

생쥐 무릎관절 공간 발생에 있어 아포프토시스 세포에 관한 면역전자현미경적 연구

채희선 · 김경용 · 이원복 · 임형수* · 황덕호* · 장가용*
중앙대학교 의과대학 해부학교실, *서울대학교 의과대학 해부학교실

An Immuno-Electron Microscopic Study of the Apoptotic Cell during Mouse Knee Joint Development

Hee Sun Chae, Kyung Yong Kim, Won Bok Lee
Hyoung Soo Lim*, Douk Ho Hwang* and Ka Yong Chang*
Dept. of Anatomy, Chung-Ang University College of Medicine
*Dept. of Anatomy, Seoul National University College of Medicine
(Received December 20, 1997)

ABSTRACT

This study was designed to investigate the appearance and the characteristics of the apoptotic cells and the process of the joint cavity formation in mouse knee joint. Fetal mouse knee joints from 15 to 19 days of gestation were used. Paraffin-embedded serial sections, stained with H & E for light microscopic observation, Epon 812 embedded thin sections for electron microscopic observation and Lowicryl HM 20 embedded thin sections for immuno-electron microscopic observation were prepared. Monoclonal antibodies to β -tubulin and polyclonal antibodies to tissue transglutaminase were used for immuno-electron microscopic study. The results obtained were as follows.

1. At 15 days of gestation, blood vessels, which have invaded in the mesenchymal cells, were present in the synovium, to form the joint cavity in the future.
2. At 16 days of gestation, the joint cleft was first appeared and several RBCs were present in the joint cleft. The invasion of blood vessels into the joint cleft was continuing, and apoptotic cells were present in the inner cell layer, adjacent to the joint cleft. Necrotic cells were also present in the outer cell layer; they were present 18 days of gestation, but apoptotic cells did not appear after 17 days of gestation.
3. In the apoptotic cells, transglutaminase were localized around vacuoles and the marginal site of the cytoplasm.
4. In the apoptotic cells, tubulin was around the endoplasmic reticulum and the marginal site of the cytoplasm. In the late stage of apoptotic cells, tubulin was

localized diffusely in the cytoplasm. Tubulin was also strongly labeled around in the cytoplasm of the neighboring cell at which the apoptotic body was phagocytosed.

Tubulin labeled particles were apparently increased in the seperated apoptotic bodies.

On the basis of the above findings, it is proposed that during the development of the mouse knee joint, blood vessel invasion first occurs and then apoptosis and cell necrosis follow it. In the apoptotic cell, present in the synovium of the developing knee joint of the mouse, it is suggested that the redistribution of tubulin is associated with apoptotic process. And transglutaminase overexpressed in the apoptotic cell.

Key words : Knee joint, Development, Apotosis, Necrosis, Transglutaminase, Tubulin

서 론

아포프토시스(apoptosis)는 살아있는 조직으로부터 단세포의 통제된 제거를 가져오는 programmed cell death의 생리학적 과정이다. 이러한 아포프토시스의 기본과정은 배자의 발달과정동안 일어나는 재구축, 변형, 정상조직에서 세포수의 조절에 중요한 역할을 한다(Arends and Wyllie, 1991; Fesus *et al.*, 1991; Strange *et al.*, 1992). 이러한 아포프토시스는 형태학적인 특징에 의하여 정의되는 세포사망의 한 형태로 사립체의 형태학적 변화없이 세포 핵의 함축과 DNA의 분획화, 염색질의 핵막쪽 편중, 세포소기관의 함축과 편중, 그리고 소포체의 확장이 특징적이다. 이후 세포는 아포프토시스체(apoptotic body)로 나뉘어진 후 주변 세포에 의해 포식되어 조직의 손상을 최소화하는 과정을 거치는 것으로, 느슨한 짜임새의 염색질과 세포막 통합성의 손실로 인한 세포소기관의 파괴현상으로 주변 조직의 손상을 동반하는 세포괴사(cell necrosis)와는 구별된다(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

세포가 아포프토시스의 과정을 거치는 동안 Ca^{++} 의존성 교차결합 단백질(Ca^{2+} -dependent cross-linked protein)인 tissue Transglutaminase(이하 TGc)라는 효소(Fesus *et al.*, 1991)가 유도되어 현저하게 많은 양이 활성화되는 것이 보고되고 있으며(Fesus *et al.*, 1987; Piacentini, 1991) 이러한 현상은 발달과정 중 일어나는 아포프토시스 세포에서도 관찰되고 있다(Pesce *et al.*, 1993).

