

마우스 성숙난자의 유리화 동결법에 따른 동결 용해 후의 염색체와 방추사의 분석

고정재 · 박성은[†] · 정형민 · 신태은¹ · Gary B. Anderson²
포천중문의과대학교

Chromosome and Spindle Configuration of Mouse Oocytes after Vitrification at the Mature Stage

Ko, J. J., S. E. Park¹, H. M. Chung, T. E. Shin¹, and Gary B. Anderson²
College of Medicine, Pochon CHA University, Korea

ABSTRACT

Selection of oocyte cryopreservation method is a prerequisite factor for developing an effective bank system. To develop an effective vitrification method, we examined whether damages in spindle and chromosome morphology induced by vitrification. Intact cumulus-enclosed oocytes were vitrified with DPBS with 5.5 M ethylene glycol and 1.0 M sucrose, and loaded onto electron microscopic copper grid for storing in liquid nitrogen. Intact vitrified and thawed oocytes were immunostaining for tubulin and karyotyping for chromosome. Vitrified and thawed oocytes had a higher rate of chromosome (32.8% vs. 19.6%) and spindle (32.3% vs. 20.2%) abnormalities compared with fresh oocytes. Mouse oocytes after vitrification at the mature stage showed increased incidence of chromosomal and spindle abnormalities.

(Key words : Vitrification, Chromosome, Spindle, Immunostaining)

I. 서론

동결보존에 의한 난자은행의 확립은 배아 동결에 따른 윤리적, 법적문제를 해결할 수 있는 대안으로서 임상적 응용 가능성이 매우 크며 (Capron 1992; Perry와 Schneider, 1992), 동물학 분야에서도 멸종위기의 희귀동물이나 경제적 가치가 큰 동물의 생식세포를 장기간 보존할 수 있다는 점에서 그 의미가 매우 크다. 또한 인간생식보조기법에 있어서 동결보존에 의한 난자은행을 이용하여 조기

폐경, 방사선 조사 혹은 화학치료 및 유전자 이상 등으로 난소기능이 상실되거나 자신의 난자를 이용할 수 없는 환자에 대해 난자공여가 가능해질 수 있다는 점에서 이 분야에 관한 관심이 고조되고 있다.

난자의 동결보존시 동결방법의 선별은 효과적인 난자은행의 개발에 있어 필수불가결한 요소이다. 유리화 동결법은 동결중 ice crystal이 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질의 손상을 줄일 수 있는 장점이 있으므로 많은 포유동물의 실험결과가 보고되었다. (Nakagata 등, 1989; Hotamis-

[†] Corresponding author : Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Korea

¹ 차병원 여성의학연구소(Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Korea)

² Department of Animal Science, UC Davis

ligil 등, 1996; Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998).

그러나 여러 연구 보고에서 성숙난자를 유리화 동결 보존할 경우 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 보고하였다 (Bos-Mikich 등, 1995; Hotamisligil 등, 1996). 이는 성숙난자의 경우 염색체에 부착되어 있는 미세소관인 방추사가 온도변화에 매우 민감하여 동결 용해과정에서 미분리 (non-disjunction)가 발생하여 염색체의 이상 특히 이수현상 (aneuploidy)이 증가되기 때문이라고 보고하였다 (Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988; Pickering 등, 1990).

또한 성숙난자의 경우 항동해제의 노출이나 동결 용해시 난세포질 표면에 존재하는 표층과립이 조기방출되거나 투명대의 물리적 손상이나 경화현상이 발생하여 용해 후 난자의 생존율 및 수정율의 저하나 이상 수정 혹은 염색체 이상의 발생 빈도가 높아진다고 보고되어 성숙난자를 이용한 동결보존은 아직까지 많은 문제점을 노출하고 있다 (Schalkoff 등, 1989; Carroll 등, 1990; Al-Hasani 등, 1987).

