

생쥐배의 생존성 평가에 있어 FDA의 이용

경희대학교 의과대학 산부인과학교실(불임클리닉), 건국대학교 축산대학 축산학과*

김재명 · 홍진기 · 서병희 · 이재현 · 정길생*

The Use of FDA to Assess the Viability of Preimplantation Mouse Embryo *In vitro*

Jae-Myeoung Kim, M.S., Jin-Ki Hong, M.D., Byung Hee Suh, M.D., Jae-Hyun Lee, M.D.
and Kil Sheoung Chung, Ph D.*

*Infertility Clinic, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Kyung Hee University,
College of Animal Husbandary, Kon Kuk University**

= Abstract =

A fluorescence microscopy technique using fluorescein diacetate(FDA) as a substract has been tested for the evaluation of the viability of early mouse embryos. Embryos were incubated in T6 containing FDA concentrations of 2.5 to 50 μ g/ml for 1 to 5min. Embryos were then examined by reflected light fluorescence using a KP 490 and 520 barrier filter in a Nikon Diaphot microscopy.

The results were as follow.

1. The rate of fluorescein accumulation increased on the concentration on FDA from 2.5×10^{-6} M to 20×10^{-6} M
2. The rate at which intracellular fluorescein was lost from embryos was depended on the temperature at which are stored.
3. Embryos with 3 min exposure to FDA have the most intensity of fluorescence.
4. Exposure of 2 cell embryos to FDA(2.5-5 μ g/ml) for 1 min did not alter their ability to delope normally in vitro.

서 론

최근 가축에서 수정란 이식과 난자의 동결보존, 인간에서도 체외 수정 및 배이식 프로그램이 널리 시행되면서 포유동물난자의 생존성, 체외에서 발달할 수 있는 능력과 위임신생쥐에 이식하였을때 태어날 산자의 기대는 일반적으로 난자의 형태학적 외관 즉 할구의 전반적 균일성 및 투명대의 상태에 의존하고 있다(Whittengham, 1978). Anderson & Foote(1974, 1975)는 난자의 대사적 활성도를 측정하여 난자의 생존성을 조사하였는데 이들방법은 방사선 동위원소 전구물질에 오랜시간동안 난자를 배양해야 하고 이들검사의 측정을 위해서 난자를 파괴하여야 한다. 또한 전자현미경적 검사방법도 난

자의 특성에 관한 많은 정보를 제공하지만 난자의 파괴를 요하므로 널리 이용되어지고 있지 않다.

세포의 생리적 기능을 조사하기 위해서 triphan blue, nigrosin, fast green과 같은 염색소가 살아있는 세포에는 침투를 배제하는 반면, 죽은 세포에는 침투하여 특정한 색을 나타내 많은 실험에 이용되고 있으나 동결보존후 융해된 난자의 생존능력 측정방법으로는 해석에 어려운 점이 많다(Doln, 1965;Green등, 1965;Pegg, 1964). Rotman & Papermaster(1966)에 의하면 체외에서 배양중인 세포에 FDA(fluorescein diacetate)를 노출시켰을때 살아있는 세포는 세포내 fluorescein을 축적하여 현광현미경에 노출시 형광을 나타내므로 세포의 생존성을 조사할 수 있는 방법으로 유용하다고 하였고, 세포의

estrase 효소활성과 세포막의 투과성에 있어서 Rotman과 Papermaster(1966)는 1분, McGrath 등(1975)는 8분, Persidisky와 Baillie(1977)은 10분이 필요하다고 하였다. 또한 Rotman과 Papermaster(1966)에 의하면 세포의 생존성과 형광색도는 밀접한 관계가 있으며, FDA가 세포의 생존성 및 계속적인 세포의 cloning에 어떠한 영향도 끼치지 않는다고 하였다. McGrath 등(1975)에 의하면 체외에서 배양중인 세포가 동결보존후 융해하였을때 세포보다 강한 형광색을 나타내는데 이는 동결에 따르는 세포내 빙정형성에 의한 세포막의 손상과 연관되어 있다고 하였다. Leibo와 Mazur(1978)는 생쥐배의 동결보존후 세포의 생존성을 조사하기 위해서 FDA를 사용하였고, Jackowski(1977)는 동결보존후 융해한 난자의 형광색도와 발달율에 있어서 높은 상관관계를 나타낸다고 하였고, 한편 Vincenzo 등(1991)는 외견상 정상적인 인간 난자를 FDA에 노출시킨후 UV현미경하에서 관찰시 밝은 형광을 나타낸 반면 고온 및 저온에 처리된 난자에서는 희미한 형광을 나타냈다고 하는데 이는 난자의 생존성과 관계가 있다고 하였다.

