The Korean Journal of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research
Vol. 6, No. 1, 35-41, June 2006

*Helicobacter pylori*에 의한 위상피세포의 Matrix Metalloproteinase-1 생산과 Extracellular Signal-regulated Kinase 및 p38 Kinase의 역할: *cagA* 유전자 인산화의 기능

Helicobacter pylori Induces Matrix Metalloproteinase-1 in AGS Cells via ERK and p38 Kinase Participation: Role of Tyrosine Phosphorylation of the *cagA*

Yong Chan Lee, M.D., **Jie-Hyun Kim,** M.D., **In Ok Lee, Jae Bock Chung,** M.D., **Michael H. Pillinger,** M.D.* and **Martin J. Blaser,** M.D.*†

Department of Gastroenterology and Institute of Gastroenterology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea and Departments of Medicine and Microbiology† , New York University School of Medicine, New York, USA*

Background/Aims: Previous studies have highlighted the importance of matrix metalloproteinases (MMPs) in ulcerogenesis and recently MMPs is reported to be associated with cancer metastasis and carcinogenesis. Little is known about the role of CagA protein in MMPs secretion by *H. pylori* infected gastric epithelial cells. Therefore, we aimed to investigate the mechanism of MMP production in *H. pylori*-infected gastric epithelium. Furthermore, we asked whether the presence of tyrosine phosphorylation of CagA protein might play a role in MMP production by gastric epithelial cells. **Methods:** A pair of isogenic *cagA* strains (one with tyrosine phosphorylation motif and the other without tyrosine phosphorylation motif; 147C and 147A) and *cagA* negative strain (8822) were used for *H. pylori* strains. MMP-1 production by AGS cells were measured by western blot and extracellular signal regulated kinase (ERK) and p38 kinase activation was analyzed in the presence of various inhibitors. Hummingbird phenotype induction was measured according to isogenic *cagA H. pylori* strains. **Results:** *CagA* positive strain showed marked production of MMP-1 by gastric epithelial cells. Presence of tyrosine phosphorylation motif showed higher level of MMP-1 production. MMP-1 production by gastric epithelial cells required activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular signal regulated kinase (ERK), and subsequent protein synthesis, but was down regulated by the alternate MAPK, p38 kinase. **Conclusions:** Taken together, these data showed that secretion of MMP-1 by *H. pylori* infected gastric epithelial cells is differentially regulated by ERK and p38 kinase and dependent of tyrosine phosphorylation of CagA. **(The Korean Journal of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research 2006;6:35-41)**

Key Words: *Helicobacter pylori*, Matrix metalloproteinase, ERK, p38

연세대학교 의과대학 소화기내과, 소화기병연구소, Departments of Medicine* and Microbiology†, New York University School of Medicine

이용찬 · 김지현 · 이인옥 · 정재복
Michael H. Pillinger*, Martin J. Blaser*†

연락처 : 이용찬
서울시 서대문구 신촌동 134번지
우편번호: 120-752
연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: 02-2228-1960
Fax: 02-393-6884
E-mail: leeyc@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 소화성궤양의 일차 발병 원인이며 전정부 위선암의 위험인자다. 그러나 어떤 기전을 통해서 궤양의 발생을 유도하는지에 대한 병인론은 밝혀지지 않았다. 한편, 숙주세포내로 주입된 CagA 단백은 인산화 과정을 거쳐서 숙주세포의 형태 변화를 유도한다는

사실이 알려져 있으나 궤양의 발생과정이나 발암에 있어서 이러한 CagA 단백이 어떤 역할을 할 수 있는지는 아직 규명되지 못하였으며 이에 대한 연구가 필요하다.[1-4]

세포내에서의 CagA 단백의 타이로신 인산화는 숙주 세포내의 신호전달체계의 변화를 가져온다. CagA 단백의 전이와 인산화가 기본적인 숙주신호전달체계에 영향을 주며 세포주기 또는 세포사멸에 영향을 미친다는 사실은 전체의 생물학적 변화가 복잡할 수 있으며 숙주에 따라서 매우 다양한 반응형태를 보일 수 있다는 가능성을 시사한다. 기왕의 연구보고를 보면 단일 위생검조직에서 배양한 단일 *H. pylori* 집락들이 *cagA* 유전자 존재유무 면에서 다를 수 있으며 세포주기의 조절에 있어서 차이를 보였다.[5,6]

