

## Open Pulled Straw 방법에 의해 동결-용해된 돼지난자의 생존능력\*

김세웅 · 박춘근 · 정희태 · 양부근 · 김정익<sup>†</sup>  
강원대학교 동물자원과학대학

## Survival Ability of Porcine Oocytes Frozen-Thawed by Open Pulled Straw Method

S. W. Kim, C. K. Park, H. T. Cheong, B. K. Yang and C. I. Kim<sup>†</sup>  
College of Animal Resource Science, Kangwon University, Chuncheon 200-701, Korea

### SUMMARY

Vitrification of oocytes has been applied recently for pigs, but remains elusive. The purpose of this study is to investigate the effects of vitrification in open pulled straws (OPS) on *in vitro* survival of porcine oocytes. When immature follicular oocytes frozen-thawed were cultured for *in vitro* maturation, maturation rates to metaphase-II stage were higher in oocytes with (25%) than without (15%) cumulus cells. After *in vitro* fertilization of oocytes frozen-thawed, the maturation rates were also significantly ( $P<0.05$ ) higher in oocytes with (41%) that than without (17%) cumulus cells. However, the penetration rates were higher in oocytes without (19%) that than with (9%) cumulus. In another experiment, porcine oocytes matured *in vitro* were frozen and thawed for *in vitro* fertilization. The penetration rates were higher than in oocytes without (35%) that than with (26%) cumulus cells. However, the proportions of oocytes dead after *in vitro* fertilization were significantly ( $P<0.05$ ) higher in oocytes with that than without cumulus cells. On the other hand, the rates of penetration and dead oocytes at 6 h after *in vitro* fertilization were not significant differences between oocytes with and without cumulus cells. However, the proportions of dead oocytes with (18%) and without (16%) cumulus cells were higher than in oocytes of control group (0%). These finding indicated the possible broader application for OPS, as they demonstrated that the maturation and fertilization *in vitro* by frozen-thawed oocytes may be accompanied by cumulus cells and culture periods according to the requirements of the survival ability after freezing of mature and immature oocytes in pigs.

(Key words : cumulus cells, *in vitro* maturation, sperm penetration, porcine oocytes, OPS)

### 서 론

최근 수정란이식분야의 산업적 이용이 가능해  
짐에 따라 체외수정, 쌍태유기, 성감별, 수정란의

동결, 유전자와 핵이식 및 복제동물 생산 등의 분  
야에서 유전공학적 기법의 연구가 활발하게 진행  
되고 있다. 이러한 첨단기술들을 활용하여 수정란  
이식 기술의 이용분야를 산업화된 기술로 발전시  
키기 위해서는 난포란 또는 수정란의 대량생산체

\* 이 논문은 2000년도 강원대학교 연구년 교수연구비에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup>Correspondence : Tel : 033-250-8613, E-mail : cikum@kangwon.ac.kr

계의 확립기술이 시급히 요구되고 있다.

