

## 각 성숙단계에서 동결·융해한 돼지 난포란의 발달능력에 관한 연구

최인경·송해범  
대구대학교 자연자원대학

### Developmental Capacity of Porcine Oocyte Frozen-Thawed at Immature, Maturing and Mature Stages

Choi, I. K. and H. B. Song

College of Natural Resources, Taegu University

#### SUMMARY

These experiments were conducted to investigate the optimal maturation stage for cryo-preservation of porcine oocyte when the oocytes were frozen-thawed and/or exposed in cryo-protectant at immature, maturing and mature stages. The results of this research are as follows ;

1. When the oocytes matured for 0, 24 and 44h were exposed in media containing cryo-protectants or without *in vitro*, the rates of cultured oocytes developed to metaphase II were 44.0, 45.0, 50.3 or 55.0%, respectively.
2. When the oocytes matured for 0, 24 and 44h were exposed in media containing cryo-protectants or without *in vitro*, the cleavage rates of cultured oocytes were 18.6, 19.7, 47.6 or 50.9%, respectively.
3. When the oocytes matured for 0, 24 and 44h were frozen and thawed using vitrification or not *in vitro*, the rates of cultured oocytes developed to metaphase II were 4.3, 7.1, 46.7 or 62.4%, respectively.
4. When the oocytes matured for 0, 24 and 44h were frozen and thawed using vitrification or not *in vitro*, the cleavage rates of cultured oocytes were 2.5, 2.4, 10.2 or 49.6%, respectively.

(Key words : Immature, Maturing, Mature, Porcine oocyte, Cryopreservation, Exposed)

#### I. 서 론

정자세포의 성공적인 동결보존 기술이 보고(Polge 등, 1949)된 이후 보다 복잡한 세포와 조직에까지 광범위한 연구가 이루어지고 있으며 이러한 cell banking 기술은 세포의 체외배양 연구에 없어서는 안 될 중요한 과정으로 인식되어져 오고 있다. 근래에는 우리

나라에서도 가축에서 수정란을 동결보존하였다가 융해하여 다른 수란축에 이식하는 일련의 과정이 일상화 되어 가는 추세에 있다.

이러한 수정란 동결보존의 성공적인 성과에 비하면 미수정란의 동결보존은 아직 미미한 수준에 있다. 포유동물의 미성숙난포란의 동결보존은 유기적인 체외 수정란 생산 시스템 및 다양한 수정란 연구에 대량의 난자를 공급하며, 시간에 구애 받지 않고 여러 가지 실

험을 할 수 있다는 커다란 장점을 가지고 있으나(Pieterse 등, 1991) 아직 접합체(zygote)나 배아에 비해 어려움이 많다(Hochi 등, 1997). 일반적으로 난자의 동결도 수정란과 마찬가지로 동결보호제의 처리 및 동결, 용해 후 동결보호제를 제거시키는 과정을 기본방법으로 하고 있으나 수정란보다 동결에 더 민감하기 때문에 용해 후 발생율이 아직도 매우 낮은 실정이다(Schroeder 등, 1990).

동결, 용해한 난자의 생존율과 발생이 저조한 원인은 성숙난자의 경우 염색체에 부착되어 있는 미세소관인 방추사가 온도의 변화에 매우 민감하여 동결, 용해 과정에서 미분리(non-disjunction)가 발생하여 염색체의 이상이나 이수현상(aneuploidy)이 증가되기 때문이라고 보고하였다(Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988; Pickering 등, 1990). 또한 성숙난자의 경우 항동해방지제의 노출이나 동결, 용해 시 난세포질 표면에 존재하는 표층과립이 조기방출되거나(premature cortical granule exocytosis; Schalkoff 등, 1989) 투명대의 물리적 손상이나 경화현상(zona hardening)이 발생하여 용해 후 난자의 생존율 및 수정율의 저하나 이상수정 혹은 염색체 이상의 발생 빈도가 높아진다고 보고(Al-Hasani 등, 1987; Carroll 등, 1990)되고 있다. 이에 따라 성숙난자 동결 보존기술의 대안으로서 방추사가 형성되기 전단계인 미성숙난자의 동결이 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 최근 제시되고 있기도 하다(박 등, 1997).

가축에 있어서 난자의 동결은 소(Schellander 등, 1988), 돼지(Didion 등, 1990), 토끼(Al-Hasani 등, 1989)에서 이루어졌으며, 기타 포유동물에서는 마우스(Pellicer 등, 1988), 햄스터(Quinn 등, 1982), 사람(Trounson과 Kirby, 1989)에서 연구되어 왔다. 최근에 토끼(Al-Hasani 등, 1989), 생쥐(Kono 등, 1991)에서는 동결난자로부터 산자의 생산이 성공되었고, 사람의 경우에서도 임신이 성공된 바 있다(Chen, 1986). 그러나 아직 돼지에서는 동결난자로부터 산자 생산에 성공한 예가 없다.

