大韓不妊學會誌: 第29卷 第4號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 4, 2002, 12

생쥐 난자의 초자화동결 시 Cytochalasin B가 Cytoskeleton에 미치는 영향

경상대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 경상대학교병원 불임 유전 연구실[2]

백원영[1,2] · 최원준[1,2] · 김세나[2] · 이종학[1,2]

The Effect of Cytochalasin B on Cytoskeletal Stability of Mouse Oocyte Frozen by Vitrification

Wong Young Paik[1,2], Won Jun Choi[1,2], Se Na Kim[2], Jong Hak Lee[1,2]

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Gyeongsang National University[1], Laboratory of Infertility and Genetics, Gyeongsang National University Hospital[2], Jinju, Korea

Objective: The purpose of this study was to evaluate the effect of Cytochalasin B (CCB) on the cytoskeletal stability of mouse oocyte frozen by vitrification.

Methods: Mouse oocytes retrieved from cycle stimulated by PMSG and hCG were treated by CCB and then vitrified in EFS-30. These oocytes were placed onto an EM grid and submerged immediately in liquid nitrogen. Thawing of the oocytes was carried out at room temperature for 5 seconds, then the EM grid was placed into 0.75 M, 0.5 M and 0.25 M sucrose at 37℃ for 3 minutes, each. These oocytes were fixed in 4% formaldehyde for an hour and then washed in PPB for 15 minutes 3 times, then incubated in PPB containing anti-tubulin monoclonal antibody at 4℃ overnight. And then, the oocytes were incubated with FITC-conjugated anti-mouse IgG and propidium iodide (PI) for 45 minutes. Pattern of microtubules and microfilaments of oocytes were evaluated with a confocal microscope.

Results: The rate of oocytes containing normal microtubules and microfilaments was significantly decreased after vitrification. The rate of oocyte containing normal microtubules in CCB treated group was higher than those in non-treated group (53.7% vs. 48.9%), but the difference was not significant. The rate of oocyte containing normal microfilaments in CCB treated group was significantly higher than those in non-treated group (64.5% vs. 38.3%, $p<0.05$).

Conclusion: Microfilaments stability could be improved by CCB treatment prior to vitrification. It is suggested that CCB treatment prior to vitrification improve stability of cytoskeleton and then increase success rate in IVF-ET program using vitrification and thawing oocyte.

Key Words: Cytochalasin B, Vitrification, Cytoskeleton, Microtubule, Microfilament

난자의 동결보존은 배아의 동결보존으로 인해 발생되는 여러 가지 윤리적인 측면과 법률적인 측면의 문제점을 해결할 수 있고, 항암 약물 치료 등으로 난소 기능을 잃을 것으로 예측되는 여성들에게 생식력을 연장시킬 수 있는 장점이 있다. 그리고 조기 폐경이나 유전적 이상 등으로 난자를 공여 받아야 하는 경우에도 유용하게 이용될 수 있으며 한번의 난자 채취로 여러 번의 배아이식을 시행함으로

주관책임자: 백원영, 우) 660-702 경남 진주시 칠암동 90번지, 경상대학교병원 산부인과
Tel: (055) 750-8152, Fax: (055) 759-1118, e-mail: wypaik@gshp.gsnu.ac.kr

써 체외수정술에 필요한 시간과 경비를 줄이는 효과도 기대할 수 있다.

난자의 동결보존은 최근까지 여러 연구자들에 의해 시도되었으며, 인간의 난자를 동결보존한 후 정상아 출생을 보고한 연구 결과도 있지만 아직까지 난자 동결보존에 대한 확실한 방법은 확립되어 있지 않다. 현재 사용되고 있는 동결 방법의 종류로는 완만동결법, 급속동결법, 초자화동결법으로 구별되고 있으며, 최근에 사용 빈도가 증가되고 있는 초자화동결법은 고농도의 동결보존액을 첨가하여 점성을 증가시켜 배아 손상의 주원인인 세포 내외의 빙결 형성을 방지하고 빠른 동결이 가능하여, 완만동결법의 단점인 세포 내 수분 소실로 인한 세포 내 전해질의 농도의 증가와 급속동결법의 단점인 세포 내에 빙결이 형성되는 문제점을 극복하고 있다. 최근 포유류 배아 및 난자의 동결보존에는 초자화동결법이 많이 사용되기 시작하고 있다.

