大韓不妊學會誌: 第29卷 第3號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 3, 2002, 9

Cumulus Free 생쥐 성숙란의 초자화 동결-융해 후 Simple Media에서의 수정 및 배 발달

고려대학교 의과대학 산부인과학교실

정수경 · 김성건 · 이정재 · 오지현 · 이용호 · 김선행

In vitro Fertilization and Embryo Development in Simple Media of the Frozen-Thawed Cumulus-free Mouse Oocytes Cryopreserved by Vitrification

Soo Kyung Jung, Sung Kun Kim, Jung Jae Lee, Ji Hyun Oh, Yong Ho Lee, Sun Haeng Kim

Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine, Korea University

Objective: To observe the capability of fertilization and embryo development including blastocyst formation of the oocytes in simple media after thawing of the cryopreserved cumulus-free mouse oocytes by vitrification method.

Methods: Oocytes were collected from 5 to 6 weeks old ICR female mice, and were denuded from the cumulus cells by 0.1% hyaluronidase. Recovered mature oocytes in study group were cryopreserved by vitrification method using EM grid for 5~7 days. In brief, oocytes were exposed in dPBS containing 1.5 M EG and 5.5 M EG+1 M sucrose for 2.5 minutes and 20 seconds each, and then executed vitrification by plunging in LN2 after loading on EM grid. Thawing treated by exposure of 1, 0.5, 0.25 and 0.125 M sucrose solution for 2.5 minutes each in order and used for experiments. Spermatozoa aspirated form the epididymis of 12 weeks old ICR male mice were used for insemination after capacitation. T6 media containing 0.4% BSA were used for fertilization and development.

Results: Survival and fertilization rates after thawing were 76.9% and 79.6% respectively. Fertilization rate was lower ($p<0.005$) than that of control group (92.9%). There was no difference in embryo developmental rates from 2-cell to morula, however, the blastocyst formation rate and mean cell numbers of blastocysts in study group (63.3%, 58.9±9.2) were lower compared with those of control group (76.1%, 63.5±8.9).

Conclusion: Vitrification is an effective method for mouse mature oocyte cryopreservation with high survival and fertilization rate after thawing. And in simple media, fertilization rates and embryo development of frozen-thawed mouse oocytes are satisfactory.

Key Words: Frozen-Thawed by vitrification, Fertilization, Embryo development

1978년 자연주기에서 얻은 난자를 이용한 체외수정으로 첫 임신 보고가 있은 후 보조생식술 (assisted reproductive technology)은 임상적 경험의 축적과 배아의 냉동보존, 체세포와의 공배양법의 도입 및 미세조작기술 등 첨단기술의 발달로 인한 임상결과의 향상은 보조생식술의 안정성 및 적응증 영역

주관책임자: 김선행, 우) 136-705 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 의과대학 산부인과학교실
e-mail: derosi@hanmail.net

을 확장시키는 결과를 가져왔다. 그 중 하나로, 잉여의 배아를 냉동보존하여 1회의 난자 채취로 여러 번의 배아 이식을 시행함으로써 임신의 가능성을 높이려는 연구가 수년간 활발히 진행되고 있다.[1~8]

지금까지 배아의 냉동보존에는 자동 세포 동결기 (programmed freezer)를 이용한 완만 동결법 (slow freezing)이 주로 이용되어 왔으나, 이는 세포에 대한 손상이 커 생존율이 나쁘고 고가의 장비가 필요하다는 단점을 가지고 있었다.[1] 그러나 최근 초 급속 동결법 (ultra-rapid freezing)의 한 방법인 초자화 동결 (vitrification)은 기존의 완만 동결법과 비교하여 배아의 생존율이나 발달율에 있어서 매우 효과적인 방법으로 보고되고 있다.[5]

