

Xenopus 예정외배엽에서 Activin A와 IGF-1의 복합처리에 의한 기관분화

정선우[†] · 이호선 · 윤춘식*

창원대학교 자연과학대학 생물학과
*대전광역시 생명공학연구소 분자세포생물학연구부

Organogenesis by Combined-Dose of Activin A and IGF-1 in *Xenopus* Presumptive Ectoderm

Seon-Woo Cheong[†], Ho-Sun Lee and Chun-Sik Yoon*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Changwon National University, 645 773, Korea
*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 305-600, Korea

Abstract

The trend of organogenesis in *Xenopus* presumptive ectoderm was studied by combined dose of activin A and IGF-1(insulin-like growth factor-1). In reference study of Asashima and his colleagues, the inductive patterns of various organs were reported with activin, the potent mesoderm inducing factor. In present study, the inducing pattern was cleared with combined-dose of concentration 1-100 ng/ml activin A and IGF-1. In addition, the result from single treatment of activin A was compared with former study. As a result, eye was differentiated in 5-20% of explants at 10 and 50 ng/ml concentrative combination of activin A. Otic vesicle was appeared in the entire concentrative combination of IGF-1. Pronephric duct was induced 19-38% of explants at the concentration of activin A 100 ng/ml by adding IGF-1. The comparison of single treatment of activin A was showed some difference in dose-dependent inducing pattern.

Key words – Combined-dose, Activin A, IGF-1, *Xenopus*, Animal cap

서 론

아프리카발톱개구리(*Xenopus laevis*)는 1829년 프랑스의 유명한 해부학자였던 Cuvier에 의해 처음으로 기재되었으며 *Xenopus*라는 속명은 1827년 Wagler에 의해 '특이한 발을 가진'이란 뜻으로 처음 결정되었다. 원산지인 남아프리카에서 들어온 개체로 영국에서 배발생 과정을 기록하였으며 현재의 학명인 *Xenopus laevis* Daudin을 갖게 되었다 [5]. 다른 개구리와는 달리, 이들은 혀가 발달되지 않고 앞다리로 먹이를 입으로 가져가며 변태 후에도 계속 수중에서 생활한다. 이들의 알은 직경 1 mm 정도로 배 조작에 유리하고, 울음소리가 들리지 않는 등 실험실내에서 유지

카에서 들어온 개체로 영국에서 배발생 과정을 기록하였으며 현재의 학명인 *Xenopus laevis* Daudin을 갖게 되었다 [5]. 다른 개구리와는 달리, 이들은 혀가 발달되지 않고 앞다리로 먹이를 입으로 가져가며 변태 후에도 계속 수중에서 생활한다. 이들의 알은 직경 1 mm 정도로 배 조작에 유리하고, 울음소리가 들리지 않는 등 실험실내에서 유지

[†] Corresponding author

하기에 매우 유리하며 albino 개체가 유지되므로 발생, 형태, 면역조직화학, 분자생물학 분야 등에 널리 쓰이는 대표적 모델동물이다.

동물극 분리배양 실험을 위해서는 HCG를 주사하여 산란기에 관계없이 수정란을 얻으며 수정란의 포배기에 포배강의 위쪽부위를 동물극의 천정부위(animal cap) 또는 예정외배엽(presumptive ectoderm)이라 한다. 포배강이라는 공간에 의해 animal cap은 식물극으로부터 격리되어 일정기간까지는 식물극으로부터 올라오는 분화신호를 받지 못하게 되며, 그 시기에 동물극의 천정부위를 분리하여 생리식염수에서 배양하면 특별한 기관을 유도하지 못하고 비정형 표피조직만을 증식시킨다. 그러나 이 분리편을 형질전환 성장인자(transforming growth factor=TGF)로 처리하여 배양하면 분리편 고유의 형질을 바꾸어 여러 가지 기관을 유도해 낸다. TGF- β superfamily에 속하는 인자 중에 가장 강력한 기관유도 효과를 가지는 것은 activin이며, 이는 Nieuwkoop center에서 발산하는 신호의 본체들로 여겨지는 *noggin*, *wnt*, *activin* 등 세 가지 후보 중에 가장 가능성이 높은 것으로 현재까지 받아들여지고 있다[3].

