高神大學醫學部 論文集 第5卷 第2號
The Journal of Kosin Medical College
Vol 5 No 2 September 1989

Ureaplasma urealyticum에 감염된 사람 임파구의 염색체이상

고신대학 의학부 미생물학교실

장명웅·김광혁·박인달·유경식

Chromosome Aberration of Human Lymphocyte Infected with Ureaplasma urealyticum

Myung Woong Chang, Kwang Hyuk Kim, In Dal Park, Gyung Sig Yoo

Department of Microbiology
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

= **Abstract** =

The Present study was made to observe the karyological and morphological changes of chromosome that occur to human lymphocyte infected with Ureaplasma urealyticum

Karyotypes and morphological changes of chromosome were observed using short term blood culture and micro-method.

The results of this study are :

1. Survival time of Ureaplasma urealyticum in the supernatant of human lymphocyte culture with RPMI 1640 was 2 days.
2. Ureaplasma urealyticum T-960(standard strain) and K-15(isolated from patient with cervicitis) strains caused mitotic inhibition of human lymphocyte when an inoculum of 10^5 color changing unit per ml of these microorganisms.
3. Ureaplasma urealyticum T-960 and K-15 were able to induced chromosome aberrations of human lymphocytes in statistically significant numbers These chromosome aberration included tetraploid, chromatid gap, chromatid break, chromosome break, chromatid exchange, dicentric chromosome, acentric chromosome, endoreduplication, quardriradial exchange, multiple exchange, ring chromosome, and satellite chromosome.

서 론

사람의 염색체수가 46개라는 것이 1956년 Tjio와 Levan[30]에 의해 밝혀진 이후 1960년 Colorado, Denver에서 개최된 유전학회에서 "Denver Classification"이 제안되어 사람 염색체의 핵형분석이 체계화되게 되었다[28]. 이후 세포유전학이 급속히 발전하게 되었으며, 염색체이상과 각종 유전질환과의 관련성이 점차 밝혀지게 되어 각종 유전질환의 진단수단으로서도 세포유전학이 중요한 위치를 차지하게 되었다[8,10,27].

사람에서 염색체 이상의 발생기전은 아직 명확히 밝혀지지는 않고 있으나 그 주요인으로 주목되고 있는 것은 첫째 산모의 고연령, 둘째 유전자의 비분리 현상, 셋째 X-선 조사나 변이유도물질, 넷째 자기면역질환, 다섯째 virus등의 감염을 지적하고 있다[23,29].

이중에서 virus에 감염된 세포에서 염색체 이상을 초래한다는 것은 1963년 Nicholas[16]에 의해 처음으로 보고된 이래 이에 관해 많이 보고되었다[1,3].

그후 1965년 Fogh등[5]에 의해 mycoplasma에 감염된 세포에서도 염색체이상이 초래될 수 있다고 보고한 이후 이와 관련된 보고도 많이 있다[4,20,25]. 또한, Aula등[4]과 Freed등[6]은 mycoplasma중에서도 arginine을 이용하는 M. hominis나 M. salivarium 등이 세포에 감염되면 이들 세균이 arginine을 먼저 이용하므로서 세포는 arginine결핍에 의해 핵산합성이 이루어지지 않아 염색체이상이 초래된다고 보고하였다.

한편, Ureaplasma urealyticum에 감염된 세포에서도 염색체이상이 초래될 수 있다고 Kundsin등[12]이 보고한 바 있다. 그러나 이에 관한 추시나 염색체이상의 발생기전에 관해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

이에 저자등은 Ureaplasma urealyticum을 감염시킨 사람의 말초 혈액 임파구의 염색체 이상을 관찰하였던 바 얻은 성적을 보고한다.

실험재료 및 방법

1. 사용균주 : Ureaplasma urealyticum

T-960 표준균주와 자궁경관염환자로 부터 신선 분리된 K-15 균주를 ureaplasma 액체배지인 10-B[24]배지에 18시간 배양하여 균수가 1mℓ당 1×10^6색조변화단위(Color Changing Unit : CCU)가 되도록 조정하여 사용하였다[26].

