

인간 배아 줄기세포의 OPS와 Grid를 이용한 유리화 동결법의 효율성 비교

박규형^{1,2} · 최성준^{1,2} · 김희선³ · 오선경³ · 문신용³ · 차광렬^{1,2} · 정형민^{1,2†}

¹포천중문의과대학교 생명과학대학원 분자발생과

Modification of Efficient Vitrification Method by Using Open Pulled Straw (OPS) and EM Grid as Vehicles in Human Embryonic Stem Cell

**K. H. Park^{1,2}, S. J. Choi^{1,2}, H. S. Kim³, S. K. Oh³, S. Y. Moon³, K. Y. Cha^{1,2}
and H. M. Chung^{1,2†}**

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University

SUMMARY

Human embryonic stem (hES) cell lines have been derived from human blastocysts and are expected to have far-reaching applications in regenerative medicine. The objective of this study is to improve freezing method with less cryo-injuries and best survival rates in hES cells by comparing various vitrification conditions. For the vitrifications, ES cells are exposed to the 4 different cryoprotectants, ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (PROH), EG with dimethylsulfoxide (DMSO) and EG with PROH. We compared to types of vehicles, such as open pulled straw (OPS) or electron microscopic cooper grids (EM grids). Thawed hES cells were dipped into sequentially holding media with 0.2 M sucrose for 1 min, 0.1 M sucrose for 5 min and holding media for 5 min twice and plated onto a fresh feeder layer. Survival rates of vitrified hES cells were assessed by counting of undifferentiated colonies. It shows high survival rates of hES cells frozen with EG and DMSO (60.8%), or EG and PROH(65.8%) on EM grids better than those of OPS, compared to those frozen with EG alone (2.4%) or PROH alone (0%) alone. The hES cells vitrified with EM grid showed relatively constant colony forming efficiency and survival rates, compared to those of unvitrified hES cells. The vitrified hES cells retained the normal morphology, alkaline phosphatase activity, and the expression of SSEA-3 and 4. Through RT-PCR analysis showed Oct-4 gene expression was down-regulated and embryonic germ layer markers were up-regulated in the vitrified hES cells during spontaneous differentiation.

These results show that vitrification method by using EM grid supplemented with EG and PROH in hES cells may be most efficient at present to minimize cyto-toxicity and cellular damage derived by ice crystal formation and furthermore may be employed for clinical application.

(Key words : human embryonic stem cell, EG, DMSO, PROH, OPS, EM grids)

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC11013)에 의해 수행되었음.

² 포천중문의과대학교 세포 및 유전자치료연구소(Cell and Gene Therapy Research Institute, Pochon CHA University)

³ 서울대학교 의학연구원(Stem Cell Research Center, Seoul National University)

† Correspondence : E-mail : hmchung@chacares.com

서 론

배아 줄기세포 (Embryonic Stem cell : ES)는 착상전 포배기 배아의 내부세포괴로부터 확립할 수 있으며 최초로 생쥐배아로부터 확립되었다. 배아 줄기세포는 생체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화가 가능하며 체외에서 계속된 배양에서도 정상적인 염색체와 발생적인 능력을 가지고 있다 (Evans et al., 1981). 인간 배아 줄기세포(Human Embryonic Stem cell : hES)는 최근에 인간의 배아에서 유래하였으며 (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000) 배아줄기세포가 갖는 자가재생산능과 각종 세포로 분화할 수 있는 전분화능으로 인해 재생의학, 약리학, 기초의학분야에서 세포치료제로서 이용 가능성이 제시되어지고 있다 (Gearhart, 1998; Keller 등, 1999).

그러나, hES cell의 이런 무한한 가능성 이면에는 일반세포와는 달리 매우 까다로운 세포배양방법을 필요로 하며, 특별한 냉동보존방법을 요구하고 있다. 일반적인 세포동결방법인 slow freezing-rapid thawing 동결법은 hES cell에서 매우 낮은 생존율을 보여주고 있다 (Reubinoff 등, 2001). 최근 포유류의 난자를 동결보존하는 방법 중의 하나인 유리화동결법 (vitrification)을 이용한 배아줄기세포를 효과적으로 동결보존이 가능하다는 사실이 보고되었다 (Reubinoff 등, 2001). 그러나 유리화동결법은 고농도 동결액으로 인한 세포독성, 냉해, 전자밀집에 의한 독성, ice crystal 형성에 의한 세포 내외의 파괴 그리고 삼투압 현상 등 여러 가지 문제점을 나타낼 수 있다. 최초의 hES cell 유리화동결법도 동결융해한 hES cell colony의 모양이 대조군에 비하여 더 많은 분화를 나타내는 문제점을 보였다 (Reubinoff 등, 2001).