이에 저자들은 난자의 생존성 평가방법으로 FDA의 효과를 조사하기 위하여 생쥐배를 이용하여 FDA의 농도에 따른 난자의 발광도, 배발달에 끼치는 영향, 난자의 발달단계에 따른 발광도를 조사하는 것을 목적으로 실험을 하였다.

실험 방법

1. 공시동물

실험동물은 ICR 생쥐를 사용하였다. 공란생쥐는 7-8주령, 웅성생쥐는 10-16주령이었으며, 일조시간과 온도가 일정하게 조절되는 사육실에서 사육하였고 먹이와 물은 무제한으로 급여하였다.

2. 배양액

난자의 배양은 0.4%의 BSA가 함유되어 있는 T6배양액을 사용하였고, 이들배양액의 PH는 7.4-7.8, 삼투압은 290m osm이었고 사용하기전에 0.2um의 milliphore filter(Gelman Science, Inc. U.S.A.)를 이용하여 가압멸균 시킨뒤 사용할때까지 5도식의 냉장고에 보관하였다.

3. 다배란 유기

다배란을 유기하기 위하여 공란 생쥐의 복강에 5IU의 PMSG(Folligon, Intervert, Holland)를 주사한후 48시간뒤 동량의 hCG(Chorulon, Intervert, Holland)를 복강에 주사하였다.

4. 난자의 회수

1세포기의 미수정란을 얻기위해서 hCG주사후 12-14시간에 경추파열법으로 생쥐를 도살하여 난관을 적출한 후 난관을 관료하여 난자를 회수하였으며, 2, 4, 8세포기, 상실배 및 배반포배를 얻기위해서 hCG주사후 웅성생쥐와 합사시킨후 익일에 plug를 검사한날을 1일로 하여 2, 3, 4일째에 난관 또는 자궁을 관료하여 난자를 회수하였다.

5. FDA stock solution 및 난자의 염색

FDA stock solution은 acetone 1ml당 5mg FDA(Fluorescein Diacetate, Sigma)를 함유하는 용액을 제조하여 빛에 노출되는 것을 피하기 위해 aluminum folio로 싸아 -20도의 냉장고에 보관한 후, 사용하기 직전에 배양액을 일정한 농도로 희석하여 이용하였다. 일반적으로 FDA농도는 배양액 ml당 FDA 2.5 μ g을 함유한 용액에 1분동안 난자를 노출시켜 난자를 염색한 후 신선한 배양액으로 1분동안 3회 이상 세척하여 여분의 FDA를 제거하였다. 또한 실험에 따라서 5.0, 10, 25, 50 μ g/ml의 FDA를 함유한 배양액에 1분간 노출시키거나 2.5 μ g/ml의 FDA를 함유한 배양액에 1분, 3분 및 5분동안 노출시킨후 난자의 발광도를 검사하였다.

6. 난자의 발광도 측정

FDA용액에 염색후 세척된 난자는 형광렌즈(UV Filter)가 장착된 Inverted Microscope(DIAPHOT Model TMD with Epi-Fluorescence Attachment, Nikon, Japan)하에서 400배로 난자를 관찰하였을때 노출계(UFX-II, Nikon, Japan)의 값을 측정하여 난자의 발광도로 이용하였다. 이때의 배율은 400배였으며, 노출계의 ASA는 800으로 조정하였다.