동결 방법에 있어 동결액의 선택도 중요하다. Wittingham 등[6]이 생쥐 배아를 발달 단계별로 동결-융해하여 최초의 산자 생산을 보고한 이래, 초자화 동결은 Rall과 Fahy 등[7]이 8세포기 생쥐 배아를 사용, VS1을 동결액으로 하는 실험에서 동결 융해 후 높은 생존율을 보고한 바 있다. 이처럼 동결 방법에 있어 중요한 요인인 동결액에 관해서도 많은 연구가 이루어지면서 1990년 Kassai 등[8]은 생쥐 상실배를 이용한 실험에서 처음으로 EFS (ethylene glycol, ficoll, sucrose) 용액을 사용하여 산자 출산 성공을 보고하였다. 초자화 동결 용액의 주된 성분으로 사용되는 ethylene glycol은 탈수효과가 크고 세포에 대한 독성이 적어 배아의 동결시 세포 내 얼음 결정 (intracellular ice crystal)의 형성을 줄여 줌으로서 동결로 인해 발생하는 세포의 손상을 최소화 할 수 있는 장점이 있다.[9]

최근에는 초자화 동결법으로 배아 이식 (embryo transfer) 후 남은 잉여 배아의 보관[10] 뿐 아니라, 조기 폐경 혹은 난소 적출술 시행으로 얻게 되는 난자의 보존 및 활용 방안에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. Porcu 등[11]과 Fried 등[12]은 체외수정 시술을 받는 환자의 난자를 완만 동결법으로 동결 융해 후, 미세 조작술을 이용하여 수정된 배아들을 이식하여 임신에 성공한 두 실험에서 수정율은 모두 20% 미만으로 매우 낮은 것으로 보고되었다. 또한 Otoi 등[13]은 소 난자를 이용하여 초자화 동결 융해 후 91.8%의 생존율을, 7.9%의 포배 형성율을 보고하였으나, 이 경우도 생존율은 매우 높으나 포배까지의 발달율은 매우 낮은 것이다.

한편, 동결 보존시 배아나 난자를 적재하는 도구에 있어서도 다양화가 이루어져 새로운 것들이 사용되었는데, Martino 등[14]은 소 난자를 이용한 실험에서 EM (electron microscope) grid를 사용하였고, Vajta 등[15]은 OPS (open pulled straw)를 사용하였으며, Lane 등[3]은 nylon loop를 사용하여 향상된 실험결과를 발표하였다.

고려대학교 의과대학 불임클리닉에서는 이러한 결과들을 바탕으로 하여 불임환자의 치료 범위를 더 확대시킬 수 있는 노력의 일환으로 안정적 난자 보존 방법의 확립과 임상 적용을 위한 전 단계로서, 우선 동물 모델에서 EM grid를 이용한 초자화 동결-융해를 시행하고, 단순 배양액의 효용성을 가늠해 보기 위하여 융해 후 수정율 및 발달율을 관찰하였다.

연구 대상 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로, 암컷은 5~6주령, 수컷은 12주 이상된 생식력이 인정된 생쥐를 사용하였다. 일조시간은 오전 6시에서 오후 8시로 14시간 주었으며, 사료와 식수는 무제한 공급하였다.

2. 배양액

본 연구의 기본 배양액은 T6 용액을 사용하였으며, 단백질 공급원으로는 3~4 mg/ml 농도의 BSA를 첨가하였다. 배양액의 pH는 7.4~7.6으로, 삼투압은 290~300 mOsm로 조정하였고, 사용직전 0.22 μm의 filter에 여과하여 실험에 이용하였다. 성숙란의 난구세포 제거는 기초 배양액에 1 mg/ml의 hyaluronidase를 첨가하여 시행하였으며, 수정란의 배양은 100 μM EDTA가 첨가된 배양액을 이용하였다.

3. 과배란 유도 및 성숙란의 회수

과배란 유도를 위해 암컷 생쥐의 복강 내에 5 IU의 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 주사하였고, hCG 주사 후 14~15시간에 도살하여 난관을 적출하였다. 이를 paraffin oil이 덮여 있는 배양 접시 내의 배양액 drop으로 옮겨 40~60배의 실체 현미경하에

서 1 cc 주사바늘을 이용, 난관 팽대부로부터 난구세포에 둘러싸인 성숙란을 회수하였다. 회수된 난자는 0.1% hyaluronidase 용액에서 난구세포를 제거한 후 3회 반복 세척하여 polar body의 유무와 상관없이 모두 실험에 공시하였다.

