

백서에서 임신 중 레티노산이
구개형태 발생에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

정명섭

백서에서 임신 중 레티노산이 구개형태
발생에 미치는 영향

지도교수 김 명 희

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

정 명 섭

정명섭의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

의 과 학 과

2006년 6월 일

감사의 글

인생가운데 가장 드라마틱한 순간을 선택하라면 주저함 없이 이곳 연대에서의 대학원과정이라 할 수 있을 것입니다. 과정을 마치기까지 남들과는 달리 4년여가 넘는 시간을 필요로 했고, 이 시간 속에서 개인적으로는 생명의 갈림길에도 서 보았습니다. 다시 새 삶을 살 수 있기까지 많은 고통과 인내가 필요했었던 시간이었기에 이 과정을 마치는 이 시간이 더욱더 감사하게 느껴집니다. 석사 과정을 통해 제 삶이 제 자신으로부터가 아닌, 하늘에 계신 아버지께서 맡겨주신 삶의 값을 지며 한 걸음, 한 걸음을 걸을 수 있도록 거듭나게 해준 시간이었습니다. 이 어려웠던 과정을 무사히 마칠 수 있도록 도와주신 분들에게 제 마음을 담아 감사의 글을 올리고자 합니다.

2002년 1월 3일, 부족했던 저를 환하게 웃는 얼굴로 받아 주시며, 제가 힘들고 어려울 때마다 채찍과 격려를 담아 과학자의 길이 얼마나 어려운지를 지도해 주셔서 이곳까지 올 수 있도록 인도해주신 김 명희 교수님께 먼저 감사의 말씀을 드립니다. 교수님을 통하여 단순히 실험을 잘하는 이가 아니라 체계적으로 생각하고, 추진하는 법을 배웠고, 곁에서 같이 생활하는 이들에게 배려하는 법도 배우게 되었습니다. 그리고 언제나 변함없는 모습으로 계신 저희 실험실 대장님, 실험실 식구들의 뒤에서 굳건히 계셔주신 박 형우 교수님께도 감사를 드립니다. 교수님 덕분에 백서의 발생과 형태적인 연구하고자 하는 열망과 열심을 가질 수 있었습니다. 그리고 바쁘신 와중에도 이 부족한 저의 실험과정과 결과를 꼼꼼히 점검하여 주셔서 좋은 논문으로 결실을 맺을 수 있게 도움을 주신 탁 관철 교수님께도 감사를 드립니다. 더불어 실험실 식구들에게도 감사를 드리고 싶습니다. 제 실험이 있을 때마다 옆에서 같이 도와주시고, 제 사수로써 전적인 지원을 해주시어 이 결과를 볼 수 있게 해주신 유 병기 선생님께 감사를 드립니다. 지금은 실험실을 떠나 더 좋은 곳에서 일하고 계시는, 저의 석사생활 기초적인 부분부터 많은 것을 가르쳐 주신 실험실 큰 형님이셨던 박 성도 선생님, 실험을 할 때 궁금한 것이 있으면 언제나 좋은 해결책을 제시해 주었던 언제나 젊은 언니 권 윤정 선생님, 기술적인 부분의 조력자가 되어 저의 힘이 되어준 맑은 웃음을 가진 강 진주 선생님, 작년 초 발생학실험실에 최초 여자 강사로써 오셔서 따스함과 저돌적인 추진력으로 모든 식구들을 안팎으로 감싸 안아주신 너른 가슴의 예쁜 유부녀 양 혜원 선생님, 따뜻한 마음으로 작은 것까지 세심하게 걱정해주고, 신경써주신 실험실 왕 언니 현주 누나, 휴학하고 다시 복학 했을 때 막막했던 내게 기술적 부분뿐 아니라 여러 가지로 많은 도움을

준 예쁜 동생 은영이, 언제나 차갑고 냉철한 이성으로 잘못된 부분을 지적하여 주어 내 자신을 다시 돌아볼 수 있게 만들어 주는 거울 같은 아가씨 공 경아 선생님, 자신이 가진 것을 사랑할 줄 알고 그러기에 더 당찬 가슴으로 살아가는 멋진 이 미희 선생님, 내가 실험실에서도 신앙적으로 흔들리지 않고 굳건히 지켜 갈 수 있었던 모범이 되었고, 비록 힘들지만 자신의 길을 굳건히 걸어가고 있는 예쁘고 듬직한 동생 은신, 올 해 초부터 우리와 함께 하여 지금은 실험실원들의 많은 부분을 챙겨주고 밀어주는 멋진 카리스마 조 정수 선생님, 새로 박사과정을 시작하여 열심히 한 걸음 한 걸음 옮기고 있는 영똥한 포항 아가씨 승혜, 그리고 실험실의 막내로 새로 시작하는 실험실에서 하나하나 배워가며, 실험실 식구들의 귀여움을 독차지하고 있는 귀여운 승리까지 모두 모두 정말 감사합니다.

제게 학부 시절 6개월여의 짧은 시간이었지만 실험실에서 많은 것을 가르쳐 주고자 노력하셨던 따뜻한 열정을 가지셨던 문 순옥 교수님, 이 곳 연대에서 대학원 과정을 시작할 수 있게 여러 가지로 도움을 주셨던 정 지형 선배님, 대학원 과정 중 저에게 지속적인 정신적, 물질적 후원자가 되어주셨던 박 선영 선배님께도 감사를 드립니다. 또한 제가 병원에 있을 때 단체로 헌혈하면서까지 저를 걱정하여 준 학부 동문들과 교수님들께 감사를 드립니다.

2002년 차가웠던 겨울 세브란스의 무균실 병동에서 제 생명의 다시 소생함을 옆에서 기도와 격려로 지켜봐 주시고 이제는 새 삶을 계획함에 있어 중요한 조언자가 되어주신 저의 영적 지킴사이신 정 대엽 목사님, 큰 형님처럼 제가 교회에서 여러 가지 일로 힘들어 할 때 격려로 이끌어 주신 이끌림 목회자 고 창주 목사님, 힘들고 외롭던 투병생활에서부터 시작된 인연으로 새로 시작한 저의 삶에 영적 영감을 주시고, 하나님과의 관계 정립을 잘 할 수 있게 도움을 주신 강 교자 교수님께도 감사를 드립니다.

대학원 과정뿐 아니라 힘들었을 때도 즐거울 때에도 나를 지켜봐주고 항상 격려를 보내준 친구들에게 감사를 전한다. 좋은 사람과 새로운 가정을 만들어 행복해 하고 있는 초보 변호사 범수, 언제나 한결같은 모습으로 곁에 있어준 너무 친해서 걱정이다 싶은 정 대리 부부 회신과 주희, 자신의 박사과정이 힘들어도 같이 기뻐하고 즐거워해준 멋진 예비 교수 윤성, 기쁨과 어려움을 같이 나누고 싶은 넉넉함과 다정함을 동시에 가진 능력 있는 컨설턴트 경현, 새로이 시작된 가정의 행복과 어린 소아들의 아픔을 돌보고 있는 의사 유석, 사법연수원에서 열심히 공부하고 있는 법조인 태준을 포함하여 모두 모두 정말 감사한다.

해준 것도 많이 없어 항상 미안한데 정말 열심히 노력해주어서 이제는 한 그루의 나무가 되어 버팀목의 역할을 감당하고 있는 사랑스런 서연, 성진, 은혜, 자연을

비롯한 서초신동교회 청년들과 우리 귀염둥이 청소년부 학생들과 전도사님께도 감사를 표하고 싶습니다.

마지막으로 저를 지금까지 양으로 음으로 언제나 지켜봐 주시고, 기도하심으로 삶의 등불이 되어주신 어머니, 제가 고통으로 힘들어 몸부림 칠 때도 새로운 용기를 주셔서 이 과정을 모두 마칠 수 있게 해주신 어머님께 말로 표현 할 수 없는 감사를 드립니다. 제가 장성한 이후에는 제 옆에 계시지는 않았지만 항상 좋은 것만 주시고자 하셨던 하늘에 계신 아버지께도 감사를 드립니다. 제 못된 성격으로 인해 불평을 해도 항상 받아주고 가족을 먼저 생각하는 아버지 같은 큰 형, 밝은 웃음과 장난기로 집안에 웃음을 가져다주는 조금 있으면 애 아버지가 되는 동생과 임신 중에 있는 동생의 사랑하는 아내 제수씨에게까지도 마음을 담아 진심으로 감사를 표합니다.

세상 누구보다도 이 모든 과정을 끝날 때까지 아니 지금 이 순간에도 그리고 앞으로도 저를 지켜주시고 인도해 주실 하나님께 감사와 영광을 드립니다.

이제 새로이 시작되는 삶을 살아가려 합니다. 비록 지금까지처럼 과학을 통한 길이 아닌 전혀 다른 새로운 길이겠지만 하나님께서 제게 부여해 주신 새 목표를 향하여 한 걸음 한 걸음 더 열심히 노력할 뿐 아니라 좀 더 너른 가슴으로 주신 것에 감사하며 저보다 남을 위하여 한 개인보다 공동체를 위하여 새로 주신 생명을 사용하려 합니다. 앞으로도 저를 지켜봐 주시고 어디에 있든 더 나은 모습을 위해 노력할 것을 약속드립니다. 감사합니다.

2006. 06. 정 명 섭 올림.

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 실험동물과 레티노산 처리	8
2. 배자 적출	8
3. 현미경 관찰과 결과 분석	9
4. RNA 분리	10
5. Genefishing을 통한 차등발현유전자 분석	10
6. 역전사 반응	11
7. primer 제작 및 중합효소 연쇄반응	12
III. 결과	14
1. 레티노산이 구개 및 배자 형태 발생에 미치는 영향	14
가. 구개 및 배자 형태 분석	14
나. 머리와 구개발생에 미치는 영향	17
다. 구개열 간격과 머리둔부길이 분석	20
2. 레티노산에 노출된 배자와 정상 배자간의 차등발현유전자 분석	22
3. 발생과정 중 레티노산 노출에 의한 <i>Hox</i> 유전자의 발현변화	24
4. 발생과정 중 레티노산 노출에 의한 세포사멸 관련 유전자의 발현변화	26
IV. 고찰	28

V. 결론 34

참고문헌 36

영문요약 43

그림 차례

Figure 1. Morphology of facial and palate development in human and rat	6
Figure 2. Morphology of embryos of day 13 to 15 pre-treated with retinoic acid on day 11 post coitum	16
Figure 3. Cleft palate and abnormal head development in RA-treated embryos	19
Figure 4. The distances of cleft palate detected in E17 embryos and crown rump length	21
Figure 5. Analysis of differentially expressed gene using by Genefishing in craniofacial region	23
Figure 6. The effect of RA on expression pattern of <i>Hox</i> genes in developing craniofacial region	25

Figure 7. The effect of RA on expression pattern of several programmed cell death related genes in developing craniofacial region of rat 27

표 차례

Table 1. Primers used for PCR analysis · · · · · 13

Table 2. PCR conditions used for each target genes · · · · 13

Table 3. Effect of all-trans retinoic acid on the formation of
cleft palate during rat embryogenesis · · · · · 14

국문 요약

백서에서 임신 중 레티노산이 구개 형태발생에 미치는 영향

백서에서의 구개발생은 배자 발생 14일째에 입천장선반(palatal shelves)이 아래쪽으로 자라며 시작한다. 발생 16일째가 되면 아래쪽으로 자라던 입천장선반이 혀 위쪽으로 이동하게 되고, 중앙을 중심으로 입천장선반의 가운데부분부터 병합하여 발생 17일째가 되면 앞뒤부분까지 병합이 완료된 완전한 구개가 형성된다. 레티노산은 비타민 A의 생체 내 활성 대사산물로써 일반적으로 배자 발생에 있어 배자의 전후 축(anteroposterior axis) 형성과 중추신경계 형성 등에 관여한다고 알려져 있다. 그러나 이러한 레티노산에 과다히 노출되거나 결핍되면 기형이 유발되고, 발생 과정 중 배자 축 형성에 관여한다고 알려진 *Hox* 유전자의 발현 또한 조절한다고 보고되어 있다.

