

Retinoic acid가 계배 wingbud의 조직발생에 미치는 영향

한만중 · 김원선

서강대학교 이공대학 생물학과

(1990. 1. 14 접수)

발생중인 계배의 날개에서 지골의 복제를 유발하는 retinoic acid(RA)가 날개의 조직발생에 미치는 영향을 알아보았다. Hamburger와 Hamilton stage 19에 도달한 계배의 wingbud 앞부분에 RA를 처리하고 처리후 24, 48, 72시간이 경과되었을 때 나타난 조직상의 변화를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (1) RA처리는 처리부위와 인접한 조직에서 세포밀도의 감소를 초래하였으며 처리부위와 떨어진 부위에서는 오히려 세포밀도의 증가를 유발하였다. (2) RA처리는 apical ectodermal ridge(AER) 길이의 신장을 유발하였고 또한 그 위치의 전단부 쪽으로의 이동을 가져왔다. (3) 이러한 조직상의 변화는 처리후 24시간에 나타나 72시간까지 계속 되었으며, 특히 처리후 72시간에는 날개의 앞부분에서 원래의 AER외에 복제된 AER을 관찰할 수 있었다.

이러한 RA처리에 따른 조직상에서의 변화는 RA처리에 의하여 유발되는 지골복제현상이 처리후 24시간이내에 시작되는 중배엽성조직 및 중배엽성조직의 성장과 분화에 필수적인 AER의 변화에 기인함을 시사하고 있다.

서 론

발생과 성장에 필수적이며, 일상적인 생리현상에 있어서 불가결한 요소중의 하나인 비타민 A(retinol)는 체내에서 일부가 retinoic acid(RA)로 변환된다. 이렇게 변환된 RA는 생식 및 상피조직의 분화에 필수적인 역할을 담당하며(Sporn *et al.*, 1984), 피부종양을 비롯한 여러가지 피부질환의 치료는 물론이고(Goodman, 1984), 종양세포의 분화(Sherman, 1986)와 발생중인 상피조직세포의 특성에 변화(Hardy, 1983)를 유발하기도 한다. 그러나 과량의 retinoic acid는 발생중인 태아의 여러기관에 작용하여 뇌, 눈, 귀, 구개와 턱, 심장, 비뇨생식기관, 골격계등의 거의 모든 기관에서 기형발생을 가져오기도 한다(Kochhar *et al.*, 1989; Biesalski, 1989). 특히 골격계에 나타나는 기형현상에 대한 많은 연구는 발생중인 생쥐의 다리를 대상으로하여 수행되었으며, RA 처리시기에 따라 다리골격의 일부 중간부분만이 결손되는 phocomelia로부터 끝부분의 결손인 hemimelia 또는 지골의 일부가 결손되는 ectrodactyly등이 일어남이 밝혀져 있다(Kochhar, 1977).

이렇게 발생중인 생쥐의 다리에 기형을 유발하는 RA를 발생중인 계배의 wingbud에 처리하면 원래의 지골과 함께 거울상을 지닌 지골이 날개의 앞쪽에 복제된다(Tickle *et al.*, 1982; Summerbell, 1983). 이러한 지골의 복제는 RA처리량과 wingbud의 발생 시기에 따라 그 정도가 좌우되며 발생 시기가 이룰수록 그리고 처리량이 많을수록 그 효과가 심화되는 것으로 나타났다(Summerbell,

1983; 한 과 김, 1988). 또한 RA처리에 따른 골격복제 현상은 재생되고 있는 양서류의 다리에서도 잘 나타나며 계배의 wingbud 경우와 마찬가지로 처리량과 처리시기에 따라 복제정도에 큰 차이가 나타난다(Maden, 1982; Maden, 1983; Thoms and Stocum, 1984; Kim and Stocum, 1986a; Lee and Kim, 1990). 생쥐의 경우와 같이 retinoic acid의 처리에 의하여 나타나는 다리골격형성의 저해 현상은 아직까지 그 원인이 잘 밝혀져 있지는 않지만 연골형성의 저해(Kochhar *et al.*, 1989) 및 예정된 세포 피사부위의 확장(Alles and Salik, 1989)과 더불어 조직에 있어서의 당화합물 조성 및 세포간의 접착력의 변화가 그 주요 원인으로 추측되고 있다(Kwasigroch and Kochhar, 1980; Kochhar, 1985). 또한 RA는 배양중인 계배의 다리를 구성할 중배엽성 세포로부터의 연골형성을 저해하며(Pacifici, 1980), RA처리에 의하여 유발되는 지골복제도 중배엽성 조직의 변화에 기인함이 조직의 치환이식 실험을 통하여 밝혀졌다(Wilde, 1987).

그러나 이러한 계배의 날개형성에 있어서 형태적인 변화를 가져오는 RA처리의 효과에 대한 조직수준에서의 연구가 Lee와 Tickle(1985)의 SEM을 통한 연구를 제외하고는 잘 되어있지 않다. 따라서 본 연구에서는 발생중인 계배의 wingbud에 RA를 처리하고 이때 일어나는 제반변화를 처리후 경과시간별로 조직학적 수준에서 조사하고 이러한 변화가 날개의 형태형성에 나타나는 형태적인 변화와 어떻게 연관되는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Windowing 및 계배의 발생단계 확인.

본 연구에서는 닭(Plymouth Rock-Arbor acres)의 수정란을 실험재료로 사용하였다. 구입된 수정란은 습도가 유지된 39.5°C의 부란기에서 발생이 진행되도록 하였으며 발생중인 계배의 wingbud에 retinoic acid(RA)를 처리하기 위하여 부란개시 후 60시간이 경과되었을 때 Summerbell과 Hornbruch(1981)의 방법을 약간 변형하여 난각에 창(window)을 만들고 발생단계를 확인 하였다.

창은 조각용 드릴과 톱을 이용하여 난각을 부분적으로 제거하여 만들었으며, 노출된 난막을 예리한 forceps를 사용하여 제거하고 난막에 밀착되어 있던 계배가 공기주머니로부터 공기가 빠져 나가면서 난막으로부터 유리되도록 함으로써 발생중인 계배에 대한 실험조작이 가능하도록 하였다.

