

생쥐 상실배의 초급속동결

경희대학교 의과대학 산부인과학교실 불임클리닉

백청순 · 서병희 · 이재현

한국과학기술연구원 유전공학센터 발생공학연구소

이 경 광

Ultrarapid Freezing of Mouse Morulae

C.S. Baik, M.S., B.H. Suh, M.D. and J.H. Lee, M.D.

Infertility Clinic, Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine Kyung Hee University

K.K. Lee, Ph.D.

Developmental Biotechnology Lab., Genetic Engineering Center, KIST

= Abstract =

We cryopreserved mouse morulae by a simple ultra-rapid method of freezing embryos directly in LN₂ after holding 2min in a LN₂ vapor, and thawed them in 37°C water bath. The time requirements for permeation and dehydration by 2.0 M glycerol and 0.2M sucrose before freezing were studied. When the embryos were equilibrated for 10 min, the optimum post-thaw survival was obtained. Embryos those developed normally to blastocyst after in vitro culture for over 24hrs were regarded as survival ones. Two experiments to assess post-thaw survival following predehydration in various mixtures of glycerol and sucrose were also accomplished. When sucrose was held constant (0.2M) and glycerol concentration varied (1.5-3.5M), post-thaw survival was best (78.0%) in 3.0M glycerol. When glycerol was held constant (3.0M) and sucrose concentration varied (0.0-1.0M), optimum post-thaw survival (78.0%) was found in 0.2M sucrose.

서 론

수정란의 동결보존에 처음으로 성공한 보고는 Whittingham 등과(1972) Wilmot(1972)에 의한 것으로 완만동결 및 완만용해 방법으로 생쥐수정란을 동결보존한후 이식하여 산자를 얻었다. 그후 동결법은 이런 방법을 기초로 많은 연구(Bank & Maurer, 1974; Leibo et al., 1974; Miyamoto & Ishibashi, 1977)가 되었다. 이들은 수정란의 동결용해 과정에서 용해후 생존율에 영향을 미치는 요인들(항동해제 종류, 평형시간, 용해속도 그리고 완만동결을 끝

내는 온도)에 대한 새로운 사실이 보고되었다.

근래 획기적인 동결법으로는 동결시 액체질소에 넣기전에 완만동결을 -30°C 혹은 -40°C (종래는 -70°C 전후)까지만 실시하여도 급속용해후 높은 생존율을 얻었다(Willadsen, 1977; Whittingham et al., 1979)는 것과 항동해제의 첨가와 제거에 있어서 시간과 노력을 절약하기 위한 다양한 방법(Kasai et al., 1980; Renard et al., 1983; Rall & Polge, 1984; Kojima et al., 1985) 및 Wood와 Farrant(1980)가 동결액에 sucrose를 첨가 함으로써 급속동결이 가능했다는 것이다. 더욱이 종래의 완만동결법의 범주

에서 완전히 독립하게 된 것은 vitification법의 도입 (Fahy et al., 1984; Rall & Fahy, 1985)이었다. 이방법은 초고속동결을 가능하게 하였다. 그러나 이방법을 사용할 경우 항동해제의 높은 농도(40%)가 필요하다. 이렇게 높은 농도의 항동해제는 그 자체만으로도 수정란에 해를 미치므로 항동해제 첨가시 주위온도를 4°C로 유지해야 하는등 어려운 점이 있어 널리 이용되지 못하고 있다 (Trounson et al., 1987).

최근에는 vitrification방법의 실용상 문제점을 보완하는 초고속동결에 대한 연구 (Williams & Johnson, 1985; William & Johnson, 1986; Trounson et al., 1987)들이 보고 되고 있다.

본 연구는 인간 난자의 동결보존의 실용화를 위한 기초실험으로서 초고속동결 방법을 확립 습득함을 목적으로 생쥐 상실패를 공시하여 초고속 동결을 위한 항동해제 glycerol과 sucrose의 적정 농도배합 및 항동해제의 적정 평형시간을 얻기 위한 것이다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 수정란 채취

본 실험에 공시된 생쥐는 ICR 계통으로 자성은 생후 6-9주령, 웅성은 4-6개월령이었다. 사육환경은 20~27°C의 실온과 점등하지 않고 자연대로의 일조시간, 무제한 급이급수하였다.