난자의 동결은 암컷 배우자의 유전자원을 장기간 보존하는 수단으로 이용될 뿐만 아니라, 체외수정을 비롯한 발생공학 연구에 기본 재료가 되는 초기배의 대량 확보 수단으로 여러 동물종에서 관심이 높아지고 있다. 특히 난포란의 동결-융해에 따른 생존성에 관한 연구는 주로 실험동물을 대상으로 성숙란 (Hochi 등, 1997; Schmidt 등, 1993; Lim 등, 1991)과 미성숙란 (Arav 등, 1993; Van der Elst 등, 1992; Didion 등, 1990)의 동결-융해 후의 체외수정율과 생존성에 대한 연구보고가 있다. 그러나 돼지 배아의 동결에 대한 연구가 상당히 진전된 것과는 대조적으로 수정되지 않은 돼지 난자의 동결에 관한 연구보고는 거의 없고, 동결-융해한 난자의 발달율은 매우 낮은 실정이다. 더욱이 돼지 성숙 난자의 동결보존은 한계가 있는데, 돼지난자의 동결시 세포내의 지방구 방출에 따른 세포상해와 동결보호제의 삼투압에 의한 세포질의 응축, 낮은 온도에서 세포질내 미세소관들이 민감하게 반응하기 때문에 동결보존하는데 어려움을 겪고 있다 (Kaidi 등, 2000; Park과 Ruffing, 1992). 또한 동해보호제의 노출이나 동결, 융해시 난세포질 표면에 존재하는 cortical granule cell이 조기방출하며, 투명대의 물리적 손상이나 경화현상이 발생하므로 융해 후 난자의 생존율 및 수정율의 저하나 이상수정 혹은 염색체 이상의 발생 빈도가 높아진다 (Carroll 등, 1990; Vincent 등, 1990; Al-Hasani 등, 1987; Johnson과 Pickering, 1987). 이에 따라 성숙난자 보존기술의 대안으로서 방추사가 형성되기 전 단계인 미성숙난자의 동결이 이러한 문제점을 해결해 줄 수 있다고 최근에 제시되고 있다 (Park 등, 1997). 그러나 미성숙난자의 경우 성숙난자에서 보다 낮은 온도에 더 민감하여 세포상해를 입으며, 동결보존에 어려움을 겪고 있다.

한편, 돼지 난자의 세포질 내에는 지방구가 다량 함유되어 있으므로 동결보존시 상해가 다른 동물종에 비하여 심한 것으로 알려져 있다. 지금까지 이용되어 온 slow-rate freezing에 의한 돼지 수정란의 동결보존은 많은 양의 지방구가 세포내에서 방출되는 것과 +10 ~ -5°C의 위험온도를 극복하

지 못하여 생존성에 제한을 가져왔다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 centrifugation과 micro-manipulation을 이용하여 지방구만을 세포질내에서 제거함으로써 수정란의 생존율을 높일 수 있지만 이 기술은 사용하기 복잡한 단점이 있다 (Ushijima 등, 1996). 따라서 최근 Vajta 등 (1997a)이 보고한 open pulled straw (OPS) 동결방법은 소에 있어서 배반포 및 확장배반포와 같은 수정란을 비롯하여 핵이식란을 동결하는데 이용되었다 (Lazar 등, 2000; Booth 등, 1999; Peura 등, 1999; Vajta 등, 1998a; Vajta 등, 1997c). 또한 체외성숙시킨 소의 난자를 이용하여 체외수정과 배양 후 배반포까지의 발육율은 25%를 나타냈으며, 이식 후 산자의 생산이 보고되었다 (Francoise 등, 2000; Vajta 등, 1998c; Le Gal 등, 2000; Beebe 등, 2000). 그러나 OPS법에 의해 동결-융해된 난자는 생리적 변화와 수정율, 수정란의 발육 및 산자의 생산에 영향을 주는 것으로 알려져 있지만 돼지의 경우 이와 관련된 연구가 아직 불충분한 실정이다. 따라서 본 연구는 난자의 동결시 동해를 최소화시키는 방법으로 알려진 OPS법에 의해 동결-융해된 돼지의 난자에 대한 생존성을 검토하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 미성숙 난포난자의 회수

도축장에서 도살직후 회수한 돼지난소를 30 ~ 32°C의 생리식염수에 침적하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하여 18-gauge 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 직경 2~6 mm의 포상 난포로부터 흡입·회수하여 난구세포가 균일한 난포란만을 선택하여 TL-Hepes (114mM NaCl, 3.2mM KCl, 2.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4mM NaHPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 10.0mM Na-lactate, 2.0mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10.0mM Hepes (Quantum, Biotechnologies INC, USA), 100IU penicillin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), pH 7.4, 280 Osm로 적정)로 3회 세척한 후 체외성숙배양에 이용하였다.