4. 초자화 동결 및 융해 방법

1) 초자화 동결

성숙란 동결은 1.5 M ethylene glycol (EG, Sigma)이 첨가된 Dulbecco's buffered saline (dPBS, Gibuco)에서 2.5분간 처리한 후 5.5 M EG과 1 M sucrose가 첨가된 dPBS에서 20초간 처리 후 바로 electron microscope grid (EM grid, Gilder Co., West Chester, PA)로 loading하여 액체 질소에 침지하였다. 이렇게 동결된 성숙란은 -196℃에서 7일 정도 보관 후 실험에 공시하였다.

2) 융 해

융해를 위해 1, 0.5, 0.25, 0.125 M sucrose가 첨가된 dPBS 용액에 액체 질소에서 꺼낸 EM grid를 1 M sucrose 용액이 있는 organ dish에 넣어 2.5~3분 안에 동결되었던 수정란을 회수하였고, 회수된 수정란은 이어서 0.5, 0.25, 0.125 M 순으로 각각 2.5분씩 처리하였다. 처리된 난자는 기본 배양액에서 3회 반복 세척하여 체외수정을 유도하였다. 이때, 동결과 융해 과정은 모두 실온에서 시행하였다.

5. 정자 처리

정자의 회수를 위해 12주 이상의 생식력이 있는 수컷 생쥐를 경추탈골로 도살하여 정소상체 (epididymis) 미부를 외과적 방법으로 적출하였고, paraffin oil이 덮여 있는 배양 접시에서 1 cc 주사기를 이용해 정자괴를 만든 후 접시 내의 배양액 drop으로 유도하여 정자 부유 상태를 확인하였으며 1.5~2시간 전배양을 실시하였다.

6. 체외수정

성숙란을 체외수정용 배양액 drop에 옮긴 다음, 전처리로 수정능력을 획득한 정소상체미부의 정자 부유액을 1×10^6/ml의 농도로 첨가하여 수정을 유도하였다. 5~6시간 후 정상적인 수정 (2PN)이 이루어진 것만을 선별하여 계속적인 배 발달을 관찰하였다.

7. 배반포의 염색 및 핵수의 측정

체외수정 후 96시간에 형성된 배반포를 0.4% polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma)가 포함된 dPBS에 세척한 후, 0.4% PVP와 1% glutaraldehyde가 포함된 bisbenzimide solution (Hoehst 33258, 100 μM, Sigma)에 염색하였다. 염색한 배반포를 다시 dPBS에 3회 이상 반복 세척하여 형광 현미경 (Olympus, Japan) 하에서 UV filter를 사용하여 (×400) 배반포의 핵수를 측정하였다.

8. 통계 처리

결과에 대한 유의성은 Student's t-test를 사용하였다.

결 과

1. 초자화 동결 - 융해 후 수정율

생쥐 성숙란을 이용한 초자화 동결-융해가 난자의 체외수정율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위한, 실험군의 공시 난자는 147개이었다. 그 중 초자화 동결 융해 후 125개가 회수되어 85.0%의 회수율을 나타내었으며, 이 중 113개가 생존하여 76.9%의 생존율을 나타냈다 (Table 1). 초자화 동결 융해 후 성숙란의 형태는 제1극체가 대부분 용해되어 있었으나 (Figure 1), 수정율과는 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 배양 후 체외수정을 실시하여 2PN이 형성된 것을 정상적인 수정으로 간주하였다 (Figure 2).

