

질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*)에 대한 마우스 복강 대식세포의 세포독성

한양대학교 의과대학 기생충학교실

柳在淑 · 安明姬 · 閔得映

요약 : 질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*)에 대한 마우스의 복강 대식세포 및 림포카인으로 활성화시킨 대식세포의 세포독성을 각각 관찰하였다. 세포독성은 질트리코모나스를 ³H-TdR로 label시킨 후 대식세포와 반응시켜 사멸한 원충에서 방출되는 방사능양을 비교하여 측정하였다.

대식세포의 원충에 대한 비율을 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 및 50:1로 증가시키고 반응시간을 12시간 및 24시간으로 변화시켰을 때, 대식세포와 원충의 비율 10:1 및 24시간 반응의 경우 가장 높은 세포독성을 보였다. 마우스 비장세포를 phytohemagglutinin으로 자극시켜 얻은 림포카인으로 활성화시킨 대식세포에서는, 아무 처리를 하지 않은 대조 대식세포와 비교하였을 때 세포독성이 유의하게 증가되었으나 세포독성이 림포카인의 회색경도와는 비례하지 않았다. 또한 질트리코모나스에 세포독성을 나타내는 세포는 주로 플라스틱에 부착하는 대식세포임을 알 수 있었다.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, mouse, macrophage, cytotoxicity, cellular immunity

서 론

질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*)는 성적 접촉에 의해 감염되는 질병의 하나로 여성에서는 대하, 소양감 등의 증세를 나타내는 질염을 일으키며 남성에서는 전립선염이나 부고환염을 일으키기도 한다.

대식세포는 자연 살세포(natural killer cell)와 더불어 자연 저항을 나타내는 세포로, 마이티스에 감염된 세포, 박테리아, 원충 및 종양세포를 직접적으로 용해(cytolysis)시키거나 잡아먹으며(engulfment), 간접적으로는 림프구의 기능을 조절하여 면역작용에 영향을 미친다고 알려져 있는데, 여러 기생충에 대해 대식세포가 세포독성을 나타낸다는 보고는 많다. Smith *et al.* (1982)은 인체 말초혈액 단핵구가 람블편모충(*Giardia lamblia*)을 죽인다고 보고하였으며, Belosevic and Faubert(1986)는 마우스 대식세포가 *G. muris*를 죽인다고 보고하였다. 질트리코모나스에 대해서도 Landolfo *et al.*(1980)은 정상 마우스의 복강내 대식세포가, Mantovani *et al.*(1981)은 인체 말초혈액 단핵구가 질트리코모나스에 대해 세포독성을 나타낸다고 하였다.

일반적으로 대식세포는 항원이나 유사분열 물질(mitogen)에 의해 자극된 림프구에서 분비된 매개체(mediator)인 림포카인(lymphokine)에 의해 활성화되며, 활성화된 대식세포는 살균작용(microbicidal activity)과 종양에 대한 세포독성이 증강된다고 알려지

으며, 기생충에 대한 작용도 강화된다고 하는데 Bout *et al.* (1981)은 정상적인 마우스 대식세포는 만손주혈 흡충의 schistosomule을 죽이지 못하나 림포카인에 의해 활성화되었을 때는 죽일 수 있다고 하였으며 Oliver *et al.* (1989)은 *Leishmania donovani*에 대해, Hughes *et al.* (1987)은 *Toxoplasma gondii*에 대해 활성화된 대식세포의 살해작용을 보고하였다. 그러나 질트리코모나스에 대해서는 림포카인에 의해 활성화된 대식세포의 세포독성에 대해 알려진 바가 없었다.

이 실험에서는 마우스 복강내 대식세포와 림포카인으로 활성화시킨 대식세포를 질트리코모나스와 반응시켜 질트리코모나스에 대한 마우스 복강내 대식세포의 세포독성을 관찰하고 이때 림포카인의 역할을 알아보 고자 하였다.

