

Effects of Acetamide and Lactamide on the Viability of Frozen-thawed Mammalian Cells

Hyun Kim^{1,2}, Young Moo Cho², Yeoung-Gyu Ko² and Hwan-Hoo Seong^{2*}

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

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

Received October 2, 2014 / Revised November 12, 2014 / Accepted November 13, 2014

While dimethyl sulfoxide (DMSO) is the most commonly used cryoprotectant agent in the cryopreservation of cultured mammalian cells, it has been reported to cause differentiation of some cell lines by DNA methylation and associated histone modifications. To avoid the side effects of DMSO in cryopreservation, other agents might be more appropriate for maintaining the stable differentiation of cultured cell phenotypes through cryopreservation. All cryoprotectants should be highly soluble in water and display low cell toxicity. Cryoprotective agents have been shown to be effective in animal sperm preservation, and eight types of amides were examined in the cryopreservation of cultured mouse endothelial cells. Among the amides examined, acetamide and lactamide were effective cryoprotectants for cultured mammalian cells. The most effective concentration of lactamide, 1.5 M, had an even lower cryoprotective ability than 1M DMSO. Because successful cryopreservation of cultured cells is hampered by osmotic stress, the adequate ionic concentration was determined by diluting phosphate-buffered saline (PBS) in the 1.5M lactamide solution. The most effective concentration was 0.4×PBS, which minimized osmotic stress during the cryopreservation of cultured cells. As the addition of high molecular weight materials in cryopreservation media improves the viability of cells, the effects of bovine serum albumin (BSA), hydroxyethyl-starch (HES), and dextran were examined. The best combination of lactamide-based media for cryopreservation was found to be 1.5 M lactamide in 0.4×PBS with 1% BSA.

Key words : Acetamide, cryoprotectant agent, lactamide, viability

서론

배양세포의 동결보존은 조직배양연구 과정에서 일시적으로 배양을 중단하고 보존하는 경우 혹은 동일한 lot를 대량 제작해 실험을 재현 시키는 경우에 필수적인 기술이다. 세포의 동결보존시에는 세포의 생존율을 떨어뜨리지 않게 하기 위해서 동결보호제, 동결보존액, 동결방법, 융해방법 등이 검토 되고, 세포내.외에서 얼음결정 형성에 의한 세포손상을 억제하는 연구노력을 해왔다. 동결보호제를 이용하지 않으면 배양세포는 -10°C에서 -20°C에, 세포내의 동결이 일어나, 파괴되는 결과를 초래한다. 현재, 가장 보편적으로 많이 사용되는 동결보호제는 Dimethyl sulfoxide (DMSO)로[11] 완만동결과 급속융해에 의해 높은 세포생존율을 손쉽게 얻을 수가 있다.

DMSO는 동결보호제로써 이용되는 것 이외에 배양세포의 분화유도제로 이용되어져 왔다[3, 10, 12, 22]. 배양세포 중에는 DMSO에 의해 세포분화가 촉진 되거나 억제되는 것이 있고[6, 9], DMSO를 이용한 동결보존에 의해 세포의 분화형질을 변화시킬 가능성이 있다. 이런 분화형질의 변화는 아마 DMSO내의 메틸기에 의해, 단백질 및 핵산의 메틸화가 촉진 되기 때문 [6]이라고 생각된다. 세포의 분화유도는 DNA의 메틸화와 크로마틴 구조의 변화에 크게 의존하고[1, 13], 분화연구에 이용되는 세포 혹은 일정하게 안정화된 유전자발현 상태를 유지하고 싶은 경우에 세포의 동결보존에 DMSO의 사용을 피하는 것이 좋다고 생각된다. 배양세포의 보다 재현성이 좋은 동결보존을 위해서는 DMSO농도를 낮추는 시도도 행해졌다[15].

