

포유류 초기 배아의 효율적인 동결 보존 방법에 관한 연구

김현^{1,2} · 조영무² · 고응규² · 김성우² · 성환후^{2*} · 야마노우치 케이타로^{1†}

¹일본 동경대학교 수의과학대학 수의생리학 교실, ²농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

Development of Effective Cryopreservation Method for Mammalian Embryo

Hyun Kim^{1,2}, Young Moo Cho², Yeoung-Gyu Ko², Sung Woo Kim², Hwan-Hoo Seong^{2*}
and Keitaro Yamanouchi^{1†}

¹Department of Veterinary Physiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

²Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effects of embryonic stage, cryoprotectant, and freezing-thawing method on the rates of survival and development of the cryopreserved mouse early embryo and finally to establish the cryopreservation method of surplus embryos obtained during assisted reproductive technology (ART). Two to eight cell embryos were obtained from oviducts of mated F₁ hybrid female mice superovulated by PMSG and hCG. Two-step EG, DMSO and 4-step EG, DMSO were used as cryoprotectant and dehydration and rehydration method of embryos, and slow-cooling or rapid-cooling method was used as frozen program. The survival rates of embryos were measured after thawing and rehydration, and the developmental rates of embryos were compared and observed during culturing embryos for 24, 48, 72, 96 hrs. As for the survival and development rates of embryos according to embryonic stage, the survival rate of 2 cell stage in EG and DMSO was significantly higher than 4~8 cell (65.4% versus 61.2%, 81.1% versus 72.5%) ($p < 0.01$, $p < 0.01$), but the development rates of 4~8 cell embryos in EG and DMSO were significantly higher than 2 cell embryos for whole culture period ($p < 0.01$) and the development rates of 4~8 cell embryos in EG were significantly higher than 2 cell embryos in DMSO ($p < 0.01$). As for the survival and development rates of embryos according to cryoprotectant, the survival rate of 2 cell embryo in DMSO was significantly higher than that in EG (77.0% versus 64.4%) ($p < 0.01$), whereas the development rate of embryos was not differ till 24 hrs. The development rate from morular to hatching blastocyst, however, was significantly higher in EG than in DMSO during 48 hr ($p < 0.01$). The survival rate of 4~8 cell embryo was 62.5% in EG and 73.3% in DMSO. The development rates of embryo in EG were significantly higher for whole culture periods ($p < 0.01$, 0.05). In respect to the effect of freezing and thawing program on the survival and development rates of embryos, method of slow cooling and rapid thawing was more effective than that of rapid cooling and rapid thawing. The survival rate of embryo in 2 cell stage was higher than in 4~8 cell stage, and EG appears more effective cryoprotectant than DMSO because EG showed better development rates of embryos in 2 and 4~8 cell stage. Moreover, slow cooling and rapid thawing method was considered as the best cryopreservation program.

(Key words : cryopreservation, mouse embryo, EG, DMSO)

서 론

초기 배아를 비롯하여 세포나 조직, 개체 등과 같은 생물학

적 재료를 형태와 기능적인 변화가 일어나지 않은 상태로 저온에서 장기간 보관하고, 필요한 시기에 해동하여 동결 보호제를 제거한 후 세포의 발달이 계속 이뤄질 수 있는 생리적

* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ009418)에서 연구비를 지원 받았습니다.

* This work was carried out with the support from the "Agenda Program (No. PJ009418)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

* This work was supported by 2014 Post Doctoral Fellowship Program of National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Republic of Korean.

† Correspondence : seonghh@korea.kr, kim7268@korea.kr

환경 상태로 되돌리는 과정을 동결 보존(cryopreservation)이라 한다(Yoon *et al.*, 2007). 동결 보존의 기본 원리는 세포의 고유한 형태를 유지하면서 내부의 수분을 고농도의 동결 보호제(cryoprotectant)의 삼투압 원리를 이용하여 점진적으로 제거하고, 이로 인해 얼음 결정을 최소화하여 세포를 보호하는 것이다. 또한, 동결을 통해 세포 내 모든 생리 및 생화학적 반응의 속도를 느리게 하거나 차단함으로써 장기간의 보존이 가능하다. 이를 위해서는 세포 내 결빙 형성(ice crystal)의 최소화라는 가장 단순하면서도 중요한 원칙이 지켜져야 한다. 결빙은 동결 전후 세포의 탈수 과정 중에 이뤄질 수 있으며, 만약 탈수가 부적절하면 세포 내 결빙이 크게 형성되어 세포는 손상을 입게 된다. 또한, 해동 시 동결 보호제의 제거가 부적절하게 이뤄질 때도 동결 보호제의 독성으로 인해 세포는 손상을 입을 수 있다. 그래서 세포의 동결 과정 동안에 만들어질 수 있는 결빙 현상과 해동 시 동결 보호제로 인한 독성 효과를 최소화하기 위해 보다 더 완벽한 동결 보존법의 개발이 필요하다.

