

*Ureaplasma urealyticum*에 감염된 K-562 세포의 세포해학적 특성

고신대학 의학부 미생물학교실

김광혁, 유경식, 박인달, 장명웅

Karyological Characteristics of K-56 Cells Infected with *Ureaplasma urealyticum*

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

Department of Microbiology

Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

= Abstract =

When cultured human chronic myelogenous leukemia cell line(K-562) were exposed to *Ureaplasma urealyticum*, the cell showed chromosomal aberrations markedly. The K-562 cells were cultivated with *U.urealyticum* in RPMI 1640 without supplemental urea for 10 days. The cells for karyotyping were propagated in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum. Chromosomal aberrations included chromosomal break, chromatid break, chromatid gap, chromosome exchange, chromatid exchange, and ring chromosome.

Key Words : *Ureaplasma urealyticum*, K-562 cell line, Karyotyping

I. 서 론

사람에서 유래된 mycoplasma에 의해서 이 배체 세포주인 WI-38가 감염되었을 때 염색체 이상을 초래하고 점진적으로 세포의 성장이 정지된다는 보고는 일찌기 Paton 등²¹⁾에 의해서 이루어 졌다. 또한 같은 시기에 Fogh 등²⁾은 mycoplasma로 감염된 이수체 세포주인

FL세포에서도 염색체 이상이 발생함을 관찰하였고 Hayflick 등⁹⁾은 세포의 형태학적, 생화학적 변화뿐만 아니라 성장양식의 변화는 세포가 오염됨으로서도 나타날 수 있기 때문에 이러한 것들을 바로 이해하기 위해서는 mycoplasma가 감염된 세포배양은 이 오염이 세포의 성장발육, 대사 및 기능에 심각한 영향을 주고 있음을 밝히고 있다^{6, 10, 11, 13, 20, 22, 24)}. 또한

Aula 등³⁾과 Freed 등⁸⁾은 mycoplasma에 의한 세포염색체 이상 초래현상에 대하여 다음과 같은 기전으로 설명하고 있다. 즉 arginine 소모성 mycoplasma인 *M. hominis* 등이 세포와 함께 존재함으로써 배지내의 arginine 이용경합에서 우위를 나타내고 실제 세포핵산 합성에 필요한 arginine은 고갈상태가 됨으로서 원활한 핵산합성이 불가능하게 되어 염색체이상이라는 결과를 만들어내는 것으로 해석하고 있다.

*Ureaplasma urealyticum*의 감염에 의한 세포염색체 이상에 관한 연구보고는 상당히 드문편이지만 Kundsин 등¹⁵⁾에 의해서 사람정상 임파구에 *ureaplasma*를 감염시켜 배양했을 때 임파구의 염색체 이상을 초래하였음을 보고하고 이 경우의 염색체 이상은 arginine이 아닌 다른 amino산이 관여되었을 것이라고 추정하여 아직 확실한 기전은 파악되지 않고 있다. 본 저자들은 장 등²⁾의 보고에 의하여 *Ureaplasma urealyticum*을 감염시킨 사람의 말초혈액 임파구의 염색체 이상을 보고한 바 있으며 김 등¹⁾의 보고에 의하여 사람 만성백혈병 세포주인 K-562 세포의 *ureaplasma* 감염으로 인한 세포배양에서의 시간에 따른 *ureaplasma* 세균수의 변화 및 세포독성 효과를 언급한바 있으나 본 실험에서는 K-562 세포에 *ureaplasma*를 작용시킨 후 세포의 염색체에 어떠한 영향을 미치는가를 핵형을 관찰함으로써 그 효과를 보고저 한다.

재료 및 방법

Human chronic myelogenous leukemia cell line(K-562)는 경희대학교 동서의학연구

소 암센터의 면역학 연구실에서 분양받아 RPMI 1640 배지에 NaHCO₃ 2g/L, L-glutamine 2mM, 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A.)을 보충한 완전배지를 본실험에 사용하였다. 또한 추가된 항생제로서는 최종농도가 100units/ml이 되게 penicillin을 사용하였다. 원래 K-562세포가 가지고 있는 핵형은 philadelphia염색체를 아주 낮은 빈도이긴 하지만 나타내는 것으로 알려지고 있으며 American Type Culture Collection에서 제시하는 핵형은 표1에 나타난 바와 같이 염색체수가 다양한 세포이다.

