# 생쥐배아의 동결보존에 관한 실험적 연구

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

이여일 권영숙 박현정

# The Experimental Study on Cryopreservation of Mouse Embryo

Yu-Il Lee, Young-Sook Kwon, Hyun-Jeong Park

*Department of Obstetrics and Gynecology, Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea, 501-190*

*주관책임자: 이여일, 전남대학교 의과대학 산부인과학교실, 광주시 동구 학1동 8번지 501-190

Tel: 062-220-6371,6376, Fax:062-227-1637, E-mail: leeyi@chonnam.ac.kr

*본 연구는 1998년도 전남대학병원 임상연구소 연구비(CUHRI U-98028) 지원에 의해 이루워진 것임

Objectives: 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).

Materials and Methods: Two to eight cell embryos were obtained from oviducts of mated $F_1$ hybrid female mice superovulated by pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG). Two-step 1, 2-propanediol (PROH), dimethylsulfoxide(DMSO) and 4-step PROH, 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.

Results: As for the survival and development rates of embryos according to embryonic stage, the survival rate of 2 cell stage in PROH and DMSO was significantly higher than 4-8 cell ( 64.5% versus 62.1%, 79.7% versus 73.2%) ($p<0.01$, $p<0.01$), but the development rates of 4-8 cell embryos in PROH 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 PROH 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 PROH (74.4% versus 64.5%) ($p<0.01$), 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 PROH than in DMSO during 48 hr ($p<0.01$). The survival rate of 4-8 cell embryo was 62.1% in PROH and 73.2% in DMSO. The development rates of embryo in PROH 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.

Conclusions: The survival rate of embryo in 2 cell stage was higher than in 4-8 cell stage, and PROH appears more effective cryoprotectant than DMSO because PROH 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, PROH, DMSO.

보조생식술은 미세 보조수정술, 과배란 유도방법 및 동결 보존법등의 발전에 힘입어 지난 20 여년 동안 비약적인 발전을 거듭해왔다. 특히 과배란 유도방법의 향상은 이전에 비해 상대적으로 많은 수의 난자 및 양질의 배아를 얻을 수 있게 하였지만, 1회 배아이식 당 임신 가능한 적정수 이상의 이식 배아로 인해 다태아 임신이 빈발해져[1] 이식하는 배아의 수를 조절해야 하는 문제가 발생하였다. 5개 이상의 배아를 자궁 내 이식하면 15 ~ 20%에서 다태임신이 발생한다고 보고되고있어[1-3] 보조생식술 첫회에 4개 이하만의 배아를 이식하고 잉여 배아를 원하는 기간까지 안전하게 보관 할 수 있는 방법을 찾게 되었다[4-6].

배아의 동결보존은 배아 세포를 동해방지제에 노출시키고 영하의 온도로 냉동 저장 한 후 필요한 시기에 해동하여 동해방지제를 제거한 후 세포의 발달이 계속 이뤄질 수 있는 생리적 환경상태로 되돌리는 과정을 말한다. 세포는 동결과정 동안 동해방지제, 동결방법 등에 따라 많은 스트레스를 받지만 그 구조와 모양이 그대로 유지되어야만 해동 후 생존이 가능한데, 이를 위해서는 세포내 결빙형성의 최소화라는 가장 단순하면서도 중요한 원칙이 지켜져야 한다. 결빙은 동결 전 후 세포의 탈수과정 중에 이뤄질 수 있으며 만약 탈수가 부적절하면 세포내 결빙이 크게 형성되어 세포는 손상을 입게된다. 또한 해동시 동해방지제의 제거가 부적절하게 이뤄질 때도 동해방지제의 독성으로 인해 세포는 손상을 입을 수 있다. 그래서 세포의 동결과정동안에 만들어질 수 있는 결빙현상과 해동시 동해방지제로 인한 독성효과를 최소화하기 위해 보다 더 완벽한 동결보존법의 개발이 필요하다.

