

거세로 유도된 흰쥐 전립선의 Apoptosis

동국대학교 의과대학 병리학교실, ¹계명대학교 의과대학 병리학교실

김 기 권 · 이 상 숙¹

Castration-induced Apoptosis in the Rat Prostate

Ki Kwon Kim and Sang Sook Lee¹

Department of Pathology, College of Medicine, Dongguk University, Kyungju 780-714, Korea

¹Department of Pathology, College of Medicine, Keimyung University

This study was carried out to investigate the morphologic findings and process of castration-induced apoptosis in the rat prostate. The experimental group was treated with bilateral orchiectomy followed by sequential sacrifices at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 days and 2, 3 weeks (6 rats, respectively). Ventral prostate was extirpated and examined by light microscopic and immunohistochemical, ultrastructural observation. Apoptotic index increased by 4 days after castration and decreased thereafter. ApopTag stain revealed brownish granular pattern in the nucleus of apoptotic cells. DNA fragmentation rate was 0.5% in the control group and began to increase by 1 day after castration and reached to 11.1% by 4 days and decreased thereafter. PCNA stain showed brownish granular pattern in the nucleus of some epithelial cells of the prostatic glands. PCNA labelling index was 2.4% in the control group and reached peak by 3 days after castration and decreased thereafter. Electron microscopically, there was chromatin condensation with margination toward the nuclear membrane by 1 day after castration. Also noted were condensation of cytoplasm, dilatation of RER and nuclear fragmentation. Apoptotic bodies were formed and phagocytosed by adjacent cells and some apoptotic bodies were found in the lumen of acini.

Based on these results, it can be concluded that castration-induced prostatic involution is the result of apoptosis. Detection of DNA fragmentation with ApopTag is a more accurate method to identify not only apoptotic body formation itself but also the previous step of apoptotic body formation. PCNA labelling index to identify the cellular proliferation seems to play an active role in the early step of apoptosis and be a good tool for investigation of apoptosis. (Korean J Pathol 1998; 32: 431~442)

Key Words: Prostate, Apoptosis, Castration, PCNA

서 론

Apoptosis는 괴사와는 다르게 능동적이며 계획된 방법에 의한 세포사의 한 형태로 Kerr등¹에 의해 처음 제시된 이후 지금까지 많은 연구가 되어 왔다. Apoptosis

는 다양한 생리적 및 병리적 현상에서 관찰되는데 특히 배형성과정과 자궁내막 등의 호르몬에 의한 위축, 장상피와 같이 증식하는 세포들의 소실, 종양세포와 면역세포에서의 세포사 그리고 췌장 등과 같은 실질장기의 도관결찰에 의한 병적위축과 거세 후의 전립선의 위축 등에서 관찰할 수 있다.¹⁻³ Apoptosis는 세포질 칼슘의 증가에 의해 Ca²⁺-Mg²⁺ endonuclease가 활성화되고 이로 인해 핵내 DNA가 분절되며 transglutaminase가 활성화되어 수용체 매개에 의한 apoptotic body의 탐식이 일어나게 되고 이 과정에서 유전자의 활성화와 단백질합성이 필

접 수: 1998년 1월 30일, 게재승인: 1998년 4월 1일

주 소: 경주시 석장동 707번지, 우편번호 780-714

동국대학교 의과대학 병리학교실, 김기권

ISSN : 0379-1149

요하게 된다.⁴⁻⁷ Heat-shock protein이나 proto-oncogene 등과 같이 apoptosis를 일으키는 자극에 의해 유도된 유전자들은 apoptosis의 발생과 직접적인 관계가 없다. 그러나 ced-3과 ced-4 그리고 ced-9 유전자 등은 직접적으로 apoptosis를 자극하거나 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸ 그리고 암유전자나 항암유전자중에서도 apoptosis의 유도에 조절작용을 하는 것으로 알려져 있는 유전자들이 있는데 대표적인 것으로 bcl-2, c-myc과 p53 등이 있으며 이들 중 bcl-2는 호르몬이나 cytokine 등에 의해 유도된 apoptosis를 방해하여 세포의 수명을 연장시키고^{9,10} c-myc은 apoptosis를 자극하거나 bcl-2 등의 유전자가 있을 경우에는 세포를 성장시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{11,12} 그리고 p53은 wild type일 경우에는 apoptosis를 자극하지만 mutant type일 경우에는 세포수명을 연장시키는 역할을 하며 방사선 조사로 인한 DNA 손상 후에 발생하는 apoptosis에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{13,14}

전립선에 있어서 androgen은 세포사를 억제하는 역할을 하고 세포증식에는 상승작용을 한다.¹⁵ 거세 후 androgen의 감소로 인해 전립선에서 발생하는 생화학적 변화는 먼저 전립선 선방의 상피세포의 핵에 있는 androgen 수용체가 급속히 감소하고 12시간이 지나면 핵에서 발견되지 않는다. 그 후 핵 DNA가 1000 bp 이하의 저분자량 nucleosomal oligomer로 분절되며 component nucleotide로 완전히 소화된다.¹⁶ 그리고 단백질과 RNA, DNA 등의 감소와 이와 동반되어 발생하는 일부 RNA와 단백질 subclass의 합성의 증가와 수분의 흡수 및 apoptotic body의 출현 등이 있다.¹⁷ Apoptosis로 인한 DNA 분절은 nucleosome 사이에 있는 linker DNA의 분할에 의해 생기고 보통 약 180 bp 정도의 multimer로 구성되며 염색질의 약 30%에서 발견이 되며¹⁸ 거세 후 4일경에는 전체 핵 DNA의 15% 정도가 저분자량의 분절로 추출된다.¹⁶ 이 apoptotic cell에서 추출된 DNA로 agarose gel electrophoresis를 했을 경우 특징적으로 DNA laddering을 나타낸다.^{16,18,19} 최근에는 본 실험에서 사용한 ApopTag과 같이 면역조직화학법에 의해 분절된 DNA를 검출하는 방법이 개발되었다.²⁰

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)는 DNA polymerase- δ 의 보조단백으로서 증식하는 세포에서 증가하며 특히 S기동안 현저히 증가하는 것으로 알려져 있으며²¹⁻²⁴ 최근 apoptosis와 세포주기와의 관계 및 PCNA에 대한 연구^{25,26}가 활발하게 진행되고 있다.

Helminen등²⁷에 의해 거세로 인한 전립선의 위축에 대한 전자현미경적 연구가 있는 후 이에 대한 많은 연구가 있었고 최근에는 immunoblotting이나 PCR 등의 분자생물학적 방법을 이용해서 apoptosis에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.^{25,28} 그러나 apoptosis의 형태학적 및 기능적 연구를 같이 한 경우는 흔하지 않다.

이에 저자는 상기한 문헌적 지견들을 기반으로 하여 백서수컷을 거세한 후 전립선 선방의 상피세포에서 apo-

ptosis가 발생하는 양상을 광학 및 전자현미경과 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 그 형태학적 소견과 과정을 알기위해 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

일정기간 사육하여 건강이 양호하다고 생각되는 평균 300 g 정도의 Sprague-Dawley종 백서 수컷 60마리를 골라 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

실험군은 에테르 마취하에 음낭을 절개하여 양측 정삭을 절찰하고 고환을 적출한 후 절개면을 봉합한 다음술 후 1, 2, 3, 4, 5일 및 6일과 1, 2주 및 3주에 각각 6마리씩 도살하여 전립선의 전엽조직을 채취하였다. 대조군은 양측 고환을 적출한 후 즉시 도살한 동종의 백서 수컷 6마리의 전립선 전엽조직을 채취하였다.

1) 광학현미경적 관찰: 적출된 백서의 전립선 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수 및 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 박절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Apoptotic index는 병리의사 2명이 모든 군에 속한 각 동물의 전립선 전엽에서 H & E 염색상 apoptotic body가 가장 많이 관찰된 부분의 선방을 선택하여 상피세포 1000개 중 여러개의 분절된 핵과 호산성의 세포질을 가진 apoptotic body를 형성한 세포수를 2번 세어서 이것의 백분율로 정하였다.

2) ApopTag을 이용한 apoptosis의 면역조직화학적 관찰: 5 μ m 두께의 파라핀절편을 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치하였다. Xylene과 계열 알코올로 탈파라핀 및 함수를 한 후 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 수세하였다. 그 후 조직절편내의 단백질을 소화시키기 위해 proteinase K로 15분간 처리한 후 증류수로 수세하고 equilibration buffer (Oncor, U.S.A.)를 가하여 10분간 실온에서 방치하였다. 그 후 working strength terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (Oncor, U.S.A.)를 가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 working strength stop/wash buffer (Oncor, U.S.A.)에 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 PBS에 수세한 후 anti-digoxigenine-peroxidase (Oncor제, U.S.A.)를 가하여 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 PBS로 수세하고 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 10~20분간 실온에서 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 양성대조군으로는 정상 백서의 소장점막을 이용하였고 염색결과의 판독은 핵에 갈색으로 진하게 염색된 것을 양성으로 간주하였다. 음성대조는 TdT 효소 대신에 물을 사용하여 위와 동일한 과정으로 염색하였다.

DNA 분절률은 apoptotic index와 같은 방법으로 전립

선 선방의 상피세포 1000개중 핵이 ApopTag에 분명하고 진한 갈색으로 염색된 세포수의 백분율로 정하였다.

3) PCNA를 이용한 면역조직화학적 관찰: 거세 후 전립선 선방의 상피세포증식능을 관찰하기 위해 PCNA (PC10, Novocastra, U.K.)항체를 사용하여 면역조직화학적 검사를 시행하였다. 5 μ m 두께의 파라핀절편을 유리 슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간동안 방치한 후 xylene과 계열알코올로 탈파라핀 및 합수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 PBS로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 인해 조직 내에 감추어진 항원을 노출시키기 위해 0.01 M citrate buffer, pH 6.0 용액에 담구어 microwave 오븐을 이용하여 5분간 가열하였다. 실온에서 20분동안 식힌 후 30분간 normal horse serum (Vectastain Elite kit)을 가한 후 일차항체인 PCNA 단클론 항체를 1:500으로 희석하여 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 그 후 PBS로 수세하고 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain Elite kit)를 가하여 37°C에서 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. ABC (Avidin-biotin peroxidase complex, Vectastain Elite kit, USA)를 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB로 5~10분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 양성대조로는 사전 실험에 의해 PCNA의 발현이 증명된 자궁경부의 편평상피암조직을 이용하였고 염색결과 판독은 핵에 진한 갈색으로 염색된 것을 양성으로 간주하였다. 음성대조는 일차항체 대신 PBS를 사용하여 위와 동일한 과정에 의해 염색하였다.

