

초기계배의 뇌 형성에 관한 세포 생물학적 연구

최임순 · 주충노* · 최춘근 · 김재원* · 주상옥
(연세대학교 이과대학 생물학과, 생화학과*)

Cell Biological Studies on Brain Formation at the Early
Stage of Chick Embryogenesis

Rim Soon Choe, Chung No Joo*, Choon Keun Choi, Jae Won Kim* and Sang Ok Joo
(Dept. of Biology and Dept. of Biochemistry*, College of Science, Yonsei University)
(1986. 6. 25. 접수)

ABSTRACT

The effect of tryptophan on brain formation at the early stage of chick embryo has been investigated morphologically using electron microscope.

The electron micrographs of cerebral cortex cells of 5~10 day old chick embryo, which received 1.0mg of tryptophan showed that the irregularity, evagination and disruption of nuclear membrane and nuclear chromatin condensation, nucleolar chromatin margination and segregation. Hypertrophy of stalks, vesicles, and vacuoles can be seen and dilation and vesiculation of rough endoplasmic reticulum and polysome disaggregation occurred.

Protein and RNA levels and the activity of several enzymes such as lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase of tryptophan administered group were significantly lower than those of control group suggesting that the tryptophan administration depressed protein biosynthesis resulting in the decrease of enzyme activity.

It was found that serotonin content of egg yolk which has been incubated for 10 days were as much as three times that of control egg yolk.

It is not clear whether the increase of serotonin content might inhibit intracellular yolk granule degradation which might result in malformation of chick embryo, but it is likely that tryptophan administration might depress protein biosynthesis, consequently, the enzyme biosynthesis would be impaired. This might give rise to improper development of chick embryo.

본 연구는 1985년도 문교부연구비로 이루어진 것임.

서 론

Emanuelsson과 Palén (1975)이 L-tryptophan을 투여한 계란의 초기 계배에서 뇌와 체질 형성의 기형발생현상을 관찰한 이후 체질과 뇌형성에 미치는 L-tryptophan의 영향 연구가 활기를 띠기 시작하였다.

초기 계배에서의 뇌와 체질형성의 기형형성의 기형현상은 비단 L-tryptophan 뿐 아니라 phenylalanine, tyrosine과 같은 방향족 아미노산을 투여했을 때도 L-tryptophan 투여시와 같은 초기 계배 기형현상이 관찰되고 있으며 (Palén and Töneby, 1981), 최 등(1985)도 방향족 아미노산이 초기계배에서의 체질형성을 방해함을 관찰하였다.

Palén 등 (1979)은 serotonin과 몇 가지 serotonin antagonist를 계란에 투여하고 초기계배에 미치는 영향을 관찰한 결과 몇가지 예외의 경우는 있었으나 배반엽확장, 원조 형성, 신경관 형성, 체질형성등에 이상이 있었음을 관찰하고 특히 L-tryptophan의 경우에는 L-tryptophan이 serotonin으로 전환되어 생성된 과량의 serotonin으로 인하여 intracellular yolk granule의 분해가 방해 또는 지연됨으로서 기형현상이 일어난다고 주장하였다. 그들은 serotonin과 serotonin antagonist를 계란에 투여하면 yolk granule의 분해가 지연되어 microvilli의 생성과 기능이 저하되고 배세포의 정상발달이 저해된다고 하였으나 serotonin은 microtubule과 microfilament의 활성을 일차적으로 촉진한다고 보고하였다.

본 연구에서는 L-tryptophan이 초기 계배의 뇌발생에 미치는 영향을 전자현미경으로 관찰하고 이와 병행하여 단백질 및 핵산의 함량과 몇가지 중요한 기초대사에 관여하는 효소활성, 그리고 serotonin의 함량을 측정함으로써 초기 계배의 뇌형성에 관한 tryptophan의 작용을 이해하는데 노력하였다.

재료 및 방법

(1) 실험 재료

수정란(70±5 g)은 서울 공능동 소재, 천호 부화장에서 구입한 MANIKER육계종란을 사용하였다. DL-Tryptophan은 Junsei 사 제품을 사용하였고, phosphate sodium salt, sodium pyruvate, nicotinamide, NAD⁺, sodium malate, DICPIP, sodium succinate, glucose-6-phosphate, NADP⁺, Trisma base는 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 밖의 용매와 일반 시약은 시중에서 구입하여 사용하였다.

