

마우스의 배자 형성 중 몸분절과 신경관 부위의 Laminin과 Fibronectin의 분포

고신대학 의학부 해부학 교실

허성근, 김순옥

Distribution of the Laminin and the Fibronectin in the Somite and Neural Tube in the Mouse Embryogenesis

Sung Koun Huh, Soon Ok Kim

*Department of Anatomy
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

= Abstract =

During the somitogenesis and the migration of neural crest cells, the distribution of laminin and fibronectin was analyzed in the mouse embryo, for the study of relationship between these embryonic events and the distribution of extracellular glycoprotein molecules. By indirect immunoperoxidase staining, fibronectin and laminin were detected only in basement membranes of the neural tube and the somite, not in the extracellular space, posterolaterally to the neural tube on 7 day in the mouse embryo. But in 9-day mouse embryo, fibronectin and laminin were stained denser not only in the posterolateral extracellular space to the neural tube, but throughout the embryo including the region of neural crest cell migration than in 7-day mouse embryo. This study shows that the migration of neural crest cells may be related to the somitogenesis and this relationship may be mediated by extracellular glycoproteins, such as fibronectin and laminin.

Key Words : Laminin, Fibronectin, neural crest cell, somitogenesis

서 론

신경관(Neural tube)은 배자의 외배엽 세포들로부터 분화한다. 신경조직으로 분화될 외배엽세포의 모양이 변화하여, 신경판(neural plate), 그리고 신경주름(neural fold)을 형성한 후, 신경주름이 배자의 중앙으로 이동하고 양측이 서로 부착하여 신경관을 형성한다. 신경관은 척수(spinal cord)와 뇌(brain) 등으로 분화하게 된다.

몸분절(Somite)은, 척삭(notochord)과 신경관의 바깥쪽에 세로로 배열된 중배엽 세포들이 삼각형의 블록을 형성한 것으로 신경관의 형성과 거의 동시에 발달된 것이다⁴⁾.

신경능선세포(neural crest cell)들은 외배엽 세포와 신경관이 만나는 부위에 존재하는 독특한 성질을 가지고 있는 세포들의 무리로서, 이 세포들은 먼 거리를 이동하여, 여러조직과 기관 즉, 멜라닌 세포, 말초 신경계, 안면의 골 등으로 분화한다^{38,39)}. 신경능선세포들은 배자내의 여러 부위로 이동하여, 다른 조직의 발달에서는 관찰할 수 없을 정도로 다양한 기관으로 분화하는 성질 때문에, 이동과 분화라는 핵심적인 발생 기전의 연구를 위한 좋은 대상으로 알려져 왔다⁴⁰⁾. 신경능선세포의 이동경로는 Johnston²⁶⁾과, Noden⁴¹⁾에 의해 알려지기 시작했으며, Bancroft와 Bellairs³⁾, Tosney 등⁵⁵⁾은 전자현미경을 이용하여 이동경로를 관찰하였다. Erickson과 Weston²⁰⁾은 신경관의 형성 이후 제일 처음 일어나는 현상은 신경관의 등쪽에 있는 기저막이 파괴되는 것이라고 밝혔으며, 이것이 신경능선세포의 이동을 유도한다고 보고하였다.

몸분절의 형성과 신경능선세포의 이동에는 여러가지 세포외 기질의 구성성분들이 관여하는 것으로 알려져 있다^{13,14,31,43)}. 신경능선세포는 신경관의 등쪽과 바깥쪽으로 이동하는데, Pratt 등⁴³⁾은 이 부위의 세포외 공간에서 hyaluronic acid가 증가한다고 보고하여 그 연관성을 제시하였다.

Fibronectin과 laminin은 세포외 기질, 특히 기저막의 중요한 성분중의 하나인, glycoprotein분자들로서^{1,28,32,33,34,36,37,54,62)} 여러 세포의 부착과 이동에 fibronectin이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며^{6,13,15,38,46,53,57)}, 이 glycoprotein분자는 세포가 이동할 때 기질로써 제공되는 것으로 보고되었다. Fibronectin은 배자의 전 부위에 걸쳐, 기저막과 세포외 기질에서 특히 높은 농도로 관찰된다^{15,40,57)}. 또한, Lash 등¹³⁾은 몸분절이 형성될 때 몸분절구(somitomere)세포들의 응집을 유발한다고 보고하였다. Laminin은 마우스의 배자 발생 중 최초로 나타나는 세포외 기질의 일종으로서 대체적으로 2-세포기와 8-세포기에서부터 나타나기 시작하며^{2,16)}, 상피세포의 접착과 성장, 이동 그리고 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{29,51)}. 또한, 근모세포^{22,23)}와 신경초세포, 그리고 암세포의 접착을 도와주며^{50,51)}, 축삭의 신장^{45,47)}, 여러가지 비상피세포들의 이동²³⁾, 특히 암세포의 잠재적인 전이성을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁵⁰⁾.

