

한국산 도롱뇽 (*Hynobius leechii*) 유생의 다리 발생 단계와 MNNG 및 retinol palmitate 처리가 다리 발생에 미치는 영향

박인식 · 김원선

서강대학교 이공대학 생물학과

한국산 도롱뇽 (*Hynobius leechii*) 유생의 다리 발생 과정을 관찰하고 잠재적 돌연변이 유발물질인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)과 잠재적 기형 유발물질인 retinol palmitate가 다리 발생에 미치는 영향을 알아보았다. 정상적인 개체에서 뒷다리의 발생 단계는 외부와 내부의 형태적 특징을 기준으로 하여 7단계로 나누어 볼 수 있었으며 전연골세포의 밀집에 따른 골격형성은 다리 발생아의 근위부에서 시작하여 원위부로 진행됨을 확인할 수 있었다. 도롱뇽 유생을 MNNG(10 ppm)나 retinol palmitate(37.5 ppm)로 처리한 경우, 공통적으로 다리 원위부의 골격 형성이 억제되었으며, 특히 이러한 골격 형성 억제 현상은 처리시기가 이룰수록 보다 심하게 나타났다. 이러한 결과는 발생을 저해하는 물질에 대한 미분화 상태의 세포들의 반응성이 발생과정 중 특정 단계에 국한됨을 시사하는 것으로 해석된다.

KEY WORDS: amphibian, *Hynobius leechii*, limb development, MNNG, retinoids, retinol palmitate

생활수준의 향상과 산업발달의 가속화에 따른 화석 연료 사용량의 급격한 증가 및 공해물질의 배출에 의한 생활 환경의 오염은 최근 많은 우려를 낳게 하고 있다. 대기 오염에 의한 산성비는 국지적인 지표수의 산성화를 유발하며, 특히 물을 서식처로 하는 양서류의 경우에는 그 폐해가 우려할 만한 수준에 이르렀다. 이른 봄에 일시적으로 생성되는 연못에 산란하는 북미산 도롱뇽의 일종인 *Ambystoma maculatum*의 경우, 물의 산성도(pH)가 6 이하이면 수정란의 치사율이 60%를 넘는다는 보고가 있으며(Pough, 1976), 미국의 Bear Meadows Bog 지역에서 조사된 바에 의하면 수질의 산성화가 여러 종류의 양서류 수정란과 유생의 치사율을 증가시킴이 밝혀졌다(Saber

와 Dunson, 1978). 또한, 수소이온농도와 연관되어 있는 음이온도 그 농도와 종류에 따라 *Ambystoma maculatum*의 생장을 억제하는 환경 오염원으로 작용함이 밝혀져 있다(Ireland, 1991).

수질의 산성화 이외에 폐수나 생활 하수의 무분별한 방출로 인한 수질의 오염도 그 심각성이 매우 크다고 할 수 있다. 중금속을 포함한 여러가지 유기화합물이 양서류의 발생에 미치는 영향도 다방면에서 연구되어 왔으며, 이들은 독립적으로 생물에게 영향을 미치기도 하지만 몇 가지가 함께 작용하여 복합 효과를 나타내는 경우에는 더욱 심각한 폐해를 유발하기도 한다(Fort 등, 1989; Scadding, 1990). 특히 소수성인 화학 물질이 특정 용매의 도움으로 물에 녹는 경우에 복합 효과가 나타날 수 있음이 보고된 바 있다(Rayburn 등, 1991). 이러한 수질 오염은 수계 생태계에도 커다란

*본 연구는 1991, 1992년도 교육부 기초 과학 육성 연구비의 지원에 의하여 수행되었음.

영향을 주고 있지만 오염된 물을 식수로 사용했을 때 인간에게 나타날 수 있는 질병이나 돌연변이로 인한 유전적 질환, 선천적 기형 등의 폐해도 장기적인 측면에서 연구되어야 할 부분이다.

이러한 폐해를 유발하는 잠재적 화학 오염원을 검색하여 피해를 최소화하기 위해서는 검색에 용이한 실험동물의 선택이 필요하다. 사람에게 미칠 수 있는 피해에 대한 가능성을 알아보기 위해서는 사람과 유전 관계가 높은 포유류를 사용한 실험이 필요하다, 실험대상의 확보와 비용 등에 어려움이 있는 것도 사실이다. *Xenopus*를 비롯하여 수중생활을 하는 양서류의 유생은 재료의 확보나 취급, 사육 등이 비교적 용이하다는 장점을 지니고 있으며, 특히 이들의 발생중인 다리는 하나의 독립적인 발생 시스템으로서 기형 유발 물질의 검색에 매우 유리하다. 이러한 일차적인 검색에 많이 이용되는 양서류의 하나는 *Xenopus*이며 이를 이용한 'The Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*(FETAX)' 방법의 효용성에 관한 많은 연구 결과가 보고되고 있다(Rayburn 등, 1991; Friedman 등, 1992).

강력한 발암물질의 하나인 N-methyl-N'-nitro N-nitrosoguanidine(MNNG)으로 처리한 *Xenopus* 올챙이에서는 발육 부진과 체축만곡현상이 유발되며, 한국산 도롱뇽(*Hynobius leechii*) 유생의 경우에도 다리 골격의 기형 현상이 유발된다(주 등, 1991). 또한, 기형 유발 물질의 한 종류인 retinol palmitate는 *Xenopus* 올챙이, axolotl 유생의 다리 발생시 골격의 형성을 억제하며(Scadding과 Maden, 1986a, b), 한국산 도롱뇽 유생의 경우에도 다리 골격의 기형을 유발한다(주 등, 1991). 본 연구에서는 이러한 효과를 나타내는 잠재적 돌연변이 유발 물질과 기형 유발 물질이 수계 생태계의 중요한 한 구성 요소인 한국산 도롱뇽 유생의 다리 발생에 미치는 영향을 조직학적인 면에서 알아보려 하였다. 이를 위하여 한국산 도롱뇽 다리의 정상 발생 과정을 형태 및 조직학적으로 조사하여 기본적인 자료를 확보하고,

MNNG나 retinol palmitate로 처리한 그룹과 비교하여 이들 물질에 의하여 유발되는 기형 현상의 조직학적 특징을 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 한국산 도롱뇽(*Hynobius leechii*)의 유생은 3월경 자연 산란된 알을 수집하여 부화시켜 얻었다. 부화된 각각의 유생은 상호간의 공격으로 인한 손상을 방지하기 위하여 특별히 제작한 격자상자에서 분리 사육하였으며, 사육수로는 지하수를 사용하였다. 먹이로 부화 후 처음 2주 동안은 갯개어난 brine shrimp를 사용하였으며, 그 이후로는 소간을 잘게 다져 주었다. 실험처리는 유생의 뒷다리의 발생 정도에 따른 초기, 중기, 후기, 말기의 4발생 단계에 걸쳐 시행하였으며 처리 방법은 다음과 같았다.