초기 배아의 냉동에 관한 연구는 Whittingham 등(1972)은 DMSO를 사용하여 완만 동결과 완만 용해의 방법으로 생쥐 배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결 보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후, 토끼(Siebzehnuebl *et al.*, 1989), 햄스터(Todorow *et al.*, 1989), 양(Szell *et al.*, 1990) 등에서도 잇달아 적용되었다. 인간에서는 Trounson과 More(1983)가 동결 보호제로 DMSO를 냉동 방식으로 -80°C 까지 매 분당 -0.3°C 씩 하강시키는 완만 동결 방법(Fehill *et al.*, 1985; Al-Hasani *et al.*, 1987; Siebzehnuebl *et al.*, 1989; Whittingham *et al.*, 1972; Todorow *et al.*, 1989)을 세포기 배아에 사용하여 첫 번째 임신에 보고하였으며, 뒤이어 1984년에는 Zeilmaler 등(Zeilmarker *et al.*, 1984)이 동일한 동결 보호제로 -40°C 까지 완만 동결하는 방법을 8세포기 배아에 적용함으로써 임신 및 분만에 성공하였다. 그 이후, Lassalle 등(Lassalle *et al.*, 1985)은 동결 보호제로 PROH에 sucrose를 첨가하여 사용함으로써 동결 온도를 -30°C 까지만 감소시키고, 시간도 줄일 수 있었다. 또, Cohen 등(Cohen *et al.*, 1985)은 glycerol로 배포를 동결 보존한 후 임신에 성공하였다. 이와 같은 초기 배아의 동결 보존 기술은 가축을 포함한 대동물과 인간에게도 적용되어 그 가치가 증가되고 있으며, 이러한 초기 배아의 동결 보존은 세포의 체외 배양 연구에 없어서는 안되는 중요한 과정으로 인식되고 있다. 근래에는 여러 동물에서 상업적 이용이 가능하게 되었으며, 인간의 체외 수정 프로그램 분야에 접목되어 그 중요성이 점점 커지고 있다(Whittingham *et al.*, 1972; Hamberger, Hazekamp, 2002).

지금까지 세포 및 초기 배아의 동결 보존에 주로 사용되어 온 동결 보호제로는 독성이 강하고, 점성이 높은 침투성의 동

해 방지제인 DMSO, propandiol(1,2-PROH), glycerol을 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등(1996)은 소 성숙난자를 ethylene glycol(이하: EG)을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 EG을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동해 방지제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 그리고 알부민이 있으나, glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Kasai *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1996; Rayos *et al.*, 1994). 이처럼 동결 보존 과정 중의 동물뿐만 아니라, 인간 배아의 생존율은 동결 및 용해 과정 중에 사용되는 동결 보호제의 종류와 농도, 동결 방법과 용해 속도 등에 많은 영향을 받는다고 알려져 있다(Friedler *et al.*, 1988; Nowshari *et al.*, 1995). 또한 동결되는 배아의 세포 주기, 발생 시기(Liu *et al.*, 1993)의 차이도 동결 보존 후의 생존율과도 깊은 관계를 갖는다고 한다.

동결 보존 시 다양한 동해 방지제와 동결 방법을 사용하는 이유는 동결 보존된 배아의 생존율과 발달율이 이들 요인에 의해 달라질 수 있기 때문이다. 그런데 동결 보존된 배아의 생존율과 발달율에 영향을 미치는 이들 요인들의 상관관계에 대한 연구는 아직 미약한 실정이며, 또한 동결 보존법에 대한 견해도 실험실마다 달라, 이에 대한 체계적 연구가 필요하다. 따라서 본 연구는 생쥐 초기 배아를 이용하여 동결 보존된 배아의 생존율과 발달율에 영향을 미치는 요인들의 상관관계를 알아보고, 동결 보존법을 체계화 하고자 배아의 발달단계, 동결 및 해빙 속도, 동결 보호제의 종류에 따라 동결 보존한 후 해동하고, 초기 배아의 생존율 및 발달율을 조사하여 동결 보존법에 대한 최적 조건들을 살펴봄으로써 임상적 적용에 대한 유용성을 검토하고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물의 사양 관리

본 연구에 사용된 실험 동물은 일본 도쿄대학교 수의과학대학 동물실험 윤리위원회A-10-1211의 승인 하에 진행하였으며, 항온 및 항습이 유지되면서 낮 12시간, 밤 12시간이 조절되는 실험 동물 사육실에서 생쥐 제 1 세대 잡종(C57BL 우 × CBA ♂)으로 생후 4~5주된 암컷과 6~8주된 생식력이 확인된 수컷에게 충분한 사료와 물, 공간을 제공하면서 사육하였다.

