

동결 생쥐 난자에서의 calcium 전류

강다원, 김은심, 최창용¹, 박재용, 한재희, 홍성근*

¹경상대학교 의과대학, 축산기술연구소 남원지소
(게재승인 : 2002년 2월 7일)

Calcium current on cryopreservation in mouse oocytes

Da-Won Kang, Eun-Sim Kim, Chang-Yong Choe¹,

Jae-Yong Park, Jae-Hee Han, Seong-Geun Hong*

College of Medicine, Gyeongsang National University
Namwon Branch Institute, National Livestock Research Institute, RDA¹
(Accepted : February 7, 2002)

Abstract : Cryopreservation is commonly used for an efficient utilization of semen, oocytes and embryos but has disadvantage in the survival, development of the post-thawed eggs. The high risk in the survival, development of eggs after thawing is thought to be caused by inappropriate internal regulation of Ca^{2+} and/or formation of intracellular ice crystals. In this experiment, we tested whether the Ca^{2+} current (iCa), a decisive factor to Ca^{2+} entry, was altered in post-thawed oocytes by using whole cell voltage clamp technique.

The quality and survival rates of the oocytes derived from both fresh and frozen groups were examined by morphology and FDA-test. Vitrified oocytes (VOs) were incubated for 4 hr after thawing and then donated to this experiment. Ethyleneglycol-ficoll-galactose (EFG) was used as a cryoprotectant for vitrification. The membrane potential was held at -80 mV and step depolarizations of 250 ms were applied from -50 mV to 50 mV in 10 mV increments.

The survival rates showed a higher in VOs vitrified with EFG containing Ca^{2+} than in VOs vitrified with EFG under the Ca^{2+} -free condition (82.0% vs 14%). In group with/without Ca^{2+} , the survival rates were significantly ($P<0.01$) difference. In the fresh metaphase II oocytes (FOs), current-voltage (I-V) relationship showed that iCa began to activate at -40 mV and reached its maximum at -10 mV. With same voltage pulses, inward currents were elicited in VOs. I-V relationships observed in VOs were similar to those in FOs. Time constants of activation and inactivation of the inward current shown in VOs were not different to those in FOs. This accordance in I-V relations and time constants in FOs with those in VOs indicates that the inward currents in FOs are unaltered by vitrification and thawing. Therefore, vitrification with EFG does not play as a factor to deteriorate Ca^{2+} entry across the membrane of the oocytes.

Key words : mouse oocytes, EFG, whole-cell current, vitrification.

서 론

수정란의 장기간 보관 및 취급이 용이한 동결보존은 1972년 Whittingham *et al*¹이 동결·보존된 생쥐 수정란을 이식하여 첫 산자를 생산한 이래 활발히 수행되어왔으며, 배란난자의 동결은 Whittingham²이 처음으로 성공

하였다.

중전의 동결방법은 완만동결을 이용하여 실시한 것으로써, 세포를 동결시키기 위해서는 많은 시간과 비싼 세포동결기가 필요할 뿐 아니라 세포내 빙정형성과 같은 문제점을 가지고 있었다. 그러나 유리화동결방법은 완만동결보다 간편하고 빠른 시간에 난자를 동결시킬

* Corresponding author : Dr. Seong-Geun Hong, Department of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-751, Gyeongnam, Republic of Korea.

수 있는 장점을 가지고 있다. Rall과 Fahy³에 의해 확립된 유리화동결은 고농도의 동결보호제를 이용하여 단시간에 세포를 동결시키는 방법이다. 생쥐난자의 유리화동결은 Nakagata⁴에 의해 성공된 이래 기술적 발전이 이루어졌으나 아직도 성숙난자의 동결은 수정란에 비해 생존율이 매우 낮고 이후의 수정과 배아 발생이 극히 저조한 것으로 알려져 있다^{5,6}. 난자는 수정란과는 달리 냉각속도에 따라 투명대 경화 (zona pellucida hardening), 이배체 난자 (digyny), 방추사 분열 (spindle disruption) 등^{7,8,9}과 같은 변화를 유발할 수 있기 때문에 저조한 생존율을 나타내었다. Pickering *et al*¹⁰도 동결·융해 난자의 저조한 생존율과 발생의 원인이 염색체에 부착되어 있는 방추사가 온도의 변화에 매우 민감하여 동결·융해 과정 중 분리되지 않아 나타나는 현상으로 설명하였다. 이와같은 문제점은 동결·융해시 일어나는 난자 표면의 물리·화학적 손상에 기인하는 것으로 추정된다. 물리·화학적 세포막 손상은 곧 세포막을 통한 물질교환 및 이온의 이동장애를 초래하여 세포기능을 저하시키는 것으로 생각된다. 대부분의 물질교환이나 이동은 세포막 운반체나 이온통로를 경유하므로 동결·융해시 관찰되는 이러한 난자의 생존 및 발생률의 저하가 물질이동을 담당하는 세포표면 구조의 손상에 기인할 가능성은 배제할 수 없다.

본 연구에서는 세포내 빙정형성과 세포내 부적절한 Ca^{2+} 조절을 동결난자의 생존을 저하 원인으로 생각하였다. 세포내 빙정형성에 대해서는 고농도의 동결보호제를 사용하는 유리화동결 방법으로 난자를 동결함으로써 배제하고자 하였다. 세포내 Ca^{2+} 조절에 대해서는 세포바깥의 Ca^{2+} 이 세포내로 이동할 수 있는 Ca^{2+} 통로를 조사하였다.