결 과

1세포기의 난자를 1분간 여러 FDA농도를 함유하고 있는 배양액에 노출시킨후 1분간 신선배양액으로 세척한 후 FDA의 농도에 따르는 난자의 형광도에 관한 도표가 그림 1에 나

타나 있다. 도표에서 보는 바와같이 2.5에서 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA를 함유하고 있는 배양액에 난자를 배양시 난자의 형광도가 비례적으로 높아졌으나 25 μg 이상의 FDA에 배양시에는 20 μg 의 영역과 같거나 혹은 낮은 형광도를 나타냈는데 이는 FDA의 고농도에 따른 난자생존성에 나쁜 영향을 끼치는 것으로 사료된다. 한편 1세포기의 난자를 1분간 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA에 노출시킨후 3회이상 세척을 실시하여 5 $^{\circ}\text{C}$, 상온과 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하며 30분마다 난자의 형광도를 측정 한 결과가 그림 2와 같다. 시간이 경과함에도 불구하고 5 $^{\circ}\text{C}$ 에 배양된 난자는 형광도를 잃지 않아 3시간 배양에도 80%의 높

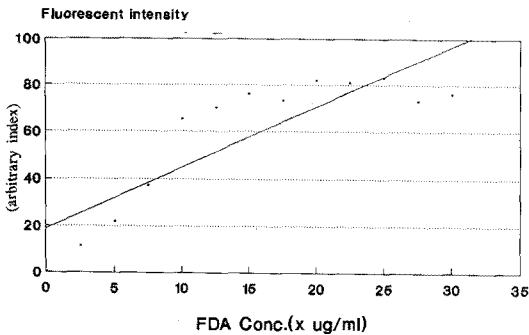


Fig. 1. Fluorescent intensity of one cell embryos exposed for 1 min to different concentration of FDA.

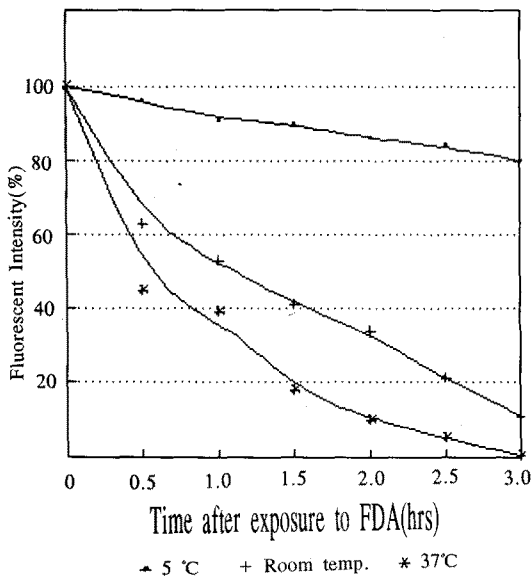


Fig. 2. Loss of accumulated fluorescein from one cell embryos stored at 37 $^{\circ}\text{C}$, Room temperature and 5 $^{\circ}\text{C}$.

은 형광을 유지한 반면, 상온과 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양된 난자는 약 1시간후에 각각 53%, 39%의 형광을 나타냈으며 3시간 배양한 결과 11%와 0.4%의 형광을 나타냈는데 이는 Mohr와 Trounson(1980)의 보고와 유사하였다.

표 1은 1세포기의 생쥐배를 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA에 1, 3, 5분동안 노출시킨후 3회이상 세척하여 난자의 형광도를 조사한 표로서 1분간 노출시킨 난자의 노출시간은 2.81 \pm 0.35, 3분간 노출시킨 난자의 노출시간은 1.98 \pm 0.34, 5분간 노출시킨 난자의 노출시간은 2.31 \pm 0.51로 3분간 노출시킨 군에서 가장 밝은 형광을 나타냈으며 각군간에 유의차가 있었다($p < 0.05$). 표 2는 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA에 1분동안 각각의 단계별 난자를 노출시킨후의 난자의 발광도를 조사한 표로서 1세포기는 2.89 \pm 0.36, 2세포기는 3.04 \pm 0.43, 4세포기는 2.97 \pm 0.41, 8세포기는 3.32 \pm 0.51, 상실배는 2.70 \pm 0.66, 배반포기의 난자는 3.21 \pm 0.45로서 상실배에서 가장 밝았으며 8세포기의 난자에서 가장 흐린 형광도를 나타냈으나 각군간의 유의성은 없었다(그림 3).

