

생쥐 난자의 유리화 동결과 전핵기 배아의 동결 조건이 배아의 발달에 미치는 영향

김지철^{1,2}, 박성백¹, 남윤성², 서병부¹, 김재명^{3,*}, 송해범¹
¹대구대학교 동물자원학과, ²ROSA 불임클리닉, ³대구여성차병원

The Effect of Cryopreservation Condition on Developmental Rate of Pronuclear Stage Embryos and Vitrification of Mouse Oocytes

Ji Chul Kim^{1,2}, Sung Baek Park¹, Yoon Sung Nam², Byoung Boo Seo¹, Jae Myeoung Kim^{3,*} and Hai Bum Song¹

¹Department of Animal Resources, Daegu University, Daegu 712-714, Korea

²ROSA Infertility Clinic, Daegu 701-845, Korea

³Medical Center of CHA General Hospital, Daegu 705-809, Korea

ABSTRACT

The present study was performed to investigate the survival and subsequent embryonic developmental rate of immature and mature oocytes after vitrification and pronuclear stage embryos after slow-freezing and vitrification. We have also tried to examine the dependency of concentrations (7.5, 15%) and exposure time (5, 10, 20 min) of ED cryoprotectant on developmental rate of pronuclear stage embryos. The developmental rates of 2-cell and blastocyst embryos at mature oocytes were significantly ($p<0.05$) higher than immature oocytes. After slow freezing, vitrification and thawing of pronuclear stage embryo, the survival and developmental rates of blastocysts and hatched blastocysts were significantly ($p<0.05$) higher after vitrification than after slow-freezing. On contrary, the developmental rates of 2-cell embryos were significantly ($p<0.05$) higher after slow freezing than after vitrification. The cryopreservation methods of pronuclear stage embryos vitrified by exposed to 7.5% ED solution for 5 minutes was significantly ($p<0.05$) higher than other experimental group. The results of our study suggest that the developmental rates of mature oocytes have been more successful than immature oocytes during vitrification. Vitrification was more efficient than slow freezing in case of pronuclear stage embryos. The effective cryopreservation method of pronuclear stage embryos was vitrified by exposed to 7.5% ED solution for 5 minutes.

(Key words : slow-freezing, vitrification, cryoprotectant, oocyte, pronuclear stage embryo)

서 론

동결 보존은 세포와 조직과 같은 재료를 형태와 기능적인 변화가 없이 동결시켜 장기간 보관하고, 필요할 때에 원래의 기능을 가지고 회복하는 것으로, 생식생물학에서는 생식세포인 정자, 난자와 배아를 동결 보존하는 방법이다. 그러나 인간을 포함한 동물에서 난자와 배아는 그 수가 한정적으로 적고 발생학적 중요성 때문에, 그 어떤 세포보다도 동결 보존의 필요성이 매우 강조되고 있다.

난자의 동결 방법의 기초는 1970년대 생쥐와 햄스터에서 난자 동결 보존이 성공되면서 시작되었으며, 여러 종에서 산자도 생산되고 인간에서도 난자 동결 보존 후 동결 난자를 이용하여 임신이 되었다는 연구가 계속 보고되었지만 성공률은 저조하다. 이 후 동결 보존 방법은 조금씩 발전을 거듭해 왔으나, 아직까지 난자의 동결은 배아 동결에 비하여 낮은 성적

을 나타내고 있다(Tsunoda 등, 1976; Chen, 1986; Fahning과 Garcia, 1992; Hochi 등, 1997). 난자 동결의 성공에도 불구하고 배아 동결보다 어려운 것은 동결 과정에서 난자 내 과립체의 조기 방출에 의한 투명대경화, 조기 난 활성화 현상, 세포 내 소골격계의 손상, 염색체 감수 분열 기구의 손상 등 여러 요인에 의해 낮은 난자의 생존율과 배아 발달율을 나타내고 있다(Van 등, 1988; Al-Hasani 등, 1989; Molle와 Wassarman, 1989; Vincent 등, 1990; Bos-Mikich 등, 1995). 이후 연구에서 유리화 동결법이 발달되어 동결-용해된 소 난자를 체외 배양한 후 포배기 배아의 발달율은 Martino 등(1996)은 15%, Vajta 등(1998)은 25%, Papis 등(1999)은 30%로 동결되지 않은 대조구에 근접하기 시작하였고, 이를 이식하여 산자도 생산되었다. 난자와 배아의 동결 방법에서 완만 동결과 유리화 동결은 세포의 발달 단계, 동결 보호제의 종류와 노출 시간에 의해서 서로 다른 결과를 나타내며(Cohen 등, 1988), 동물 종에 따라서 약간의 차이는

* Correspondence : E-mail : dangi2359@hanmail.net

있지만 비교적 유리화 동결에서 배아의 생존율이 높게 나타났다(Leibo와 Oda, 1993).