포유동물인 햄스터 난자 및 생쥐난자에서 potassium (K^+), chloride (Cl) 그리고 calcium (Ca^{2+}) 이온통로 등을 이미 확인하였다¹¹⁻¹⁴. 수정란의 배발달과정에 있어서는 여러이온 중 Ca^{2+} 이 수정장애나 2세포기 정지현상, 배발달과 밀접한 관련이 있다는 실험관찰^{15,16}에 비추어 볼 때 Ca^{2+} 통로가 난자의 성숙 및 발생에 중요한 역할을 수행할 것으로 보이며, 동결·융해에 의하여 Ca^{2+} 통로 단백질이 손상된다면 이는 수정장애나 발생률의 저하로 이어질 수 있을 것이다. 그러나 현재까지 생쥐의 신선난자와 동결·융해 후 난자에서 Ca^{2+} 통로의 존재나 그 성상을 직접 기록하여 비교한 결과가 없어 아직 확인되지 않고 있다.

본 실험에서는 생쥐난자를 대상으로 whole cell voltage clamp방법¹⁷을 이용하여 동결·융해 후 난자의 Ca^{2+} 전류를 대조군과 비교함으로써 동결이 Ca^{2+} 통로를 통한

Ca^{2+} 전류의 변화에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사양관리 : 본 실험에 사용된 실험동물은 유한양행으로부터 분양 받은 4주령의 암컷 생쥐 (ICR)를 경상대학교 의과대학 실험동물 사육장에서 점 등 시간 14시간, 온도 20~24°C, 습도 60~65% 및 환풍 조절 하에서 2주 정도 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 실험 전에 각 cage에 분리하여 사육하였으며 사료와 물은 자유로이 급식하였다. 명암주기조절은 오전 7:00에서 오후 9:00까지 14 시간은 명주기로, 오후 9:00부터 다음날 오전 7:00까지 10 시간은 암주기로 조절하였다.

과배란유도 및 난자의 채란 : 과배란을 유도하기 위하여 암컷 생쥐 (6주령)에 5 IU의 PMSG (Serarumon[®], Japan)를 복강내 주사한 후 48시간째에 5 IU의 hCG (Yuhan Co., Korea)를 역시 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. 난자는 hCG 주사 후 14 시간째에 채란하였다. 회수된 난자는 0.01% hyaluronidase (Type I-S, Sigma, USA) 용액에 30초간 노출시킨 후 실온에서 반복 pipetting 하여 난구세포를 제거한 후, 제 1 극체가 명확하고 세포질이 균일하고 충실한 것만을 선택하여 사용하였다. Ca^{2+} 전류를 기록하기 위해서는 난자의 투명대 (zona pellucida)를 0.5% protease (Type XXIV, Sigma, USA)에 30초 동안 노출시킨 후 pipette으로 부드럽게 세척하여 투명대를 제거하였으며, protease에 의한 추가적인 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 HEPES-buffered cultured medium (M2)으로 3번 이상 세척하여 실험에 이용하였다. 투명대가 제거되지 않은 난자의 일부는 동결보존 실험에 이용하였으며, 동결된 난자의 Ca^{2+} 전류 기록은 대조군과 동일한 방법으로 처리하였다.

동결 보존액 및 회색액의 제조 : EFS 유리화용액은 10% FBS를 포함한 PBS에 40% (v/v) ethyleneglycol, 18% (w/v) ficoll 70 (MW 70,000; Sigma, U.S.A.) 및 0.3 M sucrose가 최종 농도로 되도록 혼합 제조하였다. EFG 용액은 40% ethyleneglycol, 18% ficoll, 0.3 M galactose가 최종 농도로, EFT 용액은 40% ethyleneglycol, 18% ficoll 및 0.3 M trehalose가 최종 농도가 되도록 혼합 제조하였다. 완만동결용액은 EPG를 사용하였으며 10% FBS를 포함한 PBS에 1.8 M ethyleneglycol, 5.0%(w/v) PVP 및 0.05 M galactose를 혼합하여 제조하였다.

동결·용해 후 동결보호제의 제거를 위하여 사용한 희석액은 기본액 (PBS + 10% FBS)에 0.5 M sucrose, 0.5 M trehalose 및 0.5 M galactose를 첨가하여 제조하였다. 이들 보존액과 희석액은 모두 0.2 μm filter로 여과한 후 사용하였다.

난자의 동결·용해 : 유리화동결방법은 실온(20°C)에서 동결보호제(EFS, EFG, EFT, EPG-용액)에 1분간 평형을 실시한 후 0.25 ml plastic straw 내에 10개의 수정란을 주입하여 즉시 -196°C의 액체질소에 침지하였다. 침지 후 용해시까지 -196°C 액체 질소통에서 보관하였다.

완만동결의 경우는 10개의 난자를 실온에서 EPG 용액에 30분간 평형시킨 후 0.25 ml straw에 동결보존액 50 μl 와 함께 주입한 후 전기접착기를 이용하여 straw의 양단을 봉합하였다. 동결방법은 세포동결기 (CL 863, Biogenics Co., U.S.A)를 이용하여 동결시켰다. 즉 -2°C/min 속도로 -7°C까지 냉각한 후, 미리 액체질소에 담겨 두었던 forcep을 straw내 동결액의 표면에 접촉하여 식빙을 시행한 후, -7°C에서 10분간 정지시켰다. 그 후 -7°C에서부터 -35°C까지는 -0.3°C/min 속도로, -35°C에서 -85°C까지는 -1°C/min 속도로 냉각한 후 -196°C 액체질소통에 침지 보관하였다.

