

## 계배 대뇌의 신경세포 분화에 따른 탈수소효소 활성 및 미세구조 (1)

김 생 곤

조선대학교 치과대학 인체생물학교실

### Ultrastructure and Dehydrogenase activity on the Differentiation of the Cerebral Nerve Cell in the Chick Embryo (1)

Saeng Gon Kim

Dept. of Human Biology, College of Dentistry, Chosun University

(Received October 24, 1998; revised November 25, 1998)

#### ABSTRACT

To investigate the changes during the differentiation of the cerebral neurons of chick embryo of the embryogenic day (ED) 7 and 8, the ultrastructural changes in the cerebral neurons, the activity of dehydrogenases (LDH, MDH and SDH), protein expression profile and adenosine triphosphate concentration were analyzed.

In ED 7 chick embryos, relatively large nucleus, centrally located nucleolus, evenly spread chromatin over nucleoplasm, and prominent nuclear envelope were observed. Oval-shaped mitochondria with well-developed cristae were present over entire cytoplasm. In ED 8 chick embryos, evenly spread chromatin over nucleoplasm, and prominent nuclear envelope were observed. In the cytoplasm, well-developed rough endoplasmic reticulum and Golgi complex were observed. In ED 7 chick embryos and ED 8 chick embryos, 31 polypeptide bands and 34 polypeptide bands were observed, respectively. The activities of dehydrogenases were lower in ED 7 chick embryos than in ED 8 chick embryos. LDH activity was 8.16 (ED 7) and 9.28 (ED 8), MDH activity was 7.98 (ED 7) and 10.10 (ED 8), and SDH activity was 5.49 (ED 7) and 7.14 (ED 8) respectively. The ATP concentration remained unchanged over ED 7 and 8.

**Key words** : Chick embryo, Dehydrogenase, ATP, Ultrastructure

#### 서 론

계배 중추신경계의 발생은 부란 24시간 후 체질이

형성됨과 동시에 외배엽으로부터 신경관이 형성되고  
이어서 신경관이 발달한다. 신경관 내 배상피층에서  
미분화 세포들이 분열하여 기저막쪽으로 이동하면서  
기질세포로 변형된 후에 점차 신경아세포 (neurob-

\*이 논문은 1996년도 조선대학교 학술연구의 지원을 받아 연구되었음.

last)와 해면아세포 (spongioblast)로 발달한다 (Berry & Rogers, 1965).

신경세포는 신경아세포로부터 분화되는데 이 과정에서 조면소포체를 비롯한 세포소기관들이 발달하고 세포질과 돌기들이 확장되어 세포간 공간이 점차 줄어들어든다 (Berry & Rogers, 1965; Altman, 1966; Caley & Maxwell, 1966; Karfunkel, 1974; Kim *et al.*, 1988). 또한 신경세포는 출생전과 출생후에 대부분이 형성되어져서 일생동안 거의 분열하지 않고 그 성분이 일정하게 지속되며 (Calarkle & Cowman, 1975), 신경계의 발달과정중에서 나타나는 중요한 특징은 신경세포의 빠른 증식과 함께 집단적인 퇴화 현상이 보고되었다 (McMillian & Simposon, 1978). 이러한 두가지의 상반적인 현상을 거쳐 신경계가 완성되는 것으로 알려져 있는데 (Pasko, 1972) 이러한 현상은 척추동물의 배발생시 조직의 분화, 기관발생 및 형태형성의 진행시에 나타나는 일반적인 현상으로 간주된다 (Saunders, 1966; Decker, 1974; Hamburger, 1975; Chu-Wang & Oppenheim, 1978a, b; Koh *et al.*, 1988).

