

착상 전 유전진단 기술 개발의 동물실험 모델로서 할구 생검된 생쥐 배아에서 동결보존 융해 후 배아 발생 양상과 공배양 효과에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 의학연구원 인구의학연구소²,
한국과학기술원 의과학연구소³, 울산대학교 의과대학 산부인과학교실⁴
김석현^{1,2} · 김희선² · 류범용² · 최성미² · 방명걸³ · 오선경² · 지병철^{1,2}
서창석^{1,2} · 최영민^{1,2} · 김정구¹ · 문신용^{1,2} · 이진용¹ · 채희동⁴ · 김정훈⁴

Developmental Competence and Effects of Coculture after Cryopreservation of Blastomere-Biopsied Mouse Embryos as a Preclinical Model for Preimplantation Genetic Diagnosis

Seok Hyun Kim^{1,2}, Hee Sun Kim², Buom Yong Ryu², Sung Mi Choi², Myung Geol Pang³,
Sun Kyung Oh², Byung Chul Jee^{1,2}, Chang Suk Suh^{1,2}, Young Min Choi^{1,2}, Jung Gu Kim¹,
Shin Yong Moon^{1,2}, Jin Yong Lee¹, Hee Dong Chae⁴, Chung Hoon Kim⁴

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine¹, Institute of Reproductive
Medicine and Population, Medical Research Center², Seoul National University,
Biomedical Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology³,
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ulsan University⁴,
Seoul, Korea*

Objective: The effects of cryopreservation with or without coculture on the in vitro development of blastomere-biopsied 8-cell mouse embryos were investigated. This experimental study was originally designed for the setup of a preclinical mouse model for the preimplantation genetic diagnosis (PGD) in human.

Methods: Eight-cell embryos were obtained after in vitro fertilization (IVF) from F1 hybrid mice (C57BL♀/CBA♂). Using micromanipulation, one to four blastomeres were aspirated through a hole made in the zona pellucida by zona drilling (ZD) with acid Tyrode's solution (ATS). A slow-freezing and rapid-thawing protocol with 1.5M dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.1M sucrose as cryoprotectant was used for the cryopreservation of blastomere-biopsied 8-cell mouse embryos. After thawing, embryos were cultured for 110 hours in Ham's F-10 supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA). In the coculture group, embryos were cultured for 110 hours on the monolayer of Vero cells in the same medium. The blastocyst formation was recorded, and the embryos developed beyond blastocyst stage were stained with 10% Giemsa to count the total number of nuclei in each embryo.

*주관책임자: 김석현, 110-744 서울 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 전화: 760-3773, FAX: 742-2028, E-mail: seokhyun@plaza.snu.ac.kr

*본 연구는 1997년도 보건 의료기술 연구개발사업(HMP-97-B-3-0028)의 지원에 의하여 이루어진 것임.
This study was supported by a grant(HMP-97-B-3-0028) of the 1997 Good Health Research and Development Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

Results: The survival rate of embryos after cryopreservation was significantly lower in the blastomere-biopsied (7/8, 6/8, 5/8, and 4/8 embryos) groups than in the non-biopsied, zona intact (ZI) group. Without the coculture, the blastocyst formation rate of embryos after cryopreservation was not significantly different among ZI, the zona drilling only (ZD), and the blastomere-biopsied groups, but it was significantly lower than in the non-cryopreserved control group. The mean number of cells in embryos beyond blastocyst stage was significantly higher in the control group (50.2 ± 14.0) than in 6/8 (26.5 ± 6.2), 5/8 (25.0 ± 5.5), and 4/8 (17.8 ± 7.8) groups. With the coculture using Vero cells, the blastocyst formation rate of embryos after cryopreservation was significantly lower in 5/8 and 4/8 groups, compared with the control, 7/8, and 6/8 groups. The mean number of cells in embryos beyond blastocyst stage was also significantly lower in 4/8 group (25.9 ± 10.2), compared with the control (50.2 ± 14.0), 7/8 (56.0 ± 22.2), and 6/8 (55.3 ± 25.5) groups.

Conclusion: After cryopreservation, blastomere-biopsied mouse embryos have a significantly impaired developmental competence in vitro, but this detrimental effect might be prevented by the coculture with Vero cells in 8-cell mouse embryos biopsied one or two blastomeres. Biopsy of mouse embryos after ZD with ATS is a safe and highly efficient preclinical model for PGD of human embryos.

Key Words: Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Mouse embryo, Blastomere biopsy, Cryopreservation, Coculture, Vero cell, Blastocyst

착상 전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD)은 착상 전 배아를 대상으로 유전학적 진단을 실시하여 유전학적 이상이 발견되지 않은 정상 배아만을 선별하여 모체에 이식시켜 줌으로써 정상적인 임신율 유도하고자 하는 진단 기법이다. 임상에서 기존에 개발되어 시술되고 있는 융모막생검 (chorionic villus sampling, CVS)과 양수검사 (amniocentesis)는 임신이 어느 정도 지속된 이후에 시술 가능하기 때문에 만일 태아의 이상이 진단될 경우 임신을 중단하여야 하는가 하는 제반 문제점에 직면하게 된다. 그러나 PGD는 배아가 자궁내막에 착상하기 이전, 즉 임신 성립 이전에 실시되기 때문에 이러한 문제점을 극복할 수 있다는 장점이 있다.

착상 전 유전진단은 체외수정시술 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET), 배아생검 (embryo biopsy)을 위한 미세조작술 (micromanipulation) 등과 함께 유전진단이 이루어지는 시술로서, 특히 미세조작술을 이용하여 배아에서 할구를 성공적으로 생검하는 과정 및 생검이 실시된 배아의 생존력 (viability)이 착상 전 유전진단 시 가장 중요한 의미를 지니고 있다. Handyside 등¹은 이러한 기법을 적용하여 인간에서 세포분열 발생 중인 배아를 대상으로 성감별 (sex deter-

mination)에 성공한 바 있으며, Holding & Monk,² Lindman 등³은 단일유전자 질환 (single gene defect)을 진단하기도 하였다.