1972년 Whittingham등[7]이 생쥐배아의 동결보존 및 해빙에 처음 성공한 후 토끼[6], 햄스터[8], 양[9]등에서도 잇달아 적용되었다. 인간에서는 1983년 Trounson과 More[10]가 동해방지제로 DMSO를 냉동방식으로 -80℃ 까지 매 분당 -0.3℃ 씩 하강 시키는 완만동결방법을 4-8 세포기 배아에 사용하여 첫 번째 임신을 보고하였으며, 뒤 이어 1984년에는 Zeilmaler등[11]이 동일한 동해방지제로 -40℃ 까지 완만동결하는 방법을 8세포기 배아에 적용함으로써 임신 및 분만에 성공하였다. 그 이후 Lassalle등[12] 은 동해방지제로 PROH에 sucrose를 첨가하여 사용함으로써 동결온도를 -30℃ 까지만 감소시키고 시간도 줄일 수 있었다. 또 Cohen등[13]은 glycerol로 배포를 동결보존한 후 임신에 성공하였다. 이처럼 동결보존과정 중의 세포손상을 최소화하기 위해 동물뿐 아니라 인간의 배아 동결보존에 다양한 동해방지제 및 동결방법이 사용되오고 있다. 동결보존시 다양한 동해방지제 와 동결방법을 사용하는 이유는 동결보존된 배아의 생존율과 발달율이 이들 요인에 의해 달라질 수 있기 때문이다. 그런데 동결보존된 배아의 생존율과 발달율에 영향을 미치는 이들 요인들의 상관관계에 대한 연구는 아직 미약한 실정이며, 또한 동결보존법에 대한 견해도 실험실 마다 달라 이에 대한 체계적 연구가 필요하다.

따라서, 본 연구는 생쥐 초기 배아를 이용하여 동결보존된 배아의 생존율 과 발달율에 영향을 미치는 요인들의 상관관계를 알아보고 동결보존법을 체계화 하고자 배아의 발달단계, 동결 및 해빙속도, 동해방지제의 종류에 따라 동결 보존한 후 해동하고 배아의 생존율 및 발달율을 조사하여 동결보존법에 대한 최적조건들을 살펴봄으로써 임상적 적용에 대한 유용성을 검토하고자 시도하였다.

재료 및 방법

1) 실험동물

본 실험에서는 생쥐 제 1 세대 잡종(C57BL ♀ × CBA ♂)으로 생후 4-5주된 암컷과 6-8주된 생식력이 확인된 수컷을 사용하였다. 이들은 명기와 암기가 조절되는(12시간:12시간) 사육실에서 사육하였다.

2) 실험군의 분류

배아를 동결하지 않고 배양한군을 대조군으로 하고 배아의 동결 후 생존율 및 배발달율을 조사한 군을 실험군으로 설정하였다. 실험군은 배아의 발달단계, 동해방지제, 배아의 동결속도에 따라 각각 2세포 와 4-8세포배아, PROH 와 DMSO, 그리고 완만동결-급속해동 과 급속동결-급속해동군으로 분류하였다.

3) 과배란유도 및 2세포기 배아 와 4-8세포기 배아의 회수

과배란 유도를 위하여 5 IU 의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 생쥐 암컷에 복강 주사하고 48시간후 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 복강 주사하였다. hCG 주사 후 즉시 암컷과 수컷을 1:1로 합사하여 교배를 유도하였다. 2세포기 배아는 hCG주사 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 Cat. No. 450-1300)을 이용하였고 30G 주사침이 부착된 1회용 투버클린 주사기로 난관을 관류하여 회수하였다. 현미경은 해부현미경을 이용하였으며 회수용기는 1회용 배양접시(35×10mm, Falcon 3001)을 이용하였다.

4) 동해방지제 와 해동액

(1) PROH 동해방지제 와 해동액

동해방지제 와 해동액을 제조하기 위한 기본용액은 인산완충액에 20% 소태아혈청(fetal bovine serum, Gibco )을 첨가하여 사용하였다. 동해방지제는 기본용액에 1,2-propanediol(PROH, Sigma P-1009) 첨가한 1.5M PROH 용액과 1.5M PROH에 0.1M sucrose를 첨가한 용액을 사용하였다. 해동액은 기본용액 에 PROH를 첨가하여 각각 0.5M, 1.0M 용액을 만든 후 0.1M sucrose를 혼합하여 제조하였다. 제조한 동해방지제 와 해동액은 각각 0.22μmillipore filter(Acrodisc 4192, German)로 여과하여 멸균을 실시하였다.