### 2. 난자의 체외성숙

채란된 난자는 형태적으로 정상적이며 난구세포

의 균일성과 세포질이 정상적인 것만을 선택하여 체외성숙에 사용하였다. 성숙 배양액은 3.05 mM glucose, 0.32 mM Ca-lactate, 2.5 mM Hepes (Quantum, Biotechnologies INC, USA), 10% fetal calf serum (FCS), 0.2 mM Na-pyruvate (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 50 µg/ml gentamycin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 1 µg/ml FSH (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 5 µg/ml LH (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 및 1 µg/ml estradiol 17 β (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)가 첨가된 TCM-199 (Gibco, Life Technologies INC. USA) 배양액을 사용하였으며, 난자는 성숙 배양액 내에서 3회 세척 후 미리 준비해둔 소적내에 10개의 난자와 pFF (pocine follicular fluid) 5 µl씩 첨가하여 24시간 동안 성숙배양 후 hormone 물질을 제거한 성숙 배양액 내에서 24시간 동안 추가 성숙 배양을 실시하였다.

### 3. 체외수정

체외수정은 48시간동안 체외성숙시킨 난자를 수정 dish에 옮겨 3회 세척 후 수정용 소적(45 µl) 내에 5개씩의 난자를 넣어 수정을 실시하였다. 동결정액 Straw는 37°C에서 30초간 용해 후 0.4% BSA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)와 5 mM caffeine (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)이 첨가된 TCM-199 (Gibco, Life Technologies INC. USA)액으로 10분간 원심분리로 2회 세척 후  $1 \times 10^6$  spermatozoa/ml이 되도록 조정하여 미리 작성해둔 45 µl의 소적에 첨가하여 체외 수정을 실시하였다.

### 4. 고정

미성숙 및 성숙 난자의 동결-용해 후 성숙단계 및 수정 후 정자의 침입상황을 검토하기 위하여 난구세포와 투명대에 부착된 정자를 제거한 난자는 고정액 (acetic orcein : ethanol = 1 : 3)에서 2~3일간 고정하여 1% aceto-orcein으로 염색하여 위상차현미경하에서 성숙 및 수정상황을 검토하였다. 난자의 생존성 검사는 현미경하에서 염색체의 형태학적 이상 유무에 의해 결정하였다.

### 5. OPS동결

OPS동결은 Vajta 등(1997b)에 보고된 동결과정을 변형하여 이용하였다. 동결을 위한 holding media(HM)는 TCM-199 (Gibco, Life Technologies INC. USA)에 2.5 mM Hepes, 20% FCS를 첨가하여 기본으로 하였으며, sucrose media는 TCM-199 (Gibco, Life Technologies INC. USA)에 0.6M sucrose, 20% FCS를 첨가하여 사용하였다. 동결에 사용되는 동결액 조성에서 vitrification solution (VS) 1은 holding media에 10% ethylene glycol (EG), 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 사용하였고, VS2는 sucrose media에 20% EG, 20% DMSO를 첨가하여 사용하였다. 동결과정은 4well dish에 HM, VS1을 첨가한 후 mineral oil로 피복하여 실험 시작 전 2~3시간 동안 preincubation을 실시하였다. 한편 난자는 HM에 옮겨가며 세척을 실시한 후 VS1에서 3분 동안 평형을 실시하여 VS2 100 µl 소적에 옮겨 다시 세척하였다. 세척 과정에서 30초간 동해보호제에 노출 후 즉시 2 µl 소적에 5개의 난자를 넣어 모세관작용에 의해 난자를 흡입 후 바로 196°C LN<sub>2</sub>내에 침적하여 동결을 실시하였다. 동결된 Straw는 LN<sub>2</sub> container에 옮겨 7일 이상 보관한 후 용해하여 실험에 이용하였다. 용해 media는 HM과 0.6M sucrose액을 2 : 1의 비율로 혼합하여 thawing medium (TM)1으로 사용하였으며, TM2는 HM과 0.6M sucrose을 4 : 1의 비율로 혼합하여 사용하였다. Straw는 LN<sub>2</sub> container내에서 꺼내는 즉시 TM1 media에 넣어 5분 동안 용해한 후 TM2에서 5분간 유지하다가 HM에서 5분 동안 용해하였다.

