

## Xenopus 초기배의 이랑과 동물극분리배양에서 유도된 이랑간의 형태비교

윤 춘 식 · 김 홍 득\* · 정 선 우\*\*

포항공과대학교 생명과학과

\*동경대학 분자세포생물학연구소

\*\*창원대학교 생물학과

### Ultrastructural Study of Induced Otic Vesicle from Isolated *Xenopus* Presumptive Ectoderm

Chun-Sik Yoon, Hong-Duck Kim\* and Seon-Woo Cheong\*\*

Dept. Life Science Pohang University of Science and Technology, \*Inst. Molecular and Cellular Biosciences University of Tokyo, \*\*Dept. Biology Changwon National University

(Received April 30, 1997)

#### ABSTRACT

The ultrastructures of *Xenopus* otic vesicle from normal embryo (st. 43) and induced otic vesicle from animal cap assay with Activin A were compared. Activin A was applied to the presumptive ectoderm at various concentrations for three days at 20°C. The results were almost identical to the reference studies, but it was found that the otic vesicle was induced at the concentration of 10 ng/ml in low rate. This otic vesicle may be secondarily induced by the neural tissue showed commonly at the concentration of 10 ng/ml. Otoliths were observed as three or four-axis crystalline bodies in the lumen of otic vesicle. In electron micrograph of the normal embryo, two kinds of microvilli were observed on the apical position of hair cells. One was small and common, the other was large-sized and sparsely distributed. In both cell of otic vesicle, mitochondria, golgi apparatus and multivesicular body were rich, so, they showed a lot of similarities in ultrastructure. However, the otolith was not found and microvilli were overexpressed in the otic vesicle induced by Activin A.

**Key words** : Activin A, Otic Vesicle, *Xenopus laevis*, Animal Cap Assay, Electron Microscopy

#### 서 론

Activin은 TGF- $\beta$ (Transforming Growth Fac-

tor) superfamily에 포함되는 세포증식 및 분화인자 중 하나이며 3종으로 나뉘어 진다. 즉 Activin A, Activin B, Activin C이며 이들은 *in vitro*에서 다양한 세포성장분화효과를 보여주고 있다. 그 중

Activin A는 양서류의 초기배발생, 특히 동물극분리 배양실험 (animal cap assay)에서 그 처리농도와 시간에 따라 다양한 조직분화양상을 보여주고 있으며, 예정표피역과 신경역인 외배엽 (presumptive ectoderm) (Dale 과 Slack, 1987)으로부터 중배엽을 유도해내는 강력한 성장인자로 알려져 있다. Asashima 등(1991), Ariizumi와 Asashima (1994), Fukui와 Asashima (1994), Kinoshita와 Asashima (1995) 등에 의하면, 양서류의 동물극 (presumptive ectoderm)분리편을 생리식염액 (Steinberg's solution)에서 stage (st. = 시기) 43까지 무처리 배양하면 부정형 표피 (atypical epithelium)만이 분화되나, Activin A를 0.3~1 ng/ml 처리배양하면 주로 혈구상세포 (blood-like cell), 체강상피 (coelomic epithelium), 간충직 (mesenchyme) 등이 분화되어 나오고, 5~10 ng/ml농도에서는 근육과 신경조직이, Activin A 10 ng/ml와  $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$  M의 retinoic acid를 함께 처리하면 신관 (nephric duct)이, Activin A 50~100 ng/ml에서는 척색이 높은 비율로 분화하였다. 처리시간 5분에서 3시간까지는 서로 다른 조직분화양상을 보이나 3시간 이후부터는 그 효과가 같다. 이러한 사실들은 동물극분리배양에서 나타나는 Activin A의 효과에 대한 강한 경향성이라 할 수 있으며 Activin A는 *Xenopus laevis*의 동물극분리편을 근육, 신경조직, 간충직 등으로 잘 분화시켜 감각기관의 발생에 매우 중요한 요인을 제공해주고 있다. 감각기관 초기발생중 이낭 (ear vesicle=otic vesicle=otocyst)은 막미로 (membranous labyrinth) 또는 내이의 원기 (anlage of inner ear)이며 동물마다 발생방법이 다르다. *Xenopus*의 이낭은 내부의 감각상피가 비후하여 ear placode가 형성된 후 23시기에 약한 함몰을 보이다가 27시기에 폐쇄낭을 이루게 된다. 28시기에는 이낭이 표피로부터 분리되고, 29~30시기에는 분리된 이낭이 주변간충직으로 확장되면서 이낭의 벽이 얇아지며 32시기에는 내림프의 원기가 형성되며, 이어서 33~34시기에 이낭복측상피의 일부가 비후되고 이어서 막미로의 여러가지 소기관으로 발달하게 된다 (Nieuwkoop 과 Faber, 1956; Balinsky, 1981). 발달된 내이의 감각은 청신경이 연결되어 있는 유모세포 (hair cell)가 청석 (otolith)이 받는 자극을 전달받음으로써 이루