일단 windowing을 마친 계배는 현미경하에서 Hamburger와 Hamilton(1951)의 정상발생 단계표에 의거하여 발생단계를 확인한 다음, 창을 투명 접착용 테이프로 봉하고 다시 부란기에 넣어 발생이 계속 진행되도록 하였다.

Retinoic acid(RA) 처리

RA처리는 Stage 19에 도달한 계배를 선별하여 예리한 forceps로 배외막의 일부를 제거한 뒤 안과수술용 가위로 계배의 오른쪽 wingbud 앞부분과 체질의 경계부분을 깊이 2.5mm 정도로 절개하고, 가로세로 각각 0.5mm 크기의 멸균된 갱지를 RA용액에 적셔 앞서 절개한 부위에 끼워 넣음으로써 완료 하였다(Fig. 1). 본 실험에서는 dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma)를 용매로하여 40mg/ml의 농도로 용해된 retinoic acid(all-trans, type XX; Sigma)용액을 사용하였다. RA처리가 끝난 다음 난각의 창은 parafilm으로 밀 봉하였으며, 부란기에 다시 넣어 발생이 계속 진행되도록 하였다. 대조 실험으로는 RA의 용매인 DMSO만을 처리하였고, 아무 처리도 하지 않은 반대쪽 날개를 또 하나의 대조군으로 이용하였다.

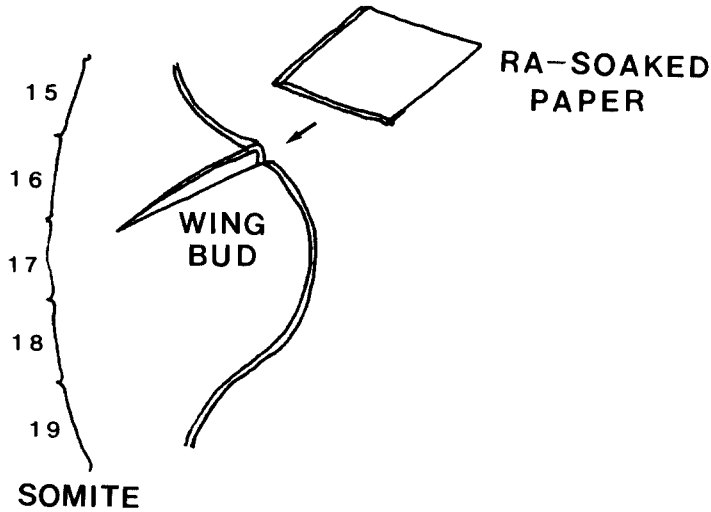


Fig. 1. A schematic diagram of RA-soaked paper implantation at the anterior margin of a developing wingbud.

조직학적 연구

조직관찰을 위하여 처리가 끝난 wingbud가 24, 48, 72시간이 경과되었을 때 발생중인 날개조직을 떼어내어 Bouin씨 고정액에서 24시간동안 고정하였다. 다음 과정으로 Li_2CO_3 로 포화된 70% 에틸알코올을 사용하여 고정된 조직에서 picric acid를 제거한 후 탈수과정을 거친 두 조직을 paraplant에 포매하였다. 이렇게 포매된 조직을 5m 두께의 연속절편으로 만들어 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 염색된 조직에서 전체적인 날개의 형태, 그리고 날개의 정단부에 위치하는 외배엽성 조직인 apical ectodermal ridge의 형태 및 위치와 wingbud의 대부분을 구성하고 있는 중배엽성 조직의 세포밀도등에 주안점을 두어 관찰하였다. DMSO만을 처리한 날개와 아무처리도 하지 않은 반대쪽 날개도 위와 같은 요령으로 절편을 만들어 염색하고 함께 비교관찰 하였다.

결 과

RA를 계배의 wingbud 전단부에 처리한 후 24, 48, 72시간이 경과한 뒤에 발생중인 날개조직을 고정하고 염색된 절편을 만들어 관찰한 결과, 전반적으로 RA는 날개 조직의 대부분을 차지하는 중배엽성 세포의 밀도와 발생중인 계배의 wingbud에서 특히 잘 나타나는 apical ectodermal ridge (AER)의 위치와 크기에 변화를 초래하였다.

RA처리 후 24시간이 경과 되었을 때 wingbud의 전단부 주변에서는 중배엽성 세포의 밀도가 현저하게 감소하였으며, 이들 세포 사이는 많은 cell process로 채워져 있음이 관찰되었다(Fig.2 I). 정상적인 wingbud에서 정단부에 위치하고 있는 AER(Fig.2 A)은 RA의 처리에 의하여 그 위치가 앞쪽으로 상당히 이동하였으며, AER의 길이도 신장되었음이 관찰되었다(Fig.2 G). 한편 DMSO만으로 처리된 wingbud에서는 RA 처리후 나타나는 세포밀도의 저하와 같은 현상은 관찰되지

않았으며, AER의 길이가 다소 길어 졌으나 RA처리의 경우와 같은 AER의 전단부로의 이동은 볼 수 없었다(Fig.2 D-F).

RA처리후 48시간이 경과 되었을때에는 발생중인 wingbud의 anterior half 쪽이 팽대되어 장차 이곳으로부터 복제된 골격이 형성될 것임을 추측할 수 있었다(Fig.3 E). AER의 위치는 더욱 앞쪽으로 이동하였고, RA로 처리된 조직 주변부의 세포밀도는 계속 저하된 상태로 유지되어(Fig.3 F-H), RA처리후 24시간이 경과 되었을때와 비교하여 큰 변화를 보이지 않았다. 한편, DMSO로 처리한 뒤 48시간이 경과된 날개조직에서는 RA처리후 나타나는 전형적인 변화를 관찰할 수 없었고, 다만 DMSO를 적신 종이 조각을 끼워 넣은 부위에서는 세포밀도가 약간 감소되었음을 관찰할 수 있었으나, 그 정도는 RA처리의 경우와 비교해 볼 때 큰 차이를 보여 주었다(Fig.3 C,D). 처리를 하지 않은 발생중인 날개의 경우 장차 humerus, radius, ulna가 될 부위에는 이미 중배엽성 세포들이 모이기 시작하여 연골화 과정의 전단계인 prechondrogenesis가 진행되고 있음을 관찰할 수 있었다. 이때 정상적인 날개의 RA 또는 DMSO로 처리된 부위에 상응하는 위치에서는 세포밀도의 저하가 관찰되지 않았다(Fig.3 A,B).