동결보존 1~10일 후 액체질소에서 꺼낸 straw는 공기 중에 10초 동안 노출시킨 후 30~37°C의 온수에서 끝을 잡고 흔들면서 급속용해를 실시하였다. 용해한 straw는 sealing powder와 cotton plug의 양쪽부분을 절단한 후 ethyleneglycol의 독성을 방지하기 위하여 희석용액 0.5 M sucrose, 0.5 M galactose 및 0.5 M trehalose로 옮겼다. 희석은 0.5 M sucrose, galactose 및 0.5 M trehalose 용액에 각각 5분간 정지한 후 20% FBS가 첨가된 PBS 용액으로 3~4회 세척한 다음 5분간 정지시켜 동결보호제를 완전히 제거 후에 M2 배양액으로 3~4회 세척한 다음 M16 배양액에서 난자를 배양하였다. 배양과정에서 증발로 인한 삼투압의 변화를 막아주기 위하여 oil (Junsei Chemical, Japan)로 drop을 피복하는 것이 적합하나 이온통로 관찰시 giga seal 형성을 용이하게 하기 위해 4 well dish에서 배양하였다. 용해 후 배아의 형태학적관정은 모양이 둥글고 세포질이 맑고 온전한 투명대를 가진 배아를 정상적인 것으로 판정하였다.

동결 난자의 생존성 : Fluorescence diacetate (FDA)액은 fluorescence diacetate (Sigma, U.S.A) 5 mg/ml acetone을 stock solution으로 제조하여 -20°C에 보관하였다. 사용전에 0.5 μl stock/ml PBS (final concentration: 2.5 μg /ml)를 만들어 사용하였다. 난자는 실온에서 1분동안

FDA에 노출시킨 후 FDA-free PBS에서 1분간 처리 후 형광현미경에서 생존여부를 판정하였다. 동결·용해된 난자를 M16 배양액에서 4시간 정도 배양한 후 대조군과 동일한 방법으로 처리한 후 FDA-test 결과 전체가 녹색형광을 강하게 발산하는 것을 생존한 것으로 하였다.

Ca²⁺ 전류의 기록 : 투명대를 제거한 신선난자(대조군) 및 동결난자를 도립현미경 위에 설치된 용기로 옮긴 후 미세조정기 (WR-88, Narishige, Japan)를 이용하여 tip 저항이 2~3 M Ω 인 유리전극을 난자의 세포막에 접근시키고 10~20 cmH₂O 정도의 음압을 가하여 giga seal (seal resistance > 1G Ω)을 형성시킨 후 순간적으로 음압을 높여 세포막을 파열시켜 whole cell patch를 형성하였다. 실험용액은 1 ml/min의 속도로 관류시키며, 실온에서 실험을 진행하였다. Patch clamp 증폭기 (CEZ-2100, Nihon Kohden, Japan)와 pClamp (V6.01, Axon, USA) 및 A/D & D/A converter (TL-1-125, Axon, USA)를 사용하여 막전압 고정과 test pulse를 적용하였다. 막전압은 -80 mV로 유지하고 -50 mV부터 10 mV 간격으로 50 mV까지 250 ms의 저분극 자극을 15초 마다 한번씩 가하여 전류를 기록하였다. Patch clamp 증폭기를 통해서 나온 전류와 전압신호는 digital oscilloscope (CS-8010, Kenwood)와 pen recorder로 관찰하고, 결과의 기록은 personal computer hard disc에 저장하였으며, 컴퓨터 모니터와 Sigma plot 4.0 프로그램을 이용하여 결과를 재생·분석하였다. Ca²⁺ 전류를 기록하기 위해 사용된 HEPES buffered Tyrode 용액 (125 mM NaCl, 6 mM KCl, 0.3 mM Na-pyruvate, 10 mM Lactate, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM CaCl₂)은 NaOH를 이용하여 20°C에서 pH 7.4로 적정하였다. 세포내 (또는 pipette) 용액은 외향전류를 억제하기 위하여 Cs⁺을 주성분으로 하여 130 mM CsCl, 15 mM TEA-Cl, 1 mM Mg-ATP, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM di-Tris creatine phosphate로 조성하였고, pH는 1 N CsOH를 이용하여 7.2로 적정하였다. 본 실험에 이용한 whole cell recording 기법상 세포막의 안정과 giga seal 형성을 촉진하기 위하여 Ca²⁺ 농도는 생리적 수준보다 높여 5 mM로 사용하였다. 실험목적에 따라 0.4% bovine serum albumin (BSA)의 첨가유무를 결정하였다.

통계학적 분석 및 실험성적의 처리 : Ca²⁺ 전류의 증가나 감소가 seal 저항의 증감 및 patch pipette과 연결된 세포막이 다시 막히는 것과 밀접한 관계가 있으므로 Ca²⁺ 전류가 동일한 막전압에서 peak에 도달하는 데 걸리는 시간이 일정하게 유지되는 난자에서 기록된 것만

을 student t-test로 통계처리하여 처리구간의 유의성을 검증하였다.