현재 대뇌신경세포 분화과정에 대한 연구로는 흰 쥐를 대상으로 뇌의 발생에서 신경성장요인의 변화 (Larkfors *et al.*, 1991), amino acid 운반자에 의하여 blood-brain barrier를 통하여 수송되는 수송기작 (Kerpere *et al.*, 1992) 등이 있다. 계배를 대상으로 현재까지의 연구로는 정상적인 상태에서 소뇌의 Purkinje 신경의 분화 (Mancini *et al.*, 1985), 12-O-tetradecanoyl phorbol (TPA)에 의한 신경세포의 영향 (Hsu, 1985), ethanol에 의한 정상신경교세포 (astrocyte) 분화의 영향 (Srivastava *et al.*, 1995), 산화에 의한 신경세포의 퇴화 유도 (Kivatinitz *et al.*, 1997) 등이 보고되었고, 또한 계배대뇌신경세포에 대한 연구로는 신경전달물질인 serotonin의 영향 (Zmanulsson, 1976; Choe *et al.*, 1989), 유기화합물인 malathion의 영향 (Flockhart & Casida, 1972; Procter *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 1988), 1-tryptophan의 영향 (Emanuelsson & Palen, 1975; Palen & Thomerby, 1981; Choe *et al.*, 1985; Choe *et al.*, 1989)에 대한 보고 등이 있으나 현재 계배발생 중 대뇌신경세포분화에 대한 단계별 연구는

미진한 실정이다.

따라서 본 연구는 계배대뇌의 신경세포 분화과정을 처리시간을 변화시켜 처리하면서 광학현미경과 전자현미경을 통해 대뇌의 조직 및 세포분화과정에서의 미세구조적 변화 등을 관찰하고 또한 세포생리 및 생화학적인 변화를 SDS-PAGE를 통하여 비교분석하였고, 단백질의 변화과정과 탈수소 효소인 LDH, MDH 및 SDH의 효소활성의 변화 및 ATP함량의 변화 등을 측정함으로써 배 발생과정에 대한 기초자료를 제공을 위한 종합적인 분석을 통하여 분화단계별 변화에 따른 기준을 설정할 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

정상 사료로 사육한 Abor acres계 (전남 나주군 노안면 지산 부화장에서 분양)의 수정란 ( $60 \pm 5$ g)을 부란기 내에서 최적 조건 (온도  $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 사대 습도 60%)으로 부란하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 광학 및 전자현미경 관찰

계배를 적출하여 대뇌를 분리하고  $1\text{ mm}^3$ 으로 절절한 후 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde에서 5시간 전고정하고, 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음, 동일한 완충액 내의 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ )용액으로 2시간동안 후고정하였다. 고정된 조직을 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음 alcohol 상순 농도 순으로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후, Epon 포매제를 포매하고, 초박절편기 (ultramicrotome LKB-V형)를 사용하여  $1\mu\text{m}$  두께로 절편 제작한 다음 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하여 대상부위를 확인하였다. 확인한 부위를 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100 CX-II 투과형 전자현미경 (80 kV)으로 관찰하였다.

#### 2) SDS-PAGE에 의한 단백질 분석

계배대뇌를 적출하여 ultrasonic dismembrator

(ARTEK-300, U.S.A.)로 ice bath 상에서 마쇄시킨 후 원심 분리기(Beckman J2-21)로 0°C에서 10,000xg로 10분간 원심분리하여 상층액을 액체 질소통에 보존하면서 단백질 분석 시료로 사용하였다. 전기영동시에 각 well에 동일한 양의 단백질을 가해 주기 위해서 다음과 같이 시료의 단백질 함량을 정량한다. 시료 완충용액 (0.1 g glycerol, 621.5 µl upper tris buffer, 0.02 g SDS, 50 µl β-mercaptoethanol, 15 µg brom thymol blue/ml)에 용해된 시료 시료단백질의 함량을 측정하기 위하여 brom thymol blue를 넣지 않은 시료 완충용액과 시료를 1:1 비율로 혼합하였다. 그 후 2분간 끓는 물에서 중탕한 다음, 미세원심분리기를 사용하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하고, 이 상층액을 Bradford (1976)방법에 따라 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로하여 단백질 정량을 하였다. 단백질이 정량된 시료를 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 spectrophotometer (Pye Unicam Co., U.K)로 595 nm에서 광학밀도를 측정하고 표준물질로 표준곡선을 작성하여 단백질 함량을 환산하였다.

