담석증에서 분자생물학적 방법을 통한 *Helicobacter* species 등 세균 감염에 대한 역할규명

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 돈 행

담석증에서 분자생물학적 방법을 통한 *Helicobacter* species 등 세균 감염에 대한 역할규명

지도 송 시 영 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 돈 행

이돈행의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 격려와 충고로 지도하여 주신 강진경 교수님과 송시영 부교수님께 진심으로 감사드리며 본 연구와 논문을 위하여 자상하신 배려와 아낌없는 조언으로 이끌어 주신 이경원 부교수님, 김호근 부교수님, 이우정 부교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 본 실험을 위한 자문에 많은 도움을 주신 연세대학교 원주의대 이동기 부교수님과 본 실험을 성심으로 도와준 인하대병원 소화기내과 최미숙 선생에게도 진심으로 감사를 드립니다. 아울러 물심양면으로 성원해 주신 인하대병원 소화기내과학교실의 모든 교수님들께 감사를 드립니다.

항상 사랑으로 보살펴 주시는 부모님, 장인, 장모님께 감사드리며, 이 논문의 결실의 기쁨을 사랑하는 아내와 건우, 건학, 건준이와 함께 나누고자 합니다.

저 자 씀

차 례

그 림 차 례

표 차 례

국문요약

담석증에서 분자생물학적 방법을 통한 *Helicobacter* species 등 세균 감염에 대한 역할규명

담석 중 갈색석의 병인으로 세균감염이 하나의 원인으로 인정받고 있지만 콜레스테롤석의 형성은 세균감염과는 무관한 것으로 생각되어 왔다. 그러나 최근 분자생물학적 방법으로 혼합콜레스테롤석의 대부분에서 세균 DNA가 추출됨으로써 세균감염이 콜레스테롤석의 형성에도 관여하며, *E. coli*와 같은 그람음성 균주의 감염이 주된 원인으로 생각되고 있다. 한편, 최근에는 여러 소화기질환에서 *Helicobacter pylori* (이하 *H. pylori*)에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있으며 새로운 종류의 *Helicobacter*들도 발견되고 있다. 담석증을 포함한 담도질환에서도 *H. pylori* 또는 *H. pylori*에 대한 특이 항체가 있음이 발견되었고, 만성 담낭염 환자의 담낭점막과 담즙에서 *Helicobacter* sp.가 검출되어 이 균주들이 담낭질환과 관련이 있을 것이라고 추측되고 있다. 그러나 아직까지 담석자체에서 *Helicobacter*가 검출된 보고는 없으며 더욱이 담석증환자에서 담낭점막, 담석 및 담즙에서 체계적으로 *Helicobacter* sp.를 검출한 연구는 국내외적으로 매우 드물다.

이에 본 연구에서는 콜레스테롤석의 병인으로 세균감염의 역할을 규명하고자 세균 16S rRNA에 대한 primer로 세균의 존재를 규명하고 그 균주를 동정하고자 하며, 담석증 환자의 담석자체와 담즙, 담낭점막에서 *Helicobacter*에 특이적인 primer를 이용하여 *H. pylori*를 포함한 hepatic *Helicobacter* sp.의 감염여부를 확인하고 염기서열 분석을 통하여 그 균주를 규명하고자 하였다.

증상 담낭담석증으로 인하대병원에 입원하여 수술적 담낭제거술을 시행 받은 58예를 대상으로 하였으며 담석, 담즙 및 담낭점막을 무균적으로 채취하였다. 담석은 내부를 잘게 갈고, 담즙 및 담낭점막에서 DNA를 추출한 후 세균의 16S rRNA에 대한 primer로 PCR을 시행하였다. 담석에서 검출된 DNA는 *E. coli* specific β-glucuronidase gene (*uidA*)에 대한 primer로 nested PCR을 시행하였고 또한 직접 염기서열 분석을 하여 세균을 동정하였다. 검출된 세균 DNA는 *Helicobacter* genus 특이 primer로 PCR을 시행한 후 *H. pylori*의 26 kDa 표면항원에 대한 primer로 PCR을 시행한 후 직접 염기서열 분석을 통해 균을 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상환자 58예의 담석을 육안적 성상 및 콜레스테롤 함량에 의거해 분류한 결과 순수콜레스테롤석은 10예, 혼합 콜레스테롤석 36예 및 갈색석 12예이었다.

2. 36예의 혼합 콜레스테롤석에서 bacterial 16S rRNA에 대한 PCR결과 25예(69.4%)에서 양성으로 관찰되었나 순수콜레스테롤 담석에서는 10예 중 1예(10%)에서만 양성으로 나타났다. 갈색석에서는 9예(75%)에서 세균 DNA가 검출되었다.

3. 세균 PCR 양성인 26예를 대상으로 *E. coli (uidA)*의 primer를 이용한 nested PCR결과 23예(88.4%)에서 양성으로 관찰되어 검출된 세균의 대부분은 *E. coli*이었다. 또한 담석에서 검출된 PCR 산물 중 17예에 대해서는 직접 염기서열분석을 시행하였는데 8개의 담석에서 *E. coli*에 대한 염기서열로 분석되었고 5예에서는 *Pseudomonas*로 2예는 *Citrobacter* sp., 2예

는 *Klebsiella* sp.로 판정되었다.

4. 콜레스테롤석 46예 및 12예의 갈색석을 포함한 총 58예 중 세균 DNA가 검출된 35예의 담석에서 *Helicobacter* genus 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 시행한 결과 4예(11.4%)에서 양성을 보였다. 담즙(48예)에서는 24예(50%)에서 세균 DNA가 검출되었으며 *Helicobacter* sp.는 6예(25%)에서 검출되었다. 담낭점막(46예)에서는 18예에서 세균 DNA (39.1%)가 검출되었고 이중 5예(27.7%)에서 *Helicobacter* sp.에 양성이었다. 따라서 *Helicobacter* sp. 검출률은 담석에서는 4/58 (6.8%), 담즙 6/48 (12.5%), 담낭점막은 5/46 (10.8%)이었다.

5. *Helicobacter* 16S rRNA로 증폭된 PCR 산물을 *H. pylori*의 26 kDa 표면항원에 대한 primer로 PCR한 결과 담석 4예 중 4예, 담즙은 6예 중 5예, 담낭점막은 5예 중 3예에서 검출되었다.

6. *Helicobacter* 16S rRNA amplicon (400 base pair)에 대한 직접 염기서열을 분석한 후 NCBI의 BLAST의 염기서열과 일치하는 세균을 찾아본 결과 담석에서는 4예 모두가 *H. pylori*와 100% 일치하였다. 담즙은 6예 중 5예에서 *H. pylori*와 일치하였고, 담낭 점막에서는 5예 중 3예에서 *H. pylori*와 일치하였다.

이상의 결과로 혼합콜레스테롤석의 대부분에서 세균 DNA가 검출되어 혼합콜레스테롤석의 형성에 세균감염이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 담석증 환자의 담석, 담즙, 담낭 점막에서 *H. pylori*가 발견되었음은 지금까지 위십이장질환에 주된 관련이 있다고 알려져 왔던 *H. pylori*가 담석증을 포함한 담도계 질환의 한 원인으로 작용할 수 있음을 시사하는 중요한 소견으로 생각되며, 향후 이 균주가 어떤 경로로 담도계로 유입되었는지 또는 다양한 담도계 질환과의 상관관계에 대한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 콜레스테롤석, 병인, 세균 감염, 헬리코박터 감염

담석증에서 분자생물학적 방법을 통한 *Helicobacter* species 등 세균 감염에 대한 역할규명

＜지도 송 시 영 교수＞

연세대학교 대학원 의과학사업단

이 돈 행

I. 서 론

담석과 관련된 질환으로 전 인류의 약 10%가 고통을 받고 있고, 점차 그 빈도가 증가하고 있으나 담석 생성기전에 관한 많은 연구에도 불구하고 아직 그 원인은 확실하지 않다.

