

마우스 성숙난자의 유리화 동결 중 Cytoskeleton Stabilizer, Taxol의 처리 후 배발달률과 산자의 생산

박성은² · 박이석^{1,2} · 정형민^{1,2}

¹포천중문의과대학교, ²차병원 여성의학연구소 불임의학연구소, 산부인과

Post-thawed Preimplantation Development and Production of Offsprings after Vitrification using Taxol™, a Cytoskeleton Stabilizer

Seung Eun Park, MS.², Lee Suk Park, MD.^{1,2} and Hyung Min Chung, PhD.^{1,2}

¹College of Medicine, Pochon CHA University, Department of Ob & Gyn

²Infertility Medical Center of CHA General Hospital, Seoul, Korea

SUMMARY

Selection of oocyte cryopreservation method is a prerequisite factor for developing an effective bank system. Compared with slow freezing method, the vitrification has various advantages such as avoiding intracellular ice crystal formation. In our previous, we attempted to employ a vitrification method using ethylene glycol and an electron microscope grid for cryopreservation of mouse oocytes. However, A high incidence of spindle and chromosome abnormalities was detected in thawed oocytes after vitrification. We examined whether the addition of a cytoskeleton stabilizer, Taxol™, to the vitrification solution could promote the post-thawed survival and subsequent development of stored oocytes. More oocytes developed to the 4-cell (44.7% vs. 69.7%), 8-cell (31.8% vs. 64.2%), morula (24.7% vs. 54.3%), and blastocyst (20.3% vs. 49.2%) stages after the addition of Taxol™ to the cryoprotectant than after no addition. 21 and 26 mouse pups were born after transfer of blastocyst derived from oocytes vitrified without and with Taxol. The addition of Taxol to vitrification solution greatly promoted post-thaw preimplantation development of ICR mouse oocytes.

(Key words : Taxol™, cytoskeletal stabilizer, oocyte cryopreservation, vitrification)

서 론

동결보존에 의한 난자은행의 확립은 인간생식 보조기법에 있어서 동결보존에 의한 난자은행을 이용하여 조기폐경, 방사선 조사 혹은 화학치료 및 유전자 이상 등으로 난소기능 상실되거나 자신의

난자를 사용할 수 없는 환자에 대해 난자공여가 가능해질 수 있다는 점에서 임상적 응용 가능성이 매우 크다.

난자의 동결보존시 동결방법의 선별은 효과적인 난자은행의 개발에 있어 필수불가결한 요소이다. 유리화 동결법은 동결중 ice crystal의 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질의 손상을 줄

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

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

일 수 있는 장점이 있으므로 많은 포유동물의 실험결과가 보고되었다 (Nakagata 등, 1989; Hotamisligil 등, 1996; Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998). 그러나 여러 연구 보고에서 성숙난자를 유리화동결 보존할 경우 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 보고하였다 (Bos-Mikich 등, 1995; Hotamisligil 등, 1996). 이는 성숙난자의 경우 염색체에 부착되어 있는 미세소관인 방추사가 온도변화에 매우 민감하여 동결 용해 과정에서 미분리(non-disjuncion)가 발생하여 염색체의 이상 특이수현상 (aneuploidy)이 증가되기 때문이라고 보고하였다 (Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988; Pickering 등, 1990). 이전의 우리의 연구에서도 생쥐의 난자를 유리화동결법에 의해 동결 용해 후 대조군에 비해 난자의 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 관찰하였다(Park 등, 2001).

이에 유리화동결 중 세포골격계를 안정화시킬 수 있다면 동결 용해후의 난자의 생존률과 배발달률을 증진시킬수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 난자의 유리화 동결시 세포골격계의 stabilizer인 Taxol™을 항동해제에 첨가하여 동결 용해 후 생존률과 배발달률을 증진시킬 수 있는지 알아보하고자 본 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 실험현미경하에서 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 동결용해

회수된 성숙난자는 연구의 목적에 따라 taxol 처리군과 taxol 비처리군으로 분류하여 동결 용해시켰다. 동결방법은 변형시킨 Martino 방법 (Martino 등, 1996)을 이용하였다. 동결방법은 taxol 비처리군의 경우 10~15개의 난자를 D-PBS와 20% FBS에 1.5 M ethylene glycol (EG)이 첨가된 항동해제에 2분 30초간 노출시켰으며, taxol 처리군은 10~15개의 난자를 1 uM taxol을 첨가시킨 항동해제에 2분 30초간 노출시켰다. taxol 비처리군, 처리군 모두 5.5 M EG와 1 M sucrose가 첨가된 용액에 20초간 노출시킨 후 Grid에 난자를 부착시켰다. 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 M에서 단계적으로 2분 30초간 노출시켰으며, PBS로 세척하고 실험현미경하에서 난자를 관찰하여 생존율을 조사하였다. 용해 후 생존한 난자는 체외수정에 공시하였다.

