大韓不妊學會誌: 第 31 卷 第 1 號 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 1, 2004, 3

생쥐모델을 이용한 동결보존제의 독성조사

송촌 산부인과[1], 서울보건대학 임상병리과[2], 을지의과대학교 산부인과[3]

양관철[1] · 강희규[2] · 이회창[3] · 이향흔[3] · 고덕성[3] · 양현원[3] · 박원일[3] · 박은주[3] · 김세웅[3*]

Toxic Effect of Cryoprotectants on Embryo Development in a Murine Model

Kwan Cheal Yang[1], Hee-Gyoo Kang[2], Hoi-Chang Lee[3], Hyang Heun Lee[3], Duck-Sung Ko[3], Hyunwon Yang[3], Won-Il Park[3], Eun-Joo Park[3], S. Samuel Kim[3*]

[1]Song-Chon OB/GYN Clinic
[2]Department of Biomedical laboratory science, Seoul health college, Seongnam
[3]Department of Obstetrics & Gynecology, Eulji University School of Medicine, Seoul Korea

Objectives: The aim of this study was to assess toxicities of cryoprotectants.

Methods: Toxicities of two cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1,2-propanediol (PROH), were investigated using a murine embryo model. Female F-1 mice were stimulated with gonadotropin, induced ovulation with hCG and mated. Two cell embryos were collected and cultured after exposure to either DMSO or PROH. Embryo development was evaluated up to the blastocyst stage. Blastocysts were stained with bis-benzimide to evaluate the cell count and with terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick labeling (TUNEL) to assess apoptosis.

Results: The total cell count of blastocysts that were treated with DMSO at the 2-cell stage was significantly lower than that were treated with PROH (75.9±27.0) or the control (99.0±18.3) ($p<0.001$). On comparison of two cryoprotectant treated groups, the DMSO treated group showed a decreased cell count compared with the PROH treated group ($p<0.05$). Both DMSO (14.2±1.5) and PROH (11.2±1.4) treated groups showed higher apoptosis rates of cells in the blastocyst compared with the control (6.2±0.9, $p<0.0001$). In addition, the DMSO treated group showed more apoptotic cells than the PROH treated group ($p<0.001$).

Conclusions: The potential toxicity of cryoprotectants was uncovered by prolonged exposure of murine embryos to either DMSO or PROH at room temperature. When comparing two cryoprotective agents, PROH appeared to be less toxic than DMSO at least in a murine embryo model.

Key Words: Cryoprotectant, DMSO, PROH, Toxicity, Embryo, Apoptosis

최근 암 치료 기술의 발달로 치료 후 장기간 생존자들이 증가하고 있는 추세이다. 젊은 여성의 경우 암 치료 이후의 삶에 질에 있어서 생식능력은 매우 중요한 부분을 차지하고 있다. 불행히도 높은 단위의 화학적 치료와 방사선치료는 대부분의 소아 및 여성 암 환자에게 그들의 생식능력을

주관책임자: 김세웅, 우) 139-711 서울특별시 노원구 하계1동 280-1 노원을지병원 산부인과
Tel: (02)970-8711, Fax: (02)970-8002, e-mail: medssk@attglobal.net
*본 연구는 범석학술재단 연구비 지원으로 수행되었음

상실하게 만들며, 성선에도 나쁜 영향을 주게 된다. 동결보존술의 발달은 생식세포의 수정능을 장기간 안전하게 보존할 수 있게 하였고, 생식의학의 발전에 지대한 영향을 미치고 있다. 남자의 경우는 항암 치료 전 정자의 동결보존방법으로 생식능력 보존이 가능하다. 그러나 정자의 동결보존에 비해 여성 환자의 경우 난자 및 수정란 동결보존은 성공률은 과거에 비하여 안정화되고 있지만 아직까지 많은 제한점이 있다.