담석은 화학적 구성성분과 외형적 모양과 성상에 따라 주로 콜레스테롤 담석과 색소성 담석으로 분류하고 콜레스테롤석은 콜레스테롤 함유정도에 따라 순수콜레스테롤석(콜레스테롤＞90%)과 혼합 콜레스테롤석(콜레스테롤 55 90%)으로 분류하고 색소성담석은 흑색색소성 담석(흑색석, black pigment gallstone)과 갈색색소성 담석(갈색석, brown pigment gallstone)으로 분류한다.[1,2]

담석의 생성에 있어서 갈색석은 그 기전이 담즙의 세균 감염이 주된 원인으로 생각되고 있지만,[3-5] 지금까지 콜레스테롤석의 생성기전과 담도계 세균 감염과의 연관에 관한 연구는 드무며, 콜레스테롤석 형성을 결정하는 세가지 주요인자로 콜레스테롤 과포화, cholesterol monohydrate결정의 핵화(nucleation)과정, 담낭의 기능저하 등으로 설명되어 왔다.[6-8] 콜레스테롤석 생성에서 세균 감염의 역할이 배제되는 근거로는 콜레스테롤석 환자의 담즙에서 세균이 거의 검출되지 않고 결석의 전자현미경적 관찰에서 세균을 찾아보기 어렵다는 점이다. 그러나 콜레스테롤석내 세균존재의 증명에 사용되어 왔던 전자현미경적 관찰, 담즙 및 담석의 배양[9-11]에는 한계점이 있기 때문에 최근 Swidsinski 등[12]은 담석내 세균의 DNA를 추출하여 PCR로 콜레스테롤석내 세균의 존재를 최초로 증명하였다. 즉 콜레스테롤 성분이 70 90%인 담석의 대부분에서 세균감염을 증명하여 콜레스테롤석 생성에 있어서 기존의 병인과는 다른 세균감염의 가능성을 새롭게 주장하였으며, Lee 등[13]도 같은 방법으로 혼합 콜레스테롤석에서 *E. coli, Pseudomonas* 등의 세균을 검출하였다. 따라서 혼합 콜레스테롤석의 생성기전은 기존에 알려져 왔던 콜레스테롤석 생성기전인 콜레스테롤 과포화와 더불

어 갈색석의 생성기전인 담즙감염이 관여할 것으로 생각되고 있다.

1983년 Warren과 Marshall[14]이 인체 위에서 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*; 이하 *H. pylori*)를 처음으로 분리 배양하였으며, 인체 간담도 질환에서 *H. pylori* 이외에도 다른 *Helicobacter* sp.를 검출한 보고가 증가되고 있는데,[15-21] 담즙에서 PCR로 *H. pylori*의 존재를 발견하였고[15] 담석증 환자의 담즙에서 *H. pylori*에 대한 특이 항체가 있음이 보고되고[17] *H. pylori* 감염이 담석형성을 증가시키는 하나의 인자일 가능성이 제시되고 있다. 최근에는 만성담낭염 환자의 담낭점막과 담즙의 일부에서 *H. pylori*가 아닌 *H. bilis, H. pullorum, F. rappini* 등과 같은 bile-resistant hepatic *Helicobacter* sp.를 검출하여 이들이 담낭질환 특히 담낭암과 관련이 있을 것이라고 보고되고 있으나,[18] 독일의 비슷한 연구에서는 *Helicobacter* sp.가 검출되지 않아 지역적 또는 인종간에 차이가 있을 가능성을 시사하였다.[19]

우리나라는 *H. pylori*의 만연지역이며 세균감염이 주된 원인으로 알려진 갈색석이 많아 혹시는 담석증에서도 *H. pylori*의 감염이 존재할 가능성이 있으나. 아직까지 담석자체에서 *H. pylori*를 포함하여 *Helicobacter* sp. 검출에 대한 연구는 없다. 또한 지금까지의 연구는 담즙에서 주로 이루어졌으며 담낭점막에서 *Helicobacter* sp.의 존재를 규명한 것도 극히 드물다.

따라서 본 연구에서는 콜레스테롤석에서 세균감염의 유무와 그 균주를 알아보고, 담석증 환자의 담석은 물론 담낭점막 및 담즙에서 *Helicobacter* sp.의 존재여부를 *Helicobacter*에 특이적인 primer를 이용하여 증폭하여 이들의 검출 여부를 확인하고 이의 염기서열 분석을 통하여 이미 알려진 여러 가지 *Helicobacter* sp.중 어떤 균주인지를 규명하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

1999년 8월부터 2000년 6월까지 인하대병원에 증상 담낭담석증으로 입원하여 수술적 담낭제거술을 시행 받은 58예를 대상으로 하였으며 남자 21예, 여자 37예, 연령분포는 31 77세(평균 55.4세)였다.

2. 방법

가. 담석, 담즙 및 담낭조직의 채취

담낭 담석증으로 입원한 환자를 대상으로 담석은 수술적방법으로 무균적으로 채취하여 −20°C의 냉장고에 보관하였다. 담즙은 수술중 담낭을 천자하여 무균적으로 채취하였으며 즉시 세균 감염여부를 판정하기 위해 배양을 시행하고 배양 양성인 경우는 담석에서의 세균 DNA의 검출시 위양성을 배제하기 위해 대상에서 제외하였다. 절제된 담낭에서 1.5× 1.5 ㎝ 크기의 담낭조직을 얻어 즉시 액체질소에 넣어 얼린 후 −70°C 냉장고에 보

관하였다.

나. 담석의 콜레스테롤 함량 분석

Boehringer Mannheim (Manheim, Germany)사의 콜레스테롤 농도 측정 kit를 사용하여 담석의 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 분쇄된 담석 5 mg을 취하여 DMF (N,N-Dimethyl Formamide)/DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 5 ml에 섞은 후 이 용액 중 200 μl을 2.5 ml의 반응용액(ammonium phosphate buffer (pH 7.0), methanol, catalase, acetylacetone, ethanol), 20 μl cholesterol oxidase를 넣고 잘 섞은 후 37°C 항온기에 두었다. 1시간 후 항온기에서 꺼내 상온에서 식힌 후 Beckman DU® 650 spectrophotometer (California, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 콜레스테롤 (1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg)을 isopropanol에 녹여 만든 후 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하고 콜레스테롤 표준 곡선을 만들었다(Fig. 1).

각 담석의 흡광도 수치를 콜레스테롤 표준 곡선에 대입하여 각 담석의 콜레스테롤 함량을 구하였다.

다. DNA 추출

(1) 담석으로부터 DNA 추출: −20°C에 보관하였던 담석을 PBS (phosphate buffered saline)로 씻어준 후 멸균된 수술용 칼을 이용하여 담석을 잘라 안쪽 부분을 긁어모았다. 약 200 mg 정도의 부순 담석에 1% SDS (sodium dodecyl sulfate)을 포함하는 lysis buffer (10 mM Tris (pH 8.5), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) 1 ml를 넣고 상온에서 12시간 이상 shaking했다. 이후 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻고 그 상층액에 7 M Lithium Chloride 용액이 1.5 M이 되도록 첨가하고 잘 섞은 후 3시간 이상 상온에서 shaking한 후 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 취해 QIAamp DNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 DNA를 정제했다. 상층액에 1/2양의 100% 에탄올을 넣고 잘 섞은 후 silica gel membrane이 들어 있는 QIAamp spin column에 담고 8,000 rpm에서 1분 동

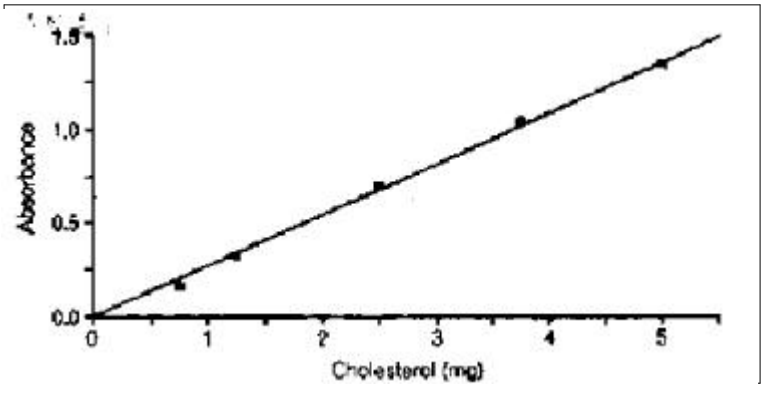

Fig. 1. Standard cholesterol curve for quantitation of cholesterol content.

안 원심 분리하였다. Collection tube에 모아진 용액은 버리고 새로운 colletion tube로 QIAamp spin column을 옮기고 buffer AW1 500 μl를 QIAamp spin column에 넣은 후 8,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 한 후, collection tube에 모아진 용액은 버리고 새로운 collection tube로 QIAamp spin column을 옮긴 다음 buffer AW2 500 μl을 넣고 14,000 rpm에서 3분 동안 원심 분리하였다. QIAamp spin column을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮긴 다음 30 μl 증류수를 넣고 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 DNA용액을 얻었다.