배아에서의 할구 생검은 분열 중인 배아,⁴⁻⁶ 혹은 포배기 배아⁷에서 모두 가능한 것으로 보고된 바 있지만, 초기 분열 배아의 경우 후기 분열 배아에 비하여 할구 생검에 의한 악영향을 상대적으로 많이 받는 것으로 알려져 있다. Nijs 등⁸은 2-세포기 배아에서 1개의 할구를 생검한 결과 배아의 세포분열 속도가 늦어졌을 뿐만 아니라 체외발생 능력도 저하되었다고 보고하였으며, Hardy 등⁹은 8-세포기 배아에서 1~2개의 할구를 생검한 결과 배아 할구 수의 감소에도 불구하고 생검된 배아의 향후 발생 및 착상 능력에 있어서 별다른 영향이 없었다고 보고하였다. Pierce 등¹⁰도 4-세포기 배아가 8-세포기 배아에 비하여 할구 생검에 민감하여 악영향을 많이 받는다고 하였다. 한편 상실기 배아 (morula)의 decompaction을 유도하여 생검을 실시한 연구 결과에 의하면 배아의 생존력에는 영향이 없었지만 착상율이 낮아지는 단점이 있었으며,¹¹ 포배기 배아 (blastocyst)에서 포배벽 (trophectoderm)을 생검하였을 경우 배아의 발생 능력에 영향을 주지는 않았지만 생쥐에서 생검 후 착상율이 33%로서 생검을 실시

하지 않은 군의 53%에 비하여 유의하게 감소되었다.⁷ 따라서 체외 발생 중인 배아에서는 8-세포기 단계에서 할구 생검을 실시하는 것이 가장 적절한 배아 생검 방법으로 인지되고 있다.

착상 전 유전진단은 통상 체외수정 후 제 3일에 배아 생검을 실시하고, 늦어도 제 4~5일에 배아의 자궁내이식을 실시하므로 배아에서 생검된 할구를 이용한 유전학적 진단은 최대 1~2일 이내에 완료되어야 한다. 따라서 유전학적 진단 결과가 늦어지는 경우, 유전학적 진단 결과 정상으로 판명된 배아이지만 여분의 배아로 남을 경우, 체외수정수술을 위한 과배란유도 후 난소 과자극증후군 등으로 배아이식을 시행하지 못하는 경우 등에서는 할구 생검된 배아를 동결보존하여야만 한다. 이러한 이유 등으로 할구 생검된 배아의 동결보존 기법과 더불어 융해 후 배아의 발생 능력 등은 PGD 시술에 있어서 중요한 과정으로 인식되고 있다.

생쥐의 4~8-세포기 배아에서 생검된 배아의 동결보존 융해 후 생존율, 발생율 및 착상율은 생검을 실시하지 않고 동결보존 융해만 시행한 배아의 경우와 유사한 성적을 보이며,^{12,13} 특히 8-세포기 배아에서 최고 2개의 할구를 생검하여도 배아의 동결보존 융해 후 착상율에는 별다른 영향을 주지 않는다고 하였다.¹³ Snabes 등¹⁴은 기존에 동결보존되었던 생쥐 8-세포기 배아를 융해하여 1개의 할구를 생검한 후 다시 동결보존 융해하여도 포배기 배아로의 발달율은 대조군과 유의한 차이가 없었다고 하였다. 그러나 Ludwig 등¹⁵은 동결보존되었던 생쥐 전핵시기 배아를 융해하여 8-세포기에서 2개의 할구를 생검한 후 다시 동결보존 융해한 경우 대조군에 비하여 유의하게 낮은 부화율을 보였다고 하였다.

Thomson 등¹⁶은 할구 생검을 위한 방법으로서 생쥐 배아에 zona piercing, 혹은 slitting을 실시한 후 동결보존 융해하였을 때 배아의 생존율은 유사하였지만 zona에 더 큰 구멍을 내어 zona 결손이 상대적으로 더 많았던 zona slitting군에서 배아의 발생율이 저하되었다고 보고하였다. 또한 Depypere 등¹⁷과 Garrisi 등¹⁸은 zona drilling에 의한 작은 크기의 구멍은 동결보존 융해 후 생존율과 포배기 배아로의 발생율에 영향을 미치지 않았지만, Lee 등¹⁹은 생쥐 2-세포기 배아에서 zona penetration, 혹은 zona dissection을 실시한 후 동결보존 융해하였을 때 zona dissection군에서 포배기

배아로의 발생율이 저하되어 할구 생검을 위한 배아 투명대의 큰 구멍은 동결보존 결과에 영향을 미친다고 하였다.

이러한 연구 보고들을 종합하였을 때 할구가 생검된 배아의 동결보존 융해 후 발달은 할구 생검의 방법, 시기, 생검되는 할구의 수 등에 의하여 유의한 영향을 받을 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 인간 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단의 임상적 적용에 선행하여 체외수정된 제 1대 잡종 (F1 hybrid) 생쥐의 8-세포기 배아를 대상으로 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검한 후 동결보존 융해를 실시하여 배아의 발생 양상을 조사 분석하고자 하였으며, 또한 동결보존 융해 후 배아의 발생에 있어 Vero cell을 이용한 공배양이 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 제 1대 잡종 (C57BL/6 × CBA/6) 생쥐를 이용하였다. 광량 (명:암=12:12) 및 온도 (22℃) 조절과 환풍 시설이 갖추어진 사육실에서 사육된 생후 6~8주령의 암컷과 생식력이 확인된 12주령 이상의 수컷에서 체외수정을 실시하여 생성된 배아를 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 생쥐의 체외수정

(1) 정자의 준비

수컷 생쥐를 경추 탈구법으로 희생시킨 후 부정소 미부를 분리하여 Ham's F-10이 담긴 배양접시로 옮겼다. 정자를 회수하기 위하여 26G 주사침으로 조직을 절단한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기 내에서 10분간 배양하였다. 이후 최상층의 정자 부유액을 회수하여 수정용 및 발생용 배양액인 Ham's F-10 (+0.4% bovine serum albumin, BSA)에 옮긴 후 10분간 배양하여 정자의 수정능력 획득을 유도하였다.