실험재료 및 방법

1) 질트리코모나스 분리 및 배양

사용된 질트리코모나스는 한양대학병원 산부인과에 내원한 질염 환자에서 분리한 HY-3주로 마우스 퍼하 집중에 의해 병원성이 입증된 주(strain)이다(신 등, 1990). 사용된 배지는 Diamond(1968)의 TPS-1 배지로 배지의 처방은 다음과 같다.

TP(Trypticase and Panmede) broth pH 7.0	435 ml
Bovine serum	50 ml
MEM vitamin solution(Gibco)	15 ml
Penicillin G	500,000 IU

2) 질트리고모나스의 표지(labeling)

TPS-1 배지에 배양중인 질트리고모나스를 RPMI 1640배지로 세척하여 1×10⁶개를 10% 우태아 혈청을 함유한 2 ml RPMI 배지에 부유시키고, 여기에 10μCi [³H]-thymidine(Amersham, UK)을 넣고, 37°C, 5% CO₂ 흡습함온기에서 24시간 배양한 후 RPMI 배지로 두번 세척하여 사용하였다.

3) 마우스의 질트리고모나스 면역

이 원충으로 면역시킨 마우스의 대식세포를 분리하기 위해 면역을 시행하였다. 세척한 질트리고모나스 1×10⁶개를 함유한 생리식염수 0.5 ml를 BALB/c 마우스 배측 피하조직에 주입 면역시키고 7~8주 후 복강 대식세포를 수집하였다.

4) 마우스 복강내 대식세포의 분리

대조 및 면역시킨 마우스를 경추탈구에 의해 희생시킨 후 마우스의 복부 표피를 벗기고 주사기를 이용하여 복강내로 RPMI 배지 10 ml를 주입하고 마사지한 후 복강세포를 채취하여 RPMI 배지 1ml당 5×10⁶개 세포를 부유시켜 100 mm직경을 가진 플라스틱 페트리 접시(Costar, USA)에 넣은 후 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 흡습함온기에서 배양하였다. 플라스틱 표면에 붙지 않는 세포를 RPMI 배지로 세척하여 제거한 후 페트리 접시에 붙은 세포는 rubber policeman으로 떼어내었다. 떼어낸 세포 중 대식세포의 비율을 알아보고자 대식세포의 동정에 사용되는 nonspecific esterase 염색을 하였는데 90% 이상이 대식세포였다.

5) 림포카인(lymphokine)의 제조 및 대식세포의 활성화

림포카인의 제조를 위해 6~8주된 BALB/c 마우스의 비장을 꺼내어 잘게 부순 후 1 ml 주사기로 5~10회 pumping하여 세포 부유액을 만들었다. 0.17M Tris-NH₄Cl(pH 7.2)을 첨가하여 적혈구를 용혈시키고 RPMI 1640배지로 2~3회 세척한 후, RPMI 배지 1ml당 5×10⁶개 세포를 부유시킨 후 자극제인 phytohemagglutinin (PHA)을 10 μg/ml로 배지에 넣고 37°C 5% CO₂ 흡습함온기에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 대식세포를 활성화시키기 위해 2×10⁶개의 복강세포를 0.9 ml의 림포카인에 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 흡습함온기에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 RPMI 배지로 세포를 세척한 후 사용하였다.

6) 세포독성 측정

U-bottom의 96-well microwell plate(Dynatech, USA)에 well당 2×10⁴개의 표지된 원충을 0.1 ml의 10% 우태아 혈청을 함유한 RPMI 배지에 부유시켜 넣고 여기에 0.1 ml 배지에 부유시킨 복강세포를 첨가하였다. 37°C 5% CO₂ 흡습함온기에서 24시간 배양한 후 plate를 400 g에서 10분간 원심분리한 후 100 μl의 상층액을 2 ml의 scintillation cocktail(Scinti A, XF)이 든 vial에 옮겨 방사능을 liquid scintillation counter (Packard, USA)로 측정하였다. 자연방출(spontaneous

release)은 microwell plate well에 0.1 ml의 표지된 원충만을 넣고 반응시켰고, 최대 방출(maximum release)은 표지된 원충에 0.1% sodium dodecyl sulfate를 넣은 후 방사능을 측정하였다.