2. 실험군의 디자인

배아를 동결하지 않으며, 배양한 군을 대조군으로 하고, 배아의 동결 후 생존율 및 초기 배아 발달율을 조사한 군을 실험군으로 디자인하였다. 실험군은 초기 배아의 발달 단계, 동결 보호제, 초기 배아의 동결 속도에 따라 각각 2세포와 4~8세포 배아, EG과 DMSO, 그리고 완만 동결 - 급속 해동과 급

속 동결 - 급속 해동군으로 분류하였다.

3. 과배란 유도 및 2세포기 배아와 4~8세포기 배아의 회수
과배란 유도를 위하여 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma)을 생쥐 암컷에 복강 주사하고, 48시간 후 5 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma)을 복강 주사하였다. hCG 주사 후 즉시 암컷과 수컷을 1:1로 합사하여 교배를 유도하였다. 2세포기 배아는 hCG 주사 48시간 후에, 4~8세포기 배아는 hCG 주사 60~62시간 후에 암컷의 수란관에서 회수하였다. 배아의 회수액은 0.4% 소혈청알부민이 첨가된 인산완충액(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco)을 이용하였다. 해부현미경을 이용해 회수 용기는 1회용 배양 접시(35 × 10 mm, Falcon)을 이용해, 30G 주사침이 부착된 1회용 튜버클린 주사기로 난관을 관류하여 회수하였다.

4. 동결 보호제와 해동액

1) EG 동결 보호제와 해동액

동결 보호제와 해동액을 제조하기 위한 기본 용액은 인산완충액에 20% 소태아 혈청(fetal bovine serum, Gibco)을 첨가하여 사용하였다. 동결 보호제는 기본 용액에 ethylene glycol(EG, Sigma) 첨가한 1.5 M EG 용액과 1.5M EG에 0.1 M sucrose를 첨가한 용액을 사용하였다. 해동액은 기본 용액에 EG를 첨가하여 각각 0.5 M, 1.0 M 용액을 만든 후 0.1 M sucrose를 혼합하여 제조하였다. 제조한 동결 보호제와 해동액은 각각 0.22 μ millipore filter(Acrodisc, German)로 여과하여 멸균을 실시하였다.

2) DMSO 동결 보호제와 해동액

동결 보호제는 기본 용액에 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merk)를 첨가한 1.5 M DMSO와 1.5 M DMSO에 0.1 M sucrose를 첨가한 용액을 사용하였다. 해동액은 기본 용액에 DMSO를 첨가하여 각각 0.5 M, 1.0 M의 용액에 0.1 M sucrose를 혼합하여 제조하였다. 제조한 동결 보호제와 해동액은 각각 0.22 μ millipore filter(Acrodisc, German)로 여과하여 멸균을 실시하였고, 동결 보호제와 해동액은 동결 또는 해동 1~2시간 전에 제조하여 사용하였다.

5. 동결 방법과 해동 방법

1) 초기 배아의 탈수 및 스트로우 장전

배아의 세포질 내에 존재하는 물을 제거하고, 제거된 양만큼 동결 보호제를 세포질 내로 유입시키는 탈수 과정은 2단계 방법을 사용하였다. 정상적으로 발달한 초기 배아를 1단계 1.5

M EG 또는 1.5 M DMSO, 2단계 1.5 M EG에 0.1 M sucrose가 첨가된 용액 또는 1.5 M DMSO에 0.1 M sucrose가 첨가된 용액에서 각각 15분 간 노출시켜 탈수를 유도하였다. 1.5 M EG에 0.1 M sucrose가 첨가된 용액 또는 1.5 M DMSO에 0.1 M sucrose가 첨가된 용액에서 15분 간 탈수가 진행되는 동안 0.25 ml 플라스틱 스트로우(IMV, France)에 mouth piece를 이용하여 장전하였다.

2) 초기 배아의 동결 과정

초기 배아를 넣은 스트로우는 마지막 탈수 시간이 종료되자마자 동결기로 옮긴 다음, 컴퓨터 프로그램에 내장된 배아 동결기(KRYO 10-III programmable freezer, U.K)에 loading하여 다음과 같은 방법으로 동결시켰다.

(1) 완만 동결 - 급속 해동법

완만 동결 방법은 +20℃에서 -7℃까지 1분당 -2℃로 하강한 후, -7℃에 도달하여 1분이 경과할 때 액체 질소(-196℃)에서 건져낸 핀셋으로 스트로우는 가볍게 집어줌으로써 식빙을 실시하였다. 식빙 후 5분간 동결기 내에 정지한 후, -30℃까지 분당 -0.3℃로 온도를 하강시키고, 이 온도에서 10분 간 정지시켜 동결한 후, 스트로우는 세포 동결기에서 꺼내 액체 질소통에 직접 넣었다. 이렇게 동결된 초기 배아는 해빙할 때까지 -196℃ 액체 질소통에 보관하였다. 급속 해동법은 초기 배아가 저장된 스트로우는 액체 질소 탱크에서 꺼내어 상온의 공기 중에 노출시켜 해동시킨 다음 스트로우는 물기를 거즈로 제거하고, 70~75% 알코올 거즈로 소독한 후, 스트로우는 양쪽을 가위로 잘라서 동결액과 초기 배아를 배양 접시에 부어 현미경 하에서 초기 배아를 회수한 다음 재침수 과정에 들어갔다.