또한 세포뼈대의 하나로 세포의 구조적 지지와 염색체 분리와 유사핵분열, 세포질내 소포의 이동 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 미세소관(Joshi *et al.*, 1990; Murphy, 1991; Mandelkow, 1990) 아포프토시스 세포의 DNA 분획화, 세포질의 수포형성, 핵의 함입과도 연관이 있으며 아포프토시스가 진행됨에 따라 미세소관의 튜블린 구조의 해축(depolymerization)으로 아포프토시스체가 아포프토시스 세포로부터 분리되는데 관여한다는 보고가 있다(Christine *et al.*, 1995).

그러나, 지금까지 관절공간 형성시 출현하는 아포프토시스 세포에 대한 전자현미경적 연구에서는 연구의 방향이 주로 형태학적인 것에만 치중되어 있었고(Takabatake and Yamamoto, 1991; Zakeri *et al.*, 1994), 아포프토시스 세포의 세포 특성에 대한 연구는 부족한 실정이다.

한편, 관절공간 형성에 관한 연구에서 발생중 생기는 관절틈새가 단지 기계적인 힘에 의한 것(Murray and Drachmann, 1969; Llusa-Perez *et al.*, 1988)과, 운활조직에 hyaluronic acid의 집중적인 축적에 의한다는 보고(Okada *et al.*, 1981; Stoff and Effendy, 1985; Craig *et al.*, 1990), 그리고 세포괴사에 의해 관절공간이 형성된다는 보고가 있다(Mitrovic, 1977, 1978, 1982). 또한 발생 중인 생쥐 팔다리뼈의 가락지사이 조직형성(Zakeri *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1995; Kimura and Shiota, 1996)과 닭의 무릎관절 형성에 아포프토시스가 관여한다는 보고가 있다(Abu-hijleh *et al.*, 1997).

그러므로, 본 연구에서는 관절공간 형성과정의 기전

을 밝히고자 발생 중인 생쥐의 무릎관절을 채취하여 연속절편을 제작한 후 광학현미경으로 관찰하고, 지금까지 무릎관절공간 형성시 나타나는 것으로 알려진 아포프토시스 세포에 대하여 TGc, 튜블린을 면역금표지한 후 표지양상과 표지되는 위치를 확인하고 아포프토시스와 TGc, 튜블린의 연관성을 밝히고자 투과전자현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료수집

대한실험동물사육센터에서 분양받은 임신한 ICR계 암컷 생쥐 20마리에서 태령 제 15, 16, 17, 18일 태령 말일인 제 19일의 태자를 임의 표본추출하여 나이별로 암수구분없이 5마리씩을 사용하였다. 태령은 교미를 시킨 후 질내에서 질전이 확인된 때를 태령 제 1일로 하였다.

2. 조직처리과정

1) 광학현미경관찰

임신한 생쥐를 목뼈탈구로 도살한 후 자궁을 적출한 다음 태자의 무릎관절을 해부현미경하에서 넙다리뼈 아래끝부위 및 정강뼈 윗쪽끝부위를 절제하였다. 절취된 조직은 4°C의 4% paraformaldehyde에 고정된 후 일반적인 방법에 의하여 처리한 후 H & E 염색을 실시하여 관찰하였다.

