

모체열충격이 Hsp70 KO 생쥐의 입천장 중간엽 발생에 미치는 영향

오 정 근, 김 원 규¹

한양대학교 의과대학 성형외과학교실, ¹해부세포생물학교실

간추림 : 모체의 고열은 실험동물 및 사람에서 중추신경계를 포함한 다양한 형태의 선천성기형을 유발하는 것으로 알려져 있고 입천장갈림증을 유발한다는 여러 실험 및 임상보고가 있다. 그러나 그 기전에 대해 명확히 밝혀진 것은 부족하다. 또한 세포가 고열에 노출되면 방어기전으로 열충격단백질을 합성, 분비한다. Hsp70은 열충격단백질의 한 종류로서 정자발생과 같은 정상발생과정뿐만 아니라 고열과 같은 스트레스에 의한 세포자멸사를 억제하는 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 유전자 조작법으로 Hsp70이 결손된 임신한 생쥐를 고열에 노출한 후 입천장돌기 중간엽의 세포바깥바탕질에서 발현되는 fibronectin, TGF- β 2 및 FGF-8 면역조직화학염색을 시행하여 모체 고열에 의한 발현양상의 변화를 관찰하고자 하였다.

실험군으로는 고열에 노출된 Hsp70 KO 생쥐 태아를, 대조군으로 고열에 노출되지 않은 Hsp70 WT 생쥐 태아를 사용하였다. 실험군은 임신 제 8.5일에 43°C 수조에서 5분간 열충격을 주었고, 대조군에는 아무런 조작도 가하지 않았다. 임신 제 13.5, 14.5 및 15.5일에 모체를 희생하여 자궁내의 태아를 적출한 후 머리를 절취하였다. 일부 표본은 아래턱과 혀를 제거한 후 외형관찰을 하였으며, 나머지 표본은 면역조직화학염색을 시행하였다.

실험군 태아에서는 입천장갈림증이 형성되어 있었다. 면역조직화학염색소견상 실험군의 경우 TGF- β 2는 대조군에 비하여 발현이 지연되었고, 태령 제 15.5일에서는 내첨단부 하방의 중간엽에서 강한 반응을 보였으며 내첨단부 상피세포에서 양성반응을 지속적으로 보였다. FGF-8은 중간엽과 상피에서 반응을 나타내었으며, 태령 제 15.5일에서 실험군은 중간엽세포와 상피세포에서 강한 양성반응을 나타내었다. Fibronectin은 태령 제 15.5일 실험군에서 중간엽전반에 걸쳐 강한 양성반응을 보였으며, 바닷막을 따라 강하게 반응을 보였다.

이상의 결과를 종합하면 모체고열은 입천장돌기 중간엽에서 TGF- β 2 및 FGF-8의 지속적인 발현과 fibronectin의 지연발현을 유발하여 입천장의 정상적인 발생과정에 영향을 미쳐 입천장갈림증을 유발하는 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 모체고열, 입천장발생, fibronectin, TGF- β 2 및 FGF-8 면역조직화학적 연구

서 론

입천장갈림증(cleft palate)은 얼굴에 나타나는 선천성 기형 중 가장 흔한 질환의 하나이며 얼굴뼈의 발육이나 언어장애 등을 동반하여 환자 본인뿐만 아니라 가족들의 사회적 또는 심리적인 위축 등 여러 가지 문제를 야기하고 있다. 입천장갈림증의 발

생기전은 여러 학자들의 연구를 통해 그 원인과 기전이 많이 알려져 있지만 대부분 유전적, 환경적 요인이 복합적으로 작용하는 다양한 인자에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 입천장은 발생학적으로 앞니구멍(incisive foramen) 전방 부위의 일차입천장이 먼저 형성되고 이후 양측의 위턱용기에서 입천장돌기가 발생하여 이차입천장이 형성된다. 양측의 입천장돌기는 최초에는 혀 옆에서 발생하고 이후 혀 위로 상승한 후 서로 융합하여 완전한 입천장을

교신저자: 김원규(한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실)
전자우편: kimwg@hanyang.ac.kr

형성하게 된다. 이러한 입천장의 발생과정에서 입천장돌기의 상승과 융합이 정상적인 입천장발생의 핵심적인 과정이다. 입천장돌기의 상승은 입천장돌기 내 중간엽세포의 성장 및 분화가 중요한 역할을 수행하며, 입천장돌기간의 융합에는 입천장돌기상피가 중요한 인자로 작용한다.

입천장돌기의 상승에는 세포바깥바탕질이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. Hyaluronic acid (Ferguson 1988), glycosaminoglycans (Singh 등 1994), type-III collagen, fibronectin 및 hyaluronate (Morris-Wiman과 Brinkley 1992), transforming growth factor (TGF) (Fitzpatrick 등 1990), fibronectin 및 type-I collagen (Amasaki 등 1991)과 tenascin-C, fibronectin, laminin 및 type-IV collagen (Singh 등 1998) 등이 대표적이다. 이 중 fibronectin은 collagen이나 proteoglycan과 같은 바탕질단백에 세포를 부착하는 기능을 갖고 있으며, 세포이동에 관여하는 것으로 알려져 있다. 발생과정 중 중배엽세포는 fibronectin 표면을 따라 이동하며, fibronectin이 제거된 상태에서는 세포의 이동이 이루어지지 않는 것으로 보고된 바 있다 (Linask와 Lash 1988). TGF- β 2는 입천장돌기 상피세포와 중간엽에서 발현되며, 입천장발생이 진행되면서 정상적으로 발현이 감소하므로 입천장갈림증의 경우 지속적으로 발현되는 것이 특징이다 (Jaskoll 등 1996). FGF-8 역시 입천장돌기 상피세포와 중간엽에서 발현된다. FGF-8은 상피세포, 중배엽세포 및 신경외배엽 기원세포의 증식과 분화를 담당하며, 생쥐에서는 22개의 아형이 있다고 알려져 있으며 (Powers 등 2000, Ornitz와 Itoh 2001), 창자배형성 (gastrulation), 얼굴, 팔다리 및 중추신경계의 발생에 필수적인 단백질이다 (Vogel 등 1996, Sun 등 1999, Tucker 등 1999). 조류에서 일차 입천장의 발생이 진행됨에 따라 FGF-8은 정상적으로 발현이 감소되지만 입천장갈림증이 있는 경우 지속적으로 발현된다 (MacDonald 등 2004).

고열이란 정상중심체온 (normal core body temperature)보다 적어도 1.5°C 이상 체온이 높아지는 것으로 정의할 수 있다. 모체의 고열은 현재 실험동물의 선천성 기형, 특히 중추신경계의 기형을 유발

하는 물질로 입증되어 있으며, 사람에서도 기형유발 인자의 하나로 인정되고 있다. 실험동물 및 사람에서 모체의 고열은 중추신경계 기형 (Edwards 1967, 1968, Miller 등 1978), 입천장갈림증 및 얼굴형성부전 (Pleet 등 1981), 팔다리결손, 몸통뼈대기형 (Hendrickx 등 1979)과 같은 다양한 선천성 기형을 유발하는 것으로 알려져 있다. Martinez-Frias 등 (2001)은 사람에서 나타나는 산모고열에 의한 여러 선천성기형-소하악증 (micrognathia), 외이기형, 심장결손, 요도하열, 위장관결손, 입술갈림증 및 입천장갈림증, 복벽결손, 가로막탈출증, Hirschsprung disease, Mobius syndrome, oromandibular limb hypogenesis spectrum과 자연유산-을 보고하였다. 모체 고열이 입천장갈림증을 유발한다는 이상 여러 학자들의 실험 및 임상 보고가 많이 있지만 그 명확한 기전은 아직 밝혀진 것이 부족한 실정이다.

모체의 고열이 독성으로 작용한다는 것은 이상의 여러 보고에서와 같이 이미 입증되어 있으나 고열 노출에 대한 방어기전 (defense mechanism)은 잘 알려져 있지 않다. 세포는 고열과 같은 스트레스에 노출되는 경우 열충격단백질 (heat shock protein: Hsp)을 생성한다. Zimmerman과 Cohill (1991)은 스트레스에 노출된 진행세포에서 열충격단백질의 일종인 Hsp70이 생성됨을 보고하였고, Feder 등 (1996)은 Hsp70 gene copy의 수가 증가한 *D. melanogaster* 유충은 스트레스에 대한 방어 기전이 향상되며, Heads 등 (1994)은 Hsp70 유전자를 세포에 transfection 하면 열충격에 더욱 저항한다고 하였다. 따라서 Hsp70 단백질은 열충격에 대한 방어기전으로서 역할을 수행한다.