이러한 fibronectin과 laminin의 접착성이 개체의 배자형성 중, 조직의 재구성과 세포의 이동에 핵심적인 역할을 하여, 생물의 형태와 발달에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다¹⁸⁾.

이 연구는 신경관의 형성과 신경능선세포들이 이동하는 초기에 있어 신경관과 몸분절 주위의 세포외 공간에서 fibronectin과 laminin을 면역 조직화학법으로 염색한 후 분포를 관찰하고, 나아가, 이들 glycoprotein분자들의 분포에 따른 신경능선세포들의 이동과 몸분절의 형성과의 연관관계를 연구하는 것을 목적으로 하였다.

실험 재료 및 실험 방법

1) 실험재료

실험재료로는 ICR계의 마우스를 교배시켜 사용하였다. 임신한 적이 없는 암컷 30마리를 밤에 숫컷과 교배시킨 후, 다음날 아침에 임

신여부를 확인하였다. 임신의 여부는 마우스의 질입구에 질마개(vaginal plug)가 관찰되었을 때 임신된 것으로 하고, 이때를 임신1일째로 하였다. 질마개가 관찰되지 않을 때는, 질도말(vaginal smear)을 시행하였다. 질도말을 광학현미경으로 관찰하여 정자가 발견되면 임신된 것으로 판정하였다.

발생 7일과 9일이 경과한 배자를 이용하였는데, 그 이유는 7일째의 배자에서 신경관과 몸분절의 형성이 시작되기 때문이다. 9일째의 배자에서는 신경관의 융합이 완료되고, 신경능선세포의 이동이 다양한 상태로 나타난다. 또한, 몸분절이 잘 형성되고, 피부근육분절(dermomyotome)과 골격분절(sclerotome)로 분화되는 시기이기 때문이다.

2) 조직처리

임신 7일과 9일째 되는 암컷을 경추 탈구하여 죽인 후, 개복하여 자궁전체를 절제하였다. 자궁을 10% buffered formalin 용액에 24시간동안 고정시킨후, 24시간 동안 흐르는 물에 충분히 씻었다. 이 조직을 탈수와 투명의 과정을 거쳐 paraffin에 포매한 후 블록을 만들어 6 μ m의 두께로 연속절편 하였다.

3) 면역 조직화학 염색

우선 배자에서의 몸분절과 신경관의 위치를 확인하기 위해 절편 중의 일부를 선택하여 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 시행하였다. 신경관과 몸분절이 관찰되면, 그 이후의 절편을 면역 조직화학법을 이용하여 염색하였다.

절편을 albumin-coated slide에 붙인 후 하룻밤 동안 57°C의 incubator에 보관하였다. 이것을 xylene에 처리하여 탈파라핀화 시킨 후, avidin-biotin method를 이용한 간접 면역 조직 화학법을 시행하였다. 제1항체로는 rabbit anti-mouse laminin(Polyscience Co.)과 rabbit anti-human fibronectin(Dako Co.)을 각각 1:16, 1:100으로 phosphate-buffered solution(PBS)에 희석시켜 사용하였다. 제2항체로는

goat anti-rabbit IgG(Lipshaw Co.)를 사용하였다.

탈파라핀화된 조직을 PBS에 5분간 담근 후, 3% H₂O₂에 10분간 처리하여 endogenous peroxidase의 활성도를 감소시켰다. 증류수와 PBS에 3분간 씻은 후 비특이적 반응을 막기 위해 protein-blocking agent를 첨가하고, 37°C의 humidified incubator에서 반응시켰다. 희석된 제1항체를 첨가하여 잘 혼합하여 1시간동안 37°C의 humidified incubator에서 반응시킨 후, PBS에 3분간 씻고, 다시 제2항체를 37°C의 humidified incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. Avidin-biotin conjugated peroxidase를 항체에서와 같은 방법으로 반응시킨 후 발색을 위해 chromogen solution을 떨어뜨렸다. 대조염색을 위해 hematoxylin을 사용하였고, Gel-Tol로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

1) 발생 7일째 배자

발생 7일째의 배자에서는 신경관이 1층의 거짓중층원주상피(pseudostratified columnar epithelium)로 관찰되었고, 몸분절은 1층 또는 2층의 세포들이 삼각형으로 밀집되어 있었다. 신경관과 몸분절사이의 중배엽 부위에서는 세포들의 수가 적고 세포외 공간이 비교적 넓었다.

