

마우스 성숙난자의 Straw와 Grid를 이용한 유리화동결법의 효율성 검토

정형민¹ · 박이석¹ · 박성은²

¹포천중문의과대학교, ²차병원 여성의학연구소

Efficiency of Vitrification using Conventional Straw and Grid as a Vehicle in Mouse Oocytes

Hyung Min Chung¹, Lee Suk Park¹ and Sung Eun Park²

¹College of Medicine, Phochon CHA University, Korea

²Infertility medical Center, CHA General Hospital, Korea

SUMMARY

To develop an effective vitrification method, we examined the use of a conventional straw as vessel for vitrification of mouse oocytes, and to compare the post-thaw survival and chromosome configuration of these oocytes with those vitrified in grids. Intact cumulus-enclosed oocytes were vitrified with DPBS with 5.5 M ethylene glycol and 1.0 M sucrose, and loaded into straws and onto electron microscopic copper grid for storing in liquid nitrogen. Intact vitrified and thawed oocytes were karyotyping for chromosome. The rates of post-thawed survival were 88.5% in vitrified oocytes with straws, and 83% in vitrified oocytes with grids. Vitrified and thawed oocytes with straws and grids were increased chromosomal abnormality (31.4% and 30.9%) compared with fresh oocytes (17.8%). The conventional straws can be used as vessel for vitrification to prevent of infection in liquid nitrogen.

(Key words : oocyte cryopreservation, vitrification, EM grid, straw)

서 론

난자의 성공적인 동결보존법의 확립은 배아 동결에 따른 윤리적, 법적 문제를 해결할 수 있는 대안으로서 임상적 응용 가능성이 매우 크며 (Capron 1992; Perry과 Schneider, 1992), 또한 인간생식 보조기법에 있어서 동결보존에 의한 난자은행을 이용하여 조기폐경, 방사선 조사 혹은 화학치료 및 유전자 이상 등으로 난소기능이 상실되거나 자신의 난자를 이용할 수 없는 환자에 대해 난자공여가

가능해질 수 있다는 점에서 이 분야에 관한 관심이 고조되고 있다. 그러나 배아동결에 비해 생존률, 수정률, 배발달률이 낮은 것으로 보고되었다. 따라서 난자의 동결보존시 동결방법의 선별은 효과적인 난자은행의 개발에 있어 필수불가결한 요소이다. 유리화 동결법은 동결중 ice crystal이 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질의 손상을 줄일 수 있는 장점이 있으므로 많은 포유동물의 실험 결과가 보고되었다. (Nakagata 등, 1989; Hotamisligil 등, 1996; Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998). 유리화동결법은 다양한 container등을 이용하여

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-1999-00082) 지원으로 수행되었음.

† Correspondence : Tel : (02) 3468-3391, Fax : (02) 3468-3399, E-mail : hmchung@chacares.com

시행할 수 있으며, Otoi 등 (1998)은 소의 난자를 straw를 이용하여 유리화동결시 slow freezing 방법을 이용 했을때보다 좋은 결과를 보고하였다. 또한 Vajta 등(1998)은 소의 난자를 open pulled straws 을 이용했을때 conventional straw를 이용했을때보다 임신률이 증진됨을 보고하였다. 이전의 우리의 연구에서도 마우스의 난자를 grid를 이용하여 유리화동결시 slow freezing방법을 이용했을 때보다 생존률이 증가됨을 관찰하였다 (Park et al., 2000).

그러나 최근에 액체질소로부터 virus가 감염되는것을 보고하였으며 (Kuleshova and Shaw, 2000), grid나 open pulled straw를 이용하여 유리화동결시 난자와 액체질소가 직접 접하게되므로 virius의 감염을 배제할 수 없다.

이에 본 연구에서는 난자의 유리화동결시 virus의 감염을 막기위해 밀봉이 가능한 conventional straw와 기존에 이용하였던 grid를 이용한 유리화동결법을 비교하여 생존률과 염색체의 이상 빈도를 알아보고자 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 성숙난자의 준비

암컷 ICR 생쥐의 복강에 5 IU의 PMSG와 hCG를 각각 48시간 간격으로 주사하여 과배란 유도를 하였다. 성숙난자의 회수를 위해 hCG를 주사한 후 14시간 후에 경추 탈골로 도살 후 난관 팽대부에서 19 gauge 주사침이 부착된 일회용 주사기 (1ml)를 사용하여 성숙난자를 회수하였다. 회수된 난자는 실체현미경하에서 난세포질이 균일하고 난구세포가 치밀하게 부착된 난자만을 선별하여 본 실험에 이용하였다. 회수된 난자는 동결전까지 20% FBS (Fetal bovine Serum, HyClone, USA)가 함유된 TCM 199 배양액 (Gibco/BRL, USA)에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 성숙난자의 Grid를 이용한 동결용해

동결방법은 변형시킨 Martino 방법 (Martino 등, 1996)을 이용하였다. 동결방법은 난자를 1.5 M ethylene glycol (EG)에 2분 30초간 노출시킨 후

5.5 M EG와 1 M sucrose가 첨가된 동결액에 20초간 노출시킨 후 Grid에 난자를 부착시킨 후, 핀셋을 이용하여 난자가 부착된 Grid를 직접 액체질소에 침지한 후 제작한 Grid carrier에 넣어 동결하였다. 용해 방법은 Grid carrier에서 Grid를 꺼낸 후 1.0 M sucrose, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M 에서 단계적으로 2분 30초간 노출시켰으며, PBS로 세척하고 실체현미경하에서 난자를 관찰하여 생존율을 조사하였다. 용해 후 생존한 난자는 염색체 염색 전까지 1시간동안 배양하였다.