어지며, 유모세포의 표면에는 다수의 미세융모가 분포해 있다 (Leeson과 Leeson, 1981). 청석은 탄산석회와 단백질로 구성되며, 그 수와 크기, 모양 등은 종에 따라 다양하다 (Kent, 1987). *Xenopus*의 내이유도에 관한 연구는 Gallagher 등(1996)이 동물극 분리편을 다른 초기배에 이식함으로써 눈의 유도와 유사한 점 등을 논의한 바 있다 (Servetnick와 Grainger, 1991).

본 연구에서는 동물극단편의 Activin A처리시 기준의 연구에서 나타난 발생경향 이외에 일정농도에서 낮은 비율로 유도되는 이낭에 대하여 정상배의 초기발생과 광학 및 전자현미경적으로 비교하고 이들의 유사성 및 차이점에 대하여 논의하고자 하며, Activin A의 또 하나의 기관발생촉진효과에 대한 가능성을 검증하려 한다.

## 재료 및 방법

### 1. *Xenopus* 초기배의 준비 및 동물극분리배양

*Xenopus laevis*는 성적으로 성숙된 암수개체를 사용하였으며 (*Xenopus* I: USA), 암수 각 500 IU씩의 HCG (Human Chorionic Gonadotrophin)를 주사하여 수정란을 얻고 3% Cystein Hydrochloride (pH. 7.8)로 젤리층을 제거한뒤 생리식염액 (pH. 7.4)으로 수 회 세척한 후 9시기에 있는 난을 선별하여 멸균된 3% Agar 판위에서 핀셋으로 난막을 제거하고 텅스텐 바늘로 동물극을 분리한 후 생리식염액으로 정상배 (normal embryo)가 43시기에 도달할 때까지 20°C에서 배양하고 이를 대조구로 하였다 (Cooke *et al.*, 1987; Kay and Peng, 1991). 처리구는 Activin A를 각각 0.5, 1, 10, 50, 100 ng/ml (0.1% Bovine Serum Albumin)씩 분리된 동물극에 계속 처리하여 조직배양 하였다. 이도 역시 정상배가 43시기에 이를 때까지 배양하였다. 배양용기는 표면처리가 되지 않은 24-well polystyrene plate를 사용하였으며, 발생단계는 Nieuwkoop과 Faber (1956)를 따랐다.

### 2: 광학현미경적 관찰

43시기에 이른 정상배와 대조구 및 처리구의 배양조액은 Bouin's Solution (Picric acid 15: Formalin 5:

Acetic acid 1)에 3시간 고정 후 70%, 90%, 100% Ethanol로 탈수하고 Paraffin 포매하여 6  $\mu$ m로 절편한 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색 관찰하였다. Plastic section은 전자현미경고정하여 Epon-Araldite에 포매한 후 thin-section하여 Toluidine blue로 염색, 관찰하였다.

