

레이저를 통한 투명대내의 천공이 동결융해 ICR 마우스 수정란의 부화에 미치는 영향

용 환 율*

충북대학교 수의과대학 BK21 동물의료·생명과학사업단

Effect of Making a Hole in Zona Pellucida by Laser on Hatching of Frozen-thawed ICR Mouse Embryos

Hwanyul Yong*

BK21 Veterinary Bioscience Research Group, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of laser-assisted hole in the zona pellucida (ZP) of frozen-thawed ICR mouse embryos on the process of hatching that is critical for expanded blastocysts to implant into endometrium.

Vitrification medium, composed of ethylene glycol and sucrose supplemented with 7.5% (w/v) PVP, was used to freeze 2~4 cell stage embryos recovered from oviducts of superovulated and mated female mice before storing them in LN₂. Right after thawing them, a laser beam was shot to make a hole in ZP followed by culturing in KSOM for 96~120 hr and examining development to blastocyst and hatching every 12 hr. Laser-treated embryos showed significantly higher hatching rate compared to control (92.9% vs. 22.1%, $p<0.05$). From around Day 4, blastocysts developed from laser-treated embryos started hatching while the blastocysts of control group failed to hatch showing a lot of shrinkage. This study shows that a laser-assisted hole in ZP improves the hatching rate of blastocysts developed from frozen-thawed, *in vitro* cultured ICR mouse embryos.

(Key words : mouse, embryo, cryopreservation, laser, hatching)

서 론

포유동물 수정란이 자궁내막에 착상하기전 거쳐야 하는 과정의 일부인 부화는 배반포의 팽창에 의한 투명대 두께의 얇아짐(thinning), trophoctoderm에서 분비되는 zona lysin, 그리고 자궁내막에서 분비되는 lytic enzyme이 관여한다(Letterie, 1997). 체내 환경과는 다르게 체외에서 수정란이 발육하는 경우에는 부화를 하는데 있어서 여러 가지 장애 요인이 있다. 예를 들면, 마우스와 사람에서는 장시간 체외 배양 환경이 투명대의 두께의 증가(thickness)와 투명대의 경화(hardening)를 일으킨다(Schiewe 등, 1995; DeFelici와 Siracusa, 1982). 이에 대한 보조부화술에는 크게 partial zona dissection(PZD), acid Tyrode's(AT) 용액을 이용한 zona drilling과 zona thinning, 그리고 laser를 이용한 zona drilling으로 구분된다.

마우스의 경우, 보조부화술은 투명대에 기계적 혹은 화학적으로 천공, 절제(ablation) 혹은 thinning을 일으켜 수정을 향상을 도모하거나(Gordon 등, 1986) 부화를 보조하는 수단으로(Lin 등, 2001; Khalifa 등, 1992) 이용되어 왔다. 사람의 경우,

반복적인 IVF 시술의 실패와 산모의 나이가 많은 경우 선택적으로 이용되고 있으며(Hsieh 등, 2002; Obruca 등, 1994; Malter와 Cohen, 1989), 소에서도 레이저가 이용되고 있다(Schmoll 등, 2003). 최근에는 체외 배양에서 배반포의 부화를 가로막는 주요 요인으로 적은 embryonic cell number와 투명대 자체의 성장 변화가 지적되어(Montag 등, 2000), *in vivo* 수정란에 비해 적은 세포수를 보이는 복제 수정란 등 장시간 체외 배양 환경에 노출되어 있는 체외 생산 가축 수정란의 임신율 증진을 위해서 보조 부화술에 대한 이해와 활용 모색이 필요하다고 생각된다.

또한, 사람을 포함하여 가축에서도 수정란의 동결은 중요한 과정으로 동결 융해 과정을 거치면서 투명대를 포함한 수정란의 성상은 더욱 악화되어 이에 따른 수태율의 감소가 보고된 바 있으나(Wood 등, 1992), 동결 수정란에 대한 보조부화술 적용에 대한 연구는 많지 않다. 가축을 포함하여 대부분의 잉여 수정란은 사용 전까지 동결 상태로 보존이 되므로 동결수정란의 보조부화술 연구는 절실하다고 생각된다.