2. 사용배지 :

Ureaplasma urealyticum의 배양에는 10-B배지를 사용하였다[24]. 10-B배지는 PPLO broth 1.5g에 증류수 73mℓ를 가하여 녹인 다음 1N HCl로 pH를 5.5로 조정하여 고압증기멸균하였다. 이를 냉각시킨 다음 마혈청 20mℓ, 25% 효모추출액 10mℓ, 10% 요소액 0.5mℓ, 2% L-cysteine 0.5mℓ, 1%Phenol red액 0.1mℓ, CVA enrichment(GIBCO) 0.5mℓ, penicillin G(10만단위) 1mℓ 등을 무균적으로 첨가한 완전배지를 만들어 사용하였다.

사람의 말초 혈액 임파구의 배양을 위해서는 RPMI 1640배지 1ℓ에 소태아혈청 100mℓ, penicillin G(10만단위) 10mℓ를 무균적으로 첨가한 완전배지를 사용하였다.

3. 말초 혈액 임파구의 염색체 관찰 :

피검자의 선정은 소변의 배양검사에서 Ureaplasma urealyticum이 검출되지 않은 건강한 성인 남자(대학생)를 대상으로 하였다. 말초 혈액 임파구의 배양 및 염색체의 관찰은 Arakadi등[2]의 micromethod를 이용하였다. 피검자의 말초 혈액을 heparin 처리한 주사기에 10mℓ 채취하였다. 이 혈액 0.8mℓ씩을 RPMI 1640배지 10mℓ에 접종하고, phytohemagglutinin 0.2mℓ를 첨가하여 37℃, 5%CO_2 부란기에 24시간 배양하였다. 24시간 후에 Ureaplasma urealyticum T-960 및 K-15 균주의 각 배양액(1×10^6CCU/mℓ) 1mℓ씩을 각각의 임파구 배양액내에 접종하고, 이를 5일간 배양하였다. 배

양 종료 3시간 전에 colchicine(5×10^{-5}M) 1㎖ 씩을 각 배양병에 첨가하고 다시 배양하였다. 3시간 후에 세포를 수거하여 1000rpm에서 10분간 원침하였다. 침사인 세포는 3회 씻은 다음 저장액인 0.075M KCl용액 5㎖를 가하여 37℃에서 15분간 정치하였다. 이를 800rpm에서 10분간 원침하여 세포를 모으고, 고정액(glacial acetic acid 1 : methanol 3) 3㎖을 가하여 10분간 고정하였다. 이 세포를 다시 3회 고정액으로 씻은 다음 1㎖의 새로운 고정액을 가하여 4℃에 보관하였다. 이세포 부유액을 청결한 slide glass(4℃보관)위에 두 방울씩 떨어뜨려 40℃ 건조판에서 건조 고정시켰다. 고정한 다음 4% Giemsa용액으로 10분간 염색하여 광학현미경(1000×)하에서 염색체를 관찰하였다[17,21,22].

염색체이상의 관찰은 Paries Conference (1971), Paries Conference Supplement(1975)[18]와 International System for Human Cytogenetic Nomenclature(ISCN : 1978)[9]의 명명규약에 준하였으며, 일본 환경변이원학회편 "염색체이상도감"을 참고로 하여 관찰하였다.

4. 임파구 배양액에서 Ureaplasma urealyticum의 소장관계 :

임파구 배양시 감염시킨 Ureaplasma urealyticum의 소장관계를 관찰하기 위하여 균 접종후 경시적으로 배양 상징액 0.1㎖씩을 취하여 10-B배지에 10배 계단희석하여 색조변화단위(CCU)로 생잔균의 유무를 확인하였다[26].

5. 임파구의 유사분열계수(Mitotic index) :

임파구 배양시 phytohemagglutinin 처리 후 정상 임파구에서와 Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구에서 이들의 분열속도를 비교하기 위하여 유사분열계수를 산정 비교하였다. 유사분열계수의 산정은 세포분열 중기의 세포수/세포분열 중기 및 간기의 세포수(총1000세포)의 비로 나타내었다. 이는 400배의 광학현미경하에서 관찰하였다[19].

결 과

1. 임파구 배양액에서 Ureaplasma urealyticum의 소장관계 : 정상인 말초 혈액 임파구의 배양액에 접종한 Ureaplasma urealyticum의 생잔기간을 관찰한 결과는 그림1과 같다.