이에 본 연구에서는 성숙난자의 유리화 동결보존시 나타나는 저조한 발생율의 원인을 규명하기 위한 기초연구로서 유리화 동결 용해 후의 난자에서의 염색체와 방추사의 이상 빈도를 알아보기 위해 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 성숙난자의 준비

암컷 ICR 생쥐의 복강에 5 IU의 PMSG와 hCG를 각각 48시간 간격으로 주사하여 과배란 유도를 하였다. 성숙난자의 회수를 위해 hCG를 주사한 후 14시간 후에 경추 탈골로 도살 후 난관 팽대부에서 19 gauge 주사침이 부착된 일회용 주사기 (1ml)를 사용하여 성숙난자를 회수하였다. 회수된 난자는 실체현미경하에서 난세포질이 균일하고 난구세포가 치밀하게 부착된 난자만을 선별하여 본 실험에 이용하였다. 회수된 난자는 동결전까지 20% FBS (Fetal bovine Serum, HyClone, USA)가 함유된 TCM 199 배양액 (Gibco/BRL, USA)에 옮겨

37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 성숙난자의 동결용해

회수된 미성숙난자는 연구의 목적에 따라 대조군과 동결 용해시킨 실험군으로 분류하였다. 동결 방법은 변형시킨 Martino 방법 (Martino 등, 1996)을 이용하였다. 동결방법은 난자를 1.5 M ethylene glycol (EG)에 2분 30초간 노출시킨 후 5.5 M EG와 1 M sucrose가 첨가된 동결액에 20초간 노출시킨 후 Grid에 난자를 부착시킨 후, 핀셋을 이용하여 난자가 부착된 Grid를 직접 액체질소에 침지한 후 제작한 Grid carrier에 넣어 동결하였다. 용해 방법은 Grid carrier에서 Grid를 꺼낸 후 1.0 M sucrose, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M에서 단계적으로 2분 30초간 노출시켰으며, PBS로 세척하고 실체현미경하에서 난자를 관찰하여 생존율을 조사하였다. 용해 후 생존한 난자는 염색체와 방추사 염색전까지 1시간 동안 배양하였다.

3. 염색체 분석

Tarkowski (1966)의 air-drying방법을 변형하여 난자의 염색체를 준비하였다. 대조군의 난자와 동결 용해 후의 생존한 난자를 0.1% hyaluronidase 용액에 처리하여 난구세포를 제거시킨 후 난자를 0.9% sodium-citrate 저장용액에 15분간 침지한 후 꺼내어 난자를 작은 점적으로 siliconized slide에 올려놓고 고정액 (메탄올 : 빙초산 = 3 : 1)을 난자가 있는 작은 점적에 부가하여 난자를 고정하였다. 고정된 난자의 염색체를 10% Giemza 용액에 염색시킨 후 Cytovison (Advanced imaging, UK)을 이용하여 karyotyping을 시행하였다.

4. 방추사 검색을 위한 immunostaining법

대조군의 난자와 동결 용해 후의 난자를 0.1% hyaluronidase용액을 이용하여 난구세포를 제거 후 난자를 25% glycerol, 25mM/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.5mM/L MgCl₂, 10mM/L ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraaceticacid, 50mM/L KCl, 25 μ M/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, and 2% Tri-

ton X-100이 첨가된 microtubule-stabilizing buffer에 1시간 동안 침지시킨다. 이들 난자들을 작은 점적으로 siliconized slide에 올려놓고 methanol을 난자가 있는 작은 점적에 부가하여 난자를 고정하였다. 난자를 PBS 용액에 세척 후 antitubulin antibody (Biosdesign, Maine)를 각 slide에 첨가시키고, 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 0.01% Triton X-100이 첨가된 PBS 용액에서 세척 후 tetramethyl rhodamine isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (1/200; Biosdesign, Maine)에서 1시간 동안 반응시키고 0.01% Triton X-100이 첨가된 PBS 용액에서 세척하였다. 염색체 관찰을 위해 Hoechst 33258 (Sigma, USA) 용액에 15분간 반응시킨 후 cover slip으로 덮은 후 형광현미경하 (Olympus, Japan)에서 관찰하였다. Hoechst 33258 (Sigma USA)염색은 UV-A filter로 rodamine signal은 N2.1 filter를 이용하여 관찰하였으며, 사진은 Ektachrome film (200 ASA; Kodak, Rochester, NY)을 이용하였다.

5. 통계분석

통계학적 유의성 검증은 χ^2 -test을 이용하여 수행하였다.