위점막의 extracellular matrix는 collagens, lamins, proteoglycans 등의 여러 물질로 구성되어 있다. Collagen 조직은 pepsin 등의 소화효소에 의해서는 분해되지 않지만 matrix metalloproteinase (MMP) 효소에 의해 분해되며 MMP는 이외에 여러 세포외간질조직을 분해할 수 있다. 현재까지 사람에서 23종이 알려져 있으며 연구에 의해 암의 발생, 성장, 침윤과 전이 등에도 관여한다는 것이 밝혀졌다. 따라서 소화성궤양의 발생과정에서 *H. pylori* 감염시 위 점막 상피세포에서 생산되는 MMP 효소에 의한 간질조직의 분해가 궤양 발생을 유도하거나 악화시키는 요인이 될 수 있으며 또한 위암의 발생을 유도하거나 악화시키는 주요한 인자가 될 수 있다. 실제로 *H. pylori*가 감염된 위 상피세포에서 MMP-7의 발현을 유도하며 ERK 활성화가 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다.[7,8] 따라서 *H. pylori*에 의한 상피세포의 MMP 생산에 관여하는 신호전달 과정을 분석하면 위암의 성장과 전이 과정에 미치는 *H. pylori*의 병태생리학적 역할을 규명할 수 있으며, 이 신호전달 과정을 제어하는 치료제의 개발 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

Mitogen activated protein kinase (MAPK)는 중요한 세포내 신호전달경로의 하나다. 외부 자극에 대한 세포의 성장, 사멸 분화에 관여하는 것으로 보고되고 있으며 대표적으로 extracellular signal-regulated kinase (ERK), JNK, p38 kinase의 세 가지로 대별된다. 이 중 ERK는 주로 세포의 성장이나 증식과 관련되며 p38 kinase와 ERK1/2는 각각 상피세포에서 MMP-1의 생산에 관여하는 것으로 보고되고 있으며 독립적으로 MMP-1 promoter의 활성화에 관계한다고 알려져 있다. 따라서 *H. pylori*에 의한 상피세포의 MMP 생산에 MAPK의 역할을 규명한다면 궤양의 발생 및 진행을 억제할 수 있는 새로운 치료제 개발의 가능성을 제시하는 것이다. 이번 연구에서는 실험실에서 배양된 위상피세포주가 *H. pylori*의 자극에 대해서 MMP-1을 생산하는지를 조사하며 이러한 생산에 있어서 대표적 MAP kinase인 ERK와 p38 kinase의 역할을 알아보며 아울러 CagA 단백의 인산화의 역할을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 위상피세포주 배양

위상피세포주인 AGS (ATCC CRL 1739; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)를 100μg/ml penicillin streptomaycin과 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640 배치에서 5% CO2, 37°C로 배양하였다. MMP-1 단백 생산과 ERK 활성화를 측정하기 위해서 세포주를 6 well plate (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)에 각 well당 0.8×10^6/ml 수로 적정한 후 밤새 배양하여 안정시켰다. 실험전에 항균제가 포함되지 않은 신선한 배지로 2회 세척 후 혈청이 포함되지 않은 배지에서 4시간 안정 후 실험에 이용하였다.

2. *H. pylori*의 배양 및 준비

cagA 양성균주로는 임상에서 추출한 Hp147C와 Hp147A 균주를 이용하였다. 음성균주로는 8822 균주를 이용하였다. Hp147C와 Hp147A 균주는 동일환자에서 검출된 균주로서 RFLP와 RAPD 검사상 동일 균주로 확인하였으나 *cagA* 유전자의 3' 위치에 타이로신 인산화부위의 유무에 따라서 다른 hummingbird 표현형을 보이는 한 쌍의 균주다.[9] 8822는 wild type의 *cagA* 음성 균주이다. *H. pylori*는 혈액한천배지에서 배양하며 필요시 상용의 선택배지인 Skirrow's media를 이용하였다. 접종 후 37°C, 5% CO_2 조건하에서 2~3일간 배양하였다.

