

생쥐 배아 동결시 전핵의 발생시기가 생존률과 발생률에 미치는 영향

P. L. 산부인과 체외수정 연구실

양현원 · 강희규 · 최규완 · 차영범 · 이승재 · 박종민

Effects of the Age of Pronucleate Ova on Survival and Development in Cryopreservation of Mouse Embryos

Hyun Won Yang, Hee Kyoo Kang, Kyoo Wan Choi, Young Beom Cha
Seung Jae Lee and Jong Min Park

IVF Research Laboratory, Park & Lee Infertility Clinic, Seoul 135-270, Korea

= Abstract =

The effects of freezing and 1,2-propanediol on early and late pronucleate stage mouse ova were investigated in terms of survival after thawing and development in vitro. The samples were divided into two groups according to different age in pronucleate ova: ova in (1) early pronuclear stage with two distant pronuclei at 18h after hCG injection, and (2) late pronuclear stage with adjacent pronuclei at 30h. Zygotes in the late pronuclear stage have been proven to be more resistant to 1,2-propanediol, showing a significantly higher developmental rate than zygotes in early stage (80.3 versus 66.3%, $P < 0.05$), but survival rate was similar in the two groups (91.0 versus 93.5%). After freezing and thawing, survival and developmental rates were decreased in both groups when compared to the control group (54.3 versus 92.3%, 47.7 versus 73.3%, respectively). And developmental rate in the late pronuclear stage zygotes showed significantly higher than in early (55.4 versus 40.0%) after thawing.

In conclusion, early pronucleate mouse ova have a lower developmental capacity in vitro and a lower survival rate after freezing and thawing than late ova. These findings suggest that the timing of freezing could be important for survival and further development in vitro in cryopreservation of human pronucleate ova.

서 론

체외 수정 및 배아 이식에 있어서 과배란 유도 방법의 발달로 다수의 난자 및 배아를 얻게 되어 잉여 난자와 배아에 대한 동결 보존 방법이 활발하게 연구 개발되어 왔다 (Fehilly et al., 1985; Al-Hasani et al., 1987; Siebzehnuebl, 1989).

배아의 분열 시기에 따라 여러 종류의 결빙 억제제가 사용되고 있으며, 또한 다양한 동결 및 해빙 방법이 보고되고 있다 (Macas et al., 1991; Mandelbaum et al., 1988; Trounson et

al., 1988; Wilson et al., 1989). 4세포기 이내의 초기 배아, 특히 전핵 시기 배아의 동결에는 결빙억제제로 dimethylsulfoxide (DMSO)보다 1, 2-propanediol (PROH)이 적합한 것으로 보고되고 있다 (Lassalle et al., 1985; Siebzehnuebl et al., 1989). 또한 PROH를 결빙억제제로 사용하여 전핵 시기 배아를 동결할 경우 급속 동결 방법보다는 저속에 의한 동결 방법이 초기 배아의 생존률을 보다 높일 수 있는 것으로 알려지고 있다 (Van der Auwera et al., 1990).

1986년 Testart가 기존의 분열 시기 배아가 아닌 전핵 시기의 배아에서 동결 보존을 성공한 이후 분열중인 배아보다는 전핵 시기의 배

아가 동결 보존에 보다 안정적이고, 임신률도 높은 것으로 보고되고 있다(Testart et al., 1986; Fugger et al., 1988; Katayama et al., 1990; Cohen et al., 1988). 따라서 최근 체외 수정 및 이식에 있어서 배아 동결 보존은 분얼 시기의 배아보다는 전핵 시기의 배아를 동결 보존하는 경향이다.

그러나 전핵 시기는 다른 세포 분열 기간보다 길고, 전핵의 이동 및 융합등 세포학적으로 활성을 보이고 있으며, 이러한 활성은 세포질내 세포 골격의 재배열에 의해서 일어나며 또한 미체소관의 중합과 해체에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있다(Wright et al., 1990). 그리고 동결시 사용되는 결빙억제제는 이러한 세포질내 미체소관에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Van der Elst et al., 1992; Sathananthan et al., 1988; Al-Hasani et al., 1992).

따라서 본 실험은 세포질내 세포 골격의 상태가 다른 초기 및 후기 전핵 시기 배아에 결빙억제제를 처리한 후의 발생 능력과 동결 및 해빙 후 생존률과 발생률을 비교하여 동결 및 결빙억제제가 전핵 시기 배아 발생에 미치는 영향을 조사함으로써, 전핵 배아의 어느 시기가 동결 보존에 보다 적합한지를 알아보고자 실행하였다.