RA처리 후 72시간이 경과된 날개조직에서는 복제되고 있는 날개의 지골부분이 뚜렷이 관찰되었으며, 원래 날개의 정단부와 복제중인 날개의 정단부에서 모두 별개의 AER이 관찰되었다(Fig.4 G-I). RA를 적신 종이를 끼워 넣은 부위인 근위부에서는 RA처리후 24시간 및 48시간대에서 보였던 것과 같은 세포밀도의 감소가 특징적으로 관찰되었다(Fig.4 J-L). 그러나 DMSO로 처리되거나 또는 전혀 처리되지 않은 날개 조직에서는 RA처리의 경우와는 달리 정상적인 날개골격이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 또한 매우 치밀하게 배열된 중배엽성의 세포들을 proximal anterior 부위에서 관찰할 수 있었고 RA처리군에서 볼 수 있었던 AER의 중복화도 관찰할 수 없었다(Fig.4 A-F).

논 의

발생중인 계배의 wingbud에 대한 RA처리는 처리부위에서의 세포밀도 감소를 유발하였으며 AER이 wingbud의 앞부분으로 이동되는 현상과 더불어 AER 길이의 신장이 초래되었고 이러한 변화는 이미 처리후 24시간부터 시작되어 처리후 72시간까지 지속되었다.

날개의 복제와 결부된 세포밀도의 변화에 관한 연구로는 Cooke와 Summerbell에 의하여 수행된 계배의 날개를 재료로한 실험을 들 수 있다. Cooke와 Summerbell(1980)은 wingbud의 후반 부위에 위치하여 날개의 전후축 결정화에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 zone of polarizing activity (ZPA)를 wingbud의 앞부분에 이식한 뒤에 ^3H -thymidine을 이용하여 wingbud 조직내에서의 세포분열 지표(mitotic index)를 조사하였다. 그 결과, ZPA이식에 의하여 세포분열의 활성도가 앞쪽 부위에서 특히 증가하였음을 관찰하였으며, 동시에 세포밀도의 저하를 관찰하였다. 본 연구에서 관찰된 결과에 의하면 RA는 처리후 72시간이 경과할 때까지도 처리부위 근처의 중배엽성 세포 밀도에 심한 저하를 초래하였다. 따라서 날개골격복제에 따른 세포밀도의 저하현상은 두 실험적 상황에서 공통점을 보이고 있다. 이러한 세포밀도의 저하는 RA처리에 의하여 기존의 세포간 간격을 채우고 있던 물질들이瓦解되고 새로운 세포간 물질들이 RA를 적신 종이에 접촉된 부위의 세포들로부터 다량 분비되기 때문이 아닌가 추측해 볼 수도 있다. Teratocarcinoma stem cell에서

RA처리 후 세포간 물질의 주요 구성성분인 fibronectin, laminin 및 collagen등의 당단백질의 증가가 유발된다(Joukoff *et al.*, 1986)는 보고와 더불어 생쥐의 경우 과량의 RA처리에 의하여 다리조직의 hyaluronic acid 양이 증가된다(Kochhar, 1985)는 사실은 이러한 추측을 뒷받침하고 있으며 이러한 점은 앞으로 조직화화적인 혹은 생화학적인 방법을 통하여 규명되어야 할 것이다.

RA처리에 따른 AER의 형태 및 위치의 변화가 상피조직에 대한 RA의 직접적인 영향인지 또는 이차적인 영향인지의 여부는 분명하지 않다. Maden(1984)과 Wilde등(1987)은 각각 axolotl과 계배의 다리에서 일련의 조직치환 이식실험을 통하여 RA처리에 의한 다리의 골격복제효과가 중배엽성 세포에 대한 RA의 직접적인 영향에 기인함을 보고한바 있다. 한편 AER의 이식을 통해 또 다른 날개의 발생이 유발된다는 것이 실험적으로 알려져 있으나(Saunders and Gasseling, 1968), 이러한 AER자체가 다리를 구성하게 될 중배엽성 조직에 의하여 유도된다는 실험적 사실(Saunders and Reuss, 1974)에 비추어 볼 때 본연구에서 나타난 RA처리에 의한 AER의 형태 및 위치의 변화는 wingbud를 구성하는 중배엽성세포의 변화로부터 유래된 이차적인 결과라고 추측할 수 있다.

한편 Lee와 Tickle(1985)은 주사전자현미경을 이용하여 RA처리후 chick wingbud에 나타나는 AER의 형태적인 변화를 처리후 경과시간 및 처리량에 따라 조사하였다. 그들의 조사에 의하면 낮은 농도의 RA처리는 AER길이의 신장을 유발하기도 하나 농도의 증가와 더불어 AER의 길이가 오히려 정상에 비해 짧아지는 것으로 나타났다. 그러나 고농도 처리는 지골의 복제보다는 지골 형성의 저해를 유발하며 저농도 처리에 의하여 지골의 복제가 유발된다는 그들의 결과를 놓고 볼 때 본 연구에서 나타난 바와 같이 지골의 복제를 유발하는 범위의 RA처리에 의하여 AER의 길이가 길어지는 현상은 그들의 연구와 일치하는 것으로 보인다. 더불어 RA처리에 의하여 AER의 위치가 전단부 쪽으로 치우치는 현상과 함께 AER길이의 신장은 역시 중배엽성 조직의 변화에 기인하는 것으로 추측된다. 이러한 추측의 근거는 RA처리후 장차 지골의 복제가 일어날 부위에서 세포밀도의 급격한 증가현상이 나타나는 것으로부터 찾아볼 수 있다. 따라서 복제되고 있는 날개에서 나타나는 AER의 변화가 RA처리에 따른 직접적인 효과라고는 보여지지 않지만 이러한 추측은 RA로 처리된 중배엽성 조직과 정상적인 상피조직의 재조합 이식실험을 통하여 더욱 확실하게 규명될 수 있으리라 보여진다.

