

냉각 후 배양시간이 생쥐 난자의 방추체와 염색체에 미치는 영향

유 일 정[†]
전북대학교 수의과대학

Effect of Incubation Time after Cooling on the Meiotic Spindle and Chromosomes of Mouse Oocytes

I. Yu[†]

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

SUMMARY

This study was conducted to determine the effects of incubation time after cooling on mouse meiotic spindle and chromosome alignment and the optimal incubation time for their restoration. Oocytes at the metaphase II were obtained from superovulated mice. Control oocytes were held at 37°C during the experiment. Oocytes were rapidly cooled to 0°C, held for 30 minutes, warmed and incubated at 37°C for 5, 15, 30, 60 and 120 minutes, respectively. The morphological features of spindle and chromosomes in oocytes were evaluated by immunofluorescent staining.

Meiotic spindle of control oocytes exhibited a normal-looking bipolar configuration(barrel-shaped) and highly fluorescent microtubules. The chromosomes were clustered in a discrete bundles at metaphase plate. Disassembly of meiotic spindle and chromosome dispersion were occurred immediately after chilling of oocyte. Fluorescence intensity index(FIS), normal chromosomes aligned and normal spindle configuration were compared according to incubation time at 37°C. Restoration of a barrel-shaped spindle and normal chromosome alignment was occurring after 5 minutes incubation at 37°C, improved as a incubation time increased, and decreased gradually after 120 minutes incubation($P<0.05$). The optimal incubation time for restoration of meiotic spindle and chromosomes in cooled oocytes was 60 minutes.

(Key words : meiotic spindle, chromosomes, chilling injury, immunofluorescent staining)

서 론

번식에 관여되는 세포를 동결하여 보존하는 방법은 사람의 불임치료 및 실험동물과 가축 등의 체계적이고 효율적인 관리를 가능하게 한다(Woods 등, 2004). 수정란의 동결보존은 현재로서 성공적인 성과를 보여주고 있으나 난자의 동결 보존의 결과는 아직까지 부진하다(Emiliani 등, 1999; Mandelbaum 등, 1998). 난자를 동결하여 보존하는 것은 체외수정, 핵이식의 복제 기술 등에 필요로

하는 난자의 유용성을 증가시키는 중요한 방법 중 하나이다(Chen 등, 2003; Van der Elst, 2003; Parks 와 Ruffing, 1992). 그러나, 난자의 동결융해 후 생존성은 저조하며 이에 따른 체외수정 후 수정란의 발달도 제한되어 있다(Van der Elst, 2003; Martino 등, 1996; Van Blerom과 Davis, 1994). 동결 과정 중 난자는 동결보호제의 첨가와 평형(equilibration) 등의 여러 단계에서 상온 이하의 온도에 노출되게 된다(Aman과 Parks, 1994; Mazur, 1990). 그러므로 난자의 동결보존에 관한 연구이전에 냉각에 대한

[†] Correspondence : E-mail : iyu@chonbuk.ac.kr

재료 및 방법

난자의 영향을 알아봄으로써 난자의 냉각에 대한 민감성 정도를 관찰하는 것이 필요하다.

난자의 중요한 구조인 감수분열의 방추체(meiotic spindles)는 미세관(microtubules)으로 이루어져 있으며 이 미세관은 α -tubulin과 β -tubulin의 tubulin dimers의 중합에 의해서 구성되어 있다. 염색체는 감수분열의 방추체의 적도면위에 배열된다(Zhou 등, 2002; Eroglu 등, 1998). 감수분열의 방추체 미세관의 변화는 난자의 수정과 그에 따른 수정란 발육 등 기능적인 면에 지대한 영향을 미친다(Chen 등, 2001; Park 등, 2001; Eroglu 등, 1998).

