

## 생쥐 초기배아의 발생시기와 냉동보존 방법에 따른 발생률

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 제일병원 체외수정연구실\*

전용필 · 이호준\* · 김문규

### Development Rates of the Cryopreserved Mouse Embryos According to the Embryonic Stage and Cryopreservation Method

Yong Pil Cheon, Ho Jun Lee\* and Moon Kyoo Kim

*Dmeprament of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea  
IVF Research Laboratory, Cheil General Hospital, Seoul 100-380, Korea\**

#### = Abstract =

The study has been carried out in order to evaluate the effects of embryonic stage, and cryopreservation method on the rates of viability and development of the cryopreserved mouse early embryos. The results were as following: In the treatment steps of cryoprotectant, for the fertilized oocyte with pronucleus(PN), 2-step was better than the others. And for the other embryos, 4-step was better than 2- or 3-step. In respect to the embryonic stage, as the embryos developed from fertilized oocytes to 8-cell embryos, the rates of viability and development were increased higher. Therefore, 8-cell embryo was better stage than the others. In respect to the kind of cryoprotectants, PROH was better than DMSO for the fertilized oocyte, as a cryoprotectant. DMSO, for the 2-cell embryos and PROH and DMSO for the 4- and 8-cell embryos were suitable for cryopreservation.

#### 서 론

체외수정 및 수정란 이식기술의 발달은 불임치료나 가축의 품종개량 및 대량생산에 이바지 하였다. 특히 불임치료시 야기되는 다임신(multiple pregnancies)에 관련된 의학적인 문제는 소수 배아를 이식하고 여분의 배아는 적절한 냉동보관방법을 사용함으로써 해결할 수 있으며 이 방법이 널리 이용되고 있다.

냉동보존 후 배아의 생존률은 생체막의 투과성, 활성화 에너지(activation energy), 표면적과 부피의 비율 등 세포의 물리적 특성과 그리고 냉동 또는 해빙 속도에 따른 얼음결정체 형성(Mazur, 1983, 1984; Leibo et al., 1978;

McGann et al., 1981)과 결빙억제제 사용 및 냉동보존 방법(Kasai et al., 1980; Kasai et al., 1982; Kim et al., 1987) 등에 의하여 결정된다. 그러므로 종에 따른 배아의 특이성(Kasai et al., 1983; Nandelbaum et al., 1988), 배아의 발생시기와 세포주기(Polge et al., 1978; Mohr et al., 1981; Lassalle et al., 1985; Kim et al., 1987; Mandelbaum et al., 1988), 그리고 냉동방법에 따라 생존률이 달라지게 된다. 그러므로 불임 시술에서는 여건에 따라, 체내 또는 체외 성숙된 난자와, 수정란에서 상실배까지 다양한 시기의 배아를 이용하고 있다(Kim et al., 1987; Choi et al., 1991; Al-Hasani et al., 1992).

냉동방법은 세포소기관의 손상에 큰 영향을 주는 요인인 냉동(Whittingham, 1976; Polge et al., 1978) 및 해빙 속도(Leibo et al., 1974; Whittingham et al., 1976; Wood et al., 1980)에

\*본 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성 연구비(BSRI-94-4437)와 제일병원 기초연구비 지원에 의한 것임.

따라 다양화되어 있다. 또한 냉동 및 해빙에 있어서 여러 다단계 처리 방법들은 비교적 생존율이 높은 장점은 있으나 복잡하고 시간이 오래 걸리는 단점을 가지고 있어 이를 보완하기 위하여 최근 초급속 냉동법이 보고되고 있다(Trounson et al., 1987; Trounson et al., 1988; Wilson et al., 1989; Gordts et al., 1990). 그러나 초급속 냉동법은 간단하고 비용이 적게 들며, 기계를 사용하지 않아도 되는 장점을 가지고 있으나 생존율이 비교적 낮으므로 최근에는 이러한 단점을 보완하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 기존에 이용하고 있는 다단계 처리 방법을 변형하여 여러가지 배아의 시기와 결빙억제제 및 처리 과정의 단계에 따른 생존률과 발생률을 관찰 분석함으로써 기존의 방법보다는 간단하고 높은 생존률 및 발생률을 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배아의 획득

