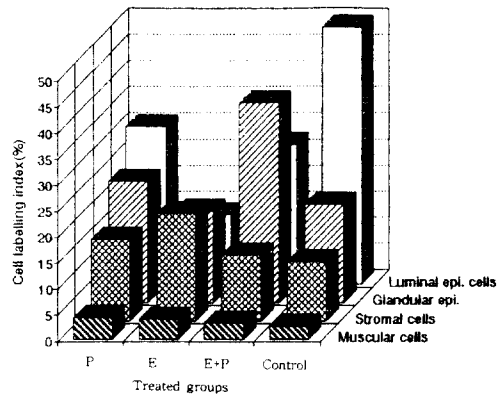
조직학적 조사는 자궁의 내막에서는 기질세포, 관강의 표면상피세포, 선상피세포를, 근육층에서는 근세포를 대상으로 PCNA 항체의 양성반응세포를 조사한 바 양성반응세포의 출현수의 비율은 Graph 1과 같이 부위별 세포종별로 변화의 범위가 넓었고 개체별로도 변화의 범위가 넓었다.

자궁내막의 기질세포와 근육층의 근세포의 조사는 현미경 하의 확대배율 400배에서 microreticle을 이용하여 한 시야(실질면이  $250 \times 250 \mu\text{m}$ ) 당 나타나는 양성세포의 수를 조사한 바, 기질세포는 progesterone 투여군은  $15.6 \pm 8.1\%$ ,(M $\pm$ SD), estrogen 투여군은  $20.6 \pm 11.9\%$ , estrogen+progesterone 투여군은  $12.7 \pm 5.5\%$ , 대조군은  $11.3 \pm 6.15\%$  으로서, estrogen 투여군, progesterone 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 순으로 많았고, 근세포는 progesterone 투여군  $4.0 \pm 2.5\%$ , estrogen 투여군  $3.7 \pm 2.9\%$ , estrogen+progesterone 투여군은  $3.1 \pm 2.6\%$ , 대조군은  $2.4 \pm 1.6\%$  으로서, progesterone 투여군, estrogen 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 순이었다(Graph 1). 이상에서 같은 부위에서 기질세포의 증식은 근세포 보다 progesterone 투여군은 3.9배, estrogen 투여군은 5.6배, estrogen+progesterone 투여군은 4.1배, 대조군은 4.7배 더 많아 기질세포의 증식이 근세포의 증식보다 평균은 4.6배로 높았다(Graph 2). 자궁의 구성은 기질세포와 근세포의 점유비율이 가장 높으므로 여성 hormone의 자궁은 자궁 전체에서 기질세포가 자궁의 발달이나 성주기의 변화에서 주를 이루고 있음을 알 수 있었고 estrogen이 기질세포의 증식에 가장 영향이 많아 자궁의 발달에 가장 영향이 많음을 알 수 있었다.

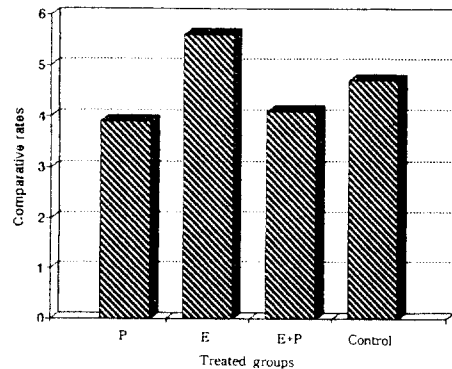
자궁관강표면상피는 자궁관의 횡단면 조직(cross section)당 나타나는 양성반응세포의 수를 조사한 바, progesterone 투여군은  $30.3 \pm 21.3\%$ , estrogen 투여군은  $13.5 \pm 8.4\%$ , estrogen+progesterone 투여군은  $26.9 \pm 23.5\%$ , 대조군은  $49.2 \pm 20.9\%$ 로서 대조군, progesterone 투여군, estrogen+progesterone 투여군, estrogen 투여군 순으로 estrogen과 progesterone이 관강 표면상피의 증식에 영향이 거의 없어 성주기 중에도 증식율의 차이가 없음을 알 수 있었고 또 부위별로도 차이가 컸는데 이는 어떤 부위별로 성주기나 hormone 영향에 관계없이 국소적으로 증식과 탈락이 집중적으로 일어나고 있음을 알 수 있었다.

