

P-8 생쥐배아의 동결 보존시 동결 및 해빙액 내에 첨가된 항산화제(GSH)가 해빙 후 배아의 발생에 미치는 영향

손인표, 최규완, 양현원¹, 권혁찬¹
바이오메드연구소, 아주대학교 산부인과¹

서 론

체외 수정 및 배아 이식에 있어서 과배란 유도 및 배양기술의 발달은 잉여 난자 및 배아를 보관하기 위한 동결보존 기술의 필요성을 증가시켜 주고 있다. 그러나 동결보존시 발생하는 물리 화학적 상해로 인해 동결하지 않은 배아에 비해 발생능력은 떨어지는 것으로 알려져 있다. 배아의 동결 보존 시 배아의 생존 및 발생에 미치는 요인으로는 얼음격자 및 팽압 등의 물리적 요인과 oxygen free radical 등에 의한 화학적 요인들이 있으며, 이들은 세포에 구조적 혹은 기능적으로 손상을 입히는 것으로 알려져 있다. (Ashwood-Smith et al., 1988) 특히 화학적 손상은 동결 시 과잉 발생하는 superoxide 제거 능력이 상실됨으로써 잉여의 유해한 hydroxyl group 및 부가적인 radical들에 의해 나타난다고 보고되고 있다(Tarin and Trounson, 1993). 본 실험은 동결 및 해빙액 내에 항산화제인 GSH를 첨가함으로써 free radical들에 의한 손상을 감소시킬 수 있을 것이라는 가정하에 시행하였다. 따라서 본 연구의 목적은 동결 및 해빙액 내에 항산화제로서 첨가된 GSH가 배 발생에 미치는 영향에 대해 알아보고, 동결 및 해빙액 내에 존재하는 GSH가 배아내의 ROS의 양에는 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보고, 나아가 human IVF에서의 새로운 동결 보존 방법에 대한 가능성을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

2-세포기 생쥐배아의 회수

실험동물은 ICR로 6-8주의 암컷을 사용하였다. 과배란 유도를 위해 7.5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 주사하였고, 48 hrs후 7.5 IU human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma)을 주사하여 수컷과 교미시켰다. 다음날 아침 질전을 확인하였고, hCG 주사후 48 시간에 수란관으로부터 2세포기의 생쥐 배아를 회수하였다. 회수된 생쥐 배아는 1 시간 이내에 동결을 시행하였다.

동결 및 해빙 방법

동결 및 해빙 과정에서 동결억제제로는 1,2-propanediol(PROH, Sigma)과 sucrose를 사용하였다. 동결은 2단계의 동결액을 처리 후 완만

동결 방법으로 시행하였다. 생쥐 배아는 0.25 ml straw 당 10개씩 넣었고 세포 동결기(Cryo Magic, 부일공업)에서 동결하였다. 동결 배아는 해빙할 때까지 -196°C 액체 질소 통에서 보관하였다. 해빙은 액체 질소 통에서 꺼낸 straw를 대기중에서 30 초간 노출한 후 실온의 증류수에서 10 초간 처리하여 급속해빙하였다. 실험군은 동결액과 해빙액에 500 μM의 GSH를 첨가방법에 따라 +/+, +/-, -/+의 3군으로 나누었고, 대조군(-/-)은 첨가하지 않았다.

배발달 및 할구수의 계수

해빙 후 72 시간에 포배기 배아발달율을 관찰하였고, 포배배아를 회수하여 slide위에 2-3개씩 붙여 대기 중에서 건조 시켰다. 이것을 5% phosphate-buffered formalin에서 고정한 후 acridine orange로 염색하여 형광 현미경에서 관찰, 할구수를 계수 하였다.

ROS 양의 측정

해빙 1시간 후 2 세포기 배아에 형광염료인 DCHFDA를 15분간 처리한 후 Quanti Cell 700으로 ROS양을 측정 하였다. ROS양이 많을수록 밝게 염색되며, Quanti Cell 700은 이 형광 빛을 다양한 color로 형상화하여 양적으로 측정한다.