생식능력보존의 새로운 기술인 난소조직 동결보존술은 아직 초기 단계이어서 사람에게 그 효율성이 확실하지는 않고 문제점도 많지만 무엇보다 성공적인 동결보존은 동결보존제의 선택에 있다. 동결보존제의 역할은 동결 시 생기는 얼음 결정 및 고농도 용매에 의한 세포 손상을 막는 것이다. 동결보존제는 친수성이며 쉽게 세포 내로 통과할 수 있고 비교적 세포 독성이 적어야 한다. 많은 화합물이 이런 특성을 가지고 있지만 dimethyl sulfoxide (DMSO), propandiol (PROH), ethylene glycol (EG) 및 glycerol이 효과적인 동결보존제로 많이 사용되어 왔다.[1,2]

아주 작은 양의 세포 내 얼음 결정 형성은 생존에 영향을 주지 않지만, 세포 내 많은 얼음 결정의 증식은 세포를 사멸케 한다. 냉각 속도와 융해 속도는 얼음결정 형성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다.[3,4] 냉각 속도가 너무 빠를 때 얼음결정 형성의 증식이 과다해지고 또한 너무 느려도 심한 탈수로 인한 염분의 침착이 문제가 된다. 느린 융해는 결정이 크게 자라는 기회를 주어 세포에 손상을 주게 되지만 급속 융해는 얼음 결정이 자라는 시간을 단축해 얼음결정의 용해를 촉진한다.[5] 냉동과 융해가 세포에 주는 손상을 줄이기 위해 동결보존제는 매우 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 동결보존제의 독성 또한 세포에 손상을 줄 수 있기 때문에 조심해 사용해야 한다. 동결보존제의 독성은 크게 화학적 독성과 삼투압적 상해로 나눌 수 있다.[6] 생식 세포에 끼치는 동결보존제 독성은 아직도 밝혀지지 않은 것들이 많다. 동결보존제 독성을 줄이기 위해서는 동결보존제에 노출시간을 최소한도로 줄여야 하는 것으로 알려졌으며[7], 일반적으로 수정란과 같은 단세포 동결 시 동결보존제 처리시간은 20분 미만이다. 그러나 난소조직은 다양한 여러 세포로 이루어졌기에 동결보존제 노출 시간이 30분 이상 되어야 적절한 동결보존제 침투를 이룰 수 있다고 알려져 있다.[8]

본 연구에서는 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 두 가지 동결보존제, 즉 DMSO와 PROH의 독성을 비교하고자 생쥐 수정란 모델을 이용한 실험을 하였다. 두 동결보존제 간의 독성의 확립을 위해 생쥐 2-세포기 배아를 장기간 (60분) 동결보존제에 노출시킨 후 포배기까지 배 발생을 시키면서 나타나는 세포사멸의 정도와 배 발달 지연 현상을 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 시약 및 배양액

배양액은 glutamine (0.1 mM/ml)이 포함된 KSOM을 사용하였고, 동결보존제의 비교 대상인 DMSO와 PROH는 1.5 M Leibovitz-L15 (Gibco BRL, UK)를 기본배양액으로 사용하였다. 본 실험에 이용된 그 외 시약들은 Sigma (St Louis, Mo, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다.

2. 수정란 준비

1) F1 생쥐의 준비

생후 6주령의 암컷 F1 hybrid mice (C57BL/6×CBA) 생쥐에 10 IU의 PMSG를 복강 주사하여 과배란을 유도하였다. PMSG 주사 후 48시간때 10 IU의 hCG를 복강에 주사한 후 수컷과 합사하여 교배를 유도하였다. 이튿날 아침 암컷의 질전을 통하여 교배여부를 확인하고 질전이 확인된 개체만을 분리 사육하였다. hCG 주사 후 48시간째에 교배가 확인된 개체만을 경추탈골 방법으로 죽인 후 외과적 수술 방법으로 난관을 떼어내었다. 그리고 인슐린 주사기를 이용하여 난관관류법으로 2-세포기의 배아를 획득하였다.