(2) DMSO 동해방지제 와 해동액

동해방지제는 기본용액에 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merk )를 첨가한 1.5M DMSO와

1.5M DMSO에 0.1M sucrose를 첨가한 용액을 사용하였다. 해동액은 기본용액에 DMSO를 첨가하여 각각 0.5 M, 1.0M의 용액에 0.1M sucrose를 혼합하여 제조하였다. 제조한 동해방지제 와 해동액은 각각 0.22μ millipore filter(Acrodisc 4192, German)로 여과하여 멸균을 실시하였으며 동해방지제 와 해동액은 동결 또는 해동 1-2시간 전에 제조하여 사용하였다.

5) 동결방법과 해동방법

(1) 배아의 탈수

배아의 세포질내 존재하는 물을 제거하고 제거된 양만큼 동해방지제를 세포질 내로 유입시키는 탈수과정은 2단계 방법을 사용하였다. 정상적으로 발달한 배아를 1단계 1.5M PROH 또는 1.5M DMSO, 2단계 1.5M PROH 에 0.1 M sucrose기 첨가된 용액 또는 1.5M DMSO 에 0.1M sucrose가 첨가된 용액에서 각각 15분간 노출시켜 탈수를 유도하였다.

(2) 스트로우에 배아의 장전

1.5M PROH 에 0.1M sucrose 가 첨가된 용액 또는 1.5M DMSO 에 0.1M sucrose 가 첨가된 용액에서 15분간 탈수가 진행되는 동안 0.25ml 플라스틱 스트로우(A-201, IMV, France)에 mouth piece를 이용하여 장전하였다.

(3) 배아의 동결과정

배아를 넣은 스트로우는 마지막 탈수 시간이 종료되자마자 동결기로 옮긴 다음 컴퓨터 프로그램에 내장된 배아동결기(KRYO 10 Ⅲ, Planer, U.K.)에 loading하여 다음과 같은 방법으로 동결시켰다.

가. 완만동결 - 급속 해동법

완만동결방법은 +20℃에서 -7℃ 까지 1분당 -2℃로 하강한 후 -7℃에 도달하여 1분이 경과할 때 액체질소(-196℃)에서 건져낸 핀셋으로 스트로우를 가볍게 집어줌으로써 식빙을 실시하였다. 식빙후 5분간 동결기 내에 정치한 후 -30℃까지 분당 - 0.3℃로 온도를 하강시키고 이 온도에서 10분간 정지시켜 동결한 후 스트로우를 세포동결기에서 꺼내 액체질소통에 직접 넣었다. 이렇게 동결된 배아는 해빙할 때까지 -196℃ 액체질소통에 보관하였다. 급속 해동법은 배아가 저장된 스트로우를 액체질소 탱크에서 꺼내어 상온의 공기중에 노출시켜 해동시킨 다음 스트로우의 물기를 거즈로 제거하고 알코올거즈로 소독한 후 스트로우의 양쪽을 가위로 잘라서 동결액과 배아를 접시에 부어 현미경 하에서 배아를 회수한 다음 재침수 과정에 들어갔다.

나. 급속동결- 급속해동법

급속동결 방법은 실온에서 0℃까지 1 분당 -3℃로 온도를 하강시킨 후 0℃에서 10분간

정치시켰다. -7℃까지 1 분당 -3℃로 온도를 하강하고, -7℃가 되면 미리 액체 질소에 담궈 두었던 핀셋으로 식빙시키고 5분간 정치시켰다. 다시 -20℃까지 1분당 -3℃로 온도를 하강시키고 10분간 정치시켰다. 1 분당 -17℃의 온도 하강으로 -100℃까지 온도를 낮춘 후 10분간 정치하여 동결 보존을 완료시켜 액체질소통에 보관하였다. 급속해동 방법은 위에 기술한 바와 동일하게 시행하였다.

