대부종콜포회지 제9권 제1호 1998
Vol. 9, No. 1, Mar., 1998

난소암 조직에서 Mycoplasma DNA 존재의 의의: PCR-ELISA 기법을 이용한 검출

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과학교실 · 이원임상검사센타 학술부*
김종혁 · 나준희 · 이명희* · 엄재영* · 김용만 · 김영탁 · 남주현 · 목정은

= Abstract =

Presence of Mycoplasma DNA in Ovarian Cancer Tissue: Detection by PCR-ELISA Technique

Jong-Hyeok Kim, Jun-Hee Na, Myung-Hee Lee,* Jae-Young Um,*
Yong-Man Kim, Young-Tak Kim, Joo-Hyun Nam, Jung-Eun Mok
Department of Obstetrics and Gynecology College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center, Seoul, Korea
*Research Department, Ewon Reference Laboratory, Seoul, Korea**

Mycoplasmas, cell wall-less bacteria of class Mollicutes, are among the smallest self-replicating organisms known and reside ubiquitously at the cell membrane or internalized into the cell. They mimic viruses in many of their activities and further they may have oncogenic activity. The oncogenic potential of mycoplasmas was only recently realized when they were shown to cause chromosomal changes and in vitro cell transformations through gradual progressive chromosomal loss and translocations. The association between these organisms and human cancers has been evaluated and actually mycoplasmas were detected in 50% of gastric cancers. In gynecologic cancer, one study demonstrated a 59.3% prevalence rate of mycoplasmas in malignant ovarian tumors but the explanations for the association between the organisms and ovarian cancer might be somewhat confusing, at least in part, due to absence of normal control. The present objective was to determine the presence of mycoplasma DNA in ovarian cancer tissues and normal ovary in Korea.

Fresh frozen tissue samples stored at −72 ℃ were used for mycoplasma DNA assay. The study materials comprised twenty-nine human ovarian cancer tissues and ten normal ovarian tissues. After extraction of DNA, the combined PCR-ELISA(polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay) procedure was performed with consensus primers targeting for 15 species of mycoplasmas and acholeplasmas together with negative and positive controls, which was known as very sensitive method.

The results showed mycoplasma DNA were present in none of normal ovarian tissue and in 13.8%(4 of 29) of the ovarian cancer specimens, which is much lower than that of the previousstudy. Three positive cases showed very strong reactivities, but there was no significant

correlation between presence of mycoplasma DNA and the clinicopathological characteristics of the patients.

These results suggest that mycoplasma can not be the contributor in the mechanism of carcinogenesis in the most of ovarian cancers in Korea, but the association between mycoplasma and ovarian cancer is worth to be investigated.

Keywords: Mycoplasma DNA, Ovarian cancer

Ⅰ. 서 론

바이러스에 의한 변화 등을 포함한 다양한 유전적 변형(genetic alteration)이 난소암을 포함한 여러 암의 발생 과정에 관여한다는 것은 널리 알려진 사실이다. 그러나 바이러스뿐만 아니라 박테리아도 특정 암의 발생에 관여한다는 가설이 일부에서 제기되고 있는 바 Helicobacter pylori에 의한 감염이 위암의 발생과 관련이 있으리라는 것[1-8]과 위암의 수술 조직에서 streptococcus의 DNA가 발견되는 사실[9] 등이 그것이라 할 수 있다.

Mycoplasma는 다형의 원핵성(prokaryotic) 생물로서 그 크기는 직경이 0.2 0.3 ㎛ 정도이며 세포벽이 없고 숙주의 세포막이나 세포내 어디에나 존재한다.[10-14] 각각의 mycoplasma 균은 숙주 세포에 600 2500 kb의 외래 DNA를 추가하게 되며[15] 이들이 세포내에서 생존할 수 있는 것은 이들이 lysosomal enzyme에 저항이 있어 분해되지 않기 때문으로 알려져 있다.[16] 병원균으로서의 mycoplasma는 폐렴, 유산 후 열(postabortal fever), 골반내 감염(pelvic inflammatory disease), 신우신염(pyelonephritis), 요도염, 주산기 사망, 관절염, 자연 유산 및 불임 등과 관련이 있으며[10,11,17,18] HIV 질환을 촉매하는 조인자(cofactor)로서 작용한다고 한다.[15] 한편 이들은 숙주의 면역체계에 영향을 줄 뿐 아니라,[19-22] 암 억제 작용에 관여하는 유전 부위(genetic region)에의 염색체 상실을 초래함으로써, 혹은 염색체의 Robertsonian translocation을 유발하여 종양 유전자(oncogene)를 활성화시켜 암화 과정에 관여한다는 가설[23]들이 제기되고 있다.