(2) 담낭조직으로부터 DNA 추출: −70°C에 저장되었던 담낭 조직 20 mg 정도를 PBS로 씻어 준 후 QIAamp DNA kit을 이용하여 DNA를 추출하였다. 담낭 조직에 buffer ATL 180 μl와 20 μl의 proteinase K를 넣고 잘 섞은 후 조직이 완전히 용해될 때까지 56°C 항온조에 두어 가끔씩 vortexing하였다. 조직이 완전히 용해된 후, 용액에 200 μl의 buffer AL을 넣고 vortexing으로 잘 섞은 후 70°C 항온조에 10분간 두었다. 이 용액에 100% 에탄올을 200 μl 넣어 잘 섞은 후, QIAamp spin column에 담고 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 DNA가 silica gel membrane에 붙도록 하였다. Collection tube에 모아진 용액은 버리고 새로운 collection tube로 QIAamp spin column을 옮기고 buffer AW1 500 μl로 한 번, buffer AW2 500 μl로 한 번씩 원심 분리하여 QIAamp spin column을 씻었다. QIAamp spin column을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮긴 다음 20 μl 증류수를 넣고 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 DNA용액을 얻었다.

(3) 담즙으로부터 DNA 추출: −20°C에 보관되었던 담즙 500 μl에 PBS 1 ml을 넣고 잘 섞은 후에 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 침전물에 400 μl lysis buffer (10 mM Tris (pH 8.5), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS)와 20 μl의 proteinase K를 넣고 55°C에서 8시간 이상 항온처리하였다. 끓는 물에 10분 정도 둔 후, 100% 에탄올을 넣고 잘 섞은 후 QIAamp DNA kit을 이용하여 DNA를 얻었다.

라. 중합효소 연쇄반응

담석, 담즙, 담낭점막으로부터 *Eubacteria*, *Helicobacter* species, *H. pylori, E. coli*의 DNA를 검출하기 위해 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다. 이를 위한 세균 16S rRNA에 대한 genomic DNA의 염기서열은 다음과 같다(Fig. 2). 그리고 목적 이외의 영역으로부터 유래하는 산물을 제거하기 위해 nested PCR을 하였다. 이들 PCR을 위한 primer는 Takara Shuzo사(Shiga, Japan)에 의뢰하여 제작하였다(Table 1, 2).

담즙, 담낭, 담낭점막에서 얻은 DNA 5 μl에 Taq polymerase 0.5 unit, 10×PCR buffer (25 mM TAPS (pH 9.3), 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-mercaptoethanol), deoxynuclotide triphophates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 각각 0.2 mM, PCR primer 각각 0.4 μM을 넣고 총 부피가 50 μl가 되도록 증류수를 첨가하고 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin Elmer, New Jersey, USA)을 사용하여 다음과 같은 조건으로 증폭하였다. 이 혼합물은 94°C에서 3분간 초기 변성을 시킨 뒤 94°C에서 1분, 51 57°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 35회 증폭

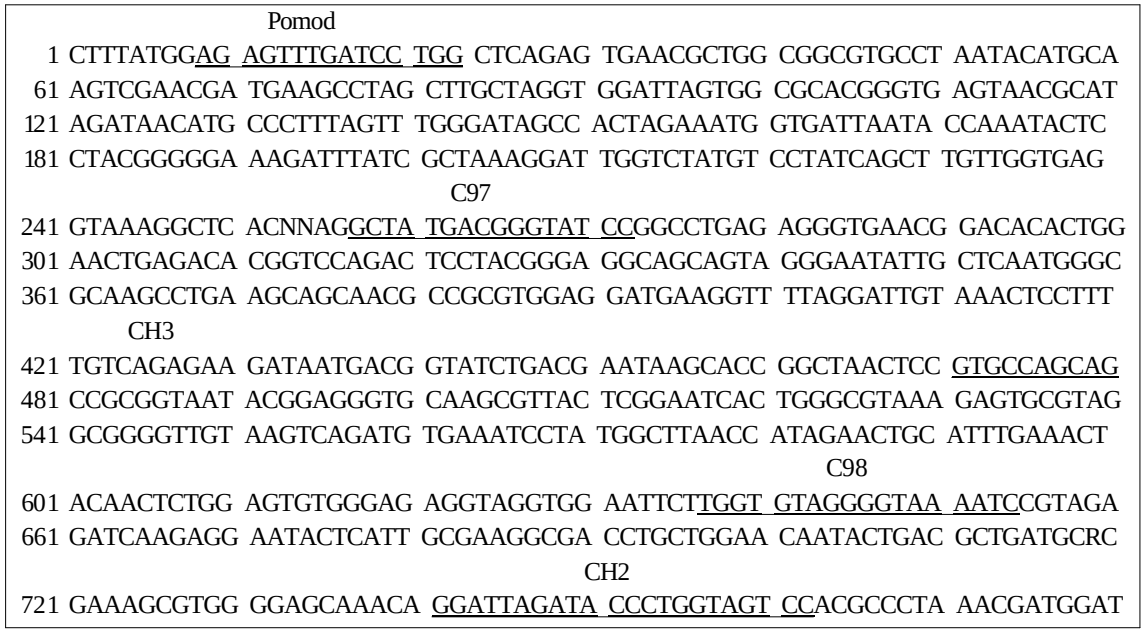

Fig. 2. Structure of bacterial 16S rRNA genomic DNA. Pomod, CH2, and CH3 are allels for eubacterial 16S rRNA. C97 and C98 are alles for *Helicobacter* specific 16S rRNA.

Table 1. Primers for bacterial 16S rRNA

Gene and DNA region	Primer		Primer sequence (5' to 3')	Annealing Tm (°C)	Size of PCR product
Eubacteria (16s rRNA)	First PCR	Pomod CH2	AGAGTTTGATC(a/c)TGG ACTAC(c/t)(a/c/g)GGGTATCTAA(g/t)CC	55°C	800 bp
	Second PCR	Pomod CH3	AGAGTTTGATC(a/c)TGG ACCGC(g/t)(a/g)CTGCTGGCAC	55°C	520 bp
E. coli (β-glucuronidase)	First PCR	uidA 858 uidA 1343	ATCACCGTGGTGACGCATGTCGC CACCACGATGCCATGTTCATCTGCC	57°C	486 bp
	Second PCR	uidA 1047 uidA 1232	TATGAACTGTGCGTCACAGCC CATCAGCACGTTATCGAATCC	57°C	186 bp

시킨 뒤 72°C에서 5분간 둔 후 종료시켰다. Nested PCR은 DNA 주형으로 앞에서 증폭한 생성물 3 μl를 사용하여 총 부피가 50 μl로 만든 후 증폭하였다.

마. 전기 영동

중합 효소 연쇄 반응으로 DNA가 증폭이 되었는지 알아보기 위해 agarose gel 전기 영동을 시행하였다. 전기영동은 Hoefer Scientific Instrument사(Buckinhamshire, England)의 hori

Table 2. Primers for *Helicobacter* 16S rRNA

Gene and DNA region	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Annealing Tm (°C)	Size of PCR product
Helicobacter species (16s rRNA)	C97	GCTATGACGGGTATCC	55°C	400 bp
	C98	GATTTTACCCCTACACCA		
H. pylori (26 kDa surface antigen)	HPF	TGGCGTGTCATTGACAGCGAGC	57°C	298 bp
	HPR	CCTGCTGGGCATACTTCACCATG		

zontal electrophoresis (HE 99X Max Submarine Unit)를 사용하였다. 수평판 위에 15×20 cm의 gel tray를 올려놓고 gel running plate를 tray 안에 놓은 다음 그 위에 20개의 well을 가진 comb를 2개 설치하였다. TBE (45 mM Tris, 45 mM Boric Acid, 1 mM EDTA) buffer 160 ml에 agarose 24 g을 넣고 ethidium bromide를 0.5 μg/ml이 되도록 첨가한 후 완전 용해시켰다. 55°C로 식혀서 수평판 위에 설치한 gel casting tray에 부어 1.5% agarose gel을 만들었다. Agarose가 굳으면 comb을 제거하고 running plate를 TBE 완충 용액(45 mM Tris, 45 mM Boric Acid, 1 mM EDTA)이 들어있는 전기 영동조에 넣고 시료 10 μl에 시료 완충 용액(30% glycerol, 30 mM EDTA, 0.03% Bromophenol Blue, 0.03% Xylene Cyanol) 2 μl를 넣고 잘 섞은 후에 well에 넣은 후 120 V의 전압에서 1시간 전기 영동하였다. DNA band의 크기를 알아보기 위해 DNA MW Standard Marker 100 bp ladder를 함께 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 후 Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하여 gel에 자외선을 쬐어 DNA band를 확인하였다.