그러하여, 본 연구에서는 동결 ICR 마우스 수정란을 모델

* Correspondence : E-mail : yongh@chungbuk.ac.kr

로 레이저를 이용한 보조부화술이 후기배 발육과 부화율에 미치는 영향에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 수정란의 회수

수정란의 회수를 위하여 5주령의 ICR 마우스를 오리엔트 주식회사(남양주, 한국)에서 구입하여 1주 이상 사육하였다. 6~8주령의 암컷 마우스에 48시간 간격으로 각각 7.5 IU equine chorionic gonadotrophin(eCG)과 7.5 IU human chorionic gonadotrophin(hCG)을 복강내 주사하고, hCG를 주사한 직후 ICR 수컷 마우스와 합사시켰다. hCG 주사 후 44~46시간에 난관관류를 통해 2~4 세포기 수정란을 회수하였다. 회수한 수정란은 M2 배지(Sigma, St. Louis, USA)로 3회 세정한 후, 37°C, M2 배지에서 동결 전까지 보관하였다.

2. 수정란의 동결

수정란의 동결과 용해에 필요한 기본 배지는 M2 배지를 사용하였다. 수정란의 초자화는 ethylene glycol(EG)과 sucrose를 기본 배지로 하였으며(Tada 등, 1993) 7.5%(w/v) polyvinylpyrrolidone(PVP)을 첨가하였다. 간략히 설명하면, M2 배지에서 꺼낸 15~20개의 2~4 세포기 수정란을 4%(v/v) EG를 포함한 equilibration 배지에서 37°C 15분간 정치하고, 35%(v/v) EG, 7.5% (w/v) PVP와 0.4 M sucrose를 포함한 vitrification 배지에 30초간 3회 세정한 후 20~30 μ l의 vitrification 배지가 담겨있는 1.8 ml cryotube(Nunc, Roskilde, Denmark)로 옮겨 액체질소에 곧바로 침지하여 1주일간 보관하였다.

3. 동결 수정란의 용해

액체질소 탱크에서 cryotube를 꺼내 37°C 가온 수조에서 1분간 녹인 후, 5분간 상온에서 300 μ l의 0.5 M sucrose, 5분간 상온에서 300 μ l의 0.3 M sucrose, 그리고 10분간 37°C에서 300 μ l의 M2 배지에서 순차적으로 용해하였다. 용해한 수정란 중 모든 할구에서 변성이 일어난 수정란을 버리고, 나머지는 레이저 천공을 하기 전까지 M2 배지에 정치시켰다.

4. 투명대상에 레이저 천공과 체외 배양

M2 배지 미소적으로 수정란을 옮겨 XYClone™ laser(Hamilton Thorne Biosciences, MA, USA)가 장착된 미세조작기(Narishige, Japan)를 이용하여 투명대에 하나의 구멍을 천공하였다(Fig. 1). 천공한 수정란을 KSOM 배지(Millipore, Benford, MA, USA) 미소적에서 1회 세정한 후 37°C, 5% CO₂의 기상 조건 하에서 배양하면서 매 12시간 간격으로 96~120 시간 동안 배반포로의 발육률과 부화율을 관찰하였다. 배반포의 발육 시점에 있어서 배반포강의 형성을 보이기 시작하면 early