일반적으로 사용하고 있는 세포동결보존법으로는 slow freezing/rapid thawing 방법과 유리화 동결법 두가지가 있다. Slow freezing 동결법은 ethylene glycol(EG), 1,2-propanediol(PROH), glycerol, trehalose, sucrose 등과 같은 동결액을 사용하여 자동화된 동결기를 사용하여 서서히 동결시킨다 (Shaw et al., 1995). 이 방법은 동결과 융해에 많은 시간이 소요되며 고가의 자동화 동결기를 구입해

야 하는 단점이 있다. 그리고 동결과 융해의 과정이 많은 시간이 소요하게 됨으로서 필연적으로 ice crystal에 의한 냉해를 입게 된다. 유리화 동결법은 생쥐의 착상전 배아를 냉동보존하기 위하여 개발 (Rall et al., 1985)된 방법인데, 이 방법은 세포내 침투속도가 빠른 EG, PROH와 DMSO를 고농도의 동결액으로 사용하여 급속하게 동결하는 방법으로 ice crystal 형성을 막을 수 있고 자동화 동결기 없이 동결할 수 있는 장점이 있다 (Ali et al., 1993). 그러므로 이러한 유리화 동결법은 냉동보존이 어려운 세포의 동결법으로 중요한 위치를 차지하고 있으며 임상적용에 또한 널리 이용되고 있다.

따라서 본 연구는 여러 가지 유리화 동결법과 세포전달체 (vehicle)를 비교하여 hES cell을 동결보존하는데 있어 효과적인 동결액과 vehicle을 조사하고 동결-융해후 배아줄기세포의 특성을 유지할 수 있는 효과적인 유리화 동결법을 개발하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 인간 배아 줄기세포의 배양

인간 배아 줄기세포의 배양은 0.1 % gelatin-coating된 세포배양 용기에 mitotically inactivated STO (ATCC, USA) 세포를 feeder layer로 사용하여 배양하였다. 배양용액은 Dulbecco's modified eagle medium with F-12 nutrient mixture (DMEM/F-12; Gibco, USA)에 20% Knockout Serum Replacement (KSR, USA), 0.53mM β -mercaptoethanol, 1% non-essential amino acids, 50 IU/ml penicillin and 50 g/ml streptomycin (all from Invitrogen, USA)를 첨가하였으며 성장인자로 4ng/ml의 bFGF (Invitrogen, USA)를 사용하였다. 계대배양은 5일에 한번씩 수행하였으며 세포의 군집을 glass pipet을 이용하여 물리적으로 분리하여 계대배양을 수행하였다.

2. 배아 줄기세포의 OPS를 이용한 동결융해

인간배아줄기세포의 냉동보관은 4가지 다른 방법을 사용하여 약 100~200개의 세포덩어리를 냉동보존하였다. 배아줄기세포는 물리적으로 분리하

Table 1. Schematic procedure on vitrification

Experiments	Reagent and vehicles	1st step	2nd step
1	EG and OPS	1.5M, 2min	5.5M, 30sec
2	PROH and OPS	1.5M, 2min	5.5M, 30sec
3	EG+DMSO using OPS	each 10%, 1min	each 20%, 20sec
4	EG+DMSO using EM grid	each 10%, 1min	each 20%, 20sec
5	EG+PROH using OPS	each 15%, 1min	each 25%, 20sec
6	EG+PROH using EM grid	each 10%, 1min	each 20%, 20sec

였으며 모든 과정은 37°C heating stage에서 수행하였다. 모든 용액은 DMEM에 HEPES buffer (Gibco, USA)와 20% FBS(Hyclone, USA)가 첨가된 용액을 holding meda (이하 HM)로 하여 제조하였다. Vitrification 과정의 개략적인 모식은 Table 1에 정리하였다. Vitrification을 위한 전달체 (vehicle)로는 open pulled straw (OPS; GmbH, Germany)와 electron microscopic grid (EM grid; Gilder Co., USA)를 사용하였다.