재료 및 방법

1. 전핵 배아의 획득

본 실험에서는 생후 4-8주된 생쥐 (ICR strain)를 사용하였다. 수정란의 획득을 위해서 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma) 5 IU를 복강주사하였고, 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) 5 IU를 주사한 뒤 암수를 합사시켰다. 초기 전핵 배아는 hCG 주사를 하고 18시간이 경과한 후에, 후기 전핵 배아는 30시간이 경과한 후에 경추파괴로 도살하여 수란관을 적출하였고, 적출된 수란관내에서 얻어진 배아를 0.1% hyaluronidase를 포함한 PBS로 처리하여 난구세포를 제거하였다. 실험에 사용한 배아는 위상차현미경하에서 관찰하여 세포질이 투명하고 건강한 전핵 두개가 명확히 보이는 배아만을 사용하였다.

2. 배아의 동결 및 해빙

배양과 세척을 위한 배양액은 10% human fetal cord serum (hFCS)을 포함한 Ham's F-10

(Gibco)을 사용하였고, 동결액으로는 10% hFCS을 포함한 PBS에 1.5M PROH (Sigma)+0.2M sucrose (Sigma)를 첨가하여 사용하였다.

배아의 생존과 발생에 미치는 결빙억제제 영향을 알아보기 위하여 대조군으로 배아를 실온에서 배양액만을 30분간 처리한 후 배양기(37°C, 5% CO₂, 100% 습도)내에서 24시간 배양하였고, 실험대조군은 동결을 시행하지 않고 난구세포를 제거한 배아를 동결액인 1.5M PROH와 1.5 PROH+0.2M sucrose에서 각각 15분씩 처리한 후 해빙액인 1.0M PROH, 0.5M PROH, 0.2M sucrose, 20% hFCS를 각각 포함한 PBS에서 5분씩 처리한 뒤 현미경하에서 관찰하여 세포질이 밝고 구형이 유지되는 배아만을 생존한 것으로 판정하고 이를 배양하였다.

또한 동결 및 해빙이 배아에 미치는 영향을 알아보기 위하여 난구세포를 제거한 배아를 동결액에서 각각 15분씩 처리한 후 straw에 넣고 세포동결기(Kryo-10, Planer)를 이용하여 -2°C/min 속도로 -7°C까지 냉각하였고, -7°C에서 10분간 정지시키고 식빙(seeding)을 시행하였다. -7°C에서 -50°C까지 저속 동결(-0.3°C/min)을 시행한 후 액체 질소통에 직접 넣었다. 수일 후 25°C 증류수를 이용하여 급속 해빙(500°C/min)시키고 4단계의 해빙액으로 처리하여 결빙억제제를 제거한 후 현미경하에서 관찰하였다. 모양이 둥글고 세포질이 밝으며, 온전한 투명대를 가진 배아를 생존한 것으로 판정하였고, 생존한 배아는 20% hFCS가 포함된 Ham's F-10에서 24시간 배양하면서 발달 과정을 관찰하였다.

생존률은 해빙 후 배양액에 들어가기 직전의 배아중 형태학적 살아있는 배아의 비율로 나타냈으며, 발생률은 생존 배아중 배양 24시간 후 2세포기까지의 발생 비율로 나타냈다.

3. 통계 처리

본 실험의 유의성 검정은 student's *t*-test 방법으로 실시하였으며, P값이 0.05보다 작은 경우 유의성 있는 것으로 판단하였다.

결 과

대조군에 있어서 배아의 생존률은 hCG 주사 후 18시간에 초기 전핵 배아와 30시간에 후기 전핵 배아에서 생존률(100%, 96.7%)과 발생률(83.3%, 86.2%)은 차이가 없이 나타났다.

Table 1. The results of freezing and thawing of the early and late pronucleate ova after treatment of PROH (Control; ova treated with only Ham's F-10, PROH; ova treated with PROH only, CRYO; frozen-thawed ova after PROH-treatment)

Group	Age of PN ova	No. of Ova	Recovery (%)	Survival (%)	Development (%)	t-Test
Control (n= 3)	Early	30	-	30(100)	25(83)	NS
	Late	30	-	29(97)	25(86)	
PROH (n= 9)	Early	92	-	86(94)	a 57(66)	p<0.05
	Late	78	-	71(91)	a 57(80)	
CRYO (n=10)	Early	175	157(90)	90(51)	b 36(40)	p<0.05
	Late	145	127(88)	83(57)	b 46(55)	