따라서 Hsp70 유전자가 결손된 임신한 Hsp70 KO 생쥐에 열충격을 가하면 열에 보다 민감하게 반응하여 입천장의 정상발생과정에 영향을 미칠 것으로 판단하였다. 이에 입천장의 발생과정 중 입천장돌기 상승에 중요한 역할을 하는 입천장돌기 중간엽의 세포바깥바탕질에서 발현되는 fibronectin, TGF- β 2 및 FGF-8을 면역조직화학염색법으로 관찰하여 모체 고열에 의한 입천장갈림증 형성 기전을 알아보 고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 열충격단백질의 한 종류인 Hsp70을 유전자조작법으로 결손시킨 C57/BL6계 생쥐 (Hsp70 Knock-out; Hsp70 KO)와 정상 C57/BL6 생쥐 (Hsp70 Wild type; Hsp70 WT)의 태아를 사용하였다. Hsp70 KO 및 Hsp WT 생쥐는 미국 Texas주 A&M 대학교 Mirkes 교수에게 기증받았다. 대조군으로는 Hsp70 WT 태아를, 실험군으로는 열충격을 받은 Hsp70 KO 태아를 사용하였고 임신 제 13.5, 14.5 및 15.5일 태아를 각 군당 10~15마리씩 배당하였다.

2. 모체열충격법

임수 생쥐를 저녁에 3:1의 비율로 합사시키고, 다음날 아침 vaginal plug이 확인되면 임신 제 0.5일로 정하였다. 임신이 확인된 날로부터 제 8.5일에 모체열충격을 시행하였다. 모체를 구멍이 뚫린 50 mL Falcon tube에 넣고, 43°C의 수조에 담근다. 2개의 탐침 (probe)이 장착된 디지털 체온계를 이용하여 하나는 모체의 직장에 삽입하고, 다른 하나는 수조에 담가 열충격 동안 모체의 체온변화를 기록하였다. 열충격 동안 수조의 온도를 43°C로 일정하게 유지하면서 모체의 체온이 43°C에 도달하면 5분간 유지하였다. 열충격을 가한 후 저체온증을 방지하기 위하여 체온이 정상으로 회복될 때까지 38°C의 부양기내에 두었다.

3. 태아적출

임신 제 13.5, 14.5 및 15.5일에 경추탈골법으로 모체를 희생시킨 후 자궁을 절제하고 Hank 용액내에서 태아를 적출하였다. 태아의 머리를 절취하여 아래턱 및 허를 제거하여 입천장을 노출시키고 디지털카메라(Nikon D100)를 이용하여 촬영하였다.

4. Hematoxylin 및 eosin 염색

절취한 머리 중 일부는 면역조직화학염색을 시행

하기 전 적정 부위를 확인하고 일반적인 입천장발생 과정을 관찰하기 위하여 10% 중성 formalin에 고정 한 후 일반적인 조직표본제작법에 따라 조직표본을 제작한 후 Hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

5. 면역조직화학염색법

TGF- β 2와 FGF-8은 3% horse serum으로 37°C에서 50분간 배양한 후 PBS로 세척하였다. 일차항체로 각각 monoclonal anti-TGF- β 2 antibody (R&D system, USA)와 monoclonal anti-FGF-8 antibody (R & D system, USA)를 사용하였다. 일차항체를 3% horse serum이 포함된 PBS에 1:30으로 희석하여 37°C에서 2시간동안 반응시켰으며, PBS로 세척한 후 이차항체 (biotinylated Ab, Vector)에 30분간 실온에서 반응시키고, avidin biotin peroxidase complex (Vectstain ABC kits, Vector Co.)를 1시간동안 반응시킨 후 발색을 위한 바탕질로 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)에 100 mL의 3.0% H₂O₂를 첨가하여 5분동안 발색시키고 methyl green으로 3분간 대조염색하였다.

Fibronectin은 3% donkey serum으로 37°C에서 50분간 배양한 후 PBS로 세척하였다. 일차항체 (monoclonal anti-fibronectin antibody, Sigma, USA)를 3% donkey serum이 포함된 PBS에 1:200으로 희석하여 37°C 배양기에서 2시간동안 배양하였다. PBS로 세척한 후 이차항체 (biotinylated Ab, Vector)에 30분간 실온에서 반응시키고, avidin biotin peroxidase complex (Vectstain ABC kits, Vector Co.)를 1시간동안 반응시킨 후 발색을 위한 바탕질로 0.05% DAB에 100 μ L의 3.0% H₂O₂를 첨가하여 5분동안 발색시키고 methyl green으로 3분간 대조염색하였다.

결 과

1. 외형관찰 및 H-E 염색소견

태령 제 13.5일 태아에서는 대조군과 실험군 모두에서 입천장돌기가 위턱용기에서 발생하고 있었고, 양측의 입천장돌기는 서로 떨어져 있었다(Fig. 1A,

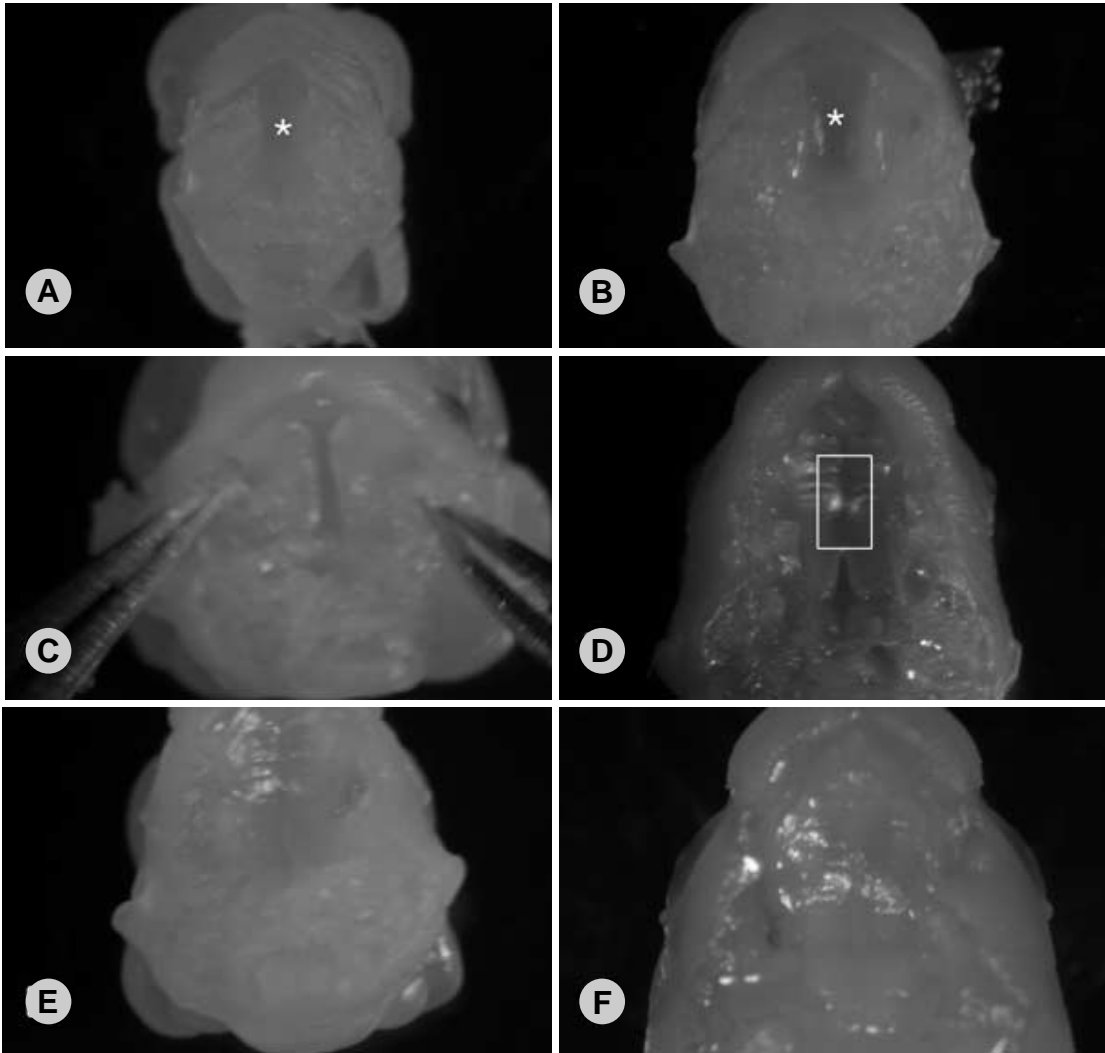


Fig. 1. External appearance of the developing palate of the experimental (A, C, E) and the control (B, D, F) groups. A, B : Control and experimental fetuses at gestational day 13.5 (E13.5) show cleft palate (CP) (asterisk). C : Cleft palate in the experimental fetus at E14.5. D : Fused palatine processes in the midline of the control group at E14.5. E : Shallow cleft palate is shown in the experimental group at E15.5. F : Completely fused palatine processes in the control group at E15.5.