(2) 수정란의 발생

수정란은 부란전에 시험군에는 1 mg의 DL-tryptophan (100mg의 DL-tryptophan을 10 ml 생리 식염수에 녹인 용액 0.1 ml)을, 대조군에는 0.1 ml생리 식염수 만을 주사하였고, 아무런 처리도 하지 않는 정상군과 함께 상대습도 60%, 37.5±0.5°C의 부란기에서 발생시켰다.

(3) 전자현미경 표본처리

전자현미경 표본은 부란 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일 후에 초기 계배를 적출하여, 뇌부위만을 세절하여 25% glutaraldehyde phosphate buffer(0.2 M, pH 7.4)용액으로 전고정한 후 같은 buffer로 세척하고, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조정된 OsO₄에서 2시간 후

고정하였다. 고정된 시료의 탈수는 에탄올의 농도상승순으로 탈수있고 최종적으로 propylene oxide를 사용하여 치환한 다음 epoxy resin으로 포매하였다. 유리칼을 사용하여 Sorvall MT2-B형 초박절편기로 thick section하여 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰 후 50~60 nm의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색 후 투과전자현미경(Hitachi-500)으로 관찰하였다.

(4) 분석시료의 제조

부란 10일째의 계배를 적출하여 생리 식염수로 3회 세척한 후 두부만을 잘라 파쇄하고 두부당 최종부피가 10 ml이 되도록 만든 다음 효소, 단백질 그리고 핵산의 정량시료로 사용하였다.

(5) Lactate dehydrogenase(LDH, EC. 1, 1, 1, 27)의 활성 측정 (Neilands, 1955)

LDH의 활성은 반응액에 효소원을 가한 후 1분동안 감소되는 NADH의 양을 340 nm에서의 흡광도의 감소로 추정하였다. 반응액(3 ml)의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.6 mM sodium pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH와 효소원(0.1 ml)이었다.

(6) Malate dehydrogenase(MDH, EC. 1, 1, 1, 37)의 활성 측정 (Joo and Han, 1976)

MDH의 활성은 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안 환원되는 2,6-dichlorophenolindophenol (DICPIP)의 양을 600 nm에서 측정하여 추적하였다. 반응액의 조성은 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM MAD^+ , 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM sodium malate와 효소원이었다.

(7) Succinate dehydrogenase(SDH, EC. 1, 3, 99, 1)의 활성 측정 (Joo and Han, 1976)

SDH의 활성은 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안 환원되는 DICPIP의 양을 600 nm에서의 흡광도 감소로 추적하였다. 반응액의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM sodium succinate와 효소원이었다.

(8) Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EE. 1, 1, 1, 49)의 활성 측정 (Lee *et al.*, 1978)

G6PDH의 활성은 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안 생성되는 NADPH의 양을 340 nm에서 흡광도의 증가로 추정하였다. 반응액의 조성은 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3), 0.67 mM $MgCl_2$, 0.067 mM $NADP^+$, 0.83 mM glucose 6-phosphate와 효소원이었다.

(9) 단백질, DNA 및 RNA의 정량

파쇄액 0.2 ml에 10% trichloroacetic acid(TCA) 3 ml를 가하고 원심분리(3,000 g×10 min)하여 침전물을 얻은 다음 같은 방법으로 2회 세척하였다. Chloroform-methanol혼합액(2:1, v/v) 3 ml를 가하여 지질을 제거하는 과정을 2회 되풀이한 후 원심분리하여 얻은 침전물에 1 ml의 0.2N NaOH를 가하고 잘 흔들어 주면서 18시간 동안 방치하였다. 이 혼합물에 0.34 ml의 6 N HCl과 1 ml의 5% TCA를 가한 다음, 냉장고에 방치하고 다시 원심분리(3,000 g×10 min)하여 상층액을 RNA정량에 사용하였고, 침전물에는 2 ml의 5% TCA를 가하고 90°C에서 15분간 물중탕한 후 원심분리하여 상층액을 DNA 정량에 사용하였다. 이때 얻은 침전물에는 2 ml의 1 N NaOH를 가해 90°C에서 10분간 물중탕하여 완전 용해한 후 단백질 정량에 사용하였다. 단백질은 표준 단백질로 bovine serum albumin(BSA)용액을 사용하여 Lowry법(1951)으로 정량하였고, DNA는 calf thymus DNA 용액을 표준 용액으로 하여 diphenylamine으로 발색하여 정량하였다(Schneider, 1957). RNA는 calf liver RNA 용