(2) 난자의 준비

난자 채취를 위하여 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma, USA) 7.5IU를 암컷 생쥐에 복강내 주사하고, 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma, USA) 5IU를 복강내 주사하여 과배란유도를 실시하였다. HCG 투여 14~16시간 후 경추 탈구법으로 희생시킨

후 양측 난관을 채취하였다. 채취된 난관을 수정용 배양액이 담긴 배양접시로 옮긴 후 난관 팽대부를 절제하여 난자-난구세포 복합체 (oocyte-cumulus cell complex, OCCC)를 회수하여 수정용 배양액 2 ml가 들어있는 배양접시에 옮겨 수정시까지 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

(3) 수정 및 확인

수정능력 획득이 유도된 정자를 30~40개의 난자가 들어있는 배양접시에 운동성 정자의 농도가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 가 되도록 주입한 후 9시간 체외 배양하여 수정시켰다. 수정 후 난자에서 전핵의 형성 여부를 관찰하여 난자의 형태나 세포질에 이상이 없고, 2개의 전핵이 명확하게 형성된 것만을 선별한 후 발생용 배양액 2 ml가 들어있는 배양접시에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

2) 배아의 할구 생검

배아의 할구 생검은 체외수정 56~60시간 후 8-세포기로 발생된 배아를 대상으로 역반사현미경 (Diaphot 300, Nikon)에 부착된 한쌍의 미세조작기 (NT-88, Narishige)를 이용하여 실시하였으며, 할구 생검시 배양액은 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺이 제거된 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, +0.4% BSA) 용액을 사용하였다. 좌측 holding pipette으로 배아를 고정 한 후 우측 acid Tyrode's solution (ATS, pH 2.3)이 들어있는 pipette을 이용하여 할구 생검을 용이하게 하기 위하여 배아의 투명대를 녹여 10~20 μm 크기의 구멍을 뚫었다.⁵ 이후 투명대의 구멍을 통하여 우측에 ATS용 pipette과 평행하게 설치된 할구 생검용 pipette으로 할구를 하나씩 흡입하여 투명대 밖으로 분리하였다. 각각의 8-세포기 배아에서 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검하였다. 생검된 할구와 할구가 생검된 배아를 각각 멸균된 오일이 덮인 Ham's F-10 (+0.4% BSA) 10 μl 배양액 방울에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하면서 24시간 간격으로 체외수정 후 110시간까지 배아의 발생을 관찰하였다.

3) 배아의 동결보존 및 융해

(1) 배아의 탈수화 및 장진

D-PBS에 20% synthetic serum substitute (SSS, Irvine Scientific)을 첨가하여 기본 용액 (basic solution)으로 사용하였으며, 배아의 동결보존액 (cryoprotectant)은 기본 용액에 1.5M dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, D-5879)와 0.1M sucrose (Sigma,

S-0389)를 첨가하여 제조하였다. 할구가 생검된 배아를 동결하기 전에 25°C 상온에서 10분 동안 동결보존액에 노출시켜 탈수화 평형 (dehydration equilibration)을 유도한 후 7~10개의 배아를 0.25 ml plastic straw 동결 용기에 넣어 장진하였다. 즉 용기에 30 μl의 동결보존액을 각각 흡입하고, 5 mm의 공기층을 형성한 후 배아와 함께 60 μl의 동결보존액을 흡입하였다. 동일한 방법으로 5 mm의 공기층과 30 μl의 동결보존액을 각각 흡입한 다음 마지막 부분은 밀봉하였다.

(2) 자동 세포동결기를 이용한 배아의 냉각

자동 세포동결기 (Kryo-10, Planner)를 이용하여 배아의 완만냉각 (slow freezing)을 실시하였다. 완만냉각 방법은 20°C에서 분당 -2°C씩 냉각한 후 -7°C에서 5분간 정체하였으며, 과냉각 (supercooling)을 방지하기 위하여 액체 질소에서 냉각된 핀셋으로 straw에 식빙 (seeding)을 실시하였다. 식빙 후 -7°C에서 -30°C까지 분당 -0.3°C씩 온도를 하강하였고, -30°C에서 10분간 정체함으로써 세포동결기에서의 냉각을 완료하였다. 냉각된 straw는 canister로 옮겨 액체 질소통 (liquid nitrogen, LN₂)에 넣어 동결보존하였다.

(3) 배아의 융해 및 체외배양

배아의 융해는 동결보존된 straw를 액체 질소통에서 대기 중으로 옮겨 20초 동안 노출시킨 후 straw 표면의 물기를 제거한 다음 알코올솜으로 straw를 소독하였다. Straw의 양쪽 선단부를 절단하고, straw내의 배아와 동결보존액을 배양접시에 부어 해부현미경하에서 배아의 수를 확인한 후 융해액으로 옮겼다. 기본 융해액은 20% SSS가 첨가된 D-PBS를 사용하였으며, 1단계로 1.0M DMSO와 0.2M sucrose 용액에서 5분 동안, 2단계로 0.5M DMSO와 0.2M sucrose 용액에서 5분 동안, 3단계로 0.2M sucrose 용액에서 5분 동안, 마지막 4단계로 기본 융해액에서 5분 동안 각각 노출시켜 배아의 재수화 (rehydration)를 실시하였다. 해부현미경하에서 배아의 형태학적 관찰을 실시하여 각 할구의 세포질이 정상으로서 모두 살아 있고, 투명대가 밝고 온전한 배아만을 생존 배아로 판정하였다. 생존 배아는 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액을 기본 배양액으로 하여 Vero cell을 이용한 공배양을 실시한 공배양군과 공배양을 실시하지 않은 단순배양군의 양군으로 대별하여 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 체외배양을 실시하였으며, 24시간마다 배아의 발생 정도

를 관찰하였다.

