

## 고열에 의한 생쥐 배아의 긴뼈 발생 지연

오순금, 최지은, 이 진, 김원규

한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실

(2012년 1월 26일 접수, 2012년 3월 15일 수정접수, 2012년 3월 19일 게재승인)

**간추림** : 임신 중 산모가 고열에 노출되면 태아의 선천성 기형 발병률이 높아진다는 다양한 연구 결과가 발표되었다. 태아의 성장 지연, 선천성 기형, 유산 등을 일으키는 산모 고열은 선천성 기형유발물질 중의 하나로 알려져 있으나 그 기전에 대한 규명은 아직 미비한 실정이다. 산모의 고열은 중배엽 기원의 앞다리 근육에 작용하는 여러 단백질의 발현을 지연시켜 근육발생에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 중배엽 기원의 위팔뼈의 초기 발생과정에서 발현되는 단백질에 산모 고열이 어떠한 영향을 주는 지 알아보려고 하였다.

8주령 ICR계 암수 생쥐를 합사하고 다음 날 아침 질마개가 확인되면 발생 제0일로 정하고 임신이 확인된 날로부터 제8일에 6분간 모체열충격을 시행하였다. 발생 제11일, 13일, 15일 및 17일에 경추탈골법으로 산모를 희생하고 자궁을 절개하여 배아를 적출하였다. 배아에서 뇌탈출증이나 눈없음증이 관찰되면 실험군으로 정하였다. 배아의 외형을 관찰한 후 긴뼈의 일종인 위팔뼈를 적출하여 western blot과 면역조직화학염색법을 이용하여 FGF8, SOX9 및 collagen II의 발현을 발생 시기에 따라 추적하였고, alizarin red S 및 alcian blue 이중염색법으로 발생 제17일 위팔뼈를 관찰하였다.

Western blot 결과 FGF8은 발생이 진행되어도 대조군에 비하여 발현이 지속되고 있었으며, SOX9은 발생 제13일까지 계속 증가하였고, collagen II는 대조군에 비하여 발현이 증가되어 있었다. Alizarin red S 및 alcian blue 이중염색결과 실험군 위팔뼈는 대조군에 비하여 뼈발생이 지연되었다.

이상의 결과를 종합하면 산모 고열은 팔다리의 초기 발생 및 긴뼈발생 동안 전반적으로 발현되는 FGF8과 중간엽세포의 농축 및 연골세포의 증식에 관여하는 SOX9, 연골바탕질에서 발현되어 중간엽세포가 연골모세포로 분화할 수 있도록 중간엽세포의 농축을 유도하는 collagen II의 발현을 지속시켜 연골속뼈발생 과정을 지연시킬 수 있었다.

**찾아보기 낱말** : 산모고열, 긴뼈발생, FGF8, SOX9, Collagen II

### 서 론

태아의 기형발생 원인 중 하나인 산모고열은 중추신경계를 포함하여 여러 가지 기형을 일으키는 기형유발물질(teratogen)로 이미 널리 알려져 있다. 산모가 고열에 노출되면 태아는 뇌노출증(exencephaly), 눈없음증(anophthalmia), 신경관결손(neural tube defects)과 입천장갈림증(cleft palate)을 포함한 안면갈림증(facial cleft) 등이 유발되며 뼈대기형(skeleton abnormalities)을 일으

킨다(Finnell 등 1993). 척추동물에서 팔다리는 축옆중배엽(paraxial mesoderm)과 가쪽중배엽(lateral mesoderm), 신경능선(neural crest)에서 기원한다. 축옆중배엽은 농축되어 몸분절(somite)을 형성하고, 몸분절은 다시 배쪽 안쪽의 뼈분절(sclerotome)과 등쪽 가쪽의 피부근육분절(dermomyotome)로 분화하며, 뼈분절 세포는 형태가 다양해지면서 중간엽을 형성하여 팔다리싹(limb bud)을 형성한다(de Crombrugge 등 2001). 팔다리싹 형성을 시작으로 팔다리는 중간엽 조직과 이를 덮고 있는 한 층의 입방형 외배엽 세포로 구성되며, 가쪽중배엽의 벽쪽층에서 유래된 중간엽 조직이 팔다리의 뼈와 결합 조직을 형성하게 된다. 팔다리싹 끝의 외배엽층은 중간엽의 자극을 받아 두꺼워져서 꼭대기외배엽능선(apical ectodermal ridge)을 형성한다(Rawls와 Olson 1997). 꼭

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.  
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.  
교신저자 : 김원규 (한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실)  
전자우편 : kimwg@hanyang.ac.kr

대기외배엽능선 바로 밑에 있는 중간엽 조직은 분화하지 않고 빠른 속도로 증식하며 이후 꼭대기외배엽능선의 영향을 받지 않는 세포가 연골과 근육으로 분화하기 시작한다. 이러한 방식으로 몸쪽에서 먼쪽 방향으로 팔다리의 발달이 진행된다(Albertson과 Yelick 2005).

팔다리발생과정 초기에 여러 인자들의 신호와 전사과정의 참여하고, 이들의 발현시기와 기능 역시 순차적인 단계로 이어진다. 꼭대기외배엽능선이 생기고 fibroblast growth factor (FGF)4와 8이 발현되며, 이들에 의해서 꼭대기외배엽능선 가까이에 있는 중간엽세포가 빠르게 분열한다. 이때 FGF8의 영향 하에 팔다리뼈가 성장함에 따라 몸쪽의 중간엽이 외배엽능선의 영향을 벗어나게 되고 세포분열이 느려지면서 분화가 시작된다(Heikinheimo 등 1994). FGF는 상피세포, 중배엽세포 및 신경외배엽기원세포의 증식과 분화를 담당하며, 생쥐에서는 22개의 아형이 있다고 알려져 있다(Powers 등 2000). 이중 FGF2, 4, 8, 10은 척추동물의 팔다리 발생에 중요한 역할을 한다. 특히 FGF8은 초기배자발생에 중요한 역할을 하며, 발생중인 생쥐의 여러 조직에서 발현되어 창자배형성(gastrulation), 얼굴, 팔다리 및 중추신경계의 발생에 필수적인 단백질이다(Vogel 등 1996, Sun 등 1999, Tucker 등 1999). 또한 닭 배아의 팔다리발생 초기에 꼭대기외배엽능선으로 추정되는 부위에서 FGF8이 발현되고, 이후에도 지속적으로 FGF8이 팔다리뼈(limb bud)에서 발현되므로 FGF8은 팔다리의 초기발생에 중요한 인자이며(Crossley 등 1996), Vogel 등(1996)은 FGF8을 배자의 옆구리에 이식하면 부수적인 팔다리가 발생하는 것을 관찰하여 FGF8은 팔다리의 성장을 증진시키는 인자라고 하였다.