Thaller와 Eichele(1987)는 계배 wingbud의 전반부와 후반부에 내재하고 있는 RA의 분포를 HPLC를 이용하여 조사하고, 그 결과 후반부에 보다 많은 양의 RA가 존재함을 밝혀 내었다. 이들은 이러한 실험적 결과로부터 RA가 날개의 전후축을 결정하는 결정소라고 주장하였다. 이렇게 날개의 발생에 결정소로 작용하리라 보여지는 RA는 세포질내에 존재하는 것으로 알려진 cellular retinoic acid binding protein(CRABP; Maden and Summerbell, 1986)에 의하여 그 분포에 구배가 나타나는 것으로 믿어지며 CRABP와 결합하지 않은 상태의 RA가 핵으로 들어가 retinoic acid receptor와 결합하고 이 복합체가 특정 유전자의 발현을 조절하는 것으로 이해되고 있다(Giguère *et al.*, 1989; Eichele, 1989). 따라서 앞으로 추구되어야 할 연구는 이러한 조직상에서의 변화가 어떤 유전자의 발현에 기인하는가에 그 방향이 맞추어져야 될 것으로 보이며 더불어 특정 유전자 발현이 조직이 위치에 따라 어떠한 차이를 보이는지 조사해야할 것이다. 이러한 점에서 최근 밝혀진 바와 같이 생쥐의 다리발생시에 homeobox 유전자의 발현에 구배성이 나타난다는 사실은 많은 가능성을 보여주고 있다(Dolé *et al.*, 1989; Tsonis, 1990).

REFERENCES

1. Alles, A.J. and K.K. Sulik, (1989): Retinoic-acid induced limb-reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology*. 40: 163-171.
2. Biesalski, H., (1989): Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology*. 57: 117-161.
3. Cooke, J. and D. Summerbell, (1980): Cell cycle and experimental pattern duplication in the chick wing during embryonic development. *Nature*. 287: 697-701.
4. Dollé, P., J-C. Izpisua-Belmonte, H. Falkenstein, A. Renucci, and D. Duboule, (1989): Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature*. 342: 767-772.
5. Eichele, G. (1989): Retinoids and vertebrate limb pattern formation. *Trend. in Gen.* 5: 246-251.
6. Giguère, V., E.S. Ong, R.M. Evans, and C.J. Tabin, (1989): Spatial and temporal expression of the retinoic acid receptor in the regenerating amphibian limb. *Nature*. 337: 566-569.
7. Goodman, D.S. (1984): Vitamin A and retinoids in health and disease. *New Eng. J. Med.* 310: 1023-1031.
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. Joukoff, E., T. Planchenault, and V. Keil-Dlouha, (1986): Changes of surface glycoprotein after retinoic acid-dibutyl cAMP-induced differentiation of teratocarcinoma stem cells. *Dev. Biol.* 114: 289-295.
11. Kim, W.-S. and D.L. Stocum, (1986): Effects of retinoids on regenerating limbs: comparison of retinoic acid and arotinoid at different amputation levels. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195: 455-463.
12. Kochhar, D.M. (1977): Abnormal organogenesis in the limbs. *In: Handbook of teratology.* Vol. 2. Mechanisms and pathogenesis. (J.G. Wilson and F.C. Fraser, editors). Plenum Press, pp. 453-479.
13. Kochhar, D.M. (1985): Skeletal morphogenesis: comparative effects of a mutant gene and a teratogen. *In: Developmental mechanisms: normal and abnormal* (J.W. Lash and L. Saxén, editors). Alan R. Liss, Inc., pp. 267-281.
14. Kochhar, D.M., J.D. Penner, and L.M. Minutella, (1989): Biotransformation of etretinate and developmental toxicity of etretin and other aromatic retinoids in teratogenesis bioassays. *Drug Metabolism and Disposition*. 17: 618-624.
15. Kwasigroch, T.E. and D.M. Kochhar, (1980): Vitamin A alters the internal viscosity of fragments of limb-bud mesenchyme. *J. Embryol. exp. Morph.* 59: 325-339.
16. Lee, H.-K. and W.-S. Kim, (1990): The effects of retinoic acid on the regenerating limbs of the larval Korean newt (*Hynobius leechii*). *Korean. J. Zool.* (In press).
17. Lee, J. and C. Tickle, (1985): Retinoic acid and pattern formation in the developing

