

생쥐 난자의 Cold-culture에 따른 체외 발생 능력

정 구 민 · 신 영 수*

한국생명과학연구소

In Vitro Developmental Ability of Mouse Oocytes following Cold-culture

Ku Min, Chung and Shin Young-Su*

Hamkook Life-Science Institute and Sin Gu College

SUMMARY

This research was performed to investigate the developmental ability of mouse oocytes following cold-culture(4°C) *in vitro*. When the oocytes were fertilized after 10 hour cold-culture in D-PBS or Ham's F10 with 0.3% BSA, the cleavage rate of the oocytes was not different in the rate of oocytes fertilized *in vitro* without cold-culture(126/189, 66.2% vs 88/133, 66.7%) and also the rate of embryos developed to blastocyst did not(123/189, 65.1% vs 82/133). But, when the time of the cold-culture was extended from 10 to 24 hours, the rate of embryos developed to blastocyst was slightly decreased(73.5% vs 52.2%). However, when the oocytes were cultured for 10 and 24hours at 37°C, the rate of oocytes developed to blastocyst was significantly decreased than that of oocytes following cold-culture. By the results of this study, it'll be possible to utilize effectively the cold-culture of the oocytes when *in vitro* fertilization is delayed.

I. 서 론

체외수정 프로그램에서 난자의 노화(ageing)를 방지하는 것은 어려운 문제점으로 남아 있다. 난자의 노화는 체외 및 체내에서 수정이 지연될 경우에 일어나며, 난자가 노화되면 다정자의 침입, 비정상적인 발생 혹은 발생능력의 상실을 초래한다. 따라서 동물의 인공수정과 체외수정 및 시험관아기 프로그램에서는 난자의 노화를 방지하기 위해서 수정적기를 맞추는 것이 시술의 성패를 좌우하게 된다. 특히, 체외수정에서는 수정 적기를 맞추기 위하여 모든 과정이 제한된 시간 내에서 진행되어야 하는 어려움이 뒤따른다. 이러한 어려움은 생식세포를 동결보존함으로써 상당히 극복할 수도 있다. 그러나 난자의 동결보존은 그 효율성이 낮기 때문에 아직도 미결의 문제점으로 지적되고 있

다.

체외에서 난자의 노화를 방지할 수 있는 방법에 대해서는 적절한 방법이 제시되지 못하고 있다. 지금까지는 동결보존법이 그 대안으로 활용되고 있지만, 난자의 생리적 독특한 특성, 즉, 막과 세포 소기관의 구조적 취약성 그리고 저온충격(cold-shock) 등이 동결보존의 부적합성으로 간주되고 있다(Vincent et al, 1990). 그럼에도 불구하고, 제한된 시간 이내에 체외수정이 불가능할 경우에는 효율성이 낮지만 부득이 난자를 동결보존하지 않을수 없는 현실이다. 이러한 측면에서 난자를 동결보존하지 않고 노화를 방지할 수 있는 적절한 방법을 모색하고자 본 연구를 실시하게 되었다. 이 연구는 두가지 상반된 측면에서 접근을 하였다. 첫째는 난자가 체온보다 낮은 온도(상온)에서 10분 이상 노출될 때 발생능력을 상실한다는 연구보고(Pickering & Johnson, 1987)에 대한 검증 실험이

* 신구전문대학 축산과(Dept of Animal Science)

며, 둘째는 저온보존(이하 냉장배양, cold-culture) 시간과 난자의 발생능력의 상관관계를 규명함으로써 냉장배양의 현실적 이용 가능성을 타진하기 위하여 본 연구를 수행하게 되었다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 장소, 실험기간 및 실험동물

본 실험은 한국생명과학연구소(이하 한생연)에서 1994년 3~6월 사이에 실시하였다. 실험동물은 F1(C57BLx CBA) hybrid 생쥐를 사용하며, 실험시 동물의 나이는 암컷이 5~6주령, 수컷이 12~16주령이었다. 사료급여는 자유급식 시켰으며, 사육실의 조건은 온도가 22~25℃, 광량이 밤과 낮 12 : 12시간으로 하였다.

