

발생초기 마우스 배자에 있어서의 Fibronectin 분포에 관한
면역화학적 연구

고신대학교 의학부 해부학교실

박귀애, 김순옥

**Immunohistochemical Investigation For Distribution of
Fibronectin in the Early Developing Mouse Embryos**

Kwiae Park, Soon Ok Kim

Department of Anatomy

Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

=Abstract=

It is known that the organogenesis is established as a result of migration of three germ cell layers in the early stage of embryogenesis. In an attempt to examine the distribution and expression patterns of fibronectin, immunohistochemical localization was performed.

Mouse embryos of gestational age 6 to 13 days were observed. Paraffin-embedded sections were immunostained with antibody to fibronectin(indirect Avidin-Biotin peroxidase method).

1. In the early stage of blastocyst(6th day mouse embryo), intracellular expression of fibronectin was observed in primitive endodermal cells of the inner cell mass. However, positivity for intracellular fibronectin diminished as gestational age increased.

2. Extracellular expression of fibronectin was detected in the interstitial spaces of primitive endodermal cells prior to differentiation and was noted on the inner surface of trophoblast and extraembryonic endoderm.

3. Extracellular fibronectin was also reactive in intervening spaces of each germ cell layer.

4. In addition, extraembryonic membrane(chorion and yolk sac wall) expressed fibronectin.

These findings may support the theory that fibronectin is essential to the proper location of cells in the early developing embryo.

Key Words : Fibronectin, Blastocyst, Ectoplacental cone, egg cylinder.

서 론

마우스 발생 약 4일경 주머니포배(blastocyst)가 자궁에 도달되며 이때 주머니포배는 단층의 영양막(trophoblast)에 의하여 둘러싸여있고 그 내부의 중심부 한쪽 즉, 동물극에 입방세포로된 내세포괴(inner cell mass)가 있다. 이들 두 종류의 세포가 출현 후 내세포괴는 두층으로 분화되는데 내층의 외배판(primitive ectoderm, epiblast)과 그 주변층인 원시내배엽(primitive endoderm, hypoblast)을 형성한다. 원시내배엽에서 장측 및 벽측내배엽이 발생된다. 이 두 종류의 내배엽세포는 그 위치와 형태학적 및 생화학적 특성이 다르다^{16,20}. 장측내배엽세포는 egg cylinder를 덮는 연속된 상피층을 형성하고 alpha-fetoprotein을 생산한다¹⁴. 벽측내배엽세포는 섬유모세포와 비슷하며, 영양막세포의 내면에 위치한다. 이 세포는 과립소포체를 가지고 있으며 Reichert's membrane의 구성요소의 대부분을 이루는 laminin, type IV collagen, entactin 및 heparan sulfate proteoglycan을 합성한다^{21,22}. egg cylinder의 후측 끝에서 중배엽세포가 나타나기 시작하여 원시내배엽과 원시외배엽세포 사이에 위치하여 결국 내배엽, 중배엽, 외배엽 이렇게 세층의 배엽층(germ layer)이 형성된다.

fibronectin과 laminin은 세포 간질의 하나인 glycoprotein을 구성하는 한 구성요소로서^{1,25,26,27,28}, 세포와 세포외간질 사이에서 상호작용을 하는 것으로 알려져 있다¹⁰. 특히 배자 발생 진행중 매우 초기에 나타나서^{8,29,30,34} 세포 이동을 유도하며^{4,36}, 세포를 세포외간질에 접착시키는 등의 역할을 하며, 또한 기저막의 중요한 성분으로서 세포 부착과 세포 이동시 기질 역할을 한다^{11,12,13,31,36,41,42}.

Linder등³⁰은 fibronectin이 계태조직의 세포층 사이에서 나타남을 관찰하였다. in vitro에서 근발생시^{5,18,23}, 연골발생시^{9,19} 그리고 신장의 세뇨관 발생시⁴⁴ fibronectin의 분포의 변화가 관찰, 보고 되므로 초기 배자

발생과 fibronectin의 연관성에 대한 연구에 촉진제가 되었다. fibronectin은 내배엽세포와 중배엽세포의 이동을 용이하게 하는 기질로 작용하고 그들 세포의 이동이 중지되기 시작할 때 laminin을 합성하고 이 laminin은 하위 세포의 간질과 상피의 상호작용을 확립시키는데 기여한다^{15,35,40,33}.