### 6. 실험계획

#### 1) 실험 1

난소로부터 채취한 미성숙 난포난자는 TL-Hepes로 세척 후 즉시 OPS방법에 의하여 동결-용해한 후 48시간 동안 체외성숙 배양을 실시하여 난자의 성숙단계를 검토하였다. 이때 미성숙 난자는 난구세포를 부착 또는 제거하여 동결-용해 후 난구세포가 난자의 성숙에 미치는 영향을 검토하였다.

## 결 과

### 2) 실험 2

난소로부터 채취한 미성숙 난포난자를 TL-Hepes 로 세척 후 즉시 OPS방법에 의하여 동결-융해하여 48시간 동안 체외성숙 배양을 실시하여 체외수정을 실시한 후 22~24시간 후 2~3일간 고정하여 염색 후 정자의 침입 및 난자의 성숙상태를 검토하였다. 이때 난자는 난구세포를 부착 또는 제거하여 동결-융해 후 난구세포가 난자의 발달과 정자의 침입에 미치는 영향을 검토하였다.

### 3) 실험 3

체외에서 성숙시킨 난자의 동결-융해 후 체외수정을 실시하여 정자의 침입 상황을 검토하였다. 성숙배양 후의 난자는 난구세포를 부착 또는 제거하여 동결-융해 후 체외수정에 이용하였다. 이때 체외성숙배양 후 극체의 방출이 관찰된 것만을 체외수정에 이용하였으며 체외수정 후 22~24시간에서 고정, 염색하여 정자의 침입 상황을 관찰하였다.

### 4) 실험 4

동결-융해 난자의 체외수정 후 6시간에서 정자의 침입상황을 검토하였다. 즉, 체외에서 성숙시킨 난자는 극체의 방출이 확인된 난자만 선별하여 난구세포를 부착 또는 제거하여 동결-융해 한 후 6시간동안 체외수정을 실시하였으며, 난자는 고정, 염색하여 난자내의 정자 침입상황을 검토하였다.

### 7. 통계분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 SAS Package 를 이용하여 각 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

실험 1은 돼지 미성숙 난포난자의 난구세포 유무에 따라 OPS방법으로 동결-융해시 체외 성숙율을 검토하기 위하여 실시하였다. Table 1에서 나타난 바와 같이 정상적으로 체외성숙시킨 Control group (62%)에 비하여 미성숙 난자의 동결-융해 후 체외에서 성숙배양한 난자의 성숙율은 유의적으로 낮았다 ( $P < 0.05$ ). 한편 난자의 동결시 난구세포 부착 난자에 있어서 융해 후의 성숙율 (25%)은 난구세포 제거시 (15%)에 비하여 높은 성숙율을 나타냈으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 실험 2에서 돼지 미성숙난자를 OPS방법으로 동결-융해한 후 체외성숙하여 수정 후 정자의 침입상황을 검토하기 위하여 실시되었다. 그 결과, Table 2에서 나

Table 1. *In vitro* maturation of porcine immature oocytes frozen-thawed by open pulled straw (OPS) methods

Presence of cumulus cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes (%)		
		GVBD	P-I~T-I	M-II
Control	194	13(7)	60(31)	121(62) <sup>a</sup>
+	150	70(47)	42(28)	38(25) <sup>b</sup>
-	150	83(55)	40(27)	23(15) <sup>b</sup>

Control : oocytes matured with cumulus cells for 48h.  
GVBD : Germinal vesicle breakdown, P-I : Prophase I, T-I : Telophase I, M-II : Metaphase II.

<sup>ab</sup> Values with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

Table 2. *In vitro* fertilization of porcine immature oocytes frozen-thawed by open pulled straw (OPS) methods

Presence of cumulus cells	No. of oocytes examined	M-II (%)	No. of oocytes (%)			No. of polyspermic oocytes (%)	No. of oocytes dead (%)
			Total(%)	ESH	BPN		
+	137	56(41) <sup>a</sup>	12(9) <sup>a</sup>	12	0	0	62(45) <sup>a</sup>
-	155	27(17) <sup>b</sup>	29(19) <sup>a</sup>	29	0	0	99(64) <sup>b</sup>

ESH : Enlarged sperm head, BPN : Both pronuclei.