3. 성숙난자의 Straw를 이용한 동결용해

동결방법은 변형시킨 Martino 방법 (Martino 등, 1996)을 이용하였다. 동결방법은 난자를 1.5 M ethylene glycol (EG)에 2분 30초간 노출시킨 후 5.5 M EG와 1 M sucrose가 첨가된 동결액 200 μ l에 30초간 노출시킨 후 0.25ml plastic straw에 10개씩의 난자를 넣어 직접 액체질소에 침지하여 동결하였다. 용해 방법은 동결된 straw를 액체질소에서 꺼낸 후 대기중에서 5초간 노출시킨 후 실온의 water bath에 10초간 넣은 후 straw를 꺼내 400 μ l의 1.0 M sucrose에서 난자를 꺼낸 후, 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M 에서 단계적으로 2분 30초간 노출시켰으며, PBS로 세척하고 실체현미경하에서 난자를 관찰하여 생존율을 조사하였다. 용해 후 생존한 난자는 염색체 염색 전까지 1시간동안 배양하였다.

4. 염색체 분석

Tarkowski (1966)의 air-drying방법을 변형하여 난자의 염색체를 준비하였다. 대조군의 난자와 동결 용해 후의 생존한 난자를 0.1% hyaluronidase 용액에 처리하여 난구세포를 제거시킨 후 난자를 0.9% sodium-citrate 저장용액에 15분간 침지한 후 꺼내어 난자를 작은 점적으로 siliconized slide에 올려놓고 고정액 (메탄올 : 빙초산 = 3 : 1)을 난자가 있는 작은 점적에 부가하여 난자를 고정하였다. 고정된 난자의 염색체를 10% Giemza 용액에 염색시킨 후 Cytovison (Advanced imaging, UK)을 이용하여 karyotyping을 시행하였다.

Table 1. Morphological survival of mouse mature oocytes after vitrification using conventional straws, or grids

Method	Oocytes	Intact morphology	%
Straw	105	93	88.5
Grid	100	83	83.0

5. 통계분석

통계학적 유의성 검증은 χ^2 test을 이용하여 수행하였다.

결 과

1. 생존률 분석결과

동결용해한 난자들의 생존률을 요약하면 Table 1에서 보는 바와 같다. Straw를 이용하여 105개의 난자를 동결용해한 결과 93개의 난자가 생존하여 생존률은 88.5%로 관찰되었고, grid를 이용하여 동결용해한 군은 100개의 난자중 83개의 난자가 생존하여(83%) 두군간에 유의적으로 차이가 없었다.

2. 염색체 분석 결과

염색체분석의 결과를 요약하면 Table 2에서 보는 바와 같다. 동결 용해 후 생존된 난자의 염색체 이상유무를 확인하기 위해 염색체 표본을 작성한 결과 판독이 가능하였던 난자의 수는 대조군의 경우 45개, straw를 이용한 동결 용해군은 35개, 그리고 grid를 이용하여 동결용해한 군은 42개 였다. 나머지 난자는 고정 중 염색체가 손실되거나 염색체의 분산이 이루어지지 않았거나 너무 많이 분산

Table 2. Chromosomal abnormality of mouse mature oocytes after vitrification using conventional straws, or grids

Groups	No. of oocytes(%)		
	Analyzed	Normal haploidy	Abnormal aneuploidy
Control	45	37	8(17.8)
Straw	35	20	11(31.4)
Grid	42	30	12(30.9)

되어 염색체의 분석을 시행할 수 없었다. 판독이 가능했던 난자의 염색체 이상빈도는 대조군의 경우 17.8%(8/45), straw를 이용한 동결 용해군은 31.4% (11/35), 그리고 grid를 이용하여 동결용해한 군은 30.9%(12/42)로 관찰되어 straw와 grid를 사용한 동결용해 후의 난자에서 대조군에 비해 염색체의 이상의 빈도가 증가되었다. 그러나 straw를 사용한 동결용해군과 grid를 사용한 동결용해군 사이에는 차이가 없었다.