Mycoplasma를 검출하는 방법으로는 배양(culture)이나 전자 현미경, cDNA ribosomal probe를 이용하는 방법과 6-methylpurine deoxyriboside biochemical 기법 등 여러 가지가 있으나 이들 모두가 민감도 면에 있어서 만족할 만한 수준이 못 된다. 따라서 민감도를 높이기 위하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 적용한 방법들이 도입되었으며,[24-26] 최근에는 PCR과 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법을 결합한 방법이 mycoplasma DNA의 검출에 아주 유용한 것으로 알려지게 되었다.[27]

저자 등은 수술 후 동결, 보존되었던 정상 난소 조직 및 난소암 조직에서 PCR-ELISA 기법을 이용하여 mycoplasma DNA의 존재를 확인하여 그 빈도를 비교함으로써 우리 나라의 경우에 난소암이 mycoplasma의 감염과 관련이 있는지 알아보고자 본 연구를 계획하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1997년 3월부터 1998년 2월까지 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과학교실에서 수술을 시행하여 악성 난소 종양으로 진단된 환자 29명에서 얻어진 원발부위 암조직과 10명에서 얻어진 정상 난소 조직을 대상으로 실험을 하였다.

2. 연구 방법

① DNA 추출

수술 후 액화 질소로 급속 냉동시킨 난소암 조직(N=29) 및 정상 난소 조직(N=10)을 분쇄기(Homogenizer)로 분쇄한 후 분쇄된 조직을 각각의 무균성의 압열-멸균된(autoclaved) 미세 원심분리용(microcentrifuge) tube에 담았다. 무균 환경을 항상 유지하였으며 교차 오염(cross-contamination)을 방지하기 위하여 분쇄기의 칼날(blade)은 서로 다른 sample에 사용할 때마다 알코올로 닦아주었다. 각각의 tube에 소화 완충액(digestion buffer)을 담고 56 ℃에서 밤새 배양

(incubation)하였다. 소화 완충액은 0.5% Tween 20, 50 mM Tris(pH 8.5), 1mM EDTA 그리고 200 ㎍/ml proteinase K(Sigma Chemical Co. St. Lous. MO)로 구성되어 있는 것을 사용하였다. 소화 과정이 끝난 후 열을 가하여 proteinase K를 불활성화시켰으며 tube는 동결된 상태로 보관하였다. 이때 proteinase K에 의해 소화된(digested) sample에서 DNA만을 순수하게 얻기 위해 Sephadex G-50 column(Paharmacia Biotech)을 통과 시켰으며 이러한 순수한(purified) DNA 10㎕를 PCR에 사용하였다.

② PCR-ELISA 법

추출된 DNA가 든 각각의 tube에서 10 ㎕의 부분 표본을 취하여 실험용 tube에 넣고, 여기에 consensus primer가 함유된 PCR용 혼합 시약(Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis. IN) 25 ㎕, 15 ㎕의 Milli-Q water를 첨가하고 25 ㎕의 mineral oil로 덮어주었다. 실험에 있어서 10 ㎕의 Milli-Q water만을 포함시킨 sample을 음성 대조군(negative control)으로 하였으며, 여기에 상품화된 mycoplasma DNA 10 ㎕를 포함시킨 sample을 양성 대조군(positive control)으로 하였다.

PCR 증폭 전에 각각의 tube에 담긴 DNA를 95 ℃에서 5분간 변성(denaturation)시켰다. PCR 기기에서의 cycling parameter는 40 step-cycles로 하였으며 94 ℃에서 30 초간 denaturation, 62 ℃에서 30초간 annealing, 72 ℃에서 1분간 extension 그리고 마지막 extension 과정은 72 ℃에서 10분간으로 하였다. 증폭된 산물(PCR products)을 전기영동(electrophoresis)을 통해 확인한 결과, 양성 대조군과 4개의 sample에서 약 700bp의 산물을 확인할 수 있었는데 이는 나중의 PCR-ELISA method에 의해 양성으로 판독된 sample과 일치하였다.

증폭된 각각의 sample에서 10 ㎕를 취하고 여기에 40 ㎕의 변성 reagent를 첨가하여 실온에서 10분간 배양한 후 450 ㎕의 hybridization reagent를 각각의 tube에 첨가하였다. 여기에서 200 ㎕를 취하여 streptavidin으로 피막 처리된 plate에 첨가하여 덮개를 덮은 후 37 ℃에서 3시간 동안 진동기 위에서(300 rpm) 배양하였다. 이후 이를 250 ㎕의 세척 완충액으로 3회 세척한 후 200 ㎕의 Anti-DIG-POD(Fab fragments of a polyclonal antibody to digoxigenin conjugated to peroxidase)를 첨가하였다. 각 plate에 자가 접착 덮개를 덮고 실온에서 30분간 진동기위에서 배양한 후 다시 250 ㎕의 세척 완충액으로 5회 세척하였다. 100 ㎕의 TMB 기질 용액(substrate solution)을 첨가하고 실온에서 20분간 배양한 후 100 ㎕의 정지 용액(stop solution)을 첨가하였다. 흡수율(absorbance)은 450 nm에서 측정하였으며 이때의 reference wavelength는 690 nm로 정하였다.

