

질트리코모나스의 병원성과 단백 분해 효소와의 상관성

沈榮基¹⁾, 朴慶姬¹⁾, 鄭坪林²⁾, 任敬一^{1)*}

延世大學校 醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶醫學研究所¹⁾, 仁荷大學校 醫科大學 寄生蟲學教室²⁾

국문초록: 이 연구는 환자로부터 분리하여 무균 배양된 10개의 질트리코모나스 분리주에 대하여 병원성 여부를 판정하고 단백분해효소 관련 여부를 알아보려 시도된 것이다. 질트리코모나스 분리주들은 마우스 피내 접종 실험을 통한 병원성 판정에서 약 병원성 주, 중등도 병원성 주 및 강 병원성 주 등 3개 그룹으로 나눌 수 있었으며 증성 단백분해효소 및 산성 단백분해효소 활성도는 질트리코모나스 추출물 및 그 배양액에서 약 병원성 주에 비해 강 병원성 주의 활성도가 높게 나타나 피하농양 크기에 따른 병원성과 상기 단백분해효소의 비활성도(specific activity) 사이에 상관관계가 있었음을 알 수 있었다($p < 0.05$). 질트리코모나스 단백분해효소는 gelatin을 기질로 하는 SDS-PAGE 전기영동에서 R_{f} 치를 달리하는 5가지 분획대가 나타났으며 그 분획양상은 각 분리주의 병원성에 따라 일정한 양상을 나타내었다. 그리고 여러가지 단백분해효소 억제제를 전기 영동 효소액에 처리했을 경우 antipain과 leupeptin 처리군에서는 분획이 전혀 나타나지 않았으며 EDTA 처리군에서는 대조군에 비해 그 활성이 약화된 분획이 관찰되었고, PMSF 처리군에서의 분획들은 대조군과 그 활성의 차이를 볼 수 없어 이들 단백 분해효소는 cysteine 단백분해효소로 추정되었다. 조직 세포에 대한 질트리코모나스 추출물의 세포독성은 병원성에 따라 차이가 있었고 추출물의 단백질 농도 $12.0 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 이상에서 세포 독성에 따른 병원성 구분이 용이하였다. 그리고 질트리코모나스 추출물에 단백분해효소 억제제를 처리한 결과 대조군에 비하여 세포 독성이 낮게 나타났으며, 특히 antipain 처리군에서는 조직 세포에 대한 세포 독성이 현저하게 낮았다. 이상의 결과로 보아 cysteine계로 추정되는 질트리코모나스의 단백분해효소는 특이한 전기영동 활성 분획상을 나타내었는 바 이들은 모두 총체의 병원성 및 세포 독성과 밀접한 관련이 있었다.

서 론

우리 나라의 질트리코모나스는 비교적 병원성이 강한 것이 대부분이라고 알려져 있으며(宋熙主 외, 1979), 劉能和 외(1984)는 한국에 분포되어 있는 질트리코모나스에는 비 병원성, 약 병원성, 강 병원성 주가 존재함을 실험적으로 입증한 바 있다. 그러나, 본 원충의 병원성 및 그 기전에 관한 연구는 그리 많지 않다. 총체의 병원성은 이들의 세대 교체 시간과 밀접한 관련이 있으며(Kuluda et al., 1970), 본 원충이 상피 세포를 기계적으로 파괴하고(Heath, 1981), 일부 조직배양세포에 대해 세포 독성을 나타낸다는(Alderete and Pearlman, 1984) 보고들은 질트리코모나스의 조직배양세포에

대한 세포 독성이 병원성 감별에 이용될 가능성을 시사한 바 있다.

기생원충에 대한 병원성을 규명함에 있어 특별히 단백분해효소에 대한 흥미가 고조되어 왔다. 그 이유는 원충류가 갖고 있는 단백분해효소가 그 감염 자체는 물론이러니와 숙주 조직에 대한 병원성에 일차적으로 관여하기 때문이다(McLaughlin and Faubert, 1977; Coombs and North, 1983; Ravdin, 1986). 그러나 현재에 이르기 까지 트리코모나스의 단백분해효소에 대한 분석 보고는 거의 없는 실정이다. 단지 단백분해효소의 활성이 *Trichomonas fetus*(McLaughlin and Müller, 1979)와 질트리코모나스(Coombs, 1982; Coombs and North, 1983)에서 인정 되었을 뿐이고 더우기 이 단백분해효소가 질트리코모나스의 병원성에 직접적으로 관여하는지에 관해서는 밝혀진 바 없다.

이에 본 연구는 한국에 분포되어 있는 질트리코모나스에 대한 병원성 여부를 판정하고 병원성에 대

* 논문접수 1993년 1월 14일, 수정재접수 1993년 3월 2일

* 별책 요청 저자

한 단백질분해효소 관여 여부를 규명하고자 병원에 내원한 환자로 부터 채취한 질트리코모나스를 분리주 별로 무균 배양하여, 첫째 그 병원성을 Honigberg *et al.* (1966)의 마우스검정법으로 평가하고, 평가된 각 분리주의 추출물과 그 배양액의 중성 단백질분해효소와 산성 단백질분해효소의 활성을 측정, 비교하여 단백질분해효소의 활성이 병원성과 연관한지를 알아보고자 하였다. 둘째로 분리주 별로 확인된 단백질분해효소의 전기영동상의 차이점을 알아보고자 Lockwood *et al.* (1987)의 polyacrylamide gel electrophoresis 방법을 이용하여 그 분획 양상과 병원성과의 연관성을 알아보고, 세째로는 Chinese hamster ovary (CHO) 세포주를 표적 세포로 행한 세포 독성 실험 성적 결과와 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 질트리코모나스의 분리 및 배양

가. 질트리코모나스의 분리: 병원에 내원한 환자를 대상으로, 본 실험에 사용된 주를 수집하였다. 질경을 삽입하여 미리 준비된 소독면봉을 생리식염수로 적시어 질구에서 부터 자궁 후용기부까지에서 고루 검사물을 채취하였다. 이를 생리 식염수 한 방울을 적하시킨 슬라이드 글라스에서 혼합하여 편모 운동을 하는 질트리코모나스 영양형을 100배 또는 400 배 현미경하에서 검경하였고 단 일회 검사로서 총체 유무를 결정하였다. 총 120명의 질트리코모나스 양성 환자 중 10명으로 부터 채취된 검체에서 무균 배양이 가능하여 (배양률: 8.3%) 이들을 본 실험에 사용하였다.

나. 질트리코모나스의 배양: 환자로부터 채취된 검체는 일부 수정한 TPS-1 배지 (Diamond, 1986)에서 무균 배양하였으며 미리 소독된 15 ml들이 마개가 있는 시험관에 TPS broth 5 ml씩을 분주하여 4°C에 보관하면서 수시로 사용하였다. 검체를 접종한 배지는 37°C 에서 배양하였으며 2일 간격으로 계대 배양하였다. TP broth에 1N NaOH를 첨가하여 pH 6.0으로 조정하고 이에 소 혈청 50 ml과 TC 199 배지 15 ml을 넣은 후 penicillin G 50만 I.U.와 streptomycin 0.5 g을 첨가하여 TPS broth를 만들었다.