동결보존시, 이용되는 동결보호제로써는 수용성이 높고, 동결시에는 고농도로 농축해, 세포독성이 없는 것이 중요하다 [11]. 세포막을 통과하는 저분자의 동결보호제로써 DMSO 이외에는 Ethylene glycol (EG), propandiol (1,2-PROH) 그리고 glycerol 등을 이용한 동결보호작용이 보고 되고 있다[17, 20]. 또한, 세포밖에 머무르면서 동결보호작용을 하는 것으로는 분자량이 큰 dextran, raffinose, 난황, 혈청알부민, glucose, sucrose 등이 보고되었다[17, 20]. 이러한 동결보호제 중에서 글리세롤은 10% 농도에서 DMSO의 대체제로 적혈구의 보존 등

*Corresponding author

Tel : +82-63-620-3525, Fax : +82-63-620-3591

E-mail : kim7268@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에 자주 사용되고 있지만, 세포생존율은 DMSO를 사용하는 경우가 훨씬 더 우수하다. 본 연구팀도 글리세롤, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜을 DMSO 대신해 조사해 본적이 있지만, 세포생존율은 50% 이하로 시간에 따라서는 세포독성도 관찰되고, 실용적인 동결보존액으로는 사용 할 수가 없었다.

가축번식의 분야에서 동물의 정자 및 수정란의 동결보존은 배양세포의 동결보존과 비슷하게 여러 가지 행해져 왔고, 완만동결 이외에도 적은 액량의 급속동결에 의한 얼음결정을 아모르파스한 상태로 되는 유리화법 등이 발달 하고 있다. 정자보존을 위한 동결보호제로써 검토 된 것 중에는 acetamide와 lactamide가 효과적이라는 보고가 있다[2, 4, 8, 16]. 정자보존에 이용되는 유리화는 액량이 적은 상태로만 가능하고, 배양세포에 적용한 경우에는 극히 소량의 세포만이 보존이 된다. 아세트아미드 그리고 락트아미드와 함께 수용성이 높고 세포독성이 적기 때문에 배양세포를 이용한 완만동결에서도 동결보호제로써의 가능성이 예상된다. 본 연구에서는 여러 가지 아미드 화합물에 정자에 대한 동결보호작용이 있는 것을 참고해서, 포유류의 배양세포에 대해서 동결보호작용을 가진 저분자로 수용성이 높은 아미드 화합물을 검출해 세포에 대해 메틸화의 영향을 주지 않는 동결보호액을 개발하는 것을 목적으로 수행했다.

재료 및 방법

세포배양

동결보존하는 포유류배양세포로써 마우스 혈관내상피세포(MSS31)를 이용했다[21]. MSS31세포는 소태아혈청(FBS : fetal bovine serum)을 2% 첨가한 D-MEM/F12 배지(invitrogen)에 10 µg/ml 트랜스페린, 1 µg/ml 인슐린, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF), 0.39 µg/l 아셀렌산나트륨(sodium selenite)를 첨가한 배양액에, 100 mm 조직배양용 플라스틱 배양접시를 이용하고, 탄산가스인큐베이터(5% CO₂, 37°C)에 배양했다. 3일마다 배지를 교환하고, 세포의 계대는 20 µg/ml 트립신, 0.2% EDTA-PBS (PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline), 용액에 세포를 박리하고, 새 배양접시에 계대했다. MSS31세포는 일반적인 섬유아세포주와 비교하면 동결에 약하고, 동결전의 세포상태 및 동결순서에 영향을 받고, 동결보존의 LOT별로 세포생존율이 변화하는 성질을 가지고 있기 때문에, 동결보존의 조건검토실험에 적합한 모델이라고 생각된다. 일본 도쿄대학교 수의과학대학 동물실험 윤리위원의 A-10-1211의 승인하에 진행하였다.

