

계배 흉근 근섬유 형성에 대한 염화수은의 영향

하재청 · 김한도* · 김병기 · 김정락** · 강호성* · 최은상

The Effect of Mercuric Chloride against the Differentiation of Pectoral Muscle Cells during Chick Embryogenesis

Hah, Jae Chung, Kim, Han Do*, Kim, Byeong Gee, Kim, Chong Rak**,
Kang, Ho Sung* and Choe, Eun Sang

(Received March 12, 1993)

ABSTRACT

To investigate the effect of mercuric chloride on the pectoral muscle cells during chick embryogenesis, chicken embryos were treated with mercuric chloride. Monoclonal antibodies against myosin were prepared for the localization of differentiation of thick filaments detected by the use of protein A-gold complex as a cytochemical marker. The effect of mercuric chloride was appeared not only to be ascribed with the reduced formation of myofibrillogenesis but also associated with induced change of morphology by the inhibition of protein synthesis.

서 론

횡문근 섬유는 발생 및 진화의 측면에서 볼때 현저하게 보존적인 구조를 가지며(Choi *et al.*, 1988; Fischman, 1986), 횡문근 섬유의 발생은 여러 계통의 간세포로 전환되는 결정 단계와 간세포의 증식을 통해 조직 특이적인 세포로 분화되는 단계를 가지므로 분화의 후기 모델로 널리 연구되어 왔다(Nguyen *et al.*, 1983; Daubas *et al.*, 1981), *in vitro* 배양시 발생중인 골격 근에서 분리한 근모세포는 근원섬유가 형성되는 근원섬유 형성과정과 다핵의 근섬유 형성과정을 거치는데 이것

은 신장된 근모세포가 증식을 거듭하면서 인접한 근모세포와 수직적인 연결을 이루고 연결한 세포간에 세포간 융합이 이루어짐으로써 근섬유가 발달한다고 알려져 있다(Dienstman and Holtzer, 1977; Knudsen and Horwitz, 1977; O'Neill and Strockdale, 1972; Merlie *et al.*, 1977; Okazaki and Holtzer, 1966). 또한 근세포의 분화에는 배양액의 조성과 같은 세포외적 환경요인이 주요한 영향을 미치는 것으로 보고되어 있고(Linhart *et al.*, 1981), 직접적으로 환경에 노출된 중금속들은 여러 동물의 성체는 물론 발생중인 태아의 조직이나 세포에 더욱 큰 영향을 미치는 요인으로 보고 되었다(최 등, 1989; 김, 1987; 민, 1987; 락, 1987; Phullpotts, 1986;

부산대학교 생물학과, 분자생물학과*, 인제대학교 생물학과**

Dept. of Biology and Molecular Biology*, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea; Dept. of Biologie**, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

*본 논문은 1992년도 문교부 지원 기초과학연구비에 의하여 연구되었음.

이 들, 1986; 위 들, 1983; 위 들, 1983; 위 들, 1983; 최 들, 1983). 이러한 점에 착안하여 본 연구는 수은화합물이 계배 근세포의 분화에 상당한 영향을 미칠 것으로 판단이 되어 계배의 난황에 수은을 주입하고 발생을 시키면서 이들 수은화합물이 근섬유 형성과정에 어떠한 영향을 미치는가를 형태학적으로 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 수은의 처리

실험에 사용한 계배는 경남 김해시 소재 한신부화장에서 구입한 백색 레그혼 종란을 이용하였다. 종란의 평균 무게는 51g 이었으며 재료의 처리는 난각을 70% ethanol로 소독한 후 21 guage의 주사바늘로 난각에 구멍을 뚫었다. 처리군은 수은을 10^{-4} M 농도로 증류수에 녹여 pore size가 0.4 μ m인 Whatman filter paper로 여과하였다. 여과된 수은 용액을 50 nl씩 microsyringe를 이용하여 난황에 주입하고 paraffin으로 봉하였다. 대조군은 동량의 0.9% NaCl을 주입하였다. 그리고 난 후에 종란을 37.5°C로 유지되는 항온기에 넣고 부란시키면서 11일배부터 24시간 간격으로 16일배까지 각각 5구의 좌측 흉근을 적출하여 실험에 이용하였다.