4) Vero cell을 이용한 공배양

(1) Vero cell의 준비

배아의 발생 능력 향상을 위한 공배양 체계는 세계보건기구 (WHO)로부터 구입한, virus와 오염 물질에 대한 안전성이 확인된 Vero cell (WHO library, ref Vero 6758)을 이용하여 실시하였다. 구입된 동결보존 상태의 ampule을 37℃ 항온 수조에서 급속히 용해하고 동결보존액을 제거하기 위하여 MEM (+20% fetal bovine serum, FBS) 9 ml로 희석하여 600G로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 상기된 배양액으로 희석한 후 MEM (+20% FBS) 10 ml가 들어있는 25 cm² tissue culture flask에 Vero cell의 농도가 2×10⁶/ml 되게 주입하였다. 이후 flask의 뚜껑을 느슨하게 풀어 주고 37℃, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. 배양 48시간 후에 단일층 (monolayer)의 형성과 yeast, fungus 등의 오염 물질의 생성 여부를 관찰하여 단일층의 형성이 잘 되어 있고, 오염에 이상이 없을 경우 전 배양된 신선한 MEM (+20% FBS)으로 배양액을 교환하고, 매 48시간 마다 상기 과정을 반복하였다. Vero cell의 단일층이 culture flask의 저면에 완전히 확산되면 (>32×10⁶ cells) 계대 배양 (subculture)을 실시하였다.

(2) Vero cell의 계대배양

Culture flask의 저면에 Vero cell의 단일층이 완전히 확산되면 flask내의 배양액을 제거하고, 죽은 세포들과 cell debris 등을 제거하기 위하여 신선한 MEM 배양액으로 2~3회 세척하였다. 이후 단일층을 분리하기 위하여 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺이 제거된 phosphate-buffered saline (PBS)에 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA가 들어있는 medium 2 ml를 주입하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기내에서 5~10시간 배양하여 flask 바닥의 Vero cell의 단일층으로부터 세포를 분리하였다. 역반사현미경하에서 단일층의 분리가 완료되면 trypsin-EDTA를 제거하기 위하여 15 ml conical tube에 Vero cell 부유액을 옮겨 MEM (+20% FBS) 5 ml로 희석한 후 300G로 5분간 원심분리하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후 최초 Vero cell의 준비 방법을 사용하여 culture flask에 Vero cell을 배양하였다. 상기 방법을 사용하여 2회 추가 계대배양을 실시하였다.

(3) Vero cell의 동결보존

계대배양을 통하여 충분한 Vero cell이 배양되면 추후 배아와의 공배양을 위하여 동결보존하

였다. Trypsin-EDTA 처리로 culture flask 바닥의 단일층으로부터 회수된 세포의 수를 계산하고, 0.2% trypan blue 염색을 시행하여 생존율을 산정하였다. 이후 15 ml conical tube에 회수된 세포 부유액을 옮겨 MEM (+20% FBS) 5 ml로 희석한 후 600G로 5분간 원심분리하였다. 동일한 방법으로 반복 세척한 후 상층액을 제거하고, MEM (+20% FBS, +10% DMSO)으로 살아있는 세포의 수가 2~3×10⁶/ml되게 희석하였다. Cryotube에 1 ml의 희석액을 주입하고 상온에서 20분간 동결보존액에 대한 평형을 유도하였다. 이후 자동 세포동결기 (Kryo-10, Planner)를 이용하여 냉각을 시행하였다. 냉각 방법은 상온에서 -30℃까지 분당 1℃씩 냉각한 후 -30℃에서 바로 액체 질소에 넣어 동결을 완료하고 사용시까지 액체 질소통에 보관하였다.

(4) 배아의 공배양

배아와의 공배양 2~3일 전에 cryotube에 동결보존된 Vero cell을 37℃ 항온 수조에서 급속히 용해한 후 동결보존액을 제거하기 위하여 MEM (+20% FBS) 9 ml로 희석하여 600G로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세포괴를 상기 배양액 1 ml로 희석한 후 MEM (+20% FBS) 2 ml가 들어있는 2-well organ culture dish에 Vero cell의 농도가 1×10⁵/ml 되게 조정하였다. 사용 당일 배양접시 바닥에 Vero cell 단일층의 확산 정도를 관찰하여 70~80% 정도 확산되어 있으면 공배양을 실시하기에 적합한 상태로 간주하여 사용하였다. 배아와의 공배양 전에 Vero cell의 단일층이 형성된 배양접시를 전 배양된 신선한 Ham's F-10 (+ 0.4% BSA)으로 2~3회 세척하여 죽은 세포나 이물질을 제거하였다. 각각의 처리 후 배아와 할구를 Vero cell 단일층이 형성된 Ham's F-10 (+ 0.4% BSA) 2 ml가 들어있는 배양접시로 옮겨 37℃, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하면서 24시간 간격으로 체외수정 후 110시간까지 배아의 발생을 관찰하였다.

5) 배아의 염색 및 세포 수의 관찰

각각의 처리에서 체외수정 후 110시간에 포배기 (blastocyst) 이상으로 발생된 배아를 대상으로 세포 수의 관찰을 위한 염색을 실시하였다. 각각의 배아를 저장성 용액 (150 mOsm) 20 μl가 들어있는 배양접시에 분리 주입하여 10분간 37℃, 5% CO₂ 배양기내에서 배양한 후 슬라이드에 옮겨 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 고정액 (methanol:

acetic acid = 3:1)에 넣어 24시간 고정시킨 후 Gurr's buffer (pH 6.8)에 10% Giemsa가 들어 있는 염색액에 넣어 20분간 염색하였다. 이후 증류수로 슬라이드를 세척하여 잔여 염색액을 제거하고 건조시킨 후 현미경 ×200 배율하에서 염색된 배아의 세포 수를 관찰하였다.