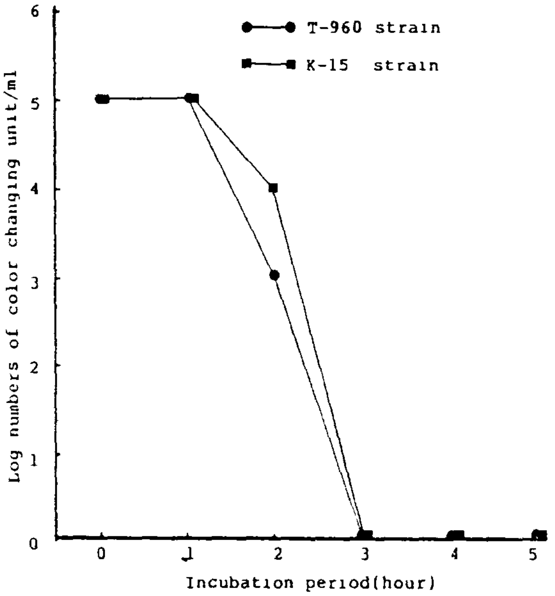

Fig. 1. Assay of the number of U.urealyticum in human leukocyte cultures

Ureaplasma urealyticum T-960 표준균주는 균 접종 24시간 후 까지는 균수가 10^5CCU를 유지하였으나 48시간 후에는 10^3CCU로 감소하였으며 72시간 후에는 균이 검출되지 않았다.

Ureaplasma urealyticum K-15 균주는 균 접종 24시간 후에는 10^5CCU로 균수가 유지되었으나 48시간 후에는 10^4CCU로 감소하였다가 72시간 후에는 균이 검출되지 아니하였다.

2. Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구의 유사분열계수 : Ureaplasma urealyticum T-960 및 K-15 균주를 각각 감염시킨 임

파구의 유사분열계수를 비교한 결과는 표1과 같다.

Table 1. Mitotic index of human leukocyte infected with U.urealyticum

Infected strain	Inoculum size(CCU/ml)	Mitotic index	Per-cent (%)
Control	10^5	74/1000	100.0
T-960	10^5	42/1000	56.7
K-15	10^5	38/1000	51.3

Ureaplasma urealyticum에 감염되지 않은 정상임파구의 유사분열계수는 7.4였으며, Ureaplasma urealyticum T-960과 K-15 균주를 감염시킨 임파구의 유사분열계수는 각각 4.2, 3.8이었다. 이를 정상 임파구의 유사분열계수를 100%로 하여 비교할 때 Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구의 유사분열계수는 각각 56.7%, 51.3%로 임파구의 유사분열계수가 현저히 감소하였다.

3. Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구의 염색체이상 : Ureaplasma urealyticum을 1㎖당 10^5CCU로 접종시킨 후 5일간 배양한 사람 말초 혈액 임파구의 염색체이상을 관찰한 결과는 표2와 같으며, 관찰된 염색체이상은 그림2~13과 같다.

정상 임파구의 중기 염색체 1012개 중에서 염색체 이상이 관찰된 것은 16개(1.58%)였으며, 이를 빈도별로 보면 4배수체(tetraploid) 0.59%, 염색분체 부분결손(chromatid gap) 0.30%, 염색분체 분절(chromatid break) 0.40%, 염색체 분절(chromosome break) 0.20%, 염색분체 교환(chromatid exchange) 0.10% 등의 순으로 관찰되었다.

Ureaplasma urealyticum T-960 균주를 감염시킨 임파구의 중기 염색체 1214개 중에서 염색체이상이 관찰된 것은 69개(5.68%)로 정상 임파구에서 보다 현저히 증가하였다. 이를 빈도별로 보면 4배수체(1.25%), 염색분체 분절(0.99%), 염색분체 부분결손(0.82%), 염색분체 교환(0.58%), 염색체 분절(0.41%), 무동원체 염색체(acentric chromosome)0.33%, 부수체 연합(satellite association)0.33%, 2동원체 염색체(dicentric chromosome)0.25%, 핵내복제(endoreduplication)0.25%, 4방사상 염색분체 교환(quardriradial exchange) 0.25%, 고리 염색체(ring chromosome) 0.16%, 다발성염색분체 교환(multiple exchange) 0.08%의 순이었다.