실험 방법

1) MNNG 처리

N-methyl-N'-nitro N-nitrosoguanidine(MNNG; Sigma)을 10 ppm이 되도록 지하수에 용해하고, 각 발생단계에 도달한 유생을 암소에서 2시간 동안 준비된 용액에 노출시켰다. 노출 후에는 지하수로 2회 세척한 후 격자상자로 옮겨 사육하였다.

2) Retinol palmitate 처리

Retinol palmitate(RP; Type VII all trans, water dispersible; Sigma)를 37.5 ppm이 되도록 지하수에 녹인 후, 이 용액을 사육수로 하여 각 발생단계에 도달한 동물들을 2주간 처리하였으며, 처리 후에는 retinol palmitate를 첨가하지 않은 지하수에서 사육하였다.

3) 고정, slide 제작과 관찰

대조군으로 사용하기 위하여 정상 발생중인 유생을 부화 후 3일부터 30일까지 하루에 5개 채씩 취하여 마취시킨 후 Bouin 고정액에 24 시간 이상 고정하였으며, 고정된 개체들을 Li_2CO_3 로 포화된 70% ethanol에 넣어 picric acid를 제거하였다. 이렇게 고정한 유생의 체장 및 뒷다리의 길이와 폭을 마이크로미터를 사용하여 측정하였으며 사진촬영을 한 뒤 몸체로부터 뒷다리를 잘라 탈수과정을 거친 다음 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직은 $5\mu\text{m}$ 두께의 미세절편으로 만든 다음 파라핀 제거 후 Erlich's hematoxilin과 eosin으로 염색하고 발생에 따른 골격 형성을 포함한 제반 조직학적 변화를 조사하였다.

MNNG 또는 retinol palmitate로 처리한 유생은 처음 2회는 3일마다, 다음 4회는 6일마다 5마리씩 취하여 Bouin 고정액에서 24시간 이상 고정하였다. 고정이 완료된 후에는 정상 발생의 경우와 동일한 방법으로 slide를 제작한 후, 대조군과 비교하여 조직학적인 변이 여부 및 골격 형성시 나타나는 차이점을 조사하였다.

결과

정상 발생

한국산 도롱뇽의 경우 앞다리는 부화시에 이미 발생이 상당히 진척된 상태이나, 뒷다리의 경우에는 부화 후 약 3일이 경과해야 발생아의 돌출을 식별할 수 있었다. 따라서 뒷다리의 외형적 특징 및 발생아의 길이와 폭의 비(Table 1; Fig. 1, 2)에 따라 부화 후 3일째 부터 7단계의 다리 발생 단계를 설정하였다. 발생 단계는 발생아를 겨우 식별할 수 있는 초기 발생아 시기(early bud stage)로부터 시작하여 중기 발생아 시기(medium bud stage), 후기 발생아 시기(late bud stage), 발생아의 말단이 첨예화되는 말기 발생아 시기(post-late bud stage)를 거쳐, 족판 형성기(foot plate stage), 지골 형성기(digit formation stage), 형태 완성기(complete limb stage) 등으로 나누어 볼 수 있었다.

각 발생 단계에서 관찰된 외형 및 조직학적 특징을 요약하면 다음과 같다.

초기 발생아 시기(early bud stage): 체절 아래쪽의 체벽으로부터 돌출된 뒷다리의 발생아는 부화 후 약 2-3일이 지나면서 관찰되기 시작했다. 발생아는 배설공의 바로 앞쪽에 위치하며 길이와 폭의 비(L/W ratio)가 1.44 정

Table 1. Average sizes (mean \pm SD) of body and hindlimb buds in the larvae of Korean salamander, *Hynobius leechii*

Days After-hatching	Body Length(mm)	Limb bud Length (mm)	Limb bud Width (mm)	Limb bud L/W ratio
1	12.2 \pm 1.26	0	0	—
3	14.2 \pm 0.30	0.39 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05	1.44
5	15.2 \pm 0.66	0.48 \pm 0.09	0.37 \pm 0.04	1.30
7	17.7 \pm 1.21	0.61 \pm 0.08	0.39 \pm 0.06	1.56
9	19.1 \pm 1.29	0.97 \pm 0.09	0.41 \pm 0.04	2.37
11	16.2 \pm 1.57	1.28 \pm 0.18	0.33 \pm 0.03	3.88
13	17.6 \pm 0.21	1.57 \pm 0.10	0.40 \pm 0.05	3.93
15	19.5 \pm 0.35	1.81 \pm 0.40	0.46 \pm 0.05	3.93
17	19.9 \pm 0.07	1.74 \pm 0.10	0.43 \pm 0.05	4.05
19	20.3 \pm 0.28	2.28 \pm 0.40	0.49 \pm 0.02	4.65
21	25.1 \pm 0.07	2.90 \pm 0.33	0.61 \pm 0.09	4.75
23	23.4 \pm 0.42	2.94 \pm 0.31	0.60 \pm 0.05	4.90