Activin A, AB, B의 3종의 효과는 거의 차이가 없는 것으로 알려져 있고 그 중 activin A는 동물극 분리편으로부터 복측 및 배측 중배엽을 모두 유도하는 강력한 유도인자로 알려져 있으며 그 처리시간과 농도에 따른 연구는 Asashima 연구팀에서 *Xenopus*에 대해 매우 자세히 연구하였다[1,2]. 그들은 또한 *Xenopus* 외에도 여러종류의 유미양서류 및 무미양서류의 배를 재료로 activin A의 효과에 대하여 연구한 바도 있으나 동물에 따른 차이가 있다고 해도 기본적 분화패턴에 미치는 영향은 일정함을 보여주었다[12]. 그 기본적인 분화패턴은 activin A를 1 ng/ml 이하의 저농도로 처리하면 주로 혈구양세포와 약간의 근육 및 신경이 발생하고 10-50 ng/ml의 농도에서는 근육, 척색 등 배측 중배엽이 유도되며 100 ng/ml 이상에서는 표피형성이 저해되어 분리편이 파괴된다는 것이다. 그러나 저자 등은 activin A 일정농도 범위에서 이포(otic vesicle)가 낮은 비율로나마 분화됨을 보고한 바 있다[20].

한편 IGF-1(insulin-like growth factor)은 간에서 분비되어 다수 종의 세포에 그 수용체가 분포하고 있으며[17] 척추동물의 성장과 발육에 필수적인 물질로 70개의 아미노산중 50개가 척추동물 사이에 공통으로 존재하고 있다[9].

*Xenopus*에서 IGF-1은 알의 성숙을 유도하며[8,18], 연골성장에 관여한다[15]. 위의 두 가지 인자는 미지의 다른 인자들과 더불어 배 발생에 매우 중요한 인자로 알려져 있으며 인자의 복합처리에 대한 연구는 일부 인자에 대해서만 이루어져 있다[11,13]. 앞서 저자 등의 연구에서 activin A 100ng/ml의 고농도와 IGF-1 0-500ng/ml의 복합처리 배양에서 신관이 분화되는 양상에 대하여 밝힌 바 있으나[4], 당시에는 activin A의 전체적인 농도와와의 조합에 대해 다루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 *Xenopus*에서 activin A의 농도별 기관유도 효과를 파악하여 기존의 연구와 비교하고 IGF-1의 단독처리에 의해 기관이 유도되는지를 확인하며, activin A 1-100ng/ml 농도와 IGF-1 1-100ng/ml 농도의 혼합처리 조합에 의한 전체적인 기관분화 양상을 파악하였다.

재료 및 방법

Xenopus 초기배의 준비 및 동물극 분리배양

*Xenopus laevis*는 성숙한 암수개체를 실험실에서 유지하면서 산란을 위해 암수개체에 HCG(human chorionic gonadotrophin)를 500 IU씩 주사하여 수정란을 얻고 젤리층은 3% cystein hydrochloride(pH 7.8)로 제거한 뒤에 멸균된 Steinberg 생리식염수(pH 7.4)로 수회 세척하였다. 멸균된 3% agar plate 위에서 St. 9의 난란을 선별하여 핀셋(watch maker's tweezers)으로 난막을 제거하고 전기분해한 텅스텐 니들로 동물극을 분리한후 Steinberg 생리식염수에서 정상배가 st. 43에 도달할 때까지 20℃에서 배양하고 이를 대조구로 하였다[10]. 처리구는 IGF-1 단독으로 1, 10, 50, 100ng/ml 처리하였고, 이 외에 activin A를 1, 10, 50, 100ng/ml/ 0.1% BSA와 IGF-1을 1, 10, 50, 100ng/ml의 농도로 조합하여 처리한 뒤 역시 정상배가 St. 43에 이를때까지 배양하였다. 배양에 쓴 용기는 멸균제 96 well plate를 사용하였으며 동물극분리편은 서로 영향을 끼치지 않도록 1 well당 1개씩 넣고, 대조구 및 처리배양액은 120 μ l씩 분주하였다. 발생단계는 Nieuwkoop 과 Faber[14]를 따랐다.