다배란 유기를 위해 마리당 5IU의 PMSG (Folligon: Intervet, Holland)를 복강에 주사한 후 48시간후에 hCG (Chorulon: Intervet, Holland)를 PMSG와 동일한 방법으로 투여한 후 자성 생쥐를 번식 능력이 확인된 웅성 생쥐의 1:1의 비율로 합사 시켰다. 다음날 아침 질전이 확인된 개체에서 hCG 주사한지 76시간 전후에 자궁을 절취하고 변형된 Dulbecco's phosphate Buffered Saline에 20% (v/v)의 Fetal Calf Serum을 첨가한 용액(이후 BM으로 약함)을 사용하여 자궁을 관류함으로써 상실패를 채취했다.

2. 동결 및 융해

가) 항동해제의 평형시간에 대한 실험

항동해제는 glycerol 0.2M과 sucrose 0.2M을 혼합하여 사용하였으며 평형시간은 각각 3, 5, 7, 10분으로 하였다. 그밖의 모든 실험방법은 실험 '나'와 동일하게 하였다.

나) 항동해제의 농도에 대한 실험

동결액은 glycerol 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 및 3.5M과 sucrose 0.2M을, glycerol 3.0M과 sucrose 0.0, 0.2, 0.5, 0.7 및 1.0M을 각각 BM에 혼합 첨가하여 사용하였다. 항동해제의 첨가 방법은 1단계로 하였으며 첨가후 평형시간은 실험 '가'에서 가장 높은 생존율을 얻은 군의 것으로 하였다. 동결은 액체질소 증기속의 철판(Williams & Johnson, 1986) 위에 2분간 정지 후 액체질소에 직접 침지함으로써 실시하였고 융해는 액체질소에서 직접 37°C의 물을 채운 항온조에 넣고 급격히 흔들어서 주는 급속융해법을 사용하였다. 융해된 수정란은 staw에서 꺼낸 즉시 2.0ml의 BM에서 15분간 정지한 다음 신선한 BM에 3번이상 세척 함으로써 항동해제를 제거하였다.

3. 시험관내 배양

해동해제가 제거된 수정란은 5%의 CO₂와 37°C의 온도가 유지되며 수증기로 포화된 배양기에서 2시간이상 미리 평형시킨 M16 배양액 소적에 넣어 24시간 이상 배양하면서 관찰하였다.

생존율은 융해후 회수한 수정란의 숫자에 대한 배반포이상의 단계까지 발달한 수정란 숫자의 백분율로 하였다.

결 과

1. 항동해제의 평형시간

동결전 항동해제(glycerol 2.0M + sucrose 0.2M)의 평형시간을 3, 5, 7, 10분으로 하였을때 동결융해후 회수한 상실패수에 대한 배반포까지 발달한 상실패의 백분율, 즉 생존율은 23.3, 34.0, 46.2, 51.5%로서 10분 동안 평형 시켰을 때 동결융해후 생존율이 가장 높았으나 7분군

Table 1. Effect of equilibration time in freezing solution containing of glycerol 2.0M and sucrose 0.2M on survival of ultrarapidly frozen mouse morulae

Equilibration Time in Freezing Sol.	No. of Embryos			Post-thaw Survival (%)
	Frozen	Recovered	Developed to Blastocyst	
3min	48	43	10	23.3 ^a
5	52	50	17	34.0 ^b
7	56	52	24	46.2
10	72	68	35	51.5 ^{a,b}

a:p<0.005, b:p<0.01

Table 2. Post-thaw survival of mouse morulae according to glycerol concentration when sucrose was held constant(0.2M)

Glycerol (%)	No. of Embryos			Post-thaw Survival (%)
	Frozen	Recovered	Developed to Blastocyst	
1.5	102	100	54	54.0 ^b
2.0	138	131	78	59.5 ^a
2.5	147	130	90	69.2
3.0	215	200	156	78.0 ^{a,b}
3.5	168	149	110	73.8

a, b: p < 0.01

Table 3. Post-thaw survival of mouse morulae according to sucrose concentration when Glycerol was held constant(3.0M)

Sucrose (M)	No. of Embryos			Post-thaw Survival (%)
	Frozen	Recovered	Developed to Blastocyst	
0.0	80	67	10	14.9 ^a
0.2	215	200	156	78.0 ^{a, b, c, d}
0.5	114	81	55	67.7 ^d
0.7	107	85	23	27.1 ^b
1.0	42	34	0	0.0 ^c

a, b, c: p < 0.005, d: p < 0.01.