전사인자인 SOX9은 중간엽세포의 농축을 유발하여 연골발생을 개시한다(Bi 등 1999). SOX9은 연골발생 초기에 발현되는 전사인자로 SRY family의 일종이며(Kawakami 등 2006), 농축된 중간엽세포와 증식중인 연골세포에서 발현하고 비후연골세포에서는 발현되지 않는다(Kronenberg 2003). SOX9<sup>-/-</sup> 생쥐 키메라에서는 연골이 형성되지 않고 더욱이 중간엽은 연골세포특이표지자를 발현하지 않는다(Bi 등 1999). 그러나 SOX9<sup>+/-</sup> 돌연변이 생쥐 배아에서는 증식중인 연골세포가 미성숙한 비후세포가 되고 바탕질을 분비하므로 SOX9은 중간엽의 농축부터 증식연골세포의 비후세포로의 전환을 포함하여 연골세포발생의 모든 과정을 조절하므로 연골형성의 조절자로서 역할을 한다고 알려져 있다(Akiyama 등 2002). 농축된 중간엽세포들은 연골모세포로 분화하고 연골바탕질에 collagen type II 단백질이 발현된

다. collagen II 단백질은 aggrecan, perlecan 같은 proteoglycan 등과 함께 연골바탕질을 구성하는 요소 중 하나이며, SOX9의 발현과 밀접한 관계가 있고(Lyons와 Ezaki 2009), 발생중인 긴뼈에서 collagen II는 증식대에 가장 풍부하게 분포하고 있으며 비후연골세포에서 collagen X가 발현함에 따라 점차 감소한다(Schmid와 Linsenmeyer 1985). Collagen II 발현이 되지 않는 돌연변이 생쥐는 연골속뼈발생이 일어나지 않아 치명적인 연골형성장장애증(chondrodysplasia)이 나타난다(Li 등 1995).

따라서 긴뼈 발생과정 동안 이들 여러 단백질이 발현됨에 따라 연골모세포는 성숙하고 팽창하여 원주형 세포로 발달하면서 연골세포가 된다. 연골세포는 점차 비대해지면서 연골판을 만들어 길이와 너비 성장이 이루어져 긴뼈 형성이 이루어지고, 바탕질이 풍부해진다(Bellon 등 2009). 이에 본 연구에서는 고열이 배아의 발생 시기에 따른 앞다리의 긴뼈발생 과정 중 발현되는 여러 단백질에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험은 한양대학교 실험동물윤리위원회의 규정에 따라 진행되었으며, 8주령 ICR계 생쥐(오리엔트바이오, 서울, 한국)를 사용하였다. 암컷생쥐와 수컷생쥐를 3:1 비율로 합사하고 다음날 아침 질막개(vaginal plug)가 확인되면 발생 제0일로 정하고 임신이 확인 된 날로부터 제8일에 모체열충격을 시행하였다. 배아는 발생 제 11일, 13일, 15일, 17일에 적출하여 관찰하였고, 선천성 기형이 관찰되는 배아를 실험군으로, 정상대조군 배아를 대조군으로 정하였다. 실험동물은 각 군당 날짜 별로 배아 6마리를 배정하였으며, 실험기간 동안 산모에게는 표준사료와 물을 무제한 공급하였고, 온도(22±1°C)와 습도(60±3%), 조명(12시간 light/dark cycle)을 자동 조절하여 사육하였다.

### 2. 모체열충격법

임신이 확인된 날로부터 제8일에 모체열충격을 시행하였다. 탐침(probe)이 장착된 디지털 체온계를 모체 직장의 약 2cm 정도 깊이로 삽입한 후 구멍이 뚫린 50 mL Falcon Tube에 모체를 넣고, 43°C 수조에 배가 잠기도록 하여 체온변화를 관찰하였다. 직장온도가 43°C에 도달하면 6분간 열충격을 지속하였다. 열충격이 끝난

후 저체온증을 방지하기를 위하여 신속히 물기를 제거하고 정상체온으로 회복될 때까지 38°C 부양기 내에 넣어두었다. 대조군은 생쥐의 체온인 38°C에서 6분간 노출시킨 후 38°C 부양기 내에 넣어두었다.

### 3. 배아적출 및 외형관찰

임신 제11일, 13일, 15일에 모체를 경추탈골법으로 희생시켜 자궁을 적출한 후 Hank 용액 내에서 자궁을 절개하여 배아를 적출하였다. 고열에 노출된 배아에서 뇌탈출증이나 눈없음증이 관찰되면 선천성기형을 동반한 배아로 실험군으로 분류하였다. 배아에서 팔을 분리하고, 피부, 근육 및 연조직을 제거한 후 위팔뼀을 적출하여 실험을 진행하였다.

### 4. Alizarin red S 및 alcian blue 이중염색

발생 제17일 배아를 적출한 후 피부, 근육 및 연조직을 제거한 후 어깨뼈를 포함하여 앞다리 전체를 적출하고 Kimmel과 Trammell (1981)의 alizarin red S 및 alcian blue 이중염색법을 시행하였다. 위팔뼀은 좌우 구분 없이 사용하였고, 대조군과 실험군 각각 10개의 위팔뼀을 관찰하였다.

### 5. Western blotting

적출한 위팔뼀을 lysis 완충액과 함께 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액은 Bradford (1976)법을 이용해 총 단백질량을 정량하였다. 정량한 단백질은 각 샘플 당 35 µg으로 하여 10~12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 후 membrane으로 전이시켰다. 5% skim milk가 첨가된 용액으로 1시간 동안 blocking 후 일차항체 FGF8 (1 : 500, R&D, cat.# MAB 323), SOX9 (1 : 500, Santa Cruz, cat.# SC-17341), collagen II (1 : 200, Santa Cruz, cat.# SC-7763)를 4°C에서 12시간 반응시켰다. 일차항체 반응 후 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 이차항체 (goat anti-rabbit, Santa Cruz, cat.# SC-2004; horse anti-mouse, Vector, cat.# BA 2000)를 1 : 5,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST 완충액을 이용하여 10분씩 3회 세척 후 Streptavidin-HRP (1 : 2,000, BD Biosciences, cat.# 550946)을 이용하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후 X-ray film (Kodak, NY)을 이용하여 immunoreactive bands를 현상하여 측정하였다. 단백질 농도측정은 Gel doc 2000 (Bio Rad, Italy)을 이용하여 농도단위를 백분율 (%)로 측정

하였다.

### 6. 면역조직화학염색

적출한 배아의 팔을 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde와 0.1 M phosphate 완충액으로 만들어진 고정액에 5시간 동안 고정하였고, 일반적 조직표본제작법에 따라 탈수과정을 거친 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀 조직을 6 µm 두께로 절편하고 탈파라핀 과정을 거친 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 5분간 내재성 peroxidase를 제거한 다음 PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 세척 후 3% goat serum과 horse serum을 이용하여 실온에서 40분간 반응시켰다. 일차항체로 FGF8 (1 : 50, R&D, cat.# MAB 323), SOX9 (1 : 30, Santa Cruz, cat.# SC-17341), Collagen II (1 : 30, Santa Cruz, cat.# SC-7763)를 4°C에서 12시간 반응시켰고, PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 그 후 이차항체 (horse anti-mouse, Vector, cat.# BA 2000; goat anti-rabbit, Santa Cruz, cat.# SC-2004)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이차항체 반응 후 PBS로 3회 세척한 후 30분간 실온에서 avidin biotin peroxidase complex (Vector Co.)를 이용하여 반응시키고 DAB로 3분간 발색시킨 후 1% methyl green으로 대조 염색하고 광학현미경 (OLYMPUS IX-71, Japan)으로 관찰하였다. 일차항체를 배제하고 음성대조를 시행하였다.