Table 1-4. Electron microscopic observation of the effect of tryptohan on chick embryogenesis.
8 day old chick embryo

Group	Control					Test				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Nuclear membran irregularity	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Nuclear membrane evagination	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Nuclear membrane disruption	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Nuclear chromatin condensation	-	+	-	-	-	+	##	+	##	##
Nucleolar chromatin margination	-	-	-	-	-	+	+	+	##	##
Nucleolar segregation	-	-	-	-	-	+	##	+	+	##
Mitochondrial swelling	-	-	+	+	-	+	##	+	+	+
Mitochondrial critae sparsing	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Mitochondrial vacuolization	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Rough endoplasmic reticulum										
Dilatation	-	-	+	+	-	+	##	+	+	+
Vesiculation	-	-	+	+	-	+	##	+	+	+
Degranulation	-	-	+	+	-	+	##	+	+	##
Polyribosome disaggregation	-	-	+	+	-	##	##	+	+	##
Golgi complex										
Hypertrophy of stalks	-	+	-	+	+	+	+	##	##	+
Hypertrophy of vesicles	-	+	-	+	+	+	+	##	##	+
Hypertrophy of vacuoles	-	+	-	+	+	+	+	##	##	+
Dilatation	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Distortion	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-

Table 1-5. Electron microscopic observation of the effect of tryptophan on chick embryogenesis.
9 day old chick embryo

Group	Control					Test				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Nuclear membrane irregularity	-	-	+	-	+	+	+	##	+	+
Nuclear membrane evagination	-	-	+	-	+	+	+	##	+	+
Nuclear membrane disruption	-	-	+	-	+	+	+	##	+	+
Nuclear chromatin condensation	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Nucleolar chromatin margination	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Nucleolar segregation	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Mitochondrial swelling	-	+	+	+	+	+	##	+	+	+
Mitochondrial critae sparsing	-	-	+	-	+	+	##	+	+	+
Mitochondrial vacuolization	-	-	+	-	+	+	##	-	+	-
Rough endoplasmicreticulum										
Dilatation	-	-	+	-	+	+	##	+	+	+
Vesiculation	-	-	+	-	+	+	##	+	+	+
Degranulation	-	-	+	-	+	+	##	+	+	+
Polyriboosome disaggregation	+	+	+	+	+	+	##	+	##	##
Golgi complex										
Hypertrophy of stalks	+	##	+	##	+	+	##	+	##	+
Hypertrophy of vesicles	+	##	+	##	+	+	##	+	##	+
Hypertrophy of vacuoles	+	##	+	##	+	+	##	+	##	+
Dilatation	+	+	+	+	+	-	##	+	##	+
Distortion	-	+	+	+	+	-	##	+	+	+

Table 1-6. Electron microscopic observation of the effect of tryptophan on chick embryogenesis. 10 day old chick embryo

Group	Control					Test				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Nuclear membrane irregularity	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nuclear membrane evagination	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Nuclear membrane disruption	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Nuclear chromatin condensation	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Nucleolar chromatin margination	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Nucleolar segregation	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Mitochondrial swelling	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mitochondrial crista sparsing	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Mitochondrial vacuolization	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Rough endoplasmic reticulum										
Dilation	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Vestibulation	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Degranulation	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Polyribosome disaggregation	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Golgi complex										
Hypertrophy of stalks	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypertrophy of vesicles	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypertrophy of vacuoles	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dilatation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Distortion	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+

으나 그 정도는 극히 경미하였다. 그러나 Golgi체는 정상군보다 증식되었으며 미토콘드리아와 조면소포체는 정상군과 유사하였으나, lysosome이 드물다(Fig. 2).

