

CPS, 기존 Straws, OPS 방법을 이용한 마우스 성숙난자 및 수정란의 유리화 동결 비교

석 호 봉[†]

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학전공

Comparison on Vitrification of Mouse Oocytes and Embryos Using Closed Pulled Straws (CPS), Conventional Straws and Open Pulled Straws (OPS)

H. B. Seok[†]

Department of Animal Science, Dankook University

SUMMARY

This study was conducted to comparing on vitrification of mouse oocytes and embryos using CPS, conventional straws and CPS by evaluating in morphological survival for oocytes, and embryonic cleavages and blastocyst formation for embryos. The morphological survival *in vitro* after thawing of vitrified oocytes using CPS (75%) and conventional straws (72%) were significantly higher ($p<0.05$) than that using OPS (68%). The blastocyst formation rates of vitrified embryos using CPS (48.6%) and unfrozen control embryos (56.0%) were significantly higher ($p<0.05$) than those of conventional straws (43.4%) and OPS (37.7%). The rates of morula formation were also higher to control, CPS, conventional straws and OPS in orderly. These results show that CPS has the advantages of achieving a high survival and safety preservation.

(Key words : conventional straws, CPS, mouse, OPS, vitrification)

서 론

수정란 동결 보존은 현재 그 처리 과정이 성공적으로 발전되고 있으나 난자 동결 보존은 난자의 생존율과 배 발달율이 낮아 결과적으로 실용성이 저조하다(Emiliani 등, 1999; Mandelbaum 등, 1998; Gook 등, 1995; Trunson과 Kirby, 1989). 최근 open pulled straws(OPS)와 같은 vitrification(유리화 동결)에 의한 난자 동결 기법은 포유동물 실험에서 효과적인 가능성을 제시하였다(Vajta 등, 1998; Mar-

tino 등, 1996). OPS 유리화 동결 기법은 소 난자 동결에서 급냉해의 영향을 미치는 단점이 있으나 conventional straw 법(기존 straw 법)보다 높은 배반포 형성률을 얻었다(Martino 등, 1996). OPS 유리화 동결 처리 방식은 기존 straw 법과 비교하여 동결 처리 시간이 단축되고, 가늘고 내벽이 얇은 pulled straw를 사용하므로 loading하는 양이 적고 filling이 신속하게 이루어져 동결 효과를 높여준다고 하였다(김 등, 2004; Vajta 등, 1998).

동결 보존 후 난자의 생존율에 영향을 미치는

* 본 연구는 2005학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

[†] Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

요인은 동결-융해 과정 중 사용되는 동해 방지제의 종류와 농도 및 처리시간, 동결 방법과 융해 후 사용한 체외 배양 배지 등이 있다(Vajta와 Kuwayama, 2006; 김 등, 1995). 전에는 독성이 강한 침투성 동해 방지제로 DMSO, glycerol, 1,2-PROH를 사용하였으나 최근에는 ethylene glycol(EG)을 많이 사용하고 있고(Martino 등, 1996), 비침투성 동해 방지제로는 sucrose나 glucose를 가장 많이 사용하고 있다(김 등, 1995). 한편, 마우스 수정란의 체외배양 배지로는 DPBS, Ham's F-10, TCM 199에 혈청, Ca-lactate, sodium 염, 호르몬, 성장인자, 아미노산, 기타 요인을 첨가한다. 동결 보존용기의 소재는 플라스틱, 유리, 금속, nylon 줄 등이 있는데 열 전달이 신속하게 이루어지고 filling하기 쉬운 재료가 좋으며 실제 사용되는 것은 open pulled straw(OPS), electron microscopic grid (EMG), nylon loop system(NLS) 등이 있고 현재까지의 비교 성적은 OPS 법이 가장 우수하였다(김 등, 2004). 효과적인 배양 체계를 위한 fetal cord serum을 첨가하거나 난관 상피 세포와의 공배양(이 등, 1997)으로 일부 배양이 까다로운 인체 난자는 물론 소, 돼지, 애완동물의 난자 배양에 사용되고 있다.