2. 실험 설계 및 통계분석

실험1은 난자를 D-PBS와 Ham's F10 배양액에 각각 넣어서 37℃와 4℃에 각각 10시간 배양 후 체외수정시켰을 때 난자의 발생능력을 조사하였다. 실험2는 Ham's F10 배양액에 난자를 넣어 37℃와 4℃에서 각각 10시간과 24시간을 배양 후 체외수정시켰을 때 난자의 발생능력을 조사하였다. 실험3은 앞의 두 실험 결과를 기초로하여 4℃에서 10시간 배양한 난자와 채취 후 즉시 체외수정시킨 난자의 체외발생능력을 각각 비교하였다. 이상의 세 실험 결과는 백분율로 표시하였으며, 각 결과의 통계적 유의성은 2-test로 검정하였다.

3. 과배란유도와 난자의 준비

난자를 생산하기 위하여 7.5IU PMSG(Sigma G-4877)를 복강주사한 후 48시간째 5IU HCG(Sigma C-1063)를 역시 복강주사하여 과배란을 유도하였으며, HCG 주사 후 16시간째 난자를 회수하였다. 난자(oocyte-cumulus complex, OCC)는 각 개체별로 좌우 각각 회수하여 각 실험의 두 처리에 각각 배치하였다. 난자 회수시 인산완충액(D-PBS)에 0.3% 소혈청알부민(BSA)을 첨가하여 실린지 필터로 무균처리하여 사용하였다.

4. 저온배양용 배양액의 준비 및 난자의 저온배양법

배양액은 한생연에서 제조한 증류수(Milli-Q wat-

er)를 이용하여 Ham's F10과 D-PBS를 각각 제조하여 이용하였다. 난자의 저온배양액은 각 배양액에 각각 0.3% BSA를 첨가하여 무균여과처리 후 사용하였다. 배양액의 삼투압은 280mOsm로 조절하였으며, pH는 Ham's F10(5% CO₂ 통과처리)과 D-PBS(0.1N HCl 혹은 NaOH 처리)를 중성(7.2~7.3)으로 조절하였다. 난자의 저온배양은 6ml culture tube(Falcon 2063)에 4ml 배양액을 담고, 난자(OCC)를 넣고 튜브의 입구를 밀폐한 후 튜브를 상온의 물이 담겨진 100ml 비이커에 꽂아서 4℃ 냉장고에서 10시간 혹은 24시간 각각 배양하였다.

5. 난자의 체외수정용 배양액 준비, 정자처리 및 체외수정

난자의 체외수정은 전배양된 Ham's F10(0.3% BSA 포함) 배양액에서 실시하였으며, 이때 Organ culture dish(Falcon 3037)를 사용하였다. 정자 처리는 2마리의 성숙한 수컷으로부터 각각 한쪽의 정소상체(부고환) 미부를 채취하여 2.5ml BSA-free Ham's F10에서 정자괴를 15분간 부유시킨 후 그 정자부유액 0.5ml를 2.5ml Ham's F10(0.3% BSA 함유) 배양액으로 옮겨서 10분간 37℃ CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 이렇게 처리된 정자를 난자 한개당 1×10⁵/ml 농도로 난자가 함유된 배양액에 주입하여 체외수정을 실시하였다.

6. 수정된 난자의 체외배양 및 현미경 검사

체외수정 후 24시간째 2-세포로 발달한 수정란과 비정상적으로 발달한 난자 및 미발생란을 구분하여 기록하였다. 그리고 2-세포 수정란을 각 처리구 별로 각각의 배양액(Ham's F10+0.3% BSA)에 옮겨서 배반포 단계까지 배양하여 관찰하였다.