### 3. 투과전자현미경적 관찰

조직표본들은 0.1 M 인산완충액 (pH 7.2)으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액과 2% formaldehyde 용액에서 4~5시간 고정하였다. 후 고정은 1% osmium tetroxide ( $OsO_4$ )로 4°C에서 1시간 고정하였으며 0.5% uranyl acetate로 4°C에서 1시간 염색하였다. 이들 조직을 ethanol로 탈수하고, Epon-Araldite에 포매하였다. 포매된 조직의 ultra-thin section은 2% uranyl acetate 용액과 Reynolds' lead citrate 용액 (Reynolds, 1963)으로 각각 염색한 후 투과전자현미경 (JEOL 1200EX)으로 관찰하였다.

## 결 과

동물극 (animal cap explant)의 분리배양 3일 후 정상배는 43시기에 도달하였으며, 무처리 대조구에서는 비정형표피만이 분화하고 (Fig. 3) 각각의 Activin A 농도로 처리한 배양조직에서는 Asashima 등 (1991)에 의해 서술된 바와 거의 일치하였으나, 10 ng/ml 농도에서는 실험 explants 중 5% 정도의 낮은 비율로나마, 이낭이 분화하였다 (Fig. 4). 정상배에서는 후뇌 (myelencephalon)와 후뇌실 (myelocoel)이 발달된 준위에서 간층직 가운데에 이낭이 확인되고 있으며, 이낭내측과 외측상피의 두께가 다른 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이낭을 plastic section 하였을 때, 내측 (IN), 즉, 후뇌측으로는 이낭의 원주상상피와 한 쪽이 좁은 원주상상피가 발달되어 있었고, 내강을 향해 청석이 3축 또는 4축 등의 다면체를 형성하여 분포하는 것이 관찰되었다. 청석은 otolithic membrane으로 한정되어 있지 않고 특별한 경계없이 원주상상피 주변에 분포하고 있었다. 반면, 외측 (OU)으로는 이낭의 편평상피가 보여지며, 이 외측으로는 청석등 분비의 흔적이 관찰되지 않았다 (Fig. 2). Activin A에

의해 유도된 이낭은 각 explant에 따라 다양한 크기로 분화하여 있었으며, 정상배와 마찬가지로 간층직내에 분포하였으나 주변에 비정형표피세포가 분화하고, 근육조직이 잘 관찰되었다. 신경조직은 발달하나 후뇌발달은 뚜렷하지 않은 explant에서도 이낭이 관찰되는 점이 특이하였다.

정상배에서 나온 이낭과 동물극분리배양에서 유도된 이낭의 미세형태를 비교하기 위해 전자현미경관찰을 하였다. 정상배의 이낭에서는 감각에 관여하는 유모세포 위에서 미세용모가 관찰되었고, 이낭의 내강에서는 이낭세포에서 분비되었을 multivesicular body (MVB)가 자주 관찰되었다. 청석은 MVB의 상부에서 관찰되었다. 이낭의 상피세포간에는 tight junction이 뚜렷이 관찰되었으며, 미세용모는 작은 것들이 일반적으로 분포해 있었으나 매우 큰 것도 가끔 관찰되었다 (Figs. 5와 6). 동물극분리배양에서 Activin A에 의해 유도된 이낭에서는 미세용모가 과다발달한 것을 보여 주었다. 한 유모세포당 미세용모들이 정상배의 이낭에 비해 매우 조밀하였으며 골지체가 잘 발달되어 이것은 정상배의 이낭세포 특징과 유사하였다. 그러나 정상배에서 관찰되던 청석은 관찰되지 않아 또 하나의 특징적인 형태로 나타났다. 유도된 이낭의 상피세포간에도 tight junction이 뚜렷하게 관찰되었고 MVB 유사구조가 이낭의 내강에서 자주 관찰되었다 (Figs. 7과 8). 정상배의 이낭세포와 유도된 이낭세포에서는 모두 조면소포체들이 발달해 있었다.