$$\% \text{ 세포독성} = \frac{\text{cpm of experimental release} - \text{cpm of spontaneous release}}{\text{cpm of maximum release} - \text{cpm of spontaneous release}}$$

실 험 성 적

1) 대식세포의 세포수 및 반응 시간에 따른 세포 독성

대식세포의 질트리고모나스에 대한 비율을 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 및 50:1로 증가시키고, 반응 시간을 12시간 및 24시간으로 변화시키면서 세포독성을 관찰하였다. 그 결과 반응 시간 12시간에는 5:1에서 6.5±1.51%였고, 대식세포의 비율이 증가됨에 따라 세포독성도 차츰 증가하여 50:1에서는 27.2±1.66%였다. 한편 24시간 반응시켰을 때에는 12시간 반응시켰을 때 보다 각각의 대식세포 비율에서 세포독성이 유의하게 증가되었는데 10:1의 비율에서 82.9±8.32%로 가장 높은 세포독성을 보였다. 그러나 대식세포의 비율이 20:1 및 50:1로 증가했을 때는 77.3±8.01% 및 74.2±3.11%로 오히려 세포독성의 감소를 보였다 (Table 1).

2) 주효세포(effector cell)의 세포 특성

질트리고모나스에 세포독성을 나타내는 세포의 특성을 알아보고자 복강세포를 플라스틱 표면에 부착하는 성질이 있는 부착성 복강세포와 부착되지 않는 비부착

Table 1. Cytotoxicity of mouse macrophages against *T. vaginalis* in different E : T ratios and incubation times

E : T ratio	Incubation time(hr)	
	12hr(%)	24hr(%)
1 : 1	0	7.4 ± 3.48
5 : 1	6.5 ± 1.51	65.2 ± 13.2
10 : 1	19.0 ± 1.28	82.9 ± 8.32
20 : 1	22.1 ± 2.41	77.3 ± 8.01
50 : 1	27.2 ± 1.66	74.2 ± 3.11

Table 2. Cytotoxicity of peritoneal cells against *T. vaginalis*

Cell population	Cytotoxicity(%)
Peritoneal cells	63.6 ± 2.15
Nonadherent peritoneal cells	28.6 ± 4.87*
Adherent peritoneal cells	69.3 ± 5.15*

*p<0.005

Table 3. Cytotoxicity of lymphokine-activated macrophages from normal & immunized mice against *T. vaginalis*

Incubation condition	Cytotoxicity(%)
Macrophage, normal mice	73.9±4.27*
Macrophage, normal mice +Lymphokine	96.9±2.38*
Macrophage, immunized mice	63.2±0.49**
Macrophage, immunized mice +Lymphokine	98.2±1.81**

*,**p<0.005

Table 4. Effect of lymphokine concentrations on the macrophage cytotoxicity against *T. vaginalis*

Incubation condition	Cytotoxicity(%)
Macrophage	54.8±5.37
Macrophage+Lymphokine	95.3±2.88*
Macrophage+1/5 Lymphokine	86.5±5.74
Macrophage+1/20 Lymphokine	84.3±2.01*
Macrophage+1/80 Lymphokine	88.9±4.33

*p<0.025

성 복강세포로 나누어 세포독성 정도를 측정하였다. 그 결과 복강세포의 세포독성은 63.6%±2.15%, 부작성 복강세포는 69.3%±5.15%로 비슷하였으나 비부작성 복강세포는 28.6%±4.87%로 나타나 질트리로코나스에 세포독성을 나타내는 세포는 대부분 부작성 복강세포임을 알 수 있었다(Table 2).

3) 면역시킨 마우스로부터 분리한 대식세포의 세포독성 및 림포카인으로 활성화시킨 대식세포의 세포독성

정상 마우스로부터 분리한 대식세포의 질트리로코나스에 대한 세포독성은 73.9±4.27%인 반면, 면역시킨 마우스로부터 분리한 대식세포는 63.2±0.49%로 약간 낮았고 각각의 대식세포를 림포카인으로 활성화시켰을 때의 세포독성은 정상 대식세포에서는 96.9±2.38%, 면역시킨 마우스의 대식세포는 98.2±1.82%로 증가되어, 정상 마우스나 면역시킨 마우스 모두에서 림포카인을 처리하였을 때 처리하지 않은 군에 비해 세포독성이 증가함을 알 수 있었다(Table 3).