이와같이 fibronectin의 접착성이 개체의 배자 형성중, 조직의 재구성과 세포 이동에 핵심적인 역할을 하여 생물의 형태와 발달에 관여하는 것으로 알려져있다. 발생초기 fibronectin의 분포를 수정란을 조직배양하여 연구한 업적은 많이 보고되어 있으나 자궁 내에서 정상 발생한 발생초기 배자에서의 분포를 연구한 업적은 비교적 희소하며 국내에서는 아직 이에 대한 연구 보고가 없을 뿐만 아니라 조직 배양하여 연구한 경우도 대부분 면역형광법에 의한 것이므로 간접면역조직화학법으로 관찰할 수 있는 주변 세포 및 조직과의 관계는 알 수 없었다. 그러므로 본 연구자는 발생중인 마우스 배자의 fibronectin의 발생에 따른 분포를 간접면역조직화학법으로 염색하여 그 분포를 형태학적으로 연구하여 이 분야에 대한 기초자료를 제공하고자 본 실험을 실시하였다.

실험 재료 및 실험 방법

1) 실험 재료

실험재료로는 ICR계의 마우스(체중 12~20gm)를 사용하였다. 임신한 적이 없는 암컷과 수컷을 밤에 교배시킨 후, 다음날 아침에 임신여부를 확인하였다. 임신여부는 암컷의 질입구에 질마개(vaginal plug)가 관찰되었을 때 임신한 것으로 보고, 이때를 임신 1일째로 하였다. 질마개가 관찰 되지 않을 때는, 질도말(vaginal smear)을 시행하여 광학현미경으로 정자가 발견되면 수정된 것으로 간주하고 실험 재료로 삼았다. 모든 실험 재료는 수태한 자궁만을 사용하였으며 마우스의 자궁을 적출하여 수태 여부를 확

인 하였다.

자궁내에 있는 발생 6일에서 13일까지 경과한 배자를 이용하였다.

2) 조직 처리

임신 6일에서부터 13일까지의 암컷을 경추 탈구하여 죽인 후, 개복하여 자궁 전체를 절제하였다. 자궁을 10% buffered formalin 용액에 24시간 동안 고정시킨 후, 24시간 동안 흐르는 물에 충분히 씻었다. 이 조직을 탈수와 투명(clearing)의 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 블록을 만들어 6 μ m의 두께로 연속 절편 하였다.

3) 면역 조직화학 염색

발생중인 배자의 구조들을 확인하기 위해 절편 중의 일부를 선택하여 hematoxylin-eosin(H-E)염색을 시행하였다. 실험에 필요한 부위가 확인된 절편들을 간접면역조직화학법을 이용하여 염색 하였다. 탈파라핀과 조직의 접착성을 증대시키기 위해 Slide를 57 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 incubation시킨 다음, 이것을 xylene에 처리하여 조직내 잔여 파라핀을 완전히 제거시켰다. 탈파라핀한 조직을 알코올과 증류수로 세척한 후 P-BS(phosphate-buffered solution)에서 5분간 세척하여, Avidin-Biotin method를 이용한 간접면역조직화학염색법을 시행하였다.

제1차 항체로는 rabbit anti-mouse fibronectin(BioGenex Co.)을 1:300으로 PBS에 희석시켜 사용하였다. 제2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG(Lipshaw Co.)를 사용하였다. 수세 후, 조직을 3% H₂O₂에 5분간 처리하여 조직내 endogenous peroxidase의 활성도를 감소시켰다. 증류수와 PBS로 씻은 후, 비특이적 항체들의 면역 염색 반응을 막기 위해 protein-blocking agent를 첨가하였다. 또한 proteolytic enzyme를 사용하여 조직항원의 노출을 용이하게 하였다. 다음, 희석된 1차 항체를 37 $^{\circ}$ C humidified incubator에서 30분 동안 반응 시킨 후, PBS에 3분간 씻

고, 2차 항체로 똑같은 방법으로 10분 동안 반응 시킨 후, Avidin-Biotin conjugated peroxidase로 10분간 처리하여 PBS로 세척 후, 발색을 위해 chromogen solution을 첨가하였다. 후염색으로 hematoxylin을 사용 하였고, Gel-Tol로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

fibronectin의 분포를 발생중인 마우스 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일 및 13일 되는 배자와 그 임신 관련 주위 조직에서 관찰하였다. 관찰이 가능한 주머니포배시기에서 부터 기관이 발생되는 시기까지의 fibronectin분포를 관찰하였다.

1. 발생 6일째의 배자

발생 6일째의 마우스 배자는 주머니포배내에 egg cylinder로 나타나는데 egg cylinder는 내세포괴가 중앙 동물극에 위치하고 그 주위를 한층의 영양막세포가 싸고 있다. 내세포괴는 입방형의 외배엽세포가 cylinder모양으로 모여있고 그 주위를 그보다 키가 작은 한 층의 내배엽세포가 둘러 싸고 있다.

rabbit anti-fibronectin 반응이 배자에서는 내배엽세포내에서, 그리고 내배엽 구성 세포와 세포 사이에서 나타났다. 한편 배자외부에서는 영양막세포 내면에서 나타났다(Fig. 1 A, B).