Rabbit anti-mouse laminin으로 반응시킨 조직에서는 신경관을 둘러싸는 기저막을 따라 연한 갈색으로 염색되었고 몸분절을 둘러싸는 기저막에도 염색되었음이 관찰되었다(fig.1-A, 1-B). 또한 rabbit anti-mouse fibronectin으로 반응시킨 조직에서도 fibronectin에 대한 반응과 유사한 결과가 나타났으나(fig.2-A, 2-B), 염색의 정도는 9일째 배자에 비해 뚜렷하지 않았다. 신경능선세포들 역시 신경관과 표면상피가 만나는 부위에서 돌출된 모양으로

관찰되었다(Fig.1B, 2-B). 그러나, 신경관과 몸분절 사이에 있는 세포의 공간에는 laminin과 fibronectin을 관찰할 수가 없었다. 즉 7일째의 배자에서는 다른 연구자들의 결과와 같이 fibronectin과 laminin이 신경관과 몸분절의 기저막에 분포함을 확인할 수 있었으나, 9일째의 배자와 비교하여 현저하지않는 것으로 나타났다. 특히 신경관과 몸분절 사이에 있는 세포의 공간에서는 laminin과 fibronectin을 관찰할 수 없었다.

2) 발생 9일째의 배자

발생 9일째의 배자에서는 전 배자의 세포의 공간을 통해 laminin과 fibronectin이 다량으로 분포되어 있었다(fig.3-A, fig.4-A). 신경관은 밀집된 신경상피세포(neuroepithelial cell)들로 구성되어 있었으며, 몸분절은 신경관의 바깥쪽으로 잘 분화되어 있었다. 또한 몸분절은 안쪽으로 골격분절이 형성되어 있었으며 바깥쪽으로는 피부근육분절이 밀집되어 형성되어 있었다(fig.3-A, fig.4-A). 신경능선세포는 신경관과 표면상피가 만나는 부위와 신경관과 몸분절의 사이에 존재하였다.

Anti-laminin을 반응시킨 경우에는 배자의 전 부위를 통해 신경관, 몸분절, 소화관 상피의 기저막을 따라 균등하게 염색이 되었으며(fig.3-A), 특히 신경관의 후외측의 공간이 뚜렷하게 염색되었다. 몸분절 상부의 기저막에도 강하게 반응이 나타났으며(fig.3-B), 또한, 신경능선세포가 이동하는 부위의 세포의 공간이 다른 부위의 세포의 공간에 비해서 진하게 염색되었다(fig. 3-B). 특히 신경관이 표면상피와 만나는 부위와, 신경관과 몸분절 사이의 공간에서 반응이 잘 나타났다(fig. 3-C, D).

Anti-fibronectin을 반응시킨 경우에도 배자의 전 부위를 통해 염색이 되었으며, laminin에 비해 현저하지는 않았으나 신경관의 기저막을 따라 잘 관찰되었다(fig. 4-B, C, D). Anti-laminin으로 반응시킨 경우와 마찬가지로 신경관과 표면상피가 만나는 부위, 그리고 몸

분절과 신경관사이의 공간이 진하게 염색되었다(fig. 4-C, D).

즉, anti-laminin과 anti-fibronectin을 반응시킨 배자에서는 7일째에 비해 9일째의 배자에서 그 염색의 정도가 현저히 증가했으며, 특히 신경관 주위에서는 신경관의 후외측으로 염색 정도의 증가를 보였다. 또한 신경능선세포가 이동하는 부위의 세포의 공간 즉, 신경관과 표면상피가 만나는 부위와, 신경관과 몸분절 사이의 공간에서 잘 관찰되었다.

고 찰

Laminin과 fibronectin은 type IV collagen과 함께 세포의 기질의 중요한 성분중의 하나로 알려져 있다^{1,17,21,25,28,34}. 이러한 glycoprotein 분자들의 역할에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있는데, 특히 세포들의 접착과 이동에 미치는 역할에 대해 중점적으로 논의되어 왔다.

Wu 등⁶⁴은 laminin이 마우스의 배자에서 8-세포기에 처음 관찰되었다고 보고하였으며, Dziadek과 Timpl¹⁶은 2-세포기에 처음 나타났다고 보고하였다. 또한 이들은 배자가 착상되기 전, 세포들 사이에 일어나는 상호작용을 laminin이 매개한다고 보고하였으며, 오디배(morula)시기에 있어 세포들이 서로 밀착하게끔 할 뿐 아니라, 세포골격의 형성과 세포극성(cellular polarity)을 나타내는 데도 관여한다고 하였다⁶⁵. 그리고 Armant 등⁵은 세포배양 실험을 통해 두종류의 세포의 기질 즉, fibronectin과 laminin이 마우스의 주머니포배(blastocyst)의 부착과 성장을 촉진한다는 것을 밝혀내었다^{10,30,45,56,60,61}. 세포와 조직의 분화 과정에 있어 신경능선세포들은, 광범위하게 이동하여 다양한 세포와 조직으로 발달하기 때문에 많은 연구자들은 신경능선세포들을 이동하게 하는 요인에 대해 주목해 왔다. 특히 배자 초기에 나타나는 세포의 기질들 즉, fibronectin과 laminin의 분포와 신경능선세포들의

이동 사이에는 서로 연관이 있음을 여러 연구자들에 의해 제시되었다^{6,7,14,15,41,46,48}.

