

액으로 고정된 후 acridine orange로 염색하여 형광현미경하에서 세포수를 계수하였다. 난자 세포질내 ROS를 측정하기 위하여 2 세포기 (post-hCG 48시간)의 배아에 DCHFDA를 침투시킨 후 Confocal microscope를 이용하여 발현 강도를 측정하였다.

실험 결과, 배아의 발생은 hCG 주사 후 96시간부터 다른 군에 비해 발생이 빨랐으며, 120시간에 포배기 이상 발생된 배아와 144시간에 탈각이 진행 혹은 완료된 배아는 B3-B5 (81.3%, 75.0%)가 P1-P2 (52.1%, 47.9%), G1-G2 (51.2%, 44.0%)에 비해 유의하게 많이 관찰되었다 ( $p < 0.01$ ). 120시간의 포배 배아의 세포수는 B3-B5가 모든 실험군에 비해 유의하게 1.5배 가량 증가하였다 (B3-B5:  $120.4 \pm 13.1$ , mHTF:  $84.1 \pm 7.8$ , P1-P2:  $77.4 \pm 14.2$ , G1-G2:  $83.0 \pm 14.3$ ). 2 세포기에서의 ROS의 양은 B3에서 배양된 배아에서 가장 낮았고, 특히 m-HTF와 P1에서의 배아에 비해 유의하게 낮은 강도를 보였다.

이상의 결과에서 배양액내의 조성은 배아의 발달에 영향을 미치는 중요한 요인이며, 초기 배아의 세포질내 ROS 양과 배아의 발생은 음의 관계가 있을 것으로 추측되며, 항산화제 및 아미노산과 성장요인들의 복합제제를 성분으로 하는 B3-B5 배양액은 배아 발달에 유용하며, 사람의 체외수정 및 이식술에 유용한 배양액이 될 것으로 사료된다.

## O-9 체외배양된 생쥐 Preantral Follicle내 난자의 성장, 성숙 및 수정후 배발달과 체내에서 성장된 난자와 발생능력의 비교

을지병원 의과연구소<sup>1</sup>, 을지의대 산부인과<sup>2</sup>, 생리학교실<sup>3</sup>, 건국대학교 축산학과<sup>4</sup>  
김동훈<sup>1</sup> · 강희규<sup>1</sup> · 한성원<sup>1</sup> · 김묘경<sup>1</sup> · 박원일<sup>2</sup> · 이호준<sup>1,3</sup> · 이훈택<sup>4</sup> · 정길생<sup>4</sup>

본 연구의 목적은 체외성장된 생쥐 preantral follicle내 난자의 체외성숙, 수정 및 배발달을 조사하고, 또한 체내에서 성장, 성숙된 난자와 발생능력의 차이를 비교하는데 있었다.

난소는 12일령 ICR계통의 생쥐로부터 회수되었으며, 회수된 난소는 1 mg/ml collagenase와 0.2 mg/ml DNase I이 함유된 Leibovitz L-15 배양액에 침적한 후, 반복적인 pipetting을 통하여 preantral follicle을 분리하였다. 분리된 preantral follicle은 Transwell-COL membrane insert에서 배양을 하였으며, 배양액은 5% FBS, 100 mIU/ml FSH 그리고 10 mIU/ml LH가 첨가된  $\alpha$ MEM 배양액을 이용하였다. preantral follicle은 10일간 체외배양을 실시하여 체외성장을 시킨 후, 체외성숙을 유도하기 위하여 1.5 IU/ml hCG가 첨가된 배양액에서 16~18시간 배양을 실시하였다. 한편, 체내성장 및 성숙된 난자는 과배란 처리된 23일령의 생쥐로부터 회수하였다. 이러한 체내 혹은 체외성숙된 난자는 수정능획득이 유기된 정자와 수정을 실시하였으며, 수정란은 10% SSS와 amino acids가 첨가된 KSOM 배양액에서 5일간 배양을 하였다. 그리고 형태적으로 정상적인 2세포기 수정란을 위임된 대리모 (ICR)의 난관에 이식을 실시하였다.