2. 발생 7일~8일째의 배자

이때의 egg cylinder에서는 배자내배엽과 배자외배엽, 배자외내배엽과 배자외배엽, 양막, 양막강, 체강, 요막이 형성되었고 배자내배엽과 배자외배엽사이에 중배엽 세포가 나타나기 시작하였다(Fig. 3A).

fibronectin 반응은 배자의 내배엽, 중배엽 그리고 외배엽사이에 가느다란 띠의 형태로 나타났다. 특히 중배엽세포 주변에서는 세포 주변을 싸고 있는 것처럼 관찰된다(Fig.

3A, B, C, D). 내배엽 세포내에서의 반응은 현저히 감소되었다. 역시 Reichert's membrane과 영양막세포의 내측면에서도 관찰된다. 배자의내배엽과 외배엽에서도 반응이 관찰되었고 ectoplacental cone에서 강한 반응이 나타났다(Fig. 2A, B). 초기 요막에서도 약한 반응이 관찰되었다(Fig. 3).

3. 발생 9일째의 배자

fibronectin반응은 신경관 주위에서 나타나며(Fig. 4A, B) 주위의 중배엽 세포의 세포외 간질에 망상으로 퍼져있는 소견을 보인다.

4. 발생 10일~11일째의 배자

발생 10일의 배자에서 fibronectin 반응이 신경관 주변, 신경절 주변, 소화관의 점막 상피층, 그리고 배자내에 있는 세포외 간질에서 관찰된다(Fig. 5A, 6). 그리고 몸분절 주위와(Fig. 6) 심방과 심실의 심내막과 심외막에서 관찰된다(Fig. 7).

5. 발생 12일째 배자

fibronectin 반응이 몸에 있는 모든 간엽조직의 세포외 간질에서 망상으로 나타나며 이시기 이루어지는 모든 기관의 원기의 기저에서 반응이 나타났다. 영양막에서도 반응이 보인다(Fig. 8).

고 찰

fibronectin은 type IV collagen과 함께 세포외 기질을 구성하는 구성 성분의 일종으로 알려져 있다^{1, 25, 28}). 이러한 glycoprotein 분자들의 세포와 세포 및 세포외 기질의 접착, 세포이동, 그리고 악성조직의 출현⁴⁹)과 조직 손상시의 수복 과정^{48, 50})에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

anti-mouse fibronectin 반응이 발생 6일째 되는 마우스 배자의 원시내배엽세포내에서, 원시내배엽세포와 세포사이에서 관찰되었는데(Fig. 1) 이와같은 소견은 여러 연구자에 의하여 발표된 바와 동일하다^{43, 46}). 특히

Wartiovaara 등⁴³)은 fibronectin이 초기 마우스 배자에서 내세포외의 원시내배엽이 형성됨과 동시에 검출됨을 보고하였다. Enders 등¹⁶)은 후기의 주머니포배 원시내배엽세포에서 소포체의 팽대된 cisternae를 관찰하여 세포외 간질을 합성하고 있음을 확인 보고하였다. 또한 벽측 및 장측내배엽에서 fibronectin이 관찰되었으며 벽측내배엽세포에서 collagen 또 다른 종류의 glycoprotein이 합성되는 것을 증명하였다⁶). Stroband 등³⁹)과 Norberg³²)는 내배엽이 형성되기 이전 시기에 세포외 기질에서 fibronectin을 전자현미경으로 관찰하여 이 fibronectin이 내배엽세포의 이동을 위한 기질로 제공된다고 주장하였다. Richoux 등³³)은 확장된 돼지의 주머니포배의 내배엽과 영양막세포의 내면에서 fibronectin을 관찰하였다. 이 실험결과들은 본 연구자의 결과와 동일하였다. 또한 돼지 수정란을 조직배양하여 초기 egg cylinder의 원시내배엽세포에서 fibronectin을 검출하였다. 이와같은 현상은 외배엽세포가 fibronectin의 주된 생산 장소인 것 같다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 외배엽세포에서 이 단백질이 관찰되지 않았다. 이것은 아마도 외배엽세포가 이 단백질을 분비하는 시기가 지났을 때인 것으로 추측된다.

fibronectin은 중배엽세포의 이동을 위한 기질의 역할도 하는데 내배엽과 외배엽 사이에 fibronectin이 섬유성 망상으로 존재하여 여기에 중배엽이 형성된다³³). 본 연구에서 중배엽은 발생 8일된 마우스 배자의 원시내배엽과 외배엽 사이에서 몇 층의 세포층으로 나타나기 시작하여(Fig. 3) 점차 빠른 속도로 증가되는 경향을 보였다. 발생중인 돼지 배자의 연구에 있어서 fibronectin이 중배엽 사이에서 검출되었고 좀 더 발생이 진행된 배자에서는 중배엽의 주된 세포 간질로 인정된다. 그러므로 fibronectin은 중배엽의 표식자(marker)로 사용할 수 있을 것 같다³³). 또 다른 분화의 표식자로는 α -fetoprotein이 장측내배엽의 표식자로 사용이

