

Retinoic acid가 쥐 태자에서 구개 발생시 성장인자 발현에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

최 홍 립

Retinoic acid가 쥐 태자에서 구개 발생시 성장인자 발현에 미치는 영향

지도 나 동 균 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 홍 립

최홍림의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

항상 격려해주시고 지도해주신 나동균 선생님께 우선 깊은 감사와 존경의 뜻을 전합니다. 아울러 항상 자상하게 지도와 조언을 아끼지 않으신 해부학 박형우 교수님께 특히 감사의 말씀을 드립니다. 또한 늘 관심과 조언으로써 저에게 도움을 주신 박병윤 교수님, 산부인과의 서경, 병리학의 양우익 교수님, 그 외에 성형외과학교실의 여러 교수님들께 진심으로 감사드립니다. 실제 실험을 진행하는데 있어 큰 도움을 주신 해부학교실의 유병기, 권윤정 선생님께 감사드립니다.

무엇보다 하느님께 영광 돌리고 부모님께 감사드리며, 항상 저에게 기쁨과 힘이 되어준 저의 반쪽 아내 진민과 자랑스런 아들 태연, 사랑하는 딸 정연에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

목 차

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 실험동물	6
2. Retinoic acid 처리	6
3. 배자의 적출	6
4. 형태 관찰	7
5. 조직과 면역효소 조직화학염색	7
III. 결과	8
1. 전체 외형 소견	10
2. 구개돌기의 외형과 조직 소견	10
3. 면역효소 조직화학염색 소견	12
TGF β -3	13
MMP-13	14
TIMP-2	15
FGF-R2	16
IV. 고찰	17
V. 결론	21
참고 문헌	22
영문 요약	27

그림 목차

Fig. 1. Rat embryos of day 16	10
Fig. 2. Sequence of closure of palatal processes in control and RA treated group	11
Fig. 3. Different status of closure of palatine processes in embryos of one breed (day 16)	12
Fig. 4. Development of collagen in day 16 and 17 rat embryos	13
Fig. 5. Immunohistochemistry with anti-TGF β -3	14
Fig. 6. Immunohistochemistry with anti-MMP-13	15
Fig. 7. Immunohistochemistry with anti-TIMP-2	15
Fig. 8. Immunohistochemistry with anti-FGF-R2	16

Retinoic acid가 쥐 태자에서 구개발생시

성장인자 발현에 미치는 영향

포유동물의 구개는 구강 양쪽 외측벽에 형성된 구개돌기가 성장하여 서로 만나 융합됨으로써 형성되는데, 이 과정에 관계되는 요인에 이상이 있으면 인간에서 가장 흔한 선천성 기형 중의 하나인 구개열(cleft palate)이 초래될 수 있다. 구개열의 발생 원인은 명확히 알려져 있지 않으나, 최근에 산모가 임신 초반에 피부질환 치료제 등으로 이용되는 retinoic acid(RA), 즉 비타민 A에 노출되는 경우에 구개열의 발생이 증가한다고 알려져 있다.

따라서 이 실험에서는 RA를 처리한 임신 쥐에서 적출한 배자의 외형과 조직 표본을 통해 구개의 성장과 융합 정도를 관찰하고, 구개형성에 관여하는 것으로 알려진 $TGF\beta$ -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2와 같은 인자의 발현 양상을 대조군과 비교함으로써 RA가 태아의 구개형성에 미치는 영향을 구명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 외형관찰 결과, RA에 노출된 군에서는 배자의 머리-둔부길이, 코에서 눈 내측부까지의 길이, 사지 및 꼬리의 길이가 대조군에 비해 짧았으며, 수지방사의 형성도 느렸다.

2. 조직표본 관찰에서 대조군에서는 발생 16일에 혀 양 쪽 구개돌기의 수평배열과 융합이 이루어졌지만, 실험군에서는 17일에 수평배열이 이루어졌다. 그러나 RA에 의해 구개돌기의 수직 성장이 저해되어 수평배열이 되어도 돌기의 길이가 짧아 융합이 일어나지 않았다.

3. Trichrome 염색 표본 관찰에서는 구개에서의 collagen 섬유 발현이 RAsp 노출된 군이 대조군보다 미약하였으며 비중격에서는 전혀 발현되지 않았다.

4. $TGF\beta$ -3, MMP-13, TIMP-2는 모두 RA에 의해 발현이 증폭되는 시기가 지연

되었다. 대조군에서는 16일에 최대였으나 실험군에서는 17일에 최대였다. FGF-R2는 RA에 의해 17일에 상피에서 발현되었으나, 이는 발생 16일에 중간엽에서 발현이 관찰된 대조군과 상반된 결과를 보였다.

이상의 결과를 종합하면 RA에 의해 구개의 발생의 속도가 지연되며, 특히 수직 성장이 저해되어 구개열이 발생하는 것으로 추정되며, TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2의 발현 저하가 구개열 발달 이상의 병인으로 작용할 수 있는 것으로 생각되었다.

핵심되는 말: retinoic acid, development, palate, cleft palate, TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2, rat

Retinoic acid가 쥐 태자에서 구개발생시 성장인자 발현에 미치는 영향

< 지도 교수 나 동 균 >

연세대학교 대학원 의학과

최홍립

I. 서 론

포유동물의 구개는 인두비부(nasopharynx)와 인두구강부(oropharynx)를 분리시켜 음식물과 공기의 통로가 섞이지 않게 하고, 구강에 음압이 형성되게 하여 유아가 젖을 빨 수 있게 해 주며, 언어의 발음에도 중요한 구조이다. 구개는 구강의 양쪽 외측벽에 형성된 돌기가 성장하여 서로 만나 융합됨으로써 형성되며, 이 과정에 관계되는 여러 요인에 이상이 있으면 인간에서 가장 흔한 선천성 기형 중의 하나인 구개열(cleft palate)이 초래될 수 있다.¹

구개열의 발생 원인은 명확히 알려져 있지 않다. 그렇지만 유전 또는 환경 요인이 개별적 또는 복합적으로 관여하며,² 인종, 지역과 성별에 따라서도 발생 빈도가 다름이 보고 되어 있다.³ 실험동물에서 오염물질이나 독소에 노출을 줄였을 때 보다 배우자(partner)에 변화를 주었을 때 구개열 발생의 재발 빈도가 더 많이 감소했다는 연구 결과는 구개열의 발생 원인으로 환경 요인 보다는 유전 요인이

더 중요할 수 있음을 시사한다.⁴

구개 발생의 연구에 많이 이용되는 쥐는 발생 13일에서 17일 사이에 구개돌기가 발생되고 융합되는 것으로 알려져 있다. 양쪽 구개돌기(palatine process)가 융합될 때 돌기 끝의 내측단상피(medial edge epithelium, MEE)가 서로 만나 정중 봉합(midline seam)을 형성하게 되는데, 결국에는 내측단상피가 없어지고 기저막이 붕괴됨으로써 완전한 융합이 일어난다. 구개열의 발생 기전으로 다양한 가설이 제안되었는데, 구개돌기 자체의 성장 지연, 처음에 수직으로 자라던 구개돌기의 수평 배열의 지연 또는 실패, 수평 배열 후 양쪽 구개돌기의 접촉 이상, 내측단상피의 비정상 세포사, 융합 후 이차적인 파괴, 구개 주위의 중간엽 축합(condensation) 및 분화의 비정상 등이 있다.⁵