동물세포의 감수분열의 방추체는 저온에 민감하여 난자가 저온에 노출되면 방추체의 미세관중 주요 구조 단백질인 tubulin의 해중합(depolymerization)과 방추체의 분열이 발생된다(Stacheki 등, 2004; Sun 등, 2004; Wang 등, 2001; Almeida과 Bolton, 1995; Aman 과 Parks, 1994; Pickering 등, 1990; Pickering과 Johnson, 1987; Magistrini 등, 1980). 정상적인 수정과 수정란의 발육에 있어 이와 같은 방추체의 분열과 염색체의 분산 등은 염색체 이상의 원인될 수 있으며, 수정율과 수정란 발육을 감소시킬 수 있다(Azambuja와 Szollosi, 1998; Yin 등, 1998; Tarin 등, 1996; Aman과 Parks, 1994).

대부분 포유동물의 난자는 위에서 언급된 바와 같이 냉각에 매우 민감하나 생쥐의 난자는 냉각 후 재가온하면 방추체가 정상으로 회복 가능한 것으로 증명되었다(Chen 등, 2004; Aman과 Parks, 1994). 난자의 냉각에 대한 민감성 여부에 대한 대부분의 연구는 냉각온도와 시간에 따른 난자의 방추체의 변화상을 관찰하는데 제한되어 있다(Sun 등, 2004; Songsasen 등, 2002; Anam과 Parks, 1994). 그러나 난자가 저온에 노출된 후 난자의 방추체와 염색체의 회복이 가능한 적정 배양시간에 대한 연구도 절실히 필요하므로 냉각 후 난자의 방추체와 염색체가 최상으로 회복이 가능한 배양 시간을 알아보고자 본 실험을 실시하였다. 본 실험에서는 1934년 Milanov에서 처음으로 사용되었던 temperature shock 현상에 근거하여 난자를 0°C까지 급속하게 냉각한 후 배양시간에 따른 난자의 회복을 관찰하고자 하였다(Martino 등, 1996).

1. 실험동물의 준비

본 실험에 생후 4~6주령의 암컷 B6C3F1 생쥐를 사용하였으며 생쥐의 과배란 처리를 위해 오전 8시 30분에 Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG; Sigma) 0.1 ml(50 iu/ml)를 복강 주사하고 48시간 후에 Human Chorionic Gonadotropin (HCG; Sigma) 0.1 ml(50 iu/ml)를 복강 주사하였다.

2. 난자의 준비

HCG 호르몬 주사 12시간 후 경추 탈구법으로 생쥐를 희생시킨 후 피부를 제거하고 생쥐의 난소와 자궁을 적출하여 생식기를 M2 배지가 포함된 0.5 ml tube에 옮겨 보관하였다. 생쥐의 생식기를 depression slide위에 놓고 실체현미경하에서 난소와 자궁 주위의 지방조직을 절제하였다. 가는 forceps을 이용하여 난관 팽대부의 한쪽부분을 찢고 난구세포로 둘러싸인 난자(cumulus cell-oocytes complex)를 채취하였다. Cumulus cell-oocytes complex를 0.2 ml hyaluronidase(1.5 mg/ml)가 포함된 M2(2 ml) 배지에 옮겨 pipette를 이용하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자를 M2 배지로 3회 세척하였다.

3. 난자의 냉각

채취된 난자중 metaphase II 상태의 난자만을 본 실험에 사용하였으며 다음과 같이 구분하여 처리하였다. 대조군은 난자를 냉각처리하지 않았으며 실험군은 난자를 0°C에서 30분간 냉각한 후 37°C에서 가온하여 즉시 일부 난자는 면역형광 염색을 실시하고 나머지 난자는 5% CO₂, 37°C가 유지된 배양기내에서 M16배지에 각각 5분, 15분, 30분, 60분, 120분간 배양한 후 면역형광 염색을 실시하였다.