Metaphase II까지의 성숙율은 체외성장군 (53.7%)이 체내성장군 (70.5%)보다 유의하게 낮은 결과를 나타냈으며 ( $p < 0.05$ ), 난자직경 또한 체외성장군 ( $69.6 \pm 2.1$ )이 체내성장군 ( $73.3 \pm 3.0$ )이 작은 것으로 나타났다. 체외수정율에 있어서도 체외성장군 (76.5%)이 체내성장군 (90.2%)이 유의하게 낮은 결과를 보여주었고 ( $p < 0.05$ ), 난할율 및 배반포 발달율에 있어서도 체외성장군 (58.7와 14.4%)이 체내성장군 (84.4와 56.6%)이 유의하게 낮은 결과를 보여주었다 ( $p < 0.001$ ). 그리고 배반포의 세포수도 체외성장군 ( $39.0 \pm 10.8$ )이 체내성장군 ( $60.5 \pm 12.5$ )

보다 유의하게 낮게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 한편, 체외성장, 성숙 및 수정된 수정란을 이식한 결과, 산자를 생산하였으나 매우 낮은 비율을 나타냈다 (3.3%, 6/181).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 체외성장된 난자는 체내성장된 난자와 같은 체외성숙 및 발달율을 갖지 못하는 것으로 생각되며, 이러한 사실은 수정란이식 후의 매우 낮은 산자발생을 설명할 수 있는 하나의 예라고 사료된다. 그리고 앞으로 preantral follicle의 배양체계를 개선하고, 체외성장된 난자의 낮은 발생능력의 원인을 규명하기 위한 보다 많은 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

## O-10 컴퓨터 세포동결기를 이용한 동결 중 액체질소의 분사방식이 생쥐 배아의 동결보존 결과에 미치는 영향

경기대학교 자연과학대학 생물학과<sup>1</sup>, 아주대학교 자연과학대학 생명과학과<sup>2</sup>,  
바이오메드연구소<sup>3</sup>, 아주대학교 의과대학 산부인과<sup>4</sup>,  
아주대학교 분자과학기술학과<sup>5</sup>

손인표<sup>1,3</sup> · 안학준<sup>2</sup> · 최규원<sup>3,4</sup> · 민철기<sup>2</sup> · 계명찬<sup>1</sup> · 권혁찬<sup>4,5</sup>

본 연구는 액체질소의 분사방식이 다른 두 종류의 세포동결기를 이용 동일한 program으로 수행된 생쥐 배아의 동결보존 결과를 비교하여 분사방식이 해빙 배아에 미치는 영향을 알아보고자 수행하였다. 실험 재료로는 생쥐의 2세포기 배아를 사용하였으며, 동결 및 해빙(완만동결-급속해빙)과 사용한 동결-해빙액 (Propanediol, Sucrose), 해빙 후 배양액 (mHTF; ECM-1<sup>®</sup>, BMI, Korea)은 모두 동일하였다. 해빙 후 배아의 생존, 발생 및 세포질내 발생기 산소 (reactive oxygen species; ROS)를 측정하였다. 포배기 배아의 세포수는 acridine orange를 사용하여 형광현미경하에서 관찰하였고 ROS의 양의 측정은 DCHFDA를 사용하여 confocal microscopy (Bio-Rad, USA)로 상대적 강도를 측정 비교하였다. 실험군은 액체질소 분사횟수가 분당 120회인 QI군 (quick injection, CryoMagic, Booil Industry, Korea), 분사횟수가 분당 50회인 SI군 (slow injection, Kryo-10, Planar, UK)으로 하였다.

결과는 다음과 같았다.

해빙 후 2세포기 배아의 회수율 (QI: 93.1%, SI: 85.5%) 및 전체적인 배아의 생존율 (QI: 81.1%, SI: 76.1%)은 두 군간에 유의한 차이가 없었으나, 온전한 배아의 생존율은 QI군 (58.9%)이 SI군 (43.7%)에 비하여 유의하게 높았다. 포배기 배아의 발생율은 QI (42.3%)군이 SI (26.7%)군보다 유의하게 높았으나, 포배기 배아의 세포수는 두 군간 차이가 없었다. 배아내 ROS의 양은 QI군에서 유의하게 감소하였다.

이상의 결과에서 액체질소의 분사량과 주기는 생쥐 배아의 동결보존의 결과에 중요한 요인으로 작용하며, 액체질소를 소량으로 분사주기를 증가시키는 것이 배아의 동결에 보다 적합한 환경을 제공해 주는 것으로 사료된다. 앞으로 분사방식에 따른 세포내 물리·화학적 손상에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.