Tryptophan을 투여한 5일째의 chick embryo의 대뇌피질 세포는 핵막이 불규칙하고 핵응축 현상이 일어났으며, 핵내의 염색질이 핵내막주위에 응집되었고, 인도 심하게 분해되었으며, 핵막이 팽출되어 생긴 수포들이 보이고, 확장된 Golgi체가 많이 생기고 있다. 조면소포체도 확장되었을 뿐아니라, 소포화된 것도 있다. 세포질 전반에 걸쳐 polysome이 늘어났고, 팽창되고 cristae가 적은 미토콘드리아도 보였으나 심하지는 않았고, lysosome이 드물게 보인다(Fig. 3).

6일째의 정상군 세포는 세포질이 조금 많아졌을 뿐 5일째 것 과 거의 비슷하였다. Saline 처리군은 핵막이 비교적 둥글고, 가끔 터졌거나 확장되었으며, 염색질은 고루분포되어 있으나 약간 응축되었고, 인도 분해되었다. 미토콘드리아는 정상군에 가까웠고 세포질에 polysome이 비교적 많이 산재되었고, Golgi체가 잘 발달되어 있었다(Fig. 4). Tryptophan 처리군은 핵막이 불규칙하거나 확장되어 터져 있으며 염색질이 응축된 가장자리로 이동되었으며, 인도 분해되었다. 미토콘드리아는 cristae가 적고 팽창되었으며, 세포질에는 많은 polysome이 분포되어 있고, 조면소포체도 확장되었으며, 팽창된 Golgi체가 많이 생겼으며, 핵막이 팽출하여 생긴 수포가 있었다(Fig. 5).

7일째의 정상군은 염색질이 고루 분포되어 있고, 뚜렷한 인이 핵막에 부착된 핵과 cristae가 뚜렷한 미토콘드리아 그리고 잘 발달된 조면소포체 polysome들이 보인다. 또한 세포체

주변에는 많은 axon, dendrites들이 보인다(Fig. 6). Saline을 처리한 대조군도 정상군의 세포와 거의 비슷하였다(Fig. 7). Tryptophan을 처리한 시험군은 핵내의 염색질이 약간 응축되었고 인도 변형되었다. 미토콘드리아도 약간 팽창되었고, 확장된 Golgi체가 많이 보였다. 조면소포체가 확장되어 있고 polysome이 세포질에 많이 산재되어 있으나 5일, 6일군에 비하면 손상이 경미한 편이었다(Fig. 8).

8일째의 정상군은 세포질이 잘 발달되어 있고, 핵막과 염색질, 인이 뚜렷하였다. 미토콘드리아도 잘 발달되어 있고, 주변에는 axon, dendrite들이 보이며, 조면소포체와 polysome, lysosome이 잘 보인다. Saline처리군은 핵막이 약간 불규칙적이었으나 염색질과 인은 정상이었다. 미토콘드리아는 일부 팽창되었고, 조면세포체도 약간 확장되어 있었으나, 정상에 거의 가까웠고, Golgi체는 현저하였다. Tryptophan 처리군은 핵막이 불규칙하고, 뚜렷하지 않으나, 미토콘드리아는 비교적 덜 손상되었다. 조면소포체는 확장되어 있었으나 확장된 golgi체의 수가 많이 늘어나고 있으며, vacuole들이 무척 많다. Polysome은 정상과 비슷하고, lysosome이 많이 보인다.

9일째의 정상군은 axon, dendrite가 잘 발달되어있고, 인, 염색질들이 뚜렷하다. Saline 처리군은 정상군에 가까웠고, 확장된 Golgi체가 많이 보이며 조면소포체도 뚜렷하고, 미토콘드리아도 건전하였다. 핵내의 염색질도 고루분포되어 있고, 인도 뚜렷하며, lysosome도 많았다. Tryptophan을 처리한 시험군은 핵막이 약간 확장되었거나 터져 있었으나 인과 염색질은 비교적 정상에 가까웠다. 미토콘드리아도 팽창되었고 조면소포체가 확장되었으며 확장된 Golgi체가 잘 발달되어 있었으며 조면소포체와 lysosome이 잘 보이고 있다.

