大韓不妊學會雜誌 : 第16卷 第1號 1989
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 16, No. 1, 1989, 6.

생쥐 2세포기배의 동결보존

경희대학교 의과대학 산부인과학교실(불임크리닉)

백청순 · 서병희 · 이재현

한국과학기술원 유전공학센타 발생공학실

이 경 광

Cryopreservation of Mouse 2-Cell Embryos

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.

KAIST Genetic Engineering Research Center Developmental Engineering Control

ABSTRACT

For the cryopreservation of human embryos this study was accomplished as a preliminary experiment.

The purpose of this study is to obtain optimal cryoprotectant, addition and dilution method of cryoprotectant and cooling rate for raising survival of frozon and thawed 2-cell mouse embryos. Seeding was done at -7 ℃ and the straw contained embryos was plunged at -30 ℃ when the slow cooling was ended. Embryos those developed normally to blastocyst after in vitro culture for over 96 hours were regarded as survival ones. The survival was the rate of number of survival embryos against the recovered embryos.

The results are followed :

1. The survivals were 6.3, 71.2 and 67.4% respectively, when Glycerol, DMSO and 1, 2-Propanediol were used as cryoprotectant.
2. When sucrose was added in freezing solution, the survival was 69.0%. That was higher than the survival of embryos frozen without sucrose in freezing solution. The difference was not significant.
3. Addition and dilution of cryoprotectant by 4 stepwise raised the survival than by direct, but that was not significant.
4. When embryos were frozen by -0.3, -0.5 and -1 ℃/min before plunged into LN_2, the survivals were 67.9, 78.0 and 37.0% respectively. The differnce was significant.

I. 서 론

IVF (체외수정법)과 GIFT(난관임신법) program의 성공은 불임환자의 임신을 가능케 하였다. 그러나 이 program들에서는 난포성장과 배란유도를 위한 hormone의 투여로 난자 채취 당시 황체기의 자궁상태가 정상과 다르므로 착상율이 낮다(Edwards and Steptoe, 1979, Testard et al. 1986). 또한 채취되는 난자수도 대부분 1

회 이식에 필요한 수를 초과하게 되어 잉여 수정란의 처리가 문제되며, donor oocyte program에서는 난자를 제공하는 사람과 받는 사람간의 생리주기 동기화가 필요하다. 이 문제들은 난자를 동결 보존할 수 있다면 쉽게 해결될 수 있을 것이며 이미 많은 사람들에 의해 사람 수정란 및 난자의 동결이 연구되어 왔다(Trounson and Mohr, 1983, Zeilmaker et al. 1984, Mohr and Trouson, 1985, Lasselle et al. 1985, Mohr et al. 1985, Cohen et al, 1986, Cohen et al. 1988, Trounson and Sjöblom, 1988).

포유류 수정란의 동결보존을 생쥐 수정란을 대상으로 최초로 성공시킨 Whittingham 등(1972)과 Wilmut(1972)의 보고 이래 생쥐 수정란은 동결보존의 방법을 발전시키는 기초연구 대상으로 사용되어 왔다. 주로 80년대 초까지의 보고를 보면 공시수정란은 4-8세포기 이후의 수정란을 많이 사용하였다(Miyamoto and Ishibashi, 1978, Leibo et al. 1974, Whittingham et al. 1979, Kasai et al. 1980, 1981, Rall et al. 1984, Rall and Fahy, 1985).

그러나 80년 중반기 부터는 동결보존에 1, 2세포기의 수정란과 미수정란을 공시(Quinn and Kerin, 1986, Troungon et al. 1987, Boone et al. 1987, Russel et al. 1987)하는 경향이 있는 것은 그동안 동결보존 방법이 현격한 발전(Rall and Falry, 1985)을 거듭한 결과이기도 하나 동결보존의 수요를 급증시킨 인간의 IVF program에서 체외배양 시간을 가능한 짧게 하는 것과 donor oocyte program에서의 oocyte의 동결이 필요한 것에도 그 원인이 있다 하겠다.

저자들도 인간 수정란의 동결보존의 기초 실험으로서 본 실험을 실시하였으며 생쥐 2세포기 수정란을 공시하여 최적의 항동해제 종류, 항동해제 첨가방법 및 동결속도를 얻음으로써 동결보존후 생존율을 높이는 것을 목적으로 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 수정란 채취

본 실험에 공시된 생쥐는 ICR계통으로 자성은 생후 6-9주령, 웅성은 4-6개월령이었다. 사육환경은 20-27℃의 실온과 자연대로의 일조시간, 무제한 급이급수하였다.