B). H-E 염색소견상 양측의 입천장돌기는 혀를 향하여 비스듬히 돌출되어 있었다 (Fig. 2A, B). 태령제 14.5일 실험군 태아에서는 양측의 입천장돌기가 서로 떨어져 있었으나 (Fig. 1C), 대조군에서는 정중선상에서 서로 만나 있었다 (Fig. 1D). H-E 염색소견상 실험군에서는 양측의 입천장돌기가 혀 상부로

상승되어 있었으나 서로 융합하지 않아 입안과 코안이 넓게 서로 교통하고 있었다 (Fig. 2C). 대조군 태아에서는 양측의 입천장돌기가 서로 융합하여 정중융합선 (midline seam)이 관찰되었다 (Fig. 2D). 태령제 15.5일 실험군에서는 양측의 입천장돌기가 서로 떨어져 입천장갈림증을 보이고 있었다 (Fig.

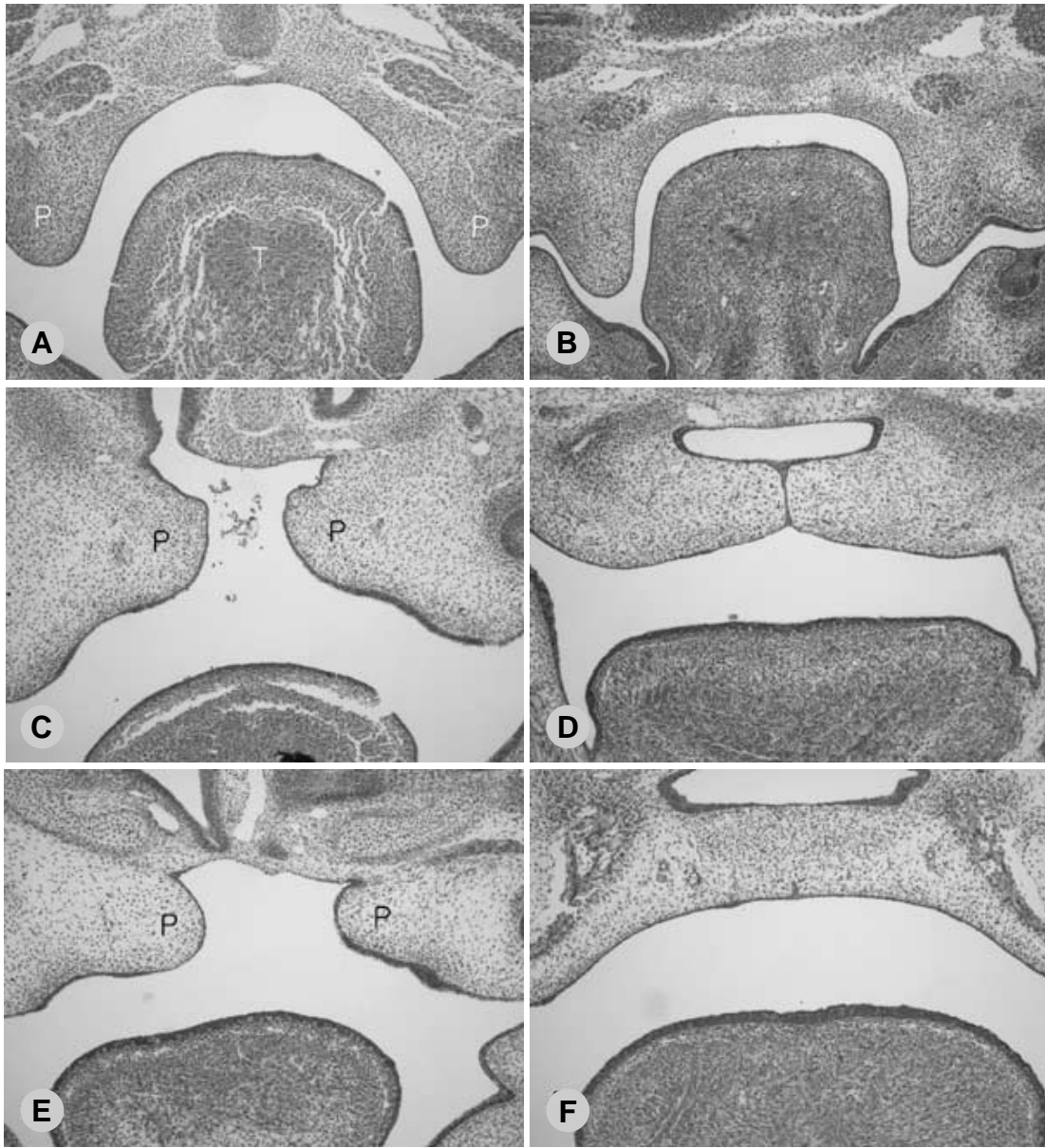


Fig. 2. Histological findings of the developing palate of the experimental (A, C, E) and the control (B, D, F) groups. A, B : Palatine processes (P) toward the tongue (T) are developed from the maxillary prominence at E13.5. C : Both palatine processes are separated from each other at E14.5. D : Both palatine processes are fused along the midline at E14.5. E : Cleft palate at E15.5. F : Most of the midline fused palatine epithelium is disappeared at E15.5.