Lamlli (1970) 및 Annapur 등(1986)의 방법에

따라 vertical slab gel kit (Hoefer, SE600)를 이용하여 전기영동(SDS-PAGE)한다. 먼저 glass plate (16×17 cm)에 1.5 mm spacer를 고정하여 10% acrylamide gel을 만들고, 단백질 함량이 측정된 시료를 조효소단백질(crude protein)함량으로 환산하여 0.8 µg protein/µl가 되도록 희석하여 조정 한 후, 이 액 30 µl와 시료 완충용액 (0.1 g glycerol, 62.5 µl upper Tris buffer, 0.02g SDS, 50 µl β-mercaptoethanol, 15 µg brom thymol blue/ml) 30 µl를 혼합하여 끓는 물에서 2분간 중탕한 다음 냉각하였다. 냉각된 시료는 미세원심분리기로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 40 µl를 well에 loading하여 각 well당 16 µg의 가용성 단백질을 전기영동하고 4°C하에서 TGS 완충용액 (3 g Tris, 14.4 g glycerol, 1 g SDS/l)를 이용하여 전류 20 mA에서 15시간동안 전개하였다. 전개된 gel은 Coomassie brilliant blue (2.5% Coomassie brilliant blue R, 40% methanol, 7% acetic acid)로 3시간 염색한 후 acetic acid buffer (5% methanol, 7.5% acetic acid)로 탈색하여 각 시료의 영동상을 분석하고 표준 단백질은 aldolase (158 KD), bovine serum

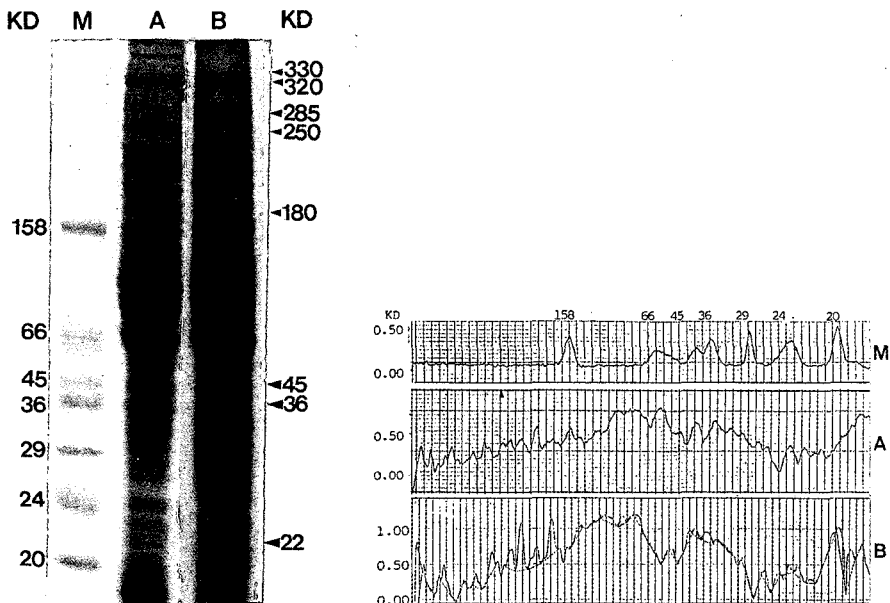


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and densitometric curves of cerebrum flide proteins in chick embryo: (M) marker protein, (A) Embryogenic day 7, (B) Embryogenic day 8

albumin (66 KD), egg albumin (45KD), glyceraldehyde-3-phosphatate dehydrogenase (36KD), carbonic anhydrase (29 KD), trypsinogen bovine pancrease (24 KD), trypsin inhiditor soybean (20 KD) 그리고  $\alpha$ -lactalbumin (14 KD)을 사용하였다. 탈색된 gel은 겔 건조기 (Hefer, SE 1160)에서 완전히 건조시킨 후에 농도계 (Shimadzu C-9000)로 570 nm에서 단백질 밴드의 밀도를 측정하여 상호 비교하였다.