Table 1. Comparison of fertilization rates between control and cryopreservation group

	No. of examined oocytes	No. of recovered oocytes (%)	No. of survived oocytes (%)	No. of fertilized oocyte (%)
Control	198	-	-	184 (92.9)
Frozen	147	125 (85.0)	113 (76.9)	90 (79.6)*

*: $p<0.005$

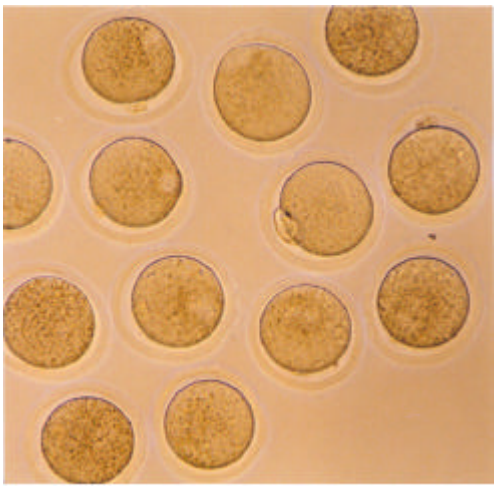

Figure 1. Photograph of oocytes after thawing of cryopreservation group (×100).

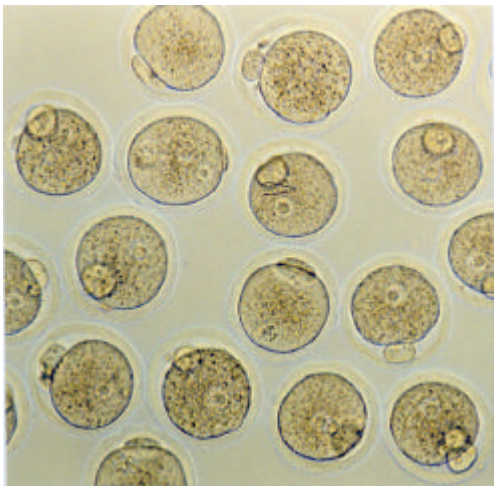

Figure 2. Photograph of fertilized oocytes after in-vitro fertilization of cryopreservation group (×100).

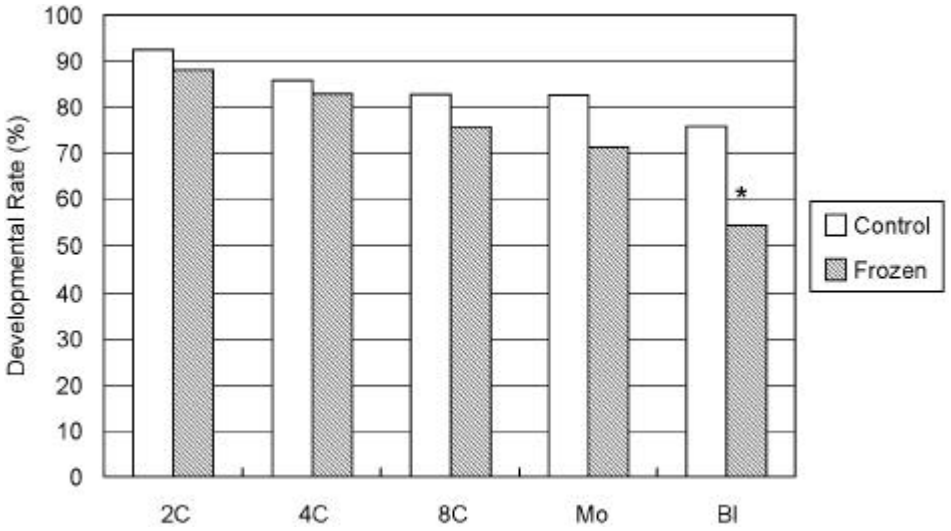

Figure 3. Comparison of embryo developmental rates between control and cryopreservation group. *: $p<0.05$

대조군의 난자 수는 198개로, 동결-융해 과정 없이 직접 수정시켜서, 그 결과를 실험군과 비교하였으며, 대조군과 실험군의 수정율은 각각 92.9%와 79.6%로 두 군 사이에서 유의차가 인정되었다 ($p<0.005$) (Table 1).