<sup>ab</sup> Values with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

타넨 바와 같이 수정 후 22~24시간에서 M-II기로 성숙한 난자의 비율은 난구세포 부착난자 (41%)가 제거된 난자 (17%)에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ). 그러나 이들 난자에 대한 정자침입율은 난구세포 제거 (19%)시 부착된 난자 (9%)에 비하여 높게 나타났으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 한편, 수정 후 사멸한 난자는 난구세포 부착 (45%)시 제거된 난자 (64%)에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

실험 3은 돼지의 성숙난자를 동결-융해하여 체외수정 후 정자의 침입율을 검토하였다.

Table 3에서 나타낸 바와 같이 정자침입율은 난구세포 제거시 (35%), 부착된 (26%) 난자에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며 ( $P<0.05$ ), 이때 사멸된 난자의 비율은 난구세포 부착시 35% (46/130)로 제거시 22% (33/150)에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ).

실험 4에서는 동결-융해 난자를 이용하여 체외수정 후 6시간에서 정자의 침입상황을 검토하였다. Table 4에서 나타낸 바와 같이 Control (61%)에 비

해 동결-융해난자의 경우 정자침입율은 난구세포 부착시 26% (45/170)와 제거시 33% (39/120)가 유의적으로 낮은 침입율을 나타냈으며 ( $P<0.05$ ), 난자의 사멸율은 Control (0%)가 동결-융해시 (16%~18%)에 비해 유의적으로 높게 나타났으나 ( $P<0.05$ ) 난구세포의 유무에 의한 차이는 인정되지 않았다.

## 고 찰

동결보존의 목적은 생명의 기능과 유전적 변화 없이 세포를 반영구적으로 보존한다는 것을 의미한다. 지난 10여년간 수정란의 동결보존을 위한 여러 가지 새로운 방법들이 발표되었는데 그 가운데 초자화 동결법이 개발되면서 동결보존이 보편화되었고, 전통적으로 사용된 slow-rates freezing법에 대한 좋은 변화로 간주되고 있다. 현재 수정란의 경우 동결과 융해 속도에 대한 연구에 관심이 집중되어 있는데 지금까지 3가지 방법 즉, electron microscopy grid (Park 등, 1999), Open Pulled straw법

Table 3. *in vitro* sperm penetration after frozen-thawing by open pulled straw (OPS) method in oocytes matured *in vitro*

Presence of cumulus cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes (%)			No. of polyspermic oocytes (%)	No. of oocytes dead (%)
		Total(%)	ESH	BPN		
+	130	34(26) <sup>a</sup>	34	0	0(0)	46(35) <sup>a</sup>
-	150	52(35) <sup>b</sup>	52	0	0(0)	33(22) <sup>b</sup>

ESH : Enlarged sperm head, BPN : Both pronuclei.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are different ( $P<0.05$ ).

Table 4. *in vitro* penetration at 6 h after frozen-thawing by open pulled straw (OPS) methods in oocytes mature *in vitro*

Presence of cumulus cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes (%)			No. of polyspermic oocytes (%)	No. of oocytes dead (%)
		Total(%)	ESH	BPN		
Control	120	73(61) <sup>a</sup>	73	31	12(10)	0(0) <sup>a</sup>
+	170	45(26) <sup>b</sup>	45	0	0(0)	30(18) <sup>b</sup>
-	120	39(33) <sup>b</sup>	39	0	0(0)	19(16) <sup>b</sup>

Control : oocytes inseminated after 48h of *in vitro* maturation.

ESH : Enlarged sperm head, BPN : Both pronuclei.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are different ( $P<0.05$ ).

