

발생중인 Chick Wingbud에 대한 Retinoic Acid의 효과

한만중·김원선

서강대학교 이공대학 생물학과

(1988. 5. 10 접수)

발생중인 제배의 날개형성에 미치는 retinoic acid(RA)의 효과를 알아보았다. RA 처리는 날개원기의 전단부로 부터 저울상을 띤 지골의 복제를 유발하였다. 이러한 RA 처리에 따른 지골의 복제 효과는 발생시기 및 처리량에 의존적이었다. 즉 stage 18시기의 날개원기에 RA를 처리했을 때 최대의 지골 복제 효과가 유발되었으며, 20mg/ml의 RA 용액으로 처리했을 때 최대의 지골 복제 효과가 나타났다.

이러한 실험결과는 RA 처리가 날개원기 세포의 positional value를 전후축 상에서 후위화(posteriorization)하기 때문에 나타나는 것으로 해석될 수 있으며, 후위화의 정도는 발생단계 및 처리량에 의존적임을 시사하고 있다.

서 론

비타민 A의 유도체인 retinoic acid(RA)는 기관의 발생과 성장 및 분화에 있어서 필수적인 요소이다(Ganguly *et al.*, 1980). 그러나 과량의 RA는 체내의 여러가지 물질 대사를 저해하며, 특히 발생중인 배(embryo)에서는 다리의 골격구조 및 안면의 형태 등에 심한 기형을 유발하기도 한다(Kwasigroch and Kochhar, 1980; Wedden, 1987). 또한 RA는 미분화 상태의 종양세포인 teratocarcinoma 세포로부터 처리 농도에 따라 내배엽성 세포, 골격근 세포, 신경 세포 등의 분화를 유발하며(Edwards and McBurney, 1983; Jones-Villeneuve *et al.*, 1983), 발생중인 닭이나 생쥐의 표피조직에서 분화의 방향을 변경시키기도 한다(Dhouailly *et al.*, 1980; Hardy, 1983). 이와 더불어 RA를 포함한 비타민 A의 유도체들인 retinoids는 여러가지 피부질환 치료에 뛰어난 효과를 보이며(Tsambaos and Offanos, 1983), 일부 악성 종양의 경우에도 높은 치료 효과를 나타냄이 보고되고 있다(Bollag and Hartmann, 1983; Moon *et al.*, 1983).

이렇게 RA 처리에 의하여 유발되는 여러가지 변화와 더불어 특기할 만한 점은 RA가 발생중인 닭의 날개에서 골격의 복제를 유발한다는 사실이다(Tickle *et al.*, 1982). 이러한 골격의 복제는 RA 처리가 아직 분화되지 않은 닭의 날개를 형성할 세포들의 positional value를 변화시키기 때문에 나타난다고 해석되고 있다. Positional value는 팔, 다리, 눈과 같은 특정한 구조를 이루는 세포들이 가지고 있다고 보여지는 3차원 공간에서의 위치 특성으로서 이에 의하여 세포들의 분화 방향이 결정되고 특정한 구조의 외부적 특성이 나타난다고 추측되고 있다(Wolpert, 1971). 이러한 positional value는 세포 표면의 당화합물 조성과 밀접한 관련을 가지고 있음이 시사되고 있으며(Steinberg and Poole, 1982; Edelman, 1983), RA 처리에 의하여 세포 표면의 당화합물 조성에 많은 변화가 유발됨이 여러가지 세포에서 알려지고 있다(Robinson *et al.*, 1978; Joukoff *et al.*, 1986).

형태형성의 메카니즘을 세포 및 분자 수준에서 밝히려는 시도에 있어서 무엇보다도 중요한 과제중의 하나는 미분화 상태의 세포들이 가지고 있다고 믿어지는 위치 특성인 positional value의 물질적인 실체를 규명하는 것이라고 할 수 있다. 앞서 밝힌 여러가지 실험결과들을 종합해 볼 때 RA는 이러한 시도에 있어서 많은 잠재성을 지닌 물질이라고 보여진다. RA를 이러한 목적에 이용하기 위하여는 먼저 RA 처리에 의하여 유발되는 날개 골격의 형태적인 변화를 체계적으로 밝히고 이와 더불어 이러한 변화를 가장 효과적으로 유발하는 처리시기 및 처리량에 대한 기초적인 연구가 선행되어야 한다.