(2) 급속 동결 - 급속 해동법

급속 동결 방법은 실온에서 0℃까지 1분당 -3℃로 온도를 하강시킨 후 0℃에서 10분간 정지시켰다. -7℃까지 1분당 -3℃로 온도를 하강하고, -7℃가 되면 미리 액체 질소에 담겨 두었던 핀셋으로 식빙시키고, 5분간 정지시켰다. 다시 -20℃까지 1분당 -3℃로 온도를 하강시키고, 10분간 정지시켰다. 1분당 -17℃의 온도 하강으로 -100℃까지 온도를 낮춘 후 10분간 정지하여 동결 보존을 완료시키고, 액체 질소통에 보관하였다. 급속 해동 방법은 위에 기술한 바와 동일하게 시행하였다.

3) 해동과 초기 배아의 재수화 및 생존성 판정

회수한 초기 배아는 재수화 용액에서 3단계로 옮겨가면서 탈수의 역과정을 수행하였다. 해동 회수된 초기 배아는 1.0 M

EG에 0.2 M sucrose가 첨가된 용액과 0.5 M EG에 0.2 M sucrose가 첨가된 용액을 포함한 기본 용액에서 각각 5분간 처리한 후, 0.2 M sucrose만 포함된 해동액에서 5분간 처리하였다. 마지막으로 배아는 20% 소태아 혈청이 포함된 인산 완충액에서 5분간 처리하고, 배양액에 옮겨 5% CO₂, 100% 습도를 유지하는 배양기(Forma Scientific Co. model 3037)에서 배양하였다. 한편, 해동된 배아는 1.0 M DMSO에 0.2 M sucrose가 첨가된 용액과 0.5 M DMSO에 0.2 M sucrose가 포함된 기본 용액에서 각각 5분씩 처리한 후, 기본 용액에 0.2 M sucrose만 포함된 해빙액에서 다시 5분간 처리하고, 마지막으로 20% 소태아 혈청이 포함된 인산 완충액에서 5분간 처리하여 재수화 과정을 마쳤다. 초기 배아의 생존성 관정은 재수화 과정이 완료된 초기 배아를 기본 용액에서 3회 세척한 후, 상온에서 5분이 경과했을 때 형태적인 양상으로 확인하였다.

6. 해동 후 초기 배아의 체외 배양

해동된 초기 배아를 상온에서 기본 배양액에 20분간 노출시킨 후, 배양액으로 옮겨 세포 발달 단계에 따라 이산화탄소 배양기에서 2세포기는 96시간, 4~8세포기는 72시간 배양 후, hatching까지 진행된 비율을 구하였다.

7. 통계학적 분석

실험을 통하여 얻은 모든 결과들은 χ^2 -test와 Student *t*-test를 시행하여 통계적 유의성을 조사하였고, *p*값이 0.05 미만일

때를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 생쥐 초기 배아의 발달 단계에 따른 동결 보존 효과

생쥐 2세포기와 4~8세포기 초기 배아를 EG와 DMSO 동결 보호제를 사용하여 동결 보존 후 세포 생존율을 조사해 본 결과, 2세포기 배아의 생존율이 EG에서 65.4% DMSO에서 81.1%, 4~8세포 배아의 생존율이 각각 61.2%, 72.5%로 EG와 DMSO 두 동결 보호제에서 모두 2세포기 배아의 생존율이 유의하게 높았으며($p<0.01$), 해빙 후 2세포기와 4~8세포기를 24, 48, 72, 96시간 배양해 본 결과, 배 발달율에 있어서는 EG를 사용한 2세포기 배아에서 82.6%, 56.1%, 32.3%, 28.4%, 4~8세포기에서는 87.6%, 87.5%, 77.6%이었고, DMSO를 사용한 2세포기 배아에서는 79.3%, 31.0%, 27.6%, 19.0%, 4~8세포기에서는 63.9%, 50.0%, 35.2%로 해빙 후, 초기 배아 발달율에 있어서는 EG와 DMSO에서 모두 4~8세포기 배아가 2세포기 배아보다 유의하게 높은 배아 발달율을 나타내었다 (Table 1, 2)($p<0.01$).