(4) 해동과 배아의 재수화

회수한 배아는 재수화 용액에서 3단계로 옮겨가면서 탈수의 역과정을 수행하였다. 해동 회수된 배아는 1.0M PROH 에 0.2M sucrose가 첨가된 용액 과 0.5M PROH 에 0.2M sucrose가 첨가된 용액를 포함한 기본용액에서 각각 5분간 처리한 후 0.2M sucrose만 포함된 해동액에서 5분간 처리하였다. 마지막으로 배아는 20% 소태아혈청이 포함된 인산완충액에서 5분간 처리하고 배양액에 옮겨 배양하였다. 한편의 해동된 배아는 1.0M DMSO 에 0.2M sucrose가 첨가된 용액 과 0.5M DMSO 에 0.2M sucrose가 포함된 기본용액에서 각각 5분씩 처리한 후 기본용액에 0.2M sucrose만 포함된 해빙액에서 다시 5분간 처리하고 마지막으로 20% 소태아혈청이 포함된 인산완충액에서 5분간 처리하여 재수화 과정을 마쳤다.

6) 생존성 판정

재수화 과정이 완료된 배아는 기본용액에서 3회 세척한 후 상온에서 5분이 경과하였을 때 형태적인 생존성을 확인하였다.

7) 해동 후 배아의 체외배양

해동된 배아를 상온에서 기본배양액에 20분간 노출시킨 후 배양액으로 옮겨 세포 발달단계에 따라 이산화탄소 부란기에서 2 세포기는 96시간, 4-8 세포기는 72시간 배양 후 hatching까지 진행된 비율을 구하였다.

8) 통계학적 분석

실험을 통하여 얻은 모든 결과들은 $\chi^2$-test와 Student t-test를 시행하여 통계적 유의성을 조사하였고 p값이 0.05 미만 일 때를 유의 하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1) 생쥐 배아의 발달단계에 따른 동결보존 효과(Table 1, 2)

생쥐 2 세포기와 4-8세포기 배아를 PROH 와 DMSO 동해방지제를 사용하여 동결보존 후 생존율을 조사해 본 결과 2세포기 배아의 생존율이 PROH에서 64.5% DMSO에서 79.7%, 4-8세포 배아의 생존율이 각 각 62.1%, 73.2%로 PROH 와 DMSO 두 동해방지제에서 모두 2 세포기 배아의 생존율이 유의하게 높았으며 ($p<0.01$), 해빙 후 2세포기와 4-8세포기를 24, 48, 72, 96시간 배양해 본 결과 배 발달율에 있어서는 PROH를 사용한 2세포기 배아에서 82.8%, 58.9%, 58.3%, 53%, 4-8세포기에서는 84.1%, 86.6%, 72.2%이였고 DMSO를 사용한 2세포기 배아에서는 80.7%, 29.8%, 30.7%, 20.2%, 4-8세포기에서는 49%, 36.2%, 25.5%로 해빙 후 배 발달율에 있어서는 PROH 와 DMSO에서 모두 4-8 세포기 배아가 2세포기 배아보다 유의하게 높은 배 발달율을 나타내었다 ($p<0.01$).

### 2) 동해방지제에 따른 생쥐 배아의 생존율 및 발달율

#### (1) 2세포기 배아 (Table 3)

2세포기 배아를 PROH와 DMSO 를 사용하여 동결후 해동해 본 결과 생존율에 있어서는 PROH에서 64.5%, DMSO에서 74.4%로 DMSO에서 유의하게 높았으며 ($p<0.01$), 해동 후 24, 48, 72, 96시간 배양에 따른 배 발달률에 있어서는 PROH 에서 82.8%, 58.9%, 58.3%, 53.0% 이었고, DMSO에서는 80.8%, 35.1%, 35.1%, 31.8%로 PROH 에서의 배 발달율이 48시간 이후부터 유의하게 높았다 ($p<0.01$).