동결보존

MSS31세포를 1×10⁶개/ml의 밀도로 동결보존 했다. 냉각속도가 너무 빠르면 세포내의 물이 많이 남아서 얼음을 형성을 초래하기 때문에 완만동결로 하고, 동결보존온도는 -80°C

로 했다. 1.5 ml 플라스틱튜브(세라무튜브)에 1.0 ml의 세포현탁액을 넣고, 온도변화의 완충제로써 이소프로페놀을 이용해 동결보존용기(BICELL, Japan)안에 플라스틱 튜브를 넣고 -80°C의 초저온 탱크에 넣고 서서히 온도를 낮추고, 그대로 -80°C에서 보존했다. 동결 보존액에는 각종의 아미드 화합물과 DMSO를 각각 이용했다. PBS를 이용해 2 M 농도로 조정하고 원액으로 PBS를 사용한 세포현탁액에 대해 원액을 동량으로 동결보존용액의 최종농도를 1 M로 했다. 사용한 아미드 화합물은 아세트아미드, 아크릴아미드, 프로피온 아미드, 메타크릴아미드, 이소프틸아미드, 락트아미드, 니코틴아미드, 이소프탈아미드 등의 8 종류로 했다. 단지, 메타크릴아미드와 이소프탈아미드는 상온에서 2 M 용액을 만드는 것이 불가능하기 때문에 각각 상온에서 포화용액을 원액으로 이용했다. 아세트아미드, 락트 아미드의 농도의존성을 조사할 때 각각 4 M 농도의 PBS용액을 제작하고, 적당히 희석해서 사용했다. 1.5 M 락트아미드 보존액의 삼투압을 변경할 시에는 1.5 M 락트아미드 수용액과 2배 농도의 PBS를 이용해 제작한 1.5 M 락트아미드 용액을 이용해, 혼합비를 변화시킴으로써 다른 희석의 PBS용액이 되게 조정했다. 세포막을 통과하지 못하는 고분자화합물로는 소태아혈청 알부민(BSA : bovine serum albumin, 분자량 68k Da)[14], 테키스트란(평균분자량 180~210 kDa)[18], HES [19]을 사용했다. 완충작용이 있는 분자로는 HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazine ethanesulfonic acid) 또는 PIPES (piperazine-N, N' -bis (2-ethanesulfonic acid) 를 이용했다. HEPES는 1 M 용액을 만들고, NaOH로 pH를 7.2로 조정했다. PIPES는 1 M 용액을 만들고, KOH로 pH를 7.2로 조정했다.

세포의 용해

세포를 -80°C의 초저온탱크에 1일 이상, 10일 이내의 동결보존을 실시한 후, 37°C에 가온한 수돗물을 이용해, 동결 애플을 급속용해 했다. 용해 후의 세포현탁액은 곧바로 10배 용량의 PBS를 이용해 희석한 후, 1,500 RPM에 5분간의 원심분리에 의해 동결보존액을 제거하고, 플라스틱 튜브 한 개에 동결보존 한 세포(약 1×10⁶)를 다시 1 ml의 PBS에 현탁하고, 세포의 생존율을 조사했다.

세포생존율

세포생존율의 계산은 동결용해 후에 Calcein-AM 와 propidium iodide (PI)의 이중염색을 실시했다[7]. 급속용해 한 세포현탁액에 Calcein-AM 과 PI 원액을 첨가해, 최종농도를 0.33 µM Calcein-AM, 1.33 µM PI 로 37°C, 15분간 배양했다. 염색한 세포는 슬라이드 글라스에 방울을 떨어뜨리고, 커버글라스를 이용해 형광현미경하에서 관찰했다. 살아있는 세포는 Calcein-AM을 받아들이고, 세포내에 대사되고, 칼슘이온과 결합해, 초록형광을 발현한다. 죽은 세포는 PI를 받아들여,

DNA가 염색되고, 핵이 붉은색의 형광을 띤다. 세포생존율은 전세포수에 대해 Calcein-AM 에 염색된 세포수를 백분율로 표시하고, 세포생존율로 했다.

통계분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료들의 통계 분석은 Statistical Analysis System (SAS release ver. 8.2, 2002)의 General Linear Model (GLM) procedur를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였으며, 각 요인들의 상관관계의 유의성 검정은 Pearson's correlation coefficient를 활용하였다.