2. 동결 보호제에 따른 생쥐 초기 배아의 생존율 및 발달율

1) 2세포기 배아

2세포기 배아를 EG과 DMSO를 사용하여 동결 후 해동해

Table 1. Effect of cryopreservation by using of EG on mouse embryo development according to two different mouse embryo stages

Cell stage	No. of frozen embryo (%)	No. of recovered embryo (%)	No. of survival embryo (%)	Development of embryo (%)			
				Culture time			
				24 hr (4~8 cell≤)	48 hr (morular≤)	72 hr (blastocyst≤)	96 hr (hatching≤)
2 cell	249	237(95.2)	155(65.4)*	128(82.6)	87(56.1)	50(32.3)	44(28.4)
4~8 cell	298	263(88.3)	161(61.2)		141(87.6)*	140(87.5)*	125(77.6)*

* $p<0.01$.

Table 2. Effect of cryopreservation by using of DMSO on mouse embryo development according to two different mouse embryo stages

Cell stage	No. of frozen embryo (%)	No. of recovered embryo (%)	No. of survival embryo (%)	Development of embryo (%)			
				Culture time			
				24 hr (4~8 cell≤)	48 hr (morular≤)	72 hr (blastocyst≤)	96 hr (hatching≤)
2 cell	169	143(84.6)	116(81.1)*	92(79.3)	36(31.0)	32(27.6)	22(19.0)
4~8 cell	165	149(90.3)	108(72.5)		69(63.9)*	54(50.0)*	38(35.2)*

* $p<0.01$.

본 결과, 생존율에 있어서는 EG에서 64.4%, DMSO에서 77.0%로 DMSO에서 유의하게 높았으며($p<0.01$), 해동 후 24, 48, 72, 96시간 배양에 따른 초기 배아 발달률에 있어서는 EG에서 83.3%, 58.7%, 58.3%, 52.0%이었고, DMSO에서는 79.0%, 34.4%, 33.8%, 29.2%로 EG에서의 초기 배아 발달율이 48시간 이후부터 유의하게 높았다(Table 3)($p<0.01$).

2) 4~8세포기 배아

4~8세포기 배아를 EG와 DMSO를 사용하여 동결 후 해동해 본 결과, 생존율에 있어서는 EG에서 62.5%, DMSO에서 73.3%로 DMSO에서 유의하게 높았으며($p<0.01$), 해동 후 24, 48, 72시간 배양에 따른 배아 발달율에 있어서는 EG에서 84.2%, 87.9%, 75.8%이었고, DMSO에서는 66.4%, 47.3%, 31.9%로 EG에서의 배아 발달율이 지속적으로 유의하게 높았다(Table 4)($p<0.01$, $p<0.05$).

3. 동결 방법에 따른 생쥐 초기 배아의 생존율 및 발달율

생쥐 초기 배아의 발달 단계에 따른 동결 보존 효과에서 더 높은 생존율을 나타내었던 2세포기 배아를 동결 방법을 달리 하여 생존율 및 발달율을 비교 조사해 본 결과, 완만 동결 - 급속 해동 방법에 따른 배아의 생존율이 75.4%, 급속 동결 - 급속 해동 방법은 3.9%로 완만 동결 - 급속 해동 방법에서 유의

하게 더 높은 생존율을 보였으며($p<0.001$), 또한 배아 발달율에 있어서는 완만 동결 - 급속 해동 방법은 41.4%가 부화 배포까지 발달한 반면, 급속 동결 - 급속 해동 방법은 해동 후 4세포기까지만 11.1%의 배아 발달이 진행되고, 그 이후로는 발달이 정지되었다(Table 5).

고 찰

배아의 발생 시기와 세포 주기에 따라 세포막에서는 물질 투과성과 세포 골격 변화가 일어난다(Fuller *et al.*, 1986; Gook *et al.*, 1993). 생쥐 모델에서는 배아의 발달 단계에 따라 동결 보호제를 달리 사용하고 있는데, 일반적으로 1~4세포기 동결 시에는 동결 보호제로 PROH를 사용하며(Lassalle *et al.*, 1985), 4~8세포기 동결 시는 세포막에 침투성이 좋은 DMSO를 이용하고 있고(Trounson *et al.*, 1983), 상실배와 배포 배아를 동결할 때는 glycerol을 사용하고 있다(Cohen *et al.*, 1985). 그러나 상실배 또는 배포기의 동결 보존은 먼저 수정된 배아를 상실배 이상까지 배양해야 하는 배양 조건과 기술의 향상이 선행되어야 하는 문제점과 PROH와 glycerol이 다른 동결 보호제보다 독성이 심한 걸로 알려져 있어(Lassalle *et al.*, 1985; Trounson *et al.*, 1983), 본 연구에서는 배아의 초기 배 발달 단계인 2, 4~8세포기 배아를 EG, DMSO를 사용하여 동결 - 해