2세포기의 난자를 ml당 2.5 μg , 5.0 μg , 10 μg , 25 μg 및 50 μg 의 FDA를 함유하고 있는 배양액

Table 1. Fluorescent light intensity of 1 cell mouse embryos according to exposure time to FDA (2.5 $\mu\text{g/ml}$)

Exposure time (min)	No. of embryo	Grade of fluorescent	
		Mean	Range
1	50	2.81 \pm 0.35a	2.23-3.38
3	62	1.98 \pm 0.34a.b	1.47-2.75
5	56	2.31 \pm 0.51b	1.62-3.23

a.b $p < 0.05$.

Table 2. The fluorescent light intensity of mouse embryo after 1 min exposure to FDA (2.5 $\mu\text{g/ml}$)

Stage of embryo	No. of embryo	Grade of fluorescent	
		Mean	Range
1 cell	60	2.89 \pm 0.36	2.23-3.38
2 cell	54	3.04 \pm 0.43	2.19-3.14
4 cell	42	2.97 \pm 0.41	2.48-3.45
8 cell	50	3.32 \pm 0.51	2.21-3.99
Morulae	52	2.70 \pm 0.66	2.06-3.38
Blasto.	50	3.21 \pm 0.45	2.72-3.51

Blasto.: Blastocyst

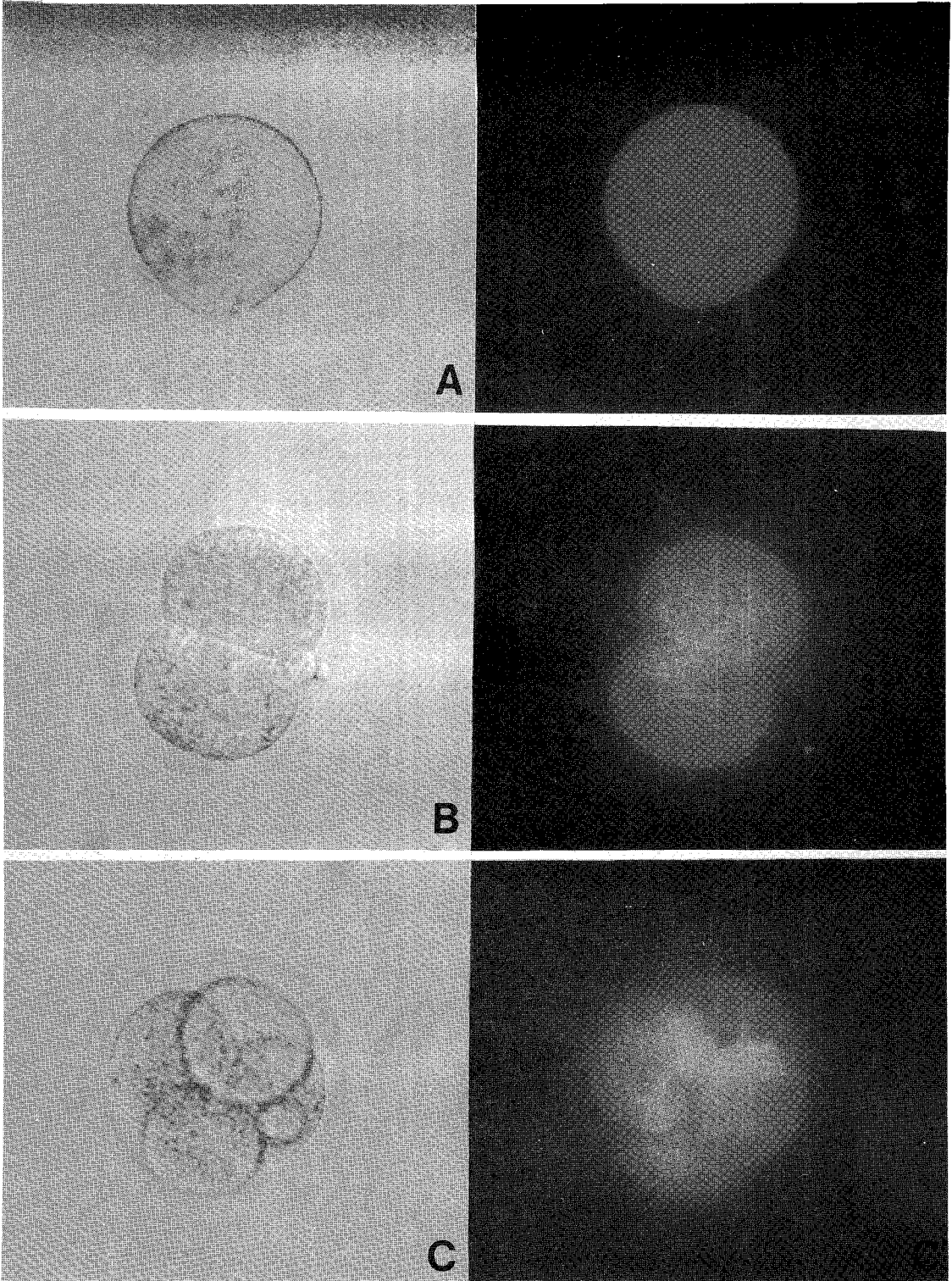


Fig. 3. The fluorescent light intensity of mouse embryos after 1 min exposure to FDA ($1\mu\text{g}/\text{ml}$). The blastomere are greatly fluorescent, and no difference in terms of fluorescence intensity are observed among the cells. **A)** one cell, **B)** 2 cell, **C)** 4 cell.