배아의 동결 보존에는 여러 가지 동결 보호제를 이용하는데, 동결 보호제는 세포의 동결 보존 및 융해 시 세포의 생존을 위하여 필수적인 것으로 세포 밖의 동결 보호제의 삼투압을 증가시켜 세포 내의 수분이 밖으로 빠져나오게 하며, 세포막과의 상호작용에 의해 세포를 보호하고, 탈수된 세포 내로 침투해서 삼투압 평형 상태를 이루어 세포를 정상적으로 회복시키는 작용을 한다. 그러나 동결 보호제가 이러한 장점 외에 융해 후 독성 작용을 나타낼 수도 있으므로 배아의 발달 단계에 따라 적절한 동결 보호제의 선택이 중요하다(Saha 등, 1996). Ethylene glycol(EG)은 탈수 효과가 크고 낮은 독성으로 인해 상실배와 포배기 배아의 동결 보존에 널리 이용되고 있으며, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 생쥐의 전핵기에서 초기 배아가 지는 독성 작용을 보이지 않는 반면, 후기 배아에서는 독성 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Bautista 등, 1998).

이에 본 연구는 생쥐 난자와 배아의 효과적인 동결 보존 방법을 확립하기 위해 생쥐 미성숙 난자와 성숙 난자의 유리화 동결에 따른 배아의 생존율과 발달율을 조사하고, 생쥐 전핵기 배아를 완만 동결과 유리화 동결하여 배아의 발달율을 비교하고, 동결 보호제인 EG와 DMSO의 농도와 노출 시간에 따른 배아의 발달율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물의 준비

생쥐 제 1세대 잡종 B6CBAF1(C57BL/CBA)의 5주령 암컷과 10~12주령의 생식 능력이 확인된 동종의 수컷 생쥐를 명 10시간과 암 14시간으로 광주기를 조절하고, 40~60%의 습도와 22~25°C의 온도를 유지하며, 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육하였다. 생쥐 미성숙 난자는 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma, USA) 5 IU를 주사하고, 46~48시간이 경과한 후 경추탈골(cervical dislocation)로 도살하고 난소를 적출하여 난소당 10개 내외의 큰 난포를 26 gauge (G) 주사침으로 침자하여 나온 난자 중 세포질과 핵이 건강한 미성숙 난자를 10% fetal calf serum(FCS, ICN Flow, UK)과 0.25 mM dbcAMP가 첨가된 M2 배양액에서 3회 세척한 후 성숙 배양 및 동결에 이용하였다. 성숙 난자는 PMSG를 주사하고, 48시간 후에 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma, USA) 5 IU를 주사한 후 12~14시간 경과한 후에 회수하였다. 회수된 난자는 10% FCS와 0.25 mM dbcAMP가 첨가된 M2 배양액에서 3회 세척한 후, 67 IU/ml 농도의 hyaluronidase(Sigma, USA)가 첨가된 M2 배양액에서 난구세포를 제거하였다. 전핵기 배아의 채취는 5 IU의 PMSG와 hCG를 각각 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도하고, hCG 주사 후 수컷과 합사시켜

자연 교미를 유도하였다. 회수된 전핵기 배아는 배아 발달 배양액인 G1(Vitrolife, Sweden) 배양액에 3회 세척 후 배양하였으며, 배양 후 48시간째에 G2(Vitrolife, Sweden) 배양액으로 교체하여 배양하였다. 난자와 배아는 10 μl당 5개씩 배아를 mineral oil(Sage, USA)을 덮은 배양 접시에서 배양하는 drop culture를 실시하였다.

2. 체외수정 및 배양

난소에서 회수한 미성숙 난자는 16시간 후에 현미경하에서 난자의 세포질 주위에 제1극체가 선명한 성숙 난자만을 선발하였다. 체외수정은 3~4개월령된 수컷 생쥐의 고환을 적출하여 부정소관에서 채취한 정자는 T6 배양액 drop에서 1시간 30분간 배양하여 수정능을 획득시킨 후, 1×10⁶ cells/ml 농도의 정자와 성숙 난자를 4 mg/ml의 BSA를 첨가한 T6 배양액에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다. 수정 5시간 후 수정이 유도된 난자는 4 mg/ml의 BSA가 첨가된 M2 배양액에서 3회 세척한 후, 4 mg/ml의 BSA와 0.3 mM EDTA가 첨가된 M16 배양액에서 배양하였다. 그리고 20~22시간 후에 수정이 확인된 배아만을 G1 배양액에 배양하였으며, 배양 후 48시간째에 G2 배양액으로 교체하여 배양하였다.