PCNA labelling index (LI)는 전립선 선방의 상피세포 1000개중 핵이 PCNA에 갈색으로 진하고 분명하게 염색된 세포수의 백분율로 정하였다.

4) 투과전자현미경적 관찰: 투과전자현미경용으로 제공된 전립선조직 절편을 1×1×1 mm의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M PBS)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M PBS로 수세한 후 1% OsO₄ 용액에 2시간 후고정을 실시한 다음 동일한 완충용액으로 세척하여 계열에탄올로 탈수를 하였다.²⁹ Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법³⁰에 의한 epon혼합물로 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μ m 두께로 박절하여 toluidine blue염색을 하여 관찰부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색 (40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson³¹ 및 Reynolds방법³²에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

5) 주사전자현미경적 관찰: 주사전자현미경적 관찰을 위한 전립선 조직을 1×1×4 mm의 크기로 자른 후 일부조직은 dimethyl sulfoxide (DMSO) 할단면 관찰을 위

하여 또 일부조직은 세포내 미세구조물을 관찰하기 위하여 aldehyde-prefix O-D-O방법^{33,34}으로 침연 (maceration)을 하였다. DMSO 할단면 관찰을 위하여 절취된 조직을 1일간 0.5% glutaraldehyde용액과 0.5% paraformaldehyde용액을 혼합한 고정액에 더 고정한 후 1% OsO₄ 용액으로 2시간 동안 후고정을 하고 0.1 M PBS 용액으로 수세한 후 25% DMSO용액에 30분간, 50% DMSO용액에 30분간 담근 다음 액체질소로 동결한 후 조직을 할단하였다. 할단된 조직을 50% DMSO용액에 녹여서 같은 완충용액에 수세한 후 2% tannic acid에 12시간 침투시킨 다음 완충용액으로 수세한 후 1% OsO₄ 용액으로 2시간동안 전도염색 (conductive staining)을 한 후 계열에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로서 침투를 시켜 Hitachi HCP-2형 임계점건조기 (critical point dryer)로 액체 이산화탄소를 사용하여 임계점건조를 실시하였다. 건조된 시료를 시료판에 부착한 후 Eiko회사제 IB-3형 이온증착기 (ion-coater)로 Pt-Pd를 사용하여 증착한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다. 침연을 위하여 절취된 시료는 1% OsO₄ 용액으로 30분간 후고정을 한 후 위와같은 방법으로 할단하여 다시 1% OsO₄ 용액으로 30분간 거친 후 0.1% OsO₄ 용액으로 20°C에서 약 72시간동안 침연한 다음 전도염색부터는 할단면 시료제작과정과 동일한 방법으로 처리한 후 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경적 소견

백서 전립선의 선방은 한층의 원주상피로 구성되어 있었고 주위의 느슨한 결합조직에 의하여 분리되어 있었으며 apoptotic body가 상피세포에서 드물게 관찰되었다.

거세 후 1일째 부터 전립선 선방의 크기가 감소하여 3일째에는 현저하게 작아진 것이 관찰되었으며 이때 선방이 위축되고 복잡한 구조를 나타내었다. 전립선 선방의 상피세포는 거세 후 4일째부터 원주상피에서 입방상피로 바뀌기 시작하여 14일째에 뚜렷이 관찰되었다. 주위 간질의 섬유화는 4일째부터 관찰되었으며 시간이 경과할수록 증가하여 7일째부터는 분명하게 관찰되었다. Apoptotic body는 여러개의 분절된 핵과 호산성의 풍부한 세포질로 구성되어 있으며 대부분 상피세포의 기저부에서 관찰되었고 (Fig. 1) 선방의 관강에서도 관찰되었다.

Apoptotic index는 대조군의 경우 0.2%였으나 실험군의 경우 2일째부터 4.5%로 급격히 증가하여 4일째에는 7.0%로 최고치를 이루었고 5일째까지 비슷한 수치를 보이다가 그 후 급격히 감소하여 7일째부터는 대조군과 비슷한 수준을 유지하였다 (Fig. 4).

2. ApopTag을 이용한 DNA 분절률의 검색

ApopTag에 의한 염색은 전립선 선방의 상피세포의 핵과 apoptotic body에 미만성 혹은 과립상으로 염색되

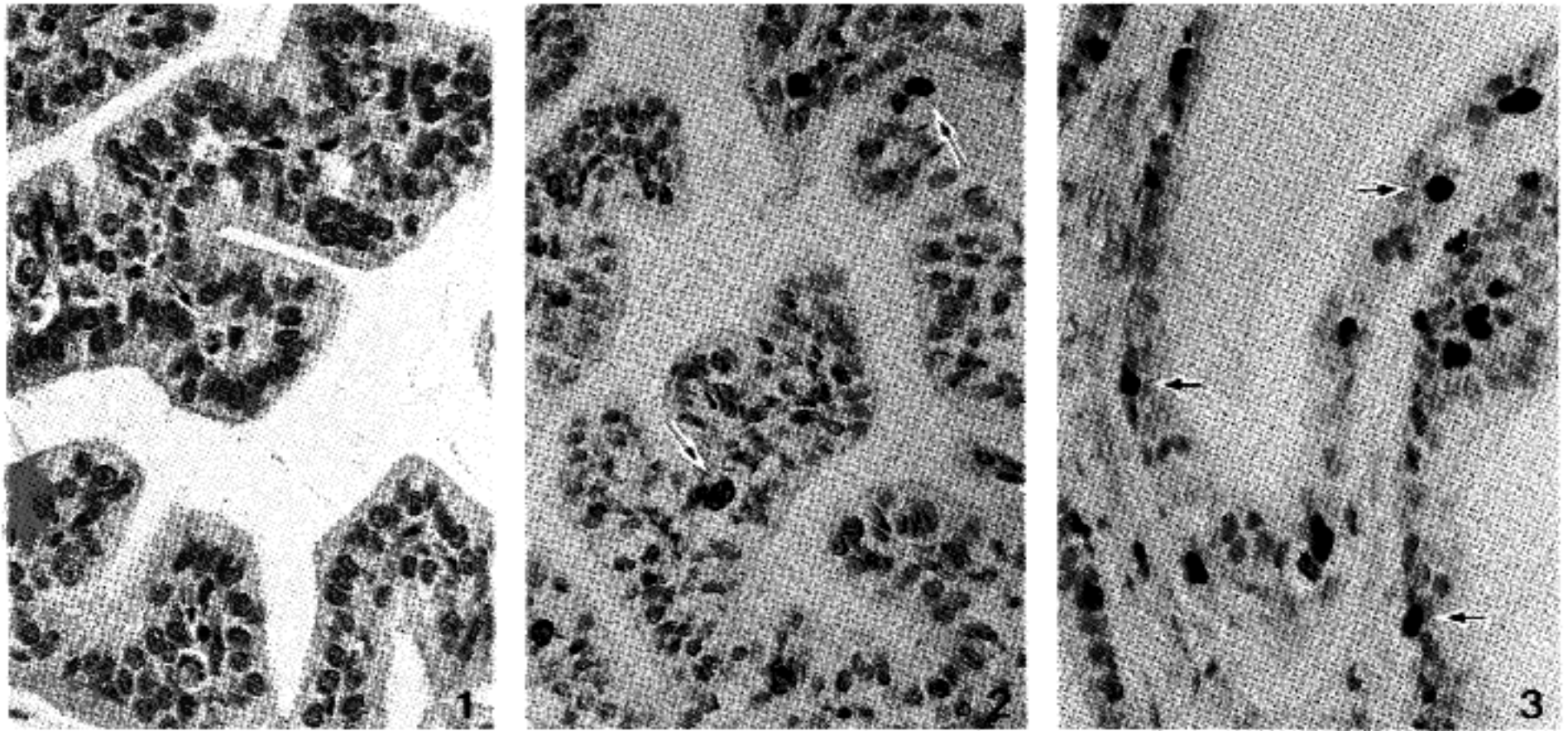


Fig. 1. Prostate of a rat killed 4 days after castration. There are any apoptotic bodies amongst the shrunken acinar epithelial cells.

Fig. 2. Immunohistochemical staining for ApopTag demonstrates strong positive reaction in the apoptotic bodies and nucleus of epithelial cells of the prostate after castration.

Fig. 3. Immunohistochemical staining for PCNA reveals strong positive reaction in the nucleus of epithelial cells of the prostate after castration.

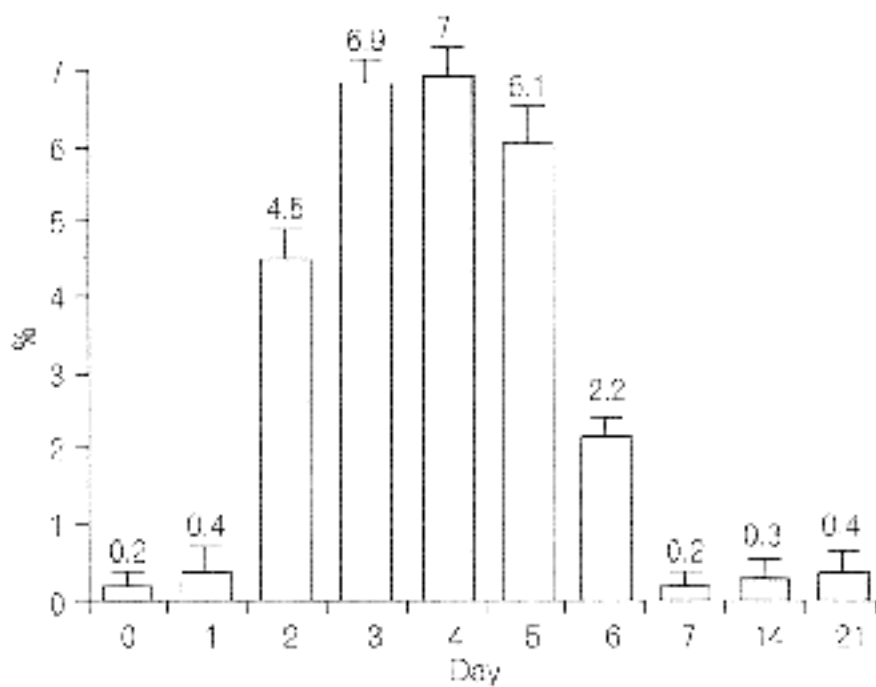


Fig. 4. Apoptotic index of prostate after castration.