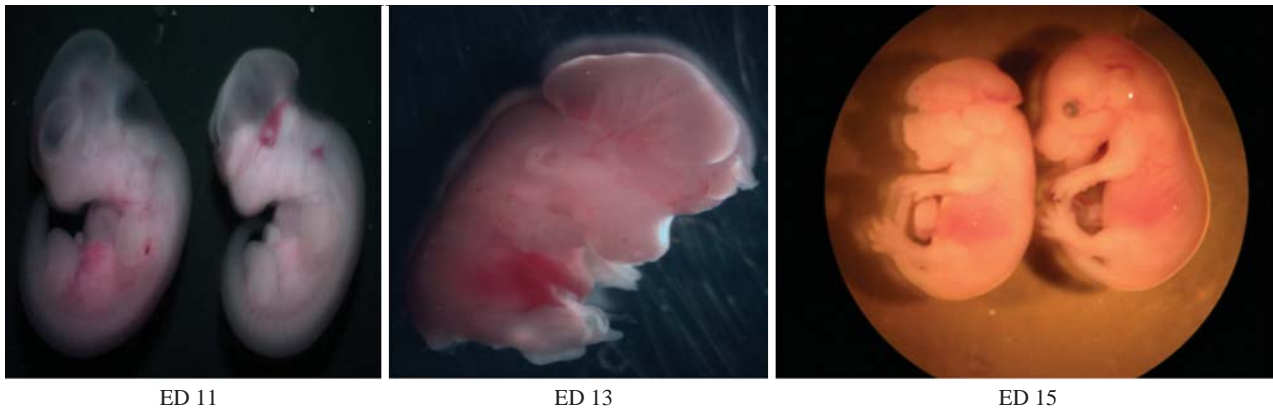
### 7. 통계처리

단백질 농도 측정은 통계 분석 SPSS 17.0 software을 이용하였다. 관찰변인들의 측정 결과에 대한 대조군과 실험집단간의 차이를 알아보기 위해 2 (실험집단) × 3 (시간; 11일, 13일, 15일)으로 하여 총 6회를 반복 측정하여 two-way mixed measure ANOVA를 이용하여 검증하였다. ANOVA 검사에서 유의한 차이가 있을 경우 Bonferroni test와 T-test를 이용하여 유의한 차이를 알아내었으며 통계적 유의 수준은 0.05 이하로 설정하였다. 모든 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다.

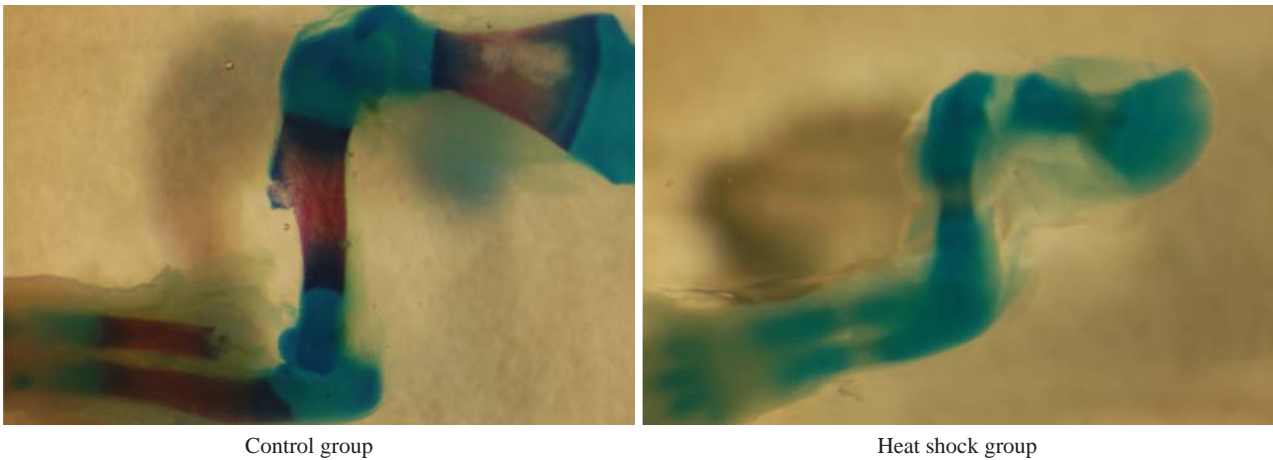
## 결 과

### 1. 외형관찰

발생 제11일, 13일, 15일 생쥐 배아에 미치는 모체열 충격의 영향을 관찰하였다. 외형적으로 발생시기에 관계없이 뇌탈출증과 눈없음증이 관찰되었다 (Fig. 1).



**Fig. 1.** External appearance of control and heat shocked embryos on embryonic day (ED) 11, 13 and 15. Exencephalic and anophthalmic fetuses were found in every developmental days examined.



**Fig. 2.** Alizarin red S and alcian blue stain. Control and heat shocked humerus at ED 17. Bony portion is stained with red color, and cartilaginous portion is blue color. Diaphysis of the control humerus shows more calcified than that of the experimental humerus.

## 2. Alizarin red S 및 alcian blue 이중염색

발생 제17일 배아의 위팔뼈에서 뼈 부분은 적색으로 염색되었고, 연골 부분은 청색으로 염색되었다 (Fig. 2). 대조군에서는 위팔뼈의 중심부에서 뼈발생이 진행되어 적색으로 염색되었으나 실험군에서는 모두 청색으로 염색되어 아직 뼈발생이 일어나지 않고 있었다.

## 3. Western blotting 소견

### 1) Fibroblast growth factor 8 (FGF8)

FGF8은 대조군에서는 발생이 진행됨에 따라 발현이 감소하였다. 실험군에서는 발생 제11일에는 대조군 보다 발현이 감소되어 있었으나 발생 제13일과 15일에서는 대조군에 비하여 발현이 현저히 증가하였다. 전반적으

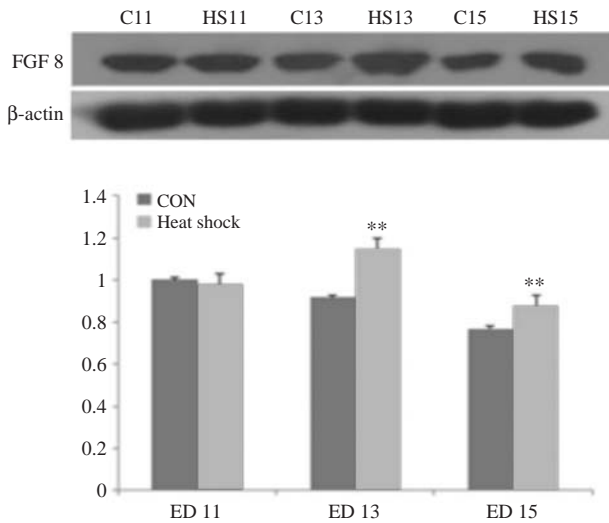
로 대조군은 발생 시기에 따라 발현이 감소하였으나, 실험군에서는 대조군보다 발현이 증가되어 있었다 (Fig. 3).

