

## 마우스 태자의 골격 형성

김보라\* · 오승현\*,\*\* · 윤여성\*\* · 성제경\*

\*연세대학교 의과대학 임상의학연구센터

\*\*서울대학교 수의과대학 조직학교실

(2001년 8월 28일 게재승인)

## Skeleton formation of mouse fetus

Bora Kim\*, Seung-hyun Oh\*,\*\*, Yeo-sung Yoon\*\*, Je Kyung Seong\*

\*Dept. of Laboratory Animal Medicine, Medical Research Center, Yonsei University College of Medicine

\*\*Dept. of Veterinary Histology and Embryology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Accepted by August 28, 2001)

**Abstract :** This study was conducted to observe the bone and cartilage formation of mouse fetuses. Mouse litters were sacrificed at pregnant 14th and 18th day and examined for gross skeletal formation using cartilage and bone staining. We identified well developed cartilage formation at the 14th pregnant day in mouse fetus. However mouse fetus at the 14th pregnant day did not show any part of bone formation. At 18th pregnant day, mouse fetus showed well developed body shape and bone and cartilage formation. This results will provide basic information for the evaluation of mouse malformation and impairment of skeleton formation. Further study will be needed for exact explanation of bone formation from cartilage portion.

**Key words :** mouse, fetus, skeleton formation, bone, cartilage

## 서 론

골격계 형성은 연골화 된 골조직이 골화되면서 우리 신체의 체형을 결정짓는 아주 중요한 발생이다. 마우스 및 랫드 태자의 골격형성은 다른 대부분의 포유동물과 마찬가지로 연골화 된 조직이 먼저 발생하고 그 다음 연골화 된 부분이 골화되면서 골격계가 형성된다고 알려져 있다<sup>1,4,7</sup>. 마우스 및 랫드 실험동물의 골격계에 관한 지식은 특히 기형 독성 실험과 유전자 변형 마우스, 혹은 돌연변이 마우스의 이상을 연구하는 가장 기본적인 연구 방법 중의 하나이다<sup>4,8</sup>. 그러나 골 형성이 끝난 뒤의 골격계 연구 혹은 골격 형성 이상 등에 관한 연구자료는 많은 편이나 연골화 된 부위에서 골화되는 부위에 관한 육안 해부학적 자료는 충분하지 않은 편이다<sup>4,6</sup>. 이에 본 연구에서는 실험동물로 많이 이용되는 ICR 마우스의 임신 14일령과 18일령의 태자의 골격계 형성을 관찰하여 정확한 골화 및 연골 형성 시기와 부위별 생성

특성을 밝혀서 마우스의 골격계 형성에 관한 연구자료로 삼고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

연세대학교 실험동물부에서 사육한 수태경력이 없는 8-10주령의 SPF(specific pathogen free) ICR 마우스 암컷과 수컷을 실험에 사용하였다. 수컷과 암컷을 한 케이지에 동거시킨 뒤 다음 날 아침 질도말에서 정자가 확인된 개체를 분리하였고 그 날을 임신 0일로 계산하였다. 교미가 실패된 암컷과 수컷은 3일 후에 다시 교배를 시도하였다. 사육 및 실험 기간의 사육실 환경은 23±2°C, 상대 습도 50±10%, 소음(40-50 phon 이하)을 유지하였고 12시간 인공 조명 하에서 랫드용 케이지(polycarbonate, 42×28×18 cm, 대종기기, 한국)에 5두씩 넣어 사육하였다. 케이지의 교환은 1주 2회 실시하였으며, 깔짚은 고

본 연구는 실험 기간 동안 동물 실험을 도와준 연세대의 실험동물부의 김형관 선생에게 감사드립니다.

Address reprints requests to Dr. Je kyung Seong, Dept. of Laboratory Animal Medicine, Medical Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-749, Korea (E-mail: yslabanim@YUMC.yonsei.ac.kr)

압 증기 소독된 것을 사용하였다. 사료(제일제당 방사선 멸균사료, 마우스용, 한국)와 무균 식수는 자유로이 공급하였다. 임신 후 14일령과 18일령에 실험동물을 pentobarbital sodium으로 과마취하여 희생시킨 뒤 실험동물의 태자를 적출하여 실험에 사용하였다.