신경능선세포는 외배엽과 신경관사이의 경계 부위에 있는 상피를 형성하고 있는데, 이들 세포들이 기저막을 통과하는 기전에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다. 이동하기 전에 이 세포들은 type IV collagen과 laminin 등이 포함되어 있는 기저막위에 배열되어 있다. 신경능선세포들의 이동이 시작되기 직전에, 연결되어 있던 배자의 머리쪽에 있는 신경능선세포의 기저막이 부분적으로 파괴되고, 그 사이를 통해 세포들이 이동하기 시작한다³⁵. 기저막의 부분적인 파괴를 일으키는 기전은 아직 밝혀지지 않고 있으나, 아마도 신경관이 닫히는 과정과 관련되는 것으로 추측하고 있으며^{12,27}, 이 과정에서 나타날 수 있는 물리적인 장력과 기계적인 힘에 의해 기저막이 파괴되는 것으로 제시되고 있다.

이외에도 기저막을 파괴 시키는 요인으로는 hyaluronic acid를 들 수 있다. Pratt 등은 hyaluronic acid의 침전이 세포를 증식시키고, 세포가 없는 부위의 팽창을 일으켜, 이러한 팽창에 의한 국소적인 압력의 증가로 인해 기저막의 파괴가 일어난다고 보고되었다⁴³. 또한 plasmin과 collaenase의 국소적인 활성도가 증가되어 기저막의 laminin과 type IV collagen이 파괴된다고 밝혀졌다⁵⁵. 그리고, 신경능선세포의 이동이 시작되는 것은 이들 세포들 사이의 접착력이 감소되는 것과 연관이 있다고 제시되었으며, 이 과정에서 세포를 서로 접촉시키는 분자가 관여 하는 것으로 알려져 왔다^{13,52}.

지금까지 알려진 매개 물질로는 chondroitin sulfate proteoglycans^{5,58}, cytotactin¹¹, type I collagen 등이 있다. 신경능선세포의 이동경로는 많은 연구자들에 의해 밝혀져 왔다. Weston²⁵, Thiery 등⁵²이 autoradiography를 이용하여 이동경로를 이용하여 이동경로를 관찰한 이후, 여러 연구자들은 세가지의 주요한 경로가 있음을 제시하였다.

첫째로는 몸분절의 앞쪽을 지나, 배자의 배쪽으로 이동하는 경로를 들 수 있으며^{7,35,44,47}, 두번째로는 몸분절의 뒤쪽에 접해 있는 세포들이 신경관과 몸분절의 사이를 주행하는 것이다. 이들 세포들은 배근신경절(dorsal root ganglion)에서 발견할 수 있다⁴⁹. 마지막의 주요경로로는 외배엽의 바로 깊은 부위를 따라 후외측으로 이동하는 것이다. 이들 세포들은 멜라닌 세포들로 분화된다. 이렇게 신경능선 세포들은 일정한 여러 경로를 통해 이동하여 다양한 세포들로 분화되는데, 이들이 이동하는데 작용하는 기전에는 신경관이 중요한 요인이며, 아마도 신경관이 이러한 경로를 인식하게 하는 것으로 알려져 있다. 또한, Erickson 등과 Bronner-Fraser와 Cohen은 신경능선 세포들이 이러한 경로를 인식할 수 있는 능력이 있다고 보고하였다^{8,19}.

Rosario 등⁴⁶은 신경능선세포들이 정확한 이동경로를 인식하는데 필요한 물질이 fibronectin이라는 것을 밝혔는데, 이들은 신경능선 세포들이 fibronectin이 있는 부위로 이동하는 것을 실험을 통하여 확인하였다. 또한, Newgreen 등은 신경능선세포들이 laminin이 풍부한 부위로도 이동한다고 제시하였다³⁹. Bronner-Fraser⁶¹는 신경능선세포의 fibronectin과 laminin에 수용체와 반응하는 항체를 조류의 초기배자에 주입한 결과 신경능선세포의 이동이 잘 이루어지지 않는다는 것을 관찰하였다. 이 실험을 통해 이들은, 신경능선세포가 fibronectin과 laminin을 인식하는 과정이 이 세포들의 이동에 중요한 요인이 됨을 밝혔다.

Loring과 Erickson³⁵은 신경능선세포가 이동하는 부위인 몸분절의 앞쪽과 신경능선세포들이 이동하지 않는 뒤쪽에서의 fibronectin과 laminin의 농도가 서로 차이가 있음을 확인하였다. 몸분절은 골격분절과 피부근육분절로 나뉘어지며, 이때 신경능선세포들은 몸분절이 분리되는 공간으로 이동하게 된다. 분리된 부위에 있는 몸분절의 세포표면에 laminin이 존재하여 신경능선세포들이 이동하도록 유도

한다고 보고 하였다.

