동결보존시 생쥐전핵배아의 시기에 따른 생존율과 발생율의 비교

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실*

김희선, 류범용, 오선경, 서창석*, 김석현*, 최영민*, 김정구*, 문신용*, 이진용*

Effects of Pronuclear Age for Freezing in Mouse Embryos Survival and Development in Vitro after Cryopreservation

H.S. Kim, B.Y. Ryu, S.K. Oh, C.S. Suh*, S..H Kim*, Y.M. Choi*, J.G. Kim*, S.Y. Moon* and J.Y. Lee*

Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center

Department of Obstetrics and Gynecololgy, College of Medicine,*

Seoul National University, Seoul, Korea

= Abstract =

This study was designed to evaluate the influence of pronuclear age on the survival and post-thawing development after cryopreservation of mouse embryos.

Freezing and thawing were performed in the different pronuclear stages of mouse embryos after IVF. Embryos were obtained from F_1 hybrid mice and classified into 4 groups according to the pronuclear stage (6hr, 9hr, 12hr and 15hr after insemination). Pronuclear ova were slowly cooled in a biological freezer using 1.5M 1,2-propanediol and 0.1M sucrose as cryoprotectant. Thawing was done at room temperature and 1,2-propanediol was removed by multi-step dilutions. Both frozen-thawed embryos and control fresh embryos were cultured in vitro in Ham's F-10 medium supplemented with 4mg/ml BSA.

In control group, the development rate after 48hr was 99.3%, and the complete hatching rate after 144hr was 61.3%. In experimental groups, the survival rate after thawing was 95.4% in 6hr, 88.7% in 9hr, 75.2% in 12hr and 62.4% in 15hr after insemination, the development rate after 48hr was 61.1, 77.0, 67.0 and 79.6%, respectively, and the complete hatching rate after 144hr was 25.7, 43.7, 42.2 and 60.0%, respectively. The survival rate in 15hr was significantly lower ($p<0.05$) compared with other groups. In vitro development rates after 48hr were similar in all groups, but complement hatching rate was significantly lower ($p<0.05$) in 6hr group.

In conclusion, cryopreservation of mouse pronuclear ova with 2 distinct pronuclei (9hr and 12hr groups) showed better results after thawing compared with early (6hr group) or late pronuclear ova just prior to cleavage (15hr group).

서 론

체외수정 및 배아이식에 있어서 과배란 유도 방법의 발달로 많은 수의 난자 및 배아를 얻게됨에 따라 이식에 필요한 적정수의 배아를 제외한 잉여 배아에 대한 동결보존방법이 활발하게 연구개발되어져 왔다 (Fehilly et al., 1985; Al-Hasani et al., 1987; Siebzehnruebl, 1989).

포유동물의 배아는 발생 단계에 따라 여러종류의 동결보존액이 사용되고 있으며, 다양한 동결 및 해빙방법이 보고되고 있다 (Mandelbaum et al., 1988; Trounson et al., 1988; Wilson et al., 1989; Macas et al., 1991). 4세포기에서 8세포기 배아의 동결보존액으로는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하고 (Fehilly et al., 1985) 전

핵시기의 배아와 4세포기 이전의 초기 배아는 1,2-propanediol (PROH)를 이용하는 것이 (Lassalle et al., 1985) 적합한 것으로 보고되고 있다. Van der Auwera등 (1990)은 PROH를 이용하여 전핵시기의 배아를 동결할 경우 급속동결보다는 저속에 의한 동결방법이 초기배아의 생존율을 보다 높일 수 있는 것으로 보고하고 있다.

최근 인간의 체외수정 및 배아이식에 있어서 잉여배아의 동결보존은 분열시기의 배아보다는 전핵시기의 배아를 동결보존하는 것이 보다 안정적이고, 임신율도 높은것으로 보고하고 있다 (Testart et al., 1986; Fugger et al., 1988; Cohen et al., 1988). 그러나 전핵시기는 전핵의 이동 및 융합등 세포학적으로 불안정한 시기이며 이 시기에는 세포질 내 세포골격의 재배열이 왕성하게 일어나는 것으로 보고되고 있다 (Schatten et al., 1985; Wright et al., 1990).