III. 결 과

1. 수정전 난자의 체외배양에서 배양온도와 배양액의 효과

수정 전에 난자를 PBS와 Ham's F10에 각각 넣어 37℃와 4℃에서 각각 10시간동안 난자를 배양한 후 체외수정시켰을 때 난자의 발생 상태는 표 1과 같다. 난할율은 두 배양액에서 모두 37℃보다 4℃에서 난자를

Table 1. The *in vitro* developmental ability of mouse oocytes fertilized *in vitro* after 10 hour culture in PBS and Ham's F10 medium at 37°C or 4°C

Culture of oocytes		No. of oocytes cultured	% Eggs following IVF-IVC			% Embryos developed to blastocyst	
Temp.	Media*		Cleaved	Fragment	1cell / Deg	>Expanded	Total
37°C	PBS	115	31.3 ^a	19.1 ^a	40.9 ^a	11.3 ^a	17.4 ^a
	Ham's F10	127	21.3 ^a	32.3 ^b	46.5 ^a	22.2 ^a	25.9 ^a
4°C	PBS	132	79.6 ^b	13.6 ^a	6.8 ^b	68.9 ^b	78.0 ^b
	Ham's F10	123	83.7 ^b	10.6 ^a	5.7 ^b	69.9 ^b	78.1 ^b

* : Each medium was added with 0.4% BSA.

a, b : Significant in the same column(P<0.05)

배양하였을 때 현저히 높게 나타났다(31.3% vs 79.6% ; 21.3% vs 83.7%)(P<0.05). 이와같이 37°C에서 배양된 난자의 발생 상태가 나쁜 원인은 난자의 파편화와 퇴행성 및 첫 난할 실패에 기인하였다. 37°C와 4°C에서 배양된 난자가 배반포로 발달하는 능력에 있어서도 37°C보다는 4°C에 보존된 난자에서 유의적으로 높았다(17.4% vs 78.0%, 25.9% vs 78.1%)(P<0.05). 그리고 수정전 난자의 보존에서 두 배양액의 효과는 4°C에서는 차이가 없었지만, 37°C에서는 Ham's F10이 D-PBS보다 다소 좋은 결과를 보였다. 이상의 결과는 난자를 체온(37°C)에서 10시간 배양 후 수정을 시키면 난자의 발생능력이 현저히 저하되지만, 저온(4°C)에서 10시간 배양 후 수정시킬 경우에는 쌍윤배반포까지 발생이 가능하다는 사실을 제시하고 있다.

2. 수정전 난자의 체외배양에서 배양시간과 배양온도의 효과

난자를 37°C와 4°C에서 각각 10시간 및 24시간 노

출(배양) 후 체외수정시켰을 때 난자의 발생능력은 표 2와 같다. 난자를 37°C에서 10시간과 24시간 각각 배양 후 수정시켰을 때 난자의 발생능력(난할율)은 두 처리간에 고도의 유의적인 차이를 보였다(40.8% vs 3.1%)(P<0.01). 그러나, 4°C 보존시 두 처리(10 vs 24시간)간에 다소 차이(74.5% vs 57.4%)가 있었지만, 37°C의 경우처럼 현저한 차이를 보이지 않았다. 이러한 경향은 배반포로 발달한 수정란의 비율에 있어서도 동일한 경향을 보였다(40.1% vs 2% ; 73.5% vs 52.2%). 따라서 이 결과는 난자의 노화가 온도와 시간에 직접적인 영향을 받는다는 사실을 제시하고 있다. 특히, 난자 배양시 온도(37°C)의 효과는 난자 배양시간이 연장될수록 더욱 현저히 나타났다. 결론적으로 난자는 수정 전에 37°C에서 24시간 노출(배양)되면 발생능력을 거의 상실(2%)하지만, 4°C에서 24시간 배양될 경우에는 첫 난할에는 다소 영향(73.5% → 57.4%)을 받지만 일단 분열된 수정란은 대부분 배반포로 발달(57.4% → 52.2%)한다는 사실을 알 수 있다