구개돌기의 발생과 융합에는 transforming growth factor (TGF),⁶ epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF)⁷ 등과 같은 성장인자 뿐만 아니라, 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 재구성(remodelling)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 matrix metalloproteinase (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 등도 관계되는 것으로 알려져 있다.⁸

TGF의 경우 TGF β -3 null mutant에서 다른 두경부의 기형 없이 구개 융합이 일어나지 않음이 보고 되었다.⁹ 또한 기관배양 연구에서 TGF β -3을 중화시키는 항체에 의해 구개융기의 융합이 일어나지 않았음이 보고 되었고,¹⁰ TGF β -3은 구개돌기의 유착(adhesion)과 중간엽으로의 변형(transformation)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{11, 12}

FGF신호는 상피-중간엽 상호작용(epithelial-mesenchymal interaction)에 중요한 역할을 하며, 구개돌기의 성장과 융합을 조절하므로 비정상적인 FGF신호는 구개열 형성과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.⁷

세포외기질은 이차구개의 형성에 중요한 역할을 하며,^{13,14} MMP와 이들의 길항제인 TIMP에 의해서 조절을 받으며, 이 둘은 EGF와 TGF β -3에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다.^{15,16,17} 이와 관련하여 TGF β 3-deficient mice를 이용한 실험에서 MMP-13의 발현이 급격히 감소하였고, 구개돌기가 융합되는 동안 MMP-13이 TGF β -3에 의해 직접적으로 유도됨이 보고되었다.¹⁷ TIMP-2 역시 TGF β -3의 조절

을 받는다고 알려져 있으며, 일반적으로 MMP와 TIMP의 상대적인 발현 비율에 의해 세포외기질의 온전성(integrity)과 세포 운명을 결정한다고 한다.¹⁷

최근에는 약물로 인한 선천성 기형이 늘고 있으며, 구개열도 마찬가지이다. 특히 산모가 임신기간 초반에 피부질환 치료제 등으로 이용되는 retinoic acid(RA)에 노출되는 경우에 구개열의 발생이 증가한다고 알려져 있다. Endogenous RA는 구개돌기의 융합 시 내측단상피의 세포탈락(apoptosis)에 중요한 역할을 하지만,¹⁸ exogenous RA는 구개의 발생에서 투여한 용량과 발생 시기에 따라 강한 기형유발물질로 작용할 수 있는 것으로 알려져 있다.^{19,20,21} 임신한 생쥐에서는 외부에서 RA를 주입하면 다양한 세포에서 세포탈락이 유도되는 것으로 보고된 바 있다.²² 이와 같이 RA는 구개발생에 영향을 미치는 강력한 기형유발물질임에도 불구하고 피지선에 미치는 영향으로 인한 피부 개선 효과 때문에 많은 가임기 젊은 여성들이 무분별하게 사용하고 있다.

따라서 이 실험에서는 특정 임신일의 임신 쥐에 RA를 주입한 후 구개가 융합되는 시기를 중심으로 그 이전 및 이후 시기에 태아를 적출하여 1) 육안 혹은 저배율 수술현미경으로 구개의 성장 및 융합 정도를 관찰하고, 2) 구개 부위의 관상단면 조직표본을 제작한 후 hematoxylin-eosin(H-E), trichrome 등의 통상적인 염색법과 면역조직화학법을 이용하여 TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2 등의 발현변화를 비교 관찰함으로써 RA가 어떤 인자의 발현에 영향을 미쳐 구개열을 유발할 수 있는지를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley 계의 흰쥐를 이용하였다. 쥐는 저녁에 암컷 3-4 마리와 수컷 1-2 마리를 한 우리에 합사시켰고, 다음 날 오전 8시에 질도말검사를 시행하여 현미경 관찰에서 질전(vaginal plug)이 관찰되면, 이때를 발생 0일로 정의하였다. 임신이 확인된 쥐는 따로 분리된 우리에서 키웠다. 발생 13일부터 17일까지 각 발생일 마다 3예의 임신 쥐를 사용하였다. 한 번 임신에서 약 12마리의 태자를 얻을 수 있었다.

2. RA 처리

Exogenous RA의 *in vivo* 효과를 관찰하기 위해, 쥐를 실험군과 대조군으로 나누어 발생 11일에 복강내 주사를 통해 RA를 주입하였다. RA (Sigma, St. Louis, MO, USA) 저장 용액(stock solution)은 100mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 -70℃에 보관하였으며, 80mg/kg이 되도록 sesame oil 1ml에 녹여 사용하였다.

3. 배자의 적출

임신 쥐는 발생 13일부터 14일, 15일, 16일 및 17일 오전 8시에 ether로 흡인 마취시킨 후 배자를 적출하였다. 우선 복벽을 절개한 후 난관을 노출시켰다. 그리고 한쪽 난관의 끝을 잡고 부착된 장간막을 절개하였고, 자궁과 질 연결 부위를 횡으로 절개하고 반대편 난관을 분리시킴으로써 전체 자궁을 적출하였다. 적출한 자궁은 실리콘이 깔린 페트리 디쉬에 담긴 phosphate buffered solution(PBS)

용액 속에서 조작하였다. 난관 끝과 자궁-질 연결부를 핀으로 바닥에 고정시킨 후, 안과용 가위로 자궁을 긴 축을 따라 절개하여 착상 부위를 노출시킨 후 탈락 막이 가급적 손상되지 않게 자궁벽으로부터 분리하였고, 날카로운 전자 현미경용 휘셋(electron microscope forceps)을 이용하여 모든 막을 벗겼다.

분리된 배자는 표본 제작의 경우 즉시 고정액에 넣었고, 형태 관찰의 경우에는 PBS에 넣어 관찰하였다.

4. 형태 관찰

배자는 5-60배로 확대가 가능한 수술현미경(M10, Leica, Switzerland)을 이용하여 대조군과 실험군에서 머리-둔부길이를 측정하고 발생 상태를 관찰하였다. 또한 구각(angle of mouth)을 절개한 후, 구개돌기의 출현, 성장 정도, 융합 정도를 관찰하였다.

5. 조직표본 관찰

① 표본 제작

분리된 배자는 4% paraformaldehyde/PBS에 하루 이상 고정시켰다. 고정이 끝난 배자는 0.87% sodium chloride로 희석한 50% 알코올에 20분 동안 처리한 후, 70, 95 및 100% 알코올의 순서로 15분씩 3차례 탈수하고, Histoclear로 투명화 시켰다. 파라핀에 30분씩 3회 침투시킨 후 포매 하였다. 파라핀 블록은 5 μ m 두께로 박절하여, 코팅된 글라스 슬라이드(Dako, Japan)에 붙인 후, 56 $^{\circ}$ C로 유지되는 dry oven에서 1시간 동안 건조시켰다.