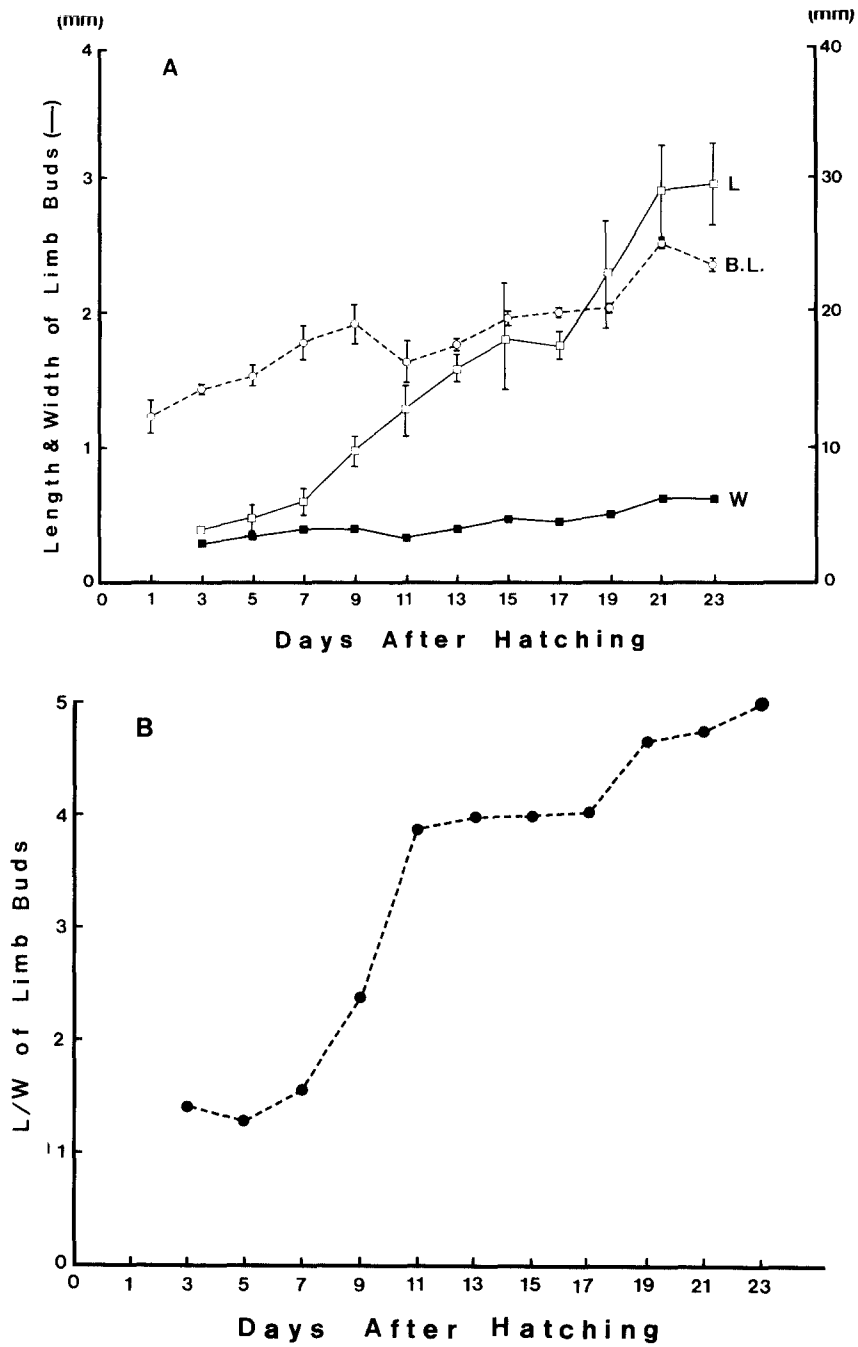


Fig. 1. (A) Body lengths (B.L.; ○) and lengths (L; □) and widths (W; ■) of hindlimb buds in Korean salamander, *Hynobius leechii*, at every 2 days after hatching. (Mean ± SD). (B) Length/Width ratios of developing hindlimb buds of Korean salamander.

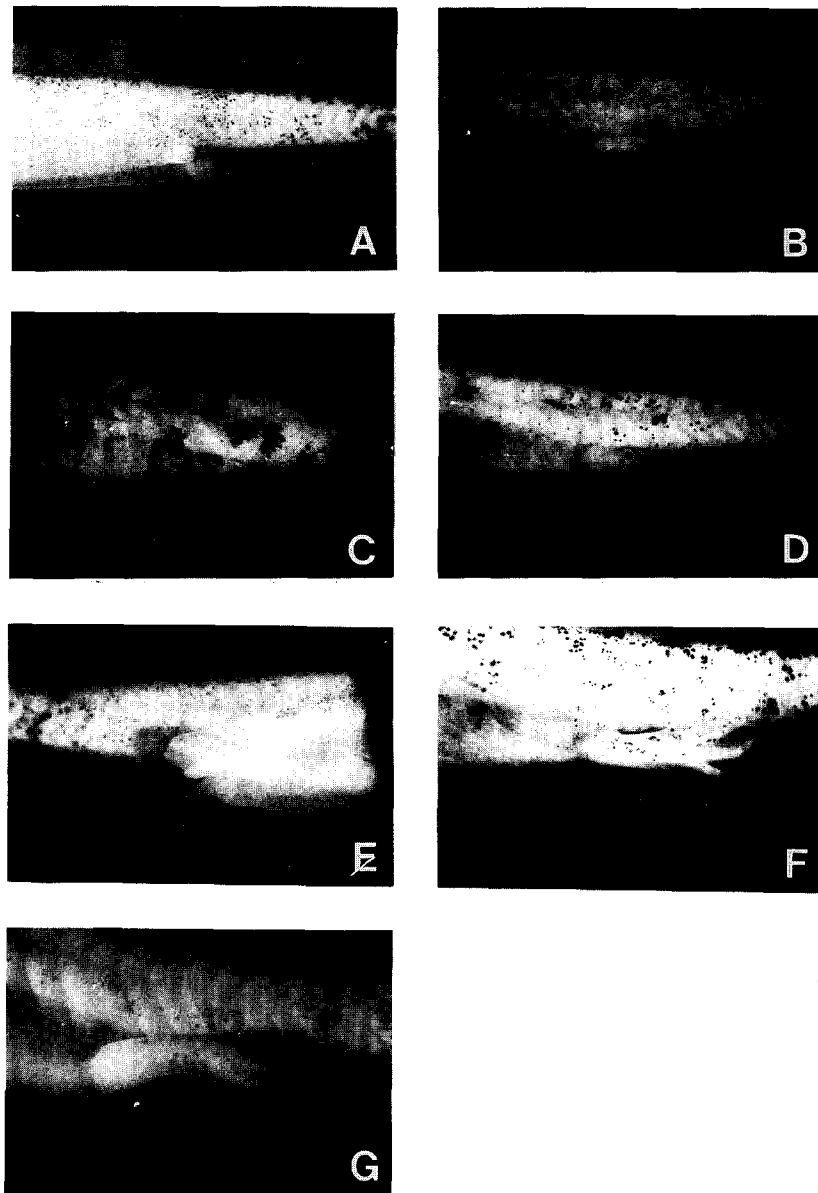


Fig. 2

Fig. 2. External morphology of the developing hindlimbs of Korean salamander, *Hynobius leechii*. 100×
 A: 3 days after hatching. A small bud protrudes from body wall in front of the anus (arrow head): early bud stage.
 B, C: 7 days(B) and 9 days(C) after hatching. Compare the sizes of growing buds in the three consecutive developmental stages (A,B,C) of limb buds.
 D: 11 days after hatching. The growing bud has a tapered tip.
 E: 13 days after hatching. Foot plate has been formed. Internally, first and second digits can be discernable.
 F: 19 days after hatching. The shape of the hindlimb is near complete except the presence of interdigital membranous tissue.
 G: 23 days after hatching. A completely formed hindlimb.

