

H. pylori 감염 위 상피세포에서
cyclooxygenase-2와
inducible nitric oxide synthase에
대한 신호변환체계

연세대학교 대학원

의과학과

조순욱

H. pylori 감염 위 상피세포에서
cyclooxygenase-2와
inducible nitric oxide synthase에
대한 신호변환체계

지도교수 김 경 환

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학과

조 순 옥

조순옥의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

지난 2년 동안 많은 것을 배울 수 있는 시간이었습니다. 많이 부족한 저에게 오늘이 있도록 도와주시고 힘이 되어주신 많은 분들께 깊이 감사드립니다. 먼저 저에게 연구할 기회를 주시고 지도해 주신 김혜영 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 많은 격려와 관심으로 이끌어주신 김경환 선생님께 감사드립니다.

보다 좋은 연구를 위하여 많은 조언을 해주시고, 배려 해주셨던 약리학 교실의 안영수 교수님, 김동구 교수님, 이민구 교수님, 박경수 교수님, 김철훈 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 심사위원으로 제 연구에 관심을 가져주시고 아낌없는 조언을 해주신 이용찬 교수님 감사합니다.

지난 2년이 넘는 시간동안 실험에 대해 많은 도움과 조언을 해주셨던 정혜연 선생님, 서정연 선생님, 유지훈 선생님, 서지혜 선생님, 이장원 선생님 감사드립니다. 그리고 비슷한 시기에 입학해서 어려울 때 힘이 되어주고 많은 것들을 도와주신 주경돈 선생님, 차보람 선생님, 이종화 선생님, 심동휘 선생님 감사합니다.

아무것도 모르던 저에게 처음 실험을 가르쳐 주시느라 정말 고생 많이 하신, 지금은 미국에 계신 임주원 선생님께 감사드립니다.

교실에서 편하게 생활할 수 있도록 도와주신 임종수 선생님, 김건태 선생님, 민선해 선생님 감사합니다. 그리고 2년간 함께 생활했던 약리학 교실에 좋은 선배님들과 친구들에게 감사드립니다.

그리고 마지막으로 지금까지 키워주시고 공부할 수 있도록 도와주신 저의 부모님과 동생 돈윤이에게 감사드립니다.

목 차

국문요약	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. <i>H. pylori</i> 균주 및 배양조건	5
2. 위 상피세포 배양 및 <i>H. pylori</i> 자극	5
3. 세포핵 추출액	5
4. 쉘 단백질 분획 이동	6
5. c-Jun, c-Fos, COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현 측정	7
6. 유전자 transfection	8
7. Western blotting	9
8. Prostaglandin E ₂ 측정	9
9. Nitrite 측정	9
10. 통계처리	10
III. 결 과	11
1. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 c-Jun과 c-Fos의 mRNA 및 단백 발현 변동	11
2. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 핵전사인자의 활성 변	

동	12
3. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 COX-2와 iNOS의 mRNA 및 단백 발현 변동	13
4. 염증 매개 효소 발현에 대한 Ras 및 핵전사인자 활성과의 상관관계	14
5. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E ₂ 생성	16
6. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E ₂ 생성에 대한 Ras 및 핵전사인자 활성과의 상관 관계	17
 IV. 고 찰	 19
V. 결 론	22
참고문헌	23
영문요약	27

그림 차례

- 그림 1.** *H. pylori* 자극에 의한 c-Jun과 c-Fos의 mRNA 및 단백질 발현 11
- 그림 2.** *H. pylori* 자극에 의한 세포내 AP-1, NF- κ B 활성화 변동 12
- 그림 3.** *H. pylori* 자극에 의한 COX-2와 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현 13
- 그림 4.** *H. pylori* 자극에 의한 세포내 COX-2와 iNOS 발현 증가에 대한 Ras 및 핵전사인자와의 상관관계 14
- 그림 5.** *H. pylori* 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E₂ 생성 16
- 그림 6.** *H. pylori* 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E₂ 생성에 대한 Ras 및 핵전사인자 활성화와의 상관관계 18
- 그림 7.** *H. pylori* 감염으로 인하여 위 상피세포에서 iNOS와 COX-2 발현에 관여할 것으로 추정되는 신호변환체계 20

국문요약

H. pylori 감염 위 상피세포에서 cyclooxygenase-2와 inducible nitric oxide synthase에 대한 신호변환체계

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 다양한 위장관질환을 일으키는 원인균으로 알려져 있다. *H. pylori* 감염에 의해 증가하는 활성산소는 핵전사인자인 AP-1과 NF- κ B의 활성을 증가시키고, 염증매개 유전자 발현에 기여한다고 알려져 있다. AP-1과 NF- κ B는 염증 매개 효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 promoter 부위에 결합 부위를 갖고 있다. 본 연구에서는 한국인 십이지장 궤양 환자의 점막에서 분리한 *H. pylori* 균주인 HP99를 사람 위 상피세포주인 AGS에 감염시켜 *H. pylori*에 의한 AGS 세포의 핵전사조절인자의 활성 변동을 규명하고자 하였다. 아울러 핵전사조절인자의 활성을 염증매개효소의 발현 변동에 의해 규명하고자 하였다. 먼저 핵전사조절인자의 활성을 측정 한 결과, NF- κ B와 AP-1의 활성 증가를 확인하였다. 그리고 *H. pylori* 감염에 의해 COX-2 및 iNOS의 발현이 증가됨을 확인하였다. *H. pylori*에 의한 AGS 세포의 COX-2 및 iNOS 발현 증가가 어떤 핵전사인자에 의하여 매개되는지 여부를 알아보기 위하여, I κ B 변이 유전자인 MAD3 또는 c-Jun 및 Ras의 dominant negative 유전자인 TAM67, Ras N-17 유전자를 세포내로 transfection 시킴으로서 NF- κ B, AP-1 그리고 Ras의 활성화를 각각 억제시킨 결과 COX-2 및 iNOS 발현이 억제되었다. 이상의 결과로 보아 위 상피세포에서 *H. pylori*는 Ras, AP-1 그리고 NF- κ B를 활성화시키고, 이는 COX-2 및 iNOS의 발현을 유도함을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과로 iNOS의 생성물인 nitrite와 COX-2의 생성물인 PGE₂ 단백질이 증가함을 알 수

있었다.