2) 전자현미경관찰

임신한 생쥐를 목뼈탈구로 도살한 후 자궁을 적출한 다음 태자의 무릎관절을 해부현미경하에서 넙다리뼈 아래끝부위 및 정강뼈 윗쪽끝부위를 절제하였다. 4°C의 2% glutaraldehyde와 4% paraformaldehyde (pH 7.2, 0.125 M HEPES 완충 용액)에서 2시간 고정하고 수세한 후 1% osmium tetroxide에 1시간동안 후 고정하였다. 이후 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 포매하여 70 nm의 절편을 구리격자에 부착시켜 uranyl acetate과 lead citrate에 염색하여 JEOL 1200EX II 전자현미경으로 관찰하였다.

3) 면역금표지

절취된 조직을 4°C의 0.1% glutaraldehyde와 4%

의 paraformaldehyde (pH 7.2, 0.125 M HEPES 완충용액)에서 2시간 고정하고 수세한 후 0°C의 30% alcohol, -20°C에서 50, 70, 95, 100%의 alcohol로 탈수한 후 Lowicryl HM20에 포매한 후 -20°C의 냉동고에서 360 nm파장의 UV를 조사하여 중합시켰다. 이후 준초박절편을 제작하여 toluidine blue로 염색을 시행하고 부위를 설정한 다음 70 nm의 두께로 초박절편하여 탄소와 colloidine이 도포된 구리격자에 조직을 부착시켰다. 면역금표지는 polyclonal rabbit anti-human transglutaminase C (서울의대 생화학교실 제공)와 monoclonal mouse anti- β -tubulin (Sigma Co., USA) 혈청을 1차항체로 하여 각각 1 : 100으로 희석한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 6 nm의 면역금이 표지된 2차 항체를 차례로 표지한 후 수세하여 uranyl acetate에서 15분간 염색하여 JEOL 1200EX II 투과전자현미경에서 30,000배의 배율로 관찰하였다.

결 과

1. 형태학적 관찰

1) 태령 제 15일

넙다리뼈, 무릎뼈, 정강뼈의 연골이 관찰되었으나 관절공간은 아직 형성되지 않았으며 연골 사이의 관절 틈새가 형성될 부위에서는 중간엽세포들이 관찰되었고, 장차 관절틈새가 될 부위에 위치하고 있는 중간엽세포들 사이에 혈관이 침입해 있었다 (Fig. 1). 중간엽세포는 크고 둥근 형태의 핵을 가지고 있었으며 연골세포보다는 낮은 전자밀도를 보였다 (Fig. 2).

2) 태령 제 16일

관절틈새가 형성되기 시작하였고 틈새의 양 끝에 큰 혈관이 위치하여 관절틈새쪽으로 침입하는 것을 관찰하였고 이미 형성된 관절틈새 안에서는 이미 침입했던 혈관이 사라지고 혈관안에 있던 적혈구들이 관찰되었다 (Fig. 3). 관절틈새와 접하는 윗쪽면의 2-3층 아래의 세포층에서 아포프토시스 세포가 관찰되었는데, 아포프토시스 세포의 핵은 압축되어 분극화되어 있었고 염색질이 농축되어 핵막쪽으로 편중되어 있었다 (Fig. 4).

또한, 아포프토시스 세포 뿐만 아니라 세포피사를 보이는 세포들이 주로 관절틈새와 접하고 있는 윤활막 면에서 관찰되었는데 이들은 뭉친염색질이 핵막쪽으로 테두름현상을 보이고 있었으며 핵막의 소실과 과립세포질세망의 현저한 확장, 다른 세포소기관들과 세포막의 파괴가 관찰되었다(Fig. 5).

3) 태령 제 17일~19일

태령 제 17일 이후 관절공간은 모두 연결되어 있었으며 윤활막에서 아포프토시스 세포들은 관찰되지 않았다. 그러나 태령 제 16일과 마찬가지로 관절공간과 인접한 윤활막면의 일부 세포들에서 세포피사의 형태가 관찰되었다.