### 3) 효소활성도 측정

(가) Lactate dehydrogenase (LDH)의 활성도 측정

LDH의 활성은 Holbrook 등 (1975)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가한 후 1분동안 감소되는 NADH의 양을 340 nm에서의 흡광도를 측정하여 감소되는 NADH의 양으로부터 환산하여 측정하였다. 반응액 (30 ml)의 조성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.6 mM sodium pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH로 하고 효소원으로는 추출된 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 효소활성도를 측정하였다.

(나) Malate dehydrogenase (MDH)의 활성도 측정

MDH의 활성은 Joo와 Han (1976)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안에 감소되는 2,6-dichlorophenol indophenol (DICPIP)의 양을 spectrophotometer (Shimadzu-1201)를 이용하여 600 nm에서 측정하여 환산하였다. 반응액의 조성은 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD<sup>+</sup>, 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM sodium malate로 하고, 여기에 추출된 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 사용하였다.

(다) Succinate dehydrogenase (SDH)의 활성도 측정

SDH의 활성은 Joo와 Han (1976)의 방법을 이용하여 반응액에 효소원을 가하고 상온에서 1분동안 환원되는 DICPIP의 양을 spectrophotometer (Shimadzu-1201)를 이용하여 600 nm에서 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM soium succinate로 하고, 추출된 조효소액 0.1 ml를 혼합하여 사용하였다.

### 4) Adenosine triphosphate (ATP) 함량 측정

계배대뇌에서 추출된 시료액 200  $\mu$ l와 HEPES 완충용액 (50 mmol Tris acetate buffer, pH 7.75, 1.5 mmol EDTA, 0.075% bovine serum albumin, 10 mmol Magnesium acetate) 200  $\mu$ l를 혼합하고 (Wulff, 1983) 여기에 HEPES 완충용액으로 용해시킨 D-luciferin-luciferase (frol Firefly; Calbiochem Co.)용액 100  $\mu$ l를 혼합한 10초 후에 발광된 광도를 luminometer (Berthold, LB9501)를 이용하여 측정하였다 (Bowie, 1978). 표준곡선은  $1.97 \times 10^{-5}$  mol ATP 용액을 HEPES 완충액으로 희석하여 시료액과 동일하게 측정하였다.

## 결 과

### 1. 광학 및 전자현미경적 소견

#### 1) 광학현미경적 소견

배발생 7~8일 계배에서 측뇌실과 제3뇌실이 전형적으로 관찰되었고 대뇌중격과 뇌척수액을 분비하는 맥락층이 관찰되었다. 또한 양 측에 발생중인 대뇌 반구는 복측의 선조체와 외측벽을 형성하는 피질부분이 두개강을 60~70% 정도가 채워져있었다 (Figs. 2, 5).

#### 2) 전자현미경적 소견

배발생 7일 계배 (Figs. 3, 4)의 신경세포의 핵은 세포질에 비하여 비교적 큰 핵의 중앙에 커다란 인을 가지고 있었으며 전 핵질에 고르게 분포된 염색질과 2중막으로 된 핵막을 관찰할 수 있었다. Mitochondria는 cristae가 뚜렷한 난원형들이 세포질 내에 고루 분포되어 있었고 세포막 주변에는 미발생중인 액포들이 군데군데 분포하였으며 세포질 전역에서 유리 ribosome이 관찰되었다.

배발생 8일군의 계배 (Figs. 6, 7)는 염색질이 고르게 분포되어 있었으며 핵과 핵막은 뚜렷하게 나타났다. 세포질에서는 조면소포체와 Golgi 복합체가 잘 발달되어 있었고 중심립도 전형적으로 관찰되었다. 또한 난원형, 세장형의 mitochondria가 잘 발달되어 있었다. 가지돌기 (dendrite)의 세포질에서는 축삭에 비해 많은 신경세포관들이 분포되어 있었고 축삭종말

의 세포질에서는 많은 시냅스 소포들이 관찰되었다.

**2. 단백질 조성 및 함량**

배발생 7일군에서는 총 31개의 단백질 밴드가 분리되었다. 분자량 330 KD, 320 KD 및 285 KD, 250 KD, 45 KD, 24 KD 및 17 KD의 단백질 등 총 31개의 단백질 밴드가 분리되었다(Fig. 1).