자궁내막의 한 선관의 횡단면을 구성하는 선상피의

평균수는  $31.7 \pm 10.9$ 개였고 이 중에 양성반응세포가 나타나는 경우는 보통 한 선관의 단면당 1개가 주었고 가끔 2-3개도 있었다. 자궁조직 절편당 나타나는 전체 선관단면의 수 중에 양성반응세포가 나타난 선관단면의 수의 비율을 조사하여 %로 환산한 바, progesterone 투여군은  $23.5 \pm 11.1\%$ , estrogen 투여군은  $17.6 \pm 12.9\%$ , estrogen+progesterone 투여군은  $38.3 \pm 31.5\%$ , 대조군은  $18.9 \pm 10.4\%$ 로 estrogen+progesterone 투여군, progesterone 투여군, 대조군, estrogen 투여군 순이었고 부위별로 차이가 많았다. 이로 보아 progesterone은 관강상피와 선상피의 발달에 영향이 많음을 알 수 있었다(Graph 1~6).



Graph 1. Comparative levels of the PCNA positive reaction cells in four groups(P : Progesterone, E : Estrogen)



Graph 2. Comparative ratio by dividing number of positive stromal cells by number of positive muscular cells in each four groups(P : Progesterone, E : Estrogen)

## 고 찰

Estrogen은 생식기관의 성장과 발달, 발정행위, 유선의 발달 등에 관여하며, progesterone은 자궁선의 발달, 수정란의 착상, 발정의 억제, 임신의 지속, 유선의 발달 등에 관련한다고 하였다<sup>1-8,30,31</sup>.

본 조사에서도 육안적으로는 estrogen 투여군은 대조군에 비하여 자궁이 현저히 증대되었으나 progesterone 투여군은 다른 군에 비하여 자궁의 크기의 차이가 적어 estrogen은 자궁의 증대에 중요한 역할을 하나 progesterone은 단기간에는 자궁의 증대에 영향을 많이 미치지 못함을 확인 할 수 있었다.

조직학적으로 실험군별 세포별로 단위면적당 양성반응세포의 많은 순서를 조사한 바, 기질세포는 estrogen 투여군, progesterone 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 순이었고 근세포는 progesterone 투여군, estrogen 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 순이었으며, estrogen 투여군은 progesterone 투여군이나 대조군 보다 기질세포의 증식이 가장 많아 estrogen은 자궁의 발달에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 한편 progesterone 투여군은 기질세포 증식에는 estrogen 투여군은 보다 낮았고 근세포와 선상피세포의 증식에는 estrogen 투여군보다 높아 선상피와 근세포에 더 작용이 많음을 알 수 있었고 이러한 소견은 자궁선의 발달, 수정란의 착상, 임신의 지속작용과 관련이 있기 때문으로 사료된다.

또 같은 면적에서 기질세포와 근세포의 양성반응세포의 수를 비교한 바, 기질세포는 근세포 보다 평균 4.6배나 높았다. 이러한 결과는 육안적 소견에서와 같이 근세포는 progesterone에 의해 서서히 증식하여 자궁을 증대시키고 기질세포는 estrogen에 의해 빠르게 증식하여 자궁의 증대에 주역할을 하는 것을 알 수 있었고 암컷의 발정주기에 따라 자궁내막의 탈락부위의 재생에도 estrogen이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되었다.

분열세포의 규명은 <sup>3</sup>H-Tdr를 이용한 방사선자기법<sup>12,13,23,24</sup>이 많이 응용하여 왔으나 근래에는 면역조직화학적 방법이 발달되고 각종 항체가 상품화 됨에 따라 BrdUr 항체<sup>11,13-22,25,26</sup> PCNA 항체<sup>11,19</sup> Ki 67<sup>11,19,32</sup> 등을 이용하여 정상적인 조직의 발달, 각종 암의 발생과 치유, 상처치유 등의 연구에 응용되고 있다. 이들 중에 PCNA에 대한 단

크론성 항체로서 분열세포를 규명하는 것은 <sup>3</sup>H-Tdr이나 BrdUr 항체를 이용하는 것보다 분열세포 대상의 범위가 넓어 그 수가 많고 또 PCNA는 모든 세포의 분열시 핵에 나타나는 단백질인 Ki 67에 대한 항체 보다도 양성세포율이 높다고 한다. 그 예로서 양성반응세포의 지수(%)는 Allegranza *et al*<sup>11</sup>은 사람의 astrocytoma에서 BrdUr는 1.6%, Ki 67은 2.01%, PCNA는 3.2%였다고 하였고, Shibuya *et al*<sup>9</sup>는 뇌하수체의 Adenoma에서 BrdUr 양성세포는 0.5%±0.1%, Ki 67은 0.1±0.2%였고, PCNA 1.1±0.2%였다고 한 바 있다. 반면에 Dawson *et al*<sup>27</sup>은 사람의 종양에서 PCNA 보다 Ki 67의 양성세포가 더 많았다고 보고한 바 있다.

본 조사에서는 PCNA의 양성반응세포만을 조사하였으므로 BrdUr 항체나 Ki 67의 항체에 대한 결과 보다 차이가 있는 것으로 사료되지만 성주기에 따른 자궁조직세포의 증식율은 위의 각종 종양세포보다도 더 높은 것으로 사료되었다.