### 태아의 골 발육에 관한 검사

출생 직후 분만한 마우스 태자의 골격형성 여부를 조사하기 위해 Kimmel(1981)<sup>4)</sup> 등의 방법으로 골격과 연골을 다음과 같이 염색하였다. 태자는 에테르에 과마취하여 안락사 시킨 후, 박피를 용이하게 하기 위하여 70°C 물에 30초간 방치하였다. 태아의 피부를 제거하고 내장을 적출한 후, 70% 에탄올에 0.14%로 제조한 alcian blue(C. I. 74240: Eastman Kodak Co.) 용액과 95% 에탄올에 0.12%로 제조한 alizarin red S(C. I. No. 58005 Fisher Scientific Co.) 용액과 glacial acetic acid 및 70% 에탄올을 각각 2:1:8:50의 비율로 혼합한 용액에서 17시간 동안 염색하였다. 그 후 2% KOH 용액에 8시간 동안 담가 둔 후, 증류수와 glycerin을 1:1 희석한 용액에 14시간 동안 방치하였다. 완성된 표본은 glycerin 용액에 담아 보관하며 관찰하였다. 태아의 두개골, 척추, 늑골, 흉골 및 사지의 골 및 연골의 발육과 골형성 여부를 stereo microscope(Zeiss, stemi V6, Germany)를 이용하여 검사하였다.

## 결 과

임신 14일령의 마우스 태자의 골격은 대부분 Alcian blue에 염색되는 연골 부위였다. 임신 14일령의 태자는 사지와 몸체의 길이에 비하여 상대적으로 두개골의 크기가 매우 커다랗다(Fig 1A, B). 두개골의 골 형성은 안와 부위 주변의 전두골과 하악골의 일부가 연골화 된 상태이다(Fig 2). 임신 14일령의 마우스 태자는 앞발과 뒷발이 매우 가까이 마주보는 모양을 하고 있었다(Fig 1). 임신 18일령의 마우스 태자는 연골 및 골화의 분화 정도가 성체와 비슷한 상태였다(Fig 2).

임신 14일령의 마우스 태자의 척추는 연골부위만 발달되었다. 횡돌기는 발달되었으나 수직 돌기의 발달은 매우 미약하며 늑골의 연접 부위 또한 발달이 매우 미약하였다. 임신 18일령의 마우스 태자의 척추는 모체의 중심에 골화 중심이 발달되어 있어서 alizarin red S에 붉게 염색되어 관찰되었다. 횡돌기, 수직돌기는 이미 골화 된 부분이 관찰되었다(Fig 3).

임신 14일령의 태자는 humerus의 원위부와 말단부만 연골화 된 골조직이 발생되었으나 골의 중간 부위는 아직까지 연골화 되지 않은 상태를 보여 골이 두 개로 나

뉘어져 관찰되었다. 반면 후지의 femur는 하나의 골로서 발달되어 있는 것이 관찰되었다. 임신 14일령의 태자에서는 carpal bone과 tarsal bone의 발달 또한 매우 미약하였다. 3지, 4지 만이 연골화 된 부분이 관찰된 반면 1, 2, 5지의 경우는 연골 부위의 형성 부위가 관찰되지 않았다. 임신 18일령의 마우스 태자에서는 사지의 골격이 대부분 골화된 것이 관찰되었다. 그러나 사지의 다른 부위 혹은 척추, 늑골 등과 달리 carpal, tarsal bone의 골화 정도는 충분치 않은 상태였다(Fig 4).

