

## 돼지 배아의 유리화 동결 시 Cytochalasin B의 농도와 처리 시간에 의한 효과

안미현 · 김인덕 · 석호봉<sup>†</sup>  
단국대학교 생명자원과학대학 동물자원과학과

### Effects of Survivability of Frozen Porcine Embryos by Different Concentrations and Exposed Times of Cytochalasin-B before Vitrification

M. H. Ahn, I. D. Kim and H. B. Seok<sup>†</sup>

Department of Animal Science, College of Life Science, Dankook University, Cheonan

#### SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the effects of Cytochalasin B treatment on the survivability. The different concentration and exposed times of CB of porcine embryos frozen by vitrification were observed..

The results were summarized as follows ;

1. The survivability rates of the porcine embryos treated CB(60.5%) were significantly higher than non-treated(32.8%)( $p < 0.1$ ). However the recovered with normal morphology rates(84.2%) were no significantly different than non-treated(81.9%).
2. We observed by different concentration of CB treatment, the group of CB treated with 7.5  $\mu\text{g/ml}$  were significantly showed a higher of normal morphology(44/45; 98%) and viability rate(33/45;73%) than other groups(morphology: 65~70%, viability: 15~74%)( $p < 0.05$ ). While the control was lower as 70% of morphology and 38% of viability.
3. We examined exposed time of *in-vitro* CB treated embryos, the group of more than 20 minutes exposed were significantly were observed a higher rates of normal morphology and viability( $p < 0.05$ ). And the group of 13 minutes, 14,000 rpm centrifuged(64%) were significantly higher than non-centrifuged(36%).

Survivability of porcine embryos were improved in CB treated group. It suggested that 7.5  $\mu\text{g/ml}$  concentration of CB treatment, 20 minutes exposed times and 13 minutes, 14000 rpm centrifuged prior to vitrification improve normal morphology and survivability rates.

(Key words : cytochalasin-B(CB), concentration, exposed times, porcine embryos, centrifuged, *In-vitro* culture)

서 론

배아의 동결에 관한 연구는 1972년 Whittingham이 DMSO를 사용하여 완전 동결에 의해 생쥐

본 연구는 한국과학재단 지역대학우수연구과제(과제번호 2002 : R05-2002-000-00388-0)의 지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 급속히 가속화되었다. 기존의 완만 동결은 많은 시간이 소요되었으며 독성이 강한 동해방지제에서 난자의 노출 시간이 길어져 동결 상해를 가져왔다. 그러나 1985년 Rall과 Fahy가 유리화 동결(vitrification)을 보고한 이후 많은 연구가 진행되어 왔다. 유리화 동결(vitrification)은 고농도의 동결보존액을 첨가하여 점성을 증가시켜 배아 손상의 주원인인 세포 내외부의 빙결 형성을 방지하고 빠른 동결이 가능하여 최근 포유류 배아의 동결 보존에 많이 사용되기 시작하고 있다.

유리화 동결법은 완만 동결법에 비해 동결 과정이 간단하고 시간이 적게 걸리며 세포 내외에 결빙형성(ice crystal formation)이 되지 않을 뿐 아니라 고가의 programmed freezer가 필요치 않아 경비가 절약되는 등 여러 가지 장점을 가지고 있다. 이러한 동결 보존은 생쥐, 소, 토끼 등에서 많은 성과와 체계가 확립된 반면 낮은 온도에 특히 민감한 돼지의 경우 그 연구결과가 적으며 결빙형성의 문제점이 성과도 거의 없다. 이러한 문제점들을 방지하기 위하여 배아의 동결 보존 시 본 연구에서 전처리로 사용하려고 하는 cytochalasin B(CB)는 난자 동결시 대부분의 동결보존물질이 세포가 냉각되기 전에 세포골격의 성분을 탈극화하여 세포에 독성을 일으켜 죽게 하는 원인이 된다. 또한 microfilament inhibitor로서 actin polymerization을 방해하고 세포질막을 보다 신축성 있게 만들어 cytoskeletal disruption을 방지하는 작용이 있다고 알려져 있다(2002. J. R. Dorbrinsky).

