

1세포기 생쥐 수정란의 초급속동결; 적정 탈수시간과 복수시간

박영식·전상식*
경북대학교 농과대학

Ultrarapid-freezing of 1 Cell Mouse Embryos; Optimal Times of Rehydration and Dehydration

Y. S. Park and S. S. Jeoun*

College of Agriculture, Kyungbuk National University

SUMMARY

The efficient cryopreservation of embryos requires optimal times of dehydration and rehydration. This study was carried out to investigate the effect of various times of dehydration and rehydration. The effects were evaluated through testing morphological normality and developmental ability of 1 cell mouse embryos which were ultrarapidly frozen and thawed.

The 1 cell embryos were dehydrated for 1.5, 3, 5, and 10 minutes using mPBS-BSA containing 3.5M DMSO and 0.25M sucrose on cooling chamber or on ice. After ultrarapidly frozen and thawed, they were rehydrated for 0, 0.5 and 5 minutes with mPBS-BSA containing 0.25M sucrose at room temperature.

The results obtained were as follows:

The embryos that were rehydrated for 0.5 minutes showed higher normality than the embryos for 0 and 5 minutes did.

The embryos that were dehydrated for 10 minutes showed higher normality than the embryos for 1.5, 3, and 5 minutes did.

The developmental ability of normal thawed-embryos was high in 10 minute dehydration treatment compared to other treatments. However, it was not affected by cooling methods (on ice and on cooling chamber) for embryo dehydration.

(Key words: 1 cell embryo, ultrarapid freezing, dehydration, rehydration)

서론

초급속동결은 Trounson 등(1987)에 의해 처음으로 수정란의 보존에 이용되었으며, 처리과정이 단순하고 소요시간이 짧으며 특별한 장비가 요구되지 않기 때문에 수정란이식이나 불임시술 후 잉여 초

기 수정란의 동결 뿐만 아니라, 유사한 동결환경을 가지고 있는 난포난자의 동결에 관한 기초자료를 제공할 목적으로 세포질의 용적이 큰 1세포기 수정란의 동결에 이용되고 있다(Cordts 등, 1990; Wilson과 Quinn, 1989; Van der Auwera 등, 1990).

동결의 효율성은 수정란의 질, 사용되는 동해방지제 종류와 농도, 동결속도 및 융해속도 뿐만 아니

* 경북대학교 의과대학(College of Medicine, Kyungbuk National University)
본 연구는 1994년 경북대학교 병원의학연구소 연구비 지원으로 수행되었음.

라 동해방지제의 처리온도와 시간에 따라 달라지기 때문에 동결조건이 다른 연구간에 차이가 있다. 특히 수정란의 체외 동결보존에 있어서, 초급속동결의 효율성은 대부분 연구에서 인정하고 있으나, Bernart 등(1994)은 1세포기 수정란의 동결에 초급속동결방법이 적당하지 않다고 보고하였다.

본 연구에서는 실용적인 초급속동결방법에 의한 1세포기 수정란의 보존 가능성을 살펴보고 나아가서 효율적인 동결방법을 찾기 위하여, 수정란의 탈수시간과 복수시간이 융해 후 동결수정란의 형태적 정상성과 초기 발생능에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 용액

초급속동결은 수정란의 회수, 세척, 동결, 융해, 세척(회석) 및 배양 과정으로 구성되며, 각 처리과정에 요구되는 기초용액, 탈수용액, 복수용액, 세척용액 및 배양용액을 준비하였다.

수정란의 동결을 위한 기초용액(mPBS-BSA)은 mPBS(136.9mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.76mM KH_2PO_4 , 0.9mM CaCl_2 및 0.49mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0)에 4mg/ml의 BSA를 첨가하여 제조되었다. 동결 전 수정란의 탈수와 동해방지제의 평형을 유도하기 위한 탈수용액은 기초용액(mPBS-BSA)에 0.0625M(0.0625S) 또는 0.125M(0.125S)의 sucrose를 첨가하거나, 0.25M sucrose와 3.5M DMSO(0.25S-3.5D)를 첨가하여 제조되었다. 한편 융해 후 동결수정란의 복수와 동해방지제의 회석을 위한 복수용액은 기초용액(mPBS-BSA)에 0.25M sucrose(0.25S)를 첨가하여 제조되었다.