과 비교할때 통계적 유의성은 없었다(표 1).

2. 항동해체의 농도

Glycerol 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 및 3.5 M과 sucrose 0.2M을 각각 혼합하여 항동해체로 사용하였을 때 생존율은 54.0, 53.4, 69.2, 78.0 및 73.8%로서 3.0M의 glycerol을 사용한 군의 생존율이 나머지 군에 비해 다소 높으나 2.5 또는 3.5M을 사용한 군과 비교할 때 통계적 유의성은 없었다(표 2).

Sucrose 0.0, 0.2, 0.5, 0.7 및 1.0M과 glycerol 3.0M을 각각 혼합하여 항동해체로 사용하였을 때 동결융해후의 생존율은 각각 14.9, 78.0, 67.7, 27.1 및 0.0%로써 sucrose 0.2M을 사용한 군의 생존율이 나머지 군에 통계적으로 유의하게 높았다(표 3).

고 찰

종래의 동결방법들이 완만동결법을 사용한 것은 세포내의 탈수를 위한 것이다(Whiltin-

gham, 1979). 또한 세포 밖에 빙정을 만들어줌으로써 세포로부터 유리수를 동결액내로 빠져 나오게 하는 것이다(Mazur, 1977). 그러나 최근에는 Williams와 Johnson(1985, 1986)과 Trounson들(1987)이 생쥐의 초기배를 액체질소 증기속 혹은 액체질소에 직접 침투함으로써 초급속동결을 실시하여 완만동결에서와 같은 생존율을 얻었다. 세포들이 초급속동결을 실시하여도 생존하는 기전을 분명하게 규명하지는 못하지만 아마도 침투성이 없는 항동해제(sucrose)를 침투성이 있는 항동해제(DMSO, glycerol, 1, 2-propanediol)와 혼합하여 사용함으로써 sucrose에 의해 부분적으로 탈수가 일어남과 동시에 glycerol이 세포내에 침투되어 동해의 요인이 되는 세포내 빙정형성을 방지할 수 있기 때문이라(Trounson et al., 1987)고 하겠다. 그러므로 세포를 동결융해 후에도 살릴수 있을 적절한 만큼의 탈수와 침투가 일어나는데 필요한 시간은 중요하다고 하겠다.

본 실험에서 얻은 동결전 적정 평형시간은 7-10분으로 생쥐의 상실패로 초급속동결시 glycerol과 sucrose의 평형시간에 대한 실험을 실시한 Szell과 Sheltion(1986)의 결과와 일치한다고 하겠다. 그러나 Trounson등(1987)이 2세포기배를 사용하여 DMSO와 sucrose의 평형을 2-3분간 실시후 초급속동결 하였을 때의 생존율이 가장 높았었다는 보고와는 차이가 있다고 하겠다. Trounson등(1987)의 경우 세포의 침투성이 상실패보다 낮은 2세포기배를 사용한 것을 감안할 때 DMSO가 glycerol에 비해 실온에서 세포내 침투 속도가 빠른 때문에 이런 차이가 생기는지 혹은 glycerol이나 DMSO와 sucrose의 어떤 화학 작용에 의한 것인지에 대해서 알 수는 없다. 초급속동결시 이들 항동해제의 종류와 초기배의 발달단계에 따른 평형시간에 대한 많은 연구가 있어야겠다.

항동해제의 농도에 대한 실험에서는 glycerol 3.0M과 sucrose 0.2M을 혼합하여 사용했을 때 동결융해 후의 생존율이 가장 높았으나 Williams와 Johnson(1985, 1986)은 glycerol 2.0M과 sucrose 0.5M을 혼합하여 사용 하였을때 생존율이 가장 높았다고 하였다. Trounson등(1987)은 생쥐의 2세포기배를 초급속 동결시킬 때에는 DMSO 3.5M과 sucrose 0.25 M을 혼합하여 항동해체로 사용하는 것이 바람직하다고 하였다.

이상의 보고들과 같이 아직은 그 방법에 있

어서 보고자간에 유동적이기는 하나 시험관 아기 program이 널리 사용되는 근래에 사람의 수정란을 동결보존 하는데 경제적으로나 실용적으로 편리한 초급속동결 방법의 확립을 위한 연구가 계속 되어야겠다.