(Lewis 등, 1999; Vajta 등, 1997b)과 Nylon-loop (Lane과 Gardner, 2001)등이 개발되었다. Vajta 등 (1998b)은 OPS방법이 동결과 융해율을 증가시켰으며, 동결보호제를 낮은 농도로 사용함으로써 독성을 감소시키고 삼투압 손실을 줄이는 것으로 보고했다. 비록 OPS방법이 쉽고 유용하게 사용될 수 있지만 LN<sub>2</sub>내에 직접 넣어 Straw가 떠다니므로 동결속도의 감소에 의해 난자에 손상을 줄 가능성이 있지만 이들 기술적인 문제만 해결이 된다면 매우 효과적인 동결법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 이와 같은 OPS법에 의한 돼지 미성숙난자와 성숙난자의 동결-융해 후 성숙을 및 정자의 침입상황에 대하여 검토하였다. 미성숙난자의 경우 난구세포의 유무에 의한 유의적인 차이를 보이지 않았으나 동결-융해 후 실제현미경 하에서 난자의 형태는 난구세포 부착난자가 훨씬 좋은 상태로 나타났으며, 24시간 성숙시 형태학적으로 난구세포의 성숙은 정상적이거나 48시간 경과 후 난자의 난구세포는 난구세포의 유사분열이 중지되며 난구세포의 팽창이 중지되어 있는 것 같은 형태를 취하고 있어 동결시 난자의 동결상해에 의한 성장억제를 나타낸 것으로 보인다. 한편, 미성숙난자의 동결-융해 후 난구세포 유무에 관계없이 세포질 외부의 지방구 방출과 cortical granule cell의 방출이 관찰되었다. 이것은 난구세포 유무에 관계없이 모두 나타났으며, 이와 같이 지방구의 방출은 동결상해에 따른 것으로 생각되며, cortical granule cell의 조기 방출은 zona hardening과 같이 수정시 정자의 침입을 막는 역할을 할 것으로 생각된다 (Phillip 등, 1997; Vincent 등, 1990; Carroll 등, 1990; George 등, 1992). 이것은 돼지에서 polyspermy가 많이 발생하는 일반적인 연구결과와 달리 동결된 난자의 경우 polyspermy가 전혀 관찰되지 않았는데 그 원인에 대해서는 앞으로 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 또한 난구세포의 유무가 동결시 미치는 영향과 작용을 확인할 수 없었으나, 융해 후 성숙시킨 난자의 난구세포와 세포질간의 microfilament에 의한 물질교류가 동결보호제의 삼투압차에 의한 파괴에 의해 난구세포는 살아 있으나 세포의 성숙은 전혀 나타나지 않는 것으로 생각된다.

microtubule은 tublin dimers ( $\alpha$ : 42kd,  $\beta$ : 56kd)로써 염색체를 지지하는 구조를 형성하며, 세포질과 세포의 형태를 유지하는데 중요한 역할을 한다 (Park과 Ruffing, 1992; Johnson과 Pickering, 1987; Bonder 등, 1989). 그러나 염색체와 극체가 나타나 있으나 지방구의 방출과 낮은 온도에 의한 microtubule의 polymeration에 따라 염색체와 극체의 이상현상이 나타나며 고정시 염색체는 보이나 극체가 보이지 않는 경우가 많이 나타났다.