도로 폭에 비해 길이가 약간 길게 나타났다. 조직학적인 면에서 이 시기의 발생아는 다층의 상피세포로 둘러싸인 미분화된 중배엽성 세포가 비교적 밀집되어 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2A, Fig. 3A).

중기 발생아 시기 (medium bud stage): 부화 후 약 7일이 경과했을 때 발생아의 길이와 폭의 비는 1.56으로 앞선 발생 단계에 비해 폭의 신장보다 길이의 신장이 더욱 두드러지게 일어났음을 알 수 있었다. 그러나 외형적으로 발생아 크기의 증가 이외에는 뚜렷한 특징을 볼 수 없었으며 조직학적으로도 전반적인 발생아의 모습은 초기 발생아 시기와 유사했고, 다만 발생아를 둘러싸고 있는 상피세포층이 얇아졌음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B, Fig. 3B).

후기 발생아 시기 (late bud stage): 부화 후 약 9일이 경과했을 때 발생아의 길이와 폭의 비는 2.37로 중기 발생아 시기에 비해 매우 높게 나타났으며, 이 시기에 발생아 길이의 급속한 신장이 있었음을 알 수 있었다. 외형적으로 발생아의 형태는 길이가 길어진 것을 제외하고는 앞선 발생 단계에서와 매우 유사하였으며, 조직학적으로도 큰 차이는 발견할 수 없었다 (Fig. 2C, Fig. 3C).

말기 발생아 시기 (post-late bud stage): 부화 후 약 11일이 경과했을 때 발생아의 길이와 폭의 비는 3.88로 여전히 길이가 폭에 비해 상대적으로 급속히 신장됨을 보여주었으며, 외형적으로도 이제까지와는 달리 발생아의 첨예화된 말단을 관찰할 수 있었다. 조직학적인 면에서 발생아의 근위부 중앙에서는 대퇴골의 형성을 위한 세포들의 밀집 현상을 볼 수 있었으며 원위부에서는 이러한 세포 밀집 현상을 볼 수 없었다 (Fig. 2D, Fig. 3D).

족판 형성기 (foot plate stage): 부화 후 약 13일이 경과했을 때 발생아의 길이와 폭의 비는 3.93으로 길이의 신장율이 다소 둔화되었음을 보여주었으며 외형적으로는 발을 형성할 첫 번째와 두 번째의 지골의 형태를 갖춘 족판 (foot plate)이 서서히 그 모습을 나타내기 시작하였다. 조직학적으로는 종아리뼈에 해당하는 경골

(tibia)과 비골 (fibula) 부위에도 연골 형성을 위한 세포의 밀집 현상이 관찰되어 연골 형성이 점차 원위부로 확산됨을 보여주었다. 또한 발생아의 말단부를 덮고 있는 상피세포층은 다층의 후막 형태를 띠고 있었다 (Fig. 2E, Fig. 3E).

지골 형성기 (digit formation stage): 부화 후 약 15일이 경과했을 때 발생아의 길이와 폭의 비는 3.93으로 족판 형성기와 동일한 수치를 보여 발생아의 성장보다는 주어진 발생아에서 형태형성 과정이 활발히 일어남을 보여주었다. 외형적으로 발생아의 족판 내부에서는 4개의 지골이 형성되고 있음을 관찰할 수 있었으며, 조직학적으로도 족근골 (tarsal) 요소의 발달을 관찰할 수 있었다. 또한 지골 사이는 얇은 조직으로만 연결되어 있었으며, 첨단부는 특히 상피성 조직으로만 구성되어 있었다 (Fig. 2F, Fig. 3F).

형태 완성기 (complete limb stage): 부화 후 약 21일이 경과했을 때 발생아의 길이와 폭의 비는 4.75로 길이의 신장이 더욱 왕성히 일어났음을 보여주었으며 외형적으로는 무릎 부위에서 관절이 약간 뒤틀려 다리의 발생이 거의 완료되었음을 알 수 있었다. 조직학적으로도 내부에서는 잘 분리된 연골들을 관찰할 수 있었으며 지골들 사이에 존재하던 조직도 거의 소멸되었음을 볼 수 있었다 (Fig. 2G, Fig. 3G).

처리군

앞선 연구에서 나타났듯이 도롱뇽 유생은 전반적으로 발생의 이른 시기에 MNNG (10 ppm) 처리에 대해 민감한 반응을 보여 MNNG 처리시 대퇴골을 제외한 연골의 형성이 극히 저해됨을 관찰할 수 있었으나, 후기 발생아 시기나 말기 발생아 시기에 MNNG를 처리한 경우에는 정상 발생과 비교해 큰 차이를 볼 수 없었다. 초기 발생아 시기와 중기 발생아 시기에 MNNG로 처리하여 나타난 이상 발생 현상 중 독특한 것은 발생아의 말단부에 형성된 작은 돌기로써 이들은 단순히 표피층이 두꺼워져