3. *H. pylori*에 의한 위상피세포의 자극실험

비혈청 포함 배지에서 안정 배양된 위암 세포주를 이용하였다. 계획된 적절한 농도의 kinase 억제제를 배양 배지에 *H. pylori* 자극 30분전에 투여하였다. *H. pylori*는 실험조건에 따라서 50 : 1 또는 100 : 1의 비로 배지에 투여하였다. 세포는 ice cold lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM sodium vanadate, 25 M sodium fluoride, 0.5% (vol/vol) Triton X-100, 2 mM PMSF, 5 KU/ml aprotinin, 10 ug/ml each of chymostatin, antipain, and pepstatin)에서 4°C, 20분간 배양한 뒤 회수하며 well에 남아 있는 세포는 1회용 cell scrapper를 이용하여 회수하였다.

4. Hummingbird 표현형 측정

Hummingbird 표현형을 재기 위해 해당 억제제가 함유되거나 함유되지 않은 비혈청 포함배지에서 다양한 *H. pylori* 균주로 AGS 세포주를 24시간 감염시켰다. 감염 후 phos-

phate buffered saline으로 2회 가볍게 세척 후 광학현미경으로 한 시야에서 100개의 상피세포를 3번씩 검색하여 hummingbird 형태변화가 온 상피세포수를 측정하여 평균값을 취하였다.

5. Western blot

전기염동으로 분리된 단백은 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 semi-dry Western blotting 방법을 이용하여 전이시켰다. 비특이 결합은 3% 탈지분유 TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 137 mM NaCl, and 0.1% Tween)에 용해시킨 차단 버퍼에 넣어서 4°C로 밤새 반응하였다. ERK를 검사하기 위해서는 5% BSA TBS-T를 이용하였다. 블롯은 1차 항체로 상온에서 2 시간 반응 또는 4°C에서 밤새 반응한 후 2차 항체로 반응 후 goat anti-rabbit IgG, 또는 goat anti-mouse IgG conjugated to HRP로 1.5시간 반응하였다. 면역블롯은 제조자의 지시에 따라서 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) 방법으로 확인하였다.

6. MMP-1 생산

위 상피세포주에 다양한 농도의 억제제와 *H. pylori*를 감염시킨 후 회수한 배양 상층액을 centricon centrifugal filter devices (MW cut off 30,000)를 이용하여 4°C, 35분 5,000 RPM으로 원심 분리하여 농축시켰다. 농축된 배양 상층액에 laemmli sample buffer를 가한 뒤 95°C, 5분간 가열한 후 10% SDS가 포함된 polyacrylamide gel에서 전기염동하였다. PVDF membrane에 단백질을 이동하였으며 membrane을 5% 탈지분유가 포함된 TBST (10 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 밤새 차단하였다. 1차 항체로 1 : 200로 희석된 MMP-1 항체를 이용하였다. TBST로 3회 세척한 후 블롯은 1차 항체로 상온에서 2 시간 반응 또는 4°C에서 밤새 반응한 후 2차 항체로 반응 후 goat anti-rabbit IgG, or goat anti- mouse IgG conjugated to HRP로 1.5시간 반응하였다. 면역블롯은 제조자의 지시에 따라서 ECL 방법으로 확인하였다. MEK 억제제로는 UO126 10 uM를, p38 kinase의 억제제로 SB203580 10 uM을 이용하였다.

7. 통계 분석

해당 결과는 3회 이상 반복하여 확인하였다. 필요시 면역블롯의 densitometric값을 측정하여 비교하였다. 통계학적인 분석은 Mann Whitney U test 또는 Student T test를 이용한다. p값이 0.05 미만을 통계적인 유의수준으로 정의하였다.