동결-융해된 난자의 체외수정시 난구세포를 부착한 난자가 제거된 난자에 비하여 정자침입율이 낮게 나타났는데 이와 같은 원인 중의 하나로 난구세포 부착 난자에서 난구세포의 사멸과 cortical granule cell의 방출에 의해 정자침입을 억제된 것으로 생각된다. 한편 체외에서 성숙시킨 난자의 동결과 융해 후 정자의 침입은 난구세포 제거시 더 높게 나타났다. 그러나 고정-염색 후 염색체와 극체가 확인된 것은 난구세포 부착시 더 높아 난구세포가 동결에 어떤 영향을 미칠 것이라고 생각된다. 또한 성숙난자의 동결-융해시 zona pellucida의 파괴를 나타내고 있는데, 이와 같은 원인은 과도한 동결속도가 zona pellucida의 파괴를 가져온 것으로 생각된다. 한편, 동결-융해 난자의 수정 후 6시간에서 난구세포의 유무에 의한 정자침입율의 차이는 없었으나 난구세포 제거시 높은 정자 침입율을 나타냈다. 그러나 대조구에 비하여 낮은 정자침입율을 나타냈지만 다정자 침입 난자는 관찰되지 않았다. 이와 같은 원인은 이미 언급한 바와 같이 난구세포가 부착된 난자의 동결-융해시 동결상해에 의한 난구세포의 손상에 의해 정자의 침입이 억제되는 것으로 생각할 수 있다 (Pellicer 등, 1988). 또 다른 관찰에서 미성숙 난자의 동결-융해 후 체외 수정에 이용했을 때 난구세포의 제거시 부착된 경우에 비해 난자의 사멸율이 높았으나 (Table 2), 성숙난자의 동결-융해 후 체외수정한 경우 오히려 난구세포 부착시 난자의 높은 사멸율을 나타냈는데 이 원인에 대해서는 아직 밝혀지지 않았으며, 앞으로 더욱 구체적인 연구가 요구된다. 본 연구에서 OPS에 의한 미성숙 및 성숙된 난자의 동결은 높은 성숙율과 수정율은 나타내지 않았으나, 돼지 미성숙난자의 동결에 효과적인 이용이 가능한 것

으로 생각된다. 그러나 미성숙 단계에서 돼지 난자의 경우 동결과정이 세포구조의 파괴와 동결에 의해 난자의 성숙에 어떠한 영향을 주는지 보고된 바가 없다. 따라서 돼지 미성숙난자의 동결에 의한 세포내의 미세소관과 cortical granule cell, 핵성숙 과정에 대한 미세구조 연구와 미성숙난자에 적당한 동결방법과 동해보호제 선택에 관한 연구가 요구된다.

### 적 요

본 연구는 OPS 방법에 의한 돼지미성숙 및 성숙난자의 동결-용해 후 난자의 생존성에 있어서 난구세포의 영향을 검토하였다. 그 결과 미성숙 난자의 동결-용해후의 성숙율은 난구세포의 부착 (25%) 및 제거 (15%)시 유의적인 차이는 인정되지 않았지만 control group (62%)에 비해서는 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 미성숙난자의 동결-용해 후 체외성숙시킨 난자의 체외수정시 난구세포 제거시 (19%), 부착된 (9%) 난자에 비해 높은 정자침입율을 나타냈으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 그러나 체외수정후의 난자 성숙율은 난구세포의 부착시 (41%), 제거된 (17%)난자에 비하여 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높았으며, 난구세포 제거시 부착된 난자에 비해 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 사멸율을 나타냈다. 한편, 체외에서 성숙시킨 난자의 동결-용해후 체외수정에 이용하였을 때 정자침입율은 난구세포 제거시 (35%), 부착된 (26%)난자에 비해 유의적으로 높았지만 이때 난자의 사멸율은 난구세포 부착 난자에서 오히려 유의성은 높았다 ( $P < 0.05$ ). 또 다른 실험에서 체외수정 후 6시간에서 정자침입율은 난구세포의 유무에 의한 차이는 인정되지 않았으나, 난구세포 제거시 높게 나타났으며, 이때 난자의 사멸율은 난구세포 부착시 높았으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 그러나 정자침입이 일어난 난자의 경우 다정자 침입난자가 전혀 관찰되지 않았다.