본 연구에서는 임신 11일째 백서에 레티노산을 복강내 주사로 주입하고 발생 13일부터 17일까지의 배자를 분리하여 배자의 형태적 변화를 관찰하고, 또 분자 수준에서 배자 머리 부분에서 발현하는 유전자를 분석하였다.

실험 결과 형태적으로는 레티노산에 노출된 배자의 경우 정상 배자에 비해 머리 발생 지연을 포함하여 머리둔부길이(CRL)와 사지 등의 길이가 짧아진 것이 보였다. 또 17일째 배자의 경우 정상 배자에서는 완전한 구개가 형성되었으나 레티노산에 노출된 배자에서는 총 52예의 배자 중 36예에서 구개열이 관찰되었으며, 구개열의 벌어진 간격은 약 0.80 ± 0.36 mm이었다. 역전사 중합효소 연쇄반응 방법을 이용하여 *Hox* 유전자의 발현 양상을 비교해 본 결과, 정상 배자에서 *Hoxa7*은 발생 13일째에 가장 강하게 발현한 후 점차 약해지는 양상을 보인 반면 레티노산에 노출된 배자에서는 발생 13일에 비해 15일째에 발현이 현저히 증가한 후 차츰 감소하였다. 반면, *Hoxc8*은 발현이 전반적으로 약하였으며, 정상 배자의 경우 발생 16일째에 발현이 감지된 반면, 레티노산에 노출된 배자에서는 정상 배자보다 조금 빠른 발생 15일째

에서 약한 발현이 관찰되었다. 또, 세포사멸에 관여하는 *Bcl* 가족 유전자(family gene)의 경우 정상 배자에서는 발생 13일에서 17일까지 anti-apoptotic한 유전자인 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*, 그리고 pro-apoptotic한 유전자인 *Bax* 모두 강하게 발현하였으나, 레티노산에 노출된 배자의 경우 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*의 발현이 발생 16일 이후에는 감소하였으며 반대로 *Bax*의 경우는 발생 13일에서 15일까지 매우 저하되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 임신 중 레티노산이 배자 발생과정 중 구개열을 포함한 형태적 기형 유발을 가능하게 할 수 있는 물질임을 알 수 있었고, 또 배자형태 발생에 관련된 *Hox* 유전자의 발현과 세포사멸에 관련된 *Bcl* 가족 유전자인 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*, 그리고 *Bax* 유전자의 발현을 조절하여 배자의 형태적 기형 유발에 관여할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : 구개발생, 구개열, 레티노산, 배자 발생, 배자 축, 세포사멸

백서에서 임신 중 레티노산이
구개 형태발생에 미치는 영향

< 지도교수 김 명 희 >

연세대학교 대학원 의과학과

정 명 섭

I. 서 론

사람에서의 얼굴발생은 발생 4~8주 사이에 주로 일어난다. 배자(embryo) 말기가 되면 얼굴이 인간의 형상을 나타내고, 발생 9주부터 출생 전까지인 태아기(fetal period)에 들어서야 얼굴의 비율이 제대로 구성된다.^{1,2} 구개 발생은 발생 4주초에 하악궁(mandibular arch)의 발달과 함께 시작되며, 발생 4주 중간에 구강인두막(oropharyngeal membrane)이 파열되고 양측 하악궁의 병합이 시작되면서 구강오목(stomatodeum)의 양측 경계를 이루는 하악융기(mandibular prominence)로 발달한다. 이후에 하악융기의 완전한 병합이 이루어지는 시점은 발생 5주말경으로 알려져 있다.¹ 이에 반하여 상악은 하악보다 조금 늦은 발생 5주초에 구강오목의 양측 경계를 이루는 융기로 처음 관찰되어져서 발생 5주말에는 상악융기(maxillary prominence)가 중앙 쪽으로 자라서 구강오목의 바깥위쪽 경계를 이룬다. 이때 외측비융기(lateral nasal prominence)와는 홈에 의해 분리가 되며, 비소와(nasal pit)가 배자의 외측 면에서 보이기 시작한다.^{1,2} 발생 6주초에 내·외측비융기들에 의해 구개발생(palatal development)이 시작된다. 발생 6주말에는 상악융기의 안쪽에서부터

튀어나온 2개의 중간엽성 융기인 입천장선반으로 발달하게 되며,^{1,2} 발생 7-8주를 거치는 동안 혀 양측의 입천장선반이 아래쪽으로 돌출되어 점점 성장하게 된다. 이때 비강부분도 발생을 시작하는데 외배엽조직인 구비강중격(ornasal septum)이 얇아져 구비강막(ornasal membrane)이 파열되어 비강과 구강이 연결부인 원시후비공(primitive choana)을 형성한다.¹ 발생 8주말에는 성장하던 입천장선반들이 짧은 순간 혀 상측으로 올라와 수평을 유지하게 된다. 양쪽의 입천장선반들이 서로 접근하여 정중앙에서 병합을 시작하며 궁극적으로 구개융기(palatine prominence)와 비중격(nasal septum)과의 병합도 이루어진다고 알려져 있다(Fig. 1).¹⁻³

이러한 정상발생과는 달리 구개열(cleft palate)은 구개성분이 제대로 융합하지 못하여 구강과 비강의 경계가 무너지면서 호흡과 음식물의 섭취를 하는데 있어 제한을 받는 경우를 말한다. 발생빈도는 환경적, 인종적, 지형적인 차이들이 있지만 현재는 약 1000명중에 1~2명꼴로 발생을 하고,^{4,5} 얼굴발생에서 여성이 남성보다 1주일정도 늦은 발생시기상 차이를 보이는데 이때 여성은 더 많은 환경적인 영향에 노출되기가 쉬워 여성에서의 구개열 발생 또한 남성보다 약 2배 정도 많이 발생한다고 알려져 있다. 구개열은 단독으로 발생하는 경우나 구순열과 같이 합병해서 발생하는 경우, 그리고 구순열만 발생하는 경우가 있다.^{1,6,7}

이제까지 이런 구개열은 왜 발생하는 것일까에 대한 논의와 연구는 많이 진행되어져 있다. 현재까지의 연구결과들을 토대로 논의하여 보면, 우선 유전적인 요인으로는 염색체 이상, 이와 더불어 Van der woude's syndrome, Ectrodactyly ectodermal dysplasia clefting(EEC) syndrome, Treacher Collins 증후군등과도 연관되어 있다고 알려져 있으며,⁶ 환경적인 요인으로는 배자발생과정 중 비타민이나 호르몬 혹은 약물의 과다 노출 또는 부족 그리고 흡연이나 음주 등으로 인하여서도 구개열이 발생하는 것으로도 알려져 있다.⁸⁻¹⁰

한편 레티노산(All-trans retinoic acid, All-trans RA)은 비타민 A(retinol)의 내인성 대사산물(endogenous metabolite)로써 동물의 발생 과정 동안 정상적인 형태 형성을 하기위해 필요한 물질로 알려져 있다.^{8,11-13} 그러나 임신초기에 피부의 여드

름 등을 치료하기 위하여 흔히 사용하는 레티노산에 과다히 노출되면 두개안면기형 (craniofacial abnormality) 및 구개열을 포함하여 흉선 무형성, 심장유출로 결손증 (lack of septation of heart-outflow tract) 그리고 신경관결손 등의 기형을 갖는 아이가 태어난다는 보고가 있다.⁸⁻¹⁰ 이 외에도 Vitamin A deficiency(VAD)현상을 유도하면 구개열을 포함한 기형뿐만 아니라 배자 사멸(embryonic death)까지 유도 되는 것으로 보고되어 있다.¹⁴⁻¹⁷ 또 cytoplasmic retinoid-binding proteins(CRBP I and II)의 이상으로도 기형이 유발된다는 보고가 있다.^{9,11,12,14} 이런 여러 가지 보고에도 불구하고 구개열 발생에 대한 분자 수준에서의 연구는 미미한 것이 현실이다.

배자 발생 과정 중 특정 시간에 그리고 배자의 특정한 위치에서 발현하여 배자의 형태를 형성하는데 관여한다고 알려져 있는 전사 조절인자(transcription factor)인 *Hox* 유전자는 레티노산과 전구물질인 레티노이드 등에 영향을 받아 배자 발생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{18,20}

특히 척추동물에서 발생과정 중 레티노산 노출에 의해 *Hox* 유전자의 발현 위치가 달라짐으로서 목뼈, 가슴, 허리, 그리고 엉치뼈 등에서 항상성 형질전환(homeotic transformation)이 관찰되는 것으로 보아 초기 전후 축(anteroposterior axis) 발생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 특히, 생쥐를 이용한 연구에서 머리발생에는 관계를 하지 않는 것으로 알려져 있는 *Hoxa7*, *Hoxb6*, *Hoxb7*, *Hoxd4*의 ectopic expression에 의하여 구개열, 감기지 않는 눈, 접합되지 않은 귓바퀴 등을 포함한 안면기형이 일어나는 형태적 변이가 관찰되었다는 보고가 있다.²¹⁻²⁵ 최근에는 *Hox* 유전자가 조절하는 downstream 목표 유전자로서 세포사멸 관련 유전자가 보고된 바 있다.²⁶

따라서 본 연구에서는 백서를 이용하여 두개안면형성이 일어나는 발생초기에 레티노산을 주입한 다음 각 단계의 배자조직을 분리하여 배자의 발달정도와 얼굴, 구개, 그리고 구개열의 형성과정을 형태학적으로 비교 분석하였다. 또 각 시기별로 얻은 배자조직에서 추출한 RNA를 이용하여 *Hox*와 세포사멸 관련 유전자들을 포함하여 정상과 레티노산에 노출된 배자 간에 서로 다르게 발현하는 유전자들을 분석