회수한 수정란이나 복수된 동결수정란을 세척하기 위한 세척용액(M2-BSA)은 M2(94.66mM NaCl, 4.78mM KCl, 1.71mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.19mM $\text{KH}_2 \cdot \text{PO}_4$, 1.19mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.15mM NaHCO_3 , 20.85mM HEPES, 23.28mM sodium pyruvate, 0.33mM sodium pyruvate, 5.56mM glucose)에 5mg/ml의 BSA를 첨가하여 제조되었다.

동결수정란의 발생을 유도하기 위한 배양용액

(M16-BSA)은 M16(94.66mM NaCl, 4.78mM KCl, 1.71mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.19mM KH_2PO_4 , 1.19mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25mM NaHCO_3 , 23.28mM sodium pyruvate, 0.33mM sodium pyruvate, 5.56mM glucose)에 5mg/ml의 BSA를 첨가하여 제조되었다.

2. 동결방법

1) 과배란처리에 의한 난자의 회수와 동결 전 처리

생쥐 수정란을 회수하기 위하여 5주 이상 성숙한 ICR 암컷의 복강에 PMSG 10IU를 주사하고 48시간 후에 hCG 5IU를 주사한 다음 수컷과 합사하여 교미를 유도하였다. 다음날 질전검사를 통하여 교미가 확인된 개체에서 hCG주사 후, 24±2시간에 난관팽대부·협부접속부를 절개하고 난자를 회수하여 세척용액(M2-BSA)으로 반복 세척하였다. 세척한 수정란을 hyarulonidase로 처리하여 난구세포를 제거한 다음, 세척용액(M2-BSA)으로 반복 세척하여 실험에 공시할 때까지 배양용액(M16-BSA)에 옮겨 CO_2 배양기에 보관하였다. 한편 한 번 처리에 사용되는 수정란은 개체별 처리에 의한 수적 제한과 짧은 처리시간 때문에 3±1 개로 제한하였다.

2) 난자의 동결, 융해 및 배양과정

기초용액(mPBA-BSA)으로 반복세척한 수정란을 실온(25℃)에서 0.0625S와 0.125S 용액에 각각 30초와 1분간 정치하여 부분적으로 수정란의 탈수를 유도하였다. 이어 냉각기(0℃로 조정된 cooling machine)에 연결된 cooling chamber나 얼음위 0.25S-3.5D 용액에 옮겨 실험 1, 2 및 3에 따라 일정시간 탈수를 유도하였다.

탈수한 수정란을 Park 등(1995)에 의한 방법에 따라 동결직전 스트로에 충전·밀봉하였으며, 밀봉한 스트로를 -196℃의 액체질소에 직접 침적하여 초급속동결하였다. 동결한 난자를 융해하기 위하여 스트로를 액체질소로부터 끄집어내어 공기 중에서 5초간 정치한 다음 37℃의 항온수조에서 7초간 가온하였다. 융해 후 수정란이 함유된 스트로 분질의 내용물 50 μ l를 동량의 0.25S에 옮겨 실험 1, 2 및 3

의 방법에 따라 일정시간 정치하여 수정란의 복수와 동해방지제의 회석을 유도하였다. 동결수정란의 완전회복을 위하여 기초용액(mPBS-BSA)에서 3회 세척한 다음 세척용액(M2-BSA)에 옮겨 반복 세척하였다. 정상형태를 가진 동결수정란을 배양용액(M16-BSA)에 옮겨 5% CO₂, 37℃, 습도 100% 조건에서 1시간 또는 24시간 배양하였다.

3. 실험설계

1) 실험 1: 초급속동결에서 적정 복수시간

적정 복수시간을 결정하기 위하여, 기초용액(M2-BSA)으로 반복세척한 신선수정란을 실온의 0.0625S와 0.125S 용액과 냉각챔버(cooling chamber)의 0.25S 3.5D 용액에서 각각 30초, 1분 그리고 2분 30초간 정치하여 수정란의 탈수와 동해방지제의 평형을 유도하였다. 이어 탈수한 수정란을 초급속동결-용해한 다음, 0.25S 복수용액에서 0, 0.5 또는 5분간 정치하여 복수처리한 동결수정란을 기초용액(mPBS-BSA)과 세척용액(M2-BSA)으로 반복 세척하여 형태의 정상성을 조사하였다.