이와같이 신경능선세포들의 이동과 몸분절의 형성은 서로 상관 관계가 있음을 추측할 수 있으나, 몸분절 형성의 기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. Lash와 Ostrovsky³¹⁾는 몸분절의 형성을 다섯가지의 시기로 구분하여 서술하였다. 제1기는 보통의 방법으로는 형태적인 변화를 감지할 수 없으나, 분절판에서 몸분절의 전 단계인 세포들이 분열하여 나선형모양으로 관찰되는데, 이러한 나선형의 군집을 몸분절구라고 한다. 제2기는 분절판의 머리쪽에서 몸분절의 전구세포들이 밀집되는 것을 관찰할 수 있는 시기이다. 제3기에서 5기까지는 분절판이 몸분절로 나뉘어지는 시기이다. Fibronectin은 제1기와 2기에서 세포들이 군집을 형성하는 과정에 관여 하는 것으로 관찰되었다.

Ostrovsky 등⁴²⁾에 의하면 몸분절이 될 부위의 앞쪽에 fibronectin의 농도가 증가함과 동시에, 이 부위의 세포들이 응집이 시작되는 것으로 밝혀졌다. 또한 Lash 등³¹⁾과 Cheney와 Lash⁹⁾의 in vitro 연구에서 분절판의 머리쪽의 세포들은 분리된 후 바로 몸분절의 형태로 재응집이되었지만, 분절판의 꼬리쪽의 세포들은 분리된 후 다시 응집되지 않았다. 그러나, fibronectin을 첨가하여 배양하면 이 세포들이 다시 응집되는 것을 관찰하였다. 이러한 두가지의 실험을 통해, 몸분절의 형성의 과정에서 fibronectin이 중요한 역할을 하며, fibronectin의 특징인 세포 접착성에 의해서 세포의 응집이 유도된다는 것을 제시하였다.

Fibronectin과 마찬가지로 laminin 역시 세포의 접착에 중요한 역할을 한다는 것이 여러 실험을 통해 밝혀졌으며, 이러한 설질에 따라 몸분절 형성 중의 세포의 응집에도 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. 아직은 몸분절 형성 중의 laminin의 분포와 변화에 대한 연구가 충분하지 않다. 본 실험의 결과에서와 같이 몸분절의 기저막과 주위의 세포의 공간에 laminin이 Fibronectin과 마찬가지로 높은

농도로 분포되어 있음을 관찰할 수 있었는데, 이러한 사실을 통해 몸분절의 형성에 이 glycoprotein분자가 중요한 역할을 하는 것으로 추측하고 있다.

개체의 발생 중 어떤 조직의 발달 및 분화는 주위 조직의 발달과 서로 상호관계를 가지면서 이루어지는 것으로 밝혀지고 있다. 신경관의 발생, 즉 신경계의 발달과 신경능선세포들의 이동과 분화, 그리고 몸분절의 형성과 골격계로의 분화는 서로 연관이 있다고 생각된다. 이러한 연관성을 이끌어 내는 것이 무엇인지, 또한 어떤 물질이 관여 하는 지에 대하여 본 실험이 이루어졌으며, 배자를 관찰한 결과, 신경관과 몸분절, 그리고 신경능선세포가 이동하는 주된 공간, 특히 신경관과 몸분절 사이의 공간에서 fibronectin과 laminin의 분포가 현저함을 관찰 할 수 있었다. 이러한 사실과, 이전의 실험들을 통해서 밝혀진 fibronectin과 laminin의 역할을 미루어 볼 때, 신경관의 발달 및 신경능선세포의 이동, 그리고 몸분절이 형성되고, 발달하는 과정에서 각각의 세포들에 의해 생산된 laminin과 fibronectin이 상호간의 발달에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 나아가서 개체의 발생에 있어 각 조직과 기관의 발달은 독립적인 과정이 아니며, 서로 밀접한 관계에 의해 하나의 개체로 발달하는 것으로 추측된다. 그리고 이러한 발달과정들을 총체적인 개체의 발달로 연결하는 고리의 역할을 laminin과 fibronectin 등의 세포외 기질이 수행하고 있다고 생각된다. 특히 laminin은 발생 중 제일 먼저 나타나는 세포외 기질이기 때문에, 발생초기에 있어 세포의 분화와 전체적인 발달을 유도하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 이를 밝히는 연구들이 계속되어야 할 것이다.