10일째의 정상군 세포는 핵내의 세포질이 고루 분포되어 있고, 핵막이 뚜렷하며 cristae가 뚜렷한 미토콘드리아와 잘 발달된 Golgi체와 조면소포체를 볼 수 있고, lysosome이 여러개 보인다(Fig. 9). Saline을 투여한 대조군은 핵막과 염색질, 인, 미토콘드리아가 정상군과 거의 같았으며, Golgi체의 수가 많아졌고, lysosome이 현저히 증가되었다(Fig. 10). Tryptophan을 처리한 시험군 세포는 핵막이 팽출되어 터진것이 가끔 보이나, 염색질과 인은 정상에 가까웠다. 미토콘드리아는 소포화된 것이 많았으며 확장되어 vesicle이나 vacuole을 형성하는 Golgi체들이 많이 보였고, 조면소포체는 약간 확장되었고, lysosome은 정상군에 비해 드물었다(Fig. 11).

부란 10일 후 계배두부의 lactate dehydrogenase (LDH), succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)와 같은 기초대사에 관여하는 효소활성을 측정하였다. LDH의 활성은 정상군에 비해 saline을 투여한 대조군이 88%, tryptophan을 투여한 시험군이 64%로 saline만을 투여한 대조군의 경우도 유의성있게 LDH의 활성이 저하되었으나, tryptophan을 투여한 경우에는 대조군의 80%에 불과하였으며 통계적으로 유의성이 있었다(Table 2). SDH의 경우도 Table 3에 표시한 바와 같이 saline 투여대조군과 tryptophan 투여 시험군은 각각 정상군에 비해 67%와 56%로 SDH의 활성이 크게 저하되었으며 tryptophan투여 시험군은 saline투여대조군의 83%에 불과하였다. MDH(Table 4), G6PDH(Table 5)도 saline 투여군, tryptophan 투여군 모두 정상군에 비해 그 효소활성이 크게 저하되고 있으며 MDH의 경우는 tryptophan 투여군이 대조군의 79%, G6PDH의 경우는 시험군이 대조군의 83%에 불과하였다.

부란 10일후 계배의 단백질량을 분석한 결과(Table 6)에 표시한 바와 같이 saline 투여

Table 2. Effect of tryptophan on lactate dehydrogenase activity of the brain of 10 day old chick embryo. The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 0.6 mM sodium pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH and 0.1 ml of enzyme.

Group	Enzyme activity*(unit/brain)	Relative activity**(%)	P
Normal	10.88 ± 2.24	100	—
Saline	8.72 ± 1.83	80	<0.3
Tryptophan	6.98 ± 4.41	64	<0.1

* One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

** Relative activities were expressed assuming that that of control group being 100

Table 3. Effect of tryptophan on succinate dehydrogenase activity of the brain of 10 day old chick embryo. The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04mM DICPIP, 20 mM sodium succinate and 0.1 ml of enzyme

Group	Enzyme activity*(unit/brain)	Relative activity**(%)	p
Normal	6.7 ± 1.74	100	—
Saline	4.5 ± 0.76	67	<0.3
Tryptophan	3.8 ± 0.80	56	<0.01

* One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

** Relative activities were expressed as percent of activity of control group being 100

Table 4. Effect of tryptophan on malate dehydrogenase activity of the brain of 10 day old chick embryo. The reaction mixture contained 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD⁺, 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM sodium malate and 0.1 ml of enzyme.

Group	Enzyme activity*(unit/brain)	Relative activity**(%)	p
Normal	3.58 ± 0.36	100	—
Saline	2.67 ± 0.38	82	<0.001
Tryptophan	2.35 ± 0.42	65	<0.001

* One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text

** Relative activities were expressed assuming that of control group being 100

Table 5. Effect of tryptophan on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity of the brain of 10 day old chick embryo. The reaction mixture contained 0.83 mM glucose 6-phosphate, 0.067 mM NADP⁺, 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3), 0.67 mM MgCl₂ and 0.1 ml of enzyme preparation.