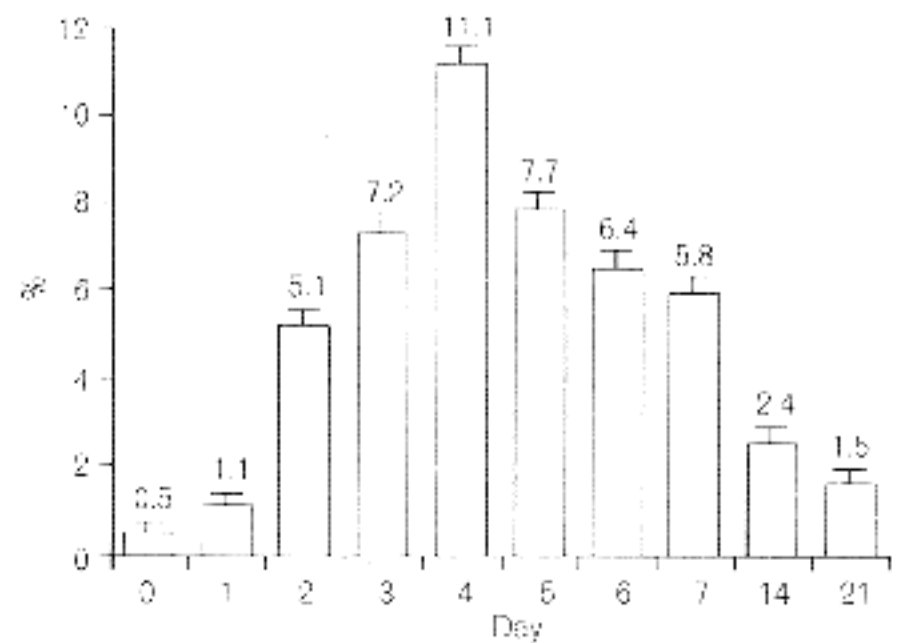


Fig. 5. DNA fragmentation rate of prostate after castration.

었으며 이들중 상피세포의 핵과 apoptotic body에 과립상의 진한 갈색으로 염색된 것을 양성으로 판정하였다 (Fig. 2).

DNA 분절률은 대조군에서는 0.5%이었으나 실험군에서는 거세 후 1일째부터 1.1%로 증가하여 4일째에는 11.1%로 가장 많이 증가하였으며 그 후 점진적으로 감소하여 14일 이후부터는 2.4% 이하였다 (Fig. 5).

3. 면역조직화학적 방법에 의한 PCNA 표지 지수

PCNA 염색은 전립선 선방의 상피세포의 핵에 과립상 또는 비만상으로 염색되었으며 이중에서 과립상의 진한 갈색으로 염색된 것을 양성으로 판정하였다 (Fig. 3). 그러나 apoptotic body에는 염색이 되지 않았다. PCNA 표지 지수는 대조군에서는 2.4%이었으나 실험군에서는 거세 후 서서히 증가하여 3일째에 8.1%로 최고치를 나타

내었고 14일째에는 1.9%로 대조군 보다도 더 감소하였다 (Fig. 6).

4. 투과 및 주사 전자현미경적 소견

1) 대조군: 백서전립선의 선방의 상피세포의 핵은 기저부에 존재하고 세포질내에는 조면세포질내세망 (RER) 과 미토콘드리아 및 골지체가 주로 관찰되었다. 상피세포들 사이에는 작은 림프구와 리소솜을 많이 함유한 대

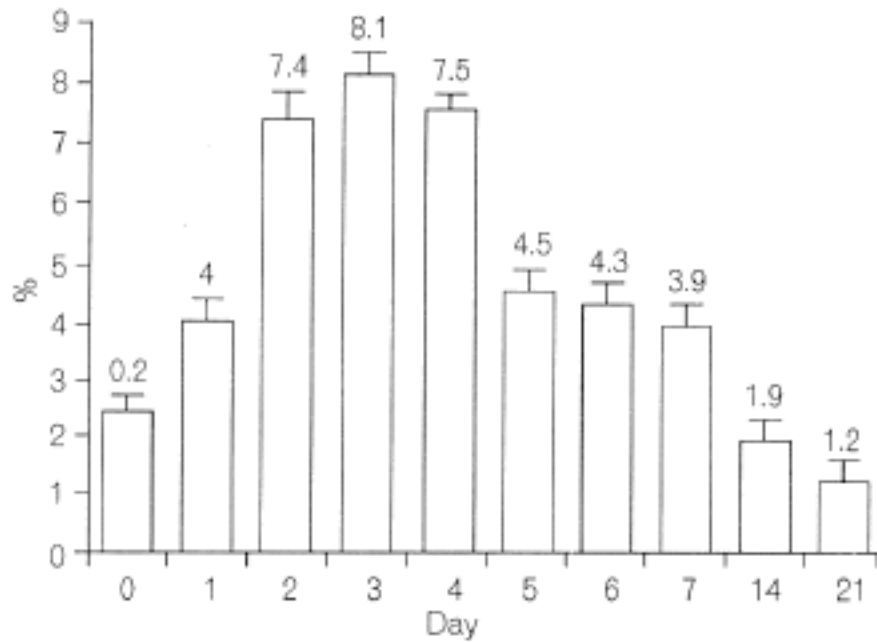


Fig. 6. PCNA labelling index of prostate after castration.

식세포가 관찰되었다.

2) 실험군: 거세 후 1일째에는 전립선 선방의 상피세포의 핵에는 이질염색질 (heterochromatin)이 핵막근처로 편재되고 핵막은 불규칙하게 되었으며 (Fig. 7), 세포질은 농축되고 RER이 확장된 소견을 보였다 (Fig. 8). 그 후 상피세포의 핵내 염색질이 농축되고 핵이 여러개로 나뉘어져서 핵 분절을 형성하고 (Fig. 9), 세포질의 농축과 분절도 관찰되었다. 그 후 시간이 경과함에 따라 막에 의하여 둘러싸인 apoptotic body가 형성되고 (Fig. 10), 이들은 세포와 세포사이 및 세포내에서 관찰되었다 (Fig. 11). 이러한 apoptotic body들은 거세 후 1일째부터 나타나기 시작하여 3일째부터는 현저하게 수가 증가되었다.

막에 의하여 둘러싸인 apoptotic body는 하나 또는 여러개의 핵 분절과 충전된 정상 소기관으로 구성되어 있었으며 (Fig. 12) 주위의 대식세포나 상피세포에 의하여 탐식된 것이 관찰되었다. 일부는 선방의 관강 (lumen)으로 빠져나와서 변성된 것도 관찰되었는데 (Fig. 13, 14) 이것은 거세 후 1일째부터 관찰되었다. Apoptotic body를 탐식한 주위세포의 세포질내에는 일차 및 이차 리소솜과 잔류체들이 관찰되었다 (Fig. 15). 14일째부터는 apoptotic body의 수가 현저히 감소하고 잔류체의 수가 증가하며 지방구가 많이 관찰되었다 (Fig. 16). 그리고 4일째부터 상피세포가 원주상피에서 입방세포로 바뀌어 세포질의 소기관들의 수가 줄어들고 핵은 주름이 잡혀