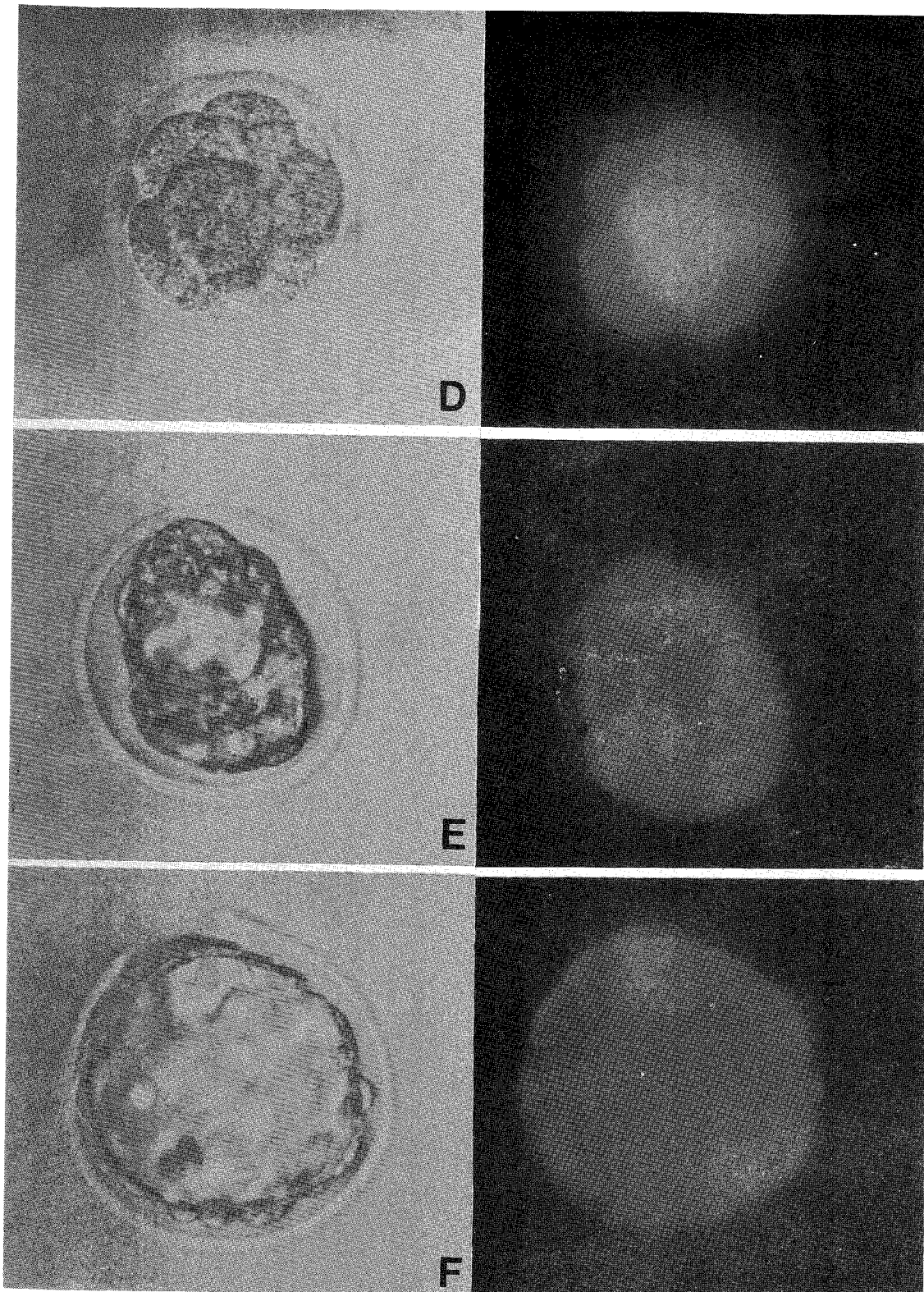


Fig. 3-D) 8 cell, E) early blastocyst, F) late blastocyst.

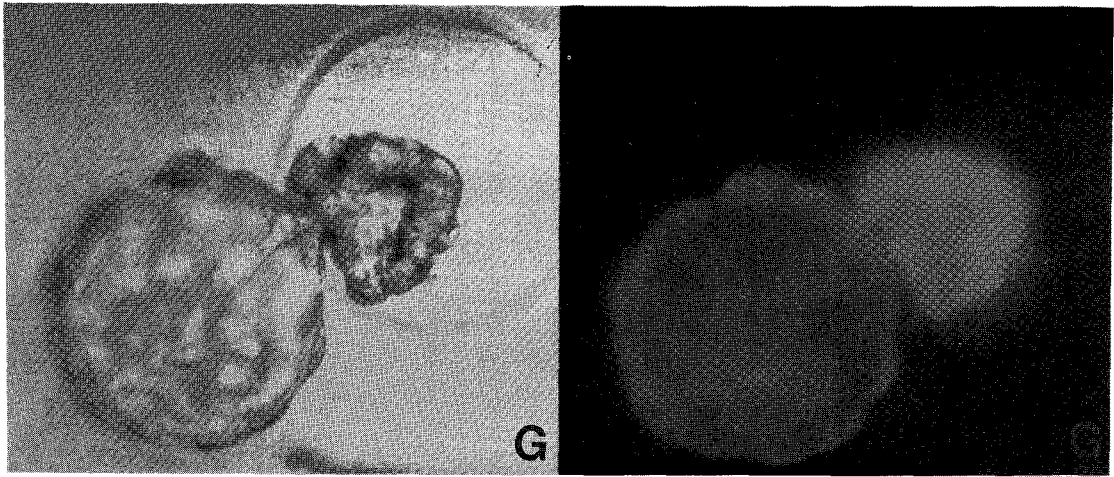


Fig. 3-G) hatched embryo; Left: light microscopy, Right: fluorescent microscopy.

Table 3. Development of two cell embryo after 1 min exposure to various FDA concentrated solution

Concentration of FDA ($\mu\text{g/ml}$)	No. of embryo	No. of developed embryo			
		4 cell	8 cell	Morulae	Blastocyst
Control	75	75 ^{a,b,c,d}	72 ^{e,f}	66 ^{g,h}	61 ⁱ
2.5	116	100	100	94	82
5.0	105	92 ^a	91	84	81
10	110	89 ^b	84	73	65
25	103	73 ^c	51 ^e	31 ^g	29
50	105	66 ^d	21 ^f	12 ^h	6 ⁱ

a, b, c, d, e, f, g, h, i p < 0.05

에 1분간 노출시킨후의 난자를 배양했을때의 배발달율이 표 3과 같다. 각각의 군에서 4세포기까지의 발달율은 각각 100, 86.2, 87.6, 80.9, 70.9 및 62.9%였으며, 8세포기까지의 발달율은 각각 96.0, 86.2, 86.7, 76.4, 49.5 및 20%였고, 상실배까지의 발달율은 각각 88.0, 81.0, 80.0, 66.4, 30.1 및 11.4%였고, 배반포까지의 발달율은 각각 81.3, 79.3, 77.1, 59.1, 28.2 및 5.7%의 배발달율을 나타냈다. 표에서 보는바와 같이 FDA에 노출된 난자는 대조군보다 낮은 발달율을 나타냈으나 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA를 함유하는 배양액에 노출시켰을때에는 유의차가 없었으며, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA용액에 노출시켰을때에는 4세포기 발달율에는 유의차가 있었으나 그다음단계의 발달에는 영향을 미치지 않았다. 그러나 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 FDA에 노출시켰을때는 배발달에 가역적인 영향을 끼쳤다.

