# 위 상피세포주에서 타우린 포함 담즙산에 의한 Nuclear Factor kappa B매개 Interleukin-8의 발현

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 현 수

# 위 상피세포주에서 타우린 포함 담즙산에 의한 Nuclear Factor kappa B매개 Interleukin-8의 발현

지도 김 원 호 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 현 수

# 김현수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____ 인

## 연세대학교 대학원

2001년 6월 일

# 감사의 글

약 2년 동안의 실험을 계획하고 진행하는 동안 참으로 많은 분들로부터 영원히 잊지 못할 도움과 많은 것을 보고 배웠습니다. 박사학위 지도교수를 흔쾌히 받아들여 주시고 어려운 여건을 극복하는 지혜와 용기를 잃지 않도록 격려하여 주신 김원호 교수님, 2년 동안의 실험과정을 멀리서나마 지켜보아 주시면서 보여주신 아낌없는 도움에 항상 감사드립니다.어렵고도 다소 낯설었던 연구실에서 실험을 계획하고 진행하는 데 있어 연구방향과 문제점을 마주하였을 때 깊은 사랑과 격려로 도움을 주신 이동기 교수님과 실험의 초기 단계부터 하나씩 자상히 지도하고 해결방법을 일러주신 김혜영 교수님, 온화하고 따뜻한 조언을 잊지 않으신 김호근 교수님과 김종선 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

다소 어려운 여건에서 실험을 계획하고 진행하는 데 있어서 너무나 커다란 힘이 되어 주신 권상옥 교수님과 백순구 교수님께 진심으로 감사드리며 같이 고생하며 실험의 준비와 진행에 열과 성을 다해준 김세중, 박선영 연구원, 아쉬울 때마다 도움과 격려를 아끼지 않은 친구들인 김태일, 서정훈, 이천균 선생, 지칠 때마다 많은 도움을 준 내시경실 가족과 간호사 분들도 잊을 수 없습니다.

머리 한구석에 늘 미안함이 배어있는 사랑스런 지윤, 해린, 그리고 민재에게도 수많은 위안을 준 것에 감사하며 부족한 저에게 끝없는 보살핌과 은혜를 아끼지 않으신 부모님과 처가 부모님께도 다시 한번 깊이 감사합니다.

또한 8년여의 힘들었던 과정을 항상 곁에서 말없이 믿음과 희망으로 꾸려오고 고됨을 마다하지 않은 사랑하는 아내 신수희가 있었습니다. 그것이 마지막으로 그녀에게 이 논문을 바치는 이유입니다.

저 자 씀

# 차 례


국문요약 ..... 1

I. 서 론 ..... 2

II. 재료 및 방법 ..... 4

1. 세포주 및 세포 배양 ..... 4

2. ODN의 준비 ..... 4

3. Cationic liposome을 이용한 ODN의 트랜스펙션 ..... 4

4. IL-8단백의 정량적 측정과 자극 조건 ..... 4

5. 핵단백질의 추출 ..... 5

6. EMSA법에 의한 NF- κB 활성도 측정과 자극 조건 ..... 5

III. 결 과 ..... 6

1. 타우린 포합 담즙산 자극 후 시간 및 농도별 IL-8의 발현 ..... 6

2. 담즙산 자극 후 시간에 따른 NF- κB 활성도의 변화 ..... 6

3. 담즙산의 농도에 따른 NF- κB 활성도의 변화 ..... 7

4. NF- κB억제제 전처리 후 담즙산 자극에 의한 NF- κB 활성도의 변화 ..... 8

5. NF- κB p50 subunit에 대한 AS-ODN을 처리한 세포주에서 TCDC자극 후 NF- κB의 활성도 변화 ..... 11

6. NF- κB 억제제나 p50 subunit에 대한 AS-ODN 처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8발현의 변화 ..... 11

IV. 고 찰 ..... 13

V. 결 론 ..... 18

참고문헌 ..... 18

영문요약 ..... 24

# 그 림 차 례

그림 1. 담즙산 자극 후 시간별 IL-8의 농도 변화 ..... 7

그림 2. NF-κB의 p50과 p65 subunit에 대한 항체를 이용한 supershift assay ..... 8

그림 3. AGS 세포주에서 담즙산 자극 후 시간별 NF-κB의 활성도 변화 ..... 9

그림 4. Kato III 세포주에서 담즙산 자극 후 시간별 NF-κB의 활성도 변화 ..... 9

그림 5. AGS 세포주에서 담즙산 자극 후 농도별 NF-κB의 활성도 변화 ..... 10

그림 6. Kato III 세포주에서 담즙산 자극 후 농도별 NF-κB의 활성도 변화 ..... 10

그림 7. NF-κB 억제제 전처리 후 담즙산 자극에 따른 NF-κB의 활성도 변화 ..... 11

그림 8. AGS 세포주에서 NF-κB p50 subunit에 대한 AS-ODN 처리 후 TCDC 자극에 따른 NF-κB의 활성도 변화 ..... 12

그림 9. AGS 세포주에서 NF-κB 억제제나 p50 AS-ODN 처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8발현의 변화 ..... 13