결 과

1. *H. pylori* 감염에 의한 위상피세포의 ERK1/2의 활성화

*H. pylori*를 AGS에 감염시켰을 때 시간에 따른 ERK1/2의 활성화를 분석하였다. ERK1/2 활성화는, *cagA* 음성 균주인 8822에 비하여 양성인 Hp147C와 Hp147A 균주로 감염시켰을 때 유의하게 높았다(Fig. 1). 한편, *cagA* 양성 균주 중에서도 EPIYA motif가 있는 Hp147C와 EPIYA motif가 없는 Hp147A 균주를 이용하여 타이로신 인산화기의 유무에 따른 ERK1/2활성화를 비교한 결과 시간에 따라 타이로신 인산화기가 있는 Hp147C 균주에 감염된 경우 ERK1/2의 활성

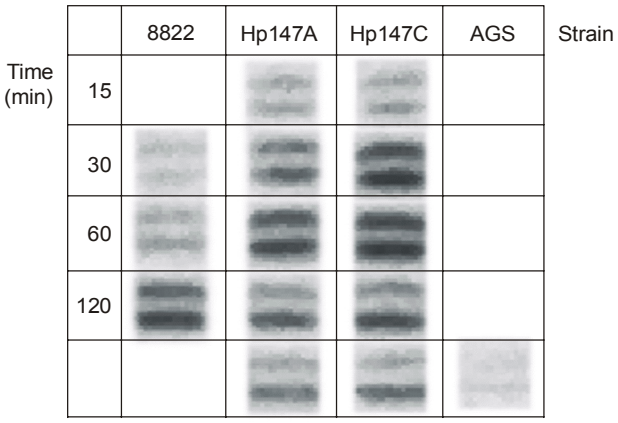

Fig. 1. Time course of phospho-ERK activation of AGS cells by isogenic *cagA H. pylori* strains.

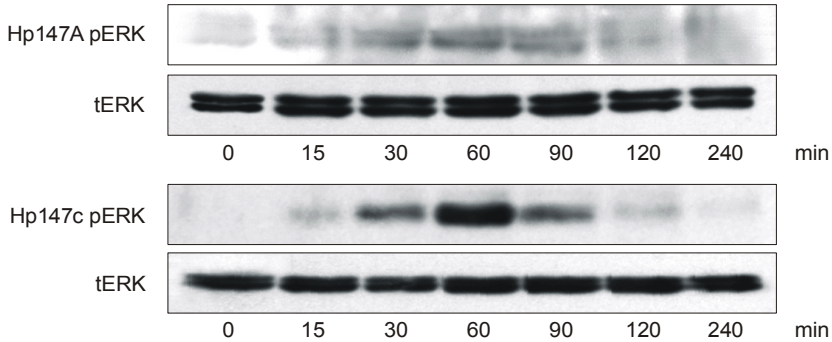

Fig. 2. Time course of phospho-ERK activation of AGS cells by isogenic *cagA* strains, Hp147C and 147A. pERK, phospho ERK; tERK, total ERK.

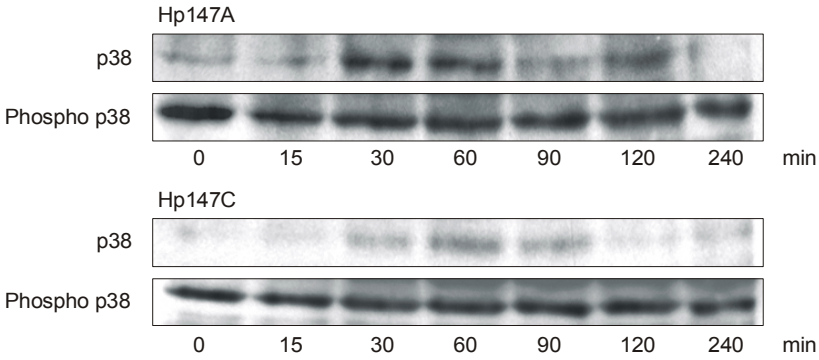

Fig. 3. Time course of phospho-p38 kinase activation of AGS cells by isogenic *cagA* strains, Hp147C and 147A.

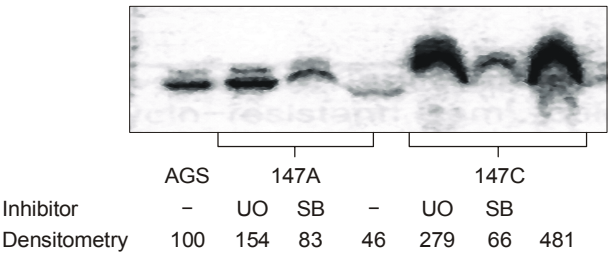

Fig. 4. MMP-1 expression by AGS cells infected by *cagA* isogenic strains and the effect of MAPK inhibitors. UO, UO126; SB, SB203580.