### 2) SOX9

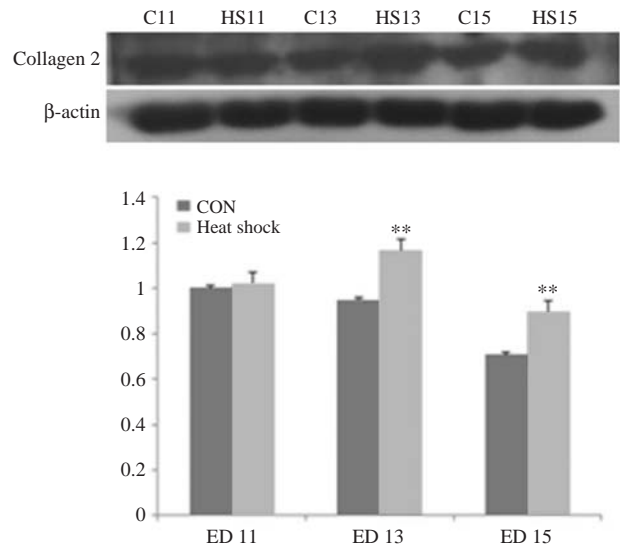
SOX9은 대조군에서는 발생이 진행함에 따라 발현이 현저히 감소하였다. 실험군은 발생 제11일에는 대조군과 비슷한 발현을 보였으나 발생 제13일에는 발현이 현저히 증가하였고, 15일에는 대조군과 유사한 양상을 보였다. 전반적으로 대조군은 발생 제11일에 가장 높게 발현되는 반면 실험군에서는 발생 제13일까지 발현이 계속 지속되었다가 발생 15일에 이르러 발현이 감소하였다 (Fig. 4).

### 3) Collagen II

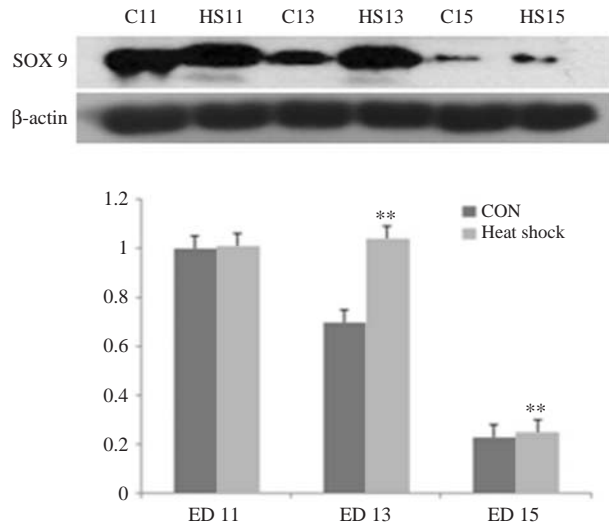
Collagen II는 대조군에서는 발생이 진행함에 따라



**Fig. 3.** Western blot analysis of fibroblast growth factor (FGF)8 in control (CON) and heat shock groups. The expression of FGF8 protein was gradually decreased in CON; however, FGF8 expression in heat shock group was significantly increased on ED 13 and 15 compared to CON. Data are means  $\pm$  SEM (n=6). \*\* $p < 0.05$  comparing heat shock groups with the control group. ED: embryonic day.



**Fig. 5.** Western blot analysis of collagen II in control (CON) and heat shock groups. The expression of collagen II protein was gradually decreased in CON; however, in heat shock group, the expression of collagen II protein was significantly increased on ED 13 and 15 compared to CON. Data are means  $\pm$  SEM (n=6). \*\* $p < 0.05$  comparing heat shock groups with the control group. ED: embryonic day.



**Fig. 4.** Western blot analysis of SOX9 in control (CON) and heat shock groups. The expression of SOX9 protein was gradually decreased in CON. However, in heat shock group, the expression of SOX9 protein was significantly increased on ED 13 and 15 compared to CON. Data are means  $\pm$  SEM (n=6). \*\* $p < 0.05$  comparing heat shock groups with the control group. ED: embryonic day.

발현이 점차 감소하였다. 실험군에서는 발생 제11일에는 대조군과 비슷한 발현을 보였으나 발생 제13일과 15일에서는 대조군에 비하여 발현이 증가하였다. 전반적으로 대조군은 발생 시기에 따라 발현이 감소하였고, 실험군은 발생 제13일까지 증가하다가 15일에 발현이 감소하였으나 대조군보다는 높게 발현되고 있었다(Fig. 5).