본 연구는 앞선 연구들을 기초로 하여 RA 처리가 닭의 날개 골격발생에 미치는 영향을 처리시기 및 처리량에 대하여 집중적으로 알아 봄으로써 앞으로 수행될 형태형성의 메카니즘을 밝히려는 연구에 기초자료를 마련함에 그 목적이 있었다.

재료 및 방법

계배의 발생단계 확인

본 실험에서는 계배(chick embryo; Plymouth Rock-Arbor acres)를 실험재료로 사용하였다. 발생 중인 계배에 retinoic acid(RA)를 처리하기 위하여 먼저 계배의 발생단계를 확인하였다. 발생단계의 확인은 부란 개시 후 2.5일이 경과된 수정란의 난각에 창을 내어 발생 중인 계배를 해부 현미경 하에서 관찰함으로써 가능하였다(Summerbell and Hornbruch, 1981). 발생단계의 확인을 마친 뒤 난각에 내었던 창은 투명 접착용 테잎으로 봉하였으며, 수정란을 부란기(39.5°C)에 넣어 발생이 계속 진행되도록 하였다.

Retinoic acid의 처리

본 실험에 사용된 retinoic acid는 all trans retinoic acid(type XX; Sigma)로써 dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma)에 5, 10, 20, 40mg/ml의 농도로 용해하여 사용하였다.

RA처리는 Hamburger와 Hamilton stage 18에서 21에 도달한 계배를 대상으로 시행하였다(Hamburger and Hamilton, 1951). 처리는 먼저 안과 수술용 가위로 계배의 오른쪽 날개 원기 앞부분과 체절의 경계부분을 깊이 0.5mm 정도 절개하고, 가로 세로 각각 0.5mm 크기의 멸균된 갱지를 준비된 RA 용액에 적서 앞서 절개한 부위에 끼워 넣음으로써 완료되었다. RA처리가 끝난 다음 난각의 창은 parafilm으로 밀봉하였으며, 처리된 수정란을 다시 부란기에 넣어 발생이 계속되도록 하였다.

위와 같은 처리방법에 의하여 계배의 발생단계에 따른 RA의 효과를 알아보기 위하여 stage 18, 19, 20, 21에 도달한 계배를 선별하고, 40mg/ml 농도의 RA용액을 적신 종이 조각을 날개 원기에 끼워 넣었다. 한편 계배의 날개 형태형성에 대한 RA의 농도별 효과를 알아보기 위하여 5, 10, 20, 40mg/ml의 RA용액을 적신 종이 조각을 stage 19에 도달한 계배의 날개에 삽입하였다. 각각의 농도별 그리고 발생단계별 처리군은 40개체 정도로 구성되도록 하였다. 대조군 실험으로는 RA의 용매인 DMSO만을 함유시킨 종이 조각을 앞서와 마찬가지로 요령으로 날개 원기에 끼워 넣었다. 계배는 실험 조작시 한쪽으로 누운 형태이므로 처리를 하지 않은 반대쪽 날개는 또 다른 대조군으로 이용되었다.

골격형태의 관찰

RA처리에 따른 날개의 골격 형태에 나타나는 변화를 알아보기 위하여 RA처리 후 7일이 경과된 계배로 부터 양쪽 날개를 절단하고, 절단된 날개를 Gregg 고정액에 24시간 동안 고정하였다. 고정을 마친 뒤 날개의 골격을 Victoria blue B 염색액으로 2시간 동안 염색하고, 탈수과정을 거친 다음,

methyl salicylate로 처리하였다(Bryant and Iten, 1974). 이러한 처리에 의하여 근육과 피부 조직이 투명하게 되었으며, 따라서 내부의 염색된 골격 관찰이 용이하였다.