하여 레티노산이 구개 형태 발생에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

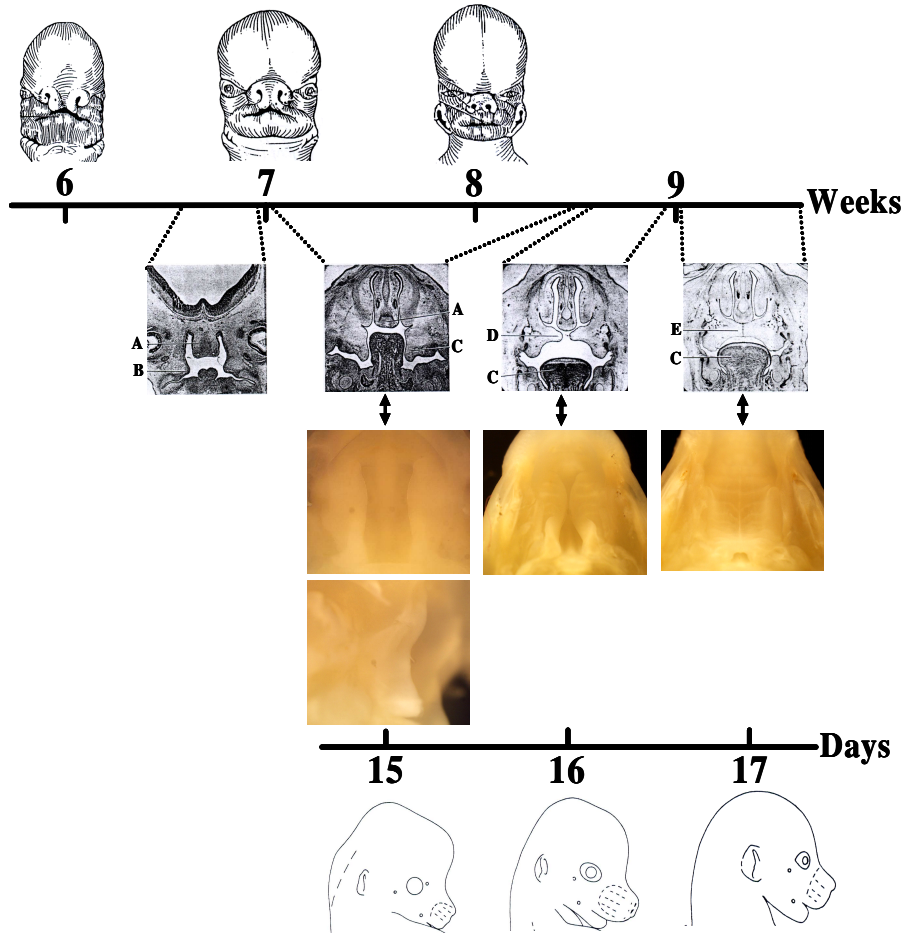


Figure 1. Morphology of facial and palate development in human and rat. The prominence, elongation, shifting, and fusion of palatal shelves construct palate along with facial development in human(6~9weeks) and in rat(15~17days). The developmental stages are as follows. (A) nasal septum; (B) maxillary process; (C) tongue; (D) palatal shelves; (E) fused palatal shelves (From James, 1994)³.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물과 레티노산 처리

실험동물로는 Sprague-Dawley 계의 흰쥐로 출생 후 8주 이후, 체중이 200 -250 g인 것을 사용하였다. 쥐는 저녁 8시에 수컷 1마리와 암컷 3-4 마리를 한 우리에 합사 시키고, 다음 날 오전 8시에 질 도말 검사(vaginal smear)를 시행하여 현미경 관찰에서 정액이 관찰되면, 임신 한 것으로 판단하여 이때를 발생 0일로 정의하였다. 임신이 확인된 쥐는 따로 분리 사육하였고, 사육조건은 18-24℃에서 12시간을 주기로 일광을 바꿔주고 먹이(샘타코, 오산, 한국)와 물은 제한 없이 공급하였다.

All-trans RA(R-2625, Sigma, St. Louis, Missouri, USA)의 *in vivo* 효과를 관찰하기 위하여, 임신한 어미 백서에 레티노산을 제외한 DMSO(D-4540, Sigma, St. Louis, Missouri, USA)를 포함한 sesame oil(S-3547, Sigma, St. Louis, Missouri, USA)만을 주입한 대조군과 sesame oil(DMSO 포함)에 레티노산을 같이 주입한 실험군으로 각각 나누어 임신 11일째에 복강내 주사(intraperitoneal injection)를 통하여 주입하였다. 레티노산 stock은 100 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 -70℃에 보관하였으며, 양은 80 mg/kg이 되도록 주입하였다.²⁷

2. 배자 적출

임신 쥐는 2차 구개 발달 및 융합과정을 관찰하기 위해 배자 발생 13일, 14일, 15일, 16일, 17일째가 되는 오전 8시에 에테르(ether)로 마취시킨 후 복벽을 절개하였다. 노출된 장을 쥐의 오른쪽으로 밀어내고 장 뒤쪽에 위치한 난관의 한 쪽 끝을

잡고 부착된 장간막을 절개하고 자궁과 질 연결 부위를 횡으로 절개하여 반대편 난관을 분리시킴으로써 전체 자궁을 적출하였다. 적출한 자궁은 실리콘이 깔린 페트리 디시에 담긴 PBS 용액 속에서 조작하였다. 난관 끝과 자궁질 연결부를 핀으로 바닥에 고정시킨 후, 안과용 가위와 끝이 날카로운 전자현미경용 포셉(EM forceps)으로 자궁의 긴 축을 따라 절개하여 착상부위를 노출시킨 후 탈락막이 가급적 손상되지 않게 자궁벽으로부터 분리하였다. 탈락막을 제거한 후에 배자와 연결된 태반은 가위를 이용하여 분리해 주었다. 배자의 머리(head)부분을 몸통(body)으로부터 분리한 다음, 머리 부분의 아래턱(mandible)은 메스(scalpel)를 이용하여 제거해 주었다. 적출된 배자는 PBS가 들어있는 새 페트리 디시에 옮겨 카메라 장치(M10, Leica, Switzerland)를 이용하여 구개부분을 비교 관찰하였다. RNA 분리를 위한 경우 degradation을 막기 위해 임신 쥐를 마취한 후 가능한 빠르게 배자를 적출하였다. 관찰이 끝난 조직은 RNA 추출을 위하여 사용하고 그 나머지는 곧 바로 -70°C 에 보관하였다.

3. 현미경 관찰과 결과 분석

배자는 80배까지 확대가 가능한 수술현미경(M10, Leica, Switzerland)을 이용하여 발생 일에 따라 8-40배에서 대조군과 실험군의 머리-둔부길이(crown rump length, CRL)를 측정하고, 외형 발생상태 등을 관찰하였다. 또한 배자의 아래턱을 제거한 후, 입천장선반의 출현, 성장 정도, 융합 정도를 시기별로 관찰하였다.

실험 결과는 평균±표준 오차로 표시하였으며, 각 군 간의 비교는 student *t* test로 검정하였다. *p* 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

4. RNA 분리

적출한 배자 또는 배자 절편(head 부분)을 액체 질소에 넣어 냉동시킨 다음 Zol B(TEL-TEST. INC, Friendswood, Texas, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 조직을 6 mm 평면 plate에 넣고 Zol B 1 ml를 첨가한 후, 날카로운 칼날(bladder)을 이용하여 잘게 잘랐다. 배자를 300 μ l의 chloroform과 함께 1.5 ml eppendorf tube(e-tube)에 넣어 inverted vortexing 후 15분 정도 얼음에서 고정을 시켜준 다음 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 25분 동안 원심분리(centrifugation)하였다. 상등액을 새로운 e-tube에 넣고 동량의 isopropanol을 넣어서 -20 $^{\circ}$ C에서 최소 1시간 이상 침전시켰다. 다시 한 번 원심분리(13,000 rpm, 25분, 4 $^{\circ}$ C)한 후, 상등액을 버리고 70% 에탄올(ethanol) 200 μ l로 세척해 주었다. 원심분리 후 생성된 침전물(pellet)은 공기 중에서 건조 시킨 다음 DEPC-H₂O에 녹여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

5. Genefishing을 통한 차등발현유전자 분석

정상과 레티노산에 노출된 배자의 아래턱을 제거한 머리 부분에서 분리한 총 RNA를 이용하여 Genefishing(Seegene, 서울, 한국)을 수행하였다. 먼저 mRNA의 poly A부위에 특이적으로 결합하는 10 mer의 짧은 목표 염기서열(target sequence)을 가진 20여개의 deoxyThymine annealing control primer(dT-ACP, Seegene, 서울, 한국)를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 역전사(reverse transcription, RT)반응을 통해 첫 번째 주형 cDNA를 합성하였다. 역전사반응의 결과로 합성된 cDNA를 주형으로 하여 primer의 접합(annealing) 부위를 조절할 수 있도록 온도를 높여주어 primer가 주형(template)의 특정부위에 결합되도록 한 후 두 번째 주형 cDNA를 만들었다. 이때 접합 온도는 역전사반응 때 보다 높아진 50 $^{\circ}$ C로 맞춰주어, 이온도에서는 dT-ACP

가 주형에 결합할 수 없고, 임의의 온도조절 primer의 핵심부분만이 특이적으로 주형가닥에 결합되도록 하였다. 최종적으로 접합 온도를 65°C로 높여 좁으로써, 임의의 primer와 100% 일치하는, 일차 증합효소반응을 통해 합성된 산물만 특이적으로 증폭하였다. 이렇게 접합 특이성(annealing specificity)을 조절한 임의 증합효소 연쇄반응(random polymerase chain reaction, random PCR)을 통하여 정상과 레티노산에 노출된 배자 간에 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)를 아가로스 겔(agarose gel) 상에서 전기영동하여 분석하였다.²⁸

6. 역전사 반응

역전사반응(reverse transcription, RT)은 Biophotometer(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용, 분광광도법(spectrophotometry)으로 RNA양을 측정하여 260 nm에서 얻은 O.D 값을 280 nm에서 얻은 O.D 값으로 나눈 값이 1.6-1.8인 RNA만을 이용하여 정량하였으며, 2 μ g의 RNA 와 200 ng의 oligo dT, H₂O를 14 μ l까지 넣고 70°C에서 5분간 열을 가하여 준 후, 바로 얼음에 넣어두고 dNTP(2.5 mM each) 5 μ l, RNase inhibitor(40 unit/ μ l, Promega, Madison, USA) 0.5 μ l, Moloney Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase(MMLV-RT 200 unit/ μ l, Promega, Madison, USA) 0.5 μ l, MMLV-RT 5 \times buffer 5 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 만들었다.

7. primer 제작 및 중합효소 연쇄반응

분석할 유전자에 대한 primer는 염기서열(sequence)을 분석(NCBI, blast search program)하여, 바이오니아(대전, 한국)회사를 통해 primer design 프로그램에 적용하여 제작, 구입하였으며 6항에서 제작한 cDNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 대조군으로 *β-actin* primer를 사용하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용한 primer와 중합효소 연쇄반응 조건은 Table 1과 2에 나타내었다.