## 고 찰

Activin A에 의해 유도된 이낭은 정상배의 이낭에 비해 큰 것도 있었으며 주변의 간층직에 의해 둘러싸여 지속적인 내이의 구조형성에 간층직이 관여할 것이라는 사실을 뒷받침해주고 있다. 또한 정상배에 비해 유모세포층, 즉 원주상세포들이 대부분을 차지하고 있으며, 얇아진 편평상피층은 정상배에 비해 오히려 적게 관찰되었는데, 이것은 이낭 유모세포의 과다 발현이 일어난 것이기 때문이라고 생각한다. 전자현미경상에서 미토콘드리아와 골지체, 조면소포체, MVB가 많이 나타난 것으로 보아 정상배와 유도된 이낭은 세포의 구조나 성격에 있어 거의 같다고 할 수 있으며,

이들은 모두, 발생초기의 이낭이므로 신진대사가 매우 활발하게 일어나고 있다는 것을 증명해 준다. 그러나, 정상배에서 나타나는 2가지 종류의 미세융모가 유도된 이낭에서는 나타나지 않는 점, 한 유모세포당 미세융모가 과다발현되어 조밀하게 나타난 점, 청석형성이 관찰되지 않는 점 등으로 보아 유도된 이낭에서는 정상적인 감각기능을 가질 수 없는 것으로 생각된다.

척추동물의 예정표피역에 대하여 중배엽을 유도하는 것으로 알려진 단백질성 성장물질은 계배(Geithe 등, 1975), 잉어의 부레(Kawakami, 1976) 등 *Xenopus* 외 기원의 여러 동물 및 기관에서 발견되어 왔다. *Xenopus tadpole*의 cell-line 배양액으로부터 얻은 중배엽유도물질은 XTC-MIF라고 하며, 이의 연구로 밝혀진 단백질계 성장인자에 TGF- $\beta$  superfamily가 포함된다. bFGF는 포유동물유래의 염기성 섬유아세포 성장인자로서 동물극분리편에 복부중배엽유도효과를 보이며(Slack 등, 1989), Activin A는 TGF- $\beta$  superfamily에 포함되는 성장인자로서 최초에는 여포 자극호르몬인 FSH의 분비를 촉진하는 것으로 알려졌다(Vale 등, 1986). 또한 이 물질은 *in vitro*에서 양서류의 동물극분리편으로부터 여러 가지 중배엽성조직을 유도하는 인자로 인식되어 왔으며(Ariizumi와 Asashima, 1995), 특히 10 ng/ml의 농도에서 50% 이상의 신경조직 유도효과와 80% 이상의 근육유도효과를 보여주고 있다. 이러한 조건에서 유도된 신경조직은 Activin A로 유도된 중배엽성조직인 근육으로부터 2차적으로 유도된 것으로 고려되며, 감각기관중 후각기(olfactory organ), 눈(optic vesicle), 이낭(otic vesicle)의 발달은 이러한 신경조직의 작용과 밀접하게 연관되어 있으며, 각 감각기관은 상호발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 실제로 Betty 등(1996)은 *Xenopus*의 내이발생과 눈의 발생이 관련된다고 밝혔으며, Activin A는 양서류 초기발생중 두화(cephalization)에 중요한 작용을 하는 인자라고 할 수 있다.

정상배 43시기의 이낭은 중배엽의 가운데 위치에서 비대칭적인 vesicle의 형태를 보이며, 이것은 내측의 원주상피, 즉 감각신경이 개재된 유모세포의 존재와 외측의 편평상피세포군이 기능적으로 서로 다르기 때문이라 할 수 있다. 청석의 분포는 다른 사지동물에서

는 membrane에 한정되어 있는 것으로 알려져 있으나, *Xenopus*의 청석은 이낭의 유모세포상부에 내강을 향하여 약간 진출하고 있는 것으로 보인다. 이석의 형태는 같은 이낭에서도 서로 다르며, 축이 있는 정형을 보이고 있었다. 청석의 형성경로에 대해서는 그다지 알려진 바 없는 것 같으나 저자들의 의견으로는 유모세포에서 분비된 물질에 의하여 형성되는 것으로 사료된다. 이는 본 연구의 사진설명에서는 포함하지 않았으나, 분비물을 막 분비하고 있는 전자현미경상을 본 연구도중 포착하였기에 참고로 언급하는 바이다. 또한 Activin A에 의해 유도된 이낭은 정상적인 청각기능을 가질수 없는 것에 대하여 유도된 이낭에도 정상이낭과 동일한 기능을 부여할 수 있는 유도물질을 찾아 나가는 것이 과제라 사료된다.