Chen 등(2001)은 유리화 동결 방식으로 처리한 마우스 난자에서 융해 후 microtubules에 심각한 손상이 나타났다고 하였으나, 최근 몇몇 학자들은 OPS 법이 기존 straw 법과 비교할 때 생존율이 개선되었다고 하였다(Bagis 등, 2005; Isachenko 등, 2005; 김 등, 2004). Closed pulled straw(CPS) 방법은 액체 질소에 직접 접촉하지 않는 폐쇄적 처리 방법으로 OPS와 같이 소량의 동결액으로 빠른 온도 변화를 주는 특징이 있다. 이 방법은 기존 straw 법과 같이 폐쇄된 상태로 동결되며 외부와 접촉하는 OPS 방법처럼 액체 질소나 주변 접촉물로부터 오염되는 위험이 배제되며 온도 변화에 안전하다는 이점이 있다(Kuleshova와 Shaw, 2000; Larman 등, 2006). 이러한 맥락에서 이들 간의 비교 실험이 가지는 의의는 크다고 할 수 있다.

본 연구에서는 CPS와 기존 straw 법, OPS를 이용한 성숙 마우스 난자의 유리화 동결-융해 후 형태학적 생존율과 과배란 처리 후 얻은 수정란의

유리화 동결-융해 후 세포 분화율과 배 발달률을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험은 동물 사육실에서 사육된 ICR 계통의 마우스를 공시 동물로 사용하였다. 자성은 4~6주령, 체중은 20~30g, 웅성(교배종)은 12~16주령, 체중은 30~45g으로 한 케이지에 한 마리씩 사육하면서 번식 능력을 확인하였다. 사육실 환경은 온도(22~25°C), 일조(11:13,명암), 환풍은 자동 조절되었고 사료와 물은 자유 급식하였다.

2. 과배란 처리, 성숙 난자 및 수정란 회수

성숙 난자를 회수하기 위하여 PMSG(Intervet)와 HCG(Intervet)을 각각 5~10 IU씩 복강 내 주사하여 과배란을 유도하였다. HCG 투여 16시간 후 수란관 좌우를 절개하고 난관팽대부에서 cumulus-oocyte-complex(COCs)를 회수하여 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 첨가한 human tubal fluid(HTF) 배지에 담았다. 과립세포는 80IU/ml hyaluronidase 포함 HTF로 pipetting하여 제거하였다. 수정란의 회수를 위하여 HCG 주사 후 동일 계통의 웅성생쥐와 합사시켜 자연 교미를 유도하였다. 70~75시간에 경추 탈구법으로 도살한 다음 0.5% BSA 첨가 HTF 액으로 관류 채란하였다.

3. 전처리액, 동결액 및 희석액의 제조

본 실험에 사용된 난자 및 수정란의 전처리액, 유리화 동결액, 희석액은 20% fetal cord serum이 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS, Gibco)를 이용하였다. Fetal cord serum은 병원에서 산모의 허락 하에 출생하는 태아의 제대혈액을 비동화하여 사용하였다. 전처리액은 1.5mol/1EG (Sigma)로서, 유리화 동결액은 5.5mol/1EG와 1.0 mol/1sucrose(EG5.5)(Ali와 Shelton, 1993)로서 그리고 희석액은 0.5, 0.25, 0.125mol/1sucrose 액으로 각각 조제하였다. pH는 0.1N의 HCl과 NaOH를 사용하여 7.4~7.6으로 삼투압은 280~285 mOsm/kg으로 보정하여 사용하였다.

4. CPS 유리화동결 및 융해

난자의 동결은 한번에 5~10개씩 나누어 1.5mol/1EG(ethylene glycol)에 5분 전 처리하였고 다시 EG 5.5mol액 한 방울(200 ul)로 1분 처리 후 평형을 유지하기 위해 배양기에 혼합하였다. Straw의 충전 방법은 주사기를 사용하여 동결 배지, 공기층, 난자와 배양액, 공기층, 동결 배지가 각각 2mm가 되도록 차례로 주입하고 양쪽을 폐쇄하였다. 충전이 끝난 straw는 액체 질소에 보관하였다가 보관 1시간~5일 정도에서 꺼내어 straw의 반대편 끝을 인지를 이용해 틈을 막고 0.5mol/l sucrose액 한 방울과 혼합하였다. 혼합한 난자는 4well dish에 0.5, 0.25, 0.125mol/l sucrose액에 나누어 2.5분 정도 holding 한 후 난자를 3회 이상 세척하였다. 수정란의 동결 및 융해는 난자와 동일한 방법으로 처리하였다.