③ Mycoplasma DNA 존재 여부의 판독

본 실험에서 음성 대조군의 흡수율(absorbance)은 0.268, 양성 대조군의 흡수율은 2.699이었으며 음성 대조군과 0.2 이상의 흡수율 차이를 보이는 경우를 양성으로 판정하였다. 음성 대조군의 흡수율을 0, 양성 대조군의 흡수율을 보이는 경우를 5+로 하여 1+부터 4+의 양성도를 규정하였다.

Ⅲ. 결 과

본 연구에 포함된 난소암 환자들의 임상적 특징을 요약하면 Table 1과 같다. 즉, 대상 환자의 연령은 21세에서 74세까지 이었으며(mean±S.D.; 50.9±14.3) 평균 출산력은 2.6(±1.5)이었다. 난소암의 조직학적 유형에는 장액성 선암이 13예(44.8%), 경계성암(borderline malignancy) 1예를 포함한 점액성 선암이 6예(20.7%)로 다수를 차지하였고, 이외에 자궁내막양 암, 명세포암, 미분화암 등이 있었으며 악성 혼합성 뮐러리안 종양(malignant mixed mullerian tumor) 1예가 포함되어 있었다. 수술 전 시행한 혈청 CA 125 치는 6.6 5660 U/ml까지로 다양하였다(Table 1). 수술 전 항암화학요법을 시행 받은 2예를 제외한 모든 환자들이 일차적으로 종양 축소술을 시행한 후 항암화학요법을 받았다. 환자들의 FIGO 병기는 I 기 6예, II 기 4예, III 기 12예 및 IV 기 5예이었고 수술 전 항암화학요법을 시행하여 병기를 정확히 알 수 없는 경우가 2예로서 IIIC기가 10예(34.5%)로 가장 많았다(Table 1).

PCR-ELISA 기법에 의하여 mycoplasma DNA가 존재하는 것으로 확인된 경우는 29예의 난소암 조직 중 4예(13.8%)이었으며(Fig. 1), 10예의 정상 난소 조직에서 mycoplasma DNA의 존재가 확인된 경우는 없었으나 mycoplasma DNA의 존재율은 난소암 조직과 정상 난소 조직에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다($p>0.05$). Mycoplasma DNA가 존재하는 것으로 확인된 4예를 보면 양성도(intensity)는 1+, 3+, 4+ 및 5+가 각각 1예씩이었고 조직학적으로 2

Table 1. Clinical characteristics of 29 ovarian cancer patients

Patient	Age	Para	Stage	CA125 (U/ml)	Pathologic Type	Chemotherapy	F/U	PCR-ELISA (Abdorbance)
1	23	0	ⅠA	27.6	dysgerminoma	NO	7(NED)	0.235
2	39	2	ⅢC	1260	serous adenoca	CC#6, TC#11	20(PER)	0.235
3	56	2	Ⅳ	1480	serous adenoca	CC#1	2(DIED)	0.242
4	59	3	ⅠC	78.9	serous adenoca	CEC#3	1(NED)	0.242
5	26	0	ⅠA	869	adenoca	CEC#5	2(NED)	0.226
6	58	3	ⅢC	58	mucinous adenoca	IPP#1, CC#2, CEC#2	17(NED)	0.237
7	67	5	Ⅳ	1190	serous adenoca	TC#5	5(PER)	0.298
8	52	2	ⅢC	5660	endometrioid adenoca	CC#4, CEC#3	9(PER/DIED)	0.235
9	74	3	ⅠA	6.6	Brenner tumor	NO	1(NED)	0.232
10	73	5	ⅢB	26.4	mucinous adenocar	CC#5	5(NED)	0.233
11	50	3	ⅢC	500	serous adenoca	CC#6, TC#9, T#6, TV#3	47(PER)	0.484(+)
12	72	2	ⅢC	89.5	mutinous adenoca	NO	1(F/U loss)	1.037(4+)
13	54	4	Ⅳ	36.4	metastatic adenoca	PF#1	2(NED)	0.224
14	55	4	Ⅳ	3830	metastatic adenoca	PV#1	2(DIED)	0.231
15	41	2	ⅢC	1007	serous adenoca	CEC#9	9(NED)	0.283
16	44	2	ⅢA	302	serous adenoca	CC#6	45(NED)	0.296
17	53	2	Ⅹ	1010	serous adenoca	CAP#4, CC#9, TP#5, TC#5	17(END)/11(PER)	0.242
18	48	3	ⅢC	916	serous adenocal	CC#8	8(NED)	2.831(5+)
19	41	2	ⅡC	1955	MMMT	CAC#6, TP#6, TC#1	22(NED)/8(REC, DIED)	0.257
20	21	1	ⅠB	349	mucinous adenoca	CC#6	42(NED)	0.311
21	63	0	ⅡC	9070	serous adenoca	CC#6, TC#4	47(NED)	0.251
22	44	5	ⅢC	125	mucinous adenoca	TP#4	10(PER)	0.225
23	58	3	ⅢC	241	mucinous adenoca(B)	CC#9, CEC#3	39(NED)	0.995(3+)
24	53	3	ⅢC	123	serous adenoca	CEC#6	16(NED)	0.253
25	51	3	ⅡC	186	endometrioid adenoca	CEC#3	3(NED)	0.234
26	69	6	Ⅹ	799	serous adenoca	CC#2	14(NED)	0.240
27	30	1	Ⅳ	101	clear cell ca	CC#2, TP#2	4(PER/DIED)	0.238
28	42	2	ⅠA	20	granulosa cell ca	NO	30(NED)	0.215
29	59	3	ⅡC	71.4	serous adenoca	CC#3	1(NED)	0.264