난자의 동결은 성숙(Leibo, 1977; Lim 등, 1991; Schmit 등, 1993) 또는 미성숙단계(van Blerkom, 1989; Rubinsky 등, 1991; Suzuki와 Nishikata, 1992)에서 행하여지고 있으나 이들 난자의 동결성에 대한 연구결과가 보고자 간에 차이가 많다. 일반적으

로 난자는 다른 세포와는 달리 큰 세포이기 때문에 동결에 따른 손상이 크며 특히 세포골격(cytoskeleton), 방추사, 난황막, 투명대 및 피층과립의 파괴 등 일반구조와 분자구조의 변화가 따르게 된다(Parks와 Ruffing, 1992). 성숙난포란의 동결 시 Hamlett 등(1989)과 Rall(1992)은 동결보호제에 노출되고 냉각되는 동안 metaphase I 또는 II 단계에서 방추사와 피층과립의 파괴에 따른 손상을 보고하였고, 미성숙 난포란의 동결 시에는 비정상적인 성상체(aster)의 형성으로 방추사의 수적인 감소가 일어나는 것으로 보고되었다(van Blerkom, 1989). 최근 난자의 발생단계에 따른 동결성에 대하여 Schroeder 등(1990)은 생쥐에서 난핵포 시기, 체외성숙 및 배란된 난자의 동결, 용해 후 생존성과 발생율이 배란된 난자에서 가장 높았으며, Mandelbaum 등(1987)은 사람에서 성숙 및 미성숙 난자의 동결에서 전자가 후자보다 생존성이 2배 정도 높다고 하였다.

돼지 배아의 동결에 대한 연구가 상당히 진전된 것과는 대조적으로 수정되지 않은 돼지 난자의 동결에 관한 정보는 거의 없고 동결, 용해한 난자의 발달율은 여전히 매우 낮다. 더욱이 돼지미성숙 난자의 냉동보존은 한계가 있으며 산자를 생산했다는 보고도 없다. 돼지 미성숙 난자를 냉동보존에 성공한다면 여러 종과 계통의 genetic resources를 더욱 유효하게 보관할 수 있으며 난포란의 다량 확보가 더욱 용이해지고, 난자 이용의 여러 가지 제한요인을 최소화 할 수 있으며 우수한 유전자원의 장기보존뿐만 아니라 육종계획에 이르기까지 많은 이점이 따를 것으로 기대된다.

따라서 본 연구는 서로 다른 성숙단계에서 실시한 동결이 돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외발생율에 미치는 영향을 조사하고자 미성숙, 성숙중, 성숙후의 3가지 성숙단계의 난포란을 동해방지제에 노출하거나 동결하여 성숙율과 배발달율을 비교 조사함으로써 효과적인 난포란의 동결시기를 결정하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 체외성숙

도살장에서 회수한 난소는 100IU/ml penicillin G, 100 $\mu$ g/ml streptomycin sulfate를 첨가한 39 $^{\circ}$ C

의 생리식염수가 담긴 보온병에 침지하여 1~2시간 이내에 실험실로 운반하고 생리식염수로 난소 주위의 이물질과 혈액을 세척한 다음 70% 알콜 가아제를 이용하여 난소의 표면을 소독하고, 21G의 주사침이 장착된 10ml 주사기로 2~6mm 크기의 난포를 흡인 후 15ml 원심분리관에 분주하여 10분간 정지하였다. 난포란은 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 4mg/ml BSA가 첨가된 PBS에서 회수하고 상층액은 pFF(porcine follicular fluid) 제조에 이용하였다. 회수된 난포란은 난구세포가 치밀하게 부착되고 난포란의 세포질이 균일한 것만 선별하여 실험에 공시하였다.

선별된 미성숙난포란은 성숙배양액으로 3회 세척 후 mineral oil 하에서 제작된 200 $\mu$ l의 성숙배지에 30개씩 미성숙난포란을 침지하여 각각 0, 24 및 44시간 동안, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 성숙배양을 실시하였다.

체의성숙단계를 전혀 거치지 않은 0시간 그룹의 난포란은 미성숙(germinal vesicle)상태이므로 미성숙(immature) 단계로 정하였고, 24시간 성숙시킨 그룹은 LH surge와 GVBD 사이의 시간이 24시간이라는 보고(박, 1997)에 의해 성숙중(maturing) 단계(GVBD~M I)로 정하였고, 돼지에 있어 43~46시간 동안 배양함으로써 metaphase II기에 도달하였다는 보고(Edwards, 1965)와 42시간 체외성숙 시 처녀발생에 의한 배발생율이 가장 낮았다는 보고(Kim 등, 1994)에 의해 44시간 성숙시킨 그룹은 성숙후(mature) 단계로 정하였다. 이것을 확인하기 위하여 0, 24 및 44시간 성숙시킨 후 관찰한 공시난포란의 성숙상태는 Table 1과 같았다.