결 론

본 실험은 인간 수정란의 동결보존을 위한 기초 실험으로서 편리하고 경제적인 초급속동결 방법을 확립숙달함을 목적으로 생쥐 상실패를 공시하여 동결전항동해제의 적정 평형시간과 농도배합을 구명하기 위해 실시하였다.

동결방법은 액체질소 증기 속에서 2분간 정제 후 바로 액체질소에 침적시키는 방법을 사용 하였고 용해는 37C의 항온조에서 급속용해법으로 하였다. 용해는 항동해제를 완전히 제거하여 24시간 이상 배양 하면서 관찰하여 정상적인 배반포로 발달한 수정란 수의 용해후 회수한 수정란수에 대한 백분율을 생존율로 하였다.

본 실험의 결과는 다음과 같다.

1. 동결전 항동해제(glycerol 2.0M + sucrose 0.2M)의 평형시간을 3, 5, 7 및 10분으로 하였을 때 각각의 생존율은 23.3, 34.0, 46.2 및 51.5 %로서 10분동안 평형시킨 후 동결한 군의 생존율이 가장 높았다. 7분간 평형 시킨 군과의 통계적 유의성은 없었다.

2. Sucrose 0.2M에 glycerol 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 및 3.5M을 각각 혼합하여 항동해제로 사용하였을 때 생존율은 54.0, 53.4, 69.2, 78.0 및 73.8 %로서 3.0M의 glycerol을 혼합하였을 때 가장 생존율이 높았으나 3.5M군과 비교할 때 통계적 유의성은 없었다.

3. Glycerol 3.0M에 sucrose 0.0, 0.2, 0.5, 0.7 및 1.0M을 각각 혼합하여 항동해제로 사용하였을 때 생존율은 14.9, 78.2, 67.7%, 27.1 및 0.0 %로 0.2M의 sucrose를 사용한 군의 생존율이 가장 높았으며 통계적 유의성도 있었다.

인 용 문 헌

- Bank H, Maurer RR: Survival of frozen rabbit embryos. *Expel Cell Res*, 1974, 89, 188-196.
- Fahy GM, McFarlane DR, Angell CA, Meryman HT: Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 1984, 21, 407-413.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A: Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J Reprod Fertil*, 1980, 59, 51-56.
- Kojima T, Soma T, Oguri N: Effect of rapid addition and dilution of dimethyl sulfoxid on the viability of frozen-thawed rabbit morulae. *Cryobiology*, 1985, 22, 409-415.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing freezing and thawing. *Expel Cell Res*, 1974, 89, 79-88.
- Mazur P: Slow-freezing injury in mammalian cells. In: *The Freezing of Mammalian Embryos*, Ciba Foundation, Symposium 52, K. Elliott and J. Whelan, eds. Elsevier/Excerpta Medica, Amsterdam, pp 19-48.
- Miyamoto H, Ishibash T: Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J Reprod Fertil*, 1977, 50, 373-375.
- Rall WF, Fahy CM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature*, 1985, 313, 573-575.
- Rall WF, Polge C: Effects of warm rate on mouse embryos frozen thawed glycerol. *J Reprod Fertil*, 1984, 70, 185-192.
- Renard JP, Heyman Y, Leymonie P, Plat JC: Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 1983, 19, 145.
- Szell A, Peura A, Kirby C: Ultrarapid freezing; A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil steril*, 1987, 48, 843-850.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P: Survival of mouse embryos frozen to -196 C and -269 C. *Science*, 1972, 178, 411-414.
- Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Halsey JA: Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 C. *J Reprod Fert*, 1979, 56, 11-21.
- Willadsen SM: Factors affecting the survival of sheep embryos during deepfreezing and thawing. In: *The Freezing of Mammalian Embryos*, Ciba Foundation Symposium 52, K. Elliott and J. Whelan, eds. Elsevier/

Excerpta Medica, Amsterdam, pp 1977,175-189.

Williams TJ, Johnson SE: Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 1985, 23, 235 abstr.

Williams TJ, Johnson SE : A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 1986, 26, 125-133.

Wilmut I: The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci*, 1972, 11, 1071-1079.

Wood M, Farrant J: Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 1980, 17, 178-180.