6) 통계학적 처리

연구 자료의 분석 및 유의성 검증에 있어 비율 비교시에는 Chi-square test를 실시하였으며, 3군 이상의 평균치 비교시에는 ANOVA로 유의성을 검증한 후 Tukey test를 실시하였다. P 값이 0.05 미만인 경우만을 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 할구 생검 배아의 동결보존 용해 후 생존율

과배란유도 후 체외수정으로 생성된 8-세포기 생쥐 배아에서 동결보존 용해 후 회수율은 모든 군에서 96.3%~100%로서 각 군간에 유의한 차이가 없었다 (Table 1). 동결보존 용해 후 배아의 생존율은 할구를 1개에서 최대 4개까지 생검한 배아군, 즉 7/8군, 6/8군, 5/8군, 4/8군 모두 투명대에 미세조작을 가하지 않아 투명대가 온전한 zona intact (ZI)군에 비하여 각각 유의하게 낮았으며, 투명대에 미세조작으로 구멍만을 뚫어준 zona drilling (ZD)군에 비하여 낮았지만 유의한 차이는 없었다. 각 할구 생검 배아군간에도 유의한 차이는 없었다.

2. 할구 생검 배아의 동결보존 용해 후 체외 발생율

동결보존 용해 후 생존한 배아 중 공배양을 실시하지 않은 체외배양시 포배기 배아 이상으로의 발생율과 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 Table 2와 같다. 각 할구 생검 배아군에서 포배기 이상으로의 발생율은 할구 생검을 실시하지 않은 ZI군 및 ZD군과 각각 비교할 때 유의한 차이가 없었다. 그러나 동결보존 용해를 실시하지 않은 대조군의 95.6% (43/45)와 비교할 때 각 할구 생검 배아군을 비롯한 ZI군, ZD군 모두 발생율이 유의하게 감소하여 동결보존 용해 과정 자체가 생쥐 배아의 체외배양시 배아 발달에 있어서 유의한 지장을 초래하였다. 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 4/8군에서 17.8±7.8개로서 할구 생검을 실시하지 않은 ZI군의 45.3±14.0개에 비하여 유의하게 감소하였다. 한편 동결보존 용해를 실시하지 않은 대조군의 50.2±14.0개와 비교할 때 6/8군, 5/8군, 4/8군 모두 세포 수가 유의하게 감소하였다. 따라서 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수만을 고려할 때 할구 생검, 동결보존 용해 등의 과정을 거치면서 7/8군만이 체외배양시 배아 발달에 있어서 상대적으로 영향을 적게 받았다.

3. 할구 생검 배아의 동결보존 용해 후 공배양 체계의 효과

동결보존 용해 후 생존한 배아 중 공배양을 이

Table 1. Recovery and survival rates of biopsied mouse embryos after freezing and thawing

Groups	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos (%)	No. of survived embryos (%)
Zona intact	50	50 (100)	44 (88.0) ^{a,b,c,d}
Zona drilling	53	53 (100)	38 (71.7)
7/8 embryos	47	47 (100)	31 (66.0) ^a
6/8 embryos	54	53 (98.1)	29 (54.7) ^b
5/8 embryos	54	54 (100)	30 (55.6) ^c
4/8 embryos	54	52 (96.3)	30 (57.7) ^d

Zona intact: non-micromanipulated embryos, Zona drilling: embryos with only a single hole in zona, 7/8 embryos: biopsied embryos from which 1 blastomere was removed, 6/8 embryos: biopsied embryos from which 2 blastomeres were removed, 5/8 embryos: biopsied embryos from which 3 blastomeres were removed, 4/8 embryos: biopsied embryos from which 4 blastomeres were removed, a, b, c, d: p<0.05 between the same superscripts in the same column

Table 2. Development of biopsied mouse embryos in vitro without coculture after freezing and thawing

Groups	No. of embryos	No. of \geq blastocyst (%)	No. of \geq hatched blastocyst (%)	No. of cells (mean \pm SD)*
Control	45	43 (95.6) ^{a,b,c,d,e,f}	1 (2.2)	50.2 \pm 14.0 ^{a,b,c}
Zona intact	22	12 (54.5) ^a	0	45.3 \pm 14.0 ^d
Zona drilling	18	13 (72.2) ^b	1 (5.6)	36.5 \pm 8.4
7/8 embryos	15	8 (53.3) ^c	2 (13.3)	35.3 \pm 9.0
6/8 embryos	14	8 (57.1) ^d	1 (7.1)	26.5 \pm 6.2 ^a
5/8 embryos	14	5 (35.7) ^e	1 (7.1)	25.0 \pm 5.5 ^b
4/8 embryos	14	8 (57.1) ^f	0	17.8 \pm 7.8 ^{c,d}

Control: non-freezing embryos, Zona intact: non-micromanipulated embryos, Zona drilling: embryos with only a single hole in zona, 7/8 embryos: biopsied embryos from which 1 blastomere was removed, 6/8 embryos: biopsied embryos from which 2 blastomeres were removed, 5/8 embryos: biopsied embryos from which 3 blastomeres were removed, 4/8 embryos: biopsied embryos from which 4 blastomeres were removed, No. of cells: mean number of nuclei in \geq blastocyst, *: ANOVA with Tukey post-hoc test, a, b, c, d, e, f: $p < 0.05$ between the same superscripts in the same column

Table 3. Development of biopsied mouse embryos in vitro with coculture after freezing and thawing