## 2. 난포란의 동결과 융해

상온에서 각 성숙단계의 난포란은 Arav 등(1993)의 초산화동결법(vitrification)을 약간 변형하여 20% FBS가 첨가된 PBS로 3회 세척 후 20%(w/v) propylene glycol + 0.25M sucrose 용액에서 5분간 평형 후 40%(w/v) propylene glycol + 0.25M sucrose에 옮겨 0.25ml straw(IMV, France)에 난포란을 주입하여 1분 이내에 액체질소에 침지하였다. straw는 powder로 봉인하고 heat sealing하여 실온에서 보온병에 미리 준비한 LN<sub>2</sub>(-196 $^{\circ}$ C) 표면에서 10초 동안 정지한 다음 즉시 침지함으로써 초급속동결을 시켰다. 사전에 LN<sub>2</sub>에 담겨져 있던 gabulette + cane에 동결한 straw는 LN<sub>2</sub> 내에서 옮긴 후 LN<sub>2</sub> container에 보관하였다.

동결된 straw는 37 $^{\circ}$ C water bath에 바로 침지하여 융해하면 straw가 갑자기 팽창하여 터질 수 있으므로 실온에서 10초간 정지 후 37 $^{\circ}$ C water bath에서 융해하였다. 융해된 straw의 내용물은 petri dish(35mm  $\times$  15mm ; FALCON, USA)로 쏟아부어 난포란을 확인한 후 0.5M sucrose용액과 0.25M sucrose용액에서 각각 5분간 정지하고, 기본배양액에서 2~3회 세척한 후 추가성숙이 필요한 난포란은 체외성숙 배양에서 성숙을 유도하였다. 융해후의 생존에 대한 판정은 각 단계에서 계속 성숙이 일어나는지와 배발달 상태로 판정하였다.

## 3. 체외수정

본 실험에 사용한 정액은 희석정액으로 정액 희석액인 EDTA Diluent Concentration(Art. NO. 9000; UNTRON, 덴마크)로 희석하여 A.I. CENTER에서 실험실까지 1시간 이내에 운반하여 정자의 운동성이 80% 이상인 것만을 사용하였다.

정자는 0.4% BSA와 5mM caffen sodium ben-

Table 1. Nuclear status of oocytes cultured during 0, 24 and 44h

IVM periods	Examined	No. (%) of oocyte				
		GV	GVBD	M I	A I ~ T I	M II
before fixed(h) <sup>1)</sup>						
0	156	126(80.8)	30(19.2)			
24	131	20(15.3)	53(40.5)	54(41.2)	5( 3.8)	2( 1.5)
44	140	11( 7.9)	7( 5.0)	22( 4.7)	22(14.7)	78(55.7)

<sup>1)</sup> Time of fixation after the onset of culture for maturation.

zonate를 첨가한 BO액으로 2회 원심분리(500g, 5분) 후 상층액을 제거하고 정자의 최종농도가  $5 \times 10^5$  /ml 이 되도록 조정하였다. 세척한 정자는 배양접시에 100 $\mu$ l의 정자 drop을 제작한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형시킨 미네랄오일을 덮어 30분간 전배양을 실시한 후 체외수정에 이용하였다. 성숙배양시킨 난포란은 0.4% BSA가 첨가된 BO액으로 3회 세척 후 정자 drop에 10~20개씩 넣어 수정을 하였다. 수정한 난포란은 수정 후 6시간에 난포란의 주변에 부착된 정자와 난구세포를 피펫으로 제거하여 10% pFF가 첨가된 TCM-199으로 48시간 마다 교환하며, 난구세포와 공배양하였다.

#### 4. 동해방지제에 노출한 난포란의 체외성숙과 난자의 발달

동해방지제의 노출이 난포란의 성숙과 배발달에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 각 난포란의 성숙단계를 미성숙, 성숙중, 성숙후의 3그룹으로 나누어 동해방지제에 노출한 후 44시간, 20시간 및 0시간 추가성숙을 실시한 다음 난포란의 성숙율과 난자의 배발생 상태를 동해방지제에 노출하지 않고 44시간 배양한 대조구와 비교 관찰하였다. 동해방지제에 노출한 후 난포란의 일부는 급속염색법(Byun 등, 1991)을 이용하여 난포란의 성숙율을 관찰하고, 난포란의 나머지 일부는 수정 후 6시간부터 매 24시간마다 신선 배양액으로 교환하면서 난구세포와 공배양을 실시하고 난자의 배발생 상태를 관찰하였다.

#### 5. 동결·융해한 난포란의 체외성숙과 난자의 발달

동결·융해가 난포란의 성숙과 배발달에 어떠한 영

향을 미치는지를 조사하기 위하여 각 난포란의 성숙단계를 미성숙, 성숙중, 성숙후의 3그룹으로 나누어 동결·융해한 후 추가성숙을 실시한 다음 난포란의 성숙율과 난자의 배발달 상태를 동결·융해하지 않고 44시간 배양한 대조구와 비교 관찰하였다. 동결·융해한 후 난포란의 일부는 급속염색법을 이용하여 난포란의 성숙율을 관찰하고, 나머지 일부는 수정 후 6시간부터 매 24시간 마다 신선 배양액으로 교환하면서 난구세포와 공배양을 실시하고 난자의 배발생 상태를 관찰하였다.