핵심 되는 말: *Helicobacter pylori*, COX-2, iNOS, 위 상피세포, AP-1,
Nuclear factor kappa B(NF- κ B)

***H. pylori* 감염 위 상피세포에서
cyclooxygenase-2와 inducible nitric oxide synthase에
대한 신호변환체계**

<지도교수 김 경 환 >

연세대학교 대학원 의과학과

조 순 옥

I . 서 론

1983년 사람의 위생검 조직으로부터 *Helicobacter pylori*(*H. pylori*)가 배양되었다는 최초의 보고 이후 이 균에 대한 많은 연구가 진행되어 *H. pylori*가 만성 위염의 원인인자임과 동시에 소화성 궤양 재발의 중요한 원인이 될 뿐만 아니라, 위암종 및 위림프종과도 관련이 있음이 밝혀지게 되었다.¹ *H. pylori*는 한국인 성인의 80%이상이 감염된 것으로 알려져 있으며, 인체 위점막 상피에 군집을 이룬다.² *H. pylori*를 박멸할 경우 소화성 궤양이 회복되며 이는 *H. pylori*가 소화성 궤양의 중요 병인임을 의미한다.³ *H. pylori* 감염의 초기단계에는 lamina propria내 호중구의 증가를 보이고, 만성적으로 진행된 상태에서는 림프구, 형질세포, 호산구 등의 증가가 관찰된다.⁴

Activator protein-1(AP-1)은 세포질 내에 존재하며, 세포가 자극을 받았을 때 핵 안으로 이동된 후 DNA motif에 결합될 때 비로소 활성을 나타내어 유효단백질(effector protein) 합성을 촉진한다. AP-1은 주로

Fos/Jun heterodimer 또는 homodimer로 이루어져 있으며, TRE(TPA responsive element) motif 에 결합할 때 유전자 전사를 개시한다. AP-1은 growth factor, tumor promoter, cytokine등에 의하여 활성화되며, 염증관련 유전자 발현의 중요한 핵전사인자로 보고되고 있다.⁵ AP-1은 세포에 따라서 산화 조건 또는 항산화 조건에 의하여 활성화되는 세포 특이성을 보인다. 최근까지의 보고들을 종합하면 *H. pylori* 감염에 의해 활성산소가 증가됨은 거의 확실시되고 있으며, *H. pylori* 감염에 의한 활성산소의 증가는 염증매개 유전자 발현에 기여하리라 생각된다. AP-1이 위상피세포에서 산화조건에 의하여 활성화 된다면, 이를 위한 신호전달과정에서 AP-1이 관여할 가능성이 높다.

NF- κ B는 세포의 성장과 분화, 염증반응, 면역반응에 중요한 유전자들의 발현을 조절하는 transcription factor이다.⁶ NF- κ B는 비자극상태에서 세포질내 존재하며 I κ B와 결합체를 이루고 있다가, 세포가 자극을 받았을 경우 비활성 결합체로부터 I κ B가 분리되어 핵 안으로 이동된 후 DNA motif에 결합될 때 비로소 활성을 나타낸다.⁷ NF- κ B에 의하여 유도되는 유전자는 cytokine, growth factor, 흡착분자(adhesion molecule), acute phase 단백 등이다.^{8,9} 활성산소인 과산화수소(H_2O_2)는 NF- κ B를 활성화시키는 대표적인 외부자극이다. 그러므로 *H. pylori* 감염에 의한 활성산소의 증가는 AP-1의 활성화뿐만 아니라 NF- κ B도 관여한다고 보고되었다.¹⁰

Nitric oxide(NO)는 반 필수 아미노산인 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase에 의하여 생성되며 체세포에서 여러 생리 및 병리작용을 매개함이 밝혀지고 있다. NO synthase(NOS)는 Ca^{2+} 과 NADPH 의존성 constitutive NOS(cNOS)와 cytokine 등의 자극물질에 의하여 합성이 유도되며 Ca^{2+} 비의존성인 inducible NOS(iNOS)로 구분된다. iNOS에 의해 생성되는 과량의 NO는 tyrosine과 쉽게 반응하여 nitrotyrosine의 조직 내 축적을 유발한다. *H. pylori* 감염 위궤양 환자의 위점막에서 nitrotyrosine 염색이 진하게 나타남은 iNOS의 활성화를 간접적으로 제시해주고 있다.¹¹

Cyclooxygenase(COX)는 constitutive한 COX-1과 cytokines, mitogen, endotoxin에 의하여 유도되는 COX-2로 구분된다. 정상조직에서 COX-1은 위점막 통합성을 유지하는 prostaglandin(PG)을 생성하며, endotoxin이나 IL-1에 반응하여 유도되는 COX-2는 염증조직에서 PG와 thromboxane(TX) 생성을 동시에 증가시킨다. PG는 위점막 혈류를 증가시키고 mucus와 bicarbonate를 분비시켜 점막보호 작용을 한다. 최근에는 COX-2가 *H. pylori*로 인한 세포독성과 염증반응으로부터 위점막을 보호하기 위한 방어 및 회복기전(defence and repair)으로 보고되었다.¹² 그러나 COX-2에 의해 세포 보호 작용과 상반되는 혈소판 응집과 혈관수축을 일으키는 TX 생성이 증가되므로 PG/TX의 비율이 COX-2의 위점막 방어 또는 손상을 좌우하는 요인으로 생각된다.¹³

AP-1과 iNOS에 관한 연구로는, demyelinating disease의 병리에서 AP-1의 활성이 iNOS mRNA의 발현에 관여한다고 Giri등(2002)⁵이 보고하였으며, 심근세포 손상에서 AP-1이 cytokine 유도에 의한 NO 생성을 조절한다고 보고하였다.¹⁰ *H. pylori*에 의한 궤양 유도물질이 iNOS에 의해 생성되는 과량의 NO와 활성산소의 복합체인 peroxynitrite일 것으로 추정된다.¹¹ 이는 과량의 NO와 tyrosin이 쉽게 반응하여 생성된 nitrotyrosine이 *H. pylori* 감염 위궤양 환자의 위점막에서 증가한다는 보고로 추측할 수 있다.¹⁴

AP-1의 활성이 COX-2 발현과 염증 및 세포증식과 관계된다는 연구는 유방암 세포, 대장상피세포 및 연골세포 등에서 보고되었다.¹⁵ 인체 상피세포에서 COX-2 발현은 비정상적으로 생성되는 prostaglandin 이성체와 thromboxane으로 인하여 염증반응을 증폭시키고, AP-1 과 C/EBP 또는 NF- κ B 등의 다른 핵전사인자와도 상호작용함이 보고되었다.^{5,16}

본 연구는 한국인 십이지장 환자의 점막에서 분리한 *H. pylori*를 이용하여 이를 감염시킨 세포주에서 iNOS와 COX-2의 발현 변동을 알아보고 iNOS와 COX-2의 발현 변동에 대한 핵전사인자 및 Ras 활성과의 상관

관계를 밝힘으로써 *H. pylori*에 의한 위점막손상 기전의 신호변환체계를 규명하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. *H. pylori* 균주 및 배양조건

한국형 *Helicobacter pylori*(*Campylobacter pyloridis*)은 CLO test를 거친 십이지장 궤양 환자의 점막으로부터 분리하여 규명한 HP99를 사용하였으며,¹⁷ 2%(v/v) fetal calf serum을 함유한 brucella broth에서 호기조건으로 37°C, 18시간 shaking (150rpm)하면서 배양하였다.⁹