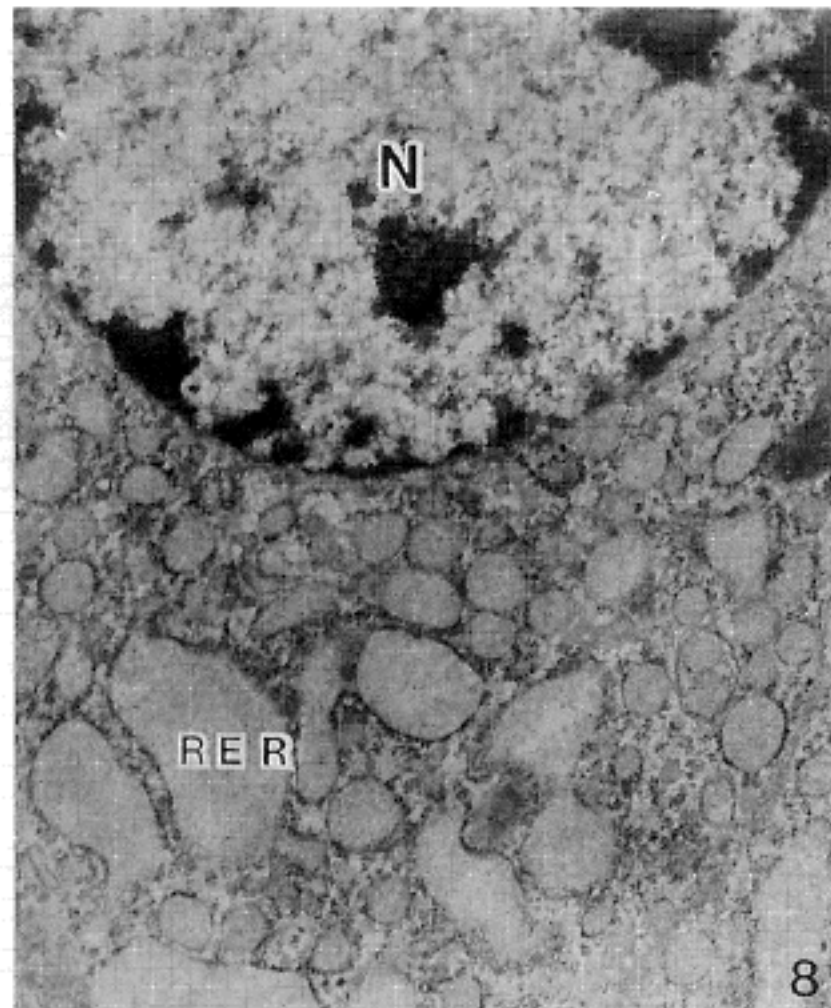
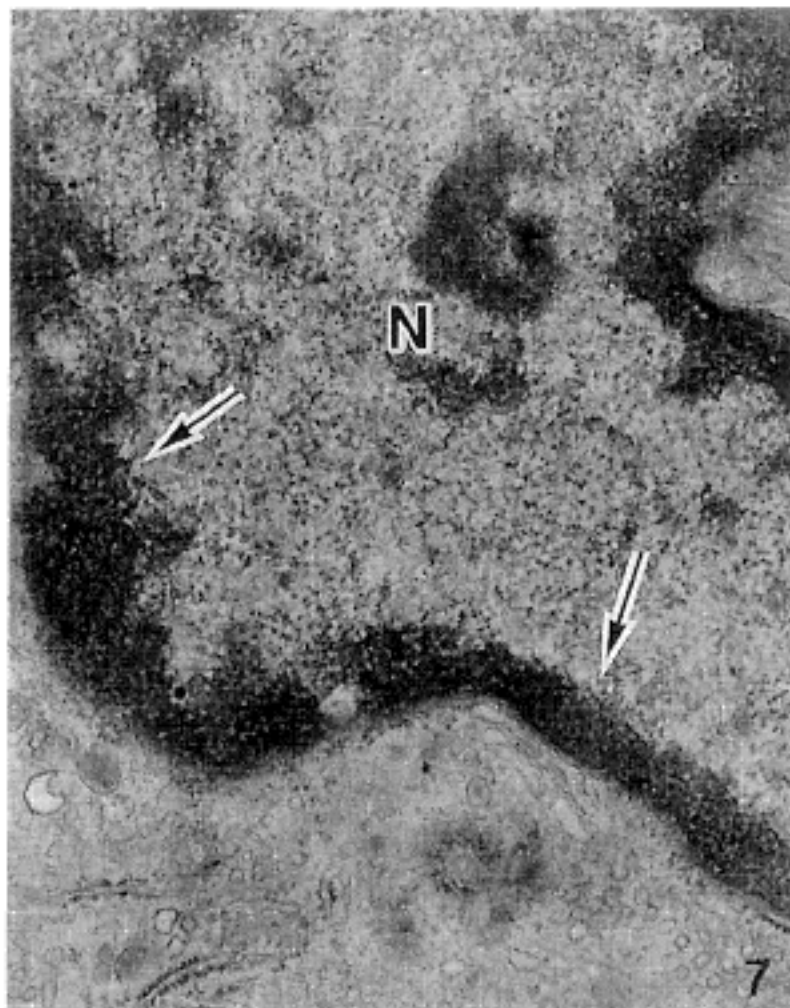


Fig. 7. Prostate of a rat killed 1 day after castration. The epithelial cell shows margination of heterochromatin (arrow) and irregular nuclear membrane ($\times 17,000$).

Fig. 8. Prostate of a rat killed 1 day after castration. The cytoplasm is condensed and reveals numerous dilated RER ($\times 12,000$).

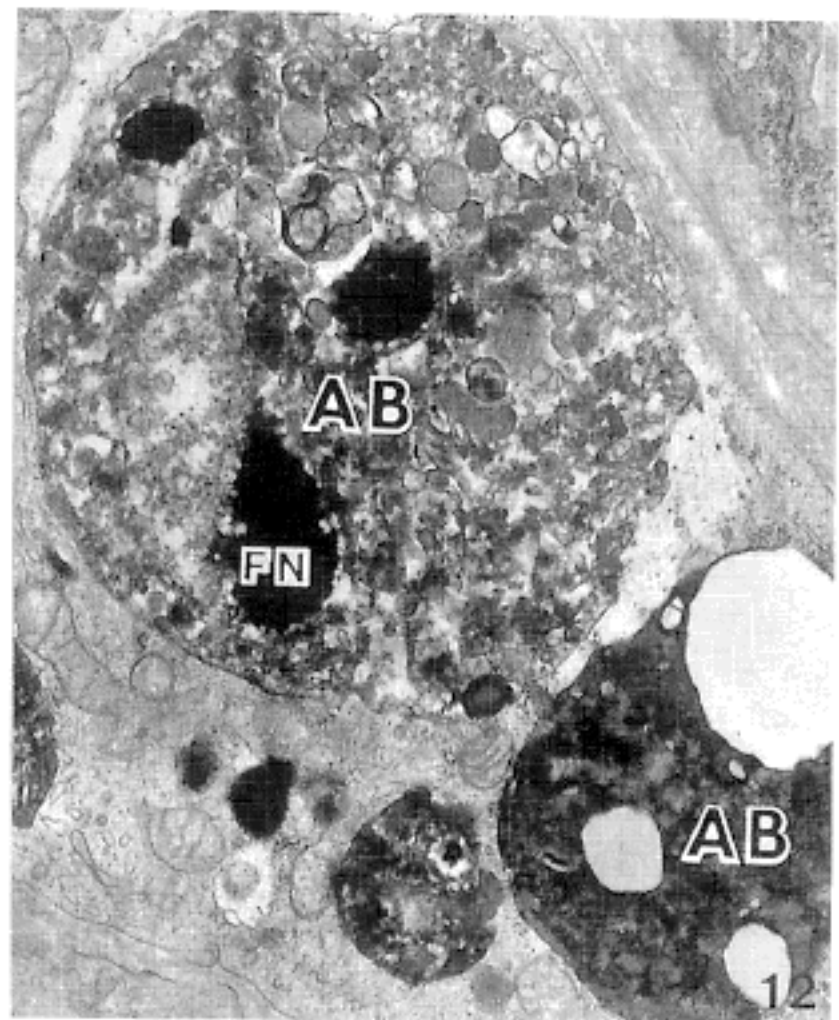
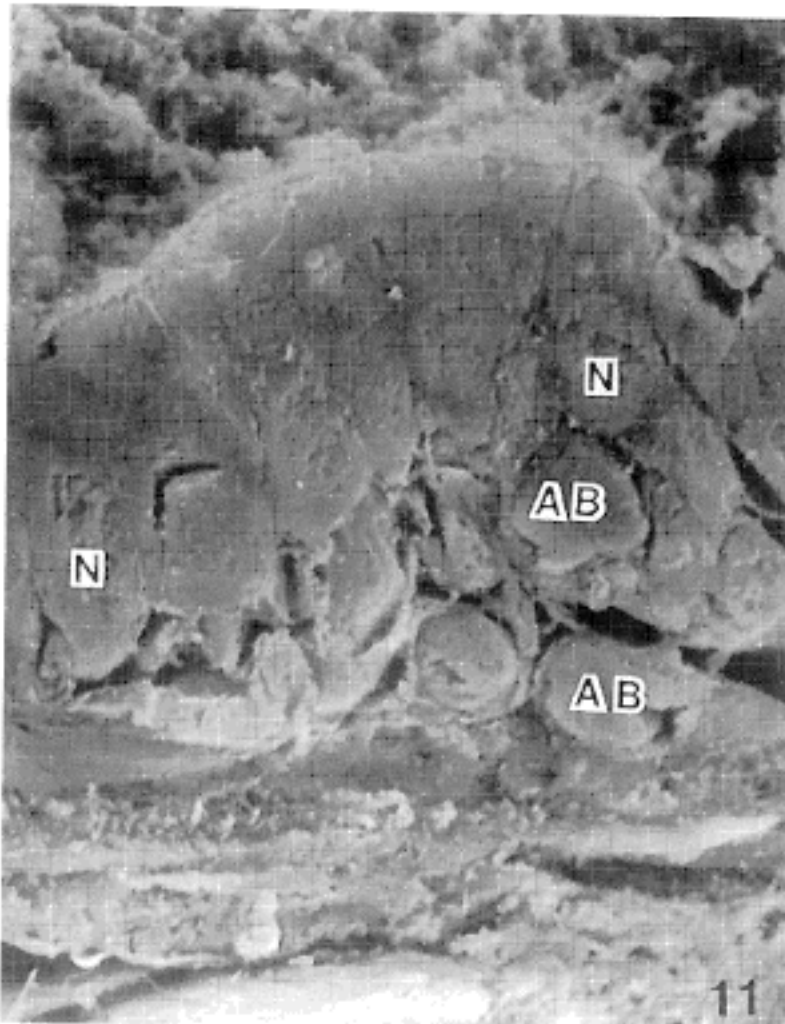
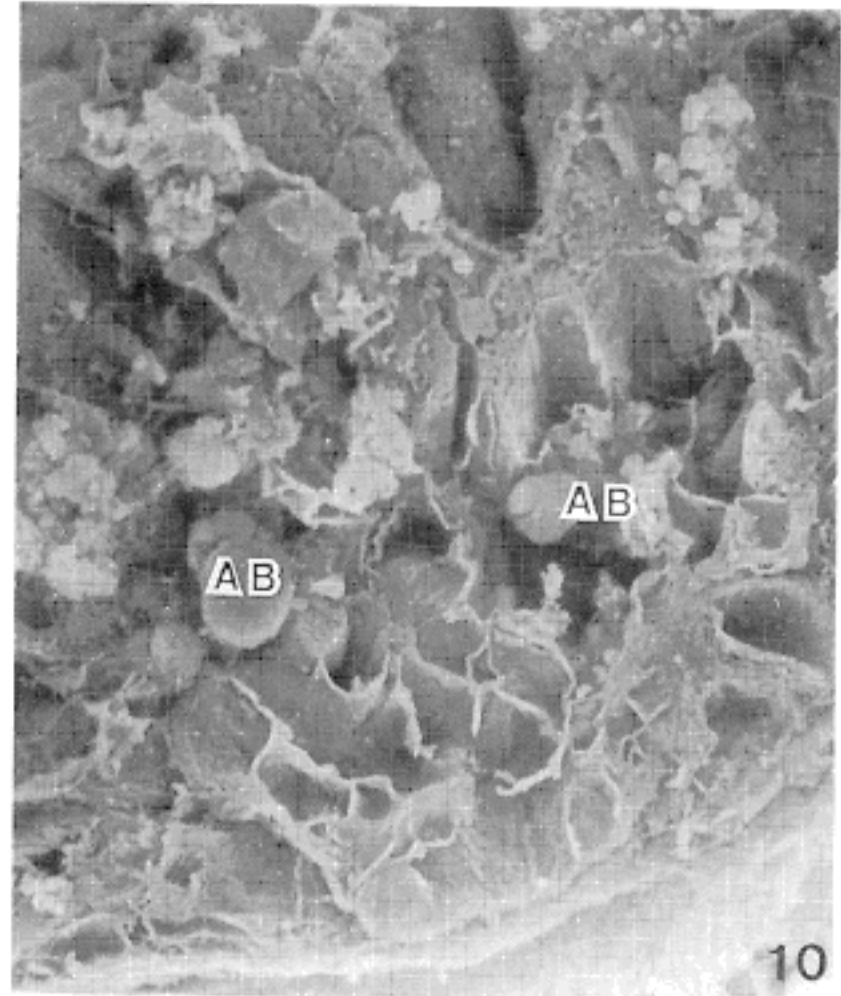
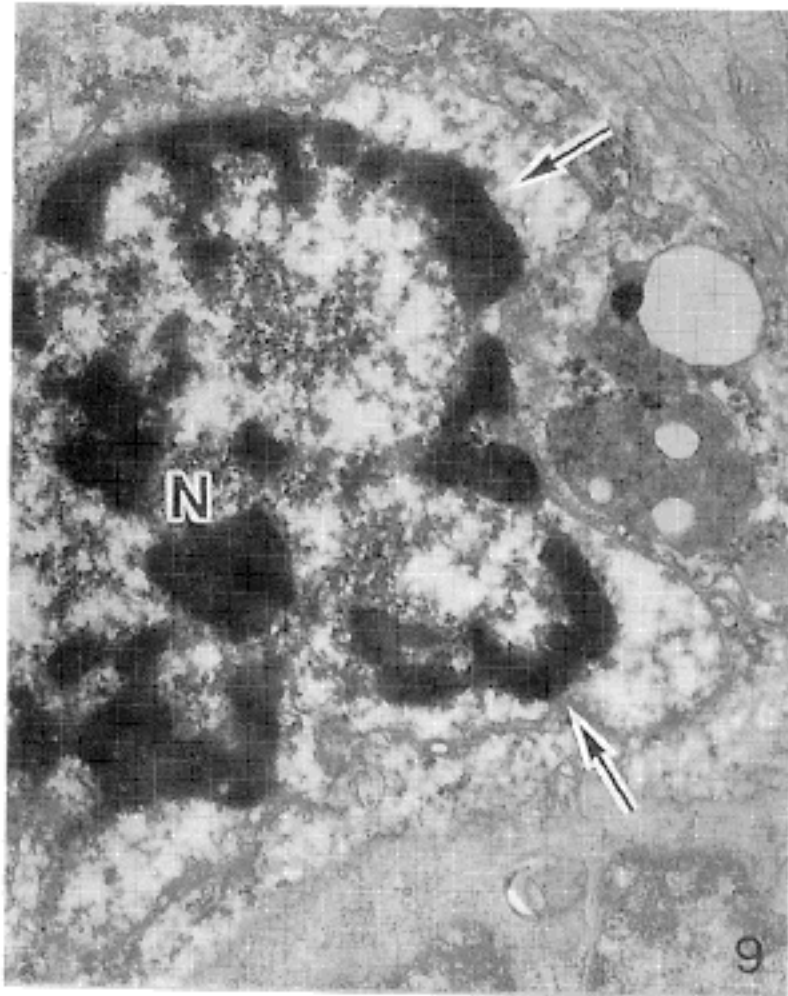