본 실험에서 사용된 *ureaplasma*균주는 *U. urealyticum* T960(serotype 8)로서 캐나다 Albert대학 Robertson교수로부터 분양받아 10-B배지²⁰⁾를 계대배양 배지로 이용하였다. 10-B배지의 조성은 PPLO broth 1.5g에 mineral을 제거시킨 증류수 73ml를 가하여 magnetic stirring하에서 충분히 녹인다음 1N HCl로 pH를 5.5로 조정된 다음 autoclave하였다. 멸균이 완료된 상기배지는 냉각을 확인한 다음 horse serum 20ml, 25% yeast extract 10ml, 10% urea 0.5ml, 2% L-cysteine 0.5ml, 1% phenol red 0.1ml, CVA enrichment(Gibco, U.S.A.) 0.5ml, penicillin G 100,000units 1ml을 무균적으로 첨가하여 완전배지로 만든 다음 사용하였다. 상기의 완전배지에 배양된 K-562세포를 2.5×10⁴ml의 세포부유액으로 조절한 다음 24 wells microplate(Costar, U.S.A.)에 well당 1ml을 추가하였다. 여기에 배양이 완료된 *ureaplasma*를 well당 1×10³ color change unit(이하 CCU)가 되게 0.1ml을 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 10

Table 1. Karyology of K-562 cell(ATCC) Chromosome Frequency Distribution 50 cells

Cells	1	1	10	12	7	13	3	2	1
Chromosomes	64	65	66	67	68	69	70	72	77

일 동안 배양하였다. 10일까지 배양하는 동안 아직 살아있는 세포만을 분리하기 위하여 Ficoll-Hypaque용액(Pharmacia, Sweden)을 이용한 비중원심법⁵⁾으로 생세포만을 분리하여 완전배지로 3회 세척하였다. 세척된 세포는 새로운 plastic용기에 옮겨 충분한 배지를 공급한 후 5% CO₂, 37°C에서 다시 배양을 계속함으로써 세포수의 증가를 위하여 14일 동안 배양하였다.

염색체관찰을 위한 colchicine처리는 colchicine액($5 \times 10^{-5}M$) 1ml씩을 K-562세포 배양병에 적하하였는데 적하시기는 배양종료 3시간 전에 실시하여 다시 배양을 하였다. 3시간후 세포를 수거하여 1,000rpm에서 10분간 원심시킨 후 상층액을 제거하고 Hank's balanced salt solution액으로 3회 원심세척 하였다. 최종적으로 원심된 세포들은 먼저 멸균된 증류수로 5배 희석한 Minimum Essential Medium(Gibco, U.S.A.) 6ml을 가하여 37°C에서 20분동안 방치시켰다. 시간이 경과한후 1,000rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 제거하고 그 원심세포에 고정액(methanol:acetic acid=3:1) 6ml을 가하여 ice bath에 30분동안 방치하였다. 다시 상기 시험관을 1,000rpm에서 10분간 원심하여 상층을 버리고 난 세포에 고정액 1ml을 작용시켜 곱게 부유액을 만든다음 ice bath에 5분동안 방치하였다가 slide에 dropping하였다. slide는 실온에서 건조한 후 Giemsa염색을 하여 관찰하고 사진을 찍었다.

결 과

세포에 ureaplasma를 노출시킨 후 수거된 세포에서 나타내는 염색체 손상결과는 그림1에서 13까지 나타난 바와 같이 ISCN¹²⁾규약의 염색체 이상분류에 준한 다음과 같은 염색체 손상을 나타냈다. 즉 chromosome break(csb), chromatid break(ctb), chromatid gap(ctg), chromosome exchange(cse), chromatid exchange(cte), ring chromosome(r)과 같은 직접적인 손상을 나타냈다.

고 찰

현재까지 세포배양과 ureaplasma와의 관계를 관찰한 연구논문은 단지 몇개에 지나지 않는다^{4,14,15,16,17,18,19)}. Manchee 등¹⁶⁾은 ureaplasma가 상피세포에 강하게 부착한다고 보고한바 있고 Shepard 등⁴⁾은 세포배양에서 ureaplasma를 성장시키기 위하여서는 urea를 계속공급해야함을 언급한바 있다. McGarrity 등¹⁹⁾은 동물에서 분리한 ureaplasma를 사람 및 동물에서 유래된 세포에 접종하여 그 감염여부를 관찰해 보았을 때 3종류의 세포배양중에서 2종류는 감염이 됨을 보고하고 또한 배양세포의 감염에 urea의 추가없이도 나타났으며 세포배양에서의 ureaplasma성장이 urea농도 4ug/ml에서 있었다고 하였다. 김등¹⁾도 배양 세포에 ureaplasma를 접종하였을 때 24시간까지 ureaplasma수가 증가하다가 그후로는 감소되었음을 보고한 바 있다. 이와같이 배양 세포에서 ureaplasma가 감염이 성립되었을 때 세포염색체상의 변화를 관찰하기 위하여 본 실험을 시도하였던바 염색체상에 상당한 손상을 주고 있음을 볼 수 있었다. Kundsин 등¹⁵⁾도 정상인의 임파구에 ureaplasma를 접종하였을 때 single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid break, isochromatid break, tetraploidy와 같은 chromosome의 비정상화를 보고하였으며 장등²⁾도 정상임파구에 ureaplasma를 접종하였을 때 임파구의 배양상층액에서의 ureaplasma생장기간이 2일이었고 ureaplasma에 감염된 임파구의 유사분열계수가 현저히 감소하였으며 임파구의 염색체 이상이 Kundsин 등과 유사한 결과가 나타났음을 보고한 바 있다. 본 실험에서는 주화세포인 K-562 세포주를 이용하여 여기에 ureaplasma를 감염시킨 후 세포의 염색체 이상유무를 보고자 하였다. 주화세포와 mycoplasma의 관계속에서 염색체 이상을 관찰한 것으로는 Paton 등²¹⁾과 Stanbridge 등²⁵⁾에 의하여 보고되었던바 chromosomal break 및 chromatid change 등의 염색체 변화를 언급