배양조직의 동정 및 기관분화 경향분석

St. 43에 이른 정상배와 대조구 및 처리구의 배양조직

은 Bouin 액에 3시간 이상 고정한 뒤 70, 90, 100% ethanol로 탈수 후 파라핀 포매하여 8 μ m 두께로 절편 후 hematoxylin-eosin으로 염색 관찰하였으며 분화된 조직은 동정하여 농도조합에 따른 기관의 분화경향을 분석하였다. 분리 배양편 내에서 분화된 각 기관의 동정은 St. 43에 도달한 정상배의 기관형태를 기준으로 하였다. 성장인자 처리된 동물극의 수는 농도별로 20개 전후씩으로 하였으며 기관 분화정도는 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

Xenopus 후기 포배기의 동물극 분리편을 activin A 1-100ng/ml와 IGF-1을 1-100ng/ml 복합처리한 결과 activin A의 단독처리와는 다른 기관분화 경향을 얻었다(Table 1). 먼저, 아무런 성장인자도 처리하지 않은 대조구에서는 비정형표피세포만이 분화하였으며 activin A농도를 기준

으로 차례대로 살펴보면, activin A 1 ng/ml 단독처리에서는 신경조직과 근육이 높은 비율로 분화되었고 눈이나 청낭의 분화는 관찰되지 않았다. IGF-1과의 복합처리에서 눈은 여전히 분화하지 않고 청낭은 32-33% 분화되었다. 이때, IGF-1의 농도에는 별로 영향을 받지 않은 듯 하였다. 그 외 IGF-1 비처리구에 비해 미분화 간엽조직이 증가되었고 근육은 별로 영향을 받지 않고 높은 비율로 분화하였다. 신장은 IGF-1 10ng/ml 외의 혼합액에서 5% 분화하였다.

Activin A 10ng/ml 농도와 IGF-1의 농도별 조합에서, activin A 10 ng/ml 단독처리에서는 눈과 청낭이 각각 5%와 11%의 낮은 비율로 분화되다가 IGF-1과의 혼합처리에 의해 눈은 10-23%, 청낭은 14-50%의 높은 비율로 유도되었다. 근육은 activin A 단독처리보다 훨씬 높은 분화율을 나타내었으며 척색은 복합처리에서 오히려 낮은 분화율을 보여주었다. 그 외 신경조직은 여전히 높은 분화율을

Table 1. Assay of animal cap explants cultivated for 3 days in the mixture of activin A and IGF-1

Combination concentration(ng/ml)	Case	Differentiation of animal cap explant(%)												
		AE	EP	NT	EY	OV	SC	IE	MC	CG	NC	MS	YE	PN
A0 I0	12	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1 I0	21	29	95	100	0	0	14	5	57	24	43	95	57	0
A1 I10	19	42	100	89	0	32	32	11	89	11	47	79	63	0
A1 I50	19	58	100	100	0	32	21	16	84	0	0	89	84	5
A1 I100	21	57	95	57	0	33	5	24	81	0	0	67	48	0
A10 I0	19	16	95	89	5	11	5	5	74	47	74	63	79	0
A10 I1	21	24	95	90	10	52	19	14	76	14	33	100	81	0
A10 I10	20	45	100	100	10	50	50	5	85	5	15	100	75	0
A10 I50	20	35	100	100	15	45	25	15	85	15	25	100	90	0
A10 I100	20	23	95	95	23	41	14	9	64	23	36	86	82	0
A50 I0	20	15	100	85	0	15	10	10	85	15	20	90	70	0
A50 I1	19	16	100	100	16	68	32	11	89	26	37	100	81	0
A50 I10	20	10	100	100	15	75	45	15	85	25	35	100	100	5
A50 I50	19	21	100	100	21	58	53	0	89	32	68	95	89	0
A50 I100	18	66	95	94	0	56	33	6	83	11	50	83	89	0
A100I0	19	Destroyed												
A100I1	21	57	100	100	0	38	14	0	76	0	5	90	100	33
A100I10	19	21	100	95	5	37	16	11	100	0	11	95	74	26
A100I50	27	48	100	100	11	30	37	26	85	11	41	100	74	19
A100I100	21	57	90	81	0	24	14	24	81	0	10	86	67	38