#### 6. 통계분석

각 실험결과와 통계분석은 컴퓨터용 통계 프로그램인 SAS (Statistical Analysis System, 1988) package를 이용하였다. 난포란의 핵성숙율과 수정란의 배발달율은 Chi-square test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검정하였고 P<0.05 이하만을 통계학적인 차이로 인정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 동해방지제에 노출한 난포란의 성숙율과 배발달

각 성숙단계의 난포란을 동해방지제에 노출 후 난자의 성숙율을 대조구와 비교 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 네 그룹 간의 성숙율을 비교해 볼 때 성숙을 완료한 난포란(M II)은 0, 24, 44시간 및 대조구에서 각각 45.2, 45.0, 50.3 및 55.0%로 대조구에 비해 모든 처리 그룹이 낮았고 동해방지제에 노출한 실험구 중에는 체외성숙 완료 후 노출한 미성숙난포란이 가장 높

**Table 2. Maturation rates of porcine oocyte exposed in cryoprotectant at immature, maturing and mature stages**

IVM periods before exposed(h) <sup>1)</sup>	Examined	No. of oocyte				
		Reached at				
		GV	GVBD	M I	A I ~ T I	M II (%)
0	166	23	30	22	16	75(45.2)
24	200	27	9	32	42	90(45.0)
44	169	11	11	19	43	85(50.3)
Control	19	7	6	34	29	93(55.0)

<sup>1)</sup> Control is 44h maturation without exposing in cryoprotectant.

**Table 3. Cleavage rates of porcine oocyte exposed in cryoprotectant at immature, maturing and mature stages**

IVM periods before exposed (h) <sup>1)</sup>	No. of oocyte			Cleavage rate (%)
	Examined	Developed at		
		2~4 cell	8~16 cell	
0	247	30	16	18.6 <sup>b</sup>
24	213	26	16	19.7 <sup>b</sup>
44	212	56	45	47.6 <sup>a</sup>
Control <sup>1)</sup>	269	73	64	50.9 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Control is 44h maturation without exposing in cryoprotectant.

<sup>a, b</sup> Means within column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

았으나 네 실험구 간에 유의적인 차이는 없었다.

고농도의 동해방지제가 미성숙, 성숙중, 성숙후 난포란에서 계속되는 핵성숙에 영향을 미치지 않는 것만 차후의 배발달에 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 각 성숙단계의 난자를 동해방지제에 노출 후 수정한 난자의 배발달율을 대조구와 비교 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 성숙이 완료된 난자의 분할율(47.6%)은 대조구의 분할율(48.8%)과 유의차가 인정되지 않았으나, 미성숙(18.6%)과 성숙중(19.7%)에 노출한 난자는 유의하게 낮은 분할율을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 그러나 네 그룹의 모든 난자는 배반포까지 발생하지 못하고 16세포기에서 분할이 중지되었다. 이상에서 보는 바와 같이 성숙이 완료되지 않은 단계에서 돼지 난포란의 동해방지제 노출은 계속되는 난포란의 성숙에는 영향을 미치지 않았으나 난자의 발달은 억제하는 것으로 나타났다.

Van der Elst 등(1992)은 미성숙난포란을 실온(22°C)에서 PROH와 DMSO에 노출할 때 제2 감수분열 방추사(spindle)의 형태에 영향을 주지 않지만 0°C에서 노출 시에는 염색사가 더욱 연장되고(elongated) 감소(reduced)되는 것이 관찰되었는데, 이는 삼투압 스트레스에 의한 것으로 정상적인 날카로운 방추사(spindle-shaped)의 이상을 유발한다고 하였다.

Taha와 Schellander(1992)는 소 난자를 동해방지제에 노출 후 미성숙난자와 성숙난자의 배발달 능력을 비교한 연구에서 짧은 시간(20초, 30초, 60초) 노출 시에는 배발달 능력의 차이는 나타나지 않았으나, 5분 또는 10분을 노출했을 때는 성숙난자는 배발달이 관찰되는 반면 미성숙난자는 배발달이 전혀 일어나지 않아

노출시간이 길어질수록 성숙난자보다 미성숙난자가 노출에 민감함을 보고하였다. 그리고 이 민감성은 삼투압 스트레스에 의한 것이 아니라 biochemical 또는 biophysic event에 의한 것이라고 하였다.

박 등(1997)은 사람 미성숙난자의 성숙에서 동결, 용해와 PROH에 노출 후의 효과를 알아보기 위한 연구에서 동결, 용해한 난자가 16.7%(1/14)로 PROH에 노출한 난자 88.2%(15/21)보다 유의하게 낮은 배발달율을 나타내고( $P < 0.05$ ), 이 두 그룹 모두 아무처리도 하지 않은 대조구 94.7%(18/21)에 비해 유의하게 낮은 핵성숙율이 나타났음을 보고하였다( $P < 0.01$ ).