Table 1. Primers used for PCR analysis

Gene	Size(bp)	Primer sequences
<i>Hoxa7</i>	425	5'-CTGGCTCTCATCTTTATGCT-3' 5'-CGGGCTTATACAATGTCAAC-3'
<i>Hoxc8</i>	458	5'-CACGTCCAAGACTTCTTCCACCACGGC-3' 5'-CACTTCATCCTTCGATTCTGGAACC-3'
<i>Bcl-xl</i>	474	5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3' 5'-CGTATCAGAGCTTTGAGCAG-3'
<i>Bcl-2</i>	356	5'-TACCGTCGTGACTTCGCAGAG-3' 5'-AAGACCCTGCTCAGCCTGG-3'
<i>Bax</i>	496	5'-GCTCTGAACAGATCATGAAG-3' 5'-CATGGCAGACAGTGACCATC-3'
<i>β-actin</i>	327	5'-CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC-3' 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG-3'

Table 2. PCR conditions used for each target gene

Gene	Denaturation	Annealing	Polymerization	Cycle
<i>Hoxa7</i>	94°C, 1 min	55°C, 50 sec	72°C, 1 min	30
<i>Hoxc8</i>	94°C, 1 min	67°C, 50 sec	72°C, 1 min	30
<i>Bcl-xl</i>	94°C, 1 min	52°C, 50 sec	72°C, 1 min	30
<i>Bcl-2</i>	94°C, 1 min	58°C, 50 sec	72°C, 1 min	30
<i>Bax</i>	94°C, 1 min	50°C, 50 sec	72°C, 1 min	30
<i>β-actin</i>	94°C, 1 min	55°C, 50 sec	72°C, 1 min	30

III. 결 과

1. 레티노산이 구개 및 배자 형태 발생에 미치는 영향

가. 구개 및 배자 형태 분석

레티노산 처리에 의한 기형 양상을 보기 위하여 임신 11일째 백서에 레티노산 80 mg/kg을 복강내주사로 주입한 후 배자 발생 13일에서부터 발생 17일까지의 배자를 적출하여 외형을 관찰하였다.

13, 14, 15일째 배자의 경우 각각 4, 3, 6마리의 어미 백서로부터 총 20, 18, 그리고 42예의 배자를 얻었으나 모두에서 구개열이 관찰되지 않았다. 그러나 어미 백서 5마리로부터 얻은 발생 16일째 배자 37예 중 27예에서, 그리고 7마리 어미 백서에서 얻은 발생 17일째 배자 52예 중 36예에서 구개열이 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Effect of all-trans retinoic acid on the formation of cleft palate during rat embryogenesis.

Embryos	Litters	Number of embryos tested	Number of embryos with cleft palate
E13*	4	20	0
E14	3	18	0
E15	6	42	0
E16	5	37	27
E17	7	52	36

* E13 means the embryo of day 13 post coitum.

레티노산에 노출된 배자의 경우 구개열외에도 정상 배자와 어떤 형태적 차이를 보이는지를 알아보기 위하여 수술현미경하에서 비교분석하였다. 배자 발생 13일에서 17일까지 모든 시기에서 위턱을 포함한 얼굴 전체에서 발생이 지연(retardation) 되는 것이 관찰 되었다(Fig. 2). 특히 발생 14일째에는 위턱뿐 아니라 아래턱에서도 발생 지연이 관찰되었으며, 사지의 길이 또한 레티노산을 처리하지 않은 정상 배자와 비교하여 짧아지는 것이 관찰되었다(Fig. 2, E14). 발생 15일째에는 얼굴 발생 지연, 사지의 길이 차이뿐만 아니라 꼬리에서도 정상 배자보다 짧아지는 것이 관찰 되었다(Fig. 2, E15). 16일에서 17일까지는 15일까지 보여 온 이상발생이 더 발달하여 사지를 포함한 형태적 길이 등의 변화가 더 크게 관찰 되었다(자료 미 첨부).

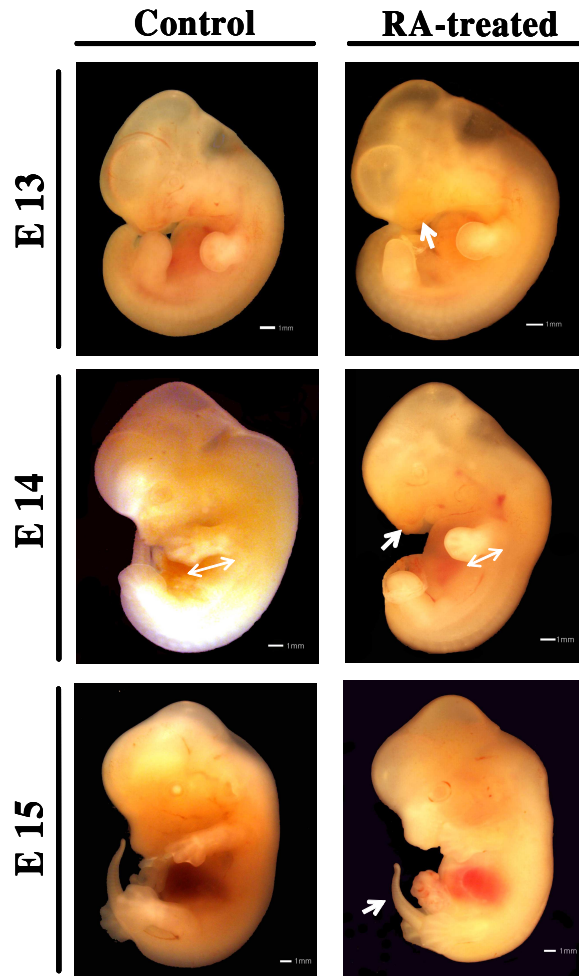


Figure 2. Morphology of embryos of day 13 to 15 pre-treated with retinoic acid on day 11 post coitum. Abnormal development on head, tail, and limbs in RA-treated groups compared to the controls were marked with arrows. E13 to E15 indicates the embryos of day 13 to day 15 post coitum. The size bar is indicated.

나. 머리와 구개발생에 미치는 영향

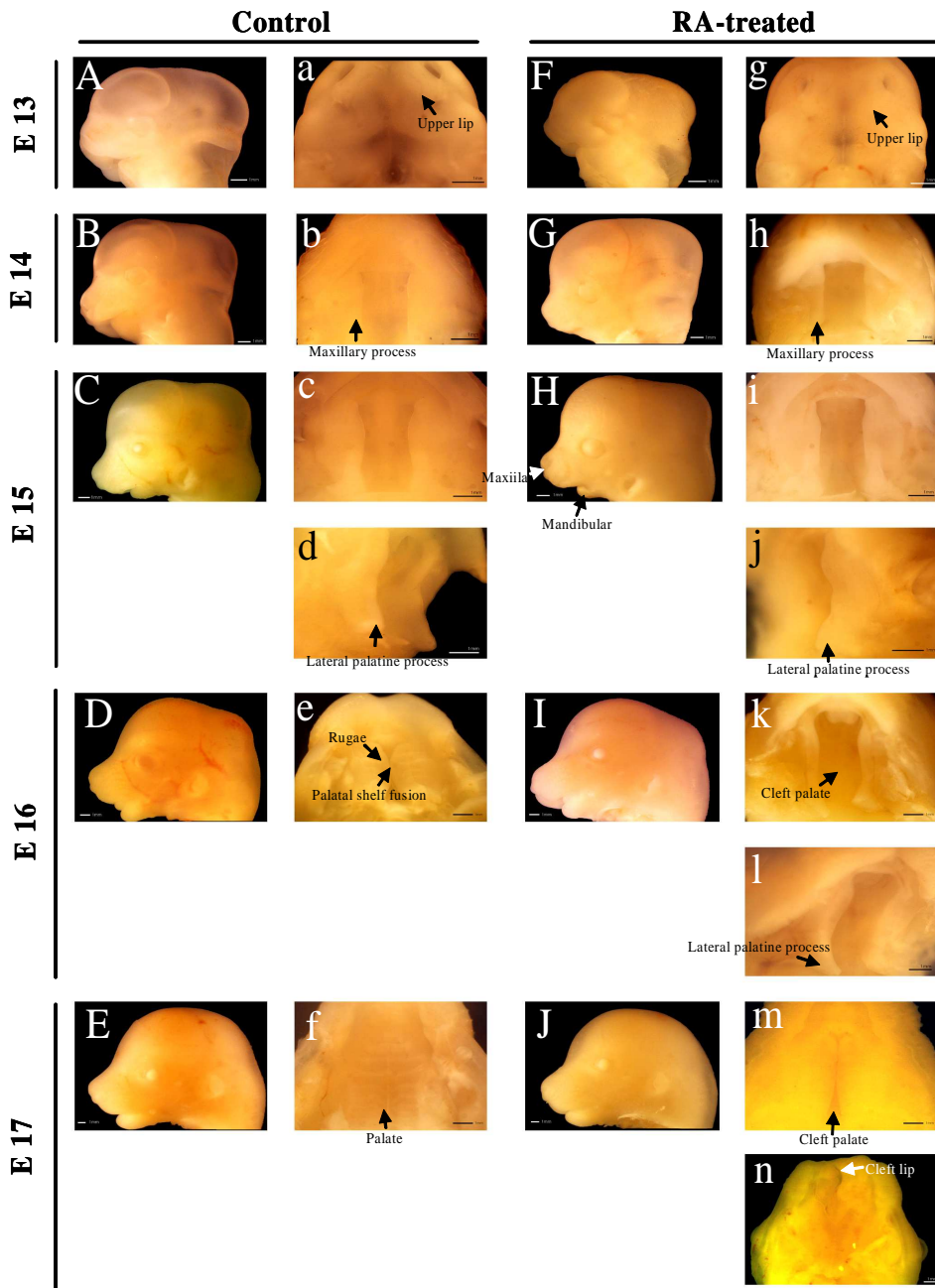
발생과정 중 레티노산에 노출된 배자에서 정상 배자와 비교해 볼 때 머리와 구개 형태 발생에 어떤 영향을 미치는지 보기 위하여 수술현미경(M10, Leica, Switzerland)하에서 확대 관찰하였다.

머리의 발달은 발생 13일째 배자에서 레티노산에 노출된 경우 위, 아래턱의 발생이 정상보다 짧아진 것을 알 수 있었다(Fig. 3A, F). 발생 14일째부터는 위턱을 포함한 얼굴 발생이 지연되었고(Fig. 3B, G), 15일째에는 정상 배자보다 레티노산을 처리한 배자에서 눈(oculus)의 발생이 지연되는 것이 관찰 되었다(Fig. 3C, H). 발생 16일째 레티노산에 노출된 배자에서는 눈과 망막(retina)의 발생이 지연된 것이 관찰 되었으나(Fig. 3D, I), 발생 17일째에는 머리 쪽 발생이 정상 배자에 비해 이전 단계에서 본 차이를 제외하고는 큰 변화가 관찰 되지 않았다(Fig. 3E, J).