2) 배양액 제조

배 발달을 위한 기본 배양액은 KSOM을 제조하여 사용하였으며, 단백질원은 0.3% BSA를 첨가하여 사용하였다. 동결보존제의 독성 평가를 위한 배양액은 Leibovitz-L15에 1% BSA를 포함한 기본

배양액에 각각의 1.5 M DMSO와 1.5 M PROH를 첨가하여 사용하였다.

3) 수정란의 동결보존제 처리

실험 30분전에 1.5 M DMSO와 1.5 M PROH의 배양액을 실내온도로 보정하였다. 획득한 2-세포기 수정란을 실온에서 60분 동안 각각의 동결보존제가 포함된 배양액에 넣어 처리하였다. 처리가 끝난 수정란은 배 발달 배양접시로 옮기기 전에 배 발달 배양액에 3회 세척을 실시하여 수정란에 남아있는 동결보존제를 깨끗이 제거한 후, KSOM 배양액 20 μl 소적을 만들고 oil을 피복한 배양접시로 옮긴 후 37℃, 5% CO_2 배양기 내에서 5일간 체외배양을 통해 배 발달을 유도하였다.

3. 배 발달율 분석

2-세포기에서 얻은 수정란을 실온에서 60분 동안 동결보존제에 노출 후 배양기로 옮겨 24시간 주기로 배반포 발생시까지 배 발달율을 관찰하였다. 96시간 동안 배양하여 형성된 배반포는 bis-benzimide (Hoechst 33342)로 염색하여 세포수를 계수하여 배 발달율을 조사하였다. 동결보존제에 노출시킴으로써 나타나는 배 발달율에 미치는 영향을 알아보고자 PMSG 주사 후 96시간을 기준으로 세포수가 40개미만은 A군, 40~70개미만은 B군으로 70개 이상인 C군으로 나누어서 분석하였다.

4. TUNEL 염색

수정란의 고정 및 염색은 다음과 같이 수행하였다. 5일간 배양된 배아는 acid tyrode 용액을 이용하여 투명대를 제거시키고, 0.3% BSA가 함유된 PBS로 3회 이상 세척하여 0.4% paraformaldehyde에 담가서 상온에서 1시간 고정시킨 후, 0.3% BSA가 함유된 PBS로 3회 이상 세척하였다. 배아의 permeability를 위해 0.5% Triton X-100을 15분간 처리 후, 0.3% BSA가 함유된 PBS로 3회 이상 세척하였다. Enzyme solution과 label solution (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescent; Roche, Germany)을 1:9로 섞어서 drop의 형태로 만들고 oil을 피복하여 배아를 넣고 37℃ 배양기내에서 1시간 배양한 후 다시 0.3% BSA가 함유된 PBS로 3회 이상 세척하였다.

5. 세포수 조사

핵을 염색하기 위하여 bis-benzimide를 10 μg/ml로 희석하여 빛이 차단된 곳에 배아를 5분간 처리한 후, 0.3% BSA가 함유된 PBS로 3회 이상 세척한 후, 배아를 slide glass위에 mounting한 후, 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 전체세포와 TUNEL positive 세포를 형광현미경 (Mag×400) 하에서 모두 계수 하였고 시료 하나 당 2사람이 반복 계수하였다.

6. 통계적 분석

통계적 유의성은 배 발달율 분석은 χ^2 test로 하였고 그 이외는 Student's *t*-test를 사용하였으며, P값이 0.05보다 낮은 경우를 유의 하다고 정의하였다.

결 과

1. 동결보존제에 따른 배 발달율 비교 분석

배 발달율은 대조군에서 92.9%가 정상적으로 발달하였으며, DMSO 처리군에서는 A 군이 12.3%, B 군이 33.8%, C 군이 53.9%로 나타났으며, PROH 처리군에서는 각각 7.7%, 29.2%, 63.1%로 나타났다. Figure 1과 같이 정상 배 발달율은 대조군보다 동결보존제 처리군에서 유의하게 낮게 나타났으나 ($p<0.001$) 처리군 간에는 차이가 없었다. 특히 DMSO 처리군에서 C 군이 다른 군에 비해 가장 낮은 비율을 냈다 ($p<0.001$).