4) 림포카인 농도에 따른 대식세포의 세포독성

대식세포를 원액의 림포카인 및 1/5, 1/20 및 1/80로 희석시킨 림포카인으로 반응시킨 후 세포독성을 측정하였다. 림포카인 원액에서는 95.3±2.88%인데 비해 1/5 희석액에서는 86.5±5.74%로 감소되었으며, 1/20 희석액에서는 84.3±2.01%로 원액에 비해 유의하게 감소되었으나 (p<0.025), 1/80 희석액에서는 88.9±4.33%로 1/5 및 1/20 희석액에 비해 약간 증가

되어 세포독성은 림포카인 희석정도와 비례하지 않았다(Table 4).

고 찰

기생충 감염에 대한 대식세포의 작용은 면역반응의 초기에 antigen-presenting cell로 작용하는 것과는 별도로 2가지 방법으로 기생충 감염에 영향을 미친다고 알려졌는데 하나는 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), colony stimulating factor(CSF)와 같은 cytokine을 분비하여 염증반응을 조절하는 것이며, 다른 한가지는 주효세포(effector cell)로 작용하여 기생충의 증식을 억제하거나 또는 죽이는 것이다(Roitt *et al.*, 1989).

이 실험에서는 마우스 복강내 대식세포가 질트리로코나스에 대해 직접적으로 세포독성을 나타내는지 알아보았는데 대식세포와 원충의 비율이 1:1에서는 반응시간 12시간에 세포독성이 없다가 반응시간이 24시간 되었을 때 7.4±3.48%로 세포독성이 낮았으며 5:1 이상의 비율에서는 12시간에 세포독성이 관찰되었다. Mantovani *et al.* (1981)도 비슷한 결과를 얻어 인체 말초혈액 단핵구가 1:1의 비율에 세포독성을 나타내지 않았다고 하였으며 3:1 이상의 비율에서 세포독성이 관찰된다고 하였다. 또한 도표에는 명기하지 않았으나 반응시간 6시간에서는 대식세포 수의 다소에 관계없이 세포독성이 전혀 관찰되지 않았으며, 48시간에서는 원충의 사멸로 인한 자연방출(spontaneous release)이 증가되므로 반응시간으로 적합하지 않았고 반응 24시간 후의 관찰이 적합하였다.

Landolfo *et al.* (1980)은 여러 주(strain)의 마우스 복강세포의 질트리로코나스 원충에 대한 세포독성을 관찰하고 BALB 배경(background)의 마우스는 비교적 높은 세포독성을 보인다고 하였다. 이 실험에서는 BALB/c 마우스를 사용하였는데 높은 세포독성이 관찰되었다.

세포독성을 나타내는 주효세포를 알아보려고 부작성 복강세포와 비부작성 복강세포로 나누어 관찰하였는데 부작성 세포의 경우 69.3±5.15%였는데 비해 비부작성 세포는 28.6±4.87%로 세포독성이 낮았다. 이 점에 대해서는 Landolfo *et al.* (1980)도 비슷한 결과를 얻어 복강내 부작성 세포의 세포독성은 24.1±1.8%이며, 비부작성 세포는 7.7±1.1%로 낮았다고 한다. 이 실험에서는 중성구와 림프구 등의 복강내 비부작성 세포의 경우 세포독성이 부작성 세포에 비해 유의하게 낮았지만 이 원충의 세포독성에는 어느 정도 관여함을 알 수 있었다. 복강세포를 nonspecific esterase 염색방법으로 판정하였을 때 부작성 복강세포의 90% 이상이 대식세포였으므로 세포독성을 나타내는 세포는 주로 대식세포임을 알 수 있었다.