2. 위 상피세포 배양 및 *H. pylori* 자극

사람의 위암 세포주인 AGS (gastric adenocarcinoma, ATCC CRL 1739)는 ATCC에서 구입하였다. 배지는 10% fetal bovine serum, 100U/mi penicillin과 100µg/ml streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포는 1×10^6 cell/well로 6-well tissue culture plate에 seeding하며 한 well당 1ml의 배지를 분주하여 1일간 배양하였다. *H. pylori*에 의한 자극 전 각 well은 항생제가 함유되지 않은 신선한 배지 1ml로 2회 세척하였다. Chocolate agar로부터 bacterial cell을 떼어내어 원심분리하여 harvest한 후, antibiotic-free배지에 재분산하고 배양하고 있는 세포에 bacterium/cell비율이 300:1이 되도록 첨가하였다 (volume:1ml). 배양 후, 상층액은 nitrite, PGE₂측정에 사용하였으며, 세포는 c-Jun과 c-Fos, 그리고 iNOS와 COX-2 발현을 위한 추출액을 제조하였다. AP-1과 NF-κB 활성 측정을 위한 세포핵 추출액을 준비하였다.

3. 세포핵 추출액

핵 단백질은 Lee 등¹⁸의 방법에 따라 얻었다. 요약하면 *H. pylori*를 처치한 세포를 모은 다음 차가운 PBS 용액으로 씻어주고 1 packed cell volume(PCV)의 저장성 완충액 A(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM

MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 µg/ml *leupeptin*, 1 µg/ml *aprotinin*)에서 부유시켰다. 부유된 세포들은 얼음 위에서 10분간 놓아둔 후 26-gauge 바늘에 5번 통과시켜 세포막을 파괴시켰다. Microcentrifuge에서 원심분리하여 핵을 침전시킨 후, 얻은 핵을 완충액 A로 두 번 씻어 주었다. 그 후 핵 침전물에 2/3 PCV의 차가운 완충액 B(20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25% *glycerol*, 1 µg/ml *leupeptin*, 1 µg/ml *aprotinin*)를 넣어 얼음 위에 30분간 방치하고 자주 진탕해 주어 핵단백질이 추출되도록 하였다.¹⁹ 얼음에 차가운 2/3 PCV의 완충액 C(10 mM HEPES, pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 µg/ml *leupeptin*, 1 µg/ml *aprotinin*)를 튜브에 첨가한 후, 15,000 xg로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이와 같이 얻은 핵 추출물을 새로운 튜브에 분주하고 -70°C에서 보관하였다. 시료의 단백질 농도는 Bradford법으로 정량하였다.²⁰

4. 젤 단백질 분획 이동

핵전사 단백질인 NF-κB의 활성화 정도는 Xu 등의 방법²¹을 변형한 젤 단백질 분획 이동법(*electrophoretic mobility shift assay*)을 통해 확인하였다. [γ -³²P]-ATP를 소식자로 표지한 NF-κB consensus *oligonucleotide*(5' -AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3') 0.0175 pmoles(>10⁴ CPM)와 1 µg의 *poly dI·dC*를 포함한 20 µl의 *binding buffer*(10 mM *Tris-HCl*, pH 7.6, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% *glycerol*)를 5 µg의 핵 단백질과 섞어주었다. 얼음 위에서 30분간 반응시킨 다음, 반응물을 6% *non-denaturing* 젤에 부하하였다. 부하 전 200 V에서 1시간 먼저 전기영동한 후, 부하 후 180 V에서 2시간 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝나면 *gel*을 건조시킨 후 자가 방사법으로 기록하였다.

AP-1의 활성화는 AP-1 consensus oligonucleotide(5' -CGCTTGAT AGTCAGCCGGAA-3')를 이용하는 것 외에는 NF- κ B DNA binding activity를 확인할 때와 동일한 방법으로 수행하였다.

5. c-Jun, c-Fos, COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현 측정

mRNA 발현은 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction ; RT-PCR)을 이용하여 측정하였으며, 내부대조물질로서 β -Actin을 같이 증폭하여 실험하였다. 총 RNA를 guanidium isothiocyanate 추출법에 의하여 분리한 후, random hexamer 50pg, each deoxynucleotide triphosphatase (dNTP) 500M, RNase inhibitor 25U, Reverse transcriptase 200U를 함유한 반응액에 RNA 2 μ g를 넣어 최종 양이 25 μ l가 되도록 맞추어 넣고 37 $^{\circ}$ C에 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. RNA 160ng과 동량의 cDNA를 각 c-Jun, c-Fos, COX-2, iNOS에 특이한 primer와 β -Actin에 특이한 primer 및 Tag polymerase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 중합효소반응법을 하였다. 중합효소 반응법은 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 29-35 cycle로 c-Jun, c-Fos, COX-2, iNOS에 대한 mRNA를 증폭시켰다. c-Jun의 primer sequences는 5' -CCGAAGGCTAGTGCGATGTTTC-3' (forward primer), 5' -ACTTGATGCAATCCAACTTTGAA-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 106 염기쌍이었다. c-Fos의 primer sequences는 5' -AGTGACCGTGCTCCTACCCAG-3' (forward primer), 5' -AGACCAGAGGTTGCTCAGAACG-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 467 염기쌍이었다. COX-2의 primer sequences는 5' -TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3' (forward primer), 5' -AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 305 염기쌍이었다.²² iNOS의 primer sequences는 5' -CTGCATGGATAAGTACAGG

CTGAGC-3' (*forward primer*), 5' -AGCTTCTGATCAATGTCATGAGCAA-3' (*reverse primer*)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 225 염기쌍이었다.²³ β -Actin의 *primer sequences*는 5' -ACCAACTGGGACGACATGGAG-3' (*forward primer*), 5' -GTGAGGATCTTCA TGAGGTAGTC-3' (*reverse primer*)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 353 염기쌍이었다.²⁴ 중합효소반응법을 한 후 중합효소반응 생성물을 0.5 μ g/ml ethidium bromide를 함유한 1.5% agarose 겔에 부하시킨 뒤 전기영동하여 UV 투조상에서 c-Jun, c-Fos, COX-2, iNOS mRNA에 대한 발현양을 측정하였다.²⁵

6. 유전자 transfection

위 상피세포는 6×10^5 cell/well로 6-well tissue culture plate에 seeding 하여 6-7시간동안 37°C에서 배양하였다. NF- κ B, AP-1과 COX-2, iNOS의 관계를 알아보기 위하여 Ras, c-Jun 및 I κ B α 의 발현을 억제하는 dominant negative mutant gene인 rasN-17²⁶, TAM67^{27,28} 각각과 NF- κ B 활성화에 필요한 I κ B 인산화를 억제하는 I κ B mutant gene인 MAD3 유전자²⁹ 그리고 control vector로는 pcDNA3(Invitrogen, Groningen, Netherland)를 DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl ammonium methylsulfate) (Boehringer-Mannheim, Pentzberg, Germany)을 이용하여 15-18시간동안 37°C에서 transfection 시키고 *H. pylori*를 처치하였다. 24시간 처치한 후, 배양액내 human PGE₂를 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 측정하였으며, NO₂ 측정 방법으로 측정하였다. mRNA 발현은 4시간 처치 후, 역전사 중합효소반응법으로 측정하였고, 단백 발현은 8시간 후에 Western blotting 방법으로 측정하였다.

