

## 생쥐초기배아 세포기가 동결보존 및 융해후 생존에 미치는 영향

연세대학교 원주의과대학 산부인과학교실

한혁동 · 김영대 · 손성욱 · 권장연 · 이영진 · 정인배 · 차동수

### Effect of Cell Stage on Development of Mice Embryo After Cryopreservation and Thawing

Hyuck-Dong Han, M.D., Young-Dae Kim, M.D., Sung-Wook Shon, M.D.,  
Jang-Yeon Kwon, M.D., Young-Jin Lee, M.D., In-Bae Chung, M.D.  
and Dong-Soo Cha, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University,  
Wonju College of Medicine, Wonju, Korea*

#### = Abstract =

To foresee appropriate developmental cell stage in human embryos for cryopreservation, we observed blastocyst development in culture medium after cryopreservation and thawing of one cell, two cell, four cell stage of mice embryos. According to our results, development of the blastocyst of cryopreserved two cell mice embryos was significantly higher than that of cryopreserved one cell mice zygotes or four cell mice embryos.

#### 서 론

배아의 동결보존(Pre-embryo cryopreservation)은 체외수정 및 배아이식술(I.V.F. & E.T)과 더불어 불임환자에게 임신을 가능하게 하는 중요한 역할을 하고 있다. 최근 과배란유도의 발전은 많은 양의 난자를 획득할 수 있게 하였으며 적절한 양의 배아를 이식한 후 남은 배아의 동결보존을 가능하게 하였다. 동결보존된 배아의 생존율은 배아의 세포기(Developmental stage), 항동해제(Cryoprotectant)의 종류, 동결보존 방법에 따라 변할 수 있다(Schneider, 1986). 일반적으로 항동해제는 1세포기(Zygote)에서 4세포기 까지 1,2-propanediol을 사용하며(Testart et al., 1986; Cohen et al., 1988; Testart et al., 1987). 4-8세포기까지는 DMSO를(Trounson & Mohr, 1983) 포배기(Blastocyst stage)에

서는 Glycerol을 사용하고(Fehilly et al., 1985) 있고 동결 융해 방법은 완만동결(Slow freezing), 완만융해(Slow thawing)(Trounson, 1986; 이동, 1990), 완만동결 고속융해(Rapid thawing)(백동, 1989; Fehilly et al., 1985; Trounson & Mohr, 1985), 초고속동결(Ultra-rapid freezing)방법등(Noto, 1991; Trounson et al., 1988; Trounson & Sjoblom, 1988)을 사용하고 있다. 배아세포기는 체외수정 및 배아이식술때 얻을 수 있는 1세포기, 2세포기, 4세포기, 8세포기의 배아를 동결보존할 수 있으며 배아를 더 배양한 후 포배기에서 동결보존할 수 있다. 그러나 체외수정 및 배아이식에서 체외 배양시간을 가능한 줄이기 위해 1세포기, 2세포기, 4세포기 배아를 많이 사용하는 경향이 있다. 본 연구는 1, 2-propanediol을 항동해제로 사용하고 완만동결 완만융해법을 이용하여 생쥐배아를 동결보존 하였으며 세포기별 즉 1세포기, 2세포기, 4세포기의 동결보존 융해후 생존율을 비교 관찰하여 동결보존에 가장 유리한 생쥐배아

이 논문은 1992년도 연세대학교 학술연구비로 쓰여졌음.

의 세포기를 알고자 시행하였다.