24시간 주기로 배 발달율을 확인해 본 결과 DMSO 처리군과 PROH 처리군 모두 대조군에 비해 배발달의 속도가 늦은 것으로 나타났다 (Figure 2). 특히 부화시기인 배양 4일째의 경우 처리군 중 DMSO 처리군에서 유의하게 낮은 부화율이 관찰되었다 ($p<0.001$)

2. 동결보존제에 따른 배반포 세포수 비교 분석

배반포 세포 수는 DMSO 처리군 (67.4±24.9)과 PROH 처리군 (75.9±27.0) 모두 대조군 (99.0±18.3)에 비해 유의하게 적게 나타났다 ($p<0.0001$). 처리군 간에는 DMSO 처리군이 PROH 처리군에 비해 유의하게 ($p<0.05$) 적게 나타났다 (Figure 3).

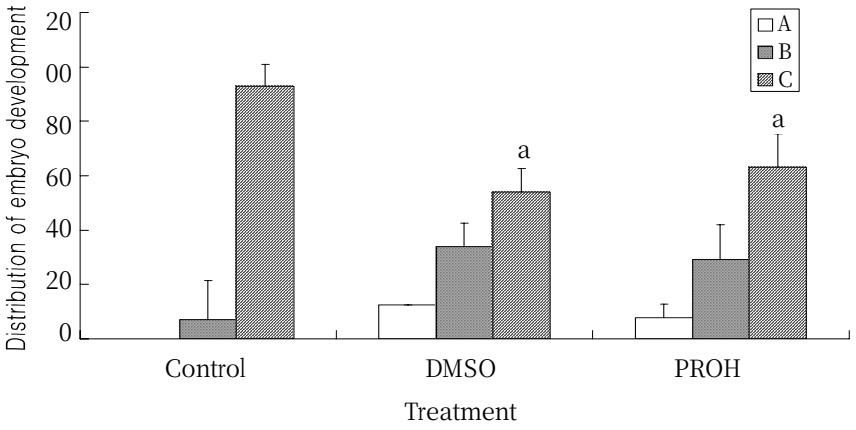

Figure 1. Comparison of embryo development after 60 minutes exposure of 2-cell murine embryo to 1.5 M DMSO or 1.5 M PROH. Data represent mean ± SD; a P<0.001 versus control. Cell number A:<40, B: 40~70, C:>70.

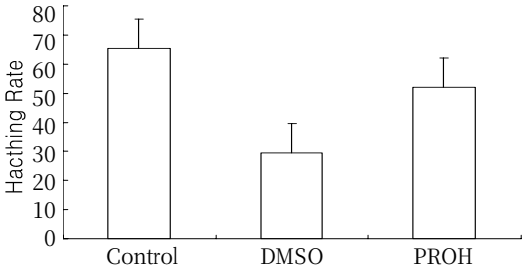

Figure 2. Comparison of hatching rates of embryos that were exposed to cryoprotectants at the 2-cell embryo stage. Data represent mean ± SD; a P<0.001 versus control.

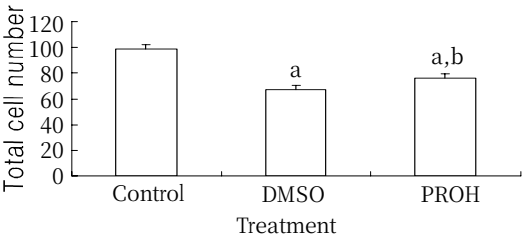

Figure 3. Comparison of total cell number of murine blastocysts which were treated with 1.5 M DMSO, 1.5 M PROH, and Leibovitz solution (control) at the 2-cell embryo stage. Data represent mean ± SEM; [a] p<0.001 versus control, [b] p<0.05 versus DMSO.