구개의 경우 구개 형성이 막 시작되는 발생 13일째에는 정상군과 레티노산 처리군 간에 차이가 관찰 되지 않았다(Fig. 3a, g). 그러나 발생 14일째부터는 정상배자의 경우 입천장선반이 관찰되었으며(Fig. 3b), 발생 15일째에는 입천장선반이 아래쪽으로 자라는 것이 관찰 되었다(Fig. 3c, d). 발생 16일째에는 아래쪽으로 향하던 입천장선반이 수평을 유지하게 하여 위쪽으로 이동하였으며, 이들은 곧 가운데를 중심으로 병합하였고(Fig. 3e), 계속 성장, 접합, 병합과정이 진행되어 발생 17일째에는 완전한 구개가 형성되었다(Fig. 3f). 반면 레티노산을 처리한 배자에서는 발생 14일(Fig. 3h)부터 시작하여 발생 15일까지 계속 성장하여야 하는 입천장선반이 배자 42예 중 27예에서 정상 배자 14일째에서와 같은 발달 양상이 보였고(Fig. 3i), 3예에서는 정상 배자 15일째와 같은 성장을 보였다(Fig. 3j). 발생 16일째에는 배자 37예 중 23예에서 입천장선반이 혀 위쪽으로 수평하게 이동은 하였으나 중앙을 중심으로 접합되지 않아 구개열이 관찰되었고(Fig. 3k), 3예에서는 정상 배자 15일째와 같이 입천장 선반이 아래쪽으로만 자라고 있는 것이 보였다(Fig. 3l). 발생 17일째 배자에서는 입천장선반이 완전히 병합하여 구개를 이룬 정상 배자와는 달리 입천장선반이

아직 병합이 이루어지지 않아 구개열이 생긴 배자가 총 52예 중 36예에서 관찰 되었으며(Fig. 3m, n), 이 중 구개열뿐만 아니라 구순열을 함께 갖고 있는 배자도 4예 관찰 되었다(Fig. 3n).

Figure 3. Cleft palate and abnormal head development in RA-treated embryos. Retinoic acid was intraperitoneally injected into the pregnant female rat at day 11 post coitum. The craniofacial morphology of normal(A-E) and RA-treated(F-J) embryos were shown. The phenotype of normal palatogenesis(a-f) and the malformation pattern by RA treatment(g-n) was compared. Cleft palate was shown from day 16. The counted number of abnormal embryos: i (27 / 42), j (3 / 42) at 15 day(RA-treated), k (23 / 37), l (3 / 37) at 16 day, and m (36 / 52), n (4 / 52) at 17 day.



다. 구개열 간격과 머리둔부길이 분석

레티노산에 노출된 배자의 경우 발생 17일째에 정상 배자와는 달리 구개열이 관찰되었으므로 이들 구개열의 벌어진 정도, 즉 벌어진 입천장선반 사이 간격을 측정한 후 통계학적으로 비교분석 하였다. 레티노산에 노출된 발생 17일째 배자 52예 중 구개열이 관찰된 36예에서의 평균 입천장 선반사이의 간격은 0.80 ± 0.36 mm이었다. 반면, 정상 발생 17일째 배자의 경우 분석한 15예 모두에서 입천장선반들이 완전히 병합되어있었으며 단 하나의 구개열도 관찰되지 않았다(Fig. 4A).

레티노산에 노출된 배자는 정상 배자와 달리 구개열을 포함한 구개발생이 지연되었으므로 두 배자간의 성장 차이를 비교해 보기 위하여 발생 13일부터 17일까지의 배자를 각각 분리한 다음 머리둔부길이(CRL)를 측정하였다(Fig. 4B). 정상 발생 13일째 배자(22예)는 8.20 ± 0.70 cm이었고, 발생 14일째 배자(26예)는 10.03 ± 0.78 cm, 15일째 배자(16예)는 12.97 ± 0.53 cm, 16일째 배자(31예)는 14.64 ± 1.34 cm, 발생 17일째 배자(15예)에서는 18.03 ± 1.27 cm로 관측되었다. 반면, 레티노산에 노출된 발생 13일째 배자(20예)는 7.32 ± 1.42 cm를 나타내었고, 발생 14일째 배자(18예)는 8.03 ± 1.74 cm, 15일째 배자(42예)는 11.30 ± 1.53 cm, 16일째 배자(37예)는 14.33 ± 1.11 cm, 발생 17일째 배자(52예)에서는 17.64 ± 0.72 cm로 관측되었다(Fig. 4B).

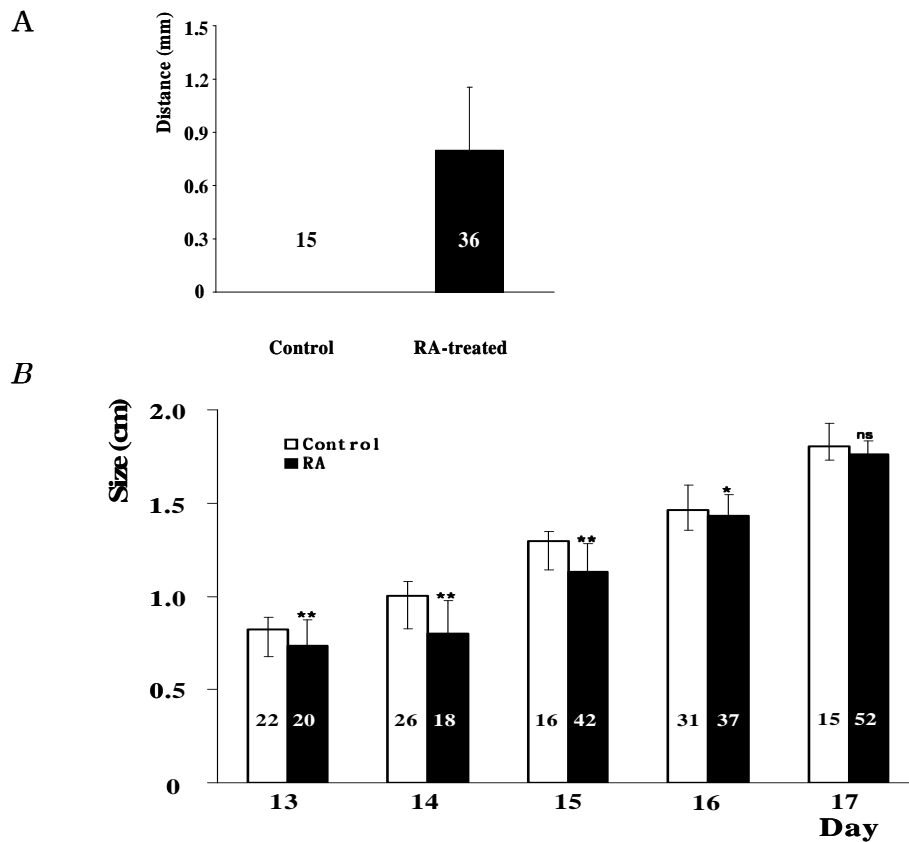


Figure 4. The distances of cleft palate detected in E17 embryos and crown rump length. (A) The average distances of cleft palate were indicated as bars. The arabic numerals indicate the number of embryos used for the measurements. The data analysed by student *t*-test. (B) The crown rump length of embryos were measured and compared to those of controls. The value of RA-treated group was slightly shorter compared to the control. The number of embryos used for the measurements were indicated as arabic numerals in each bar. The differences in values were considered to be significant. ns: $0.1 < p$, *: $0.01 < p < 0.1$, **: $0.001 < p < 0.01$.

2. 레티노산에 노출된 배자와 정상 배자간의 차등발현유전자 분석

레티노산에 노출된 배자의 경우 형태적으로 정상 배자와 차이를 보였으므로, 이런 형태적인 차이가 유전자 수준에서의 발현차이에 기인하고 있는 것인지를 알아보기 위하여 아래턱을 제외한 배자의 머리부위로부터 총 RNA를 분리하고, 이를 이용하여 재료 및 방법에서와 같이 Genefishing 방법을 적용하여 differential display reverse transcription(DDRT) - polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. DDRT-PCR 결과물을 아가로스 겔 상에서 비교 분석하여 본 결과, 정상 배자와 레티노산에 노출된 배자 사이에 서로 다르게 발현하는 유전자(differentially expressed gene)들이 많이 존재하고 있음이 확인 되었다(Fig. 5)

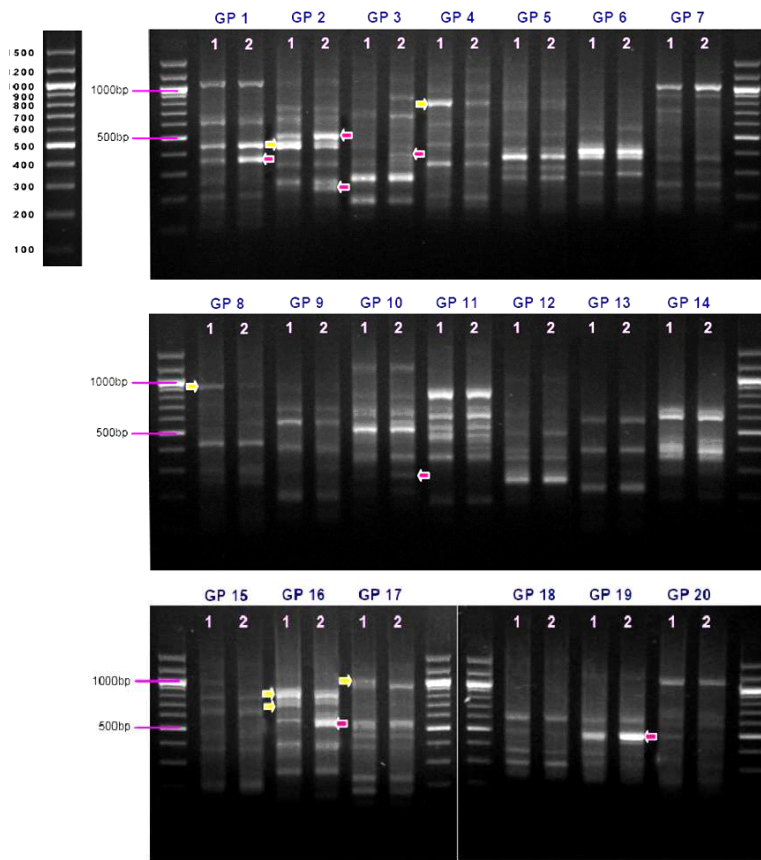


Figure 5. Analysis of differentially expressed gene using by GeneFishing in craniofacial region. The overexpressing genes(→) were found in control compared to the RA-treated. The overexpressing genes(←) were found in RA-treated compared to the control. 1 is control , 2 is RA-treated group. GPs were used as random primers (Seegene, Seoul, Korea).