결 과

생쥐 난자의 동결·융해 후 생존성 : 생쥐 난자의 유리화 및 완만 동결·융해 후 생존성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 유리화동결시 동결보호제로는 EFS 용액을, 희석제로는 0.5 M sucrose를 사용하였으며, 완만동결시는 동결보호제로 EPG와 희석제로 0.5 M galactose를 사용하였다. 유리화동결시 평형시간은 1분, 완만동결시는 30분 동안 동결보호제에 노출시킨 후 동결을 실시하였다. 동결·융해 후 형태학적 정상율, 생존율을 대조군과 비교해보면 유리화동결 후 49개중 40개가 형태학적으로 정상을 유지하였으며 49개중 38개가 100% 녹색형광을 발함으로써 77.6%의 생존율을 나타내었다. 완만동결 후 결과도 유리화 동결과 마찬가지로 81.6%의 형태학적 정상과 73.5%의 생존율을 나타냄으로써 동결방법간에 있어서는 유의한 (P<0.05) 차이는 보이지 않았다. 대조군과 동결·융해 난자를 비교해보면 동결·융해난자는 대조군에 비해 생존성에 있어서 유의한 (P<0.05) 감소를 보였다.

동결보호제의 종류에 따른 난자의 생존율 : Table 1에서 살펴본 결과에서 동결과정은 난자의 생존율에 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 그러나 유리화동결과 완만동결 방법간의 결과에서 유의한 (P<0.05) 차이는 보이지 않았다. 따라서 본 실험에서는 완만동결보다는 간편한 유리화동결방법을 택하여 실험을 진행하였다. Fig 1에서는 유리화동결 과정시 동결보호제의 종류에 따른 난자의 생존율을 살펴보았다.

EFS, EFG, EFT 동결보호제를 이용하여 난자를 동결시킨 후 융해한 다음 FDA-test 결과 100% 형광을 발하는 동결난자를 생존한 것으로 하였다. Fig 1에서는 단당류의 galactose와 이당류의 trehalose, sucrose가 포함된

EFG, EFS, EFT 동결보호제로 난자를 동결시킨 후 융해하여 생존율을 조사하였다. 이러한 동결보호제는 비침투성 동결보호제로 이용되는 sucrose, trehalose, galactose의 차이로 각 처리구간의 생존율을 비교하였다. EFG, EFS, EFT 처리구에 있어 난자의 생존율을 살펴보면 각각 88.0% (44/50), 77.6% (38/50), 78.0% (39/50)로써 처리구간에 유의한 (P<0.05) 차이는 없었다. 그러나 이당류로 조성된 동결보호제보다는 단당류로 만들어진 EFG를 사용한 난자에서 생존율이 10% 정도 높게 나타났다.

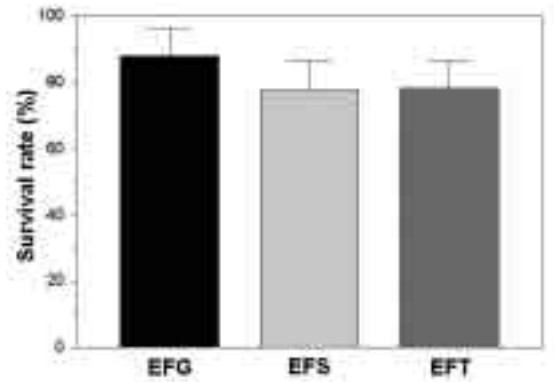


Fig 1. Effect of cryoprotectants on survival *in vitro* of frozen mouse oocytes

Data were collected from five replicate

EFG : 10% FBS + PBS + 40% ethyleneglycol + 18% ficoll + 0.3 M galactose

EFS : 10% FBS + PBS + 40% ethyleneglycol + 18% ficoll + 0.3 M sucrose

EFT : 10% FBS + PBS + 40% ethyleneglycol + 18% ficoll + 0.3 M trehalose

동결에 있어서 Ca²⁺의 영향 : Ca²⁺은 난자나 수정란의 배양에 있어서는 반드시 필요한 이온으로 알려져 있으나 동결시에는 Ca²⁺이 어떠한 변화를 유발하는지를 조사하였다. 유리화동결과정에서 사용하는 동결 보호제를 EFG로 하였으며 EFG를 만들 때 사용하는 PBS 용액

Table 1. Comparison of survival rates of frozen mouse oocytes by using FDA-test

Treatment	No. of oocytes	No.(%) of oocytes recovered	No.(%) of oocytes morpholog. intact	No.(%) of oocytes survived
Control	50			49(98.0) ^a
Vitrification	49	49(100) ^a	40(81.6) ^a	38(77.6) ^b
Slow-freezing	50	49(98) ^a	40(81.6) ^a	36(73.5) ^b

^{a, b}There was significant (P<0.05) difference between the different superscripts in the column.

Data were collected from five replicate

을 Ca^{2+} 이 들어있는 것과 들어있지 않은 것으로 나누어 본 실험에 적용하였다. Ca^{2+} 이 들어있는 용액을 사용할 경우 82%의 생존율을 나타내는 반면 Ca^{2+} 이 들어있지 않은 용액을 이용하여 동결을 실시한 군에서는 14%의 저조한 생존율을 보임으로써 두 처리구간에 유의한 ($P<0.01$) 차이를 보였다. 이 결과로 보아 Ca^{2+} 은 배양 및 동결과정에 있어서도 난자의 생존율에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

Table 2. Effect of Ca^{2+} on post-thaw survival of mouse oocytes following vitrification

Treatment	Ca^{2+} in medium	No. of oocytes	No(%). of oocytes survived
Vitrification	+	50	41(82.0) ^a
	-	50	7(14.0) ^b

^{a, b} There was significant ($P<0.01$) difference between the different superscripts in the column.