Table 3. Effect of two different cryoprotectants on survival and development rate of 2 cell mouse embryo

Cryo-protectant	No. of frozen embryo (%)	No. of recovered embryo (%)	No. of survival embryo (%)	Development of embryo (%)			
				Culture time			
				24 hr (4~8 cell ≤)	48 hr (morular ≤)	72 hr (blastocyst ≤)	96 hr (hatching ≤)
Control		60		57(95.0)	55(91.7)	50(83.3)	46(76.7)
EG	245	233(95.1)	150(64.4)	125(83.3)	88(58.7)*	83(58.3)*	78(52.0)*
DMSO	230	200(87.0)	154(77.0)*	121(79.0)	53(34.4)	52(33.8)	45(29.2)

* $p<0.01$.

Table 4. Effect of two different cryoprotectants on survival and development rate of 4~8 cell mouse embryo

Cryo-protectant	No. of frozen embryo (%)	No. of recovered embryo (%)	No. of survival embryo (%)	Development of embryo (%)		
				Culture time		
				24 hr (4~8 cell ≤)	48 hr (morular ≤)	72 hr (blastocyst ≤)
Control		40		40(100)	40(100)	36(90.0)
EG	300	264(88.0)	165(62.5)	139(84.2)*	145(87.9)*	125(75.8)**
DMSO	165	150(91.0)	110(73.3)*	73(66.4)	52(47.3)	35(31.9)

* $p<0.01$, ** $p<0.05$.

Table 5. The development of 2 cell mouse embryos according to two different frozen methods

Method	No. of frozen embryo (%)	No. of recovered embryo (%)	No. of survival embryo (%)	Development of embryo (%)			
				Culture time			
				24 hr (4~8 cell≤)	48 hr (morular≤)	72 hr (blastocyst≤)	96 hr (hatching≤)
Control		60		58(96.7)	52(86.7)	49(81.7)	45(75.0)
Slow	350	333(95.1)	251(75.4)*	209(83.3)	166(66.1)	110(43.8)	104(41.4)
Rapid	327	280(85.6)	11(3.9)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)

* $p < 0.001$.

동하고, 생존율과 배아 발달율을 비교 조사해 보았다. 포유류 및 인간 배아의 동결 보존 과정에서 성공률에 영향을 주는 요인들로는 동물의 종, 동결 시 배아의 발달 단계와 배아의 형태(Lassalle *et al.*, 1985; Wilmut, 1972), 동결 및 융해 속도(Polge *et al.*, 1949; Wilmut, 1972), 동결 보호제의 선택(Polge *et al.*, 1949; Wilmut, 1972)을 들 수 있다. 이처럼 배아가 동결 및 해동 과정에서 가능한 손상을 입지 않도록 하기 위한 연구가 활발히 이루어져오고 있으나, 이에 대한 견해는 연구자들 간에 다양한 실정이다.

Lassalle 등(Lassalle *et al.*, 1985)은 EG를 초기 배아의 동결 시 사용하여 인간 1~4세포기에서 53%, 4세포기 이상에서 24.5% 생존율을 얻어, 2세포기 배아에서 64.5%, 4~8세포기에서 62.1%인 본 연구의 생존율 성적보다 다소 낮았지만, PROH 뿐만 아니라, EG이 4세포기 이하의 배아 동결 보존 후 생존율에 더 효과적이라는 의견에서는 일치하였다. 그러나 본 연구 결과, 동결 및 해빙 후의 배 발달율에 있어서는 2세포기보다 4~8세포기 배아에서의 발달율이 유의하게 높아 1 세포기와 4세포기를 이용하여 배 발달 후 착상 및 임신율을 보았던 Liu (Liu *et al.*, 1993)와, 1세포, 4세포, 배포를 사용하여 배 발달율을 비교하였던 Emiliani 등(Emiliani *et al.*, 2000)의 보고와 비슷하였다. 또한, 배아의 동결 시 다양한 동결 보호제를 사용하게 되는데, 그 이유는 동결 보호제가 빙점을 낮추어서 세포 내 빙 결정을 방지 및 지연시켜주고(Whittingham *et al.*, 1980), 세포 밖의 동결 보호제의 삼투압을 증가시켜 세포 내의 물이 세포 밖으로 빠져 나오게 하며(Renard *et al.*, 1984), 동결 및 해빙 중에 액체에서 고체로, 다시 고체에서 액체 상태로 변화하는 과정에서 동결 보호제가 세포막과의 상호작용에 의해 세포를 보호하고, 탈수된 세포 내로 침투하여 삼투압 평형 상태에 도달하게 하여 세포를 정상적인 형태로 회복시키는 작용을 하기 때문이다. 동결 보호제가 이러한 이점을 갖고 있는 반면에, 해동 후 그 독성작용을 나타내기도 하여 최근에는 독성을 줄이기 위하여(Fahy *et al.*, 1986) 침투성 동결 보호제인 EG, DMSO, glycerol에 비 침투성 동결 보호제인 sucrose를 혼합하

여 동결 - 해동 시 사용함으로써 삼투압 변화로 인한 손상을 감소시키고 있다(Schneider, 1986; Testart *et al.*, 1986).