따라서 본 연구에서는 유리화 동결 시 CB는 전처리 하는 경우 CB가 유리화 동결 후 돼지 배아의 형태가 정상적으로 되돌아오는 회수율과 생존률에 미치는 영향, 각기 다른 CB의 처리시간과 농도별에 따른 영향을 알아보고자 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난소 및 난포란의 채취

본 실험에 사용된 난소는 충남 (주) 사조산업 도축장에서 도축되는 암돼지로부터 적출한 난소는

0.9% NaCl(30~35℃)의 생리식염수기에 담아 1~2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실에서 0.9% NaCl로 2회 세척한 다음, 38℃로 조정되어 있는 항온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란의 체외성숙은 TCM-199(Earle's supplement) 배지에 첨가제를 첨부하여 사용하였다. 성숙 배양액은 4-well culture dish(Nunc, Denmark)에 0.6 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 2~3시간 동안 38.5℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 well당 40~50개의 미성숙 난포란을 적하하고 44시간 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외 성숙 배양액들은 pH 7.4, 삼투압은 280~310 mOsmol로 조정하여 사용하였다.

### 3. 정자의 준비 및 체외수정

각각의 성숙 배지에서 체외배양 시킨 난포란들은 0.1% hyaluronidase를 이용하여 cumulus cells을 제거한 뒤, pH 7.8, 삼투압 260~280 mOsmol로 조정된 modified Tris-buffered medium(mTBM) 수정 배지에 세 번 세척한 후 4-well culture dish에 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간 동안 38.5℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 하루 전부터 충분히 평형시킨 수정배지에 well당 40~50개의 난포란을 적하하였다. 체외수정을 위한 정자는 동결 정액을 percoll 처리를 한 후에 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능획득을 유지시킨 정자 부유액을 성숙 난포란에 주입하여 6시간 매정시켰다.

### 4. 체외배양 및 우수 배아 선발

체의 수정시킨 수정란들은 수정 6시간 후 난자에 붙어있는 cumulus cell을 0.1% hyaluronidase을 이용해서 완전히 제거 후 0.5% BSA가 함유하고, pH 7.4, 280~300 mOsmol로 조정된 NCSU23 media를 0.5 ml씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간 동안 38.5℃, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 평형시킨 배지에 수정란들을 48시간 동안 배양시켰다. 그 후 48시간째 배 발달이 시작된 난자들만 따로 모아 0.1 mg/ml cysteine, 10 IU

/ml eCG, 10 IU/ml hCG, 10 ng/ml EGF, 0.4% BSA, 10 % FBS, 10% pFF가 첨가된 NCSU23에 옮겨서 체외 배 발달을 유도하였다. 체외 발달을 유기한지 6일째에 우수한 상실배와 배아를 선발하였다.

### 5. 수정란의 CB 처리 및 농도별, 시간별 처리 및 유리화 동결·융해

우수한 morulae와 blastocyst를 선발한 후 CB 처리를 위해 유리화 동결 전에 7.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 cytochalasin B (Sigma, C-6762)에 20분간 노출시켰으며 처리 후에는 비처리군과 같은 방법으로 유리화 동결을 실시하였다. 또한 CB의 각기 다른 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 30  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 CB 처리를 하였으며, CB의 다른 처리 시간별의 영향을 알아보기로 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60분의 CB 노출을 하여 원심처리군과 비처리군으로 나누어서 같은 방법으로 유리화 동결을 실시하였다. 동결 방법은 변형시킨 Vajta 방법(G. Vajta, 1999)을 이용하였다. Vitrification 동결한 수정란의 융해는 30~35°C의 융해액에 직접 침지하였으며, 급속 융해 후 culture media에 배양하였다. 그 후 수정란의 배 발달 상황을 육안으로 확인하였으며, bisbenzimidazole (Hoechst33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포의 활력도와 생존률을 확인하였다.