1E). H-E 염색소견상 양측의 입천장돌기는 중간엽으로 구성되어 있었으며, 입안과 코안이 교통하고

있는 입천장갈림증 소견을 나타내었다 (Fig. 2E). 대조군 태아에서 양측의 입천장돌기는 서로 융합해

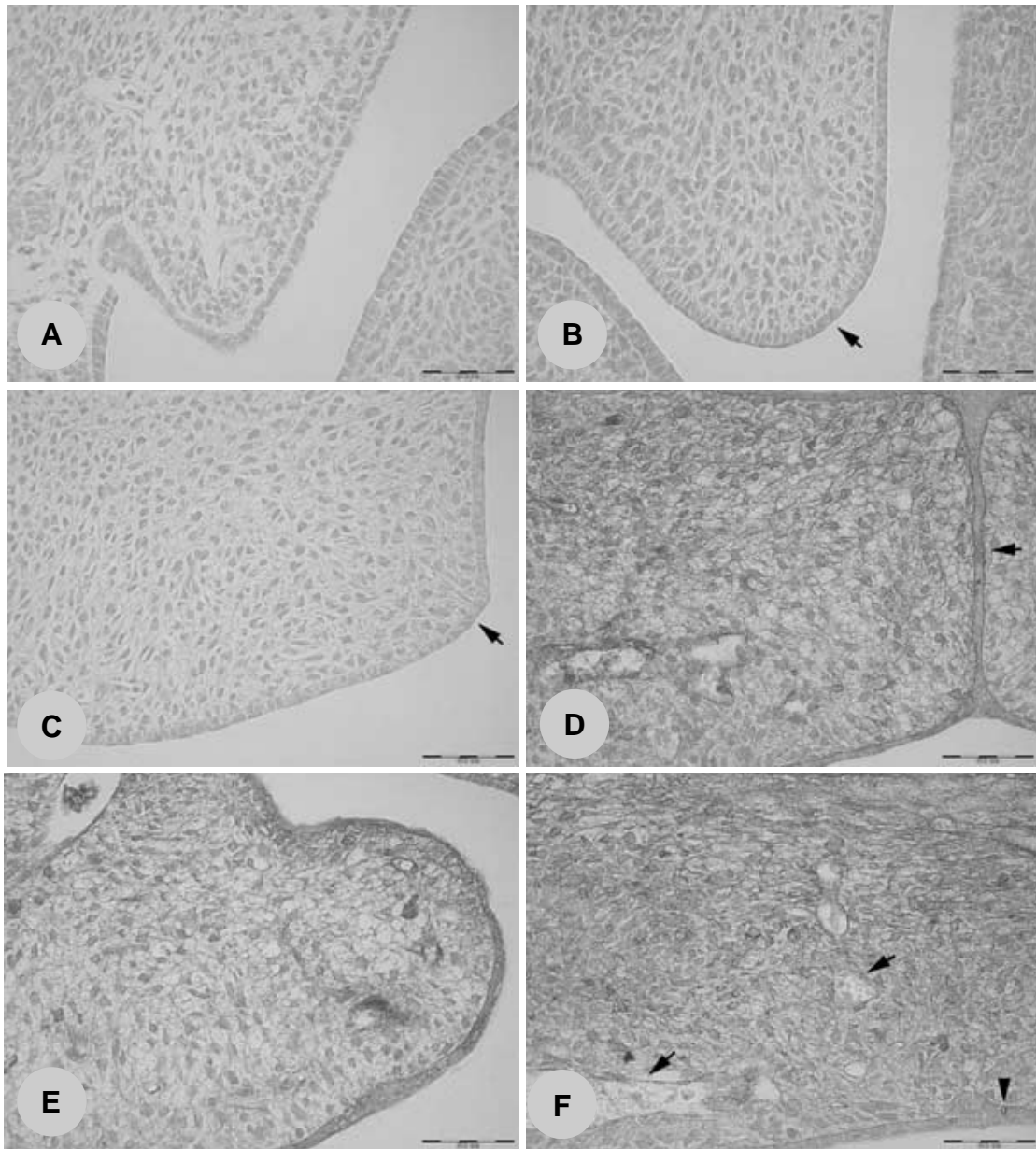


Fig. 3. TGF- β 2 immunohistochemistry findings. A, C and E are the experimental palate at E13.5, E14.5 and E15.5, respectively. Developing palate at E13.5 (B), E14.5 (D) and E15.5 (F) are arranged in the right column. A : TGF- β 2 is not revealed positive reaction. B : Slightly positive reaction is shown through the mesenchyma. Arrow indicates positively reacted superficial epithelial cells. C : TGF- β 2 immunoreactivity is slightly increased than at E13.5 Arrow shows positively reacted epithelial cells. D : Immunoreaction in the mesenchyme is markedly increased, and revealed through the basal lamina in the fused midline seam (arrow). E : TGF- β 2 immunoreactivity under the medial edge epithelium (MEE) and some epithelial cells show strong positive reaction. F : TGF- β 2 is revealed strongly around the mesenchymal condensation. Arrow indicates immunoreactivity of vascular endothelial cell is decreased than at E14.5. A few epithelial cells show positive reaction.

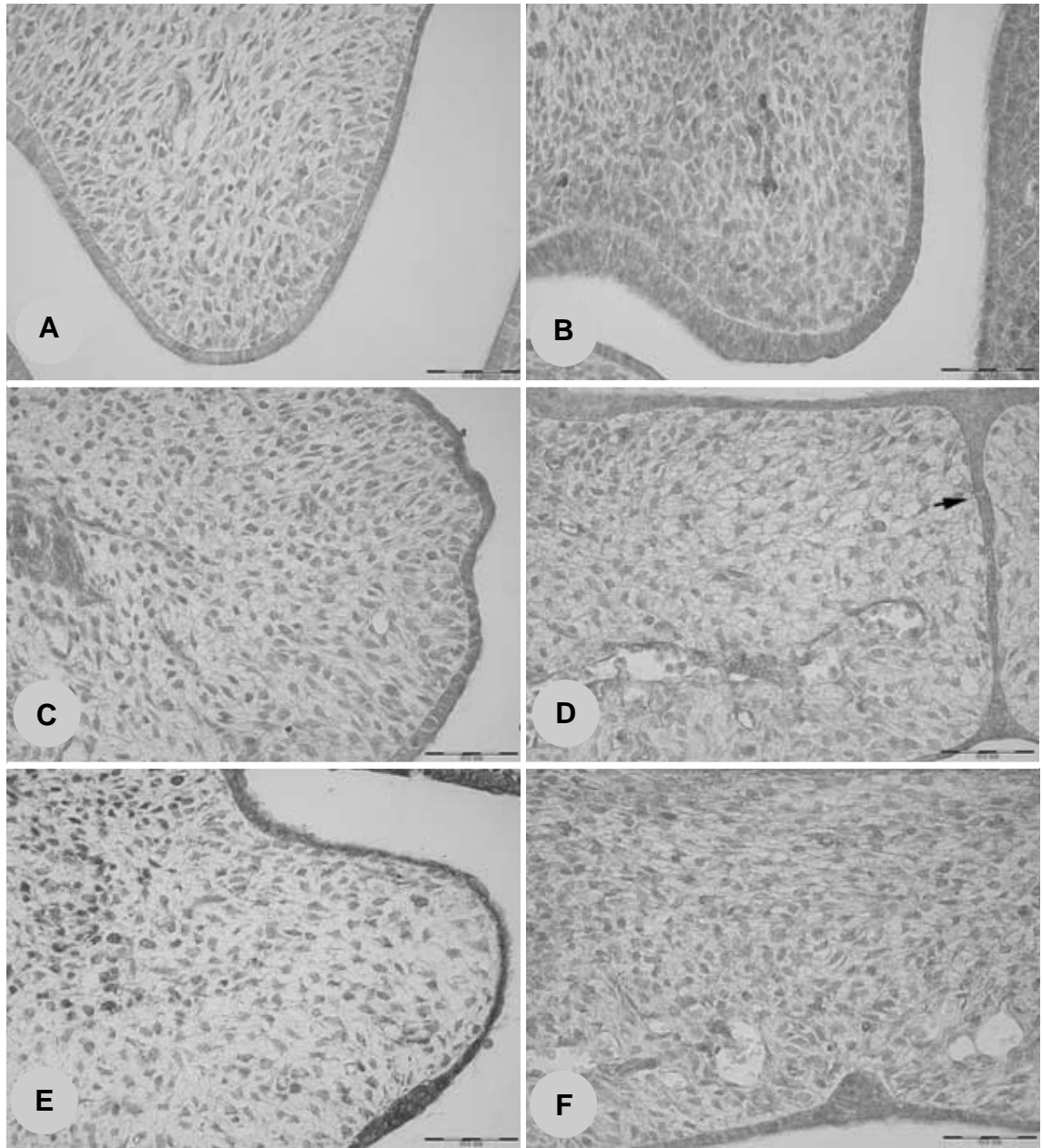


Fig. 4. FGF-8 immunohistochemistry findings. A, C and E are the experimental palate at E13.5, E14.5 and E15.5, respectively. Developing palate at E13.5 (B), E14.5 (D) and E15.5 (F) are arranged in the right column. FGF-8 immunoreactivity in the palatine mesenchyme is peaked at E14.5 (C). At E15.5 most of mesenchymal cells and epithelial cells reveal strongly positive reactivity. B : FGF-8 is expressed weakly throughout the mesenchyme. D : Positive reactivity is increased and strongly revealed in the basal lamina of the midline fused seam at E14.5 (arrow). FGF-8 positive epithelial cells are mainly located in the oral epithelium (D, F).