바. PCR산물의 정제와 염기 서열 결정

전기 영동법으로 확인한 DNA band가 원하는 DNA인지 확인하기 위해 DNA sequencing을 하였다. 전기 영동법으로 PCR로 증폭된 DNA를 확인하고 원하는 크기의 DNA band가 있는 부분의 agarose gel을 자른 후 Gel extraction kit을 사용하여 DNA를 정제하였다. Buffer QG를 gel 무게의 3배 부피로 넣어주었다. 50°C 항온조에 넣고 2 3분 간격으로 vortexing하며 gel slice를 녹였다. Gel을 완전히 녹인 후 gel의 무게와 동량의 isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 QIAquick spin column에 넣었다. DNA가 silica gel membrane에 붙을 수 있도록 14,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하였다. Collection tube에 모아진 용액은 버리고 QIAquick spin column에 0.75 ml의 완충 용액을 넣어 14,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 씻어주었다. Collection tube에 모아진 용액은 버리고 다시 14,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리한 후 깨끗한 1.5 ml microcentrifuge tube로 QIAquick spin column을 옮긴 다음 증류수 20 μl를 넣은 다음 14,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 DNA를 정제하였다.

정제된 DNA을 dideoxynucleotide chain-termination법을 응용한 BigDye™Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, New Jersey, USA)로 분석하였다. 정제된 DNA 30 90 ng에 terminator ready reaction mix 용액 4 μl, 각 primer 3.2 pmol을 넣고 증류수로 10 μl가 되도록 만든 후 PCR 기계에 넣고 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분을 25회 반복하였다. 반응이 끝난 후 PCR 생성 산물에 증류수 90 μl, 3 M NaOAc (pH 4.6) 10 μl, 100% 에탄올 250 μl를 넣은 후 10분 동안 얼음에 담가 두었다. 그런 후 14,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리한 후 상층액을 버리고 70% Ethanol로 씻어 준 후 건조시켰다. 건조 후 pellet을 TSR용액 25 μl에 녹이고 95°C에서 2분간 두어 DNA를 denature시킨 후 autosampler에 loading하여 sequencing하였다.

사. Sequencing data의 분석을 통한 균주의 동정

Sequencing의 결과는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST network server를 이용하여 분석하여 어떤 균주인지 동정하였다.

III. 결 과

58예의 담석을 육안적 성상 및 콜레스테롤 함량 분석에 의한 분류상 순수콜레스테롤석은 10예, 혼합콜레스테롤석 36예 및 갈색석 12예이었다.

1. 콜레스테롤 담석에서 bacterial DNA의 검출

순수콜레스테롤석은 10예로 평균 콜레스테롤 함유농도가 92.4% (90 99%)이었으며 혼합콜레스테롤석은 36예로 72.5% (55 90%)이었다. 36예의 혼합콜레스테롤석에서 bacterial 16S rRNA에 대한 PCR결과 25예(69.4%)가 양성이었으며 순수콜레스테롤석에서는 10예 중 1예(10%)에서 양성으로 나타났다(Table 3, Fig. 3). 한편 갈색석 12에 중에서 9예(75%)에서 세균 DNA가 검출되었다.

2. Nested PCR 또는 염기서열 분석을 통한 세균의 동정

세균 PCR양성인 담석 26예를 대상으로 시행한 *E. coli* specific β-glucuronidase gene (*uidA*)

Table 3. Bacterial DNA detected in crushed gallstones

	Mixed cholesterol (n=36)	Pure cholesterol (n=10)	Brown pigment (n=12)
Bacterial DNA	25 (69.4%)	1 (10%)	9 (75%)
Cholesterol content	72.5%	92.4%	32.5%

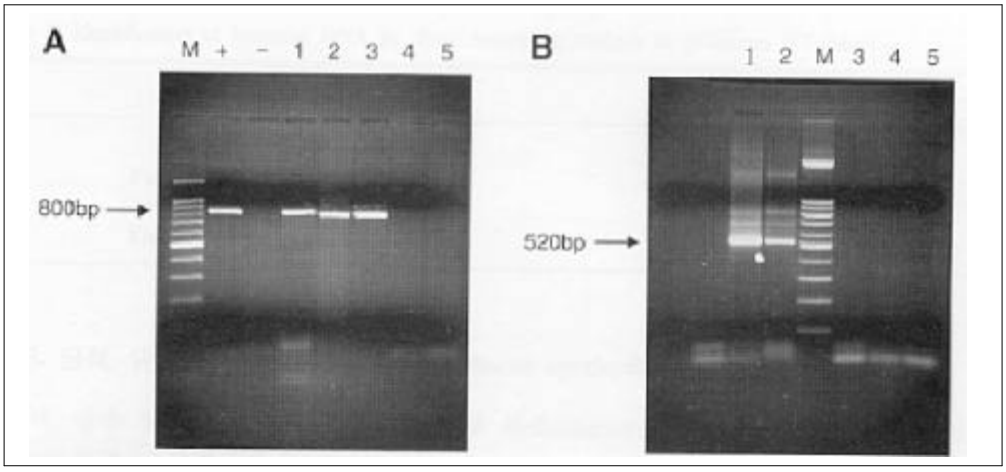

Fig. 3. Bacterial 16S rRNA PCR products in gallstones. PCR products were amplified with the primers Pomod alleles (800 bp) for A, CH3 for B. (A) M; size marker, +; positive control, −; negative control, 1 3; positive samples, 4, 5; negative samples. (B) M; size marker, 1 2; positive samples, 3 5; negative samples.

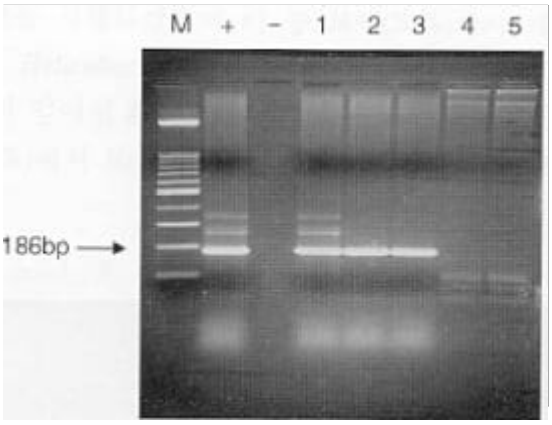

Fig. 4. Nested PCR for *E. coli* species *uidA* gene in gallstones. M; size marker, +; positive control, −; negative control, 1 3; positive samples, 4, 5; negative samples.

를 이용한 nested PCR결과 23예(88.4%)에서 양성으로 관찰되어 검출된 세균의 대부분이 *E. coli*이었다(Fig. 4).

또한 검출된 PCR산물 중 17예에 대해서는 직접 염기서열분석을 하였는데 8개의 담석에서 *E. coli*에 대한 염기서열로 분석되었고 5예에서는 *Pseudomonas*로 분석되었고 *Citrobacter* sp. 2예, 및 *Klebsiella* sp. 2예 등으로 동정되었다(Table 4).

Table 4. Identification of bacterial DNA by direct sequences analysis in gallstones (17 cases)

Bacteria	Number
E. coli	8
Pseudomonas	5
Citrobacter sp.	2
Klebsiella sp.	2

3. 담석, 담즙 및 담낭점막에서 *Helicobacter* species의 검출

담석, 담즙 및 담낭점막에서 상술한 대로 *Helicobacter*를 포함한 *Eubacteria*에 대한 16S rRNA로 PCR을 시행하였다.

담석의 경우에는 콜레스테롤석 46예와 12예의 갈색석을 포함하여 총 58예를 대상으로 하였는데, 갈색석에서는 12예 중 9예(75%)에서 세균 DNA가 검출되어 콜레스테롤석을 포함하여 모두 35예(60.3%)의 담석에서 세균 DNA가 검출되었다. 이 PCR산물로 *Helicobacter* genus 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 시행한 결과 4예(11.4%)에서 양성을 보였다.