## 실험대상 및 방법

### 1. 생쥐 난자의 과배란 유도 및 1세포기 접합체, 2세포기 배아 4세포기 배아의 획득

생후 6-10주 사이의 BDF<sub>1</sub>(C<sub>57</sub>BL×DBA) 암컷 생쥐에 5 I.U. pregnant mare serum gonadotropin(PMS)를 복강내 주사한 48시간 후 5 I.U. human chorionic gonadotropin(hCG)를 복강내 주사하여 과배란 유도를 시킨 후 동종의 BDF<sub>1</sub> 숫컷 생쥐와 교미 시켰다. 교미 시킨 다음날 아침 암컷 생쥐의 질점액전을 확인하여 교미된 암컷 생쥐의 질점액전을 확인하여 교미된 암컷 생쥐를 경추탈골 방법으로 희생시켜 생쥐 난관에서 1세포기 접합체-난구세포 복합체(Cumulus-oocyte complex)를 30G 주사침을 이용하여 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)에 50mg/ml bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 첨가된 용액에서 난관 팽대부로부터 얻었으며 1세포기 접합체는 1세포기 접합체-난구세포 복합체를 67 I.U./ml 농도의 hyaluronidase로 처리하여 난구세포를 제거한 후 2번 DPBS에서 세척한 후 얻었다. 2세포기 생쥐 배아는 1세포기 접합체를 10% 태아제대혈청을 함유한 Ham's F-10배지에서 약 24시간 배양하여 얻었으며 4세포기 생쥐배아는 약 48

**Table 1.** Recovery and blastocyst development of one cell mice zygotes after freezing and thawing

Times	Number of frozen embryos	Number of recovery embryos (%)*	Number of blastocyst develop (%)**
1	8	4(50%)	2(50%)
2	15	7(47%)	1(14%)
3	13	11(85%)	2(18%)
4	8	5(63%)	1(20%)
5	10	7(70%)	2(29%)
Mean ±SD	10.8±3.1	6.8±2.6 (63.0±15.5%)	1.6±0.5 (26.2±14.4%)

\*Recovered embryos: well preserved normal morphologic features by microscopy after the removal of the freezing solution

\*\*Blastocyst development rate(%): No. of blastocyst develop/No. of recovered embryos×100

시간 배양하여 얻었다.

### 2. 1세포기 접합체, 2세포기 생쥐배아 및 4세포기 생쥐배아의 냉동보존 및 융해 후 배양 및 난할을 관찰

위에서 얻어진 각 세포기(1 cell, 2 cell, 4 cell)의 생쥐 배아를 냉각용기의 냉동 배지내로 이송하여 냉각기 내에서 상온에서 부터 -6°C까지는 -1°C/min의 냉각속도로 냉각 후 5분간 평형시킨 후 빙정형성을 위해 식빙을 시행하였으며 다시 5분 평형시킨 후 -0.5°C/min의 냉동속도로 -80°C까지 냉각 시켜서 -196°C로 유지하고 있는 액화질소 탱크에 냉동보존 하였다. 이때 사용한 냉동배지는 3mg/ml의 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 함유하고 있고 항동해제로 1.5M 1,2-propanediol을 포함한 DPBS를 사용하였다. 각 세포기의 생쥐 배아를 융해 시키는 과정은 액화질소 탱크에 냉동보존되었던 각 세포기의 생쥐 배아를 -100°C로 유지되어 있는 냉각기로 이송하여 5분간 평형시키고 8.0°C/min의 융해속도로 상온 (20°C)까지 융해시킨뒤 5분간 평형시켜서 융해를 완료후 항동해제를 제거하기 위해 1.0M 1,2-propanediol을 함유한 용액에서 5분간, 0.5M 용액에서 5분간, 0.0M 용액에서 5분간 평형시켰으며 항동해제를 제거한 배아는 현미경으로 관찰하여 정상형태학적 특징이 잘 보존되어 있는 배아(Recovered embryo)를 선택하여 배양하였다. 정상형태로 회복된 1세포기 생쥐 접합체는 10% 태아 제대혈청을 함유한 Ham's F-10배지에서 약 96시간 배양했고 2세포기 생쥐배아는 약 72시간, 4세포기 생쥐배아는 약 48시간 배양하