Table 2. Metaphase plate with chromosome aberration induced by U.urealyticum

Chromosome aberration	Numbers(per-cent)		
	Control	T-960	K-15
No.metaphase examined	1012	1214	1116
Tetraploid	6(0.59)	15(1.25)	17(1.52)
Endoreduplication	0(0)	3(0.25)	5(0.45)
Dicentric chromosome	0(0)	3(0.25)	2(0.18)
Chromatid gap	3(0.30)	10(0.82)	13(1.16)
Chromatid break	4(0.40)	12(0.99)	9(0.81)
Chromosome break	2(0.20)	5(0.41)	8(0.72)
Chromatid exchange	1(0.1)	7(0.58)	11(0.99)
Quardriradial exchange	0(0)	3(0.25)	4(0.36)
Acentric chromosome	0(0)	4(0.33)	7(0.63)
Ring chromosome	0(0)	2(0.16)	2(0.18)
Multiple exchange	0(0)	1(0.08)	3(0.27)
Satellite association	0(0)	4(0.33)	3(0.27)
Total	16(1.58)	69(5.68)	84(7.52)
		153(6.57)	

Ureaplasma urealyticum K-15 균주를 감염시킨 임파구의 중기 염색체 1116개 중에서 염색체 이상이관찰된 것은 84개(7.52%)로 정상 임파구에서 보다 현저히 증가하였다. 이를 관찰 빈도별로 보면 4배수체(1.52%), 염색분체 부분결손(1.16%), 염색분체 교환(0.99%), 염색분체 분절(0.81%), 염색체 분절(0.72%), 무동원체 염색체(0.63%), 핵내복제(0.45%), 4방사상 염색분체 교환(0.36%), 다발성 염색분체 교환(0.27%), 부수체 연합(0.27%), 2동원체 염색체(0.18%), 고리 염색체(0.18%)의 순으로 나타났다.

Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구에

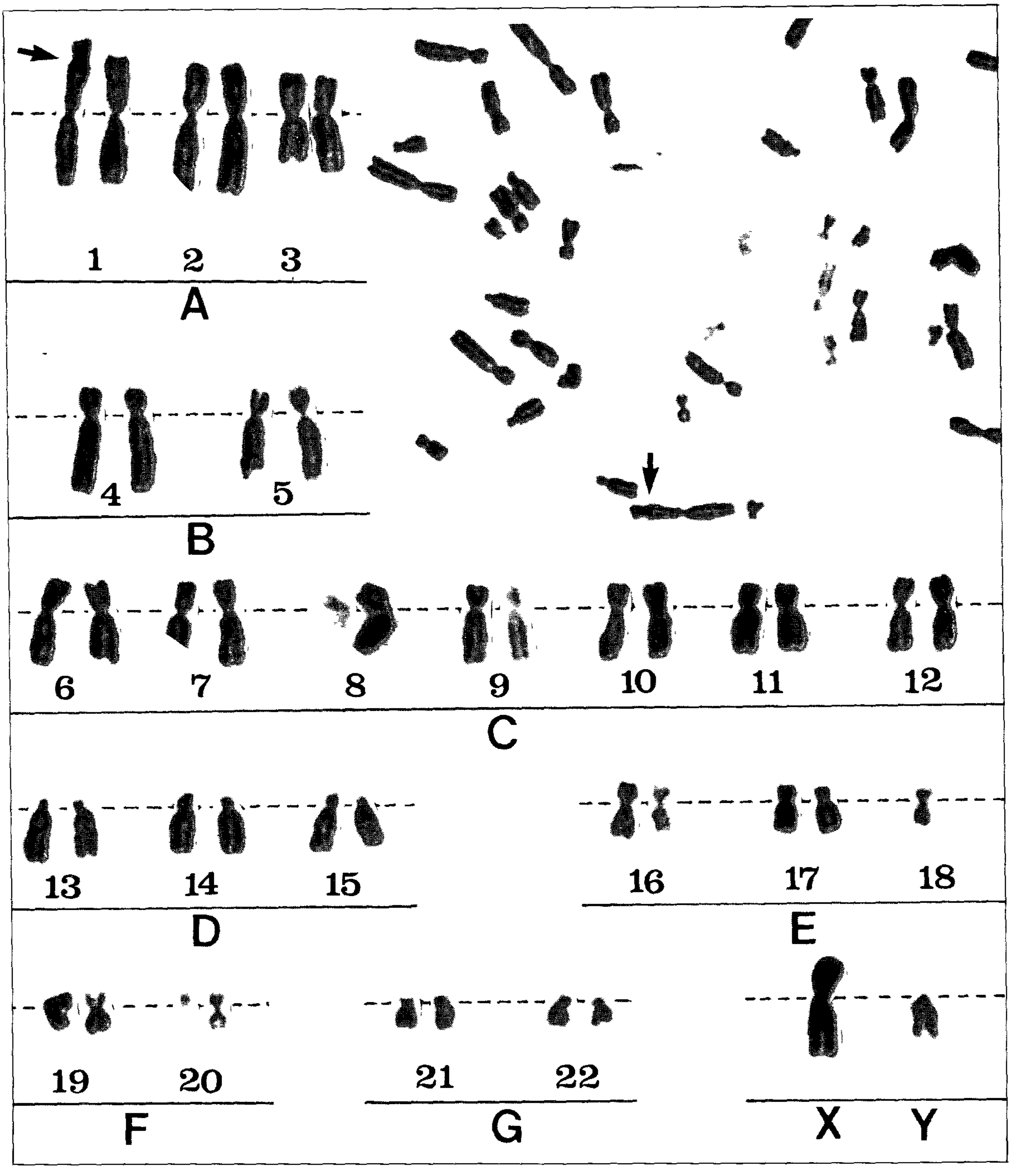

Fig. 2. Dicentric chromosoe(translocation) induced by U urealyticum

Fig. 3. Tetraploid induced by U.urealyticum

Fig. 4. Endoreduplication induced by U.urealyticum.

Fig. 5. Single chromatid gap induced by U.urealyticum.

Fig. 6. Chromatid break induced by U.urealyticum.

Fig. 7. Chromosome break induced by U urealyticum.

Fig. 8. Chromatid exchange induced by U urealyticum

Fig. 9. Quardriradial exchange induced by U urealyticum

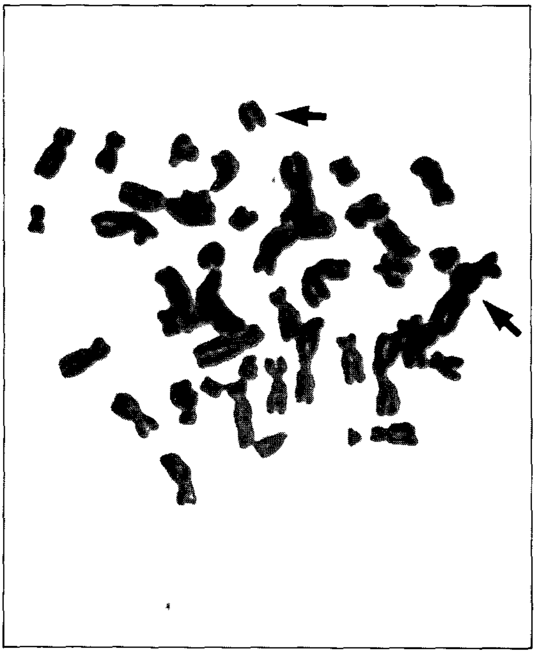

Fig. 10. Acentric chromosome induced by U urealyticum

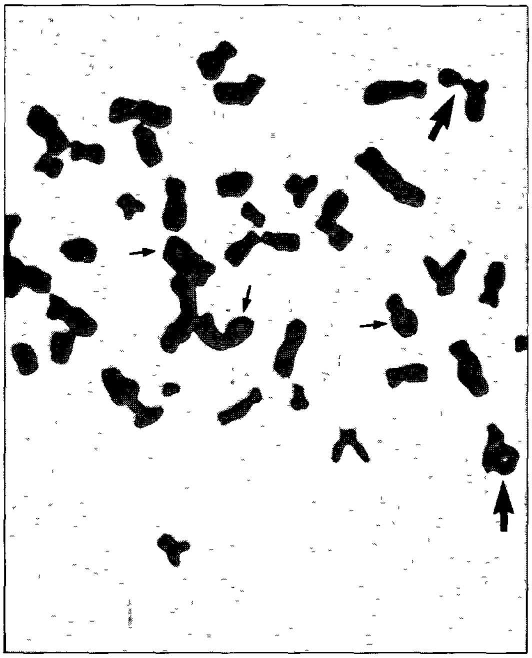

Fig. 11. Ring chromosome induced by U.urealyticum.