3. 발생과정 중 레티노산 노출에 의한 *Hox* 유전자의 발현변화

Hox 유전자는 배자 발생단계에서 특정 시간에 그리고 배자의 특정한 위치에서 발현하여 배자의 형태를 형성하는데 관여한다고 알려져 있는 전사조절 인자(transcription factor)이다. *Hoxa7*의 ectopic expression이 구개열을 포함한 얼굴의 기형을 유발하였다는 보고가 있으므로²³ 발생 과정 중 레티노산에 노출된 배자에서 보인 구개발생의 형태적 차이가 *Hox* 유전자의 발현 변화와 관련이 있는지 알아보 고자 배자에서 얻은 총 RNA를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 정상 배자에서 *Hoxa7*의 발현 양상은 발생 13일째 배자에서 가장 강하였으며 그 후로 점차 약해지는 양상을 보인 반면, 레티노산에 노출된 배자에서는 발생 13일째에 는 약하게 발현하였지만, 발생 15일째에는 발현이 현저히 증가되었고, 발생 16일, 17일이 되면서 차츰 감소하였다(Fig. 6). 반면, *Hoxc8*의 경우, 정상 배자와 비교해 볼 때 발현이 전반적으로 미약하였다. 그러나 정상 배자의 경우 발생 16일째에 발 현이 미약하게 감지된 반면, 레티노산에 노출된 배자에서는 발생 15일째에 약한 발 현이 관찰되었다(Fig. 6).

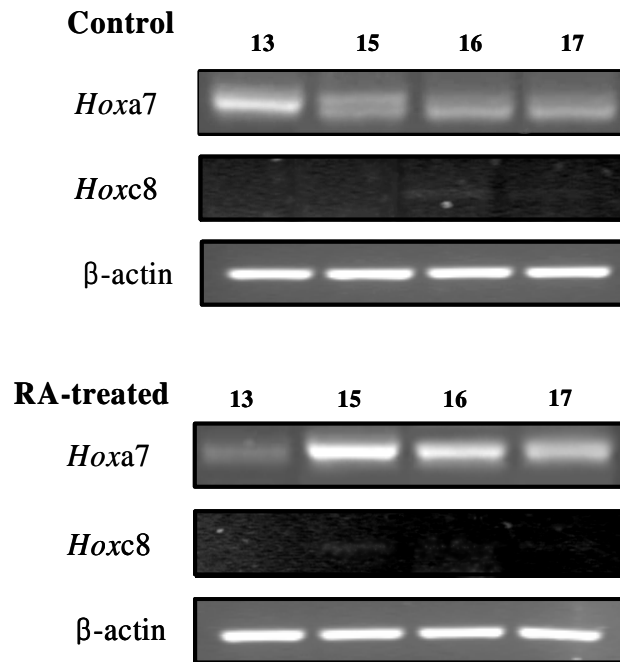


Figure 6. The effect of RA on expression pattern of *Hox* genes in developing craniofacial region. The expression of *Hoxa7* in craniofacial region was strongly increased at day 15 but decreased at 16 day by RA; whereas the expression of *Hoxc8* increased from day 15, but decreased from day 16 among RA-treated group. As an internal control, β -actin gene was analysed.

4. 발생과정 중 레티노산 노출에 의한 세포사멸 관련 유전자의 발현변화

구개는 발생과정 중 가장자리 상피세포(MEE)에서 세포사멸이 일어나야 하며, 만약 세포사멸(PCD)이 제대로 일어나지 않으면 입천장선반이 접합은 일어나나, 병합은 일어나지 못하게 되어 구개열이 형성된다는 보고가 있다.³⁴ 따라서 본 실험에서는 발생과정 중 레티노산에 노출된 배자에서 나타나는 구개열이 세포사멸에 관여하는 유전자들의 발현 이상에 기인하는 것인지를 알아보고자 세포 사멸에 관여하는 *Bcl* 가족 유전자(family gene)에 속하는 *Bcl-x1*, *Bcl-2*, 그리고 *Bax* 유전자를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 anti-apoptotic 관련 유전자인 *Bcl-x1*과 *Bcl-2*의 경우 정상 배자의 경우에는 발생 13일부터 17일까지 거의 비슷한 양상으로 강하게 발현하였으나, 레티노산에 노출된 배자에서는 발생 13일부터 15일까지는 비슷한 양상으로 발현하다가 16일째부터는 점차 감소하였다(Fig. 7). 그러나 pro-apoptotic 유전자로 알려진 *Bax*의 경우 anti-apoptotic한 유전자들과는 달리 정상 배자에서는 발생 13일부터 17일까지 일정한 양으로 강하게 발현한 반면, 레티노산에 노출된 배자에서는 구개발생 초기인 발생 13일부터 15일까지는 발현이 거의 일어나지 않다가 발생 16일째가 되어서야 발현이 증가하였다(Fig. 7).

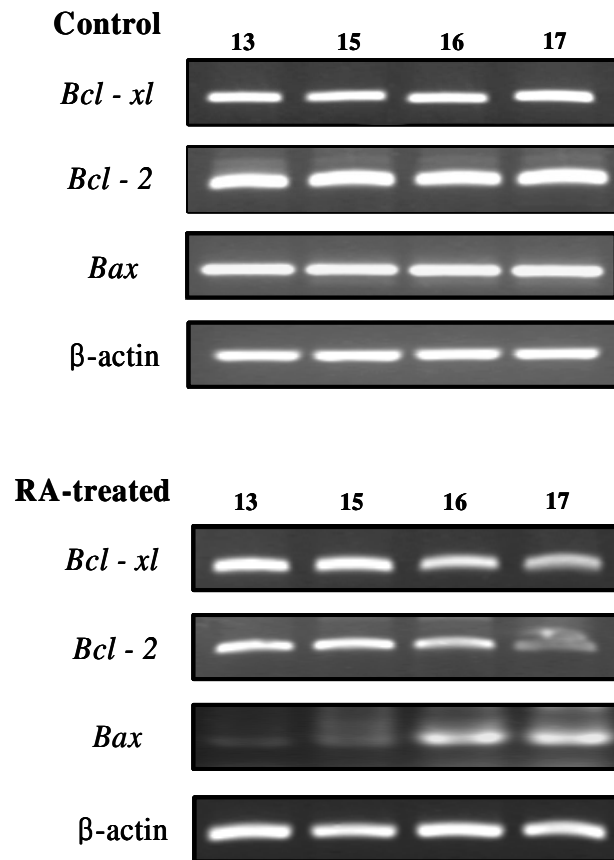


Figure 7. The effect of RA on expression pattern of several programmed cell death related genes in developing craniofacial region of rat. The expression of *Bcl-xl*, *Bcl-2* shown to be decreased from day 16 p.c by RA; whereas the expression of *Bax* increased from day 16 p.c in RA-treated groups. As an internal control, *β -actin* gene was analysed.

IV. 고 찰

사람에서의 구개 발생은 얼굴 발생 초인 4주를 지나 발생 6주초에 정중구개융기 (median palatine process or primary palate)와 2개의 외측구개융기(lateral palatal process or secondary palate)로부터 시작되는데, 융기의 발생시기와 방법에는 차이가 있는 것으로 알려져 있다.¹ 계속하여 성장한 상악융기는 안쪽 공간에 중간엽 덩어리를 형성하여, 후에 절치(incisive tooth)를 포함하는 상악전골(premaxillar)이 된다. 또한 양쪽 내측비융기(medial nasal prominence)가 융합하여 형성되는 상악간분절(intermaxillary segment)은 일차구개를 형성하는 구개성분을 비롯하여 상악위쪽의 인중(philtrum)을 형성하는 구순성분, 4개의 절치 및 잇몸을 포함하는 상악 성분으로 이루어진다.^{1,2} 발생 6주말에는 경구개와 연구개의 원기인 외측구개돌기가 절치공(incisive foramen)부분에서 뒤쪽으로 뺏어 나가기 시작하는데, 상악융기의 안쪽에서부터 튀어나온 2개의 중간엽성 융기인 입천장선반으로 발달하게 된다. 발생 7주초에 이르면 상악융기는 내측비융기와 병합이 이루어져 두 융기사이를 이루고 있던 홈은 없어지고, 비소와가 구강오목과 분리되어지게 된다고 알려져 있다. 발생 7-8주를 거치는 동안 혀 양측의 입천장선반이 아래쪽으로 돌출되어 점점 성장하게 되고,^{1,2} 발생 8주말에는 성장하던 입천장선반들이 짧은 순간 혀 상측으로 올라와 수평을 유지하게 된다.¹⁻³ 양측의 입천장선반들이 서로 접근하여 정중앙에서 병합되기 시작한 후 정중구개융기와 비중격과의 병합도 이루어진다고 알려져 있다.^{3,29-33} 이러한 병합과정에서 기저판인 상피세포가 중간엽세포로 변화하는 것과 세포의 죽음^{33,34} 등이 일어난다고 보고되어 있다. 결국 이 모든 과정을 통하여 경구개(primary palate)는 양측의 내측비융기와 전두비융기(frontonasal prominence)와의 결합으로 상악의 앞부분과 함께 형성되어지며, 연구개(secondary palate)는 양측의 중간엽성 상악융기로 인하여 형성되어진다.^{1,2}

이러한 정상 발생과는 달리 구개열은 현재까지 여러 원인에 의해 발생 되는 것으로 보고 되어있다. 먼저, 유전적 요인으로는 염색체 이상, 이와 더불어 Treacher

Collins 증후군 등과도 연관되어져 있다고 알려져 있으며,⁶ 또 환경적 요인으로는 배자의 비타민과 호르몬 혹은 약물의 과다 노출과 부족 그리고 흡연, 음주 등에 의해서도 구개열이 발생하는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹⁰ 구개열은 배자의 발달 과정 중 입천장선반의 성장(elongation)이나 이동(elevation) 그리고 병합(fusion)과정의 이상으로 발생한다. 입천장선반의 성장 능력 저하(retardation)로 인하여 구개열이 생기게 되면, 입천장선반의 중앙가장자리상피(medial edge epithelium; MEE)에 있는 상피세포(epithelial cell)가 접합 시 세포사멸이 일어나서 병합이 일어나는데 이때 저해물질(teratogen)로 인하여 병합되지 못하면 그대로 구개열이 된다.^{3,33,34} 이 때 저해물질로 작용할 수 있는 레티노산은 비타민 A의 생체내의 활성 대사산물으로써 배자발생에 관여한다고 알려져 있다. 실제로 생쥐(mouse)와 백서(rat)를 이용한 동물실험연구에 의하면 레티노산에 의해 구개열 외에도 구순열(cleft lip), 사지소지증, 작은 안구증(micro-phthalia), unascended kidney 등이 나타나는 것으로 보고되어 있다.^{8,9} 백서에서는 발생 16일에서 17일 사이에 구개병합이 일어나는데,^{8,9} 이 때 양쪽의 입천장선반 중앙가장자리 상피가 융합하여 중앙 봉합선(midline seam)을 형성함과 동시에 중앙가장자리 상피세포의 세포사멸이 필요하다고 알려져 있다.³⁴ 반면 최근에는 입천장선반의 병합과정에서 가장자리 상피세포의 세포사멸이 꼭 선행되어야만 하는 필수조건은 아니라는 보고도 있다.³⁵ 또, 레티노산이 입천장선반의 병합시에 있어야할 상피세포의 중간엽 세포(mesenchymal cell)로의 변환(transformation)을 방해하고,^{33,34,36} 세포의 순환주기(cell-cycle) 중지(arrest)를 유도하여 구개열을 발생시킨다는 보고가 있으며,³⁷ 또한 입천장선반의 병합 시에 구개주름(palatal ruga)의 이상으로 인하여 접합 부분이 제대로 만나지 못하여 구개열이 발생한다는 보고 또한 있다.³⁸ 배자발생에서 배자의 전후 축을 형성하는 데 중요한 역할을 하는 master 전사 조절인자(transcription regulator)인 *Hox* 유전자는³⁹ 레티노산과 이의 전구물질인 레티노이드 등의 영향을 받아 배자발생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{18,20} 특히 척추동물에서 레티노산 처리에 의해 *Hox* 유전자의 발현위치가 변하면 그 위치에서 항상성 형질전환이 유발되며,^{15,18} 생물체의 축 형성 이

상 등을 포함한 형태적 기형이 발생한다.⁴⁰

본 연구에서는 임신 중 레티노산이 구개발생에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 두개안면형성이 일어나는 발생초기인 임신 11일째의 어미 백서에 레티노산을 처리하여 발생 단계별로 배자를 분리하여 외부 형태와 구개를 관찰하고, 배자 머리 부분에서 발현하는 유전자를 분석하였다.