III. 결 과

1. 염색체 분석 결과

염색체분석의 결과를 요약하면 Table 1에서 보는 바와 같다. 동결융해군의 경우 84.6%(110/130)의 생존율을 나타내었다. 동결 융해 후 생존된 난자의 염색체 이상 유무를 확인하기 위해 염색체 표

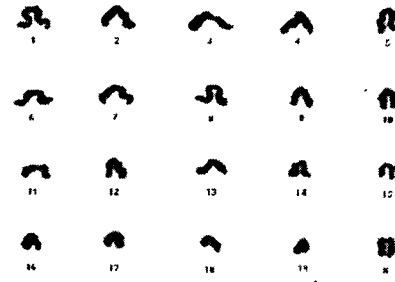


Fig. 1. Chromosomes analyzed by Cytovision. Normal haploidy mouse oocyte (n=20).

본을 작성한 결과 판독이 가능하였던 난자의 수는 대조군의 경우 46개 그리고 동결 융해군은 58개였다. 나머지 난자는 고정중 염색체가 손실되거나 염색체의 분산이 이루어지지 않았거나 너무 많이 분산되어 염색체의 분석을 시행할 수 없었다. 판독이 가능했던 난자의 염색체 이상빈도는 대조군의 경우 19.6%(9/46), 동결 융해군은 32.8%(19/58)로 관찰되어 동결융해 후의 난자에서 염색체의 이상의 빈도가 증가되었다. Fig. 1은 염색체 분석결과 정상적인 반수체 (Fig. 1)의 난자를 보여주고 있다.

2. 방추사 분석결과

방추사 분석의 결과를 요약하면 Table 2에서 보는 바와 같다. 동결보존군의 경우 83.5%(142/170)의 생존율을 보였다. 방추사의 이상 유무를 확인하기 위해 immunostaining을 한 결과 염색 과정 중 난자가 손실되어, 판독이 가능했던 난자는 대조군의 경우 104개, 그리고 동결 융해군의 경우 124개였다.

정상적인 성숙난자의 방추사의 모양은 미세소

Table 1. Chromosome abnormality of cumulus enclosed oocytes after vitrification and thawing at the mature stage

Status of oocytes	No. of oocytes (%)				
	used	survived	Analyzed	with normal chromosome	with abnormal chromosome
None	95	95(100)	46	37	9(19.6) ^a
Vitrified and thawed	130	110(84.6)	58	39	19(32.8) ^b

^{a,b} Different superscripts within the same parameter are significantly different, $p < .05$.

Table 2. Spindle abnormality cumulus-enclosed oocytes after vitrification and thawing at the mature stage

Status of oocytes	No. of oocytes (%)						
	used	survived	Analyzed	Nomal spindle	Disorganized spindle	Absent spindle	Total abnormalites
None	120	120(100)	104	83	21	0	21(20.2) ^a
Vitrified and thawed	170	142(83.5)	124	84	40	0	40(32.3) ^b

^{a,b} Different superscripts within the same parameter are significantly different, $p < .05$.