결과 및 고찰

마우스 혈관내상피세포주(MSS31)세포의 동결보존시 기준에는 세포의 동결보존에 이용되어 온 DMSO첨가 후, 세포생존율과 비교하는 것에 의해 각종 아미드 화합물에 동결보호작용이 있는지를 먼저 검토했다(Table 1). 동결에 이용된 세포수는 1×10⁶개/ml의 농도이다. 동결하는 세포의 농도가 너무 높으면 세포 사이에 얼음결정이 형성이 진행되어 세포가 좁은 공간에 갇혀지는 것과 같이 되어, 세포간의 접촉에 의한 기계적인 스트레스가 세포막에 영향을 줄 가능성이 있기 때문에, 세포농도의 검토가 필요하지만, 본 연구에서는 동일한 세포농도로 맞추어 실험했다. 조사한 아미드 화합물에는 아세트아미드, 아크릴아미드, 프로피온아미드, 메타크릴아미드, 이소프탈아미드, 락트아미드, 니코틴아미드, 이소프탈 아미드의 8종류이다. DMSO 그리고 각각의 아미드 화합물을 PBS를 이용해서 1 M용액에 세포를 동결보존 했다(Table 1). 메타크릴아미드와 이소프탈아미드에 관해서는 1/2 포화용액을 이용해 동결했다. 1 M의 DMSO용액을 이용한 경우의 세포생존율은 약 45% 인 것에 비해 아세트아미드는 약 33%, 락트아미드의 경우에는 약 19%였다. 이 결과로부터 세포생존율은 DMSO에 비해 높지는 않지만, 아세트아미드와 락트아미드도 동결보호작용이 있는 것을 확인했고, 두 화합물은 높은 용해성을 지니고 있어 용매로써 잘 이용되는 물질로 알려져 있다. 아세트아미드와 락트아미드 이외의 아미드 화합물에는 세포생존율이 5% 이하로, 동결보호작용은 없었다. 특히, 메타크릴아미드와 이소프탈아미드는 낮은 용해도로부터 동결보호작용이 낮은 것 이란 예상과 일치해 낮은 세포생존율을 확인했다. 아세트아미드와 락트아미드에 관해 농도의존적인 방법으로 동결보호작용이 변화하는지를 검토하기 위해 각각 0~2 M의 범위에서 세포생존율을 조사했다(Table 2). 아세트아미드의 동결보호작용은 0.5 M 그리고 락트아미드의 동결보호작용은 1.5 M의 농도에서 생존율이 가장 높음을 확인했다. 0.5 M 아세트아미드의 세포생존율은 약 28%인 것에 반해, 1.5 M의 락트아미드의 경우는 약 37%로 조사한 아미드 화합물 중에서 가장 높은 결과를 보였다. 동결보호제로써의 기능에 필요한 요소로는 빙점강하를 일으키고, 수용성이 높으며, 세포막을 안정화시키고, 저온에서 석출하지 않는 것 등이 생각되지만, 무엇보다도 세포독성이 낮은 것이 필요하고, 락트아미드의 농도의존적인 효과는 이런 조건들의 균형으로부터 성립된다고 사료된다.

배양세포의 동결보호에 대해서는 90% 정도의 세포생존율을 가지는 것이 실용적으로는 필요로 하다. 1.5 M 락트아미드의 세포생존율에서는 아직까지 불충분하고, 세포생존율의 개선을 도모하기 위해서, 동결보존 시 세포 외부의 얼음결정화를 조절하고 동결보호작용이 있는 고분자 화합물의 동결보호증강작용을 조사했다. 조사한 고분자 화합물은 동결보존 시

Table 1. Cell viability according to various amide compounds

Cryoprotectants	PBS	DMSO	Acet	Acryl	Prothion	Methacryl	Isopropyl	Lact	Nicotin	Isopeutal
			amide							
Viability (%)	1.1±0.4	43.8±0.81	31.6±0.4*	0	1.7±0.5	4.5±0.1	2.6±0.8	19.9±1.2*	0.7±1.1	0.6±0.2

Cell viability expressed as percentage of viable cell.

* : p<0.05

Dimethylsulfoxide (DMSO).

PBS: phosphate buffered saline.