5. 기존 Straw 유리화 동결 및 융해

난자를 1.5mol/l EG와 EG 5.5에 각각 전 처리한 후 CPS와 같은 방식으로 0.25cc straw에 주사기로 배지 1cm, 공기층 0.5ml, 난자액 2cm, 공기층 0.5 cm, 배양액 3.5cm 되도록 차례로 충전하였다 (Chen 등, 2000; Rall과 Fahy, 1985). 충전된 straw는 한쪽을 powder나 plug로 밀봉하지 않고 액체 질소에 침적하였다. 침적한 straw는 동결한 후 꺼내어 5초 동안 holding 하였다가 10초 동안 37℃ 물에 warming하였다. 회수한 난자는 0.5ml/l sucrose 액에 담아서 회석하였다. 수정란의 동결 및 융해는 난자와 동일한 방법으로 처리하였다.

6. OPS 유리화동결 및 융해

난자를 CPS와 같이 1.5mol/l EG와 EG5.5에 각각 전 처리한 후 pulled straw의 끝 부분에 인지를 접촉한 모세관 현상으로 난자를 포함한 동결액의 초미세방울(1~2 ul)이 되도록 빨아 올려 충전하였다 (Vajta 등, 1998). OPS 관은 곧바로 액체 질소에 담아 냉동 보관하였고 융해는 OPS 끝부분을 이용해 0.5mol/l sucrose 액에 담아 회석하였다. 수정란의 동결 및 융해는 난자와 동일한 방법으로 처리하였다.

7. 동결 융해 난자 및 수정란의 배양

동결 융해한 난자와 수정란을 씻어내고 0.4%

BSA 첨가 HTF 배지에 옮긴 다음 37℃ CO₂ 배양기에 배양하고 난자와 수정란의 배양 상태를 각각 3~5일 동안 관찰하였다.

8. 동결 융해 난자 및 수정란의 생존율 및 배발달을 조사

동결 융해한 난자는 회수율과 COCs의 형태학적 생존성 그리고 난구 세포의 탈락 정도, 난자의 ICM 형태의 변화와 색깔 변화를 중심으로 판정하였다. 형태학적으로 난자의 현미경적 구조가 투명대와 세포막 및 굴절성 세포질을 가지고 있는 경우 생존하는 것으로 판정하였다. 동결 융해한 수정란의 배발달률은 배양 후 3~5일간 2~8세포기, morula, blastocyst로 나누어 6~12시간 간격으로 관찰하였다.

9. 통계분석

실험 결과는 백분율로 표시하였으며 각 결과의 통계적 유의성은 *T-test*로 검정하였다.

결과 및 고찰

CPS, OPS 및 기존 straw 법에 의해 동결된 마우스 난자의 형태학적인 생존율은 Table 1과 같다.

배양동안에 추가 사멸된 난자는 비 생존군으로 포함하였다. CPS와 기존 straw 법의 형태학적 생존율은 OPS보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). OPS 법(68%)에 의한 난자의 유리화 동결은 CPS(75%)와 기존 straw 법(72%)에 의한 방법보다 형태학적으로 유의적인 손상이 인정되었다. 이는 OPS 처리

Table 1. Morphological survival of mouse oocytes after vitrification using CPS, OPS or conventional straws method

Methods	Oocytes	Intact morphology	%
CPS ^a	153	114	75
OPS ^b	142	96	68
Straws ^a	167	121	72

^{a,b} : $p < 0.05$ compared with oocytes vitrified in CPS, conventional straws or OPS methods.