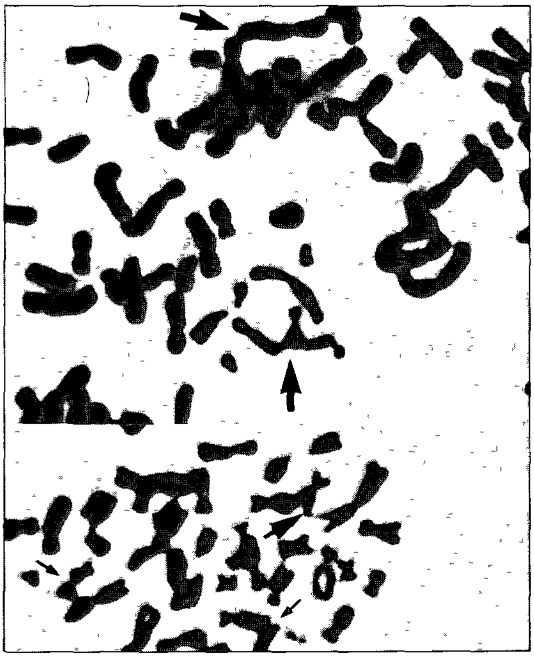

Fig. 12. Multiple exchange(interchange) induced by U urealyticum.

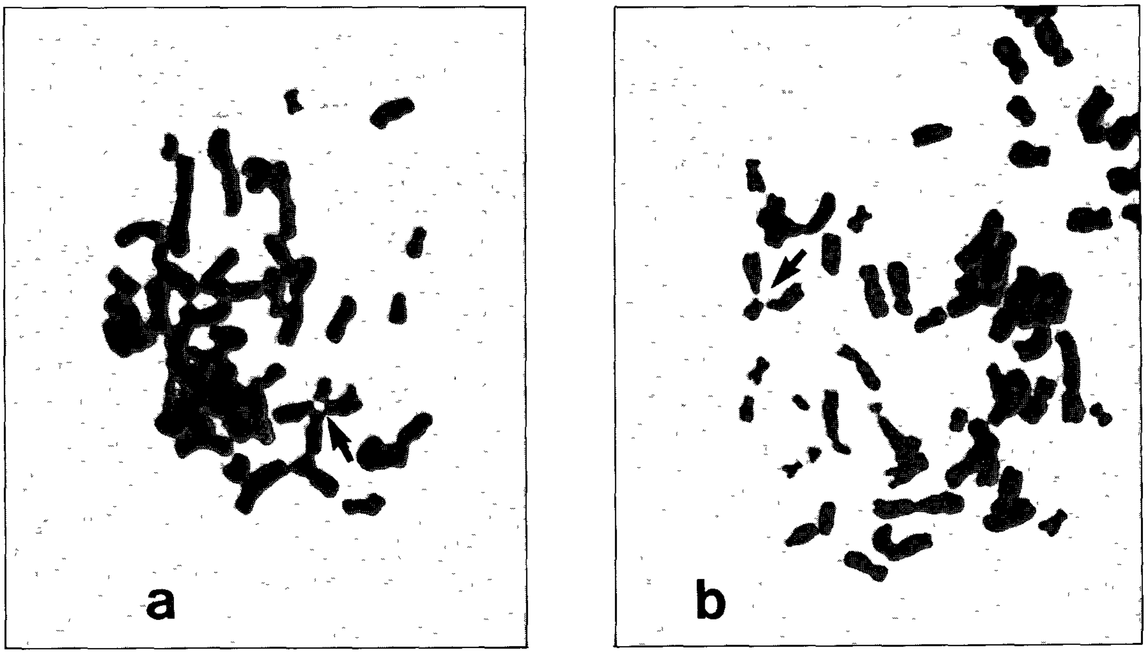

Fig. 13. Satellite association induced by U urealyticum(a and b)

서 관찰된 염색체이상의 빈도가 높은 것을 순위 별로 보면 4배수체, 염색분체 부분결손, 염색분체 분절, 염색분체 교환, 염색체 분절, 무동원체 염색체, 핵내복제, 4방사상 염색분체 교환, 무동원체 염색체, 다발성 염색분체 교환, 고리 염색체, 부수체 연합 등의 순이었다.