- chick wing: SEM and quantitative studies of early effects on the apical ectodermal ridge and bud outgrowth. *J. Embryol. exp. Morph.* 90: 139-169.
18. Maden, M. and D. Summerbell, (1986): Retinoic acid-binding protein in the chick limb bud: identification at developmental stages and binding affinities of various retinoids. *J. Embryol. exp. Morph.* 97: 239-250.
 19. Maden, M. (1982): Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature.* 295: 672-675.
 20. Maden, M. (1983): The effects of vitamin A on the regenerating axolotl limb. *J. Embryol. exp. Morph.* 77: 273-295.
 21. Maden, M. (1984): Does vitamin A act on pattern formation via the epidermis or the mesoderm? *J. Exp. Zool.* 230: 387-392.
 22. Pacifici, M., G. Gossu, M. Molinaro, and P. Chambon, (1980): Vitamin A inhibits chondrogenesis but not myogenesis. *Exp. Cell Res.* 129: 469-474.
 23. Saunders, J.W. Jr. and M.T. Gasseling, (1968): Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *In: Epithelial-mesenchymal interactions* (R. Fleischmajer and R.E. Billingham, editors). Baltimore, Williams and Wilkins. pp. 78-97.
 24. Saunders, J.W. Jr. and C. Reuss, (1974): Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo. *Dev. Biol.* 38: 41-50.
 25. Sherman, M.I. (1986): Differentiation of embryonal carcinoma cells: commitment, reversibility, and refractoriness. *Curr. Top. Dev. Biol.* 20: 345-356.
 26. Sporn, M.B. and A.B. Roberts, (1984): Cellular biology and biochemistry of the retinoids. *In: The retinoids*, (M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, editors). Academic Press, Inc. London, Vol. 2: 209-286.
 27. 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.
 28. Summerbell, D. (1983): The effects of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb. *J. Embryol. exp. Morph.* 78: 269-289.
 29. Thaller, C. and G. Eichele, (1987): Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature.* 327: 625-628.
 30. Thoms, S.D. and D.L. Stocum, (1984): Retinoic acid-induced pattern duplication in regenerating urodele limbs. *Dev. Biol.* 103: 319-328.
 31. 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.
 32. Tsonis, P.A. (1990): Molecular approaches in limb development and regeneration. *Trend. Biochem. Sci.* 15: 82-83.
 33. Wilde, S.M., S.E. Wedden, and C. Tickle, (1987): Retinoids reprogramme pre-bud mesenchyme to give changes in limb pattern. *Development.* 100: 723-733.
 34. 한만중, 김원선, (1988) : 발생중인 chick wingbud에 대한 retinoic acid의 효과. 한국 환경성형 돌연변이·발암위 학회지 8:47-55

The Effects of Retinoic Acid on the Developing Tissue of Wingbuds in Chick Embryos

Man-Jong Han and Won-Sun Kim

*Department of Biology
College of Science and Engineering
Sogang University
C.P.O. Box 1142, Seoul, Korea*

A histological study has been done to examine the skeleton duplicating effect of retinoic acid (RA) in developing chick wingbuds. After RA-treatment on chick embryos at Hamburger-Hamilton stage 19, histological changes in developing wingbuds have been observed as follows. (1) RA-treatment caused decrease of mesenchymal cell density around the RA-applied area and increase of mesenchymal cell density at the distal region of wingbud where the future duplicated structure would arise. (2) RA-treatment evoked lengthening of apical ectodermal ridge (AER) and dislocation of AER toward anterior margin. (3) The above changes appeared at 24 hours post-RA-treatment and persisted upto 72 hours. Furthermore, at 72 hours post-RA-treatment, a duplicated AER in addition to the original AER covered the mesenchymal tissue which would ultimately form the duplicated skeletons.

The above observations suggest that RA-evoked wing skeleton duplicating effect might be the result of changes in the mesenchymal and AER tissue which are manifested at 24 hours after RA-treatment.

Figure Legends

- Fig. 2.** Sections of chick wingbuds treated with RA (in DMSO)-soaked or DMSO-soaked papers and an untreated control at 24 hours after implantation. In all figures, left sides of the figures correspond to the anterior sides of wingbuds while right sides correspond to the posterior sides.
- A:** Longitudinal section of a control normal wingbud. A characteristic apical ectodermal ridge (AER, arrow head) covers the mesenchymal tissue near the center (slightly toward anterior margin) of wingbud. x 60.
 - B:** Higher magnification of Fig. 2A (distal region). Note the well-developed AER (arrow heads) which is very similar to the AER in DMSO-treated wingbud (Fig. 2E). x 300.
 - C:** Higher magnification of Fig. 2A (proximal region). The cell density of the mesenchymal tissue in the anterior part of wingbud is as compact as that of the DMSO-treated one (Fig. 2F), but it is quite higher than that of the RA-treated one (Fig. 2I). x 300.
 - D:** Longitudinal section of a DMSO-treated wingbud. The AER (arrow head) has been widened somewhat, but it covers the center of the wingbud as in the control. x 50.
 - E:** Higher magnification of Fig. 2D (distal part). Note the thickened AER (arrow heads) over the mesenchymal tissue. x 280.
 - F:** Higher magnification of Fig. 2D (proximal part). Compare the mesenchymal cell density with the RA-treated one (Fig. 2I). x 280.
 - G:** Longitudinal section of RA-treated wingbud. The AER (arrow head) has been widened and moved anteriorly from its original position. RA-soaked paper (arrow) can be seen at the anterior margin of the wingbud. x 50.
 - H:** Higher magnification of Fig. 2G (distal part). Note the AER (arrow heads) cover the anterior part of the wingbud mesenchymal tissue. x 260.
 - I:** Higher magnification of Fig. 2G (proximal anterior region). Note the low cell density in the region where the RA-soaked paper has been inserted. These mesenchymal cells show numerous cell processes among themselves. x 260.
- Fig. 3.** Sections of chick wingbuds treated with RA (in DMSO)-soaked or DMSO-soaked papers and untreated control at 48 hours after implantation. In all figures, lower sides of the figures correspond to the anterior sides of wingbuds while upper sides correspond to the posterior sides.
- A:** Longitudinal section of an untreated control wingbud. Note the prechondrogenic condensation of mesenchymal cells at the region where humerus, radius and ulna will be formed. x 40.
 - B:** Higher magnification of Fig. 3A (proximal anterior region). Mesenchymal cells of the wingbud in this region show relatively high cell density. x 280.
 - C:** Longitudinal section of a DMSO-treated wingbud. Note the inserted paper (arrow). Since the wing had undergone bending at this developmental stage, only part of proximal tissue can be seen in this section. In this case, any sign of duplication cannot be observed. x 40.
 - D:** Higher magnification of Fig. 3C. Note the remaining paper segment at the