중 난자 내부의 일부 구조가 액체 질소의 급격한 온도 변화와 동결 보호제의 농도 차이 및 평형 과정에 의한 직접적인 외부 접촉에 의해서 난자 생존에 negative effect로 나타난 것으로 보고 있다 (Chen 등, 2001). 또 여러가지 난자 처리의 전 처리 과정으로 나타날 수 있는 상해는 반복적인 동결액의 농도 변화, 장시간의 노출 시간, 희석 배율의 단계 방법에 의해 증가될 수 있다(O'Neil 등, 1997). 따라서 난자의 유리화 동결에 가장 적합한 구비 조건은 더욱 체계적으로 연구되어야 할 것이다.

과배란 처리 후 채란한 2-세포기 마우스 수정란을 3가지 다른 유리화 동결 방법으로 처리한 후 융해하여 3~5일간 배양한 다음 수정란의 세포 분열과 배 발달상태를 조사한 결과는 Table 2와 같다. CPS, OPS, straw 방법으로 융해하여 얻어진 수정란을 배양하여 2~8세포, morula, blastocyst의 발달 단계의 수정란과 동결 처리하지 않은 fresh embryo를 대조군으로 하여 비교하였다. CPS와 대조군의 배 발달률은 OPS와 straw보다 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), morula 형성률은 대조군, CPS, straw, OPS 순으로 낮아졌다. 배 발달율은 Table 1에서와 같이 CPS가 다른 2가지 유리화 동결법에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 동결-융해 시에 투명대와 세포막의 손상과 세포질의 일부 결함 및 손상이 일어날 수 있고(Vajta와 Kuwayama, 2006; O'Neil 등, 1997), 특히 microtubules의 손상이 세포 분화에 장애를 주어 배양시 결국 변성란, 사멸란이 되는 경우가 많다고 하였다. 수정 1시간 내 첫 분화 과정으로 정상 microtubules이 형성되고 곧 이어

서 chromosomes와 spindle의 재조립이 이루어지는 1~2시간의 과정이 매우 중요한 것으로 시사하고 있다(Chen 등, 2001). 동결-융해 과정에서 난자의 심각한 온도 변화가 이러한 세포 분화 및 발달에 제기 불능의 심각한 원인이 되는 것으로 생각된다.

Pulled straw에 담은 수정란은 기존 straw 법 (Rall과 Fahy, 1985)보다 소량에 담겨져 있어 동결과 융해 속도가 빨라 고농도의 동해 방지제와 불합리한 온도에 노출되는 시간을 줄일 수 있는 이점이 있다. 대량의 용액에 동결-융해하고 희석하는 기술을 줄여 시간을 단축할 수 있다. 일반적으로 CPS, OPS가 기존 straw 법보다 spindles 보유성이 우수하다는 이유를 말해주고 있다. 실제적으로 소에서 유리화 동결 성적은 CPS와 OPS가 기존 straw 법보다 배반포 생존율이 우수하다고 하였다 (Vajta 등, 1998; Martino 등, 1996). 최근에 유리화 동결 방법에 의한 난자 보존은 감염의 위험성에 항상 노출되어 있는 것이 지적되어 난자를 장기간 보존할 때 CPS(aseptic system)에 의한 보관 방법이 OPS보다 더욱 효과적이라고 지적하고 있다 (Isachenko 등, 2005; Kuleshova와 Shaw, 2000). 임상적인 수술을 해야 하는 과정에서 난자의 보관, 처리, 이식에서 무균적으로 수행되도록 계획되어야 한다. 사람에서 외부 오염 기회가 많은 OPS에 의한 이식 결과 임신 성공률이 점차 높게 나타나고 있으나(Isachenko 등, 2005; Hong 등, 1999; Mandelbaum 등, 1998), 동물과 달리 오염으로 인해 임신 시 심각한 고민에 빠질 수 있다. CPS에 의한 유리화 동결법이 OPS에 비하여 비접촉성으로 외부

Table 2. Development of vitrified mouse embryos to the blastocystic stage in three different methods

Methods	No. of frozen embryos	No. of cultured embryos (%)	2~8 cells (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
CPS	107	96 (89.7)	88 (82.2) ^b	64 (59.8) ^b	52 (48.6) ^a
OPS	114	98 (85.9)	72 (63.2) ^c	63 (55.3) ^{bc}	43 (37.7) ^c
Straws	122	105 (86.1)	84 (68.8) ^c	68 (55.7) ^{bc}	53 (43.4) ^{ab}
Control	-	50	46 (92.0) ^a	36 (72.0) ^a	28 (56.0) ^a

* Pooled data from three replicates.