배발생 8일군에서는 총 34개의 단백질 밴드가 분리되었다. 330 KD, 320 KD, 285 KD, 250 KD, 180 KD, 45 KD, 36 KD, 22 KD의 단백질 밴드 등 총 34개의 단백질 밴드가 분리되었다(Fig. 1).

**3. 효소활성도의 변화**

**1) Lactate dehydrogenase (LDH)의 활성도**

배발생 7일군 계배의 LDH 활성은 8.16 (unit/cerebrum)이었으며, 배발생 8일군 계배의 LDH 활성은 9.28 (unit/cerebrum)이었다. 배발생 7일군 계배보다 8일군 계배의 LDH 활성이 더 증가되었다는 것을 알 수 있었다(Table 1).

**2) Malate dehydrogenase (MDH)의 활성도**

배발생 7일군 계배의 MDH 활성은 7.98 (unit/cerebrum)이며 배발생 8일군 계배의 MDH 활성은 10.10 (unit/cerebrum)으로 배발생 7일군 계배보다 크게 증가 되었다는 것을 알 수 있었다(Table 1).

**3) Succinate dehydrogenase (SDH)의 활성도**

배발생 7일 계배의 SDH 활성은 5.49 (unit/cerebrum)이며 배발생 8일군의 활성은 7.14 (unit/cerebrum)이었다. 다른 효소의 활성도보다 적었으나 배발생 8일군의 활성도가 증가되었다는 것을 알 수 있

**Table 1.** Dehydrogenase activity of the cerebrum in chick embryo

Embryoni days	Enzyme activity <sup>+</sup> (unit/cerebrum)		
	lactatye dehydrogenase (LDH)	malate dehydrogenase (MDH)	succinate dehydrogenase (SDH)
7	8.16	7.98	5.49
8	9.28	10.10	7.14

<sup>+</sup>One unit of enzyme activity was defined as 0.1 of optical density change per minute under the experimental condition described in the text.

**Table 2.** Adenosine triphosphate (ATP) contents of the cerebrum in chick embryo

Embryogenic days	ATP mol/ml
7	$3.45 \times 10^{-6}$
8	$3.95 \times 10^{-6}$

었다(Table 1).

**4. Adenosine triphosphate (ATP)의 변화**

7일군 계배의 ATP양은 정상군이  $3.45 \times 10^{-6}$  mol/ml이었으며, 8일군의 ATP양은  $3.95 \times 10^{-6}$ 로 나타났으며, 8일군은 7일군에 비해 증가현상을 보였다(Table 2).

**고 찰**

신경배 형성의 외배엽으로부터 형성되고 신경관의 가운데 부분이 합입되어 신경고랑이 생기고 이들 양쪽 가장 자리 세포들은 신경주름을 만든 양쪽의 신경주름은 위쪽에서 자라 올라가서 결국 정중선에서 융합되어 신경관을 이룬다. 신경관 형성 직후에는 외배엽과 신경관 사이의 외배엽세포가 분리되어 신경능선을 형성한다. 조류에서는 신경관의 형성이 머리쪽에서 시작하여 꼬리쪽으로 진행된다. 발생이 진행됨에 따라 초기 신경배는 신경관으로부터 중추 신경계를 형성한다. 신경의 앞쪽 부분은 먼저, 전뇌, 중뇌, 후뇌로 되고 나머지 부분은 척수가 된다. 전뇌는 다시 중뇌와 간뇌로 분화되고 후뇌는 수뇌로 분화된다. 그러나 중뇌는 보다 발달된 중뇌로만 분화된다. 중뇌는 대뇌, 후각뇌 등으로 되고 후뇌는 소뇌, 교뇌 등으로 분화된다(Kim *et al.*, 1997). 본 연구에서의 배발생 7~8일 계배에서 대뇌는 측뇌실과 제3뇌실이 전형적으로 관찰되었고 대뇌중격과 뇌척수액을 분비하는 맥락층이 관찰되었다. 또한 양측에 발생중인 대뇌반구는 복측의 선조체와 외측벽을 형성하는 피질부분이 두개강을 60~70% 정도가 채워져있었다. 미세구조적 변화는 계배발생 7일군에서 세포질에 비해 비교적 큰 핵 중앙에 위치한 인, 전 핵질에 고르게 분포된 염색질과 2중막으로 된 핵막이 나타났고, mitochondria는 cristae가 뚜렷한 난