- right lower corner. The mesenchymal cell density has somewhat decreased, but has never reached the extent as in the RA-treated ones. x 300.
- E: Longitudinal section of an RA-treated wingbud (distal portion). A sign of duplication can be seen as an expansion of mesenchymal tissue at the anterior region of the wingbud (arrow). Note the aggregations of prechondrogenic mesenchymal cells at the site of prospective stylopodial and zeugopodial skeletal elements. x 50.
- F: Higher magnification of Fig. 3E (anterior region). Note the dislocated AER (arrow heads) from its original position. x 280.
- G: Oblique section of an RA-treated wingbud (proximal portion). RA-soaked paper still can be seen at the site of insertion. x 50.
- H: Higher magnification of Fig. 3G (near the site of paper insertion). Sparcely distributed mesenchymal cells show extensive cell processes among themselves. x 300.
- Fig. 4. Sections of chick wingbuds treated with RA (in DMSO)-soaked or DMSO-soaked papers and untreated control at 72 hours after implantation. In all figures, lower sides of the figures correspond to the anterior sides of wing-buds while upper sides correspond to the posterior sides.
- A, B: Longitudinal section of an untreated control. A; distal part: B; proximal part. Note the extensive chondrogenesis at the sites of humerus(h), radius(r), carpals (c), and digits(d). x 40.
- C: Higher magnification of Fig. 4B (anterior region). The cell density in this region is comparable to that of the corresponding region in the DMSO-treated case. x 250.
- D, E: Longitudinal section of a DMSO-treated wingbud. D; distal part: E; proximal part. The overall morphologies are similar to those in A, B. x 30.
- F: Higher magnification of Fig. 4E. Note the disintegrated paper segment (arrow heads). Cell density around the paper insertion site is not so low as that of the corresponding region in the RA-treated one. x 180.
- G: Longitudinal section of a RA-treated wingbud (distal portion). The outline of a duplicating wing can be clearly seen at the anterior part of the tissue (arrow). In each wing (original and duplicating), separate AERs (arrow heads) can be recognized. Also, note the chondrogenic condensation of radius(r) and ulna(u), carpals(c) and digits(d). x 50.
- H: Higher magnification of Fig. 4G (original wing part). Note the new AER at its anterior region. Cell density is relatively high. x 250.
- I: Higher magnification of Fig. 4G (duplicating wing part). Note the new AER at the apex of the duplicating wingbud. The cell density is comparable to that of the original wingbud. x 250.
- J: Longitudinal section of a RA-treated wingbud (proximal portion). Proximal part of developing humerus(h) can be seen. x 40.
- K: Close-up view of the region where the RA-soaked paper has been inserted. Only the trace of paper remains (arrow). x 100.
- L: Higher magnification of Fig. 4J (near the paper insertion site). Note the sparce-ly distributed mesenchymal cells and extensive cell processes among them-selves. x 320.