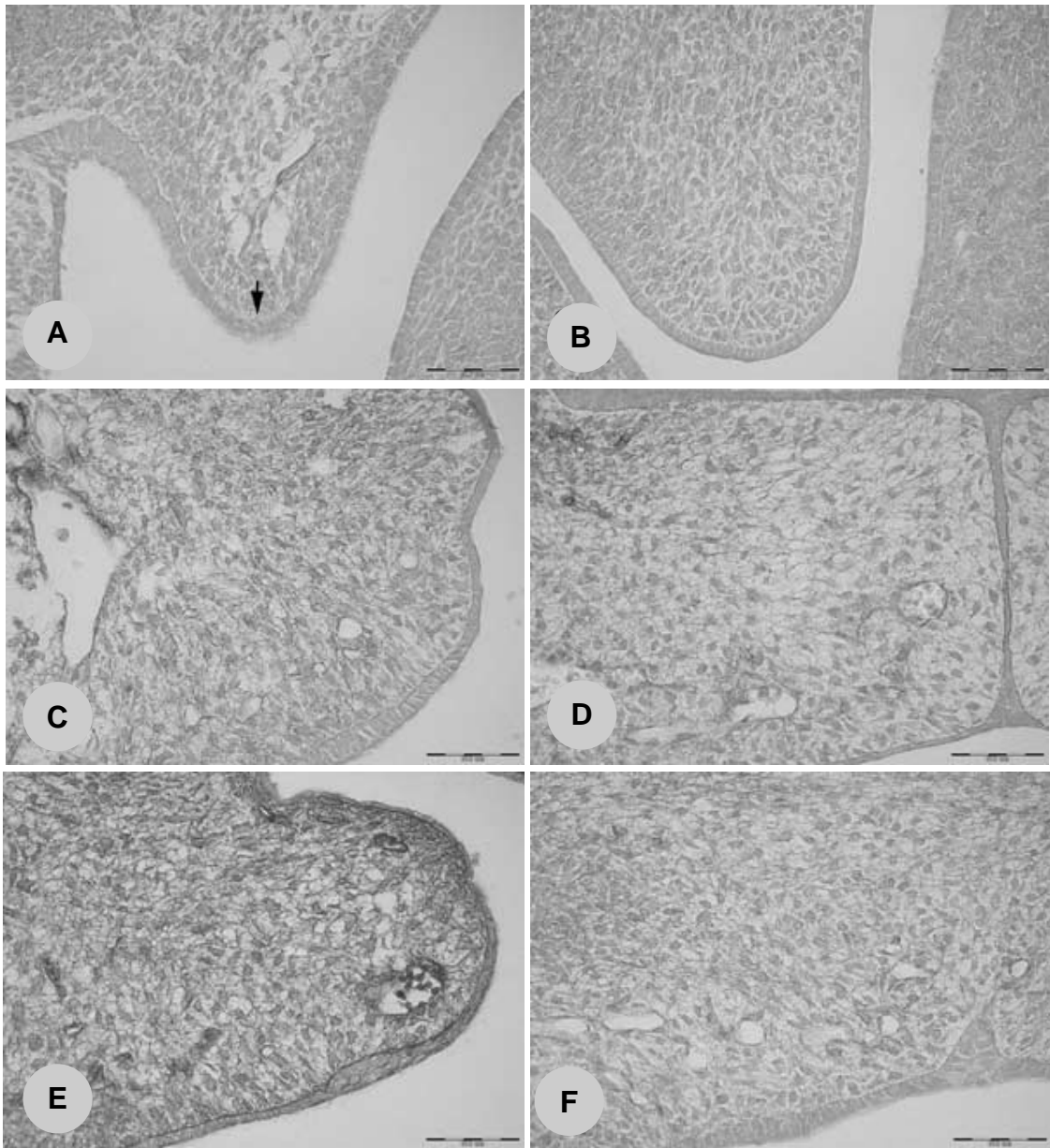


Fig. 5. Fibronectin immunohistochemistry findings. A : Fibronectin begins to reveal in the basal lamina of the MEE. Fibronectin immunoreactivity in the basal lamina is gradually increased with time (C, E). Fibronectin is evenly expressed in the mesenchyme (B, D, F).

있었고, 입천장에서 주름 (palatal rugae)이 관찰되었다 (Fig. 1F). H-E 염색소견상 태령 14.5일에 관찰되

던 정중 봉합선은 소실되어 있었고, 중간엽으로 구성된 입천장에서는 연골화를 위한 중간엽농축이 관

찰되었다(Fig. 2F).

2. TGF- β 2 면역염색소견

태령 제 13.5일 실험군에서 입천장돌기 중간엽 바탕질과 상피에서 TGF- β 2는 거의 반응을 나타내지 않았으나(Fig. 3A), 대조군 중간엽에서는 실험군에 비하여 강하게 반응하였고, 내첨단부 상피세포의 침부에서는 선상의 약한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 3B). 태령 제 14.5일 실험군 입천장돌기 중간엽 바탕질에서 TGF- β 2는 미약한 양성반응을 보였고 내첨단부에 인접한 입안부분 상피세포의 극히 일부에서 미약한 양성반응을 나타내었다(Fig. 3C). 대조군 중간엽에서는 혈관내피세포에서 강한 양성반응을 보였으며, 입안부분보다 코안부분에서 보다 강한 반응을 나타내었고, 정중융합선상의 일부 상피세포에서 양성반응을 보였다(Fig. 3D). 태령 제 15.5일 실험군 입천장돌기 중간엽 바탕질에서 TGF- β 2는 태령 제 14.5일에 비해 강한 양성반응을 보였으며 내첨단부 직하방의 바탕질에서는 강한 양성반응을 나타내었고, 내첨단부 상피세포에서도 강한 양성반응을 보이는 세포가 다수 관찰되었다(Fig. 3E). 대조군에서는 입천장 중간엽내 혈관 내피세포에서 반응도가 태령 제 14.5일에 비하여 다소 감소하였고, 입안 하방에서는 바탕질 전반에 걸쳐 반응도가 감소한 소견을 나타내었으며, 입안상피의 일부 세포에서 양성반응을 보였다(Fig. 3F).

3. FGF-8 면역염색소견

태령 제 13.5일 실험군 입천장 중간엽에서 FGF-8은 혈관내피세포에서 강한 양성반응을 보였고, 바탕질에서는 미약한 양성반응을 보였으며, 입천장돌기 상피세포에서는 입안부분, 내첨단부 및 코안부분에서 양성반응을 나타내는 세포가 관찰되었다(Fig. 4A). 대조군에서는 입천장 중간엽 바탕질 전반에 걸쳐 실험군에 비해 보다 강한 반응을 보였고, 상피의 바닥막을 따라 약한 양성반응을 나타내었으며, 입천장돌기 상피에서는 대부분의 표층세포와 일부 기저층 세포에서 양성반응을 보였다(Fig. 4B). 태령 제 14.5일 실험군 입천장 중간엽 바탕질에서 FGF-8은

태령 제 13.5일보다 강한 반응을 나타내었고, 혈관내피세포에서 강한 양성반응을 보였으며, 대부분의 입천장돌기 상피세포에서 양성반응을 나타내었다(Fig. 4C). 대조군에서는 중간엽내 혈관내피세포에서는 강한 양성반응을 보였으며, 중간엽 바탕질 전반에 걸쳐 양성반응을 나타내었고, 정중융합선 바닥막에서 뚜렷한 양성반응을 보였다(Fig. 4D). 태령 제 15.5일 실험군 입천장 중간엽 바탕질에서는 미약한 양성반응을 보였으나 중간엽세포와 입천장돌기 상피세포에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 4E). 대조군 입천장 중간엽내 혈관내피세포는 태령 제 14.5일에 비하여 반응도가 감소하였으며, 바탕질과 입안상피세포는 태령 제 14.5일군과 대동소이한 양성반응을 나타내었다(Fig. 4F).

4. Fibronectin 면역염색소견

태령 제 13.5일 실험군 입천장 중간엽 바탕질에서 fibronectin은 미약한 양성반응을 보였고 내첨단부 바닥막에서는 음성반응을 나타내었다(Fig. 5A). 대조군에서는 바탕질 전반에 걸쳐 실험군에 비하여 다소 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 5B). 태령 제 14.4일 실험군 입천장 중간엽에서는 바탕질 전반에 걸쳐 양성반응을 보였으며, 바닥막에서는 미약한 양성반응을 나타내었다(Fig. 5C). 대조군 입천장 중간엽에서는 전반에 걸쳐 양성반응을 보였으며, 융합된 정중융합선 상피 바닥막에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 5D). 태령 제 15.5일 실험군 입천장 중간엽 바탕질에서 fibronectin은 태령 제 14.5일 실험군에 비하여 강한 양성반응을 보였고, 내첨단상피 및 입천장상피 바닥막에서도 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 5E). 대조군 입천장 중간엽 바탕질에서 fibronectin은 태령 제 14.5일 대조군에 비하여 중간엽농축이 일어나는 중앙부에서 다소 강한 반응을 보였다(Fig. 5F).

고 찰

모체의 고열은 모든 실험동물에서 선천성기형을 유발하는 기형유발물질이며, 사람에서도 그 가능성

이 높게 제기되고 있고(Edwards 등 1995), 현재에는 여러 역학조사에 의하면 기형유발물질의 하나로 인정되고 있다(Martinez-Frias 등 2001). 임신초기에 사우나, 열탕 및 열성질환에 의하여 선천성기형이 유발될 수 있으며, 고온에서 운동을 하는 경우에도 태아의 선천성기형이 유발된다(Sasaki 등 1995). 사람의 경우 소하악증, 외이기형, 심장결손, 요도하열, 위장관결손, 입술갈림증 및 입천장갈림증, 복벽결손, 가로막탈출증, Hirschsprung disease, Mobius syndrome, oromandibular limb hypogenesis spectrum과 자연유산 등의 선천성기형이 보고되었다(Martinez-Frias 등 2001).

고열에 의한 세포사망은 세포계획사(programmed cell death)와 유사한 과정을 거치게 되고 결과적으로 비정상적인 발생과정을 유발하게 되어 선천성기형을 일으키게 된다. Breen 등(1999)은 고온에 노출된 태령 제 10일 흰쥐의 태아 조직에서 TUNEL 양성세포가 증가하고, 세포분열은 현저히 감소한다고 보고하였다. Mirkes 및 Little(2000)은 태령 제 9일 생쥐 태아를 배양하면서 고열에 노출 시킨 결과 전 뇌세포의 사립체에서 cytochrome c의 방출, caspase-3의 활성화, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 cleavage 및 DNA 분절화를 관찰하고 이러한 소견이 고열에 의한 세포자멸사(apoptosis)의 특징이라고 하였다. Mirkes(2002)는 고열은 cytochrome c의 방출, procaspase-9의 활성화 및 effector caspase의 활성을 유도하는 mitochondrial apoptotic pathway를 통하여 세포사망을 일으킨다고 보고하였다.