② 표본의 염색

핵과 세포질을 관찰하기 위해 H-E 이중염색을 시행하였다. 이를 위해 xylene에서 5분 동안 3 차례 파라핀을 제거하고 100, 95, 85, 및 70% 알코올에서 3분 동안 흡수과정을 거친 후, 흐르는 물에 수세하고 hematoxylin에 5분 동안 핵 염색

을 한 다음, 흐르는 물에 수세하고 0.5% HCl/70% 알코올로 탈색하여 흐르는 물에 다시 수세하였다. Eosin에 3분 동안 염색하였고, 70, 85, 95 및 100% 알코올에서 탈수하여 xylene에서 청명 과정을 거친 후 permount로 봉입하였다.

collagen을 염색하기 위하여, Masson's trichrome 염색을 시행하였다. Xylene에서 파라핀을 제거하고, 100, 95, 85, 70% 알코올의 순서로 함수시킨 후 흐르는 물에 수세하였다. 부양고정액(Bouin's fixative)에 담아 실온에 놔두었고, 다음 날 아침, 노란색이 없어질 때까지 흐르는 물에 수세하였다. 10분간 Weigert's iron hematoxylin에서 핵을 염색하였다. 10분간 흐르는 물에 수세한 후 Biebrich scarlet-acid fuchin 용액에서 15분 동안 염색하였다. 증류수로 수세한 후, phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액에서 15분간 방치한 후, 2.5% aniline blue 용액에서 20분간 염색한 후, 증류수로 씻고 1% acetic acid 용액에 5분간 방치하였다. 알코올에서 탈수하고, 청명과정을 거친 후 봉입하였다.

③ 면역조직화학법

표본은 Histoclear로 파라핀을 제거한 후, 알코올로 함수하였다. 우선 endogenous peroxidase의 활성을 막기 위해 3% H₂O₂/methanol에 10분 동안 둔 후, 물에 씻고, epitope의 활성 회복을 위해 citrate buffer가 들어있는 용기에 넣어 15분간 끓였다. Tris-buffered saline - 0.1% tween20 (TBST)로 씻어주고, 이후 과정은 Cap-Plus Detection Kit(Zymed, South San Francisco, CA, USA)를 사용하여 면역염색을 시행하였다.

우선 blocking solution에 10분 동안 처리한 후, anti-TGFβ-3 (Lab Vision, Westinghouse Er. Fremount, CA, USA) (1:100), anti-FGF-R2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) (1:50), anti-MMP-13 (Lab Vision) (1:100), anti-TIMP-2 (Lab Vision) (1:100) 항체로 4℃에서 다음 날까지 반응시켰다. PBS로 10분간 씻어준 후, biotinylated secondary antibody (Zymed)로 20분 동안 반응시키고, 다시 PBS로 10분간 씻어준 후, Streptavidin-HRP (Zymed)로 20분간 반응시켰다. PBS로 10분간 씻은 후, 1 방울의 DAB Chromogen (Dako, Japan)을 1ml의 substrate (Dako, Japan)에 희석한 용액을 슬라이드에 떨어뜨려 1-2분간 incubation

시킨 뒤, 증류수로 씻었다. 대조염색을 위해 Mayer hematoxylin에 5초간 담근 후 물로 씻고, 알코올로 다시 탈수시킨 후 봉입하였다.

III. 결 과

1. 전체 외형 소견

대조군과 RA 처치군 모두에서 발생이 진행됨에 따라 배자의 크기가 커졌으나 같은 발생일의 경우 RA 처치군이 대조군 보다 머리-둔부길이가 짧았다. 또한 RA 처치군에서 대조군에 비해 성장이 저해되어 있는 것을 관찰할 수 있었는데 (Fig. 1) 우선 상악부의 성장을 나타내는 지표인 턱에서 눈 내측부까지의 길이가 짧았고, 사지는 짧고 작았으며 세포탈락에 의해 형성되는 발가락의 형성이 지연되어 있음을 관찰하였다. 꼬리도 RA 처치군에서 더 짧았다.

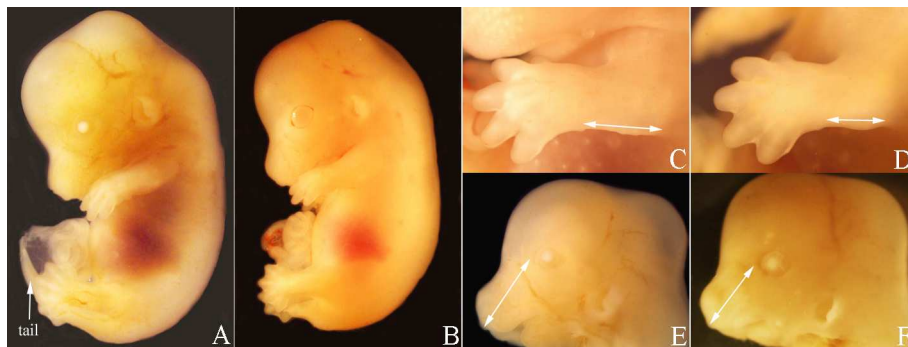


Fig. 1 Rat embryos of day 16. A, C, E Control group. B, D, F RA treated group. RA treated embryos were smaller than control, and showed short tail (B), short limb bud (D). Also the distance between the medial angle of eye and the jaw is reduced in RA treated embryo (F).

2. 구개돌기의 외형과 조직 소견

구개돌기의 형성은 대조군과 RA 처치군 모두에서 발생 13일에 상악돌기 (maxillary process)의 내측면에서 하방으로 뻗는 작은 돌출로 시작되었다.

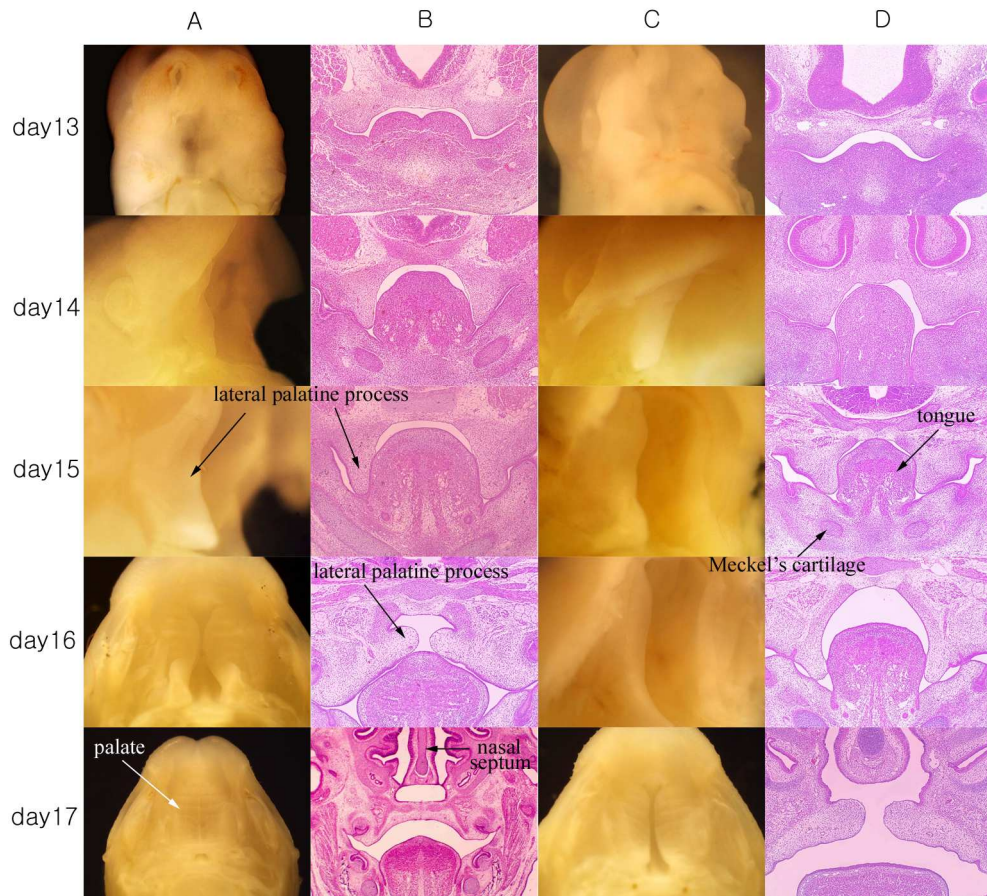


Fig. 2 Sequence of closure of palatal processes in control (A, B) and RA treated group (C, D). While palatal shelves formed a horizontal position at day 16 p.c. in control, this was accomplished with no contact of shelves at day 17 p.c. in the retinoic acid group.