2. 면역전자현미경적 관찰

TGc는 아포프토시스 세포가 아닌 정상 세포에서도 관찰되는 효소로써, 본 실험에서도 윤활막의 중간엽세포에서도 TGc가 표지되었다. 그러나, 이 중간엽세포에 표지된 금입자의 수와 빈도는 아포프토시스 세포내에서와는 다른 양상으로 중간엽세포에서는 2~3개의 금입자가 세포질내에 전반적으로 퍼져 있었으나 핵과 세포질의 농축, 수포 형성이 현저한 아포프토시스 세포내에서는 7~10개 정도의 금입자가 표지되었다. 금입자가 표지된 위치는 주로 세포질 가장자리와 공포 주변이었다(Fig. 6). 또한 핵의 농축과 편중현상은 그리 현저하지는 않았으나 세포의 전자밀도가 높고 사립체와 과립세포질세망 등 세포소기관들이 세포질의 한쪽으로 몰려 있는 편중이 있는 초기 단계의 아포프토시스 세포에서도 전형적인 아포프토시스 세포와 같은 양상으로 7~10개의 금입자가 세포질 안, 세포막 경계부위에 표지되었다(Fig. 7).

튜블린은 아포프토시스 세포안에서 주로 과립형질내 세망 주변과 세포질 가쪽에 주로 표지되었다(Fig. 8). 그러나 초기의 아포프토시스 세포와는 달리 아포프토시스체를 형성하기 직전의 비교적 말기의 아포프토시스 세포 내에서의 튜블린 표지 양상은(Figs. 9, 10) 세포의 핵부분을 제외한 세포질 전체에 균등하게 분포되어 있었으며 표지된 금입자의 양도 적은 편이었다(Figs. 9, 10). 이에 반해 아포프토시스 세포로부터 분리된 아포프토시스체에서는 튜블린 표지의 수가 증

가하는 양상을 보였다(Fig. 8). 또한 아포프토시스세포를 포식하는 정상세포의 포식부위 세포질에 튜블린의 표지가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

고찰

생쥐의 무릎관절 발생에서 태령 제 15일에는 아직 관절공간이 형성되지 않은 시기로 넓다리뼈, 정강뼈, 무릎뼈의 연골이 관찰되고 관절반월과 윤활막주름 원기가 형성되며 양쪽 연골 말단부에 세포의 압축과 일부의 세포 피사가 관찰되었다. 태령 제 16일에는 무릎뼈 뒤쪽에 처음 관절공간이 형성되어 무릎뼈 아래힘줄 뒷쪽에 중간엽세포 사이로 모세혈관들이 관찰되고, 무릎뼈와 정강뼈 사이에서도 처음으로 관절공간이 생긴다는 보고가 있었다(Okada *et al.*, 1981; Hwang *et al.*, 1990).

무릎관절은 윤활관절의 하나로 윤활관절 발생 과정 중 관절공간 형성의 기전에 대해서는 세포의 퇴행 및 세포피사에 의해 형성된다는 것(Mitrovic, 1977, 1978), 두 개의 연골층 사이에 좁은 혈관을 포함한 중간엽 조직의 붕괴에 의한 것(Link and porte, 1978), 윤활조직에 hyaluronic acid의 집중적인 축적에 의한다는 것(Okada *et al.*, 1981) 및 물리적인 압력에 의해 관절틈새가 형성된다는 것(Llusa-Perez *et al.*, 1988) 등이 알려져 있었다.

최근 Takabatake와 Yamamoto (1991)는 생쥐의 무릎관절 공간 형성이 세포피사에 의한 것이라 하였으며, Mori 등(1995)과 Kimura 등(1996)은 생쥐 태자의 팔다리뼈 가락지사이 조직의 발생 중 관절공간 형성이 아포프토시스에 의한 것이라 하였다.

본 연구에서는 관절공간이 형성되기 시작하는 태령 제 16일에는 아포프토시스와 세포피사가, 관절공간 형성이 완성되는 태령 제 17일 이후부터는 세포피사를 보이는 세포만이 관찰되었다. 세포피사를 보이는 세포가 주로 관찰된 부위는 관절틈새나 관절공간과 인접하는 윤활막면이었으며 아포프토시스 세포가 주로 관찰된 곳은 세포피사가 관찰된 층으로부터 2~3층 아래의 세포층이었다. 이러한 사실로 미루어 보아 관절공간 형성은 세포피사와 아포프토시스의 복합적 작용에 의해 이루어지는 것으로 사료된다.