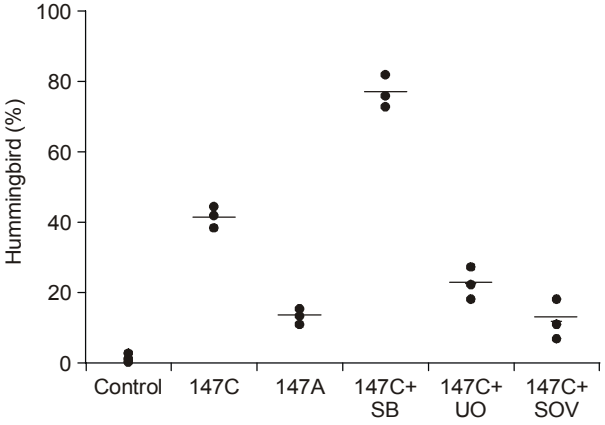

Fig. 5. Hummingbird phenotype induction of AGS cell in response to isogenic *cagA H. pylori* strains. SB, SB203580; UO, UO126; SOV, sodium orthovanadate.

화(인산화)가 유의하게 높았다(Fig. 2).

2. *H. pylori* 감염에 의한 위상피세포의 p38 kinase의 활성화

ERK1/2의 활성화와 비교하기 위해 같은 조건에서 위상피세포의 p38 kinase의 활성화를 분석한 결과, *H. pylori* 감염은 AGS 세포에서 p38 kinase를 활성화시킨다는 것을 확인하였다. 그러나 EPIYA motif가 있는 Hp147C와 EPIYA motif가 없는 Hp147A를 비교하여 타이로신 인산화기의 유무에 따른 p38kinase의 활성화를 비교한 결과 인산화기가 없는 Hp147A 균주 감염때의 활성화가 상대적으로 높았다(Fig. 3).

3. *cagA* 아형별 *H. pylori* 감염 후 MMP-1의 생산

cagA 아형균주인 Hp147C와 Hp147A를 AGS 상피세포에 감염한 후 western blot으로 MMP-1 생산을 조사하였다. 두 균주 모두에 대해 AGS 상피세포의 MMP-1 생산이 증가하였으나 Hp147C를 감염시켰을 때의 MMP-1 생산이 유의하게 높았다. 또한 선택적인 MEK 억제제인 UO126로 전처치한 뒤 감염시킨 경우 MMP-1의 생산이 감소됨을 관찰할 수 있었으며 선택적인 p38 kinase억제제인 SB203580로 전처치한 경우 Hp147C 감염에 대한 AGS상피세포의 MMP-1 생산이 더욱 증가하는 현상을 관찰하였다(Fig. 4).

4. *H. pylori* 감염에 대한 AGS 세포의 hummingbird 표현형 발현에 대한 MAP kinase 억제제의 효과

cagA 아형 균주의 타이로신 인산화에 따른 hummingbird 표현형을 비교하면 타이로신 인산화기를 가진 Hp147C 균주가 Hp147A 균주에 비해 유의하게 많은 양의 hummingbird 표현형을 유도하였다. 한편 p38 kinase억제제인 SB203580로 전처치한 AGS 세포주는 Hp147C로 감염시켰을 때 대조군에 비해 유의하게 hummingbird 표현형이 증가하였으며 이는 Hp147C 단독감염에 비해서도 유의한 차이를 보였다. 반면에 UO126로 전처치하였을 때 hummingbird표현형이 유의하게 감소하였으며 sodium vanadate로 전처치하였을 때에도 hummingbird 표현형이 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