Table 2. Cell viability according to different concentration of acetamide and lactamide

Con (M)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
Acetamide	9.4±2.1	26.0±0.4*	16.9±0.2	6.1±1.1	6.7±0.1	1.0±0.3	1.9±1.6	0.4±2.2
Lactamide	9.9±0.4	14.9±0.1	26.9±3.5	28.1±0.4	29.1±0.5	37.9±1.6*	28.9±5.1	26.1±2.9

Con: Concentration.

Cell viability expressed as percentage of viable cell.

* : p<0.05.

첨가물로서 효과가 있는 BSA, 테키스트란, HES이다. 1.5 M 락트아미드-PBS용액에 BSA, 테키스트란, HES를 각각 0.5%, 1.0% 첨가해 동결보존 한 결과, BSA를 첨가한 경우에 동결보호작용의 증강이 보였고, 세포생존율은 50% 가까이 보였다 (Table 3). 테키스트란과 HES를 첨가한 경우에는 세포생존율이 저하하고 기존의 보고된 것과 같은 동결보호작용의 증강은 락트아미드와의 조합에서는 없었다. 이는 배양세포의 동결보호작용에는 고분자의 탄수화물이 그다지 높은 효과를 가지고 있지 않을 가능성이 생각된다. 동결보호작용을 증강시키는 방법의 한가지로써 조직배양에 이용하는 소태아혈청을 DMSO와 조합해서 사용하는 경우가 있지만, 혈청의 동결보호작용의 증강이 포함된 알부민에 의한 것이라면, 혈청의 알부민농도가 4~5%인 것으로부터, 본 연구팀이 이용한 농도보다 더욱 더 높은 농도를 이용하는 것에 의해 동결보호작용이 증강 될 가능성이 생각된다.

DMSO를 이용한 기존의 동결방법에서는 보존액의 기본이 배지 혹은 혈청이기 때문에 다시 PH 조절을 할 필요가 없었지만, 락트아미드를 이용한 세포생존율의 개선에 PH의 안정이 조금이라도 영향을 미치는지를 확인하기 위해서 HEPES와 PIPES첨가의 효과를 조사했다. 이런 완충액은 각각 1960년대에 제창된 Good 완충액의 하나로, 탄산가스 배양기의 이산화탄소에 의해 PH의 변화를 억제하기 위해서 넓게 조직배양에

이용 되어져 왔다. 또한, 세포투과성이 낮은 것으로부터 세포 내의 생리적인 조건에 대해서 영향은 낮은 것으로 생각된다. 각각 PH7.2로 조정된 완충액을 최종농도 25 mM로 첨가하고, 1.5 M 락트아미드-PBS로 동결보존 후의 세포생존율을 조사하면 HEPES와 PIPES첨가가 미세하지만 세포생존율을 저하시키고, 동결보호작용의 증강은 보이지 않았다(Table 3).

락트아미드의 동결보호작용은 1.5 M의 농도에서 최대였다. 세포의 생리적인 삼투성과 비교해서 현저하게 높은 농도지만, 락트아미드는 세포막을 통과하는 것으로 생각되기 때문에, 세포를 1.5 M의 용액에 침지해도 막 삼투압 효과를 세포에 초래하지 않을 것으로 생각된다. 그러나, 첨가한 락트아미드는 응고점을 하강시키는 것 외에도 용액의 삼투압을 크게 변화시키는 것으로 일시적이지만, 세포에 대한 삼투압 충격을 일으킬 가능성이 생각된다. 세포를 동결시의 삼투압에 의한 세포 내외의 물의 출입은 생존율에 큰 영향을 줄 가능성이 있고[5, 17], 1.5 M의 락트아미드 용액을 제작 할 때의 기본용액인 PBS의 농도를 바꿔, 세포에 대한 실질적인 삼투압을 변화시킨 동결보호작용을 조사하는 것으로 했다. 농도가 다른 PBS로 제작하고, 삼투압을 변화시켜, 동결 후의 생존율을 조사한 결과, 0.4배 농도의 PBS에서 제작된 1.5 M 락트아미드-PBS가 동결보호작용이 최고로 높았다(Table 4).