2. 동물 실험에 의한 분리주별 병원성의 평가

Honigberg *et al.* (1966)의 평가 방법을 수정 적용하여 질트리코모나스의 주별 병원성을 판정하였다. 즉, 계대 배양된 총체를 배양액 0.5 ml당 1 × 10⁶개가 되도록 하여 체중 15-20 g 내외의 백색 음성 BALB/c 마우스 배부피하에 주사하고, 접종 6 일 후에 희생시켜 피하에 형성된 농양의 장, 단경을 측정기 (dial caliper)을 사용하여 재고, 면적을 계산하였다. 각 분리주별 병원성은 형성된 농양의 평

균 면적을 구하고, 각 평균치의 신뢰 구간을 산정하여 상호 비교하였으며 이때의 신뢰도는 95%로 하였다. 본 실험에는 분리주 (株)당 10마리의 마우스를 사용하였다. 대조군으로 한 마우스에는 TP broth 만을 피하 주사하여 농양 형성 여부를 관찰하였다.

3. 조직 병리학적 검사

질트리코모나스를 피하로 접종시켜 형성된 농양 조직을 떼어내어 일반 조직 표본 제작에서와 같이 10% formalin에 고정하여 동상 조사를 거쳐 hematoxylin-eosin 염색을 하여 검경하였다.

4. 단백질분해효소 활성도 측정

가. 단백질분해효소 추출: 무균 배양된 질트리코모나스를 30,000 × g에서 30분간 4°C에서 원심 분리하여 침전물을 모은 뒤 이를 10 m mol Tris-HCl (pH 7.4) 용액으로 2회 원심 세척하였다. 그 침전물을 0.25 mol sucrose가 포함된 10 m mol Tris-HCl (pH 7.4) 용액에 부유시킨 후, 0.25% (v/v) Triton X-100을 가하였다. 이를 초음파 분쇄기로 grade 60 에서 수초간 초음파 분쇄한 다음 원심 분리하여 그 상층액을 -70°C에 보관하면서 추출물을 시료로 사용하였으며 첨가된 sucrose와 Triton X-100은 투석으로 제거하였다. 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였다.

나. 단백질분해효소 측정을 위한 배양액의 준비: 24 시간 배양된 질트리코모나스를 멸균된 0.85% NaCl 용액으로 2-3회 씻어준 뒤, ml 당 3 × 10⁶ 개의 질트리코모나스를 상기 식염수용액 50 ml에 넣어준 다음 37°C에서 12시간 배양시켰다. 이를 원심 분리 (30,000 × g, 10분)하여 상층액을 모아 약 48시간 냉동 건조 (lyophilization)시켰다. 이 시료를 증류수 2 ml에 용해시켜 단백질분해효소 함량을 측정하였다.

다. 중성 단백질분해효소 활성도 측정: 중성 단백질 활성도는 McLaughlin and Faubert (1977)의 방법에 따라 측정한다. 0.2 mol sodium phosphate (pH 6.0)에 녹인 1% azocasein (Sigma, U.S.A.) 반응액 100 μl에 추출물 또는 배양된 효소액을 첨가하여 최종 부피가 150 μl 되게 하고, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 250 μl의 0.5 mol trichloroacetic acid (TCA)를 가하고 각 시험관을 10분간 방치한 뒤, 10,000 × g에서 15분간 원심 분리하였다. 그 상층액에 0.5N NaOH 1 ml 씩 넣고 분광측광기 (Shimadzu UV-120-02)를 사용, 파장 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. 산성 단백질분해효소 활성도 측정: 산성 단백질분해효소 활성도는 McLaughlin and Faubert (1977) 방법을 따라 측정한다. 증류수로 8% 용액이 되도록 만든 소 혈색소 (Sigma, U.S.A.) 150 μl에 추출

물 또는 배양된 효소액 40 μl과 1.0 mol formate (pH 3.0) 150 μl를 가하고 다시 증류수로 최종 부피가 600 μl 되게 한 다음, 37°C에서 2시간 반응시켰다. 그후 6% TCA 0.9 ml를 넣은 뒤 10,000 × g로 15 분간 원심분리하였다. 그 상층액을 취해서 분광측광기로 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 단위 결정은 이상의 정상 반응 조건에서 1시간 반응한 시료에서 기질이 azocasein인 경우는 420 nm 에서 흡광도의 변화 0.1을, 혈색소인 경우는 280 nm에서 흡광도의 변화 0.03을 1단위로 하였다. 비활성도(specific activity)는 효소액의 단백질 함량 1 mg당 효소의 단위로 나타내었다.

5. 질트리고모나스 단백질분해효소의 전기영동 및 억제제 효력 검증

가. 질트리고모나스 단백질분해효소의 전기영동: 질트리고모나스 단백질분해효소의 전기영동상의 차이를 관찰하고자 Laemmli(1970)와 Lockwood et al. (1987)의 방법으로 sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. Separating gel의 acrylamide의 농도는 10% 이었으며 여기에 기질로서 gelatin의 최종 농도가 0.4% (w/v)가 되게 하여 3 μg ammonium persulfate를 첨가하여 굳혔다. 전기영동할 효소 시료는 전기 영동 kit (Hofer Scientific Instruments, SE 200)를 이용하여 6 mA로 4 °C에서 5시간 전기영동시켰다. 전기영동 분획상은 gelatin기질과 반응한 단백질분해효소의 활성 분획상이어서 표준 단백을 동시에 영동시킬 수 없어 각 분획의 분자량을 계산할 수 없었으나, 표시 염색액으로 사용하였던 bromophenol blue액의 주행거리를 100으로 하였을 때 각 분획의 주행거리 비율(R_F 치)로서 분획의 특이성을 기록하였다.

일면, 각 분리주 별로 전기영동한 gel을 말린 뒤 570 nm에서 농도계 (Gelman Science Inc, France)로서 각 분획의 농도를 관찰하였다.

나. 질트리고모나스 단백질분해효소의 억제제 효력 검증: 앞의 단백질분해효소 측정을 위한 전기영동 방법과 동일하되, 30 μg의 단백질이 함유된 효소 시료 약 4 μl에 각 억제제 antipain, leupeptin, PMSF, EDTA 등을 첨가하여 20°C에서 1시간 반응시킨 후 전기 영동 kit에 부하시켰다. 사용된 억제제의 농도는 antipain과 leupeptin의 경우에 100 μg/ml이 되게, 그리고 PMSF와 EDTA 경우엔 1 m mol이 되도록 하였다. 배양 완충액에는 시료에 처리한 것과 같은 동일 억제제를 첨가한 바 그 농도는 antipain과 leupeptin의 경우에는 20 μg/ml이 되도록 하고 PMSF, EDTA 경우엔 1 m mol로 하였다 (Lockwood et al., 1987).