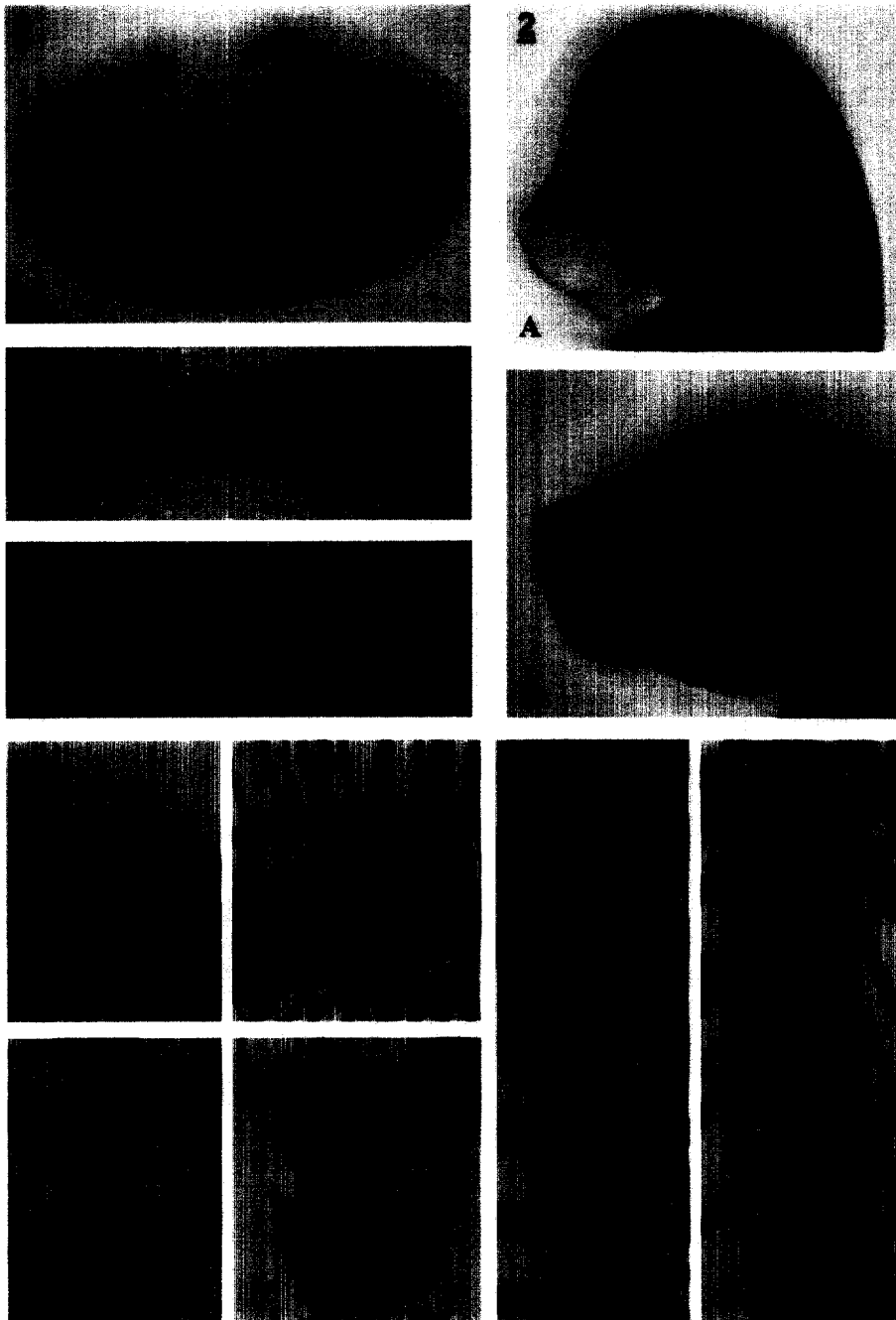
임신 14일령의 태자는 늑골의 중간 부위는 연골화 된 부분이 관찰되지 않았으나 양 말단 부위 부분은 모두 연골화 된 형태를 갖추고 있었다. 반면 임신 18일령의 마우스 태자는 골화된 부위와 연골화 된 부분이 모두 발달된 완전한 형태의 모습을 취하고 있었다. 임신 14일령의 마우스 태자의 장골 부위의 연골화 된 부분은 성체의 것과 유사한 정도로 발달되었으나 다른 부위는 아직까지 충분하게 발달되지 않았다.

## 고 찰

골격계 형성은 신체의 주요한 발생과정으로 발생 연구의 가장 기본적인 자료라고 할 수 있다. 최근 유전자 기능을 in vivo에서 확인하고자 다양한 종류의 유전자 변형 마우스들이 개발되고 있으며 이러한 마우스에서 기형 및 사지 발생의 정상 및 비정상 여부는 유전자의 기능을 연구하는 중요한 수단 중의 하나가 되고 있다<sup>1-4</sup>. 그러나 마우스 태자의 연골화 되는 시기의 처음 단계와 연골화된 부위에서 골화되는 시기에 대한 육안 해부학적 연구 결과는 충분하지 않은 실정이다. 이러한 연구결과는 마우스 혹은 랫드 등의 설치류를 이용한 기형 연구결과와 기전 해석에 참고되는 자료이다<sup>9,10</sup>.