3. 완만동결과 융해

동결액은 20% serum substitute supplement(SSS, Irvine Scientific, USA)를 첨가한 PBS 기본 용액에 1.5 M PROH(1,2-propanediol, Sigma, USA), 1.5 M PROH+0.1 M sucrose(Sigma, USA)이며, 융해액은 기본 용액에 1.0, 0.5 M PROH와 0.2, 0.1 M sucrose를 각각 첨가하여 제조하였다. 동결액에 10분 노출하여 동결한 배아는 1.5 M PROH+0.1 M sucrose 용액에서 10분간 노출시켜 탈수를 유도한 후 0.25 ml plastic straw(IVM International, France)에 15개의 배아를 loading하여 자동 세포 동결기(Kryo 10-III Programmable freezer, Planer Biomed, UK)에 넣어 동결을 실시하였다. 2주 이상 액체질소에 보관되어 있던 배아는 PROH의 농도에 따라 5단계로 제거하였으며, 융해과정은 Table 1과 같다. 융해가 완료된 배아는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 16~18시간 평형시킨 G1 배양액에서 세척한 후 배양하였다.

Table 1. Thawing procedure in slow freezing media

Step No.	PROH (M)	Sucrose (M)	Duration time (min)
1	1.0	0.2	5
2	0.5	0.2	5
3	0	0.2	5
4	0	0.1	5
5	0	0	5

4. 유리화 동결과 융해

동결액은 기본 용액에 7.5% EG(Sigma, USA)+7.5% DMSO (Sigma, USA)와 15.0% EG+15.0% DMSO+0.5 M sucrose이며, 융해액은 기본 용액에 0.5 M sucrose와 1.0 M sucrose를 각각 첨가하여 이용하였다. 배아는 7.5% EG+7.5% DMSO이 첨가된 용액에 옮겨서 10분간 전처리하였고, 15.0% EG+15.0% DMSO+0.5 M sucrose에 옮긴 후 바로 cryo-loop(Hampton research, USA)에 적재하고 가능한 빨리 액체질소에 침지하였으며, 30초가 넘지 않도록 신속히 수행하였다. 2주 이상 액체질소에 보관되어 있던 배아는 꺼낸 뒤 바로 37℃, 1.0 M sucrose 용액에 1분간 옮기고, 실온에서 0.5 M sucrose 용액에 3분간 침지하고, 기본 용액에 5분간, 37℃의 기본 용액에 5분간 침지한 후에 융해가 완료된 배아는 완만 동결과 같은 방법으로 배양하였다.

5. 통계처리

실험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 SPSS program을 이용한 chi-square test에 의해 분석하였고, $p < 0.05$ 일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 유리화 동결이 생쥐 미성숙 난자와 성숙 난자의 생존과 배아의 발달에 미치는 영향

생쥐 난자의 유리화 동결처리 유무에 따른 난자의 생존율과 배아의 발달율 및 부화율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 생쥐 난자의 유리화 동결에 따른 난자의 생존율은 대조구 100.0%보다 미성숙 난자 처리구 82.6%와 성숙 난자 처리구 91.1%에서 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 미성숙 난자 처리구보다 성숙 난자 처리구가 높았지만, 두 처리구간의 유의차는 없었다. 미성숙 난자의 성숙율은 대조구 77.5%가 처리구 54.3%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 2-세포기 배아의 발달율은 미성숙 난자의 대조구, 처리구와 성숙 난자의 처리구는 각각 52.5%, 10.9%와 60.0%가 성숙 난자의 대조구 81.4%보다 유의하게

낮았으며($p < 0.05$), 미성숙 난자의 대조구와 성숙 난자의 처리구가 미성숙 난자의 처리구보다도 유의하게 높았다($p < 0.05$). 포배기 배아의 발달율은 성숙 난자의 대조구 53.5%가 성숙 처리구 11.1%, 미성숙 난자의 대조구 7.5%와 처리구 0.0%보다 유의하게 높았고($p < 0.05$), 미성숙 난자 처리구와 성숙 난자 처리구간에도 유의적인 차이가 있었으며($p < 0.05$), 미성숙 난자의 처리구는 포배기 배아의 발달이 진행되지 않았다. 배아의 부화율은 성숙 난자의 대조구 39.5%가 미성숙 난자의 대조구 7.5%와 성숙 난자의 처리구 6.7%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