6. 질 트리고모나스의 세포독성 측정

가. 표적 세포의 배양: 질트리고모나스의 세포독성 측정을 위해 표적 세포로 사용된 세포는 李泳憲 외 (1986)가 적당하다고 판정한 Chinese hamster ovary세포(CHO 세포)를 사용하였으며 이 세포의 배양액은 20 m mol HEPES(N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid), 100 unit/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10% fetal calf serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium(EMEM)을 사용하였다. 세포 배양용 플라스크에 넣은 CHO 세포는 37°C의 5% CO₂ 항온기(NAPCO, U.S.A.)에서 배양하였다.

나. 세포독성 측정: 세포 독성은 Gillies et al. (1986)의 방법과 Alderete and Pearlman(1984)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 즉 상기 표적 세포의 단일층과 단백질 함량을 달리한 질트리고모나스의 추출물을 12 시간 반응시킨 후 상층액을 제거하고 Eagle's balanced salt solution(EBSS)용액으로 2회 씻어준 후, EBSS로 만든 1% glutaraldehyde용액을 각 well 당 100 μl씩 넣어 상온에서 15분간 고정 후 고정액을 제거하고 0.1% crystal violet 용액을 각 well 당 100 μl씩 넣어 상온에서 30분간 염색한 후 증류수로 3회 세척하여 건조시켰다. 0.2% Triton X-100용액으로 염색액을 용해시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 활성도는 Alderete and Pearlman(1984)의 방법에 따라 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{세포 독성 활성도(\%)} = (1 - \text{실험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

다. 질트리고모나스 세포독성에 대한 단백질분해소 억제제의 영향: Fulford and Marciano-Cabral (1986)의 방법을 응용하여 질트리고모나스의 세포 독성에 대한 단백질분해소 억제제의 영향을 실험하였다. 즉, 실험에 사용한 억제제로는 antipain, leupeptin, PMSF 및 EDTA 이었으며 이들의 농도는 96 well의 plastic plate 각 well에 단백질 농도 별로 조작된 질트리고모나스 추출물 100 μl 당 40 μg이 함유되도록 하였다. 질트리고모나스의 추출물은 세포 독성이 강하다고 인정되었던 YS-8주를 이용하였으며 Eagle's MEM으로 조제된 단백질 농도는 24 μg/100 μl로부터 1.5 μg/100 μl까지 배수 희석하여 실험에 사용하였다. 우선 well 당 Eagle's MEM 100 μl, 각 억제제 40 μg 및 여러 단백질 농도의 추출물을 넣고 1 시간 동안 37°C 5% CO₂ 항온기 내에서 배양하였다.

표적세포는 조직 세포 배양 플라스크 내에서 배양된 CHO세포를 Eagle's MEM ml 당 5 × 10⁵개가 되도록 조정하여 바닥이 편평한 96 well의

plastic plate에 각 well 당 100 μ l씩 (50,000 cells/well) 분주하였다. 이를 12시간 동안 37°C 5% CO₂ 항온기 내에서 배양하여 단일층을 만들었다. 이어서 만들어진 각 well의 혼합 상층액을 버리고 1 시간 동안 배양시켰던 억제제와 추출물 혼합액 100 μ l씩을 각 단일층 well에 분주하여 2시간 동안 37°C 5% CO₂ 항온기 내에서 배양시켰다. 세포독성 결과 판정은 상기한 6-나의 방법에 준하였다.

결 과

1. 질트리코모나스의 분리주별 병원성

총 120 질트리코모나스 양성 예 중 10예에서 무균 계대 배양이 가능하였으며 실험에 사용할 때까지 총 배양기간은 12-16 주이었다. 채취된 모든 질트리코모나스 양성 예 중 칸디다 속과 혼합 감염된 예는 모두 실험에서 제외되었고, 실험에 사용한 질트리코모나스는 모두 무균 배양된 것들이었다. 또한 계대 배양된 분리주를 채취하였던 환자의 임상적 병력상은 공통적으로 대하증을 동반한 질염이나 만성 자궁 경부염이 있었다 (Table 1).

마우스 검정법에 의하여 총체 부유액을 배부 피하에 접종하고 6일 후 발생한 마우스 피하 병소의 면적을 구하고 그 신뢰 구간을 도식화하여 본 바 질트리코모나스의 병원성은 3그룹으로 구분되었으며 이번 실험에서는 비 병원성 주는 발견하지 못하였다. 즉 YS-4, YS-6, YS-9 주는 피하 농양 평균 면적이 20.04-23.16 mm²으로서 약 병원성 주로,

YS-1, YS-2, YS-3, YS-5주는 농양의 평균 면적이 29.99-40.19 mm²으로서 중등도 병원성 주로 간주하였다. 중등도 병원성 주는 약 병원성 주와 강 병원성 주의 농양 평균치에 대한 신뢰구간에 겹치는 그룹이었다. YS-7, YS-8 및 YS-10주는 평균 농양 면적 범위가 62.40-70.23 mm²이어서 강 병원성 주로 구분하였다. 특히 약 병원성 주와 강 병원성 주 사이에는 신뢰도 95%로 하는 신뢰 구간도 벌어져 있었고 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 (p < 0.05). TP broth 만을 주사하였던 대조군에서는 농양을 형성하지 않았다 (Fig. 1).

2. 조직 병리학적 소견

임의로 선택된 10개의 농양조직을 병리학적으로 경검한 결과, 모든 농양 조직에서 다핵백혈구의 침윤이 현저하였고, 괴사된 총체 주변에는 parasitoporous vacuole이 형성되어 있었으며, 총체가 피하 근섬유까지 침입한 예는 찾아볼 수 없었다.