Fig. 9. Prostate of a rat killed 3 days after castration. The nucleus of epithelial cell shows condensation and fragmentation (arrow) ($\times 10,000$).

Fig. 10. Prostate of a rat killed 3 days after castration. Several membrane-bounded apoptotic bodies are noted (SEM, $\times 2,000$).

Fig. 11. Prostate of a rat killed 3 days after castration. The epithelial cells reveal intracellular and intercellular apoptotic bodies. ($\times 2,200$)

Fig. 12. Prostate of a rat killed 3 days after castration. Distinct membrane-bounded extracellular apoptotic bodies containing pyknotic nuclear fragment and intact organelles are noted amongst epithelial cells ($\times 10,000$).

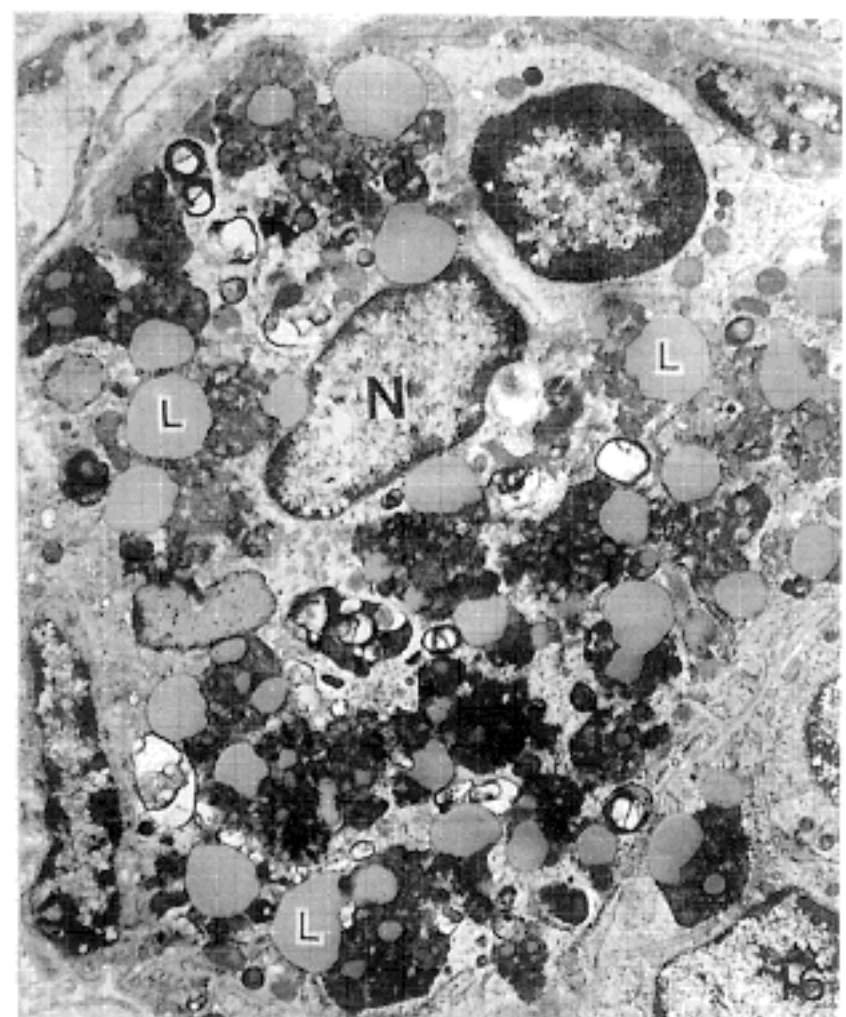
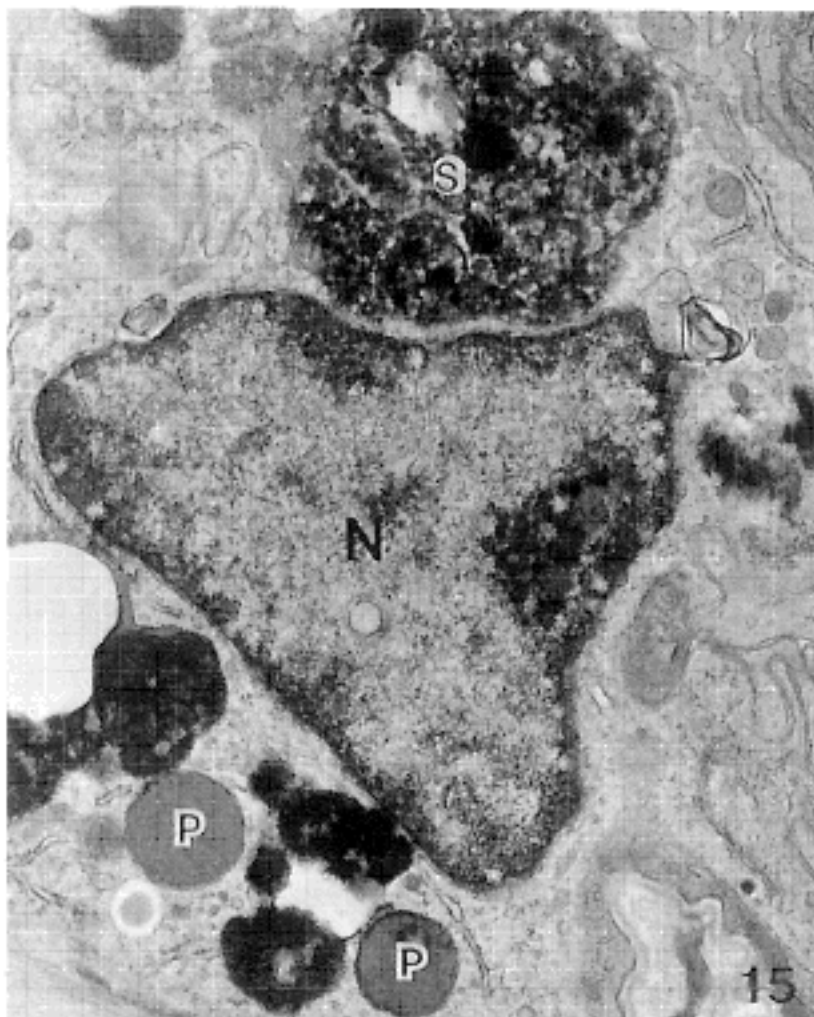
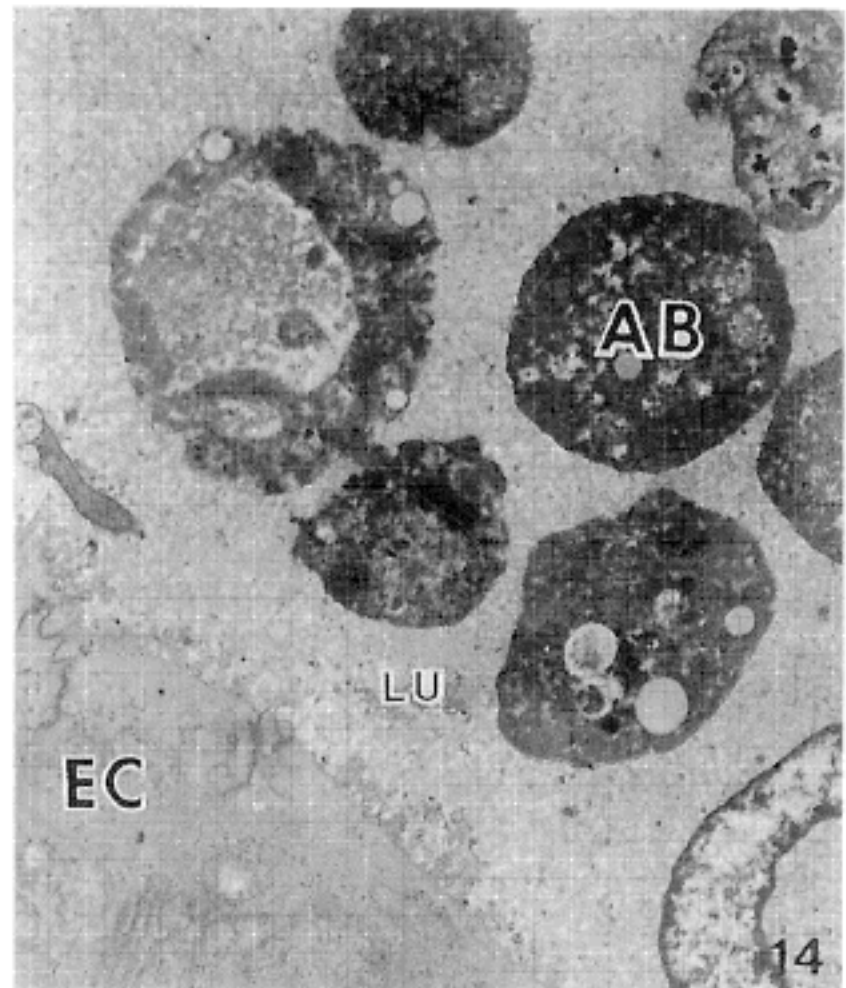
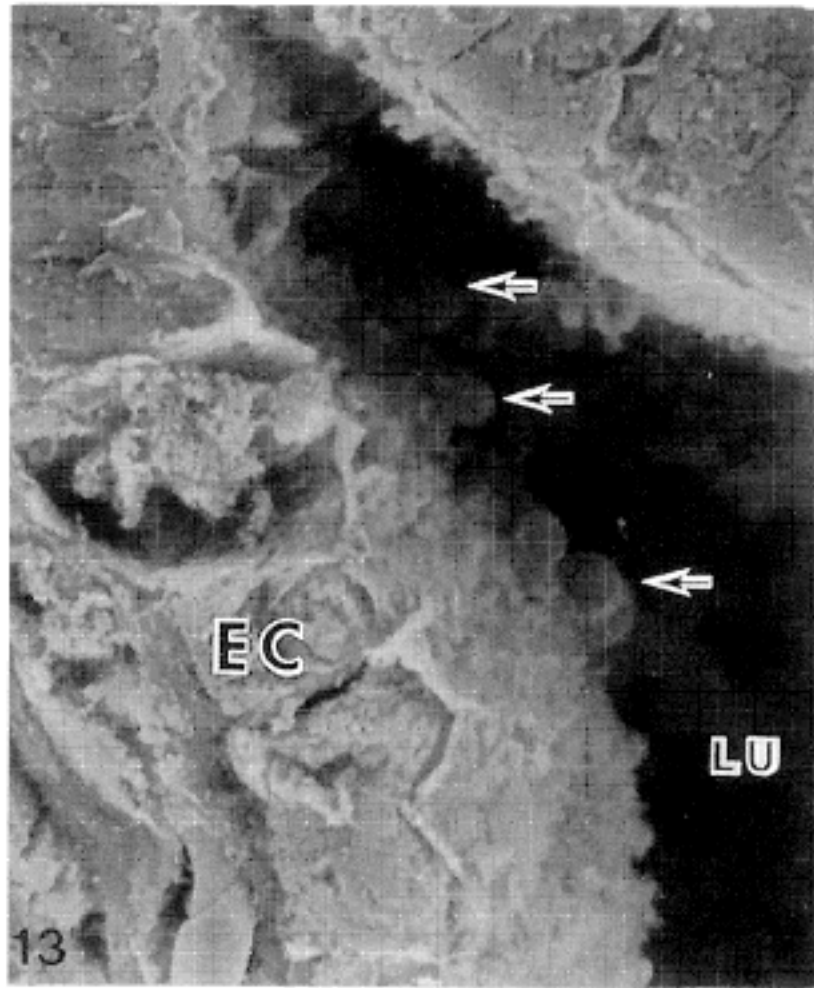