7. Western blotting

세포를 차가운 PBS로 두 번 씻은 다음 50 mM Tris, pH 7.2, 2 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.2 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin이 포함된 단백질 추출 완충액을 넣고 얼음 위에서 10분간 방치하였다. 그 후 추출 완충액을 회수하여 15,000 xg에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 얻어 단백질 정량을 하였다. 100µg의 단백질을 10% polyacrylamide 젤 전기영동으로 분리하고, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 5% 탈지분유로 blocking한 후 c-Jun (1:1000; sc-44), COX-2 (1:1000; sc-19999) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), c-Fos (1:500; Catalog # 06-341) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), 그리고 iNOS (1:1000; Catalog # N32030) (Transduction Laboratories, San Diego)와 anti-rabbit이나 anti-mouse secondary antibody (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)를 연이어 반응시켰다. 신호의 검출을 위해 secondary antibody는 horse radish peroxidase가 달려있는 IgG를 사용하였고, 발광반응의 측정에 enhanced chemiluminescence kit(Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)을 사용하였다.

8. Prostaglandin E₂ 측정

AGS 세포에 HP99를 처치하고 24시간 후에 세포의 배양액을 취하였다. 배양액 내의 PGE₂양은 ELISA kit(R&D, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다.

9. Nitrite 측정

Nitrite는 Misko 등(1993)의 방법²⁹을 이용하여, 배양액을 Greiss reagent(1% sulfanilic acid, 5% phosphoric acid, 0.1% naphthylethylene

diamine dihydrochloride의 혼합액)에 혼합 후 상온에서 10-30분 반응시킨다. Nitrite와 반응된 혼합물을 spectrophotometer로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 통계처리

모든 값은 "평균값 \pm 표준오차(mean \pm S.E.)"로서 표현하고, 각 실험군 간의 변화 양상을 비교 검토하기 위해서 analysis of variance를 응용하고, F 값이 의의가 있을 때에는 Fisher's least significant difference법으로 각 군의 값을 비교하였다. 또한 Student's *t*-test가 알맞을 때에는 그 방법을 이용하고, 어느 경우든지 P 값이 0.05이하일 때에는 의의있는 변동으로 규정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. *H. pylori* 자극에 의한 c-Jun과 c-Fos의 mRNA 및 단백질 발현 변동

AGS 세포에 *HP99*를 처치한 후 각각의 시간에서 AGS 세포의 c-Jun 또는 c-Fos mRNA 및 단백질 발현을 각각 역전사 증합효소연쇄반응법 및 Western blotting법을 이용하여 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori*에 의한 c-Jun의 발현에서는 mRNA 발현이 30분부터 1시간까지 증가하였다. 그리고 c-Jun의 단백질 생성의 증가는 1시간부터 2시간에 가장 높게 증가하였다(그림 1A). *H. pylori* 자극에 의한 c-Fos의 mRNA 발현 증가는 30분에 가장 증가하였다. 그리고 단백질 발현은 1시간에 가장 증가하였다(그림 1B).

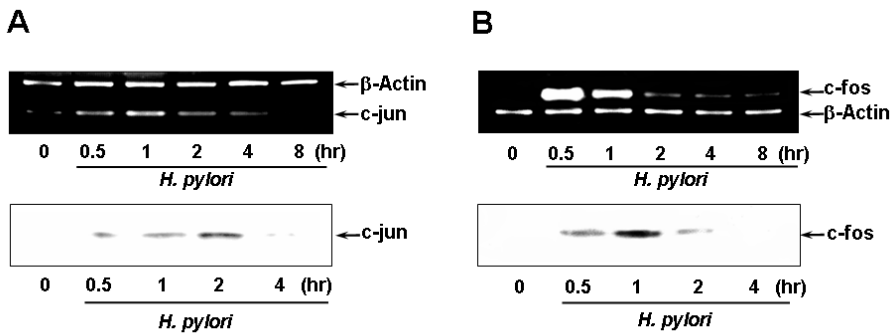


그림 1. *H. pylori*의 자극에 의한 c-Jun과 c-Fos의 mRNA 및 단백질 발현. A. AGS 세포에 *HP99*로 자극을 준 뒤 세포에서 total RNA를 분리하여, 역전사 증합효소반응법을 이용하여 c-Jun에 대한 mRNA 발현을 8시간까지 측정하였다. AGS 세포에 *HP99*로 자극을 준 뒤 세포에서 protein을 분리하여, Western blotting법을 이용하여 단백질 발현을 4시간까지 측정하였다. B. AGS 세포에 *HP99*로 자극을 준 뒤 total RNA 및 단백질 분리 후 역전사증합효소반응법과 Western blotting법을 이용하여 c-Fos의 mRNA 발현과 단백질 발현을 측정하였다.

2. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 핵전사인자의 활성 변동

H. pylori 자극에 의한 AGS 세포의 핵전사인자의 활성을 젤 단백질 이동법을 이용하여 측정하였다. *H. pylori*의 자극에 의한 AGS 세포에서의 AP-1의 활성은 1시간에서 가장 높게 나타내었다. 또한, NF- κ B의 활성은 1시간에 가장 높게 나타내었다(그림 2).