A: activin A I: IGF-1(insulin-like growth factor), AE: atypical epithelium, EP : epithelium, NT: neural tissue, EY: eye, OV: otic vesicle, SC: spinal cord, IE: intracoelmic epithelium, MC: mesenchyme, CG: cement gland, NC: notochord, MS: muscle, YE: yolk-rich endoderm, PN: pronephros

나타내었다.

Activin A 50ng/ml 농도와 IGF-1의 농도별 조합에서 activin A 50ng/ml 단독처리에서는 청낭이 15%정도 분화되었고 척색은 20%로 분화율이 매우 낮아졌다. 그리고 근육은 여전히 높은 비율로 분화되었다. IGF-1과의 복합처리에서는 청낭의 출현비율이 56-75%로 극히 높아졌으며 눈은 15-21%로 분화하였다. 신경조직과 근육은 매우 높은 분화율을 유지하고 있었으며 IGF-1 첨가에 의해 척색의 분화비율은 별로 영향을 받지 않았다.

Activin A 100ng/ml와 IGF-1의 농도별 조합에서는 activin A 100ng/ml 단독처리에 의해 배양분리편들이 표피형성을 하지 못하고 죽게 되는 경우가 매우 많으므로 파괴되는 것으로 처리하였다. IGF-1을 이러한 고농도의

activin A에 복합처리 하였다. 분리편이 파괴되지 않고 잘 살아 남았으며 여러가지 기관을 유도하였다. 그 중 청낭이 24-38%로 잘 분화되었고 눈은 5-11% 분화되었다. 근육과 신경조직은 여전히 높은 비율로 유도되었으며 activin A 50ng/ml 까지는 거의 출현하지 않던 신관이 19-38%의 비율로 유도된 것이 특이하였다.

기관별 조직학적 분석을 하였을 때, 대조구에서는 비정상 표피조직만이 증식하였다(Fig. 3). 복합처리에서 눈은 정상기관에 비해 수정체가 없고 시신경층이 분화초기의 두터운 다층의 형태를 보여주면서 분화하였고 시신경 색소층은 뚜렷이 분화되어 나왔다. 또한 눈은 거의가 1개씩만 분화되나 실험도중 단 하나의 배양편에서 2개의 눈이 분화되었다(Fig. 4). 청낭은 정상배(Fig. 1)와는 달리 배양편