#### (2) 4-8세포기 배아 (Table 4)

4-8세포기 배아를 PROH와 DMSO 를 사용하여 동결후 해동해 본 결과 생존율에 있어서는 PROH에서 62.1%, DMSO에서 73.2%로 DMSO에서 유의하게 높았으며 ($p<0.01$), 해동 후 24, 48, 72시간 배양에 따른 배 발달율에 있어서는 PROH 에서 84.1%, 86.6%, 76.2% 이었고, DMSO에서는 67.0%, 49.5%, 34.9%, 로 PROH에서의 배 발달율이 지속적으로 유의하게 높았다 ($p<0.01$, $p<0.05$).

### 3) 동결방법에 따른 생쥐 배아의 생존율 및 발달율 (Table 5)

생쥐 배아의 발달 단계에 따른 동결보존 효과에서 더 높은 생존율을 나타내었던 2 세포기 배아를 동결방법을 달리하여 생존율 및 발달율을 비교 조사해 본 결과 완만동결-급속해동 방법에 따른 배아의 생존율이 74.8%, 급속동결-급속해동 방법은 3.2%로 완만동결-급속해동 방법에서 유의하게 더 높은 생존율을 보였으며 ($p<0.001$), 또한 배 발달율에 있어서도 완만동결-급속해

**동 방법은 39.1%가 부화 배포까지 발달한 반면 급속동결-급속해동 방법은 해동 후 4 세포기 까지만 11.1%의 배 발달이 진행되고 그 이후로는 발달이 정지되었다.**

Table 1. Effect of cryopreservation by using of PROH 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 4-8cell≤ 24hr | morular≤ 48hr | morular≤ 24hr | blastocyst≤ 72hr 48hr | hatching≤ 96hr | hatching≤ 72hr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 cell | 246 | 234(95.1) | 151(64.5)* | 125(82.8) | 89(58.9) | | 50(83.3) | 46(76.7) | |
| 4-8 cell | 299 | 264(88.3) | 164(62.1) | | 138(84.1)* | | 142(86.6)* | | 125(76.2)* |

*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 4-8cell≤ 24hr | morular≤ 48hr | morular≤ 24hr | blastocyst≤ 72hr 48hr | hatching≤ 96hr | hatching≤ 72hr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 cell | 170 | 143(84.1) | 114(79.7)* | 92(80.7) | 34(29.8) | | 35(30.7) | 23(20.2) | |
| 4-8 cell | 163 | 149(91.4) | 109(73.2) | | 73(49)* | | 54(36.2)* | | 38(25.5)* |

*p<0.01

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

| cryoprotectant | No. of frozen embryo | No. of recovered embryo (%) | No. of survival embryo (%) | development of embryo (%) culture time 24hr (4-8cell≤) | 48hr (morular≤) | 72hr (blastocyst≤) | 96hr (hatching≤) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | | 60 | | 57(95.0) | 55(91.7) | 50(83.3) | 46(76.7) |
| PROH | 246 | 234(95.1) | 151(64.5) | 125(82.8) | 89(58.9)* | 88(58.3)* | 80(53.0)* |
| DMSO | 230 | 203(88.2) | 151(74.4)* | 122(80.8) | 53(35.1) | 53(35.1) | 48(31.8) |

*p<0.01

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

| cryoprotectant | No. of frozen embryo | No. of recovered embryo (%) | No. of survival embryo (%) | development of embryo(%) culture time 24hr (morular≤) | 48hr (blastocyst≤) | 72hr (hatching≤) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | | 40 | | 40(100) | 40(100) | 36(90.0) |
| PROH | 299 | 264(88.3) | 164(62.1) | 138(84.1)* | 142(86.6)* | 125(76.2)** |
| DMSO | 163 | 149(91.4) | 109(73.2)* | 73(67.0) | 54(49.5) | 38(34.9) |

*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 24hr (4-8cell≤) | 48hr (morular≤) | 72hr (blastocyst≤) | 96hr (hatching≤) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | | 60 | | 56(93.3) | 53(88.3) | 50(83.3) | 48(80.0) |
| Slow | 354 | 334(94.4) | 250(74.8)* | 209(83.6) | 166(66.4) | 111(44.4) | 108(43.2) |
| Rapid | 325 | 284(87.4) | 9(3.2) | 1(11.1) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |

*$p<0.001$

## 고 찰

세포의 동결보존이란 세포대사가 일시적으로 중단될 수 있게 충분히 낮은 온도에서 동결상태로 보존하므로써 세포의 생장기간을 연장하여 생명을 유지시키는 것을 말한다. 생식세포의 동결보존에 대한 연구는 1947년 Chang[14]이 토끼 난자를 동결보존하여 번식시키고, 1949년 Polge[15]가 소의 정자를 효과적으로 동결하는데 성공하면서 시작되었다. 그리고 배아의 동결보존은 1972년 Whittingham등[8]과 Wilmut[16]가 8-세포 생쥐배아를 동결보존하는데 성공함으로써 오늘날의 배아 동결보존에 관한 토대를 이룩하게 되었다.

그 후 동결보존에 관하여 많은 연구가 이루어졌고 수많은 동물의 배아에 대한 다양한 동결보존기법이 성공하였으며 인간의 배아에 대해서도 이를 적용하게 되었다.

포유류 및 인간배아의 동결보존 과정에서 성공률에 영향을 주는 요인들로는 동물의 종, 동결시 배아의 발달단계와 배아의 형태[12,16], 동결 및 융해속도[15,16], 동해방지제의 선택[15,16]을 들 수 있다. 이처럼 배아가 동결 및 해동과정에서 가능한 손상를 입지 않도록 하기 위한 연구가 활발히 이루어져오고 있으나 이에 대한 견해는 연구자들 간에 다양한 실정이다.

배아의 발생시기와 세포주기에 따라 세포막에서는 물질 투과성과 세포골격 변화가 일어난다. 이에 따라 물과 용질의 투과성, 동결속도와 세포내 얼음 결정 형성등 물리적 동결보존 요인에 대한 적응 변화가 야기된다[17,18]. 생쥐 모델에서는 배아의 발달단계에 따라 동해방지제를 달리 사용하고 있는데 일반적으로 1-4세포기 동결시에는 동해방지제로 PROH를 사용하며[12], 4-8세포기 동결시는 세포막에 침투성이 좋은 DMSO를 이용하고 있고[10], 상실배와 배포 배아를 동결할 때는 glycerol을 사용하고 있다[13]. 그러나 상실배 또는 배포기의 동결보존은 먼저 수정된 배아를 상실배 이상까지 배양해야 하는 배양조건과 기술의 향상이 선행되야 하는 문제점과 glycerol이 다른 동해방지제 보다 독성이 심한 걸로 알려져 있어[10] 본 연구에서는 배아의 초기 배 발달단계인 2, 4-8세포기 배아를 PROH, DMSO를 사용하여 동결-해동 하고 생존율과 배 발달율을 비교 조사해 보았다. Lassalle등[12]은 PROH를 초기 배아의 동결시 사용하여 인간 1-4세포기에서 53%, 4세포기 이상에서 24.5% 생존율을 얻어, 2세포기 배아에서 64.5%, 4-8 세포기에서 62.1% 인 본 연구의 생존율 성적 보다 다소 낮았지만 PROH가 4세포기 이하의 배아 동결보존 후 생존율에 더 효과적이라는 의견에서는 일치하였다. 그러나 본 연구 결과 동결 및 해빙후의 배 발달율에 있어서는 2세포기 보다 4-8세포기 배아에서의 발달율이 유의하게 높아 1세포기와 4세포기를 이용하여 배 발달 후 착상 및 임신율을 보았던 Liu[19]와, 1세포, 4세포, 배포를 사용하여 배 발달율을 비교하였던 Emiliani등[20]의 보고와 비슷하였다.