고 찰

본 연구에서는 마우스의 성숙난자를 conventional straw와 grid를 이용하여 유리화 동결법에 의해 동결 용해한 후 생존율과 염색체의 이상성을 관찰하였다. 동결 용해 후의 생존율은 straw와 grid를 이용한 경우 각각 88.5%와 83%로 이전의 slow freezing 방법에서 보다 생존율이 증가됨을 관찰하였다. 이는 slow freezing 방법과 비교하여 유리화 동결법은 높은 농도의 항동해제를 사용하므로 난자의 ice crystal의 형성을 방지할 수 있기 때문으로 보고하였다 (Martino 등, 1996). 즉 유리화 동결 시 사용한 grid와 straw의 경우 이론적으로 cooling과 warming rate이 각각 $-180,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 와 $-2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 급속으로 동결되어 난자의 ice crystal의 형성을 막을 수 있는 것으로 보고하였다. Martino 등 (1996)은 소의 성숙난자를 ethylene glycol과 electron microscope를 이용하여 유리화 동결법에 의해 동결 용해하여 발달시킨 결과, 높은 비율의 배반포 형성을 보고하였으며, Vajata 등 (1998)은 open pulled straw를 이용하여 소의 난자를 동결 용해한 결과 임신률의 증가를 보고하였다. 이전의 우리 연구에서도 grid를 이용하여 마우스의 성숙난자를 유리화동결법에 의해 동결 용해하였을때 높은 생존률을 보고하였다 (Park 등, 2000).

그러나 grid와 open pulled straw를 사용하여 유리화 동결 후 난자를 액체질소에 보관시 난자와 액체질소가 직접하므로 virus의 감염의 위험이 있는 것으로 보고하였다. (Kuleshova와 Shaw, 2000). 따라서 본 연구에서는 virus의 감염을 막기 위해

유리화 동결시 conventional straw를 사용하여 grid와 비교한 결과 유의적 차이는 없었으나 높은 생존률을 나타내어 유리화동결시 straw의 사용이 유용함을 관찰할 수 있었다.

본 연구 결과 대조군과 비교하여 동결 용해한 군에서 염색체이상성이 유의적 차이는 관찰되지 않았으나 대조군에 비해 증가됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 높은 농도의 ethylene glycol을 함유한 항동해제의 사용이 난자가 dehydration이나 rehydration될 때 방추사의 이상을 초래한 것으로 사료된다. 또한 동결중의 난자의 저온에서의 노출이 2차 감수분열의 방추사의 이상을 초래하여 결국 염색체의 이상을 유도하는 것으로 추정된다. 동물 난자를 이용한 연구에서 저온노출 후에 방추사의 파괴와 비중합반응의 유도가 aneuploidy와 polyploidy를 유도하는 것으로 보고되었다 (Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988).

그러나 Aligner 등(1992)은 미세소관의 재중합 과정이 동결 용해 후 배양시간에 따라 회복됨을 보고하였다. 본 연구에서는 난자를 용해 후 분석 전까지 1시간 동안 배양하였으며, 이 기간 중 일부의 난자들에서만 동결 중 손상된 난자의 미세소관이 재중합반응이 일어나서 정상적인 방추사로 회복 되었을 것으로 추정된다. 이처럼 유리화 동결 용해한 마우스의 난자에서 염색체와 방추사의 이상이 증가됨이 관찰되었고 이러한 영향이 이후의 수정 및 배발달을 감소되는 원인으로 작용할 것으로 사료된다. Bos-Mikich 등(1995)과 Hotamisligil 등(1996)은 유리화 동결법에 의해 동결 용해한 마우스의 난자에서 난자의 세포골격계와 발달율이 저하함을 보고하였다.

따라서 난자의 동결 용해 후 염색체와 방추사의 이상을 예방할 수 있는 효과적인 유리화 동결방법의 연구가 필요하며, 이전의 우리의 연구에서는 세포골격계를 안정화시키는 stabilizer 인 taxol을 사용하여 배발달률이 증가됨을 관찰하였다.

그러나 동결 용해후의 세포골격계의 결손이 발달을 저하의 원인으로 설명하기에는 부족하므로 동결후의 난자의 세포질의 손상에 관한 다양한 연구가 필요하며, 또한 유리화 동결시 사용되는 다양한 용기의 개발 및 이들 용기들의 장단점에 관한

연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aligner S, Van der Elst J and Siebzehnruhl E. 1992. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 7:857-864.
- Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ and Whittingham DG. 1995. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 53:780-785.
- Capron AM. 1992. Parenthood and Frozen embryos. More than property and privacy. *Hastings Centre Rep.*, 22:32-33.
- Hotamisligil S, Toner M and Powers RD. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.*, 55:161-168
- Kuleshova LL, and Shaw JM. 2000. A Strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum. Reprod.*, 15:2604-2609.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.
- Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fertil.*, 87:479-483.
- Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES and Lim JM. 2001. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using TaxolTM, a cytoskeleton stabilizer. *Fert. Steril.*, 75:1177-1184.
- Perry C and Schneoder LK. 1992. Cryopreserved embryos: who shall decide their fate? *J. Leg.*

- Med., 13:463-500.
- Sathanathan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS and Ho J. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryo. *Gamete Res.*, 21:385-401.
- Tarkowski AK. 1966. An air-drying method for chromosome preparations from mouse egg. *Cytogenetics*, 5:394-400.
- Van der Elst J, Van sen Abbeel E, Jacobs R, Wisse E and Van Steirtghem A. 1988. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 3:960-967.13.
- Vajta G, Holm P and Kuwayama M. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:53-58.
-

(접수일: 2001. 10. 21/ 채택일: 2001. 12. 9)