

Mouse受精卵의 凍結, 融解에 있어 Ethylene glycol의 效果에 關한 研究

趙忠鎬 · 鄭昌國 · 黃禹錫

서울大學校 獸醫科大學

(1987. 7. 30 接受)

Studies on the Effects of Ethylene glycol on the Survival of Frozen-Thawed Mouse Embryos

Choong-ho Jo, Chang-kook Cheong and Woo-suk Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received July 30th 1987)

Abstract: The effects of ethylene glycol as a cryoprotective agent on the survival of frozen-thawed mouse embryos were examined. The effects of the stage of development of ethylene glycol were also examined.

Eight-cell embryos, morulae, early blastocysts and mid-blastocysts were recovered from super-ovulated immature ddY mice. Ethylene glycol was added to the embryos in 5 equal increments 5 minutes apart, giving a final concentration of 1.5M. The embryos were cooled to -6°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and seeding was induced at -6°C . After being held for a further 5 minutes at the seeding temperature, the samples were cooled to -35°C at $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then transferred to liquid nitrogen. Rapid thawing was done by placing the straws in 37°C water. The thawed embryos were diluted in PBS of same time and manners as adding procedures.

Survival of 8-cell embryos and morulae were assessed as a normal development of the embryos to the blastocyst stage and expanding blastocyst after 54 hours and 48 hours of in vitro culture, respectively. While those of the early and mid-blastocysts were assessed to the expanding blastocyst stage after 24 hours of in vitro culture.

The survival rates of 8-cell embryos, morulae, early blastocysts and mid-blastocysts were 73.8%, 74.3%, 87.8% and 77.4%, respectively.

Significant difference on the survival rate among the four stages of development was not observed.

緒 論

포유동물의 정액에 대한 동결보존법은 오래 전부터 개발, 개량되어 Polge 등(1949)이 glycerol을 이용하는 방법을 확립시켰다. 이에 비해 포유동물 수정란의 동

결보존에 관한 연구에는 Ferdows 등(1958)이 가토수정란을, Sherman과 Lin(1958)이 마우스의 미수정란을 이용하여 그 가능성을 시사했으나 융해후 생존율은 매우 낮았다. Whittingham(1971)은 Polyvinylpyrrolidone을 이용해 마우스수정란을 -79°C 에서 30분간 보존하

는데 성공하였으며, Whittingham 등(1972)은 -196°C 의 동결보존에 성공하였다. 마우스수정란 이외에도 소(Wilmot와 Rowson, 1973), 랫트(尾川과 友田, 1974), 양(Willadsen 등, 1984),山羊(Bilton과 Moore, 1976), 말(Slade 등, 1984, Yamamoto 등, 1983), 사람(Tronson과 Mohr, 1983) 등 각종 포유동물수정란의 동결보존 성공예가 발표되었다. 그러나 초기의 성공예에 있어서는 동결보호제의 종류, 농도, 첨가법 및 회석법, 냉각속도, 융해속도 등이 복잡하여 야외에서의 응용은 매우 어려웠다. 이에 간편한 동결법을 개발하기 위한 연구가 정열적으로 진전되어 Leibo 등(1982)에 의해 Straw를 이용한 동결 후 직접 이식법이 최초로 발표되었다. 한편, 동결보호제로서는 전부터 일반적으로 이용되어 온 glycerol, dimethylsulfoxide(DMSO) 등이 있으나 Ethylene glycol을 동결보호제로 사용하는 보문은 많지 않다. 이에 Ethylene glycol의 동결보호제로서의 효과를 파악하기 위해 마우스수정란을 이용, 란의 발육단계별로 Ethylene glycol의 동결보존효과를 비교 검토하였다.

材料 및 方法

공시동물 : 본 실험에 사용한 마우스는 생후 30~40일령의 ddY계 미성숙 마우스였다. 마우스 사육실은 7시 30분부터 14시간 점등하였으며 자유급식 및 자유급수로 사육하였다.

과배란 처리 : 과배란을 유도하기 위해 pregnant mare serum gonadotrophin(日本帝國臟器 Co., 이하 PMSG라 약함)을 16시에 7.5IU 복강내 주사하고, 48시간 후에 human chorionic gonadotrophin(日本帝國臟器 Co., 이하 HCG라 약함)을 7.5IU 복강내 투여하였다. HCG를 투여한 직후부터 ddY계 숫마우스와 1일 밤을 동거시켜 다음 날 아침 질전의 유무를 확인하였다.