생쥐에 대한 면역성 부여

생후 6~8주 되는 BALB/c 암컷 생쥐에 myosin 50 μ g (Sigma Chemical Co.)을 phosphate buffered saline, pH 7.2(PBS)에 녹인 후 동량의 Freund's complete adjuvant (FCA)와 혼합하여 복강내에 주사하였으며 이 후의 항원은 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 이용하여 동일한 부위에 주입하였다. 주사 10~14일 후에 미정맥에서 소량의 혈액을 채취하여 ELISA test (Bendayan *et al.*, 1980)를 이용하여 항체의 존재 유무 및 역가를 조사하고 마지막 주사 후 역가반응이 제일 양호한 개체에 항원 10 μ g을 동일한 방법으로 복강주사한 뒤 6일째 세포융합을 실시하였다.

Hybridoma의 생산

면역반응을 시킨 생쥐의 비장을 무균적으로 적출하여 Hank's balanced sodium salt (HBSS)에서 비장세포를 유리시켜 세포수를 ml 당 $1-2 \times 10^7$ 으로 조정하고 NS-1 myeloma cell과의 비를 5:1로 하여 450g에서

10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 35% polyethylene glycol (PEG)를 첨가하여 부유시켰다. 여기에 20ml의 HBSS를 첨가하여 동일하게 원심분리한 다음 동량의 HBSS로 재차 현탁하여 37°C에서 20분간 배양하였다. 그리고 20ml의 complete culture medium을 첨가하여 450g에서 10분간 원심분리 시킨 후 HAT 배지 (1×10^{-4} M hypoxanthine, 4×10^{-7} M aminopterin, 3×10^{-5} M thymidine)로 현탁하여 96 well 배양용기에 well 당 10 μ l가 되게 분주하여 37°C에서 배양하였다. 배지는 2주까지 4일 마다 배양액의 반정도를 새로운 배지로 교체하여 HAT 배지를 첨가하였다. 또한 well이 산성으로 바뀌는 즉시 배양 상층액을 ELISA로 검사하여 항체반응도를 조사하였고 양성반응을 나타낸 well의 hybridoma는 다시 배양용기에 분주하여 단일항체 생산군을 얻기 위한 cloning을 여러번 실시하였다.

면역 전자현미경용 표본의 제작

11일배 부터 16일배까지의 좌측 흉근을 1 mm³으로 잘게 자른 후 조직을 0.1 M PBS, pH 7.4로 만든 2% glutaraldehyde에 4°C에서 2시간 동안 전고정을 하였고 O₃O₄에서의 후고정은 항원의 파괴를 방지하기 위하여 생략하였다. 고정이 끝난 조직은 동일한 완충액으로 하룻밤동안 수세한 후 각 단계의 ethanol로 탈수하여 epon 혼합액으로 포매하였다. 포매된 조직은 ultramicrotome (LKB ultratome NOVA, Sweden)으로 준초박절편(1 μ m)을 만들고 toluidine blue로 염색하여 절편부위를 정한 다음 초박절편을 만들어 200 mesh nickel grid 위에 올렸다.

면역 세포화학반응 및 관찰

연속적으로 얻은 초박절편을 PBS로 만든 0.5% ovalbumin (Sigma Chemical Co.) 용액에 15분간 띄워서 비특이적인 항원·항체반응을 억제시킨 다음 수세하지 않고 이미 준비한 단일항체를 grid 당 20 μ l씩 분주하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 grid을 PBS로 5분간 급속 수세한 후 PBS로 다시 5분간 반응시켰으며 수세하지 않은 상태로 De May (1983)의 방법에 따라 만든 단백질 교질금 복합체 (Bendayan, 1984)에서 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 grid은 교반기 위에서 2분간 5회 PBS로 수세한 후 마지막으로 3차 증류수에서 5분간 수세하였다.

수세가 끝난 grid는 30% ethanol을 용매로 한 3% uranyl acetate에서 40분간, lead citrate에서 4분간 각각 혼합염색한 후 전자현미경 (JEM 100SX, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 대조군은 일차항체 단계를 뺀 후 동일한 방법으로 반응을 시행하였다.