하였다.

따라서 조직배양 세포에서의 mycoplasma 감염은 세포염색체 이상 출현의 빈도를 증가시키고, 이러한 증가는 세포가 정상적으로 성장하는데 필요한 영양소를 mycoplasma가 이용하므로 나타나는 것으로 생각되고 있다³⁾. 즉 arginine이 결핍된 배지에서의 배양세포에서 나타나는 염색체 이상이 mycoplasma감염으로 인한 염색체 이상과 같은 결과를 나타냈다. 그렇다면 ureaplasma에 의한 감염도 mycoplasma감염에서처럼 배지 내에 arginine 결핍으로 인하여 염색체 이상이 나타난 것인지 혹은 ureaplasma가 생성 해내는 어떤 물질에 의해서 이러한 이상을 나타내는 것인지는 앞으로 더욱 찾아 보아야 할 사항으로 사료된다.

결 론

사람만성백혈병세포주(K-562)가 *Ureaplasma urealyticum*에 노출되었을 때 현저한 염색체 이상을 초래했다. K-562 세포는 urea의 추가없이 RPMI 1640배지에서 *U.urealyticum*과 함께 10일 동안 배양시킨 후 여기에서 살아남은 세포만을 10% 우태아혈청포함 RPMI 1640 배지에 계대배양하여 karyotyping하였다. 여기에서의 염색체 이상은 chromosomal break, chromatid break, chromatid gap, chromosome exchange, chromatid exchange, ring chromosome를 보여주었다.

REFERENCES

1. 김광혁, 유경식, 박인달, 장명웅 : 사람 만성 백혈병 세포주(K-562)의 *Ureaplasma* 감염. 고신대학 의학부 논문집 5 : 13, 1989
2. 장명웅, 김광혁, 박인달, 유경식 : *Ureaplasma urealyticum*에 감염된 사람 임파구의 염색체 이상. 고신대학 의학부 논문집 5 : 1, 1989
3. Aula PW, Nichols W. The cytogenetic effects of mycoplasma in human leukocyte cultures. J. Cell Physiol. 70 : 281, 1967
4. Barile MF, Razin S : The mycoplasmas. 1st ed. New York, Academic Press, 1979 pp452-494
5. Boyum A : Separation of leukocyte from blood and bone marrow. Scan. J. Clin. and Lab. Invest. 21 : 97, 1968
6. Chen TR : In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 strain. Exp. Cell Res. 104 : 255, 1977
7. Fogh J, Fogh H : Chromosome changes in pleuro-pneumoniae-like organisms infected FL human amnion cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 : 223, 1965
8. Freed TJ, Schatz SA : Chromosome aberration in cultured cell deprived of single essential amino acids. Exper. Cell Res. 55 : 393, 1969
9. Hayflick L : The limited in vitro life time of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37 : 614, 1965
10. Hemler ME, Strominger JL : Monoclonal antibodies reacting with immunogenic mycoplasma proteins present in human hematopoietic cell lines. J. Immunol. 129 : 2734, 1982
11. Hessling J, Miller S, Nevy N : A direct comparison of procedures for the detection of mycoplasma in tissue culture. J. Immunol. Methods 38 : 315, 1980
12. ISCN : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Cytogenet. Cell Genet., 1985
13. Kaprtova J, Jurmanova K, Spurna V, Minarova E, Hofnova J, Nevola