본 연구에서도 2, 4~8세포기 배아 동결 - 해동 시 EG와 DMSO에 sucrose를 혼합하여 사용해 해동 후 세포 손상을 감소시키려 노력하였으나, 배 발달율에 있어서 대조군만큼의 성적을 얻지는 못하였다. 2세포기에서는 EG 사용 시 해빙 후 배양 48시간째 배 발달율이 유의하게 감소하여($p < 0.01$) 동해로의 배 발달율 감소를 나타냈으나, 그 이후 배양 기간 동안에는 유사한 배 발달율을 나타내어 동결 보호제의 독성에서 벗어나 동해에 대한 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 그리고 DMSO에서도 해동 후 배 발달율에 있어서 유사한 효과를 얻었다. 4~8세포기 배아에서는 동결 보호제로 EG 사용 시 해동 후 배 발달율에는 변화가 없어서 동해로 인한 상해를 입지 않음을 알 수 있었으나, DMSO에서는 배양 48시간째 배 발달이 유의하게 감소하여 동해에 대한 상해를 입음을 알 수 있었다. 그렇지만 본 실험에 사용한 EG는 2, 4~8세포기 배아의 동결 후 DMSO 사용 시보다 배 발달율에 있어서 더 유의하게 증가된 성적을 나타내어 생쥐 2세포를 이용하여 DMSO에서보다 PROH 사용 시 배포까지의 발달에 좋은 성적을 얻었던 Macas 등(Macas *et al.*, 1991)과 생쥐 전핵 배아를 이용하여 EG에서 더 효율적인 결과를 얻었던 Van-den-Abbeel 등(Van-den-Abbeel *et al.*, 1994)의 보고와 거의 유사한 결과를 확인할 수가 있었다. 대동물인 소의 연구 결과와 직접적으로 비교하긴 힘들지만, Martino 등(1996)은 소 성숙 난자를 ethylene glycol (이하: EG)을 사용하여 높은 배 반포율을 보고한 것과 같이 EG을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동해 방지제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 그리고 알부민이 있으나, glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Kasai *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1996; Rayos *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1993).

마지막으로, 배아의 동결 - 해동 후 생존율에 영향을 미치는 주요 인자로 동결 속도를 또한 들 수 있는데, 현재 가장 적합한 냉각 속도로는 $-0.3 \sim -0.4^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 보고되고 있으며(Whittingham *et al.*, 1972), -80°C 까지 냉각하는 방법(Whit-

tingham *et al.*, 1972; Willadsen *et al.*, 1978)과 -30°C 까지만 냉각한 후 액체 질소 속에 담그는 완만 동결법이 알려져 있다 (Polge *et al.*, 1978). 완만 동결법은 보다 많은 세포를 탈수시킬 수 있고, 해동 후에도 세포의 생존성을 증가시킨다고 하는데, 본 연구 결과에서도 완만 동결 - 급속 해동 방법에서 좋은 결과를 얻었다. 그렇지만 모든 세포에 있어 완만 동결이 좋은 건 아니며, 각각의 세포에 적합한 최적의 동결 속도가 있다고 한다(Mazur *et al.*, 1963). 이는 삼투압 차에 따른 반응 속도와 물의 이동에 대한 온도의 효과가 세포마다 다르기 때문으로 생각되고 있다. 그러나 완만 동결 방식은 동결 후 생존율이 좋은 반면, 경비와 시간이 많이 소요되는 단점이 있어 최근에 들어서는 초자화 동결법이 개발되면서 고농도의 동결 보호제에 바로 노출시켜도 생존율이 상당히 좋다고 보고되고 있어(Kasai *et al.*, 1992; 2002), 이에 대한 배아 초자화 동결액 성분의 세밀한 조합과 함께 다양한 동결 방법의 비교 검토 과정 등의 전략이 반드시 추가되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서 생쥐 초기 배아를 이용하여 동결 보존된 배아의 생존율 또는 발달율에 영향을 미치는 요인들의 상관관계를 알아본 결과, 배아의 발달 단계에 따른 동결 - 해동 후 생존율에 있어서는 2세포기 배아가 4~8세포기 배아보다 유의하게 높았으나($p<0.01$), 배 발달율에 있어서는 4~8세포기 배아가 유의하게($p<0.01$), 높아 생존율과 배 발달율과는 상관관계가 없는 것으로 사료된다. 또한, 동결 보호제에 따른 배아의 생존율에 있어서는 2, 4~8세포기 배아 모두 DMSO에서 유의하게 높았으나($p<0.01$), 배 발달율에 있어서는 EG가 DMSO에 비해 더 유의하게 높은 성적을 나타내어($p<0.01$, $p<0.05$) 동해로 인한 상해가 적은 것으로 생각되어 2, 4~8세포기 배아에서 EG가 더 효과적인 동결 보호제로 사료되며, 동결 프로그램으로는 완만 동결 - 급속 해동법이 더 우수한 프로그램으로 보인다. (중심 단어 : 동결 보존, 생쥐 배자, EG, DMSO)