2. 생쥐 전핵기 배아의 완만 동결과 유리화 동결이 배아의 생존과 발달에 미치는 영향

동결방법에 따른 생쥐 전핵기 배아의 생존율과 발달율 및 부화율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 생쥐 전핵기 배아의 생존율은 대조구와 유리화 동결구에서 100.0%와 96.1%로 완만 동결구의 87.2%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 2-세포기 배아의 발달율은 대조구 97.4%와 완만 동결구 83.3%가 유리화 동결구 75.0%보다 유의하게 높았으며($p < 0.05$), 포배기 배아의 발달율은 대조구 79.5%, 유리화 동결구 64.5%, 완만 동결구 30.8%에서 각각 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 배아의 부화율은 대조구가 56.4%로 가장 높게 나타났으며, 유리화 동결구 43.4%가 완만 동결구 20.5%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

3. 동결 보호제의 서로 다른 농도와 노출 시간이 전핵기 배아의 발달에 미치는 영향

생쥐 전핵기 배아를 ED 용액에 노출한 후 발달율과 부화율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 2-세포기 배아의 발달율은 대조구와 처리구에서 거의 모두 2-세포기 배아로 발달하였으며, 포배기 배아의 발달율은 대조구가 79.5%로 가장 높았으며, 7.5% ED의 5, 10, 20분 처리구와 15% ED의 5분 처리구는 각각 56.5%, 63.6%, 52.8%와 50.0%로 7.5% ED의 10분 처

Table 2. Survival and subsequent embryonic developmental rate of GV and MII stage of oocytes after vitrification

Vitrification	No. of oocytes	No. of oocytes survived (%)	No. of MII (%)	No. (%) of embryo developed to		
				≥2 cell	BL	Hatched BL
NT-GV	40	40 (100.0) ^a	31 (77.5) ^a	21 (52.5) ^b	3 (7.5) ^{bc}	3 (7.5) ^b
T-GV	46	38 (82.6) ^b	25 (54.3) ^b	5 (10.9) ^c	0 (0.0) ^c	0 (0.0) ^b
NT-MII	43	43 (100.0) ^a	-	35 (81.4) ^a	23 (53.5) ^a	17 (39.5) ^a
T-MII	45	41 (91.1) ^b	-	27 (60.0) ^b	5 (11.1) ^b	3 (6.7) ^b

^{a-c} With the same columns, values with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

Vitrification, using cryo-loop; MII, Metaphase II; BL, Blastocyst; NT, Not treated; GV, Germinal vesicle; T, Treated.

Table 3. Survival and subsequent embryonic developmental rate of pronuclear embryos after slow freezing and vitrification

Group	No. of zygotes	No. of zygotes survived (%)	No. (%) of embryo developed to		
			≥2 cell	BL	Hatched BL
Control	78	78 (100.0) ^a	76 (97.4) ^a	62 (79.5) ^a	44 (56.4) ^a
Vitrification	76	73 (96.1) ^a	57 (75.0) ^b	49 (64.5) ^b	33 (43.4) ^a
Slow freezing	78	68 (87.2) ^b	65 (83.3) ^a	24 (30.8) ^c	16 (20.5) ^b

^{a-c} With the same columns, values with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

BL, Blastocyst; Control, at 30hr post hCG; Vitrification, using cryo-loop.

Table 4. Survival and subsequent embryonic developmental rate of pronuclear embryos according to cryoprotectant exposure time and concentration

Group	Exposure time (min)	No. of zygotes	No. (%) of embryo developed to		
			≥2 cell	BL	Hatched BL
Control	0	44	43 (97.7)	35 (79.5) ^a	25 (56.8) ^a
	5	46	46 (100.0)	26 (56.5) ^b	20 (43.5) ^{ab}
7.5% ED	10	44	44 (100.0)	28 (63.6) ^{ab}	13 (29.5) ^b
	20	36	36 (100.0)	19 (52.8) ^b	9 (25.0) ^b
15% ED	5	44	44 (100.0)	22 (50.0) ^b	12 (27.3) ^b
	10	44	44 (100.0)	7 (15.9) ^c	1 (2.3) ^c
	20	45	45 (100.0)	0 (0.0) ^d	0 (0.0) ^c

^{a-d} With the same columns, values with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

BL, Blastocyst; Control, at 30hr post hCG; ED, EG and DMSO.