3. 단백질분해효소의 활성도

가. 중성 단백질분해효소의 활성도: 질트리코모나스 분리주별로 추출물과 배양액 내의 중성 단백질분해효소 활성을 측정한 바 추출물은 YS-4의 비활성도 (specific activity)가 16.3 \pm 0.68 단위/mg 단백질로 가장 낮았고 YS-10은 40.9 \pm 0.76 단위/mg 단백질로 가장 높게 나타났다. 배양액은 전반적으로 추출물에 비해 비활성도가 낮게 나타나 그 범위는 3.85 \pm 2.40 단위/mg 단백질 (YS-6)에서 16.40 \pm 1.58 단위/mg 단백질 (YS-10)의 범위를 보였다

Table 1. Medical history of patients from whom *Trichomonas vaginalis* were isolated^{a)}

Isolate	Date isolated	Patient age	Symptom	Diagnosis	Total period of cultivation (Wks) ^{b)}
YS-1	March 2, 1989	46	Leukorrhea	Chronic cervicitis	16
YS-2	March 7, 1989	42	Leukorrhea Rt. flant pain	Chronic cervicitis	16
YS-3	March 12, 1989	23	Leukorrhea	Vaginitis	15
YS-4	March 9, 1989	32	Leukorrhea	Vaginitis	16
YS-5	March 4, 1989	38	Leukorrhea	Vaginitis & Chronic cervicitis	16
YS-6	March 12, 1989	45	Leukorrhea	Chronic cervicitis	15
YS-7	March 12, 1989	30	Leukorrhea	Vaginitis & Cervicitis	15
YS-8	March 14, 1989	51	Leukorrhea Bloody urine	Vaginitis & Chronic cervicitis	15
YS-9	March 16, 1989	38	Leukorrhea	Cervicitis	15
YS-10	April 3, 1989	37	Leukorrhea Vaginal bleeding Low abd. pain	Vaginitis & Chronic cervicitis	12

^{a)}Ten isolates out of 120 positive cases (8.3%) were axenically cultivated. ^{b)}Period of cultivation by serial transfers (once per 2 days) at 37 \pm 0.5°C from the day of isolation to inoculation.

(Table 2).

추출물이나 배양액 내에서의 활성도는 각 분리주 별로 차이가 심하여 피하농양 크기에 따라 구분된 강, 중, 약 병원성 그룹별로 중성 단백분해효소의 활성도를 비교하여 본 바 추출물이나 배양액에서 모두 약 병원성 주인 YS-4, YS-6, YS-9에 비해 강 병원성 주인 YS-7, YS-8, YS-10의 활성도가 현저히 높음을 알 수 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

나. 산성 단백분해효소의 활성도: 추출물 및 배양액에서 산성 단백분해효소의 활성도 역시 각 분리주에 따라 차이가 심하게 나타났다. 즉 추출물은 YS-4의 비활성도가 11.2 ± 0.06 단위/mg 단백질로 가장 낮았고 YS-10의 산성 단백분해효소가 35.1 ± 1.29 단위/mg 단백질로 가장 높게 나타났다. 배양액의 산성 단백분해효소의 비활성도는 그 범위가 2.18 ± 0.47 단위/mg 단백질(YS-4)에서 부터

14.30 ± 2.45 단위/mg 단백질(YS-10)으로 나타나 추출물에 비해 배양액 내에서의 산성 단백분해효소의 비활성도가 낮음을 알 수 있었다 (Table 2).

피하 농양의 크기에 따른 각 그룹별 산성 단백분해효소의 활성을 비교하여 본 바 추출물이나 배양액 모두에서 약 병원성 주에 비해 강 병원성 주의 활성이 높게 나타났다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

즉 모든 치료에서 산성 단백분해효소나 중성 단백분해효소의 활성이 인정되었으나 피하농양 크기에 따른 병원성과 그 비활성도 사이에 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

4. 질트리코모나스 단백분해효소의 전기영동

가. 단백분해효소의 분획 양상: 질트리코모나스 단백분해효소의 분획양상을 알아보기 위하여 기질로서 gelatin이 들어 있는 SDS-PAGE를 시행하여 본 바 주행거리의 비율 (rate of flow, R_F 치)을 달리하

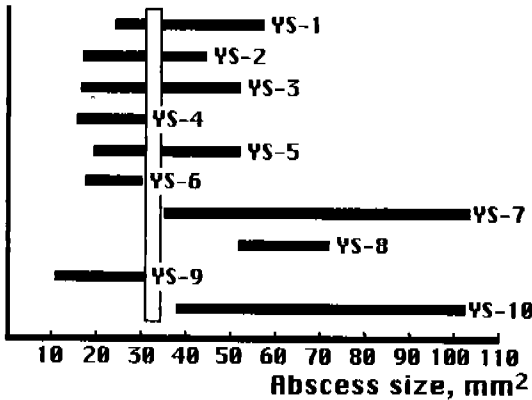


Fig. 1. Confidence intervals (5% significance level) of mean areas of 6-day subcutaneous lesions in mice caused by *Trichomonas vaginalis* inoculation.

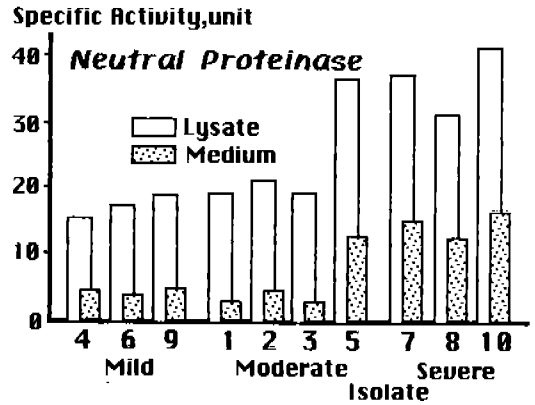


Fig. 2. Specific activities of neutral proteinase in the mild-, moderate-, severe-pathogenic groups of *Trichomonas vaginalis*.

Table 2. Neutral and acid proteinase activities in *Trichomonas vaginalis* lysate and cultured media^{a)}

Isolate	Neutral Proteinase		Acid Proteinase	
	Lysate	Cultured media	Lysate	Cultured media
YS-1	19.2 ± 2.17 ^{b)}	4.09 ± 1.50	18.3 ± 0.90	4.95 ± 0.27
YS-2	20.7 ± 1.85	5.21 ± 0.68	17.6 ± 0.84	5.10 ± 0.97
YS-3	19.3 ± 1.19	3.96 ± 0.78	18.6 ± 0.46	4.24 ± 1.11
YS-4	16.3 ± 0.68	3.88 ± 1.19	11.2 ± 0.06	2.18 ± 0.47
YS-5	27.5 ± 2.42	12.20 ± 1.72	20.0 ± 4.75	7.40 ± 1.29
YS-6	18.0 ± 2.49	3.85 ± 2.40	13.9 ± 0.35	6.28 ± 1.40
YS-7	36.3 ± 4.84	14.10 ± 0.21	32.5 ± 1.16	10.40 ± 0.75
YS-8	30.8 ± 2.43	12.50 ± 0.45	24.9 ± 0.68	8.95 ± 0.87
YS-9	18.6 ± 1.72	5.30 ± 0.92	15.2 ± 0.97	4.03 ± 1.24
YS-10	40.9 ± 0.76	16.40 ± 1.58	35.1 ± 1.29	14.30 ± 2.45

^{a)}Specific activity (units/mg protein). ^{b)}Mean ± S.E.