담즙은 48예에서 PCR을 시행하였으며 이 중 24예(50%)에서 세균 DNA가 검출되었으며 담석에서와 마찬가지로 *Helicobacter*에 특이적인 primer를 이용한 PCR결과 6예(25%)에서 검출되었다. 또한 수술시 얻어진 46예의 담낭점막에서는 18예에서 세균 DNA (39.1%)가 검출되었고 이중 5예(27.7%)에서 *Helicobacter* sp. 양성이었다(Fig. 5A). 따라서 전체 담석에서

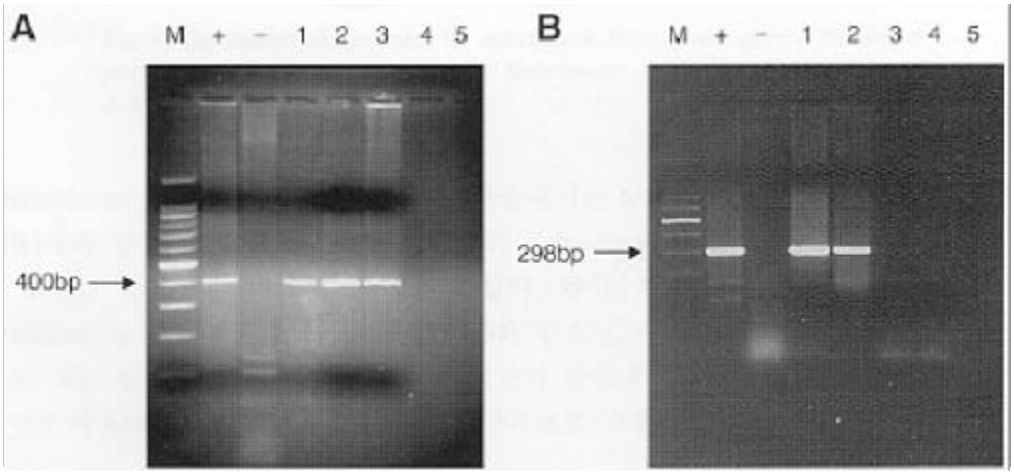

Fig. 5. A. *Helicobacter* genus specific 16S rRNA PCR products in gallbladder mucosa. M; size marker, +; positive control, −; negative control, 1 3; positive samples, 4, 5; negative samples. B. PCR products of 26 kDa surface Ag for *H. pylori*. M; size marker, +; positive control, −; negative control, 1, 2; positive samples, 3 5; negative samples.

Table 5. *Helicobacter* specific DNA in gallstone, bile and gallbladder mucosa

	Gallstone (n=58)	Bile (n=48)	Gallbladder mucosa (n=46)
Bacterial DNA	35 (60.3%)	24 (50.0%)	18 (39.1%)
Helicobacter DNA	4 (6.8%)	6 (12.5%)	5 (10.8%)

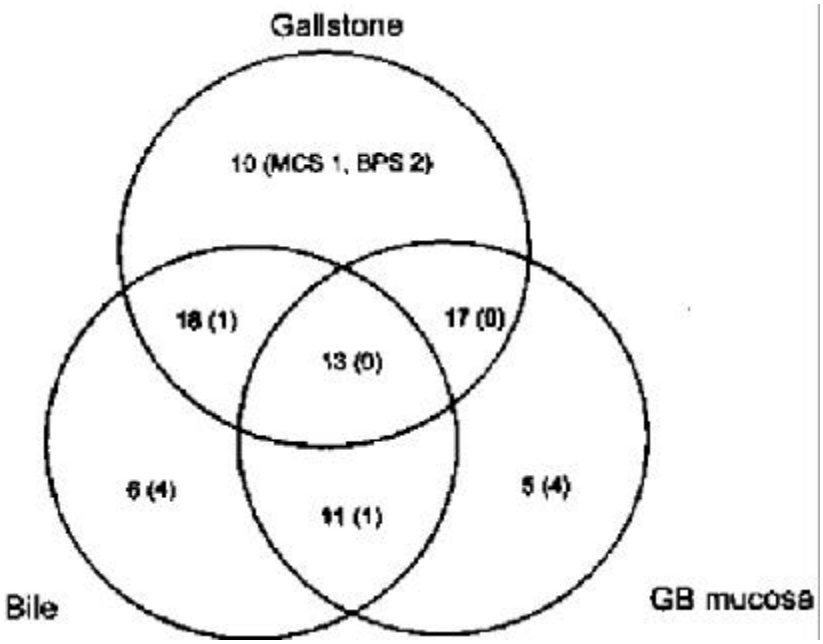

Fig. 6. The number of specimens for detection of *Helicobacter* species. Number of parenthesis mean positive samples for *Helicobacter* sp. MCS; mixed cholesterol stone, BPS; brown pigment stone.

의 *Helicobacter* sp. 양성률은 4/58 (6.8%), 담즙에서는 6/48 (12.5%) 및 담낭점막에서는 5/46 (10.8%)에서 양성이었다(Table 5). 담석에서의 *Helicobacter* sp.는 혼합 콜레스테롤석 2예, 갈색석 2예로 담석성분에 따른 차이는 없었다. 담석, 담즙 및 담낭점막의 세 검체에서 *Helicobacter* sp. 양성률을 도식화하면 Fig. 6과 같으며, 세 검체 모두에서 *Helicobacter* sp.가 검출된 예는 없었고 담석과 담즙 및 담낭점막과 담즙에서 동시에 검출된 경우가 각각 1예씩이었으며 나머지는 각각의 검체에서만 단독으로 검출되었다.

4. *H. pylori* 26 kDa surface antigen을 통한 *H. pylori*의 동정

Helicobacter 16S rRNA로 증폭된 PCR산물을 *H. pylori*에 대한 primer로 PCR한 결과 담석 4예 중 4예, 담즙은 6예 중 5예, 담낭점막은 5예 중 3예에서 양성으로 검출되었다(Fig. 5B).

5. *Helicobacter* 16S rRNA amplicon의 직접염기서열 분석을 통한 동정

Helicobacter 16S rRNA amplicon 400 base pair에 대한 직접염기서열분석 후 NCBI의 BLAST network server와 일치하는 세균을 찾아본 결과 담석에서는 4예 모두 *H. pylori*와 100% 일치하였다. 담즙은 6예 중 5예는 *H. pylori*와 일치하였으나 나머지 1예는 일치하는 세균이 없었다. 또한 담낭 점막에서도 5예 중 3예에서는 *H. pylori*와 일치하였고 2예는 data base와 일치하는 세균이 없었다(Table 6).

Table 6. Summary of identification of *Helicobacter* species in specimens of gallstone, bile and gallbladder mucosa

	Gallstone	Bile juice	Gallbladder mucosa
Pomod - PC5 (Eubacteria)	35/58 (60.3%)	24/48 (50.0%)	18/46 (39.1%)
C97 - C98 (genus *Helicobacter*)	4/35 (11.4%)	6/24 (25.0%)	5/18 (27.8%)
Helicobacter(+)/Total	4/58 (6.8%)	6/48 (12.5%)	5/46 (10.8%)
HPF-HPR (*H. pylori* surface Ag)	4/4 (100.0%)	5/6 (83.3%)	3/5 (60.0%)
Direct sequencing	*H. pylori* (4)	*H. pylori* (5) Unidentified (1)*	*H. pylori* (3) Unidentified (2)*

*No identical bacteria with BLAST network server of NCBI

IV. 고 찰

담낭 담석 생성기전에 관한 연구는 발전을 거듭해 왔으나 발생원인은 아직도 확실하지 않다. 담석은 화학적 구성성분과 외형적 모양 및 성상에 따라 콜레스테롤 담석과 색소성담석으로 분류하고 콜레스테롤석은 콜레스테롤 함유정도에 따라 순수콜레스테롤석(콜레스테롤>90%)과 혼합콜레스테롤석(콜레스테롤 55 90%)으로 분류하고 색소성담석은 흑색색소성 담석과 갈색색소성 담석으로 분류한다.[1] 지역에 따라 호발하는 담석의 종류가 다르며 같은 지역이라도 담석구성 성분이 변화한다는 것은 잘 알려진 사실이며 우리 나라에서도 콜레스테롤 담석이 점차 증가되고 있다. 최근 우리 나라에서 다기관 연구로서,[2] 1997년 2월에서 7월까지 약 6개월 동안 수술을 시행하였던 1274예의 담석증 환자에서 담낭 담석은 64.0%, 총담관 담석은 21.9%, 간내담석은 14.1%를 차지하였다. 전체 담낭담석 중 콜레스테롤석은 58.1%를 차지하였으며 흑색석 약 25.2%, 갈색석은 약 12.1%였고, 이 중 콜레스테롤

함량이 90%를 넘는 순수콜레스테롤석은 콜레스테롤석 중 21%를 차지하였다. 또한 총담관 담석에서는 갈색석이 전체의 76.1%, 콜레스테롤석이 18.4% 및 흑색석이 3.5%를 차지하였으며 간내담석은 갈색석(61.4%)과 혼합석(35.6%)으로 나눌 수 있어 서구에 비해 색소성 담석이 차지하는 비율이 높아 담석 생성에 있어 세균감염이 중요한 인자로 생각되고 있다.

