

사람 만성백혈병 세포주(K-562)의 Ureaplasma 감염

고신대학 의학부 미생물학교실

김광혁, 유경식, 박인달, 장명웅

Ureaplasma Infection of Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line(K-562)

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

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

= Abstract =

K-562 cells were infected with *U.urealyticum* and incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C for 10 days. At every 1 day intervals, the ureaplasma numbers in the culture supernatants were calculated by color change units(CCU) and the viable K-562 cells were counted by trypan blue exclusion method.

The results of this study were as follows.

1. Growth of *U.urealyticum* was enhanced by day 1, but it was decreased from day 2.
2. *U.urealyticum* inoculated to K-562 cells survived by day 6 or day 9 according to the quantity of inoculum.
3. Growth curves of K-562 cells infected with *U.urealyticum* were delayed 1 or 2 days at the peak point when compared with non-infected K-562 cells(control). Furthermore, ureaplasma cytopathic effect to K-562 cells was slight.
4. Numbers of viable K-562 cells infected with *U.urealyticum* were higher than those of non-infection at day 10.

서 론

세포배양에서 mycoplasma의 오염에 대한 많은 보고가 있어왔지만 ureaplasma가 오염되어 분리, 보고된 예는 단 하나일 뿐이다. 즉

Sethi¹⁸⁾에 의하여 BHK21/C-13세포배양에서 ureaplasma가 분리된 것이었다. Manchee등¹²⁾은 ureaplasma가 사람유래세포에 상당히 강하게 부착된다는 것을 보고한 바 있다. 시험관 내에서 *Ureaplasma urealyticum*과 조직세포와

의 상호반응을 관찰하기 위하여 세포배양을 이용한 인위적인 감염에 관한 보고들이 있다. Mazzali 등¹⁴⁾도 L132, HeLa, Vero 세포에서 단기간 ureaplasma를 감염시키는데에 성공하였다. 그러나 이 경우에 있어서 요소를 보충시켜 주는 것이 필요하다는 것이다. Masover 등¹³⁾은 urea의 보충없이 WI-38 세포에서 *U.urealyticum*을 관찰할 수 있었으며 *U.urealyticum*을 감염시킨 후 맨처음 계대에서부터 성장율이 떨어지면서 그 다음 계대에서부터는 세포 배양액 상층에서 urease 활성을 찾아볼 수 없게 되고 한천배지 상에서도 ureaplasma 집락을 발견할 수 없게 되어 WI-38세포 배양에서의 유해한 영향을 볼 수 없었다 한다. Shepard 등²⁰⁾은 HeLa-S3 세포배양에서 48시간 정도 짧은 기간 동안 감염을 시킬 수 있었으나 HeLa, McCoy 등의 세포에 감염시키는 것은 실패하였다. 또한, HeLa-S3 세포에서의 ureaplasma 감염을 시키기 위해서는 요소의 보충을 보고한 바 있다.

이상 몇몇 보고에서 ureaplasma의 지속감염은 불가능하였으며 단지 짧은 기간동안만 나타날 뿐이었다. 이러한 현상은 급속성장에 따른 급속사멸 때문일지도 모른다. 또한 ureaplasma가 나타내는 세포 독성효과는 상기세포들에게 적은 것으로 나타나고 있다. 요소는 *U.urealyticum*의 필수성장 인자로서 ml당 10 μ g의 비교적 적은양이 요구된다. 여기에서 본 저자들의 연구의 목적은 K-562세포에서 ureaplasma가 감염될 수 있는 지를 결정하고 ureaplasma와 K-562세포와의 상호반응의 결과로서 ureaplasma의 K-562세포에 대한 세포 독성 효과를 관찰하는데 있다.

재료 및 방법

1. Ureaplasma와 배지

이 실험에서 사용된 ureaplasma 균주는 *U.urealyticum* T960(혈청형 VⅢ)로서 캐나다 Albert대학 Robertson교수로부터 분양받아

Shepard 등¹⁹⁾이 기술한 10-B배지에 18시간 배양한 균액을 사용하였다.