고 찰

난자의 생존성과 발달능력을 조사하는 방법으로 현미경하에서 투명대 또는 할구의 균일성을 조사하는 방법이 널리 이용되고 있다. 그러나 이방법으로는 초기배의 생존성 및 발달능력을 예측한다는 것은 매우 어려우며 정상적인 외형을 지닌다고 난자가 정상적으로 발달한다고 단정할 수 없고, 이들 방법에 의한 판별법은 오랜경험을 요한다(Church & Shea, 1976). 또한 체외 또는 체내 배양으로 난자의 발달단계를 조사하는 방법은 시간을 요하는 단점을 지니고 있고, Elsdie 등(1978)은 소수정난을 형태적 외관에 따라 4그룹으로 분류한 뒤 이식후의 임신율을 조사한 결과 형태적 외관에 의한 판별법과 상관관계가 없다고 하였다.

FDA는 non-fluorescent 구성물로서 살아있는 세포에만 존재하는 가수분해효소와 결합시 flu-

orescent 물질로 전환되어 형광현미경하에서 관찰시 강한 초록의 형광을 발하여 세포의 생사 판별의 시약으로 널리 사용되어 왔다. 난자를 FDA에 노출시켰을 때 전반적인 발달단계에서 형광을 발하며, 각각의 난자에 축적될 수 있는 FDA의 양은 동일한 세포단계의 난자라 할지라도 매우 변이가 많다(Mohr & Trounson, 1980).

이와같이 형광색도에서의 변이는 FDA가 난자에 노출된 시간, 난자의 생존성에 밀접한 관계를 갖고 있다. Persidisky와 Baillie(1977)에 의하면 골수세포는 FDA에 노출되었을 때 20분간은 강한 빛을 발하다가 점점 형광이 쇠퇴한다고 하며, 생쥐 암과세포의 Km 값은 $2.9 \times 10^6 M$, 1세포기의 배의 Km 값은 $8.5 \times 10^6 M$ 의 값을 지닌다고 하며(Rotman & Papermaster, 1966), Mohr와 Trounson(1980)은 $6 \times 10^6 M$ 의 농도를 이용하였다. 1세포기의 난자가 배양되고 있는 배양액의 온도가 감소함에 따라 형광색도가 감소하며, 37°C에서 2시간동안 배양함에 따라서 형광도의 손실을 나타냈고(Rotman & Papermaster, 1966), 저자등의 경우 1분간 FDA가 함유되어 있는 배양액에 난자를 노출시킨후 5°C 및 37°C시에 배양한 결과 37°C에 배양한 난자는 1시간후 39%의 형광도를 나타낸 반면 상온과 5°C에 배양한 난자는 각각 53%와 80%의 높은 형광도를 나타냈다. 또한 FDA에 일정시간 노출후 생쥐암과세포의 계대배양에 어떠한 영향을 미치지 않았고(Rotman & Papermaster, 1966), 2세포기의 난자가 부화배로의 발달에도 영향을 끼치지 않았다(Mohr & Trounson, 1980).

저자들의 경우에 있어서 ml당 $2.5 \mu g$, $50 \mu g$ 의 FDA를 함유하고 있는 배양액에 난자를 노출한후 배양하였을 때 대조군과 유의차가 없었으나 그이상의 농도에 노출시 난자의 발달율을 억제함을 관찰할 수 있었다.

배반포의 난자에 있어서 배반포강내에는 형광을 나타내지 않는데 이는 배반포강 체액내 esterase효소의 결핍에 기인하는 것으로 생각되며, 착상전 생쥐배를 FDA 또는 UV에 노출시에도 배의 발달율과 산자율에 어떠한 영향도 끼치지 않는다고 Mohr와 Trounson(1980)은 보고하였다.