수정란의 채취 : HCG 투여 후 64~68시간에 8세포기 배를, 76~77시간에 상실배를, 90~92시간에 초기배반포 또는 중기배반포를 각각 채취하였다. 경추탈구법에 의해 도살 후 자궁 및 난관을 비동화자우혈청(calf serum, 이하 CS라 약함, GIBCO)을 5% 첨가한 Dulbecco's phosphate buffered saline(이하 5% CS+PBS로 약함)로 관류하였다. 실험현미경하에서 수정란의 형태를 관찰, 정상란을 5% CS+PBS에 3회 세척 후 실험에 사용하였다.

동결보호제의 첨가 및 평형 : 동결보호제로서 Ethylene glycol을 최종 첨가농도 1.5M이 되도록 하였다. Ethylene glycol의 첨가는 0.3M의 Ethylene glycol을 함유한 5% CS+PBS에 수정란을 옮겨 5분간 평형시킨

후 차례로 0.3M씩 증가된 5% CS+PBS에 각 단계별 5분씩 총 6단계로 평형시켰다. 최종 1.5M의 용액에 평형시킨 수정란은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 0.25ml의 정액동결용 스트로에 7~15개씩 넣었다.

동결 : 수정란을 넣은 스트로를 수정란 동결기(Cryo-embryo-PSP, Hoxan Co.)에 넣고 Fig. 2와 같은 냉각곡선을 설정하여 동결을 하였다. 최후 -35°C 에 달한 시점에서 스트로를 액체질소내에 직접 담가 -196°C 까지 급냉하였고 그 후 액체질소 탱크내에 보존하였다.

융해 : 액체질소내에 7~80일간 보존 후 스트로를 꺼내어 37°C 의 온탕에 30초간 담가 동결 수정란을 융해시켰다.

동결보호제의 회석 및 제거 : 융해시킨 수정란은 차례에 회수하여 5% CS+PBS용액에 Ethylene glycol의 첨가시 농도별 역순 및 동일한 시간으로 조작하여 Ethylene glycol을 회석 제거하였으며 0.3M에 회석 후에는 5% CS+PBS용액에 3회 세척하였다.

체외배양 및 생존선 판정 : 동결보호제를 제거시킨 수정란을 스트로별로 Brinster(1963)의 미소적배양법에 준해 체외배양하였다. 배양액은 BMOC-3(Brinster, 1971)을 이용하였고 37°C , 5% CO_2 , 95% 공기조건의 탄산가스 배양기(田葉井 Co.)를 사용하였다. 8세포기 배는 융해후 54시간 정도, 상실배는 48시간 정도, 초기배반포 및 중기배반포는 24시간 정도 체외배양하여 각각 확장배반포 이상 발육된 수정란으로 판정하였다.

結 果

Ethylene glycol에 대한 수정란의 발육단계별 생존율은 Table 1에 나타난 바와 같이 8세포기, 상실배, 초기배반포 및 중기배반포에 대하여 각각 73.8%, 74.3%, 87.8% 및 77.4%로서 이들 발육단계간 유의차는 인정되지 않았다.

Table 1. The Effect of Ethylene Glycol in the Freezing Medium on the Survival Rates of Mouse Embryos

Development stage	8-cell	Morula	Early blastocyst	Mid-blastocyst
Survival rate	73.8	74.3	87.8	77.4

考 察

포유동물 수정란을 동결할 때 세포내 氷晶형성이나 삼투압차에 의한 세포장해를 방지하여 수정란을 보호하기 위해 동결보호제를 첨가할 필요가 있다. Whitti-