Groups	No. of embryos	No. of \geq blastocyst (%)	No. of \geq hatched blastocyst (%)	No. of cells (mean \pm SD)*
<i>Without Coculture (from Table 2)</i>				
Control	45	43 (95.6) ^{a,b}	1 (2.2)	50.2 \pm 14.0 ^a
Zona intact	22	12 (54.5)	0	45.3 \pm 14.0
Zona drilling	18	13 (72.2)	1 (5.6)	36.5 \pm 8.4
<i>With Coculture</i>				
7/8 embryos	16	13 (81.3) ^c	3 (18.8)	56.0 \pm 22.2 ^b
6/8 embryos	15	12 (80.0) ^d	1 (6.7)	55.3 \pm 25.5 ^c
5/8 embryos	16	10 (62.5) ^a	1 (6.3)	34.8 \pm 15.0
4/8 embryos	16	6 (37.5) ^{b,c,d}	1 (6.3)	25.9 \pm 10.2 ^{a,b,c}

Control: non-freezing embryos, Zona intact: non-micromanipulated embryos, Zona drilling: embryos with only a single hole in zona, 7/8 embryos: biopsied embryos from which 1 blastomere was removed, 6/8 embryos: biopsied embryos from which 2 blastomeres were removed, 5/8 embryos: biopsied embryos from which 3 blastomeres were removed, 4/8 embryos: biopsied embryos from which 4 blastomeres were removed, No. of cells: mean number of nuclei in \geq blastocyst, *: ANOVA with Tukey post-hoc test, a, b, c, d: $p < 0.05$ between the same superscripts in the same column

용한 체외배양시 포배기 배아 이상으로의 발생율과 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 Table 3과 같다. 각 할구 생검 배아군에서 포배기 이상으로의 발생율은 할구 생검과 공배양을 실시하지 않은 ZI군 및 ZD군과 각각 비교할 때 유의한 차이가 없었다. 그러나 동결보존 용해를 실

시하지 않은 대조군과 비교할 때 5/8군과 4/8군은 각각 유의하게 감소하였지만 7/8군과 6/8군은 각각 유의한 차이가 없어 배아 발달에 유의한 영향을 초래하는 동결보존 용해 과정의 악영향을 체외배양시 공배양을 이용함으로써 일부 극복할 수 있을 것으로 사료되었다. 포배기 이상으로 발

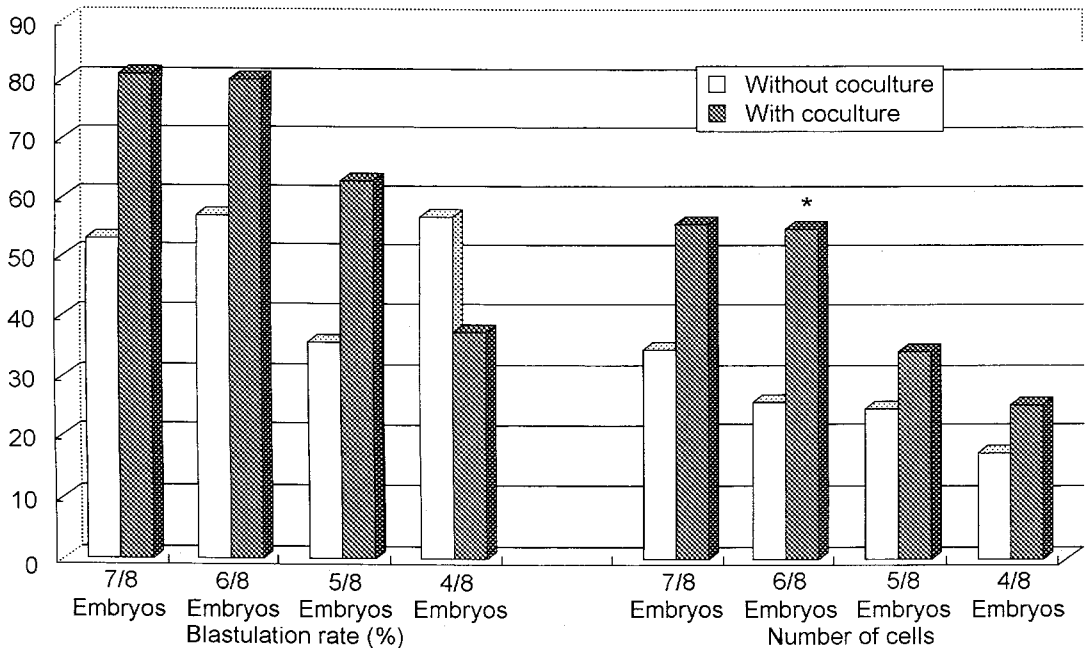


Figure 1. Comparison of blastulation rate and cell numbers in blastomere-biopsied embryos without or with coculture after freezing and thawing. *: $p < 0.05$, compared with the corresponding group without coculture

생한 배아의 세포 수는 각 할구 생검 배아군에서 ZI군 및 ZD군에 비하여 유의한 차이가 없었으며, 동결보존 용해를 실시하지 않은 대조군과 비교할 때 4/8군 (25.9 ± 10.2 개)에서만 유의하게 감소하였다. 따라서 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수만을 고려할 때 공배양을 이용함으로써 할구 생검, 동결보존 용해 등으로부터의 악영향을 극복할 수 있을 것으로 사료되었다. 한편 각 할구 생검 군에서 공배양을 실시하지 않은 경우와 실시한 경우의 직접적인 상호 비교에 있어서 각각 포배기 발달율은 유의한 차이가 없었으며, 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 6/8군에서만 유의한 차이가 있었다 (Figure 1).