2. 수정란의 배 발달

체외수정이 확인된 수정란은 100 μM EDTA가 첨가된 T6 배양액 drop에서 배 발달을 유도하였다. 대조군의 경우 수정된 184개의 난자 중에서 2 cell, 4 cell, 8 cell 및 morula가 각각 92.4, 85.9, 82.6 및 82.6%로 높은 발달율을 보였고, 실험군은 91.1, 84.4, 78.9 및 76.7%의 발달율을 나타내어 각각의 발달 단계에서는 두 군 사이의 유의차는 보이지 않았다 (Figure 3). 배반포의 형태적 분포에도 두 군 사이의 차이는 없었으나 (Figure 4a, b), 배반포 형성율은 대

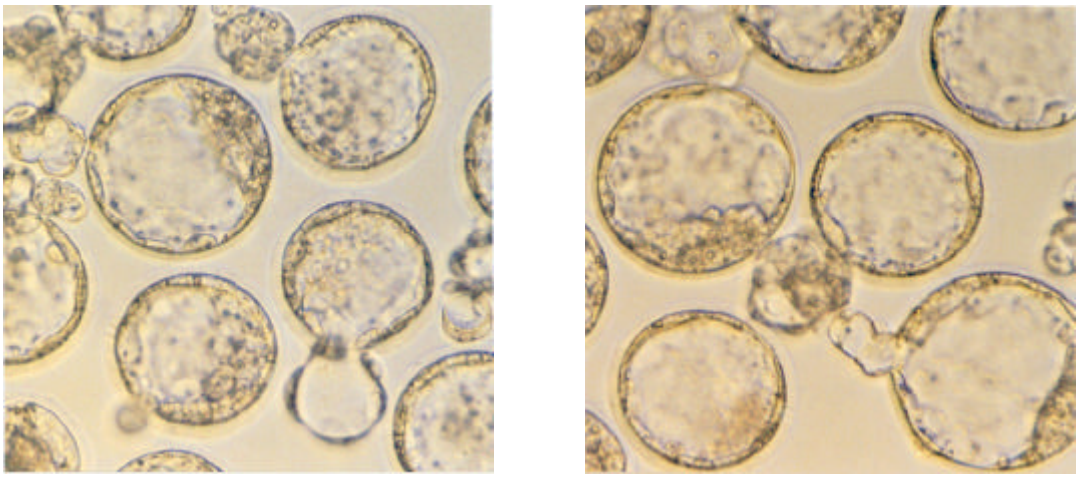

Figure 4. Photograph of blastocysts control and cryopreservation group after 96 hr cultured (×200).

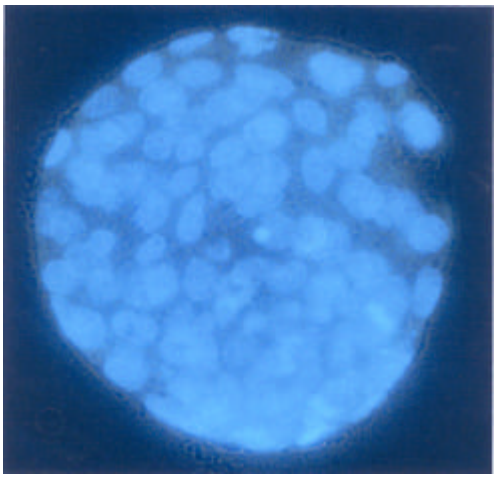

Figure 5. Floresence micrograph of blastocysts stained with Hoechst 33258 (×400).