2. 세포배양

Human chronic myelogenous leukemia 세포주(K-562)는 경희대학교 부속병원의 면역학 연구실에서 분양받아 본 교실에서 계대배양 중인 것을 Rosewell Park Memorial Institute 1640(이하 RPMI 1640으로 약함, GIBCO, U. S. A.)배지에 NaHCO_3 2 g/L, L-glutamine 2mM, penicillin 100units/ml, 10% fetal bovine serum(GIBCO, U. S. A.)을 보충시킨 완전 배지에 배양하여 2.5×10^4 /ml의 세포부유액이 되도록 조절하여 사용하였다.

3. 배양세포의 감염

상기와 같이 조절된 세포를 24wells microplate에 well당 2.5×10^4 /ml되게 분주하고 완전 배지 1ml씩을 추가하였다. ureaplasma는 $5 \times 10^3, 5 \times 10^2, 5 \times 10^1$ color change units(이하 CCU)인 0.1ml을 세포가 분주되어있는 각 well에 접종하였으며 각 시험군은 4개씩 시행하였다. 접종이 완료된 plate는 5% CO_2 조건에서 37℃에 배양하였다.

4. Ureaplasma 검사

세포배양에서의 ureaplasma의 성장산정은 Stemke 등²²⁾의 방법에 의한 배양상층액을 10배 계단희석하여 수행하였다. ureaplasma의 수는 mililiter당 CCU로서 나타냈으며 감염시킨 후 10일 동안 매일 산출하였다.

5. 세포배양에서의 Ureaplasma의 영향

ureaplasma 감염으로 인한 배양세포의 성장율의 변화는 ureaplasma 감염 후 10일 동안 매일 살아있는 세포수를 산정하였다. 생세포의 산정은 Kruse 등의 방법인 trypan blue exclusion 방법⁴⁾으로 실시하였다.

대조로서는 ureaplasma를 감염시키지 않은 K-562세포를 동시에 배양하여 10일 동안 매일

산정하였다.

결 과

1. 세포배양에서의 *Ureaplasma*의 발육

K-562 사람세포주에 *U.urealyticum* T960균주를 감염시켜 보았으며 이때 요소의 추가는 하지 않았다. 10일 동안 배양하는 가운데 매일 CCU를 산정한 결과는 표1에 나타냈으며 그의 성장곡선을 그림1에 나타낸 바와 같다. 즉 ureaplasma 5×10^3 CCU를 감염시킨 경우 1일째에 10^5 으로 증가하였으며 2일째에 10^2 으로 감소되면서 3,4일째에 10^1 으로, 5일째에는 상층액에서 나타나지 않다가 6,7,8일째에는 약간(±) 나타나다가 9일째에 10^1 으로 나타났다. 그러나 10일째에는 나타나지 않았다. ureaplasma 5×10^2 CCU를 감염시킨 경우 1일째에 10^3 으로 증가하였으며 2,3일째 10^1 으로 감소되면서 4일째는 나타나지 않았다. 그러나 5일째에 10^1 으로, 6일째에 약간(±) 나타나다가 7일째부터는 나타나지 않았다. ureaplasma 5×10^1 CCU를 감염시킨 경우 1일째에 10^2 으로 증가하였으며, 2,3일째에 10^1 , 4일째에는 나타나지 않았으나 5일째에 10^1 으로 증

Table 1. Growth of *U.urealyticum* in the Condition of K-562 Cell Cultivation

Days	Inoculated <i>U.urealyticum</i> (per ml)		
	5×10^3	5×10^2	5×10^1 *
1	10^5	10^3	10^2
2	10^2	10^1	10^1
3	10^1	10^1	10^1
4	10^1	10^0	10^0
5	10^0	10^0	10^1
6	10^1 (±)	10^1 (±)	10^2
7	10^1 (±)	10^0	10^2
8	10^1 (±)	10^0	10^1
9	10^1	10^0	10^0
10	10^0	10^0	10^0