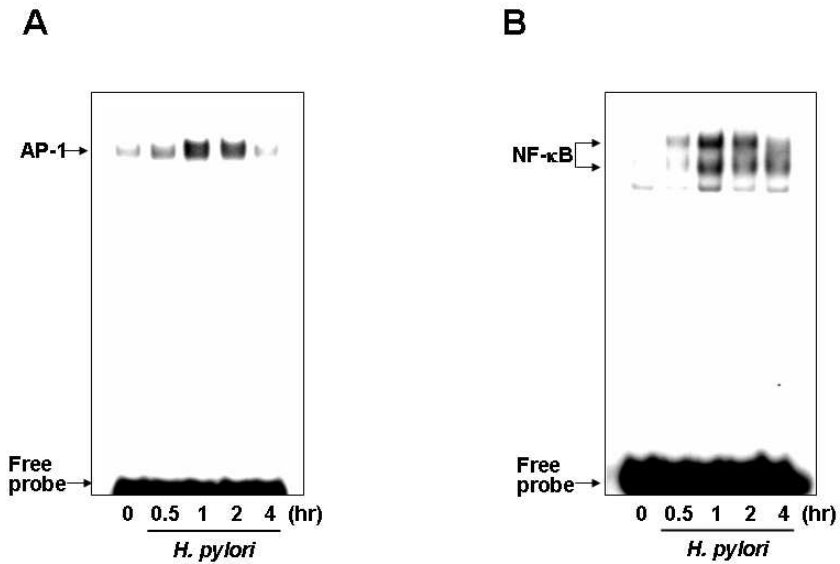


그림 2. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 AP-1, NF- κ B 활성 변동. *H. pylori* 로 AGS 세포를 자극한 후 세포에서 핵 추출물을 분리하여 AP-1(A), NF- κ B(B)에 대한 젤 지연분석법을 시행하여 *H. pylori*에 의한 AGS 세포의 핵전사인자의 활성 변동을 측정하였다.

3. *H. pylori* 자극에 의한 COX-2와 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현 변동

AGS 세포에 *HP99*를 투여한 다음 해당 시간에서 AGS 세포의 COX-2 또는 iNOS mRNA 및 단백질의 발현을 각각 역전사 중합효소연쇄반응법 및 Western blotting법을 이용하여 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori*에 의한 COX-2의 발현에서는 mRNA 발현이 2시간 이후부터 증가하였다. 그리고 COX-2의 단백질 생성의 증가는 4시간 이후부터 증가하였다(그림 3A). *H. pylori* 자극에 의한 iNOS의 mRNA 발현 역시 2시간 이후부터 증가하였다. 또한, 단백질 발현 역시 시간에 따라 증가하였다(그림 3B).

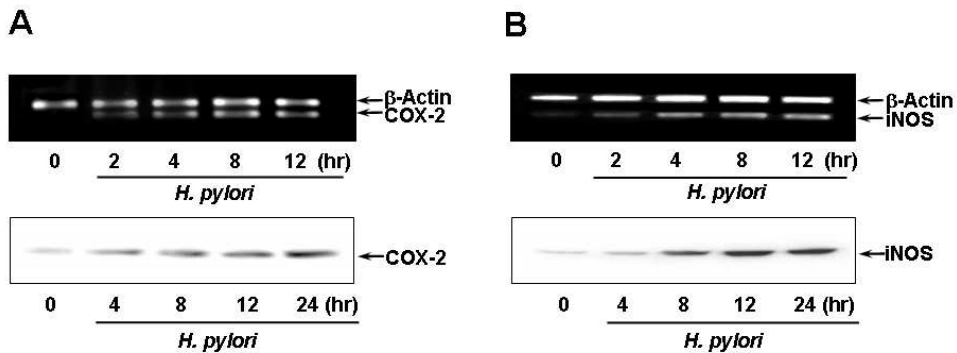


그림 3. *H. pylori*의 자극에 의한 COX-2와 iNOS mRNA 및 단백질의 발현. A. AGS 세포에 *HP99*로 자극 후 세포에서 total RNA를 분리하여, 역전사중합효소반응법을 이용하여 COX-2의 mRNA 발현을 12시간까지 측정하였다. AGS 세포에 *HP99*로 자극 후 세포에서 단백질을 분리하여, Western blotting법을 이용하여 단백질 발현을 24시간까지 측정하였다. B. AGS 세포에 *HP99*로 자극 후 total RNA 및 단백질 분리 후 역전사중합효소반응법과 Western blotting법을 이용하여 iNOS의 mRNA 발현과 단백질 발현을 측정하였다.

4. 염증 매개 효소 발현에 대한 Ras 및 핵전사인자 활성과의 상관관계

H. pylori 자극에 의한 COX-2 및 iNOS의 발현 증가가 Ras 그리고 핵전사인자인 AP-1 및 NF- κ B에 의하여 매개되는지를 알아보기 위하여 Ras에 대한 dominant negative mutant 유전자인 *rasN-17* 유전자를 세포에 transient transfection시켜 Ras의 활성 증가를 억제시키거나, c-Jun의 dominant negative mutant 유전자인 TAM67 유전자 그리고 I κ B α 의 인산화되는 부위인 serine 32와 36 부위를 alanine으로 치환함으로써 인산화에 의한 I κ B α 의 분해를 억제시켜 NF- κ B의 활성화를 억제하는 I κ B의 mutant 유전자인 MAD3 유전자를 세포에 transient transfection시켜 AP-1 또는 NF- κ B의 활성 증가를 억제시킨 뒤 *H. pylori*로 자극시키고, COX-2 및 iNOS의 mRNA 또는 단백질 발현 변화를 측정 한 결과 *H. pylori*에 의한 COX-2의 발현 증가는 *rasN-17*과 TAM67 그리고 MAD3 유전자의 transfection에 의해서는 *H. pylori*에 의한 COX-2의 발현 증가가 억제되었다(그림 4A). 그리고 iNOS의 mRNA 발현과 단백질 발현도 COX-2와 유사하게 *rasN-17*과 TAM67 그리고 MAD3 유전자의 transfection에 의해서 모두 iNOS의 발현 증가가 억제되었다(그림 4B). 그러므로 *H. pylori* 균주에 의한 COX-2와 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현 증가는 Ras, AP-1, NF- κ B에 의하여 매개됨을 알 수 있었다.

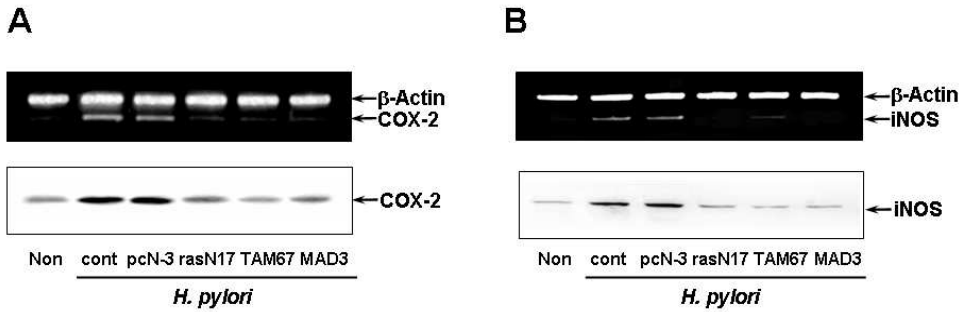


그림 4. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 COX-2와 iNOS 발현 증가에 대한 Ras 및 핵전사인자와의 상관관계. A. AGS 세포에 rasN-17, TAM67 또는 IκB mutant 유전자를 함유한 vector 그리고 control vector를 18시간 동안 transient하게 transfection 시키고 *H. pylori*로 12시간 동안 자극한 후 세포의 mRNA를 분리하여, COX-2에 대한 역전사 증합효소연쇄반응법을 행하였다. AGS 세포에 rasN-17, TAM67 또는 IκB mutant 유전자를 내재한 vector 그리고 control vector를 18시간 동안 transient하게 transfection 시키고 *H. pylori*로 24시간 동안 자극한 후 세포의 단백을 분리하여, COX-2에 대한 Western blotting법을 시행하였다. B. AGS 세포에 rasN-17, TAM67 또는 IκB mutant 유전자를 내재한 vector 그리고 control vector를 18시간 동안 transient하게 transfection 시키고 *H. pylori*로 12시간, 24시간 동안 자극한 후 COX-2와 같은 방법으로 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현을 측정하였다. none은 *H. pylori*로 자극하지도 않고 transfection 시키지 않은 AGS 세포, Control은 transfection 시키지 않은 AGS 세포, Vector는 Vector만 transfection시킨 AGS 세포.