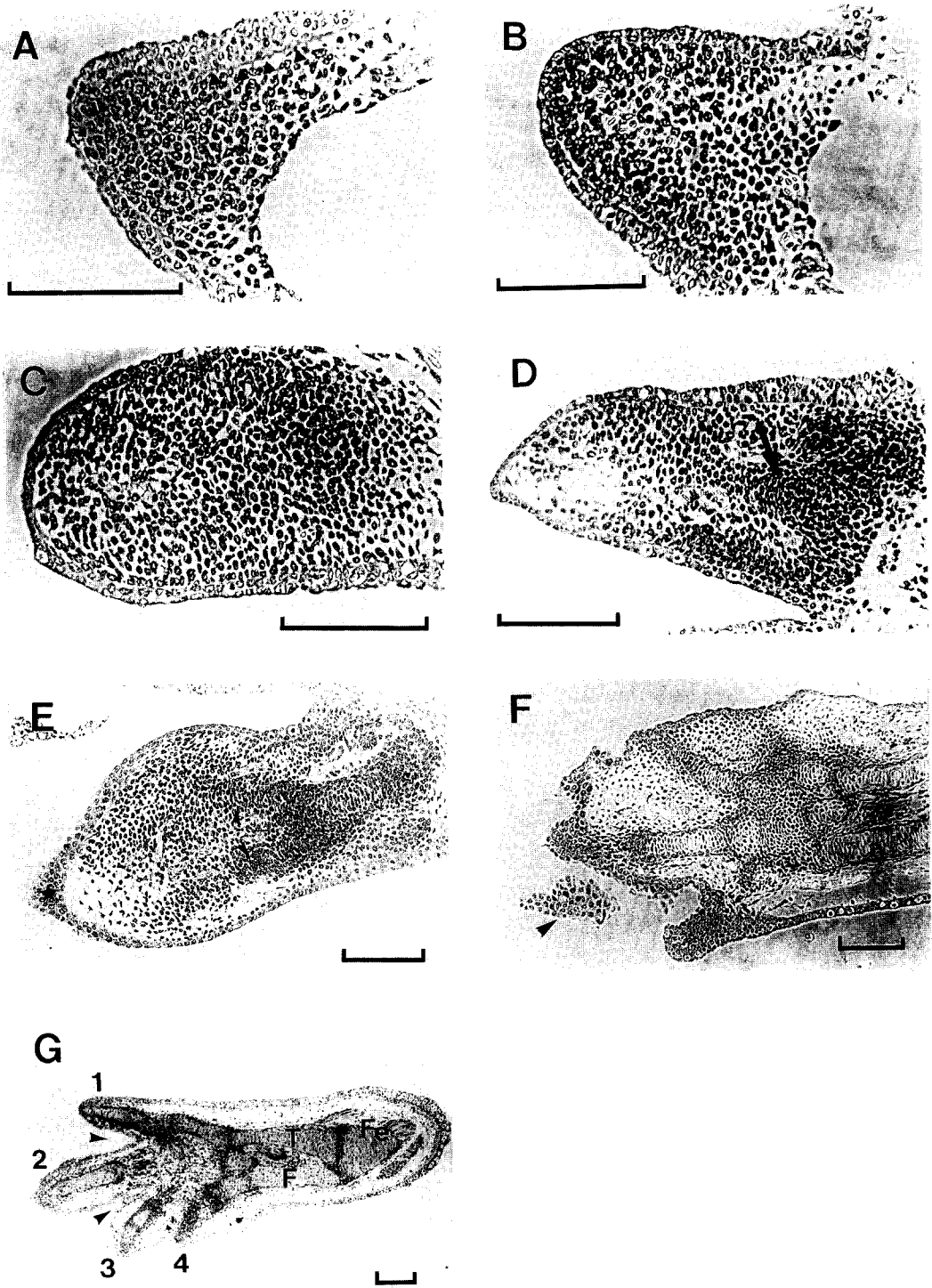


Fig. 3

형성된 것이 아니라 중배엽성 조직을 표피층이 감싸고 있는 형태이었으며 (Fig. 4A, 4B), 발생의 진행과 더불어 소멸되는 것으로 보아 일시적으로 나타나는 이상조직으로 판단되었다. 도롱뇽 유생을 후기 발생아 시기와 말기 발생아 시기에 MNNG로 처리하였을 때에는 지골의 형성저해가 간혹 관찰된 것을 제외하고는 정상 발생과 유사한 발생양상을 보였다. MNNG 처리에 의하여 유발된 다리의 외형적인 발육저하는 조직학적인 방법을 통하여 내부적으로도 확인할 수 있었으며, 주로 족판부위에 해당하는 원위부의 골격형성 저해가 흔히 관찰되었다 (Fig. 4C-F).

도롱뇽 유생을 retinol palmitate (37.5 ppm)로 처리한 경우에는 각 시기에 공통적으로 나타나는 두 가지의 이상 발생 현상을 관찰할 수 있었다. 그 중 하나는 다리의 발육이 저해되는 것이고 다른 하나는 다리가 자라면서 무릎 아래 부분이 등 쪽으로 휘는 현상이었다. 다리의 발생이 억제된 정도를 처리 시기별로 조사해보았을 때, 초기 발생아 시기에 처리한 retinol palmitate는 대퇴골 이하의 골격형성을 억제하는 것으로 나타났으며 (Fig. 4G), 처리 시기가 늦어질수록 골격형성의 저해 부위가 점점 원위부에 국한됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4H).

논의

정상적인 다리 발생 과정을 조직학적으로 관찰해 본 결과 발생아 형성 초기에는 이를 구성하는 세포들이 비교적 균질하게 분포하고 있었으며, 이러한 양상은 발생이 진행되어 발생아가 신장되는 동안에도 계속 유지되다가 골격형성이 시작되는 시기를 전후로 하여 사라졌다. 골격형성의 시작은 발생아 말단부의 침예화 현상과 함께 근위부의 중심에서 연골이 형성될 부위에 세포들이 밀집되는 현상으로 판별할 수 있었다. 장차 연골이 형성될 부위에서 나타나는 세포 밀도의 증가현상은 연골 형성 전단계의 일반적인 현상이며, 닭의 날개 발생시 연골 형성 부위에서의 세포밀도는 60%나 증가함이 밝혀졌다 (Thorogood과 Hinchliffe, 1975). 다리 발생아의 말단이 팽대하여 족판을 형성하는 시기에 원위부 (distal region)에서는 골격형성의 시작을 의미하는 세포 밀집 현상이 지골이 될 부분에 나타나고 있었으나, 근위부 (proximal region)에서는 이미 골격형성이 상당히 진척되어 대퇴골의 일부가 뚜렷이 관찰되었다. 이러한 현상은 골격의 형성이 근위부에서 시작되어 발생이 진행되면서 원위부로 확산되므로, 골격형성이 거의 완료된 근위부에서는 더이상 세포 밀집 현상을 관찰할 수 없고 골격형성이 비로소 시작되는 원위부에서만 세포 밀집 현상이 나타나기 때문인 것으로 추측된다 (Hinchliffe와 Johnson, 1980).

한편, 족판 형성 초기에 존재하던 지골 사이의 조직은 발생이 진행되면서 점차 소멸되어 완

Fig. 3. Longitudinal sections of the normal hindlimb buds of Korean salamander, *Hynobius leechii*. In each section, the left side corresponds to the distal region of the limb bud while right side corresponds to proximal region. Bar: 200 μ m.

- A: Early bud stage. Thick epidermal cap composed of multilayer of epidermal cells covers the undifferentiated mesenchymal tissue. Basement membrane is already present between two tissues (arrow heads).
 B: Medium bud stage. The thickness of the epidermal cap at the tip of the developing limb bud diminished compared to the previous stage. Internal space is occupied by the homogeneously distributed, undifferentiated mesenchymal cells.
 C: Late bud stage. Overall histological morphology is similar to that at medium bud stage.
 D: Note the accumulation of prechondrogenic cells at the proximal region of the bud (arrow).
 E: Foot plate has formed. Prechondrogenic cell condensation is still in progress at the future regions of tibia and fibula (arrow heads). Also, note the well-developed epidermal thickening at the tip of the bud (★).
 F: Basic skeletogenesis is at the near completion. However, interdigital tissue still exists between digits, and well developed epidermal tissue is present at the distal ends. Arrow head indicates the part of epidermal tissue extended from the growing foot plate tip.
 G: Most of the interdigital tissue has disappeared (arrow heads), and basic limb skeletogenesis has been finished. Fe: femur, T: tibia, F: fibula, 1~4: digit numbers.