* Color Change Unit, (±) Slightly Color Change

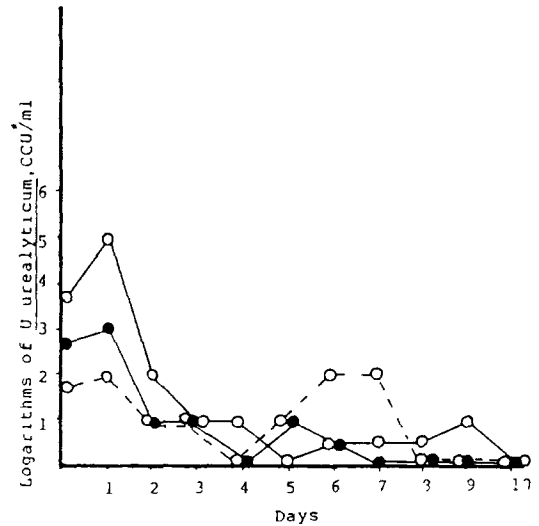


Fig. 1 Growth curve of *U.urealyticum* in the condition of K-562 cell cultivation Inoculated *U.urealyticum* ○—○ : 5×10^3 ccu/ml, ●—● : 5×10^2 ccu/ml, ○--○ : 5×10^1 ccu/ml * color change unit.

가하면서 6,7일째에 10^2 으로 증가하다가 8일째 10^1 으로, 9일째부터는 나타나지 않았다.

2. *Ureaplasma*를 감염시킨 배양세포의 발육

세포발육에 대한 ureaplasma 감염의 영향을 결정하기 위하여 K-562 사람 세포주에 *U.urealyticum* T960 균주를 감염시켰으며 ureaplasma의 성장발육을 돕기 위한 요소의 추가는 하지 않았다. 감염시킨 세포는 10일 동안 배양하는 가운데 매일 살아있는 세포수만을 산정하였다. 그 결과는 표2와 그림 2, 3, 4에 나타낸 바와 같다. 대조군에서는 하룻만에 0.44×10^5 로서 2배까지 증가는 되지 않았으며 6일째에 18.70×10^5 로서 정점을 이루었고 이때부터 감소되어 10일째에는 0.65×10^5 세포수를 나타냈다.

Ureaplasma 5×10^3 CCU를 감염시킨 군에서는 1일째 0.20×10^5 서 감염시키기 전 세포수보다 낮았으나 2일째부터는 계속 증가하여 8

일째에 13.88×10^5 세포수로서 정점을 나타내어 대조군에 비하여 2일 지연되어 나타났고 세포수도 대조군에 비하여는 낮았다. 그러나 10일째에 살아남은 세포수는 5.55×10^5 로서 대조군에서 보다 높게 나타났다. ureaplasma

Table 2. Growth of K-562 Cell Infected with *U.urealyticum*

Days	Inoculated <i>U.urealyticum</i> (per ml)			
	5×10^3	5×10^2	5×10^1 *	0
1	0.20	0.28	0.40	0.44
2	0.44	0.44	0.43	0.83
3	0.85	1.09	1.88	2.78
4	1.29	1.80	2.64	6.69
5	2.80	3.90	4.33	12.60
6	7.03	8.90	9.88	18.70
7	7.70	12.45	12.20	12.48
8	13.88	8.65	13.35	3.60
9	9.43	9.10	10.30	1.40
10	5.55	6.18	4.73	0.65

* : Color Change Unit

5×10^2 CCU 감염군에서는 1일째 0.28×10^5 세포수로서 감염시키기 전 세포수와 거의 같았으나 2일째부터는 증가하기 시작하여 7일째는 정점을 이루어 12.45×10^5 세포수를 나타냈다. 즉 대조군에 비하여 1일이 지연되어 정점

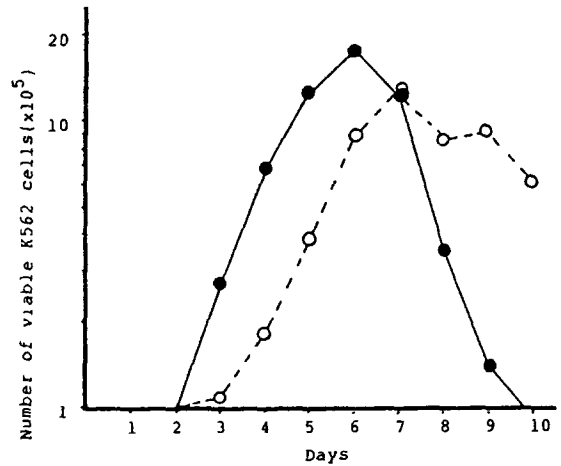


Fig. 3 Growth curve of K-562 cells infected with *U.urealyticum*, 5×10^2 color change units/ml, $\circ - \circ$: *U.urealyticum*-infected, $\bullet - \bullet$: Non-infected(control)