5. *H. pylori* 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E₂ 생성

H. pylori 자극에 의한 AGS 세포의 nitrite 생성을 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori* 자극한 배지내 nitrite양(nmol/10⁶ cells)은 배양 0, 4, 8, 12, 24시간에서 각각 0.65±0.14, 1.96±0.09, 2.22±0.04, 2.27±0.03, 2.72±0.07로 측정되어 시간 의존적으로 nitrite양이 증가함을 알 수 있었다(그림 5A).

AGS 세포에서 *H. pylori* 자극한 후 세포 배양액을 분리하여 ELISA법을 이용하여 prostaglandin E₂(PGE₂) 단백질의 양을 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori* 자극한 배지내 PGE₂ 단백질양(pg/10⁶ cells)은 각각의 배양 0, 4, 8, 12, 24시간에서 13.07±4.12, 36.91±5.51, 47.95±3.26, 60.57±5.63, 92.30±6.13으로 측정되어 시간 의존적으로 PGE₂ 단백질이 증가함을 알 수 있었다(그림 5B).

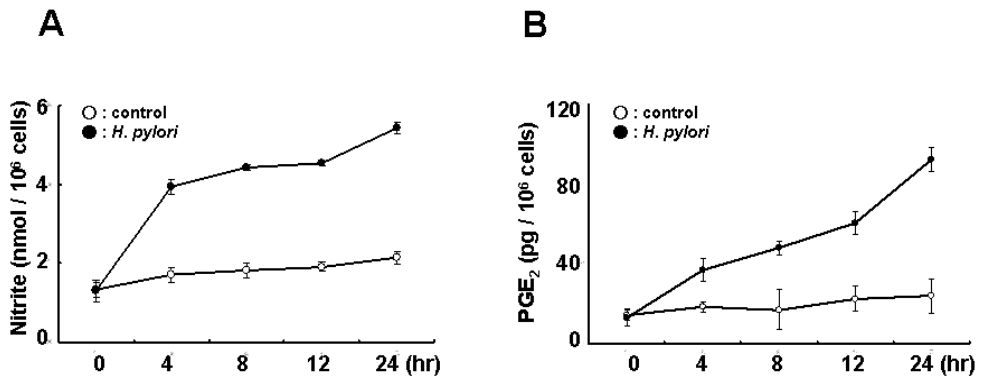


그림 5. *H. pylori* 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E₂ 생성. A. AGS 세포에 HP99로 자극 후 시간에 따라 세포 배양액을 분리하여, nitrite양을 24시간까지 측정하였다. B. AGS 세포에 HP99로 자극 후 시간에 따라 세포 배양액을 분리하여, PGE₂ 단백질의 양을 24시간까지 측정하였다. 각각의 양은 평균±평균오차로 표시하였다. control = *H. pylori* 을 처치하지 않은 군, *H. pylori* = *H. pylori* 을 처치한 군.

6. *H. pylori* 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E₂ 생성 발현에 대한 Ras 및 핵전사인자 활성과의 상관관계

H. pylori 자극에 의한 COX-2 및 iNOS의 발현 증가가 Ras 그리고 핵전사인자인 AP-1 및 NF-κB에 의하여 매개됨을 알아보았다. *H. pylori* 자극에 의한 AGS 세포의 nitrite 생성과 PGE₂ 단백질의 생성이 Ras 및 핵전사인자 활성과의 상관관계를 알아보기 위하여 Ras에 대한 dominant negative mutant 유전자인 rasN-17 유전자를 세포에 transient transfection시켜 Ras의 활성 증가를 억제시키거나, c-Jun의 dominant negative mutant 유전자인 TAM67 유전자 그리고 IκBα의 인산화되는 부위인 serine 32와 36 부위를 alanine으로 치환함으로써 인산화에 의한 IκBα의 분해를 억제시켜 NF-κB의 활성화를 억제하는 IκB의 mutant 유전자인 MAD3 유전자를 세포에 transient transfection시켜 AP-1 또는 NF-κB의 활성 증가를 억제시킨 뒤 *H. pylori*로 자극시키고 *H. pylori* 자극에 의한 AGS 세포의 nitrite 생성을 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori* 자극한 배지내 nitrite양 (nmol/10⁶ cells)은 Ras, AP-1, NF-κB에 의하여 매개됨을 알 수 있었다(그림 6A).

AGS 세포에서 *H. pylori* 자극한 후 세포 배양액을 분리하여 ELISA법을 이용하여 PGE₂ 단백질의 양을 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori* 자극한 배지내 PGE₂ 단백질양 (pg/10⁶ cells) 또한, Ras, AP-1, NF-κB에 의하여 매개됨을 알 수 있었다(그림 6B).