정상 대조군의 구개돌기는 혀 양쪽에서 수직 방향으로 계속 성장이 일어나다가, 발생 16일 혀의 상방에서 수평으로 놓였다 (Fig. 2). 한 배의 발생 16일 배자 전체를 관찰해 본 결과, 자궁 쪽의 배자는 수평으로 놓여 양쪽의 돌기가 거의 접촉되었으나 난소 쪽의 배자는 아직 수평으로 놓여 있지 않아 구개돌기가 수평으로 놓이는 과정은 빠르게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한 돌기의 전방부가 먼저 수평으로 놓였으며, 발생이 진행되면서 후방부도 수평으로 놓였다. 양쪽 구개돌기의 접촉은 제3, 4구개주름(rugae) 위치에서 가장 먼저 일어나 X자 모양을

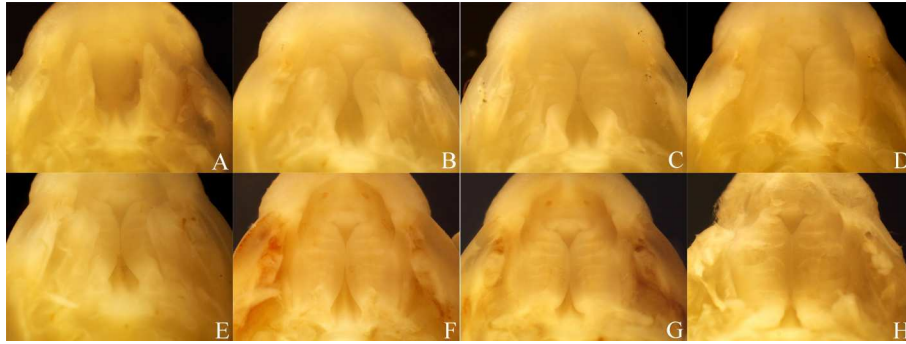


Fig. 3 Different status of closure of palatine processes in embryos of one breed (day 16). Embryos were arranged from the one proximal to the ovary in alphabetical order. The further the embryo were from the ovary, the more palatal process occurred.

나타내었으며, 지퍼를 채우 듯 전후 방향으로 구개의 접착이 진행되었다. 접착된 돌기의 융합은 발생 17일에 이루어졌다.

RA 처치군에서도 구개돌기는 발생 13일에 발달하기 시작하였으나, 대조군과 달리 성장이 뚜렷하게 지연된 것을 관찰할 수 있었다. 우선 발생 14일, 15일 및 16일에 일어나는 구개돌기의 수직 성장이 대조군에 비해서 뚜렷하게 저해되어 혀의 양쪽에서 관찰되는 구개돌기의 길이가 짧았다. 또한 구개돌기의 수평 배열이 대조군에 비해 느려져 발생 16일 배자에서 구개돌기가 수평으로 놓인 경우는 한 예도 없었고, 발생 17일이 되어서야 수평으로 놓인 양쪽 돌기는 사이의 간격이 대조군에 비해 훨씬 떨어져 있어 돌기의 성장이 크게 저하되어 있음을 알 수 있었다.

한편 H-E염색과 trichrome 염색을 한 조직 표본의 관찰 결과 (Fig. 4) 대조군에서는 collagen 섬유 발현이 발생 16일에 맥켈 연골 주위의 하악골에서 뚜렷했고 구개에서는 소량이 관찰되었으며, 발생 17일에 하악골 및 구개, 비중격 근처에서 collagen 섬유가 관찰되었다. 반면 RA 처치군에서는 collagen 섬유 발현이 발생 16일에 하악골 주위에서만 관찰되었고 발생 17일이 되면 하악골 및 구개에서 발현이 있지만 대조군에 비해 구개의 발현은 미약하였으며 비중격에서는 전혀 발현되지 않았다.

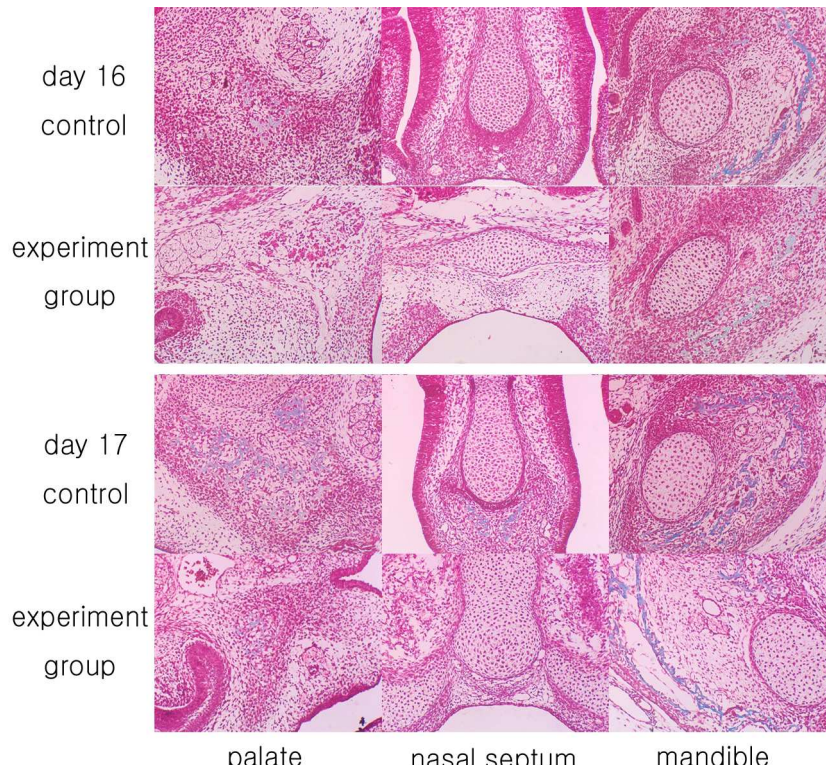


Fig. 4 Development of collagen in day 16 and 17 rat embryos. Trichrome stain. Strong stain in mandible around the Mechel's cartilage and weak expression in palate were detected at day 16 p.c. and nasal septum as well as palate and mandible showed collagen stain in control group. However, stain was detected only in the mandible at day 16 p.c. and in the mandible and palate at day 17 p.c. in retinoic acid group.

3. 면역효소 조직화학염색 소견

구개의 발생과 성장에 관여하는 것으로 알려져 있는 유전자인 $TGF\beta$ -3, MMP-13, TIMP-2 및 FGFR-2의 발현이 대조군과 RA 처치군에서 어떤 차이를 나타내는지를 살펴해보았는데, 발생 13일과 14일에는 대조군과 RA 처치군에서 특별한 차이가 관찰되지 않았다.