- M : An autoradiographic method of detecting *M. hyorhins* in cell cultures. In Vitro 17 : 563, 1981
14. Kotani H, McGarrity GJ : Ureaplasma infection of cell culture Infect. Immun. 52 : 437, 1986
 15. Kundsın RB, Ampola M, Streeter S, Neurath P : Chromosomal aberrations induced by T-strain mycoplasmas. J Med. Genet. 8 : 181, 1971
 16. Manchee RJ, Taylor-Robinson D : Studies on the nature of reports involved in attachment of tissue culture cells to mycoplasmas. Br. J. Exp. Pathol 50 : 66, 1969
 17. Masover GK, Namba M, Hayflick L : Cytotoxic effect of a T-strain mycoplasma (*Ureplasma urealyticum*) on cultured normal human cell(WI-38) Exp Cell Res 99 : 363, 1976
 18. Mazzali R, Taylor-Robinson D : The behaviour of T-mycoplasmas in tissue culture. J. Med. Microbiol. 4 : 125, 1971
 19. McGarrity GJ, Kotani H : Ureaplasma-eukaryotic cell interactions in vitro. Pediatr Infec. Dis. 5 : 316, 1986
 20. McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J. : Comparative studies between microbiological culture and uptake of uridine/uracil to detect mycoplasmal infection of cell cultures. Exp. Cell Res. 121 : 159, 1979
 21. Paton GR, Jacobs JP, Perkins FT : Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with mycoplasma. Nature 207 : 43, 1965
 22. Schneider EL, Stanbridge EJ : Comparison of methods for the detection of mycoplasmal contamination of cell cultures : A review. In Vitro 11 : 20, 1976
 23. Shepard MC, Lunceford CD. - Serological typing of *Ureaplasma urealyticum* isolated from urethritis patients by an agar growth inhibition method J Clin Microbiol 8 : 566, 1978
 24. Stanbridge EJ. Mycoplasma detection-an obligation of scientific accuracy. Isr J. Med. Sci. 17 : 563, 1981
 25. Stanbridge E, Onen M, Perkins FT, Hayflick L : Karyological and morphological characteristics of human diploid cell strain WI-38 infected with mycoplasmas Exp. Cell Res. 57 : 397, 1969
-

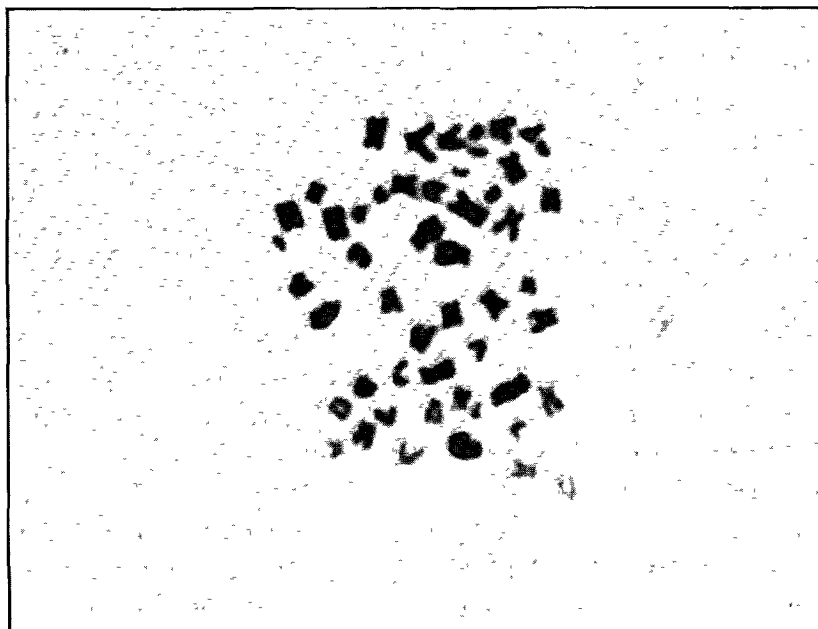


Fig. 1. Chromosomes from normal K-562 cells.

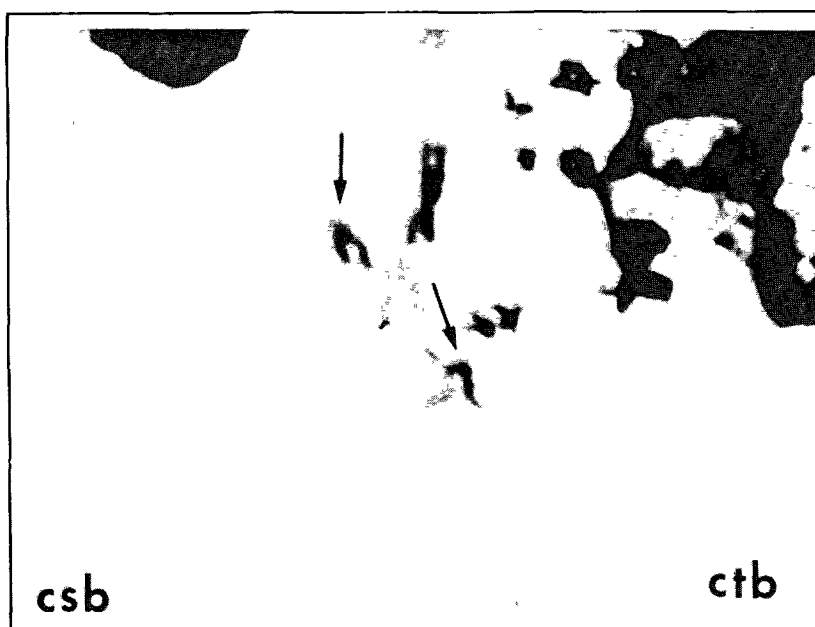


Fig. 2. Chromosome(csb) and chromatid break(ctb)
from U urealyticum-infected K-562 cells.