난자의 동결보존에서 현재 가장 문제점으로 생각되는 것은 난자를 동결보존할 경우 매우 낮은 출생률이며 Mandelbaum 등은 생쥐 난자의 동결보존 후 수정 및 배아이식한 경우에서 매우 낮은 출생률을 보고하고 있다.[1] 난자가 동결보존을 거치게 되면 낮은 생존율과 발달률을 보이며 결국에는 낮은 출생률을 보이는 이유는 동결보존 후 난자 세포질의 과립막 조기 방출, 투명대의 구조적 손상 및 경화현상으로 설명되고 있으며 최근에는 microtubule의 손상으로 인한 염색체의 비분리, microfilament의 손상으로 인한 전핵의 이동과 극체 방출의 장애 등의 cytoskeleton의 장애로 설명되고 있다.[2~5]

난자의 cytoskeleon는 microtubule과 microfilament의 두 가지로 구성되어 있으며 포유류 난자의 수정 및 발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Microtubule은 수정 후 전핵의 형성 및 이동에 중요하게 작용한다고 생각되며, 주로 난자의 주변부에 위치하는 microfilament는 전핵의 형성 및 이동에 microtubule과 같이 관여하며 meiotic spindle의 역할에도 중요하게 작용한다고 생각되고 있다.[6] 그 외 microfilament는 세포 주변부에 위치하는 염색체의 polar body의 배출 등에 관여하는 등 난자의 수정 및 발달에 매우 중요한 역할을 하고 있다고 생각되어지고 있다.[7]

난자의 동결보존 후 발생하는 cytoskeleton의 손상을 방지하기 위해 난자의 동결보존 전에 특정 약물의 전처치로 cytoskeleton의 안정화를 유도하여 수정률 및 발달률을 향상시키려는 노력이 이루어지고 있다. Cytochalasin B (CCB)는 microfilament inhibitor로서 actin polimerization을 방해하고 세포질막을 보다 신축성 있게 만들어 cytoskeleton의 손상을 방지하는 작용이 있다고 알려져 있어[8,9] 동결보존 전 CCB의 처치는 동결보존 시 난자의 cytoskeleton을 안정화시켜 세포질막의 손상의 방지와 meiotic spindle 등의 보존에 중요하게 작용하여 수정률 및 발달률의 향상에 도움이 될 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 생쥐 난자의 초자화동결 후 cytoskeleton을 구성하는 microtubule과 microfilament의 손상을 형광 염색 후 현미경으로 관찰하여 평가하고 초자화동결 전 CCB의 전처치가 cytoskeleton 안정화에 어떤 영향을 주는지를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험 동물 및 난자의 준비

본 연구에서는 제 1대 잡종 (C57BL♀×CBA♂) 생쥐를 이용하였다. 광량 (명 : 암 = 12 : 12) 및 온도 (22℃) 조절과 환풍 시설이 갖추어진 사육실에서 사육된 생후 6~8주령의 암컷을 실험에 이용하였다.

난자 채취를 위하여 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma) 5 IU를 암컷 생쥐에 복강 내 주사하고, 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) 5 IU를 복강 내 주사하여 과배란 유도를 하였다. hCG 투여 14~16시간 후 경추 탈구법으로 희생시킨 후 양측 난관을 채취하였다. 채취된 난관을 수정용 배양액이 담긴 직경 35 mm의 petri dish에서 3회 세척한 후 실체 현미경 하에서 26 gauge 주사바늘로 난관 팽대부를 절제하여 난자-난구세포 복합체 (cumulus-oocyte complexes, COCs)를 회수하였다. 회수된 난자는 0.1% hyaluronidase 용액 (Sigma, H-3759, USA)이 함유된 배양액을 사용하여 난구세포를 제거하여 metaphase II인 난자만을 선별하여 수정용 배양액 2 ml가 들어 있는 petri dish에 옮겨 수정까지 37℃, 5% CO_2 배양기 내에서 배양하였다.