고 찰

본 연구에서는 인간 배아를 대상으로 한 착상 전 유전진단의 임상적 적용에 선행하여 과배란 유도 후 체외수정된 생쥐의 8-세포기 배아에서 acid Tyrode's solution (ATS)을 사용하여 투명대에 zona drilling을 시행하고, 1개에서 최대 4개까지의 할구를 생검한 후 할구가 생검된 생쥐 배아를 대상으로 동결보존 용해를 실시하여 배아의 발생 양상을 조사 분석하였으며, 또한 동결보존 용

해 후 배아의 발생에 있어 Vero cell을 이용한 공배양이 미치는 영향을 규명하였다.

8-세포기 생쥐 배아에서 동결보존 용해 후 회수율은 모든 할구 생검 배아군에서 96.3%~100%로서 비교적 높은 결과를 보였으며, 동결보존 용해 후 배아의 생존율은 모든 할구 생검 배아군에서 투명대에 미세조작을 가하지 않아 투명대가 온전한 zona intact (ZI)군에 비하여 유의하게 낮았고, 투명대에 미세조작으로 구멍만을 뚫어준 zona drilling (ZD)군에 비하여도 낮았지만 유의한 차이는 없었다. 이러한 연구 결과는 Krzyminska & O'Neill²⁰이 보고한 propanediol (PROH)을 이용한 동결보존 용해시 대조군과 6/8군의 생존율이 각각 69.1%, 58.2%로서 유의한 차이가 있었다는 연구 결과와 유사하였으며, 따라서 배아에서 할구를 생검한 후 동결보존 용해 과정을 거치면 배아의 생존율이 저하된다는 것을 추론할 수 있다.

본 연구에서는 동결보존 용해 후 생존된 배아의 질 (quality), 즉 발생 능력을 평가할 수 있는 지표로서 포배기 배아 이상으로의 발생율과 동시에 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수를 비교 분석하였다. 체외배양시 공배양을 실시하지 않은 실험 결과 각 할구 생검 배아군의 포배기 배아 이상으로의 발생율은 할구 생검을 실시

하지 않은 ZI군 및 ZD군과 비교시 유의한 차이가 없었으며, 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 4/8군에서만 ZI군에 비하여 유의하게 감소하였다. 그러나 동결보존 용해를 실시하지 않은 대조군과 비교시 각 할구 생검 배아군을 비롯한 ZI군, ZD군 모두 발생율이 유의하게 감소하였으며, 6/8군, 5/8군, 4/8군에서 배아의 세포 수가 유의하게 감소하였다. 이러한 연구 결과로서 배아는 할구 생검과 동결보존 용해 과정을 거치면서 생존율이 유의하게 감소하며, 생존 배아에서도 발생 능력이 유의하게 저하된다는 것을 추론할 수 있다. 한편 7/8군은 대조군과 비교시 최소한 배아의 세포 수에 있어서 유의한 차이가 없었으므로 다른 할구 생검 배아군에 비하여 할구 생검과 동결보존 용해 과정 후에도 비교적 발생 능력을 유지할 수 있는 데 반하여 4/8군은 포배기 발달율과 배아의 세포 수가 다른 군에 비하여 현저히 감소하였으므로 배아 생검시 전체 할구의 절반을 생검하면 동결보존 용해 후 배아는 치명적인 악영향을 받을 수 있을 것으로 사료된다.

Liu 등¹⁵은 할구 생검시 배아는 악영향을 받으며, 이는 동결보존 용해 후 발생 능력의 저하를 유발한다고 보고하였으며, Hardy 등⁹은 인간에서 8-세포기 배아를 대상으로 1개에서 최고 3개까지의 할구를 생검하였을 때 포배기 이상 발생한 배아의 세포 수는 7/8군에서 대조군과 유의한 차이가 없었으나 5/8군에서는 현저하게 감소하였다고 보고하였다. 또한 Somers 등²¹, Tarin 등²²은 각각 생쥐와 인간에서 배아 생검시 생검되는 할구의 수가 증가될수록 배아에서 내부세포피(inner cell mass, ICM)와 포배벽(trophectoderm)의 비가 감소되어 배아의 발생 능력이 저하된다고 보고하였다. 그러나 생쥐의 4~8-세포기 배아에서 할구 생검된 배아의 동결보존 용해 후 생존율, 발생률 및 착상율은 생검을 실시하지 않고 동결보존 용해만 시행한 배아의 경우와 유사하였다는 보고도 있으며,^{12,13} 특히 8-세포기 배아에서 최고 2개의 할구를 생검하여도 배아의 동결보존 용해 후 착상율에는 유의한 영향을 미치지 않았다고 하였다.¹³

본 연구에서는 할구 생검 및 동결보존 용해 과정을 거치면서 배아의 생존율이 유의하게 감소하며, 생존 배아에서도 배아의 발생 능력이 유의하게 저하되므로 체외배양시 Vero cell을 이용한 공배양을 실시하여 이러한 악영향을 극복할 수

있는지 여부를 규명하고자 하였다. 체외배양시 공배양은 상피세포에서 분비되는 cytokine, 성장인자(growth factor) 등의 물질이 배아의 성장 발달에 도움을 주며, 배아에서 분비되는 대사산물을 상피세포에서 흡수함으로써 배양액내 독성물질을 제거하여 체외배양 조건을 향상시킴으로써 배아의 발달을 돕는 것으로 이해되고 있다.²³ 이러한 공배양에 이용되는 세포로는 난관 상피세포, 자궁내막 상피세포, 과립막세포, 난구세포, 섬유아세포(fibroblast), 원숭이(Green African monkey) 신장의 상피세포에서 유래된 Vero cell 등 여러 가지가 있으나,²⁴ 본 연구에서는 비교적 취급이 용이하고, 경제적인 Vero cell을 이용하여 공배양을 실시하였다. 본 연구자들은 할구가 생검된 배아 및 생검된 할구의 체외 발생에 있어서 공배양의 효용성을 입증 발표한 바 있다.²⁵