F/U: follow up, PCR-ELISA: presence of Mycoplasma DNA by PCR-ELISA

serous adenoca: serous cystadenocarcinoma, MMMT: malignant mixed mullerian tumor, mucinous adenoca: mucinous cystadenocarcinoma, (B): boredrline tumor, endometrioid adenocaca: endometrioid cystadenocarcinoma, CEC: cyclophosphamide+epirubicin+carboplatin, CAP: cyclophosphamide+adriamycin+cisplatin, CC: cyclophosphamide+cisplatin, TP: taxol+cisplatin, TC: taxol+carboplatin, PV: cisplatin+VP-16, CAC: cyclophosphamide+adriamycin+carboplatin, TV: taxol+VP-16, T: taxol, PER: persistence NED: no evidence of disease

예가 장액성 선암이었으며 1예는 점액성 선암, 1예는 경계성 점액성 선종이었다. FIGO 병기는 모두 IIIC 기이었고 혈청 CA 125 치는 500, 89.5, 916 및 241 U/ml이었다. 즉 임상적으로는 mycoplasma DNA가 존재하는 난소암 환자와 그렇지 않은 환자 사이에 유의한 차이는 없었다.

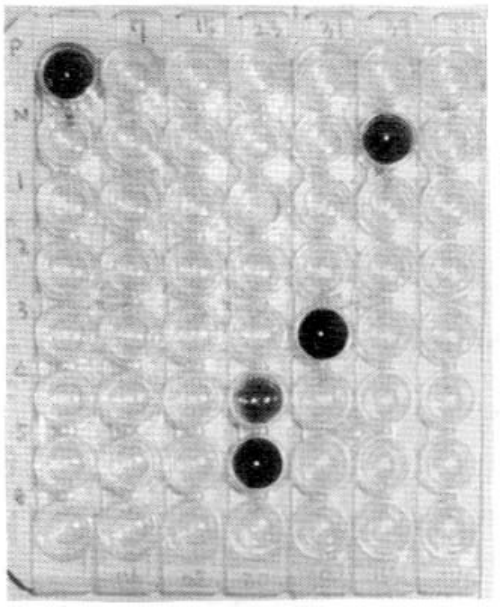

Fig. 1. Final result of PCR-ELISA technique for mycoplasma DNA in malignant ovarian tumor tissues.

Ⅳ. 고 찰

1965년 Fogh 등[28] 및 Paton 등[29]은 mycoplasma에 감염된 인간 세포에서 염색체의 변화가 있음을 보고하였으며 1966년 MacPherson과 Russel[30]은 baby hamster kidney(BHK) 세포의 배양 중에 mycoplasma의 감염에 따라 즉각적으로 세포의 형태적 변형(morphologic transformation)을 초래한다고 하였으나 BHK 세포는 자연(spontaneous) 변형률이 높은 세포이기 때문에 별다른 관심을 끌지 못하였다. 20년 후 Katoni 등[31]은 mycoplasma의 일종(strain)인 Spiroplasma mirum이 NIH-3T3 및 CV-1 세포주에서 악성 변형(malignant transformation)을 초래한다고 발표하기도 하였지만 대부분의 학자들은 mycoplasma가 단지 세포의 변형과 유사한 artifact를 나타낼 뿐이라고 생각하였다.[32] 비록 mycoplasma가 바이러스와 같이 포유동물 세포를 종양 세포로 변형시킬 수 있다고 믿었던 학자는 거의 없었지만 이러한 가능성이 가지는 엄청난 임상적 의미로 인하여 조금씩 연구가 되었고 인간의 악성 종양, 적어도 종양과 유사한 병변의 발생과 mycoplasma의 감염과 어떠한 관련이 있을 것이라는 임상적 관찰이 보고되었다.[33-37]

오래 전부터 별다른 병원성(virulence)이 없는 미생물이라도 만성적으로 지속적인 감염이 있다보면 감염된 포유동물 세포의 생물학적 변화를 일으킬 수 있다는 믿음이 있어왔는데 세포벽이 없는 mycoplasma는 포유동물 세포와 오랜 기간 긴밀한 상호 작용을 하면서 별다른 변화 없이 성장하고 때로는 세포의 표면에서 세포의 성장 촉진에 관계되는 신호를 세포의 핵에 전달할 수 있음이 밝혀지게 되었다.[38-39]