다배란 유기를 위해 자성생쥐에 수당 5IU의 PMSG(Folligon ; Intervet, Holland)를 복강내에 주사한후 48시간만에 HCG(Chorulon; Intervet, Holland)를 PMSG와 동일한 방법으로 투여하였다. 그후 번식능력이 확인된 웅성 생쥐와 1 : 1의 비율로 합사시켰다. 다음날 아침 질전을 확인하여 질전이 확인된 개체에서 HCG 주사한지 48시간만에 2세포기 난을 난관 관류에 의해 채취하였다. 이때 관류액은 변형된 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline을 사용하였다.

2. 동결 및 융해

동결액은 난관 관류시 사용한 용액에 사람혈장을 20 %(V/V) 첨가한 용액(이후 BM으로 약함)에 항동해제를 첨가하여 사용하였다. 항동해제로는 1.5 M의 1, 2-Propanediol DMSO, Glycerol을 0.2 M의 Sucrose와 각각 혼합하여 사용하였다. 이에서 생존율이 높은 결과를 얻은 항동해제를 택해서 다음 실험들의 기본 항동해제로 하였다.

항동해제의 첨가 및 제거방법에 있어서는 1단계(첨가는 BM에 1분간 평형시킨후 1.5 M의 항동해제와 0.2 M의 Sucrose를 함유한 용액에 직접 넣어 15분간 평형시켰다. 제거는 2.5 ml의 BM에 직접 straw내의 동결액 및 수정란을 직접 쏟아내어 15분간 평형시킨후 BM에 3번 이상 세척하였다.), 3단계(첨가는 BM에 1분간 두었다가 0.5, 1.0, 1.5 M의 항동해제를 첨가한 용액에 차례로 옮김으로써 실시하였는데 1, 4단계에 비해 동결액에 Sucrose를 첨가하지 않았으며 이때 평형시간은 5, 5, 10분으로 하였다. 제거는 1.0, 0.5, 0 M의 항동해제와 0.2 M의 Sucrose를 함유한 용액에 차례로 5분씩 평형시킨 후 BM에 3번 이상 세척하였다.)와, 4단계(첨가는 BM에 1분간 두었다가 0.5, 1.0, 1.5 M의 항동해제를 첨가한 용액에 차례로 옮긴 다음 다시 1.5 M의 항동해제와 0.2 M의 Sucrose를 함유한 용액에 옮겨 각각 5분간씩 평형시간을 줌으로써 실시하였다. 제거는 3단계와 같은 방법으로 하였다.)의 3가지 방법으로 하였다.

동결방법은 실온에서 -7℃까지 -2℃/min의 속도로 냉각한후 -7℃에서 식빙하고 10분간 평형시간을 준 다음 -30℃까지 -0.3℃/min, -0.5℃/min과 -1℃/min의 세가지 방법으로 하였다. -30℃에서는 직접 LN_2에 넣음으로써 동결하였다. 융해는 동결보존후 2-3일후에 LN_2에서 바로 37℃의 Water bath속으로 옮겨 급격히 흔들어 줌으로써 실시하였고 전술한 바와같이 각각 항동해

Table 1. Effects of cryoprotectants on the survival of 2-cell mouse embryos frozen and thawed.

Cryprotectant (+ Sucrose)	Addition & Dillution (by stepwise)	No. of Embryos		
		Frozen	Recovered (%)	Normally Developed to Blastocyst (%)
Glycerol	4	53	48(90.6)	3(6.3)
DMSO	4	112	104(92.9)	74(71.2)
1, 2-Propanediol	4	105	92(87.6)	62(67.4)

N.S.
Cooling Rate : -0.3℃/min

Table 2. Effects of addition and dillution method of cryoprotectant, and Sucrose in freezing solution on the survival of 2-cell mouse embryos frozen and thawed

Cryprotectant	Addition & Dillution (by stepwise)	No. of Embryos		
		Frozen	Recovered (%)	Normally Developed to Blastocyst (%)
1, 2-Propanediol	4*	70	58(82.9)	40(69.0)
	3**	56	55(98.2)	35(63.6)
	1*	72	69(95.8)	42(60.9)

N.S.
* : 1, 2-Propanediol(1.5 M)+Sucrose(0.2 M)
** : 1, 2-Propanediol(1.5 M)

Table 3. Effects of cooling rate on the survival of 2-cell mouse embryos frozen and thawed.