한편 기생충에 감염된 마우스로부터 분리한 대식세

포가 정상 마우스 대식세포와 비교하여 세포독성에 영향을 미치는지 알아보았는데 Kanwar *et al.* (1987)과 Belosevic and Faubert(1986)는 람블편모충 및 *G. muris*에 감염된 마우스 복강내 대식세포는 정상 마우스 대식세포에 비해 이 원충에 대한 세포독성이 증가된다고 보고하였으며 Reed *et al.*(1982)은 *Trypanosoma cruzi*를 면역시킨 마우스로부터 분리한 대식세포는 주사전 자현미경으로 관찰하였을 때 정상 대식세포에 비해 더 활발히 원충을 섭취한다고 보고하였다. 그러나 이 실험에서는 질트리코모나스를 마우스 피하 내로 접종시킨 다음 7~8주 후에 분리한 대식세포가 정상 대식세포에 비해 세포독성이 오히려 약간 감소되어 다른 보고자와는 반대의 현상을 보였는데 그 이유는 알 수 없었다.

일반적으로 대식세포는 감염 초기에 활성화되며, cytokine에 의해 활성화되었을 때 면역 조절기능과 effector기능이 강화된다고 한다. 대식세포를 활성화시키는 factor는 주로 T림프구에 의해 분비된 interferon- γ (IFN- γ), granulocyte/macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF), interleukin-3(IL-3) 및 interleukin-4(IL-4) 등이 복합적으로 관여한다고 알려져 있다(Roitt *et al.*, 1989). 또한 활성화된 대식세포는 세포 내에 기생하는 기생충에 대해 식작용(phagocytosis) 과정 중 생산되는 H₂O₂와 O₂⁻의 생산을 증가하여 기생충을 죽이거나 성장을 저지함이 알려졌는데(Freund and Pick, 1985; Passwell *et al.*, 1986) 세포 밖에 기생하는 기생충에 대해서는 어떤 기전에 의해 세포독성을 나타내는 지 알려진 바가 없다.

이 실험에서는 마우스 복강내 대식세포를, 마우스 비장 림프구를 T림프구 유사 분열물질인 PHA로 자극시켜 생성된 림포카인으로 활성화시켰을 때 아무 처치도 하지 않은 정상 대식세포에 비해 질트리코모나스 원충에 대해 높은 세포독성을 나타내었다. 그러나 림포카인이 대식세포에 어떻게 작용하여 세포독성을 증가시켰는지에 대하여는 앞으로도 연구되어야 한다. 또한 Bout *et al.*(1981)은 만성주혈흡충에서, Passwell *et al.*(1986)은 *Leishmania major*에서 대식세포에 의한 세포독성이 대식세포를 활성화시킬 때 사용된 림포카인의 양에 비례해서 일어나며 대식세포를 회색시킨 림포카인으로 처리하였을 때 회색의 정도에 따라 기생충을 적게 죽인다고 하였는데 이 실험에서는 1/5 및 1/20로 회색시킨 림포카인을 처리한 대식세포의 세포독성이 원액의 림포카인을 처리했을 때보다 감소되었으나 림포카인을 1/80로 회색시켰을 때 원액에 비해서는 감소하였으나 1/5 및 1/20 회색액에 비해 증가하였으므로 세포독성이 림포카인의 회색경도와 반드시 일치되지 않는 것이다. 그러나 림포카인의 회색경도가 더 낮아질 때 세포독성도 낮아질지에 대해서는 앞으로 연구되어야 한다.