가능할 것 같다는 보고가 된 바 있고¹⁴⁾ plasminogen은 벽측내배엽의 표식자를 활성화시키는 물질로 보고된 바 있다³⁸⁾. 이러한 표식자들은 동물의 종류(spaces), 발생 시일 그리고 검출 방법에 따라 보고된 결과가 다를 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 fibronectin의 분포가 발생초기에는 중배엽세포의 세포막과 인접하여 세포를 둘러싸고 있는 것처럼 관찰되었으나(Fig. 3C, D) 시간이 경과됨에 따라 중배엽 세포 사이의 세포와 간질에서 망상으로 퍼져있는 상태로 관찰되었다. 이와같은 fibronectin 분포의 분석으로 fibronectin은 발생초기 내배엽 및 중배엽의 표식자가 될 수 있다는 설을 재확인하였다. 쿤 등⁴⁷⁾은 백서의 실험적 연골내골형성 과정에서 fibronectin의 분포가 세포질과 세포외 기질에 출현하여, 간엽세포의 이동과 분화에 밀접한 관련성이 있음을 보고하였다. 배자 발생시 다른 종류의 여러세포들 즉 쥐와 양서류의 원시배세포(primitive germ cell)^{2, 17, 20, 45)} 그리고 계태(chick embryo)의 신경능세포는 exogenous fibronectin에 의하여 이동된다¹¹⁾. 그러므로 이동하는 모든 세포는 그들 자신이 fibronectin을 분비하는 것은 아니다⁷⁾. 한편 쥐과의 벽측내배엽세포는 fibronectin을 합성하지 않는다^{3, 24)}. 돼지배자 연구에서 fibronectin은 내배엽 형성 이전의 주머니포배에서 출현된다고 보고되었는데 이것은 이동하는 중배엽 및 내배엽세포가 그들 자신이 분비한 fibronectin을 이용한다는 설과는 상반된다. Richoux 등³³⁾은 발생 8일에서 13일 사이의 내배엽과 영양막세포를 anti-fibronectin antibody로써 처리한 후 관찰하여 세포내 염색성을 확인하였는데 이 세포내의 염색은 anti-fibronectin IgG의 세포외 반응이 증가되는 시기이며 또한 내배엽과 중배엽이 이동되는 시기이기 때문이라고 결정되었다. 본 연구에서도 발생 마우스 배자 초기부터 13일까지 계속하여 영양막에서의 반응이 관찰되었다(Fig. 1-8). Zetter와 Martin⁴⁶⁾은 fibronectin이 조직배양 4일된 주머니

포배의 영양막 바깥면에서는 관찰되지 않았다고 하였다. 그러나 Wartiovaara 등⁴³⁾은 fibronectin이 4,5일된 주머니포배의 영양막 내면에서 관찰되었으며 발생 7일째에서의 trophoblast derived trophoblastic giant cell에서 fibronectin의 뚜렷한 세포질 염색을 관찰하였는데 이러한 세포질 염색은 in vivo에서의 다른 배자세포나 성숙세포에서는 검출할 수 없다고 하였다. 이에 비하여 조직배양세포에서는 많은 양의 fibronectin이 생산된다는 연구 발표가 있다³⁷⁾. 벽측내배엽과 영양막 사이에 fibronectin이 존재함으로써, 이 두 세포들 사이에 형성된 Reichert's membrane에 fibronectin의 분포를 가능케 하는 것 같다. 그러므로 본 fibronectin은 세포외 간질의 주된 구성 성분으로서 초기 배 발생에 있어 세포의 분리, 집착, 이동, 집합, 형태변화를 위하여 필요 불가결하다는 학문적 견해를 뒷받침하는 자료로 사용되리라 생각된다. 또한 발생학 영역에 있어서의 fibronectin의 연구는 암의 발생 및 전이 기구⁴⁹⁾, 그리고 조직 손상의 수복기전등^{48, 50)}의 학적 중요한 과제에도 그 공헌이 기대된다.

요 약

마우스 발생초기 세 배엽층(germ layer)이 형성되어 각 배엽의 세포가 이동하여 기관을 형성하게 되는데 그 시기의 fibronectin의 분포를 관찰하기 위하여 발생중인 마우스 배자를 실험재료로 하여 indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase method로 염색 후 광학현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포내 fibronectin은 내배엽세포가 이동하기 이전의 주머니포배 즉 발생 6일째의 마우스 배자의 원시내배엽세포에서 관찰되었다. 그러나 발생시간이 경과되어 중배엽이 나타나는 시기에는 내배엽세포내의 반응은 현저히 소실되었다.

2. 세포외 fibronectin은 원시내배엽세포의 간질에서, 그리고 영양막과 세포외내배

엽의 내면에서 관찰되었다.