Group	Enzyme activity*(unit/brain)	Relative activity**(%)	p
Normal	5.77 ± 1.18	100	—
Saline	4.39 ± 0.61	76	<0.2
Tryptophan	3.64 ± 0.51	63	<0.001

* One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

** Relative activities were expressed as percent of the activity of control group being 100.

Table 6. Protein level of the brain of chick embryo which had received tryptophan.

Group	Protein amounts(mg/brain)	Relative amounts*(%)	p
Normal	21.2 ± 2.10	100	—
Saline	19.4 ± 4.50	92	<0.2
Tryptophan	16.4 ± 3.27	77	<0.2

* Relative amounts were expressed assuming that of control being 100.

Table 7. DNA level of the brain of chick embryo which had received tryptophan.

Group	DNA amounts(mg/brain)	Relative amounts**(%)	p
Normal	0.22 ± 0.08	100	—
Saline	0.31 ± 0.11	97	>0.5
Tryptophan	0.28 ± 0.07	88	<0.5

* Reative amounts were expressed assuming that of control being 100.

Table 8. RNA level of the brain of chick embryo which had received tryptophan.

Group	RNA amounts(mg/brain)	Relative amounts**(%)	p
Normal	1.12 ± 0.17	100	—
Saline	0.98 ± 0.23	88	<0.3
Tryptophan	0.85 ± 0.10	76	<0.001

* Relative amounts were expressed assuming that of control being 100.

군은 정상군의 92%, tryptophan 투여군은 정상군의 77%로 모두 단백질 함량이 저하되었으나, tryptophan 투여군의 단백질 함량저하는 극심하였고 대조군에 비해 84%에 불과하였다. 부란 10일 후 계배두부의 DNA양을 조사한 결과 saline 투여군은 정상군에 비해 별다른 변동이 없었으나 tryptophan은 정상군의 88%였다(Table 7). RNA의 경우는 saline 투여군에 비해 88%, tryptophan 투여군이 76%로 상당한 RNA 합성 저하를 나타내었다(Table 8). serotonin의 함량을 조사한 결과 부란 3일째의 정상군이나 대조군의 함량은 1~2 $\mu\text{g}/\text{egg yolk}$ 이었으나, tryptophan을 투여한 시험군의 경우는 6~7 $\mu\text{g}/\text{egg yolk}$ 였고 10일 후의 egg yolk은 정상군과 대조군의 경우는 6~7 $\mu\text{g}/\text{egg yolk}$, 시험군의 경우는 16~20 $\mu\text{g}/\text{egg yolk}$ 였다.

고 찰

Tryptophan을 투여한 계란을 5~10일간 부란한 계배의 대뇌피질세포는 정상군에 비해 크게 손상되고 있으며 특히 핵막이 불규칙하고 핵응축 현상이 심하며 염색질이 핵막에 응집되고 인이 심하게 분해되었고 핵막이 팽출되어 수포가 많이 생기고 확장된 golgi 체가 많으며 조면소포체는 확장되고 소포화된 것들도 있었으나 lysosome은 드물게 보였으며 tryptophan 투여로 인한 기형현상이 뚜렷하였다.

Saline만을 투여한 대조군의 경우도 경미하나마 핵막이 약간 손상되었고 핵내의 염색질이

응집되었으며 인도 약간 분해되었으나 Golgi 체는 정상군보다 증식되었고 lysosome는 드물게 보였다. 이것은 saline 투여와 같은 자극이 계배발생에 영향을 미쳤음을 의미하는 것이지만 tryptophan 투여의 경우는 saline 투여군에 비해 손상이 훨씬 큰 것으로 보아 과량의 tryptophan이 뇌형성에 크게 영향을 미친 것으로 사료된다.

특히 시험군에서 lysosome의 수가 정상군에 비해 희유하고 반대로 Golgi체는 훨씬 많은 것은 흥미있는 일이며 시험군에서는 과량의 tryptophan이나 그 대사물의 배설작용이 활발하게 일어나고 있을 것으로 예측되지만 분명치는 않다.