2) 실험 2: 초급속동결에서 적정 탈수시간

적정 탈수시간을 결정하기 위하여, 신선수정란을 0.0625S와 0.125S 용액에서 각각 30초와 1분간 정치한 다음, 냉각챔버위 0.25S-3.5D 용액에 1.5, 3, 5, 또는 10분간 정치하여 수정란의 탈수와 동해방지제의 평형을 유도하였다. 이어 탈수한 수정란을 초급속동결-용해한 다음, 0.25S 복수용액에서 0.5분간 정치하여 복수한 동결수정란을 기초용액(mPBS-BSA)과 세척용액(M2-BSA)으로 반복 세척하여 형태적 정상성을 조사하였으며, 정상 동결수정란을 배양용액(M16-BSA)에서 1시간 배양하여 형태의 정상성을 조사하였다.

3) 실험 3: 탈수처리와 초급속동결난자의 용해 후 발생능

초급속동결 후 형태적으로 정상인 동결수정란의 초기 발생능을 조사하기 위하여, 신선수정란을 0.0625S와 0.125S 용액에 각각 30초와 1분간 정치한 다음, 얼음위(on ice) 또는 냉각챔버(on cooling

chamber)위 0.25S 3.5D 용액에서 1.5, 3, 5 및 10분간 정치하여 수정란의 탈수와 동해방지제의 평형을 유도하였다. 용해 후 정상형태를 유지하는 동결수정란을 대상으로 배양용액(M16-BSA)에서 24시간 배양하여 2세포기로의 발생능을 조사하였다.

4. 처리의 평가 및 분석

생쥐 개체간 내동성에 차이가 있기 때문에 복수처리 및 탈수처리간 비교를 정확하게 하기 위해서 개체별로 회수한 수정란을 각 실험내 처리에 동일하게 분산 공시하였다. 한편 실험에 따라서 용해 후의 세척용액(M2-BSA)으로 세척한 후 또는 배양용액(M16-BSA)으로 옮겨 1시간 배양한 후 동결수정란 형태를 조사하였으며, 또한 배양용액(M16-BSA)에서 24시간 배양한 후 2세포기로의 난황을 조사하였다. 얻어진 실험의 결과는 분산분석(ANOVA)에 의해 통계처리하여 처리간 유의성을 검정하였다.

결 과

수정란의 초급속동결에 있어서 적절한 복수시간을 결정하기 위하여 용해 후 수정란을 복수용액(0.25S)에서 0, 0.5 및 5분간 정치하여 수정란의 복수와 동해방지제의 회석을 유도하였던 바, 세척용액(M2-BSA)에서 동결수정란의 형태적 정상성은 각각 81.1(30/37), 97.3(36/37), 및 73.0(27/37)%였다(Fig. 1). 즉, 용해 후 동결수정란의 형태적 정상성은 0.5분 처리가 5분 처리에 비해 유의하게 높았다. 한편 용해 후 복수용액에 노출되지 않고 직접 기초용액에서 세척한 경우(0분 처리) 0.5분 처리에 비해 낮은 정상성을 나타냈다.

수정란의 초급속동결에 있어서 적절한 탈수시간을 결정하기 위하여, 신선수정란을 0.25S-3.5D에서 1.5, 3, 5 및 10분간 정치하여 탈수를 유도하였던 바, 용해 후 동결수정란의 형태적 정상성은 각각 97.1(34/35), 97.1(34/35), 94.6(35/37) 및 100(39/39)%였으며, 1시간 배양 후 형태적 정상성은 각각 11.4(4/35), 22.9(8/35), 35.1(14/37), 92.3(36/39)%였다(Fig. 2). 즉, 세척용액(M2-BSA)에서 동결수정란의 정상성은 탈수처리간 유의한 차