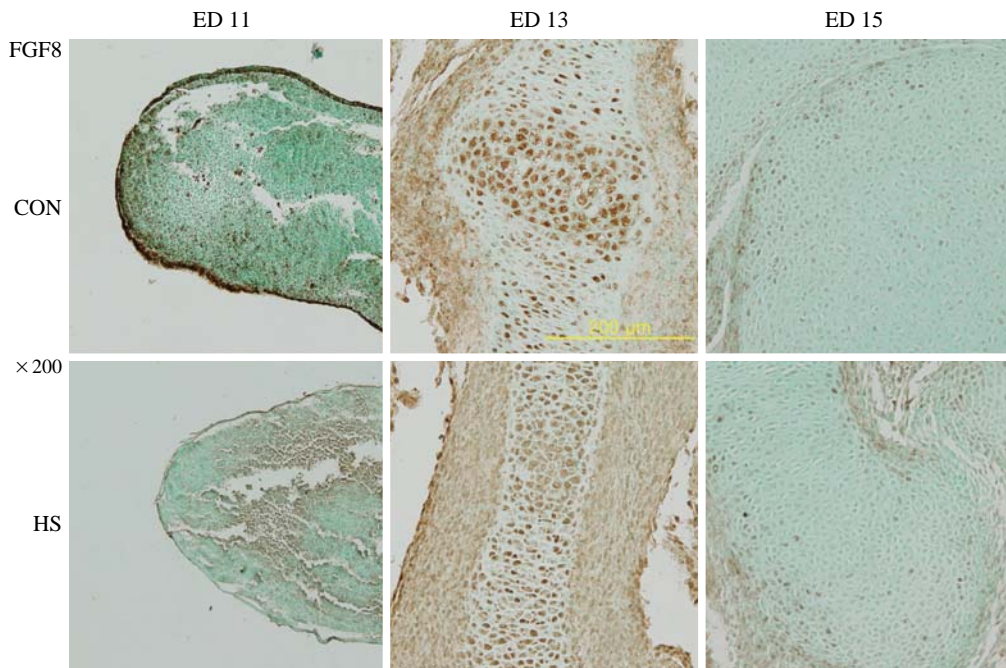
4. 면역조직화학염색 소견

1) FGF8

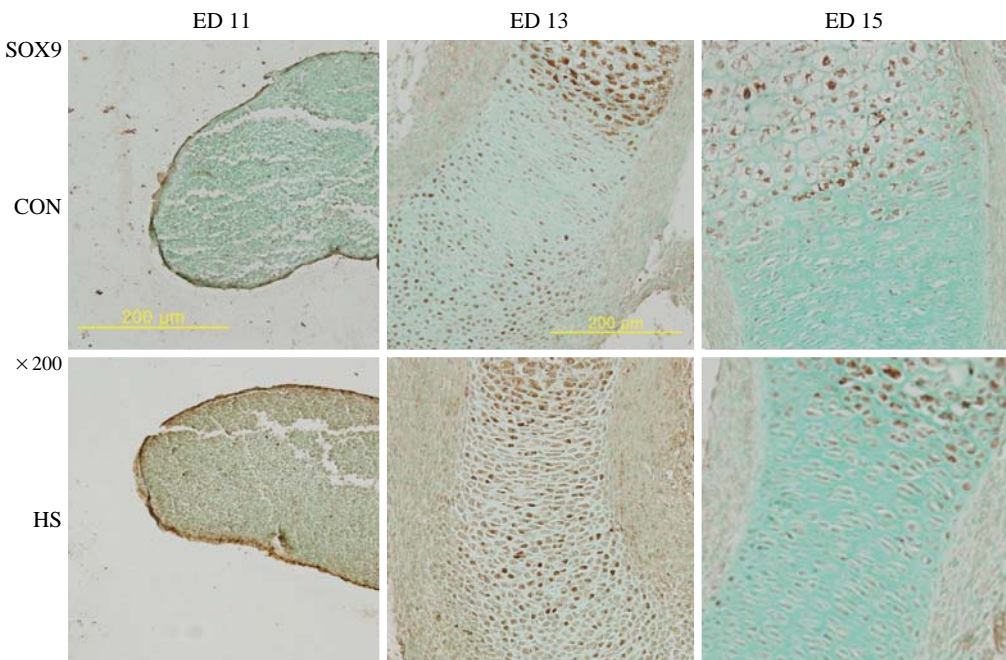
FGF8은 세포질에서 양성 반응을 나타내었다. 발생 제11일 대조군 배아에서 앞다리 중간엽과 꼭대기외배엽 능선에서 강한 반응을 보이는 반면 실험군에서는 대조군에 비해 중간엽에서 약한 반응을 보이며 꼭대기외배엽 능선에서는 반응을 나타내지 않았다. 발생 제13일 대조군은 위팔뼈 중심부에서 분화중인 연골세포에서 강한 양성 반응을 보였다. 실험군에서는 뼈몸통과 뼈몸통끝에서 분화중인 중간엽세포에서 강한 양성 반응을 보였다. 발생 제15일 대조군 배아의 위팔뼈에서는 예비대에서 일부 세포가 양성 반응을 보이는 반면, 실험군에서는 예비대의 많은 세포가 양성 반응을 보이고 있었다(Fig. 6).

2) SOX9

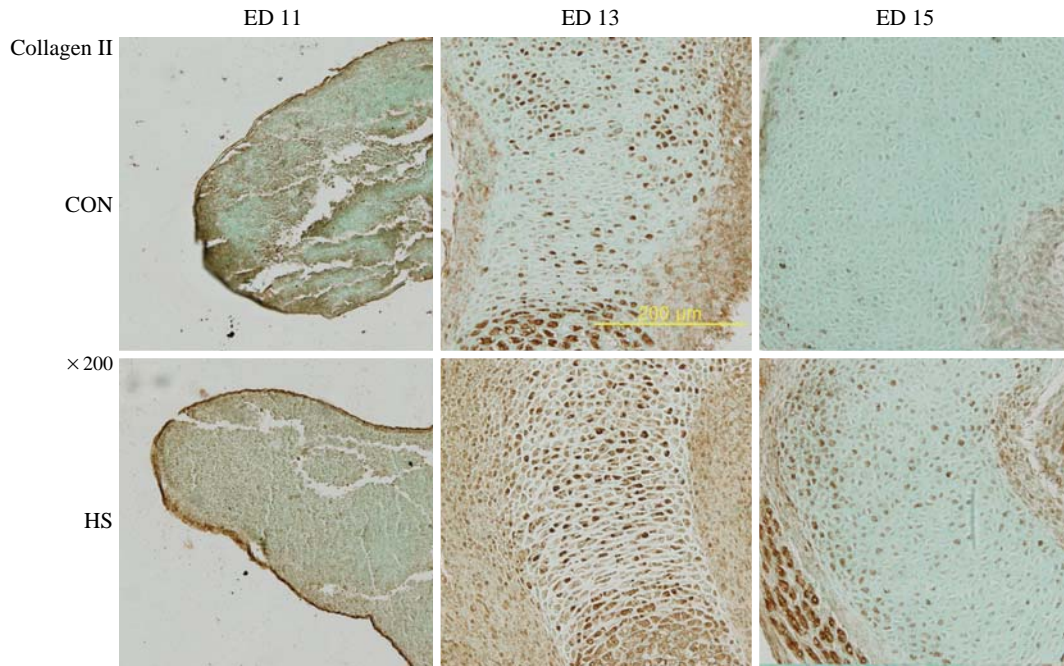
SOX9은 발생 제11일 대조군과 실험군에서 비슷한 반응을 보이고 있었다. 발생 제13일에 대조군은 위팔뼈 중심부의 비후연골세포에서 강한 양성 반응을 나타내고 있었고, 뼈끝과 뼈몸통끝의 일부 분화중인 중간엽세포가 양성 반응을 나타내고 있었다. 반면, 실험군에서는 분



**Fig. 6.** FGF8 immunohistochemistry in control (CON) and heat shock groups (HS). Strong positive reaction for FGF8 was observed in mesenchymal cells and apical ectodermal ridge of CON, and no reaction was revealed in HS on ED 11. On ED 13 differentiating cartilage cells showed strong positive reaction in central portion of developing humerus; however, condensed mesenchymal cells were located and revealed positive reaction for FGF8 in HS. A few cells in reserving zone showed positive reaction in CON; on the contrary, many positive reserving cells were found in HS. All pictures were photographed with  $\times 200$  magnification.



**Fig. 7.** SOX9 immunohistochemistry in control (CON) and heat shock groups (HS). Immunoreaction of CON and HS showed similar activity on ED 11. On ED 13, maturation zone revealed strong positive reaction in CON; however, in HS, condensed mesenchymal cells showed positive immunoreaction. Some immunopositive cells were found on reserving and proliferating zone in CON on ED 15 compared to many positive cells in HS. All pictures were photographed with  $\times 200$  magnification.



**Fig. 8.** Collagen II immunohistochemistry in control (CON) and heat shock groups (HS). Immunoreaction of mesenchymal cells was stronger in CON compared to HS on ED 11. On ED 13, maturation zone was observed in CON and showed strong positive reaction; however, in HS, immunopositive mesenchymal cells were observed. On ED 15, some immunopositive cells were found on reserving zone in CON; however, positive cells were observed in reserving and proliferating zone of HS. All pictures were photographed with  $\times 200$  magnification.

화중인 중간엽세포에서 양성반응을 보였다. 발생 제15일 대조군 배아의 위팔뼈에서는 예비대 및 증식대에서 일부 세포가 양성 반응을 보이는 반면, 실험군에서는 예비대 및 증식대의 많은 세포가 양성반응을 보이고 있었다(Fig. 7).

### 3) Collagen II

Collagen II는 발생 제11일 대조군 배아의 앞다리 중간엽에서 강한 양성반응을 보이는 반면 실험군에서는 대조군에 비해 중간엽에서 약한 반응을 보였다. 발생 제13일 대조군은 뼈몸통의 비후연골세포에서 강한 양성반응을 보이고 뼈몸통끝의 분화중인 중간엽세포에서 양성반응을 나타내고 있었으나, 실험군에서는 분화중인 중간엽세포에서 양성반응을 보였다. 발생 제15일 대조군은 예비대에서 일부 세포가 양성 반응을 보이는 반면, 실험군에서는 예비대와 증식대에서 양성 반응을 보이고 있었다(Fig. 8).