동해방지제 노출은 미성숙난자의 성숙에는 영향을 미치지 않지만 차후의 배발달에는 영향을 주는 것 같다. 마우스에서 GV난자를 1.5M PROH에 15분 노출하였을 때 M II까지의 성숙율은 control과 차이가 없으나 미성숙난자를 초급속동결하였을 때 성숙율은 control에 비해 낮고 이종의 반 정도가 2cell로 발달하였으나 배반포는 형성하지 못하였다(Van der Elst, 1992). 이 결과는 Cha 등(1997)이 사람 미성숙난자의 성숙율에 미치는 영향의 조사에서 아무처리도 하지 않은 대조구와 PROH에 노출한 그룹의 비교에서 각각의 성숙율은 76.8% 와 67.1%로 대조구가 높았지만 유의적인 차이는 없었다는 보고와 같았다.

이상의 결과와 보고를 종합하면 돼지 미성숙난포란의 동결, 용해에서 나타난 낮은 성숙율은 동결과정에서 생기는 낮은 온도에 의한 손상이지 고농도의 동해방지제에 의한 성숙억제작용은 아닌 것으로 보인다.

## 2. 동결·융해한 난포란의 성숙율과 난자의 발달율

각기 다른 성숙단계에 있는 돼지 난포란의 동결, 융해 처리가 차후 계속되는 난자의 핵성숙율에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 성숙단계를 미성숙, 성숙중, 성숙후의 3그룹으로 나누어 동결, 융해 후 추가 성숙을 실시한 다음 난자의 성숙율을 대조구와 비교 관찰한 결과는 Table 4와 같다. 미성숙과 성숙중 동결한 난포란의 성숙율은 4.3%와 7.1%로 극히 저조한 수의 난자만이 성숙을 완료하였으며, 44시간 체외성숙 후 동결, 융해한 성숙후 난포란의 성숙율은 46.7%로 동결, 융해하지 않은 대조구(62.4%)에 비해서는 모두 유의하게 낮은 성숙율을 나타내었다( $P < 0.05$ ).

각기 다른 성숙단계의 돼지 난포란의 동결, 융해 처리가 차후 계속되는 난자의 수정율 및 발달에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 성숙단계를 미성숙, 성숙중, 성숙후의 3그룹으로 나누어 동결, 융해 후 추가 성숙을 실시한 후 수정율 하여 대조구와 비교 관찰한 난자의 발달율은 Table 5와 같다. 대조구의 경우 49.6%가 2cell 이상으로 배발달을 한 반면, 미성숙, 성숙중 동결, 융해의 처리를 거친 성숙단계의 난자들은 저조한 배발달율을 얻었으며 이들 역시 4cell에서 배발달을 정지하였다. 이상에서 보는 바와 같이 각기 다른 성숙단계(미성숙, 성숙중, 성숙후)에 있는 돼지 난포란의 동결, 융해 처리는 난포란의 성숙과 난자의 발달에 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났다.

동결, 융해 처리를 한 세 그룹의 난자가 모두 각 성숙시간에 해당하는 체외성숙을 하지 않은 미성숙난포란은 GV, 24시간 체외성숙한 성숙중 난포란은 GV-

BD~MI, 44시간 체외성숙한 성숙후 난포란은 MII에서 각각 49.7, 57.7, 46.7%로 다른 핵성숙 단계보다 높게 나타나는 것으로 보아 동결, 융해 후 대부분의 난자가 생존하지 못한 것으로 보인다. 돼지 난자의 생존성은 현미경 하에서 육안으로 판단하기가 어려워 확실히 퇴화된 것으로 판단되는 것을 제외하고 형태적으로 정상적으로 보이는 것은 성숙 판단을 위한 염색에 모두 사용하였다.

van Blerkom(1989)은 미성숙난자의 vitrification 후 미세구조의 연구에서 나타나는 손상을 (i) 미성숙 염색체의 응축, (ii) 세포질과 nucleoplasm의 혼합, (iii) 핵막의 바깥 면에서 염색질의 존재 등 세 가지로 구분하였는데, 이 이상은 많은 수가 관찰되지만 대부분 회복할 수 있으며, 이 형태의 장애는 차후의 배발달에 영향을 줄 수 있다고 하였다. 즉 노출 후 각 성숙단계에 따른 성숙에는 차이가 나타나지 않았으나 배발달에 영향을 나타내는 이유가 될 수 있을 것이다.

Rubinsky 등(1991)은 돼지의 동결한 미성숙난포란은 체외성숙 후 겨우 25%만이 metaphase I 또는 II에 도달하였다고 하였는데, 본 실험에서는 약간 낮은 성적을 얻었으며, Didion 등(1990)이 돼지 미성숙난포란은 동결, 융해 직후 trypan blue 염색에서 세포질과 난구세포가 모두 살아있는 난포란이 전혀 없었고, 난구세포만 살아있는 난포란이 53%, 세포질과 난구세포가 모두 죽은 난포란이 47%로 생존성이 거의 없다고 보고한 결과와 유사한 결론을 얻었다.