**Table 2.** Recovery and blastocyst development of two cell mice embryos after freezing and thawing

Times	Number of frozen embryos	Number of recovery embryos(%)	Number of blastocyst develop(%)
1	7	4( 57%)	4(100%)
2	8	8(100%)	8(100%)
3	9	6( 67%)	6(100%)
4	10	7( 67%)	7(100%)
5	12	9( 75%)	7( 78%)
Mean ±SD	9.2±1.9	6.8±1.9 (73.8±16.1%)	6.4±1.5 (95.6±9.8%)

**Table 3.** Recovery and blastocyst development of four cell mice embryos after freezing and thawing

Times	Number of frozen embryos	Number of recovery embryos (%)	Number of blastocyst develop (%)
1	10	7(70%)	7(100%)
2	10	5(50%)	1( 20%)
3	7	4(57%)	1( 25%)
4	10	8(80%)	6( 75%)
5	10	4(40%)	3( 75%)
Mean ±SD	9.4±1.8	5.6±1.8 (59.4±15.9%)	3.6±2.8 (59.0±34.9%)

여 포배기 배아를 관찰하였으며 포배기 난할율은 총 회복된 배아에 대한 포배기 배아의 발육을 백분율로 표시 하였다.

### 실험 결과

1세포기 배아 10.0±3.1(Mean±SD)개를 5회 동결보존 유효한 결과 63±15.8%(Mean±SD)의 배아가 온전히 보존되었으며(Recovery rate) 이 중 26.2±14.4%(Mean±SD)의 배아가 포배기로 난할 되었고(표 1), 2세포기 배아 9.2±1.9개를 5회 동결보존 유효한 결과 73.8±16.1%의 배아가 온전히 보존되었으며 이 중 95.6±16.1%의 배아가 포배기로 난할되었으며(표 2), 4세포기 배아 9.4±1.3개를 5회 동결 보존유효한 결과 59.4±15.9%의 배아가 온전히 보존되었으며 이 중 59.0±34.0%의 배아가 포배기로 난할되었다(표 3). 이상 결과 1세포기 배아, 2세포기 배아, 4세포기 배아의 동결보존 유효후 Recovery rate에는 차이를 보이지 않았으나 포배기 배아 난할율은 2세포기 배아를 동결보존 했을때 1세포기, 4세포기에 비해 유의하게 높은 난할율을 보였다(표 4).

### 고 찰

배아의 냉동보존에는 세포의 투과성에 따른 항동해제의 종류 및 첨가방법, 냉각 및 용해속도에 따른 냉각 및 용해 조건들에 따라 세포가 냉동보존 유효후 회복율에 차이가 있다. 인간 배아의 냉동보존은 1세포기 접합체에서 포배기 까지 모든 배아에서 냉동보존 되었으며 용해후

**Table 4.** Recovery and blastocyst development of different mice embryos stage after freezing and thawing(Mean±SD)

Group	No. of frozen	No. of recovered (%)	No. of blastocyst develop (%)
One cell mice zygotes	10.8±3.1	6.8±2.6 (63.0±15.5%)	1.6±0.5 (26.2±14.4%)
Two cell mice embryos	9.2±1.9	6.8±1.9 (73.8±16.1%)	6.4±1.5* (95.6±9.8%)*
Four cell mice embryos	9.4±1.3	5.6±1.8 (59.4±15.9%)	3.6±2.8 (59.0±34.9%)

\*:The value of P<0.05:between one cell and two cell

The value of P<0.05:between two cell and four cell

배아이식에 성공하였다. 그러나 최근에는 항동해제 1.2-propandiol을 이용한 초기 배아(1세포기 접합체, 2세포기 배아, 4세포기 배아)의 동결보존이 가장 많이 사용되고 있다. 이것은 비교적 높은 임신 성공율을 보일 뿐 아니라 손쉽게 체외수정 및 배아 배양중 얻을 수 있기 때문이라 하겠다. 이에 1세포기 접합체, 2세포기 배아, 4세포기 배아 중 어떤 세포기를 선택하여 동결보존 프로그램을 적용 시키는 것이 가장 유리한 효과를 나타낼 수 있는가는 흥미로운 과제가 될 수 있다.