리구가 높았으나 유의적 차이는 없었으며, 15% ED의 10분, 20분 처리구 15.9%와 0.0%는 다른 처리구보다 유의하게 낮았고($p < 0.05$), 서로 간에도 유의적인 차이도 있었다($p < 0.05$). 배아의 부화율은 대조구가 56.8%로 가장 높았으며, 7.5% ED의 5, 10, 20분 처리구와 15% ED의 5분 처리구는 각각 43.5%, 29.5%, 25.0%와 27.3%로 7.5% ED의 5분 처리구가 높았으나 유의적 차이는 없었으며, 15% ED의 10분, 20분 처리구는 2.3%와 0.0%로 다른 처리구보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

고 찰

난자의 동결은 미성숙 난자와 성숙 난자에서 연구자에 따라 서로 다른 연구 결과를 나타내며, Mandelbaum 등(1987)은 인간의 미성숙 난자와 성숙 난자를 동결-융해한 후 난자의 생존율에서 성숙 난자가 2배 정도 높게 나타났으나, 본 연구에서는 생쥐 성숙 난자가 미성숙 난자 처리구보다 높은 난자의 생존율을 보였으나 유의적인 차이는 없었으며, Hamlett 등(1989)은 성숙 난자의 동결 시 동결 보호제에 노출되고 냉각되는 동

안 방추사와 피층과립의 파괴에 따른 손상이 발생하고, 미성숙 난자에서는 비정상적인 정상체(aster)의 형성으로 방추사의 수적인 감소가 일어난다고 보고하였다. 또한 Herrler 등(1991)은 성숙 단계가 다른 소 난자의 수정율과 발달율에 동결 보호제가 미치는 영향에 관한 연구에서 성숙 단계 처리구가 대조구와 유의적인 차이는 없었지만, 미성숙 처리구는 대조구보다 배아의 발달율이 낮게 나타나는 것으로 보아 미성숙 난자는 동결 보호제의 처리에 더욱 민감한 것으로 추정된다고 보고하였다. 본 연구의 2-세포기와 포배기 배아의 발달율은 성숙 난자가 미성숙 난자 처리구보다 유의하게 높은 결과를 보였는데, 이는 미성숙 난자의 유리화 동결 시 동결 보호제에 의한 동결 손상이 포배기 배아까지 존재하는 반면, 성숙 난자는 시간이 경과됨에 따라 발생이 재개되어 부화에 이르는 것으로 생각된다. Fahning 과 Garcia(1992)는 난자의 동결에 대한 손상은 배아 동결보다는 더 높다는 것을 알 수 있다고 보고하였으며, Chen 등(2000)은 유리화 동결-융해한 후 생쥐 난자의 경우 염색체 감수분열기구의 손상은 융해 후 난자를 1시간 동안 배양하면 미세소관에서 재중합반응(repolymerization)이 일어나

회복되는 것이 관찰되었다고 보고하였으나, 본 연구의 미성숙 처리구에서는 초기 배아의 발달 이후 후기 배아의 발달은 진행되지 않았으며, 성숙 처리구는 아주 낮게 나타났다. 이러한 결과는 동결과정에서 세포내 손상이 불안정한 세포단계인 난자에서 심하게 나타난 것으로 생각된다. 그러나 이러한 결과에도 생쥐 성숙 난자와 돼지 난자를 유리화 동결 후에 산자를 생산하였다는 보고가 있었으며, 유리화 동결법으로 난자를 동결 보존하려는 많은 연구가 시도되었다(AI-Hasani 등, 1989; Fahy 등, 1987; Arav 등, 1990).