3. 체외수정

수컷 ICR 생쥐의 부정소관에서 채취한 정자를 Tyrode,s 배양액에 1시간 30분 배양하여 수정능을 획득시킨 후 1.0×10^6 /ml 정자를 수정용 배양액에 첨가하여 수정을 유도하였다. 수정 4시간 후 난자들을 배양액에 3~4회 세척한 후 변형시킨 P-1 배양액에 배양하며 48, 72, 84, 96시간에 배발달률을 관찰하였다.

4. 체외배양

수정된 난자들의 배양액은 P-1(Irvine Scientific Co.) 배양액에 비필수아미노산 (0.5%, v/v)과 필수아미노산 (1%, v/v) 용액 (Gibco BRL), hemoglobin (1 µg/ml, Sigma), EDTA (0.1mM), PVA (0.05mg/ml)를 첨가시킨 배양액을 제조하여 이용하였다. 10~15개의 수정된 난자들을 oil (BDH)을 덮어 준비한 5 µl의 변형된 PI 용액에 배양하였다.

5. 배반포의 이식

정관길찰술을 시행한 수컷 ICR 생쥐를 8주 이상된 암컷 ICR 생쥐와 교미시킨 후, 교미 2.5일의

Table 1. Effects of addition of TaxolTM(1 μ M), a cytoskeleton stabilizer, to CPA solution on the preimplantation development of ICR mouse oocytes vitrified and thawed at the mature stage

CPA W (+) or W/O (-) taxol	No.(%) of oocyte		No.(%) of oocytes fertilized	No. (%) of inseminated oocytes developed to			
	Examined	Survived after thawing		4-cell (48)	8-cell (72)	Morula (84)	Blastocyst (96)
-	450	375 (83.3)	295 (78.7)	132(44.7) ^a	94(31.8) ^a	73(24.7) ^a	60(20.3) ^a
+	400	338 (84.5)	274 (81.3)	191(69.7) ^b	176(64.2) ^b	149(54.3) ^b	135(49.2) ^b

^{a,b} Superscripts were significantly different within the same column (p<0.05).

대리모에 배반포를 이식하였다. 준비된 대리모를 마취시킨 후 등쪽을 일부 절개 후 자궁을 노출시키고 자궁각 선단부에 26 gauge 주사침을 이용하여 작은 구멍을 만든 후 배반포를 흡입시킨 유리피펫을 삽입하여 배반포를 이식하였다. 이식 후 자궁을 넣고 절개부분을 봉합하여 분만시까지 관리를 통해 산자생산을 유도하였다.

6. 통계분석

통계학적 유의성 검증은 χ^2 test을 이용하여 수행하였다.

결 과

1. 생존률 및 배발달률 결과

동결 용해한 난자들의 체외수정 후 생존률과 배발달률을 요약하면 Table 1에서 보는 바와 같다. Taxol 비첨가군의 경우 450개의 마우스 성숙란을 동결 용해시켰을때 375개의 난자가 생존하여 생존율은 83.3%로 관찰되었고, taxol 첨가군은 400개의 난자를 동결 용해 후 338개가 생존하여(84.5%) 두 군간에 차이가 없었다. 배발달률은 taxol 비첨가군의 경우 4세포기 44.7%(132/295), 8세포기 31.8%

(94/295), 상실배 24.7%(73/295), 그리고 배반포 20.3%(60/295)였고, taxol 첨가군은 4세포기 69.7%(191/274), 8세포기 64.2%(176/274), 상실배 54.3%(149/338), 그리고 배반포까지 발달률은 49.2%(135/274)로 모든 배발달 단계에서 두군간의 유의성이 관찰되었다.

2. 배아이식에 의한 산자 생산

동결 용해한 난자를 체외수정 후 발달시켜 얻은 배반포를 대리모인 마우스에 이식한 결과는 Table 2에 나타나있다. taxol 비처리군에서 56개의 배반포를 7마리의 대리모에 8개씩 이식한 결과 3마리의 대리모가 임신되어 21마리의 산자가 태어났으며, taxol 처리군의 경우 72개의 배반포를 9마리의 대리모에 8개씩 이식한 결과 4마리의 대리모에서 26마리의 산자가 태어나 임신율과 착상률 모두 두 군간에 차이가 없었다.