참 고 문 헌

- Belosevic, M. and Faubert, G.M. (1986) Killing of *Giardia muris* trophozoites *in vitro* by spleen, mesenteric lymph node and peritoneal cells from susceptible and resistant mice. *Immunology*, **59**: 269-275.
- Bout, D.T., Joseph, M., David, J.K. and Capron, A.R. (1981) *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages. *J. Immunol.*, **27**(1):1-5.
- Diamond, L.S. (1968) Techniques for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae. *J. Parasitol.*, **54**: 1047-1056.
- Freund, M. and Pick, M. (1985) The mechanism of action of lymphokines VIII. Lymphokine-enhanced spontaneous hydrogen peroxide production by macrophages. *Immunology*, **54**:35-45.
- Hughes, H.P.A., Speer, C.A., Kyle, J.E. and Dubey, J.P. (1987) Activation of murine macrophages and a bovine monocyte cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, **55** (3):784-791.
- Kanwar, S.S., Walia, B.N.S., Ganguly, N.K. and Mahajan, R.C. (1987) The macrophages as an effector cell in *Giardia lamblia* infections. *Med. Microbiol. Immunol.*, **176**:83-88.
- Landolfo, S., Martinotti, M.G., Martinetto, P. and Fortni, G. (1980) Natural cell-mediated cytotoxicity against *Trichomonas vaginalis* in the mouse. *J. Immunol.*, **124**(2):508-514.
- Mantovani, A, Polentarutti, N., Peri, G., Martinotti, G. and Landolfo, S.(1981) Cytotoxicity of human peripheral blood monocytes against *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Exp. Immunol.*, **46**:391-396.
- Oliver, M., Bertrand, S. and Tanner, C.E. (1989) Killing of *Leishmania donovani* by activated liver macrophages from resistant and susceptible strains of mice. *Int. J. Parasit.*, **19**(4):377-383.
- Passwell, J.H., Shor, R., Gazit, E. and Shoham, J. (1986) The effect of ConA-induced lymphokines from the T-lymphocyte subpopulations on human monocyte leishmaniacidal capacity and H₂O₂ production. *Immunology*, **59**:245-250.
- Reed, S.G., Douglass, T.G. and Speer, C.A. (1982) Surface interactions between macrophages and *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,

31(4):723-729.
Roitt, I.M., Brostoff, J. and Male, D.K. (1989)
Immunology(2nd ed.). pp.9.8~9.10 & 17.4~17.6.
Gower Medical Publishing. London. New York.
신수재 · 류재숙 · 신명현 · 안명희 · 민득영 (1990) 질트
리코모나스에 대한 마우스의 세포매개성 면역반응에

관한 연구. 한양의대 학술지, 10(1):237-244.
Smith, P.D., Elson, C.O., Keister, D.B. and Nash,
T.E. (1982) Human host response to *Giardia*
lamblia I. Spontaneous killing by mononuclear
leukocytes *in vitro*. *J. Immunol.*, 128(3):1372-1376.

=Abstract=

**Cytotoxicity of resident and lymphokine-activated mouse peritoneal
macrophage against *Trichomonas vaginalis***

Jae-Sook Ryu, Myong-Hee Ahn and Duk-Young Min

*Department of Parasitology, College of Medicine, Hanyang University,
Seoul 133-791, Korea*

This study was aimed to observe the direct and lymphokine-activated cell mediated cytotoxic effects against *Trichomonas vaginalis* by mouse peritoneal macrophages. Cytotoxicity was measured as release of ³H-thymidine from prelabeled protozoa, and tested in U-bottom microtiter plates. A 0.1 ml suspension of labeled protozoa (2×10^5 /ml) was placed in each well, followed by 0.1 ml of a suspension containing increasing numbers of peritoneal cells. After a 24 hr incubation at 37°C, 0.1 ml of the supernatant was collected and counted in liquid scintillation counter.

Mouse peritoneal macrophages had appreciable level of spontaneous cytotoxicity against *T. vaginalis* at the effector to target cell ratios from 5 : 1 to 50 : 1. Treatment of macrophages with lymphokine, produced by PHA-stimulated spleen cells, increased the cytotoxicity in comparison with resident macrophages against *T. vaginalis*. The degree of macrophage activation for the killing was not dependent upon the lymphokine concentration. Peritoneal cells adherent to plastic displayed significant levels of cytotoxicity against *T. vaginalis*.

This study indicates that mouse peritoneal macrophages are spontaneously cytotoxic for *T. vaginalis* and lymphokine increases the cytotoxicity by activating macrophages to kill *T. vaginalis*.

[*Korean J. Parasit.*, 28(2):85-89, June 1990]