한편 tryptophan을 투여한 계배의 대뇌피질의 손상도를 보면 정상군에 비하여 5~7일째가 극심하게 손상되었다가 8일 이후는 점차로 좋아지는 것으로 보아 tryptophan이 특히 초기발생에 큰 영향을 주는 것으로 예상된다.

효소활성의 분석에 의하면 saline 투여군이나 tryptophan 투여군에서 모두 대조군에 비해 효소활성이 저하되고 있으나 tryptophan을 처리한 시험군에서는 효소활성의 저하가 saline을 투여한 대조군의 80%내외에 불과한 것으로 보아 tryptophan의 영향임을 알 수가 있었다.

시험군에서의 DNA의 함량은 대조군에 비하여 크게 저하되지는 않았으나 RNA 함량 및 단백질 함량은 tryptophan 투여군에서 크게 저하되고 있으며 이것은 tryptophan 투여가 단백질 합성을 저해한 것으로 생각할 수 있다.

한편 10일 계배의 serotonin의 함량은 시험군에서 크게 늘고 있으며 대조군에 비해 약 3배로 추산되었다.

Tryptophan에서 생성되는 biogenic amine인 serotonin은 neurotransmitter로 알려져 있으며, adult animal에 enterochromaffin cell과 platelet에 존재하는 것으로 알려져 왔으나 최근에 점차적으로 무척추 동물과 척추동물의 embryo에서도 나타나는 것으로 밝혀 졌다(Fischen, 1971).

최근 Palén(1975, 1981)은 세포 수준에서 serotonin으로 인한 기형은 egg yolk granule의 분해가 지연됨으로서 모양을 변형시키는 embryo cell의 능력이 손상됨으로서 유발되는 것으로 추측된다고 하였다.

본 연구에서 얻은 tryptophan 투여군에서의 serotonin양의 증가가 Palén 등이 주장하듯이 intracellular yolk granule의 분해를 억제함으로써 기형현상이 일어나는자의 여부는 분명치 않으나 tryptophan을 투여함으로써 단백질 합성이 저해되고 따라서 효소활성이 저하됨으로서 세포 분화에 저장을 초래하는 것으로 생각할 수가 있는 것이다.

적 요

Tryptophan을 계란에 투여하고 배양하였을 때의 초기 계배의 뇌형성에 미치는 영향을 대뇌피질세포의 전자현미경 관찰과 계배두부의 단백질 및 핵산과 serotonin의 정량 그리고 몇 가지 기초대사에 관여하는 효소활성을 관찰하였다.

계란에게 tryptophan을 투여하고 5~10일간 부란한 계배의 대뇌피질세포 전자현미경으로 관찰한 결과 정상군에 비해 크게 손상되었으며 특히 핵막이 불규칙하고 핵응축현상이 심하며, 염색질이 핵막에 응집되어 있고 인이 심하게 분해되었고 핵막이 팽출되어 수포가 많이 생기고 확장된 Golgi체가 많으며 조연소포체가 확장되고 소포화된 것들도 있었으나 lysosome

은 드물게 보였으며 tryptophan 투여로 인한 기형현상이 뚜렷하였다.

Tryptophan을 투여한 10일 계배의 DNA 함량은 크게 저하되지는 않았으나 RNA 함량과 단백질 함량 그리고 lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase, glucose 6-phosphate dehydrogenase와 같은 기초대사에 관여하는 효소들의 활성이 저하된 것으로 보아 tryptophan은 단백질 합성을 저하시킨 것으로 관찰되었다.

한편 10일 계배의 serotonin의 함량은 시험군에서 크게 늘고 있으며 serotonin의 증가가 intracellular yolk granule의 분해를 지연시켜 기형현상이 일어나는지는 분명치 않으나 tryptophan 투여로 인하여 단백질 합성이 저하되고 따라서 효소활성이 저하됨으로서 세포분화에 지장을 초래하는 것으로 생 된다.