또한, 배아의 동결시 다양한 동해방지제를 사용하게 되는데 그 이유는 첫째, 동해방지제가 빙점을 낮추어서 세포내 빙 결정을 방지 및 지연시켜주고[21] 둘째, 세포밖의 동해방지제의 삼투압을 증가시켜 세포내의 물이 세포 밖으로 빠져 나오게하며[22] 셋째, 동결 및 해빙 중에 액체에서 고체로 다시 고체에서 액체상태로 변화하는 과정에서 동해방지제가 세포막과의 상호작용에 의해 세포를 보호하고[23] 넷째, 탈수된 세포내로 침투하여 삼투압 평형상태에 도달하게하여 세포를 정상

적인 형태로 회복시키는 작용을 하기 때문이다[23]. 동해방지제가 이러한 잇점를 갖고 있는 반면에 해동 후 그 독성작용을 나타내기도 하여 최근에는 독성을 줄이기 위하여[24] 침투성 동해방지제인 PROH, DMSO, glycerol에 비 침투성 동해방지제인 sucrose를 혼합하여 동결-해동시 사용함으로서 삼투압 변화로 인한 손상를 감소시키고 있다[25,26]. 본 연구에서도 2, 4-8세포기 배아 동결-해동시 PROH와 DMSO에 sucrose를 혼합하여 사용해 해동 후 세포손상을 감소시키려 노력하였으나 배 발달율에 있어서 대조군 만큼의 성적을 얻지는 못하였다. 2세포기에서는 PROH 사용시 해빙 후 배양 48시간째 배 발달율이 유의하게 감소하여 ($p<0.01$), 동해로의 배 발달율 감소를 나타냈으나 그 이후 배양기간 동안에는 유사한 배 발달율을 나타내어 동해방지제의 독성에서 벗어나 동해에 대한 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 그리고 DMSO에서도 해동 후 배발달율에 있어서 유사한 효과를 얻었다. 4-8세포기 배아에서는 동해방지제로 PROH 사용시 해동후 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 PROH는 2, 4-8세포기 배아의 동결 후 DMSO 사용시 보다 배 발달율에 있어서 더 유의하게 증가된 성적을 나타내어 생쥐 2세포를 이용하여 DMSO에서 보다 PROH 사용시 배포까지의 발달에 좋은 성적을 얻었던 Macas등[27] 과 생쥐 전핵 배아를 이용하여 PROH에서 더 효율적인 결과를 얻었던 Van-den-Abbeel등[28]의 보고와 일치하였다.

마지막으로, 배아의 동결-해동 후 생존율에 영향을 미치는 주요인자로 동결속도를 또한 들 수 있는데 현재 가장 적합한 냉각속도로는 -0.3 ~ -0.4℃/min로 보고되고 있으며[7], -80℃까지 냉각하는 방법[7,29]과 -30℃까지만 냉각한 후 액체질소 속에 담그는 완만동결법이 알려져 있다[30]. 완만동결법은 보다 많은 세포를 탈수시킬 수 있고 해동 후에도 세포의 생존성을 증가시킨다고 하는데 본 연구 결과에서도 완만동결-급속해동방법에서 좋은 결과를 얻었다. 그렇지만 모든 세포에 있어 완만동결이 좋은건 아니며 각각의 세포에 적합한 최적의 동결 속도가 있다고 한다[31]. 이는 삼투압 차에 따른 반응 속도와 물의 이동에 대한 온도의 효과가 세포마다 다르기 때문으로 생각되고 있다. 그러나 완만동결 방식은 동결 후 생존율이 좋은 반면 경비와 시간이 많이 소요되는 단점이 있어 최근에 들어서는 초자화동결법이 개발되면서 고농도의 동해방지제에 바로 노출시켜도 생존율이 상당히 좋다고 보고되고 있어[32] 이에 대한 연구가 앞으로 기대된다.

본 연구에서 생쥐 초기 배아를 이용하여 동결보존된 배아의 생존율 또는 발달율에 영향을 미치는 요인들의 상관관계를 알아본 결과 배아의 발달단계에 따른 동결-해동 후 생존율에 있어서는 2세포기 배아가 4-8세포기 배아 보다 유의하게 높았으나 ($p<0.01$) 배 발달율에 있어서는 4-8세포기 배아가 유의하게 ($p<0.01$) 높아 생존율과 배 발달율과는 상관관계가 없는 것으로 사료된다. 또한, 동해방지제에 따른 배아의 생존율에 있어서는 2, 4-8세포기 배아 모두 DMSO에서 유의하게 높았으나 ($p<0.01$) 배 발달율에 있어서는 PROH가 DMSO에 비해 더 유의하게 높은 성적를 나타내어 ($p<0.01$, $p<0.05$) 동해로 인한 상해가 적은 것으로 생각되어 2, 4-8세포기 배아에서 PROH가 더 효과적인 동결보존제로 사료되며, 동결프로그램으로는 완만동결-급속해동법이 더 우수한 프로그램으로 보인다.