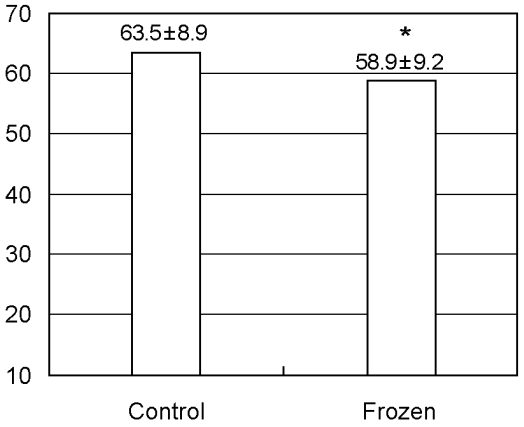

Figure 6. Mean cell numbers in blastocysts cultured 96 hr after in-vitro fertilization. *: $p<0.05$

조군에서 76.1%로 실험군의 63.3%와 비교하여 유의한 차이가 인정되었다 ($p<0.05$) (Figure 3).

3. 배반포의 핵수

두 군의 배반포 핵수를 측정하기 위해 수정 후 96시간에 Hoechst 33258로 형광 염색하여 형광 현미경하에서 관찰하였다 (Figure 5). 대조군의 배반포의 평균 핵수는 63.3개로 실험군의 58.9개와 유의한 차이가 인정되었다 ($p<0.05$) (Figure 6).

고 찰

초자화 동결-융해 방법은 고농도의 동결보존제에 세포 또는 조직을 단시간 노출시켜 실행하는 초고속 동결 방법 (ultrarapid testing)으로, 세포나 조직의 탈수를 빠르게 진행시켜 세포 내 얼음 결정의 형성을 최소화하는 이점을 가지고 있어, 자동 세포 동결기를 이용한 완만 동결법보다 더 높은 생존율을 나타내는 것으로 보고되었다.[8,16,17]

본 연구에서 수정율을 볼 때 두 군간에 유의한 차가 있었고, 그 이유는 기존에 보고되었던 난자의 동결-융해 과정에서 야기되는 투명대 경화현상,[1,18] 혹은 동결-융해 후 실험군의 형태학적인 모습에서 나타나는 극체의 용해와 같은 형태적 불안정성에 비롯된 것으로 추정할 수 있다. 기존의 실험 결과들에서 동결-융해 후 전반적인 수정율은 35~70% 정도로 보고되었으며,[19,20] Lane 등[1]은 F1 mouse oocyte를 실험에 공시하고 nylon loop를 사용하여 보고한 논문에서 대조군 (73.4%)과 비교될 만한 69.7%의 높은 수정율을 보고한 바 있다. 이 실험에서는 실험군의 수정을 유도하기 위해 laser를 이용해 zona drilling (5 μm)을 시행하였다. 그러나, 수정을 위한 보조적 처치 없이 실시한 본 실험의 수정율 (79.6%)은 이제까지 보고된 결과들과 비교하여 매우 높은 것으로써, 이와 같은 결과는 동결 후 발생할 수 있는 것으로 보고된 투명대 경화현상은 수정율에 중요한 인자가 아닐 수 있음을 제시한다.

수정 이후 배 발달 과정을 보면, 상실배까지의 발달에서는 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이가 없었으나, 세포의 수가 많아지고 분화의 정도가 다양해지는 배반포 형성과 핵수에 있어서는 유의한 차이가 인정되는 바, 이는 동결-융해로 인한 cytoskelectal system의 손상이나 세포 내 소기관의 재배열 등에 따른 것으로 추정할 수 있을 것으로 본다.[20~22] 정상 임신과 연관된 융모상피암환자의 대부분은 진단이 늦고 따라서 원격전이 때문에 예후가 불량한 것으로 되어 있다. 융모상피암을 in situ 상태에서 발견하면 좋은 예후를 기대할 수 있다.[21,22] Chen 등[23]은 ICR mouse의 난자를 이용한 실험에서 동결-융해 후 배반포까지의 발달율이 58%이었고, Park 등[20]의 실험에서는 cumulus enclosed 난자를 이용하여 22.2%, 그리고 cumulus free 난자를 이용하여 7.1%를 보고하였으며, 본 실험에서는 63.3%의 높은 발달율을 나타내었다. 기존에 보고된 실험과 본 실험의 차이는 기존의 보고들이 낮은 수정율을 극복하기 위해 cumulus enclosed 난자[24]를 사용하여 동결-융해를 하거나, 투명대 경화현상의 극복 및 cytoskelectal system의 안정을 위한 전 처치를 시행하였으며, 또는 낮은 발달율을 극복하기 위하여 복합 배양액 (complex media)에서 배양하였으나, 본 실험에서는 cumulus free 난자를 실험에 공시하였고 여타의 전처치 과정이나 물질 처리를 하지 않았으며, 동결-융해 후 단순 배양액을 사용하였다는 것이다. 기존의 연구 결과들에 비교하여 높은 본 연구의 수정율과 발달율은 Park 등[20]이 제시한 난자 동결시의 난구세포의 역할이 중요하지 않음을 의미하며, 그 외에도 또 다른 중요 인자가 작용하였을 것으로 추정되나, 단순 배양액에서의 배양이 효과적이었던 것으로 생각할 수 있다.