임신 14일령의 마우스 태자는 6주령의 사람 태아에 비교된다. 이 시기는 이미 대부분의 주요 기관들이 형성되었기 때문에 마우스의 주된 선천적 기형은 창상 혹은 외부 자극에 의해서는 발생하지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 골격계의 경우는 14일령의 마우스 태자는 외부의 자극에 매우 민감하게 반응을 보이는 것으로 알려져 있다. 마우스에서는 임신 12일령 태자부터 사지의 연골화 된 부분의 형성이 시작된다고 알려져 있고 14일령부터 연골화 된 부분이 하나의 개체의 윤곽을 알 수 있는 시기로 알려져 있다<sup>4,6,7,8</sup>.

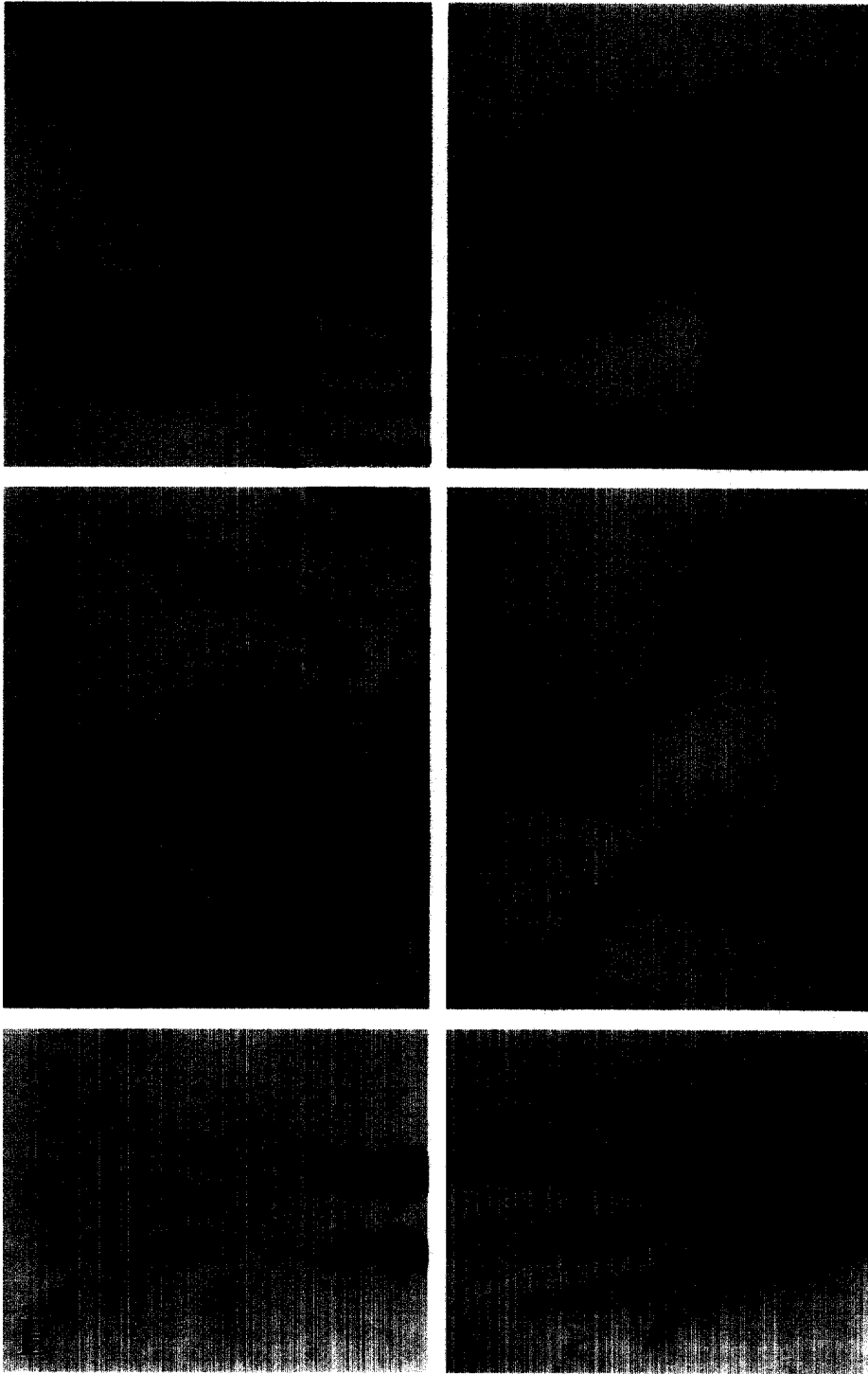
임신 18일령의 마우스 태자에서는 다른 부위와 달리 carpal, tarsal bone의 골화 정도는 충분치 않은 상태로 관찰되어 사지 말단 부위의 골화 형성이 가장 늦음을 알