갈색석 생성의 주된 기전은 담즙의 세균 감염으로 생각되고 있지만[3-5] 지금까지 콜레스테롤석의 생성기전과 담도계 세균 감염과의 연관에 관한 연구는 드물다. 담도계는 여러 인체 방어 기전에 의해 무균 상태로 알려져 있지만,[22-24] 세균이 담도계로 침입할 수 있는 통로는 십이지장에서 유두 괄약근을 통한 상행성 통로와 문맥계로부터 간을 거쳐 담즙으로 배출되는 하행성 통로를 생각할 수 있다. 하지만 정상인에서는 여러 방어기전에 의해 이들 통로를 통한 세균침입이 차단될 수 있다. 그러나 여러 방어기전에도 불구하고 정상인에서 담도계가 일시적으로는 세균 감염에 노출된다는 증거들이 있다. 간, 담도계 질환이 없는 환자의 수술실에서 얻은 담낭 담즙(20%)과 간조직(17%)에서 세균이 검출되었다는 보고가 있으며,[25] 역시 간, 담도 질환과 무관한 복부 수술환자에서 문맥혈내 세균 배양 양성률이 32%로 보고되고 있으나,[26] 이러한 일시적인 세균감염이 임상적으로 어떤 의의가 있는지는 확실하지 않다.

갈색석의 생성과 성장이 담즙내 세균 감염과 밀접한 관련이 있다는 증거는 결석의 성분이 담즙내 세균 감염에 의한 담즙성분의 변화와 연관이 있고 갈색석 환자의 담즙 및 결석에서 거의 모두 세균을 검출할 수 있기 때문이다. Leung 등[5]은 83%의 갈색석 절단면에서 세균의 존재를 전자현미경으로 규명하였다. 반면에 콜레스테롤석 생성에서 세균 감염의 역할이 배제되는 근거로는 콜레스테롤석 환자의 담즙에서 세균이 검출되지 않고 결석의 전자현미경적 검색에서 세균을 찾아보기 어렵다는 점이다. 그러나 지금까지 콜레스테롤석내 세균존재의 규명에 사용되어 왔던 전자현미경적 관찰과 담즙 및 담석의 배양법에는 한계점이 있기 때문에 최근 담석내 세균 DNA를 추출하여 PCR로 콜레스테롤석내 세균의 존재를 증명하고자 하는 노력이 있어 왔다. 즉 담석에서 세균 DNA를 추출하여 모든 유핵 세균이 공통적으로 갖고 있는 16S rRNA 부분에 대한 PCR을 시행하여 세균의 존재를 규명한 후 PCR산물의 염기서열을 분석함으로써 균을 동정하는 방법으로 기존의 세균 배양법에 비하여 민감도가 높으며 오랜 시간에 걸쳐 생성되는 담석내 이미 사멸된 세균도 동정할 수 있다는 이점이 있다. Swidsinski 등[12]은 이런 방법으로 콜레스테롤 성분이 70 90%인 담석의 대부분에서 세균감염을 증명하여 콜레스테롤석 생성에 있어 기존의 병인과는 다른 세균감염의 가능성을 주장하였다. Lee 등[13]도 같은 방법으로 혼합 콜레스테롤석에서 *E. coli, Pseudomonas* 등의 세균을 검출하여 세균감염이 콜레스테롤석의 생성 초기부터 관여하며, 순수콜레스테롤석 일수록 세균 감염 빈도가 낮고 혼합콜레스테롤석일수록 세균감염의 빈도가 높았다고 하였다. 이와 같은 사실은 혼합콜레스테롤석의 생성이 기존에 주된 기전으로 알려진 콜레스테롤 과포화와 더불어 갈색석의 생성기전으로만 알려져 있던 담즙감

염이 함께 관여함을 시사하나 아직 확실하지 않다. 본 연구에서도 콜레스테롤 함유량이 55 90%인 혼합콜레스테롤 담석에서는 69.4%에서 세균 DNA가 검출되고 순수콜레스테롤 담석에서는 10예 중 1예에서만 검출되어 혼합콜레스테롤석 형성에 있어서 세균감염이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 더욱이 검출된 세균이 *E. coli, Pseodomonas, Klebsiella* 등과 같은 β-glucuronidase를 생산하는 세균이어서 이 가능성을 더욱 뒷받침해 주고 있다.

그러나 어떤 기전에 의해 세균감염이 콜레스테롤석 형성에 관여하는지는 아직 확실하지 않은데, 담석에 부착된 세균은 biofilm을 형성하고 biofilm을 구성하는 glycocalyx가 핵화인자인 담낭 mucus와 유사한 역할을 할 수 있을 것으로 추측된다. 이외에도 세균이 생성한 β-glucuronidase, phospholipase 등에 의한 담즙성분의 변화, 그람음성 세균이 생성한 lipopolysaccharide에 의한 담낭 상피세포의 mucin 생성 촉진 혹은 세균 자체에 의한 면역체계 활성화에 따른 핵화 촉진 등의 기전도 생각할 수 있다. 결국 순수콜레스테롤석의 형성은 콜레스테롤 과포화와 같은 화학적기전으로 생각되나 혼합콜레스테롤석은 화학적 기전 이외에도 갈색석과 마찬가지로 세균감염이 결석 형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 세균감염이 지금까지 알려진 콜레스테롤 담석 생성 기전과 어떻게 상호 작용하는지에 관해서는 향후 규명되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 담석, 담즙, 및 담낭점막에서 *Helicobacter* sp.의 검출에 주된 역점을 두었는데, 1983년 Warren과 Marshall[14]이 처음 인체 위에서 분리한 *H. pylori*는 만성위염 및 소화성궤양의 중요한 원인이며 위선암, 위림프종 발생의 위험 인자로 인식되고 있다.[27-29] 또한 이외에도 다른 소화기 질환과의 연관성에 대한 연구가 계속되고 있다.

*H. pylori*가 발견된 이래 지금까지 25여종 이상의 *Helicobacter* sp.가 인간을 포함한 많은 척추동물과 조류의 위장, 장관, 간 등에서 발견되어 *H. pylori* 뿐만 아니라 다양한 종류의 *Helicobacter* sp.가 여러 가지 질환의 원인일 수 있다고 생각되고 있다.[29-33] *H. hepaticus*는 쥐에서 간염과 간종양을 유발시킬 수 있으며,[30,31] *H. pullorum, Flexispira rappini,* 또는 *H. canis* 등은 설사하는 환자의 대변에서 검출되어 이러한 균주가 인수공통감염증(人獸共通感染症, Zoonosis)의 가능성이 있음을 말해주고 있으며,[32-35] 인간에서도 간질환을 비롯한 다양한 질환의 원인일 가능성이 있다. *H. pylori*는 담즙산에 민감하여 담즙내에서 성장하기 힘들지만,[35] *F. rappini, H. hepaticus, H. bilis, H. canis, H. cholecystus*와 *H. pullorum* 등은 담즙산의 존재 하에서도 자랄 수 있어 *Helicobacter* sp.들이 간이나 담도계에서도 증식할 수 있음을 알 수 있는데, 이러한 사실은 여러 동물들의 담낭조직과 담즙에서 bile-resistant hepatic *Helicobacter* sp.를 검출한 연구를 통해 증명되었다.[36,37] 즉 *H. hepaticus*를 감염시킨 쥐는 만성 간염, 간부종, 담관세포 증식 또는 담관상피세포의 손상을 일으킬 수 있으며,[31] *H. cholecystus*는 햄스터의 담낭에서 배양되었으며 담관섬유화와 췌장염을 일으킬 수 있다.[38]

지금까지 인체의 담도질환에서 *H. pylori* 또는 *Helicobacter* sp.에 대한 연구들을 살펴보면 7예의 경피경간적으로 채취한 담즙중 3예에서 urease A gene의 PCR에서 *H. pylori* 양성을

발견하여 이 균주가 무증상 담관염을 일으킨다고 보고되었으며,[15] 담석증으로 수술 받은 환자의 담낭점막에서 조직학적으로 *H. pylori*와 유사한 세균 발견이 보고되었다.[16] Figura 등[17]은 담석증 환자의 담즙에서 *H. pylori*에 대한 특이 항체가 있음을 발견하고 *H. pylori* 감염이 담석형성을 증가시키는 하나의 인자일 가능성을 제시하였다.

최근들어 인체의 여러 조직에서 *Helicobacter* sp.의 검출에 대한 보고가 증가하고 있는데, Fox 등[18]은 만성담낭염 환자의 담낭조직과 담즙에서 *Helicobacter* sp.를 검출한 연구결과를 발표하였는데, 23명의 칠레인 만성담낭염 환자의 담낭조직 중 9예, 담즙 중 13예에서 *Helicobacter* sp.를 발견하였으며 이들을 염기서열 분석한 결과 *H. bilis, H. pullorum, F. rappini*로 밝혀내어 이들 bile-resistant hepatic *Helicobacter* sp.가 담낭질환 특히 담낭암과 관련이 있을 것이라고 보고하였으며 지금까지 인체담낭조직에서 시행한 유일한 연구이다. 그러나 독일의 유사한 연구에서는 담즙에서 *Helicobacter* sp.가 검출되지 않아 지역적 또는 인종간의 차이가 있음을 시사하였다.[19] 최근 Lee 등[20]도 담석증환자의 담석과 담즙에서 Southern blot hybridization 방법으로 *H, pylori*가 비교적 높게 검출되나 실제로 담낭점막에서는 검출률이 낮으며 이들 균주가 위조직으로부터 유입되었을 가능성이 있다고 하였다. 한편 Nillson 등[21]도 원발성 경화성 담관염 환자와 원발성 담즙성 간경변 환자의 간조직에서 *H. pylori*와 다른 hepatic *Helicobacter* sp.를 PCR, 부분염기서열 분석한 결과 많은 수에서 *H. pylori*가 발견되었으나 *H. bilis, H. pullorum* 또는 *H. hepaticus*와 같은 균주는 발견하지 못하여 본 연구에서와 비슷한 연구결과를 발표하였다.