생후 8-12주된 생쥐(ICR계)의 복강에 PMSG(Sigma) 5iu를 주사한 후 48시간만에 hCG(Sigma) 5iu를 주사하여 과배란을 유도하고 숫놈과 교배시켰다. 수정란(전핵 상태; PN), 후기 2-세포 배아, 4-세포 배아 그리고 8-세포 배아들은 hCG 주사후 각각 17-20시간, 48-50시간, 60시간, 그리고 70시간에 수란관을 적출하고 0.4% BSA를 포함한 BWB(Biggers et al., 1971) 배양액을 관류하여 획득하였다.

### 2. 배아의 냉동 및 해빙

수획한 배아들은 0.4% BSA를 포함한 PBS(Dulbeco)에 옮긴 후 결빙억제제인, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)와 1,2-propanediol (PROH, sigma)를 처리하였는데, 결빙억제제의 처리단계(일련농도)는 2단계(0.75, 1.5M), 3단계(0.5, 1.0, 1.5M), 4단계(0.25, 0.5, 1.0, 1.5M)로 구분하였으며 각각의 농도에서 8분간씩 처리하였다. 최종 1.5M로 평형 상태를 유지시킨 배아들은 10-15개씩 straw(150 $\mu$ l, 91mm in length, IMV, L'aigle, France)에 넣어 Kim등(1987)의 방법과 과정에 따라 세포 냉동기(Planar products LTD, R204)내에서 냉동하였다.

해빙 방법은 straw를 37°C 온수에 직접 넣어 급속히 녹이는 방법을 적용하였다. 회수된 배아는 결빙억제제 처리 단계의 역순으로 결빙억제제를 제거한 후 0.4% BSA를 포함한 PBS에서 5분간 정치한 다음 0.4% BSA가 들어있는 BWB에 옮겼다. 해빙된 배아의 생존 여부는 도립현미경(Nikon, TMD)하에서 검경하여 할구수 50% 이상 상해를 입지 않은 것을 정상배아로 판정하였다(Kim et al., 1987).

### 3. 배아의 배양 및 통계

냉동 후 해빙한 배아들은 Brinster(1963)의 방법으로 37°C 공기중 5% CO<sub>2</sub> 100% 습도를 유지하는 배양기에서 48-72시간 배양하여 포배기까지 발생한 배아를 계수하였다. 통계적 유의성 검정은  $\chi^2$ -test로 분석하였으며 p < 0.05일 때 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 결빙억제제 처리 단계에 따른 배아의 발생률

결빙억제제의 처리 단계에 따라 배아가 포배로 발생하는 율을 보면 표와 같다. 수정란의 발생률은 결빙억제제로서 PROH를 처리하였을 경우 2단계에서 66.7%로 3단계(38.5%)와 4단계(30.4%)에 비해 유의하게 높았다(p < 0.01). 한편 DMSO를 처리하였을 경우 2단계에서 63.3%로 3단계(58.7%)와 4단계(48.1%)에 비해 유의성은 없었으나 높은 경향을 보였다.

2-세포 배아의 발생률에 있어서는 PROH를 처리하였을 경우, 2단계에서 42.4%, 3단계에서 40.9%, 그리고 4단계에서 56.9%였으며 4단계가 2단계에 비해 유의하게(p < 0.001) 높았다. 한편 DMSO를 처리하였을 경우 4단계(75.0%)가 2단계(67.9%)와 3단계(43.9%)에 비해 유의하게(각각 p < 0.05, p < 0.01) 높았다(표 1).