국내에서는 본 PCNA 항체의 응용예를 찾아볼 수 없어 새로운 흥미로운 비교 연구과제의 제시로 사료된다.

## 결 론

Rat의 자궁에서 progesterone과 estrogen이 미치는 영향을 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 항체를 응용하여 조사코사 난소를 절제한 rat를 progesterone 투여군, estrogen 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 등<sup>4</sup>군으로 구분하여 처리한 후, 자궁을 육안적으로 관찰하고 PCNA 양성반응세포를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

1. 육안적으로 estrogen 투여군은 자궁의 크기가 현저히 증가되었고 progesterone 투여군은 자궁의 크기의 증가에 영향이 적었다.

2. 조직학적으로 hormone 투여군별, 세포종별로 PCNA 양성반응세포의 출현이 많은 순서는 자궁내막의 기질세포는 estrogen 투여군, progesterone 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 순이었고, 근세포는 progesterone 투여군, estrogen 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군 순이었으며 단위면적당 양성반응세포의 수는 기질세포는 근세포 보다 전체 평균 4.6배 높았다. 이로 보아 자궁크기의 증대에 영향은 hormone별로는 estrogen이 progesterone보다 더 많았고 세포별로는 기질세포가 근세

포 보다 더 많았다.

3. 자궁내막 관강표면 상피세포의 PCNA 양성세포의 출현이 많은 순서는 progesterone 투여군, estrogen+progesterone 투여군, 대조군, estrogen 투여군 순이였고, 자궁내막내 선상피세포는 estrogen+progesterone 투여군, pro-

gesterone 투여군, 대조군, estrogen 투여군 순으로 estrogen과 progesterone은 관강표면상피의 증식에는 영향이 적었고 선상피의 발달에는 estrogen보다 progesterone의 영향이 더 많았다.

### Legends for figure

Fig 1. PCNA positive reaction cells of stromal cells and glandular epithelial cells in the uterus of progesterone-treated group are seen. Immunohistochemical stain.  $\times 40$ .

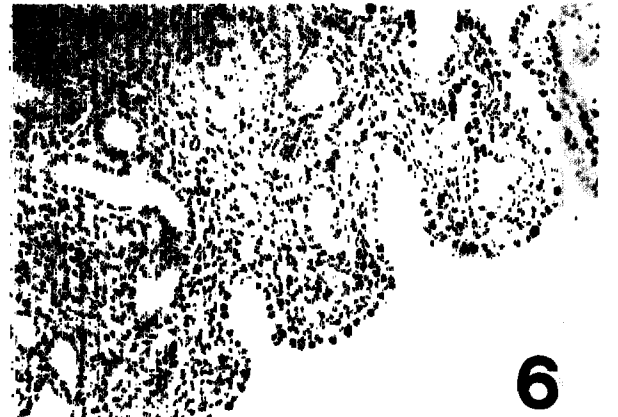
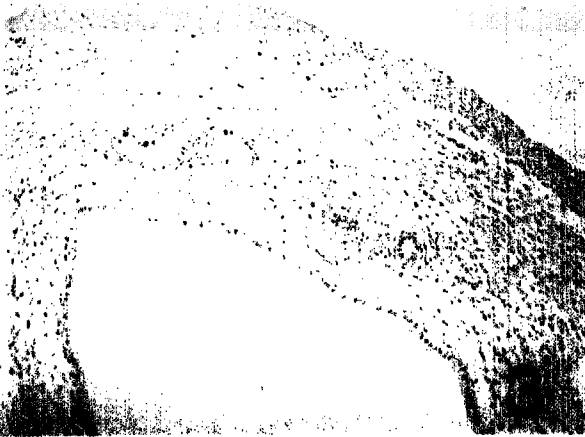
Fig 2. Higher magnification in figure 1. Immunohistochemical stain.  $\times 100$ .

Fig 3. PCNA positive reaction cells are seen in the endometrium of the uterus of estrogen-treated group. Immunohistochemical stain.  $\times 40$ .

Fig 4. Higher magnification in figure 3. Immunohistochemical stain.  $\times 100$ .

Fig 5. PCNA positive reaction cells of stromal cells of the endometrium and luminal epithelial cells are seen in the uterus of estrogen+progesterone-treated group. Immunohistochemical stain.  $\times 40$ .

Fig 6. Higher magnification in figure 5. Immunohistochemical stain.  $\times 100$ .