는 5가지의 분획대를 관찰할 수 있었다. 각 분획의 R_F 치는 0.10, 0.21, 0.40, 0.45, 0.53이었다. 각 분리주별에 따른 분획양상을 살펴보면 YS-1, YS-2, YS-3, YS-5에서는 R_F 치 0.10, 0.21, 0.53인 3개의 분획이 관찰되었고, YS-4, YS-6, YS-9에서는 R_F 치 0.21, 0.53인 2개의 분획만이 관찰되었다. YS-7, YS-8, YS-10에서는 R_F 치가 0.21, 0.40, 0.45, 0.53인 4개의 분획대가 관찰되었다 (Figs. 4 & 5). 이러한 분획 양상은 마우스 피하 농양 크기에 따라 구분한 병원성 그룹과 일치됨을 알 수 있었다. 또한 R_F 치 0.21과 0.53인 분획은 실험에 사용한 모든 분리주에서 공통적으로 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 4). 그리고 전기영동된 gel을 농도계로 측정된 결과 각 분획간의 농도의 차이가 있었다 (Fig. 6).

나. 단백분해효소에 대한 억제제의 영향: 단백분해효소의 종류를 알아보기 위하여 일부 알려진 4가지 억제제로 처리한 후 전기영동을 시행하여 보았다.

Specific Activity, unit

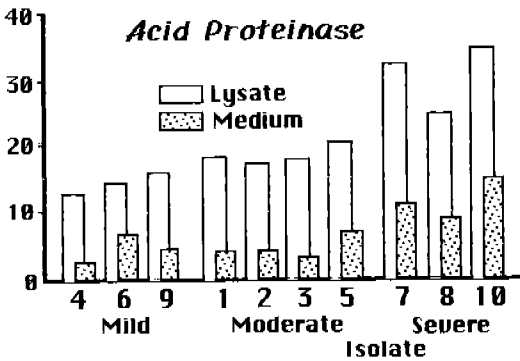


Fig. 3. Specific activities of acid proteinase in the mild-, moderate-, severe-pathogenic groups of *Trichomonas vaginalis*.

R_F value

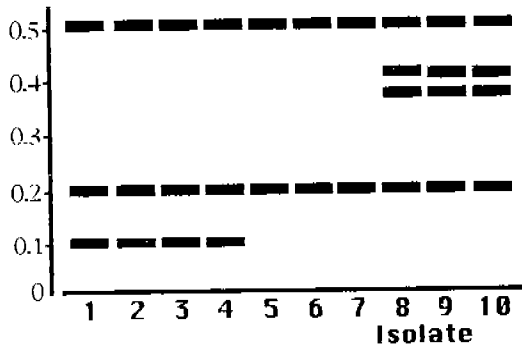


Fig. 4. Diagrammatic representation of proteinase banding patterns of *Trichomonas vaginalis*.

그 결과 cysteine 단백분해효소의 억제제로 알려진 antipain이나 leupeptin으로 전처리하였을 경우 단백분해효소 분획이 전혀 나타나지 않았다. 그러나, serine 단백분해효소 억제제로 알려진 PMSF를 처리하였을 경우, 억제제로 처리하지 않은 대조군과 동일한 양상의 분획들이 관찰되었고, EDTA로 처리하였을 경우는 대조군에 비해 비교적 흐린 분획들이 관찰되었다 (Table 3).

5. 질트리코모나스의 세포독성

가. 분리주별 추출물의 세포독성: 질트리코모나스 분리주별 추출물의 단백질 농도를 달리하여 CHO 세포에 대한 세포독성을 관찰한 바 단백질 농도 1.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서는 평균세포독성이 4-51%, 단백질 농도 3.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서는 11-67%, 단백질 농도 6.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서는 18-83%, 단백질 농도 12.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서는 32-89%, 단백질 농도 24.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서는 47-94%로 각각 나타났다. 단백질 농도에 비례해서 세포독성이 증가하는 경향이 있었으나 단백질 농도 12.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 이상에서는 세포독성 증가 정도가 둔화되었으며 세포독성에 따른 병원성 주의 구별이 용이하였다 (Fig. 7).

나. 질트리코모나스의 병원성에 따른 세포독성의 비교: 질트리코모나스 추출물의 CHO 세포에 대한 세포독성을 마우스 피하 농양 크기에 따른 병원성과

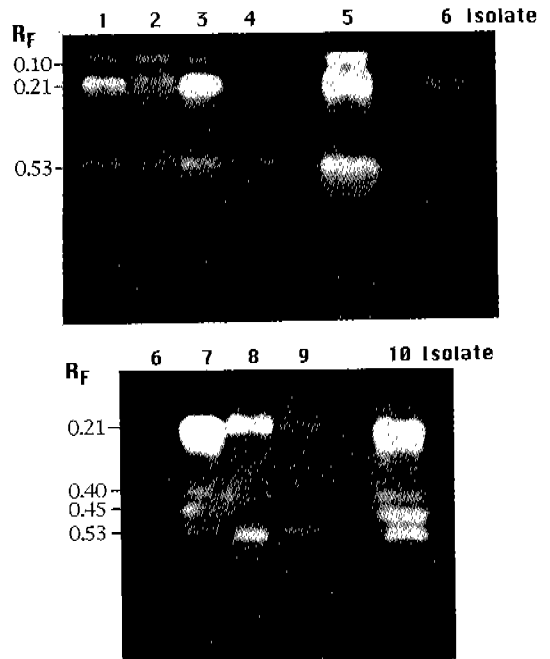


Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis banding patterns of proteinases in *Trichomonas vaginalis*.

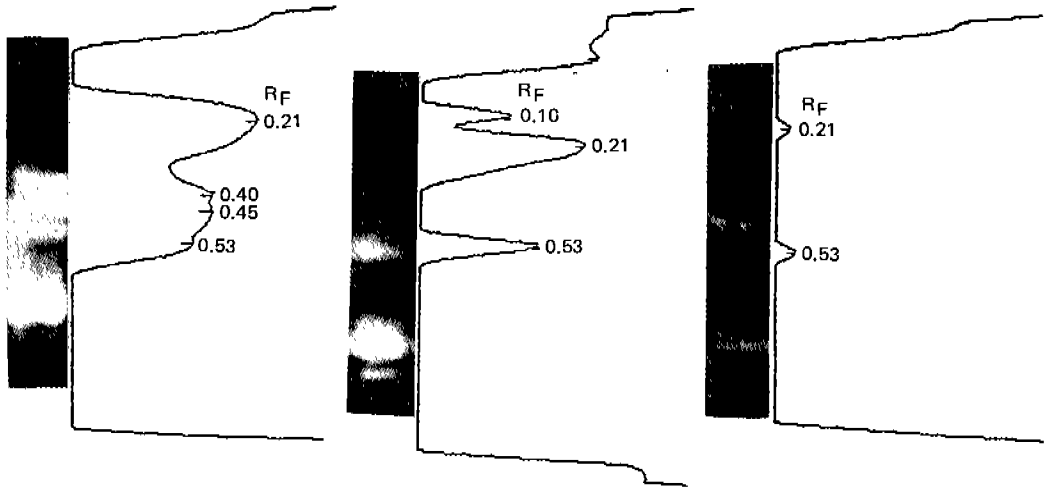


Fig. 6. The densitometrics scan of *Trichomonas vaginalis* proteinase banding patterns is shown. Gels were incubated at pH 5.5 in the presense of 1 mmol dithiothreitol. Samples were run in the direction cathode (top) to anode (bottom).