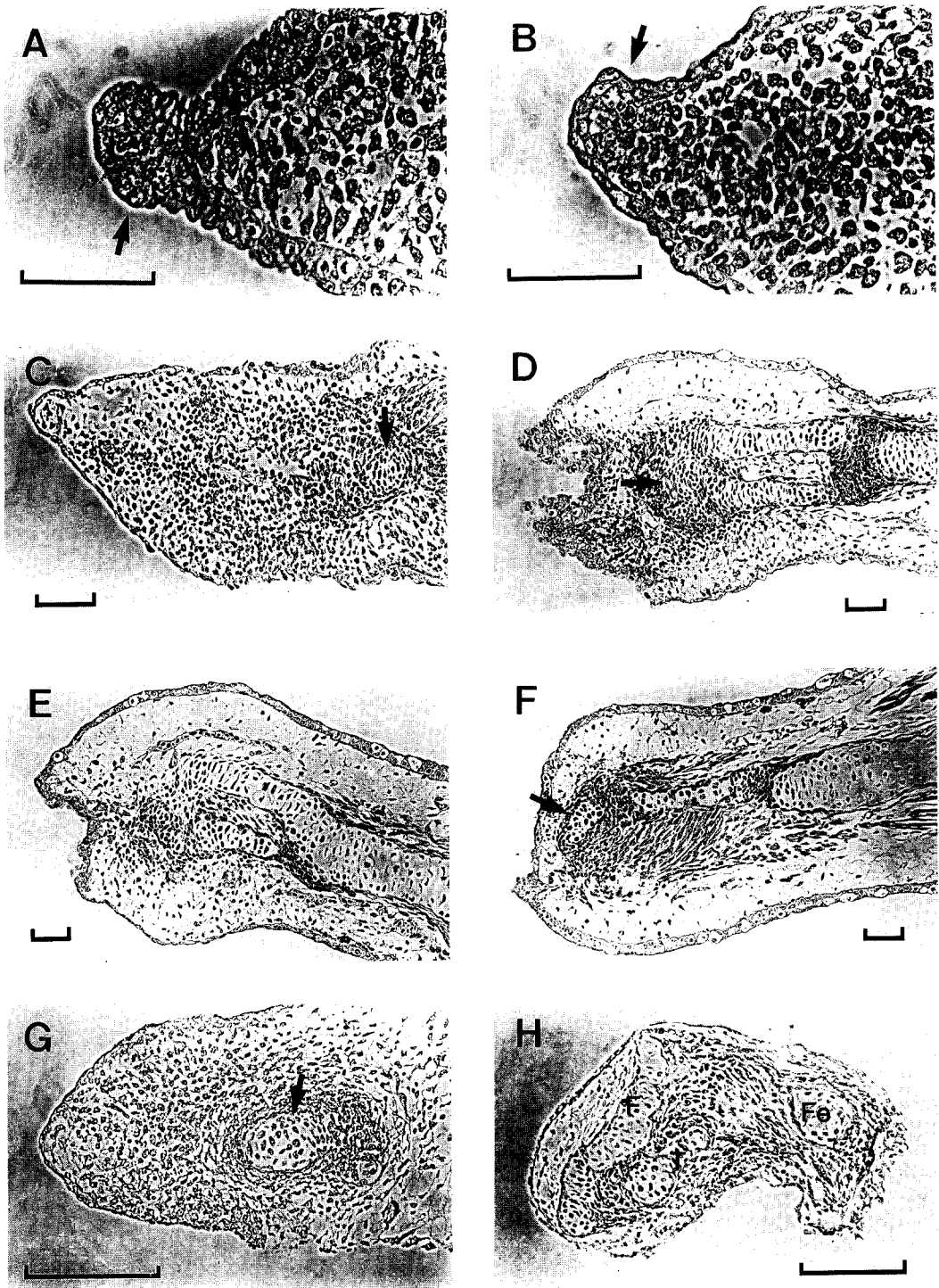


Fig. 4

전한 지골의 형태는 발생의 최종 단계에 이르러서야 비로소 명확하게 나타났다. 지골 사이의 조직을 구성하는 세포들의 예정된 소멸은 양막류 이상의 동물에서는 흔히 관찰되는 현상이지만 (Saunders와 Fallon, 1967), 무미양서류인 *Xenopus*에서는 다리 발생아 말단부의 특정 위치에서 세포의 선택적 증식에 의해 지골을 포함한 말단부의 형태형성이 이루어진다 (Cameron과 Fallon, 1977). 도롱뇽과 같은 유미양서류의 경우 지골 사이의 조직 소멸 여부에 관한 체계적인 연구는 아직 보고되지 않고 있으나, 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 양막류의 경우와 유사하게 한국산 도롱뇽을 포함한 유미양서류의 일부에서도 지골 부위의 형태형성은 지골 간 조직을 구성하는 세포의 괴사에 의한 결과일 가능성이 있다.

조직학적인 면에서 정상발생의 경우와 비교해 보았을 때 MNNG나 retinol palmitate 처리는 한국산 도롱뇽 유생의 다리발생을 저해하는 것으로 나타났다. 이들의 영향은 다리 골격 중 원위부에 해당하는 부위의 형성 저해로 나타났다으며 처리 종류와 처리 시기에 따라 그 정도에 차이가 있었다.

먼저 MNNG 처리군의 경우 처리 시기에 따른 반응의 차이는 두가지 면에서 나타났다. 첫째, 초기 발생아 시기와 중기 발생아 시기에 도롱뇽 유생을 MNNG로 처리한 결과, 발생아

의 말단부에 형성된 돌기를 관찰할 수 있었으며 이러한 돌기 형성의 빈도는 초기 발생아 시기에 MNNG로 처리했을 때 높게 나타났고 발생이 진행되면서 소멸되었다. 이러한 돌기 형성은 발생 초기에 미분화상태로 존재하던 세포들이 MNNG의 영향으로 이상 증식을 일으켜 형성된 것으로 추측되나, 이것이 다리 골격의 비정상적 발생 현상과 직접적인 관련이 있는지는 분명하지 않다. 다만, 알킬화 물질인 MNNG가 쥐의 소화기관에서 악성종양의 형성을 유발한다는 실험적 결과로 미루어 볼 때, 앞서 보인 발생아 말단 조직에서의 이상 증식 현상이 이와 연관되어 있을 가능성도 있다 (Zusman 등, 1991).