결 과

RA처리에 따른 골격 형태의 변화는 그 정도가 매우 다양하였다. 이러한 변화는 주로 전후축(anteroposterior axis) 상에서 지골(digit)의 복제로 나타났으며, 종종 날개의 하완부(zeugopodium) 골격인 요골(radius)의 원위부(distal region)가 척골(ulna)의 원위부와 닮은 대칭적인 형태를 나타내었다. 지골의 경우 복제된 골격은 항상 원래의 골격과 거울상을 이루었으며, 복제된 지골의 배열순서는 2234, 32234, 432234 등으로 원래의 배열순서와 순조로운 구배를 형성하였다. 따라서 이렇게 다양한 복제를 보이는 RA 처리에 따른 실험 결과들을 정리하고 전체적인 경향성을 알아보기 위하여 Table 1과 같은 scoring system을 정하고 이에 따라 각 실험 경우에 해당하는 복제 정도를 기록하였다.

이렇게 얻어진 기록으로 부터 각각의 실험군에서 나타나는 전체적인 복제 정도를 알아보기 위하여 복제 지표(DI:duplication index)를 다음과 같은 식,

$$DI = \frac{\sum(DD \times f)}{n}$$

에 의하여 산출하였다. 즉 각각의 복제등급에서 관찰된 빈도(f)를 해당하는 복제 등급(DD : degree of duplication)에 곱한 뒤, 이를 총합하고, 이렇게 얻어진 값을 전체 실험 개체수(n)로 나누어 복제 지표(DI)를 산출하였다.

Table 2는 stage 18에서 21에 이르는 계배의 발생단계에 따른 날개의 형태형성에 미치는 RA의 효과를 요약하고 있다. 이 표에서 볼 수 있듯이 RA는 발생단계가 이룰수록 더 큰 효과를 유발하였다. 즉 stage 18의 경우에는 DI가 3.16정도로 아주 높았으며, 이것은 평균적으로 4번째 지골의 완전한 복제와 더불어 심한 후위화(posteriorization)가 일어났음을 보여준다. 그러

Table 1. Scoring system for the duplication of digits resulting from RA-treatments in developing chick wing-buds.

Degree of Duplication (DD)	Characteristics
0	normal digit pattern, 234
1	2234
2	32234 or 3(2)34
3	432234 or 43(2)34
4	4334
5	4334
6	434
7	44 or (4)

() : shared digit

□ : partially fused digits

Table 2. The effects of RA(40 mg/ml) on various stages of chick wingbuds. Numbers represent cases observed in each category.

Stage	DD								Total cases	DI
	0	1	2	3	4	5	6	7		
18	2	4	3	4	12	7	3	1	36	3.61
19	3	5	5	14	8	4	3	2	44	3.20
20	23	12	2	10	3	3	5	2	60	1.95
21	26	4	1	2	1	0	1	0	35	0.63

DD: degree of duplication

DI: duplication index

Table 3. Dose effects of RA on stage 19 chick wing-buds. Numbers represent cases observed in each category.

RA conc. (mg/ml)	DD								Total cases	DI	
	0	1	2	3	4	5	6	7			
0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0
5	21	6	11	3	0	0	0	0	41	0.90	
10	10	1	1	19	4	1	0	0	36	2.25	
20	3	1	2	19	5	4	1	1	36	3.19	
40	3	5	5	14	8	4	3	2	44	3.20	

DD: degree of duplication

DI: duplication index

나 발생단계가 21에 이르렀을 때에는 DI가 0.63으로서, 극히 일부의 경우에만 지골의 복제가 나타남을 보여 주어 이 시기에는 RA처리에 의한 후반부화가 극히 경미함을 나타내고 있다. Stage 19와 20에서는 DI가 각각 3.20과 1.95로서 큰 차이를 보여주고 있으며, 이는 stage 19와 stage 20 사이에 날개 원기를 구성하고 있는 세포들의 RA에 대한 예민성에 큰 변화가 나타났음을 암시하고 있다.