## 참고 문헌

1. Hild-Petito S, Stouffer RL, Brenner RM, *et al.* Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology*, 123:2896-2905, 1988.
2. 윤창현, 민관식, 장규태 등. 한국재래산양 분만의 인위적 조절에 관한 연구. I. Progesteron F<sub>20</sub> 투여에 의한 분만유기 효과. 가축번식학회지, 15:109-115, 1991.
3. Hild-Petito S, Verhage HG, Fazleabas AT, *et al.* Immunocytochemical localization of estrogen and progesterin receptors in the Baboon (*Papio anubis*) uterus during implantation and pregnancy. *Endocrinology*, 130:2343-2353, 1992.
4. Okulicz WC, Savasta AM, Hoberg LM, *et al.* Biochemical and immunohistochemical analyses of estrogen and progesterone receptors in the rhesus monkey uterus during the proliferative and secretory phases of artificial menstrual cycles. *Fertil Steril*, 53: 913-920, 1990.
5. Perrot-Applanat M, Logeat F, Groyer-Picard MT, *et al.* Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology*, 116:1473-1484, 1985.
6. Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology*, 123:1511-1519, 1988.
7. Press MF, Greene GL. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterin receptors. *Endocrinology*. 122:1165-1175, 1988.
8. Press MF, Udove JA, Greene G. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Am J Pathol*, 131:112-124, 1988.
9. So AG, Downey KM. Mammalian DNA polymerases  $\alpha$  and  $\delta$ : Current Status in DNA Replication. *Biochemistry*, 27:4591-4595. 1988.
10. West NB, McClellan MC. Immunocytochemistry versus binding assays of the estrogen receptor in the reproductive tract of spayed and hormone treated macaques. *Endocrinology*, 21:1789-1800, 1987.
11. Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 419:417-23, 1991.
12. Lacy ER, Kuwayama H, Cowart KS. A rapid, accurate, immunohistochemical method to label proliferating cells in the digestive tract. A comparison with tritiated thymidine. *Gastroenterology*, 100:259-262, 1991.
13. Ohmori K, Hong Y, Fujiwara M. In situ demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence suggesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organ. *Lab Invest*, 66:54-62, 1992.
14. Shibuya M, Ito S, Davis RL. A new method for analyzing the cell kinetics of human brain tumors by double labelling with bromodeoxyuridine in situ and with iododeoxyuridine *in vitro*. *Cancer*, 71:3109-3113, 1993.
15. 박수동. 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의分裂과移動에 대하여. 대한수의학회지, 32:489-496, 1992.
16. Chiras DD, Greenwald GS. Analysis of ovarian follicular development and thymidine incorporation in the cyclic golden hamster. *Anat Rec*, 157:309-317, 1980.
17. Potten CS, Kellet M, Roberts SA. Measurement of *in vivo* proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut*, 33:71-78, 1992.
18. Raza A, Spiridonidis C. Double labeling of S-phase murine cell with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. *Cancer Research*, 45:2283-2287, 1985.
19. Risio M, Coverlizza S, Ferrari A. Immunohistochemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the large bowel. *Gastroenterology*, 94:899-906, 1988.



20. Schutte B, Reynders MJ. Studies with anti-bromodeoxyuridine the antibody: Simultaneous immunohistochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem*, 35:371-374, 1987.
21. Soriano E, Del JA. Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J Histochem Cytochem*, 39:255-63. 1991.
22. Thoolen B. Brdurd labeling of S-phase cells in testes and small intestine of mice, using microwave irradiation for immunogoldsilver staining; An immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem*, 38(2):267-273. 1990.
23. Yuasa S, Kawamura K, Ono K. Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat Embryol*, 184:195-212, 1991.
24. 광수동. 家畜 및 實驗動物 消化管腺의 構造에 관한 연구. II. 哺乳 mouse 腸粘膜炎의 細再生 週期에 대하여. *대한수의학회지*, 32:1-6, 1992.
25. 광수동, 박성식, 강원화. Anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody를 이용한 랫드 胃와 腸의 분열 상피세포의 분포에 관하여. *대한수의학회지*, 33(4): 597-603, 1993.
26. 광수동, 김종섭, 강정부. 닭의 대퇴부 골단조직의 세포증식에 대한 면역조직화학적 관찰. *대한수의학회지*, 34(2):237-242.5, 1994.
27. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol*, 136:1115-1124, 1990.
28. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol*, 134:733-739, 1989.
29. Toschi L, Bravo R. Changes in Cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol*, 107:1623-1628, 1988.
30. 김곤섭, 한수남. Estradiol-17 $\beta$ 를 처리한 쥐뇌에 있어서 cAMP phosphodiesterase 특성에 관한 연구. *서울수의대논문집*, 11:23-39, 1986.
31. 윤창현, 성환우. 한국 재래산양 분만의 인위적 조절에 관한 연구. IV. Dexametasone 단독 및 Estradiolbenzoate와의 병용투여에 의한 분만유기 효과. *가축번식학회지*, 16:231-237, 1992.
32. Tsujihashi H, Nakanishi A, Matsuda H. Cell proliferation of human bladder tumors determined by Bromodeoxyuridine and ki-67 immunostaining. *J Urol*, 145:846-849, 1991.