McGrath등(1975)에 의하면 체외에서 배양 중인 세포가 동결보존후 용해한 세포군보다 높은 형광도를 나타냈는데 이는 동결시 세포내

빙정형성에 의해 세포막의 손상과 연관되어 있다고 하며 동결보존후 난자의 생존성의 조사방법으로 유용하다고 하였다. 이상과 같이 일반적인 검사법으로 난자의 생존성과 발달율을 예측하기 어려운 실험에 FDA를 이용한 검사법으로 예후를 추정할 수 있으며 특히 동결보존후 난자의 생존성을 조사하는 방법으로 동결기술의 향상을 위해서 귀중한 방법으로 사료된다.

결 론

본 실험은 착상전 난자의 생존성을 조사하는 방법의 일환으로 FDA를 이용하여 난자에 가장 최적의 FDA농도치, 난자의 발달단계에 따른 형광색도, FDA노출시간에 따른 난자의 형광도 및 여러농도에 따른 난자의 발달율을 조사하여 그 실험결과를 임상적으로 이용함을 목적으로 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. FDA의 농도에 따른 난자의 형광색도는 $2.5 \times 10^{-6} M$ 에서 $20 \times 10^{-6} M$ 농도까지는 비례적인 밝기를 나타냈으나 그 이상의 농도에서는 낮은 형광색도를 나타냈다.
2. FDA노출시간에 따른 난자의 형광색도는 3분간 노출시켰을 때 가장 밝은 형광색도를 나타냈다(1.98 ± 0.34).
3. FDA에 노출시킨후 배양되는 온도영역에 따른 형광도의 손실율은 37°C에 보관하였을 때 높았고 5°C에 보관시에는 3시간후에도 80%의 높은 형광도를 유지하였다.
4. 난자의 발달단계에 따른 형광도에 있어서는 유의차가 나타나지 않았다.
5. FDA의 농도에 따른 2세포기난자의 발달율에 있어서 $2.5 \times 10^{-6} M$, $5.0 \times 10^{-6} M$ 농도에 노출시 대조군과 유의차가 나타나지 않았으나 그 이상의 농도에서는 유의차가 있었다.

인 용 문 헌

- Anderson GB, Foote RH: Effect of low temperature storage upon subsequent energy metabolism of rabbit embryos. *Exp Cell Res* 1974, 87, 302-306.
- Anderson GB, Foote RH: Effect of low temperature upon subsequent nucleic acid and protein synthesis of rabbit embryos. *Exp Cell Res* 1975, 90, 73-78.
- Church RB, Shea B: Some aspects of bovine em-

- bryo transfer. Seminar on egg transfer in cattle. *Cambridge* 1975, Dec 10-12, 73-86.
- Doln MF: Viability assay-A critique, *Fed Proc* 1965, 15(Suppl), S275-S279.
- Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE: Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* 1978, 9, 17-26.
- Green AE et al.: Preservation of cell cultures by freezing in liquid nitrozed vapor. *Proc Soc Exe Biol Med* 1964, 116, 462-467.
- Jackowski SC: Physiological differences between fertilized and unfertilized mouse ova; glycerol permeability and freezing sensitivity. 1977. Ph. D dissertation. University of Tennessee, Knoxville.
- Leibo SP, Mazur P: Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In *methods in mammalian Reproduction* 1978, pp. 179-201.
- McGrath JJ, Carvalho EG, Huggins CE: An experimental comparison of intercellular ice formation and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells. *Cryobiology* 1975, 12, 540-550.
- Mohr LR, Trounson AO: The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J Reprod Fert* 1980, 58, 189-196.
- Pegg DE: The cytology of human bone marrow subjected to prolonged storage at -79°C. *J Appl Physiol* 1964, 19, 301-309.
- Persidsky MD, Baillie GS: Fluorometric test of cell membrane integrity. *Cryobiology* 1977, 14, 322-331.
- Rotman B, Papermaster BW: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic ester. *Proc Natn Acad Sci U.S.A.* 1966, 55, 134-141.
- Vincenzo N et al.: Fluorescein diacetate assessment of embryo viability after ultrarapid freezing of human multipronucleate embryos. *Fertil and Steril* 1991, 55, 1171-1175.
- Whittenham DG: Viability assays for mammalian ova. *Cryobiology* 1978, 15, 245-248.