이상의 결과에 의해서, 0.4배 농도의 PBS로 제작한 1.5 M

Table 3. Cell viability according to different additives of lactamide

Cryoprotectants	Control (lactamide)	0.5%			1.0%			25 mM	
		BSA	HES	Dextran	BSA	HES	Dextran	HEPES	PIPES
Viability (%)	38.2±2.1	49.2±0.4*	37.1±2.1	34.1±1.6	49.9±0.2*	31.6±2.6	38.3±0.2	32.4±1.3	36.9±0.8

BSA : bovine serum albumin.

HES : hydroxyethyl-starch.

HEPES : (4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazine ethanesulfonic acid).

PIPES : piperazine-N, N' -bis (2-ethanesulfonic acid).

Cell viability expressed as percentage of viable cell.

* : p<0.05

Table 4. Cell viability according to different concentration of PBS on lactamide (1.5 M)

Solvent*	Water	PBS					
		X 0.2	X 0.4	X 0.6	X 0.8	X 1.0	X 1.2
Viability (%)	20.4±2.6	29.7±1.6	36.5±0.4*	25.5±5.2	23.1±2.1	24.4±3.2	18.3±4.1

Cell viability expressed as percentage of viable cell.

* : p<0.05

Table 5. Cell viability according to different cryopreservation medium

Cryopreservation medium	1M DMSO-PBS	1.5M lactamide		
		0.4xPBS	0.4xPBS + 0.5% BSA	0.4xPBS + 1.0% BSA
Viability (%)	52.3±2.6	45.8±3.1	56.1±2.1	67.1±1.1*

Cell viability expressed as percentage of viable cell.

* : p<0.05

락트아미드-PBS에 0.5% 혹은 1.0%의 BSA를 첨가하면 세포 생존율이 더욱 더 개선된다고 예상해, 기존의 방법인 10% DMSO의 경우와 동결보존 후의 세포생존율을 비교했다(Table 5). 0.4 배 농도의 PBS로 제작한 1.5 M 락트아미드-PBS에 약 45%였던 세포생존율은 1.0%의 BSA를 첨가하는 것에 의해 약 66%로 개선하고, 1 M DMSO (약 52%)와 비교해도 높은 동결보호작용을 보였다. 동결보호작용을 더욱 더 증강시켜, 90% 이상의 생존율을 얻기 위해서는 락트아미드 이외의 세포막 투과형 동결보호제의 추가조합 및 세포 외의 유리화를 촉진할 수 있게 BSA의 농도를 5% 정도까지 올리는 것과 동결보호작용이 보고된 고분자를 조합해 보는 전략이 필요할 것으로 사료된다. 또한, DMSO 사용의 경우에는 그다지 문제는 되지 않지만, 락트아미드의 고농도 사용의 경우에는 용해시의 세포 세척액에 의한 용액의 급격한 희석에 의한 쇼크에 대해서도 급후 세밀한 검토가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