운활관절의 발생과정은 사람과 흰쥐에서 첫째, 세포 압축 및 세포 괴사기, 둘째, 세 층의 간질기, 셋째, 혈관의 침입 및 관절틈새기 등 세단계로 발달함이 알려져 있고(Whillis, 1940; Mitrovic, 1978) 운활관절 중의 하나인 무릎관절에서도 이 세단계를 거쳐 관절발생이 이루어지는 것이 알려져 왔다(Haines, 1953; Gardner and O'Rhahilly, 1968; Stoff and Effendy, 1985).

본 연구 결과 중간엽세포로 차 있는 장차 관절공간이 형성될 부위에 혈관이 먼저 침입하고 후에 혈관이 침입한 부위와 인접한 곳에 위치한 세포에서 점차로 세포괴사와 아포프토시스가 일어나 관절틈새가 형성되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 지금까지 알려져 온 세포의 괴사 후 혈관의 침입이 있고 그 후 관절틈새가 형성된다는 보고(Whillis, 1940; Mitrovic, 1978)와는 다른 결과였다.

한편 발생과정 중 나타나는 아포프토시스에 대한 연구들이 활발히 진행되어 왔으나 대부분의 연구가 형태학적 관점에 의해 시행되어(Takabatake and Yamamoto, 1991; Zakeri et al., 1994) 아포프토시스의 생화학적 검증과 아포프토시스 세포 자체의 특성에 대해서는 연구가 부족한 실정이었다. Fesus 등(1987)과 Pesce 등(1993)의 많은 연구자들이 아포프토시스 과정 동안 많은 양의 TGc가 특징적으로 표현되는 것을 보고하였으나 이 연구들은 광학현미경을 이용한 면역조직화학적 연구로 전자현미경으로 TGc의 표현 양상과 그 위치를 확인한 연구는 없었다. 이에 본 연구에서는 아포프토시스 세포에서의 TGc의 표지 양상과 그 위치를 확인하기 위하여 TGc와 아포프토시스 세포에서 일어나는 형태학적 변화의 기전을 밝히기 위하여 튜블린을 각각 면역금표지하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

본 연구의 결과 무릎관절발생시 출현하는 아포프토시스 세포에서도 다른 아포프토시스 세포에서와 마찬가지로 TGc가 중간엽세포에서보다 아포프토시스 세포의 세포질에서 더 많이 표지되는 것을 확인할 수 있었다. 아포프토시스 세포에서 TGc의 표지는 형태적으로 초기 단계의 아포프토시스 세포로 추정되는 세포에서도 전형적인 아포프토시스 세포에서의 금표지 양상과 같은 양상이 관찰되었다. 이러한 결과는 지금까지 전자현미경을 이용한 아포프토시스 세포 관찰시 형태학

적 소견만으로는 초기 단계의 아포프토시스 세포의 확인에 어려움이 있었던 문제점을 보완하여 TGc가 비교적 초기 단계의 아포프토시스 세포까지 확인해 낼 수 있는 좋은 표지물로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