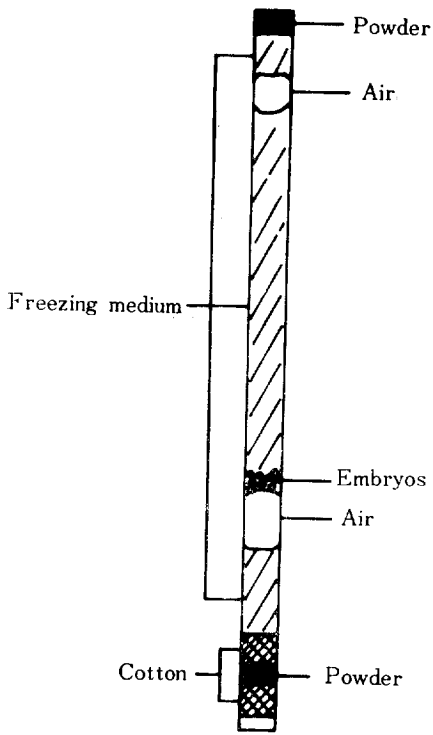


Fig. 1. Embryo frozen straw.

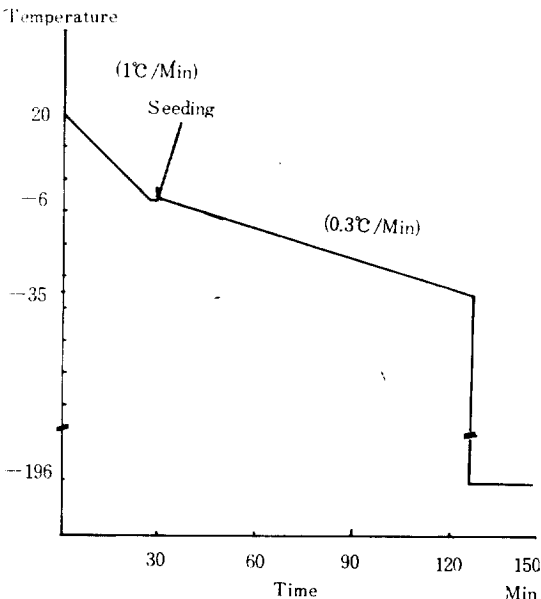


Fig. 2. Freezing curve

ngnam(1971)은 7.5%의 PVP를 동결용매에 첨가하여 동결보호제의 이용 가능성을 시사하였고, DMSO와 glycerol도 동결보호제로서 유효하다는 사실을 확인하였다(Whittingham 등, 1972). 이외에 마우스 수정란에 대한 동결보호제로서 Methyl alcohol(Rall 등, 1984), Ethylene glycol(Miyamoto와 Ishibashi, 1977), Polyvinyl alcohol(Creighton과 Lindner, 1983), Acetamide(Rall과 Fahy, 1985) 등이 이용되어 왔다. 본 실험에서는 마우스 수정란에 있어 발육 단계별로 동결보호제로서 Ethylene glycol의 효과를 비교 검토하였다. 마우스와 랫트의 8세포기란에 대한 Ethylene glycol의 동결에서는 DMSO와 유사한 성적 또는 그 이상의 효과가 있다는 사실이 보고되었다(Miyamoto와 Ishibashi, 1977). 본 실험에서도 8세포기란의 생존율이 73.8%로서 이들의 결과와 거의 일치한 것으로 나타났다. 포유동물의 수정란의 동결보존에 있어 内海(1981)는 일반적으로 수정란의 발육단계가 진전되면 내동성이 증가된다고 하였으며, 그 이유로는 발육단계가 낮을수록 각각의 혈구용적이 커서 세포내 수분탈수가 어려우며 삼투압에 대한 세포막의 저항성이 낮은 것으로 알려져 있다(宮本와 石橋, 1984). 또한 Leibo 등(1974)은 마우스 2세포기란과 8세포기란에서 냉각속도 및 용해속도에 의해 생존율이 차이가 나며, 세포내 수분탈수가 가장 중요한 요소라 하였다. 이와 함께 수정란의 동결용해시에 세포장해의 주된 원인은 동결과정에서의 세포내 氷晶형성과 용해과정에서의 氷晶의 성장 및 再結晶化 등에 있으며 이를 방지하기 위해 가능한한 세포내 수분탈수를 많이 시켜야 한다고 요구하고 있다(内海, 1981). Massip 등(1984)은 배반포를 구성하고 있는 내부 세포피와 영양막세포와의 성질상 차이 및 세포강내의 수분으로 인해 마우스의 상실배 및 초기배반포는 확장배반포에 비해 내동성이 강한 것으로 주장하여, 상술한 여러 보고와 엇갈리고 있다. 본 실험에서는 8세포기란~중기배반포까지의 발육단계별 생존율에 있어 유의차가 없어 이들의 보고와 일치하지 않으나 이 결과가 Ethylene glycol이 특수한 동결보호작용으로 인한 것인지는 더욱 상세한 연구가 요망된다.