CagA 단백의 전위와 인산화는 숙주인 위상피세포의 신호 전달체계와 연관작용을 세포질내의 actin-cytoskeletal 계

통의 변화를 유발하여 hummingbird라는 숙주세포의 형태학적 변화를 유도한다.[10] CagA 단백은 웨스턴 블롯 검사를 해보면 크기의 다양성을 보이는데 이는 3' 부위의 존재하는 DNA 반복 염기에 의해 결정된다. 이러한 *cagA* 유전자의 3' 부위의 염기서열과 크기의 다양성은 결과적으로 숙주세포내로 전위된 CagA 단백의 타이로신 인산화 정도에 영향을 준다.[11]

연구자는 박테리아 게놈 내의 반복 염기서열 간의 재조합은 타이로신 인산화 부위의 중복 또는 결실을 유도할 수 있다는 것을 발견하였으며 한 개체의 숙주 위점막에서 살고 있는 *H. pylori* 집단 내에는 다양한 *cagA* 유전자를 포함하는 quasispecies군이 존재하며 감염시 숙주 위점막 상피세포내로 다양한 크기의 CagA 단백의 주입을 유발하고 이에 따른 다양한 표현형의 숙주 반응을 유도한다는 사실을 보고하였다.[9] 이는 *H. pylori*의 대표적 병독 유전자인 *cagA* 유전 아형이 *H. pylori* 집단내에 준종족(quasispecies) 상태로 존재하며 위점막 상피 감염시 숙주인 상피 세포의 표현형의 변화를 유발한다는 유전형 변이의 역할을 입증하는 것이다.

Mitogen activated protein kinase (MAPK)는 세포의 성장, 사멸 분화에 관여한다.[12] ERK는 신호전달체계의 인산화를 동반하며 NFkB 전사인자의 활성화와 연관 깊다고 알려져 있으며 이의 선택적 차단제가 항암화학요법의 대상으로 연구되고 있다. JNK/SAPK는 주로 염증반응과 apoptosis에 관여하는 것으로 알려져 있으며 AP1 또는 c-jun homodimer 전사인자를 통해 염증성 사이토카인의 생산 및 활성화와 연관 있는 것으로 알려지며 류마티스성 관절염의 치료제의 한 방편으로 연구되고 있다. p38 kinase는 전염증성 사이토카인, UV 및 스트레스 등에 의해 활성화되며 NF-κB를 제어하여 여러 염증성 사이토카인의 생산을 유도한다고 알려져 있다. 그러나 이러한 단순화된 구도는 근자에 들어와서는 반대되는 연구결과가 나오면서 각 MAP kinase 체계가 조직이나 자극조건에 따라서 다양한 역할을 하는 것으로 생각하고 있다. 특히 stress나 염증반응에 의해 활성화 되는 p38 kinase는 ERK 활성화와 많은 경우에 서로 길항적인 작용을 하고 있어서 이 두 신호전달체계 사이에 cross-talk이 존재한다는 연구보고도 있다.[13] 또한 이들간의 활성도의 비가 암세포의 전이나 조직 침투 정도와 중요한 상관관계를 가진다는 연구보고도 있다. 즉 ERK/p38의 비가 높은 경우 종양의 증식도나 전이율이 높아지며 비가 낮을수록 종양이 잠재적인 안정기에 있다는 것이 실험적으로 여러 종양세포들에서 입증되었으며 이는 p38과 ERK가 신호전달체계에서 길항적인 작용을 할 수 있음을 시사하였다.[14] 이번 연구에서는 *H. pylori* 감염에 따른 위상피세포의 MMP-1 생산에 ERK와 p38 kinase가 깊이 관계하며 상호간에 길항적인 작용을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *H. pylori*에 의한 위상피세포의 특이한 형태변화인 hummingbird 표현형에도 이들 ERK와 p38 kinase가 관여하며 선택적인 억제제를 투여하였을 때 hummingbird표현형의 증가 또는 억제가 현저히 나타났다. 이는 *H. pylori*에 의한 위상피세포의 hummingbird 표현형 유도에 *cagA* 유전자의 타이로신 인산화가 중요한 역할을 한다는 것을 증명한 결과이며 이것이 MMP생산과 연관 지울 수 있다는 가능성을 제시한 결과다.