Table 3은 RA처리량에 따라 stage 19의 계배에서 나타나는 날개 지골의 복제 정도를 요약하고 있다. 복제 정도는 RA처리량이 많아짐에 따라 증가하였으나 20 또는 40mg/ml 용액에 적신 종이 조각을 끼워 넣었을 때 나타난 결과는 거의 비슷하였다. 따라서 이러한 결과는 최대의 복제를 유발하는 RA의 처리량에 한계가 있음을 보여준다. DMSO 만으로 처리된 경우에는 복제된 골격을 전혀 관찰할 수 없었으며, 이는 RA처리에 따른 지골의 복제가 RA에 의한 전형적인 효과임을 반증하고 있다.

고찰

날개의 형태형성에 미치는 RA의 효과는 발생시기가 이른 조직일수록 강하게 나타나는 것으로 본 실험 결과 판명되었다. 이러한 경향은 네단계의 발생시기, 즉 stage 18에서 21에 대한 실험 결과로부터 알 수 있었으며, Summerbell(1983)에 의하여 시행된 비슷한 실험과 비교하여 볼 때 대체로 그 경향이 유사함을 알 수 있었다.

처리량에 따른 RA의 효과는 DMSO에 용해된 RA의 농도가 20mg/ml 일때 그 효과가 최고점에 도달하였으며, 그 이상의 농도인 40mg/ml의 경우에도 이와 비슷한 결과가 나타났다. 한편 5mg/ml 또는 10mg/ml의 농도에서는 위의 경우와 비교할 때 현격히 낮은 효과를 유발하였다. Summerbell(1983)은 RA의 농도가 8mg/ml에 도달했을 때 이미 그 효과의 극대화가 유발됨을 보고하였으나, 본 실험의 결과를 이에 비교해 보면 극대의 효과를 유발하는 RA의 농도에 있어서 약 2.5배 정도의 차이를 보이고 있다. 이러한 차이는 Summerbell에 의하여 설정된 등급기준이 본 실험에서 사용된 등급기준과 서로 다를 뿐 아니라, 서로 다른 닭의 품종간에 존재할지도 모를 RA처리에 대한 날개원기 세포의 예민성의 차이에도 기인할 수 있으리라 추측된다.

이러한 차이점에도 불구하고 보다 근본적인 문제점은 왜 보다 이른 시기의 날개 원기 세포가 RA처리에 대하여 더 민감한가 하는 점이다. 계배의 발생에 있어서 날개의 장(wing field)의 전후 축(anteroposterior axis)이 stage 8에 이미 결정된다는 실험적 결과(Chaube, 1959)로 보아 RA는 이미 결정되어 있는 전후 축에 근본적인 변화를 야기하며, 이러한 변화는 날개 원기구를 구성하는 세포들이 비교적 이른 시기에 있을 때 더욱 심한 것으로 보인다. 발생단계에 따른 RA의 효과는 재생되고 있는 유미양서류의 다리의 경우에서도 관찰되었다(Niazi *et al.*, 1985). 즉 재생되고 있는 양서류의 다리에서 역분화시기(dedifferentiation stage)에 RA를 처리하면 골격의 복제를 유발하지만, 재분화 시기(redifferentiation stage)에 처리하면 골격형성이 저해된다. 이는 세포의 분화 상태에 따라 RA의 효과가 다양함을 시사하여 주며 stage 18 정도의 발생 초기에 있는 계배의 날개 원기세포는 미분화 상태인 반면 stage 21정도에 도달하면 이미 근위부로 부터 시작하여 분화가 진행되고 있으므로 자연히 RA 처리에 대한 효과도 감소하는 것으로 해석할 수 있다.