Table 2. The *in vitro* developmental ability of mouse oocytes fertilized *in vitro* after 10 and 24 hour culture in Ham's F10 medium at 37°C or 4°C

Culture of oocytes		No. of oocytes cultured	% Eggs following IVF-IVC			% Embryos developed to blastocyst	
Time	Temperature		Cleaved	Fragment	1cell / Deg	>Expanded	Total
10 hr	37°C	147	40.8 ^a	21.8	37.4	36.1a	40.1a
	4°C	113	73.5b	15.0	11.5	62.8b	73.5b
24 hr	37°C	98	3.1c	31.6	65.3c	0.0c	2.0c
	4°C	115	57.4d	23.5	19.1d	42.6d	52.2d

a, b : a, c ; c, d : Significant in the same column(P<0.01)

Table 3. The *in vitro* developmental ability of mouse oocytes fertilized directly after recovery or after 10 hour cold-culture in Ham's F10 medium at 4°C

Fertilization time of oocytes	No. of oocytes cultured	% Eggs following IVF-IVC			% Embryos developed to blastocyst	
		Cleaved	Fragment	1cell /Deg	>Expanded	
					Total	
Directly after recovery	189	66.7	20.6	12.7	58.2	65.1
After 10 hour cold-culture	133	66.2	16.5	18.8	48.1	61.7

었다.

3. 수정전 난자의 체외배양 유무에 따른 난자의 발생 능력

난자를 채취 후 즉시 체외수정시킨 경우와 4°C에서 10시간동안 cold culture 후 체외수정시킨 경우에 난자의 발생율은 표 3과 같다. 두 처리간에 난할율(66.7% vs 66.2%)과 배반포(65.1% vs 61.7%)로 발달한 수정란의 비율은 차이가 없었다. 그러나 팽윤배반포로 발달한 수정란의 비율은 약 10%의 차이를 보였다(58.2% vs 48.1%). 이러한 사실은 표1, 2에서도 동일한 결과를 보였으며, 이는 수정 전에 저온배양 동안에 받은 손상이 배반포 단계에서 강(cavity)의 팽윤 단계에서 부분적으로 나타났다.

IV. 고 찰

난자는 체외조건에서 노출온도와 노출시간에 매우 민감한 반응을 보였다. 특히, 37°C에 노출될 경우에 난자의 노화는 급격히 촉진된다는 사실을 알 수 있었다. 본 연구에서는 이러한 노화가 어떤 측면에서 유발되었는지 확인할 수 없었지만, 분명한 것은 난자의 노화는 첫 번째 난할과정에서 결정적인 영향을 미친다는 사실이다. 그러나 흥미로운 사실은 비록 비율이 낮지만 수정 전에 37°C에서 10시간 노출된 난자라도 첫 난할에 성공한 난자는 대부분 배반포까지 발달이 가능하다는 것이다. 이러한 사실은 난자간에도 노화에 대한 적응력이 다를수 있다는 사실을 암시하고 있다. 더욱 놀라운 사실은 난자가 37°C에서 24시간 노출되면 대부분 발생능력을 상실한다는 사실이다. 본 연구자의 또 다른 실험(unpublished data)에서는 난자의 노화가

37°C 배양기보다 난관에서 더욱 촉진된다는 사실을 경험한 적이 있다. 체내(난관)에서 배란 후 시간이 경과할수록 난자의 노화 속도가 빨라지는 것은 난관액에 노화촉진물질이 시간이 경과할수록 급속히 증가하기 때문일까?