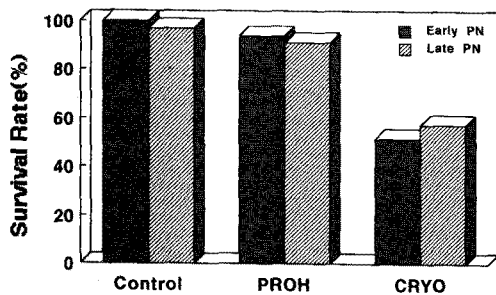


Fig. 1. The survival rates of early and late pronucleate ova after treatment of PROH (Control; ova treated with only Ham's F-10, PROH; ova treated with PROH only, CRYO; frozen-thawed ova after PROH-treatment).

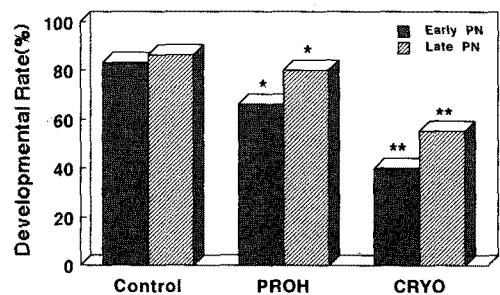


Fig. 2. The developmental rates of early and late pronucleate ova after treatment of PROH (Control; ova treated with only Ham's F-10, PROH; ova treated with PROH only, CRYO; frozen-thawed ova after PROH-treatment). *, **: p<0.05.

동결은 하지않고 결빙억제제와 해빙액만을 처리한 실험대조군에서는 생존률이 초기 전핵 배아에서 93.5%, 후기 전핵 배아에서 91.0%로 전체적으로 대조군과 비슷한 수준으로 나타났으나, 발생률은 66.3%와 80.3%로 대조군에 비해 낮은 수준을 보였다.

동결은 시행한 실험군에서는 생존률 (51.4%, 57.2%) 및 발생률 (40.0%, 55.4%)이 대조군과 실험대조군에 비해 두군 모두 낮게 나타났으며, 특히 2세포기까지의 발생률은 실험대조군과 실험군에서 후기 전핵 배아가 초기 전핵 배아보다 통계학적으로 유의하게 (P<0.05) 높게 나타났다(표 1).

각군에서 초기 및 후기 전핵 배아의 생존률을 비교한 결과 동결을 하지않은 두 군에서는 평균 95.2%로 비슷한 양상으로 높게 나타났지만 동결을 시행했던 실험군에서는 평균 54.3%로 두군에 비해 생존률이 크게 감소한 것을 알 수 있었다(그림 1).

각군에서 초기 및 후기 전핵 배아의 발생률을 비교해 보면 결빙억제제만을 처리했던 실험대조군에서 후기 전핵 배아는 발생률이 80.3%

로 초기 전핵 배아의 66.3%보다 유의하게 (P<0.05) 높은 발생률을 보였다. 또한 동결까지 시행했던 실험군에서는 실험대조군에 비해 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나, 실험대조군과 동일하게 후기 전핵 배아 (55.4%)가 초기 전핵 배아 (40.0%)보다 발생률이 유의하게 (P<0.05) 높게 나타났다(그림 2).

고 찰

체의 수정 및 이식에 있어서 과배란 유도 방법의 발달로 잉여 난자와 배아에 대한 동결 보존 방법이 활발하게 연구 개발되고, 배아의 분열 시기에 따라 여러 종류의 결빙억제제가 사용되고 있으며, 또한 다양한 동결 및 해빙 방법이 보고되고 있다. 전핵시기 배아를 동결할 경우 결빙억제제로 PROH가 적합한 것으로 보고되고 있으며 (Lassalle et al., 1985; Siebzhnruebl et al., 1989), 동결 방법은 저속의 동결이 전핵 시기 배아의 생존률을 보다 높일 수 있는 것으로 알려지고 있다 (Van der Auwera

et al., 1990).

그러나 전핵 시기는 다른 분열 시기보다 길며, 세포질내에서는 세포 골격의 재배열이 활발히 일어나고 전핵내 DNA의 합성이 일어난다. 또한 전핵의 이동은 미세소관의 중합과 해체에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있다 (Wright et al., 1990). 그리고 동결시 사용되는 결빙억제제는 이러한 세포질내 미세소관과 전핵내 DNA합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Van der Elst et al., 1992; Sathanathan et al., 1988; Al-Hasani et al., 1992).