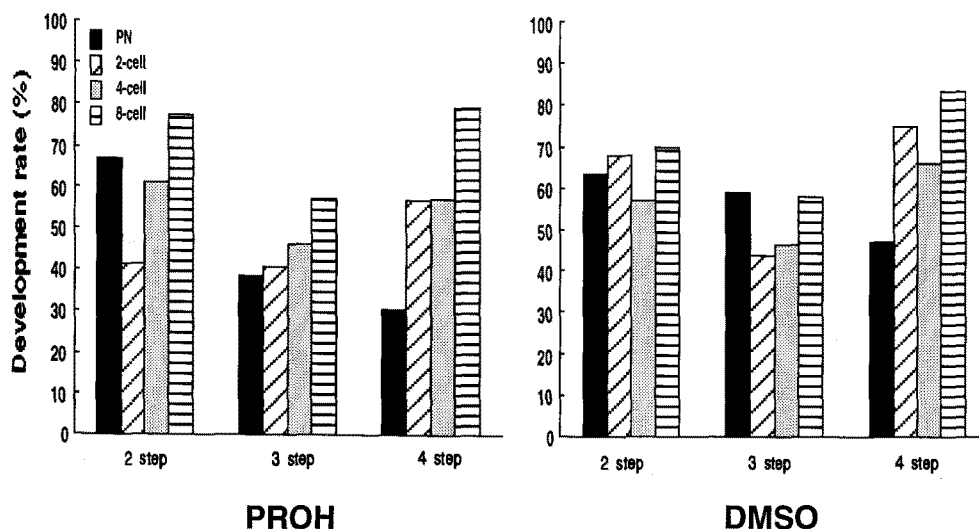
4-세포 배아의 발생률을 보면 PROH를 처리하였을 때 2단계(66.1%)와 4단계(70.05%)가 3단계(46.0%)보다 유의한 증가를(p < 0.01) 보였다. DMSO를 처리한 경우 2단계가 57.0%, 3단계가 53.2%, 그리고 4단계가 66.2%로 나타나 단계간에 유의한 차이는 없었으나 4단계에서 높은 결과를 얻었다.

8-세포 배아의 발생률을 보면 PROH를 처리한 경우 2단계(77.5%), 4단계(79.2%)가 3

**Table 1.** The development to blastocyst of frozen-thawed mouse embryos according to the treatment step of cryoprotectant (PROH, DMSO)

Cryoprotectant	Step	PN	2-cell	4-cell	8-cell
PROH	2	*40/60(66.7) <sup>b</sup>	24/58(41.4)	76/114(66.1)	69/89(77.5)
	3	30/78(38.5)	27/66(40.9)	58/126(46.0) <sup>b</sup>	54/94(57.4) <sup>b</sup>
	4	17/56(30.4)	33/58(56.9) <sup>b</sup>	63/90 (70.0)	57/72(79.2)
DMSO	2	38/60(63.3)	38/56(67.9)	57/100(57.0)	56/80(70.0)
	3	37/63(58.7)	25/57(43.9)	58/109(53.2)	46/79(58.2)
	4	38/79(48.1)	36/48(75.0) <sup>a</sup>	47/71 (66.2)	54/65(83.1) <sup>b</sup>

\*No. of blastocysts/No. of embryos cultured(%), Significantly different compared with the other steps(<sup>a</sup>: $p < 0.05$ , <sup>b</sup>: $p < 0.01$ ).



**Fig. 1.** The development to blastocyst of frozen-thawed embryos according to embryonic stage.

단계(57.4%)에 비해 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았다. DMSO를 처리하였을 경우에는 2단계에서 70.0%, 3단계에서는 58.2%, 그리고 4단계에서는 83.1%로 나타나 4단계가 3단계에 비해 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았으나 다른 단계간에는 유의한 차이가 없었다.