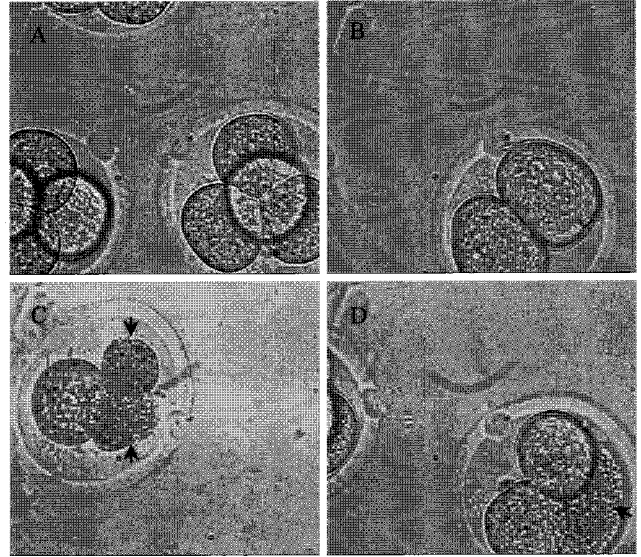


Fig. 1. Laser-assisted holes in ZP of frozen-thawed ICR mouse embryos, respectively, 4-cell (A), 2-cell (B), 3-cell with two apoptotic blastomeres (C) and 3-cell with an apoptotic blastomere (D). Arrows in C and D indicate apoptotic blastomeres.

blastocyst, 투명대의 thinning이 개시하기 직전 배반포강의 충분한 expanding을 보이면서 full blastocyst로 판별하였으며, 투명대를 뚫고 나오기 시작하고 완전히 투명대에서 벗어난 발육 단계의 배반포를 각각 hatching과 hatched blastocyst로 명명하였다.

5. 통계학적 분석

본 연구의 실험 결과는 SPSS version 12.0(SPSS, Inc., Chicago, IL) 프로그램의 paired *t*-test를 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

결 과

후기배 발육은 초기 배반포까지 차이를 보이지 않았으나, 투명대의 thinning을 보이는 expanding 배반포 발육률은 대조군이 레이저 처리군에 비해 유의적으로 높은 발육률을 보여주었다(88.2% vs. 4.7%). 그러나 부화율에 있어서는 반대로 레이저 처리군이 대조군에 비해서 유의적으로 높은 차이를 보였는데(92.9% vs. 22.1%), 레이저 처리군은 교미 후 4일(Day 0; 교미시점) 사이에 부화를 시작했고, 대조군은 이보다 2~3일 늦게 부화를 시작하거나 일부는 expanding 과정을 멈추고 shrinkage를 일으켰다(Table 1). 레이저 처리군은 투명대의 thinning없이 부화가 일어나는 반면에 대조군은 충분히 thinning이 일어났음에도 불구하고 shrinkage가 일어난 배반포를 볼 수

Table 1. Effect of making a hole in ZP by laser on *in vitro* development of frozen-thawed, 2- to 4-cell stage ICR mouse embryos

| Laser ablation | No. embryos treated* | No. (%) of embryos developed to | | | |
|----------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--|
| | | Morula (%) | Early/full blastocyst (%) | Expanding blastocyst (%) ^a | Hatching/hatched blastocyst (%) ^b |
| Yes | 97 | 91 (93.8) | 85 (87.6) | 4 (4.7) ^c | 79 (92.9) ^c |
| No | 80 | 75 (93.7) | 68 (85.0) | 60 (88.2) ^d | 15 (22.1) ^d |

* Five replicates.

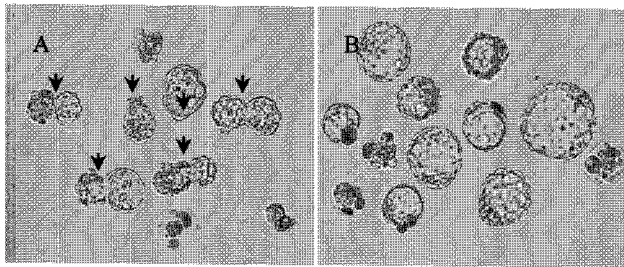
^{a,b} No. (%) of embryos developed from early/full blastocysts.^{c,d} Values with different superscripts within each column are significantly different ($p < 0.05$).

Fig. 2. Hatching or expanding blastocysts of frozen-thawed ICR embryos on Day 4 with(A) or without(B) laser ablation in ZP. Arrows in A indicate the point of hatching and a "figure-8" shape.