Cohen 등(1988)은 난자와 배아의 동결 방법에서 완만 동결과 유리화 동결은 세포의 발달 단계, 동결 보호제의 종류와 노출 시간에 의해서 서로 다른 결과를 나타내며, 동물 종에 따라서 약간의 차이는 있지만 비교적 유리화 동결 배아의 생존율이 높게 나타났다(Leibo와 Oda, 1993). 그리고 Park 등(2009)은 생쥐 전핵기 배아를 유리화 동결한 배아의 생존율이 완만 동결보다 높게 나왔으며, Kim과 Lee(2007)는 EG를 기본 동결액으로 이용한 유리화 동결이 완만 동결보다 배아의 생존율, 발달율과 부화율에서 유의하게 높은 성적을 나타내었다. 본 연구에서도 EG+DMSO(ED)를 기본 동결 용액으로 이용한 유리화 동결이 완만 동결과 비교하여 모든 처리구에서 유의하게 높은 배아의 발달율을 나타내었다. 그러나 Kim 등(2008)은 인간 전핵기 배아의 생존율은 유리화 동결이 유의하게 높았으나, 2-세포기 배아의 발달율은 완만 동결이 유리화 동결보다 유의하게 높은 배아의 발달율을 보였으며, 이러한 결과는 본 연구의 결과와도 일치한다. 이는 유리화 동결 과정 중 전핵기 배아가 액체 질소의 급격한 온도 변화와 동결 보호제의 농도 차이 및 평형 과정에 의한 직접적인 외부 접촉에 의해서 부정적인 영향으로 나타난 것으로 보인다. Isachenko 등(2004)은 유리화 동결 후 용해의 재수화 과정에서 sucrose의 3단계 재수화 과정보다 4단계의 재수화 과정으로 동결 보호제를 제거하는 것이 전핵기 배아의 삼투압 변화에 따른 손상을 줄이는데 효과가 있다고 하였는데, 이는 본 연구의 1.0과 0.5 M sucrose를 이용한 재수화 과정이 효과가 있었던 것으로 생각된다. 그리고 Kasai (1990)은 생쥐 배아에서 유리화 동결-용해한 후 배아의 발달율이 높게 나타났고, Park 등(2009)은 생쥐 전핵기 배아에서 유리화 동결이 완만 동결보다 포배기 배아의 발달율과 부화율에서 유의한 차이가 있다고 보고하였는데, 본 연구에서도 완만 동결보다 유리화 동결이 배아의 생존율과 후기 배아의 발달율에서 유의하게 높은 결과를 나타내었다.

Dochi 등(1998)은 소의 미성숙 난자를 1.5M polyethylene glycol(PG)와 1.5M EG에 노출하여 배아의 발달율과 포배기 배아의 형성율을 조사한 결과에서 대조구는 PG구보다 높은 배아의 분할율을 나타내었으나 유의차는 없었고, 포배기 배아의 발달율은 PG와 EG구가 대조구보다 낮았고, 동결 보호제의 노출은 배아의 발달과 포배기 배아의 발달에 나쁜 영향을 주

는 것으로 보고하여 본 연구의 결과와 일치하였다. Kuleshova 등(2001)은 난자와 배아같이 세포의 크기가 크고 수분 함량이 높은 세포의 유리화 동결을 위해서는 일반적인 체세포에 비해 고농도의 동결 보호제의 노출 시간을 줄이거나, 냉각 속도를 올리는 것이 필수적이라고 보고하였다. 본 연구에서 15% ED의 20분 처리구는 전핵기에서 2-세포기 배아로 모두 발달되었지만 포배기 배아와 부화 단계까지는 진행되지 않았는데, 이러한 결과는 동결 보호제의 높은 농도와 긴 노출 시간이 세포에 대한 독성을 높이기 때문에 전핵기나 초기 배아의 발달 지연, 정지하는 배아의 비율이 높아져서 후기 배아의 발달에 상당한 영향을 미친다는 결과와도 일치한다(Dobrinsky 등, 2000). Friedler 등(1988)은 투과율이 높고 독성이 적은 동결 보호제를 이용하거나, 침투성과 비침투성의 한 종류의 이용으로는 효과가 떨어지거나, 혼합하여 이용하면 삼투압의 변화로 인한 피해를 감소시킬 수 있으며, 상대적 농도의 변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 방법을 통해 세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결-용해 후 효율을 증진시키고 있다. 또한 침투성 동결 보호제로서 EG는 생쥐 8-세포기 배아에서 glycerol을 이용한 초기의 연구를 제외하고, 유리화 동결에 관한 많은 연구에서 이용되고 있다(Landa와 Tepla, 1990). EG 단독이나 DMSO와 혼합 이용되고, 탈수 효과가 크고 낮은 독성으로 인해 상실배와 포배기 배아의 동결 보존에 널리 이용되고 있다(Bautista 등, 1998). Kasai 등(1979)은 침투성 동결 보호제인 DMSO를 이용한 연구에서 생쥐 난자의 동결-용해 후 생존율은 60%, 체외 수정율은 47%를 보고하였다. 또한 본 연구에서 생쥐 전핵기 배아를 EG와 DMSO가 혼합된 ED 용액에 침지시켰을 때 2-세포기인 초기 배아의 발달율은 농도와 노출 시간에 영향을 받지 않았으나, 포배기 배아의 발달과 부화율은 농도가 높고, 노출 시간이 긴 처리구일수록 유의하게 낮은 성적을 나타내었다. 이러한 결과는 Takagi 등(1993)이 소 배아에서 동결 보호제의 독성은 노출 시간에 비례했다는 보고와도 일치하였다. Li 등(2006)은 돼지의 포배기 배아를 10% ED에 2분+20% ED에 25초 처리에서 포배기 배아의 재팽창 및 생존을 확인할 수 있었으며, Cong 등(2007)은 핵 치환된 돼지 배아에서 발달된 포배기 배아의 생존에 미치는 유리화 동결액의 농도에서 10% ED에 2분+20% ED에 25초 처리구 11.8%가 5% ED에 2분+10% ED에 25초 처리구 0.0%와 15% ED에 2분+30% ED에 25초 처리구 0.0%보다 유의하게 높은 확장 포배기 배아의 발달율을 나타내었다. 그러나 본 연구에서는 7.5% ED의 5분 처리구가 대조구보다 배아의 부화율이 낮게 나타났지만, 유의적인 차이는 없었다. 이것은 다른 처리구에 비하여 낮은 농도와 짧은 노출 시간이 동결 보호제의 독성에 의한 세포의 손상을 줄일 수 있으므로 가능하다면 발달단계에 맞는 동결 보호제의 농도와 노출되는 시간을 최소화하는 것이 중요하다는 것을 알 수 있다. Vajta 등(1997)이 보고한 EG+DMSO+sucrose를 혼합한 EDS 용액은 EG+

