

O-11 동결 및 해빙과정이 생쥐 배아의 세포내 변화와 발달에 미치는 영향

아주대학교 자연과학대학 생명과학과, 경기대학교 자연과학대학 생물학과¹,
바이오메드연구소², 가천의과대학 산부인과³, 아주대학교 의과대학 산부인과⁴,
아주대학교 분자과학기술학과⁵

안학준 · 손인표^{1,2} · 김석영³ · 김미란⁴ · 황경주⁴ · 계명찬¹
최규완^{2,4} · 권혁찬^{4,5} · 민철기

동결보존 과정에서 일어나는 세포의 손상은 결빙 및 탈수과정에서 세포 내 소기관들의 결빙에 의한 상해와 동해억제제의 삼투압에 의한 배아의 과다한 수축 등의 물리적 손상이 잘 알려져 있으나, 냉각과정에서도 몇 가지 물리적, 기능적 손상이 보고되고 있다. 배아의 동결보존에 사용되는 동해억제제인 propanediol (PROH), glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 삼투압을 증가시켜 세포를 탈수하고 세포 내로 침투하여 세포 내의 얼음 결정의 생성을 방지하며 동시에 세포의 외형적 구조가 변형되는 것을 방지한다. 해빙시에도 다단계 농도의 동해억제제에 노출시켜 급격한 수분유입으로 인한 세포의 팽창을 방지한다. 또한 냉각과정에서도 세포의 탈수와 동해억제제 치환으로 인한 전해질의 이동이 저하되며 일부의 동해억제제 (DMSO, glycerol)는 유리 반응기 보집기능을 갖고 있어 세포손상을 방지한다고 알려져 있다. 그러나 이러한 진보에도 불구하고 현재의 동결보존 후 해빙 배아의 생존율은 시기별로 차이는 있으나 약 50%~70% 정도로써 아직 많은 개선의 여지가 있다. 따라서 본 연구는 동결-해빙과정이 생쥐 배아 세포 내에서의 유리 산소기 발생, 세포막과 골격의 물리화학적 변성 여부, 배아의 발달 등에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

실험 재료로는 생쥐의 2 세포기 배아를 사용하였으며 대조군 (fresh embryo)과 실험군 (frozen-thawed embryo)으로 나누어 실험을 수행하였다. 동결방식은 완만동결-급속해빙으로 하였고, 동결-해빙액은 Propanediol과 Sucrose, 해빙 후 배양액은 mHTF (ECM-1[®], BMI, Korea)를 사용하였다. 해빙 후 배아의 생존, 발생 및 세포질내 발생기 산소 (reactive oxygen species; ROS)를 측정하였다. 포배기 배아의 세포수는 acridine orange를 사용하여 형광현미경하에서 관찰하였고 DCHFDA를 사용한 ROS의 상대적 양의 측정과 FITC labeled F-actin을 이용한 세포골격은 confocal microscopy (Bio-Rad, USA)으로 측정 비교하였다. 세포막 유동성을 측정하기 위하여 배아를 형광이 표지된 wheat germ agglutinin로 염색한 후 INNOVA 90 Plus series ion laser를 이용하여 Photobleaching 한 후 형광의 복원 속도를 측정하였다.

해빙 직후에 측정된 H₂O₂의 상대적 농도는 실험군에서 62.8±23.5, 대조군에서 34.2±14.5로써 실험군에서 유의하게 높았다 (p<0.01). 또한 photobleaching을 시행한 결과 실험군에서 1.46초, 대조군에서는 0.28초 세포막의 변성을 확인할 수 있었으며, FITC labeled F-actin을 이용하여 세포 골격을 관찰한 결과 대조군에서는 actin이 전체적으로 균일하게 분포되었으나 실험군에서는 응집되고 불균일하게 분포되는 양상을 보였다. 포배기 배아의 발생율은 대조군에서 74.7%, 실험군에서 33.7%, 포배기 배아의 세포수도 대조군에서 95.9±19.1, 실험군에서 42.0±11.3로써 대조군에서 유의하게 높았다 (p<0.01).

이상의 결과에서 동결-해빙과정은 동해억제제를 사용함에도 불구하고 생쥐배아의 세포에서 막과 세포질의 변형을 초래하고 H₂O₂를 다량 발생시켜 배아의 발생을 저해한다고 사료된다.