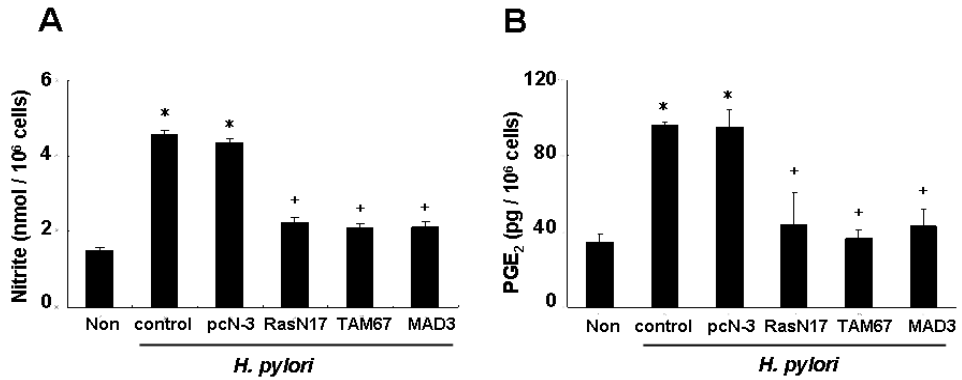


그림 6. *H. pylori* 자극에 의한 nitrite와 prostaglandin E₂ 생성에 대한 Ras 및 핵전사인자 활성과의 상관관계. **A.** AGS 세포에 *rasN17*, TAM67 또는 IκB mutant 유전자를 함유한 vector 그리고 control vector를 18시간 동안 transient하게 transfection 시키고 *H. pylori*로 24시간 동안 자극한 후 세포배양액을 분리하여, 배양액내에 있는 nitrite양을 측정하였다. **B.** AGS 세포에 *rasN17*, TAM67 또는 I-κB mutant 유전자를 함유한 vector 그리고 control vector를 18시간 동안 transient하게 transfection 시키고 *H. pylori*로 24시간 동안 자극한 후 세포의 배양액을 분리하여 배양액내에 있는 PGE₂ 단백질의 양을 측정하였다. 단백질양은 평균 ±표준오차로 나타내었다. *P<0.05 vs none, ⁺P<0.05 vs control. none은 *H. pylori*로 자극하지도 않고 transfection 시키지 않은 AGS 세포, Control은 transfection 시키지 않은 AGS 세포, Vector는 Vector만 transfection 시킨 AGS 세포.

IV. 고 찰

*H. pylori*는 만성 B형 간염, 소화성 궤양, 위선암 및 위림프종 발생의 위험인자로 인식되고 있다. *H. pylori* 감염에 의해 증가하는 활성산소는 핵전사인자인 AP-1과 NF- κ B의 활성을 증가시키고, 염증매개 유전자 발현에 기여한다고 알려져 있다. 염증 매개 효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 promoter 부위에는 AP-1과 NF- κ B 결합 부위를 갖고 있다. 우선 본 연구에서 한국인 십이지장 궤양 환자의 점막에서 분리한 *H. pylori* 균주인 HP99를 인체 위 상피 세포주인 AGS에 감염시켜 *H. pylori* 감염에 의한 AGS 세포의 c-Jun과 c-Fos의 mRNA 발현과 단백 생성이 증가함을 확인하였다. AP-1은 주로 Fos/Jun heterodimer 또는 homodimer로 이루어져 있다고 알려져 있다. *H. pylori* 감염에 의해 AGS 세포의 활성화된 AP-1은 c-Jun과 c-Fos로 이루어져 있으며, *H. pylori* 감염에 의하여 핵으로 이동하여 활성화 된다.³¹ 본 연구에서는 *H. pylori* 감염에 의하여 AP-1이 활성화 될 뿐 아니라, AP-1의 구성요소인 c-Jun과 c-Fos의 발현이 감염 30분부터 증가됨을 밝혔다. 이는 *H. pylori* 감염이 지속적으로 AP-1을 활성화시킴으로서 염증을 매개함을 나타내 주는 결과이다. 본 연구에서는 c-Jun과 c-Fos가 모두 *H. pylori* 감염 초기에 발현이 시작되었으며, 다른 보고에 의하면 NIH 3T3 세포에서 c-Fos 단백질이 1시간부터 발현되었다.³² *H. pylori* 감염에 의한 AGS 세포의 COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현과 단백 생성, NF- κ B와 AP-1의 활성도를 측정 한 결과 *H. pylori* 감염에 의한 AGS 세포의 NF- κ B와 AP-1의 활성의 증가와 COX-2 및 iNOS 발현의 증가를 확인할 수 있었다.

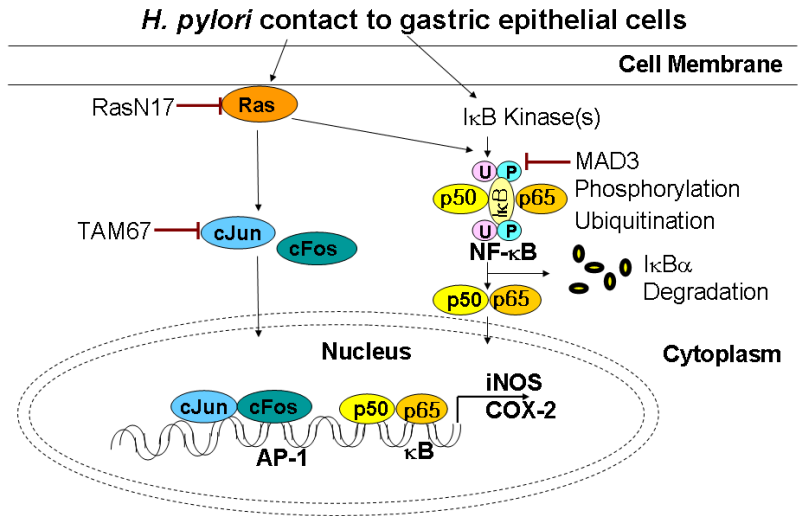


그림7. *H. pylori* 감염으로 인하여 위 상피세포에서 iNOS와 COX-2 발현에 관여할 것으로 추정되는 신호변환체계

NF-κB는 면역이나 염증관련 자극에 의하여 다양한 유전자의 활성을 조절하는 전사조절인자로서 Rel family에 속하며, p50, p52, Rel (c-Rel), Rel A(p65) 및 Rel B 등이 알려져 있다. 활성화된 NF-κB의 전형적인 형태는 p65와 p50의 heterodimer로서 알려져 있고, *H. pylori* 감염에 의해 AGS 세포의 활성화된 NF-κB는 p65/p50 heterodimer와 p50 homodimer 임이 보고되었다.³³ *H. pylori*에 의한 AGS 세포의 COX-2 및 iNOS 발현 증가가 어떤 핵전사인자에 의하여 매개되는지 여부를 알아보기 위하여, IκB mutant 유전자인 MAD3 또는 c-Jun 및 Ras의 dominant negative 유전자인 rasN-17, TAM67 유전자를 세포내로 transfection 시켜 각각 NF-κB, AP-1 그리고 Ras의 활성화를 억제시킨 후 COX-2 및 iNOS 발현을 측정하였다. NF-κB, AP-1 그리고 Ras의 활성화를 억제시킨 결과 COX-2와 iNOS 발현이 감소함을 확인할 수 있었고, 따라서 이와 같은 실험 결과로서 COX-2와 iNOS 발현이 NF-κB, AP-1 그리고 Ras에 의해

매개됨을 알 수 있었다. Ras의 dominant negative 유전자인 rasN-17로 Ras의 활성화를 억제한 결과 NF- κ B, AP-1의 활성화가 감소되었다는 보고⁹를 통해 Ras가 NF- κ B, AP-1을 조절한다는 것을 알 수 있다. iNOS의 생성물인 nitrite와 COX-2의 생성물인 PGE₂ 단백질 측정결과 역시 *H. pylori* 감염에 의해 발현이 증가하고, NF- κ B, AP-1 그리고 Ras에 의해 생성이 매개됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 위 상피세포에서 *H. pylori*는 Ras, AP-1, 그리고 NF- κ B를 활성화시키고, 이는 COX-2 및 iNOS의 발현을 유도함을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과로 iNOS의 생성물인 nitrite와 COX-2의 생성물인 PGE₂ 단백질이 증가함을 알 수 있었다.