따라서, 동결시 야기되는 난자의 손상에 대한 보다 정확한 규명과 이를 극복할 수 있는 방법이 필요하므로 복합 배양액과의 비교 실험, 동결-융해 과정에서 야기되는 것으로 알려져 있는 투명대 경화현상 및 염색체이상 (chromosome abnormality)에 대한 세부적이고 심층적인 재검토가 계속적으로 진행된다면, 성숙란의 동결시 최적의 조건을 찾을 수 있고, 나아가 인간모델에서 보다 안정적이고 유용하게 사용할 수 있는 동결법이 확립될 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. Mol Reprod Develop 2001; 58: 342-7.
2. Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. Fertil Steril 1999; 72: 142-6.
3. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. Fertil Steril 1999; 62: 1073-8.
4. Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos. Mol Biotechnol 1997; 7: 173-9.
5. Youm H, Kim SK, Song SJ, Park YS, Koong MK, Kang IS. Vitrification of mouse blsatocyst using cryoloop. Kor J Fertil Steril 2001; 28: 121-9.
6. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -269℃. Science 1972; 178: 411-4.

7. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 1985; 313: 573-5.
8. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89: 91-7.
9. Chen SU, Lien YR, Chao KH, Lu HF, Ho HN, Yang YS. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. Fertil Steril 2000; 74: 804-8.
10. Yeoman RR, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning AA, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. Human Reprod 2001; 16: 1965-9.
11. Porcu E, Ciotti PM, Fabbri R, Magrini O, Seracchioli R, Flamigni C. Birth of a healty female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. Fertil Steril 1997; 68: 724-6.
12. Fried EP, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A, Gonzalez MG. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. Fertil Steril 1998; 69: 555-7.
13. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. Cryobiology 1998; 37: 77-85.
14. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol Reprod 1996: 1059-69.
15. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) virification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Develop 1998; 51: 53-8.
16. Rall WF, Wood MJ. High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. J Reprod Fertil 1994; 101: 681-8.
17. Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*Bublous bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. Ani Reprod Sci 2000; 63: 159-65.
18. Fuku E, Xia L, Downey BR. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiolgy 1995; 32: 139-56.
19. Shaw PW, Fuller BJ, Bernare A, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes: Improved rates of survival, fertilization, and development to blastocysts. Mol Reprod Develop 1991; 29: 373-8.
20. Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol™, a cytoskelecton stabilizer. Fertil Steril 2001; 75: 1177-84.
21. Park SE, Lee KA, Son WY, Ko JJ, Lee SH, Cha KY. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. Fertil Steril 1997; 68: 920-6.
22. Isachenko EF, Nayudu PL. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. Hum Reprod 1999; 14: 400-891.
23. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, No HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grid. Human Reprod 2001: 2350-56.
24. Elst JV, Amerijckx Y, Van Steirteghem A. Ultrarapid freezing of mouse oocytes lowers the cell number in the inner cell mass of 5 day old in-vitro cultured blastocysts. Human Reprod 1998; 13: 1595-9.