실험 1에서 HM에 침지시켜둔 약 20개의 hES clump를 첫 번째 vitrification solution (이하 VS1)인 1.5M ethylene glycol (EG; Sigma, USA)에 2분간 노출시킨 후 2번째 vitrification solution (이하 VS2)인 5.5M EG와 1M sucrose가 첨가된 동결액에 30초간 노출시킨 후 20 µl droplet을 만든 후 최종적으로 10 µl droplet을 만들어서 OPS에 넣었다. OPS는 곧바로 액체질소에 침지시킨 후 goblet에 보관하여 액체질소 보관 탱크에 넣어서 보관하였다.

실험 2에서는 1.5M 1,2-propanediol (PROH; Sigma, USA)이 첨가된 VS1과 5.5M PROH와 1M sucrose가 첨가된 VS2 동결액을 사용하여 vitrification을 수행하였다. 모든 과정은 실험 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

실험 1과 2에서 해동과정은 먼저 OPS를 액체질소에서 빼낸 후 3초간 액체질소를 제거하여 주었다. 그리고 곧바로 1M sucrose가 첨가된 HM에 1분간 침지하였다. OPS 내에 있는 hES clump는 1ml BD syringe를 이용하여 분리하였다. hES clumps는 다시 1ml 배양용액에 담긴 0.5M, 0.25M, 0.125M, 0M sucrose가 첨가된 HM에 2분 30초간

순차적으로 해동하였다. 해동된 hES cell은 새로운 feeder layer에 옮겨주었다.

실험 3에서는 hES clumps를 10% EG와 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)가 첨가된 VS1에 1분간 노출시킨 후 20% EG와 20% DMSO 그리고 0.5M sucrose가 첨가된 VS2에 20초간 노출시켰다. 이후 약 20 clump의 hES cell을 20 µl droplet에 세척한 후 최종 10 µl droplet을 만들어 OPS에 loading 하였다. OPS는 곧바로 액체질소에 침지한 후 보관하였다.

실험 4에서는 15% EG와 15% PROH가 첨가된 동결액에 1분, 25% EG와 25% PROH가 첨가된 동결액에 20초간 처리하였다. 모든 실험방법은 실험 3과 동일하게 처리하였다.

3. EM Grids를 이용한 동결융해

EM Grid를 이용한 실험은 OPS의 실험에서 양호한 생존율을 보인 EG와 PROH, DMSO를 혼합한 동결액을 사용하여 동결융해하였다. 실험방법은 EM grid를 사용한 것을 제외하고 OPS를 사용한 동결융해방법과 동일하게 수행하였다.

4. Characterization of vitrified ES cells

Vitrification 방법으로 동결-해동한 hES cell의 특징은 먼저 줄기세포 표식인자인 alkaline phosphatase (AP)의 발현과 인간 배아줄기세포 특이 표면 항체인자로 알려진 stage specific early antigen (SSEA) 3과 4의 형광면역염색방법을 이용하여 확인하였다. AP 염색은 AP staining kit (Sigma, USA)를 이용하여 수행하였다. 먼저 동결-해동한

hES cell을 4-well 배양접시에 3일간 배양한 후 3% para-formaldehyde로 20분간 고정하였다. 고정시킨 hES cell은 Fast blue BB base (FBB)- alkaline, sodium nitrite와 naphthol AS-BI mixture solution을 이용하여 실온에서 15분간 배양후 AP 염색을 확인하였다. SSEA-3, 4의 형광면역염색은 AP 염색과 같은 방법으로 세포를 고정시킨 후 1차 항체를 실온에서 6시간 동안 반응한 이후에 fluorescence가 붙은 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 실험에서 사용한 1차 항체의 종류와 희석농도는 monoclonal SSEA-3 1:25, monoclonal SSEA-4 1:100 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA, USA)농도로 사용하였으며 2차 항체는 rabbit anti-mouse immunoglobulins conjugated to fluorescein isothiocyanate (Jackson Lab, USA)을 1:500 농도로 사용하였다.