$TGF\beta$ -3

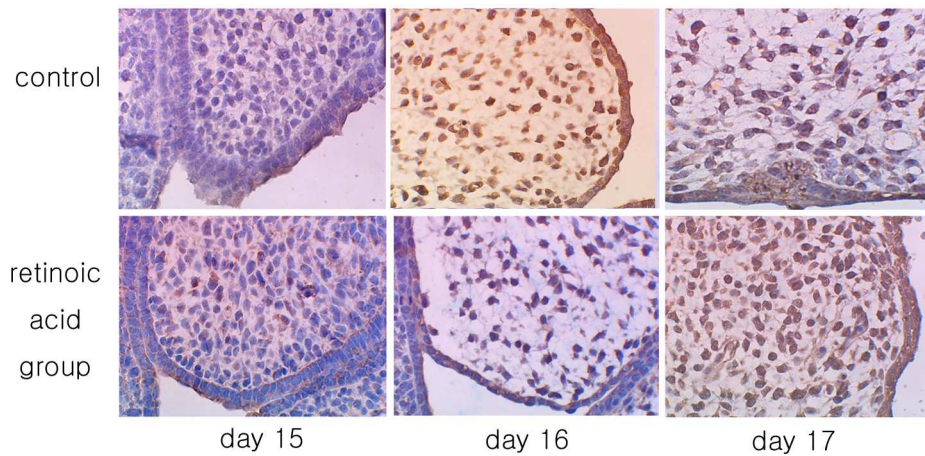


Fig. 5 Immunohistochemistry with anti-TGF β -3. All sections were coronal. The most intensive expression was detected in both mesenchyme and epithelium at day 16 p.c. in control and at day 17 p.c. in the retinoic acid group.

대조군에서는 발생 15일에 그 발현이 약하였으나 (Fig. 5) 구개돌기가 수평으로 놓이기 직전인 발생 16일에 최대의 발현을 보였으며, 이후에는 약간 감소하였으나 여전히 강하게 발현되었다. TGF β -3는 구개돌기 부위 상피와 중간엽세포 주변 가까이의 세포외기질에서 발현되었다.

실험군에서는 발생 16일보다는 발생 17일에 아주 강하게 발현되었으며, 대조군과 마찬가지로 상피와 중간엽에서 모두 발현되었다. 대조군의 발생 16일과 실험군의 발생 17일은 구개돌기가 수평으로 배열되었으나 내측단상피가 아직 융합되지 않은 점에서 구개의 발달 정도가 비슷한데, TGF β -3가 강하게 발현된다는 점에서도 상당히 유사하였다.

MMP-13

대조군과 실험군 모두에서 TGF β -3와 유사하게 발생 15일에는 MMP-13의 발현이 미약하였다 (Fig. 6). 대조군의 경우 구개돌기가 수평으로 배열되는 발생 16일에 가장 많이 발현이 되었다가 이후에는 발현이 감소하였다. RA를 처리한 실험군에서는 TGF β -3의 유사하게 발생 16일에는 미약하지만 발생 17일에 아주 급격한 발현 증가를 나타내었다.

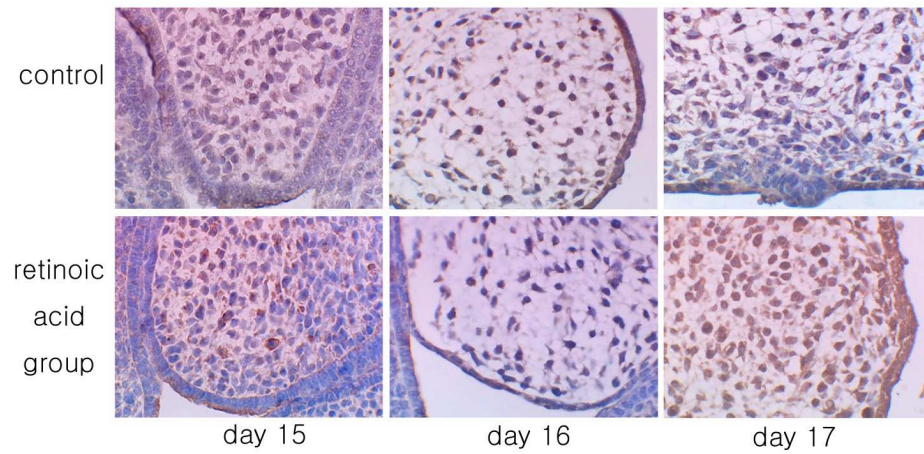


Fig. 6 Immunohistochemistry with anti-MMP13. All sections were coronal. While the most intensive expression was detected at day 16 p.c. in control, it was at day 17 p.c. in the retinoic acid group.

대조군에서는 내측단상피가 융합되기 전인 발생 16일에 상피와 중간엽세포 주변의 세포외기질에 발현되었으나, 내측단상피의 융합으로 정충봉합이 거의 사라진 발생 17일에는 대부분 상피에서만 관찰되었다.

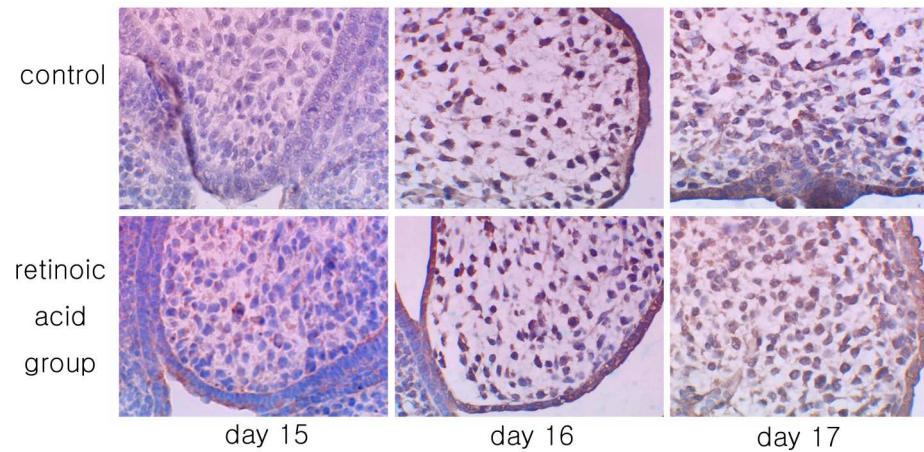


Figure 7. Immunohistochemistry with anti-TIMP2. All sections were coronal. The most intensive expression was detected at day 16 p.c. in both cases.