Cooling rate (℃/min)	No. of Embryos		
	Frozen	Recovered(%)	Normally Developed to Blastocyst(%)
-0.3	181	156(86.2)	106(67.9)
-0.5	264	255(96.6)	199(78.0)
- 1	188	162(86.2)	60(37.0)

$p<0.05$
Croprotectant : 1, 2-propanediol (1.5 M)+ Sucrose (0.2 M)

제를 제거하였다.

항동해제가 제거된 수정란을 수정란 배양용 incubator에서 2시간 이상 평형시킨 배양액 소적에서 96시간 이상 배양하면서 관찰하였다. 생존율은 융해후 회수한 수정란의 숫자에 대한 배반포 이상 발달한 수정란 숫자의 비율로 하였다.

III. 결 과

항동해제의 종류가 동결융해후의 발달율에 미치는 영향을 보면 항동해제로 Glycerol, DMSO, 1, 2-Propanediol을 사용하였을때 생존율은 각각 6.3, 71.2, 67.4 %이었다. Glycerol과 DMSO를 사용하였을때 각각의 생존율간 통계적 유의차는 없었다(Table 1).

Sucrose를 동결액에 첨가했을 때의 생존율은 69.0 %, 첨가하지 않았을 때의 생존율은 63.6 %이었다. 전자가 후자보다 높기는 하나 통계적 유의차는 없었다(Table 2).

항동해제를 첨가·제거하는 방법에 있어서도 4단계로 첨가·제거한 경우의 생존율은 69.0 %, 1단계로 한 경우는 60.9 %이었으며 이들간 통계적 유의차는 없었다(Table 2).

동결속도가 융해후 생존율에 미치는 영향을 보면 동결속도가 각각 분당 -0.3 ℃, -0.5 ℃, -1 ℃일 때 생존율은 67.9 %, 78.0 %, 37 %로 분당 -0.5 ℃의 속도로 동결하였을때 생존율이 가장 높았으며 통계적 유의차도 있었다(Table 3).

IV. 고 안

항동해제는 침투성의 유무에 따라 두종류로 나눌수 있다. 침투성이 있는 것으로는 1, 2-propanediol, DMSO, Glycerol과 Methanol등이며, 침투성이 없는 것은 Sucrose, Dimethyl formamide, Erythritol과 Polyvinyl pyrolidine등인데 이들 침투성이 없는 항등해제는 그 자체 하나 만으로는 침투성이 있는 항동해제에 비해 항동해제

로서의 효과가 떨어진다(Frideler et al. 1988). 그중에서 Sucrose는 동결·융해후 항동해제의 제거시 삼투압 격차에 의한 해를 줄이는데 사용되었다(Kasai et al. 1981, Szell and Shelton, 1986). 또한 Tesfart등(1986)은 Propanediol과 Sucrose를 혼합하여 항동해제로 사용하여 높은 생존율(80%)을 얻었다.

본 실험에서 침투성이 있는 항동해제로는 Glycerol, 1, 2-propanediol, DMSO의 세가지를 사용하였는데 이중 Glycerol을 사용하였을때 융해후 생존율이 6.3%로 다른 항동해제의 경우보다 매우 낮은 것을 알 수 있었다. 이것은 Glycerol을 동결전에 첨가할때 할구가 다른 항동해제를 사용할때에 비해 매우 작고 동그랗게 빨리 변하는 것이나 융해후 제거할때 갑자기 팽창하는 것을 볼때 당연한 결과라 할수 있겠다. 그 원인을 확실히 알수는 없으나 아마 Glycerol의 경우는 특히 첨가·융해시 주위 온도에 따라 수정란이 받는 상처가 크기 때문이라 사료되며 Bernard와 Fuller(1984)가 보고한대로 Glycerol이 투과할 시간을 충분히 주었으면 좀더 높은 생존율을 얻을 수 있었을 것이라 사료되나 이에 대한 실험은 실시하지 않았다. 또한 가장 생존율이 좋은 항동해제는 DMSO(71.2%)이나 1, 2-propanediol(67.4%)과 통계적 유의차는 없었으며 2세포기의 수정란에 독성이 적은(Renard et al. 1984) 1, 2-propanediol을 기본 항동해제로 하였다.