고열이 세포에 독성으로 작용하는 기전은 많은 연구가 진행되어 왔지만 그 방어기전은 아직 명확하지 않다. 세포가 고열 혹은 다른 stress에 노출되면 방어기작으로 열충격유전자(heat shock gene)가 유도되고 열충격단백질을 합성하여 세포를 보호하게 된다(Lindquist 1986). De Maio(1995)에 의하면 열충격단백질(heat shock protein: Hsp)은 여러 가지 불리한 환경-온도상승, 아미노산 유사물에서의 배양, 유리산소기, 자외선방사, 중금속 및 ethanol에의 노출-에 반응하여 생성된다고 한다. 열충격단백질의 한 종류인 Hsp70은 정자발생과 같은 정상발생에 관여할 뿐만 아니라 고열과 같은 스트레스에 의해 유도

되는 chaperone으로서 항세포자멸(anti-apoptosis)의 기능을 갖고 있다(Christians 등 2003). Zimmerman과 Cohill(1991)은 진핵세포가 열충격과 같은 스트레스에 노출되면 생성된다고 하였고, Feder 등(1996)은 Hsp70 gene copy의 수가 증가한 *D. melanogaster* 유충은 스트레스에 대한 방어 기전이 향상된다고 하였으며, Heads 등(1994)은 Hsp70 유전자를 세포에 transfection 하면 열충격에 더욱 저항한다고 하였다. Theodorakis 등(1999)은 열충격내성세포(thermotolerant cell)는 열충격 이후 Hsp70 발현이 더욱 증가한다고 하였으며, Gabriel 등(2002)은 부양중인 계태에 44°C의 고열을 가하면 Hsp70 mRNA치가 15배 이상 증가한다고 하였다. 이상 여러 학자들의 보고를 종합하면 세포에 열충격이 가해지면 그 방어기전으로 Hsp70 단백질이 합성, 분비됨을 알 수 있다.

입천장갈림증은 얼굴에서 나타나는 선천성기형 중 가장 흔한 질환의 하나이며 신생아 1000명당 1명의 비율로 나타나고, 입술갈림증을 동반하는 경우에는 그 비율이 1:700으로 높아진다(Gorlin 등 2001). 입천장갈림증은 다른 증후군의 한 증상으로 나타나는 경우가 55%에 달하며(Jones 1988), 가족 중 입천장갈림증이 있는 경우 그 빈도는 더욱 증가하게 된다(Murray 2002). 입천장갈림증은 대부분 수술로써 그 치료가 가능하지만 수술후에도 얼굴뼈의 발육 이상과 언어장애 등을 동반하여 환자 본인의 사회적 또는 정신적 장애는 물론 가족들의 심리적인 위축 등의 문제를 야기하고 있다.

입천장은 위턱용기의 파생물(outgrowth)로 형성되어 혀의 양옆으로 성장하고 이후 혀 위로 상승하여 서로 정중선상에서 융합하게 된다. 생쥐의 경우는 vaginal plug이 관찰된 날을 0일로 하면 태령 제 14일에 혀 위로 상승하고 서로 융합하기 시작한다(Ferguson 1988). 본 실험에서도 태령 제 14.5일에 정중봉합선이 관찰되었으며, 태령 제 15.5일에는 입천장의 재성형이 진행되고 있었다. 입천장의 발생에는 입천장돌기 중간엽세포의 증식에 따른 성장이 필수적이며, 입천장돌기 상피세포간의 융합역시 중요한 인자로 작용한다. 이러한 발생과정은 세포의 이동, 증식, 세포자멸사 및 융합 등의 과정을 통해 일어나며, 이와 관련된 전사인자, 성장인자수용체, 세

포바깥바탕질의 구성요소 및 세포표면의 결합물질과 같은 여러 유전자에 변이가 있는 경우 입천장갈림증이 유발된다(Wilkie와 Morris-Kay 2001).

입천장돌기의 상승에 관하여 Ferguson (1988)은 입천장돌기 중간엽내 hyaluronic acid가 입천장돌기 상승 전에 많이 축적되고 이후 수화되면서 내재성 입천장돌기상승력이 발생하므로 입천장돌기가 상승한다고 하였다. 또한 Morris-Wiman과 Brinkley (1992)는 입천장이 상승할 때 hyaluronate가 팽창함을 보고하였고, Singh 등(1994)은 흰쥐의 입천장돌기내 중간엽에 분포하는 hyaluronan, heparan sulfate 및 chondroitin-4-sulphate를 추적한 결과 hyaluronan이 상승전에는 비율이 높고 입천장돌기가 상승 이후에는 감소하며, 다른 glycosaminoglycan은 변화가 없으므로 입천장돌기의 상승에는 hyaluronan이 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Zenk와 Stiler (1990)는 ³H thymidine을 이용하여 중간엽세포의 증식을 연구한 결과 입천장갈림증이 있는 경우 표지 지수 (labelling index)가 현저히 감소하므로 입천장돌기의 발생에는 중간엽세포의 증식이 매우 중요하다고 하였다. Zschabitz 등(1994)은 입천장발생과정 중 탄수화물 복합구조가 세포와 세포, 세포와 바탕질간의 상호작용을 조절하는데 중요한 역할을 할 것으로 제시하였다.

이러한 입천장돌기의 상승에 관여하는 glycosaminoglycan 외에 입천장돌기의 성장에 중요한 역할을 하는 여러 인자들이 있다. 이 중 TGF- β 는 포유류에서 발현되는 TGF- β 의 한 종류로서 (Roberts와 Sporn 1990), 상피-중간엽 상호작용, 세포성장, 세포바깥바탕질의 합성 및 조직 재성형(tissue remodeling)에 관여하여 머리와 목부분, 뼈대계통, 심장, 눈, 귀 및 비뇨생식계의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Sanford 등 1997, Bartram 등 2001). 세 종류의 TGF- β isoforms는 입천장돌기 상피세포와 중간엽에서 모두 발현되며, Kaartinen 등 (1995)에 의하면 TGF β 를 생성하지 못하면 입천장돌기간의 융합이 일어나지 않아 입천장갈림증이 유발된다고 하였다. 특히 입천장발생에서 TGF- β 의 역할에 대해 Fitzpatrick 등(1990)은 상승한 입천장돌기의 내첨단부 하방의 중간엽에서 발현되어 융합

한 이후에도 계속 발현된다고 하였다. 그러나 Jaskoll 등(1996)은 정상적인 입천장에서는 발생이 진행됨에 따라 TGF- β 2 mRNA의 발현이 현저히 감소하였지만, corticosteroid에 의해 입천장갈림증이 유발된 경우에는 TGF- β 2 mRNA 발현이 대조군에 비해 하루 늦게 지연발현(delayed expression)되는 것을 관찰하였다. Nugent 등(1988)은 입천장 중간엽 세포를 배양하면서 retinoic acid를 투여하면 TGF- β 2 mRNA의 발현이 증가하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 입천장갈림증의 경우 TGF- β 2 발현이 정상적으로 감소하지 않고 지속되는 것을 의미하므로 TGF- β 2는 입천장돌기 중간엽세포의 증식과 성장에 연관이 있음을 알 수 있다. 또한 Nugent 등(2002)은 TGF- β 2 heterozygous mice를 교배시키면 입천장갈림증을 동반하는 태아의 비율이 77%로 높아짐을 밝혀 TGF- β 2의 지연 혹은 지속적인 발현이 입천장갈림증과 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. 또한 Dunker와 Kreigstein (2002)은 TGF- β 2 KO 생쥐 태아에서 복벽과 같은 정중 융합이 일어나지 않는 것을 관찰하였고, Dunker 등(2002)은 TGF- β 2 KO 생쥐에서 발생중인 팔다리의 손발가락사이에서 TUNEL 양성세포가 현저히 감소한 바 TGF- β 2는 세포의 정상 발생과정의 일종인 세포자멸사를 억제한다고 하였다. 본 실험에서 실험군에서는 입천장돌기가 상승하기 시작한 태령 제 14.5일에서 약한 양성반응을 나타내었으나 태령 제 15.5일에서는 그 반응이 현저히 증가해 있었고, 특히 내첨단부 직하방의 중간엽과 상피세포에서도 강한 반응을 보였다. 대조군에서는 정중융합선이 관찰되는 태령 제 14.5일에서는 중간엽 바탕질 전반에 걸쳐 강한 양성반응을 보였으나, 융합선이 소실되고 입천장의 재성형이 시작되는 태령 제 15.5일에서는 중간엽농축이 관찰되는 부위에서는 강한 양성반응을 보였지만 나머지 입안 상피에 인접한 부위에서는 그 반응도가 감소하였다. 이러한 결과는 실험군의 경우 입천장돌기가 이미 상승하여 발생이 진행되었음에도 TGF- β 2는 지속적으로 발현되고 있음을 의미하며, 이는 앞에서 서술한 여러 학자들의 견해와 일치하는 것이라고 생각된다. 또한 대조군 태령 제 15.5일의 경우 강한 양성반응을 보이는 것은 입천장돌기의 성장이나 융

합과는 무관한 입천장의 재성형과정에 의한 것으로 판단된다.