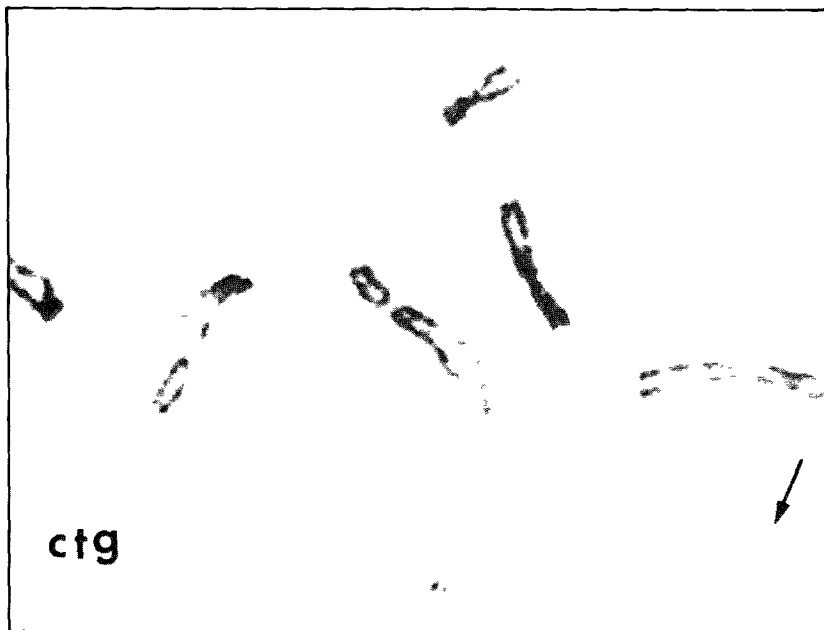


Fig. 3. Chromatid gap(ctg) from *U. urealyticum*-infected K-562 cells

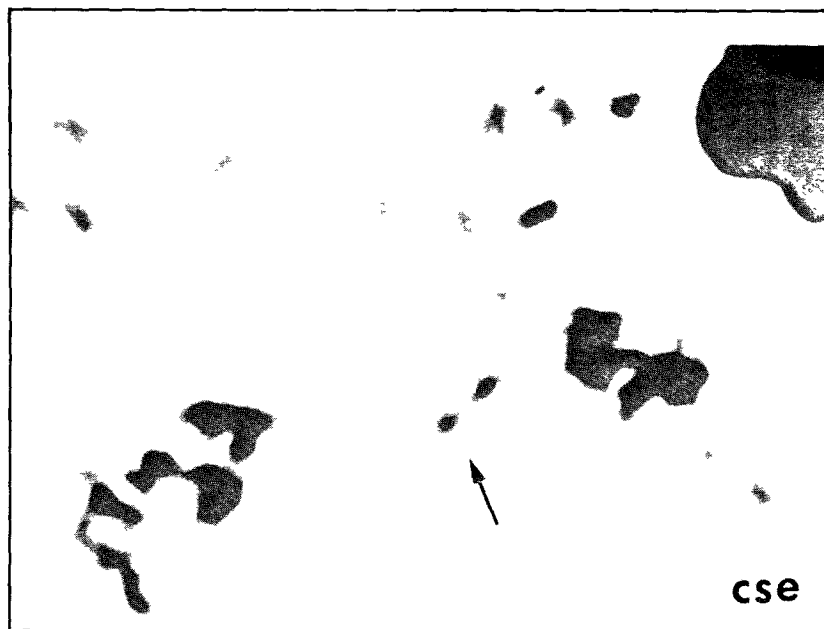


Fig. 4. Chromosome exchange(cse) from *U. urealyticum*-infected K-562 cells

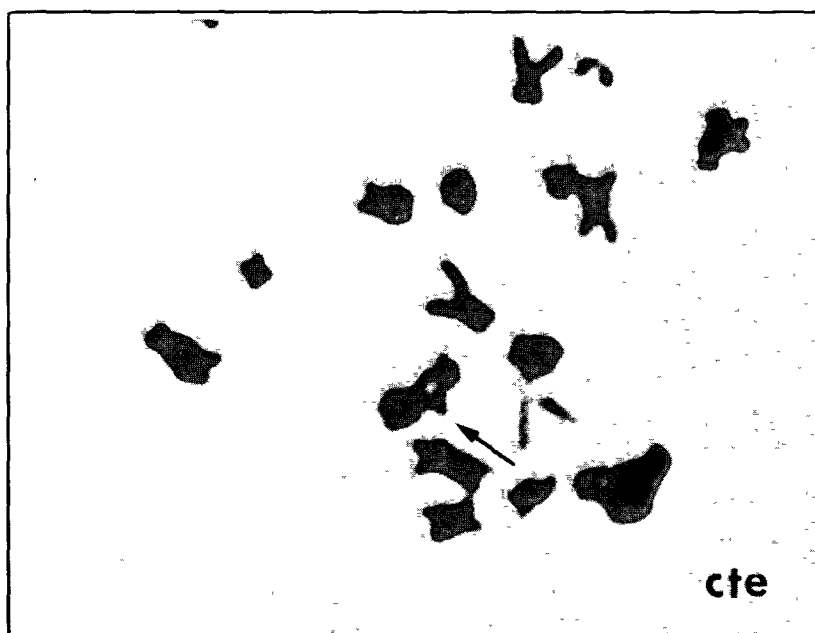


Fig. 5. Chromatin exchange(cte) from *U. urealyticum*-infected K-562 cells

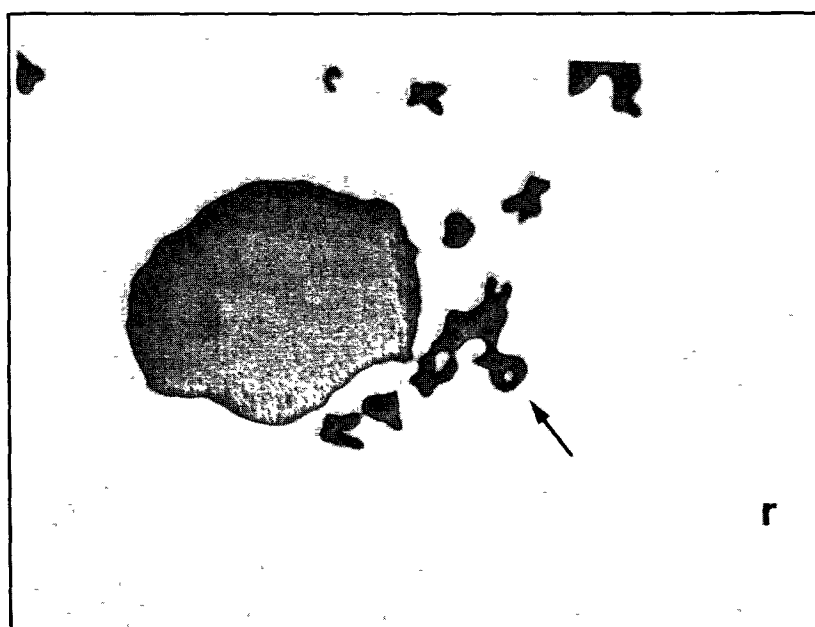