즉 많은 종류의 *Helicobacter* sp.가 동물 또는 인체의 간, 담도 또는 장관 질환에서 증명되었으나 그 임상적 의의는 아직 확실하지 않으며, 특히 담석 그 자체에서 *Helicobacter* sp.가 검출된 보고는 없다. 본 연구에서는 담석증환자의 담석, 담즙, 및 담낭점막에서 세균 DNA가 양성인 검체를 대상으로 *Helicobacter*-genus에 특이적인 primer를 이용하여 *Helicobacter* sp.의 존재를 검출한 결과 세균 DNA가 검출된 예 중 담석에서는 11.4%, 담즙 25% 및 담낭점막 27.7%에서 *Helicobacter* sp.의 DNA가 검출되어 적지 않은 예에서 *Helicobacter* sp.가 존재하였다. 또한 이렇게 검출된 DNA를 *H. pylori*에 대한 PCR 또는 직접 염기서열을 분석한 결과 검출된 *Helicobacter* sp.는 모두 *H. pylori*로 판명되었고, *Helicobacter* DNA가 검출된 검체중 담즙 1예 및 담낭점막 2예서는 염기서열 분석결과에 일치하는 세균을 발견할 수 없었는데 이는 아마도 실험과정에서 오염의 가능성도 있으나 혹시는 다른 알려지지 않은 균주의 감염 가능성을 배제할 수 없는 소견으로 생각된다. 기존의 연구에서는 *Helicobacter*의 존재를 주로 RFLP 또는 Southern blot hybridization 등의 방법을 사용하였는데, 본 연구에서는 검출된 PCR산물을 직접염기서열 분석을 통해 균주를 동정하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 균주의 동정에 있어 가장 정확한 방법이지만 다른 균주와의 혼합감염이 있는 경우 가장 유사한 균주만 검출되어 혼합 감염된 균주를 검출할 수 없기 때문에 이미 알려진 여러 가지 종류의 *Helicobacter* sp.에 대한 primer를 이용한 Southern blot

analysis 등과 같은 다양한 방법을 이용하여 이를 확인하는 연구도 필요하리라 생각된다. 또한 본 연구에서는 담석, 담즙 및 담낭점막 중 두 검체이상에서 시행된 예를 분석한 결과 대부분 한 검체에만 *H. pylori*가 검출되었고 2예에서만이 두 개의 검체 모두에서 발견되었는데 이에 대해서는 앞으로 전향적으로 위점막조직과 더불어 각각의 검체에서 *Helicobacter* sp.의 검출을 시행하여야만이 *H. pylori*를 포함한 *Helicobacter* sp.의 유입경로를 알 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과로 우리 나라와 같은 *H. pylori*의 유병률이 높은 지역에서 담석증 환자의 담석을 포함한, 담즙 및 담낭조직에서 *H. pylori*가 검출됨을 확인할 수 있었고, 이는 담낭결석의 형성과정에 *H. pylor*i 감염이 관여할 가능성을 강력하게 시사하는 소견으로 향후 담도계로의 유입경로 및 담석형성 기전에 관한 연구가 필요하리라 생각되며, 담낭담석증 이외의 담도계암 및 염증성 질환의 병인으로서의 역할에 대한 규명도 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

콜레스테롤석에서 세균감염의 유무 및 균주를 동정하고 담석증 환자의 담석, 담즙 및 담낭점막에서 *H. pylori*를 포함한 *Helicobacter* sp.의 검출 여부를 알아보기 위하여 담석, 담즙 및 담낭점막에서 DNA를 추출한 후 bacterial 16S rRNA에 대한 PCR과 직접염기서열 분석을 통해 균을 동정하였고 이를 토대로 *Helicobacter* genus에 특이적인 primer로 PCR을 시행한 후 *H. pylori*의 26 kDa surface Ag에 대한 primer로 PCR을 시행하고 직접 염기서열 분석을 통해 동정하여 아래의 결과를 얻었다.

1. 콜레스테롤 함유 55 90%인 혼합콜레스테롤석에서 세균 DNA의 검출은 69.4%이었으나 순수콜레스테롤석에서는 10%에서만 세균 DNA가 검출되어 혼합콜레스테롤석의 대부분에서 담석내부에 세균감염이 동반되어 있었다.

2. 세균 PCR양성인 26예를 대상으로 시행한 *E. coli* specific β-glucuronidase gene (*uidA*)를 이용한 nested PCR결과 23예(88.4%)에서 양성으로 관찰되어 검출된 세균의 대부분이 *E. coli* 임을 확인하였다. 또한 17개의 담석에서 검출된 PCR산물에 대해 직접 염기서열분석을 하였는데 8개의 담석에서 *E. coli*에 대한 염기서열로 분석되었고 5예에서는 *Pseudomonas*로 2예는 *Citrobacter* sp., 2예는 *Klebsiella* sp.로 분석되었다.

3. 세균 DNA가 검출된 담석, 담즙, 담낭점막을 대상으로 *Helicobacter* genus 특이 primer로 PCR을 시행한 결과 담석에서는 11.4%, 담즙 25.0%, 담낭점막 27.8%에서 *Helicobacter* sp.가 검출되었다. 따라서 전체 담석에서의 양성률은 4/58 (6.8%), 담즙에서는 6/48 (12.5%) 및 담낭점막 5/46 (10.8%)에서 *Helicobacter* sp.에 양성이었으며 담석성분에 따른 *Helicobacter* sp.에 대한 양성률에 따른 차이는 없었다.

4. *Helicobacter* sp.가 검출된 검체를 대상으로 *H. pylori* surface Ag에 대한 PCR과 직접염

기서열 분석결과 담석에서는 4예 모두가 *H. pylori*와 100% 일치하였으며 담즙은 6예 중 5예에서 *H. pylori*와 일치하였고, 담낭 점막에서는 5예 중 3예에서 *H. pylori*와 일치하였으나 *H. hepaticus*, *H. bovis*, *H. bilis* 등과 같은 기존에 알려진 hepatic *Helicobacter* sp.와 일치하는 세균은 없었다.

이상의 결과로 혼합콜레스테롤석의 대부분에서 세균 DNA가 검출되어 혼합콜레스테롤석의 형성에 있어 세균감염이 하나의 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 담석증 환자의 담석, 담즙, 담낭 점막의 일부에서 직접 염기서열 분석결과 우리 나라 위십이장질환에서 흔히 발견되는 *H. pylori*가 담도계에서도 발견됨을 확인할 수 있었는데, 이는 담낭결석의 형성과정에 *H. pylori* 감염이 관여할 가능성을 강력하게 시사하는 소견으로 향후 담도계로의 유입경로 및 담석형성 기전에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH. Sleisenger & Fortran's Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997.
2. 강진경, 민병철. 담석증. 1st ed., 대한소화기학회, 1999.
3. Maki T. Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: Role of *E. coli*, Beta-glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. Ann Surg 1966;164:90-100.
4. Cetta F. The role of bacteria in pigment gallstone disease. Ann Surg 1991;213:315-26.
5. Leung JWC, Sung JY, Costerton JW. Bacteriological and electron microscopy examination of brown pigment stones. J Clin Microbiol 1989;27:915-21.
6. Crowther RS, Soloway R. Pigment gallstone pathogenesis: From man to molecules. Semin Liver Dis 1990;10:171-80.
7. Small DM. Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation. N Eng J Med 1980; 302:1305-7.
8. Donovan JM, Carey MC. Physical-chemical basis of cholesterol and pigment gallstone formation. Gastroenterol Clin North Am 1991;20:47-66.
9. Kaufman HS, Magnuson TH, Lillemoe KD, Frasca P, Pitt HA. The role of bacteria in gallbladder and common duct stone formation. Ann Surg 1988;209:584-92.
10. Smith AL, Stewart L, Fine Robert, Pellegrini CA, Way LW. Gallstone disease, the clinical manifestation of infectious stones. Arch Surg 1989;124:629-33.
11. Wetter LA, Hamadeh RM, Griffiss JMCL, Oesterle A, Aagaard B, Way LW. Differences in outer membrane characteristics between gallstone-associated bacteria and normal bacterial flora. Lancet 1994;343:444-8.
12. Swidsinski A, Ludwig W, Pahlig H, Priem F. Molecular genetic evidence of bacterial coloni-