### 6. 통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 12회 이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 SAS package(1996)를 이용하여 분산분석을 하였으며, 처리간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

## 결 과

### 1. 유리화 동결 시 CB 처리군과 비처리군의 난자 회수율과 생존율에 미치는 영향

OPS straw당 5~6개의 체외 배양한 배아를 담아 유리화 동결하였고 융해 후 CB처리와 CB비처리군의 정상 배아 형태와 배반포 형성에 의한 생존율을 관찰하였다(Table 1). 유리화 동결 전 CB처리 후 형태학적 정상회수율 84.2%(64 $\pm$ 0.6)는 비처리 회수율의 81.9%(50 $\pm$ 0.5)보다 조금 높았으나 처리군 간의 유의차는 인정되지 않았다. 융해 후 72시간 생존율은 각각 60.5%(46 $\pm$ 0.6), 32.8%(20 $\pm$ 0.6)로 1% 유의차를 보였다( $p < 0.1$ ).

### 2. 유리화 동결 시 CB 농도에 의한 효과

CB 농도를 처리하지 않은 것부터 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 30  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 효과를 조사하였다(Table 2). 7.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 처리군의 정상형태의 회수율 98%로 다른 농도의 처리군의 65~76%보다 높았고, 융해 후 24시간 배아 생존율은 67%로

Table 1. Survival comparison between CB treated and CB non-treated before OPS vitrification

CB treatment	No of examined*	No(%) of recovered	No(%) of blastocysts survival after warming / culture time		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
+	76	64 $\pm$ 0.6 (84.2)	60 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup> (78.9)	55 $\pm$ 0.5 (72.4)	46 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup> (60.5)
-	61	50 $\pm$ 0.5 (81.9)	33 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup> (54.1)	30 $\pm$ 0.5 (49.2)	20 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup> (32.8)
Total	137	114(83.2)	93(67.9)	85(62.0)	66(48.2)

\* Filled in 5~6 embryos/OPS straw and examined 12 straws per each treatment. Mean $\pm$ standard error. experiments were repeated twelve times.

<sup>ab</sup>: Values with different superscripts within columns are significantly different( $p < 0.1$ ).

Table 2. Survival of the porcine thawed embryos treated with different concentrations of CB before vitrification

CB concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovered with normal morphology/vitrified No. %	No. of survival after thawing	
		12 h No. %	24 h No. %
0.0	56/80 (70) <sup>b</sup>	30/80 (38)	26/80 (33) <sup>b</sup>
2.5	53/72 (74) <sup>b</sup>	18/72 (25)	16/72 (22) <sup>b</sup>
5.0	45/59 (76) <sup>b</sup>	13/59 (15)	9/59 (15) <sup>b</sup>
7.5	44/45 (98) <sup>a</sup>	33/45 (73)	30/45 (67) <sup>a</sup>
10.0	40/56 (71) <sup>b</sup>	32/56 (57)	31/56 (55) <sup>a</sup>
12.5	55/85 (64) <sup>b</sup>	40/85 (47)	35/85 (41) <sup>a</sup>
15.0	40/60 (67) <sup>b</sup>	17/60 (28)	12/60 (20) <sup>b</sup>
30.0	40/62 (65) <sup>b</sup>	20/62 (32)	14/62 (23) <sup>b</sup>

\* Embryos survival were examined by the blastocystic morphology after cultured and by Hoechst 33342 staining.

\*\* <sup>a,b</sup> Values with different superscripts within in each column were significantly different ( $P < 0.05$ ).

Table 3. Survivability of porcine embryos by different exposure times in case of centrifuged and non-centrifuged embryos which treated with 7.5  $\mu\text{g/ml}$  CB before vitrification