2. 난자의 동결보존 및 융해

Modified Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)에 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 기본용액 (basic solution)으로 사용하였으며, 난자의 동결보존액 (cryoprotectant)인 EFS는 기본용액에 ethylene glycol 30% (v/v) (EG, Sigma, E-9129)와 Ficoll-70 18% (w/v) (average molecular weight 70,000, Sigma, F-2878), 0.5 M sucrose (Sigma, S-1888)를 첨가하여 제조하였다. 난자를 동결하기 전에 20% EG가 첨가된 D-PBS (+ 10% FBS)에 5분 동안 노출시켜 탈수화평형 (dehydration equilibration)을 유도한 후 pasteur pipette을 사용하여 EFS에 30초간 침지하였다. 이후 즉시 멸균 여과지 위에 있는 electron microscope grid (EM grid, 400 mesh; Gilder, USA) 상에 난자를 올려놓은 다음 pincette을 사용하여 EM grid 상에 부착시키고 잉여의 EFS 용액이 제거되도록 하였다. 이어 난자가 부착된 EM grid를 -196°C의 LN_2에 침지함으로써 초자화동결을 하였다. 이때 EFS 동결용액에 침지부터 LN_2 침지까지 30초를 넘기지 않도록 하였다. 초자화동결된 난자는 최소 7일에서 최장 31일간 보관하였다.

초자화동결된 난자의 융해는 37°C의 0.75 M, 0.5M, 0.25 M sucrose가 첨가된 각각의 D-PBS 용액에 난자가 부착된 EM grid를 pincette을 사용하여 stepwise로 3분간씩 침지함으로써 난자의 재수화 (rehydration)를 하였다. 융해 후 난자가 부착된 EM grid는 10% FBS가 첨가된 D-PBS 용액으로 옮긴 다음 pasteur pipette을 사용하여 조심스럽게 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 신선 배양액으로 3회 세척한 다음 체외성숙용 배양액으로 옮겨 융해 2시간 후에 해부현미경 하에서 난자의 형태학적 관찰을 하여 세포질이 응집된 현상이 나타나지 않고 깨끗하며 위란강 (perivitelline space)이 넓지 않고 정상으로 모두 살아있고, 투명대가 밝고 온전한 난자만을 생존 난자로 판정하고 실험에 사용하였다.

3. 초자화동결 전 Cytochalasyn B (CCB)의 전처치

생쥐 난자의 CCB 처치를 위해 초자화동결 전에 미세구조 안정화 제재인 Cytochalasin B (CCB, Sigma, C-6762)를 5 ?g/ml의 농도로 10분간 노출시켰으며 처치 후에는 처치하지 않은 군과 같은 방법으로 초자화동결을 시켰다.

4. 난자의 미세구조 염색

과배란 유도된 난자는 아무 처치도 하지 않은 대조군과 동결보호제에 노출만 시키고 동결은 하지 않은 동결보호제 노출군, 동결보호제 노출 후 초자화동결을 시킨 초자화동결군으로 나누어 미세구조 염색을 시행하였으며, 동결에 의한 손상을 방지하기 위해 CCB를 동결 직전 처리한 CCB 전처치군과 전처치하지 않은 군으로 나누어 미세구조 염색을 시행하여 cytoskeleon의 안정도를 비교 평가하였다.

난구세포를 제거한 난자를 fix solution (4% formaldehyde, 30 ?l Triton X-100, 10 ml PBS)에서 1시간 동안 고정시킨 후 PPB (10 ml PBS/PVA, 0.1 g BSA, 1% (v/v) sodium azide)로 15분 동안 3회 세척을 하였다. 1% goat serum이 첨가된 PPB에 10분간 처리 후 anti-? /?-tubulin mono-clonal antibody (각각 1 : 100, Sigma, F-2168, F-2043)가 첨가된 PPB로 4°C에서 보관하였다 (overnight). 냉장 보관된 난자를 다시 PPB로 15분 동안 3회 세척한 후 FITC-conjugated anti-mouse IgG (1 : 40, Sigma, F-2772)가 첨가된 PPB에서 45분간 처리 후 PPB로 15분 동안 3회 세척하고, 10 ?g/ml propidium iodide (PI, Sigma, P-4170)가 첨가된 PPB에서 90분간 염색을 한 후 슬라이드 위에 올린 후 confocal microscope (flow view program, Olympus, Japan)를 사용하여 microtubule과 chromosome pattern을 확인하였다 (excitation 494 nm, barrier 518 nm for FITC; excitation 536 nm, barrier 617 nm for PI). Microfilament 염색을 위해 난자를 fix solution에서 1시간 동안 고정시킨 후 PPB로 15분 동안 3회 세척을 하였다. FITC-labelled phalloidin (10 ?g/ml)이 첨가된 PPB에서 90분간 둔 후 슬라이드 위에 올린 후 confocal microscope를 사용하여 microfilament pattern을 확인하였다.