Table 3. The effect of inhibitors on electrophoretic banding patterns of *Trichomonas vaginalis* proteinases^{a)}

Inhibitor	Proteinase band appearance ^{b)}								
	YS-1			YS-4		YS-10			
	a ^{c)}	b	c	b	e	b	c	d	e
Antipain	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leupeptin	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PMSF	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EDTA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysate without inhibitors	++	++	++	++	++	++	++	++	++

^{a)}Gels incubated at pH 5.5 in presence of 1 mmol dithiothreitol. Results were from 2 experiments. ^{b)}—, no band detectable; +, reduced but band visible by eye; ++, distinct band visible by eye. ^{c)}a, R_F 0.10; b, R_F 0.21; c, R_F 0.40; d, R_F 0.45; e, R_F 0.53.

비교하여 볼 때, 약 병원성 주(2분획)의 세포 독성이 가장 낮게 나타났으며, 강 병원성 주(4분획)의 세포독성이 가장 높게 나타났다. 단백질 농도 24.0 µg/100 µl에서의 약 병원성 주의 세포독성은 50% 미만이었고(평균 48.0 ± 0.58%), 중등도 병원성 주에서는 세포독성이 50% 이상 80% 미만(평균 68.0 ± 4.27%), 강 병원성 주에서는 세포독성이 모든 주에서 80% 이상(평균 91.3 ± 1.33%)으로 나타났다. 각 병원성 그룹으로 분류하여 평균 세포독성을 산출하였을 때는 추출물의 단백질이 저농도인 경우에도 병원성 주의 구별이 용이하였다(Fig. 8).

다. 단백질분해효소 억제제가 질트리코모나스 세포독

성에 미치는 영향: 질트리코모나스 단백질분해효소가 CHO 세포주에 대한 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다시 단백질분해효소 억제제를 처리한 결과 전반적으로 억제제를 처리한 그룹은 질트리코모나스 추출물의 단백질 함량에 관계없이 대조군에 비하여 세포독성이 낮게 나타났으나 단백질 농도 3.0 µg/100 µl 이하에서는 그 이상에 비하여 그 차이가 뚜렷하지 않았다. 또한 EDTA를 제외한 antipain, leupeptin, PMSF로 처리한 그룹에서는 대조군이 단백질 농도에 비례하여 세포독성이 증가하는데 비해 그 증가 정도가 완만하거나 비슷하였다. 특히 단백질 농도 6.0 µg/100 µl 이상에서 antipain으로 처리한 경우에는 대조군에 비하여 세

Cytotoxicity, %

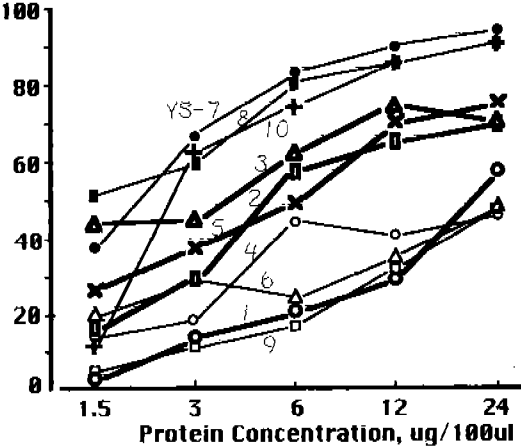


Fig. 7. Cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* lysates to the Chinese hamster ovary cell line.

Cytotoxicity, %

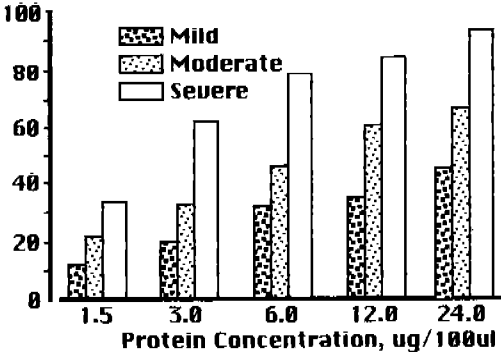


Fig. 8. Mean cytotoxicities of the pathogenic groups of *Trichomonas vaginalis* lysate to Chinese hamster ovary cell line.

포독성이 현저히 낮았다(Table 4).

고 찰

질트리코모나스에 감염된 환자의 증상은 나타나지 않거나 기생하는 충체수나 질강 내의 환경 변화에 따라 다양하게 나타날 수 있다(Fouts and Kraus, 1980). 우리나라에서도 본 원충의 감염률은 상당히 높은 것으로 나타나 있고(Soh et al., 1961; 鄭坪林 외, 1968), 특히 宋熙主 외(1979)는 우리나라의 질트리코모나스는 비교적 병원성이 강한 것이 대부분이라고 하였으며 劉能和 외(1984)는 한국에 분포되어 있는 질트리코모나스에는 비병원성, 약 병원성, 강 병원성 주가 존재함을 실험적으로 입증한 바 있다. 그러나 현재까지 우리나라는 물론 외국에서도 본 원충의 병원성 및 그 기전에 관한 연구는 그리 많지 않다.

최근 충체에서 분비되는 단백분해효소가 숙주 내로의 침투 및 감염 유발에 직접적인 관련이 있으며, 숙주에 대한 충체 자체의 방어, 영양 공급 및 생활사에도 영향을 주는 것으로 인식되어(North, 1982), 이들 단백 분해효소의 병원성 관련여부에 대한 관심이 고조되어 왔다.

본 실험에서는 10개의 분리주에 대하여 산성 단백분해효소와 중성 단백분해효소 활성에 대하여 비교, 검토하였으나, Hartley(1969)는 catalytic residue의 여러가지 억제제에 대한 감응도를 기준으로 aspartic(carboxyl) 단백분해효소, metallo 단백 분해효소, serine 단백분해효소, cysteine(thiol-) 단백분해효소 등으로 분류하였다. 즉, aspartic 단백분해효소는 억제제의 일종인 pepstatin, acetyl pepstatin, diazoacetyl-norleucine methyl ester, epoxy propane 등에 의해, metallo 단백분해효소는 chelating agent인 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid), 8-hydroxyquinoline 등과 phosphoramidon에 의해, serine 단백분해효소는 PMSF, DIFP 등에 의해, cystein 단백분해효소는 iodoacetamide,

Table 4. Effect of proteinase inhibitors on the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* lysate

Inhibitor	Mean Cytotoxicity (%): (2-E/c) × 100 ^{a)}				
	1.5 ^{b)}	3.0	6.0	12.0	24.0
Antipain	20	31	12	14	26
Leupeptin	33	37	34	30	31
PMSF	22	11	22	25	45
EDTA	40	25	43	62	61
Lysate without inhibitor	45	44	72	88	66

^{a)} Assayed by method of Alderate and Pearlman (1984); E = optical density value in experimental group, C = optical density value in control group. ^{b)} Protein concentration (μg/100 μl).

iodoacetate, heavy metals, N-ethyl maleimide 등에 의해 특이하게 그 활성이 저지된다고 하였다. 흔히 사용되는 chloromethyl 유도체인 TLCK, TPCK와 미생물 억제제인 leupeptin, antipain은 일부 serine 단백분해효소와 대부분의 cysteine 단백분해효소를 억제한다(Asch and Dresden, 1979; Maki et al., 1982; North, 1982; McDonald, 1985).