Embryos treatment	Exposure time(min)	No. of recovered normal morphology/vitrified No. %	No. of survival after thawing	
			12 h No. %	24 h No. %
Centrifuged	0	36/90 (40)	12/90 (13)	8/90 ( 9)
	10	30/84 (36)	30/84 (36)	24/84 (29)
	20	65/80 (81)	55/80 (69)	51/80 (64)
	30	54/75 (72)	45/75 (60)	33/75 (44)
	40	66/96 (69)	60/96 (63)	54/96 (56)
	50	44/82 (54)	42/82 (51)	38/82 (46)
	60	20/80 (25)	10/80 (12)	5/80 ( 6)
Non-centrifuged	0	32/74 (43)	16/74 (22)	10/74 (14)
	10	48/90 (53)	24/90 (26)	18/90 (20)
	20	56/88 (64)	32/88 (36)	32/88 (36)
	30	52/80 (65)	28/80 (35)	16/80 (20)
	40	56/88 (64)	40/88 (45)	32/88 (36)
	50	54/84 (64)	18/84 (21)	12/84 (14)
	60	45/80 (56)	25/80 (31)	20/80 (25)

\* Embryos survival was examined by the morphology after culture and by Hoechst 33342 staining.

탄 농도의 15~55%보다 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 10  $\mu\text{g/ml}$ 와 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서도 유의적인 차이를 보였으나 7.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 수준에는 미치지 못하였다.

### 3. 유리화 동결 시 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CB 전처리에서 처리시간별에 의한 효과

CB 7.5  $\mu\text{g/ml}$  농도의 전처리 후 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분별로 일정한 CB 농도 상태에서 정상난의 회수율과 배양후 생존율을 조사하였다(Table 3). 20분 노출시켰을 때 정상 난 회수율과 24시간 생존율은 각각 81%, 64%로서 다른 시간별 처리에 비하여 25~69%, 6~56%로서 높았으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 원심처리군(13,000 rpm, 15 min)과 원심처리하지 않은 군으로 각각 실험한 결과 20분의 처리군이 각각 난회수율과 융해 후 생존율에서도 높은 결과를 보였다. CB처리 후 원심처리가 비원심처리보다 난자 생존에 더욱 효과적인 결과를 나타내었다

## 고 찰

유리화 동결법은 고농도의 동결 보존액을 사용함으로써 난자 및 배아의 빙결 형성을 방지하여 포유류 배아의 동결 보존에 적용할 수 있는 새로운 동결방법으로 생각되고 있다. 하지만 아직까지 저온에 극도로 예민한 돼지의 경우 세포 내에 빙결이 형성되는 문제점을 극복되어야 할 과제로 남아 있다. 최근 많은 연구자들이 포유류 동물의 수정란 동결에 많은 관심을 보이고 있으며 몇몇 꾸준한 연구로 산자생산까지 하고 있으며 대부분 *In-vivo* 난에서 가능하고 *In-vitro* 난에서는 아직까지 어려운 점이 많아 실효를 거두지 못하고 있다.

본 연구에서는 돼지 *In-vitro* 생산 배아를 유리화 동결 시 발생하는 cytoskeleton의 손상을 방지하고자 CB로 전 처리군과 비처리군의 배아에 대한 영향을 비교하였다. CB는 cytoskeleton에 특이적, 가역적 작용을 가지고 있다고 알려져 있으며, Dobrinsky(2002)등은 *In-vivo* 돼지 배아의 유리화 동결 시 CB를 전처리를 함으로써 유리화 동결 융해 후에 7마리의 모돈 내에 224개의 배아를 이식을 하

여 29마리의 자돈을 생산하였다는 연구 결과를 발표하였다. 또한 Volodimir Isachenko(1998) 등은 돼지 미성숙 난자를 CB 처리군과 비처리군으로 나누어 전처리한 후 유리화 동결 융해 후에 체외 배양한 결과 MII stage까지 성숙률이 각각 11(22%), 3(5.6%)로, 유리화 동결 전에 CB 전처리를 함으로써 난자의 세포골격을 안정화 시키는데 기여한다는 연구 결과를 발표하였다.

본 연구의 결과에서 돼지 배아의 유리화 동결 융해 후 정상적인 형태를 나타낸 비율에서는 CB 전 처리군과 비처리군이 각각 84.2%, 81.9%로 유의한 차이를 보이지는 않았으나, 72시간 췌 생존율의 결과에서는 각각 60.5%, 32.8%로 유의적( $p < 0.1$ )인 차이를 나타내었다.