## 2. 냉동보존 배아의 시기에 따른 발생률

2단계에서는 결빙억제제로 PROH를 사용할 경우 2-세포(41.4%)는 수정란(66.7%), 4-세포(61.1%), 8-세포(77.5%) 배아에 비해 유의하게( $p < 0.01$ ) 발생률이 낮았다. 그러나 DMSO 군에서는 모두 난할 수에 관계없이 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 1). 3단계에서는 PROH를 처리할 경우 8-세포 배아(57.4%)가 수정란(38.5%) 및 2-세포 배아(40.9%)의 발생률 보다 유의하게( $p < 0.01$ ) 높은 반면, DMSO 처리 군에서는 각 시기간에는 유의한

차이가 없었다(그림 1). PROH를 4단계로 처리하였을 경우 수정란(30.4%)은 2-, 4-, 8-세포 배아(각각 56.9%, 70.0%, 79.2%)에 비해 발생률이 유의하게( $p < 0.05$ ) 낮았고, 2-세포 배아(56.9%)는 8-세포 배아(79.2%)에 비해 발생률이 유의하게( $p < 0.01$ ) 낮았다. DMSO 처리 군에서는 수정란(48.1%)에 비해 2-, 4-, 8-세포 배아(각각 75.0%, 66.2%, 83.1%)에서 발생률이 유의하게(각각  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) 점점 증가하였다. 또한 8-세포 배아(83.1%)는 4-세포 배아(66.2%)에서 비해 발생률이  $p < 0.05$ 로 유의하게 높았다(그림 2).

## 3. 결빙억제제에 따른 배아의 발생률

배아 세포에 대한 결빙억제제의 상해는 결빙억제제의 종류, 처리 시간, 그리고 농도에 따라 다르게 나타난다. 수정란은 4단계 처리 군에서 DMSO군이 48.1%, PROH군이 30.4%

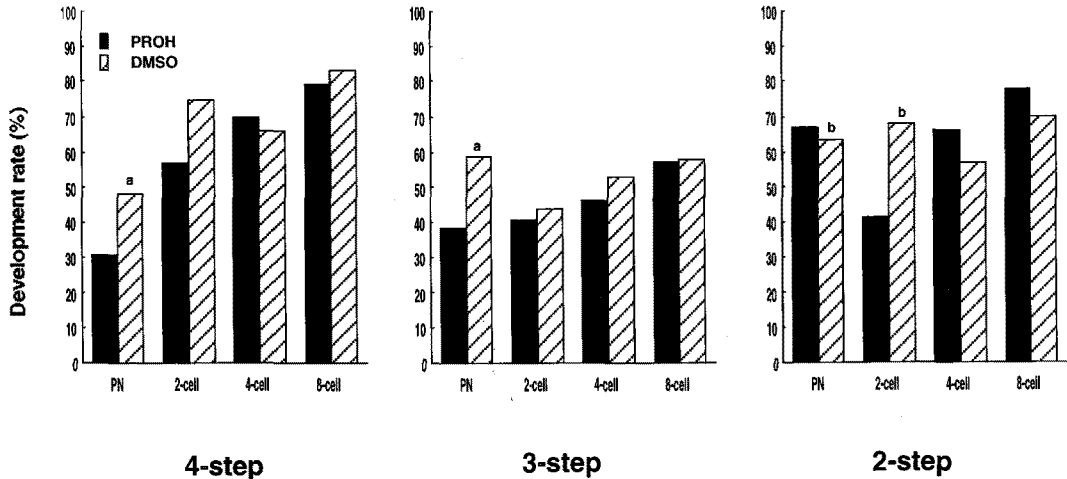


Fig. 2. The development to blastocyst of frozen-thawed mouse embryos according to cyroprotectant(a;  $p < 0.05$ , b;  $p < 0.01$ ).

로 DMSO군에서 발생률이 유의하게( $p < 0.05$ ) 높았고, 3단계에서도 동일한( $p < 0.01$ ) 결과를 얻었다. 그러나 2단계에서는 PROH군이 66.7%로 DMSO군에 비해 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았다(그림 2).

2-세포 배아의 경우 4단계와 3단계에서는 결빙억제제간에 유의한 차이가 없었으나 2단계에서 DMSO(67.9%)가 PROH(41.4%)에 비해 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았다(그림 2). 그러나 4-, 8-세포 배아에서는 결빙억제제에 대한 유의성은 없었다(그림 2). 따라서 수정란에서는 PROH, 2-세포 배아에서는 DMSO, 4-세포 배아 이상에서는 어느 것을 사용해도 될 것이다.