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

References

- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.
- Dalimata, A. M. and Graham, J. K. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* **48**, 831-841.
- Edwards, M. K., Harris, J. F. and McBurney, M. W. 1983. Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol Cell Biol* **3**, 2280-2286.
- Hanada, A. and Nagase, H. 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil* **60**, 247-252.
- Hunt, C. J., Armitage, S. E. and Pegg, D. E. 2003. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1.Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34 (+) cells to dimethylsulphoxide. *Cryobiology* **46**, 61-75.
- Iwatani, M. 2006. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* **24**, 2549-2556.
- Kaneshiro, E. S., Wyder, M. A., Wu, Y. P. and Cushion, M. T. 1993. Reliability of calcein acetoxymethyl ester and ethidium homodimer of propidium iodide for viability assessment of microbes. *J Microbiol Methods* **17**, 1-7.
- Kashiwazaki, N., Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T. and Inomata, T. 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J Reprod Dev* **52**, 511-516.
- Katkov, I., Kim, M. S., Bajpai, R., Altman, Y. S., Mercola, M., Loring, J. F., Terskikh, A. V., Snyder, E. Y. and Levine, F. 2006. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* **53**, 194-205.
- Krystosek, A. and Sachs, L. 1976. Control of lysozyme induction in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Cell* **9**, 675-684.
- Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* **183**, 1394-1395.
- Lyman, G. H., Preisler, H. D. and Papahadjopoulos, D. 1976. Membrane action of DMSO and other chemical inducers of Friend leukaemic cell differentiation. *Nature* **262**, 361-363.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-673.
- Liu, Y., Xu, X., Ma, X. H., Liu, J. and Cui, Z. F. 2001. Effect of various freezing solutions on cryopreservation of mesenchymal stem cells from different animal species. *Cryo Letters* **32**, 425-435.
- Liu, Y., Xu, X., Ma, X., Martin-Rendon, E., Watt, S. and Cui, Z. 2010. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. *Biotechnol Prog* **26**, 1635-1643.
- Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T., Inomata, T., Kamijo, S. and Kashiwazaki, N. 2007. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp Anim* **56**, 29-34.
- Pegg, D. E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* **368**, 39-57.
- Quan, G. B., Han, Y., Liu, M. X., Fang, L., Du, W., Ren, S. P., Wang, J. X. and Wang, Y. 2011. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. *Cryobiology* **62**, 135-144.
- Stolzing, A., Naaldijk, Y., Fedorova, V. and Sethe, S. 2012. Hydroxyethylstarch in cryopreservation mechanisms, benefits and problems. *Transfus Apher Sci* **46**, 137-147.
- Walter, Z., Szostek, M., Weglarska, D., Raguszevska, D., Jabłoński, M., Lorenz, F. and Skotnicki, A. B. 1999. Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przegl Lek* **56**, 34-39.
- Yanai, N., Satoh, T. and Obinata, M. 1991. Endothelial cells create a hematopoietic microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell Struct Funct* **16**, 87-93.
- Young, D. A., Gavrillov, S., Pennington, C. J., Nuttall, R. K., Edwards, D. R., Kitsis, R. N. and Clark, I. M. 2004. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 759-765.

초록 : 포유류배양세포 동결보존에 있어 Lactamide의 효과김 현^{1,2} · 조영무² · 고응규² · 성환후^{2*}

(1일본 동경대학교 수의과학대학 수의생리학 교실, 2농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장)

DMSO는 배양포유류세포 동결보존의 동결보호제로써 일반적으로 사용 되어져 왔지만, DNA 메틸화 및 히스톤의 수식에 의해 일부 세포에서는 분화를 일으키는 것으로도 알려져 있다. 동결보존시의 배양세포의 안정된 분화형질유지에는 메틸화를 일으키는 DMSO 이외의 동결보호제의 사용이 필요하다. 세포독성이 낮고, 동물정자동결보존에 효과적인 것으로 알려진 아미도 화합물이 동일하게 포유류의 배양세포의 동결보존에서 동결보호작용이 있는지를(8종류의 아미드 화합물) 배양 마우스 혈관내피세포를 이용해 조사했다. 조사한 아미드 화합물 중에 아세트아미드와 락트아미드의 2종류가 배양세포에 대해서 동결보호작용이 있고, 가장 효과적인 것은 농도가 1.5 M의 락트아미드이다. 배양세포의 동결보존에 관해서는 삼투압 스트레스를 받지 않을 필요가 있기 때문에, 1.5 M 락트아미드 용액을 제작 시, 용매를 각 희석율의 PBS로 하고, 삼투압을 바꾼 동결 보존액에 동결세포의 생존율을 조사했다. 그 결과, 0.4배 농도의 PBS가 삼투압 스트레스를 가장 낮고 생존율이 가장 높음을 확인했다. 동결보존배지에 고 분자량재료를 첨가하면 세포생존율이 개선되는 것이 알려져 있기 때문에 BSA, HES, 데키스트란의 효과를 조사했다. 그 결과, 락트아미드를 이용한 동결보존배지는 0.4× PBS를 이용한 1.5 M 락트아미드용액에 1%의 BSA를 첨가한 경우, DMSO의 동결보호작용에 필적하는 동결보호작용을 나타내는 것을 확인했다.