본 실험에서 결빙억제제와 해빙액만 처리한 실험대조군에서는 전체적으로 생존률이 90% 정도로 대조군과 비슷한 수준을 보인 반면, 발생물에서는 66-80%로 대조군에 비해 낮은 경향을 보인 것으로 보아 결빙억제제인 PROH가 배아의 생존에는 큰 영향을 미치지 않으나, 배아의 분열과 발생에 화학적 상해를 입히는 것으로, 여겨지며 이는 PROH가 정자 성상체와 전핵의 이동에 관여하는 미세소관과 전핵내 DNA합성에 영향을 미치기 때문으로 사료된다.

또한 동결을 실시했던 실험군에서 생존률과 발생률이 모두 낮게 나타난 것은 동결시에 생기는 ice crystal과 결빙억제제의 독성이 세포내 소기관과 미세소관에 영향을 줌으로써 일어나는 현상으로 사료되며, PROH를 사용한 저속 동결 방법 또한 문제점을 가지고 있음을 보여주고 있다.

특히, 실험대조군과 실험군에서 발생률이 초기 전핵 배아보다 후기 전핵 배아에서 통계학적으로 유의하게 높게 나타난 것은 후기 전핵 배아 시기에 정자 성상체가 사라지고 세포질내 미세소관이 보다 안정된 형태로 존재하며, 전핵내 DNA합성이 완료됨으로써 PROH의 화학적 상해나 동결로 인한 물리적 상해를 적게 받기 때문으로 사료된다 (Van der Auwera et al., 1992).

즉, 인간 접합자내에 자웅 전핵은 자발적으로 형성되고 수정 후 12-16시간이 지나면서 두 전핵은 근접하여 접합한다 (Trounson et al., 1982). 웅성 전핵은 정자 침투자리 부근에서 형성을 시작하며, 자성 전핵은 방추사의 세포질극에서 형성되고, 형성된 두 전핵은 수정란의 중앙 부위로 이동하게 된다 (Soupart and Strong, 1975). 이러한 전핵의 이동은 미세소관과 소포체가 모두 다발을 형성한 방사형의 기질인 정자 성상체에 의하여 조절된다 (Longo,

1976). 그러나 미세소관 구조를 파괴한다고 알려진 화학적, 물리적 방법은 이러한 전핵의 이동과 접합을 방해하고 (Longo, 1976), 또한 형태학적으로 방추사와 비슷한 구조를 가지고 있는 정자 성상체는 결빙억제제인 DMSO 또는 PROH의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다 (Chedid et al., 1992). 그리고 동결시 생성되는 결빙으로 인한 상해는 DNA복사에는 영향을 미치지 않는 것으로 보이나, 전핵의 이동이 느려지고 정체되는 원인이 될 수 있는 것으로 보고하고 있다 (Wright, 1990).

또한 많은 중에서 핵산의 복제는 전핵이 생성된 후 즉시 일어나는 것으로 알려지고 있으며, 인간 접합자에서도 이러한 DNA합성은 난자가 수정이 된 후 초기 전핵 시기에 일어나는 것으로 보고되고 있다 (Tesarik et al., 1989). 이런 이유로 접합자 또는 배아를 동결할 경우 DNA합성 시기를 피하는 것이 유리하며, 인간 접합자의 동결보존은 수정 후 20-22시간이 경과한 시기에 즉 후기 전핵 시기 배아에 동결하는 것이 보다 좋은 결과를 얻을 수 있는 것으로 보고하고 있다 (Balakier et al., 1993). 한편, Wright등은 두개의 전핵 이동이 완전히 끝난 후, 즉 두개의 전핵이 완전히 접합하고 전핵내에 인이 적도면에 분포하고 있는 수정 후 26시간이 경과한 후에 동결 보존하는 것이 높은 성공률을 얻을 수 있다고 보고하였다.

위의 결과 생쥐 전핵 배아의 시기에 따라 체외에서의 발생 능력과 동결 및 해빙 후 생존률과 발생률이 다른 것을 알 수 있었고, 특히 PROH를 사용하여 전핵 배아를 동결보존할 경우 전핵과 세포질내 환경이 보다 안정된 후기 전핵 시기 배아를 가지고 동결 보존하는 것이 보다 효과적이라고 생각한다.

결 론

본 실험은 세포질내 세포골격의 상태가 다른 초기 및 후기 전핵 시기 배아에서 결빙억제제만을 처리한 후의 발생 능력과 동결 및 해빙 후 생존률과 발생률을 비교하여 동결 및 결빙억제제가 배아 발생에 미치는 영향을 조사함으로써, 전핵의 어느 시기가 동결 보존에 보다 적합한지를 알아보려고 시행하였고 결과는 다음과 같았다.