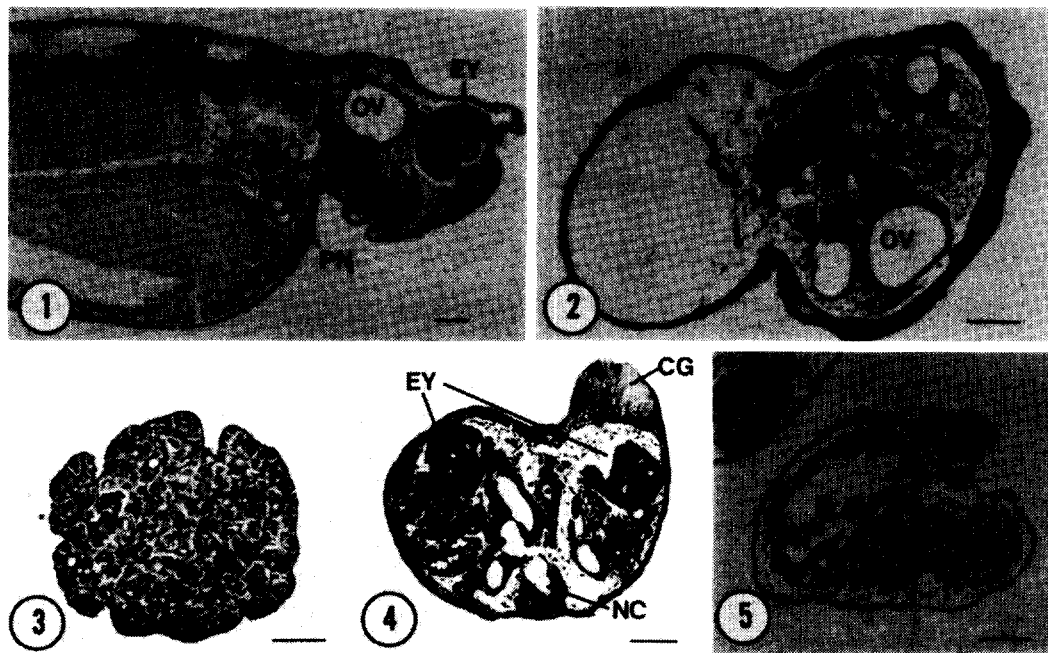


Fig. 1. Light micrograph of longitudinal section showing the level of pronephros(PN), otic vesicle(OV) and eye(EY) of normal embryo at st. 43. Paraffin section and HE stain. Bar : 100 μ m
 Fig. 2. Animal cap explant showing three otic vesicles(OV) cultivated with combined-does at the concentration of activin A 50ng/ml and IGF-1 100ng/ml. Bar : 100 μ m
 Fig. 3. Atypical epithelium of animal cap explant cultivated without growth factor. Bar : 100 μ m
 Fig. 4. A pair of eye(EY) were rarely induced. This explant was cultivated in mixture of activin A 50ng/ml and IGF-1 1ng/ml. CG: cement gland, NC: notochord Bar : 100 μ m
 Fig. 5. Pronephros(PN) was induced by combined-dose of activin A 100ng/ml and entire concentration of IGF-1. MS: muscle Bar : 100 μ m

하나에 1-3개 이상 분화하였고 외측 편평상피와 내측 섬모 원주상피의 구분이 뚜렷치 않은 경우도 많았다(Fig. 2). 또한 싼관은 정상배에서 체질의 측부와 내배엽성의 상부사이에 나타나나 배양편에서는 매몰된 경우도 있었고 성숙한 싼관세포의 특징인 포(vacuole)의 발달이 약한 미성숙 상태를 보여주는 경우도 많았다(Fig. 5).

Activin A 단독처리에 의한 효과에 대한 경향은 Ariizumi 등[2]이 밝힌 바와 같이 St. 9의 배를 사용하였을 때와 비교했을 때, 대조구에서는 비정형 표피조직만이 분화되었으므로 동일 하였다. 그러나 activin A 1 ng/ml 처리 농도에서는 다량의 신경조직과 근육, 척색이 분화되었으므로 배측 중배엽기원의 매우 강한 유도효과를 보여준 것으로 생각되며, 저농도에서 척색이 강하게 분화되었으므로 Asashima 등의 실험결과와는 약간의 차이가 있다[3]. Activin A 10 ng/ml 농도에서는 높은 근육 분화율과는 달리 근육의 분화는 activin A 처리 전농도에 걸쳐 높은 것으로 보인다. 즉, 근육은 activin A 처리 자체에 의해 강하게 유도된다고 생각된다. Activin A 50 ng/ml 농도에서 척색은 오히려 비교적 낮은 분화율을 보여 앞선 연구와 차이를 보였으며 activin A 100 ng/ml 처리에서는 표피의 발달이 저해되어 조직이 파괴되어 죽은 것으로 판단, 처리하였으나, 실제로 죽은 조직내에서 척색, 근육 등 약간의 기관발달을 볼 수 있었다.