5. *In vitro* differentiation of vitrified ES cells and RT-PCR analysis

동결-해동한 hES cell을 mitotically inactivated STO feeder 위에서 5번의 계대배양 후 RT-PCR을 수행하였다. hES cell의 배상체 (embryoid body : EB)형성은 미분화된 hES cell을 glass pipette을 이용하여 조각을 낸 후 pluronic F-127 (Sigma, USA)이 coating된 60mm petri-dish(Falcon BD, USA)에 5일간 배양하여 형성하였다. 형성된 배상체는 0.1

% gelatin coating된 6 well-plate에 재부유하여 5일, 10일간 배양하였다. 5, 10일간 배양한 세포는 0.25 % trypsin/ 0.53mM EDTA 용액을 실온에서 1분간 처리하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포는 trypsin 반응을 억제하기 위하여 serum이 첨가된 배양액을 넣어 준 후 1000rpm에서 4분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 남은 세포의 총 RNA를 TRIZOL(Invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였다. cDNA는 1 μ g 총 RNA를 superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. PCR은 itaq PCR master mix (Intron, Korea)를 사용하여 수행하였으며 target gene의 primer와 PCR 조건은 Table 2에 정리하였다.

6. Statistical Analysis

통계학적 유의성 검정은 각 실험군을 *t*-test와 ANOVA 분석을 통하여 유의성을 검정하였으며, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1. 동결보호제에 따른 Vitrification 후의 생존율

다양한 방법으로 동결 용해한 hES cell의 생존율을 요약하면 Fig. 1에서 보는 바와 같다. OPS를 이용하여 4가지 동결액을 사용하여 vitrification을

Table 2. RT-PCR primers used in this study

Gene product	Primer sequence	Reaction condition	Product size (bp)
Oct-4	GAGAACAATGAGAACCCTTCAGGAGA TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	30cycles at 60 $^{\circ}$ C	219
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACACC GTACTCAGCGGCCAGCATCG		302
α -Fetoprotein	GCTGGATTGCTGCAGGATGGGGAA TCCCCTGAAGAAAATTGGTTAAAAT		216
NF-68KD	GAGTGAAATGGCACGATACCTA TTTCTCTCCTTCTTCACCTTC	30cycles at 62 $^{\circ}$ C	473
α -Cardiac actin	GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA		486

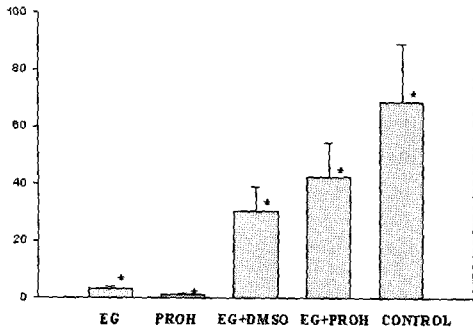


Fig. 1. Comparison of survival rates under the various vitrification conditions.

* Values are significantly different ($P < 0.05$).

수행한 결과 EG와 DMSO (38.1%), EG와 PROH (50.84%)를 혼합한 동결보존액이 EG (2.4%) 또는 PROH (0%)를 사용한 방법보다 통계적으로 유의한 차이를 보이며 더 좋은 생존율을 보였다.

2. OPS를 이용한 vitrification 후의 생존율

OPS를 이용하였을 때 실험 결과는 Fig. 2와 같았다. 첫 번째 계대배양에서는 대조군 미동결 hES cell의 생존율 72%에 비하여 EG와 DMSO, EG와 PROH는 각각 32.3%, 42.6%의 생존율을 보였다. 그러나 계대배양을 할수록 양호한 생존율을 보였으며 5번째 계대배양에서는 대조군의 81.4%와 비교하여 각각 76.1%와 71.4%의 생존율을 나타내어 통계학적으로 유의성이 인정되지 않았다.

3. EM grid를 이용한 vitrification 후의 생존율

EM grid를 이용하였을 때 실험 결과는 Fig. 3과

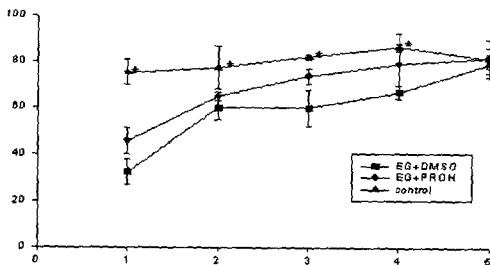


Fig. 2. Colony forming rates after passage down 5 times, following vitrification supplemented with EG with DMSO and PROH by using OPS.