원형들이 세포질 내에 고루 분포됨이 관찰되었다. 한편 계배발생 8일군에서는 고르게 분포된 염색질, 핵과 핵막은 뚜렷하게 나타났고, 세포질에서는 조면소포체와 Golgi 복합체가 잘 발달되어 있었다. 이러한 배양시간에 따른 mitochondria의 수적 증가와 cristae의 발달로 세포내 탈수소효소인 SDH, MDH 활성 등의 증가를 가져와 기초대사를 활성화하는 것으로 생각되며, 결국 배양시간에 따른 미세구조의 변화는 대뇌세포의 분화와 형태형성을 가져온다고 본다.

Bamurg 등(1973)은 계배 발생 중 대뇌의 neurotubule 단백질은 계배발생 5일과 계배발생 11일 사이에서 유의성있게 증가하여 계배발생 11~17일 사이에는 거의 1/4 정도가 neurotubule 단백질로서 이 기간 동안 그 농도가 일정하게 유지되다가 성체가 되면 감소하였으며, 소뇌에서는 일부 단백질이 발생 8일 쯤에 크게 증가되었다가 계배발생 16~20일까지는 점차적으로 감소한다고 보고하였다.

Hah 등(1987)은 계배의 중추신경조직으로부터 단백질의 주요 밴드 범위는 90 KD에서 16 KD까지 나타나며, 부란 4일 후 약 24~28개의 밴드가 densitometry에 의해 관찰된다고 보고하였다. 본 연구에서는 7일간 배양된 계배에서는 31개의 단백질 밴드가 분리되었고, 8일 배양시 34개의 밴드가 생성되어 배양시간의 증가에 의한 현상으로 생각된다.

Asztalos와 Nemcsok (1985)는 몇가지 중금속과 살충제에 의한 조직손상의 정도는 LDH활성이 증가와 비례하며 따라서 대뇌조직 및 혈액내에서 LDH활성이 증가되었는데, 이는 약물의 독성작용에 대한 방어기전의 하나로서 나타나는 현상이라고 하였다. 반면 Choe 등(1985)은 phenylalanine, tryptophan, tyrosine과 같은 방향족 아미노산을 투여하고 15일간 부란한 계배의 경우 LDH, MDH 그리고 SDH와 같은 기초대사에 중요한 효소들의 활성도를 크게 감소된다고 보고하였고, Choe 등(1986)은 부란 10일 후 계배 두부의 LDH, MDH 그리고 SDH와 같은 기초대사 관련 효소들의 활성도를 측정하였던 바 LDH 활성도는 tryptophan 투여군의 경우에 정상군에 비해 80% 크게 감소되었고, MDH 활성의 경우에는 79%로 활성이 감소되었으며 SDH의 경우도 56%로

감소가 일어남을 보고하였다. 한편 본 연구에서는 LDH, MDH 및 SDH 활성도는 7일 배양시 보다 8일 배양시 증가현상을 보였는데 이는 배양시간의 증가에 따른 탄수화물, 지질, 아미노산 등의 최종 생물학적 산화회로인 TCA 회로의 효소활성이 증가된 것으로 생각된다.

## 결 론

배발생 7, 8일 계배의 대뇌 신경세포 분화의 변화를 관찰하기 위하여 신경세포의 미세구조 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰하였으며, 또한 대뇌 단백질, 탈수소효소의 활성도 및 ATP의 변화상을 분석한 결과는 다음과 같다.