청낭과 눈은 외배엽기원의 신경조직에서 유래하여 분화하는 것이나, 청낭은 외배엽 기원이면서 중배엽 기원의 어떤 기구의 영향을 받아 형성되는 기관중 하나인 만큼[6] 중배엽 유도인자인 activin A 단독처리에 의해서도 낮으나 마 발현이 되는 것이 당연하나, IGF-1이 매우 강력한 mitotic factor이므로, 이것과 상호작용하여 더 높은 청낭의 분화율을 보여 준 것으로 생각된다. 눈은 수정체까지 형성되는 완전한 눈을 보여주는 경우도 가끔 있었지만 대개는 시세포층과 두터운 색소상피층으로 구성되어 있었고, 거의 하나의 배양편당 1개씩의 눈을 분화시켰으며 많은 실험을 통해 2개의 눈이 발생한 경우도 있었다. 수정체는 시상의 신호발산에 의해 신경 외표피로부터 유도되어 시세포층위에 결합하게 되는데, 이러한 수정체의 유도현상은 activin A나 IGF-1의 기능과는 밀접하게 관련되지 않기 때문에 본 연구에서 이러한 현상이 나타나지 않은 것으로 생각된다.

중배엽 유도인자인 activin A 단독사용으로 싼관유도가

희박하게 일어나는 것은 싼관이 activin A보다는 다른 중배엽 유도인자에 의해 더욱 잘 유도되기 때문인 것으로 여겨진다. 그리고 IGF-1의 복합처리에 의해 싼관이 매우 낮은 비율로 출현하다가 activin A 100 ng/ml의 매우 높은 농도와 복합처리에 IGF-1의 소량첨가에 의해 상당히 높은 빈도로 출현하게 된 것은 IGF-1이 activin A 고농도에 의한 조직파괴로부터 resque 효과를 준 것 뿐만 아니라 다양한 기관형성 효과까지도 준다는 것을 의미하며, 싼관유도에는 반드시 100ng/ml 정도의 고농도의 activin A가 필요하다는 것을 시사한다. 청낭의 분화율은 눈의 분화율과는 거의 일치하지 않으며 극단적인 경우 activin A 1ng/ml 농도에서 청낭이 많이 분화한 반면 눈은 분화되지 않았다.

IGF-1은 특정기관을 추가로 분화시키는 효과를 가지고 있으나 그 농도에는 별로 영향을 받지 않는 것 같다. 그러나 IGF-1의 농도가 500ng/ml 정도로 높아지면 눈과 청낭, 그리고 싼관의 분화율이 매우 높아지는 사실이 저자 등에 의해 밝혀진 바 있으며[4], 이는 이들 기관의 유도율을 높이기 위해서는 매우 높은 농도의 IGF-1 처리가 필요함을 시사한다.

IGF-1의 연골성장효과[15,19]에 대한 검증으로 연골이 발생할 시기까지 장기간 배양하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나, 본 실험에 사용된 처리배양액으로 장기배양 했을 때, 유도된 미분화 간엽조직으로부터 연골을 분화시키기에는 지금까지 알려진 N-CAM 이나 N-cadherin[7, 16] 등 세포접착인자 및 물질 외에도 미지의 물질들이 차례로 필요할 것이다. 따라서, 이는 매우 어려운 일이라 하겠으며, 실제로 4일 이상의 배양에서는 분화된 조직마저 퇴축되어 일주일 이 지나면 대부분 죽게된다.

요 약

Xenopus 동물극 분리편에 activin A와 IGF-1(insulin-like growth factor-1)을 혼합처리 하여 기관유도의 경향을 연구하였다. 강력한 중배엽유도인자인 activin A를 처리한 기관분화경향은 이미 Asashima 등의 실험에서 밝혀진 바 있으나, 본 실험에서는 activin A의 단독처리에 의한 기관분화경향을 그들과 비교하고 activin A 1-100 ng/ml와 IGF-1 1-100 ng/ml의 농도조합을 처리하여 전체적인 기관

분화 경향을 파악하였다. 그 결과 혼합처리에서 눈이 5-23%로 주로 activin A 10 ng/ml와 IGF-1의 여러 농도조합, 그리고 activin A 50 ng/ml와 IGF-1의 농도조합에서 분화되었으며, 청낭은 IGF-1과의 복합처리 전 농도에 걸쳐 출현하였다. 그리고 신허은 activin A 1-50 ng/ml 농도에서 IGF-1과 복합처리 하여도 유도되지 않다가 activin A 100ng/ml 농도에서 IGF-1의 첨가에 의해 19-38%의 높은 비율로 분화되었다.