V. 결 론

*Helicobacter pylori*에 의한 위상피세포 손상의 기전 연구는 인체의 위상피세포주인 AGS를 대상으로 하여 한국형 *H. pylori*인 HP99 균주를 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 c-Jun과 c-Fos의 발현을 증가시켰다.
2. *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 AP-1과 NF- κ B 활성을 증가시켰다.
3. *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 iNOS와 COX-2의 발현을 증가시켰다.
4. *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 iNOS와 COX-2의 발현 증가는 Ras, AP-1, NF- κ B의 활성화에 의하여 매개되었다.
5. *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 iNOS의 생성물인 nitrite와 COX-2의 생성물인 PGE₂의 생성을 증가시켰다.
6. *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 Nitrite와 PGE₂의 생성의 증가는 Ras, AP-1, NF- κ B의 활성화에 의하여 매개되었다.

결론적으로 한국형 *H. pylori*인 HP99 균주는 AP-1 및 NF- κ B 활성을 증가시키며, Ras, AP-1 및 NF- κ B 활성을 매개하여 iNOS와 COX-2의 발현이 유도되었다. 또한 iNOS의 생성물인 nitrite와 COX-2의 생성물인 PGE₂의 생성을 증가시킴으로써 *H. pylori*에 의한 소화기 염증 관련 질환이 유도됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastro-intestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37.
2. Blaser MJ. Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1987;93:371-383.
3. Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1989;96:615-625.
4. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990;161:626-633.
5. Giri S, Jatana M, Rattan R, Won JS, Singh I, Singh AK. Galactosylsphingosine-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase via AP-1 and C/EBP. *FASEB J* 2002;16:661-672.
6. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Eng J Med* 1997;336:1066-1071.
7. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF- κ B/Rel and I κ B gene families : mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996;74:749-769.
8. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers L. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45(1):7-17.
9. Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF- κ B and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS

- cells. *Lab Invest* 2004;84:49-62.
10. Zingarelli B, Hake PW, Yang Z, O'Connor M, Denenberg A, Wong HR. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF- κ B and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *FASEB J* 2002;16:327-342.
 11. Guzik TJ, Korb R, ADAMEK-GUZIŁ. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:469-487.
 12. John LW, Pallavi RD. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Brit J Pharmacol* 2005;145:275-282.
 13. Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2005;56:57-73.
 14. Olivares D, Gisbert JP, Pajares JM. *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:505-520.
 15. Peter CK, Joanna K, Jan WK, Agnieszka N, Stanislaw JK, Eckhart GH. *H. pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR α and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. *Med Sci Monit* 2003;9:SR65-SR78.
 16. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 2001;408:243-268.
 17. Kim JS, Jung HS, Kim JM, Song IS, Kim CY. Interleukin-8

- expression by human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:1249-1255.
18. Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T. MEKK1 activates both I κ B kinase α and I κ B kinase β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(16):9319-9324.
 19. Li, JJ, Westergaard C, Ghosh P, Colburn NH. Inhibitors of both nuclear factor- κ B and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response. *Cancer Res* 1997;57:3569-3576.
 20. Bradford JC, Duszenkova IV, Nagradova NK. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
 21. Xu J, Wu Y, He L, Yang Y, Moore SA, Hsu CY. Regulation of cytokine-induced iNOS expression by a hairpin oligonucleotide in murine cerebral endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:349-397.
 22. Hla T, Neilson KO. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7384-7388.
 23. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994;269:6765-6772.
 24. Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene : interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;82:6133-6137.
 25. Lim JW, Kim H, Kim HK. Cell adhesion-related gene expression

- by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial AGS cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1284-1296.
26. Cai H, Szeberenyi J, Cooper GM. Effect of a dominant inhibitory *Ha-ras* mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1990;10:5314-5323.
 27. Brown PH, Chen TK, Birrer MJ. Mechanism of action of a dominant-negative mutant of c-Jun. *Oncogene* 1994;9:791-799.
 28. Brown PH, Alani R, Preis LH. Suppression of oncogene-induced transformation by a deletion mutant of c-jun. *Oncogene* 1993;8:877-886.
 29. Traenckne EB, Pahl HL, Henkel T. Phosphorylation of human I κ B α serines 32 and 36 controls I κ B α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 1995;14:2876-2883.
 30. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 1993;214:11-16.
 31. Chu SH, Kim H, Seo JY, et al. Role of NF- κ B and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells. *Dig Dis Sci* 2003;48:257-265.
 32. Paula M, Javier HL, Ruth JL, Maria DC, J Silvio G. Regulation of the Transcription Activity of c-Fos by ERK. *J Biol Chem* 2005;280:35081-35084.
 33. Kim H, Seo JY, Kim KH. Effects of mannitol and dimethylthiourea on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production in gastric epithelial cells. *Pharmacology* 1999;59:201-211.

Abstract

Signal transduction for the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells

Soon Ok Cho

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by professor Kyung Hwan Kim)

Helicobacter pylori infection leads to gastroduodenal inflammation, peptic ulcer, and gastric carcinoma. Oxygen radicals are important regulators in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-induced gastric disease, COX-2 and iNOS might be regulated by oxidant-sensitive transcription factors, NF- κ B and AP-1. Cyclooxygenase-2(COX-2) and inducible nitric oxide synthase(iNOS) are important enzymes that mediate inflammatory processes. In addition, the binding sites for NF- κ B and AP-1 are found in the promoter region of COX-2 and iNOS gene. Present study was aimed to investigate whether *H. pylori*-induced expressions of COX-2 and iNOS are regulated by NF- κ B and AP-1 in gastric epithelial AGS cells, and whether the transcriptional regulation of COX-2 and iNOS are inhibited by transfection with mutant genes for Ras(ras N-17), c-Jun(TAM67), and I κ B α (MAD3). As a result, *H. pylori* induced activation NF- κ B and AP-1 and thus COX-2 and iNOS expressions were induced in gastric epithelial cells. Transfection with

mutant genes for Ras(ras N-17), c-Jun(TAM67), and I κ B α (MAD3) inhibited *H. pylori*-induced COX-2 and iNOS expression in AGS cells. In conclusion, *H. pylori* induced the expression of mRNA and protein of COX-2 and iNOS via activation of ras, NF- κ B, and AP-1.

Key Words : *Helicobacter pylori*, COX-2, iNOS, AGS cell,
Nuclear factor kappa B(NF- κ B), AP-1