5. 통계 처리

결과에 따른 통계학적 분석은 통계 프로그램인 SPSS 7.5 for window를 이용하였으며, 통계학적인유의성을 검증하기 위해 chi-square test를 사용하였다.

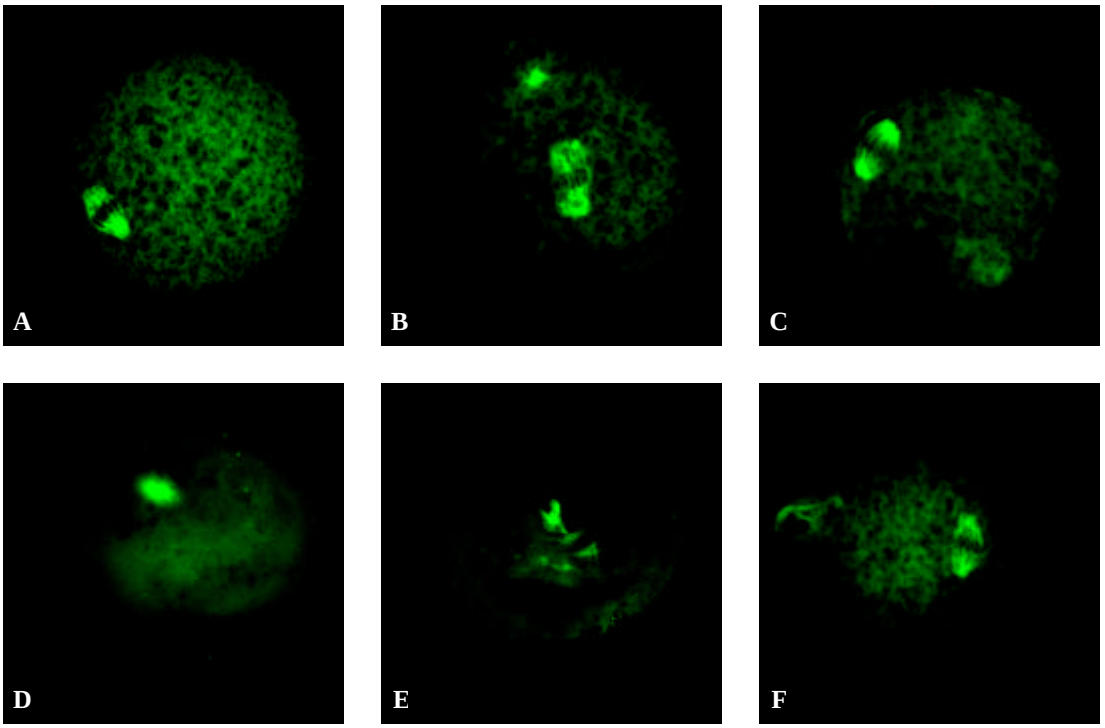

Figure 1. Immunocytochemical staining of microtubules by FITC. Confocal microscopic images of microtubules in the mouse oocyte. Green; microtubule. **A**, **B**, **C**; Microtubules in control oocytes were observed exclusively in the second meiotic spindle, which appeared barrel-shaped with chromosomes aligned at the equatorial plate. The spindle was localized cortically and parallel to the cell surface. **D**, **E**; Vitrified oocyte fixed immediately upon thawing. Microtubular staining demonstrated that oocytes underwent dramatic changes such as the appearance of numerous microtubular asters and a microtubular network formed by radiating arrays of these asters. **F**; CCB treated oocyte prior vitrification. Note the appearance of microtubule similar to the patterning observed from control oocyte.