한편 Thaller와 Eichele(1987)은 정상적인 계배의 날개 원기에서 전후 축상에 분포하고 있는 RA의 양에 차이가 있음을 보고 하였다. 이들은 날개 원기의 후반부에 보다 많은 양의 RA가 존재한다는 사실을 확인하고, 이를 바탕으로 날개 원기에서 RA가 전후 축을 결정하는 형태형성 요소로서 작용한다고 주장하였다. 그러나 이러한 주장은 Iten과 Murphy(1980)에 의하여 시행된 이식 실험의 결과를 설명하는데 문제점을 가지고 있으며 이 점에 대한 타당성 여부는 앞으로 더욱 연구되어 밝혀져야 될 과제이다. RA가 날개 원기의 전후 축 결정에 작용하는 진정한 의미의 형태형성 요소라면 날개 원기의 전후 축 결정이 최초로 일어난다고 보여지는 stage 10 이전에도 이미 날개 원기가 유래하는 체절부위에서 RA 분포의 불균일성이 나타날 것으로 기대된다. 이것을 검증하기 위하여는 stage 10을 전후로 하여 날개 원기가 유래하는 체절 부위에 존재하는 RA의 양을 측정할 필요가 있으며, 또한 이 시기에 RA를 체절 부위에 처리했을 때 마찬가지로 골격 복제 효과가 나타나는지를 알아 보아야 할 것이다.

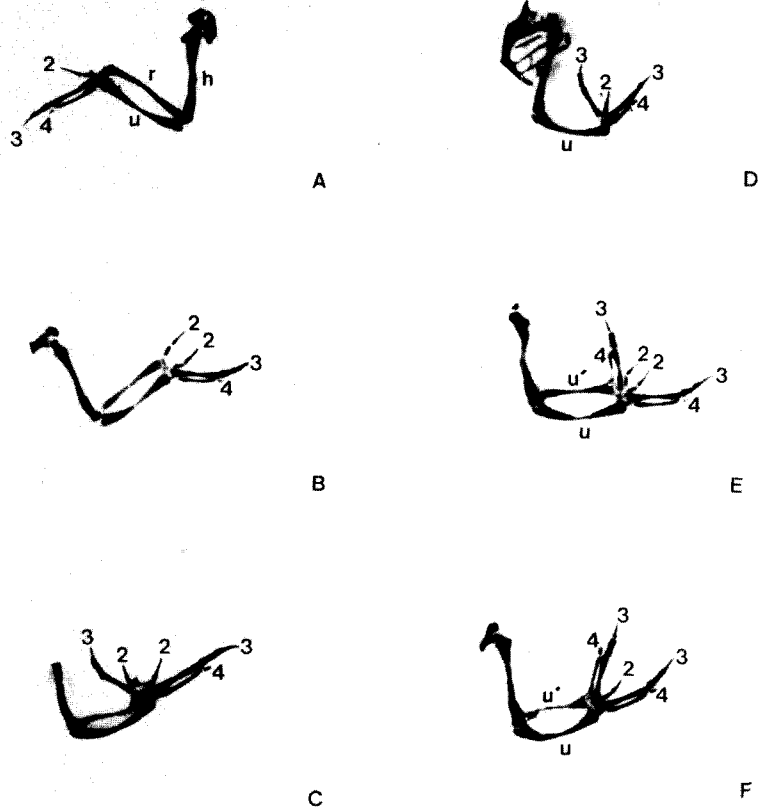


Fig. 1. Wing skeletal patterns that developed following application of RA(in DMSO)-soaked paper onto the anterior margins of chick wing-buds (stage 18-20). Dorsal view.

Magnification: X5.

h: humerus, r: radius, u: ulna, u': ulna-like, 2,3,4: denote digit numbers, () : shared digit, □ : partially fused digits, DD: degree of duplication.

- A: Normal left wing with digit pattern 234, DD=0.
- B: Right wing with digit pattern 2234, DD=1.
- C: Right wing with digit pattern 32234, DD=2.
- D: Right wing with digit pattern 3(2)34, DD=2. 2nd digit shared by the original and the duplicated limb, radius is missing.
- E: Right wing with digit pattern 432234, DD=3. In the duplicated limbs, tips of 3rd and 4th digits fused. Also, note the tip of the duplicated ulna (u').
- F: Right wing with digit pattern 43(2)34, DD=3. 2nd digit shared by the original and the duplicated limbs. Also, note the tip of the duplicated ulna (u').