본 연구는 생쥐를 이용하여 전핵이 처음 형성되어 2세포기로 분열하기 직전까지의 세포질 내 세포골격의 상태가 다른 전핵시기를 동결 및 해빙하여 그 생존율과 발생율을 비교하여 동결에 가장 적합한 전핵배아의 시기를 알아보고자 실행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 생쥐 제 1세대 잡종 (C57BL ♀× CBA ♂)으로 생후 6-8주된 암컷과 12주된 생식력이 확인된 수컷을 사용하였다. 이들을 명기와 암기가 조절되는 (12시간 : 12시간) 사육실에서 사육하였다. 과배란 유도를 위해 7.5 I.U.의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 생쥐암컷에 복강 주사하고 48시간 후 5 I.U.의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 복강주사하였다.

2. 전핵배아의 획득

전핵배아는 체외수정과정을 통해 획득하였다. 수정능력이 확인된 12주령의 수컷생쥐를 경추 탈구법으로 희생시키고 부정소 미부와 정관 부위를 분리하여 Ham's F-10 배양액에 넣었다. 26G 주사침으로 정자괴를 유리시켜 이를 5% CO_2가 공급되고 37℃가 유지되는 배양기에서 10분간 배양하였다. 상층액 부분 0.5ml을 0.4% BSA (bovine serum albumin)가 첨가된 Ham's F-10배양액에 옮긴 후에 10분이상 수정을 시키는 시간까지 배양하였다.

HCG 주사 후 14시간에 암컷생쥐를 경추탈구법으로 희생시키고 양쪽 난관을 분리하여 Ham's F-10에 0.4% BSA가 첨가된 배양액이 담긴 배양접시로 옮겼다. 해부현미경하에서 난관의 팽대부를 26G 주사침으로 찢어 난자-난구세포를 얻었다. 이들을 세번의 세척과정을 거친 후에 Ham's F-10에 0.4% BSA가 2ml들어있는 수정용 배양접시 (Falcon #3037)에 모았다.

준비된 수정능력을 획득한 정자의 부유액을 수정용 배양접시에 10^5 - 10^6 / ml의 농도씩 넣어 수정을 시켰다.

수정 후 6시간에 전핵이 확인되는 전핵배아를 골라 이들을 계속 배양하면서 수정 후 전핵이 처음보이기 시작하는 6시간 (Fig. 1), 두개의 전핵이 뚜렷하면서 세포질의 양끝에 멀리 떨어져있는 9시간 (Fig. 2), 두개의 전핵이 뚜렷하면서 근접한 12시간 (Fig. 3) 그리고 두개의 전핵이 융합되는 15시간 (Fig. 4)에 각각 동결을 시행하였다. 수정 후 16시간 부터는 2 세포기로 진행되는 배아가 관찰되었다 (Table 1).

3. 배아의 동결 및 해빙

배아의 동결보존액으로는 20% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 D-PBS에 1.5M PROH와 0.1M sucrose를 첨가하여 사용하였다.

배아를 동결보존액에 10분간 노출시켜 탈수화를 유도한 후 0.25ml plastic straw에

7개에서 10개씩의 배아를 넣어 자동 세포동결기 (Kryo - 10, Planer)에서 동결하였다.

10℃에서 -7℃까지는 분당 -2℃씩 냉각시키고 -7℃에서 5분간 정지시키고 정지 1분 후 과냉각을 방지하기 위하여 액체질소에서 냉각된 핀셋으로 식빙 (seeding)을 시행하였다. -7℃에서 -30℃까지는 분당 -0.3℃씩 냉각하였으며 -30℃에서 10분간 정지 후 액체 질소통에 넣어 보존하였다.

배아의 융해는 동결된 straw를 액체질소통에서 대기중으로 옮겨 20초간 노출시킨 후 straw표면의 물기를 제거한 다음 알코올을 묻힌 거즈로 닦아 소독하였다. Straw내의 배아와 동결보존액을 배양접시에 부어 해부현미경하에서 배아의 수를 확인한 후 융해액으로 옮겼다.