투과성이 없는 Sucrose를 1, 2-propanediol과 혼합하여 사용하였을때 생존율은 69.0%로 Sucrose를 첨가하지 않았을때의 생존율(63.6%)보다 높았으나 통계적 유의차는 없었다. 항동해제의 첨가에 있어서 Willadsen등(1976)은 삼투압의 변화에 의한 충격을 줄이고 자유수의 충분한 탈수를 위해 6단계 첨가법을 보고한 반면 Leibo등(1974)은 항동해제 첨가후 5분이면 자유수의 탈수가 충분히 이루어지며 그후부터 항동해제가 수정란에 침투하여 세포내외의 평형이 이루어진다고 하였다. 본 실험에서는 항동해제의 첨가·제거방법에 있어서 1단계법과 4단계법을 각각 사용하여 각각 60.9%, 69%의 생존율을 얻었다. 4단계법을 사용하였을때 생존율이 더 높았으나 통계적 유의차는 없었다. 이 결과는 Kojima등(1985)이 토끼 상실배를 공시하여 항동해제의 첨가·제거시 1단계와 3단계방법을 각각 사용하였을때 생존율에 유의차가 없었다는 결과와 일치한다고 하겠다.

동결속도가 융해후의 생존율에 미치는 영향에 대한 보고로는 진등(1985)에 의한 것으로 1.5M DMSO와 Glycerol을 항동해체로 사용하여 8세포기의 생쥐 수정란을 동결함에 있어 식빙후 -50℃까지 동결속도가 분당 -1℃인 경우 융해후 배의 생존율은 43-49%였으나, -3℃의 경우는 13.2~16.9%로 급격히 감소하였으며 7℃ 이상에서는 생존성이 없었다고 한다. 본 실험에서는 동결속도가 각각 분당 -0.3℃, -0.5℃, -1℃일때 생존율은 67.9, 78.0, 37%로 분당 -0.5℃의 속도로 동결하였을때 생존율이 가장 높았다. 분당 -1℃의 속도로 동결한 수정란은 융해 직후부터 배양 24시간까지는 형태적으로 거의 모든 수정란이 정상적으로 보였으나 그 이후부터는 발달이 지연되거나 멈추어 결국에는 퇴행해 버렸다. 배양 환경에서는 영향을 미칠만큼 변화가 없었던 것으로 보아 어떤요인에 의한 것인지 알수 없으나 동결속도가 그 원인이 된다면 이에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 실험은 인간 수정란의 동결보존을 위한 기초실험으로서 생쥐 2세포기란을 공시하여 동결보존후 생존율을 높이기 위한 최적의 항동해제 종류, 항동해제 첨가·제거방법 및 동결속도를 얻기 위한 목적으로 실시하였다. 식빙온도는 -7℃로 하였으며 완만동결이 끝나는 온도 즉 LN_2에 침적시키는 온도는 -30℃로 하였다. 융해후 배양시간은 96시간 이상으로 하였으며 생존율은 융해후 회수한 수정란수에 대한 배양하는 동안 정상적인 배반포단계까지 발달한 수정란수의 비율로 나타내었다.

본 실험의 결과는 다음과 같다.

1. Glycerol, DMSO, 1, 2-propanediol을 항동해제로 사용하였을때 생존율은 각각 6.3, 71.2, 67.4%이었다. Glycerol을 사용하였을때 가장 저조한 생존율을 얻었다.

2. Sucrose를 동결액에 첨가했을 때의 생존율은 69.0%, 첨가하지 않았을 때의 생존율은 63.6%로 통계적 유의차가 없었다.

3. 항동해제를 첨가·제거하는 방법에 있어서 4단계로 첨가·제거한 경우의 생존율은 69.0%, 1단계로 한 경우는 60.9%이었다. 이들간 통계적 유의차는 없었다.

4. 동결속도를 분당 -0.3, -0.5, -1℃로 하였을 때 생존율은 67.9, 78.0, 37 %로 분당 -0.5℃의 속도로 동결하였을때 생존율이 가장 높았다.