Data were collected from five replicate

+ : 10% FBS + PBS + 40% ethyleneglycol + 18% ficoll + 0.3 M galactose

- : 10% FBS + Ca^{2+} , Mg^{2+} free-PBS + 40% ethyleneglycol + 18% ficoll + 0.3 M galactose

생쥐난자의 동결·용해 후 Ca^{2+} 전류 : 세포내 Ca^{2+} 농도를 변화시킬 수 있는 기전중의 하나인 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 이동을 Fig 2에서 살펴보았다. 세포바깥의 Ca^{2+} 이 세포내로 이동하는 것을 whole cell voltage clamp

기법을 이용하여 대조군과 동결난자에서 Ca^{2+} 전류의 크기를 비교하였다.

생쥐 배란난자에서 Ca^{2+} 전류를 기록하기 위해 -80 mV의 막전압을 유지한 채 15초 간격으로 250 ms 동안 -50 mV부터 50 mV까지 10 mV 간격으로 저분극 자극을 주었다. 배란난자에서 관찰되는 내향 전류는 주어진 저분극 자극에 따라 leak 전류를 동반하기 때문에 leak subtraction을 한 후 전류를 기록하였다 (Fig 2). Fig 2에 의하면 막전압의 변화에 따라 이온전류의 크기가 변하는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 막전압에 따른 전도도의 변화는 막전압의존성 전류의 가장 큰 특징으로 들 수 있으며, 막전압이 저분극될수록 내향전류가 빠르게 활성화되었다가 곧 이어 감소함으로써 적어도 150 ms 이후에는 거의 원래상태로 회복하는 것을 볼 수 있다. Fig 2A에서 보는 바와 같이 내향전류는 -40 mV부터 활성화되어 -10 mV에서 최대값 (I_{max} , -1.72 ± 0.07 nA, $n=15$)을 나타내고, 더욱 저분극 될수록 전류의 크기가 감소하였으며 +40 mV와 +50 mV 사이에서 역전전압 (reversal potential, E_{rev})을 보이는 종모양의 전류-전압곡선 (I-V curve)을 나타내었다. Fig 2B는 전류크기의 최고치를 나타내는 -10 mV에서 기록한 전류곡선이다. 동결난자에 있어서도 동일한 방법으로 Ca^{2+} 전류를 기록하였다. 동결난자에서 Ca^{2+} 전류는 대조군과 유사한 반응을 보였다 (Fig 2A와 2B). 동결과정을 거친 난자의 Ca^{2+} 내향전류는 -1.69 ± 0.08 nA ($n=15$)를 나타내었다. Fig 2A에서 살펴본 바와 같이 내향전류의 최고치를 나타내는 전압과

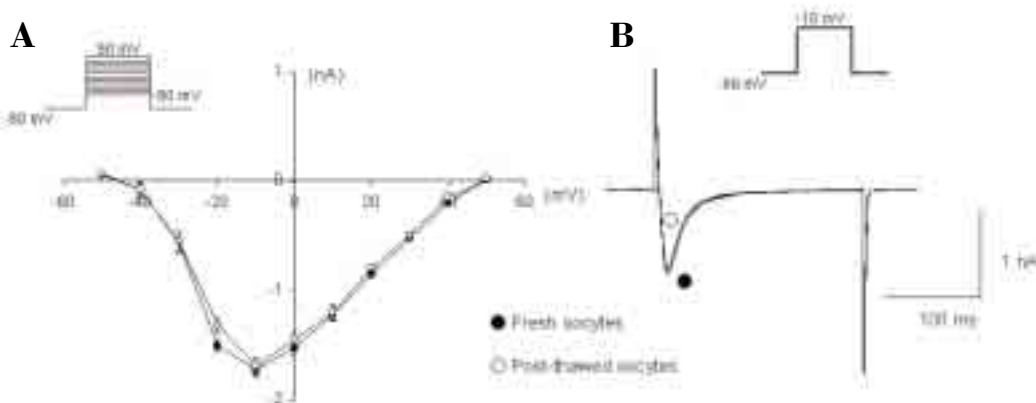


Fig 2. Ca^{2+} current following vitrification of mouse oocytes

A : The current-voltage (I-V) relationship for the peak inward currents measured in ovulated oocytes. These inward currents were measured in the presence of 5 mM Ca^{2+} .

Current traces recorded in response to step depolarization shown in the upper inset.

Each data versus voltage was plotted as mean \pm S.D.

B : Superimposed traces of Ca^{2+} current elicited by -10 mV voltage pulse in the fresh and post-thawed oocytes.

역전전압 등은 동결과 무관하게 유지되는 것으로 보아 동결과정 자체가 난자의 Ca^{2+} 통로를 손상시키지 않는 것으로 생각된다.