anterior ← posterior

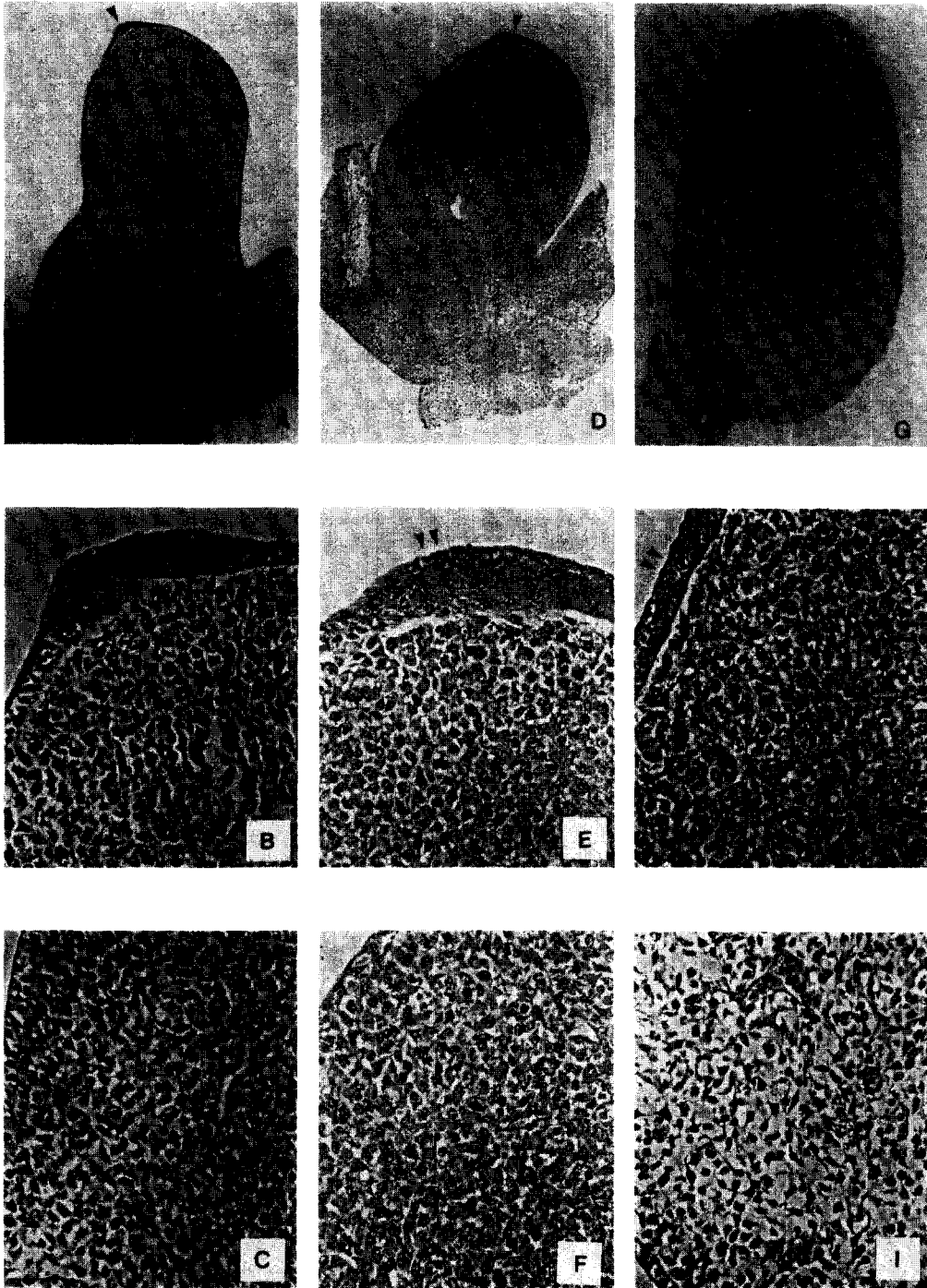


Fig. 2

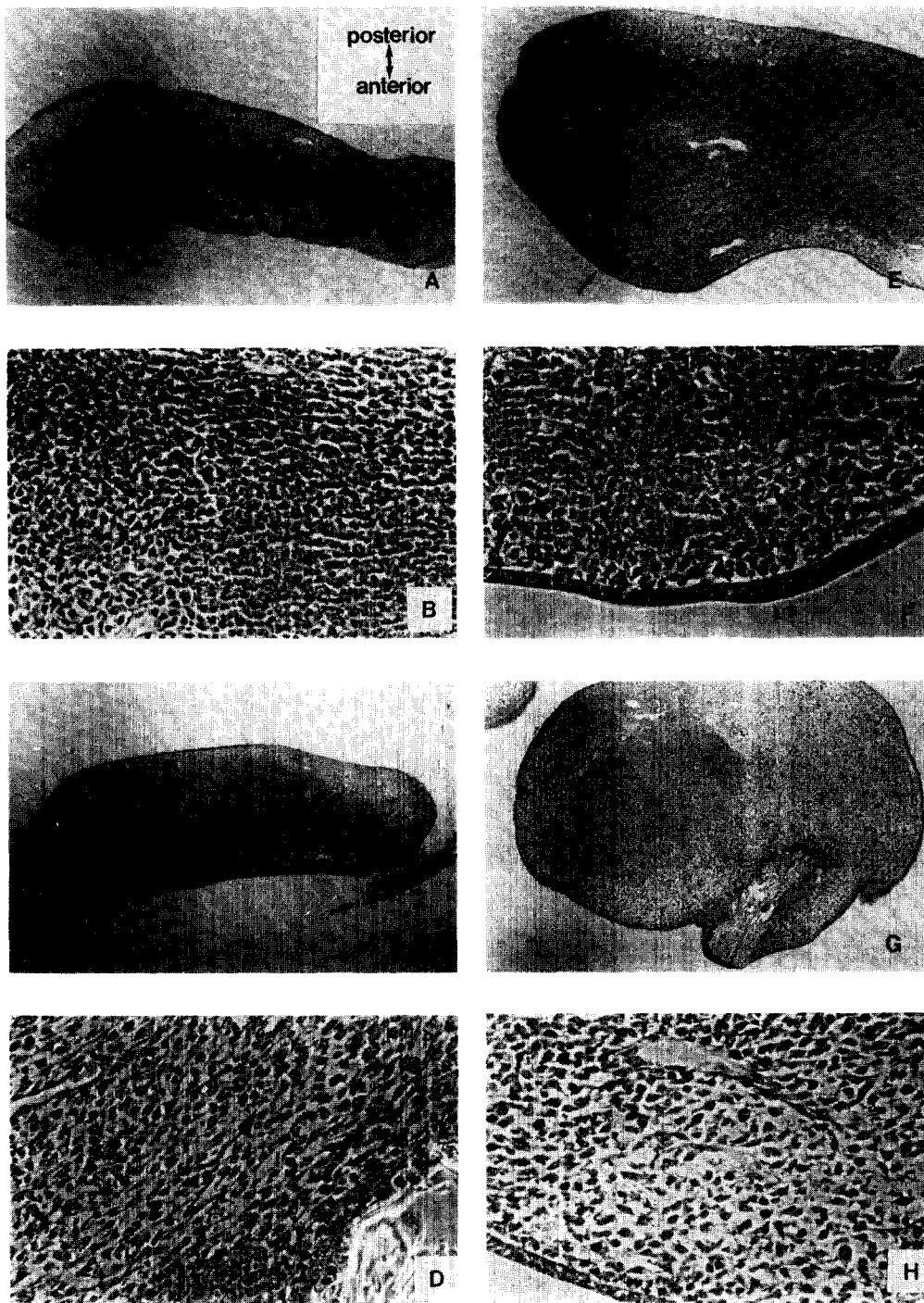