먼저 형태적으로 보면 이전 다른 그룹의 보고와 유사하게,⁸ 본 실험에서도 레티노산에 노출된 배자에서는 전체적으로 턱을 포함한 안면형성 발달지연이나 짧아진 사지 및 꼬리의 길이 같은 여러 기형이 관찰 되었다(Fig. 2). 그리고 구개 형성에 있어서도 정상배자의 경우 발생 16일째에 입천장선반의 접합과 병합이 시작되어 발생 17일째에는 완전한 구개가 형성되는데 반하여, 레티노산에 노출된 배자는 17일째에서도 입천장선반의 병합이 일어나지 않은 구개열의 상태를 그대로 보여주었다(Fig. 3). 즉, 형태적으로 정상 발생에 비해 약 1일정도 발생이 늦어지는 것처럼 관찰되었으므로 레티노산에 노출된 배자 발생 17일 후의 발생 상태, 더 나아가 출생 이후까지 관찰을 계속한다면 구개열의 발달과 지속여부에 대한 이해를 더 넓힐 수 있을 것으로 생각된다. 이로써 레티노산이 발생 단계에서 과다 노출 시 기형 유발 가능한 것임을 확인할 수 있었으나, 평소에 레티노산이 내인성 대사산물로 존재하고 있는 것이라고 생각한다면 배자 발생 단계 중 어느 시기에, 얼마의 양에 노출되었느냐에 따라 다른 발생 혹은 기형을 유도할 수도 있을 것으로 생각된다.^{27,45}

Hox 유전자의 실험결과를 보면, 생쥐에서 *Hoxa7*은 흉추(thoracic vertebrae) 3번(somite 13-14) 이하에서 발현이 된다고 알려져 있다.³⁹ 그러나 *Hoxa7*을 원래 발현장소가 아닌 얼굴을 포함하는 머리부위에서 발현을 유도하면 구개열을 포함한 안면부분의 기형이 유발된다는 보고가 있다.²³ 사람 *Hoxa7* 유전자의 5' upstream 쪽에는 레티노산 반응 부위(retinoic acid response element, RARE)가 존재하는데,⁴¹ 발생과정 중 레티노산에 노출되는 시기와 농도에 따라 약간의 차이는 있으나 원래 가슴부분에서 발현되어야 하는 *Hoxa7*이 배자 발생 초기에 레티노산에 과다하게 노출되면 경추부분으로까지, 부족하면 허리아래까지 이동하여 발현되어 궁극적으로는

몸의 형태가 전후 축에서 더 후부(posterior)쪽 또는 전반부(anterior)쪽의 형태로 변환되는 항상성 형질전환이 일어나게 된다.^{18,42-44} 백서를 이용한 본 실험 결과에 의하면 정상 발생하는 배자의 머리에서 발생 13일째에 가장 강하게 발현 하였고 15일째부터는 발현이 점차 감소한 반면, 레티노산에 노출된 배자의 머리에서는 정상과 달리 입천장선반이 아래로 성장하는 단계인 발생 15일째에서 강하게 발현되었으며, 그 이후로는 점차 감소하였다(Fig. 6). 이렇듯 *Hoxa7*의 발현이 레티노산에 의해 조절을 받아 정상 배자 발생 13일째에서 보인 발현 양상이 레티노산에 노출된 배자에서는 발생 15일째로 지연되는 양상을 보인 것으로 생각된다. 반면, 생쥐에서 경추 7번부터 흉추 13번(somite 10-24)까지의 위치에서 발현한다고 알려져 있는 *Hoxc8*³⁹의 경우 백서를 이용한 본 실험에서는 전반적으로 머리부위에서의 발현이 매우 약하거나 거의 발현이 감지되지 않았다. 정상 배자의 경우 발생 16일째에서 약간의 발현이 감지되었으나, 그 후 점차 감소하였고, 레티노산에 노출된 배자에서는 정상 배자보다 조금 빠른 발생 15일째에서 미약하나마 약한 발현이 관찰되었고 그 후로는 정상 배자와 같이 점차 감소되는 양상이 관찰 되었다. 이런 *Hox* 유전자의 발현 양상의 변화는 형태적으로 레티노산에 노출된 배자가 정상 배자보다 발생이 늦추어지는 양상을 보임에 따라, 레티노산에 의해 배자 발현이 지연될 수 있는 가능성을 시사한다.⁴⁵ 이는 배자의 형태형성에 관여하는 유전자가 레티노산에 의해 발현 지연이 유도되어 궁극적으로 몸의 형태가 지연되어 만들어질 수 있을 것으로 유추된다.

세포사멸(apoptosis, programmed cell death)과 관련하여 일반적으로 레티노산은 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다.^{34,35,46,47} 또한 레티노산 처리에 의하여 *Bcl* 가족 유전자 중 anti-apoptotic한 유전자로 알려진 *Bcl-2* 및 *Bcl-xl*이 세포 사멸을 유도하는데 조절자(key regulator) 역할을 수행하여 세포 사멸을 저해하며,⁴⁶⁻⁴⁸ pro-apoptotic 유전자인 *Bax*는 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다.⁴⁹ 본 연구에서는 정상 배자의 경우 발생 13일부터 17일까지 anti-apoptotic한 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*, 그리고 pro-apoptotic한 *Bax*의 발현이 일정한 강도로 높게 관찰된 반면 레티노산에 노출된 배자에서는 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*의 발현이 발생 16일 이전까지 그리고 *Bax*는 16

일 이후에만 강하게 발현하였다. 이상의 결과는 발생 16일째에 입천장선반이 올라와서 가운데 부분의 가장자리 상피세포에서 세포사멸이 일어나야 한다고 하는 이전 결과에 비추어보면, 발생 16일째에서부터 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*의 발현은 감소하고, *Bax*의 발현은 증가할 것으로 예측되었으나, 본 실험에서는 정상 배자 발생 16일째에서부터 감소되는 양상이 관찰되지 않았다. 반면, 레티노산에 노출된 배자에서 구개 병합 시 세포사멸이 유도되지 않아 구개열이 형성 된다면 발생 16일째에서부터 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*의 발현은 증가하고 *Bax*의 발현이 감소할 것으로 예상하였으나, 흥미롭게도 본 실험에서는 이와는 반대로 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*의 발현이 발생 16일째에서부터 감소하였고, *Bax*의 발현은 증가되었다. 최근 구개발생과정 중 구개 병합 시 상피세포의 세포사멸이 꼭 선행되어야만 하는 필수조건은 아니라는 보고가 있으며,³⁵ 이에 비추어 볼 때 구개열 형성에 *Bcl-xl*, *Bcl-2*, *Bax* 같은 유전자의 발현이 직접적인 영향을 미치는지에 대해서는 현재로서는 명확치 않다. 본 실험에서는 *Bcl-xl*, *Bcl-2*, *Bax*의 발현을 전사 수준에서 본 것이나 이들이 기능을 수행하기 위해서는 일단 단백질로 해석되어야 하며 또 이 단백질은 다시 미토콘드리아 막에 위치해야만 한다.⁵⁰ 따라서 현재로서는 레티노산에 의한 *Bcl-xl*, *Bcl-2*, *Bax* 유전자의 전사수준에서의 발현 차이가 실제로 상피세포의 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지 유추하기는 어렵다고 본다. 또 실험에 사용된 mRNA가 구개 부분만을 추출하여 사용한 것이 아니라 아래턱을 제외한 나머지 머리 부분을 모두 사용한 것이어서 입천장선반의 상피세포의 세포사멸을 제외하고라도 머리 부분의 각 기관 발생이 레티노산에 의해 조절된다는 보고도 있어,⁴⁴ 머리 부분의 다른 기관의 세포사멸로 인하여 *Bcl-xl*, *Bcl-2*가 감소되는 그리고, *Bax*가 증가되는 발현양상을 보였을 수도 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과로 미루어 보아 임신 중 레티노산 노출이 배자 발생과정 중 구개열을 포함한 형태적 기형 유발을 가능하게 하는 물질임을 알 수 있었으며, 또한 배자의 형태발생에 관여하는 *Hox* 유전자의 발현과 세포사멸과 연관된 *Bcl-xl*, *Bcl-2*와 *Bax* 유전자의 발현을 조절하여 배자 형태 기형을 유발한 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 임신 중 레티노산이 구개 형태발생에 미치는 영향을 알아보고자 임신 11일째 백서에 레티노산을 복강내 주입한 후 임신 13일부터 17일까지의 배자를 분리하여 배자 형태 및 유전자 발현을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 레티노산에 노출된 배자의 경우 정상에 비해 머리 발생 지연을 포함하여 머리둔 부길이와 사지 등의 길이가 짧아졌다.
2. 17일째 배자의 경우 정상 배자는 구개형성이 완료된 반면, 레티노산에 노출된 배자에서는 총 52예 중 36예에서 구개열이 관찰되었으며, 구개열의 벌어진 간격은 약 0.80 ± 0.36 mm이었다.
3. DDRT-PCR 방법을 통해 정상과 레티노산을 처리한 배자 사이에서는 서로 다르게 발현하는 유전자가 많이 존재하고 있음을 확인하였다.
4. 배자의 형태형성에 관여한다고 알려진 *Hoxa7*의 경우 정상 배자에서는 발생 13일째에 강하게 발현한 후 감소하는 양상을 보였으나, 레티노산에 노출된 배자에서는 발생 15일째에 발현이 현저히 증가하였으며 이후 차츰 감소하였다. 반면, *Hoxc8*은 전반적으로 약하게 발현하였으나, 정상배자의 경우 발생 16일째에 발현이 관찰되었고, 레티노산에 노출된 배자에서는 정상보다 약간 빠른 15일째에 약한 발현이 관찰되었다.
5. 세포사멸에 관여하는 *Bcl* 가족 유전자의 경우 정상 배자에서는 발생 13일에서 17일까지 anti-apoptotic한 유전자인 *Bcl-xl*과 *Bcl-2* 그리고 pro-apoptotic한 *Bax* 모두 강하게 발현 하였으나, 레티노산에 노출된 배자에서는 *Bcl-xl*과 *Bcl-2*의 발

현이 16일 이후에는 감소하였으나 *Bax*의 경우는 증가하였다.