Lim 등(1991)은 소 미성숙난자의 동결실험에서 미성숙(0시간 성숙후 동결) 난자의 동결, 융해 후 형태적 생존율과 체외수정 시 합구분할율이 성숙중이거나

**Table 4. Maturation rates of porcine oocyte frozen-thawed at immature, maturing and mature stages**

IVM periods before exposed(h) <sup>1)</sup>	No. of oocyte					
	Examined	Reached at				
		GV	GVBD	MI	AI~TI	MI I (%)
0	161	80	53	14	7	7( 4.3) <sup>c</sup>
24	156	35	35	55	5	11( 7.1) <sup>c</sup>
44	182	14	14	48	20	85(46.7) <sup>b</sup>
Control	194	18	18	41	3	121(62.4) <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> control is 44 h maturation without freezing.

a, b, c Means within column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 5. Cleavage rates of porcine oocyte frozen-thawed at immature, maturing and mature stages**

IVM periods before exposed(h) <sup>1)</sup>	No. of oocyte			Cleavage rate (%)
	Examined	Developed at		
		2~4 cell	8~16 cell	
0	323	8	0	2.5 <sup>c</sup>
24	293	7	0	2.4 <sup>c</sup>
44	205	21	0	10.2 <sup>b</sup>
Control <sup>1)</sup>	252	37	88	49.6 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Control is 44h maturation without freezing.

a, b, c Means within column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

성숙후(6, 12, 18, 24시간 성숙후 동결) 난자에 비해 낮았다고 하였고, 모든 난자가 8cell 이상 발달하지 않았다고 하였다. 또 융해 후 정상적인 형태를 나타내는 난자수도 미성숙 그룹이 낮았다고 하였으나 Schellander 등(1988)은 소 미성숙난포란의 동결, 융해 후 생존율이 88.9%로 매우 높다고 하였는데, 또 본 연구의 결과는 동결, 융해한 난자나 동결하지 않은 난자의 배아로의 발달능력은 거의 유사하다고 한 Schroeder 등(1990)과 대조적인 것으로 돼지 난자의 특성상 소나 마우스 등 다른 동물의 난자보다 cryogenic 저장에 민감하고, 지금까지 돼지 난자의 동결방법에 대한 정확한 확립이 없으므로 이 실험에서 사용된 동결, 융해의 방법이 돼지 난자에 적합한 동결방법이 아닐 수도 있다고 볼 수 있다.

본 실험에서 성숙이 완료된 후 동결했음에도 불구하고 44시간 체외성숙하고 동결한 성숙후 난자의 동결, 융해 후 핵성숙율은 동결, 융해하지 않은 대조군 난자보다 낮은 성숙율을 나타냈는데, 이것은 냉동난자의 염색체 이상에 기인한 것으로 생각된다(Glenister 등, 1987; Carroll 등, 1989; Lim 등, 1991). Zhao 등(1997)은 동결, 융해한 소 난자의 미세구조 평가에서 TEM(transmission electron microscopy)을 이용한 연구에 의하면 동결, 융해한 미성숙난자는 체외에서 성숙후 난자의 동결, 융해보다 vesicle 뿐만 아니라 미토콘드리아, smooth endoplasmic reticulum (sER), microvilli 같은 cell organelles가 더 큰 변화가 일어났다고 하여 미성숙난자가 체외에서 성숙후 난자에 비해 냉동보존에 더 민감함을 추정하였고, 이러한 발견은 Fuku 등(1992)의 보고와도 일치하였다. Hochi 등(1997)은 냉동, 융해한 난자가 그렇지 않은

난자에 비해 수정율과 배반포의 발달율이 떨어지는 것으로 보아 냉동에 의한 손상 메카니즘(damage mechanism)은 소 난자의 핵성숙 과정을 억제한다고 하였고, 동결에 의한 손상은 미성숙 단계일 때가 성숙중이거나 성숙을 완료한 단계보다 크다고 하였다.

본 연구의 결과와 같은 결과를 얻은 Lim 등(1991)은 냉동한 미성숙난자의 핵성숙율과 발달율이 성숙중이거나 성숙후 난자에 비해 떨어지는 것에 대한 3가지의 가설을 제안하였다. “첫째, 냉동한 난자의 융해 후의 핵성숙율과 발달능력은 그들의 미세기관구조(micro-organic structure) 즉 다시 말해 미성숙난자에서 microorganelles의 배열(arrangement)이 동결 쇼크에 민감한 것과 연관이 되어 있을 것이다(Hyttel 등, 1986; Sunstrom과 Nilsson, 1988). 둘째, 난자의 냉동능력은 세포질에서 발생하는 단백질 합성과 관련이 있다(Fulka 등, 1986; Moor와 Crosby, 1986; Hunter와 Moor, 1987). 셋째, 난구세포는 융해 후 생존율에 중요한 역할을 하므로 냉동능력에서 난구세포의 효과를 고려해 보아야 한다”고 하였으나 단백질 합성 활동에 관한 부정적인 견해도 보고되어 있고(Wassarman, 1988) 단백질 합성의 메카니즘은 더욱 명료한 연구가 필요하며, Whittingham(1977)은 마우스 난자에서 난구세포의 부착 유무에 따라 융해 후 생존율과 2cell까지의 발달에 차이가 없다고한 부정적인 견해도 있다.