Mycoplasma 자체가 종양을 유발할 수 있음이 증명된 것은 비교적 최근의 일로서, 쥐의 배아 세포를 통해 수립한 C3H 세포주는 자연 변형을 일으키는 일이 거의 없기 때문에 잠재적 발암 인자의 검증에 있어서 표준으로서 이용되는데, Tsai 등[23]은 C3H 세포주에 Mycoplasma fermentans와 Mycoplasma penetrans를 감염시켜 mycoplasma의 종양 유발능을 증명하게 되었다. 그들은 mycoplasma에 감염된 세포가 즉각적으로 변형을 나타내는 것은 아니며 감염 후 11주 이내에는 세포 변형과 관련된 특성이 생기더라도 항생제 치료로써 배지에서 mycoplasma를 제거하면 이러한 성질이 소실될 수 있으나 18주 이상의 지속적인 감염이 있는 경우 상기의 치료를 하더라도 세포 변형이 없어지지 않으며, 그 정체가 확실하지는 않지만, 모종의 염색체 이상을 초래할 것이라고 보고하였다. 즉, mycoplasma에 의한 세포의 계속적 형태 변형을 위해서는 일정한 감염 기간이 필요하며 이 기간이 지나면 mycoplasma가 없더라도 영구적 세포 변형이 지속되는 것을 증명한 것인데, 이러한 특징은 특정 발암 인자가 유전자의 변이로 대표되는 염색체의 이상을 초래하고 나면 그 인자가 없어져도 염색체의 이상은 지속된다는 사실을 상기할 때, mycoplasma에 의한 감염은 단순히 배양 중에 이미 존재하는 악성 C3H 세포를 골라내는 역할이 아니라 그 자체가 세포의 암화에 관계하는 기전이 있을 것이며 그것은 인간 세포에서의 암 발생과 유사한 점이 많다고 하였다.

Mycoplasma 감염에 의한 세포의 암화 기전을 분자생물학적으로 규명하기 위한 연구로서 Zhang 등[40]의 연구가 대표적이다. 그들은 Tsai 등[23]의 보고에 근거하여 Mycoplasma fermentans와 Mycoplasma penetrans에 의한 감염 기간이 18주 이상되어 변형된 C3H 세포주에서 c-myc, N-myc, H-ras, N-ras, src 및 p53 유전자에 대한 분석을 실시하였는데, 이들 유전

자에서 과증폭(overamplification)이나 재배치(rearrangement) 등의 DNA 수준의 변화를 관찰할 수는 없었으나 이들 유전자의 전사산물인 mRNA를 분석한 결과 H-ras 및 c-myc 유전자의 mRNA가 고농도로 존재함이 증명되었고 이러한 세포들은 동물에 이식할 경우 종양 형성이 가능하다는 것을 밝혀낸 바 있다. 그들은 c-myc mRNA의 유도(induction)는 전사 인자(transcriptional factor)로서 작용하는 c-fos와 c-jun 원형-종양유전자의 유도 후에 일어난다는 사실[41-42]에 근거하여 mycoplasma에 의해 변형된 C3H 세포에서 혈청 자극을 주어 c-fos와 c-jun mRNA의 상승을 관찰하였다. 한편 mycoplasma는 여러 가지 발암 바이러스(oncogenic viruses)와는 달리 자신의 DNA를 포유류 숙주의 genome으로 내재화(integration)하지는 않는 것으로 보고되어 있다.[43] 따라서 현재까지의 연구 결과를 종합한다면 mycoplasma의 감염은 세포의 표면에서 일종의 신호를 방출하며 이는 c-fos, c-jun과 같은 원형-종양유전자의 활성화를 초래하고 이들은 다시 c-myc mRNA의 발현을 유도하며 다시 H-ras mRNA를 유도하고 세포에서의 DNA 복제를 촉발함으로써 세포의 변형에 관여할 것이라는 mycoplasma에 의한 세포 변형 기전의 가설을 세울 수 있다.

한편 HIV 감염 환자를 대상으로 한 연구에서는 mycoplasma가 핵산 분해 효소(nuclease), 반응성 산소기(reactive oxygen radical) 또는 초항원(superantigen) 등을 분비하여 세포의 복제에 관계할 것이라는 보고도 있다.[15,44,45]