이상의 결과는 임신 중 레티노산이 배자 발생과정 중 구개열을 포함한 형태적 기형을 유발하며, 이는 형태 형성에 관여하는 *Hox* 유전자와 세포사멸에 관련된 유전자 (*Bcl-x1*, *Bcl-2*, *Bax*)의 발현을 조절하여 형태적인 기형 유발에 관여한 것으로 유추된다.

참 고 문 헌

1. 박형우. 인체발생학. 2nd ed. 서울: 군자출판사; 1999.
2. James K. Avery. Oral development and histology. 2nd ed. New York(NY) : Thieme Medical Publishers; 1994.
3. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sengupta A, Brown N, Sandy JR. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J R Coll Surg Edinb* 2000;45:351-358.
4. Kim S, Kim WJ, Oh C, Kim JC. Cleft lip and palate incidence among the live births in the Republic of Korea. *J Korean Med Sci* 2002;17:49-52.
5. Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, et al. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: assessment of candidate regions. *Cleft Palate Craniofac J* 2002;39:149-156.
6. Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. *Ann Hum Genet* 2001;65 (Pt 6) :505-515.
7. Vieira AR, Orioli IM. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *ASDC J Dent Child* 2001;68:272-279.
8. Morriss-Kay G. Retinoic acid and development. *Pathobiology* 1992;60:264-270.
9. Shenefelt RE. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 1972;5:103-118.

10. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency: Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 1953;92:189-217.
11. Brickell P, Thorogood P. Retinoic acid and retinoic acid receptors in craniofacial development. *Semin Cell Dev Biol* 1997;8:437-443.
12. Yu J, Gonzalez S, Martinez L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Effects of retinoic acid on the neural crest-controlled organs of fetal rats. *Pediatr Surg Int* 2003;19:355-358.
13. Bavik C, Ward SJ, Ong DE. Identification of a mechanism to localize generation of retinoic acid in rat embryos. *Mech Dev* 1997;69:155-167.
14. Zile MH. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr* 2001;131:705-708.
15. Kaiser ME, Merrill RA, Stein AC, Breburda E, Clagett-Dame M. Vitamin A deficiency in the late gastrula stage rat embryo results in a one to two vertebral anteriorization that extends throughout the axial skeleton. *Dev Biol* 2003;257:14-29.
16. White JC, Highland M, Kaiser M, Clagett-Dame M. Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev Biol* 2000;220:263-284.
17. Sharma HS, Misra UK. Developmental pattern of the hepatic DNA, RNA and protein in relation to maternal vitamin A status in rats. *Acta Vitaminol*

Enzymol 1985;7:85-91.

18. Kessel M, Gruss P. *Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid.* Cell 1991;67:89-104.
19. Smith SM, Dickman ED, Power SC, Lancman J. *Retinoids and their receptors in vertebrate embryogenesis.* J Nutr 1998;128 (2 Suppl):467S-470S.
20. Marshall H, Morrison A, Studer M, Popperl H, Krumlauf R. *Retinoids and Hox genes.* FASEB J 1996;10:969-978.
21. Whiting J. *Craniofacial abnormalities induced by the ectopic expression of homeobox genes.* Mutat Res 1997;396:97-112.
22. Kaur S, Singh G, Stock JL, Schreiner CM, Kier AB, Yager KL, et al. *Dominant mutation of the murine Hox-2.2 gene results in developmental abnormalities.* Exp Zool 1992;264:323-336.
23. Balling R, Mutter G, Gruss P, Kessel M. *Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice.* Cell 1989;58:337-347.
24. McLain K, Schreiner C, Yager KL, Stock JL, Potter SS. *Ectopic expression of Hox-2.3 induces craniofacial and skeletal malformations in transgenic mice.* Mech Dev 1992;39:3-16.
25. Lufkin T, Mark M, Hart CP, Dolle P, LeMeur M, Chambon P. *Homeotic transformation of the occipital bones of the skull by ectopic expression of a*

- homeobox gene. *Nature* 1992;359:835-841.
26. Lei H, Wang H, Juan AH, Ruddle FH. The identification of *Hoxc8* target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2420-2424.
 27. Campbell JL Jr, Smith MA, Fisher JW, Warren DA. Dose-response for retinoic acid-induced forelimb malformations and cleft palate: a comparison of computerized image analysis and visual inspection. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2004;71:289-295.
 28. Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CI, Gu YY, Chun JY. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques* 2003;35:1180-1184.
 29. Ferguson MW. Palate development. *Development* 1988;103: (Suppl) :41-60.
 30. Ferguson MW. Palate development: mechanisms and malformations. *Ir J Med Sci* 1987;156:309-315.
 31. Chou MJ, Kosazuma T, Takigawa T, Yamada S, Takahara S, Shiota K. Palatal shelf movement during palatogenesis: a fate map of the fetal mouse palate cultured in vitro. *Anat Embryol* 2004;208:19-25.
 32. Tamarin A. The formation of the primitive choanae and the junction of the primary and secondary palates in the mouse. *Am J Anat* 1982;165:319-337.
 33. Gurley JM, Wamsley MS, Sandell LJ. Alterations in apoptosis and epithelial-mesenchymal transformation in an in vitro cleft palate model. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:907-914.

34. 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;245:145-156.
35. Takahara S, Takigawa T, Shiota K. Programmed cell death is not a necessary prerequisite for fusion of the fetal mouse palate. *Int J Dev Biol* 2004;48:39-46.
36. Sharpe PM, Ferguson MW. Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:195-230.
37. Yu Z, Lin J, Xiao Y, Han J, Zhang X, Jia H, et al. Induction of cell-cycle arrest by all-trans retinoic acid in mouse embryonic palatal mesenchymal (MEPM) cells. *Toxicol Sci* 2005;83:349-354.
38. Ikemi N, Otani Y, Ikegami T, Yasuda M. Palatal ruga anomaly induced by all-trans-retinoic acid in the Crj:SD rat: possible warning sign of teratogenicity. *Reprod Toxicol* 2001;15:87-93.
39. Horgan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo a Laboratory Manual*. 2nd ed. Plainview(NY): Cold Spring Harbor Laboratory press; 1994.
40. Langston AW, Gudas LJ. *Curr Opin Genet Dev*. Retinoic acid and homeobox gene regulation 1994;4:550-555.
41. Kim MH, Shin JS, Park S, Hur MW, Lee MO, Park H, et al. Retinoic acid response element in *HOXA-7* regulatory region affects the rate, not the formation of anterior boundary expression. *Int J Dev Biol* 2002;46:325-328.

42. Conlon RA. Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet* 1995;11:314-319.
43. Boncinelli E, Simeone A, Acampora D, Mavilio F. *Hox* gene activation by retinoic acid. *Trends Genet* 1991;7:329-334.
44. Herget T, Specht H, Esdar C, Oehrlein SA, Maelicke A. Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line. *J Neurochem* 1998;70:47-58.
45. Kochhar DM. Teratogenicity of retinoic acid. *Teratology* 2000 ;62:178-180.
46. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Nakanishi H, Ohira M, Isogai E, et al. *Bcl-2* is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 2006;27;Epub ahead of print.
47. Okazawa H, Shimizu J, Kamei M, Imafuku I, Hamada H, Kanazawa I. *Bcl-2* inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. *J Cell Biol* 1996;132:955-968.
48. Park JR, Robertson K, Hickstein DD, Tsai S, Hockenbery DM, Collins SJ. Dysregulated *bcl-2* expression inhibits apoptosis but not differentiation of retinoic acid-induced *HL-60* granulocytes. *Blood* 1994;84:440-445.
49. Hou Q, Hsu YT. *Bax* translocates from cytosol to mitochondria in cardiac cells during apoptosis: development of a GFP-*Bax*-stable *H9c2* cell line for apoptosis analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H477-87.
50. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death*

Differ 2006 19;[Epub ahead of print]

Abstract

Effect of *retinoic acid* on palate formation during rat embryogenesis

Meang Sub Cheng

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Myoung Hee Kim)

Palatogenesis begins from day 14 to day 17 during the rat embryogenesis. Palatal shelves grow vertically from day 14 until the beginning of day 16 of the embryo. Subsequently, the palatal shelves elevate horizontally to the level of tongue, grow medially, and then fuse together in the midline to be connected with nasal septum. *Retinoic acid* (RA) is an endogenous metabolite involved in the formation of anteroposterior axis during the embryonic development. It is known that excess or deficiency of RA is involved with the embryonic malformation. *Hox* gene is known as a master regulator involved in the pattern formation during embryogenesis. It is also reported that the ectopic expression of *Hox* generates an abnormality in craniofacial region with the cleft palate.

In this study, we injected RA intraperitoneally into the pregnant female rat on day 11 of its pregnancy, and then embryos in the stages between day 13 to day 17 of gestation were isolated consequently. The palate morphology was analyzed by the microscopic method. The expression patterns of *Hox* and

several programmed cell death genes were studied by using RT-PCR.

For the morphological study, the retardation of craniofacial region, the shortage of crown rump length and limbs were analyzed in the RA-treated embryos. In the RA-treated embryos of day 17, it was observed that the palatogenesis was completely finished just like in the normal embryos. However, the cleft plate was observed in 36 out of 52 total samples with the distance of 0.80 ± 0.36 mm in average. The temporal expression pattern of *Hox* genes through RT-PCR revealed that the expression of *Hoxa7* reached its peak on day 13 then slowly declined in the normal embryos. Whereas in the RA-treated embryos, the expression peak was observed on day 15, then declined subsequently. With the *Hox8* gene, its expression was low in all stages until the day 16 of normal embryogenesis. On the other hand, *Hox8* gene expression was detected slightly early on day 15 in the RA-treated embryos. In the study of *Bcl*-family genes, uniformly strong expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes was observed from day 13 to day 17 of normal embryos, whereas anti-apoptotic gene expressions were decreased after day 16 in the RA-treated embryos. Additionally, a dramatic decline of pro-apoptotic gene expression was observed from day 13 to day 15 of the RA-treated embryos.

Therefore, we believe that RA is a potential factor that is actively involved in the cleft palate formation. Moreover, it is profoundly linked with the regulation of *Hox* and *Bcl* family gene expression pattern that leads to the embryonic malformation.

Key words : anteroposterior axis, cleft palate, embryogenesis, palatogenesis, programmed cell death, retinoic acid.