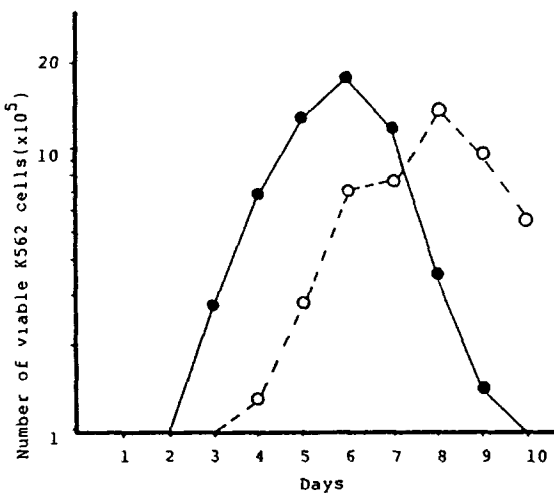


Fig. 2 Growth curve of K-562 cells infected with *U.urealyticum* 5×10^3 color change units/ml, $\circ - \circ$: *U.urealyticum*-infected, $\bullet - \bullet$: Non-infected(control).

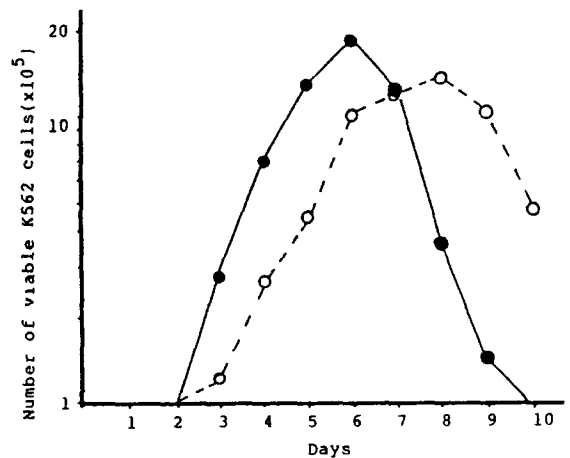


Fig. 4 Growth curve of K-562 cells infected with *U.urealyticum*, 5×10^1 color change units/ml, $\circ - \circ$: *U.urealyticum*-infected, $\bullet - \bullet$: Non-infected(control).

을 나타냈으며 세포수도 낮게 나타났다. 그러나 10일째에는 대조군에 비하여 살아있는 세포수가 더 높게 나타났다. Ureaplasma 5×10^5 CCU 감염군에서는 1일째에 0.40×10^5 세포수를 나타내어 대조군에 접근하는 수치를 나타냈으며 8일째에는 13.35×10^5 세포수로서 정점을 나타냈고 10일째에 4.73×10^5 세포수로서 대조군보다 높게 나타났다.

고 찰

세포배양에 ureaplasma를 관련지은 연구는 상당히 희소한 편이고, 세포배양에 ureaplasma 감염이 안된다는 보고가 있기도하며 세포배양에 ureaplasma를 감염시키기 위해서는 요소가 필요하다 혹은 필요하지 않다 라고 하는 서로 상반된 보고들이 있다^{1, 2, 3, 12, 13, 14, 20}.

본 실험에서 저자들은 K-562 세포주에 요소의 추가없이 ureaplasma를 접종시켰을 때 여기에서 감염이 성립되는지와 감염이 된다면 그 성장곡선은 어떻게 나타날 것인가 그리고 ureaplasma가 접종된 상태 속에서 K-562세포주의 세포성장은 어떻게 영향을 받을 것인가 하는 것을 관찰하고자 하였다. K-562세포에서 ureaplasma의 감염이 성립된 결과로부터 세포와 ureaplasma의 상호관계가 ureaplasma의 감염과 성장에 관계되는 것으로서 이들의 상호반응이 세포와 ureaplasma에 특이적인 것으로 사료된다.