3. 세포의 fibronectin은 내배엽, 중배엽 및 외배엽 각 층 사이에서도 관찰되었으며, 특히 내배엽과 외배엽 기저에서는 가느다란 선상으로 나타나는데 비해 중배엽에서는 그 세포를 둘러싸고 있는 것이 관찰되었다.

4. 배자의 막(용모막과 난황낭벽)에서도 관찰되었다.

이상의 결과로서 fibronectin이 내배엽세포와 중배엽세포가 이동하는데 중요한 기질로 사용된다는 설을 재확인 하였다.

REFERENCES

1. Abrahamson Dr: Recent studies on the Structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* 149: 257-278, 1986
2. Alvarez-Buylla A, M Merchant-Larios H: Mouse primordial germ cell use fibronectin as a substrat for migration. *Exp cell Res* 165: 362-368, 1986
3. Amenta PS, Clerk C, Martinez Hernandez A: Deposition of fibronectin and laminin in the basement membrane of rat parietal yolk sac: immunohistochemical and biosynthetic studies. *J Cell Biol* 96: 104-111, 1983
4. Bouchant JC, Darribere T, Shi DL, Boulekbache H, Yamada KM, Thiery JP: Evidence for the role of fibronectin in amphibian gastrulation. *J Embryol Exp Morphol* 89: 211-227, 1985
5. Chen LB: Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis. *Cell* 10: 393-400, 1977
6. Clark CC, Tomichuk EA, Kozarika TR, Mimor RR, Kefalides NA: The embryonic rat parietal yolk sac. *J Biol Chem* 250: 5259-6267, 1975
7. Couchman JR, Rees DA, Green MR, Smith CG: fibronectin has a dual role in locomotion and anchorage of primary chick fibroblast and can promote entry into the division cycle. *J Cell Biol* 93: 402-410, 1982
8. Darribere T, Boucher D, Larcorix JC, Boucaut JC: fibronectin synthesis during oogenesis and early development of the amphibian *Pleurodeles Waltlii*. *Cell Diff* 14: 171-177, 1984
9. Dessau W, Sasse J, Von Der Mark K: Role of fibronectin and collagen types I and II in chondrocytic differentiation in vitro, *Ann N Y Acad Sci* 312: 104-105, 1978
10. Duband JL, Darribere T, Boucaut JC, Boulekbache H, Thiery JP: Regulation of development by the extracellular matrix cell membranes. In: *Methods and Reviews*. Vol3: Elson E, Frazier W, Glaser L. Eds. ppl-53, 1987
11. Duband JL, Thiery JP: Apperance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev Biol* 94: 337-350, 1982
12. 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
13. Duband JL, Thiery JP: Distribution fo fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. *J Cell Biol* 93: 308-323, 1982
14. Dziadek M, Adamson E: Localization and synthesis of alpha-fetoprotein in postimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 43: 289-313, 1978
15. Dziadek M, Timpl R: Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and

- in teratocarcinoma cells. *Dev Biol* 111 : 372-382, 1985
16. Enders AC, Given RL, Schlafke S : Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. *Anat Rec* 198 : 65-78, 1978
17. Fujimoto T, Yoshinaga K, Kono I : Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat Rec* 211 : 271-278, 1985
18. Gardner JM, Fambrough DM : fibronectin expression during myogenesis. *J Cell Biol* 96 : 474-485, 1989
19. Hasell JR, Pennypacker JP, Yamada KM, Pratt RM : Changes in the cell surface proteins during normal and vitamin A-inhibited chondrogenesis in vitro. *Ann NY Acad Sci* 312 : 406-409, 1978
20. Heasman J, Hynes RO, Swan AP, Thomas V, Wylie CC : Primordial germ cells of *Xenopus* embryos : The role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell* 27 : 437-447, 1981
21. Hogan BLM, Newman R : A scanning electron microscopic study of the extraembryonic endoderm of the 8th day mouse embryo. *Differentiation* 26 : 138-143, 1984
22. Howe CC, Solter D : Identification of non collagenous basement membrane glycopolypeptides synthesized by mouse parietal endoderm and endodermal cell line. *Dev Biol* 77 : 480-487, 1980
23. Hynes RO : Cell surface proteins and malignant transformation. *Biochem Biophys Acta* 458 : 78-107, 1976,
24. Jetten A., Jetten MER, Sherman MI : Analysis of cell surface secreted proteins of primary cultures of mouse extraembryonic membranes. *Dev Biol* 91 : 431-439, 1979
25. Kefalides NA : Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 6 : 63-104, 1973
26. Laurie GW, Bing JT, Kleinman HK, Hessel JR, Aumailley M, Martin GR, Feldman RJ : Localization of binding sites for laminin, heparin sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol* 189 : 205-216, 1986
27. Laurie GW, Leblond CP, Martin GR : Light microscopic immunolocalization of type IV collagen, laminin, heparin sulfate proteoglycan and fibronectin in the basement membranes of a variety of rat organs. *Am J Anat* 167 : 71-82, 1983
28. Leblond CP, Inous S : Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185 : 390, 1989
29. Lee GR, Hynes, Kirschner M : Temporal and spatial regulation of fibronectin in the early *Xenopus* development. *Cell* 36 : 729-740, 1984
30. Linder E, Vaheri A, Ruoslahti E, Wartiovaara J : Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. *J Exp Med* 142 : 41-49, 1975
31. 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
32. Norberg HS : Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo : cleavage and blastocyst stages. *Z Anat Entwickl Gesch* 14 : 95-114, 1973
33. Richoux V, Darrieber T, Boucant JC, Flechon JE, Thiery JP : Distribution of fibronectins and laminin in the early pig embryo. *Ana Rec* 223 : 72-81, 1989