고 찰

사람의 말초 혈액 임파구의 배양시에 감염시킨 Ureaplasma urealyticum이 임파구 배양액내에서의 생잔기간을 관찰하였던 바 균접종 후 2일 까지는 균의 검출이 가능하였으나 3일 후에는 균의 검출이 불가능한 것으로 보아 이 균은 임파구 배양상징액에서 2일 정도 생존가능한 것으로 사료된다. 이는 Kotani등[11]이 HeLa 세포, 3T6세포, CV-1 세포 배양시 Ureaplasma urealyticum을 감염시켰던 바 균접종 2~3일 후에 배양상징액에서 균이 검출되지 않았다고 보고한 것과 일치되는 결과였다. 또한 이등[14]의 FL세포 배양시 이 균을 감염시켰던 바 3일 후에 배양상징액에서 균이 검출되지 않았다는 보고와도 같은 경향이었다. 따라서 Ureaplasma urealyticum은 일반조직 배양 세포나 임파구의 배양시에 배양상징액에서 생잔기간은 2~3일 정도임을 알 수 있었다.

Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구의 분열속도를 유사분열계수로 비교하였던 바 정상 임파구의 유사분열계수 7.4를 100%로 하였을 때 Ureaplasma urealyticum T-960과 K-15 균주에 감염된 임파구의 유사분열계수는 각각 4.2와 3.8로 정상에 비하여 43.3~48.7%로 감소하였다. 이는 Aula등[3]은 M. salivarium에 감염된 임파구의 분열 속도가 정상 임파구에 비해 현저히 감소하였다고 보고한 것과 일치되는 결과라 하겠다. 따라서 Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구는 정상 임파구에 비하여 분열속도가 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구의 염색체이상으로 가장 빈도가 높게 나타난 것은 4배수체(그림3)이었으며, Kundsin[12] 등도 같은 결과를 보고한 바 있다. 두번째가 염색분체 부분결손(그림5)이었으며, Kundsin[12] 등의 보고와 일치하는 결과였다. 세번째가 염색분체 분절(그림6)이었고, 네번째가 염색분체 교환(그림8), 다섯번째가 염색체 분절(그림7), 및 무동원체 염색체(그림10), 핵내복제(그림4), 2동원체 염색체(그림2) 등의 순으로 관찰되었으며, 이들은 모두 Kundsin등[12]이 보고한 결과와 유사하였다. 그러나 4방사상 염색분체 교환(그림9), 고리염색체(그림11), 다발성 염색분체 교환(그림12), 및 부수체 연합(그림13) 등은 Kundsin등[12]의 보고에서는 관찰되지 않았던 것이었으나, Fogh등[5]과 Freed등[6]의 mycoplasma에 감염된 임파구에서 관찰된 결과와는 유사한 성적이었다. 따라서 Ureaplasma urealyticum에 감염된 임파구에서도 mycoplasma에 감염된 것과 같은 각종 염색체이상을 초래할 수 있는 것으로 사료된다.

그러나 이와같은 염색체이상이 초래되는 기전이 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 다만 Aula등[4]과 Freed등[6]에 의해 arginine deiminase을 가지고 있는 mycoplasma에서는 감염세포에 arginine결핍을 초래시켜 염색체의 분절을 유발시키므로서 여러가지 염색체이상이 초래된다는 보고가 있을 뿐이다. Kundsin등[12]은 arginine을 이용하지 못하는 기타 mycoplasma나 ureaplasma에서는 arginine이외의 다른 어떤 아미노산의 결핍에 의해 일어날 것이라고 추정하고 있다. 그러므로 이분야의 연구가 앞으로 해야할 과제로 사료된다.

결 론

Ureaplasma urealyticum을 감염시킨 사람의 말초 혈액 임파구의 염색체이상을 short term blood culture법과 micromethod로 관찰하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 임파구의 배양상징액에서 Ureaplasma

urealyticum의 생잔기간은 2일이었다.

2. Ureaplasma urealyticum T-960 및 K-15 균주에 감염된 임파구의 유사분열계수는 현저히 감소하였다.

3. Ureaplasma urealyticum T-960 및 K-15 균주에 감염된 임파구에서 염색체이상은 정상 임파구에서의 염색체이상의 출현빈도 보다 현저히 증가되었다. 염색체이상으로 출현빈도가 높은 것으로는 4배수체, 염색분체 부분결손, 염색분체 분절, 염색체 분절, 염색분체 교환, 핵내복제, 2동원체 염색체, 무동원체 염색체, 4방사상 염색분체 교환, 다발성 염색분체 교환, 고리 염색체, 및 부수체 연합의 순이었다.