인 용 문 헌

- Choe, R.S., C.N. Joo, C.K. Choi and J.W. Kim, 1985, Cell biological studies of the effect of aromatic amino acids on early development of chick embryo. *Korean J. of Zool.* 28(4), 257-273.
- Emanuelsson, H. and K. Palén, 1975, Effects of L-tryptophan on morphogenesis and growth in the early chick blastoderm. *Wilhelm Roux' Arch. Devl. Biol.* 177, 1-17.
- Joo, C.N. and J.H. Han, 1976, The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and α -keto glutaric dehydrogenase, *Korean Biochem. J.* 9, 43-51.
- Lee, C.Y., C.H. Langley and J. Burkhart, 1978, Purification and molecular weight determination of glucose 6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme from mouse and drosophila, *J. Anal. Biochem.*, 86, 697-706.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Neilands, J.B., 1955, Lactic dehydrogenase of heart muscle, *Methods Enzymol.* 1, 449-454.
- Palén, K. and Thöneby, 1981, Effects of L-phenylalanine on somite formation in the early chick embryo, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 161, 175-190.
- Palén, K., L. Thöneby and Emanuelsson, 1979, Effects of serotonin and serotonin antagonists on chick embryogenesis, *Wilhelm Roux' Archiv. Devl. Biol.* 187, 89-103.
- Schneider, W.C., 1957, Determination of nucleic acids in tissue by pentose analysis, *Methods Enzymol.*, 3, 680-681.

Figure 1-11

Abbreviation: N=Nucleus, No=Nucleolus,

M=Mitochondria, RER=Rough endoplasmic Reticulum,

P=Polysome, L=Lysosome, G=Golgi Complex

Fig. 1. Electron micrograph of cerebral cortex cells of normal chick embryo (5 day old). There are many neurons consisted of nucleus and cytoplasm and well developed mitochondria and rough endoplasmic reticulum can be seen. Polysomes are spread over whole cytoplasm and several lysosomes appeared.

Fig. 2. Electron micrograph of cerebral cortex cells of chick embryo (5 day old) A slight nuclear membrane evagination and nuclear chromatin margination and hypertrophy of stalks, vesicles and vacuoles of golgi complex could be observed. A few lysosomes appeared.

Fig. 3. Electron micrograph of cerebral cortex cells of tryptophan (1 mg) administered chick embryo (5 day old). Irregularity, evagination and disruption of nuclear membrane can be observed and nuclear chromatin condensation and margination occurred. Mitochondria were swollen and sparsed cristae can be seen. Rough endoplasmic reticulum were dilated and some were vesiculated. Polysome disaggregation occurred and golgi complexes were dilated and hypertrophy of stalks, vesicles and vacuoles can be observed. A very few lysosomes are seen.

Fig. 4. Electron micrograph of cerebral cortex cells of saline administered chick embryos (6 day old). A slight nuclear chromatin condensation occurred.

Fig. 5. Electron micrograph of cerebral cortex cells of tryptophan (1 mg) administered chick embryo (6 day old). Irregularity and disruption of nuclear membrane occurred. Swollen and cristae sparsed mitochondria can be seen. Rough endoplasmic reticulum were dilated and hypertrophy of stalks of golgi complex can be observed.

Fig. 6. Electron micrograph of cerebral cortex cells of normal chick embryo (7 day old). Well developed mitochondria and many axon and dendrites can be observed.

Fig. 7. Electron micrograph of cerebral cortex cells of saline administered embryos (7 day old). No particular impairment occurred.

Fig. 8. Electron micrograph of cerebral cortex cells of tryptophan (1 mg) administered chick embryo (7 day old). Nuclear chromatin condensation and nucleolar segregation occurred. Mitochondria were slightly swollen and hypertrophy of stalks, vesicles of golgi complex can be observed.

Fig. 9. Electron micrograph of cerebral cortex cells of normal chick embryo (10 day old).

Fig. 10. Electron micrograph of cerebral cortex cells of saline administered embryo (10 day old).

Fig. 11. Electron micrograph of cerebral cortex cells of tryptophan (1 mg) administered embryo (10 day old). Evagination and disruption of nuclear membrane occurred and cristae sparsed mitochondria can be seen. Dilatated rough endoplasmic reticulum can be seen and polysome disaggregation occurred and hypertrophy of stalks, vesicles and vacuoles of golgi complex can be observed.