한편, 세포의 구조적 지지와 염색체 분리, 유사핵분열, 세포질내 세포체의 이동에 중요한 역할을 하며 주로 과립형질내 세망 주변에 위치하는 것으로 알려진 미세소관(Joshi et al., 1990; Murphy, 1991; Mandelkow, 1990)의 구성단위인 튜블린이 아포프토시스와 연관되어 DNA의 분획화와 세포질의 수포형성과 핵의 합입과 연관이 있으며 아포프토시스가 진행되면서 미세소관의 결합이 끊어진다는 보고가 있었다(Christine et al., 1995). 본 연구에서는 무릎관절공간 형성시 출현하는 아포프토시스 세포에서는 분획화된 핵 주변 부위에 튜블린이 표지되기는 하였으나 그 양상이 다른 부위에 비해 특이할 만한 것은 아니었으며 세포소기관과 핵의 형태가 비교적 잘 유지되고 있는 초기 단계의 아포프토시스 세포에서는 세포의 가장자리와 과립형질내세망에 부위에서 다량의 튜블린이 표지되었다. 그러나, 아포프토시스체를 형성하기 전 단계로 사료되는 비교적 말기의 아포프토시스 세포에서는 튜블린의 표지가 세포질 전체에 고루 퍼져 있었으며 표지된 양도 감소되어 있었다. 하지만, 아포프토시스 세포에서 떨어져 나간 경우 아포프토시스체 내에 표지된 튜블린의 표지 밀도는 증가되어 있었다. 이러한 현상은 아포프토시스 과정이 진행됨에 따라 미세소관 결합의 끊어짐이 일어난다는 Christine 등(1995)의 보고와 같은 결과로 세포소기관의 변형이 적은 초기의 아포프토시스 세포에서는 미세소관의 형태가 유지되다가 말기에 이르면서 미세소관의 구조가 깨지게 되고 이러한 구조의 파괴로 아포프토시스 세포가 아포프토시스체를 생성하게 되며 세포질 부분이었던 아포프토시스체의 경우 세포에서 분리되어 나오는 과정 중 세포단백질과 세포액의 유출로 농축화 과정을 거치면서 튜블린의 단위 면적당 밀도가 증가하는 현상을 보이는 것으로 사료된다.

또한, 아포프토시스체를 포식하고 있는 세포의 포식 부위에 다량의 튜블린이 표지되었다. 그러나 포식되고 있는 세포의 경우는 포식부위와 인접한 세포의 가장자리 부분을 제외한 나머지 부위에서는 튜블린의 표지양

상이 증가되지 않았다. 아포프토시스체를 포식하는 세포에서 표지된 다량의 튜블린은 세포나 세포질소기관의 운동에 관여하는 미세소관의 기능과 연관되어 나타난 것으로 생각되며, 포식되고 있는 아포프토시스체의 포식인접부위에 나타난 다량의 튜블린은 아포프토시스 세포로부터 아포프토시스체를 형성하여 떨어져 나가는 수포형성과 관련되어 나타난 것으로 사료된다.

본 연구에서 확인한 무릎관절공간 형성시 출현하는 아포프토시스세포에 대한 연구는 전자현미경적 연구와 함께 복합적으로 광학현미경적 면역조직화학법을 이용한 연구를 시행하여 관절공간에서의 세포괴사와 아포프토시스가 일어나는 부위에 대한 폭 넓은 접근이 병행되어야 할 것이며 관절공간 형성시 출현하는 아포프토시스세포의 특징적 형태변화와 그 기전을 밝히기 위한 세포내 다른 구조물과 효소 등에 대한 생화학적 고찰과 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

태령 제 15일에서 19일에 이르는 생쥐의 무릎관절을 대상으로 발생 중 관절공간에서 출현하는 아포프토시스 세포의 특성과 관절공간 형성기전을 규명하기 위하여 트랜스글루타미네이즈와 튜블린에 대한 면역금표지를 시행하여 투과전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 관절틈새가 형성되기 전인 태령 15일에는 장차 관절틈새가 형성될 부위의 중간엽세포 사이에 혈관이 침입해 있었다.

2. 태령 제 16일에 처음으로 관절공간이 형성되었으며, 관절틈새에서 적혈구가 관찰되었고 관절틈새 쪽으로 계속해서 혈관이 침입하고 있었다. 관절공간과 인접한 부위의 윗면에서는 세포괴사가, 그리고 이보다 2~3층 아래의 세포층에서는 아포프토시스가 관찰되었다. 관절공간이 완전히 형성되는 태령 제 18일 이후에는 아포프토시스 세포가 관찰되지 않았으나 세포괴사는 드물게 관찰되었다.

3. 트랜스글루타미네이즈는 아포프토시스 세포의 공포 주변부위와 세포질의 가장자리 등에서 표지가 증가되었다.