결 과

대조군에서 11일배의 근모세포는 큰 핵과 세포질내에 많은 유리리보솜, 미분화된 조면 소포체를 가지고 있었으나 뚜렷한 형태의 근원섬유 및 다른 세포기관의 발달은 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 교질금 입자는 다수의 미토콘드리아 및 유리리보솜과 함께 미세섬유상으로 세포질내에 분포하고 있었다. 12일배의 근모세포도 11일배와 유사한 형태적인 양상을 나타내었으며 13일배에서는 핵의 크기가 다소 감소되었고 신장되었으며 근원섬유는 미약한 Z대가 형성되었으나 A, H와 I대는 관찰되지 않았다 (Fig. 2). Fig. 3에서 보는 것처럼 근섬유의 분화는 14일배 이후에 이루어져 뚜렷한 근절구조가 관찰되었으며 방추형의 핵 및 소포체의 구조가 뚜렷하였다. 교질금 입자는 근절과 유리리보솜에 분포하였다.

처리군에서는 발생의 전 과정을 통해 근원섬유의 형성을 관찰할 수 없었다. 근모세포의 핵은 다형성 (pleomorphic)으로 관찰되었으며 핵소체의 크기 및 모양도 다양하였다 (Fig. 4, 5). 그리고 세포질에는 많은 소포가 관찰되었고 세포기관의 발달은 전 과정을 통해 미미하였으며 일정하지 않았다. 교질금 입자는 대조군의 근모세포에 비하여 현저히 감소되었고 주로 세포질내의 유리리보솜에 일정하지 않게 위치하였다.

고 찰

분화된 근조직의 기능적인 성분은 전구세포인 근모세포의 발생 및 분화동안에 합성되는 여러 근수축 단백질이며 특히 근원섬유의 형성은 횡문근 조직에서 관찰되는 중요한 분화현상이다. Wang 등 (1988)은 배양 심근세포에서 근원섬유가 어떻게 형성되는가를 규명하기 위하여 actin, tropomyosin, myosin 등에 대한 여러가지 근특이항체를 사용하여 면역형광법으로 연구를 행하였다. 또한 많은 연구자들은 근원섬유의 형성을 조절하는 기작을 이해하기 위해서 *in vitro*에서 다양한 pH, 이온강도

(Harrington and Rodgers, 1984), 온도, 칼슘농도 (Higuchi and Ishiwata, 1985), 및 sodium pyrophosphate의 존재 (Reisler *et al.*, 1986) 등 여러 요인에 관해 연구, 보고하였다. 최근에는 myosin과 actin 등의 근원섬유 구성요소가 근원세포의 분화 과정에서 어떻게 생합성 되어지는가를 알아보기 위하여 면역 세포화학적 방법을 다수 이용하고 있다 (Gregory *et al.*, 1990; Pedrosa *et al.*, 1989; Mercier *et al.*, 1989).

본 연구의 결과에서 11일배와 12일배의 근모세포는 뚜렷한 근원섬유나 세포기관이 발달되지 않은 미분화된 형태로 관찰되었으며, 교질금 입자는 미세섬유상으로 세포질내에서 미토콘드리아와 유리리보솜과 함께 분포하고 있었다. 13일배에서 근원섬유는 미약한 Z대를 형성하였으며 14일배 이후에 비로소 뚜렷한 근절구조를 나타내어 근섬유가 분화되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 사실로 미루어 myosin은 근모세포가 분화되는 시기에 합성이 되고 이 단백질이 근원섬유의 형성에 관여하여 기능을 나타내는 시기는 13일배 이후로 생각할 수 있다. 염화수은 처리군에서는 발생이 전 과정을 통해 근원섬유의 형성을 관찰할 수 없었고 근모세포도 양성종양세포가 가지는 일반적인 형태적 특징인 다형성세포로 전환되었음을 알 수 있었다. 교질금 입자의 수 및 세포질내에 분포도 대조군과 비교할때 비특이적이었다. 따라서 수은화합물은 근모세포내의 골지체의 소포를 팽창시켜 세포질을 파괴함과 동시에 소포체의 균일한 평행성 구조를 상실케하여 근섬유로의 분화의 진행을 억제하는 것으로 보여진다. 이와 유사한 결과는 수은이 계배 근세포 배양시 단백질의 합성을 크게 저해한다는 이 (1986)의 보고나 수은을 포함한 중금속 배지에서 호르몬의 합성량을 감소시킨다는 Na와 Liu의 보고 (1990) 및 중금속 투여시 계배의 간장내에 공포한 형성되고 그속에 지방이 축적되어 간장의 효소활성이 저하됨을 보고한 조 (1991)의 결과와 일치한다고 할 수 있다. 이와 같은 사실로 미루어 수은은 근모세포의 근원섬유를 구성하는 단백질의 합성을 저해함과 동시에 골지체와 같은 세포기관의 형태 변화를 유도하여 근섬유로의 분화를 억제시키는 하나의 요인으로 생각되며, 향후 근세포 발생의 분자적 현상 및 세포골격 (cytoskeleton)과 mRNA의 상호작용에 관계되는 단백질의 기작과 관련된 분화 및 억제의 설명에 본 연구의 역점을 두어야 할 것으로 생각된다.