본 연구 결과 동결보존 용해 후 생존한 배아에서 공배양을 이용한 체외배양시 포배기 배아 이상으로의 발생율과 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수는 각 할구 생검 배아군에서 할구 생검과 공배양을 실시하지 않은 ZI군 및 ZD군과 비교시 각각 유의한 차이가 없었다. 동결보존 용해를 실시하지 않은 대조군과 비교시 발생율은 7/8군과 6/8군에서 각각 유의한 차이가 없었으며, 포배기 이상 배아의 세포 수는 4/8군에서만 유의하게 감소하였다. 포배기 배아 이상으로의 발생율만을 고려할 때 7/8군과 6/8군에서 공배양의 효과가 관찰되었으며, 포배기 이상으로 발생한 배아의 세포 수만을 고려할 때 7/8군, 6/8군, 5/8군에서 공배양의 효과가 관찰되었다. 따라서 최소한 7/8군과 6/8군까지는 공배양을 실시하여 배아의 발생 능력이 향상되었다고 추론할 수 있다. 한편 4/8군은 공배양을 실시하여도 할구 생검 및 동결보존 용해 과정의 악영향을 극복하지 못하는 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구는 배아의 착상 전 유전진단시 필요한 경우 생검된 배아를 동결보존하여야 할 때 공배양을 이용한 체외배양이 동결보존 용해 후 배아의 발달에 미치는 영향을 규명하고, 생쥐 8-세포기 배아에서 몇 개의 할구를 생검하는 것이 동결보존 용해 후 배아 발달시 가장 적합한지를 판단하고자 시행되었다. 본 연구 결과 동결보존 용해 후 배아의 생존율, 발생률 및 세포 수를 종합하여 고려할 때 8-세포기 배아에서는 1개의 할구를 생검하는 것이 가장 좋을 것으

로 사료되며, 공배양을 실시하면 2개까지의 할구를 생김하여도 동결보존 용해 후에 적절할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
2. Holding C, Monk M. Diagnosis of β -thalassaemia by DNA amplification in single blastomeres from mouse pre-implantation embryos. *Lancet* 1989; iii: 532-5.
3. Lindman R, Lutjen J, O'Neill C, Trent RJ. Exclusion of β -thalassaemia by biopsy and DNA amplification in mouse preembryos. *Prenat Diagn* 1990; 10: 295-301.
4. Wilton LJ, Trounson AO. Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micro-manipulated embryos and proliferation of single blastomeres in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40: 145-52.
5. Gordon JW, Gang I. Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocytes and embryos. *Biol Reprod* 1990; 42: 869-76.
6. Krzyminska UB, Lutjen J, O'Neill C. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod* 1990; 5: 203-8.
7. Monk M, Muggleton-Harris AL, Rawlings E, Whittingham DC. Pre-implantation diagnosis of HPRT-deficient male and carrier female mouse embryo by trophectoderm biopsy. *Hum Reprod* 1988; 3: 377-81.
8. Nijs M, Camus M, Van Steirteghem AC. Evaluation of different biopsy methods of blastomeres from 2-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1988; 3: 999-1003.
9. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH. Human preimplantation development in-vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5: 708-14.
10. Pierce KE, Michalopoulos J, Kiessling A, Seibel MM, Zilberstein M. Preimplantation development of mouse and human embryos biopsied at cleavage stages using a modified displacement technique. *Hum Reprod* 1997; 12: 351-6.
11. Van Blerk M, Nijs M, Van Steirteghem AC. Decompaction and biopsy of late mouse morulae: assessment of in-vitro and in-vivo developmental potential. *Hum Reprod* 1991; 6: 1298-304.
12. Wilton LJ, Shaw JM, Trounson AO. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* 1989; 51: 513-7.
13. Liu J, Van den Abbeel E, Van Steirteghem A. The in-vitro and in-vivo development potential of frozen and non-frozen biopsied 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 1481-6.
14. Snabes MC, Cota J, Hughes MR. Cryopreserved mouse embryos can successfully survive biopsy and refreezing. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10: 513-6.
15. Ludwig M, Muschalla H, Al-Hasani, Diedrich K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 3165-8.
16. Thompson LA, Srikantharajah A, Hamilton MPR, Templeton A. A comparison of the effects of different biopsy strategies on the post-thaw survival of 8-cell-stage mouse embryos: implication for preimplantation diagnosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 659-63.
17. Depypere HT, Carroll JC, Vandekerckhove D, Matthews CD. Normal survival and in-vitro development after cryopreservation of zona-drilled embryos in mice. *Hum Reprod* 1991; 6: 432-5.
18. Garrisi GJ, Talansky BE, Sapira BE, Gordon JW, Navot D. An intact zona pellucida is not necessary for successful mouse embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1992; 57: 677-81.
19. Lee RKK, Su JT, Chen YW, Hwu YH. A comparison of the effects of different degrees of zona pellucida damage followed by cryopreservation on the postthaw development of mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 170-3.

20. Krzyminska UB, O'Neill C. The effects of cryopreservation and thawing on the development in vitro and in vivo of biopsied 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1991; 6: 832-5.
21. Somers GR, Trounson AO, Wilton LJ. Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm of 3/4 mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 1990; 2: 51-9.
22. Tarin JJ, Conaghan J, Winston RML, Handside AH. Human embryo biopsy on the 2nd day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of quarter of embryo retards cleavage. *Fertil Steril* 1992; 58: 970-6.
23. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam SS. Co-cultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991; 56: 179-91.
24. Chen HE, Ho HN, Chen SU, Chao TY, Yang YS. Peptides extracted from Vero cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 165-71
25. 김석현, 류범용, 지병철, 최성미, 김희선, 방명걸 등. 생쥐 모델을 이용한 배아의 할구 생명검사와 할구가 생검된 배아의 배양시 공배양 효과에 관한 연구: 인간에서의 착상 전 유전진단 기술 개발을 위한 동물실험 모델의 개발. *대한불임학회지* 1999; 26: 9-20.