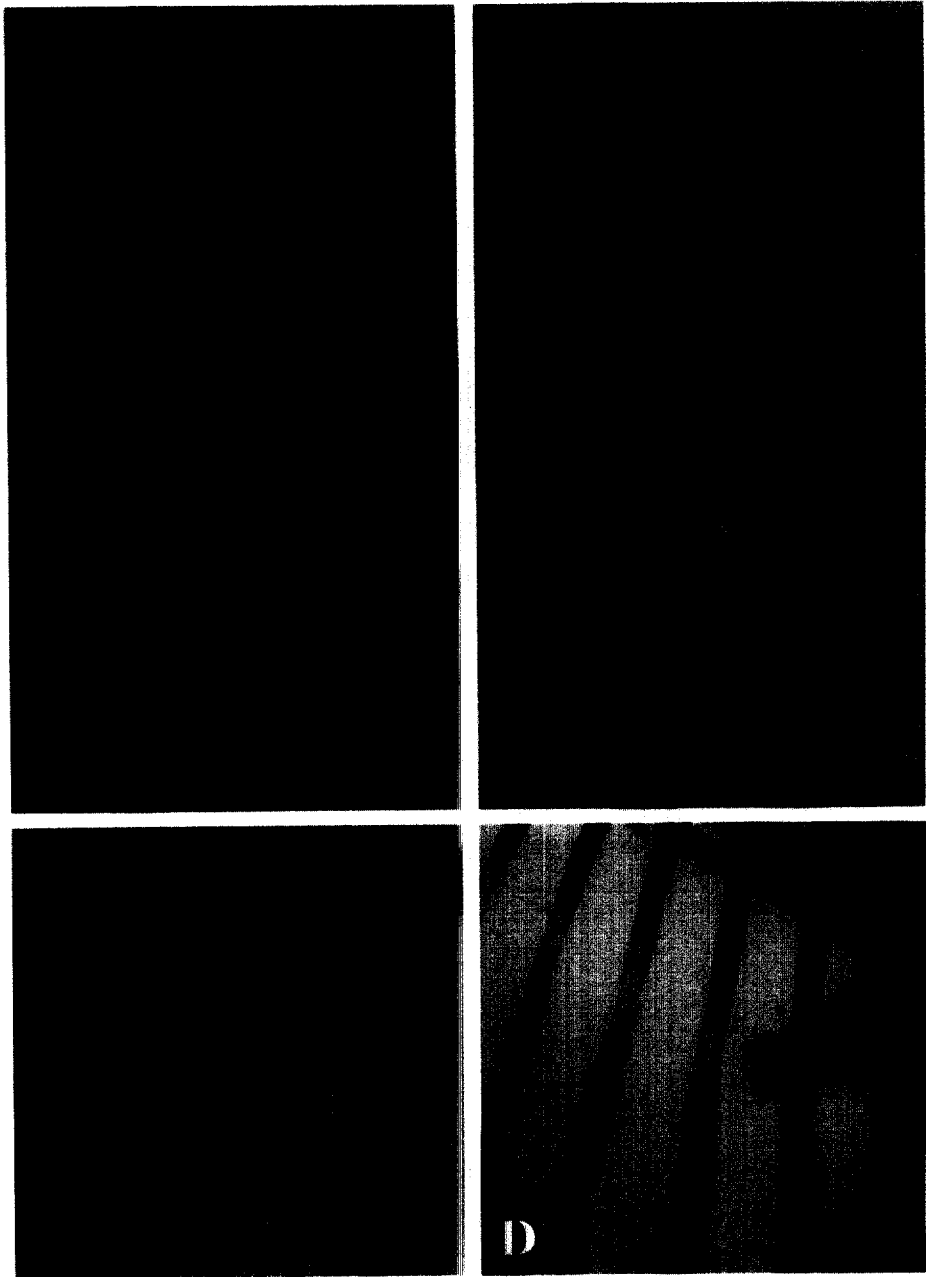
**Fig 1.** Mouse fetus at 14th(A, B) and 18th(C) pregnant day. Skeleton formation is not complete in 14th pregnant day mouse fetus. Bone formation was not seen in any part limbs. However mouse fetus at 18th pregnant day showed well developed bone and cartilage formation. That was almost same of adults (Double staining for cartilage and bone by alizarin red S and alcian blue).