## 고 찰

결빙억제제의 처리단계와 시간을 줄이는 등 착상전 배아의 냉동보존에 간단하고 빠른 방법을 개발하려고 많은 연구가 진행되어 왔다(Kasai et al., 1980; Takahashi and Kanagawa, 1985; lasalle et al., 1985; Mandelbaum et al., 1987; Shaw et al., 1987; Shaw et al., 1991; Dury et al., 1991). 배아의 냉동과정중 식빙은  $-6^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 유지(Kim et al., 1987)하고, 식빙후 유지시간을 생략하기도 하므로(Mandelbaum et al., 1988) 본 실험에서는 10분간 유지하였다.

배아의 냉동보존 과정에서 배아에게 결정적인 상해를 입히는 얼음 결정의 형성이  $-32^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 일어나므로(Rall et al., 1983) 본

실험에서는 세포냉동기내에서 서서히  $-50^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각하여 직접 액화결소에 넣어 보존하였다. 또한 냉동보관하는 용기로는 plastic straw를 이용하였는데 유리관병에 비해 열전도율은 떨어지나 다루기 쉽고 입구를 봉하기 쉬워서 시간을 단축할 수 있으며 해빙시 파열되는 현상이 없어 배아의 회수율을 높일 수 있었다.

수정은 난막의 구조적 변화와 전기적 성질을 변화시키며, 발생 시기와 세포주기에 따라 세포막에서는 물질투과성과 세포골격(cytoskeleton) 변화가 일어난다. 이에 따라 물과 용질의 투과성, 냉동속도와 세포내 얼음결정 형성등 물리적 냉동보존요인에 대한 적응 변화가 야기된다(Jackowski, 1977; Fuller and Bernard, 1986; Gook et al., 1993). 배아시기에 따른 발생률은 수정란의 경우는 2단계에서, 후기 배아의 경우는 4단계에서 생존율(data not shown) 및 발생률이 높게 나타났다(표 1). 2-, 4-, 8-세포 배아에서는 4단계, 2단계가 3단계에 비해 높게 나타났으며 4단계가 2단계에 비해 높은 경향을 보였다(표 1). 또한 결빙억제제에 따른 발생률이 수정란의 경우 2단계에서 PROH에서 DMSO보다 발생률이 유의하게 높았으며(그림 2) 이는 PROH를 결빙억제제로 사용시 수정란 배아가 8-세포기 배아나 그 이후의 배아보다 민감성이 없다는 보고(Lassalle et al., 1985)와 일치하는 결과이다.

결빙억제제 처리는 본 실험에서 단계에 따라 40-20분간으로 단계에 따라 생존률이 70% 이상을 보였으며, 이는 40-20분에서 좋은

결과를 준다는 보고(Shaw et al., 1991)와 일치한다. 배아의 시기에 따른 세포분열 관련 세포내 소기관들의 결빙억제제에 대한 민감성 (Al-Hasani et al., 1992)은 결빙억제제의 화학적 특성 및 처리 방법에 따라 영향을 받을 수 있기 때문에 사려된다.

따라서 배아의 냉동보존은 본 연구의 결과 수정란은 2단계, 2-세포 이상의 배아는 4단계가 가장 좋으리라 사려된다. 결빙억제제에 있어서 수정란에는 PROH, 2-세포배아에는 DMSO, 그리고 4-세포 이후 배아에는 PROH나 DMSO를 선택하는 것이 문제가 되지 않으리라 사려된다.

## 결 론

본 실험은 생쥐 수정란 및 초기배아의 냉동보존에 있어 배아의 시기, 결빙억제제의 종류 및 처리 단계가 생쥐 초기배아의 생존 및 발생에 미치는 영향을 알아봄으로써, 배아 발생률을 향상시키는 방법을 개발하고자 본 실험을 시행하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 결빙억제제의 처리단계로 볼 때 수정란의 경우 2단계가 가장 좋았으며, 2~8-세포배아에서는 4단계가 가장 좋았다.