참 고 문 헌

Bernard A., Fuller B. : *Fartors influencing successful crypreservation of in vitro fertilized two-cell mouse embryo(Abstr). Cryobiology, 21 : 712, 1984.*

Boone W.R., Brown C.A., Vasquez J.M., Shapiro S.S. : *Freezing embryos without a programmable freezer(Abstr225). Presented at the forty-second annual meeting of the Amenican Fertility Society, Reno, Nevada, September 28 to 30, 1987. Published by the American Fertility Society, p93, 1987.*

Cohen J., Klaus E.W., Graham W. : *Prognostic value of morphologic characteristics of cryopreserved embryos : a study using videocinematography. Fertil Steril. 49 : 827, 1988.*

Cohen J., Simons R.F., Fehilly C.D., Edwards R.G. : *Factory affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. J. In-Vitro Fertil Embryo Transfer, 3 : 46, 1986.*

Edwards R.G., Steptoe P. : *A Matter of Life. Hutchinson, London, pp. 135, 1980.*

Friedler S., Giudice L.C., Lamb E.J. : *Cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril, 49 : 743, 1988.*

진동일, 임경순, 오봉국, 이용무 : 동해방지제, 식빙, 동결속도 및 보존기간이 생쥐 초기배의 생존성에 미치는 영향. 한국축산학회지, *28 : 474, 1986.*

Kasai M., Niwa K., Iritani A. : *Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod Fertil, 59 : 51, 1980.*

Kasai M., Niwa K., Iritani A. : *Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozed and frozen mouse embryos. J. Reprod Fertil, 63 : 175, 1981.*

Kojima T., Soma T., Oguri N. : *Effect of rapid addition and dilution of dimethyl sulfoxide on the viability of frozen-thawed rabbit morulae. Cryobiology, 22 : 409, 1985.*

Lassalle B., Testart J., Renard J.P. : *Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2-propanediol. Fertil Steril, 44 : 654, 1985.*

Leibo S.P., Mazur P., Jackowski S.C. : *Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Expl. Cell Res. 89 : 79, 1974.*

Miyamoto H., Ishibashi T. : *The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. J. Reprod Fertil, 54 : 427, 1978.*

Mohr L., Trounson A.O. : *Cryopreservation of human embryos. In Seppala, M. and Edwardsa R.G.(eds), In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Ann. N. Y. Acad. Sci., 442 : 536, 1985.*

Mohr L.R., Trounson A., Freemann L. : *Deep-Freezing and Transfer of human Embryos J. of in vitro Fertillzation and Embryo Transfer, 2 : 1, 1985.*

Rall W.P., Czlonkowska M., Barton S., Ploge C. : *Cryoprotection of day-4-mouse embryos by methanol. J. Reprod Fertil, 70 : 293, 1984.*

Rall W.F., Fahy G.M. : *Icefree cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification. Nature, 313 : 573, 1985.*

Renard J.P., Nguyen B.X., Garnier V. : *Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J. Reprod Fertil, 71 : 573, 1984.*

Russell J.B., Pellicer A.,De Cherney A.H. : *The use of a DMSO-PROH mixture to preserve mouse embryos(Abst. pp-136). Presented at the Fifth World Congress on In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Norfolk, Virginia, April 5 to 10, Published by The American Fertility Society, p. 79, 1987.*

Quinn P., Kerin J.F.P. : *Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish success-*

ful techniques. J. In Vitro Fertil Embryo Transfer, 3 : 40, 1986.

Szell A., Shelton J.N. : *Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod Fert, 76 : 401, 1986.*

Testart J., Lassalle B., Belaish-Allart J., Hazout A., Forman R., Rainhorn J.D., Frydman R. : *High pregnancy rate after early embryo freezing. Fertil Steril, 46 : 268, 1986.*

Trounson A.O., Mohr L. : *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. nature, 305 : 707, 1983.*

Trounson A.O., Peura A., Kirby C. : *Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil Steril, 48 : 843, 1987.*

Trounson A., Sjoblom P. : *Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. Fertil Steril, 50 : 373, 1988.*

Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. : *Survival of mouse embryos frozen to -196 ℃ and -269 ℃. Science, 178 : 414, 1972.*

Whittingham D.G., Wood M., Farrant J., Lee H., Halsey J.A. : *Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 ℃. J. Reprod Fertil, 56 : 11, 1979.*

Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E.A., Moor R.M. : *Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod Fertil, 46 : 151, 1976.*

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., 11 : 1071, 1972.*

Zeilmaker G.H., Alberda A.Th., Van Gent I., Rijkmans C.M.P.M., Drogendijk A.C. : *Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril, 2 : 293, 1984.*