기본 융해액은 20% FBS가 포함된 D-PBS로 하여 첫 단계에서는 1.0M PROH와 0.2M sucrose용액에서 5분간, 두번째 단계에서는 0.5M PROH와 0.2M sucrose용액에서 5분간, 세번째 단계에서는 0.2M sucrose용액에서 5분간 노출시키고 마지막 단계에서는 기본 융해액에서 5분간 두었다. 해부 현미경하에서 세포질과 투명대가 밝고 온전한 배아를 생존한 것으로 판정하였고, 생존한 배아는 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10배양액에서 배양하였으며 24시간마다 발생을 관찰하였다.

4. 통계처리

본 실험의 통계적인 유의성 검정은 student's t-test 방법으로 실시하였으며, p값이 0.05보다 작은경우 유의성이 있는것으로 판단하였다.

결 과

수정 후 6시간, 9시간, 12시간, 15시간에 동결을 시행하여 융해하였을 때 회수율은 모두 100%를 나타냈고 생존율은 각각 95.36%, 88.73%, 75.17%, 62.42%를 나타냈다 (Table 2). 생존율에 있어서 15시간군이 다른군에 비하여 유의하게 낮았다 ($p<0.05$).

생존된 배아를 24시간동안 배양하였을 때 2세포기까지의 발생율은 대조군이 100%, 6시간은 93.75%, 9시간은 97.62%, 12시간은 88.07%이고 15시간은 98.98%로 나타나 대조군과 비교하였을 때 실험군에서 유의한 차가 없었다. 그러나 생존된 배아를 48시간 동안 배양하였을 때 4세포기까지의 발생율은 대조군이 99.30%, 6시간은 61.11%, 9시간은 76.98%, 12시간은 66.97%이고 15시간은 79.59%를 보여 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 낮았다 (Table 3, $p<0.05$).

생존된 배아 중 배양 96시간에 포배기로 발생한 비율은 대조군이 95.77%, 6시간은 49.30%, 9시간은 73.01%, 12시간은 70.04%이고 15시간은 90.82%였으며 48시간 더 배양했을 때 완전히 탈각한 부화율은 각각 61.27%, 25.69%, 43.05%, 42.20%, 60.20%로 나타났다 (Table 4). 발생율과 부화율에 있어서 수정 후 6시간에 동결한 군이 가장낮은 비율을 보였다.

고 찰

체외수정 및 배아이식에 있어서 잉여 난자 및 배아의 동결보존 방법이 활발하게 연구되어져 왔다. 포유동물의 배아는 발생단계에 따라 여러 동결보존액이 사용되고 있으며 다양한 동결 및 해빙방법이 보고되고 있다. 인간의 체외수정 및 배아이식에 있어서 잉여 배아의 동결보존은 전핵시기에 시행하는 것이 분열시기보다 안정적이고 임신율도 높은것으로 보고하고 있다 (Testart et al., 1986 ; Fugger et al., 1988 ; Cohen et al., 1988). 그러나 전핵시기는 전핵의 이동 및 융합 등 세포학적으로 불안

정한 시기이며 이 시기에는 세포질 내 세포골격의 재배열이 일어나는 것으로 보고되고 있다 (Schatten et al., 1985; Wright et al., 1990).

본 실험은 이러한 불안정한 시기인 전핵시기 중에서 동결 및 해빙에 적합한 시기를 알아보고자 생쥐를 이용하여 전핵시기를 수정 후 6시간, 9시간, 12시간 그리고 15시간으로 나누어 각 시기에 따른 동결 및 해빙 후의 그 생존율과 발생율을 비교하였다.

각 시기에 따른 회수율은 모두 100%를 나타내었고 생존율은 분열직전인 15시간군에서 다른군에 비해 유의하게 낮은 생존율을 보였다 (62.42%, $p < 0.05$). 이것은 Chedid 등 (1992)이 두개의 전핵이 보이는 휴지기 1세포기에 동결하는 것이 세포분열시기의 1 세포기를 동결하는 것보다 생존율이 높다는 보고와 일치한다.