골격 형성의 심한 저해도 초기와 중기 발생아 시기에 MNNG를 처리했을 때 나타난 특징 중 하나로서, 초기 발생아 시기에 MNNG를 처리한 경우 대퇴골까지만 발생이 진행됨을 관찰할 수 있었으며 중기 발생아 시기에 처리한 경우 경골(tibia), 비골(fibula)과 함께 족근골(tarsals)로 보이는 소수의 골격을 관찰할 수 있었다. 정상 발생의 경우, 근위부에서 골격의 모습이 나타나기 시작할 때 원위부에서는 세포 밀집 현상이 나타나지만, 이 두 경우 모두 그러한 양상을 보이지 않는 것은 MNNG의 처리에 의해 원위부 골격의 분화가 억제되어 나타나는 현상으로 해석된다. 후기 및 말기 발생아

Fig. 4. Sections of the hindlimb buds of Korean salamander, *Hynobius leechii*, treated with either MNNG (A-F) or retinol palmitate (G-H). In each section, the left side corresponds to the distal region of the limb bud while the right side corresponds to the proximal region. Bar: 100 μ m.

A: 6 days after MNNG treatment at early bud stage. Note the protruding tissue at the tip of the bud (arrow).

B: 18 days after MNNG treatment at early bud stage. A mass of undifferentiated protruding tissue still exists at the tip of the bud (arrow).

C: 24 days after MNNG treatment at early bud stage. Protruding tissue disappeared. At the proximal region of the bud, a part of femur can be seen (arrow), but skeletogenesis at the distal region is very poor.

D: 12 days after MNNG treatment at medium bud stage. Note the incompletely formed distal tips of the tibia and the fibula (arrow). The shape of the distal-most tissue is quite abnormal.

E: 18 days after MNNG treatment at medium bud stage. Note the irregular shape of skeletons without clear distinction between skeletal elements.

F: 30 days after MNNG treatment at medium bud stage. Hypomorphic skeletal pattern. Only a tarsal-like cartilaginous element is present (arrow) instead of whole foot skeletal elements.

G: 18 days after retinol palmitate treatment at early bud stage. Hypomorphic development of limb skeletal elements. Only a femur-like cartilaginous nodule can be discernable (arrow).

H: 30 days after retinol palmitate treatment at late bud stage. Femur (Fe), tibia (T) and fibula (F), developed normally, but only a few tarsal elements developed distally.

시기에 도롱뇽 유생을 MNNG로 처리하면 전체적인 골격 패턴에 대한 기형 유발보다는 일부 지골의 발달이 저해되는 현상을 볼 수 있는데(주 등, 1991), 이러한 현상은 기본적인 골격 패턴은 거의 완성되고 오직 지골의 형성을 가져오는 세포들만이 MNNG 처리에 대한 반응성을 지니기 때문인 것으로 해석된다.

실험 동물을 retinol palmitate로 처리한 경우, 발생의 이른 시기에 MNNG로 처리했을 때와 마찬가지로 다리 골격의 형성이 억제되었다. 이와 같은 현상은 처리 시기가 이를 수복 심하게 나타나 초기 발생아 시기에 처리한 경우 대퇴골까지만 형성되었으며 중기 발생아 시기에 처리한 경우에는 경골과 비골의 일부, 후기 발생아 시기의 경우에는 경골 및 비골과 족근골의 일부까지도 형성되었다. 그러나 형성된 골격의 원위부에서는 더 이상의 세포 밀집 현상이 관찰되지 않았으며, 특히 형성된 골격과 표피층 사이에 미분화 상태의 세포들이 존재하지 않는 것으로 보아 더 이상의 골격형성은 일어나지 않을 것으로 판단되었다. Retinol palmitate와 같은 retinoids 처리에 따른 골격형성의 저해는 발생중인 생쥐의 경우에서 잘 밝혀져 있으며, 이 경우 저해 정도는 발생시기에 의해 좌우되어 앞다리에 비해 약간 늦게 형성되는 뒷다리는 그 늦어지는 시기 만큼 처리에 의한 골격 형성 저해가 지연된다(Kwasigroch와 Kochhar, 1980; Kwasigroch와 Bullen, 1991). 본 연구에서 나타난 바와 같이 발생의 이른 시기에 골격형성이 보다 심하게 저해된 것은 생쥐의 경우에서와 유사하게 retinol palmitate가 골격 형성 기간 중 특정 시기에 영향을 미치기 때문이라고 추측된다. 또한 이렇게 retinol palmitate의 처리 시기가 늦어짐에 따라 가장 원위부에 위치하는 골격의 종류가 다리의 말단쪽으로 근접하는 것은 retinol palmitate가 연골 형성 과정 중 특정시기에만 작용하기 때문에 나타나는 현상으로 추측할 수 있으며, 발생중인 생쥐의 경우에도 처리 시기에 따른 근원위축 상에서의 골격형성 이상의 구배성이 존재한다는 사실은 이러한 추측을 뒷

받침한다(Kwasigroch와 Kochhar, 1980).

잠재적인 기형 유발물질인 retinoids 처리에 의한 골격형성 저해의 근본적인 원인에 대한 가설로는 첫째, retinoids의 화학적 특성에 의한 생체막의 변화, 둘째, 당단백질의 당화합물 조성 변화, 셋째, 유전자 발현에 대한 직접적인 영향 등이 제시되고 있으나, 최근 핵내의 retinoic acid 수용체의 발견 등은 세번째 가설을 지지하고 있다(Sulik과 Alles, 1991). 본 연구에서 사용한 retinol palmitate는 체내로 흡수되어 대사과정을 통해 retinol, retinal, retinoic acid 등의 중간 대사산물로 존재하며(Frolik, 1984), 체내에 존재하는 retinoid receptor들인 cytoplasmic retinol binding proteins(CRBP I, CRBP II), cytoplasmic retinoic acid binding proteins(CRABP I, CRABP II), retinoid X receptors(RXR α, β, γ), retinoic acid receptors(RAR α, β, γ) 등은 이들과 결합하여 핵내의 retinoic acid 농도를 조절하며, 특정 유전자의 발현에 영향을 미친다는 것이 알려져 있다(Mendelsohn 등, 1992). 발생중인 쥐의 경우, 이 receptor들은 그 발현 양상이 시간과 장소에 따라 매우 역동적인 변화를 보이며(Dollé 등, 1989, 1990; Ruberte 등, 1992), retinoic acid 처리는 RAR β 및 CRABP의 발현양상을 변화시킴이 알려져 있다(Osumi-Yamashita 등, 1992).