실체현미경하에서 난자를 M2 배지가 담긴 0.25 ml straw에 옮겨서 straw의 끝부분을 열처리하여 봉입하였다. 난자가 담긴 straw를 미리 0°C로 냉각되어진 ethanol이 담긴 controlled-rate freezer(Bio-cool IV, FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA)에 침적 후 30분간 냉각하였다. 냉각 후 37°C water bath에서 straw를 가온하여 5% CO₂, 37°C가 유지

된 배양기내에서 난자를 M16 배지에 배양하였다.

4. 면역형광 염색

난자의 면역형광염색은 Zenes 등의 방법(2001)에 준하여 실시하였다. 난자를 2.0% formaldehyde, 0.5% triton X-100, 1uM taxol로 이루어진 microtubule stabilizing buffer로 20분동안 고정하였다. 고정된 난자를 blocking solution으로 3회 세척하였다. Blocking solution(BS)을 2% bovine serum albumin, 2% carnation powered skim milk (Nestle USA, Glendale, CA, USA), 2% goat serum, 0.1 M glycine, 0.01% Triton X-100가 첨가된 phosphate-buffered solution(PBS)으로 조성하여 사용하였다.

난자를 37°C가 유지된 배양기에서 monoclonal mouse antibody α -tubulin(Clone DM-1A; ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, U.S.A.)에 1시간동안 배양하였다. 난자를 BS로 세척한 후 실온에서 fluorescein-conjugated goat-anti-mouse Ig(IgG; ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA)에 1시간동안 배양하였다.

난자를 PBS-sodium azide solution으로 세척하고 propidium iodide(0.1 mg/ml)로 염색하였다. 염색된 난자를 PBS로 세척한 후 100 mg/ml triethylenediamine과 90% glycerol이 첨가된 PBS위에 난자를 옮겨 cover slip를 덮고 형광 현미경(Nikon Corporation, Tokyo, Japan)의 200 배율에서 난자의 방추체와 염색체를 관찰하였다.

5. 현미경적 평가

난자의 분석은 Zenes 등의 방법(2001)에 준하였다. 즉, (1) 방추체(spindle)위의 염색체(chromosomes)의 배열, (2) 형광 염색된 미세관(microtubules)의 양, (3) 방추체의 형태(bipolar spindle의 유무)을 관찰하였다. 염색체의 배열은 정상(normal), 비정상(abnormal), 변성(degenerated)으로 구분하였다.

형광염색된 미세관의 양을 측정하기 위해 난자를 nil(0), weak(1), moderate(2), strong(3)로 구분하였다. 각 실험군마다 형광염색된 미세관의 양을 측정하는데 정확성을 높이기 위해 Zenes(2001)등의 방법에 의한 다음 식에 따라 FIS(fluorescence in-

tensity index)을 산출하여 평가하였다.

$$FIS = \frac{[(\text{number of oocytes}) \times (\text{fluorescent intensity})]}{\text{the total number of oocytes in each group}}$$

형광 UV light 와 excitation filter(450~490 nm)가 갖추어진 도립현미경에 부착된 디지털 카메라(Coolpix 950; Nikon, Lewisville, TX, USA)를 이용하여 200 배율에서 난자의 사진을 촬영하였다.

6. 통계처리

본 연구에 의해 얻어진 실험결과의 통계처리는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 분석하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

냉각처리하지 않은 생쥐의 난자를 면역형광 법으로 염색하여 방추체와 염색체를 관찰한 결과 마우스 metaphase II상태의 난자는 대칭성이며 원통모양의 방추체 상을 보였으며 염색체는 metaphase plate위에 분리된 다발모양으로 밀집되어 보였다(Fig. 1 A와 B). 냉각 직후 미세관의 소실 등에 의한 방추체 형태의 이상과 형광성의 소실이 나타났으며 염색체는 다발모양의 밀집된 형상에서 벗어난 형태를 보였다(Fig. 1 C와 D).