생존된 배아의 해빙 후 24시간이 지난 후 2 세포기로의 발생율을 보았을 때 대조군과 실험군간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 해빙 후 48시간이 지난 후 4세포기로의 발생율은 대조군에 비해 실험군의 발생율이 유의하게 낮은 경향을 보였다 ($p < 0.05$). 이것은 1 세포기에서 2 세포기로의 첫번째 세포분열은 동결에 의해 영향을 받지 않는 것으로 보이나 정자에 있는 중심립에 의해 영향받는 (Rugh, 1990) 4세포기로의 두번째 분열은 전핵시기의 동결에 의해 영향을 받는 것으로 사료된다.

융해 후 생존된 배아의 포배기로의 발생율과 부화율을 비교하여 보았을 때 수정 후 15시간에 동결한 군은 대조군과 유의한 차가 없었으나 6시간, 9시간 그리고 12시간군에서 유의하게 낮았다. 특히 전핵 내 DNA합성이 왕성하게 일어나기 시작하는 6시간군에서 가장낮은 발생율과 부화율을 보였다. 이것은 전핵내 DNA합성시기를 피하여 동결하는 것이 보다 좋은 결과를 얻을 수 있다는 Balakier등 (1993)의 보고와 같은 결과를 보여준다. 2개의 전핵이 뚜렷이 보이고 전핵이 이동하는 단계인 9시간과 12시간군의 경우 비슷한 발생율 (73.01% / 70.64%)과 부화율 (43.65% / 42.20%)을 보여주는 것으로 보아 두개의 전핵이 세포질내 양끝에서 형성되어 중앙으로 이동을 하는

전핵시기가 동결에 비교적 안정적인 것으로 사료된다.

위의 결과 생쥐 전핵시기 배아의 동결은 그 시기에 따라 생존율, 발생율 그리고 부화율에 다른 결과를 나타내었다. 전체적인 배아의 발생을 종합하여 볼때 전핵이 처음 보이기 시작하는 시기와 전핵이 소실된 분열직전의 시기보다는 뚜렷한 두개의 전핵이 보이면서 이동하는 시기가 좀 더 유용할 것으로 판단된다. 따라서 인간의 전핵시기 배아를 PROH를 사용하여 동결할 때도 또한 동결의 시기가 그 생존율과 발생에 중요한 요인이 될 수 있음을 알 수 있다.

결 론

본 연구는 생쥐를 이용하여 전핵이 처음 형성되어 2세포기로 분열하기 직전까지 상태가 다른 전핵시기를 동결 및 해빙하여 그 생존율과 발생율을 비교함으로써 동결에 가장 적합한 전핵배아의 시기를 알아보고자 시행하였다.

본 연구의 결과는 다음과 같다.

1. 수정 후 6시간, 9시간, 12시간, 15시간에 동결을 시행하여 융해하였을 때 회수율은 모두 100%를 나타냈고 생존율은 각각 95.36%, 88.73%, 75.17%, 62.42%로 나타났다.

2. 생존된 배아를 24시간동안 배양하였을 때 2세포기까지의 발생율은 대조군이 100%, 6시간은 93.75%, 9시간은 97.62%, 12시간은 88.07%이고 15시간은 98.98%로 나타났다.

3. 생존된 배아를 48시간동안 배양하였을 때 4세포기까지의 발생율은 대조군이 99.30%, 6시간은 61.11%, 9시간은 76.98%, 12시간은 66.97%이고 15시간은 79.59%이었다.

4. 생존된 배아 중 배양 96시간에 포배기로 발생한 비율은 대조군이 95.77%, 6시간은 43.75%, 9시간은 73.01%, 12시간은 70.04%이고 15시간은 90.82%였으며 48시간 더 배양

했을 때 완전히 탈각한 배아율은 각각 61.27%, 25.69%, 43.05%, 42.20%, 60.20%**로 나타났다**.

이상의 결과 생쥐 전핵배아의 동결보존시기는 생존율과 발생율을 비교하여 볼때 전핵이 처음 형성되어 보이기 시작하는 시기 (수정 후 6**시간)와 전핵이 소실되어** 2**세포기로 분열하기 직전의 시기 (수정 후** 15**시간)보다는 뚜렷한 두개의 전핵이 보이면서 이동하는 시기 (수정 후** 9**시간**, 12**시간)가 유용할 것으로 사료된다**.