있다(Fig. 2). 또한, 레이저 처리군의 배반포 중 일부는 부화도중에 완전한 부화를 일으키지 못하고 8자 형태로 천공 부위에 trapping되는 현상을 보였다(Fig. 2). 모든 군에 있어서 배양중 추가로 일부 할구가 변성된 수정란은 배반포까지의 발육은 하였으나, 부화를 개시한 수정란은 없었다.

고 찰

본 연구에서는 초기 분할 단계 동결 용해 마우스 수정란에 레이저를 이용한 보조부화술이 유용하다는 것을 보여주었다. 2~4 세포기의 동결 용해 ICR 마우스 수정란의 투명대에 레이저를 발사하는 경우에는 세포막이 손상을 받지 않도록 적합한 위치를 선정해야 한다(Fig. 1). 세포막에 손상을 주는 경우, 즉각적인 할구내 세포질의 유출을 일으켜 영구적인 손상을 주게 된다. 특히, 투명대와 세포막이 밀착되어 있는 배반포 단계에서 레이저 천공을 하는 경우, 즉각적인 shrinkage를 일으키고 세포막에 손상을 주기가 쉽다(Montag 등, 2000). 따라서, 후기배 단계보다 초기 분할 단계의 수정란에 보조부화술을 실시하는 것이 이상적이라고 사료된다. 동결 마우스 수정란을 레이저 처리하였을 때 대조군에 비해 투명대의 expanding 없이 높은 부화율을 보이고, 빠른 부화 시점 그리고 부화중 trapping된 상태로 부화를 끝내지 못하는 일부 수정란을 보

여준 본 연구의 결과는 AT를 이용한 투명대의 thinning과 PZD 방법 등 레이저 이외의 보조부화술로 2 세포기 정상 마우스 수정란을 이용한 Malter와 Cohen(1989)의 연구 결과와 유사하였다.

사람의 불임 클리닉에서 고령 산모의 난자의 이용, 염색체 이상 검사를 위한 PZD로 인한 보조부화 그리고 잉여 동결 수정란의 이용 등이 쌍둥이의 출산율이 높은 이유 중 하나라고 생각된다. 왜냐하면 임신율을 높이기 위해 두 개 이상 수정란을 이식하는 경우 외에 하나의 수정란이 천공된 투명대를 통해 부화하는 과정에서 trapping으로 인해 artificial twinning이 될 수도 있기 때문이다(Malter와 Cohen, 1989). 고령의 산모와 소의 배반포에 레이저 보조술을 한 Schmolz 등(2003)과 Montag 등(1999)의 연구에서는 일정 크기 이상의 천공이 효과적인 부화에 필요하고, 두 개 이상의 천공은 trapping을 증가시키고, 배반포 단계에서의 천공은 즉각적인 shrinkage를 일으키며, 부화의 재개를 늦춘다는 것을 보여주었다. 따라서 본 연구 결과를 통해서도 하나의 레이저 천공으로 충분한 부화가 가능하며, 2~4 세포기의 초기 분할 단계에서의 천공이 유용하리라고 사료된다. 부화 과정 중 trapping을 방지하기 위해 투명대의 완전 천공보다 일부 천공을 하면 배반포의 expansion으로 인한 투명대의 thinning과 함께 폭발적인 shedding으로 인해 완전 부화가 가능할 수 있다고 생각한다(Petersen 등, 2006; Petersen 등, 2005). 또한, 소의 배반포에 레이저 천공을 하여 부화율을 비교한 Park 등(1999)의 연구에서 레이저 처리군이 높은 부화율을 보였는데, 가축의 산자 생산 효율 개선을 위해 수정란 이식 전에 시도해 볼 만한 기술이라고 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통해 동결 용해 ICR 마우스 수정란 투명대의 레이저 천공이 배반포의 부화를 증가시키는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 ICR 마우스 동결 용해 수정란을 이용해 레이저를 통한 투명대의 천공이 자궁내막에 착상을 하기 전의

중요한 과정인 부화에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

EG와 sucrose를 기본으로 하여 7.5%(w/v) PVP를 첨가한 동결배지를 이용, 과배란 처리 후 교배를 시킨 마우스의 난관에서 회수한 2~4 세포기의 수정란을 동결한 후 액체질소에 보관하였다. 융해 후 곧바로 투명대에 레이저를 발사하여 하나의 천공을 형성해서 KSOM 배지에서 96~120 시간 동안 매 12시간마다 후기배 발육률과 부화율을 관찰하였다.