결 과

초자화동결이 microtubule과 microfilament에 미치는 영향을 평가하기 위해 초자화동결군, 동결보호제 노출군, 대조군으로 나누어 현미경으로 형태를 평가하였으며, 초자화동결 전에 전처치한 CCB가 동결 융해 후 microtubule과 microfilament에 미치는 영향을 평가하기 위해 CCB를 전처치한 군, 전처치하지 않은 군, 대조군으로 나누어 평가하여 결과를 얻었다.

1. Confocal microscope 상에서 microtubule과 microfilament의 형태학적 관찰

Microtubule은 FITC를 사용한 면역화학 염색에서 초록빛으로 염색이 되며 모양이 barrel-shape으로 나타나는 것을 정상적인 형태로 판정하였으며 (Figure 1; A, B, C, F), barrel-shape 이외의 형태로 나타나는 것을 비정상적인 형태로 판정하였다 (Figure 1; D, E).

Microfilament는 FITC를 사용한 면역화학 염색에서 초록빛으로 세포질 내에 응집 없이 균등하게 분포하고 있는 것을 정상적인 형태로 (Figure 2; A, B), 세포질 내에 응집되어 관찰되거나 균등하지 않게 분포되어 있는 것을 비정상적인 형태로 판정하였다 (Figure 2; C, D). 그리고 PI에 염색된 염색질 (chromatin)은 적색으로 보이며 세포질 내의 일정한 장소에 모여 있었고 microfilament가 정상적인 형태를 보인 난자에서는 잘 관찰되었지만 비정상적인 형태를 보인 난자에서는 관찰되지 않은 경우가 많았다.