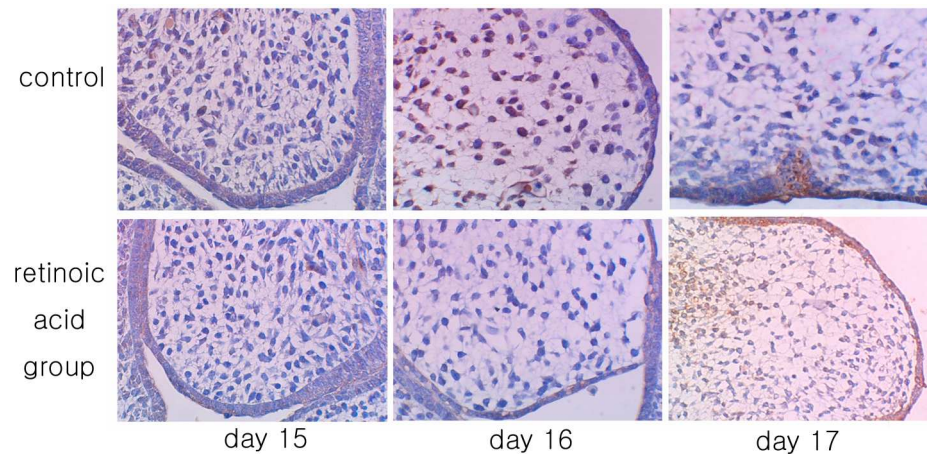


Figure 8. Immunohistochemistry with anti-FGFR2. All sections were coronal. Strong expression was detected only in mesenchymal cells at day 16 p.c. in control, whereas only epithelium cells showed intense FGF-R2 expression at day 17 p.c. in retinoic acid group.

실험군에서는 발생 16, 17일에 상피와 중간엽에서 모두 발현이 관찰되었으며, 대조군과 달리 발현양은 발생 17일에 급격히 증가하였다. 이 경우에도 $TGF\beta$ -3의 경우처럼 RA를 처리한 군의 발생 17일 소견은 대조군의 발생 16일에서와 유사하였다.

TIMP-2

대조군과 실험군에서 모두 발생 15일에는 그 발현이 미약하였으나 (Fig. 7), 발생 16일 경 발현이 크게 증가하였다가 그 이후에는 감소하였으며 특히 중간엽에서의 발현이 급감하고 상피에서는 여전히 발현이 관찰되었다. TIMP-2와 같이 세포외기질을 재구성하는 역할을 하는 MMP-13와는 그 발현 양상이 상당 부분 겹치기는 하나 발현 정도의 증감은 조금 달랐다. RA를 처리한 경우에 MMP-13은 발생 16일에는 그 발현이 약하나 17일에 강하게 증가한 데 반해, TIMP-2는 16일에 강하게 나타나고 17일에는 그 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

FGFR-2

대조군과 실험군 모두 발생 15일에는 그 발현이 미약하였다(Fig. 8). 대조군에서는

발생 16일에 중간엽에서만 강하게 발현되고, 발생 17일에는 발생 16일과 달리 중간엽에서의 발현은 약화되고 상피에서 강하게 발현되었다.

그러나 실험군에서는 발생 16일까지 FGFR-2의 발현이 미약하였고, 발생 17일에는 상피에서만 그 발현이 증가하였다. 실험군의 발생 17일의 경우, 대조군의 16일과 구개의 발생 정도는 비슷함에도 불구하고 FGFR-2의 발현이 관찰되는 부위는 RA의 처리에 의해 대조군과 다르게 나타났다.

IV. 고 찰

구개는 주름(rugae)이 있는 앞쪽의 경구개(hard palate)와 주름이 없는 뒤쪽의 연구개(soft palate)로 이루어져 있으며, 해부학적으로 구강의 천정 및 비강의 바닥을 형성한다. 구개는 제1인두궁의 신경능선 세포들이 원시구강으로 이동해 두정부의 외배엽(craniopharyngeal ectoderm)과 상호 작용함으로써 상악돌기의 내측면에 구개돌기를 형성하여 발생이 시작된다. 구개돌기는 발생 초기에는 수직으로 성장하다가 수평을 이루게 되고, 이때 구개돌기는 내측단상피 부위에서 서로 접촉되고 융합된다. 내측단상피의 유착으로 형성된 정중봉합(midline epithelial seam, MES)은 처음에는 여러 세포층으로 이루어지지만 결국 단세포층으로 되면서 소실되며, 이를 통해 양쪽 구개돌기 및 비중격이 융합되어 비강과 구강의 분리된다. 인간의 경우²³는 발생 약 6주경에, 쥐에서는 발생 약 13일경에 발생이 시작되어 인간에서는 발생 약 9주경에, 쥐에서는 발생 약 17일에 융합이 완성된다.

구개가 수직으로 성장하다가 수평으로 놓이게 되기 위해서는 구개 중간엽의 세포외기질에 존재하는 hyaluronan, collagen III, fibronectin이 중요하다고 알려져 있다.^{13, 14, 24} 이 물질들은 구개의 배열이 변경되는 동안 각각의 시간적 및 공간적으로 특징적으로 발현되며, 이 발현 변화는 구개의 형태 변화와 관련이 있다고 한다. 특히 hyaluronan이 많은 세포외기질의 형성은 구개의 배열 변화를 일으키는 힘(intrinsic force)으로 제시되었다.^{13, 14} 이러한 과정이 이루어지기 위해선 구개를 형성하는 상피와 중간엽사이의 긴밀하고 복잡한 상호작용이 필요하며 이를 위해선 많은 성장인자와 세포외기질의 요소들이 관련된 것으로 알려져 있다.

TGF β family는 구개의 중간엽세포에서 hyaluronan 분비를 자극한다.²⁵ 쥐에서 구개 형성될 때 특정 부위에 glycosaminoglycans (GAGs), 특히 hyaluronan의 축적이 구개를 올리는 힘(intrinsic shelf elevating force)으로 작용한다는 보고가 있다.²⁶ Hyaluronan은 정전부하(electrostatic charge)가 매우 강하기 때문에 같은 무게의 다

른 분자에 비해 물과의 친화성이 열배 정도 강하며, 국소적인 부위에 축적이 되면 세포외기질(ECM)에 수분 함량이 급증하게 되어 구개가 수평으로 놓이는데 작용한다.²⁷ 구개가 수평으로 놓여 융합이 일어날 때, 전측부가 후측부에 비해 hyaluronan이 먼저 증가하고 감소도 먼저 일어난다는 보고가 있다.²⁸ 이 실험에서도 16일 배자에서 구개가 수평으로 올라가는 것을 관찰해 보면 앞쪽 부분이 먼저 올라가고 이어서 뒤쪽 부분이 올라감을 관찰하였고, 이는 hyaluronan의 분비 때문으로 추정할 수 있다. 반대로 RA 처리군에서는 TGF β -3의 발현이 발생 16일에는 미약하였고 수평으로 놓인 후인 발생 17일에 특징적으로 증가하였다. 따라서 대조군에 비해 구개가 수평으로 놓이는 것이 느리게 일어났으며 수평으로 놓인 후에도 hyaluronan의 분비가 정상에 비해 부족하여 세포외기질 내의 수분 함량이 부족하게 되어 구개돌기의 세포밀도가 상당히 증가해 있음을 관찰하였다.

이와 같은 hyaluronan의 증가와 더불어 collagen III와 fibronectin이 내측 및 중앙부의 중간엽에서 사라지게 되는데,^{13, 14} 이것에는 MMP가 담당하며, 최근 연구에 의하면 TGF β -3의 직접적인 조절을 받는다.⁶ MMP가 TGF β -3의 조절을 받으며 구개의 발생에 관여한다는 연구 결과는 여럿 있는데, 1) TGF β -3 -/- 배자에서 MMP 13과 MMP-13의 길항제인 TIMP-2의 발현이 억제되었으며, 구개열 현상이 나타났고,⁹ 2) 용기하는 구개돌기의 섬유모세포를 배양한 결과, TGF β -3가 MMP-13을 강하게 유도 시킴을 확인할 수 있었으며, 3) TIMP-2와 같은 길항제의 처리로 MMPs의 활성을 억제 시킨 경우, 구개의 융합이 이루어지지 않았다고 한다.