고 찰

동결보존은 포유동물의 수정란을 저장하는 효율적인 방법으로 활용되어왔다. 그러나 난자의 동결은 수정란의 동결에 비해 생존율과 수정이후 발달률이 낮다. Table 1에서는 동결방법에 따른 난자의 생존율을 조사하였다. 생쥐 난자의 생존율에 있어서 유리화동결과 완만동결의 동결방법간에는 유의한 ($P<0.05$) 차이를 보이지 않았다. 그리하여 본 실험에서는 간편한 유리화동결 방법을 택하여 실험을 진행하였다. 유리화동결은 Rall과 Fahy³가 8세포기의 생쥐수정란을 성공적으로 동결함으로써 더욱 확립되었다. 난자의 동결·융해동안 세포손상의 주원인 중의 하나로 세포내 빙정형성을 들 수 있다. 유리화동결방법은 세포내 빙정형성을 최소화하고 동결보호제의 독성을 감소시키기 위하여 open pulled straw^{18,19} 또는 nylon loop²⁰⁻²²를 이용하여 동결방법을 개선하여왔다.

유리화동결과 완만동결 후 생존율 및 배발달에 있어서는 여러 가지 의견이 대립되고 있다. 그러나 본 실험에서는 유리화동결과 완만동결 후 생존율을 비교해 본 결과 유의한 ($P<0.05$) 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 강 등^{23,24}의 연구결과에 의하면 토끼의 전핵배 및 토끼 상실배와 핵이식배에서 유리화동결과 완만동결을 실시한 결과 동결방법간에는 유의한 ($P<0.05$) 차이를 보이지 않았으며, 본 실험의 결과와도 동일하였다.

동결보존시 생존성에 관여하는 중요한 요인으로는 세포내 빙정형성, 부적절한 세포내 Ca^{2+} 조절, 동결보호제의 종류, 화학적독성, 농도, 평형시간 및 온도 등으로써 동결·융해수정란의 생존력은 동결과정 자체보다는 유리화용액 노출, 희석과정과 같은 연속적인 과정등에 따라 감소된다²⁵. 그러나 Shaw 등²⁶은 동결보호제만으로는 배아의 생존 및 발달률에 영향을 끼치지 않는다고 하였다. 본 실험에서 동결시 EFG, EFT, EFS 동결보호제를 이용하여 생쥐난자의 생존율을 조사한 결과 유의한 ($P<0.05$) 차이를 보이지 않았다 (Fig 1). Kasai *et al.*^{27,28}은 생쥐와 토끼수정란의 동결보존시 ethyleneglycol을 기본으로 하는 비교적 독성이 적은 동결보호제 EFS용액을 이용하여 성공적으로 유리화동결을 실시하였다. Leibo와 Oda²⁹는 생쥐 전핵배와 수정란에 효과적인 동결보호제로서 EPG 동결보호제 (8 M Ethyleneglycol + 7.5% Polyvinylpyrrolidone + 0.25 M galactose)를 제시하였다. Fig

1에서 사용한 동결보호제 EFG, EFT, EFS는 Kasai *et al.*^{27,28}과 Leibo와 Oda²⁹의 동결보호제를 변형시켜 사용한 것이다. EFG, EFT, EFS 동결보호제는 단당류의 galactose와 이당류의 trehalose, sucrose가 포함된 것으로써 생쥐 난자를 동결·융해시킨 후 난자의 생존율을 (88.0, 77.6, 78.0%) 비교해본 결과 처리구간에 유의한 ($P<0.05$) 차이를 보이지 않았다 (Fig 1). 당에 있어서는 같은 삼투압의 이당류 점성이 단당류의 점성보다 강하고 단당류는 이당류보다 짧은 시간에 다른 동결보호제와 잘 섞이어 침투할 수 있으므로 시간의 단축으로 동결·융해 및 희석과정에서 세포의 손상을 막을 수 있다고 보고한 바 있다³⁰. 삼투압변화에 의해 나타나는 동결·융해 수정란의 손상은 osmotic buffer에 비침투성 동결보호제를 혼합하여 사용함으로써 세포내·외 삼투압 차이를 감소시켜 최소화할 수 있다³¹고 하였다. Ishida *et al.*³²은 Kasai *et al.*²⁸의 EFS 동결보호제를 변형한 것으로 sucrose 대신에 trehalose를 사용하여 평형시간을 달리하여 동결·융해 후 배반포의 형성률을 보았을 때, 40분까지 노출시켰을 때에도 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. 그러나 Smorag *et al.*³³에 의하면 평형시 sucrose보다 trehalose가 세포막 안정성 증진에 더욱 효과적임을 보고하였다. Rayos *et al.*³⁴은 난자의 동결시 trehalose와 sucrose의 차이가 없음을 보고하였다. 본 실험의 결과에서는 당의 변화에 있어 유의한 ($P<0.05$) 차이는 보이지 않았지만, 단당류를 사용한 EFG 동결보호제로 동결·융해한 난자의 생존율이 다소 높았다.