34. Rio JF, Darribere T, Shi DL, Richoux V, Boucaut JC : Synthesis of laminin related polypeptides in oocytes, eggs and early embryos of amphibian *Pleurodeles Waltlii* Roux8Arch Dev Biol 196£328-332, 1987
35. Roger SL, Edson KJ, Etrouneau PC : Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. Devl Biol 113 : 429-435, 1986
36. Rovasio RA, Delouvie 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
37. Stenman S, Wartiovaara J, Vaheri A : Changes of distribution of a major fibroblast protein, fibronectin, during mitosis and interphases. J Cell Biol 74 : 453-467, 1977
38. Strickland S, Reich E, Sherman MI : Plasminogen activator in early embryogenesis : Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell 9 : 231-24£240, 1976
39. Stroband HWJ, Taverne N, Bogaard M : The pig blastocyte : Its ultrastructure and the uptake of protein macromolecules, Cell Tissue Res 235 : 347-356, 1984
40. Terranova VP, Liotta LA, Russo Rg, Martin GR : Role of laminin in the attachment of PAM 212(epithelial) cells to basement membrane collagen. Cell 22 : 719-726, 1980
41. Thiery JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM : Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis, Proc Natn Acad Sci USA 79 : 6737-6741, 1982
42. Tucker GC, Ciment G. Thiery JP : Pathways of avian neural crest cell migration in the developing gut, Devl Biol 116 : 439-450, 1986
43. Wartiovaara J, Leivo I. Vaheri A : Expression of the cell surface associate glycoprotein, fibronectin in the early mouse embryo, Dev Mol 69 : 247-257, 1979
44. Wartiovaara J. Stenman S, Vaheri A : Chnages in expression of fibroblast surface antigen(SFA) during cytodifferentiation and heterocaryon formation. Differentiation 5 : 85-89, 1976
45. Wylie CC, Haesman J : Effects of the substratum on the migration of the primordial germ cells, Phil Trans R Soc London Ser B 299 : 177-183, 1982
46. Zetter BR, Martin GR : Expression of a high molecular weight cell surface glycoprotein (LETS protein) by preimplantation mouse embryo and teratocarcinoma stem cells, Proc Natl Acad Sci USA 75 : 2324-2328, 1978
47. 권영호, 김재도, 서재희, 허만하 : 실험적 연골내골화 과정에서의 fibronectin의 분포에 관한 면역조직화학 검색. 대한 정형외과의학지 27(4), 1992
48. 서재희, 장희경, 허만하, 박영훈 : 간 및 연부조직에 있어서의 fibronectin의 동태, 대한병리학회지 제24차 추계 초록집 A31, 1990
49. 허방, 임학, 허만하 : 간세포암의 Type IV Collagen 및 fibronectin의 분포에 관한 면역 조직화학적 검색. 고신대학 의학부 논문집 8(1) : 1-22, 1992
50. 홍인식, 이정윤, 안희창, 한예식, 장희경, 허만하 : 창상 창상 치유과정에서의 fibronectin의 동태, 대한정형외과학회지 18(6) : 1166-1177, 1991