대뇌 신경세포의 미세구조의 변화는 배발생 7일군에서는 세포질에 비해 비교적 큰 핵의 중앙에 위치한 인, 전 핵질에 고르게 분포된 염색질과 2중막으로 된 핵막이 나타났고, mitochondria는 cristae가 뚜렷한 난원형들이 세포질 내에 고루 분포됨이 관찰되었다. 한편 배발생 8일군에서는 고르게 분포된 염색질, 핵과 핵막은 뚜렷하게 나타났고, 세포질에서는 조면소포체와 Golgi복합체가 잘 발달되어 있었다. 계배대뇌의 배발생 7일군에서는 31개의 단백질 밴드들이 분리되었고, 배발생 8일군에서는 34개의 밴드가 생성되었다. 탈수소효소 활성도는 배양시간이 증가할수록 증가하는 현상을 보였는데, LDH의 활성도는 배발생 7일군은 8.16이며 배발생 8일군은 9.28이었고, MDH는 각각 7.98과 10.10으로 나타났다. 그리고 SDH는 배발생 7일군에서는 5.49이며 배발생 8일군에서는 7.14의 활성을 보여 증가했음을 알 수 있다. ATP의 변화는 배발생 7일군과 배발생 8일군은 비슷하게 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Altman J, 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. J. Comp. Neurol. 128, 431-474  
 Annapur GS, GI Gudling, TA Benson, BB Spear, 1986. Vegetative expression of the  $\delta$ -endotoxin

- genes of *B. Thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *B. subtilis*, *J. bacteriol.* 166, 194-204
- Asztalos B, J Nemcsok, 1985. Effect of pesticides on the LDH activity and isozyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) sera. *Comp. Biochem. Physiol.* 82, 217-219
- Bamburg JR, EM Shooter, L Wilson, 1973. Developmental changes in microtubule protein of chick brain. *Biochem.* 12(8), 1476-1482.
- Berry M, AW Rogers, 1965. The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99, 691-709
- Bowie LJ, 1978. In *methods in enzymology*, Academic press. NY. 57, 26
- Bradford, M.M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Caley DW, DS Maxwell, 1966. An electron microscopic study of the neuroglia during postnatal development of the rat cerebrum. *J. Comp. Neurol.* 133, 45-70
- Choe KS, CN Joo, CK Choi, JW Kim, SO Joo, 1986. cell biological studies on brain formation at the early stage of chick embryogenesis. *Korean J. Zool.* 29(3), 215-233
- Choe RS, SO Joo, CN Joo, OS Oh, KS Shin, 1989. Cell biological study on factors affecting brain formation at early chick embryo I. The effect of serotonin. *Korean J. Zool.* 32(1), 55-73.
- Choe RS, CN Joo, CK Choi, JK Kim, 1985. Cell biological studies of the effect of aromatic amino acid on early development of chick embryo *Korean J. Zoo.* 28(4), 257-273
- Chu-Wang IW, RW Opeenheim, 1978a. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development. *J. Comp. Neurol.* 177, 33-58
- Chu-Wang IW, RW Opeenheim, 1978b. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. II. A quantitative and qualitative analysis of in the ventral root, including evidence for axon outgrowth and limb innervation prior to cell death. *J. Comp. Neurol.* 177, 59-86
- Decker RS, 1974. Lysosomal packaging in differentiating and degenerating anuran lateral motor column neurons. *J. Cell. Biol.* 61, 599-612
- Emauulsson H, L Palen, 1975. Effects of L-tryptophan on morphogenesis and growth in the early chick blastoderm. *Wilhelm Roux Archives.* 177, 1-17
- Flockhart IR, JE Casida, 1972. Relationship of the acylation of membrane esterase and proteins to the teratogenic action of organophosphorus insecticides and eserine in developing hen eggs. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2591-2603
- Hah JC, CB Han, DS Kim, 1987. Studies on the distribution of soluble proteins within the central nervous system during embryogenesis of chick embryo. *Korean J. Zool.* 30(3), 261-271
- Hamburger V, 1975. Cell death in the development of lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160, 535-546
- Holbrook JJ, A Liljas, SJ Steindel, MG Rossmann, 1975. Lactate dehydrogenase, In "The Enzyme, Vol. XI, Ed. P.D. Boyer". Academic Press Inc., N.Y. pp. 191-292
- Hsu L, 1985. Neurite-promoting effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on chick embryo neurons. *Neurosci. Lett.* 62(2), 283-289
- Joo CN, JH Han, 1976. The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. *Korean Biochem. J.* 9, 43-51
- Karfunkel P, 1974. The mechanism of neural tube formation. *Int. Rev. Cyto.* 38, 245-270
- Kerper LE, N Ballatori, TW Clarkson, 1992. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am. J. Physiol.* 262(5), 761-765
- Kim WC, HC Park, BH Lee, WG Lee, CB Lee, HS Lee, YH Cheung, WB Cho, Z Cho, DS