동결에 있어서 Ca^{2+} 의 영향을 살펴보면 지금까지의 보고는 동결과정이 정자의 세포막을 변화시키는 것으로 알려졌다³⁵⁻³⁸. 세포내 Ca^{2+} 은 동결·융해동안 나타날 수 있는 세포 손상의 주원인중의 하나이다. 포유동물 난자 및 수정란에 있어서, Ca^{2+} 은 다양한 세포내 현상을 조절하는 인자로 알려져있으며, 특히 미성숙난자 및 배란난자에서 Ca^{2+} 은 필수적임을 보고하였다^{39,40,15}. 난자를 Ca^{2+} free 배양액에서는 4시간정도 배양하면 이 난자는 퇴화되게 된다³. 따라서 Ca^{2+} 은 난자의 배양과정에 필수적인 인자로 생각되었다. 또한 2세포기 발생정지현상이 나타난 생쥐배의 배양에 Ca^{2+} 이 없을 경우 바로 퇴화된다. 이와같이 Ca^{2+} 은 난자의 성숙, 수정 및 배발달과정에서 중요한 역할을 한다⁴¹⁻⁴⁵. 다양한 세포내 현상을 조절하는 중요한 인자인 Ca^{2+} 이 동결과정과는 어떠한 관련이 있는지를 본 실험에서 조사하였다. 생쥐난자를 동결시킬 때 동결보호제에 Ca^{2+} 이 들어있는 군과 들어있지 않은 군으로 나누어 난자의 생존율을 조사하였다 (Table 2). Ca^{2+} 이 들어있는 동결보호제를 이용하여 동결한 군은 Ca^{2+} 이 들어있지 않은 동결보호제로 동결시킨 난자

보다 높은 생존율을 보였다. 이러한 결과로 보아 동결에 있어서도 Ca^{2+} 은 난자의 생존율과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 8세포기의 생쥐 수정란을 Ca^{2+} free 동결보호제로 동결한 후 난자의 생존율을 조사하였을 때 각각의 할구가 분리되어 정상적인 형태를 가진 수정란을 확인할 수 없었다 (data not shown). 난자 및 수정란을 배양할 때 Ca^{2+} 의 필요성은 이미 확인된 바 있다. 그러나 Ca^{2+} 을 필요로 하는 시기에는 반드시 Ca^{2+} 유입현상이 일어나야 하므로 생쥐난자에서 Ca^{2+} 통로의 존재를 생각하였다. 생쥐난자에서의 Ca^{2+} 통로는 이미 확인된 바 있다^{46,11,14}. 본 실험에서는 동결과정이 세포막의 Ca^{2+} 통로에 어떠한 영향을 미치는 지를 whole cell voltage clamp 기법을 이용하여 조사하였다. 유리화동결은 Fig 2에서 보는 바와 같이 세포막에서 Ca^{2+} 을 이동시킬 수 있는 기전 중의 하나인 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 의 이동에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

본 실험에서는 생쥐 난자의 유리화동결이 세포막의 Ca^{2+} 통로를 손상시키지 않은채 난자를 동결시킬 수 있다는 것을 처음으로 제시하였다. 그리고 생쥐난자의 동결·융해 후 생존율 및 그 이후의 발달률을 향상시키기 위해서는 난자에 적합한 동결보호제, 동결·융해 방법 및 체외배양체계를 정립하는 것이 필요하다고 생각한다.

결 론

본 실험에서는 동결·융해 후 생쥐 난자에서 동결방법과 동결보호제를 달리하여 난자의 생존성을 조사한 후 whole cell voltage clamp 기법을 이용하여 동결난자에서 Ca^{2+} 전류를 기록하였다. 과배란시킨 생쥐의 난관으로부터 채란된 난자를 동결에 이용하였으며, 동결보호제로는 EFS (ethyleneglycol + ficoll + sucrose), EPG (ethyleneglycol + polyvinylpyrrolidone + galactose), EFG (ethyleneglycol + ficoll + galactose), EFT (ethyleneglycol + ficoll + trehalose)를 사용하였다. 동결·융해 후 난자는 5%, 39°C CO₂ 배양기에서 M16 배양액에 배양하였다. 난자의 생존성 확인은 FDA-test를 이용하였으며, 난자의 생존율은 100% 형광을 발하는 난자만을 택하여 통계 처리하였다.

유리화동결과 완만동결방법을 이용하여 난자를 동결시킨 후 융해하여 생존율을 비교한 결과 동결방법간에는 유의한 ($P<0.05$) 차이를 보이지 않았다. 그리고 난자의 생존율을 각각다른 세가지 동결보호제 (EFG, EFS, EFT)를 이용하여 동결시킨 후 융해하여 생존율을 비교하였다. 그 결과 세 처리구에 있어서 생존율의 유의한 ($P<0.05$) 차이는 없었다. 그러나 단당류의 비침투성 보

호제인 galactose를 첨가시킨 EFG로 동결시킨 처리군에서 10% 정도 높은 생존율을 보였다. 동결과정시 Ca^{2+} 이 들어있는 동결보호제를 이용한 군과 Ca^{2+} 이 들어있지 않은 동결보호제를 사용한 군을 비교해 본 결과 Ca^{2+} 이 들어있는 동결보호제를 사용한 군이 Ca^{2+} 이 들어있지 않은 군보다는 난자의 생존율이 현저히 상승하였다. 따라서 Ca^{2+} 은 동결과정시 중요한 인자로 생각되며, 이러한 Ca^{2+} 이 이동할 수 있는 경로인 Ca^{2+} 통로의 변화를 동결·융해 후 대조군과 비교하였다. 동결·융해 난자에서 Ca^{2+} 전류의 변화는 동결과정을 거치지 않은 난자와 거의 동일한 전류-전압곡선을 나타내었다.