McGarrity 등¹⁵⁾은 HeLa, 3T6, CV-1 세포주를 배양하여 ureaplasma를 감염시켰을 때 ureaplasma 균주에 따라 ureaplasma의 성장발육이 차이가 있었으며 각 세포주에 대한 흡착력도 균주가 분리된 동물의 종에 따라서 차이가 있었다는 것을 보고한 바 있다. Kotani 등¹¹⁾도 다양한 세포주에 여러종류의 ureaplasma 균주를 각각 감염시켰을 때 감염이 성립되어 성장발육하는 경우는 선택적이라 하여 세포가 성장되면서 생성해 내는 산물이 ureaplasma의 성장발육에 관계한다고 보고하였다. 이러한

관점에서 K-562세포에 대한 ureaplasma의 감염은 K-562세포가 생성해 낸 산물에 지배된다고 볼 수 있고 또한 ureaplasma의 K-562세포에 대한 부착력에도 관계했다고 볼 수 있다. 표1과 그림1에서 나타나 있듯이 1일 후의 상승된 발육은 그 다음부터 떨어지기 시작하다가 완전히 나타나지 않는 때가 나타나며 그 다음에 또 한번의 ureaplasma의 출현이 있게 되는데 이것은 세포에 부착됐던 ureaplasma의 출현으로 해석된다. 세포배양에서의 ureaplasma오염에 관한 보고가 현재까지 한 경우만 보고된 것도 표1에서 보는 바와 같이 감염이 되어 성장발육이 됐다 하더라도 오랫동안 지속적인 감염이 되지 않고 일시적으로만 유지되다가 소실되기 때문에 ureaplasma오염을 찾아내기가 그만큼 희소하리라 사료된다. 그러나 일시적인 감염이라 할 지라도 세포 내의 분자수준의 변화는 클 것으로 예견된다. mycoplasma의 경우에는 세포배양에 지속적으로 생존하면서 세포의 성장, 대사 및 기능에 지대한 영향을 주게 되기 때문에 이들 원인 Mycoplasma를 탐색하기 위한 많은 시도들이 있었던 것이다^{5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 21}.

Masover 등¹³⁾은 WI-38 사람 diploid fibroblast세포에 ureaplasma를 요소의 추가없이 감염시켰을 때 나타내는 ureaplasma의 세포독성 효과를 관찰하였고, Mazzali 등¹⁴⁾도 L132, HeLa, Vero 세포에 짧은 기간 ureaplasma를 감염시키는데 성공하였으나 두 연구팀 모두 ureaplasma의 세포독성 효과는 미소하였다고 보고하고 있다. 본 실험에서도 표2, 그림 2, 3, 4에 나타난 바와 같이 접종된 ureaplasma의 균수가 많을 수록 하룻사이에는 세포의 성장이 둔화되다가 시간이 더 지나면서는 균수에 관계없이 비슷하게 세포의 성장을 늦추고 있다. 성장곡선의 정점을 대조와 비교하였을 때 대조에서는 6일째에 이루는 반면 균 접종 세포에서는 1일 내지 2일 지연되어 나타났으며 세포수는 대조군 정점에서의 세포수의 약 2/3를 나타냈다. 마지막 날, 즉 10일째에는 대조

군보다 생존세포수가 7.3배 내지 9.5배로 높게 나타난 것은 ureaplasma로 인하여 대사활성 정도가 둔화된 결과로 사료된다.

mycoplasma의 경우에 있어서는 세포주에 지속감염이 성립되기 때문에 탐색과정을 통한 검색이 가능하지만 ureaplasma의 감염은 일시적으로 나타났다가는 소실되기 때문에 세포수나 그 형태학적 관찰만 가지고는 ureaplasma의 노출에 대한 가부를 판단하기 어렵다. 따라서 ureaplasma의 경우에서는 대상세포의 내적변화를 관찰하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

즉, 염색체 변화 혹은 분자생물학적 차원의 검색이 요망된다 하겠다.

요 약

*U.urealyticum*으로 감염시킨 K-562세포를 10일 동안 37℃, 5% CO₂ 부란기에서 배양하여 매일 ureaplasma의 수적변화를 color change unit(CCU)로 시험하였고 살아있는 K-562세포를 trypan blue exclusion 방법에 의해서 산정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. *U.urealyticum*의 성장은 1일째까지는 증가되었으나 2일째부터 감소하였다.
2. K-562세포에 접종된 *U.urealyticum*은 접종량에 따라 6일 내지 9일까지 살아남아 있었다.
3. *U.urealyticum*으로 감염시킨 K-562세포의 성장곡선은 감염시키지 않은 K-562세포와 비교할 때 그 정점이 1~2일 지연되었다. 또한 K-562세포에 대한 ureaplasma의 세포독성 효과는 미소하였다.
4. 배양 10일째에 *U.urealyticum*으로 감염시킨 살아있는 K-562 세포수는 감염시키지 않은 K-562 세포군보다 높게 나타났다.