배아 생존율에서 CB 처리군과 비처리군의 유의적인 차이를 나타낸 결과로 미루어 보아, 정상적인 형태를 나타낸 비율에서 유의적인 차이가 나지 않았던 것은 육안으로 검사함으로써 배아 내의 미세소관의 파열이나 그 외 다른 세포막의 손상을 확실하게 검경하지 못한 것으로 사료된다. 이 결과로 미루어 보아 유리화 동결 전 CB의 전처리가 돼지 배아의 cytoskeleton의 안정화에 기여함으로써 융해 후에는 cytoskeleton의 손상을 방지하였기 때문이라고 생각되며, CB 처리군은 CB 비처리군에 비해 높은 viability와 cool osmotic stress로부터의 손상을 덜 받는 것으로 사료된다.

두 번째 연구에서는 유리화 동결 시 CB 전처리의 농도별 처리 즉 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 30  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 배아에 미치는 영향을 알아본 결과 7.5  $\mu\text{g/ml}$ 가 정상적인 형태를 나타낸 난 회수율이 98%로 다른 처리군과 유의적인 차이를 나타내었으며, 24시간 생존율에서 67%의 유의적인 차이를 보여 주었다. 이는 Dobrinsky, Beebe 등이 7.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 가장 좋은 효과를 보였다는 연구 결과와 일치하였다.

그러나 Dobrinsky 등에서 유리화 동결 시 CB 노출 시간과는 상이한 연구 결과를 보여 주었다. 그의 연구 결과에 따르면 CB 노출 시간이 45분으로 처리를 하였으나 본 연구 결과에서는 20분의 노출 시간과 동결 전에 원심 처리를 하였을 때 가장 좋은 효과를 나타내었으며, Beebe 등(2002)의

연구 결과와 일치하였다.

이러한 결과들은 유리화 동결 전 CB의 전 처리에 과다한 고농도와 과다 노출시간은 CB 특유의 독성으로 인해 수정란에 상해를 입히는 것으로 사료된다. 결론적으로 CB가 유리화 동결 시 돼지 수정란의 cytoskeleton의 안정화에 기여하며, 돼지 배아의 유리화 동결 시 미세구조 안정화 물질로 CB가 사용될 수 있으리라 생각한다. 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CB 농도에서 20분의 처리시간과 원심분리에 의한 처리하였을 때 돼지 배아의 유리화 동결 시 가장 적합한 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구는 돼지 배아의 유리화 동결 시 CB 처리군과 CB 비처리군의 영향을 비교하였다. CB의 농도별, 처리 시간별로 처리한 뒤 유리화 동결 용해 후 정상적인 형태 회수율과 생존률을 각각 조사하였다.

1. CB를 전 처리한 군과 비처리군의 정상적인 형태율이 각각 84.2%, 81.9%로 유의한 차이가 없었으나, 용해 후 72시간 쯤 생존률의 결과에서는 각각 60.5%, 32.8%로 유의성( $p < 0.1$ )이 검증되었다.
2. CB 농도별 생존률에 미치는 영향은 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리군이 다른 처리군에 비하여 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 정상 형태율 95%와 용해 후 생존률 73%로서 다른 농도에 비하여 65~76%, 15~57%보다 각각 높았다.
3. 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 CB 전처리의 처리 시간에 따른 영향은 20분 처리하였을 때 정상적인 형태율은 81%로 다른 처리군(25~69%)보다 높았고, 24시간 쯤 생존률의 결과로도 64%, 6~56%로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 원심 처리군과 비처리군에서도 CB를 20분으로 처리하였을 때 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 원심 비처리군보다는 원심 처리군이 좀 더 높은 결과를 보여 주었다.