중합효소 연쇄반응(PCR)이 개발되기 이전의 보고에 의하면 농양이 없는 경우 정상 난소나 난관에서는 mycoplasma가 검출되지 않으며[10,46] 자궁 내막에서도 7%정도에서만 검사에 양성을 보인다고 한다.[47] 본 연구에서는 현재까지 개발된 방법 중 가장 민감도가 높은 것으로 알려진 PCR-ELISA 기법[27]을 적용하였는데, 이 방법은 1 20 copy의 mycoplasma DNA도 검출할 수 있는 민감도를 보인다고 하며 본 연구에서 이용한 consensus primer는 15종 이상의 mycoplasma 및 acholeplasma DNA를 검출할 수 있다. 실제로 미국 Loma Linda 대학의 Chan 등[48]은 본 연구와 같은 PCR-ELISA 기법으로 파라핀에 포매된 난소암 조직에서 mycoplasma DNA의 존재를 확인한 결과 전체 대상 환자의 59.3%에서 양성임을 보고하면서 mycoplasma의 종양 유발 가능성을 감안할 때 난소암과 mycoplasma 감염과는 서로 상관 관계가 있을 수 있음을 제시하였다. 그들은 mycoplasma가 난소암을 일으킨다는 기전을 제시하지는 못하였고 단순히 조직에서 그 DNA가 흔히 검출된다고 하여 원인 인자라고 볼 수는 없지만, 본 고찰의 앞부분에서 제시한 가설, 즉 mycoplasma에 의한 암화 기전에 H-ras 및 c-myc 유전자가 관계한다는 점과 실제로 난소암을 대상으로 한 많은 연구에서 이들 유전자의 과증폭(overamplification)이나 전사물(transcriptional product)의 과다 생산 등에 의한 과발현(overexpression)이 보고되고 있다는 점[49-54]을 생각할 때, mycoplasma 감염과 난소암의 발생은 무관하지 않으리라고 추정할 수 있다. 따라서 아직 밝혀져야 할 과제가 많기는 하지만 mycoplasma가 난소암을 유발하는 원인 인자의 하나가 된다면 그들의 연구는 치명적인 난소암 예방에 큰 역할을 하게 됨이 틀림없다. 본 연구도 이러한 견지에서 우리 나라의 난소암의 경우 mycoplasma 감염과의 연관도를 알아보고자 하였다. 그러나 같은 PCR-ELISA 기법을 적용하였고 오히려 파라핀 포매 조직보다 DNA의 상태가 양호하리라고 예상되는[55-57] 신선동결 조직을 이용하였음에도 불구하고 단지 13.8%에서만 mycoplasma DNA의 존재가 확인됨으로서 Chan 등[48]의 보고보다 현저히 낮은 양성률을 보임을 확인하였다. 이러한 이유로 가능성이 있는 것은 첫째, 우리 나라에서의 mycoplasma 감염의 빈도가 서양의 그것보다 현저히 낮을 것이라는 예측이 이유가 될 수 있겠다. 이러한 경우, 만일 위의 가설대로 mycoplasma가 난소암의 원인인자가 된다면 우리 나라에서 서양보다 난소암의 빈도가 비교적 낮은 이유의 하나가 mycoplasma의 감염이 적기 때문일 것이라는 추정도 가능하다. 그러나 외국의 경우에도 mycoplasma에 의한 골반내염의 빈도가 명확하지 않고[58] 아직 우리 나라 여성에서 생식기의 mycoplasma 감염의 빈도가 보고된 바가 없어 이를 증명할 수는 없다. 다음으로는 전술한 바와 같이 mycoplasma가 감염되어도 그 DNA가 숙주의 genomic DNA에 삽입되지 않고 세포 표면에만 존재한다고 하면 이미 전술한 가설의 기전에 의하여 암이 유발되어도 이후에 항생제 치료를 하는 경우 암은 계속 지속되더라도 mycoplasma의 감염은 치료가 될 수 있다는 것이므로 암조직에서 mycoplasma DNA는 검출되지 않을 수 있다. 따라서 우리 나라와 같이 항생제의 사용이 비교적 많은 나라에서는 이러한 가정도 할 수 있으리라 생각된다. 물론 지금까지 밝혀진 사실만으로 myco-

plasma의 감염이 난소암의 원인 인자 중의 하나라는 명확한 증거는 없다. 또한 mycoplasma DNA가 존재하는 난소암과 그렇지 않은 난소암 환자 사이에 임상-병리학적 특성의 차이를 분석한 보고는 없으며 본 연구에서는 mycoplasma DNA가 존재하는 난소암 증례가 많지 않아서인지 유의한 차이점을 볼 수는 없었다. 향후 mycoplasma DNA가 존재하는 난소암 조직에서 특이한 분자생물학적 특성을 확인하여 보는 연구를 시도할 수 있겠으나 이러한 시도는 mycoplasma 감염과 난소암 사이에 원인-결과적인 관계가 in vitro에서 상당 부분 정립된 후에나 의미를 가질 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자 등은 난소암이 mycoplasma의 감염과 관련이 있는지 알아보고자 수술 후 동결, 보존되었던 정상 난소 조직 및 난소암 조직에서 PCR-ELISA 기법을 이용하여 mycoplasma DNA의 존재를 확인한 결과, 29예의 환자에서 얻어진 난소암 조직중 4예(13.8%)에서만 mycoplasma DNA의 존재가 확인되었으며 10예의 정상 난소 조직은 양성 반응을 보인 경우가 없었으므로 난소암 조직과 정상 난소 조직 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 mycoplasma DNA가 존재하는 난소암과 그렇지 않은 난소암 환자 사이에 임상-병리학적 특성의 유의한 차이를 볼 수 없었다. 본 연구의 결과로 미루어 우리 나라에서는 mycoplasma의 감염과 난소암은 별다른 관련성이 없는 것으로 보이나 높은 관련성을 시사하는 외국의 보고들을 감안할 때, 이것은 국내의 mycoplasma의 감염율이나 그 치료면에서 외국과 차이가 있을 수 있다는 점으로 해석할 수도 있겠다. 향후 국내에서 mycoplasma DNA가 존재하는 난소암 조직에서의 추가 연구는 mycoplasma 감염과 난소암 사이에 원인-결과적인 관계가 상당 부분 정립된 후에나 의미를 가질 것으로 사료된다.