참 고 문 헌

Al-Hasani S, Diedrich K, van der Van H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D : Cryopreservation of human oocytes. Hem Reprod 1987, 2, 695-700.

Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF : Characterization of the first cell cycle in human zygotes : implications for cryopreservation. Fertil Steril 1993, 59, 359-365.

Chedid S, Van den Abbeel E, Van Steirteghem AC : Effects of cryopreservation on survival and development of interphase- and mitotic-stage 1-cell mouse embryos. Hum Reprod 1992, 7, 1451-1456.

Cohen J, De vane G, Fehilly C, Kort H, Massey J, Turner T : Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. Fertil Steril 1988, 49, 283-289.

Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG : Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human : a comparative study. Fertil Steril 1985, 44, 638-643.

Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfman AD, Bender SD, Schulman JD :

Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. Fertil Steril 1988, 50, 273-278.

Lassalle B, Testart J, Renard J : Human embryos features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. Fertil Steril 1985, 44, 645-651.

Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B, Ruelicke T : Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods. J IVF & ET 1991, 8, 208-212.

Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MD, 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.

Rugh R : Normal development of the mouse. The mouse, New York : Oxford University Press, 1990, 44-101.

Schatten G, Simerly C, Schatten H : Micrituble configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtuble-mediated motility during mammalian fertilization. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82, 4152-4156.

Siebzehnruebl ER : Cryopreservation of gametes and cleavage stage embryos. Hum Reprod 1989, 4, 105-110.

Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazoult A, Forman R, Rainborn JD, Frydman R : High pregnancy rate after early human embryo freezing. Fertil Steril 1986, 46, 268-272.

Trounson A, Peura A, Kirby C : Ultrarapid freezing of early cleavage stage human

embryos and eight-cell mouse embryos. Fertil Steril 1988, 49, 822-826.

Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR : Cryopreservation of pronucleate mouse ova : slow versus ultrarapid freezing. Hum Reprod 1990, 5, 619-621.

Wilson L, Quinn P : Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. Hum Reprod 1989, 4, 86-90.

Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J : Observations on the morphology of pronuclei and nucloli in human zygotes and implications for cryopreservation. Hum Reprod 1990, 5, 109-115.

Table 1. Cell division in mouse zygotes after insemination

	16hr	16.5hr	17hr	17.5hr	18hr	18.5hr
2PN	71	50	34	11	5	0
2-cell	3	24	40	63	69	74

Table 2. Number of morphologically intact embryos after freezing and thawing of 6hr, 9hr, 12hr and 15hr after insemination

	6hr	9hr	12hr	15hr
No. of frozen embryos	151	142	145	157
No. of recovered embryos (%)	151 (100)	142 (100)	145 (100)	157 (100)
No. of survived embryos (%)	144 (95.36)	126 (88.73)	109 (75.17)	98* (62.42)

* ; $p<0.05$

Table 3. Development rates of control and experimental groups after 24hr and 48hr in-vitro culture

	control	6hr	9hr	12hr	15hr
No. of 2-cell embryos at 24hr (%)	142 (100)	135 (93.75)	123 (97.62)	96 (88.07)	97 (98.98)
No. of 4-cell embryos at 48hr (%)	141 (99.30)	88* (61.11)	97* (76.98)	73* (66.97)	78* (79.59)

* ; $p<0.05$

Table 4. Development rates of control and experimental groups after 96hr and 144hr in-vitro culture

	control	6hr	9hr	12hr	15hr
No. of blastocysts at 96hr (%)	136 (95.77)	71* (49.30)	92* (73.01)	77* (70.64)	89 (90.82)

No. of complete hatched embryos at 144hr (%)	87 (61.27)	37** (25.69)	55** (43.65)	46** (42.20)	59 (60.02)

*, ** ; $p < 0.05$

Fig 1. 1-cell stage embryos collected 6hours after insemination (X10)

Fig 2. 1-cell stage embryos collected 9hours after insemination (X10)

Fig 3. 1-cell stage embryos collected 12hours after insemination (X20)

Fig 4. 1-cell stage embryos collected 15hours after insemination (X20)