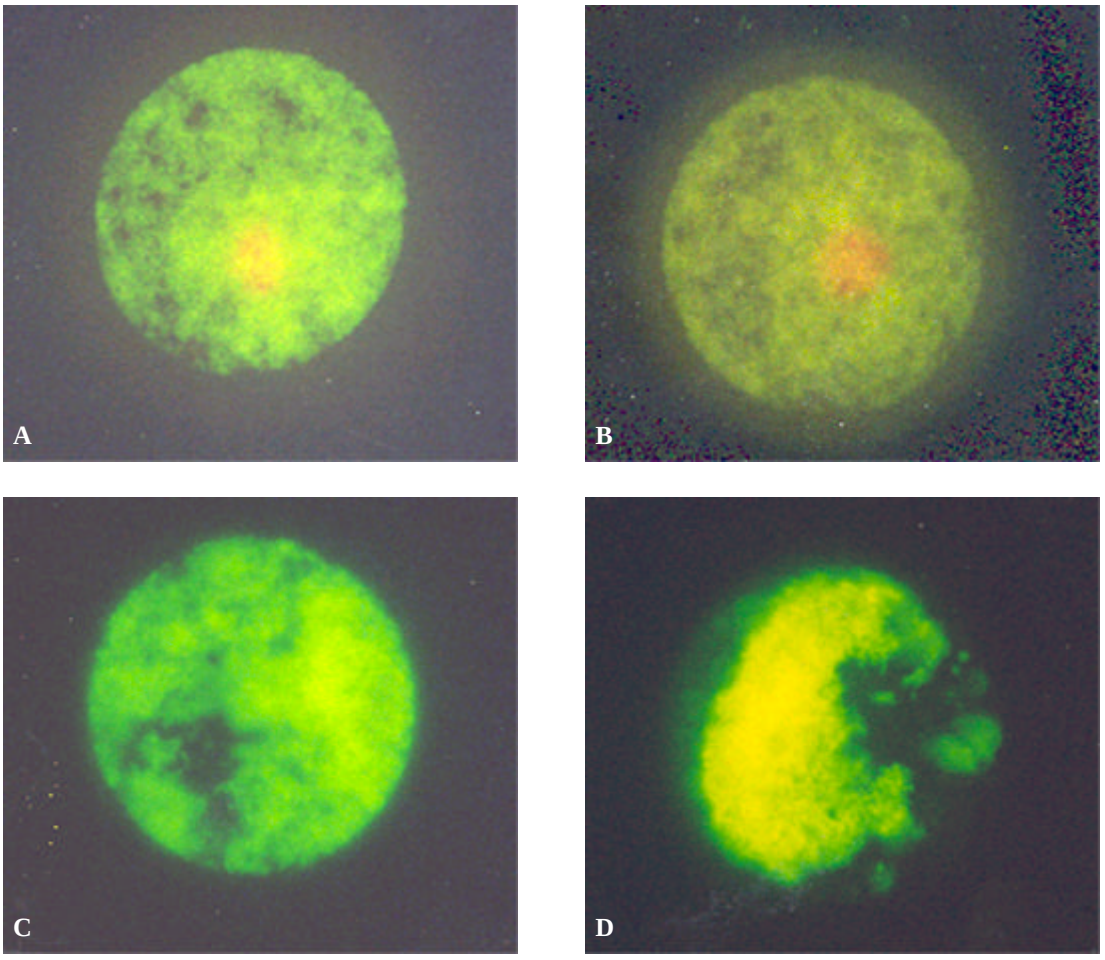

Figure 2. Immunocytochemical staining of microfilaments by FITC & PI. Confocal microscopic images of microfilaments and chromatin in the mouse oocyte. Green; microfilament, Red; chromatin **A**; Control oocyte exhibiting FITC-labelled phalloidin-stained filamentous actin that the shows intense microfilament localization at adjacent cell borders. **B**; CCB treatment before vitrification. The appearance of microfilament repolymerization similar to the patterning observed from control oocyte. **C** (partially reduced) & **D** (completely reduced); Microfilament formed large clumps in the cytoplasm suggesting that the depolymerized actin have aggregated following depolymerization.

2. 초자화동결이 microtubule과 microfilament에 미치는 영향

Microtubule의 정상적인 형태를 가진 난자는 동결보호제 노출군이 64.3%, 초자화동결군이 49.1%로 대조군의 95.8%에 비하여 유의하게 감소하였다 (Table 1).

Microfilament 의 정상적인 형태를 가진 난자는 동결보호제 노출군은 87.7%, 초자화동결군은 39.2%로 초자화동결군은 대조군의 92.2%에 비하여 유의하게 감소하였다 (Table 2).

3. 초자화동결 시 CCB 전처치가 microtubule과 microfilament에 미치는 영향

CCB가 생쥐 난자의 cytoskeleton에 미치는 영향을 보면 CCB를 전처치하지 않은 군에서는 microtubule의 정상적인 형태를 가진 난자가 48.9%, CCB를 전처치한 군은 53.7%로 CCB를 전처치한 군이 CCB를 전처치하지 않은 군에 비하여 증가하였다. 그러나 통계적으로는 유의하게 나타나지 않았다 (Table 3).

Table 1. Changes in microtubules of mouse oocytes frozen by vitrification

Treatment	Microtubule change (%)			
	n*	Normal	p.r.	c.r.
Control	48	46 (95.8)[a]	2 (4.2)	0
Exposed	42	27 (64.3)[b]	13 (31.0)	2 (4.7)
Vitrification	53	26 (49.1)[b]	20 (37.7)	7 (13.2)

p.r. partially reduced; c.r. completely reduced
[a,b] Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p<0.05$).
* Three replication

Table 2. Changes in microfilaments of mouse oocytes frozen by vitrification

Treatment	Microfilament change (%)			
	n*	Normal	p.r.	c.r.
Control	64	59 (92.2)[a]	5 (7.8)	0
Exposed	57	50 (87.7)[a]	6 (10.5)	1 (1.8)
Vitrification	53	20 (39.2)[b]	12 (23.5)	19 (37.3)

p.r. partially reduced; c.r. completely reduced
[a,b] Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p<0.05$).
* Three replication

Microfilament에서는 CCB를 전처치하지 않은 군에서는 정상적인 형태를 가진 난자가 38.3%, CCB를 전처치한 군에서는 64.5%로 CCB를 전처치한 경우 유의하게 microfilament의 안정화가 관찰되었다 (Table 4).