**Fig 2.** Skull of mouse fetus at 14th(A) and 18th(B) pregnant day. Note cartilage portion of frontal bone and occipital bone was developed around optic area (Double staining for cartilage and bone by alizarin red S and alcian blue).

**Fig 3.** Vertebrae of mouse fetus at 14th(A, C, E) and 18th(B, D, F) pregnant day. Any part of cartilage was not developed to bone formation at 14th day pregnant day. Core portion of bone formation of vertebrae body was distinct at 18th pregnant day (Double staining for cartilage and bone by alizarin red S and alcian blue).



**Fig 4.** Arm and leg of mouse fetus at 14th(A, C, E) and 18th(B, D, F) pregnant day. Humerus had divided two portion of cartilage in mouse fetus at 14th pregnant day. Carpal bone was poorly developed in mouse fetus at 14th pregnant day (Double staining for cartilage and bone by alizarin red S and alcian blue).



**Fig 5.** Girdle and ribs of mouse fetus at 14th(A, C) and 18th(B, D) pregnant day(In 14th pregnant day mouse fetus, bone formation is not complete (Double staining for cartilage and bone by alizarin red S and alcian blue).

수 있었다. 연골의 발생 및 골화된 부위는 사지 및 신체의 말단 부위에 비하여 신체의 중심된 모양을 결정하는 척추 주요 내장 및 흉부 장기를 둘러싼 부분이 먼저 골화가 시작되는 것을 알 수 있었다<sup>47</sup>.

신체 각 부위의 정확한 골화 시기를 분석하기 위해서는 본 연구에서 관찰한 임신 14일령과 18일령 사이의 태자에서 0.5일 간격으로 좀 더 세분화 된 실험군을 구성하여 관찰하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

임신 14일령과 18일령의 ICR 마우스 태자의 골격형성 여부를 관찰한 바 14일령에서는 태자의 연골이 형성된 것을 관찰할 수 있었으나 대부분이 조직에서 골화는 이루어지지 않았다. 두개골의 전두골과 하악골의 일부는 연골화 된 조직이 보였으나 두개골의 다른 골은 연골화 된 부위조차도 형성되지 않았다. 18일령의 태자에서는 대부분의 골격계의 연골의 분화 및 골화 형성 정도가 성인의 것과 커다란 차이를 보이지 않았다.

## 참고문헌

1. Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, *et al.* Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol*, 44:707-714, 2001.
2. Cash DE, Bock CB, Schughart K, *et al.* Retinoic acid receptor alpha function in vertebrate limb skeletogenesis: a modulator of chondrogenesis. *J Cell Biol*, 27:445-457, 1997.
3. Kingsley DM. Genetic control of bone and joint formation. *Novatis Found Symp*, 232:213-222, 2001.
4. Lettice LA, Purdie LA, Carlson GJ, *et al.* The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 17:9695-9700 1999.
5. Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol*, 105:2569-2579, 1987.
6. Patton JT, Kaufman MH. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bone of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. *J Anat*, 186:175-185, 1995.
7. Shibata S, Suzuki S, Tengan T, *et al.* A Histological study of the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible using coronal sections. *Arch Oral Biol*, 41:47-54, 1996.
8. Soskolne WA, Schwartz Z, Ornoy A. The development of the fetal mice long bones in vitro: an assay of bone modeling. *Bone*, 7:41-48, 1986.
9. Zimmermann B. Occurrence of osteoblast necroses during ossification of long bone cortices in mouse fetuses. *Cell Tissue Res*, 275:345-353, 1994.
10. 장동우, 윤영민, 박지영, 오승현, 전우진, 정수연, 김봉경, 성제경. 알코올 투여가 임신 랫드의 태자 골격형성에 미치는 영향. *실험동물학회지*, 15(2):115-120, 1999.