1. 결빙억제제인 PROH는 초기 및 후기 전핵 배아의 생존률에는 영향을 미치지 않으나,

발생률은 후기 전핵 배아(80.3%)에서 초기 전핵 배아(66.3%)보다 높게 나타났다.

2. 전핵 배아를 저속 동결한 결과 생존률과 발생률이 실험 대조군에 비해 모두 감소하였고, 특히 초기 전핵 배아(40.0%)에서 발생률이 크게 감소한 것을 알 수 있었다.

따라서 체외 수정 기술에서 잉여 수정란, 특히 전핵 시기 배아를 성공적으로 동결 보존하는데 있어서 전핵 배아의 어느 시기에 동결하느냐는 동결 보존의 성공률을 높이는 중요한 요인으로 생각되며, 본 실험의 결과에서 알 수 있듯이 결빙억제제 및 동결이 초기 전핵 배아에서 발생률을 저하시킨다는 것을 확인할 수 있었고, 특히 PROH를 사용하여 전핵 배아를 동결 보존할 경우 후기 전핵 배아 시기에 동결하는 것이 더 높은 동결 보존 성공률을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Al-Hasani S, Diedrich K, van der Van H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D: Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987, 2, 695-700.
- Al-Hasani S, Hepnar C, Diedrich K, van der Ven H, Krebs D: Cryopreservation of rabbit zygotes. *Hum reprod* 1992, 7, 81-83.
- Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF: Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993, 59, 359-365.
- Chedid S, Van Den Abbeel E, Van Steirteghem AC: Effects of cryopreservation on survival and development of interphase-and mitotic-stage 1-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1992, 7, 1451-1456.
- Cohen J, DeVane G, Elsner C, Fehilly C, Kort H, Massey J, Turner T: 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, 638-643.
- Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfmann AD, Bender SD, Schulman JD: Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988, 50, 273-278.
- Katayama KP, Stehlik ED, Roesler M, Pentimalli C, Gunnarson C, Jagusch S, Meyer M: Cryopreservation of human embryos as a useful tool for infertile couples. *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol* 1990, 16, 97-100.
- Lassalle B, Testart J, Renard J: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645-651.
- Longo FJ: Sperm aster in rabbit zygotes: its structure and function. *J Cell Biol* 1976, 69, 539-745.
- Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B, Ruelicke T: Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods. *J IVF & ET* 1991, 8, 208-212.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988, 3, 117-119.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T: The effect of cooling human oocytes. *Hum Reprod*, 1988, 3, 968-977.
- Siebzehnuebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L, Lang N: Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Hum Reprod* 1989b, 4, 312-317.
- Siebzehnuebl ER: Cryopreservation of gametes and cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 1989, 4, 105-110.
- Soupart P, Strong PA: Ultrastructural observations on human oocytes fertilized *in vitro*. *Fertil Steril* 1975, 25, 11-44.
- Soupart P, Strong PA: Ultrastructural observations on polyspermic penetration of zona-pellucida-free human oocytes inseminated *in vitro*. *Fertil Steril* 1975, 26, 523-537.
- Tasarik J, Kopecny V: Developmental control of human male pronucleus by ooplasmic factors. *Hum Reprod* 1989, 4, 962-968.
- Tasarik J, Kopecny V: Nucleic acid synthesis

- and development of human male pronucleus. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 540-558.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazoult A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R : High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268-272.
- Trounson A, Peura A, Kirby C : Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 822-826.
- Trounson AO, Mohr LR, Wood C, Leeton JF : Effect of delayed insemination on *in vitro* fertilization, culture and transfer of human embryos. *J Reprod Fertil* 1982, 64, 285-294.
- Van der Auwera I, Cornillie F, Pijnenborg R, Koninckx PR : The age of pronucleate mouse ova influences their development *in vitro* and survival after freezing. *Hum Reprod* 1992, 7, 660-664.
- Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR : Cryopreservation of pronucleate mouse ova : slow versus ultrarapid freezing. *Hum Reprod* 1990, 5, 619-621.
- Van der Elst J, Nerinckx S, Van Steirteghem AC : *In vitro* maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing : limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Hum Reprod* 1992, 7, 1440-1446.
- Wilson L, Quinn P : Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Hum Reprod* 1989, 4, 86-90.
- Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J : Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990, 5, 109-115.
-