* Values are significantly different ($P < 0.05$).

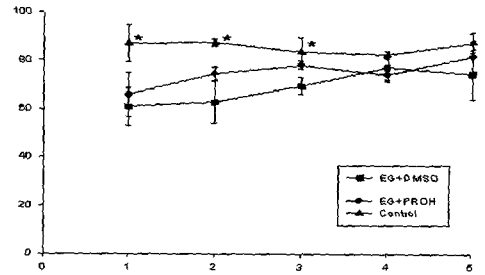


Fig. 3. Colony forming rates after passage down 5 times, following vitrification supplemented with EG with DMSO and PROH by using EM grids.

* Values are significantly different ($P < 0.05$).

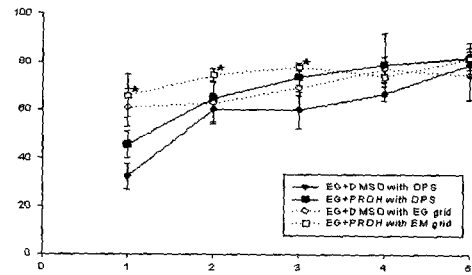


Fig. 4. Colony forming rates after passage down 5 times, following vitrification supplemented with EG with DMSO and PROH by OPS and EM grids.

* Values are significantly different ($P < 0.05$).

같았다. 첫 번째 계대배양에서의 생존율은 대조군 미동결 hES cell의 생존율 86.9%에 비하여 EG와 DMSO, EG와 PROH는 각각 60.8%, 65.7%의 생존율로 낮게 나타났으나 OPS를 이용하였을 때보다는 더 좋은 생존율을 보였다 (Fig. 4). OPS와 마찬가지로 계대배양을 할수록 좋은 생존율을 보였으며 5번째 계대배양에서는 대조군의 81.4%와 비교하여 각각 76.1%와 71.4%의 생존율을 보였으며 통계학적으로 유의성을 보이지 않았다.

4. Characterization of survived hES cells, following vitrification

동결융해 후 hES cell의 고유한 성격을 그대로 유지하는지에 대하여 대조군과 비교하여 줄기세포 표지인자인 alkaline phosphatase와 SSEA-3, 4를 면역항체염색법을 이용하여 확인한 결과 hES cell의 특징이 변하지 않았음을 확인하였다 (Fig. 5).

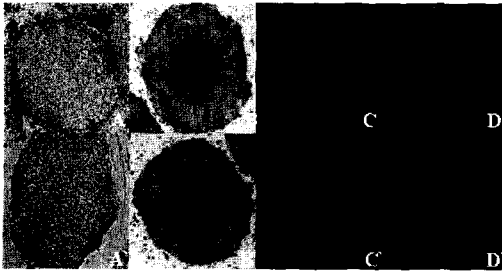


Fig. 5. Immunohistochemistry of vitrified ES cells.
 A) Control hES, B) AP staining, C) SSEA-3,
 D) SSEA-4
 A') Vitrified hES, B') AP staining, C') SSEA-3,
 D') SSEA-4.

5. 유리화 동결된 인간 배아줄기세포의 자발적 분화유도 및 표식인자의 발현

동결융해한 hES cell을 자연적 분화를 시킨 후 hES cell의 미분화 표식인자인 Oct-4와 3가지 germ layer marker를 비교하였다. EB가 시간이 지남에 따라 oct-4의 발현량이 줄어들고 반면에 각각의 germ layer marker인 neurofilament (ectoderm), α -fetoprotein (endoderm), α -cardiac actin (mesoderm)의 발현량은 증가하는 것이 관찰되었다 (Fig. 6, 7).