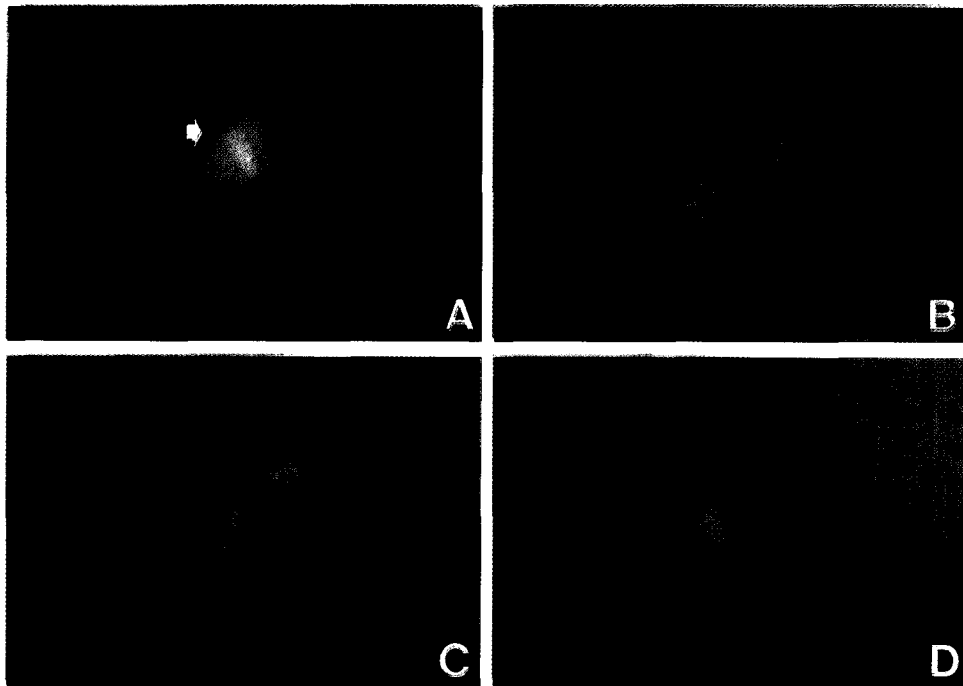


Fig. 2. Spindle configurations of mouse oocytes (A) Normal barrel-shaped spindle with chromosome. Arrow indicates chromosome (B) Normal barrel-shape spindle. (C and D) Abnormal appearance of a disorganized spindle.

관들이 염색체를 가로지르는 원통형의 모양을 나타낸다. (Fig. 2A, 2B) 비정상적인 방추사의 모양은 미세소관의 수가 감소하거나, 방추사의 모양이 붕괴되거나 결손되는 경우이다 (Fig. 2C, 2D). 방추사의 이상빈도는 대조군의 경우 20.2%(21/104), 동결 용해군의 경우 32.3%(40/124)로 관찰되어 동결 용해 후의 난자에서 방추사의 이상성이 증가됨을 관찰하였다.

IV. 고찰

본 연구에서는 마우스의 성숙난자를 유리화 동결법에 의해 동결 용해한 후 생존율과 방추사와 염색체의 이상성에 대해 보고하였다. 동결 용해 후의 생존율은 83.5%와 84.6%로 이전의 slow freezing 방법에서 보다 생존율이 증가됨을 관찰하였다. Nakagata 등 (1989)과 Shaw 등 (1991)도 마우스의

난자를 유리화 동결법에 의해 동결 용해시켰을 때 생존율이 증진됨을 보고하였다.

유리화 동결법은 빠르고 간편한 동결 방법으로 ice crystal의 형성을 방지할 수 있다는 장점이 있다. Martino 등 (1996)은 소의 성숙난자를 ethylene glycol과 electron microscope를 이용하여 유리화 동결법에 의해 동결 용해하여 발달시킨 결과, 높은 비율의 배반포 형성을 보고하였다. 이는 유리화 동결시 cooling rate이 이론적으로 $-180,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 straw를 이용할 경우의 $-2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 보다 급속으로 동결되어 난자의 ice crystal의 형성을 막을 수 있었기 때문으로 보고하였다.

그러나 항동해제의 독성과 삼투압의 변화에 의한 세포의 손상이 발생할 수 있으므로 항동해제의 선택과 농도, 노출시간 등이 중요하다.

본 연구 결과 대조군과 비교하여 동결 용해한 군에서 염색체이상성 (19.6% vs. 32.8%)과 방추사의 이상성 (20.2% vs. 32.3%)이 증가됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 높은 농도의 ethylene glycol을 함유한 항동해제의 사용이 난자가 dehydration이나 rehydration될 때 방추사의 이상을 초래한 것으로 사료된다. 또한 동결중의 난자의 저온에서의 노출이 2차 감수분열의 방추사의 이상을 초래하여 결국 염색체의 이상을 유도하는 것으로 추정된다. 동물 난자를 이용한 연구에서 저온노출 후에 방추사의 파괴와 비중합반응의 유도가 aneuploidy와 polyploidy를 유도하는 것으로 보고되었다 (Van der Elst 등, 1988; Sathanathan 등, 1988).

그러나 Aligner 등(1992)은 미세소관의 재중합 과정이 동결 용해 후 배양시간에 따라 회복됨을 보고하였다. 본 연구에서는 난자를 용해 후 분석 전까지 1시간 동안 배양하였으며, 이 기간 중 일부의 난자들에서만 동결 중 손상된 난자의 미세소관이 재중합반응이 일어나서 정상적인 방추사로 회복되었을 것으로 추정된다. 이처럼 유리화 동결 용해한 마우스의 난자에서 염색체와 방추사의 이상이 증가됨이 관찰되었고 이러한 영향이 이후의 수정 및 배발달을 감소시키는 원인으로 작용할 것으로 사료된다. Bos-Mikich 등(1995)과 Hotamisligil 등

(1996)도 유리화 동결법에 의해 동결 용해한 마우스의 난자에서 난자의 세포골격계와 발달율이 저하함을 보고하였다.