- Han, 1997. Vertebrate Anatomy. Cheung moon gak. pp. 62-66
- Kim WJ, YK Deung, RS Choe, 1988. Effects of malathion on the development of the chick embryo cerebrum. *Korean J. Zool.* 31(3), 191-206
- Kivatinitz SC, MA Pelsman, AC Alonso, L Bagatolli, S Quiroga, 1997. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J. Neurochem.* 69(5), 2102-2114
- Koh KS, CO Shin, CK Yoo, RS Choe, 1988. A cytochemical study on the acid phosphatase of neurons of developing chick embryo brain. *Korean J. Electron Microscopy.* 18(2), 119-131
- Lammi UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-685
- Larkfors L, A Oskarsson, J Sundberg, T Ebendal, 1991. Methylmercury induced alterations in the nerve growth factor level in the developing brain. *Brain-Res-Dev-brain-Res.* 62(2), 287-291
- Mancini L, M Bertossi, L Roncali, 1985. Differentiation of cerebellar Purkinje neurons of the normal and chronically hypoxic chick embryo. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 61(1), 79-85
- McMillian V, SB Simpson, 1978. Proliferative and degenerative events in the early development of chick dorsal root ganglia. I. Normal development. *J. Comp. Neurol.* 182, 727-740
- Palen K, L Thomerby, 1981. Effects of L-phenylalanine on somite formation in the early chick embryos. *J. embryol. Exp. Morph.* 161, 175-190
- Pasko R, 1972. Mode of cell migration to the superficial layer of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61-84
- Procter NH, AD Moscioni, JE Casida, 1976. Chicken embryo NAD levels lowered by teratogenic organophosphorus and methylcarbamate insecticides. *Biochem. Pharmacol.* 25, 757-762
- Saunders JW, 1966. Death in embryonic systems. *Science.* 154, 604-612
- Srivastava N, J Grove, A Vernadakis, 1995. Astrocyte differentiation is enhanced in chick embryos treated with ethanol during early neuroembryogenesis. *Neurochem. Res.* 20(9), 985-989
- Wulff K, 1983. In methods of enzymatic analysis, 3rd ed. i C, Verlag Chem Weinheim 1, 351-355



### FIGURE LEGENDS

- Fig. 2.** Light micrographs of chick embryo incubated for 7 days. CH, cerebral hemisphere; LV, lateral ventricle; TV, third ventricle.  $\times 13$ .
- Fig. 3.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of chick embryo incubated for 7 days. Neurons contain oval-shaped nucleus (N) with a prominent nucleolus (No). A lot of free ribosomes (R) are evenly scattered in the cytoplasm. Some vesicles (arrow) are gathered in the upper side of the nucleus. M, mitochondria.
- Fig. 4.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of chick embryo incubated for 7 days. Oval-shaped mitochondria (M) and Golgi complex (G) are observed. Chr, heterochromatin; N, nucleus; R, ribosome.
- Fig. 5.** Light micrograph of the brain of chick embryo incubated for 8 days. CH, cerebral hemisphere; CP, choroid plexus.  $\times 13$ .
- Fig. 6.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of chick embryo incubated for 8 days. Neurons contains a nucleus (N) with two prominent nucleoli. A number of mitochondria and polysomes (P) are observed. G, Golgi complex; Nt, Neurotubules; RER, rough endoplasmic reticulum.
- Fig. 7.** Electron micrograph of neurons in the cerebral cortex of chick embryo incubated for 8 days. A number of mitochondria (M) and rough endoplasmic reticulum (RER) are observed. No, nucleolus; M, mitochondria; RER, rough endoplasmic reticulum.