고찰

동결보존법중 일반적인 slow-freezing 방법은 programmable embryo freezing machine을 사용하는 관계로 많은 시간과 비용이 필요로 한다. 이에 반해 유리화 동결법은 짧은 시간과 간단한 액체질

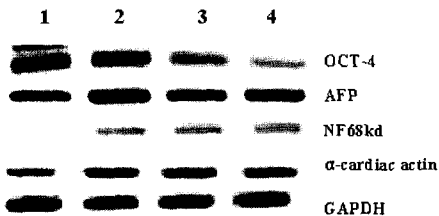


Fig. 6. Gene expression profiling of vitrified ES cells by differentiation.
 Lane 1 : undifferentiated ES cells, Lane 2 :
 EB day 5, Lane 3 : EB replating after 5days,
 Lane 4 : EB replating After 10days.

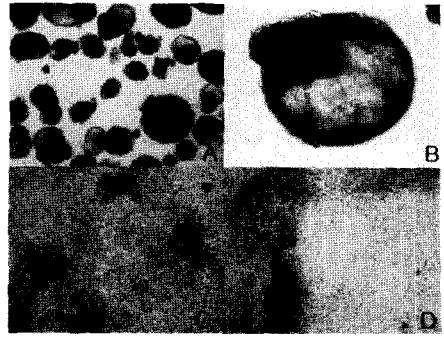


Fig. 7. EB formation and spontaneous differentiation of hES cells.
 A) Day 5 old EBs , B) Typical cystic EB,
 C) EB replating after 5days, D) EB replating after 10days.

소 보관기만을 필요로 한다. 유리화 동결법은 현재 알려진 포유류 난자를 보관하는 방법 중 가장 앞서 있는 방법이며 동물의 난자 및 배아뿐만 아니라 인간의 생식세포나 배아의 동결보존에 적극적으로 활용되고 있다 (Hong 등, 1999; Cha 등, 2000; Chung 등, 2000; Choi 등, 2000; Yoon 등, 2003). 최근 장기와 조직을 보관하는 방법으로 유리화 동결법이 중점적으로 개발되고 있는데 이는 slow-freezing시 생기는 ice crystal formation을 줄일 수 있는 방법이 최선의 동결법으로 유리화 동결법이 제시되었기 때문이다. 이미 Yoon 등 (2000)은 유리화 동결법에 의하여 동결 융해된 인간 난자가 착상과 건강한 신생아가 태어났음을 보고하였다.

본 연구에서는 인간 배아 줄기세포를 OPS와 grid를 이용하여 여러 가지 유리화 동결법에 의해 동결 융해 후 생존율과 배아줄기세포의 특징을 그대로 유지하고 있는지 조사하였다. 동결 융해 후의 생존율은 EG와 DMSO, EG와 PROH를 동결액으로 사용하여 OPS를 이용한 유리화 동결을 시행하였을 때 각각 38.1%와 50.84%의 생존율을 보였으며, 같은 방법으로 EM grid를 이용하였을 때는 각각 60.8%와 65.7%의 생존율을 관찰할 수 있었다. 반면 EG나 PROH 한가지만을 동결액으로 사용하였을 때는 각각 2.4%와 0%로 매우 낮은 생존율을 보임을 관찰하였다. 이는 slow freezing 방법과 비교하여 유리화 동결법은 높은 농도의 항동해제를 사용하므로 세포내의 ice crystal 형성을 방지할 수

있기 때문인 것으로 사료된다 (Martino 등, 1996). Vajata 등 (1998)은 OPS를 이용하여 소의 난자를 이용하여 유리화 동결 용해한 결과 높은 임신율을 보였으며, Park 등(2000)의 연구에서도 grid를 이용하여 생쥐의 성숙난자를 유리화 동결법에 의해 동결 용해하였을 때 높은 생존율을 보고하였다. 본 연구에서도 OPS와 grid를 사용하여 생존율을 비교하였을 때 grid 사용시 보다 양호한 생존율이 관찰되었는데 이는 grid가 열 전도율에서 OPS보다 더 높고 동결용액의 양이 적었기 때문이라고 사료된다. 그리고 EG나 PROH 한가지만을 사용하였을 때 생존율이 떨어지는 이유는 항동해제의 노출시간이나 농도가 적당하지 않아서 생존율이 떨어지는 것으로 사료되는데 이러한 결과는 Emiliani 등 (2000)이 동결액의 노출시간이나 농도, 세포내 침투속도등에 의하여 생존율에 차이가 보였던 결과와 일치되는 것이었다.