## 결 론

*Xenopus laevis*의 정상초기배에서 발생하는 이낭의 광학 및 전자현미경적 구조와 *Xenopus*난의 동물극분리편(animal cap explant)에 성장인자 중 강한 중배엽유도능을 갖는 Activin A를 처리하여 유도된 이낭의 광학 및 전자현미경적 구조를 비교하였다. 우선 Activin A의 중배엽유도효과를 입증하기 위해 동물극분리편을 무처리생리식염액인 SS내에서 정상배가 20°C에서 43시기에 도달하는 3일간 배양한 결과 비정형 표피세포만이 분화하였다. 그러나 Activin A를 0.5~100 ng/ml의 농도로 처리배양한 결과, 다른문헌의 실험결과와 유사하였으나, 10 ng/ml의 농도에서 5% 정도의 낮은 비율로 이낭이 유도되었다. 이것은 10 ng/ml의 농도에서 신경조직분화가 왕성하게 일어나는 것이 일반적이기 때문에 2차적으로 감각기관인 이낭이 유도될 가능성이 높아졌기 때문이라 사료된다. 이낭의 내부에는 원주상 유모세포의 주변에 3~4층의 결정인 청석이 관찰되었으며, 전자현미경상에서 정상배의 이낭은 크고 작은 2종류의 미세융모가 관찰되었다. 유도된 이낭에서는 미세융모가 잘 발달되었고 미토콘드리아와 골지체가 풍부하게 관찰되는 등, 기본적으로는 정상배의 이낭과 유사한 세포구조를 보여주었다. 그러나, 정상배의 이낭에서 볼 수 있는 청석이 발견되지 않았고 유모세포위의 미세융모가 과다 발현되어 매우

조밀하게 분포하였다.

### 감사의 글

본 연구에 사용된 Ativin A를 제공하여 준 동경대학의 Asashima교수에게 감사드린다.

### 참 고 문 헌

- Ariizumi T, Asashima M, 1994. *In vitro* control of the Embryonic form of *Xenopus laevis* by activin A: time and dose-dependent including properties of Activin-treated ectoderm, *Development. Growth & Differ.* 36(5), 499-507.
- Ariizumi T, Asashima M, 1995. Control of the embryonic body plan by activin during amphibian development, *Zoological Science* 12, 509-521.
- Asashima M, Nakano H, Uchiyama H, Sugino H, Nakamura T, Eto Y, Ejima D, Nishimatsu SI, Ueno N, Kinoshita K, 1991. Presence of activin (erythroid differentiation factor) in unfertilized eggs and blastulae of *Xenopus laevis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6511-6514.
- Balinsky BI, 1981. *An introduction to embryology*, 5th ed., Saunders College Publishing, pp. 768.
- Cooke J, Smith JC, Smith EJ, Yaqoob M, 1987. The organization of mesodermal pattern in *Xenopus laevis*: experiments using a *Xenopus* mesoderm-inducing factor, *Development* 101, 893-908.
- Dale L, Slack JMW, 1987. Fate map of the 32 cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* 99, 527-551.
- Fukui A, Asashima M, 1994. Control of cell differentiation and morphogenesis in amphibian development, *Int. J. Dev. Biol.* 38, 257-266.
- Gallagher BC, Henry JJ, Grainger RM, 1996. Inductive processes leading to inner ear formation during *Xenopus* development, *Developmental Biology* 175, 96-107.
- Geithe HP, Asashima M, Born J, Tiedemann H, Tiedemann H, 1975. Isolation of a homogenous morphogenetic factor, inducing mesoderm and endoderm derived tissues in *Triturus* ectoderm. *Exp. Cell Res.* 94, 447-449.
- Kay BK, Peng HB, 1991. *Methods in cell biology* : Vol. 36. *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology, Academic Press Inc. pp.62-109.
- Kawakami I, 1976. Fish swim bladder: an excellent mesodermal inductor in primary embryonic induction, *J. Embryo. exp. Morphol.* 36, 315-320.
- Kent GC, 1987. *Comparative anatomy of the vertebrates*, 6th ed., Times Mirror/Mosby College Publishing, pp.646+25.
- Kinoshita K, Asashima M, 1995. Effect of activin and lithium on isolated *Xenopus* animal blastomeres and response alternation at the midblastula transition, *Development* 121, 1581-1589.
- Leeson TS, Leeson CR, 1981. *Histology*, 4th ed., W.B. Saunders Company, pp.600.
- Nieuwkoop PD, Faber J, 1956. *Normal table of Xenopus laevis* (Daudin), North-Holland Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Rosa F, Roberts AB, Danielpour D, Dart LL, Sporn MB, Dawid IB, 1988. Mesodermal induction in amphibians: the role of TGF- $\beta$ -2-like factors. *Science* 239, 783-785.
- Servetnick MD, Grainger RM, 1991. Changes in neural and lens competence in *Xenopus* ectoderm: evidence for an autonomous developmental timer, *Development* 112, 177-188.
- Slack JMW, Isaacs HV, 1989. Presence of basic fibroblast growth factor in the early *Xenopus* embryo, *Development* 105, 147-153.
- Vale W, Rivier J, Vaughan, McClitock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess Y, 1986. Purification and characterization of an FSH-releasing protein from porcine ovarian follicular fluid, *Nature* 321, 776-779.