- References -

1. Correa P, Fox J, Fontham E et al: Helicobactor pylori and gastric carcinoma. Serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risk. Cancer 1990;66:2569-74.
2. Forman D, Sitas F, Newell D et al: Geographic association of Helicobactor pylori antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. Int J Cancer 1990;46:608-11.
3. Forman D: Helicobactor pylori infection: a novel risk factor in the etiology of gastric cancer(editorial). J Natl Cancer Inst 1991;83:1702-3.
4. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH et al: Helicobactor pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 1991;325:1132-6.
5. Parsonnet J, Friedmann GD, Vandersteen DP et al: Helicobactor pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-31.
6. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A et al: Gastric adenocarcinoma and Helicobactor pylori infection. J Natl Cancer Inst 1991;83:1734-9.
7. Sipponen P, Kosunen TU, Valle J et al: Helicobactor pylori infection and chronic gastritis in gastric cancer. J Clin Pathol 1992;45:319-23.
8. Fukuda H, Saito D, Hayashi S et al: Helicobactor pylori infection, serum pepsinogen level and gastric cancer: a case-control study in Japan. Jpn J Cancer Res 1995;86:64-71.
9. Sasaki H, Igaki H, Ishizuka T et al: Presence of Streptococcus DNA in surgical specimens of gastric cancer. Jpn J Cancer Res 1995;86:791-4.
10. Cassell GH, Cole BC: Mycoplasmas as agents of human disease. N Engl J Med 1981;304:80-9.
11. Friberg J: Mycoplasmas and ureaplasmas in reproductive failure. Contemp Obstet Gynecol 1983;28: 271-86.
12. Busolo F, Zanchetta R, Bertoloni G: Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. Fertil. Steril. 1984;42:412-7.
13. Dallo SF, Su CJ, Horton JR et al: Identification of PI gene domain containing epitope(S) mediating Mycoplasma pneumoniae cytoadherence. J Exp Med 1988;167:718-23.
14. Taylor-Robinson D, Davies HA, Sarathechandra P et al: Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. Int J Exp Pathol 1991;72:

705-14.
15. Blanchard A, Montagnier L: AIDS-associated mycoplasmas. Annu Rev Microbiol 1994;48:687-712.
16. Moulder JW: Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol Rev 1985;49:298-337.
17. Cole BC, Cassell GH: Mycoplasma infections as models of chronic joint inflammation. Arthritis Rheam 1979;22:1375-81.
18. Taylor-Robinson D, McCormack W: The genital mycoplasmas. N Engl J Med 1980;302:1003-10.
19. Cole BC, Atkin CL: The mycoplasma arthritidis T-cell mitogen, MAM-a model superantigen. Immunol Today 1991;12:271-6.
20. Stuart PM, Cassel GH, Woodward JG: Induction of class II MHC antigen expression in macrophages by Mycoplasma species. J Immunol 1989;142:3392-9.
21. Takema M, Oka S, Uno K et al: Macrophage-activating factor extracted from mycoplasmas. Cancer Immunol Immunother 1991;33:39-44.
22. Tsunekawa H, Takagi E, Kishimoto H et al: Depressed cellular immunity in mycoplasma pnuemoniae pneumonia. Eur J Respir Dis 1987;70:293-9.
23. Tsai S, Wear DJ, Shih JWK et al: Mycoplasmas and oncogenesis: Persistent infection and multistage malignant transformation. Proc Natl. Acad Sci USA 1995;92:10197-201.
24. Bernet C, Garret M, DeBarbeyrac B et al: Detection of Mycoplasma pneumonia by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989;27:2492-6.
25. Teng K, Li M, Yu W et al: Comparison of PCR with culture for detection of Ureaplasma urogenital infections. J Clin Microbiol 1994;32:2232-4.
26. Razin S: DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Mol Cell Probes 1994;8:497-511.
27. Kempf I, Gesbert F, Guittet M et al: Mycoplasma gallisepticum infection in drug-treated chickens: Comparison of diagnosis methods including polymerase chain reaction. Zentralbl Veterinarmed B 1994;41: 597-602.
28. Fogh J, Fogh H: chromosome changes in PPLO-infected human amnion cells. Proc Soc Exp Biol Med 1965;119:233-8.
29. Paton GR, Jacobs JP, Perkins FP: Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with mycoplasma. Nature 1965;207:43-5.
30. MacPherson I, Russell W: Transformations in hamster cells mediated by mycoplasma. Nature 1966;210: 1343-5.
31. Kotani H, Phillips D, McGarrity J: Malignant transformation of NIH-3T3 and CV-1 cells by a helical mycoplasma, Spiroplasma mirum, strain SMCA. In Vitro Cell Dev Biol 1986;22:756-62.
32. McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J: Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: A Review. In Vitro 1984;20:1-18.
33. Hayflick L, Koprowski H: Direct agar isolation of mycoplasmas from human leukaemic bone marrow. Nature 1965;205:713-4.
34. Boden WE, Carleton RA, Khan AH et al: Left ventricular hemangioma masquerading as mycoplasma pericarditis. Am Heart J 1983;106:771-4.
35. Abo W, Sawada Y, Ogawa S et al: Mesothelial cell proliferation and localized pleural pseudotumour associated with Mycoplasma pneumoniae infection. Eur J Pediatr 1988;148:62-3.
36. Park SH, Choe GY, Kim CW, Chi JG, Sung SH. Inflammatory pseudotumor of the lung in a child with Mycoplasma pneumonia, J Korean Med Sci 1990;5:213-23.
37. Jansson E, Wegelius K, Hakkarainen K et al: Mycoplasmas and leukaemia. Res Virol 1991;142:333.
38. Weinberg RA: The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. Science 1985;230:770-6.
39. Karp Broder S: New directions in molecular medicine. Cancer Res 1994;54:653-655.
40. Zhang B, Shih JW, Wear DJ et al: High level expression of H-ras and c-myc oncogenes in mycoplasma-mediated malignant cell transformation. Proc Soc Exp Biol Med 1997;214:359-66.
41. Lau LF, Nathans D: Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. Proc Natl Acad USA 1987;84:1182-6.
42. Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B et al: Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. Mol Cell Biol 1993;13:841-51.
43. Zhang B, Shih JW, Ditty S et al: Absence of myco-