본 실험에서는 4가지 억제제를 사용하여 강 병원성 주에서만 특이하게 나타났었던 R_F 치 0.40 및 0.45의 분획이 어떤 종류의 단백분해효소인지를 규명하고자 하였으나 leupeptin과 antipain으로 처리 시 모든 분획이 억제되어 그 특성을 증명하지 못하였다. 이를 규명하기 위해서는 앞으로 보다 다양한 억제제를 사용하여 각 분획의 생화학적 성상을 밝혀야 할 것으로 사료된다.

단백분해효소에 대한 연구는 적절한 pH와 특수한 기질 및 상기한 억제제의 선택이 중요하다. pH에 따라 같은 효소가 다른 단백질을 분해할 수 있으므로 pH의 조절이 중요하며 기질의 특이성에 따라 단백분해효소의 활성 범위가 영향을 받으므로 기질의 선택이 중요하다. 본 실험에서, casein은 혈액소보다 높은 pH에서 가수분해가 잘 되므로 pH 6.0에서 중성 단백분해효소 활성도 측정의 기질로, 산성 단백분해효소는 pH 3.0에서 단백분해 작용에 가장 적합한 소 혈색소를 사용하였다.

기생 원충류의 단백분해효소는 숙주세포 침범에 중요한 역할을 하며(Dluzewski et al., 1986; Alfieri et al., 1989), 그 병원성에 직접적인 관련이 있음이 밝혀진 바 있으나(Lushbaugh et al., 1985) 질트리로코모나스에서 이들 단백분해효소가 병원성과는 어떤 상관관계가 있는지 또 전기영동상 분획양상과 병원성과의 관계, 세포독성 실험상 이들 단백분해효소의 관계에 대한 연구는 드물어 본 실험에서는 이들의 상관관계를 규명하고자 하였다.

본 실험에서 질트리로코모나스 단백분해효소의 성상을 알아보기 위한 전기영동은 SDS-PAGE를 시행하였다(Laemmli, 1970; Lockwood et al., 1987). 전기영동상 기질로 사용된 gelatin은 수용성 단백질로 자연계에 존재하지 않으나 교원질의 가수분해에 의해 얻어지며 무색 또는 옅은 황색으로 무미, 무취, 투명하며 물을 흡수하면 5-10배 불어나며 35-40°C 이하에서 gel 상태로 존재하므로 단백분해효소의 활성을 측정하기에 알맞다. 이 gelatin에 Coomassie blue가 착색되고 분획대가 형성되는 부분은 탈색되어 희게 보여 통상 전기영동 결과와는 달리 반전된 상(像)이 나타난다. 본 실험에서의 결과가 Coombs and North(1983)의 분획양상 결과와는 다른 것은 흥미로웠다. 즉 R_F 치 0.21, 0.53의 2분획은 약 병원성 주, R_F 치 0.10, 0.21, 0.53의 3분획은 중등도 병원성 주, R_F 치

0.21, 0.40, 0.45, 0.53의 4분획은 강 병원성 주와 일치함을 알 수 있었다. 이들 각 분획의 농도를 농도계로 측정된 결과 각 분획간에 농도의 차이가 있었으며 4분획양상에서는 대체로 강하게, 2분획양상에서는 약하게 나타남을 알 수 있었고, 단백분해효소의 분획양상과 병원성과는 유관함을 알 수 있었다.

이들 단백분해효소의 종류를 알아보기 위해 억제제로서 antipain, leupeptin, PMSF, EDTA 등을 처리한 결과 주로 cysteine 단백분해효소를 억제하는 것으로 알려진 antipain, leupeptin으로 처리하였을 경우 전혀 분획대가 나타나지 않았다. 그리고 serine 단백분해효소를 억제하는 것으로 알려진 PMSF로 처리하였을 경우 대조군과 비교하여 전혀 차이가 없었으며 metallo proteinases를 억제하는 것으로 알려진 EDTA로 처리하였을 경우 대조군에 비하여 호린 양상을 나타내었다. 이 결과 질트리로코모나스의 단백분해효소는 주로 cysteine 단백분해효소임을 나타내며, 질트리로코모나스에서 단백분해효소의 활성에 강약이 있음은 다양한 형태의 cysteine 단백분해효소 때문이라고 사료됨은 Coombs(1982), Coombs and North(1983)의 결과와도 일치한다. 질트리로코모나스는 아메바 형태로 기계적으로 상피세포를 파괴시키는 것이 주사현미경으로 관찰되었고(Heath, 1981), 李泳憲 외(1986)는 자유생활 아메바의 병원성 점점에서 CHO세포가 Vero 세포나 HeLa 세포보다 적합하다고 하였다. 따라서 본 실험은 한국에 분포되어 있는 질트리로코모나스의 CHO세포에 대한 세포독성여부를 CHO 세포의 단일층에 각각 단백질 농도를 달리한 질트리로코모나스 추출물을 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 이 결과 각 분리주별로 흡광도의 차이가 심하였으며 대체적으로 단백질 농도가 증가할 수록 흡광도도 증가하여 세포독성이 증가하므로 이들 단백질의 농도와 세포독성은 비례함을 알 수 있었다. 그리고 병원성 그룹별로도 비례관계가 있어 강 병원성 주에서는 높은 세포 독성을, 약 병원성 주에서는 낮은 세포독성을 보여 이들 세포 독성과 병원성과는 일치함을 알 수 있었다.

또 질트리로코모나스 단백분해효소 억제제가 CHO 세포주에 대한 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 억제제를 처리한 그룹은 질트리로코모나스 추출물 단백질 함량에 관계없이 대조군에 비하여 전반적으로 세포독성이 낮게 나타났으나 단백질 농도 3.0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 이하에서는 그 이상에 비하여 그 차이가 뚜렷하지 않았는데 이는 세포독성에 본 실험에서는 알 수 없는 어떤 알지 못하는 인자가 작용하였는지, 병원성 기생생물에서 분비될 수 있는 다른 병원성 물질인 H_2O_2 , O_2^- , singlet oxygen 등(Root et al., 1975; Dougherty et al., 1976)이 작용하였거나, 실험상 생물학적 오차때문일 것으로

추측된다. 또한 단백질 농도 6.0 µg/100 µl 이상에서 antipain과 leupeptin으로 처리한 그룹에서는 처리하지 않은 대조군에 비해 그 세포독성이 현저하게 저하되었다. 본 실험의 결과로 미루어 질트리코모나스 단백질분해효소는 적어도 부분적으로나마 세포독성에 관여함을 알 수 있었다.