REFERENCES

1. Ackerman WM, Cox DC, Kurtz H, Powers CD, Davies SJ : Effect of poliovirus on deoxyribonucleic acid synthesis in HeLa Cells. J.Bacteriol 91 : 1943, 1966
2. Arakadi DT, Sparks RS : Microtechnique for cultured leukocytes from whole blood. Cytogenetics, 2 : 57, 1963
3. Aula PW, Nichols W, Levan A : Virus associated chromosome changes. N.Y. Acad. Sci. Conf. on leukocyte chemistry and morphology. Correlated with chromosome anomalies Nov. 1966
4. Aula P, Nichols WW : The cytogenetic effects of mycoplasma in human leukocyte cultures. J. Cellular Physiol. 70 : 281, 1967
5. Fogh J, Fogh H : Chromosome changes in pleuropneumonia-like organisms infected FL human amnion cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 : 223, 1965
6. Freed TJ, Schatz SA : Chromosome aberration in cultured cell deprived of single essential amino acids. Exper. Cell Res. 55 : 393, 1969
7. Freshney RI : Culture of animal cells. 2nd ed, New York, Alan R Liss, 1987, pp : 57-84
8. Hook EB, Hamerton JL : The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies difference between studies results by sex and by severity of phenotypic involvement. In Hook EB, Porters IH(eds) : Population cytogenetic studies in human. New York, Academic press, 1977, pp : 63
9. ISCN : An international system for human cytogenetic nomenclature. Cytogent. Cell Genet. 21 : 309, 1978
10. Jacobs PA, Handen DG, Buckton KE, Court-Brown WM, King MI, McBrodge JA, MacGreger TN, Maclean N : Cytogenetic studies in primary amenorrhea. Lancet 1 : 1183, 1961
11. Kotani H, McGarrity GJ : Ureaplasma infection of cell cultures. Infection Imunity : 52 : 437, 1986
12. Kundsin RB, Ampola M, Streeter S, Neurath P : Chromosomal aberrations induced by T-strain mycoplasmas. J. Med. Genet. 8 : 181, 1971
13. 黑田行昭：培養細胞遺傳學實驗法, 東京, 共立出版, 1981, pp : 91-113
14. 이민철, 장명웅 : Estrogen과 Progesterone이 Ureaplasma urealyticum의 증식과 세포부착성에 미치는 영향. 고신대학 의학부 논문집. 5 : 41, 1989
15. 日本環境變異原學會：化學的物質による染色體異常アトラス, 朝倉書店, 1988. pp16-37
16. Nicholas WW : Relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis. Hereditas, 50 : 53, 1963
17. 오언경, 이형환, 문신용, 장윤석 : 염색체이상 환자의 세포 유전학적 연구. 대한

불임학회지 : 12 : 39, 1985

18. Paris Conference Supplement : Standardization in human cytogenetics. Cytogenet. Cell Genet. 18 : 201, 1975
19. Paton GR, Jacobs JP, Perkins FT : Chromosome changes in human diploid cell cultures infected with mycoplasma. Nature, 207 : 43, 1965
20. Paton GR, Jacobs JP, Perkins FT : The effect of mycoplasma on the karyology of normal cells. Ann N.Y. Acad. Sci. 143 : 626, 1967
21. Priest JH : Medical cytogenetics and cell culture. 2nd ed, Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. pp : 91-131
22. Priest JH : Medical cytogenetics and cell cultures. 2nd ed, Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. pp : 317-319
23. Rooney DE, Czepulkowski BH : Human cytogenetics. Washington DC, IRL press, 1986. pp : 85-134
24. Shepard MC, Lunceford CD : Serological typing of Ureaplasma urealyticum isolated from ureathritis patients by an agar growth inhibition method. J. Clin. Microbiol. 8 : 566, 1978
25. Stenbridge E, Onen M, Perkins FT, Hayflick L : Karyological and morphological characteristics of human diploid cell strain WI-39 infected with mycoplasmas. Exper. Cell Res. 57 : 397, 1969
26. Stemke GW, Robertson JA : Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. J. Clin. Microbiol. 16 : 959, 1982
27. 田中克己, 德永千代子, 安田德一, 戶張嚴夫 : 人類遺傳學 3版, 東京, 岩波, 1976. pp : 9~102
28. Thompson JS, Thompson MW : Genetics in medicine. 3rd ed, Philadelphia, WB Saunders, 1980. pp : 7-31
29. Thompson JS, Thomopson MW : Genetics in medicine. 3rd ed, Phildelphia, WB Saunders, 1980. pp : 142-165
30. Tjio JH, Levan A : The chromosome number of man. Hereditas, 42 : 1, 1956