그러나 Dobrinsky 등 (2000)은 유리화 동결 중 항동해제에 세포골격계 inhibitor 인 cytochalasin-b를 첨가하여 생존율과 배발달율이 증진됨을 보고하였다.

이처럼 동결 용해중의 세포골격계의 손상을 막을 수 있는 다양한 종류의 안정성있는 세포골격계의 stabilizer와 inhibitor의 사용이 난자의 동결 용해 후 염색체와 방추사의 이상을 예방할 수 있을 것으로 추정되며, 이에 관한 연구가 현재 진행중이다.

그러나 동결용해후의 세포골격계의 결손이 그 이후의 배발달을 저하의 원인으로 설명하기에는 부족하므로 동결후의 난자의 세포질의 손상에 관한 다양한 연구가 필요하며 이를 방지할 수 있는 새로운 동결방법의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 적 요

난자의 동결보존 방법은 보다 효과적 난자은행을 개발하기 위한 필수불가결한 요소이다. 본 연구에서는 보다 효과적인 유리화 동결법을 개발하기 위해 유리화 동결 용해 후 염색체와 방추사의 손상이 일어나는지를 알아보고자 본 실험을 수행하였다. 난구세포에 둘러싸인 난자를 5.5 M ethylene glycol과 1.0 M sucrose 용액에 노출 후 electron microscope grid에 부착시킨 후 액체질소에서 냉동 보존하였다. 동결 용해 후 생존한 난자들은 방추사의 이상성을 보기 위해 immunostaining 방법을, 염색체의 이상성을 보기 위해 karyotyping을 시행하였다. 실험결과 염색체 이상빈도는 대조군의 경우 19.6%, 동결 용해군은 32.8%로 관찰되었고, 방추사의 이상빈도는 대조군의 경우 20.2%, 동결 용해군의 경우 32.3%로 대조군에 비해 염색체와 방추사의 이상성이 증가되었다. 결론적으로 마우스의 성숙난자를 유리화 동결시킨 후 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 관찰하였다.

VI. 인용문헌

1. Al-Hasani, S., Diedrich, K., van der Ven, H., Reinecke, A. and Krebs, D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Hum. Reprod.*, 2: 695-700.
2. Aligner, S., Van der Elst, J. and Siebzehnruhl, E. 1992. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 7: 857-864.
3. Bos-Mikich, A., Wood, M. J., Candy, C. J. and Whittingham, D. G. 1995. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 53:780-785.
4. Carroll, J., Depypere, H. and Matthews, C. D. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 90:547-553.
5. Capron, A. M. 1992. Parenthood and Frozen embryos. More than property and privacy. *Hastings. Centre. Rep.*, 22:32-33.
6. Dobrinsky, J. R., Pursel, V. G., Long, C. R. and Johnson, L. A. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.*, 62:564-570.
7. Hotamisligil, S., Toner, M. and Powers, R. D. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.*, 55:161-168.
8. Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, S. P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.
9. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fertil.*, 87:479-483.
10. Perry, C. and Schneoder, L. K. 1992. Cryopreserved embryos: who shall decide their fate? *J. Leg. Med.*, 13:463-500.
11. Pickering, S. J., Braude, P. R., Johnson, M. H., Cant, A. and Currie, J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil. Steril.*, 54:102-108.
12. Sathanathan, A. H., Ng, S. C., Trounson, A. O., Bongso, A., Ratnam, S. S. and Ho, J. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryo. *Gamate. Res.*, 21:385-401.
13. Schalkoff, M. E., Oskowitz, S. P. and Powers, R. D. 1989. Ultra-structural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservation. *Bio. Reprod.*, 40:370-393.
14. Shaw, P. W., Fuller, B. J., Bernard, A. and R. W. 1991. Vitrification of mouse oocytes: improved rates of survival, fertilization, and development to blastocyst. *Mol. Reprod., Dev.*, 29: 373-378.
15. Tarkowski, A. K. 1966. An air-drying method for chromosome preparations from mouse egg. *Cytogenetics*, 5:394-400.
16. Van der Elst J., Van sen Abbeel, E., Jacobs, R., Wisse, E. and Van Steirtghem, A. 1988. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 3:960-967.
17. Vajta G., Holm, P. and Kuwayama, M. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:53-58.

(접수일자: 2001. 6. 18. / 채택일자: 2001. 7. 20.)