그렇다면 난자의 노화촉진물질의 존재는 어디에서 비롯되는걸까? 37°C 배양기와 난관에서 노화의 속도가 차이가 있지만 궁극적으로 4°C에 노출될 때보다 더욱 촉진된다는 사실은 난자의 노화는 난자(세포질, 투명대) 혹은 난구세포 자체에 기인할 가능성도 배제할 수 없을 것 같다. 역설적으로 난자를 4°C에 보존한 결과 노화 현상이 놀라울 정도로 줄어 들었다. 이 사실은 노화촉진물질의 생산 억제와 관련이 있는 걸까? 아니면 또 다른 측면에서 난자의 대사 억제와 관련이 있는 걸까? 본 연구에서 난자를 D-PBS와 Ham's F10에 각각 노출시켰을 때 4°C에서는 배양액의 효과가 나타나지 않았지만, 37°C에서는 D-PBS에서 다소 나쁜 결과를 보였다. 물론 D-PBS가 탄산가스와의 반응이 일어나지 않도록 조치를 취했으며, 두 처리간에 환경 효과가 나지 않도록 노력하였다. 이 경우에 37°C에서 phosphate가 난자에 나쁜 영향을 주었을 가능성이 높지만, 다른 측면에서는 phosphate가 노화촉진물질의 생산을 촉진할 가능성은 없을까? 아니면 Ham's F10에 많이 함유된 hypoxanthine혹은 다른 어떤 인자가 난자의 노화방지에 다소나마 영향을 미치지 않았을까 생각된다. 그러나 분명한 것은 4°C에서 두 배양액의 효과는 동일하였다.

본 연구는 4°C에서 난자를 위의 두 배양액에 넣어 10시간 혹은 24시간 cold-culture 하였을 때 노화방지 효과가 나타났다. 즉, 4°C에 노출된 난자가 배반포까지 발생이 가능하였다. Pickering et al(1990)은 난

자를 상온(25℃)에서 10분 이상 노출한 결과 방추사의 이탈 현상이 일어난다는 보고를 한 바 있다. 본 연구가 실용적으로 더욱 접근하기 위해서는 cold-culture 후 배반포로 발달한 수정란에 대한 유전적인 연구가 수행되어야 할 필요성이 있다고 생각한다. 왜냐하면, 난자의 cold-culture가 방추사의 일부를 훼손하여 염색체의 잘못된 분리가 일어났을 가능성을 배제할 수 없기 때문이다.

V. 적 요

생쥐 난자를 이용하여 난자의 냉장배양(cold-culture)의 가능성과 냉장배양 후 발생 가능성을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하게 되었다. 생쥐의 배란된 난자(OCC)를 0.3% BSA가 각각 함유된 D-PBS 혹은 Ham's F10에 넣어 10시간 냉장보존한 후 체외수정시켰을 때 난할율은 대조군(채취 후 즉시 수정시킨 경우)과 차이를 보이지 않았으며(126/189, 66.2% vs 88/133, 66.7%), 배반포로 발달한 난자의 비율(123/189, 65.1% vs 82/133, 61.7%)에서도 차이를 보이지 않았다. 그러나, 냉장배양(4℃ 보존)을 24시간으로 연장한 결과는 10시간 배양한 결과보다 난할율(73.5% vs 57.4%)과 배반포(73.5% vs 52.2%)로 발달한 수정란의 비율이 다소 낮았으며, 특이한 점은 일단 분열된 난자는 대부분 배반포까지 발달이 가능하였다. 한편, 난자를 수정 전에 37℃에서 10시간 및 24

시간 배양한 결과 배반포로 발달한 수정란의 비율은 냉장배양보다 현저히 떨어졌다(40.1% vs 73.5% : 2.0% vs 52.2%). 이상의 결과로써 수정이 지연될 경우에 난자를 37℃ 배양기에 방치하는 것보다는 냉장(4℃) 배양한다면 난자의 효율적인 이용이 가능할 것이다.

VI. 인용문헌

1. Pickering, S. J. and M. H. Johnson, 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.* 2:207.
2. Pickering, S. J., P. R. Braude, M. H. Johnson, R. M. Cant and R. M. Currie. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil. Steril.* 54:102.
3. Vincent, C., S. J. Pickering and M. H. Johnson, 1990. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fertil.* 89. 253.