** ^{a-c} : Table with different superscripts in the same column was significantly different at $p < 0.05$.

오염이나 온도 변화에 유리하다고 본다.

적 요

본 연구는 마우스의 성숙 난자와 수정란의 유리화 동결을 위한 CPS, 기존 straw 및 OPS 방법의 효과에 대하여 비교하였다. 마우스 난자의 유리화 동결-용해 후 형태학적인 생존율을 조사한 결과, CPS (75%)와 기존 straw(72%)법이 OPS(68%)법에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다($p < 0.05$). 과배란 처리 후 채란한 2-세포기 마우스 수정란을 유리화 동결-용해하여 3~5일간 배양한 다음 수정란의 배 발달 상태를 비교한 결과, 동결하지 않은 대조군(56%)과 CPS법(48.6%)의 배반포 발달률이 기존 straw법(43.4%)과 OPS법(37.7%)보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). Morula 형성률도 비동결 대조군, CPS, 기존 straw, OPS 순으로 낮아졌다. 이러한 결과는 CPS에 의한 유리화 동결법이 기존 straw와 OPS에 비하여 높은 생존성과 안전향 보존성 유지에 유리하다고 본다.

참고문헌

Ali J and Shelton JN. 1993. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 98:459-465.

Bagis H, Mercan HO, Cetin S and Sekmen S. 2005. The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws : *In vitro* and *In vivo* evaluations. *Mol. Reprod. Dev.*, 72:474-501.

Chen SU, Lien YR, Chen YY, Chen HF, Ho NH and Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straw (OPS) and grids. *Hum. Reprod.*, 16:2350-2359.

Emiliani S, Van den Bergh M and Vannin AS. 1999. The outcome of cryopreserved human

embryos after intracytoplasmic sperm injection and traditional IVF. *J. Assist. Reprod.*, 16:405-509.

Gook DA, Schiewe MC and Osborn SM. 1995. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Hum. Reprod.*, 10:2637-2641.

Hong SW, Chung HM, and Lim JM. 1999. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil. Steril.*, 72:142-146.

Isachenko V, Monlag M, Isachenko E, Zaeva V, Krivokharchenko I, Shafei R and van der Ven H. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum. Reprod.*, 20:492-496.

Kuleshova LL and Shaw JM. 2000. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum. Reprod.*, 15:2604-2609.

Larman MG, Sheehan CB and Gardner DK. 2006. Vitrification of mouse pronuclear oocytes with no direct liquid nitrogen content. *Reproductive BioMedicine Online*, 12:66-69.

Mandelbaum J, Belaisch-Allart J and Junca AM. 1998. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum. Reprod.*, 13:161-174.

Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.

O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ and Shaw RW. 1997. Murine oocytes cytoskeletal changes, fertilization and embryonic development following exposure to a vitrification solution. *Cryo-Lett.*, 18:17-26.

Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopre-

- ervation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Trounson A and Kirby. 1989. Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl sulfoxide. *Fertil. Steril.*, 52: 778-786.
- Vajta G and Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama 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.
- 김인택, 안미현, 석호봉. 2004. 미성숙돼지 난자의 유리화 동결에 관한 연구; OPS, EMG 및 NLS의 비교. *한국수정란이식학회지*, 19:27-34.
- 김태영, 남상규, 석호봉. 1995. 침투성 및 비침투성 동결보호제를 이용한 생쥐 수정란의 급속동결에 따른 생존성에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 10:193-202.
- 이성, 허의중, 석호봉. 1997. 마우스 수정란의 체외 발달에 미치는 소와 돼지의 난관 상피세포와의 공배양 효과. *한국가축번식학회지*, 21:139-146.
-
- (접수일: 2006. 2. 27/ 채택일: 2006. 3. 10)