## 참고문헌


1. Kerin JF, Warnes GM, Quinn PJ, Jeffery R, Kirby C, Matthews CD, et al. Incidence of multiple pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. Lancet 1983;2:537-40.
2. Dawson KJ, Rutherford AJ, Margara RA, Winston RML. Reducing triplet pregnancies following in vitro fertilization. Lancet 1991;337:1543-4.
3. Tucker MJ, Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef DE, Toledo AA. How many IVF transfer[letter]? Lancet 1991;337:1482.
4. Fehill CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG. Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human ; A comparative study. Fertil Steril 1985;44:638-44.
5. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Van H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. Hum Reprod 1987;2:695-700.
6. Siebzehnruebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L, Lang N. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos : a comparison of DMSO and propanediol. Human Reprod 1989;4:312-7.
7. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -296℃. Science 1972;178:411-4.
8. Todorow SJ, Siebzehnrubl ER, Koch R, Wildt L, Lang N. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster. Hum Reprod. 1989;4:805-11.
9. Szell A, Zhang J, Hudson R. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180 degrees C. Reprod Fertil Dev. 1990;2:613-8.
10. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983;305:707-9.
11. Zeilmarker GH, Alberta AT, Van Gent I. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984;42:293-296.
12. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. Fertil Steril 1985;44:645-51.
13. Cohen J, Somons FR, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocytes. J IVF ET 1985;2:59-64.
14. Chang MC. Normal development of fertilized rabbit ova stored at low

temperature for several days. Nature 1947;159:602.
15. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Retrieval of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949;164:666-76.
16. Wilmut L. The effect of cooling rate, warming rate cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci 1972;2:1071-9.
17. Fuller BJ, Bernard A. The relationship between intracellular glycerol permeation and survival following cryopreservation of in vitro fertilized 2-cell murine embryo. Cryo-Letters 1986;7:257-259.
18. Gook DA, Osborn SM, Johbston WIH. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum Reprod 1993;8:1101-9.
19. Liu J, Van den Abbeel E, Van Steirteghem AC. Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos. Hum Reprod. 1993;8:1115-9.
20. Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum Reprod. 2000;15:905-10.
21. Whittingham DG. Principles of embryo preservation. In: Ashwood Smith MJ, Farrant J. editor. Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical, Tunbridge Wells; 1980;65-83.
22. Renard JP, Bui-Xuan Nguyen, Garnier V. Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J Reprod Fertil 1984;71:573-80.
23. 김정훈, 문신용, 장윤석. 동해방지제가 생쥐 배아에 미치는 독성작용에 관한 연구. 대한산부인과학회지 1991;34:1400-9.
24. Fahy LE. The relevance of cryoprotectant "Toxicity" to cryobiology. Cryobiology 1986;23:1-13.
25. Schneider U. Cryobiological principles of embryo freezing. J IVF ET 1986;3:3-9.
26. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Fryman R. High pregnancy rate after early human embryo freezing. Fertil Steril 1986;46:268-72.
27. Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B, Rulicke T. Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods. J IVF ET 1991;8:208-212.

28. Van-den-Abbeel E, Van-der-Elst J, Van-Steirteghem AC. 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 1994;31:423-433.
29. Willadsen S, Polge C, Rowson LEA. The viability of deep-frozen cow embryos. Reprod Fertil 1978;52:391-3.
30. Polge C. Willadsen SM. Freezing eggs and embryos of farm animals. Cryobiology 1978;15:370-3.
31. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J Gen Physiol 1963;47:347-69.
32. 김묘경, 김은영, 이봉경, 윤산현, 박세필, 정길생, 등. EFS로 초자화 동결된 생쥐 미수정란의 체내/외 발달. 대한불임학회지 1998;25:87-92.