Testart등(1987)은 인간배아 냉동보존 유효후 세포기에 따른 배아 회복율의 비교에서 8세포기 이상의 배아에 비해 초기 배아가 높은 회복율을 보이고 1, 2, 4세포기등의 지수의 세포기(exponential cell stage)가 3, 5, 6세포기등의 중간난할기(intermediate cleavage stage)보다 높은 회복율을 보인다고 했고 1, 2, 4세포기의 회복율을 비슷한 결과를 보인다고 말하고 있다.

이는 본 연구에서 1세포기, 2세포기, 4세포기의 회복율 63%, 74%, 59%를 보인 결과와 비슷한 회복율을 보임과 동일함을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서는 회복된 배아의 난할율이 2세포기 95.6±9.8%의 포배기 난할율을 보여 1세포기 접합체 4세포기 배아에 비해 높은 난할율을 보였고 이로써 2세포기가 냉동 보존에 보다 유리한 세포기임을 알 수 있었다. 그러나 이 결과는 Cohen등(1988)의 2세포기 냉

동보존 후 회복된 배아의 자궁이식에서 한명의 임신을 얻지 못한 결과와 상이한 결과로 보다 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

1세포기 접합체  $10.8 \pm 3.1$  (Mean  $\pm$  SD) 개를 5회 동결보존 용해한 결과  $63.0 \pm 15.5\%$  (Mean  $\pm$  SD)의 배아가 온전히 보존(Recovery Rate) 이 중  $26.2 \pm 14.4\%$  (Mean  $\pm$  SD)의 배아가 포배기로 난할되었으며 2세포기 배아  $9.2 \pm 1.9$  개를 5회 동결보존 용해한 결과  $73.8 \pm 16.1\%$  배아가 온전히 보존되었으며 이 중  $95.6 \pm 9.8\%$ 의 배아가 포배기로 난할되었고, 4세포기 배아  $9.4 \pm 1.3$  개를 5회 동결보존 용해한 결과  $59.4 \pm 15.9\%$ 의 배아가 온전히 보존되었으며 이 중  $59.0 \pm 34.9\%$ 의 배아가 포배기로 난할되었다. 이상 결과 1세포기 접합체, 2세포기 배아, 4세포기 배아의 동결보존 용해후 Recovery Rate에는 차이를 보이지 않았으나 포배기 배아 난할율은 2세포기 배아를 동결보존 했을때가 1세포기, 4세포기에 비해 유의하게 높은 난할율을 보였다.

## 인 용 문 헌

- 백청순, 서병희, 이재현, 이경옥: 생쥐 2세포기 동결보존. 대한불임학회잡지 1989, 16, 9-14.
- Cohen J, Kort HI, Devane GW, Massey JB, Elsner CW, Turner TG, Fehilly CB: Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 283-289.
- Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study. *Fertil Steril* 1985, 44, 683-644.
- 이한수, 백청순, 서병희, 이재현: 2세포기 생쥐 수정란의 동결 해빙에 미치는 실험적 조건에 관한 연구. 대한산부회지 1990, 33, 413-423.
- Noto V, Campo R, Roziere P, Gordts S: Fluorescein diacetate assessment of embryos. *Fertil Steril* 1991, 55, 1171-1175.
- Schneider U: Cryobiological principles of embryo freezing. *J in Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986, 3, 3-9.
- Testart J, Allart JB, Lassalle B, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Gazengel A, Frydman R: Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987, 48, 107-112.
- Testart J, Lassalle B, Allart JB, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268-272.
- Trounson A: Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1986, 46, 1-11.
- Trounson A, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707-709.
- Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C: Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 822-826.
- Trounson A, Peura A, Kirby C: Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryos cryopreservation. *Fertil Steril* 1987, 48, 843-850.
- Trounson A, Sjoblom P: Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. *Fertil Steril* 1988, 50, 373-376.