zation of cholesterol gallstones. Gastroenterology 1995;108:860-4.
13. Lee DK, Tarr PI, Haigh WG, Lee SP. Bacterial DNA in mixed cholesterol gallstones. Am J Gatroenterol 1999;94:3502-6.
14. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli in gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;1:1273-5.
15. Lin TT, Yeh CT, Wu CS, Liaw YF. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. Dig Dis and Sci 1995;40:2214-9.
16. Kawaguchi M, Saito T, Ohno H, Midorokawa S, Sanji T, Handa Y, et al. Bacteria closely resembling *Helicobacter pylori* detected immunohistologically and genetically in resected gallbladder mucosa. J of Gastroenterology 1996;31:294-8.
17. Figura N, Cetta F, Angelico M, Montalto G, Cetta D, Pacenti L, et al. Most *Helicobacter pylori*-infected patients have specific antibodies, and some also have *H. pylori* antigens and genomic material in bile: Is it a risk factor for gallstone formation? Digest Dis Sci 1998; 43:854-62.
18. Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, et al. Hepatic *Helicobacter* species idenfied in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecyctitis. Gastroenterology 1998;114:755-63.
19. Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Strenmel W. *Helicobacter* sp. are not detectable in bile from German patients with biliary disease. Gastroenterology 1999;116:1016-7.
20. Lee DK, Ha SH, Kim JB, Kim KH, Kim TW, Jung JH, et al. *Helicobacter* species in bile from Korean patinets with gallbladder stones. Gastroenterology 2000;A297(abst).
21. Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadstrom T. Identification of *Helicobacter* pylori and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. J Clin Microbiol 2000;38:1072-6.
22. Edlund YA, Mollstedt BO, Ouchterlony O. Bacteriological investigation of the biliary system and liver in biliary tract disease correlated to clinical data and microstructure of the gallbladder and liver. Acta Chir Scand 1959;116:461-76.
23. Csendes A, Fernandez M, Uribe P. Bacteriology of the gallbladder bile in normal subjects. Am J Surg 1975;129:629-31.
24. Csendes A, Becerra M, Burdiles P, Demian I, Bancalari K, Csendes P. Bacteriological studies of bile from the gallbladder in patients with carcinoma of the gallbladder, cholelithiasis, common bile duct stones and no gallstones disease. Eur J Surg 1994;160:363-7.
25. Dye Mcdonald A, Smith G. The bacterial flora of the biliary tract and the liver. Br J Surg 1078;65:285-7.
26. Schatten WE, Desprez JD, Holden WD. Bacterioiogic study of portal vein blood in man. Arch Surg 1955;71:404-9.

27. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N Engl J Med 1991;324:1043-7.
28. Parsonnet J, Frieman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-31.
29. Parsonnet J, Hanson S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Frieman GD. *Helicobacter pylori* infection and gastric MALT lymphoma. N Engl J Med 1994;330:1267-71.
30. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. Nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol 1994;32:1238-45.
31. Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benvenist RE. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. Am J Pathol 1994;145:959-68.
32. Archer JR, Romero S, Ritchie AE, Hamacher ME, Steiner BM, Bryner JH, et al. Characterization of an unclassified microaerophillic bacterium associated with gastroenteritis. J Clin Microbiolo 1988;26:101-5.
33. Stanley J, Linton D, Burens AP, Dewhirst FE, Owen RJ. *Helicobacter canis* sp. Nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. J Gen Microbiol 1993;139: 2495-504.
34. Stanley J, Linton D, Burens AP, Dewhirst FE, On SL, Porter A, et al. *Helicobacter pullorum* sp. Nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. Microbiology 1994;140:3441-9.
35. Hanninen ML. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991;10:515-8.
36. Fox JG, Lee A. The role of *Helicobacter* species in gastrointestinal tract diseases of animals. Lab Anim Sci 1997;47:222-55.
37. Fox JG, Yan L, Dewhirst FE, Paster BJ, Shames B, Murphy JC, et al. *Helicobacter bilis* sp. Nov., a novel *Helicobacter* isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mouse strains. J Clin Microbiol 1995;33:445-54.
38. Franklin CL, Beckwith CS, Livingston RS, Riley LK, Gibson SV, Besch-Williford CL, et al. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. Nov., from the gallbladders of syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. J Clin Microbiol 1996;34:2952-8.

Abstract

Identification of bacterial DNA including *Helicobacter* species by molecular biologic analysis from patients with gallbladder stones

Don Haeng Lee

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Si Young Song)

The pathogenesis of gallstone formation is still unclear. However considerable date implicate bacteria in the formation of brown pigment gallstones. In contrast the formation of cholesterol gallstones is believed to depend mainly on cholesterol saturation and solubility. Recently some authors documented bacterial DNA in mixed cholesterol gallstone (cholesterol content 55 90% of weight) and suggested that the bacteria or bacterial products may play a role in the formation of cholesterol gallstones.

There are increasing reports *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and other *Helicobacter* species were detected in various human tissues such as stomach, liver, bile, and gallbladder tissue. Several studies have been reported that *H. pylori* or *H. pylori* specific antiboby in human bile samples although its pathological role is not clear. Recent reports on the association of *Helicobacter* sp. with gallbladder disease show discrepant results. The discrepancy may be explained by regional differences in the distribution of *Helicobacter* sp.. There is no reports for the detection of *Helicobacter* sp. in gallstones itself.

Therefore we have attempted to detect bacterial DNA in cholesterol gallstones and identify the species of bacteria. Also we studied the presence and identification of *Helicobacter* sp. in gallstone, bile and gallbladder mucosa from patients with gallbladder stones. Gallbladder stones, bile and gallbladder mucosa were obtained using strict aseptic technique from 58 patients (10 pure cholesterol, 36 mixed cholesterol and 12 brown pigment gallstones) with symptomatic patients with gallbladder stones. The DNA was extracted from crushed gallstones. gallbladder epithelium, and bile. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify bacterial 16S rRNA and *uidA* (encoding *E. coli*) in crushed cholesterol gallstones. PCR products were sequenced and resulting sequences were compared to databases accessed through the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Geneinfo BLAST network server. Gallstones (58), bile (48) and gallbladder mucosa (46) were subjected to

PCR analysis using *Helicobacter* genus-specific 16S rRNA primers to generate amplicons of approximately 400 bases. The *Helicobacter* 16S rRNA amplicons were sequenced and analyzed to compare with databases to identify the species. Also we attempted PCR to detect *H. pylori* by primer with *H. pylori* 26 kDa surface Ag. The results were as follows.

1. Bacterial DNA were detected in 25 (69.4%) of 36 mixed cholesterol gallstones. In contrast only one (10%) of ten pure cholesterol gallstones yielded a product.

2. The 23 PCR products (88.4%) of 26 were revealed as DNA of *E. coli* by nested PCR with *E. coli* specific β-glucuronidase gene (*uidA*). Sequences of *E. coli* were obtained in 8 patients, DNA of *Pseudomonas* was found 5 patients, 2 patients for *Citrobacter* sp. and 2 for *Klebsiella* sp by direct sequence analysis of 17 samlpes.

3. By PCR analysis, 4 (6.8%) of 58 gallstones, 6 (12.5%) of 48 bile and 5 of 46 gallbladder mucosa were positive for *Helicobacter* sp.

4. Amplified *Helicobacter* DNA were revealed as *H. pylori* by PCR with *H. pylori* 26 kDa surface Ag in all of 4 gallstones, 5 of 6 bile, and 3 of 5 gallbladder mucosa. Direct sequencing of *Helicobacter* amplicons represented strains of *H. pylori* in all of 4 gallstones, 5 of 6 bile, and 3 of 5 gallbladder mucosa. However other hepatic *Helicobacter* sp. were not detected in gallstones, bile or gallbladder mucosa.

From these results, most mixed cholesterol gallstones harbor bacterial DNA and *E. coli* was predominant strain. The actual role of bacteria in gallstone formation warrants further study. In some portion of gallstones, bile and gallbladder mucosa, *H. pylori* were identified. However other hepatic *Helicobacter* sp. were not detected. The route of transmission or the pathogenetic role of *Helicobacter* sp. in gallstone diseases will be elucidated.

Key Words: cholesterol gallstone, pathogenesis, bacterial infection, *Helicobacter* infection