4. 아포프토시스 세포의 과립형질내세망과 세포의

가장자리 부분에서 다량의 튜블린이 표지되었다. 또한 아포프토시스체를 포식한 세포의 포식부위에서도 다량의 튜블린이 표지되었으며 아포프토시스 세포에서 떨어져 나간 아포프토시스체에서도 튜블린이 표지되었다.

이상의 결과를 종합하면 생쥐의 무릎관절공간 발생 과정은 관절공간이 형성될 부위에 혈관이 침입하고 이후 세포괴사와 아포프토시스에 의해 관절공간이 형성된다. 관절공간 형성에 관여하는 아포프토시스 세포에서 초기단계에는 과립형질내세망 주변에 집중적으로 표지되던 튜블린이 말기단계에서는 세포질 전체에 고루 퍼져 표지되며, 또한 튜블린은 아포프토시스체가 포식되는데 관여한다. 아포프토시스 세포는 트랜스글루타미네이즈의 표지가 증가한다.

참 고 문 헌

- Abu-hijleh G, Reid O, Scothorn RJ, 1997. Cell death in the developing chick knee joint : I, Spatial and temporal patterns, *Clin. Anat.* 10, 183-200
- Azhar S, Murphy DB, 1990. Structural plugs at microtubule ends may regulate polymer dynamics in vitro, *Cell Motil. Cytoskel.* 15(3), 156-61
- Arends MJ, Wyllie AH, 1991. Apoptosis mechanism and role in pathology, *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254
- Christine M, Ireland, Sally M, Pittman, 1995. Tubulin alterations in taxol-induced apoptosis parallel those observed with other drugs, *Biochem. Pharmacol.* 49, 1491-1499
- Craig FM, Bayliss MT, Bently G, Archer CW, 1990. A role for hyaluronan in joint development, *J. Anat.* 171, 17-23
- Fesus L, Davis P, Piacentini M, 1991. Apoptosis: molecular mechanism in cell death, *Eur. J. Cell Biol.* 56, 170-177
- Fesus L, Thomazy V, Autori F, Ceru MP, Tarcsa E, Piacentini M, 1989. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase

- action, FEBS Lett. 245(1,2), 150-154
- Gardner E, O'Rahilly R, 1968. The early development of the knee joint in the staged human embryos, *J. Anat.* 102, 289-299
- Haines RW, 1953. The early development of the femoro-tibial and tibiofibular joints, *J. Anat.* 87, 192-206
- Hwang DH, Lee JM, Chng KY, 1990. An immunohistochemical study on the differentiation of synoviocytes in the knee joint in mouse, *Seoul J. Med.* 31, 155-166
- Joshi HC, Cleveland DW, 1990. Diversity among tubulin subunits : toward what functional end? *Cell Motil. Cytoskel.* 16(3), 159-63
- Kerr JFR, Wyllie A, Currie AR, 1972. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26, 239-257
- Kimura S, Shiota K, 1996. Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis, *J. Morphol.* 229, 337-346
- Knight CRL, Rees RC, Griffin M, 1991. Apoptosis : a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumor progression, *Biochem. Biophys. Acta.* 1096, 312-320
- Kristic RV, 1984. Illustrated encyclopedia of human histology, 1st ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p.408
- Llusa-Perez M, Suso-Vergara S, Ruano-Gill D, 1988. Recording of chick embryo movements and their correlation with joint development, *Acta. Anat.* 132, 55-58
- Mandelkow E, Mandelkow EM, 1990. Microtubular structure and tubulin polymerization, [Review] *Current Opinion in Cell Biology* 2(1), 3-9
- Mitrovic D, 1977. Development of metatarsophalangeal joint of the chick embryo : morphological, ultrastructural and histochemical studies, *Am. J. Anat.* 150, 333-348
- Mitrovic D, 1978. Development of diarthrodial joints in the rat embryo, *Am. J. Anat.* 151, 475-486
- Mitrovic D, 1982. Development of the articular cavity in paralyzed chick embryos and in chick embryo limb buds cultured on chorioallantoic membranes, *Acta. Anat.* 113, 313-324
- Mori C, Nakamura N, Kimura S, 1995. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation, *Anat. Rec.* 242, 103-110
- Murray PDF, Drachmann DB. 1969. The role of movement in the development of joints and related structures : the head and neck in the chick embryo, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22, 349-371
- Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K, 1981. Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix, *Arth. Rheum.* 24, 835-843
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M, 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitor factor promote primordial germ cell survival in culture by suppressing programmed cell death, *Development* 118, 1089-1094
- Piacentini M, Autuori F, Dini L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Fesus L, 1991. "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation, *Cell tissue Res.* 263, 227-235
- Piacentini M, Fesus L, Ferrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G, 1991. The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death, *Eur. J. Cell Biol.* 54, 246-254
- Stofft E, Effendy W, 1985. Development and morphology of rat synovial membrane, *Acta. Anat.* 121, 36-40
- Strange R Li F, Saurer S, Burkhard A, Friis RR, 1992. Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution, *Development* 115, 49-58
- Takabatake K, Yamamoto T, 1991. Morphology of the synovium during its differentiation and development in the mouse knee joint. A histo-