Fig. 3

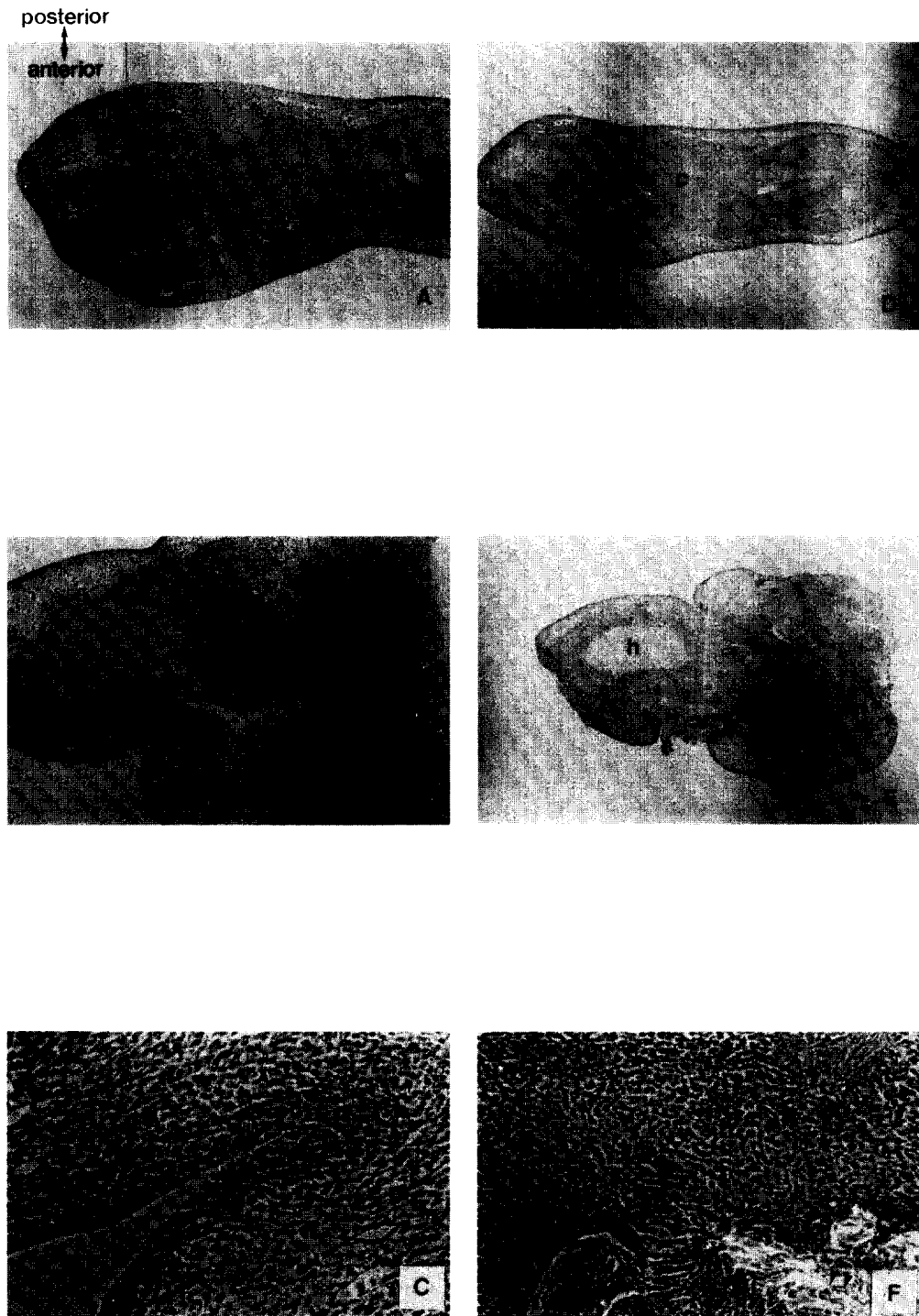


Fig. 4

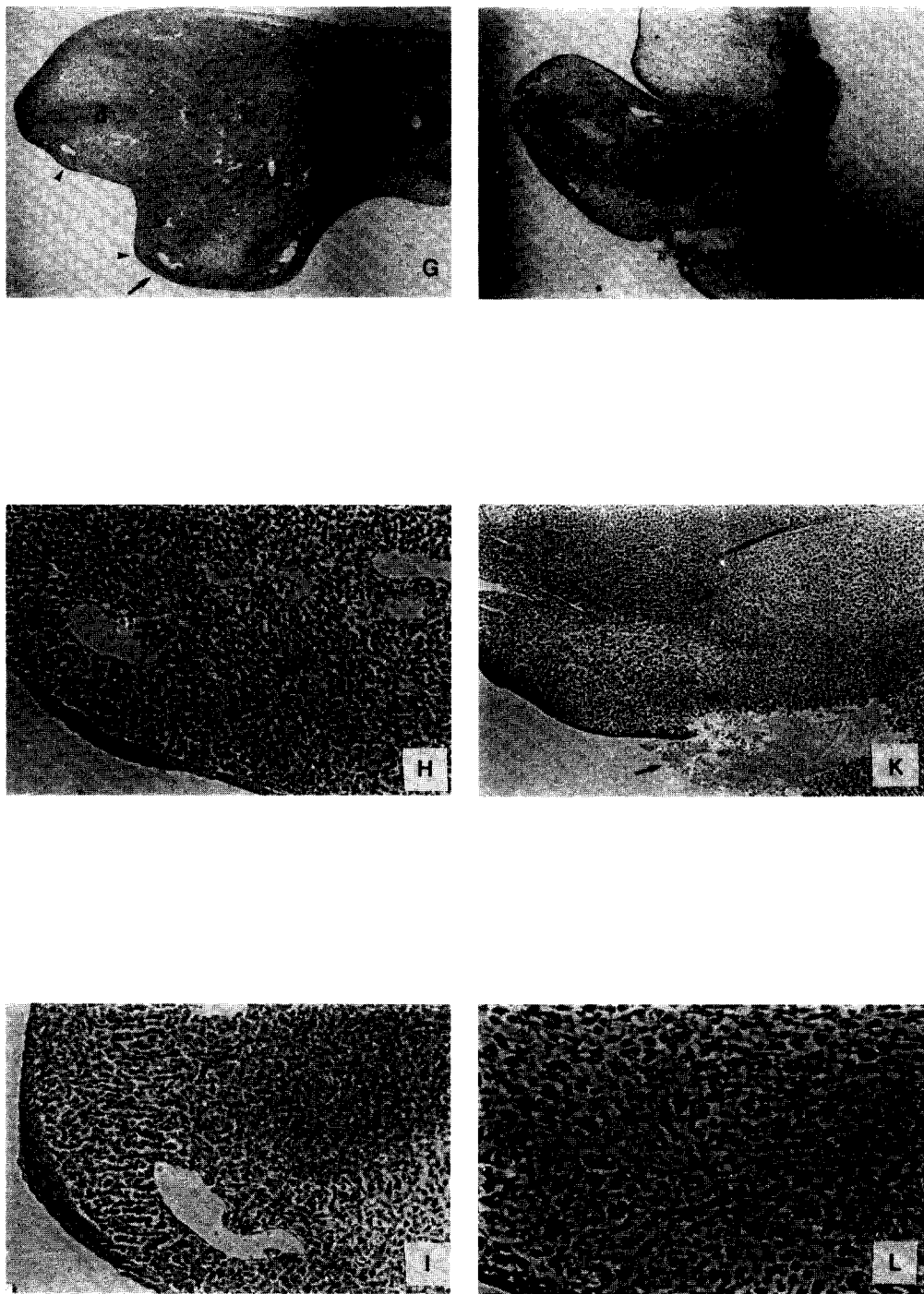


Fig. 4