Fig. 13. Prostate of a rat killed 4 days after castration. Apoptotic bodies are noted in the lumen of acini ($\times 2,200$).
Fig. 14. Prostate of a rat killed 6 days after castration. A membrane- bounded bodies in the lumen of acini contain some dense granular ill-defined materials ($\times 5,000$).
Fig. 15. Prostate of a rat killed 2 weeks after castration. The epithelial cell shows primary and secondary lysosome in the cytoplasm ($\times 8,000$).
Fig. 16. Prostate of a rat killed 2 weeks after castration. Numerous residual bodies and lipid globules are noted in the cytoplasm of macrophage-like cell ($\times 4,000$).

서 흡을 형성한 것도 관찰이 되었으며 간질에는 4일째부터 교원질이 침착하기 시작하였고 시간이 경과함에 따라 더 많이 증가하였다.

고 찰

생물이 생존하기 위해서는 세포수의 항상성을 유지해야 하는데 이를 위해서는 세포의 증식과 죽음사이의 균형이 중요한 역할을 한다.¹⁹ 과거 수십년동안 이러한 세포증식과 세포사에 대한 생화학적, 형태학적, 분자생물학적 연구가 있었고 최근에는 인체에서 발생하는 암의 치료를 위한 한가지 방법으로 연구되고 있다.³⁵ 세포사에는 크게 두가지 종류가 있는데 조직손상에 의한 괴사와 능동적인 방법에 의한 apoptosis가 있다.³⁶⁻³⁹ 괴사의 특징은 저산소증이나 독물 등에 의하여 DNA가 파괴되고 ATP가 감소되며 세포막이 손상받게 된다. 이로 인해 세포가 집단으로 종창되고 세포질내 소기관이 파괴되어 응고괴사의 형태를 나타내게 되며 주위에 염증 반응을 동반하게 된다. 이러한 괴사의 특징에 비해 apoptosis의 경우에는 생리적, 병리적 자극에 의하여 endonuclease가 활성화되고 DNA가 분절화되어 주로 한개의 세포들에서 apoptotic body를 형성하여 탐식되는 과정을 거친다.

Bursch등⁴⁰에 의하면 apoptosis는 조직학적으로 여러 단계가 있으며 처음에는 자극이 있어도 세포에는 어떠한 조직학적인 변화도 일어나지 않는 시기가 있으며, 이 시기는 조직의 종류와 자극의 종류에 따라 차이가 있다고 하였다. 본 실험에서 광학 현미경적 소견상 백서를 거세 한 후 전립선에 약 1일동안의 조직학적 변화가 없는 시기가 있다가 2일째부터 apoptotic body의 수가 갑자기 증가하였으나 전자현미경적 소견상에는 거세 후 1일째부터 선방의 상피세포의 핵과 세포질에 변화가 관찰되어 거세로 인한 전립선의 apoptosis과정에서는 이 시기가 약 1일 정도로서 이는 이유 (weaning) 후에 유방에서 apoptosis가 일어나기 시작하는데 6일이 걸리며, 스테로이드로 인한 흉선세포의 apoptosis의 경우는 이 시기가 4시간 정도¹⁹인 것에 비하면 상당한 차이가 있다. 정상적으로 백서전립선의 선방의 상피세포들은 하루에 2% 정도 소실되고^{15,41} 거세 후에는 3일 후에 20% 정도가 소실되고 10일 이내에 80%정도가 소실되며^{15,42,43} 85%가 2주내에 소실된다고 한다.⁴⁴ 본 실험에서 전립선 선방의 상피세포에서 apoptotic body가 관찰되는 시기는 거세 후 1일부터 나타나서 3일과 4일째에 가장 많은 수가 관찰되었는데 이는 선방의 크기가 분명히 작아진 시기와 일치하며 Kerr등³⁶의 연구결과와도 일치하였다. 그리고 apoptotic body가 선방의 관강내에서도 관찰되었는데 이때에는 변성된 형태로 나타났고 이는 Helminen등⁴⁵의 연구 결과와 일치하는 소견이었다. 그리고 저자의 전자현미경적 관찰에서 거세 후 1일째에 상피세포의 핵에서 이질염색질이 핵막근처로 편재되고 핵막이 불규칙