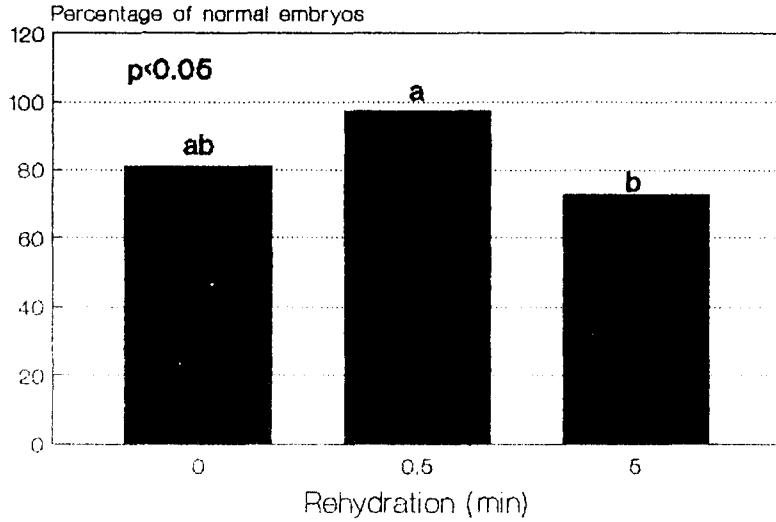


Fig. 1. Rehydration times and morphological normality of thawed-embryos. The 1 cell embryos, that were dehydrated, ultrarapidly frozen and thawed, were rehydrated for 0, 0.5 and 5 minutes in mPBS-BSA with 0.25M sucrose. There were significant differences in normality of thawed embryos among rehydration times.

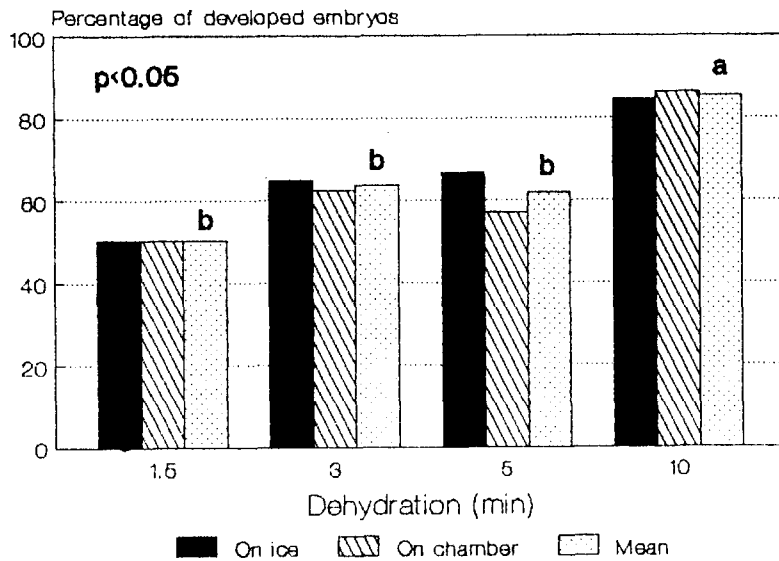


Fig. 2. Dehydration times and normality of thawed-embryos. Before frozen, the embryos were dehydrated for 1.5, 3, 5, and 10 minutes in mPBS-BSA with 3.5M DMSO and 0.25M sucrose. There were significant differences in normality among dehydration times.