3. 동결보존제에 따른 세포사멸 비교 분석

세포사멸된 세포수를 분석한 결과에서도 DMSO 처리군 (14.2±1.5)과 PROH 처리군 (11.2±1.4) 모두 대조군 (6.2±0.9)에 비해 유의하게 높게 나타났으며 (p<0.001), 처리군 간에는 DMSO 처리군이 PROH 처리군에 비해 유의하게 (p<0.001) 세포사멸된 세포의 비율이 높은 것으로 나타났다 (Figure. 4,5).

고 찰

동결보존제는 모든 살아있는 세포의 냉동 보존에 필수적이다. 세포에 대한 냉동 손상을 방지하는 동결보존제의 여러 가지 기능에는 속일성의 (colligative) 효과, 세포막의 안정화, 반응성 수산기의 제어 (hydroxyl radical scavenging)등이 있다고 잘 알려졌다. 그러나 동결보존제의 독성의 정확한 본질은 모른다. 동결보존제의 독성은 아마 세포막 지질의 용해와 단백질 변성에 의해 나타날 수 있다.

동결보존제의 독성은 화학 약품의 고유 특성들, 노출기간과 온도에 의존한다. 독성을 최소화하기 위해 저온에서 세포내로 동결보존제를 급속한 침투는 시키는 것이 바람직하다. 37℃에서 PROH에 노출된 경우는 실온에 비해 배반포의 형성이 상당히 감소했으며, 37℃에서 5분 이상 전핵기 수정란을 동결보존제에 노출하면 배의 발달이 감소한다고 보고되어 왔다.[9] Takagi[10] 등은 소 배아의 연구에서 동결보존제의 독성은 노출 시간과 비례한다고 보고하였다. 다세포로 이루어진 조직들이 평형에 도달하기 위해서는 더 긴 노출 시간이 필요하고 결과적으로 조직에 대한 동결보존제 독성의 위험