Fig. 6. Ring Chromosome(r) from *U. urealyticum*-infected K-562 cells



Fig. 7. Chromosome break(csb) from *U urealyticum*-infected K-562 cells

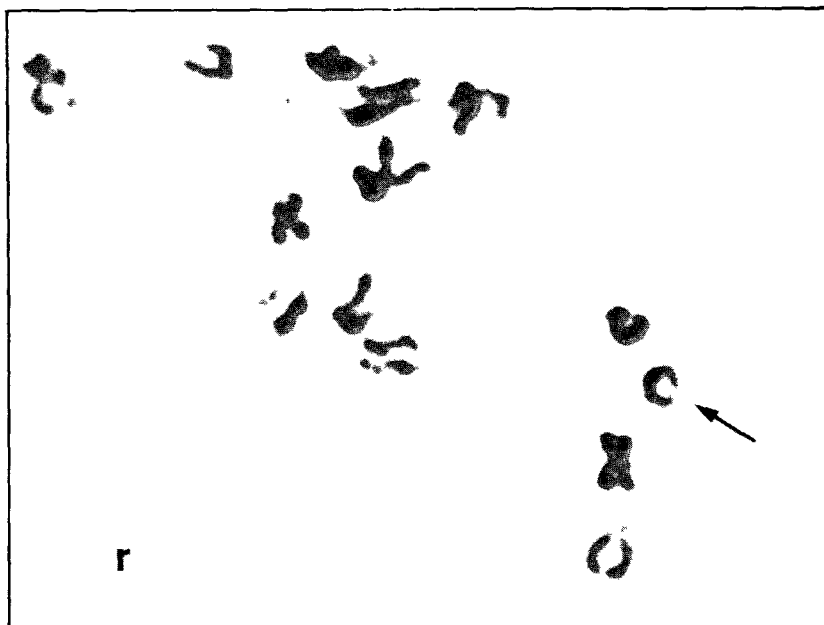


Fig. 8. Ring chromosome(r) from *U urealyticum*-infected K-562 cells

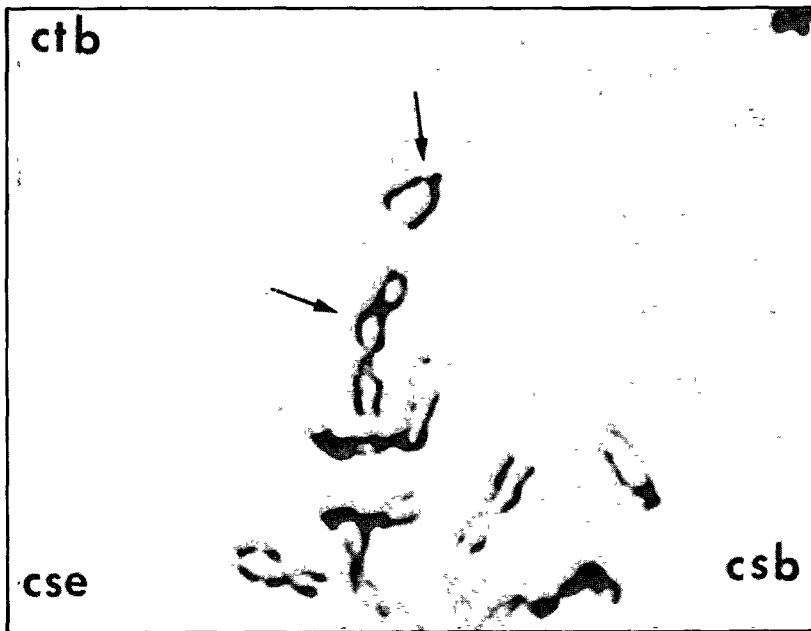


Fig. 9. Chromatid break(ctb), chromosome exchange(cse), and chromosome break(csb) from U urealyticum-infected K-562 cells.