2. 냉동 보존한 배아의 생존 및 발생률은 수정란에서 부터 8-세포 배아에 이르기까지 점진적으로 높아졌다. 따라서 배아의 시기는 8-세포기가 가장 적합하였다.

3. 냉동보존한 배아의 생존 및 발생률에 좋은 결빙억제제는 수정란에는 PROH, 2-세포배아에는 DMSO, 4-세포기 이후의 배아에는 PROH나 DMSO도 좋은 것으로 사려된다.

## 인 용 문 헌

- Al-Hasani S, Hepnar C, Diedrich K, van der Ven H, Krebs D: Cryopreservation of rabbit zygotes. *Hum Reprod* 1992, 7, 81-83.
- Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG: The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel Jr. JC ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: Freeman and Co., 1971, 86-116.
- Brinster RL: A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963, 32, 205-208.
- Choe KW, Lee HJ, Kang HK, Cheon YP, Kim MK: Study on the survival of frozen-thawed mouse oocytes according to maturation stage and cryoprotectants. *Kor J Fertil Steril* 1991, 18, 55-61.
- Dury K, Silverman J, Cook C: Live birth using an ultra-rapid two step embryo freezing method. *Hum Reprod*, Abstracts of the 7th World Congress on IVF and Assisted Procreations, Paris, 30 June-3 July, 1991, p. 202.
- Fuller BJ, Bernard A: The relationship between intracellular glycerol permeation and survival following cryopreservation of the vitro fertilized 2-cell murine embryo. *Cryo-Letters* 1986, 7, 257-259.
- Gook DA, Osborn SM, Johbston WIH: Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1, 2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993, 8, 1101-1109.
- Jackowski SC: Physiological differences between fertilized and nufertilized mouse ova: Glycerol permeability and freezing sensitivity. Ph. D. Thesis. University of Tennessee. Knoxville, TN, 1977.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A: Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J Reprod Fertil* 1980, 59, 51-56.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A: Survival of rat embryos after freezing. *J Reprod Fert* 1982, 66, 367-370.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A: Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0°C. *J Reprod Fert* 1983, 68, 377-380.
- Kim MK, Lee HJ, Lee SJ, Jun JY: Effects of warming rate and degenerated blastomere (s) on development of frozen and thawed mouse embryos. *Kor J Fertil Steril* 1987, 14, 51-59.
- Lassalle B, Testart J, Renard J: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2-propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645-651.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski C: Factors af-

- fecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 1974, 89, 79-88.
- Leibo SP, McGrath JJ, Gravalho EG: Microscopic observation of intracellular ice formation in mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1978, 15, 257-271.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988, 3, 117-119.
- Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, Plachot M, Alnot MO, Rin H, Salat-Baroux J, Cohen J: Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. *Annals New York Academy of Sciences* 1987, 551-561.
- Mazur P: Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963, 47, 347-369.
- Mazur P: Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 1984, 16, 125-142.
- McGann LE, Turner AR, Alalunis MJ, Turc JM: Cryopreservation of human peripheral blood stem cells: Optimal cooling and warming conditions. *Cryobiology* 1981, 18, 469-472.
- Mohr LR, Trounson A: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* 1981, 25, 1009-1025.
- Polge C, Willadsen SM: Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology* 1978, 15, 370-373.
- Rall WF, Mazur P, McGrath JJ: Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethylsulfoxide. *Biophys J* 1983, 41, 1-12.
- Shaw JM, Diotallevi L, Trounson AO: A simple rapid 4.5 M dimethyl-sulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 1991, 3, 621-626.
- Takahashi Y, Kanagawa H: Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapour: effects of sugar. *Jap J Vet Res* 1985, 33, 141-144.
- Trounson A, Peura A, Kirby C: Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987, 48, 843-850.
- Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C: Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 822-826.
- Whittingham DG, Anderson E: Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos. *J Reprod Fert* 1976, 48, 137-140.
- Wilson L, Quinn P: Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Hum Reprod* 1989, 4, 86-90.
- Wood NJ, Farrant J: Brief communications: Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* 1980, 17, 178-180.