레이저 처리군은 대조군에 비해 유의적으로 높은 부화율(92.9% vs. 22.1%)을 보였으며, 교미 후 4일경 레이저 처리군의 배반포는 부화를 개시한 반면, 대조군은 shrinkage를 일으키는 현상을 보이면서 부화에 실패하였다.

본 연구의 결과로부터 동결 융해 ICR 마우스 수정란의 투명대에 가하는 레이저 천공은 체외 배양 배반포의 부화율을 증가시키는 것으로 사료된다.

참고문헌

- DeFelice M and Siracusa G. 1982. 'Spontaneous' hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. Gamete. Res. 6:107-115.
- Gordon JW and Talansky BE. 1986. Assisted fertilization by zona drilling: A mouse model for correction of oligospermia. J. Exp. Zool. 239:347-354.
- Hsieh YY, Huang CC, Cheng TC, Chang CC, Tsai HD and Lee MS. 2002. Laser-assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. Fertil. Steril. 78:179-182.
- Khalifa EA, Tucker MJ and Hunt P. 1992. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. Hum. Reprod. 7:532-536.
- Letterie GS. 1997. Assisted hatching: Rationale, technique, and clinical outcomes. Assist. Reprod. Reviews. 8:116-125.
- Lin SP, Lee RK and Tsai YJ. 2001. *In vivo* hatching phenomenon of mouse blastocysts during implantation. J. Assist. Reprod. Genet. 18:341-345.
- Malter HE and Cohen J. 1989. Blastocyst formation and hatching *in vitro* following zona drilling of mouse and human embryos. Gamete. Res. 24:67-80.
- Montag M, Koll B, Holmes P and van der ven H. 2000. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts *in vitro* versus *in vivo*. Biol. Reprod. 62:1738-1744.
- Montag M, van der ven H. 1999. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. Croat. Med. J. 40:398-403.
- Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kogosowski A, Barak Y and Feichtinger W. 1994. Use of lasers in assisted fertilization and hatching. Hum. Reprod. 9:1723-1726.
- Park S, Kim EY, Yoon SH, Chung KS and Lim JH. 1999. Enhanced hatching rate of bovine IVM/IVF/IVC blastocysts using a 1.48-micron diode laser beam. J. Assist. Reprod. Genet. 16:97-101.
- Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JB, Felipe V, Massaro FC and Franco JG Jr. 2006. Laser-assisted hatching of cryopreserved-thawed embryos by thinning one quarter of the zona. Reprod. Biomed. Online. 13:668-675.
- Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JB, Massaro FC, Elder K and Franco JG Jr. 2005. Implantation failures: Success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. Reprod. Biomed. Online. 10:224-229.
- Schiewe MC, Araujo E, Asch RH and Balmaceda JP. 1995. Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. J. Assist. Reprod. Genet. 12:2-7.
- Schmoll F, Schneider H, Montag M, Wimmers K, Rink K and Schellander K. 2003. Effects of different laser-drilled openings in the zona pellucida on hatching of *in vitro*-produced cattle blastocysts. Fertil. Steril. 80:714-719.
- Tada N, Sato M, Amann E and Ogawa S. 1993. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification: Beneficial effect of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. Theriogenology 40:333-344.
- Wood MJ, Whittingham DG and Lee SH. 1992. Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. Biol. Reprod. 46:1187-1195.

(접수일: 2008. 2. 22 / 채택일: 2008. 3. 10)