요 약

신경관과 몸분절이 형성하는 시기와 신경능선세포들이 이동할 때, 신경관과 몸분절 주위

의 세포의 공간에서 fibronectin과 laminin의 분포에 따른 신경능선세포의 이동과 몸분절의 형성과의 상관관계를 연구하고자, 발생 7일과 9일째의 마우스의 배자를 실험재료로 하여 indirect avidin-biotin immunoperoxidase method로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 발생 7일째의 배자에서는 laminin과 fibronectin의 분포를 신경관과 몸분절의 기저막을 따라 관찰할 수 있었으나, 신경관과 몸분절의 사이에 있는 세포의 공간에는 laminin과 fibronectin을 관찰할 수가 없었다.
2. 발생 9일째의 배자에서는 전 배자의 세포의 공간을 통해 fibronectin과 laminin이 다량으로 분포되어 있었다. 신경능선세포가 이동하는 부위의 세포의 공간에는 다른 부위의 세포의 공간에 비해서 진하게 염색되었으며, 특히 신경관과 표면상피가 만나는 부위와 몸분절 사이의 공간에서 잘 관찰되었다.
3. 발생 7일째에 비해서 9일째의 배자에서는 전체적인 염색의 정도가 현저히 증가했으며, 특히 신경관과 몸분절 사이에 존재하는 세포의 공간에서의 laminin과 fibronectin의 분포가 증가하였다.

REFERENCES

1. Abrahamson DR : Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* 149 : 257-278, 1986
2. Armant DR, Kaplan HA, Lennarz WJ : Fibronectin and laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Devl Biol* 116 : 519-523, 1986
3. Bancroft M, Bellairs R : The neural crest cells of the trunk region of the chick embryo studied by SEM and TEM. *Zoon* 4 : 73-85, 1976
4. Bellairs R, Veini M : Experimental analysis of control mechanisms in somite segmentation in avian embryos. II. Reduction of material in the gastrula stages of the chick. *J Embryol Exp Morph* 79 : 183-200, 1984
5. Brauer Pr, Bolender DL, Markwald RR : The distribution and spatial organization of the extracellular matrix encountered by mesencephalic neural crest cells. *Anat Rec* 211 : 57-68, 1985
6. Bronner-Fraser M : An antibody to receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development in vivo. *Devl Biol* 117 : 528-536, 1986
7. Bronner-Fraser M : Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Devl Biol* 115 : 44-55, 1986
8. Bronner-Fraser M, Cohen AM : Analysis of the neural crest ventral pathway using injected tracer cells. *Devl Biol* 77 : 130-141, 1980
9. Cheney CM, Lash JW : An increase in cell-cell adhesion in the segmental plate results in a meristic pattern. *J Embryol Exp Morph* 79 : 1-10, 1984
10. Cohen A, Hay ED : Secretion of collagen by embryonic neuroepithelium at the time of spinal cord-somite interaction. *Devl Biol* 46 : 262-280, 1971
11. Crossin KL, Hoffman S, Grumet M, Thieryn JP, Edelman GM : Site-restricted expression of cytactin during development of the chicken

- embryo. *J Cell Biol* 102 : 1917-1930, 1986
12. Di Virgilio G, Lavenda N, Worden JL : Sequence of events in neural tube closure and the formation of the neural crest in the chick embryo. *Acta Anat* 68 : 127-146, 1967
 13. Duband JL, Rochert S, Chen WT, Yamada KM, Thiery JP : Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo : Location and possible role of the putative fibronectin. *J Cell Biol* 102 : 160-178, 1986
 14. Duband L, Thiery JP : Distribution of laminin & collagens during avian neural crest development. *Development* 101(3) : 461-478, 1987
 15. Duband JL, Thiery JP : Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. *J Cell Biol* 93 : 308-323, 1982
 16. Dziadek M, Timpl R : Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Devl Biol* 111 : 372-382, 1985
 17. Ekblom P : Formation of basement membranes in the embryonic kidney : An immunohistological study. *J Cell Biol* 91 : 1-10, 1981
 18. Ekblom P, Alitalo K, Vaheri A, Timpl R, Saxen L : Induction of basement membrane glycoprotein in embryonic kidney : Possible role of laminin in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 485-489, 1980
 19. Erickson CA, Tosney KW, Weston JA : Analysis of migrating behavior of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. *Devl Biol* 77 : 142-156, 1980
 20. Erickson C, Weston JA : An SEM investigation of neural crest migration in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 74 : 97, 1983
 21. Fitch JM, Linsenmayer TF : Monoclonal antibody analysis of ocular basement membranes during development. *Dev Biol* 95 : 137-153, 1983
 22. Gardner JM, Fambrough DM : Fibronectin expression during myogenesis. *J Cell Biol* 96 : 474-485, 1983
 23. Goodman SL, Risse G, Von der Mark K : The E8 subfragment of laminin promotes locomotion of myoblasts over extracellular matrix. *J Cell Biol* 109(2) : 799-809, 1989
 24. Hay ED : Extracellular matrix. *J Cell Biol* 91 : 2056-2235, 1981
 25. Ikawa H, Trelstad RL, Hutson JM, Mangano TF, Donahoe PK : Changing patterns of fibronectin, laminin, type IV collagen and a basement membrane proteoglycan during rat Mullerian duct regression. *Devl Biol* 102 : 206-263, 1984
 26. Johnston M : A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat Rec* 156 : 143-156, 1966
 27. Karfunkel P : The mechanism of neural tube formation. *Int Rev Cytol* 38 : 245-271, 1974
 28. Kefalides NA : Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 6 : 63-104, 1973
 29. Kleinman HK, Cannon FB, Lauri GW, Hassel JR, Aumailly M, Terranova VP, Martin GR, Dubois-Dalq M :

- Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* 27 : 317-326, 1985
30. Krotoski DM, Domingo C, Bronner-Fraser M : Distribution of a putative cell surface receptor for fibronectin and laminin in the avian embryo. *J Cell Biol* 103 : 1061-1071, 1986
 31. Lash JW, Seitz AW, Cheney CM, Ostrovsky D : On the role of fibronectin during the compaction stage of somitogenesis in the chick embryo. *J Exp Zool* 232 : 197-206, 1984
 32. Laurie GW, Bing JT, Kleinman HK, Hassell JR, Aumailley M, Martin GR, Feldmann RJ : Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol* 189 : 205-216, 1986
 33. Laurie GW, Leblond CP, Martin GR : Light microscopic immunolocalization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin in the basement membranes of a variety of rat organs. *Am J Anat* 167 : 71-82, 1983
 34. Leblond CP, Inoue S : Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185 : 367-390, 1989
 35. Loring JF, Erickson CA : Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Devl Biol* 121 : 220-236, 1987
 36. Martinez-Hernandez A, Amenta PS : The basement membrane in pathology, *Lab Invest* 48(6) : 656-675, 1983
 37. Martin GR, Timpl R : Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol* 3 : 57-85, 1987
 38. Newgreen DF, Gibbins IL : Factors controlling the time of onset of the migration of neural crest cells in the fowl embryo. *Cell Tiss Res* 224 : 145-160, 1982
 39. Newgreen DF, Scheel M, Kastner V : Morphogenesis of sclerotome and neural crest in avian embryos : In vivo and in vitro studies on the role of notochordal extracellular material. *Cell Tiss Res* 244 : 299-313, 1986
 40. Newgreen DF, Thiery JP : Fibronectin in early avian embryos : Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tiss Res* 211 : 269-291, 1980
 41. Noden DM : An analysis of the migratory behavior of avian cephalic neural crest cells. *Devl Biol* 42 : 106-130, 1975
 42. Ostrovsky D, Cheney CM, Seitz AW, Lash JW : Fibronectin distribution during somitogenesis in the chick embryo. *Cell Differ* 13 : 217-223, 1984
 43. Pratt RM, Larsen MA, Johnston MC : Migration of cranial neural crest cell in a cell-free hyaluronate-rich matrix. *Devl Biol* 44 : 298-305, 1975
 44. Rickman M, Fawcett JW, Keynes RJ : The migration of neural crest cells and the growth of motor neurons through the rostral half of the chick somite. *J Embryol Exp Morph* 90 : 437-455, 1985
 45. Rogers SL, Edson KJ, Letrouneau PC : Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. *Devl Bio* 113 : 429-435, 1986

46. Rovasio RA, Delouree A, Yamada KM, Timpl R, Thiery JP : Neural crest cell migration : Requirement for exogenous fibronectin and high cell density. *J Cell Biol* 96 : 462-473, 1983
47. Sanes JR : Laminin for axonal guidance ? *Nature* 315(7) : 714-715, 1985
48. Sternberg J, Kimber SJ : Distribution of fibronectin, laminin and entactin in the environment of migrating neural crest cells in early mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 91 : 267-282, 1986
49. Teillet MA, Kalcheim C, Le Douarin NM : Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo : Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Devl Biol* 120 : 329-347, 1987
50. Terranova VP, Liotta La, Russo RG, Martin GR : Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. *Cancer Res* 42 : 2265-2269, 1982
51. Terranova VP, Rohrbach DH, Martin GR : Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22 : 719-726, 1980
52. Thiery JP, Duband JL, Delouree A : Pathways and mechanism of avian trunk neural crest cell migration and localization, *Devl Biol* 93 : 324-343, 1982
53. Thiery JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM : Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natn Acd Sci USA* 79 : 6737-6741, 1982
54. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR : Laminin. A glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 259 : 9933-9937, 1979
55. Tosney KW : The early migration of neural crest cells in the trunk region of the avian embryo. An electron microscopic study. *Devl Biol* 62 : 317-333, 1978
56. Trelstad RL, Hay ED, Revel JP : Cell contact during morphogenesis in the chick embryo. *Devl Biol* 16 : 78-106, 1967
57. Tucker GC, Ciment G, Thiery JP : Pathways of avian neural crest cell migration in the developing gut. *Devl Biol* 116 : 439-450, 1986
58. Tucker RP, Erickson CA : The control of pigment cell pattern formation in the Californian newt, *Tarichia torosa*. *J Embryol Exp Morph* 97 : 141-168, 1986
59. Valinsky JE, Le Douarin NM : Production of plasminogen activator by migrating cephalic neural crest cells. *EMBO J* 4 : 1403-1406, 1985
60. von der Mark K, von der Mark S, Gay S : Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. *Devl Biol* 48 : 237-249, 1976
61. von der Mark K, von der Mark H, Timpl R, Trelstad RL : Immunofluorescent localization of collagen type I, II and III in the embryonic chick eye. *Devl Biol* 59 : 75-85, 1977
62. Wan YJ, Wu TC, Chung AE, Damjanov I : Monoclonal antibodies to laminin reveal the heterogeneity of basement membranes in the developing and