**FIGURE LEGENDS**

- Fig. 1.** Light micrograph showing the level of otic vesicle (OV) of normal embryo at st. 43. Myelencephalon (MY) and myelocoele (ME) are well developed. Mesenchyme (MC) is distributed around the otic vesicle. Notochord (NC) is located over the pharynx (PH). Somites are located on each side of notochord. Heart (HT) is seen on the ventral part. Paraffin section and stained with HE. Bar : 100  $\mu$ m
- Fig. 2.** Light micrograph of otic vesicle (OV). Cylindrical epithelium of innerside (IN) have many hair-like structures and otoliths (arrow heads) are distributed on them. Acoustic nerve (NV) is connected on the cylindrical cells. Plastic section and stained with Toluidine blue. Bar : 10  $\mu$ m
- Fig. 3.** Light micrograph showing atypical epithelium of normal animal cap explant cultured without Activin A treatment for 3days. HE staining. Bar : 100  $\mu$ m
- Fig. 4.** Light micrograph showing the otic vesicle (OV) induced by Activin A (10 ng/ml). Cultured explant differentiated into atypical epithelium (AE), mesenchyme (MC) and neural tissue: neural tissue is poor in this section. HE staining. Bar : 50  $\mu$ m
- Fig. 5.** Electron micrograph showing the otic vesicle from a normal embryo. Stereocilia (elongated microvilli, arrow heads) are distributed on apical surface. Tight junction (TJ) is distinct. Each cell has numerous mitochondria and rER. Multivesicular body (MVB) and otolith (OT) are also observed in the lumen of the otic vesicle. Bar : 1  $\mu$ m
- Fig. 6.** Electron micrograph showing the otic vesicle from a normal embryo. There are two kinds of microvilli ; common microvilli (arrow heads) and large-sized microvilli (blank arrow head). Bar : 1  $\mu$ m.
- Fig. 7.** Electron micrograph showing the otic vesicle induced by animal cap assay. Overexpressed microvilli are distributed on apical surface of hair cells. Newly secreted multivesicular bodies (starisk) are observed. Bar : 2  $\mu$ m
- Fig. 8.** Electron micrograph of hair cells from induced otic vesicle. Golgi apparatus (G) is well developed in the upper part. Newly secreted multivesicular body (starisk) is observed. Dense microvilli are arranged on apical surface, however, large-sized microvilli are absent. Bar : 1  $\mu$ m