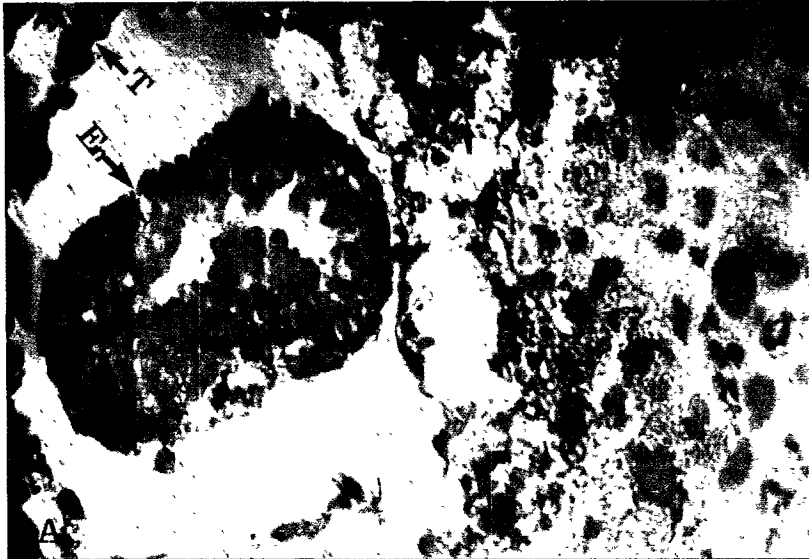


Fig. (1A, B) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of blastocyst (6-day mouse embryo). Immunoreactivity is seen in the primitive endodermal cells surrounding inner cell mass. Transverse section.

En : primitive endodermal cells, Ec : ectoderm, T : trophoblast (A : x100, B : x200)



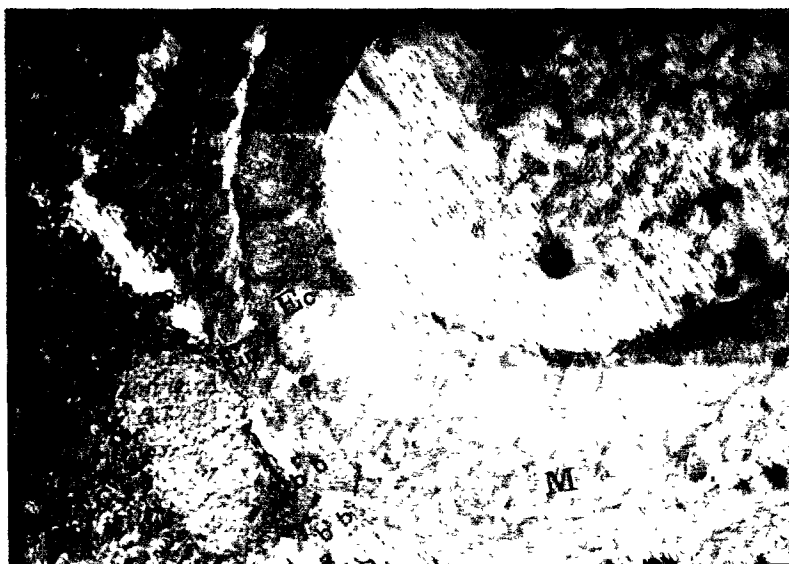
Fig. (2A, B) indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of egg cylinder (7-day mouse embryo). Longitudinal section. Immunoreactivity is seen on the inner side of the trophoectoderm lining the blastocoel. At this stage, intracellular staining in the intraembryonic cells is not seen.

T : trophoectoderm, P : ectoplacental cone (A : $\times 100$, B : $\times 200$)



Fig. (3A, B, C, D) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of 8-day egg cylinder. immunoreactivity is seen in the apical area of endodermal cell membrane.

En : endodermal layer, Ec : ectodermal layer, M : mesodermal layer (A : longitudinal section, x40 : B, C, D : transverse section, B : x100 C : x200, D : x400)





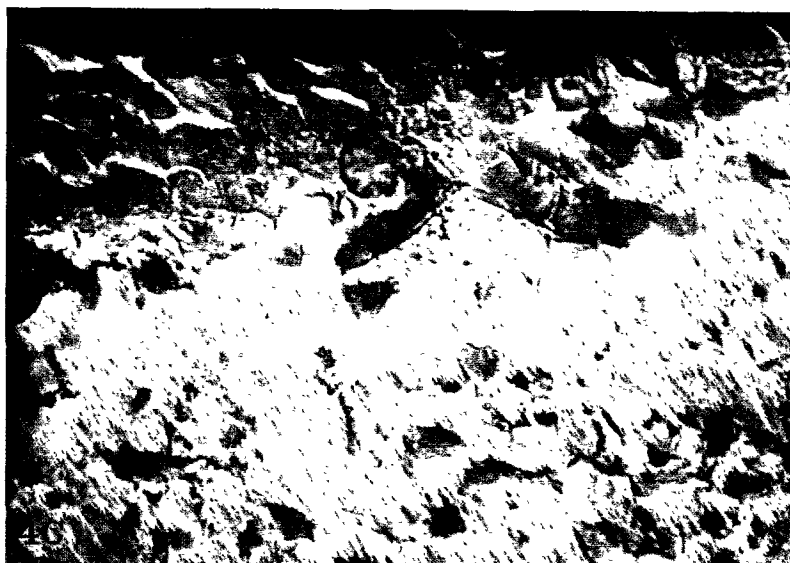


Fig. (4A, B, C) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of 9-day mouse embryo. (A : x40, B : x200, C : x400)