본 연구 결과 실험에 사용된 동결 용해한 배아 줄기세포는 대조군과 비교하여 불 때 계대배양 초기 3번째까지의 생존율이 대조군과 비교하여 떨어지는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 높은 농도의 항동해제의 사용이 일차적으로 세포독성을 초래하였거나 세포가 dehydration이나 rehydration 될 때 세포에 다소간의 손상을 초래한 것으로 사료된다 (Chen et al., 2001). 그러나 4번째 계대배양 이후부터는 대조군과 비교하여 생존율이 통계학적으로 유의성을 보이지 않으므로 이러한 세포내 독성이 회복됨을 보여준다. 또한 가장 좋은 생존율을 보인 EG와 PROH를 혼합한 동결액에 grid를 사용하여 동결 용해한 인간 배아 줄기세포의 표식인자와 분화능력을 확인한 결과 대조군과 비교하여 불 때 줄기세포 표식인자와 분화능력이 변함없이 유지됨을 관찰할 수 있었다.

본 연구 결과 grid를 사용하여 고농도의 EG와 PROH를 동결액으로 이용한 유리화 동결법이 hES cell을 냉동보존하는데 가장 효율적인 생존율을 보이는 방법임을 관찰할 수 있었다. 그러나 grid를 이용한 방법은 액체질소에 직접 침지함으로써 액체질소를 통한 virus의 감염이 있을 수 있으므로 (Tedder et al, 1995) straw를 이용한 유리화 동결법이 검토되어야 할 것이며, grid를 사용한 동결은 대

량의 세포를 동결하는 데에는 적합하지 못하므로 대량의 세포를 동결하는 방법 또한 향후에 개발되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ali J and Shelton N. 1993. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 99:471-477.
- Cha KY, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Han SY, Choi DH and Yoon TK. 2000. Freezing immature oocytes. *Mol. Cell Endocrine*, 169: 43-47.
- Chen SU, Ho HN and Yang YS. 2001. Vitrification of embryos and oocytes with 5.5 mol/l ethylene glycol and 1.0 mol/l sucrose. *Hum. Reprod.*, 16:1778-1779.
- Chen SU, Lien YL and Chen HF. 2000. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum. Reprod.*, 15:2598-2603.
- Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK and Cha KY. 2000. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertil. Steril.*, 74: 838-839.
- Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Han SY, Choi DH and Cha KY. 2000. *In vitro* blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil. Steril.*, 73: 545-551.
- Emiliani S, Bergh MV, Vannin N-S, Biramane J and Englert Y. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reprod.*, 15:905-910.
- Evans MJ and Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse

- embryos. *Nature*, 292:154-156.
- Gearhart J. 1998. New potential for human embryonic stem cells. *Science*, 282:1061-1062.
- Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee Bill and Cha KY 1999. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil. Steril.*, 72:142-146.
- Karlsson OM. 2002. Cryopreservation: Freezing and Vitrification. *Science*, 296:655-656.
- Keller G and Snodgrass HR. 1999. Human embryonic stem cells: the future is now. *NAT Med.*, 5:151-152.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA and Forest KT. 1999. Adapting a proven method for flash-cooling protein crystals to the cryopreservation of live cells. *Nature Biotechnol.*, 17:1234-1236.
- Lane M, Schoolcraft WB and Gardner DK. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*, 72:1073-1078.
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G and Tucker MJ. 2002. Potential Importance of Vitrification in Reproductive. *Medicine Biol. Reprod.*, 67: 1671-1680.
- Martino A, Songasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocyte cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.
- Park SE, Lee KA, Son WY, Ko JJ, Lee SH and Cha KY. 1997. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil. Steril.*, 68:920-926.
- Rall WH and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G and Trounson AO. 2001. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reprod.*, 16:2187-2194.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A and Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnol.*, 18:399-405.
- Shaw JM, Ward C and Trounson AO. 1995. 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.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.
- 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.
- Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ and Cha KY. 2000. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril.*, 74: 180-181.
- Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM and Cha KY. 2003. Live birth after vitrification of oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril.*, 79:1323-1326.

(접수일: 2003. 12. 1/ 채택일: 2003. 12. 20)