고 찰

난자의 동결보존은 인간배아의 동결보존에 대한 법적, 윤리적인 문제를 어느 정도 피할 수 있는 장점이 있어 최근에 많은 관심이 집중되고 있다. 역사적으로 인간에서 최초의 난자의 동결보존은 1986년 Chen 등이 수정난의 동결과 같은 완만동결법으로 성공하였고,[10] 그 후로도 여러 연구자들에 의해 연구되었으며 임신의 성공도 보고되고 있다.[1] 하지만 성숙난자는 동결보존 시 낮은 온도와 삼투압에 매우 민감한 문제점 등으로 인해 완만동결법으로는 극히 낮은 성공률을 보였다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 1987년 Rall 등과 1989년 Nakagata 등에 의해 성숙난자를 초자화동결법으로 동결보존하려는 시도가 있었으며 산자 생산도 하였다.[11,12] 이후 많은 연구자들에 의해 초자화동결법으로 난자를 동결보존하려는 많은 연구가 시도되고 있다. 하지만 지속적인 초자화동결법의 발전에도 불구하고 초자화동결 융해 후 난자는 투명대의 물리적 손상 및 경화현상과 난자 피질과립의 조기 방출 등이 발생하기도 하며, 최근에는 microtubule, microfilament 등과 같은 미세구조의 손상이 발생해 방추사의 기능이상, 염색체의 산란, 다수체의 증가 등을 유발한다고 생각되고 있다.[2~5]

Table 3. Effect of CCB on microtubules of mouse oocytes frozen by vitrification

Treatment	Microtubule change (%)			
	n*	Normal	p.r.	c.r.
Control	44	41 (93.2)[a]	3 (6.8)	0
Vitrification CCB (-)	47	23 (48.9)[b]	17 (36.2)	7 (14.9)
Vitrification CCB (+)	54	29 (53.7)[b]	21 (38.9)	5 (9.3)

p.r. partially reduced; c.r. completely reduced
[a,b] Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p<0.05$).
* Three replication

Table 4. Effect of CCB on microfilaments of mouse oocytes frozen by vitrification

Treatment	Microtubule change (%)			
	n*	Normal	p.r.	c.r.
Control	54	49 (90.7)[a]	5 (9.3)	0
Vitrification CCB (-)	47	18 (38.3)[b]	20 (42.6)	9 (19.1)
Vitrification CCB (+)	48	31 (64.5)[c]	11 (23.0)	6 (12.5)

p.r. partially reduced; c.r. completely reduced
[a,b,c] Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p<0.05$).
* Three replication

대부분의 포유류 동물의 성숙난자는 방추사가 염색체에 붙은 상태로 2차 감수분열의 중기에 정지하고 있으며, 이때의 microtubule은 염색체의 이동에

관여하여 세포분열에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Microtubule은 온도에 매우 민감한 구조물로서 낮은 온도에 노출되면 손상을 입게 되고 결국 염색체 비분리를 초래시키는 것으로 생각된다.[13,14] 본 연구에서도 초자화동결 융해 후 정상적인 microtubule의 형태를 가진 난자는 49.1%로 동결을 하지 않은 대조군의 95.8%에 비해 유의하게 감소하였다.

세포골격의 형성에 중요한 역할을 하는 microfilament는 세포분열 시 극체 방출에 관여하기도 하며 수정 후 전핵 형성과 전핵이 난자 변연부에서 중심부로 이동하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 감수분열 시 방추사를 지지하는 역할을 담당하며 주로 세포의 변연부에서 발견되지만 수정 후에는 전핵 근처에서 발견되기도 한다.[6] Microtubule과 마찬가지로 저온에 노출되면 심각한 손상을 입게 되어 난자의 생존율과 수정률을 떨어뜨리게 되며 수정 후에도 발달률을 저하시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서도 초자화동결 융해 후 정상적인 microfilament의 형태를 가진 난자는 39.2%로 동결을 하지 않은 대조군의 92.2%에 비해 유의하게 감소하였다.