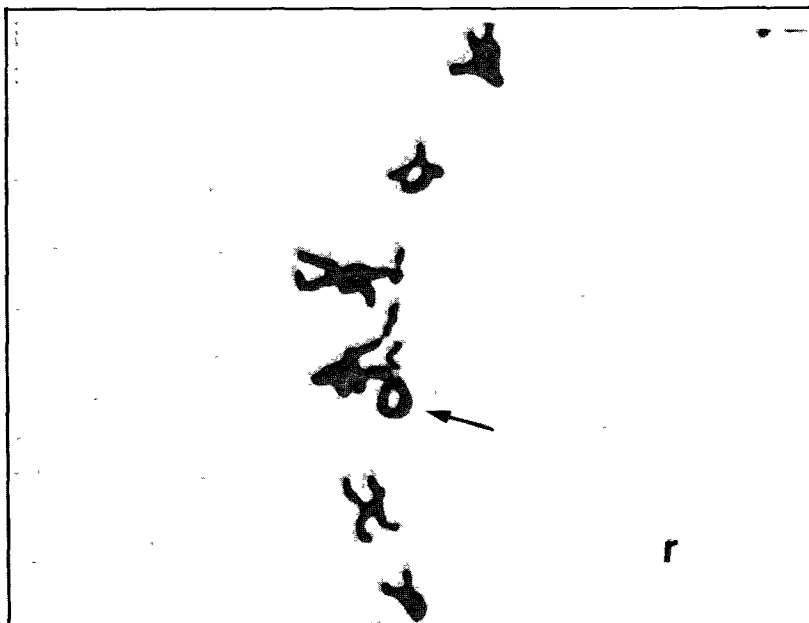


Fig. 10. Ring chromosome(r) from U.urealyticum-infected K-562 cells

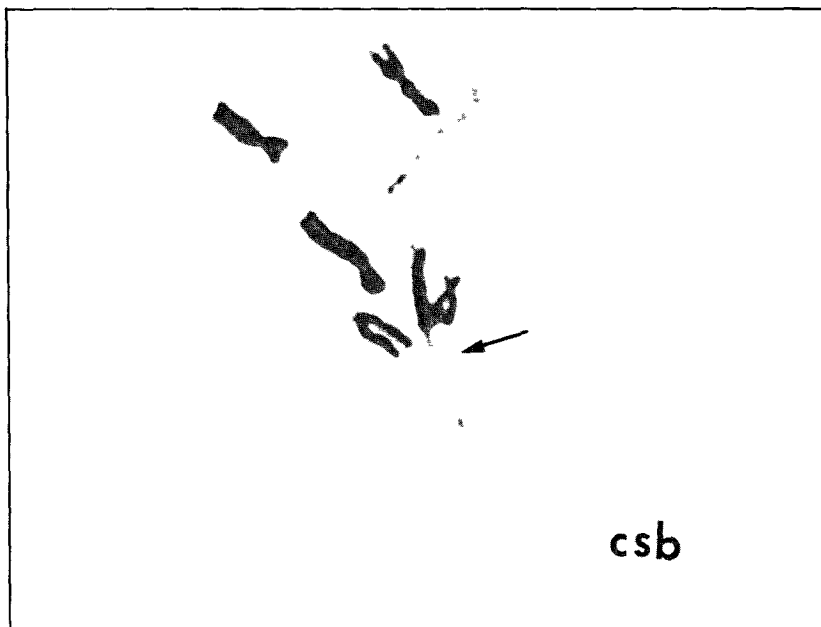


Fig. 11. Chromosome break(csb) from *U urealyticum*-infected K-562 cells