H. pylori 감염에 따른 위상피세포의 MAPK 활성화 유도는 실험적으로 증명되었다.[15] *H. pylori* 감염은 p38 kinase와 ERK1/2의 활성화를 유도하며 이는 *cagA* 양성 균주에서 더 높은 활성도를 보였다. 또한 MEK 억제제인 PD98059를 사용하여 ERK를 억제하면 *H. pylori*에 의한 세포 사멸이 증가하였으며 bcl-2 유전자의 mRNA 전사의 억제를 동반하였으며 이러한 억제 효과는 *cagA* 양성 균주에서 더 뚜렷함이 보고되었다.[16] *H. pylori*의 MAPK 활성화는 *cagA* 양성 균주가 음성균주에 비해 더 높게 나타남이 보고되었으며 균주의 유전자 유무에 따라 ERK, p38와 NFkB의 활성화가 다름이 관찰되었다.[15] 이번 연구에서 *H. pylori*를 위암 상피세포주에 반응시켰을 때 위암세포에서 p38 kinase와 ERK1/2의 활성화가 시차를 두고 일어났으며 *cagA* 유전자의 인산화 존재여부에 따라 다른 활성화 현상을 확인하여 CagA 단백의 세포 내 인산화가 숙주세포의 세포내 신호전달체계에 변화를 줄 수 있음을 입증하였다. 또한 선택적인 MEK1 억제제를 사용하였을 때 p38 kinase의 인산화가 증가하였으며 p38 kinase 억제제를 사용하였을 때 ERK1/2의 인산화가 증가하는 사실을 관찰하였다. 이는 두 신호전달체계가 서로 독립적으로 다른 기능을 가지는 것보다는 상호간에 밀접한 관계를 가지고 신호 전달되고 있음을 제시한다. *H. pylori* 감염 때 관찰되는 이러한 세포내 MAPK 간의 상호 교차 전달은 *H. pylori*에 감염되었을 때 왜 다양한 위장질환이 발현될 수 있는지에 대한 한가지 해석을 가능하게 한다. 즉 세포의 증식, 사멸 등의 경로가 보다 활성화되는 방향으로 촉진되었을 때 위암의 발생을 이해할 수 있으며 염증성 신호가 활성화되는 방향으로 촉진하였을 때 소화성 궤양 등의 발생이 이루어질 수 있는데 실례로 *H. pylori* 감염은 MAPK cascade를 활성화하며 protooncogen인 c-fos와 c-jun의 발현을 증가시킨다는 사실이 관찰되었으며 이러한 현상은 *cagA* 음성 또는 cag island가 결손된 균주에서는 관찰되지 않아서 *H. pylori*에 의한 발암기전에 중요한 역할을 하리라는 것이 제시되었다.[17] 이런 관점에서 *H. pylori* 감염에서 위 상피세포내 MAPK간의 상호 cross-talk는 매우 흥미로운 연구분야다.

*H. pylori*는 그람 음성 간균으로서 위점막속에서 짧게는

수년간 길게는 일생동안 살아가면서 위십이지장궤양을 유발할 수 있고 위선암의 중요한 인자로 인정받고 있지만 대다수의 감염자는 특별한 증상없이 지내게 된다. 이번 연구를 통해 *H. pylori*가 위상피세포에서 MMP-1의 생산을 유도하는 것을 확인하였는데 이는 *H. pylori*에 의한 위십이지장궤양의 병태생리에 대한 중요한 단서가 될 수 있을 것이다.

이번 연구를 통해 밝혀진 *H. pylori* 균주에 의한 위상피세포의 MMP-1 생산에 관여하는 신호전달 체계인 ERK와 p38 kinase의 상호작용은 선택적인 MAPK 신호전달체계의 제어를 통해 상피세포의 MMP-1 생산을 억제할 수 있다는 것을 제시한다. 이는 나아가서 MAP kinase 신호전달체계의 억제제가 위 십이지장궤양 치료제로서도 이용 될 가능성을 시사한다.

결론으로, 이번 연구를 통해 *H. pylori* 감염때 위상피세포의 MMP-1 생산을 확인하였으며 MMP-1의 생산은 *cagA* 유전자에 의존하며 특히 CagA 단백의 인산화가 중요한 역할을 한다는 것을 증명하였다. 또한 MAPK인 ERK와 p38 kinase가 위상피세포의 MMP-1 생산에 상호길항적인 작용을 한다는 이번 연구결과는 선택적인 MAPK 신호전달체계의 제어를 통한 *H. pylori*연관 위십이지장 질환의 치료 가능성을 제공할 것이다.