이상의 결과로부터 유리화동결이 생쥐 난자의 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 의 이동에는 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178:411, 1972.
- Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J. Reprod. Fert.*, 49:89-94, 1977.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575, 1985.
- Nakagata N. Survival of 4-cell mouse embryos derived from in vitro fertilization after ultrarapid freezing and thawing. *Exp. Anim.*, 38(3):279-282, 1989a.
- Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, et al. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod*, 2:695-700, 1987.
- Imoedehe DG, Sigue AB. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *J. Assist Reprod Genet*, 9:323-327, 1992.
- Carroll J, Warnes GM, Matthews CD. Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod fertil*, 85: 489-494, 1989.
- George MA, Johnson MH. Cytoskeletal organization and zona sensitivity to digestion by chymotrypsin of frozen-thawed mouse oocytes. *Hum Reprod*, 8(4):612-620, 1993.
- Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum*

- Reprod*, 2(3):207-216, 1987.
10. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, et al. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*, 54:102-108, 1990.
 11. Kang DW, Yi SM, Kim ES, et al. Electrical and pharmacological properties of T-type calcium current in mouse oocytes. *Theriogenology (Abs)*, 55(1):322, 2001.
 12. 김양미. Ca^{2+} dependency of transient outward currents in hamster eggs. 석사학위논문, 1993.
 13. 김양미. 햄스터 난자에 존재하는 Cl^- 통로의 성상. 박사학위논문, 1997.
 14. 한재희. 햄스터 난자의 수정 후 초기 분화와 관련된 전압 의존성 전류의 변화. 박사학위논문, 1995.
 15. De Felici M, Siracusa G. Survival of isolated, fully grown mouse oocytes is strictly dependent on external Ca^{2+} . *Dev Biol*, 92:539-543, 1982.
 16. Rapael AF, James MR. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol Reprod Develop*, 32:9-16, 1992.
 17. Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 391:85-100, 1981.
 18. Vajta G, Booth PJ, Holm P, et al. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw(OPS) method. *Cryp-Letters*, 18:191-195, 1997.
 19. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open pulled straw(OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, 51:53-58, 1998.
 20. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev*, 58(3):342-347, 2001.
 21. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, et al. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*, 17:1234-1236, 1999a.
 22. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril*, 72:1073-1078, 1999b.
 23. 강다원, 조성근, 한재희 등. 토끼전핵배의 동결보존 후 배발달. *한국가축번식학회지*, 23(1):75-84, 1999.
 24. 강다원, 최창용, 하란조 등. 토끼의 정상 및 핵이식 배의 유리화 및 완만동결에 따른 용해 후 발달률. *한국수정란이식학회지*, 13(1):1-9, 1998.
 25. Gajata B, Smorag Z. Factors affecting the survival of one- and two-cell rabbit embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 39:499-506, 1993.
 26. Shaw JM, Ward C, Trounson AO. Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum Reprod*, 10:396-402, 1995.
 27. Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu, SE, et al. T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a sample method. *Biol. Reprod*, 46:1042-1046, 1992.
 28. Kasai M, Komi JH, Takakano A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert*, 89:91-97, 1990.
 29. Leibo SP, Oda K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters*, 14:133-144, 1993.
 30. McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod*, 10(5):1163-1171, 1995.
 31. Leibo SP, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing In Daniel JC, Jr(ed). Method for the preservation of mammalian Reproduction. *Academic press, New york, NY, USA*:179-201, 1978.
 32. Ishida GM, Saito H, Ohta N, et al. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. *Hum Reprod*. 12(6) : 1259-1262. 1997.
 33. Smorag Z, Heyman Y, Gardner V, et al. The effect of sucrose and trehalose on viability of one- and two-cell rabbit embryos. *Theriogenology*, 33(3):741-746, 1990.
 34. Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, et al. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. Reprod Fertil*, 100(1):123-129, 1994.
 35. Bailey JL, Buhr MM. Ca^{2+} regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187. *Cryobiology*, 30(5):470-481, 1993.
 36. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. In vitro capacitation of bovine spermatozoa ; role of intracellular

- calcium. *Theriogenology*, 15 ; 51(2):461-472, 1999.
37. Szasz F, Gabor G, Solti L. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Vet Hung*, 48(3): 325-333. 2000.
 38. Zhao Y, Buhr MM. Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *J Androl*, 16(3);278-285,1995.
 39. Bae IH. Role of Calcium in resumption of meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod*, 24:92, 1981.
 40. Bae IH, Channing CP. Effect of Calcium ion the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graafian follicles. *Biol Reprod*, 79-87, 1985.
 41. Homa ST, Caroll J, Swann K. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum Reprod*, 8(8):1274-1281,1993.
 42. Jaffe LA. Sources of calcium in egg activation; a review and hypothesis. *Dev. Biol*, 99:265-276, 1983.
 43. Robert MT, Calvin S, Gary GB, et al. Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J. Cell. Biol*, 117:799-811, 1992.
 44. Whitaker M, Steinhardt RA. Ionic signaling in sea urchin egg fertilization. In Metz, C. & Monroy, B. (eds), *Biology of fertilization*, Academic Press, New York, 3:167-221, 1985.
 45. Whittingham DG. Parthenogenesis in mammals. In Finn, C.A. (ed), *Oxford Review in Reproductive Biology*. Vol. 2. University Press, Oxford, pp. 205-211, 1980.
 46. Day ML, Johnson MH, Cook DI. Cell cycle regulation of a T-type calcium in early mouse embryos. *Pflugers Arch*, 436(6):834-842, 1998.