참 고 문 헌

- Al-Hasani S, Diedrich K, van der Van H, Reinecke A, Hartje M and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. Hum. Reprod. 2:695-700.
- Cohen J, Somons FR, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB. 1985. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocytes. J. IVF ET. 2:59-64.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, 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. Hum. Reprod. 15:905-910.
- Fahy LE. 1986. The relevance of cryoprotectant "Toxicity" to cryobiology. Cryobiology. 23:1-13.
- Fehill CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB and Edwards RG. 1985. Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human ; A comparative study. Fertil. Steril. 44:638-644.
- Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril. 49:743-764.
- Fuller BJ and Bernard A. 1986. The relationship between intracellular glycerol permeation and survival following cryopreservation of *in vitro* fertilized 2-cell murine embryo. Cryo-Letters. 7:257-259.
- Gook DA, Osborn SM and Jobbston WIH. 1993. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum. Reprod. 8:1101-1109.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera T, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fertil. 89:91-97.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T and Machida T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol- based solution by a simple method. Biol. Reprod. 46:1042-1046.
- Kasai M, Ito M and Edashige K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Hum. Reprod. 17:1863-1874.
- Kim MK, Lee SJ, Uhm EY, Yoon SH, Park SP, Chung KS and Lim JH. 1996. Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. J. Animal. Reprod. 20:119-126.
- Liu J, Van den Abbeel E and Van Steirteghem AC. 1993. Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos. Hum. Reprod. 8:1115-1119.
- Hamberger L and Hazekamp J. 2002. Towards single embryo transfer in IVF. J. Reprod. Immunol. 55:141-148.
- Junca AM, Mandelbaum J, Alnot MO, Plachot M, Cohen J and Salat-Baroux J. 1988. Factors involved in the success of human embryo freezing. Does cryopreservation really improve the IVF results? Ann. N Y Acad. Sci. 541:575-582.
- Lassalle B, Testart J and Renard JP. 1985. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with

- the use of 1,2 propanediol. *Fertil. Steril.* 44:645-651.
- Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B and Rulicke T. 1991. Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods. *J. IVF ET.* 8:208-212.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.* 54:1059-1069.
- Mazur P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 47:347-369.
- Nowshari MA, Nayudu PL and Hodges JK. 1995. Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Hum. Reprod.* 10:3237-3242.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Retrieval of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666-676.
- Polge C and Willadsen SM. 1978. Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology* 15:370-373.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. Reprod. Fertil.* 24:100-123.
- Renard JP, Bui-Xuan Nguyen and Garnier V. 1984. Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fertil.* 71:573-580.
- Schneider U. 1986. Cryobiological principles of embryo freezing. *J. IVF ET.* 3:3-9.
- Siebzehnuebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L and Lang N. 1989. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos : a comparison of DMSO and propanediol. *Human Reprod.* 4:312-317.
- Szell A, Zhang J and Hudson R. 1990. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180 degrees C. *Reprod. Fertil. Dev.* 2:613-618.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD and Fryman R. 1986. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.* 46:268-272.
- Todorow SJ, Siebzehnuebl ER, Koch R, Wildt L and Lang N. 1989. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster. *Hum. Reprod.* 4:805-811.
- Trounson A and Mohr L. 1983. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305:707-709.
- Van-den-Abbeel E, Van-der-Elst J and Van-Steirteghem AC. 1994. The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxides or 1,2-propanediol solutions. *Cryobiology* 31:423-433.
- Whittingham DG and Leibo SP. 1972. Mazur. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science NY.* 187:411-414.
- Whittingham DG. 1980. Principles of embryo preservation. In: Ashwood Smith MJ, Farrant J. editor. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology.* Pitman Medical, Tunbridge Wells. 65-83.
- Wilmut L. 1972. The effect of cooling rate, warming rate cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 2:1071-1079.
- Willadsen S, Polge C and Rowson LEA. 1978. The viability of deep-frozen cow embryos. *Reprod. Fertil.* 52:391-393.
- Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS and Cha KY. 2007. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 88:952-956.
- Zeilmaker GH, Alberta AT and Van Gent I. 1984. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.* 42:293-296.

Received September 16, 2014, Revised September 18, 2014,
Accepted September 26, 2014