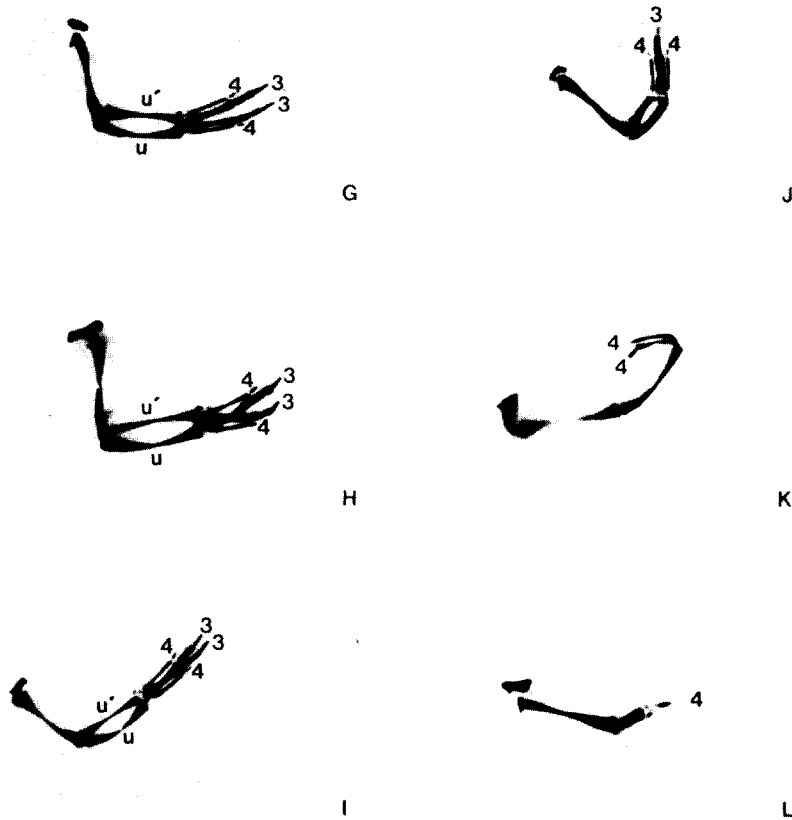


Fig. 1. (Continued)

- G: Right wing with digit pattern 4334, DD=4. 2nd digit is completely missing. Note the complete mirror image of the duplicated ulna to the original ulna.
- H: Right wing with digit pattern 4[□]334, DD=5. 2nd digit is completely missing. 3rd digits are partially fused. The distal tip of the duplicated ulna resembles that of the original ulna.
- I: Right wing with digit pattern 4[□]334, DD=5. 2nd digit is completely missing. 3rd digits are partially fused (more distally compared to H).
- J: Right wing with digit pattern 434, DD=6. 2nd digit is completely missing. Also, note the shared 3rd digit. Zeugopodial pattern is uu'.
- K: Right wing with digit pattern 44, DD=7. 2nd and 3rd digits are completely missing. Also, rather a thick block of cartilage presents in the position of ulna.
- L: Right wing with digit pattern (4), DD=7. 2nd and 3rd digits are completely missing. A thick block of ulna-like cartilage presents as a zeugopodial element.