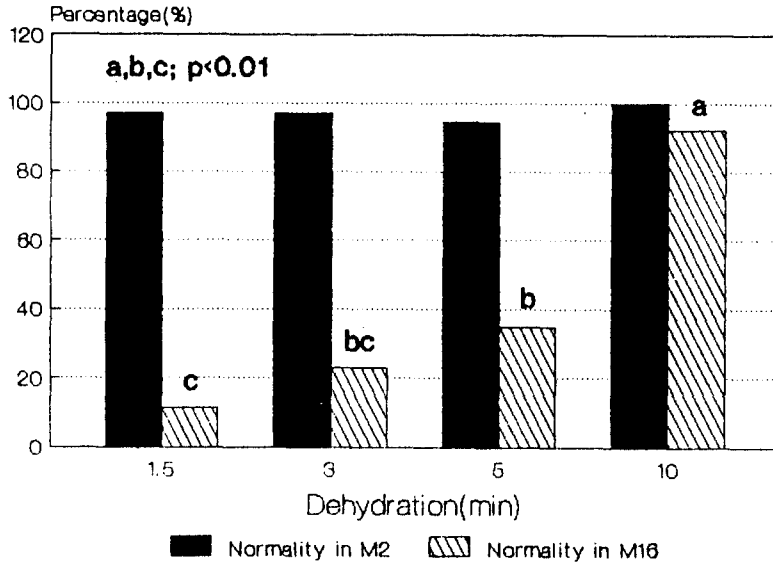


Fig. 3. Developmental ability of normal thawed-embryos and dehydration times according to cooling methods. There were significant differences among dehydration times (1.5, 3, 5, and 10 minutes) but not between cooling methods (on ice and on cooling chamber).

이가 없었으나, 배양용액(M16-BSA)에서 배양 1시간 후 동결수정란의 정상성은 다른 탈수처리에 비해 10분 처리에서 유의하게 높았다.

초급속동결 후 형태적 정상성을 나타내는 수정란의 2세포기로의 발생능은 얼음위에서 1.5, 3, 5 및 10분간 탈수한 경우 각각 50(2/4), 65(9/14), 66.7(18/27), 84.4(27/32)%였으며, 냉각챔버를 이용한 경우 각각 50(2/4), 62.6(5/8), 57.1(8/14) 및 86.1(31/36)%였다(Fig. 3). 각 탈수처리당 71, 69, 72 및 75개의 1 세포기 수정란을 공시하여 초급속동결한 다음, 회수한 정상 수정란의 발생능은 탈수시 저온유지방법에 따른 차이가 없었으나, 탈수시간에 따라 차이가 있었는데, 다른 탈수처리에 비해 10분 처리에서 유의하게 높았다.

고 찰

수정란의 초급속동결에 관한 대부분 연구에서 동결수정란의 복수처리는 sucrose용액을 이용하여 실온에서 5 또는 10분간 정치하여 실시하고 있다(Bernart 등, 1994; Gordts 등, 1990; Trounson과 Sjob-

lom, 1988), 그러나 Van der Elst 등(1995)은 실온에서 고삼투압용액에 오랜동안 노출하게 되면 수정란의 생존성과 발생능이 감소한다고 보고한 바 있다. 실험 1에서 복수처리시 0.25M sucrose용액에 노출되는 시간을 달리하였던 바(Fig. 1), 용해 후 5분간 복수처리한 동결수정란의 형태적 정상성이 0.5분처리에 비하여 유의하게 감소하였는데, 이러한 감소는 높은 삼투환경에서 상대적으로 긴 시간동안 노출됨으로써 예상되는 난막의 손상에 기인한 것으로 추측된다. 한편 Wilson과 Quinn(1989)은 용해 후 동결수정란에 부여되는 삼투충격이 난자의 생존율을 감소시킨다고 보고하였다. 실험 1의 복수 0분 처리에서 유사한 결과가 얻어졌는데, 용해 후 sucrose용액을 이용하지 않고 직접 기초용액(M2-BSA)에서 복수를 유도한 동결수정란에서 정상성이 저하되었다.

수정란의 동결에 관한 많은 연구에서 동결 전 탈수온도와 시간은 밀접한 상관성을 가지고 동결수정란의 생존성과 발생능에 영향을 미친다고 보고되고 있다(Gordts 등, 1990; Trounson과 Sjoblem, 1988). 실온에서 탈수처리를 수행한 대부분 연구에

서는 대체로 2~3분의 짧은 탈수시간을 추천하고 있는데, Bernart 등(1994)은 실온에서 생쥐 1세포기 수정란을 1분간 탈수하고 초급속동결하여 높은 배반포 발생율을 얻었다고 보고한 바 있다. 한편 Van der Elst 등(1995)은 탈수온도 22℃와 4℃의 비교에서 탈수온도가 높은 환경에서 평형시간이 증가할수록 수정란의 용해 후 발생능이 현저히 감소하였으며, 4℃에서는 동해방지제의 종류(PROH, DMSO)나 농도(3M, 4.5M)와 무관하게 30분간의 평형시간을 부여하여도 발생능이 감소되지 않았다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 0℃로 조정된 냉각기에 연결된 냉각챔버위에서 탈수처리하였을 때, 1.5, 3, 또는 5분 처리에 비하여 10분 처리에서 용해 후 동결수정란의 형태적 정상성이 높았다(Fig. 2). 따라서 본 실험조건에서 10분 이하의 탈수처리후 동결된 수정란의 경우 불충분한 탈수와 동해방지제 평형으로 인하여 동결과정에서 세포질 내 빙정이 형성되고 용해시 염해를 받음으로써 난막이 파열되어 동결수정란의 정상성이 감소된 것으로 추측된다.