## 고 찰

임신 중 고열은 사람을 비롯하여 모든 동물 종에서 기형을 일으키는 기형유발물질로 알려져 있다(Edward

등 2003). 고열은 임신 중 산모가 내외부의 환경변화에 따라 정상 체온보다 적어도  $1.5^{\circ}\text{C}$  이상 중심체온이 상승한 경우를 의미한다. 임신 중 산모가 사우나 이용, 고강도 운동, 그리고 독감 등을 포함한 열성질환 등에 노출되었을 때 고열이 유도된다. 이러한 임신 중 고열은 프로스타글란딘을 증가시키고, 자궁의 활동과 태아의 육체적 고통을 높이고, 세포자멸사를 유도한다(Lee 등 2009). 따라서 태아는 사산 혹은 자연유산되며, 생존하는 경우에도 성장지연이나 선천성기형을 일으킨다. 실험동물에서 산모의 고열은 뇌없음증, 뇌탈출증, 작은뇌증과 수막척수류, 작은눈증, 눈없음증, 척추갈림증 등의 중추신경계 기형과 그 외 입천장갈림증, 팔다리결손, 몸통뼈대기형을 유발한다(Edwards 등 2003). 사람의 경우 역학조사에 의하면 임신초기, 특히 임신 12주 이내에 열성질환이나 잦은 사우나에 의해 무뇌아(Miller 등 1978, Shiota 1982), 수막척수류(Chance와 Smith 1978), 작은눈증(Fraser와 Skelton 1982), 후두부 뇌탈출증(Fisher와 Smith 1981), 얼굴형성부전(Pleet 등 1981) 등이 발표되어 있으며, 소하악증(micrognathia), 외이기형, 심장결손, 요도하열, 위장관결손, 입술갈림증 및 입천장갈림증, 복벽결손, 가로막탈출증, Hirschsprung disease, Mobius syndrome, oromandibular limb hypogenesis spectrum과 자

연유산(Martinez-Frias 등 2001) 등이 보고된 바 있다. 고열에 의한 모든 포유동물의 기형은 정상체온보다 최소 2.0~2.5°C 이상 체온이 상승되었을 때 나타난다는 Edwards 등(2003)의 보고와 같이 본 실험에서도 모체 생쥐의 직장 온도가 43°C에 도달하면 6분간 열충격을 시행하였다. 대조군은 생쥐의 체온인 38°C에서 6분간 담가 관찰하였다. 본 실험에서 산모의 고열은 실험군에서 뇌탈출증과 눈없음증을 유발하였다. 고열은 노출시기와 노출시간에 따라 다양한 형태의 선천성기형을 유발하는 것으로 알려져 있다. 흰쥐의 경우 43°C에서 5분간 고열에 노출되면 머리얼굴기형이 초래되고(Webster 등 1985), 7분간 노출되면 소안증과 소뇌증이 유발된다(Walsh 등 1987). 또한 생쥐의 경우 고열에 1회 노출되는 것보다 2회 노출되었을 때 뇌탈출증의 비율이 증가하며(Chernoff와 Golden 1988), 43°C의 열충격을 가한 경우 실험군에서는 90% 이상의 태아에서 척추후방변형이 관찰된다(Li와 Shiota 1999). 또한 생쥐의 경우 발생 제 8일은 V-자 형태의 태아가 C-자 형태의 태아로 주름(folding)이 일어나는 기관형성기에 접어드는 날로써 기형유발물질에 민감한 시기이다(Mirkes와 Little 2000). 본 연구실에서는 발생 제8일에 고열을 유도하여 선천성기형 유발효과 혹은 예방에 대한 여러 논문을 발표한 바 있으며(Kim과 Mirkes 2003, Kim 2005, Oh와 Kim 2005, Yoo 등 2005, Yoo 등 2007, Ahn 등 2008, Lee 등 2008, Lee 등 2009, Lee 등 2011) 이에 따라 본 실험에도 발생 제 8일에 고열에 노출시켰다.

뼈발생 과정에는 뼈모세포 또는 중간엽세포가 직접 뼈세포로 분화한 후 뼈를 형성하는 막속뼈발생과 중간엽세포가 연골모세포로 분화하여 연골을 형성한 후 혈관의 형성과 함께 뼈모세포가 출현하여 뼈가 형성되는 연골속뼈발생의 두 과정이 있다. 이 중 연골속뼈발생은 주변 조직에서 기원하는 여러 가능성을 가진 중간엽세포가 여러 인자들의 영향을 받아 연골과 뼈로 분화하는 과정이다(Kiyokawa 등 1996). 또한 연골속뼈발생은 분열이 가능한 세포가 결집하여 증식하고 연골모세포로 분화한 후 연골을 형성하여 길이와 너비 증식을 하게 되고, 연골형성 후 뼈발생이 이루어지게 되면서 긴 뼈의 길이와 너비 성장을 담당한다(McKibbin 1978). 연골속뼈발생과정을 겪는 긴뼈는 초기 팔다리뼈의 발생부터 뼈발생이 일어나는 과정에서 여러 인자들의 신호와 단백질들이 작용하여 발현시기와 기능이 순차적 단계로 이어진다. 생쥐에서 발생 제11일 팔다리뼈 끝의 외배엽층은 중간엽의 자극을 받아 두꺼워져 꼭대기외배엽능선을 형성하고(Martin 1990), 이후 FGF8이 발현

되어 중간엽세포의 농축이 일어나고 연골발생이 시작되면서 난원형의 연골모세포가 발달하기 시작한다(Sun 등 2000). FGF8은 팔다리뼈 형성부터 긴뼈발생 단계에서 전반적으로 발현된다(Ornitz와 Marie 2002). 더욱이 FGF8은 팔다리뼈가 출현할 몸통의 외배엽에서 최초로 발현하고 꼭대기외배엽을 형성을 유도한다(Crossley 등 1996). 또한 FGF8을 발현하지 못하는 limbless 유전자 돌연변이 닭 태아는 꼭대기외배엽능선이 형성되지 않아 팔다리뼈가 출현하지 않는다(Goldfarb 1996). 본 실험에서 western blot 결과 FGF8은 발생이 진행됨에 따라 정상적으로 발현이 감소하였으나 실험군에서는 발생 제13일에 높게 발현하였고, 발생 제15일에 감소하지만 대조군에 비하여 여전히 높은 발현을 보이고 있었고, 면역조직화학염색 결과도 western blotting 결과와 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 생쥐 앞다리 정상발생과정에서 FGF8이 발생 제9.5일에 꼭대기외배엽능선에서 가장 발현이 높고(Lewandoski 등 2000), 발생 제14.5일에 증식대 및 비후대의 연골세포에서 약하게 발현한다는 보고(Minina 등 2005)와 일치하는 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 고열에 의해 FGF8의 발현이 발생이 진행됨에 따라 감소하지 않고 오히려 지속되는 것은 긴뼈 성장의 억제 혹은 지연발생과 관계있는 것으로 생각된다.