plasmal gene in the transformed mammalian cells induced by chronic persistent infection of mycoplasmas. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society of Microbiology (New Orleans). Washington, DC: Amerian Society of Microbiology 1996;p284.

44. Meier B, and Habermehl GG: Evidence for superoxide dismutase and catalase in mullicutes and release of reactive oxygen species. Arch Biochem Biophys 1990;277:74-9.
45. Minion FC, Jarvill-Taylor KJ, Billings DE et al: Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. J Bacteriol 1993;175:7842-7.
46. Mardh PA, Westrom L: Tubal and cervical cutures in acute salpingitis with special reference to Mycoplasma hominis and T-strain mycoplasmas. Br J Vener Dis 1970;46:179-86.
47. Stray-Pedersen B, Eng J, Reikvam TM: Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure. Am J. Obstet. Gynecol 1978;130:307-11.
48. Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH et al: Prevalence of Mycoplasma Conserved DNA in Malignant Ovarian Cancer Detected Using Sensitive PCR-ELISA. Gynecol Oncol Radiology 1996;63:258-60.
49. Viel A, De Pascale L, Toffoli G, et al: Frequent occurrence of Ha-ras allelic deletion in human ovarian adenocarcinomas. Tumori 1991;77:16-20.
50. Chien CH, Wang FF, Hamilton TC: Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by estrogen in human ovarian cancer cells. Mol Cell Endocrinol 1994;99:11-9.
51. Van Dam PA, Vergote IB, Lowe DG et al: Expression of c-erbB-2, c-myc, and c-ras oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma. J Clin Pathol 1994;47:914-9.
52. Bian M, Fan Q, Huang S: Amplification of proto-oncogenes C-myc, C-N-ras, C-Ki-ras, C-erbB2 in ovarian carcinoma. ChungHua Fu Chan Ko Tsa Chih 1995;30:406-9.
53. Bian M, Fan Q, Huang S et al: Amplifications of proto-oncogenes in ovarian carcinoma. Chin Med J 1995;108: 844-8.
54. Zachos G, Varras M, Koffa M et al: Glucocorticoid and estrogen receptors have elevated activity in human endometrial and ovarian tumors as compared to the adjacent normal tissues and recognize sequence elements of the H-ras proto-oncogene. Jpn J Cancer Res 1996;87:916-22.
55. Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G et al: Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. J Clin Pathol 1991;44:115-8.
56. Greer CE, Peterson SL, Diviat NB et al: PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. Am J Clin Pathol 1991; 95:117-24.
57. Honma M, Ohara Y, Murayama H et al: Effects of fixation and varing target length on the sensitivity of polymerase chain reaction for the detection of human T-cell leukemia virus type I proviral DNA in formalin- fixed tissue sections. J Clin Microbiol 1993;31:1799-803.
58. Taylor-Robinson D: Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update. Clin Infect Dis 1996;23:671-82.