본 연구에서는 초자화동결 시 microfilament의 손상을 감소시키는 물질로 알려진 Cytochalasin B (CCB)를 첨가하여 cytoskeleton에 미치는 영향을 평가하였다. 일반적으로 cytoskeletal stabilizer로 알려진 CCB는 세포질 내의 microfilament에 특이적이며 가역적인 작용을 하며,[15] actin polymerization이 되는 것을 막음으로서 동결-융해 시 microfilament의 손상을 방지하는 것으로 알려져 있고[9] 또한 세포질막을 보다 신축성 만들어 난자 및 배아의 동결로 인한 손상을 적게 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[7] 이런 이유로 난자 및 배아의 동결 시 CCB를 전처치하여 동결보존 후 생존율과 수정률 및 배아발달률을 높이려는 연구들이 있다. 이중 Isachenko 등은 미성숙 돼지 난자의 초자화동결 전에 CCB를 전처치하였을 때 체외성숙률이 22.2%로, 전처치를 하지 않은 경우의 5.6% 보다 유의하게 증가되어 미성숙 난자 동결 시에 유용하게 사용될 수 있다고 하였으며,[15] Dobrinsky 등은 돼지 배아의 초자화동결 시 CCB를 전처치한 군에서 포배기까지의 발달률이 60%로 처치하지 않은 군의 22% 보다 유의하게 증가되었다는 결과를 발표하였다.[7]

본 연구에서는 CCB를 전처치하여 초자화동결을 하였을 경우 정상적인 microtubule을 보인 난자는 53.7%로 전처치하지 않은 경우의 48.9%에 비하여 약간 증가되었고, 정상적인 microfilament를 보인 난자는 64.5%로 CCB를 전처치한 경우 전처치하지 않은 경우의 38.3%에 비하여 유의하게 증가되었다. 이러한 결과는 초자화동결 전 CCB 전처치가 동결 시 microfilament의 손상을 감소시킨다는 다른 연구자들의 소견[16]과 일치하였으며, microfilament의 손상 감소는 동결보존 시 난자 세포질 내 미세구조의 안정화에 기여하여 융해 후 난자의 생존율 및 체외발달률을 향상시킬 것으로 생각된다. 결론적으로 본 실험의 결과는 향후 적절한 초자화동결법의 정립에 있어 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 기대되며 나아가서는 인간의 난자 동결보존 방법에 있어 새로운 계기가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, et al. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. Hum Reprod 1998; 13 (Suppl 3): 161-74.
2. 이봉경, 김은영, 남화경, 이금실, 윤산현, 박세필 등. 초자화동결된 생쥐 미수정란의 cytoskeleton 및 염색체 변화. 대한불임학회지 1998; 25: 287-92.
3. Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. Biol Reprod 1995; 53: 780-5.
4. Van der Elst J, Nerinckx S, Van Sterteghem AC. Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyploid at the pronucleate stage, reduced cell numbers in blastocysts and impaired fetal development. J Reprod Fertil 1993; 99: 25-32.
5. Sterzik K, Fosenbusch B, Grab D, Wahl A, Beier HM, Lauritzen C. Numerical chromosome anomalies

after fertilization of freeze-thawed mouse oocytes. Arch Gynecol Obstet 1992; 251: 133-8.
6. Kim NK, Chung KS, Day BN. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and pathogenesis in pig oocytes. J Reprod Fertil 1997; 111: 143-9.
7. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol Reprod 2000; 62: 564-70.
8. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo using microsurgery and cell fusion. Science 1983; 220: 1300-2.
9. Theodoropoulos PA, Gravanis A, Tsapara A, Margioris N, Papadogiorgaki E, Galanopoulos V, Stournaras C. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. Biochem Pharmacol 1994; 47: 1875-81.
10. Chen C. Pregnancy after human ooctye cryopreservation. Lancet 1986; 8486: 884-6.
11. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification. Nature 1985; 313: 573.
12. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J Reprod Fertil 1989; 87(2): 479-83.
13. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem. A Effect of 1,2-propanediol and dimethysulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyt. Hum Reprod 1988; 3: 960-7.
14. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertil Steril 1990; 54: 102-8.
15. Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. Vitrification of immature porcine oocytes; Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addiction and removal of cryoprotectant. Cryobiology 1998; 36: 250-3.
16. Battaglia DE, Gaddum-Rosse P. The Distribultion of polymerized actin in the rat egg and its sensitivity to cytochalasin B during fertilization. J Exp Zool 1986; 237: 97-105.