본 실험에서 관찰된 바와 같이 생쥐 난자는 저온에 노출되었을 때 방추체가 분열되고 염색체 배열의 이상이 나타난다(Pickering과 Johnson, 1987; Magistrini와 Szollosi, 1980). 증별로 냉각에 대한 민감성 정도의 차이는 있으나 소의 난자의 경우도 냉각된 후 감수분열의 방추체의 염색 정도가 감소되어 미세관의 감소나 완전한 상실이 유발되었음을 시사했다(Aman과 Parks, 1994). 가온과 배양 후에 관찰되는 방추체의 비정상적인 형태중 하나는 방추체의 다극성(multipolar spindle)의 형성이다. 이는 두 개 이상의 미세관 구조 중심(microtubule-organizing centers)과 관련이 있으며 이에 따른 염색체의 분열과도 연관이 있다(Aman과 Parks, 1994). 염색체의 분열은 증기의 적도면 위에 위치하던 염

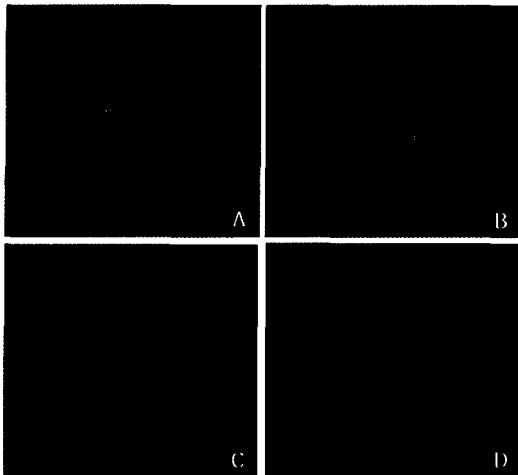


Fig. 1. Fluorescent micrographs of mouse oocytes: (A) normal spindle morphology: a barrel-shaped spindle of control oocyte. (B) normal chromosome morphology: chromosomes of control oocyte aligned regularly in a compact group. (C) abnormal spindle morphology: nonuniform fluorescent intensity of spindle displayed on a oocyte fixed immediately after cooling. (D) abnormal chromosome morphology: chromosomes aligned irregularly after cooling.

색체의 배열의 이상을 뜻한다. 이와 같은 염색체의 이상은 후에 발육되는 수정란의 염색체의 이상을 유발한다(Aman과 Parks, 1994).

본 실험결과 냉각 처리된 생쥐의 난자를 37°C에서 가온하고 배양하였을 때 미세관의 재증합(re-polymerization)이 일어나 미세관의 형광성을 회복하기 시작하였고 방추체는 정상적인 형태로 회복되었다(Fig. 2 C). 이와 같은 방추체의 회복에 의해 염색체도 본래의 정상적인 형태로 변화되었다(Fig. 2 D). 방추체의 재증합은 microtubule organizing centers, 유리 tubulin의 양, 염색체의 존재, 이에 연관된 kinetochores에 따라 달라진다(Aman과 Parks, 1994). Sathananthan 등(1992)은 냉각과 가온이 생쥐 난자의 감수분열의 방추체에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 난자를 냉각 및 가온한 후 전자현미경을 이용하여 난자의 방추체를 관찰하였다. 그 결과 0°C와 -7°C에서 방추체의 미세관이 소실되고 4°C에서 미세관의 부분적이거나 완전한 해증합이 일어났으며 염색체는 저온에서 회전되거나 응축되는