FGF-8은 배자의 초기발생에 중요한 역할을 하며, 발생중인 생쥐의 여러 조직에서 발현되어 창자배형성, 얼굴, 팔다리 및 중추신경계의 발생에 필수적인 단백질이며, FGF-8이 없으면 창자배형성동안 세포의 이동이 되지 않으므로 배자가 생존할 수 없다 (Vogel 등 1996, Sun 등 1999, Tucker 등 1999). 얼굴의 발생과정 중 FGF-8은 위턱용기의 꼬리쪽 외배엽, 위턱용기와 아래턱용기사이 (Ohuchi 등 1994)와 발생중인 인두굽이 (pharyngeal arch)의 외배엽과 내배엽에서 발현된다 (Abu-Issa 등 2002). Trumpp 등 (1999)에 의하면 FGF-8은 첫째인두굽이에서 중간엽의 생존을 증진하여 둘째인두굽이의 형태발생을 유도한다고 하였다. Richman 등 (1997)은 얼굴용기 (facial prominences)를 피복하는 외배엽에서 FGF-8이 발현되어 얼굴용기로부터 파생물이 형성된다고 하였다. 한편 Schneider 등 (2001)은 FGF-8이 발현되지 않으면 세포계획사가 증가하고 이마코돌기 (frontonasal process)에서 세포증식이 감소한다고 하였으며, McDonald 등 (2004)은 계태 (chicken embryo)의 윗부리를 형성하는 일차입천장에서 입천장갈림증이 생긴 경우 FGF-8이 하향조절되지 않고 지속적으로 발현된다고 보고하였다. 본 실험에서 FGF-8은 중간엽바탕질의 경우 대조군에서 실험기간 전반에 걸쳐 실험군에 비해 강한 반응을 나타내었다. 입천장돌기 상피세포에서는 실험군의 경우 태령 제 13.5일에는 대조군에 비해 약한 반응을 보이다가 입천장돌기가 상승한 태령 제 14.5일에서는 반응도가 증가하였고, 태령 제 15.5일에서는 바탕질에서는 반응도가 현저히 감소하였으나 바탕질내 중간엽세포와 상피세포에서는 강한 양성반응을 보였다. 이러한 결과는 FGF-8이 입천장갈림증의 경우 정상적인 하향조절 대신 지속적으로 발현한다는 Macdonald 등 (2004)의 실험결과와 일치하는 것으로 생각된다.

Fibronectin은 아교질이나 proteoglycans 같은 바탕질에 세포를 부착하는 기능을 갖고 있으며, 발생과정에는 세포이동에 관여하여 중배엽세포의 이동은 fibronectin 표면을 따라 일어나고 fibronectin이

제거된 상태에서는 세포의 이동이 이루어지지 않는다고 알려져 있다. 이에 대해 Linask와 Lash (1988)는 심장의 초기 형성 중 fibronectin에 대한 항체를 투여하면 심장전구세포의 이동이 없어지면서 두 개의 가쪽심장관 (lateral endocardial tubes)이 형성되었다고 보고하였다. 또한 Georges-Labouesse 등 (1996)은 fibronectin이 결손된 생쥐의 태아는 중배엽의 분화가 일어나지 않기 때문에 태령 제 8.5일에 사망한다고 하였다. 따라서 fibronectin은 중배엽성 조직 혹은 장기의 발생에 필수적인 요소이다. Fibronectin은 발생중인 입천장에서 관찰된다. 이에 대해 Silver 등 (1981)은 생쥐의 입천장돌기 중간엽에서 fibronectin은 바닥막에 존재하며 연골형성이 시작되는 곳에서 강하게 발현된다고 하였다. Amasaki 등 (1991)은 소의 태아 입천장돌기 중간엽에서 fibronectin과 제1형 아교질이 발생 초기에는 중간엽 전반에 걸쳐 높은 밀도를 나타내다가 분화가 진행되면서 표피세포 하방에 재배열된다고 하였다. 그러나 Singh 등 (1998)은 면역조직화학염색소견상 fibronectin은 발생기간을 통해 균등하게 분포하고 있다고 하였다. 본 실험에서 fibronectin은 실험군과 대조군에서 발생초기부터 중간엽에서 발현되었고 실험군에서는 태령 제 14.5일에 보다 강하게 반응하기 시작하여 태령 제 15.5일에서는 바닥막을 따라 강하게 나타났고, 특히 내첨단부 직하방의 중간엽에서 강한 양성반응을 보였다. 대조군에서는 중간엽 바탕질 전반에 걸쳐 고르게 분포하고 있었으며 중간엽농축이 일어난 곳에서는 보다 강하게 반응하였다. 입천장갈림증이 유발된 중간엽에서 fibronectin이 보다 강하게 반응하는 것은 중간엽의 성장을 위한 보상적인 기전에 의한 것으로 추정된다. 그러나 이에 대한 보다 정밀한 연구를 해야 할 것으로 생각된다.

본 실험의 결과를 종합하면 열충격을 가하지 않은 대조군 생쥐태아는 태령 제 14.5일에 양측의 입천장돌기가 정중에서 서로 붙어 있었고, 조직학적으로 양측의 입천장돌기 상피가 융합되어 정중융합선이 관찰되었다. 태령 제 15.5일에서는 입천장에는 주름이 형성되어 있었으며, 조직학적으로 융합선이 소실되어 입천장이 재성형 (remodelling)되는 소견을 보였다. 실험군에서는 태령 제 14.5일 및 15.5일에

입천장갈림증이 형성되어 있었으며, 조직학적으로도 양측의 입천장돌기가 서로 분리되어 구강과 비강이 서로 교통하고 있었다. 따라서 모체 열충격은 입천장돌기내 중간엽의 정상적인 발생과정을 방해하여 입천장갈림증을 유발함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN : Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 129 : 4613-4625, 2002.
- Amasaki H, Matsumoto S, Takanosu M, Daigo M : Distribution of extracellular matrix and carbonic anhydrase III during bovine palatine ridge development. *J Vet Med Sci* 53 : 1031-1036, 1991.
- Bartram U, Molin DGM, Wisse LJ, Mohamad A, Sanford LP, Doetschman T, Speer CP, Poelmann RE, Gittenberger AC, de Groot AC : Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF- β 2 knockout mice. *Circulation* 5 : 2745-2752, 2001.
- Breen JG, Claggett TW, Kimmel GL, Kimmel CA : Heat shock during rat embryo development in vitro results in decreased mitosis and abundant cell death. *Reprod Toxicol* 13 : 31-39, 1999.
- Christians ES, Zhou Q, Renard J, Benjamin IJ : Heat shock proteins in mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 14 : 283-290, 2003.
- De Maio A : The heat shock response. *New Horiz* 3 : 198-207, 1995.
- Dunker N, Kriegelstein K : Tgf β 2 $-/-$ Tgf β 3 $-/-$ double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol* 206 : 73-83, 2002.
- Dunker N, Schmitt K, Kriegelstein K : TGF- β is required for programmed cell death in interdigital webs of the developing mouse limb. *Mech Dev* 113 : 111-120, 2002.
- Edwards MJ : Congenital defects in guinea-pigs following induced hyperthermia during gestation. *Arch Pathol* 84 : 42-48, 1967.
- Edwards MJ : Congenital defects in the rat following induced hyperthermia during gestation. *Teratology* 1 : 173-175, 1968.
- Edwards MJ, Shiota K, Smith MSR, Walsh DA : Hyperthermia and birth defects. *Reprod Toxicol* 9 : 411-425, 1995.
- Feder ME, Cartano NV, Milos L, Krebs RA, Lindquist SL : Effect of engineering Hsp70 copy number on Hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 100 : 1837-1844, 1996.
- Ferguson MWJ : Palatal development. *Development* 103 (Supple) : 41-60, 1988.
- Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ : differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109 : 585-595, 1990.
- Gabriel JE, da Mota AF, Boleli IC, et al : Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. *Growth Dev Aging* 66 : 27-33, 2002.
- Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO : Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev Dyn* 207 : 145-156, 1996.
- Gorlin RJ, Cohen MM Jr, Hennekam RCM : Syndromes of the head and neck. 4th ed. Oxford University Press. New York, New York, USA, pp. 850-853, 2001.
- Heads RJ, Latchman DS, Yellon DM : Stable high level expression of a transfected human hsp70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress. *J Mol Cell Cardiol* 26 : 695-699, 1994.
- Hendrickx AG, Stone GW, Hendrickson RV, Matayoshi K : Teratogenic effects of hyperthermia in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Teratology* 19 : 177-182, 1979.
- Jaskoll T, Choy HA, Melnick M : Developmental expression and CORT-regulation of TGF- β and EGF receptor mRNA during mouse palatal morphogenesis: correlation between CORT-induced cleft palate and TGF- β 2 mRNA expression. *Teratology* 54 : 34-44, 1996.
- Jones MC : Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *Cleft Palate J* 25 : 16-20, 1988.
- Kaartinen V, Voncken J, Shuler CF, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J : Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11 : 415-421, 1995.