하게 되며 세포질은 농축되고 RER이 확장된 소견을 보이고 이 후에 apoptotic body를 형성하며 주위 세포에 의해 탐식되는 것 등은 Kerr등³⁶과 Helminen등⁴⁵의 연구결과와 일치하였다. 주위의 세포에 의해 탐식된 apoptotic body는 이를 탐식한 세포의 세포질내에서 소멸되는데 이는 자가용해의 과정과 유사하다.^{46,47} 그러나 자가용해로 인한 자가탐식공포는 탐식된 apoptotic body와는 다르게 핵 잔해물이 관찰되지 않는다.⁴⁸ 본 실험에서는 광학 및 전자현미경적으로 분명한 핵 잔해물이 관찰되었고 주위세포에 의하여 탐식된 경우에는 특징적으로 두층의 막에 의하여 둘러싸인 apoptotic body가 관찰되었다. 이 두층의 막 중에서 바깥쪽의 막은 탐식한 세포의 phagosome에 의한 것이고 안쪽의 막은 apoptotic body 자체의 것으로 생각하였고 이는 Kerr등⁴⁸의 주장과 일치하는 소견이었다. 탐식된 apoptotic body를 처리하는 과정에서 리소솜 효소가 중요한 역할을 한다.⁴⁹⁻⁵¹ 이 중 lysosomal hydrolase는 탐식세포내 phagosome의 존재에 의하여 합성이 자극된다.⁵² 리소솜 효소에 노출된 apoptotic body는 분해되어 빠르게 높은 전자밀도를 가진 잔류체가 된다.^{49,50,53-55} 이러한 리소솜 효소에 의한 apoptotic body의 소멸과정은 저자의 실험에서 잘 관찰되었으며 이 apoptotic body의 소멸은 24시간내에 이루어진다고 알려져 있다.^{49,56} 그리고 본 실험에서 전자현미경적 소견상 선방의 표면과 관강에서 잔류체와는 구별되는 변성된 apoptotic body가 관찰되었는데 이는 리소솜 효소에 의한 apoptotic body의 소멸과정과는 다르게 선방의 관강을 통한 소멸과정으로 생각되었고 apoptotic body의 소멸과정은 이 두가지 경로에 의한 것으로 추측되었다. 그러나 아직 apoptosis가 유도되는 기전은 잘 알려져 있지 않다.

Apoptosis를 검출하는 방법은 여러가지가 있다. 이들 중 resin에 포매된 조직절편으로 농축된 염색질과 정상 염색질의 염색강도의 차이를 이용하여 apoptotic body를 검출하는 방법^{57,58}과 Bouin에 고정된 조직을 이용하여 Feulgen염색을 하는 방법,⁵⁹ 그리고 toluidine blue와 safranin으로 대조염색하는 방법⁶⁰이 있었으나 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에는 적용하기 어려운 문제점이 있었다. 그 후 통상의 파라핀에 포매된 조직에서 apoptotic body를 검출하는 방법들이 시도되었는데 특히 SGP-2 (Sulfated glycoprotein-2)의 단백질이나 mRNA의 검출법⁶¹과 cathepsin D⁶² 및 조직 glutaminase를 이용한 검출법⁶³ 등이 있었고 ethidium bromide염색 후 agarose gel electrophoresis를 이용하여 분절된 DNA를 검출하는 방법들이 있었다.¹⁶ 최근에는 면역조직화학적 방법에 의해 파라핀으로 포매된 조직절편으로 핵내에서 분절된 DNA를 검출하는 방법이 개발되었는데²⁰ 그 중 한 방법이 본 실험에 사용한 ApopTag이다. ApopTag kit의 원리는 apoptosis 과정중에 nucleosome내의 분절로 인해 생긴 새로운 3'-OH DNA end에 digoxigenin-nucleotide가 TdT의 촉매작용에 의해 결합이 되고 결합된 nucleotide들이 digoxigenin-11-dUTP와 dATP의 random heteropol-

mer를 형성한다. 여기에 peroxidase를 가진 anti-digoxigenin antibody가 결합하고 색소기질로 발색하여 조직절편의 특정 세포의 핵내의 분절된 DNA를 관찰하게 된다. 이때 apoptotic body뿐만 아니라 형태학적으로는 정상이지만 apoptosis가 진행되어 분절된 DNA를 가진 핵에도 염색이 된다. 본 실험의 결과 apoptotic body뿐만 아니라 형태학적으로는 특별한 변화가 없는 세포의 핵에도 염색이 되어서 형태적으로 정상적인 세포의 핵에서도 분절된 DNA가 존재하는 것을 알 수 있었다.

DNA 분절률은 대조군의 경우 0.5%로 Isaacs¹⁵이 보고한 정상 백서의 하루동안 소실되는 전립선 세포의 비율과 Kyprianou등¹⁶이 gel electrophoresis에 의한 수치보다는 낮은 결과를 보였다. 거세 후 1일째에는 DNA 분절화율이 대조군에 비해 2배 정도로 증가되었고 2일째에는 급속히 증가하고 4일째에는 11.1%로 가장 높은 수치를 나타내었으며 그 후 서서히 감소하였다. 이러한 결과는 H & E 염색상 측정된 apoptotic index의 시기별 빈도와 비교해 볼때 전 기간동안에 DNA 분절화율이 apoptotic index 보다 높은 빈도로 관찰이 되었으며 이는 apoptotic body 뿐 아니라 조직학적으로는 정상이지만 DNA가 분절되어 apoptosis가 일어나고 있는 세포에 ApopTag이 염색되었기 때문으로 생각되었다. 그리고 거세 후 4일 이후부터 DNA 분절화율과 apoptotic index의 차이가 커진 것은 DNA가 분절된 세포 모두가 apoptosis를 일으키는 것이 아니고 일부 염색질의 농축과 분절로 인해 생기는 apoptosis의 형성과정과 DNA 분절의 형성과정이 서로 다른 경로에 의해서도 일부 일어난다는 것을 의미하는 것으로 이에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각되었다.

조직에서 세포주기중 DNA 합성기인 S phase를 관찰하는 방법은 은호기성 염색방법과 thymidine labelling방법, 유세포 측정기에 의한 DNA 분석방법 그리고 bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation과 Ki-67 항체를 이용한 면역조직화학적 방법 등 여러가지가 있다.⁶⁴ Thymidine labelling과 BrdU incorporation방법은 신선한 조직을 이용해야 하고 특히 thymidine labelling의 경우 방사능에 노출될 위험성이 있다.⁶⁴ 면역조직화학적 방법에 의해 세포의 S phase주기를 측정하는 방법은 세포와 조직구조가 유지되고 간단하고 빠른 결과를 볼 수 있어서 많이 사용되고 있다.⁶⁵ 최근 Ki-67 항체가 많이 이용되나 이것은 G₀이외의 모든 세포주기에서 검출되고 신선 조직에서 주로 이용이 가능한 단점이 있다.⁶⁶

PCNA는 Miyachi등⁶⁷이 SLE환자의 혈청에서 자가항체를 이용하여 처음 발견한 단백질로 DNA 복제시기에 증가하며 세포주기중 특히 S phase 동안 현저히 증가하는 36 kD의 핵 단백질로, 증식하지 않는 세포에는 관찰되지 않으나 증식하는 세포에는 증가하는 DNA polymerase- δ 에 대한 보조 단백질이다.^{21,22,66} 본 실험에서 저자는 거세한 전립선의 DNA 합성과 세포증식 및 apoptosis와의 관계를 보기 위하여 PCNA염색을 시행한 결과

PCNA는 선방의 상피세포의 핵에 과립상으로 염색이 되었다. 대조군에는 2.4%에서 양성반응을 보였으나 거세 후 1일부터 양성률이 증가하고 3일째에 가장 높게 나타나서 8.1%의 양성반응을 보였고 그 후 감소하였다. 이로써 PCNA는 apoptosis 동안에 증가하는 것으로 사료되며 이는 Gazitt등²⁶이 apoptosis동안 50%에서 150%까지 증가한다고 보고한 것과 비슷한 결과였다. 그리고 PCNA가 증가하는 기전은 자세히 알려져 있지 않으나 거세로 인해 순환하지 않는 G₀ phase의 분화된 전립선 선방의 상피세포가 세포주기내로 복귀하여 이 세포가 세포주기를 성공적으로 완성할 수 없어서 apoptosis를 야기하며 이 과정에서 PCNA가 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁶ 본 실험에서 PCNA와 DNA 분절화율 및 apoptotic index와의 관계에 있어 PCNA는 DNA의 분절화와 apoptotic body 형성이 최고치에 도달하기 전에 최고로 증가하며 서로 연관성있게 증가하여 PCNA가 apoptosis의 초기단계에 작용하는 것으로 추측되었다.

이상의 성적과 이미 보고된 문헌적 지견을 종합하면 거세로 인한 전립선의 위축은 apoptosis에 의하여 초래되고 이 apoptosis는 형태학적으로는 apoptotic body의 형성단계와 주위세포에 의한 탐식과정으로 이루어진다고 생각된다. 생화학적으로는 cytosolic calcium의 증가에 의하여 endonuclease가 활성화 되고 이로 인해 DNA가 분절되고 transglutaminase가 활성화되어 apoptosis가 진행되며 이러한 과정중에서 DNA 분절을 검색하는 것이 apoptosis를 발견하는 좋은 지표가 될 것으로 생각되며 PCNA를 이용한 방법이 apoptosis과정을 연구하는데 중요한 방법이 될 것으로 생각된다. 그리고 apoptosis에 대한 형태학적, 생화학적 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 아직 apoptosis가 유도되는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않아 이 방면에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

결 론

저자는 거세 후 백서전립선에서 생기는 apoptosis의 형태학적 소견과 과정을 알기 위하여 Sprague-Dawley종 백서 수컷 60마리를 거세시킨 후 0, 1, 2, 3, 4, 5일 및 6일과 1, 2주 및 3주째에 각각 6마리씩 도살하여 전립선 전엽 조직을 채취한 후 광학현미경과 전자현미경 및 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

광학현미경적 소견으로는 거세 후 1일째 부터 선방의 크기가 작아지기 시작하여 3일째에 분명하게 선방의 위축이 관찰되었고 선방의 상피세포는 4일째부터 원주상피에서 입방상피로 바뀌었고 14일째에 뚜렷이 관찰되었다. 주위 간질의 섬유화는 4일째부터 관찰되어 시간이 경과할수록 증가하였다. Apoptotic body는 호산성의 세포질과 여러개의 분절된 핵을 가지며 주로 상피세포의 기저부와 일부 선방의 관강에서 관찰이 되었다. Apo-

ptotic index는 대조군의 경우 0.2%였으나 거세 후 2일째부터 4.5%로 증가하기 시작하여 4일째에 7.0%로 최고치를 이루었고 5일 이 후에는 감소하였다.