참 고 문 헌

1. Ariizumi, T. and M. Asashima. 1994. *In vitro* control of the embryonic form of *Xenopus laevis* by activin A: time and dose-dependent including properties of activin treated ectoderm. *Develop. Growth & Differ.* **36(5)**, 499-507.
2. Ariizumi, T., N. Moriya, H. Uchiyama and M. Asashima. 1991. Concentration dependent inducing activity of activin A. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **200**, 230-233.
3. Asashima, M., H. Nakano, K. Shimada, K. Kinoshita, H. Shibai and N. Ueno. 1990. Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A(erythroid differentiation factor). *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **198**, 330-335.
4. Cheong, S. W., J. H. Jin and C. S. Yoon. 1998. Pronephros induction by combined dose of activin A and IGF-1, and high dose effect of IGF-1 in *Xenopus* animal cap assay. *Korean J. Life Science*, **18(5)**, 479-485.
5. Deuchar, E. M. 1975. *Xenopus*, the South African clawed frog. pp. 1-20, A Wiley-Interscience Publication.
6. Gilbert, S. F. 1995. *Developmental Biology*. p.342, Sinauer Associates, Inc.
7. Hall, B. K. and T. Miyake. 1995. Divide, accumulate, differentiate: cell condensations in skeletal development revisited. *Int. J. Dev. Biol.*, **39**, 881-893.
8. Grigorescu, F., M. T. Baccara, M. Rouard and E. Renard. 1994. Insulin and IGF-1 signaling in oocyte maturation, *Horm. Res.*, **42(1-2)**, 55-61.
9. Kajimoto, Y. and P. Rotwein. 1990. Evolution of insulin-like growth factor I(IGF-I) precursor from *Xenopus laevis*. *Mol. Endocrinol.*, **4(2)**, 217-226.
10. Kay, B. K. and H. Peng. 1991. *Methods in cell biology, Xenopus laevis: practical used in cell and molecular biology*. pp. 62-108, Academic Press, Inc.
11. Kinoshita, K. and M. Asashima. 1995. Effect of activin and lithium on isolated *Xenopus* animal blastomeres and response alternation at the midblastula transition. *Development*, **121**, 1581-1589.
12. Malacinski, G. M., T. Bessho., C. Yokota, A. Fukui, and M. Asashima. 1997. An essay on the similarities and differences between inductive interactions in anuran and urodele embryos, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 410-417.
13. Miyanaga, Y., R. Shiurba, S. Nagata, J. Pfeiffer and M. Asashima. 1998. Induction of blood cells in *Xenopus* embryo explants. *Develop. Genes and Evolution*, **207**, 417-426.
14. Nieuwkoop, P. D. and J. Faber. 1956. External and internal stage criteria in the development *Xenopus laevis*. pp. 162-188, Normal table of *Xenopus laevis*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
15. Nilsson, A., J. Isgaard, A. Lindahl, A. Dahlström, A. Skottner and O.G.P. Isaksson. 1986. Regulation by growth hormone number of chondrocytes containing IGF-1 in rat growth plate. *Science*, **233**, 571-574.
16. Oberlender, S. A. and R. S. Tuan. 1994. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*, **122**, 177-187.
17. Reinecke, M., I. Broger, R. Brun, J. Zapf and C. Maake. 1995. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I and II in the endocrine pancreas of birds, reptiles, and amphibia. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **100(3)**, 385-396.
18. Sadler, S. E. and J. L. Maller. : *In vivo* regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1. *J. Biol. Chem.*, **262(22)**, 10644-10650.
19. Schneider, A. and W. Hanke, W. 1997. Hormonal control of the *in vitro* uptake of ³⁵S₄ sulfate by cartilage of *Xenopus laevis* tadpoles. *Comp. Biol. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **117(3)**, 317-322.
20. Yoon, C. S., D. H. Kim and S. W. Cheong. 1997. Ultrastructural study of induced otic vesicle from isolated *Xenopus* presumptive ectoderm. *Korean J. Electron Microscopy*, **27(2)**, 189-196.