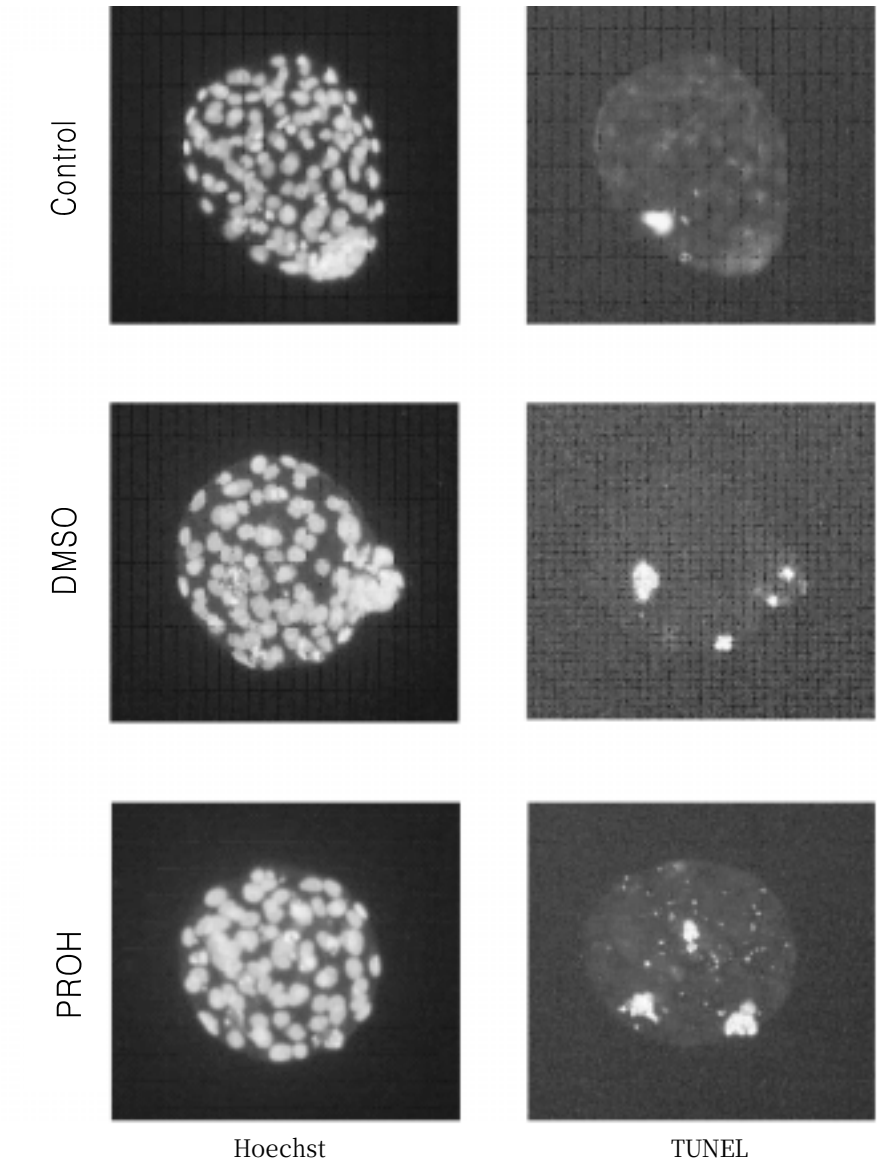

Figure 4. Murine blastocyst stained with a TUNEL method and counter- stained with Hoechst 33342.

성이 증가될 것으로 사료된다. 실온에서 60분 동안 EG에 노출된 경우에는 원시난포 (primordial follicles)의 생존율이 감소되었다는 보고가 있으며 이는 노출된 동결보존제의 화학 독성에 기인한다고 추론하였다.[11,12]

동결보존제는 성공적인 동결을 하기 위한 필수 불가결한 물질이기 때문에 이러한 동결보존제에 대한 세포 독성을 확인하고자 하였다. 배아세포의 동결보존제 노출 시간을 우리의 이전 연구에서 30분 노출로는 확인할 수 없었기에 잠재적인 독성을 발견하기 위해서 본 연구에서는 의도적으로 60분으로 연장시켰다. 그 결과 DMSO 또는 PROH 처리군과 대조군 사이에는 배아 부화율에 있어서 차이가 있었으며 이는 배아에 대한 동결보존제의 잠재적인 독성을 확인한 결과였다. 이번 연구에서 장기간 처리했을 때 PROH 처리군보다 DMSO 처

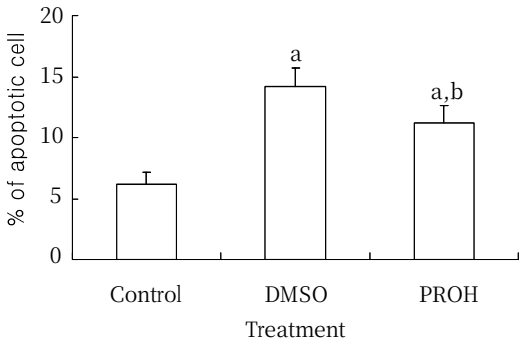

Figure 5. Comparison of the apoptotic rates of cells in blastocysts which were treated with 1.5 M DMSO, 1.5 M PROH for 60min at the 2-cell embryo stage. Data represent mean ± SEM; a $p<0.001$ versus control, b $p<0.01$ versus DMSO.

리군에서 배발달과 세포수가 저하된 것은 DMSO의 독성이 더 높을 것으로 사료되며 이전의 연구결과와[9,13] 일치하는 결과를 나타내었다.