참고문헌

宋熙主, 李純炯, 池提根 (1979) 韓國 膾트리코모나스 (*Trichomonas vaginalis*)의 病原性에 關한 實驗的 研究. 寄生蟲學잡지 **17**: 1-8.

劉能和, 明春玉, 鄭坪林, 李根泰 (1984) 『질 트리코모나스』(*Trichomonas vaginalis*)의 주별(株別) 병 원성에 따른 isozyme 양상에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집 **17**: 142-154.

李泳愚, 金泰宇, 鄭仁實, 鄭坪林, 李根泰 (1986) 자유 생활 아메바의 병원성 검정에 관한 실험적 연구. 연세의대논문집 **19**: 358-369.

鄭坪林, 李奉鎬, 李栽熙, 千炯福, 金英漢 (1968) 여수, 군산 지역 점대부들의 『질트리코모나스』 및 『질칸디다』 감염에 관한 역학적 조사. 농촌위생 **3** 1-5.

Alderete JF, Pearlman E (1984) Pathogenic *Trichomonas vaginalis*: Cytotoxicity to cell culture monolayer. *Br J Vener Dis* **60**: 99-105.

Alfieri SC, Shaw E, Ziberfarb V, Ravinovitch M (1989) *Leishmania amazonensis*: Involvement of cystein proteinases in the killing of isolated amastigotes by l-leucyl ethyl ester. *Exp Parasit* **98**: 423-431.

Asch HL, Dresden MH (1979) Acidic thiol proteinase activity of *Schistosoma mansoni* egg extracts. *J Parasitol* **65**: 543-649.

Coombs GH (1982) Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology* **84**: 149-155.

Coombs GH, North MJ (1983) An analysis of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* **86**: 1-6.

Diamond LS (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. *J Parasitol* **54**: 1047-1056.

Dluzewski AR, Rangakari K, Wilson RJM, Gratzner WB (1986) *Plasmodium falciparum*: proteinase inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. *Exp Parasit* **62**: 416-422.

Dougherty TJ, Gomes CJ, Weishaupt KR (1976) Energetics and efficiency of photoinactivation of marine tumor cells containing hematoporphyrin and light. *Cancer Res* **36**:

2330.

Fouts A, Kraus SJ (1980) *Trichomonas vaginalis*: Reevaluation of its clinical presentations and laboratory diagnosis. *J Inf Dis* **141**: 137-143.

Fulford DE, Marciano-Cabral F (1986) Cytolytic activity of *Naegleria fowleri* cell free extract. *J Protozool* **33**: 498-502.

Gillies RT, Dider N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cell culture. *Anal Biochem* **159**: 109-113.

Hartley BS (1960) Proteolytic enzymes. *Ann Rev Biochem* **29**: 45-72.

Heath JP (1981) Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cultures. A study by light and scanning electron microscopy. *Br J Vener Dis* **57**: 106-117.

Honigberg BM, Livingston MC, Frost JK (1966) Pathogenicity of fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*: "The Mouse Assay" versus clinical and pathological findings. *Act Cytol* **10**: 353-361.

Kulda J, Honigberg BM, Frost JK, Hollander DH (1970) Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. *Am J Obstet Gynecol* **108**: 908-918.

Laemmli, UV (1970) Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* **227**: 680-683.

Lockwood BC, North MJ, Scott KI, Bremner AF, Coombs GH (1987) The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem Parasitol* **24**: 89-95.

Lowry OH, Rosebough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folic phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265.

Lushbaugh WB, Hofbauer AF, Pittmann FE (1985) *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin. *Exp Parasit* **59**: 328-336.

Maki J, Furuhashi A, Yanagisawa T (1982) The activity of acid proteases hydrolysing hemoglobin in parasite helminths with special reference to interspecific and intraspecific distribution. *Parasitology* **84**: 137-147.

McDonald JK (1985) An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: Aspects related to nomenclature and classification. *Histochem J* **17**: 773-785.

McLaughlin J, Faubert G (1977) Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and an acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can J Microbiol* **23**: 420-425.

McLaughlin J, Müller M (1979) Purification and characterization of a low molecular weight

- thiol proteinases from the flagellate protozoan *Trichomonas fetus*. *J Biol Chem*, **254**(5): 1526-1533.
- North MJ (1982) Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiol Rev* **46**: 308-340.
- Ravdin JI (1986) Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact dependent cytolysis. *Review of Infectious Diseases* **8**(2): 247-260.
- Root RK, Metcalf J, Oshino N, Chance B (1975) H₂O₂ released from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation and some regulating factors. *J Clin Invest* **55**: 945-955.
- Soh CT, Lee KT, Shin EW, Kang TC (1961) Incidence of parasite in Seoul area based on examination of the Severance Hospital out-patients. *Yonsei Med J* **2**: 31-41.

=Abstract=

Proteinase activity in the isolates of
Trichomonas vaginalis according to their pathogenicity

Young-Ki Shim¹⁾, Kyung-Hee Park¹⁾, Pyung-Rim Chung²⁾ and Kyung-il Im^{1)*}

Department of Parasitology¹⁾, College of Medicine & Institute of Tropical Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Department of Parasitology²⁾, College of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Ten axenic isolates of *Trichomonas vaginalis* were subcutaneously injected to the BALB/c mice in order to assess their pathogenicity by means of so-called "mouse assay" method. All the isolates revealed neutral and acid proteinase activities both in their lysates and in culture media, but the specific activities of both proteinases in the severely pathogenic group were significantly higher than the mildly pathogenic group (p < 0.05). In the SDS-PAGE system in which the electrophoretic gels contained 0.4% gelatin as the substrate, five different banding patterns of trichomonal proteinases were detected, and the patterns were closely related with the pathogenicity of the isolates of *T. vaginalis*. All five bands might be regarded as cysteine proteinases group in the inhibitor assays. The cytotoxicity of the lysates of *T. vaginalis* to the target Chinese hamster ovarian (CHO) cell line was also significantly different according to the pathogenicity of the isolates, and generally lower in the lysates treated with cysteine proteinase inhibitors than in the control lysates. In summarizing the results, it might be considered that the proteinases of *T. vaginalis* showing five electrophoretic banding patterns are closely related with the pathogenicity and cytotoxicity of the isolates of *T. vaginalis*.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, proteinase, pathogenicity, cytotoxicity, PAGE

[*Korean J. Parasit.*, **31**(2): 117-127, June 1993]

*Corresponding author