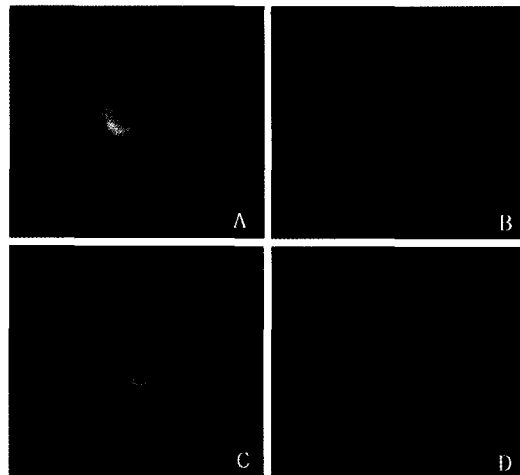


Fig. 2. Fluorescent micrographs of oocytes incubated and fixed after cooling, warming and incubation: (A) abnormal spindle morphology: non-uniform fluorescent intensity of spindle displayed after 30 minute incubation. (B) abnormal chromosome morphology: chromosomes separated into two clumps after 15 minute incubation. (C) restoration of a normal barrel-shaped spindle after 15 minute incubation. (D) restoration of a normal chromosome alignment after 60 minute incubation.

경향을 보였다. 본 실험결과에서도 Fig. 2 B와 같이 염색체가 두개의 응축된 형태로 관찰되었다.

생쥐의 난자를 냉각처리 후 가온하여 배양시간에 따라 방추체 미세관의 형광성(FIS)를 비교하였다. 대조군 난자의 FIS는 평균 2.5로 나타났고 0°C에서 30분간 냉각한 직후 난자의 FIS는 0으로 미세관의 형광성을 상실하였다(Fig. 1 C). 난자를 냉각한 후 가온하여 시간별로 배양하였을 때 배양 60분까지 점진적으로 FIS는 증가하다가 120분 배양에서는 다시 감소하였다(Table 1). 대조군에 비해 냉각 직후와 냉각·가온 후 15분간 배양하였을 때까지는 유의적인 차이로 FIS가 감소하였다($P < 0.05$). 15분 이상 배양하였을 때 대조군에 비해 FIS가 다소 감소하여 유의성이 인정되었으나($P < 0.05$), 15분에서 120분간 배양시간에 따른 유의적인 차이는 없었다.

난자를 냉각처리한 후 가온하여 배양시간에 따른 염색체의 배열을 관찰하였을 때 냉각처리를 하

지 않은 대조군은 90% 이상이 정상적인 형태를 보였으며(Fig. 1 B), 냉각직후와 냉각·가온 후 배양한 난자중 정상 염색체 배열을 보인 난자의 비율은 대조군에 비해 낮게 나타났다. 그러나 배양시간이 증가할수록 정상 염색체의 배열을 보인 난자의 회복율이 증가하였다($P<0.05$).

난자를 냉각처리한 후 가온하여 배양시간에 따른 방추체의 형태를 관찰하였을 때 대조군의 88% 이상이 정상적인 방추체의 형태를 보였으며 냉각직후와 냉각·가온 후 배양한 난자중 정상 방추체의 형태를 가진 난자의 비율은 대조군에 비해 낮게 나타났다($P<0.05$). 위의 세 가지 평가를 기준하여 냉각 후 난자의 회복율을 관찰하였을 때 배양 60분에서 최상의 성적을 나타냈다.

냉각이 난자에 미치는 영향에 대한 대부분의 연구는 냉각온도의 차이와 냉각시간의 차이에 따른 난자의 회복율을 관찰하여 본 실험의 결과와 직접적인 비교가 어려우나 사람 난자의 경우는 냉각한 후 거의 25% 정도의 난자만이 1시간 또는 4시간 배양 후 방추체가 회복되었다고 보고되었다(Pickering 등, 1990). 동결 용해한 난자와 비교하여 완전한 방추체의 회복을 나타낸 시기를 보면 생쥐 난자는 완만 동결과 용해 후 1시간이었으며 사람 난자의 경우도 완만 동결과 용해 후 1시간 배양하였을 때 60%의 난자가 정상적인 방추체 형태를 나타냈다

(Eroglu, 1998; Gook, 1993).