특히 MMP-13은 다른 MMP보다도 다양한 substrate에 작용하는데, 이는 collagen I, II, III을 substrate로 할 뿐만 아니라, 강력한 젤라틴(gelatin) 분해 능력을 갖으며, type IV, X XIV collagen, tenascin, fibronectin, aggrecan core protein에 대해서도 작용을 한다.^{29, 30, 31, 32, 33} MMP-13이 이렇게 다양한 substrate에 대해 기능을 하기 때문에, 빠르고 효과적으로 아교질성의 세포외기질의 재구성을 가능하게 한다고 한다.

이 실험에서도 MMP-13은 구개의 수평 배열이 일어나는 발생 16일에 그 발현이 상당히 증가되어 있었고, 이는 TGF β -3의 발현 양상과 상당히 유사한 것으로 관찰되었다. 즉 MMP-13은 TGF β -3의 조절을 받아 세포외기질의 성분을 빠르고 효과적으로 조절하여 구개의 수평 배열을 가능하게 한 것으로 유추된다.

MMP-13의 길항제로 알려져 있는 TIMP-2 또한 구개가 융기될 때 구개의 상피와 중간엽에서 관찰되었다. TGF β -3 -/- 생쥐의 경우, 구개열이 발생하였고 이때 TIMP-2의 발현이 억제된 것으로 보고된 바 있다.⁹ 그러나 구개의 중간엽세포를 배양한 결과, TGF β -3 -/- 세포에서 TIMP-2는 억제되지도 않았고 TGF β -3에 의해 유도되지도 않았다. 따라서 TIMP-2는 TGF β -3의 직접적인 조절 대상이라기보다는 다른 신호체계에 의해 조절되는 것으로 해석되고 있다.⁶

이번 실험의 결과에서도 MMP-13의 발현은 TGF β -3의 발현 결과와 매우 유사하였으나, TIMP-2는 조금 차이가 있었다. 모두 발생 16일에 증가하긴 하였으나 발생 16일에는 MMP-13이, 발생 17일에는 TIMP-2가 더 강하게 발현한 것으로 관찰되었다. 발생 16일은 구개의 수평 배열이 일어나는 시기로, 세포외지질에서 MMP-13의 작용이 융기에 필요한 내부적 힘을 만들어내며, 구개의 수평 배열이 끝나고 내측단상피의 융합과 MES의 소멸을 위한 상피와 중간엽 사이의 긴밀한 상호작용을 위해 MMP-13의 기능이 TIMP-2에 의해 억제된 것으로 보인다. 즉 MMP-13의 기능을 조절하는 것은 TIMP-2의 존재 유무가 아니라 MMP-13에 대한 TIMP-2의 비율이 중요한 것으로 해석된다. 그러나 면역조직 염색 결과 MMP-13과 TIMP-2의 양을 분석하는 것을 쉽지 않으며 western blot analysis와 같은 양적 분석이 뒷받침 되어야 좀 더 정확한 해석이 가능할 것으로 생각된다.

FGF 신호 또한 구개 형성에 중요하다는 결과가 많이 보고 되고 있다.^{34, 35, 36, 37, 38,}
³⁹ 특히 FGF-R2 knockout mouse에서는 구개열이 나타났으며,⁴⁰ FGF의 ligand는 생쥐 배자에서 구개가 발생하는 시기에 구개에서 발현하는 것으로 알려져 있다.⁴¹ 이 실험에 의하면 FGF-R2는 발생 16일에 중간엽 세포에서 특이적으로 강하게 발현되며, 이러한 발현 양상은 FGF 신호체계가 구개 돌기의 수평 배열을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 또한 이러한 사실은 FGF-R2 knockout mouse가 구개열 증상을 보이는 현상을 설명할 수 있다.

RA를 처리한 경우, 구개돌기의 융기는 17일에 이루어졌으며, 돌기의 길이 성장이 대조군보다는 짧아 수평배열이 된 후에도 내측단상피의 융합이 이루어지지 않았다. Endogenous RA는 발생 중인 구개에서 계획세포사를 조절하는 것으로 알려져 있고,¹⁸ 외부에서 주입한 RA는 구개돌기의 성장, 융기, 융합에 모두 영향을

미친다고 한다.^{19, 20, 21} 14.5일의 생쥐에서 구개 돌기가 융합되지 않은 것은 MEE의 세포 사멸의 증가로 인한 결과라는 보고가 있다.¹⁸ 또한 최근에는 RA가 세포 주기를 억제한다고 알려졌다.

이 실험에서도 exogenous RA에 의해 구개돌기의 발생에서, 특히 구개가 수평으로 되는 과정이 하루 정도 지연되었고 구개돌기의 길이 성장은 대조군에 비해 덜 일어났다. 이러한 현상은 RA로 인한 세포주기의 억제에 의해 성장이 지연된 것으로 보이며, 또한 이는 세포사멸의 증가로 인한 길이 성장 장애를 일으킨 것으로 보인다. 이로 인해 RA를 처리한 경우에는 17일에 구개돌기가 융기한 후에도 충분히 길이 성장이 이루어지지 않아 양 쪽 두 돌기가 융합되지 않는 결과를 초래한 것으로 유추된다.

구개의 발생의 속도가 지연된 것과 유사하게 $TGF\beta$ -3의 발현 또한 대조군보다는 하루 늦게 그 최대 발현 현상을 보였으며 $TGF\beta$ -3의 조절을 받는 MMP-13 또한 예상대로 대조군보다는 늦게 그 발현이 증폭되었다. 이들은 모두 구개돌기의 세포외지질을 재배열하여 수직으로 배열된 구개돌기를 수평으로 배열되도록 조절하는 내부적 힘을 만들어내는 요소라는 것을 고려할 때, RA에 의해 구개 돌기의 융기가 지연된 것은 $TGF\beta$ -3와 MMP-13의 발현이 지연된 것과 상당한 관계가 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

Retinoic acid(RA)에 노출된 임신 쥐에서 적출한 발생 13일에서 17일까지의 배자는 전체적인 외형뿐만 아니라 구개의 발생에 있어서 다음과 같은 성장 저하와 발생 지연 현상을 보였다.

외형의 경우, RA에 노출된 군에서는 배자의 머리-둔부길이, 코에서 눈 내측부까지의 길이, 사지 및 꼬리의 길이가 대조군에 비해 짧았으며, 수지방사의 형성도 느렸다.

구개돌기의 경우, RA에 의해 구개돌기의 융기가 느리게 일어났을 뿐만 아니라, 구개돌기의 수직 성장이 저해되어 수평배열이 되어도 돌기의 길이가 짧아 융합이 일어나지 않았다.

TGF β -3, MMP-13, TIMP-2는 모두 RA에 의해 발현이 증폭되는 시기가 지연되었고 FGF-R2는 발현 부위에 있어서 대조군과 상반된 결과를 보였다.

이러한 exogenous RA에 의한 구개돌기 발생 지연과 유사하게 TGF β -3, MMP-13, TIMP-2의 발현이 동시에 지연되고 FGF-R2의 발현이 변화된 것을 고려할 때, 이들 또한 RA에 의한 구개열 발생에 깊이 관여하는 것으로 보인다.