ficoll+sucrose를 혼합한 EFS용액(Kasai 등, 1990), EG+DMSO+1,3-butanediol을 혼합한 VS 용액(Valdez 등, 1992) 등과 같이 유리화 동결에서 많이 이용되고 있으며, 이런 용액을 다시 조합하여 세포 단계에 맞게 응용하고 있다. 이에 본 연구에 이용되는 유리화 동결액의 기본 조성도 EDS 용액과 관계가 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과로, 생쥐 미성숙 난자와 성숙 난자의 유리화 동결에는 성숙 난자가 더 효과적이며, 전핵기 배아는 유리화 동결이 완만 동결보다 더 높은 배아의 생존율과 발달율을 보였으며, 동결 보호제인 ED 용액은 7.5% 농도와 5분의 노출 시간이 가장 효과적인 동결용 액으로 유리화 동결에 이용될 수 있을 것이라 생각되며, 앞으로 미성숙과 성숙 난자의 동결 보존에는 동결로 인한 세포의 손상을 줄일 수 있는 연구가 더 이루어져야 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 생쥐 난자와 배아의 효과적인 동결 보존 방법을 확립하기 위해서 유리화 동결이 생쥐 미성숙 난자와 성숙 난자의 생존과 배아의 발달에 미치는 영향과 전핵기 배아의 완만 동결과 유리화 동결이 배아의 생존과 발달에 미치는 영향 및 동결 보호제인 ED 용액(EG+DMSO)의 서로 다른 농도(7.5%와 15%)와 노출 시간(5, 10, 20분)이 전핵기 배아의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 생쥐의 미성숙 난자와 성숙 난자를 유리화 동결-용해한 후 2-세포기와 포배기 배아의 발달율은 성숙 난자 처리구가 미성숙 난자 처리구보다 유의하게 높았고($p<0.05$), 완만 동결과 유리화 동결-용해한 후 전핵기 배아의 생존율, 포배기 배아의 발달율과 부화율은 유리화 동결구가 완만 동결구보다 유의하게 높았지만($p<0.05$), 2-세포기 배아의 발달율은 완만 동결구가 유의하게 높았다($p<0.05$). 7.5%와 15%의 ED용액에 5, 10, 20분간 노출한 후 포배기 배아의 발달율은 7.5% ED의 5, 10, 20분 처리구와 15% ED의 5분 처리구는 15% ED의 10분, 20분 처리구보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 이러한 결과를 종합하며 보면 생쥐 미성숙 난자와 성숙 난자의 유리화 동결에는 성숙 난자가 더 효과적이며, 전핵기 배아는 유리화 동결이 완만 동결보다 더 높은 배아의 생존율과 발달율을 보였으며, 동결 보호제인 ED 용액은 7.5% 농도와 5분의 노출 시간이 가장 효과적인 동결용액으로 유리화 동결에 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