본 실험에서 생쥐 난자의 냉각 후 배양시간에 따른 FIS, 방추체의 형태, 염색체의 배열 등을 평가함으로써 난자의 회복율을 확인하였으나 실질적으로 냉각이 난자에 미치는 영향을 확인하기 위해서는 체외수정과 수정란 이식을 실시하여 수정란의 발달을 관찰하는 것이 더 명확한 결과를 보여 줄 것으로 생각된다.

적 요

동결 과정중 필수적인 단계중 하나인 냉각(cooling)과 냉각 후 배양시간이 생쥐 난자의 방추체의 형태와 염색체의 배열에 미치는 영향을 알아봄으로서 냉각 후 손상되었던 난자의 방추체와 염색체가 정상적으로 회복하는데 필요한 최적의 배양시간을 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다.

생후 4~6주령의 암컷 B6C3F1 생쥐를 과배란 처리하여 metaphase II 상태의 난자를 회수하여 다음과 같이 처리하였다. 대조군은 난자를 냉각처리하지 않았으며 실험군은 난자를 0℃에서 30분간 냉각한 후 37℃에서 가온하여 즉시 일부 난자는 면역형광 염색을 실시하고 나머지 난자는 5% CO₂, 37℃가 유지된 배양기내에서 M16 배지에 각각 5분, 15분, 30분, 60분, 120분간 배양한 후 면역

Table 1. Effect of chilling on fluorescent intensity index(FIS), chromosome alignment, and organization of meiotic spindles in mouse oocytes

| Incubation time (minutes) | Oocytes (n) | FIS | Chromosome aligned (%) | Bipolar spindles (%) |
|---------------------------|-------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| Control (Unchilled) | 45 | 2.5 ^a | 91.1 ^a | 88.1 ^a |
| 0 | 44 | 0.0 ^b | 8.9 ^b | 2.3 ^b |
| 5 | 38 | 0.9 ^{b,c} | 4.2 ^b | 28.0 ^b |
| 15 | 46 | 1.5 ^{a,c} | 16.1 ^b | 59.7 ^{a,c} |
| 30 | 46 | 1.7 ^{a,c} | 36.2 ^b | 64.7 ^{a,c} |
| 60 | 47 | 1.8 ^{a,c} | 58.1 ^{a,c} | 67.0 ^{a,c} |
| 120 | 35 | 1.6 ^{a,c} | 53.0 ^{b,c} | 57.3 ^{a,c} |

FIS: fluorescence intensity index, Chromosome aligned(%): the percentage of normal chromosome alignment, Bipolar spindle: the percentage of normal spindle configuration.

^{a,b,c} Different letters within the same column indicate significant differences($P<0.05$).

형광염색을 실시하였다. 난자의 방추체와 염색체를 평가하기 위한 면역형광염색은 Zenes 등의 방법(2001)에 준하여 실시하였다.

냉각처리하지 않은 생쥐 난자를 면역형광 염색하여 방추체와 염색체를 관찰한 결과 생쥐 meta-phase II 상태의 난자는 대칭성의 원통모양의 방추체 형태를 보였으며 염색체는 metaphase plate위에 분리된 다발모양으로 밀집되어 보였다. 냉각 직후 미세관의 소실에 의한 방추체 형태의 이상과 형광성의 소실이 나타났으며 염색체는 다발모양의 밀집된 형상에서 벗어나 비정상적인 배열상을 보였다. 냉각 처리된 난자를 37℃에서 가온하고 배양하였을 때 미세관의 재중합이 일어나 미세관의 형광성을 회복하기 시작하였고 방추체는 정상적인 배열상으로 회복되었다.

생쥐 난자를 냉각처리한 후 배양시간에 따른 방추체 미세관의 형광성(FIS), 염색체의 배열, 방추체의 형태를 비교하였다. 배양 5분에서 60분까지 FIS, 정상 염색체 배열을 보인 난자의 비율, 정상 방추체의 형태를 보인 난자의 비율이 점진적으로 증가하였으나 120분 배양에서는 감소하였다($P < 0.05$). 위의 세 가지 평가를 기준으로 하여 냉각 후 난자의 회복율을 관찰하였을 때 배양 60분에서 최상의 회복율을 나타냈다.