본 연구의 결과로부터 OPS방법에 의한 돼지 미성숙, 성숙난자의 동결은 미성숙난자의 경우 난구세포의 부착이 효과적인 것으로 사료되며, 성숙난자의 경우 난구세포 제거시 정자침입율이 높게 나

타나 동결-용해시 난구세포가 난자의 성숙과 수정시 정자의 침입에 관여하는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Al-Hasani, Diedrich SK, Van der ven H, Reinecke A and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Hum. Reprod.*, 2:695-700.
- Avav A, Shehu D and Matitiali. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 99:353-358.
- Beebe LFS, Camerson RDA, Blackshaw AW, Higgins A and Nottle MB. 2000. Piglets born from vitrified zona-intact blastocysts. *Theriogenology*, 53:249 (abstr.).
- Bonder EW, Fishkind DJ, Cotran NM and Begg DA. 1989. The cortical actin-membrane cytoskeleton of unfertilized sea urchin eggs: analysis of the spatial organization and relationship of filamentous actin, nonfilamentous actin and egg spectrin. *Dev. Biol.*, 134:327-341.
- Booth PJ, Vajta G, Holm HojP, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1999. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrification cytoplasts : work in progress. *Theriogenology*, 51:999-1006.
- Carroll J, Depypere H and Matthews CD. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucid explains decreased frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 90:547-553.
- Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homonics GE and Markert CL. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, 68:2803-2810.
- Francoise B, Francoise MB, Locatelli A, Christine P and Tequi M. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, 41:116-124.
- George MA, Johnson MH and Vincent C. 1992.

- Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 7:408-412.
- Hochi S, Akira K, Ken K and Akira H. 1997. *in vitro* fertilizing ability of bovine oocyte frozen-thawed at immature, maturing and mature stage. *J. Mamm. Ova Res.*, 14:61-65.
- Johnson MH and Pickering SJ, 1987. Effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*, 100:313-324.
- Kaidi S, Donnay I, Lambert P, Dessy F and Massip A. 2000. Osmotic behavior of *in vitro* produce bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology*, 41:106-115.
- Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol. Reprod. Dev.*, 58:342-347.
- Lazar L, Spak J and David V. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*, 54:571-578.
- Le Gal F, Deroover R, Verhaeghe B, Etienne D and Massip A. 2000. Birth of calves from vitrified oocytes. *Ann. Med. Vet.*, 144:33-26.
- Lewis IM, Lane MW and Vajta G. 1999. Pregnancy rate following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology*, 51:168 (abstr.).
- Lim JM, Fukui Y and Ow H. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
- Park SE, Chung CJ, Son WY, Chung HM, Lee SH, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK and Cha KY. 1997. Chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro* following cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Kor. J. Fertil. Steril.*, 24:253-259.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS and Lim JH. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum. Reprod.*, 14:2838-2843.
- Park JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survivals of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Peura TT, Lane MW, Lewis IM and Trounson AO. 1998. The use of vitrified multigenerational cloned cattle embryos as donors in nuclear transfer. *Theriogenology*, 49:326 (abstr.).
- Pellicer A, Lightman A, Parmer TG, Behrman HR and De Cherney AH. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 50:805-810.
- Phillip LM, Jason G, Steohen MJ, John LY and Edirisinghe WR. 1997. Cryopreservation of oocytes and embryos : use of a mouse model to investigate effects upon zona hardeness fertilization programme. *Hum. Reprod.*, 12: 1550-1553.
- Schmidt M, Hyttle P, Greve T and Avery B. 1993. Ultrastructure of frozen thawed bovine *in vitro* maturation oocytes. *Theriogenology*, 39:304.
- Ushijama H, Yamakawa H and Nagashima H. 1996. Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic lipid droplet. *Theriogenology*, 45:159 (abstr.).
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letter*, 18:191-195.
- Vajta G, Greve T and Callesen H. 1997b. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta. Vet. Scand.*, 38:349-352.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997c.



- Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *J. Reprod. Fertil.*, 111:65-70.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1998a. Open pulled straw (OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:53-58.
- Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M, Greve T and Callesen H. 1998b. Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo -Letters*, 19:389-392.
- Van der Elst J, Nerinckx S and Strirtegham AC. 1992. *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.*, 7:1440-1446.
- Vincent C, Pickering SJ and Johnson MH. 1990. The hardening effect of DMSO on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fert.*, 89:253-260.
- 
- (접수일: 2001. 7. 1 / 채택일: 2001. 8. 1)