면역조직화학적 소견상 ApopTag은 전립선의 일부 상피세포의 핵과 apoptotic body에 과립상의 진한 갈색으로 염색이 되었다. ApopTag에 의한 DNA 분절화율은 대조군의 경우 0.5%였으나 거세 후 1일째부터 1.1%로 증가하기 시작하여 4일째에 11.1%로 가장 높았다. PCNA는 상피세포의 핵에 과립상의 진한 갈색으로 염색이 되었으며 PCNA를 이용한 증식지수는 대조군의 경우 2.4%였으나 거세 후 서서히 증가하여 3일째에 8.1%로 최고치를 나타내었고 그 후 14일째에는 1.9%로 감소하였다.

전자현미경적 소견상 거세 후 1일째부터 전립선 선방세포의 핵내 이질염색질이 핵막근처로 편재하고 세포질의 농축과 조면세포질내세망의 확장이 관찰되었다. 그 후 상피세포의 핵과 염색질의 농축과 분절이 일어나며 막에 의하여 둘러싸인 apoptotic body가 형성되고 이들은 세포사이와 세포내에서 관찰되었다. Apoptotic body 내에는 핵 분절과 정상 소기관들이 관찰되었고 이것은 주위 세포에 의하여 탐식되거나 일부는 선방의 관강으로 빠져나와서 변성된 것도 발견되었다. Apoptotic body를 탐식한 주위세포의 세포질내에는 일차 및 이차 리소솜과 잔류체가 관찰되었다. 이 apoptotic body는 거세 후 1일째부터 나타나기 시작하여 3일째에는 수가 현저하게 증가되었고 14일째부터는 급격히 감소하고 잔류체의 수가 증가하며 지방구가 많이 관찰되었다. 그리고 상피세포가 원주상피에서 입방세포로 바뀌어 세포질내의 소기관들의 수가 줄어들고 핵은 주름이 잡혀서 홈을 형성한 것도 관찰되었다. 간질의 교원질 침착은 거세 후 4일째부터 관찰되었고 시간이 경과할수록 증가하였다.

이상의 성적으로 보아 거세로 인한 전립선의 위축은 형태학적으로 선방의 상피세포의 apoptosis에 의해 초래됨을 확인하였고 apoptotic body의 소멸과정은 대식세포에 의한 경로와 선방의 관강내로 바로 소멸되는 경로가 있는 것으로 생각된다. 거세 후 ApopTag에 의한 DNA 분절률의 검색으로 apoptotic body가 형성되기 전단계에도 apoptosis를 검출할 수 있어 보다 정확한 apoptosis 연구의 한 방법이 되며 PCNA를 이용한 실험결과 세포의 증식이 apoptosis의 초기단계에 능동적으로 관여함을 시사하여 PCNA가 apoptosis의 연구에 중요한 방법이 될 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 226: 239-57.
2. Webster DA, Gross J. Studies on possible mechanisms of programmed cell death in the chick embryo. *Dev Biol* 1970; 22: 157-84.

3. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
4. Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Activation of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate* 1988; 13: 103-18.
5. Connor J, Sawdzuk IS, Benson MC, et al. Calcium channel antagonists delay regression of androgen-dependent tissues and suppress gene activity associated with cell death. *Prostate* 1988; 13: 119-30.
6. Martikainen P, Isaacs JT. Role of calcium in the programmed cell death of rat ventral prostatic glandular cells. *Prostate* 1990; 17: 175-87.
7. Vaux D. Towards an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 786-9.
8. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-9.
9. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. *bcl-2* inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991; 67: 879-88.
10. Korsmeyer SJ. *bcl-2*: An antidote of programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15: 105-18.
11. Buttyan R, Zakeri Z, Lockshin R, Wolgemuth D. Cascade induction of *c-fos*, *c-myc* and heat shock 70 K transcripts during regression of the rat ventral prostatic gland. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 650-7.
12. Bissonette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*. *Nature* 1992; 359: 552-4.
13. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild type *p53* induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-7.
14. Lane DP. Cancer. A death in the life of *p53*. *Nature* 1993; 362: 786-7.
15. Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* 1984; 5: 545-57.
16. Kyprianou N, Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat neutral prostate after castration. *Endocrinology* 1988; 122: 552-62.
17. Lee C. Physiology of castration-induced regression of the rat prostate. *Prog Clin Biol Res* 1981; 75A: 145-59.
18. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
19. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 1071-4.
20. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de velde CJH, Cornelisse CJ, Van dierendonck JH. A new method to

- detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 7-12.
21. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 105: 1549-54.
 22. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 1987; 326: 515-7.
 23. Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1623-8.
 24. Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 1989; 264: 13856-64.
 25. Colombel M, Olsson CA, Ng PY, Buttyan R. Hormone regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostatic cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res* 1992; 52: 4313-9.
 26. Gazitt Y, Erdos GW. Fluctuations and ultrastructural localization of oncoproteins and cell cycle regulatory proteins during growth and apoptosis of synchronized AGF cells. *Cancer Res* 1994; 54: 950-6.
 27. Helminen HJ, Ericsson JLE. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Mechanism of autophagy in epithelial cells, with special reference to the rough-surfaced endoplasmic reticulum. *J Ultrastruct Res* 1971; 36: 708-24.
 28. Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Programmed cell death during regression of PC-82 human prostatic cancer following androgen ablation. *Cancer Res* 1990; 50: 3748-53.
 29. Fujita H. Procedures from fixation to embedding. *J Clin Electron Microsc* 1989; 21: 31-5.
 30. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 409-17.
 31. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958; 6: 475-9.
 32. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17: 208-12.
 33. Tanaka K, Mitsushima A. A revised osmium-DMSO-osmium method with aldehyde perfusion. *J Microsc* 1984; 133: 213-6.
 34. Hanaki M, Tanaka K, Kashima Y. Scanning electron microscopic study on mitochondrial cristae in the rat adrenal cortex. *J Electron Microsc* 1985; 34: 373-80.
 35. Westin P, Bergh A, Damber JE. Castration rapidly results in a major reduction in epithelial cell numbers in the rat prostate, but in the highly differentiated Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 1993; 22: 65-74.
 36. Kerr JFR, Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch [B]* 1973; 13: 87-102.
 37. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JFR. An electronmicroscope study of the mode of cell death induced by cancer chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 1975; 116: 129-38.
 38. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982; 17: 229-59.
 39. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic basis of disease, ed 5. Philadelphia, WB Saunders Co., 1994; 17-21.
 40. Bursch W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch Cell Pathol* 1985; 50: 153-66.
 41. Berges R, Furuya Y, Remington L, English HF, Jacks T, Isaacs JT. Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8910-14.
 42. Coffey DS, Shimazaki J, Williams-Ashman HG. Polymerization of deoxyribo-nucleotides in relation to androgen-induced prostatic growth. *Arch Biochem Biophys* 1968; 124: 184-98.
 43. Lesser B, Bruchovsky N. The effects of testosterone, 5 α -dihydrotestosterone and adenosine 3'5'monophosphate on cell proliferation and differentiation in rat prostate. *Biochem Biophys Acta* 1973; 308: 426-37.
 44. Sanford ML, Searle JW, Kerr JFR. Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation. *Pathology* 1984; 16: 406-10.
 45. Helminen HJ, Ericsson JLE. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Evidence for focal irreversible damage to epithelium, and heterophagic digestion in macrophages. *J Ultrastruct Res* 1972; 39: 443-55.
 46. Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE. Studies on necrosis of mouse liver in vitro. Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. *Lab Invest* 1965; 14: 343-71.
 47. Kerr JFR. An electron-microscope study of liver cell necrosis due to Helioirine. *J Pathol* 1969; 97: 557-64.
 48. Kerr JFR. Some lysosome functions in liver cells reacting to sublethal injury. In: Dingle JT, Fell HB eds. Lysosomes in biology and pathology. Vol. 3. Amsterdam: North-Holland, 1972; 126-42.
 49. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular

- death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20.
50. Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972; 107: 41-4.
 51. Kerr JFR, Searle J. The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *J Pathol* 1972; 108: 55-8.
 52. Ballard KJ, Holt SJ. Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the fetal rat foot: The role of macrophages and hydrolytic enzymes. *J Cell Sci* 1968; 3: 245-62.
 53. Klion FM, Schaffner F. The ultrastructure of acidophilic "councilman-like" bodies in the liver. *Am J Pathol* 1966; 48: 755-67.
 54. Farbman AI. Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Dev Biol* 1968; 18: 93-102.
 55. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J Pathol* 1973; 111: 255-61.
 56. Wyllie AH, Kerr JFR, Macaskill IAM, Currie AR. Adrenocortical cell depletion: The role of ACTH. *J Pathol* 1973; 111: 85-94.
 57. Sarraf CE, Bowen ID. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumors. *Cell Tissue Kinet* 1988; 21: 45-9.
 58. English HF, Kyprianou N, Isaacs JT. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* 1989; 15: 233-50.
 59. Goldberg MT, Tackaberry LE, Hardy MH, Noseworthy JH. Nuclear aberrations in hair follicle cells of patients receiving cyclophosphamide. *Arch Toxicol* 1990; 64: 116-21.
 60. Martin-Partido G, Alvarez IS, Rodriguez-Gallardo L, Navascués J. Differential staining of dead and dying embryonic cells with a simple new technique. *J Microsc* 1986; 142: 101-6.
 61. Buttyan R, Olsson CA, Pintar J, et al. Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3473-81.
 62. Sensibar JA, Liu X, Patai B, Alger B, Lee C. Characterization of castration-induced cell death in the rat prostate by immunohistochemical localization of cathepsin D. *Prostate* 1990; 16: 263-76.
 63. Piacentini M, Autuori F, Dini L, et al. "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation. *Cell Tissue Res* 1991; 263: 227-35.
 64. Hall PA, Levison DA. Review; Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
 65. Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cell proliferation: Achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 505-22.
 66. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab V, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.
 67. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-34.

Key for Abbreviations; AB: Apoptotic body, CF: Collagen fibrils, EC: Epithelial cells, FN: Fragmented nucleus, G: Golgi complex, L: Lipid globules, LU: Lumen of acini, M: Mitochondria, N: Nucleus, P: Primary lysosome, RER: Rough endoplasmic reticulum, S: Secondary lysosome