REFERENCES

1. Bollag, W. and H.R. Hartmann, (1983): Prevention and therapy of cancer with retinoids in animal and man. *Cancer Surv.* 2: 293-313.
2. Bryant, S.V. and L.E. Iten, (1974): The regulative ability of the limb regeneration blastema of *Triturus viridescens*. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 174: 90-101.
3. Chaube, S., (1959): On axiation and symmetry in transplanted wing of the chick. *J. Exp. Zool.* 140: 29-77.
4. Dhouaily, D., M.H. Hardy, and P. Sengel, (1980): Formation of feathers on foot scales: a stage-dependent morphogenetic response to retinoic acid. *J. Embryol. exp. Morph.* 58: 63-78.
5. Edelman, G.M., (1983): Cell adhesion molecules. *Science.* 219: 450-457.
6. Edwards, M.K. and M.W. McBurney, (1983): The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev. Biol.* 98: 187-191.
7. Ganguly, J., M.R.S. Rao, S.K. Murthy, and K. Sarada, (1980): Systemic mode of action of vitamin A. *Vit. Horm.* 38: 1-54.
8. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, (1951): A series of normal stages in the chick embryo. *J. Morph.* 88: 49-92.
9. Hardy, M.H., (1983): Vitamin A and the epithelial-mesenchymal interactions in skin differentiation. *In: Epithelial-Mesenchymal interactions in development* (J.F. Fallon and R.H. Sawyer, editors). Praeger, New York, pp. 163-168.
10. Iten, L.E. and D.J. Murphy, (1980): Pattern regulation in the embryonic chick limb: Supernumerary limb formation with anterior (non-ZPA) limb bud tissue. *Dev. Biol.* 75: 373-385.
11. Jones-Villeneuve, E.M.V., M.A. Rudnicki, J.F. Harris, and M.W. McBurney, (1983): Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2271-2279.
12. Joukoff, E., T. Planchenault, and V. Keil-Dlouha, (1986): Changes of surface glycoprotein after retinoic acid-dibutyryl cAMP-induced differentiation of teratocarcinoma stem cells. *Dev. Biol.* 114: 289-295.
13. Kwasigroch, T.E. and D.M. Kochhar, (1980): Production of congenital limb defects with retinoic acid: phenomenological evidence of progressive differentiation during limb morphogenesis. *Anat. Embryol.* 161: 105-113.
14. Moon, R.C., D.L. McCormick, and R.G. Mehta, (1983): Inhibition of carcinogenesis by retinoids. *Cancer Res.* [Suppl]. 43: 2469s-2475s.
15. Niazi, I.A., M.J. Pescitelli, and D.L. Stocum, (1985): Stage-dependent effects of retinoic acid on regenerating urodele limb. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194: 355-363.
16. Robinson, J., R.K. Freinkel, and R. Gotschalk, (1984): Effect of retinoic acid and low calcium conditions on surface glycoconjugates defined by differential lectin labeling in mouse epidermal cell culture. *Br. J. Dermatol.* 110: 17-27.
17. Steinberg, M.S. and T.J. Poole, (1982): Cellular adhesive differential as determinants of morphogenetic movements and organ segregation. *In: Developmental order: its origin and regulation* (S. Subtelny and P.B. Green, editors). Alan. R. Liss, Inc., New York, pp. 351-378.

18. Summerbell, D. and A. Hornbruch, (1981): The chick embryo: A standard against which to judge *in vitro* system. *In: Culture techniques: Applicability for studies on prenatal differentiation and toxicity.* (D. Neubert and H.J. Merker, editors). Walter de Gruyter and Co., Berlin, pp. 529-538.
19. Summerbell, D. (1983): The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb. *J. Embryol. exp. Morph.* 78: 269-289.
20. Thaller, C. and G. Eichele, (1987): Identification and spacial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature.* 327: 625-628.
21. Tickle, C., B. Alberts, L. Wolpert, and J. Lee, (1982): Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature.* 296: 564-566.
22. Tsambaos, D. and C.E. Orfanos, (1983): Antipsoriatic activity of a new synthetic retinoid. *Arch. Dermatol.* 119: 746-751
23. Wedden, S.E., (1987): Epithelial-mesenchymal interactions in the development of chick facial primordia and the target of retinoid action. *Development.* 99: 341-351.
24. Wolpert, L., (1971): Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 6: 183-224.

The Effects of Retinoic Acid on the Developing Chick Wingbuds.

Man-Jong Han and Won-Sun Kim

*Department of Biology
College of Science and Engineering
Sogang University*

The effects of retinoic acid (RA) on the developing chick wingbuds have been studied. RA treatments on the wingbuds caused the duplications of mirror-imaged wing digits from the anterior margins of the wingbuds. The degree of RA-induced digit duplications was both stage- and dose- dependent. RA treatment invoked maximum duplication of digits in the stage 18 chick wingbuds and at the concentration of 20 mg/ml RA in dimethylsulfoxide. These results suggest that RA causes the posteriorization of positional values in the anteroposterior axis of the chick wingbud cells in a dose- and stage- dependent manner.