RAR β 는 지골 사이의 조직과 같이 죽음이 예정되어 있는 세포들에도 발현되며(Dollé 등, 1989), retinoic acid 처리에 의한 RAR β 의 발현 변화는 과도한 세포의 죽음을 유발하여 결과적으로 비정상적인 발생을 가져온다는 보고도 있다(Osumi-Yamashita 등, 1992). 이러한 실험적 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용한 retinol palmitate 처리시 도롱뇽에서 나타난 다리 골격 형성의 저해현상도 쥐의 경우에서와 유사한 메카니즘에 의해 유발되었을 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 앞으로 retinoids 처리에 따른 기형 유발 원인을 규명하기 위하여는 유전자 수준에서의 변화나 세포간 물질의 종류나 양의 변화 등에 대한 연구가

병행되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Cameron, J. A. and J. F. Fallon, 1977. The absence of cell death during development of free digits in amphibians. *Dev. Biol.* **55**: 331-338.
- Dollé, P., E. Ruberte, P. Kastner, M. Petkovich, C. M. Stoner, L. J. Gudas, and P. Chambon, 1989. Differential expression of genes encoding α , β , and γ retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* **342**: 702-705.
- Dollé, P., E. Ruberte, P. Leroy, G. Morriss-Kay, and P. Chambon, 1990. Retinoic acid receptors and cellular retinoids binding proteins: I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* **110**: 1133-1151.
- Fort, D. J., B. L. James, and J. A. Bantle, 1989. Evaluation of the developmental toxicity of five compounds with the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus*(FETAX) and a metabolic activation system. *J. Appl. Toxicol.* **9**: 377-388.
- Freidman, M., J. R. Rayburn, and J. A. Bantle, 1992. Structural relationships and developmental toxicity of solanum alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*. *J. Agric. Food. Chem.* **40**: 1617-1624.
- Frolik, C. A., 1984. Metabolism of retinoids, *In*: The retinoids (Sporn, M. B., A. B. Roberts, and D. S. Goodman, eds). Academic Press Inc., London. Vol. 2 pp. 177-208.
- Hinchliffe J. R. and D. R. Johnson, 1980. Descriptive embryology, *In*: The development of the vertebrate limb. Oxford University Press, NewYork. pp. 67-108.
- Ireland, P. H., 1991. Separate effects of acid-derived anions and cations on growth of larval salamander of *Ambystoma maculatum*. *Copeia* **1**: 132-137.
- Kwasigroch, T. and D. Kochhar, 1980. Production of congenital limb defects with retinoic acid: Phenomenological evidence of progressive differentiation during limb embryogenesis. *Anat. Embryol.* **161**: 105-113.
- Kwasigroch, T. and M. Bullen, 1991. Effects of isotretinoin (13-cis-retinoic acid) on the development of mouse limbs *in vivo* and *in vitro*. *Teratology* **44**: 605-616.
- Mendelsohn, C., E. Ruberte, and P. Chambon, 1992. Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev. Biol.* **152**: 50-61.
- Osumi-Yamashita, N., S. Iseki, S. Noji, T. Nohno, E. Koyama, S. Taniguchi, H. Doi, and K. Eto, 1992. Retinoic acid treatment induces the ectopic expression of retinoic acid receptor β gene and excessive cell death in the embryonic mouse face. *Develop. Growth & Differ.* **34**: 199-209.
- Pough, F. H., 1976. Acid precipitation and embryonic mortality of spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Science* **192**: 68-70.
- Rayburn, J. R., D. J. Fort, R. McNew, and J.A. Bantle, 1991. Synergism and antagonism induced by three carrier solvents with t-retinoic acid and 6-aminonicotinamide using FETAX. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **46**: 625-632.
- Ruberte, E., V. Friederich, G. Morris-Kay, and P. Chambon, 1992. Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. *Development* **115**: 973-987.
- Saber, P. A. and W. A. Dunson, 1978. Toxicity of bog water to embryonic and larval anuran amphibians. *J. Exp. Zool.* **204**: 33-42.
- Saunders, J. E., Jr. and J. F. Fallon, 1967. Cell death in embryonic morphogenesis, *In*: Major problems in developmental biology (Locke, M. ed.), Academic Press Inc., New York, London. pp. 289-314.
- Scadding, S. R. and M. Maden, 1986a. Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Embryol. exp. Morph.* **91**: 19-34.
- Scadding, S. R. and M. Maden, 1986b. Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in *Xenopus laevis* tadpoles. *J. Embryol. exp. Morph.* **91**: 35-53.
- Scadding, S. R., 1990. Effects of tributyltin oxide on the skeletal structures of developing and regenerating limbs of the axolotl larvae, *Ambystoma mexicanum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **45**: 574-581.
- Sulik, K. and A. J. Alles, 1991. Teratogenicity of the retinoids, *In*: Retinoids: 10 years on. (Saurat, J.-H. ed). Karger, Basel. pp. 282-295.
- Throgood, P. V. and J. R. Hinchliffe, 1975. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**: 581-606.
- Zusman, I., A. Zimmer, H. Gdaleritch, P. Yaffe, and H.

Pinus, 1991. Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and deoxycholic acid on process of tumorous transformation of rat visceral yolk sac: *In vitro* and *in vivo* studies. *Acta. Anat.* **140**: 362-368.

주봉건, 김선희, 박성경, 한만중, 김원선, 1991.

Low pH, MNNG, retinoids 처리가 *Xenopus* 유생과 한국상 도롱뇽 유생의 발생에 미치는 영향. 한국 환경성 물연변이·발암원 학회지. **11**: 43-61.

(Accepted November 30, 1992)

The stages of larval hindlimb development in the Korean salamander, *Hynobius leechii*, and the effects of MNNG and retinol palmitate treatment on the limb development

In-Sik Park and Won-Sun Kim (Sogang University, College of Science and Engineering, Department of Biology, C.P.O. Box 1142, Seoul 100-611, Korea)

The stages of larval limb development of Korean salamander, *Hynobius leechii*, were established and the effects of a potential mutagen, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), and a potential teratogen, retinol palmitate, on the larval limb development were examined. In the normal larvae, developments of hindlimbs can be divided into seven stages according to their external and internal morphological features. The skeletogenesis, judged by the condensation of prechondrogenic cells, initially began at the proximal part of the limb buds and, later, propagated to the distal part. In the larvae treated with either MNNG (10 ppm) or retinol palmitate (37.5 ppm), limb skeletogenesis was inhibited especially at the distal region of the limb buds, and the inhibition of limb skeletogenesis was more severe when the larvae were exposed to the agents at earlier stage of development. Our results suggest that the sensitivity of the limb bud cells to the mutagenic or teratogenic agents is limited to the quite narrow period in developmental stages.