결 론

계배 흉근 분화에 대한 염화수은의 영향을 면역 세포 화학적인 방법으로 검토하였다. 흉근세포의 근원섬유는 13일배에서 원시적인 형태로 나타났으며 이 시기의 근원섬유 형태는 A, H 및 M대의 분화는 미약하지만 Z대의 분화는 비교적 뚜렷하였다. 이와같은 흉근섬유의 분화에 염화수은은 myosin이 근원섬유의 형성에 관여하여 기능을 나타내는 13일배 이후에 근모세포의 골지체의 소포를 팽창시켜 세포질을 파괴함과 동시에 소포체의 평행성 구조를 상실케하여 근모세포의 근섬유로의 분화의 진행을 억제하여 결국 근세포를 다형성 또는 대소부동의 근세포로 전화시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

곽상룡, 1986 구리가 생쥐 초기 배아의 발생에 미치는 영향에 관한 연구, 원광대학교 석사학위 논문.
 김인환, 1987. 카드뮴과 납화합물 폭로시 혈액학적 변화에 관한 연구. 한양대학교 석사학위 논문.
 민홍규, 1987. 한국산 송사리에 대한 중금속류의 영향에 대한 연구. 전남대학교 박사학위 논문.
 위인선, 권혁방, 최충길, 이원교, 이기숙, 1983. 생쥐의 초기발생계에 미치는 중금속의 영향. 전남대학교 기초과학 논문집. 3 : 287-308.
 위인선, 나철호, 최충길, 백문기, 이종빈, 하두봉, 1983. 배양 계배 근세포의 분화과정에 미치는 중금속 이온의 영향, 전남대학교 기초과학 논문집. 3 : 309-329.
 위인선, 최충길, 이종빈, 양수인, 최저일, 최민규, 1983. 성계의 초기발생계에 미치는 중금속의 영향. 전남대학교 기초과학 논문집. 3 : 331-351.
 이종빈, 1986. 배양 계배의 근세포의 분화과정에 미치는 중금속 이온의 영향. 전남대학교 박사학위 논문.
 조현욱, 1991. 계배 발생중 간장의 구조단백질 및 효소 활성에 미치는 중금속의 영향. 부산대학교 박사학위 논문.
 최영현, 이원호, 1989. *D. me lanogaster* 에 있어서 HgCl₂의 영향에 관한 생리 유전학적연구. 부산대학교

자연과학 논문집. 45 : 180-189.
 최충길, 차성실, 1983. 전기 자어기의 잉어에 대한 중금속 이온의 독성비교. 전남대학교 기초과학 논문집. 14 : 169-175.
 Bendayan M., J. Roth, A. Perrelet and L. L. Orci, 1980. Quantitative immunocytochemical localization of pancreatic secretory proteins in subcellular compartments of the rat acinar cell. *J. Histochem. Cytochem.* 28 : 149-152.
 Bendayan M., 1984. Protein A-gold electron microscope immunocytochemistry: Methods, Applications and limitations. *J. Elec. Micro. Tech* 1 : 243-270.
 Choi, J., T. Schulthesis, M. Lu. W. franke, D. Bader, D. Fishchman and H. Holtzer, 1988. Founder cells for the cardiac and skeletal myogenic lineage. In: Cellular and Molecular Biology of Muscle Development. Alan R. Liss, Inc., New York.
 Daubas, P., D. Caput, M. Buckingham and F. A. Gros, 1981. Comparision between the synthesis of contractile proteins and the accumulation of their translatable mRNA during car myoblast differentiation. *Deve lop. Biol.* 84: 133-143.
 De May, J., 1983. A critical review of light and electron microscopic immunocytochemical techniques used in neurobiology. *J. Neurosci. Methods.* 7 : 1-18.
 Dienstman, S. R. and H. Holtzer, 1977. Skeletal myogenesis: control of proliferation in normal cell lineage. *Exp Cell Res.* 107 : 355-364.
 Fischman, D. A., 1972. Developments of striated muscel. In: The structure and function of muscel. Acad. Press, New York, pp. 75-149.
 Gregory, P., J. Gagnon, D. A. Essig, S. K. Reid, G. Prior and R. Zak, 1990. Differential regulation of actin and myosin isoenzyme synthesis in functionally over loaded skeletal muscle. *Biochem. J.* 265 : 525-532.
 Harrington, W. F. and M. E. Rodgers, 1984. Myosin. *Annu. Rev. Biochem.* 53 : 35-73.
 Higuchi, H. and S. Ishiwata, 1985. Disassembly