부화지연 현상은 동결보존제의 독성을 배아 세포가 극복하는 시간 차이를 나타내 주는 것으로 사료되는 데, 일반적으로 세포는 세포주기에 따라 check point를 두어 내재적인 결함을 치유하는 기전을 가지고 있기 때문이다. PROH 처리군과 DMSO 처리군간의 부화율을 보면 PROH 처리군이 유의하게 높은 것으로 나타나는 데, 이는 초기 배 발달 단계에서 DMSO 처리군에서는 상해를 입은 배아는 포배기까지 상해를 입은 상태로 존재하는 반면, PROH 처리군에서는 시간이 경과함에 따라 발생이 재개되어 부화에 이르는 것으로 추정할 수 있다. 전반적인 배 발달 양상을 보면 DMSO 처리군에서 부화된 배아보다 팽창포배의 수가 많은 것으로 관찰되었으며, 이는 부화에 관여하는 기전에도 동결보존제가 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또 한가지 동결보존제의 세포독성은 수정란에 있어서 부화기전에 영향을 미치는 것으로 추론되어진다. 최근에 많은 연구에서 배아에 의해서 배반포 팽창에 분비되는 투명대의 용해소 (lysin) 이론이 확인되었다. 'strypsin'이라고 불리는 trypsin을 닮은 단백질 가수 분해 효소는 분리된 쥐의 배반포의 부화에 집적 포함된다고 보고되었다.[4] Schiewe[14] 등은 배반포 anti-hatching 모형을 이용하여 연구한 결과 배반포의 부화는 물리적인 팽창 또는 투명대의 강화가 아니라 배아의 투명대 용해소 분비의 차이에 기인한다고 보고하였다. 이 연구 결과를 분석해 보면 DMSO의 독성에 의한 투명대 용해소의 분비 장애로 인해 DMSO 처리군이 PROH 처리군보다 부화가 늦어졌을 가능성도 배제 할 수 없다.

아직까지 동결보존제의 독성에 대해 많은 부분이 밝혀지지 않고 있으므로, 동결보존제의 독성을 알아보는 연구가 수반되어져야 할 것으로 사료된다. 특히 생식 (germ)세포에 대한 성장과 발달에 있어서 저해 효과를 최소화 할 수 있도록 분자 수준에서의 비치사성 동결보존제 손상을 밝힐 필요가 있다고 사료된다. 또한 동결보존제의 알려지지 않은 독성을 감소시키기 위해서 가능하면 동결보존제에 노출되는 시간을 최소화하는 것이 중요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, Nature 1959; 183: 1394-5.
2. Boutron P. A more accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propandiol aqueous solutions: Comparison with equilibrium, Cryobiology 1984; 21: 183-91.
3. Sutton RL. Critical cooling rate to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents J Chem Soc Faraday Trans 1991; 87: 101-05.
4. Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. In "Handbook of in vitro Fertilization". 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, FL, 2000; pp 205-64.
5. Hey JM, MarFarlane DR. Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethly sulphoxide. Cryobiology 1996; 33: 205-16.
6. Newton H, Pegg DE, Barrass R, Gosden RG. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocyte. J Reprod Fertil 1999; 117: 27-33.

7. Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology 2001; 43: 21-31.
8. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. Hum Reprod 1998; 13: 376-80.
9. Mahadevan MM, Miller MM. Deleterious effect of equilibration temperature on the toxicity of propanediol during cryopreservation of mouse zygotes. J Assist Reprod Genet 1997; 14: 51-4.
10. Takagi M, Boediono A, Saha S, Suzuki T. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. Cryobiology 1993; 30: 306-12.
11. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. J Reprod Fertil 1997; 110: 11-9.
12. Cohen J, Simons RE, Edwards RG, Fehilly CB, Fisher FB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. J In Vitro Fert Embryo Transf 1985; 2: 59-64.
13. Demici B, Lomage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. Fertil Steril 2001; 75: 754-62.
14. Schiewe MC, Hazeleger NL, Scliment DF, Balmaceda JP. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. Fertil Steril 1995; 63: 288-94.