감사의 글

본 연구에 도움을 주신 미국, Conservation Research Center의 Dr. Nucharin Songsasen과 전북대학교 수의과대학 김용준 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- Almeida PA and Bolton VN. 1995. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote*, 3:357-365.
- Aman RR and Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:103-110.
- Azambuja RM, Kraemer DC and Westhusin ME. 1998. Effects of low temperatures on *in-vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 49: 1155-1164.
- Chen SU, Lien YL, 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.
- Chen SU, Lien YR, Lien KH, Chao HN, Ho YS, Yang YS and Lee TY. 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing-a review article. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 202:101-107.
- Chen CK, Wang CW, Tsai WJ, Hsieh LL, Wang HS and Soong YK. 2004. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertil. Steril.*, 82:666-672.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J and Englert Y. 1999. The outcome of cryopreserved human embryos after intracytoplasmic sperm injection and traditional IVF. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 16:405-409.
- Eroglu A, Toth TL and Toner M. 1998. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil. Steril.*, 69:944-957.
- Gook DA, Osborn SM and Johnston WIH. 1993. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration and the meiotic spindle. *Hum. Reprod.*, 8:1101-1109.
- Magistrini M and Szollosi D. 1980. Effects of cold and isoprophyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur. J. Cell. Biol.*, 22:699-707.
- Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO and

- Salat-Baroux J. 1998. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum. Reprod. Suppl.*, 3:161-174.
- Martino A, Pollard JW and Leibo SP. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Biol. Reprod.*, 45:503-512.
- Mazur P. 1990. Equilibration, quasi-equilibration, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell. Biophys.*, 17:53-92.
- Parks JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Parks 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. *Fertil. Steril.*, 75:1171-1184.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil. Steril.*, 54:102-108.
- Pickering SJ and Johnson MH. 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 2: 207-216.
- Sathananthan AH, Kirby C, Trouson A, Philipatos D and Shaw J. 1992. The effects of cooling mouse oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 9: 139-148.
- Songsasen N, Yu JJ, Ratterree MS, Vandevort CA and Leibo. 2002. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. *Fertil. Steril.*, 77:818-825.
- Stachecki JJ, Munne S and Cohen J. 2004. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 8:664-672.
- Sun XF, Zhang WH, Chen XJ, Xiao GH, Mai WY and Wang WH. 2004. Spindle dynamics in living mouse oocytes during meiotic maturation, ageing, cooling and overheating: a study by polarized light microscopy. *Zygote*, 12:241-249.
- Tarin JJ, Vendrell FJ, Ten J, Blanes R, van Blerkom J and Cano A. 1996. The oxidizing agent tertiary butyl hydroperoxide induces disturbances in spindle organization, c-meiosis, and aneuploidy in mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 2:895-901.
- Van Blerkom J and Davis PW. 1994. Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc. Res. Tech.*, 27: 165-193.
- Van der Elst J. 2003. Oocyte freezing: here to stay? *Human. Reprod. Update.*, 9:463-470.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R and Keege DL. 2001. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum. Reprod.*, 16:2374-2378.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y and Critser JK. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48:146-156.
- Yin H, Baart E, Betzendahl I and Eichenlaub-Ritter U. 1998. Diazepam induces meiotic delay, aneuploidy and predivision of homologous and chromatids in mammalian oocytes. *Mutagenesis*, 13:567-580.
- Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF and Leibo SP. 2001. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.*, 75:769-777.
- Zhou J, Shu HB and Joshi HC. 2002. Regulation of tubulin synthesis and cell cycle progression in mammalian cells by gamma-tubulin-mediated microtubule nucleation. *J. Cell. Biochem.*, 84: 472-483.

(접수일: 2004. 10. 15 / 채택일: 2004. 12. 8)