통계처리

본 실험의 통계적 유의성 검정은 chi-square test 방법을 사용하였으며, p값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결과 및 논의

해빙 후 2세포기 배아의 회수율 및 생존율은 -/-, -/+, +/-, +/+의 군간에 유의한 차이가 없었다. 해빙 후 72시간에 포배기까지의 배 발생은 intact와 partial간의 배 발생율은 유사하게 나타났지만, 각 군간의 배 발생을 보면 -/-, -/+, +/-, +/+에서 각각 38%, 53%, 59%, 50%를 나타내 동결 및 해빙액 내에 GSH를 첨가한 군이 첨가하지 않은 대조군에 비하여 유의하게 높은 배 발생율을 보였다(Fig 1).

포배배아의 할구수는 대조군과 비교했을 때 GSH처리군들에서 다소 높은 경향을 보였으나

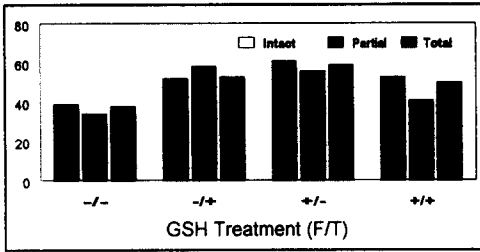


Fig. 1. Development of Embryos to Blastula at 72 hour of culture after thawing.

은 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다.

배아 내에 존재하는 ROS의 양은 GSH를 처리하지 않은 배아들(Fig 2. A)은 GSH를 처리한 배아들(Fig 2. B)보다 밝은 형광을 띄어 더 많은 양의 ROS가 존재하는 것으로 관찰되었다(Fig 2). Quanti Cell 700에 의해 측정된 ROS양은 GSH 처리군 보다 대조군에서 유의하게 높은 것으로 나타났다.

수정란의 동결 보존 시 배아는 얼음 격자에 의한 물리적 요인과 해빙 시 형성되는 발생기 산소에 의한 생화학적 요인으로 인한 상해를 입는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 배아의 동결 보존 시 발생하는 발생기 산소를 감소시키고자 동결 및 해빙액 내에 첨가한 항산화제인 glutathione(GSH)은 회수율과 생존율에는 영향을 주지 못하였지만, 포배로의 배아 발달율은 유의하게 향상시켰다. 이는 생존과 발달에 미치는 요인이 서로 다르기 때문으로 사료된다. 즉 물리적 요인은 회수 및 생존성에 영향을 미치며, 배아의 발달은 발생기 산소의 양에 크게 영향을 받는 것으로 사료된다(Tarin and Trounson, 1993).

또한 동결 및 해빙액 내의 GSH에 의한 해빙 후 배아 내의 ROS 양의 감소는 해빙 후 배아 발달 향상의 결과를 뒷받침해주는 유력한 증거이다.

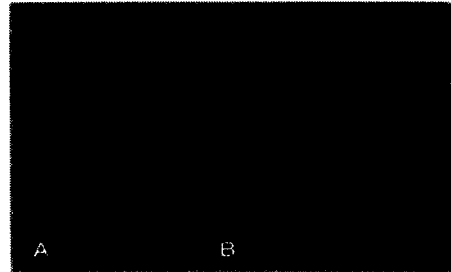


Fig. 2. Microphotograph of embryonic ROS
A: Not GSH-treated, B: GSH-treated

이상의 결과로부터, 동결보존시 세포질 내의 ROS의 양적 감소는 배 발달의 향상의 한 요인이며, 본 연구 결과는 human IVF에서 새로운 동결보존 방법을 개선하기 위한 기초로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Ashwood-Smith MJ, Morris GJ, Fowler R, Appleton TC, and Ashom R (1988) *Hum Reprod* 3: 795.
Tarin JJ and Trounson AO (1993) *Biol Reprod* 49: 1362.