요 약

목적: Matrix metalloproteinase (MMP) 효소는 세포외 간질의 여러 물질을 분해 할 수 있는 것으로 알려져 있으며 최근에는 종양의 전이와 암화과정에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 한편 위상피세포의 MMP생산에서 CagA 단백의 역할을 잘 알려져 있지 않다. 이번 연구에서는 *H. pylori*감염 위상피세포의 MMP^{-1} 생산의 기전을 알아보고자 하였으며 또한 CagA 단백의 타이로신 인산화가 MMP^{-1} 생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. **대상 및 방법**: 위상피세포주로 AGS세포를 이용하였으며 *H. pylori*균주로는 *cagA* 유전자 아형균주 Hp147A와 Hp147C 및 *cagA* 음성균주 8822를 사용하였다. 위상피세포의 MMP-1 생산은 배양액에 대한 면역블롯으로 측정하였으며 ERK 및 p38 kinase의 활성화를 다양한 억제제 및 *H. pylori* 균주 감염조건에서 조사하였다. *H. pylori*를 위상피세포에 감염시킨 후 상피세포의 hummingbird 표현형의 변화를 측정하였다. **결과**: *H. pylori*균주는 위상피세포의 MMP-1 생산을 유도하였으며 이는 특히 *cagA* 양성균주에서 뚜렷하였다. *cagA* 유전자의 타이로신 인산화 존재는 유의하게 MMP-1 생산과 관련있었다. 위상피세포의 MMP-1 생산은 ERK 억제제에 의해 저하되었으며 p38 kinase에 의해 항진되었다. 또한 p38 kinase억제제는 유의하게 위상피세포의 hummingbird 표현형 증가를 유도하였다. **결론**: *H. pylori*에 의한 위상피세포의 MMP-1 생산은 전위된 CagA 단백의 타이로신 인산화에 의존하였으며 ERK와 p38 kinases의 상호길항작용에 의해 조절되었다.

색인단어: *Helicobacter pylori*, Matrix metalloproteinase, ERK, p38

감사의 글

이 논문은 2003년도 연세대학교 의과대학 장기해외연수교수 연구비 및 2003년도 소화기병연구소 학술기금의 지원을 받아 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. Alm RA, Ling LS, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999;397:176-180.
2. Ochman H, Moran NA. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. Science 2001;292: 1096-1099.
3. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, et al. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 1998;28:37-53.
4. Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 93:14648-14653.
5. Asahi M, Azuma T, Ito S, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J Exp Med 2000;191:592-603.
6. Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. Cancer Res 1999;59:6124-6131.
7. Crawford HC, Krishna US, Israel DA, Matrisian LM, Washington MK, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. Gastroenterology 2003;125:1125-1136.
8. Bebb JR, Letley DP, Thomas RJ, et al. *Helicobacter pylori* upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells in vivo and in vitro in a Cag dependent manner. Gut 2003;52:1408-1413.
9. Aras RA, Lee Y, Kim SK, Israel D, Peek RM, Blaser MJ. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. J Inf Dis 2003; 188:486-496.
10. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fisher W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science 2002;287;1497-1500.

11. Puls J, Fischer W, Haas R. Activation of *Helicobacter pylori* cagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. Mol Microbiol 2002;43:961-970.
12. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002;298:1911-1912.
13. Xiao YQ, Malcolm K, Worthen GS, Gardai S, Schiemann WP, Fadok VA. Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta. J Biol Chem 2002;277:14884-14893.
14. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK (MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38 (SAPK). Cancer Res 2003;63:1684-1695.
15. Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM Jr, Murray PG, Kelly CP. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- *Helicobacter pylori*. J Immunol 1999;163:5552-5559.
16. Choi IJ, Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase1 and 2 pathway on apoptosis and bcl-2 expression in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells. Infect Immun 2003;71:830-837.
17. Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. J Biol Chem 2000;275:16064-16072.