REFERENCES

1. 장명웅, 김광혁, 박인달 : *Ureaplasma urealyticum*의 Vero 세포에 대한 부착성의 검토, 고신대학 의학부 논문집 2 : 37,

1986

2. 장명웅, 김광혁, 박인달, 배광성 *Ureaplasma urealyticum*의 세포부착성 및 부착기전. 대한미생물학회지 23 : 307, 1988
3. 장명웅, 김광혁, 박인달, 배광성 : Human Leukemia 세포에 부착된 *Ureaplasma urealyticum*의 소장에 관한 전자현미경적 연구. 고신대학 의학부 논문집 4 : 71, 1988
4. Babara BM, Stanley MS : Selected method in cellular immunology. 1st Ed. San Francisco, W.H. Freeman and Co., 1980, pp 16~17
5. Barile MF : Mycoplasma infection of cell culture. Isr J Med Sci 17 : 555, 1981
6. Chen TR : In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent hoechst 33258. Exp Cell Res 104 : 255, 1977
7. Hemler ME, Strominger JL : Monoclonal antibodies reacting with immunogenic mycoplasma proteins present in human hematopoietic cell lines. J Immunol 129 : 2734, 1982
8. Hessling J, Miller S, Levy N : A direct comparison of procedures for the detection of mycoplasma in tissue culture. J Immunol Methods 38 : 315, 1980
9. Kaplan DR, Henkel TJ, Braciale V, Braciale TJ : Mycoplasma infection of cell cultures : thymidine incorporation of culture supernatants as a screening test. J Immunol 132 : 9, 1984
10. Keprtova J, Jurmanova K, Spurna V, Minarova E, Hofmanova J, Nebola M : An autoradiographic method of detecting *A.laidlawii* and *M.hyorhinis* in cell cultures. In Vitro 17 : 563, 1981
11. Kotani H, McGarrity GJ : Ureaplasma

- infection of cell culture. Infect Immun 52 : 437, 1986
12. Manchee RJ, Taylor-Robinson D : Studies on the nature of receptors involved in attached of tissue culture cells to mycoplasmas. Br J Exp Path 50 : 66, 1969
13. Masover GK, Namba M, Hayflick L : Cytotoxic effect of a T-strain mycoplasma(*Ureaplasma urealyticum*) on cultured normal human cells(WI-38). Exp Cell Res 99 : 363, 1976
14. Mazzali R, Taylor-Robinson D : The Behaviour of T-mycoplasma in tissue culture. J Med Microbiol 4 : 125, 1971
15. McGarrity GJ, Kotani H : *Ureaplasma*-eukaryotic cell interactions in vitro. Pediatr Infec Dis 5 : 316, 1986
16. McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J : Comparative studies between microbiological culture and uptake of uridine/uracil to detect mycoplasmal infection of cell culture. Exp Cell Res 121 : 159, 1979
17. Schneider EL, Stanbridge EJ : Comparison of methods for the detection of mycoplasma contamination of cell cultures : a review. In Vitro 11 : 20, 1976.
18. Sethi KK : On the incidence of mycoplasma contamination in cell cultures. Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr 1 Abt Orig Reihe A 219 : 550, 1972
19. Shepard MC, Luncford CD : Serological typing of *Ureaplasma urealyticum* isolated from urethritis patients by an agar growth inhibition method. J Clin Microbiol 8 : 566, 1978
20. Shepard MC, Masover GK : The Mycoplasmas 1st Ed. New York, Academic Press 1979, pp 452-494
21. Stanbridge EJ : Mycoplasma detection-an obligation of scientific accuracy. Isr J Med Sci 17 : 563, 1981
22. Stemke GW, Robertson JA : Comparison of two methods for enumeration of mycoplasma. J Clin Microbiol 16 : 959, 1982