結 論

ddY계 미성숙 마우스에 과배란 처치를 실시하여 얻은 8세포기란 상실배, 초기배반포 및 중기배반포에 대하여 Ethylene glycol을 동결보호제로서 첨가하여 0.3M의 농도부터 시작, 최종 농도 1.5M에 이르기까지 5단계로 처리하여 수정란의 발육단계에 따른 내동성의 차이를 비교 검토하였다. 각 발육단계별로 동결, 용해과

정을 거쳐 체외배양을 실시하여 얻은 생존율은 8세포 기란이 73.8%, 상실배 74.3%, 초기배반포 87.8% 및 중기배반포의 77.4%로서 각 발육단계별로 유의차가 인정되지 않았으며, 이는 발육단계별 생존율에 대한 차이가 있다는 현재까지의 학설과 차이가 있는 바, 본 실험에서 동결보호제로 채택한 Ethylene glycol의 특수한 동결보호작용에 기인한 것인지는 좀더 상세한 연구가 요구된다.

參 考 文 獻

Bilton, R.J. and Moore, N.W. (1976) *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci., 29:125~129.

Brinster, R.L. (1963) A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. Cell Res., 32:205~208.

Brinster, R.L. (1971) *in vitro* culture of the embryo. In: Pathway to conception, ed. Sherman, A., 1:245~277, Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publishing Company.

Creighton, K.A. and Lindner, G.M. (1983) Effect of Polyvinyl alcohol on *in vitro* survival of frozen-thawed mouse embryos. Theriogenology., 19: 120(abstract).

Fordows, M., Moore, C.L. and Dracy, A.E. (1958) Survival of rabbit ova stored at -79°C . J. Dairy Sci., 41:739(abstract).

Leibo, S.P., Mazur, P. and Jackowski, S.C. (1974) Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exp. Cell Res., 89:79~88.

Leibo, S.P., West III, A.W. and Perry, B. (1982) A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine Embryos. I. basic studies. Cryobiology., 19:673(abstract).

Massip, A., van der Zwalmen and Leroy, F. (1984) Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed rapidly. Cryobiology., 21:574~577.

Miyamoto, H. and Ishibashi, T. (1977) Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. J. Reprod. Fertil., 50:373~375.

Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and

dehydration at low temperatures. Nature., 164:666.

Rall, W.F., Czlonkowska, M., Barton, S.C. and Polge, C. (1984) Cryoprotection of day-4 mouse embryos by methanol. J. Reprod. Fertil., 70: 293~300.

Rall, W.F. and Fahy, G.M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature., 313:573~575.

Sherman, J.K. and Lin, T.P. (1958) Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. Proc. Soc. Biol. Med., 98: 902~905.

Slade, N.P., Takeda, T., Squires, E.L. and Elsdon, R.P. (1984) Development and viability of frozen-thawed equine embryos. Theriogenology., 21:263(abstract).

Trounson, A. and Mohr, L. (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature., 305:707~709.

Whittingham, D.G. (1971) Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature., 233: 125~126.

Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C . and -269°C . Science., 178:411~414.

Wiladsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M. (1974) Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. Cryobiology., 11: 560(abstract).

Wilmot, I. and Rowson, L.E.A. (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., 92:685~690.

Yamamoto, Y., Oguri, N. and Hachinohe, Y. (1983) Viability of equine embryos after cooling to low temperatures. The 5th World Conference on Animal Production, p.85(abstract).

宮本元, 石橋武彦 (1984) 凍結・融解マウス胚の生存性におよぼす胚の發生段階の影響. 哺乳研誌, 1:95~98.

尾川昭三, 友田仁 (1974) マウスラット, 家兎胚および牛卵胞卵の凍結保存(-80°C)について. 明大農研報, 32:27~30.

内海恭三 (1981) 初期胚の保存. 哺乳動物の初期發生. 第1版. 妹尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷明, 鈴木秋悦, 館隣編, 229~256, 東京:理工學社.