- chmical, SEM and TEM study, *Anat. Embryol.* 183, 537-544
- Whillis J, 1940. The development of synovial joints, *J. Anat.* 74, 277-283
- Williams PL, Warwick R, 1980. *Gray's Anatomy.* 36th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 427.
- Wyllie AH; Kerr JFR, Currie AR, 1980. Cell death : the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306
- Zakeri Zz, Quaglino d, Ahujua HS, 1994. Apoptotic cell death the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant, *Dev. Biol.* 165, 294-297

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light micrograph at 15 days old mouse fetus. Blood vessels invaded in mesenchymal cells. Stained by toluidine blue. $\times 1,000$
- Fig. 2.** An electron micrograph of Mesenchymal cell (MC) at 15 days old mouse fetus. Bar: $1\mu\text{m}$, $\times 5,000$
- Fig. 3.** A light micrograph at 16 days old mouse fetus. Big blood vessel is invading to the joint cavity. In early-formed joint cavity, RBCs were observed. Stained by H & E. $\times 400$
- Fig. 4.** An electron micrograph of the typical apoptotic cell in joint cavity at 16 days old mouse fetus. Nuclear condensation and margination were shown. N: Nucleus, M: Mitochondria, V: Vacuole Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 8,000$
- Fig. 5.** An electron micrograph of the necrotic cells (NC) at the 17 days old mouse fetus. The necrotic cells appeared near joint cavity (JC). Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 5,000$
- Fig. 6.** An electron micrograph of the apoptosis cell at 16 days old mouse fetus. Immunolabelled by transglutaminase C. Note the transglutaminase C (arrows) was marked near endoplasmic reticulum and vacuole in the cytoplasm. N: Nucleus Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 12,000$
- Fig. 7.** An electron micrograph of the early stage apoptotic cell at 16 days old mouse fetus. The apoptotic cell (AP) was shrunked and electron-densed cytoplasm. Its mitochondria were margined to the lower part of the cytoplasm. Immunolabelled by transglutaminase C. Note the immunolabelling of transglutaminase C (arrows) around vacuole and the cytoplasm boundary. Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 8,000$
- Fig. 8.** An electron micrograph of the 16 days old mouse fetus. Tubulin (arrows) were concentrated near endoplasmic reticulum (ER) and the boundary of the cytoplasm, mainly. Also, many tubulins were concentrated in the apoptotic body (APB). Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 30,000$
- Fig. 9.** An electron micrograph of the late stage apoptotic cell (AP) at 17 days old mouse fetus. Tubulins (arrows) diffused around the boundary of the cytoplasm. Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 30,000$
- Fig. 10.** The late stage apoptotic cell was being phagocytosed by neighboring cell. Note the immunolabelling of tubulin (arrows), marked around the phagocytosing site of the neighboring cell. APB: Apoptotic body, N: Nucleus Bar: $1\mu\text{m}$ $\times 30,000$