- kinetics of thick filaments in rabbit skeletal muscle fibers: effects of ionic strength, Ca^{2+} concentration, pH, temperature, and cross-bridges on the stability of thick filament structure. *Biophys.* 47 : 267-275.
- Knudsen, K. A. and A. F. Horwitz, 1978. Differential inhibition of myoblast fusion. *Develop. Biol.* 1978 : 294-307.
- Linkhart, T. A., C. H. Clegg and S. D. Haushka, 1981. Myogenic differentiation in permanent clonal mouse cell lines: regulation by macromolecular growth factors on the culture medium. *Deve lop. Biol.* 86 : 19-30.
- Liu, J., W. C. Kershaw and C. D. Klassen, 1990. Rat primary hepatocyte culture are a good model for examining metallothieline-induced tolerance to cadmium toxicity *in vitro*. *Cell. Devel Biol.* 26 : 75-79.
- Mercier, F., H. Reggio, G. Devilliers, D. Bataille and P. Mangeat, 1988. Membrane cytoskeleton dynamics in rat parietal cells: Mobilization fo actin and spectrin upon stimulation of gastric acid secretion. *J. Cell Biol.* 108 : 441-453.
- Merile, J. P., M. E. Buckingham and R. G. Whalen, 1977. Molecular aspects of myogenesis. In: Current topic in developmental biology (Editor by Moscona, A. A. and Monroy, A.). Vol. II: Academic Press, Inc., ISBN: 61-114.
- Nguyen, H. T., R. M. Medford an B. Nadal-Ginard, 1983. Reversibility of muscel differentiation in the absence of commitment; analysis of a myogenic cell line temperature-sensitive for commitment. *Cell.* 34 : 281-293.
- Okazaki, K. and H. Holtzer, 1966. Myogenesis: Fusion, myosin synthesis. and the mitotic cycle. *Pro. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 56 : 1481-1490.
- O' Nell, W. C. and F. E. Stocdale, 1972. A kinetic analysis of myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* 52 : 52-65.
- Pedrosa, F., G. S. Butter-Brown, G. K. Phoot, D. A. Fischman and L. E. Thornell, 1989. Diversity in expression of myosin heavy chain isoforms and M-band proteins in rat muscle spindles. *Histochem.* 92 : 185-194.
- Phillipotts, C. J., 1986. Histopathological changes in the epithelial cells of rat duodenum following dietary exposure to cadmium with particular refernce to paneth cells. *Br. J. Exe. Path.* 67 : 505-516.
- Reisler, E., P. Cheung, N. Borochoy and J. A. Lake, 1986. Monocional dimers, and minifilaments of vertebrate skeletal-myosin in the presence of sodium pyrophosphate. *Biochem.* 25 : 326-332.
- Wang, S. M., M. L. Greaser, E. Schultz, J. C. Bulinski, J. J. C. Lin and J. L. Lessard, 1988. Studies on cardiac myofibrilliogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin. *J. Cell Biol.* 37 : 543-548.

FIGURE LEGENDS

Figs. 1-3. Electron micrographs of the differentiation of pectoral muscle cells during embryogenesis in untreated chicken embryo. Incomplete myofibrillar structure began to appear in cytoplasm in 11 day old embryo. Fig. 1: 11 day, $\times 10,000$. Fig. 2: 13 day, $\times 6,000$. Fig. 3: 15 day, $\times 6,000$.

Figs. 4-5. Electron micrographs of the differentiation of pectoral muscle cells during embryogenesis in treated chicken embryo. Note the vacuoles, and pleomorphic cells with severe anisonucleosis. Fig. 4: 11 day, $\times 4,000$. Fig. 5: 15 day, $\times 10,000$.

M: Mitochondria, MF: Myofibril. Poststaining with uranyl acetate and lead citrate (Specimen not osmicated).