고 찰

본 연구에서는 마우스의 성숙난자를 유리화동결법에 의해 동결 용해시 항동해제에 cytoskeleton stabilizer인 taxol을 첨가했을 때 배발달률이 증가

Table 2. The result of embryo transfer to pseudopregnant mice

CPA with (+) or without (-) taxol	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients(%)	No. of live offspring
-	56	7	3(42.9)	21
+	72	9	4(44.4)	26

됨을 관찰하였다. 동결 용해 후의 생존률은 taxol 처리군과 비처리군에서 각각 83.3%와 84.5%로 차이가 없었고, 이전의 slow freezing 방법에서보다 생존률이 증가됨을 관찰하였다. 유리화 동결법은 빠르고 간편한 동결 방법으로 ice crystal의 형성을 방지할 수 있다는 장점이 있다. Martino 등 (1996)은 소의 성숙난자를 ethylene glycol과 electron microscope을 이용하여 유리화 동결법에 의해 동결 용해하여 발달시킨 결과, 높은 비율의 배반포 형성을 보고하였다. 이는 유리화 동결시 cooling rate이 이론적으로 180,000°C로 급속으로 동결되어 난자의 ice crystal의 형성을 막을 수 있었기 때문으로 보고하였다. 그러나 항동해제의 독성과 삼투압의 변화에 의한 세포의 손상이 발생할 수 있으므로 항동해제의 선택과 농도가 중요하다.

이전의 우리의 연구에서 마우스의 성숙난자를 ethylene glycol과 electron microscope을 이용하여 유리화동결시 대조군에 비해 염색체 (20.3% vs. 32.6%)와 방추사(25% vs. 32.1%)의 이상성이 증가하였다 (Park et al., 2000). 이에 동결시 항동해제에 세포골격계의 stabilizer인 Taxol을 첨가하여, 용해 후 수정된 난자의 배발달률을 관찰하였으며, 그 결과 4세포기, 8세포기, 상실배, 배반포 모두에서 비처리군에 비해 배발달률이 증가됨을 관찰하였다. 이는 유리화 동결 중 세포골격계의 손상이 난자의 손상의 주요한 요인으로 작용하므로, 유리화 동결 중 세포골격계를 안정화시키는 것이 용해 후 발달률을 증진시킬 수 있는 것으로 사료된다. Taxol은 미세소관의 stabilizer로 α 와 β tubulin dimer의 연결을 강화하며, tubulin과 결합하는 단백질들과의 결합을 강화하여 microtubule을 안정화시키는 것으로 보고되었다 (Albertini et al., 1984). 그러나 Taxol은 일반적으로 항암제로 이용되므로 난자에 이용시 안정성의 검증이 필요하므로 동해 용해 후 얻은 배반포를 대리모에 이식한 결과 임신률은 taxol 비처리군과 처리군에서 각각 42.9%, 44.4%로 차이가 없었으며, taxol 처리군, 비처리군 모두에서 정상적인 산자가 분만되었다.

그러나 taxol 첨가군에서 비처리군에 비해 배반포의 발달률이 증가되었으나 동결하지 않은 난자를 제외배양하여 얻은 배반포를 보다는 20% 정도

낮은 결과를 얻었다(미기재). 따라서 보다 높은 배발달률을 얻기 위해서는 보다 효율적인 유리화 동결법의 개발이 요구된다. 즉, 다른 종류의 세포골격계의 stabilizer, inhibitor의 이용, 다른 항동해제의 이용, 다른 종류의 유리화 동결을 위한 container등의 연구가 필요할 것으로 사료된다. Dobrinsky 등 (2000)은 돼지의 배아를 동결시 미세소관의 inhibitor인 cytochalasin B를 첨가하여 배발달률이 증가됨을 보고하였다. 또한 최근에는 LN₂를 통한 virus의 감염이 보고되어 grid, loop등의 사용보다 straw의 사용이 증가되고 있다. (Kuleshova and Shaw, 2000; Chen et al., 2001).

본 연구 결과 grid를 이용한 유리화 동결 시 마우스 성숙난자의 생존률을 증가시킬 수 있었으며, 항동해제에 Taxol을 첨가하여 동결 시 용해 후 수정된 난자들이 비처리군에 비해 배발달률이 증가되었고, 배반포를 대리모에 이식한 결과 건강한 산자가 분만되었다. 따라서 마우스를 이용한 이들 동결 방법을 임상적으로 이용한다면 난자 공여가 필요한 환자를 위한 난자은행의 설립에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Albertini DF, Herman B, Sherline P. 1984. *In vivo* and *in vitro* studies on the role of HMW-MAPS in TaxolTM-induced microtubule binding. *Eur. J. Cell. Biol.*, 33:3695-3702.
- 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.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN and Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.*, 16:2350-2356.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos

- cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.*, 62:64-70.
- 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 Taxol™, a cytoskeleton stabilizer. *Fert. Steril.*, 75:1177-1184.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil. Steril.*, 54:102-108.
- 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. *Gamate Res.*, 21: 385-401.
- Van der Elst J, Van sen Abbeel E, Jacobs E, Wisse E, and Van Steirghem A. 1988. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 3:960-967.
- Vajata 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)