참고문헌

- Al-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K, Blanke S, Van der Ven H and Krebs D. 1989. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in vitro* fertilized rabbit oocytes. Hum. Reprod. 4:77-79.
- Arav A, Bacci ML and Rubinsk B. 1990. Vitrification of immature pig oocytes. In Preceding of the 11th International Pig Veterinar Society Congress Lausanne Abst. 479.
- Bautista JA, Dela Pena EC, Katagiri S, Takahashi Y and Kanagawa H. 1998. *In vitro* viability of mouse oocytes vitrified in an ethyleneglycol-based solution. Jpn. J. Vet. Res. 46:13-18.
- Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ and Whittingham DG. 1995. Cryogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. Biol. Reprod. 53:780-785.
- Chen C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet. I. 884-886.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN and Yang YS. 2000. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. Hum. Reprod. 15:2598-2603.
- Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI and Massey JB. 1988. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. Fertil. Steril. 49:283-289.
- Cong PQ, Song ES, Kim ES, Li ZH, Zhang YH and Lee JM. 2007. Effect of cryoprotectant, warming solution and removal of lipid on viability of porcine nuclear transfer embryos vitrified by open pulled straw method. Reprod. Dev. Biol. 31(2):103-108.
- Dobrnisky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol. Reprod. 62: 564-570.
- Dochi O, Oshima K, Takenouchi N and Komatsu M. 1998. Effect of exposure to cryoprotectent solutions in cleavage and subsequent development of immature bovine oocyte *in vitro*. Theriogenology Abst. 49(1):167.
- Fahning ML and Garcia MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology 29:1-18.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA and Meryman HT. 1987. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 24:387-402.
- Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril. 49:743-764.
- Hamlett DK, Franken DR, Cronje HS and Luus H. 1989. Murine oocyte cryopreservation: Comparison between fertilization success rates of fresh and frozen metaphase I and II oocytes. Arch. Andol. 23:27.

Al-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K, Blanke S, Van der Ven H and Krebs D. 1989. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in vitro* fertilized rabbit oocytes. Hum. Reprod.

- Herrler A, Rath D and Nieman H. 1991. Effect of cryoprotectant on fertilization and cleavage of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 35:212(Abst.).
- Hochi S, Akira K, Ken K and Akira H. 1997. *In vitro* fertilization ability of bovine oocyte frozen-thawed at immature, maturing and maturestage. *J. Mamm. Ova. Res.* 14:61-65.
- Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth F, Dessole S and van der Ven H. 2004. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocyte after step-wise versus direct rehydration. *Hum. Reprod.* 19:660-665.
- Kasai M, Iritani A and Chang MC. 1979. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biol. Reprod.* 21:839-844.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* 89:91-97.
- Kim EK, Kim MY, Son SM and Kim DW. 2008. Comparison of the efficiency between slow freezing and vitrification method for cryopreservation of human embryos. *J. Emb. Trans.* 23(1):19-24.
- Kim MY and Lee YL. 2007. Comparison of vitrification and slow freezing for the cryopreservation of mouse pronuclear stage embryos. *Kor. J. Reprod. Mrd.* 34(2):117-123.
- Kuleshova LL, Shaw JM and Trounson AO. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43:21-31.
- Landa V and Tepla O. 1990. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia. Biol.* 36:153-158.
- Leibo SP and Oda K. 1993. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylglycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters* 14:133-144.
- Li R, Lai L, Wax D, Hao Y, Murphy CN and Rieke A, et al. 2006. Cloned transgenic swine via *in vitro* production and cryopreservation. *Biol. Reprod.* 75:226-230.
- Mandelbaum J, Junka AM, Plachot M and Alnot MD. 1987. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum. Reprod.* 3:117.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Bio. Reprod.* 54:1059-1069.
- Moller CC and Wassarman PM. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* 132:103-112.
- Papis K, Shimizu M and Izaike Y. 1999. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 51:173.
- Park MC, Kim JY, Kim SB, Park YS, Park HD and Lee JH, et al. 2009. The effect of cryopreservation on the mouse embryos at various-pronuclear stages. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:174-180.
- Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C and Suzuki T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* a;33:291-299.
- Takagi M, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1993. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology* 30:306-312.
- Tsunoda Y, Parkening TA and Chang MC. 1976. *In vitro* fertilization of mouse and hamster egg after freezing and thawing. *Experimentia* 32:223-224.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth Pj, Jacobsen H and Greve T, et al. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification : A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 51:53-58.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E and Van Sterirtegehem A. 1988. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.* 3:960-967.
- Vincent C, Pickering SJ and Johnson MH. 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.* 89:253-259.