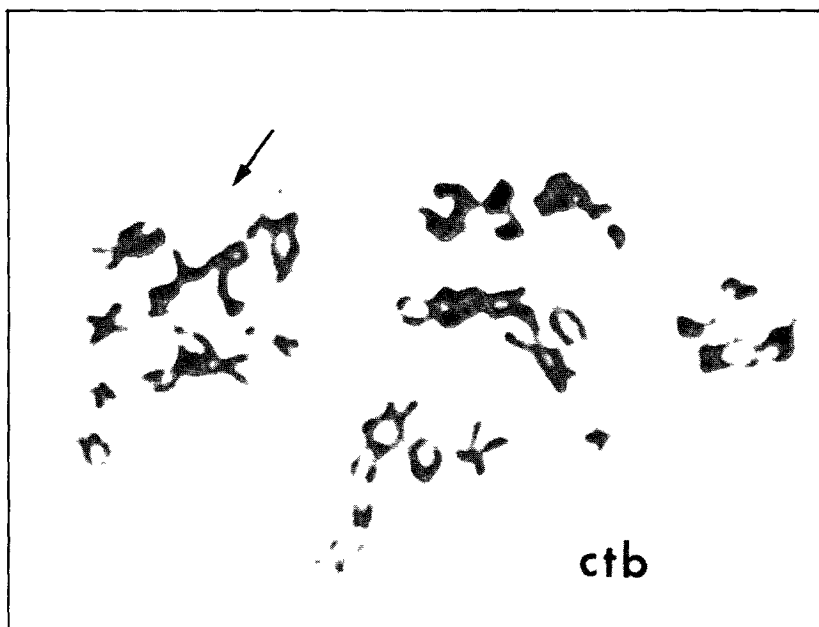


Fig. 12. Chromatid break(ctb) from *U urealyticum*-infected K-562 cells

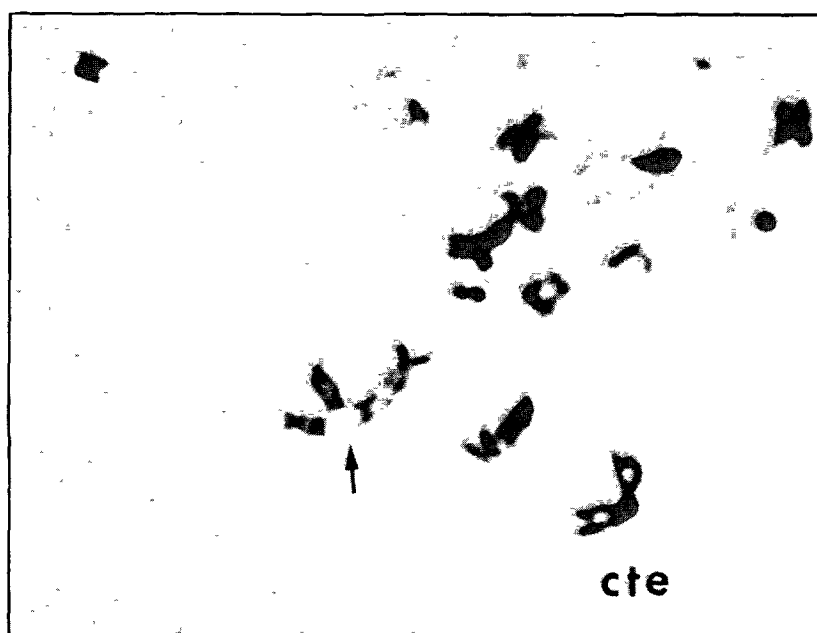


Fig. 13. Chromatid exchange(cte) from *U.urealyticum*-infected K-562 cells