FGF8의 발현 후 초기 일차연골세포의 신호전달에 의해 SOX9의 발현이 유도된다(Murakami 등 2000). SOX9은 중간엽세포 농축과정에서 가장 일찍 발현되는 단백질 중의 하나로(Ferguson 등 1998) 농축된 중간엽세포를 연골모세포로 분화시키는 과정을 조절하는 전사인자이다(Shen과 Darendeliler 2005). 또한 SOX9은 농축된 중간엽세포와 증식중인 연골세포에서 발현되고 collagen II 발현을 직접 조절하므로 연골분화의 균형을 조절하는 역할을 한다(Kawakami 등 2006). 연골형성과정에서 매우 민감하게 발현되는 SOX9은 비대연골세포와 뼈모세포에서는 발현되지 않는 특징을 가지고 있다(de Crombrugge 등 2001). 본 연구에서 western blot 실험 결과 발생 제11일에는 대조군과 실험군에서 비슷한 발현 양상을 보였으나 발생 제13일에 대조군은 발현이 11일에 비하여 감소하였으나 실험군에서는 11일 실험군과 비슷한 정도의 발현을 보였으며, 발생 제15일에서는 대조군과 실험군 모두 발현이 감소하였다. 면역조직화학염색 결과 발생 제15일 대조군에서 비대연골세포에서는 SOX9이 발현되지 않는 반면 실험군에서는 비대연골세포들을 관찰할 수 없었으며 분화중인 연골세포에서 SOX9이 발현하고 있었다. 이러한 결과는 연골속

뼈발생 초기단계에 SOX9이 발현하며 뼈발생이 진행되어 비후연골세포가 되면 더 이상 SOX9 발현이 되지 않는다는 기존의 결과(de Crombrugge 등 2001)와 유사하였다. SOX9 돌연변이 생쥐 태아에서 발생중인 손허리뼈 중간엽세포는 발생 제12.5일에는 SOX9을 발현하지만 발생 제13.5일에는 SOX9 발현 세포가 현저히 감소하다가 발생 제15.5일이 되면 극소수의 양성세포만이 관찰된다(Akiyama 등 2002). 또한 SOX9<sup>-/-</sup> 생쥐 태아의 다리뼈에서 발생 제15일에도 중간엽세포가 관찰되는바(Bi 등 1999) 이는 SOX9이 연골세포 형성 초기 과정에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다고 생각된다. 따라서 본 실험에서 발생 제13일 실험군에서 SOX9 발현이 높게 나타난 것은 위팔뼈의 성장이 지연되고 있는 것을 암시하는 결과라고 생각된다.

중간엽세포의 농축과 연골세포의 발생이 일어나는 동안 SOX9에 의해 collagen II의 발현이 조절된다(Ferguson 등 1998). 증식중인 연골세포는 collagen II, IX 및 XI을 합성하며, 이 중 collagen II는 증식대에 가장 많이 분포하고 있다(Yamasaki 등 2001). 연골바탕질은 치밀한 collagen으로 구성되어 있고, collagen II는 연골속뼈발생이 진행됨에 따라 중간엽세포가 농축된 후 분열중인 세포층과 비대연골세포층에서 발현되어 연골과 뼈로 이루어진 부분에서 연골바탕질을 분해하고 석회화시키는 중요한 역할을 한다(Bell 등 1997, Gustafsson 등 2003). 그러나 발생중인 긴뼈의 비후대는 더 이상 collagen II를 분비하지 않고 대신 collagen X를 분비하여 무기질화한다는 보고(Schmid와 Linsenmeyer 1985)도 있다. Collagen II 유전자 결여된 생쥐는 발생 제16.5일에 넙다리뼈와 정강뼈에서 뼈끝연골은 확장되고 빈 구멍이 형성되어 정상적인 뼈성장이 억제된다(Gustafsson 등 2003). 또한 collagen II(Col2a1<sup>-/-</sup>) 유전자결손 형질전환 생쥐는 출생시 사망하고 비정상적인 연골속뼈발생으로 인하여 심각한 뼈대결함을 나타낸다(Aszodi 등 2001). 본 실험에서 western blot 결과 대조군에서는 발생이 진행함에 따라 발현이 감소하였으나 실험군에서는 발생 제13일에 발현이 증가하였고, 발생 제15일에는 다소 감소하였지만 대조군에 비하여 높은 발현을 나타내고 있었다. 면역조직화학염색 결과 대조군은 발생이 진행함에 따라 반응이 점차 감소하였고 발생 제15일에서는 약한 양성반응을 보였으나 실험군에서는 발생 제13일에는 증식층에서 양성반응을 보였고 발생 제15일까지 발현이 지속되었다. 이러한 결과는 collagen II가 Sox9에 의해 직접적으로 조절되고 이에 따라 발생 제13일에 높게 발현된 것으로 생각된다. 실험군 발생 제15일에는 대조군

보다 발현이 높게 나타났으며 이는 비후대 형성이 지연되는 것으로 생각되며, 결과적으로 긴뼈 발생이 지연되는 것으로 판단된다.

이상의 연구결과를 종합하면 고열은 위팔뼈의 초기 형성과정에 작용하여 발생이 진행되에도 불구하고 중간엽세포의 이동과 농축에 관여하는 FGF8의 발현을 지연시키고, 중간엽세포의 농축과 연골모세포로의 분화를 담당하는 SOX9 및 collagen II의 발현을 지속시킴으로써 뼈발생이 일어나야 할 발생 단계에서도 연골발생이 지속되어 연골속뼈발생 과정을 지연시킴을 본 실험을 통해서 확인 할 수 있었다. 그러나 연골속뼈발생은 시간 및 공간적으로 잘 조화되고 복잡한 발생과정이므로 더 많은 연구를 수행해야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Ahn DC, Kim JR, Kim WK : The effect of hyperthermia on FGF-8 and BMP-4 expression during early odontogenesis in Hsp70 knock-out mice fetuses. *Korean J Phys Anthropol* 21: 203-213, 2008.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugge B : The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16: 2813-2828, 2002.
- Albertson RC, Yelick PC : Roles for fgf8 signaling in left-right patterning of the visceral organs and craniofacial skeleton. *Dev Biol* 283: 310-321, 2005.
- Aszodi A, Hunziker EB, Olsen BR, Fassler R : The role of collagen II and cartilage fibril-associated molecules in skeletal development. *Osteoarthritis Cartilage* 9: S150-159, 2001.
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS : SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16: 174-178, 1997.
- Bellon E, Luyten FP, Tylzanowski P : delta-EF1 is a negative regulator of Ihh in the developing growth plate. *J Cell Biol* 187: 685-699, 2009.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugge B : Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-89, 1999.
- Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.
- Chance PF, Smith DW : Hyperthermia and meningomyelocle and anencephaly. *Lancet* 1: 769-770, 1978.