참고 문헌

1. Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet.* 1992; 51(6): 1377-1385.
2. Bonner JJ, Slavkin HC. Cleft palate susceptibility linked to histocompatibility-2 (H-2) in the mouse. *Immunogenet* 1975; 2: 213-218
3. Gorlin RJ, Cervenka J, Pruzansky S. Facial clefting and its syndromes. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1971; 7(7): 3-49.
4. Christensen K, Schmidt MM, Vaeth M, Olsen J. Absence of an environmental effect on the recurrence of facial-cleft defects. *N Engl J Med.* 1995; 333(3): 161-164.
5. Ferguson MWJ. Palate development: mechanisms and malformations. *Irish J Med Sci* 1987; 156: 309-315.
6. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(5): 1457-1466.
7. Lee S, Crisera CA, Erfani S, Maldonado TS, Lee JJ, Alkasab SL, Longaker MT. Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in mouse palate development. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107(7): 1776-84.
8. Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl).* 2000 Aug; 202(2): 129-141.
9. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta

- 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* 1995; 11(4): 415-421.
10. Brunet CL, Sharpe PM, Ferguson MW. Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(2): 345-355.
 11. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, et al. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.* 1995; 11(4): 409-414.
 12. Sun D, Vanderburg CR, Odierna GS, Hay ED. TGF β -3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development.* 1998; 125: 95-105
 13. Morris-Wiman J, Brinkley L. An extracellular matrix infrastructure provides support for murine secondary palatal shelf remodelling. *Anat Rec.* 1992; 234(4): 575-586.
 14. Morris-Wiman J, Brinkley L. Rapid changes in the extracellular matrix accompany in vitro palatal shelf remodelling. *Anat Embryol (Berl).* 1993; 188(1): 75-85.
 15. Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JMP, Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 273: 9769-9777
 16. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The Activity of Collagenase-1 is Required for Keratinocyte Migration on a Type I Collagen Matrix. *J Cell Biol* 1997; 137: 1445-1457
 17. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(5): 1457-1466
 18. Cuervo R, Valencia C, Chandraratna RA, Covarrubias L. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Dev Biol.* 2002; 245(1): 145-156.

19. Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Etiology of retinoic acid-induced cleft palate varies with the embryonic stage. *Teratology*. 1989; 40(6): 533-553.
20. Newall DR, Edwards JR. The effect of vitamin A on fusion of mouse palates. II. retinyl palmitate, retinol, and retinoic acid in vitro. *Teratology*. 1981a; 23(1): 125-130.
21. Newall DR, Edwards JR. The effect of vitamin A on fusion of mouse palates. I. Retinyl palmitate and retinoic acid in vivo. *Teratology*. 1981b; 23(1): 115-124.
22. Sulik KK, Cook CS, Webster WS. Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development*. 1988; 103 Suppl: 213-231.
23. Yoon H, Chung IS, Seol EY, Park BY, Park HW. Development of the lip and palate in staged human embryos and early fetuses. *Yonsei Med J* 2000; 41(4): 477-484.
24. Knudsen TB, Bulleit RF, Zimmerman EF. Histochemical localization of glycosaminoglycans during morphogenesis of the secondary palate in mice. *Anat Embryol(Berl)*. 1985; 173(1): 137-142.
25. Sharpe PM, Ferguson MW. Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems. *J Cell Sci Suppl*. 1988; 10: 195-230.
26. Pratt RM, Goggins JF, Wilk AL, King CT. Acid mucopolysaccharide synthesis in the secondary palate of the developing rat at the time of rotation and fusion. *Dev Biol*. 1973; 32(1): 230-237.
27. Brinkley LL, Bookstein FL. Cell distribution during mouse secondary palate closure. II. Mesenchymal cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1986; 96: 111-130.
28. Singh GD, Moxham BJ, Langley MS, Waddington RJ, Embery G. Changes in the composition of glycosaminoglycans during normal palatogenesis in the rat. *Arch Oral Biol*. 1994; 39(5): 401-407.
29. Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett*. 1996; 380(1-2): 17-20.
30. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin

- C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem.* 1994; 269(24): 16766-16773.
31. Knauper V, Cowell S, Smith B, et al. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem.* 1997; 272(12): 7608-7616.
 32. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, et al. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996; 271(3): 1544-1550.
 33. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996; 97(3): 761-768.
 34. Malcolm S, Reardon W. Fibroblast growth factor receptor-2 mutations in craniosynostosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 785: 164-170.
 35. Reardon W, Wilkes D, Rutland P, et al. Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unsutural sporadic craniosynostosis. *J Med Genet.* 1997; 34(8): 632-636.
 36. Yamaguchi TP, Rossant J. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5(4): 485-491.
 37. Cohen MM Jr. Craniosynostosis: phenotypic/molecular correlations. *Am J Med Genet.* 1995; 56(3): 334-339.
 38. Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23(2): 59-62.
 39. Gorlin RJ. Fibroblast growth factors, their receptors and receptor disorders. *J Craniomaxillofac Surg.* 1997; 25(2): 69-79.
 40. De Moerloose L, Spencer-Dene B, Revest J. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127: 483, 2000

41. Sharpe PM, Brunet CL, Foreman DM, Ferguson MWJ. Localization of acidic and basic fibroblast growth factors during mouse palate development and their effects on mouse palate mesenchyme cells in vitro. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 202: 132, 1993

Abstract

The effect of retinoic acid on expression of growth factors during
palatogenesis in rat embryos

Hong Lim Choi

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dong Kyun Rah)

The formation of the mammalian secondary palate involves the growth of the palatine process vertically on either side of the tongue, then reorientation of these processes to a horizontal position above the tongue, and finally fusion of these processes. Thus, disruption at any stage of this complex process might result in cleft palate which is a frequently encountered congenital anomaly.

The pathogenesis of cleft palate is not fully understood, however, recently it has been known to be produced by retinoic acid application which is used commonly for skin diseases during the pregnancy.

Therefore, we analyzed palatogenesis of rat embryos treated with retinoic acid by gross and microscopic examinations. The expression of TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2 were also examined immunohistochemically and compared to the control. The results are as followings:

1. Embryos in the retinoic acid group showed reduction of embryo size and the distance between the medial angle of eye and the nose is also reduced.

2. While palatal shelves are formed a horizontal position at day 16 p.c. in control, this was accomplished at day 17 p.c. in the retinoic acid group. However, palatal shelves could not be contacted each other due to the

shortage of shelves caused by the impaired vertical growth in the retinoic acid group. Additionally, collagen fiber of palate was less than in control and even no collagen fiber was detected in nasal septum.

3. The expression of TGF β -3, MMP-13, TIMP-2 was delayed by retinoic acid. Whereas the most intensive expression was detected at day 16 p.c. in control, it was at day 17 p.c. in the retinoic acid group. Moreover, although FGF-R2 was expressed only in epithelium at day 17 p.c. in control, it was detected only in mesenchyme at day 16 p.c. in the retinoic acid group.

In conclusion, retardation of palatogenesis by the treatment of retinoic acid was paralleled with the delay or change of the expression of TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2. These results imply that TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2 might be involved in the developmental retardation and impaired growth of palatal shelves induced by retinoic acid.

Key words : retinoic acid, development, palate, cleft palate, TGF β -3, FGF-R2, MMP-13, TIMP-2, rat