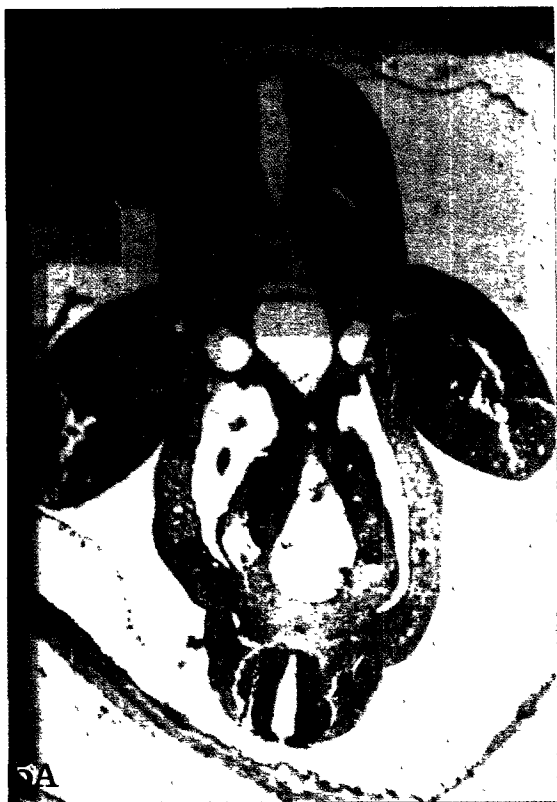




Fig. (5A, B, C, D) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of 10-day mouse embryo. (A : x20, B : x40, C : x200, D : x200)

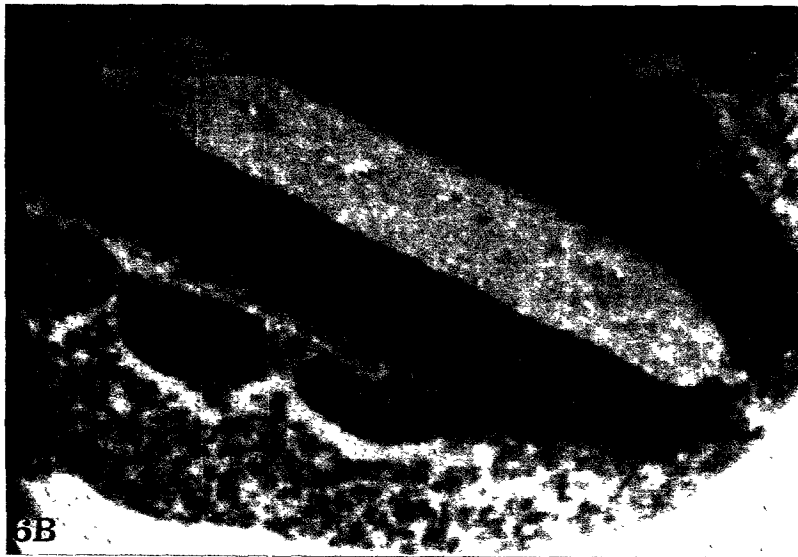
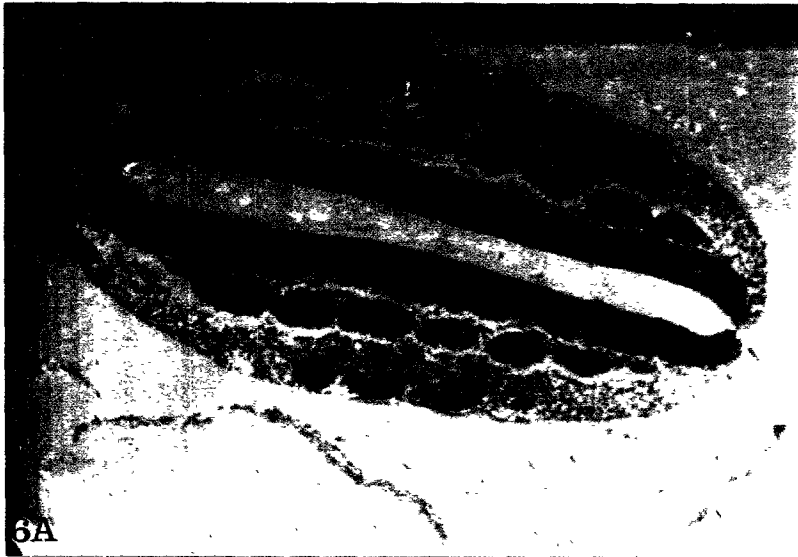


Fig. (6A, B) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of 11-day mouse embryo.

N : neural tube, G : ganglion, S : somite (A : x20. B : x40)





Fig. (7A, B, C) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of 11-day mouse embryo. (A : x40, B : x200, C : x400)





Fig. (8A, B, C) Indirect Avidin-Biotin immunoperoxidase staining for fibronectin of 1day mouse embryo. (A : x40, B : x200, C : x40)