- Chernoff GF, Golden JA : Hyperthermia-induced exencephaly in mice: Effect of multiple exposures. *Teratology* 37: 37-42, 1988.
- Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR : Roles for FGF-8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84: 127-136, 1996.
- de Crombrugge B, Lefebvre V, Nakashima K : Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 721-727, 2001.
- Edwards MJ, Saunders RD, Shiota K : Effects of heat on embryos and fetuses. *Int J Hyperthermia* 19: 295-324, 2003.
- Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA : Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann NY Acad Sci* 857: 33-42, 1998.
- Finnell RH, Van Waes M, Bennett GD, Eberwine JH : Lack of concordance between heat shock proteins and the development of tolerance to teratogen-induced neural tube defects. *Dev Genet* 14: 137-147, 1993.
- Fisher NL, Smith DW : Occipital encephalocele and early gestational hyperthermia. *Pediatrics* 68: 480-483, 1981.
- Fraser FC, Skelton J : Possible teratogenicity of maternal fever. *Lancet* 2: 634, 1978.
- Goldfarb M : Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine and Growth factor reviews* 7: 311-325, 1996.
- Gustafsson E, Aszodi A, Ortega N, Hunziker EB, Denker HW, Werb Z, Fassler R : Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. *Ann NY Acad Sci* 995: 140-150, 2003.
- Heikinheimo M, Lawshe A, Shackelford GM, Wilson DB, MacArthur CA : Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev* 48: 129-138, 1994.
- Kawakami Y, Rodriguez-Leon J, Izpisua Belmonte JC : The role of TGF $\beta$ s and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 18: 723-729, 2006.
- Kim WK : Effects of maternal hyperthermia on the development of C57/BL6 strain Hsp70 knock-out mice fetuses. *Korean J Phys Anthropol* 18: 105-113, 2005.
- Kim WK, Mirkes PE : Alterations in mitochondrial morphology are associated with hyperthermia-induced apoptosis in early postimplantation mouse embryos. *Birth Defects Research Part A* 67: 929-940, 2003.
- Kimmel CA, Trammell C : A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and neonatal animals. *Stain Technology* 56: 271-273, 1981.
- Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A : Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27 (Kip1). *Cell* 85: 721-732, 1996.
- Kronenberg HM : Developmental regulation of the growth plate. *Nat* 423: 332-336, 2003.
- Lee J, Cho JY, Oh SD, Kim SM, Shim YT, Park S, Kim WK : Maternal exercise reduces hyperthermia-induced apoptosis in developing mouse brain. *Int J Hyperthermia* 27: 445-452, 2011.
- Lee J, Kim WK, Shim CS : Effects of exercise on Hsp70 knock-out mice fetuses exposed to maternal hyperthermia. *Korean J Sport Sci* 19: 34-43, 2008.
- Lee J, Mirkes PE, Paik DJ, Kim WK : Effects of maternal hyperthermia on myogenesis-related factors in developing upper limb. *Birth defects research (Part A)* 85: 184-192, 2009.
- Lewandoski M, Sun X, Martin GR : Fgf8 signaling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26: 460-463, 2000.
- Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fassler R, Lapvetelainen T, Kiraly K, Peltari A, Arokoski J, Lui H, Arita M, Khillan JS : Transgenic mice with targeted inactivation of Col2a1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev* 9: 2821-2830, 1995.
- Li ZL, Shiota K : Stage-specific homeotic vertebral transformations in mouse fetuses induced by maternal hyperthermia during somitogenesis. *Dev Dyn* 216: 336-348, 1999.
- Lyons K, Ezaki M : Molecular regulation of limb growth. *J Bone Joint Surg Am* 91: 47-52, 2009.
- Martin P : Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int J Dev Biol* 34: 323-336, 1990.
- 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.
- McKibbin B : The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B: 150-162, 1978.
- Miller P, Smith DW, Shepard TH : Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. *Lancet* I: 519-521, 1978.
- Minina E, Schneider S, Rosowski M, Lauster R, Vortkamp A : Expression of Fgf and Tgf $\beta$  signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expression Patterns* 6: 102-109, 2005.
- 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.
- Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrugge B : Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast

- growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1113-1118, 2000.
- Oh JK, Kim WK : Effects of maternal hyperthermia on the palatal mesenchyme development of Hsp70 knock-out mice fetuses. *Korean J Phys Anthropol* 18: 115-130, 2005.
- Ornitz DM, Marie PJ : FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16: 1446-65, 2002.
- 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.
- Rawls A, Olson EN : MyoD meets its maker. *Cell* 89: 5-8, 1997.
- Schmid TM, Linsenmeyer TF : Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* 100: 598-605, 1985.
- Shen G, Darendeliler MA : The adaptive remodeling of condylar cartilage - a transition from chondrogenesis to osteogenesis. *J Dent Res* 84: 691-699, 2005.
- Shiota K : Induction of neural tube defects and skeletal malformations in mice following brief hyperthermia in utero. *Biol Neonate* 53: 86-97, 1988.
- Sun X, Lewandoski M, Meyers EN, Liu YH, Maxson RE Jr, Martin GR : Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* 25: 83-86, 2000.
- 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.
- 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.
- Walsh DA, Li Z, Wu Y, Nagata K : Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell Mol Life Sci* 53: 198-221, 1997.
- Webster WS, Germain MA, Edwards MJ : The induction of microphthalmia, encephalocele, and other head defects following hyperthermia during the gastrulation process in the rat. *Teratology* 31: 73-82, 1985.
- Yamasaki A, Itabashi M, Sakai Y, Ito H, Ishiwari Y, Nagatsuka H, Nagai N : Expression of type I, type II, and type X collagen genes during altered endochondral ossification in the femoral epiphysis of osteosclerotic (oc/oc) mice. *Calcif Tissue Int* 68: 53-60, 2001.
- Yoo JY, Shim YT, Lee J, Ahn SG, Kim JR, Kim WK : Immunohistochemical study on early odontogenesis in Hsp70 knock-out mice fetuses exposed by maternal hyperthermia. *The Korean J Anat* 40: 47-56, 2007.
- Yoo SH, Ahn SG, Kim WK : Delayed endochondral ossification in Hsp70 knock-out mice fetuses due to maternal hyperthermia. *The Korean J Anat* 38: 215-225, 2005.

# Delayed Long Bone Formation in Hyperthermia-exposed Mouse Embryos

Soon-Keum Oh, Ji Eun Choi, Jin Lee, Won Kyu Kim

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

---

**Abstract** : Maternal hyperthermia, which is currently confirmed as one of major causative factors inducing growth retardation, congenital anomalies and abortion, is known to influence normal development of CNS and various organ system. In addition, maternal hyperthermia could induce severe developmental defects including development of the limb. However, it is not clearly identified how maternal hyperthermia affects the expression of chondrogenesis-related proteins in developing limb of mouse. Thus, this study is aimed to investigate the effects of the maternal hyperthermia on the expression of a various proteins in developing upper limb.

To elucidate it, ICR mice were used in this study, and the animals were divided into control and heat shock groups. The heat shock treatment was given to embryonic day (ED) 8. The animals were sacrificed on ED 11, 13, 15 and 17, and the humerus were removed. Chondrogenesis-related factors such as FGF8, SOX9 and collagen II were detected on ED 11, 13 and 15 using western blot and immunohistochemistry. Developing humerus on ED 17 was stained with alizarin red S and alcian blue.

The expression of FGF8 of heat shock groups was continued even though the development was succeeded. SOX9 expression in heat shock groups was significantly elevated on ED 13 compared to the control embryos. In addition, collagen II expression of heat groups was significantly higher than that of the control group on ED 13 and 15.

The results of this study suggest that hyperthermia causes delayed endochondral ossification in long bone through continuous expression of FGF8, SOX9 and collagen II proteins even though the endochondral ossification is succeeded.

---

**Keywords** : Maternal hyperthermia, Long bone formation, FGF8, SOX9, Collagen II