탈수를 위한 저온유기방법(얼음, 냉각챔버)이나 탈수시간이 용해 후 정상형태의 동결수정란의 발생에 미치는 영향을 조사하였던 바, 저온유기방법간에는 유의한 차이가 없었으나, 10분간 탈수처리에서 가장 높은 발생율을 얻었다(Fig. 3). 본 실험조건에서 10분 이하 탈수처리된 동결수정란의 경우 용해 후 정상형태를 유지한다고 하더라도 계속된 배양에서 2세포로의 난항이 일어나지 않았는데, 이는 불완전한 탈수에 의해 발생기구가 손상되었기 때문인 것으로 추론할 수 있다. 따라서 수정란이식에 있어서 일반적으로 용해 후 1시간 전후하여 동결수정란을 이식하고 있는데, 동결수정란을 효율적으로 이식하기 위해서는 동결 전 수정란을 충분히 탈수하여야 하며, 용해 후 체외에서 일정시간 배양하여 계속적인 발생을 확인한 다음 이식하는 것이 필요하다.

결론적으로 세포용적이 큰 1세포기 수정란의 초급속동결에서 동결수정란의 회복을 위하여 짧은 복수시간을 부여하는 경우, 탈수시간을 충분히 연장하면 탈수를 위한 저온유기방법에 관계없이 용해 후 형태적 정상성과 발생능을 높일 수 있다.

적 요

수정란을 효율적으로 동결보존하기 위해서는 적절한 탈수와 복수처리가 요구된다. 본 연구에서는 다양한 복수시간과 탈수시간이 용해 후 1세포기 수정란의 형태적 정상성과 발생능에 미치는 영향을 조사하였다.

과배란처리에 의해 회수한 수정란을 냉각챔버 또는 얼음위에서 3.5M DMSO와 0.25M sucrose가 함유된 mPBS-BSA용액에 1.5, 3, 5 또는 10분간 노출하여 수정란의 탈수와 동해방지제의 평형을 유도하였다. 탈수한 수정란을 초급속동결 용해 후 상온에서 0.25M sucrose가 함유된 mPBS-BSA용액에 0, 0.5 또는 5분간 노출하여 복수를 유도하였다.

복수처리간 비교에서 0.5분간 복수처리한 수정란의 정상성은 다른 처리에 비해 높았다. 또한 탈수처리간 비교에서 10분간 탈수처리한 동결용해 수정란의 정상성은 다른 처리에 비해 높았다. 한편 용해 후 정상 수정란의 발생능은 다른 탈수처리에 비하여 10분 처리에서 유의하게 높았으며, 탈수온도 유지방법(얼음과 냉각챔버)간에는 유의한 차이가 없었다.

참고문헌

- Bernart W, Kamel M, Neulen J and Breckwoldt M. 1994. Influence of the developmental stage and the equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 9:100-102.
- Gordts S, Roziars P, Campo R and Noto V. 1990. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil. Steril.*, 53:469-472.
- Park YS, Suh TK, Lee TH and Jeoun SS. 1995. Ultrarapid freezing of mouse ova. *Korean J. Emb. Transfer.*, 10(3):203-208.
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil.*

- Steril., 48:843-850.
- Trounson A and Sjoblem P. 1988. Cleavage and development of human embryos *in vitro* after ultrarapid freezing and thawing. Fertil. Steril., 50:373-376.
- Vander Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R and Koninckx PR. 1990. Cryopreservation of pronucleate mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. Hum. Reprod., 5:619-621.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E and Van Steirteghem AC. 1995. The effect of equilibration temperature and time on the outcome of ultrarapid freezing of 1 cell mouse embryos. Hum. Reprod., 10:379-383.
- Wilson L and Quinn P. 1989. Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. Hum. Reprod., 4:86-90.