이와 같이 타동물에서 보고된 연구결과와 비교하여 볼 때 본 실험의 결과는 차이를 보였을 뿐만 아니라 생존율에 있어서도 매우 낮은 수준이었다. 그러나 미성숙난포란의 동결에서는 감수분열시 방추사의 손상을 줄일 수 있으며(Friedler 등, 1988), aneuploid의 발

생빈도가 낮다는 보고(van Blerkom, 1991)가 있기 때문에 앞으로 미성숙난포란의 동결은 수정란의 체외 생산기술 개발과 이용에 있어서 주요한 연구과제라고 사료된다. 또한 돼지에서 동결난포란의 발생능이 대조구에 비해 현저히 낮은 것은 4세포기 발달증지현상과 다정자침입이 동결난포란에서 매우 높았던 것에 기인된 것으로 추측되며, 또한 Pellicer 등(1988)과 Schmidt 등(1993)이 밝힌 바와 같이 동결, 융해에 따른 투명대의 파열, 난황막의 균열 및 난구세포와 난자간의 연결구조적 변화와도 관련이 있는 것으로 보아 난자의 미세구조의 손상을 최소화 할 수 있는 동결방법의 개발이 필요한 것으로 생각된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 돼지 난포란의 동결시기를 결정하고자 미성숙, 성숙중, 성숙후의 3가지 성숙단계의 난포란을 동해방지제에 노출하거나 동결, 융해하여 체외성숙율과 체외발생율을 대조구와 비교 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다

1. 각각 0, 24, 44시간 동안 성숙배양한 난포란을 동해방지제에 노출한 후 추가배양했을 때 난포란의 성숙율은 각각 45.2, 45.0, 50.3%으로 무처리구 55.0%와 비슷하였다.
2. 각각 0, 24, 44시간 동안 성숙배양한 난포란을 동해방지제에 노출한 후 체외수정하고 배양했을 때 난자의 발달율은 각각 18.6, 19.7, 47.6%로 0시간과 24시간에서는 무처리구 50.9%보다 유의하게 낮은 배발달율을 나타내었으나 44시간에서는 차이가 나타나지 않았다.
3. 각각 0, 24, 44시간 동안 성숙배양한 난포란을 일단계 초자화동결법(one-step vitrification)으로 추가배양했을 때 난포란의 동결, 융해 후 성숙율은 각각 4.3, 7.1, 46.7%로 무처리구 62.4%보다 유의하게 낮은 성숙율을 나타내었다.
4. 각각 0, 24, 44시간 동안 성숙배양한 난포란을 일단계 초자화동결법(one-step vitrification)으로 동결, 융해 후 체외수정하고 배양했을 때 난자의 발달율은 각각 2.5, 2.4, 10.2%로 무처리구 49.6%보다 유의하게 낮은 성숙율을 나타내었다.

#### V. 인용문헌

1. Al-Hasani, S., K. Diedrich, H. Van der ven, A. Reinecke and D. Krebs. 1987. Cryopreservation of human oocytes. Human Reprod., 2:695-700.
2. Al-Hasani, S., A. Tolksdorf, K. Diedrich, H. Van der ven and D. Krebs. 1989. Successful *in vitro* fertilization of frozen thawed rabbit oocytes. Human Reprod., 1:309-312.
3. Arav, A., D. Shehu and M. Mattioli. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 99:353-358.
4. Byun, T.H., S.H. Lee and H.B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. Korea J. Anim. Sci., 33(1):25-31.
5. Carroll, J., G.M. Warnes and C.D. Matthews. 1989. Increase in digyny explains polyploid after *in-vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocyte. J. Reprod. Fert., 85:489-494.
6. Carroll, J., H. Depypere and C.D. Matthews. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J. Reprod. Fert., 90:547-553.
7. Cha, K.Y., H.M. Chung, K.A. Lee, S.E. Park, S.Y. Han, T.K. Yoon and J.J. Ko. 1997. Clinical use of human immature oocyte. J. Mamm. Ova Res., 14:29-34.
8. Chen, C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet, I, pp 884-886.
9. Didion, B.A., D. Pomp, M.J. Martin, G.E. Homanics and C.L. Markert. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. J. Anim. Sci., 68:2803-2810.
10. Edward, R.G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and