## 참고문헌

- Younis AI, Keskinetepe L, Simplicio AA, Gould K and Brackett BG. Effects of egta and cytochalasin B during freezing and vitrification of immature and mature bovine and rhesus monkey(*M. mulatta*) oocytes. *Theriogenology*, 361.
- Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A and Nottle MB. 2002. Piglets born from centrifuged and vitrified early perihatching blastocysts. *Theriogenology*, 57: 2155-2165.
- Bethelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui M. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, 41:116-124.
- Casella J, Flanagan H and Lin S. 1981. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filament formed during platelet shape change. *Nature*, 293:302-305.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction*, 62:564-570.
- Dobrinsky JR. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57:285-302.
- Dobrinsky JR and Johnson LA. 1994. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification : A study of *in vitro* development. *Theriogenology*, 42:25-35.
- Dobrinsky JR, Ling CR and Johnson LA. 1997. Stability of microfilaments during embryo cryopreservation. *Theriogenology*, 47:343 abstr.
- Dobrinsky JR, Nagashima H, Pursel VG, Schreiber LL and Johnson LA. 2001. Cryopreservation of morula and early blastocyst stage swine embryos : Birth of litters after embryo transfers. *Theriogenology*, 55:303 abstr.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson

- LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Bio Repro.*, 62:564-570.
- Escriba MJ and Garcia-Ximenez F. 1999. Electroactivation of rabbit oocytes in an hypotonic pulsing medium and parthenogenetic *in vitro* development without cytochalasin B-diploidizing pretreatment. *Theriogenology*, 51:963-973.
- Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva, McCue PM, Seidel Jr GE and Squires EL. 2002. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin B and/or trypsin. *Theriogenology*, 58:717-720.
- Manabu Kawahara, Tadashi Mori, Hoami Tanaka and Hiroshi Shimizu. 2002. The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in porcine enucleated oocytes. *Theriogenology*, 8618 : 1-15.
- Mezzalira A, Vieira AD, Barbieri DP, Machado MF, Thaler Neto A, Bernardi ML, Silva CAM and Rubin MIB. 2002. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B. *Theriogenology*, 472.
- Modinski JA. 1980. Preimplantation development of microsurgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with cytochalasin B on enucleated eggs. *National Library of Medicine*, 60:153-161.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF and Nottle MB. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, 37:839-850.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG and Nottle MB. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*, 374: 416.
- Plante C, Pollard JW, Kobayashi S and Leibo SP. 1993. Chilling sensitivity of porcine morulae. *Theriogenology*, 39:285 abstr.
- Pollard JW and Leibo SP. 1986. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101 -106.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573.
- Schkoff ME, Oskowitz SP and Poers RD. 1989. Ultrastructural observations of human mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol. Reprod.*, 40:379-393.
- Theodoropoulos PA, Gravanis A, Tsapara A, Margioris N, Papadogiorgaki E, Galanopoulos V and Stourmaras C. 1994. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. *Biochem. Pharmacol.*, 47:1875-1881.
- Trounson AO. 1990. Cryopreservation. *Br. Med. Bull.*, 46:695-708.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997. Vitrification of porcine embryos using the open-pulled straw(OPS) method. *Acta. Vet. Scand.*, 38:349-352.
- Vagita G, Holm P, Kumayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1998. Open-pulled straw(OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:53-58.
- Vincent C, Garnier V, Heyman Y and Renard JP. 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and *in-vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 89:809-820.
- Volodimir Isachenko, Carles Soler, Eugenia Isachenko, Francisco Perez-Sanchea and Valentin Grishchenko. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes : effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, 36: 250-253.
- 안미현, 홍대옥, 석호봉. 2002. Vitrification of in-vitro cultured porcine embryos treated with cytochalasin B. *대한수의학회지*, 42:55.
- 안미현, 김인덕, 석호봉. 2003. Effects of different

exposed times and concentrations of *in-vitro* porcine embryos pre-treated with cytochalasin B. 대한수의학회지, 4: 70-71.

이봉경, 김은영, 남화경, 이금실, 윤산현, 박세필, 임진호. 1998. 초자화 동결된 생쥐 미수정란의 cytoskeleton 및 염색체 변화. 대한불임학회지, 25: 287-292.

최원준, 이순애, 이종학, 백원영. 2003. Cytochalasin B가 생쥐 난자의 초자화 동결시 생존률과 체외 발달률에 미치는 영향. 대한산부학회지, 46:317-322.

---

(접수일: 2003. 12. 1/ 채택일: 2004. 1. 16)