- Linask KK, Lash JW : A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. I. Dose dependent effects of fibronectin antibody. *Dev Biol* 129 : 315-323, 1988.
- McDonald ME, Abbott UK, Richman JM : Upper beak truncation in chicken embryos with the cleft primary palate mutation is due to an epithelial defect in the frontonasal mass. *Dev Dyn* 230 : 335-349, 2004.
- Martinez-Frias ML, Mazario MLG, Caldas CF, Gallego MPC, Bermejo E, Rodriguez-Pinilla E : High maternal fever during gestation and severe congenital limb disruptions. *Am J Med Genet* 98 : 201-203, 2001.
- Miller P, Smith DW, Shepard TH : Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. *Lancet* I : 519-521, 1978.
- Mirkes PE : 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal development. *Teratology* 65 : 228-239, 2002.
- Mirkes PE, Little SA : Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydrozycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. *Toxicol Appl Pharmacol* 162 : 197-206, 2000.
- Morris-Wiman J, Brinkley L : an extracellular matrix infrastructure provides support for murine secondary palatal shelf remodelling. *Anat Rec* 234 : 575-586, 1992.
- Murray J : Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61 : 248-256, 2002.
- Nugent P, Ma L, Greene RM : Differential expression and biological activity of retinoic acid-induced TGF- β isoforms in embryonic palate mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 177 : 36-46, 1998.
- Nugent P, Pisano MM, Martin CW, Robert MG : Increased susceptibility to retinoid-induced teratogenesis in TGF- β 2 knockout mice. *Reprod Toxicol* 16 : 741-747, 2002.
- Ohuchi H, Yoshioka H, Tanaka A, Kawakami Y, Nohno T, Noji S : Involvement of androgen-induced growth factor (FGF-8) gene in mouse embryogenesis and morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 204 : 882-888, 1994.
- Ornitz DM, Itoh N : Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2 : 3005.1-3005.12, 2001.
- Pleet H, Graham Jr. JM, Smith DW : Central nervous system and facial defects associated with maternal hyperthermia at four to 14 weeks gestation. *Pediatrics* 67 : 785-789, 1981.
- Powers CJ, McLesky SW, Wellstein A : Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7 : 165-197, 2000.
- Richman JM, Herbert M, Matovinovic E, Walin J : Effect of fibroblast growth factors on outgrowth of facial mesenchyme. *Dev Biol* 189 : 135-147, 1997.
- Roberts AB, Sporn MB : The transforming growth factor- β s. In: Sporn MB, Roberts AB (eds) *Handbook of experimental pharmacology. Peptide growth factors and their receptors*, vol 95/I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 419-472, 1990 cited from Dunker N, Kriegstein K : *Anat Embryol* 206 : 73-83, 2002.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot A, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T : TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 124 : 2659-2670, 1997.
- Sasaki J, Yamaguchi A, Nabeshima Y, Shigemitsu S, Mesaki N, Kubo T : Exercise at high temperature causes maternal hyperthermia and fetal anomalies in rats. *Teratology* 51 : 233-236, 1995.
- Schneider RA, Hu D, Rubenstein JL, Maden M, Helms JA : local retinoid signalling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development* 128 : 2755-2767, 2001.
- Silver MH, Foidaart JM, Pratt RM : Distribution of fibronectin and collagen during mouse limb and palate development. *Differentiation* 18 : 141-149, 1981.
- Singh GD, Moxham BJ, Langley MS, Waddington RJ, Embery G : Changes in the composition of glycosaminoglycans during normal palatogenesis in the rat. *Arch Oral Biol* 39 : 401-407, 1994.
- Singh GD, Johnston J, Ma W, Lozanoff S : Cleft palate formation in fetal Br mice with midfacial retrusion: tenascin, fibronectin, laminin, and type IV collagen immunolocalization. *Cleft Palate Craniofac J* 35 : 65-76, 1998.
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR : Targeted disruption of fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13 : 1834-1846, 1999.
- Theodorakis NG, Drujan D, De Maio A : Thermotolerant cells show an attenuated expression of Hsp70 after heat shock. *J Biol Chem* 274 : 12081-12086, 1999.
- Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JLR, Bishop JM, Martin GR : Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Gene Dev* 13 : 3136-3148, 1999.

- Tucker AS, Khamis A, Ferguson CA, Bach I, Rosenfeld, MG, Sharpe PT : Conserved regulation of mesenchymal gene expression by FGF-8 in face and limb development. *Development* 126 : 221-228, 1999.
- Vogel A, Rodriguez C, Izpisua-Belmonte J : Involvement of FGF-8 in the initiation, outgrowth and patterning of vertebrate limb. *Development* 122 : 1737-1750, 1996.
- Wilkie AO, Morris-Kay GM : Genetics of craniofacial development and malformations. *Nat Rev Genet* 2 : 458-468, 2001.
- Zenk W, Stiler KJ : Proliferative activity of mesenchyme and epithelium in teratogen-affected palatogenesis. *Acta Histochem* 39(Supple) : 245-248, 1990.
- Zimmerman JL, Cohill PR : Heat shock and thermotolerance in plant and animal embryogenesis. *New Biol* 3 : 641-650, 1991.
- Zschabitz AR, Biesalski HK, Krahn V, Gabius HJ, Weisler H, Khaw A, Hmms C, Stofft E : Distribution patterns in glycoconjugate expression during the development of the rat palate. *Histochem J* 26 : 705-720, 1994.

K C I

Abstract

Effects of Maternal Hyperthermia on the Palatal Mesenchyme Development of Hsp70 Knock-out Mice Fetuses

Jung-Keun Oh, Won-Kyu Kim¹

Department of Plastic Surgery,

¹*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

To investigate the effects of maternal hyperthermia on the development of the palate, pregnant Hsp70 knock-out mice at gestational day (GD) 8.5 were immersed in 43°C water bath until their body core temperature reached at 43°C. Thereafter, pregnant mice were given more 5 minutes hyperthermic exposure. Heat-untreated Hsp70 WT mice fetuses were used as the control group. Fetuses were collected at embryonic day 13.5, 14.5 and 15.5 (E13.5, E14.5 and E15.5). Heads followed by removal of the mandible and the tongue were obtained and photographed for palatal development. Developing palates were processed for histological and immunohistochemical studies. Tissue sections were immunostained for TGF-β2, FGF-8 and fibronectin, and observed with light microscope. The obtained results were as follows:

Cleft palate was formed in heat-treated Hsp70 KO fetuses at E14.5 and E15.5. Immunohistochemical findings indicated that TGF-β2 expression of the experimental fetuses were more delayed than that of the control fetuses. Mesenchyme under the medial edge epithelium (MEE) and cells of MEE showed continuously strong positive TGF-β2 reactivity at E15.5. FGF-8 was revealed in both of the mesenchyme and the epithelium at the same time. FGF-8 immunoreactivity in the mesenchyme and the epithelium of the heat-treated fetuses showed strong reactivity at E15.5. In the experimental fetuses fibronectin was revealed the mesenchyma and basal lamina at E15.5.

Taken together, it is suggested that maternal hyperthermia induces continuous expression of TGF-β2 and FGF-8 in the mesenchyme and delayed expression of fibronectin. These should affect the normal palatogenesis and result in cleft palate.

Key words : Maternal hyperthermia, Palate development, TGF-β2, FGF-8, Fibronectin, Immunohistochemistry