- dult mouse tissues. *J Cell Biol* 98 : 971-979, 1984
63. Weston J : A radiographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Devl Biol* 6 : 274-310, 1963
64. Wu TC, Wan YJ, Chung AE, Damjanov I : Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses. *Devl Biol* 100 : 496-505, 1983
65. Ziomek CA, Johnson MH : Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomere at compaction. *Cell* 21 : 935-942, 1980

LEGENDS FOR FIGURES

- Fig.1.** Indirect avidin-biotin immunoperoxidase staining for laminin of frontal sections of 7-day mouse embryos, embedded in paraffin.
A : x100, B : x200, Neural crest cells can be seen (arrows). Basement membranes of the neural tube and somite are stained (arrowheads). N : neural tube, S : somite.
- Fig.2.** Indirect avidin-biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of frontal sections of 7-day mouse embryos, embedded in paraffin.
A : x100, B : x200, Neural crest cells can be seen (arrows). Basement membranes of the neural tube and somite are stained (arrowhead). N : neural tube, S : somite.
- Fig.3.** Indirect avidin-biotin immunoperoxidase staining for laminin of frontal sections of 9-day mouse embryos, embedded in paraffin.
A : x100 B : Extracellular space between the neural tube (N), the sclerotome (SC) and dermomyotome(DM), is strongly stained. x200 C and D : Posterolateral area of the neural tube and basement membrane is stained (arrows). x400
- Fig.4.** Indirect avidin-biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of frontal sections of 9-day mouse embryos, embedded in paraffin.
A : x100 B and C : Extracellular space between the neural tube (N), the sclerotome (SC) and dermomyotome(DM) is strongly stained. x200 D : Posterolateral area of the neural tube and basement membrane is strongly stained (arrows). x400.

PLATE 1

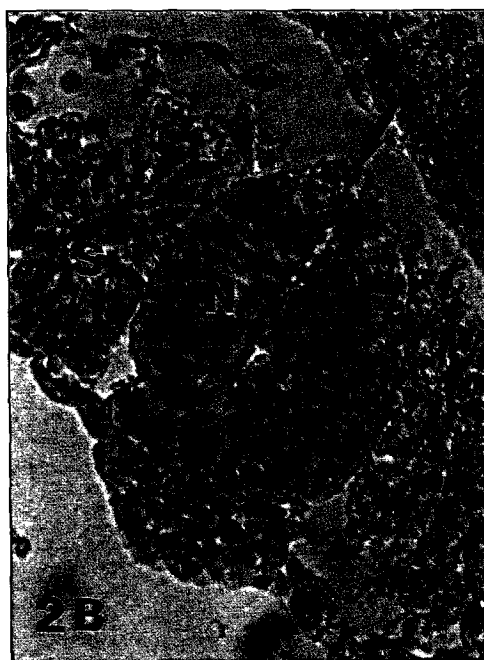
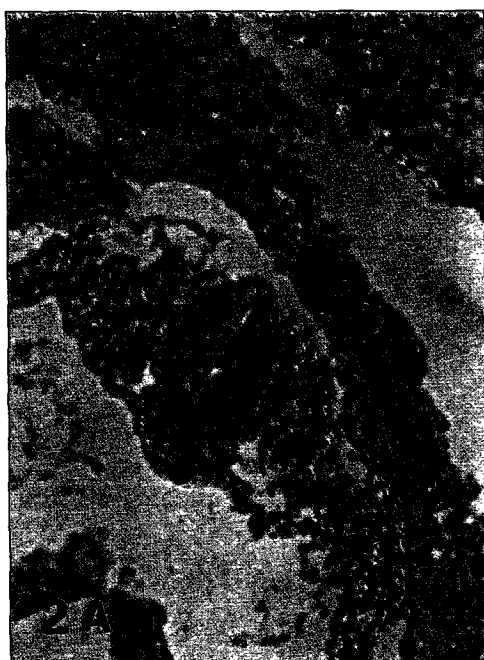


PLATE 2



PLATE 3