- human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-551.
11. Friedler, S., L. Guidice and E.J. Lamb. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.*, 49:743-764.
  12. Fuku, E., L. Xia and B.R. Downey. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocyte cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32:139-156.
  13. Fulka, J.Jr., J. Motlik, J. Fulka and F. Jilek. 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 77:281-285.
  14. Glenister, P.H., J. Maureen, J. Wood, K. Carol and D.G. Whittingham. 1987. Incidence of chromosome abnormalities in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res.*, 16:205-216.
  15. Hamlett, D.K., D.R. Franken, H.S. Cronje and H. Luus. 1989. Murine oocyte cryopreservation: Comparison between fertilization success rates of fresh and frozen metaphase I and II oocytes. *Arch. Andol.*, 23:27.
  16. Hochi, S., K. Akira, K. Ken and H. Akira. 1997. *In vitro* fertilizing ability of bovine oocyte frozen-thawed at immature, maturing and mature stage. *J. Mamm. Ova Res.*, 14:61-65
  17. Hunter, A.G. and R.M. Moor. 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 70:1646-1651.
  18. Hyttel, P., K.P. Xu, S. Smith and T. Greve. 1986. Ultrastructure of *in vitro* oocytes maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78:615-625.
  19. Kono, T. O.Y. Kwon and T. Nakahara. 1991. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Cryobiology*, 28:50-54.
  20. Kim, S.B., H. Lee, T.H. Byun, J.T. Jeon, S. H. Lee and H.B. Song. 1994. Early development of pathenogenetically activated porcine oocyte after *in vitro* maturation for various periods. *Korean J. Emb. Trans.*, 9(1):117-125.
  21. Leibo, S.P. 1977. Fundamental ryobiology of mouse ova and embryos. I. The freezing of mammalian embryos. Siba Foundation Symposium 52, K. Elliot and J. Whelan, eds. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 69-92.
  22. Lim, J.M., Y. Fukui and H. Ono. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
  23. Mandelbaum, J., A.M. Junca, M. Plachot and M.D. Alnot. 1987. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod.*, 3:117.
  24. Moor, R.M. and I.M. Crosby. 1986. Protein requirement for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 94:207-220.
  25. Parks, J.E. and N.A. Ruffing. 1992. Factors affecting low temperature survivals of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
  26. Pellicer, A., A. Lightman, T.G. Parmer, H. R. Behrman and A.H. De Cherney. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil. Steil.*, 50:805-810.
  27. Pickering, S.J. and M.H. Johnson. 1987. The influenced of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.*, 2:207-216.
  28. Pieterse, M.C., PLAM. Vos, ThAM. Kruij, Y.A. Wurth, ThH. van Benden, A.H. Willemse and M.A.M. Taverne. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocyte. *Theriogenology*, 53:19-24.

29. Polge, C., A.V. Smith and A.S. Parkers. 1949. *Nature.*, 164 : 666.
30. Quinn, P., C. Barros and D.G. Whittingham. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilization capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66:161-168.
31. Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos ; Methods and applications. *Animal Reprod. Sci.*, 28:237-245.
32. Rubinsky, B., A. Arav and A.L. Devires. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-Letters*, 12:93-106.
33. SAS /STAT:User's guide, release 6.03 edition SAS institute Inc., 1988, Cary. NC. USA.
34. Sathanathan, A.H., S.C. Ng, A.O. Trounson, A. Bongso, S.S. Ratnam and J. Ho. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.*, 21:385-401.
35. Schalkoff, M.E., S.P. Oskowitz and R.D. Powers. 1989. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservation. *Bio. Reprod.*, 40:370-393.
36. Schellander, K. B.G. Brackett, F. Fuhrer and W. Schleger. 1988. In vitro fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. *Proc. 11th. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem.* June 26-30. Dublin, Ireland. Vol. I. P. 349 (Abst.).
37. Schmidt, M., P. Hyttle, T. Greve and B. Avery. 1993. Ultrastructure of frozen thawed bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*, 39:304.
38. Schroeder, A.C., A.K. Champlin, L.E. Mobraaten and J.J. Eppig. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89:43-50.
39. Sunstrom, P. and B.O. Nilsson. 1988. Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycle is asynchronous. *Human Reprod.*, 3:613-619.
40. Suzuki, T. and Y. Nishikata. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. *Theriogenology*, 37:306.
41. Taha, T.A. and K. Schellander. 1992. Development capacity of immature and *in vitro* matured bovine oocyte after exposure to vitrification solution. *Theriogenology*, 37:307 (Abst.).
42. Trouson, A. and C. Kirby. 1989. Problems in the cryopreservation of unfertilized egg by slow cooling in dimethyl sulfoxide. *Fertil. Steril.*, 52:778-786.
43. van Blerkom, J. 1989. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocyte after cryopreservation ; alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Human Reprod.*, 4:883-898.
44. Van der Elst, J., E. Van den Abbeel, R. Jacobs, E. Wisse and A. Van Steirtghem. 1988. Effect of 1,2-propaneol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouseoocyte. *Human Reprod.* 3:960-967.
45. Van der Elst, J., S. Nerinckx and A.C. Stirteghem. 1992. *In vitro* maturation of mouse germinal vesicle-stage oocyte following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing:limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Human Reprod.*, 7(10):1440-1446.
46. Wassarman, P.M. 1988. The mammalian ovum. In:Knobil E. and Neil J.(eds), *The physiology of reproduction*, Raven Press, New York, pp. 69-103.
47. Whittingham, D.G. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mo-

- use oocyte previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . J. Reprod. Fert., 49:89-94.
48. Zhao, J., M. Hattori and N. Fujihara. 1997. Ultrastructural comparison between immature and *in vitro* matured bovine oocyte cryopreserved in propandiol. J. Mamm. Ova Res., 14:84-94.
49. 박성은, 정창조, 손원영, 정형민, 이숙환, 이우식, 고정재, 윤태기, 차광열, 1997. 인간 미성숙난자의 동결·융해 후 체외 배양된 난자에 대한 염색체 분석. 대한불임학회지, 24(2):253-259.  
(접수일자 : 1998. 11. 9. / 채택일자 : 1998. 12. 10.)