그림 10. Kato III 세포주에서 NF-κB 억제제 전처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8발현의 변화 ..... 14

국문요약

## 위 상피세포주에서 타우린 포함 담즙산에 의한 Nuclear Factor kappa B매개 Interleukin-8의 발현

담즙의 장-위 역류는 위의 유문부를 제거하는 위부분 절제술 후에 발생하는 가장 흔한 수술 후 합병증으로 위 상피세포 손상을 유발한다. 담즙이 위 상피세포를 손상시키는 기전은 담즙 고유의 세정 작용에 의하여 상피세포막을 구성하는 지질을 용해시키고 수소 이온이 세포 내로 역류되어 점막 방어벽을 손상시키기 때문으로 알려져 있다. 담즙의 주성분인 담즙산은 이러한 세포 외 작용과 더불어 세포 내로도 흡수되어 작용하나 담즙산 매개 위 상피세포 손상에 관여하는 세포 신호전달 경로에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 본 연구는 간에서 합성되어 장으로 분비되는 담즙산 중에서 비교적 고농도로 존재하는 타우로콜릭산(TC)과 타우로케노데옥시콜릭산(TCDC)을 이용하여 위 상피세포주를 자극한 후 대표적 친염증성 싸이토카인으로 알려진 Interleukin-8 (IL-8)의 발현 여부를 알아보고자 하였다. 또한 IL-8 유전자의 핵심적인 전사조절 인자로 알려진 Nuclear factor kappa B (NF-κB)의 억제제를 이용하여 IL-8의 발현에 대한 NF-κB의 역할을 규명하고자 하였다. 위 상피세포주에 TC와 TCDC를 각각 고농도와 저농도로 투여한 뒤 시간별로 NF-κB 및 IL-8의 발현을 정량적으로 분석하였고 NF-κB의 억제제인 레바미피드(rebamipide)나 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)를 전처리하거나 NF-κB의 anti-sense (AS) oligonucleotide (ODN)를 위 상피세포주에 트랜스펙션한 후 NF-κB의 활성도와 IL-8의 발현의 변화를 분석하여 다음의 결과를 얻었다.

1. AGS와 Kato III 세포주에 TC (0.5 5 mM)와 TCDC (0.1 1 mM)를 투여한 후 IL-8의 발현은 시간별(12 24시간), 농도별로 증가하였고 TC 5 mM과 TCDC 1 mM 자극 24시간 후 대조군 세포주에 비해 각각 3.3배, 4.9배 증가하였다.

2. AGS와 Kato III 세포주에서 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)를 투여한 15분 후부터 NF-κB의 활성도가 증가하기 시작하여 30 60분 후에 최대로 활성화되었다가 120분 후부터는 감소하였고 각각의 담즙산 투여 30분 후에 측정한 NF-κB의 활성도는 두 세포주에서 모두 농도별로 증가하였다.

3. NF-κB의 억제제인 레바미피드와 PDTC는 담즙산에 의한 NF-κB의 활성화와 IL-8 발현을 유의하게 억제하였다.

4. NF-κB의 p-50 subunit에 대한 antisense oligonucleotide는 고농도의 담즙산 자극에 의한 NF-κB의 활성화 및 IL-8의 발현을 유의하게 억제하였다.

이상으로 타우린 포함 담즙산에 의한 위 상피세포주 손상에는 NF-κB 매개 IL-8의 발현이 주요한 세포 신호전달 경로로 작용함을 알 수 있었다.

---

핵심되는 말: 위 상피세포주, 타우린 포함 담즙산, Nuclear factor kappa B, Interleukin-8

# 위 상피세포주에서 타우린 포합 담즙산에 의한 Nuclear Factor kappa B매개 Interleukin-8의 발현


<지도 김 원 호 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 현 수


## I. 서 론

잔위염은 위 유문부를 절제하는 위 부분절제술이나 위-공장 우회술 후에 나타나는 가장 흔한 합병증의 하나이다. 수술 후 잔위염 발생은 간에서 합성되어 담도를 통해 분비된 담즙을 포함하는 장관 내용물의 역류가 주요한 원인으로 알려져 있다.[1,2] 실험적인 연구에 따르면 담즙산을 포함하는 담즙에 위 점막이 노출되면 융모성 선와의 증식, 선조직의 낭종화, 점막 근판층의 부종과 점막 모세혈관의 혈관부종 등의 뚜렷한 조직학적인 변화가 수술 후 문합부를 중심으로 서서히 발생하게 된다.[3,4] 이러한 변화는 위 내 담즙산의 농도가 높을수록 심하게 나타나 담즙산이 주요한 위 점막 손상의 원인물질임을 시사한다.[4]

간에서 콜레스테롤로부터 합성되는 담즙산은 글리신(glycine)이나 타우린(taurine) 포합(conjugation) 과정을 거쳐 다양한 종류의 1차 담즙산 형태로 담도를 거쳐 십이지장으로 분비되며 글리신과 타우린 포합 담즙산의 비는 2.5 : 1이다.[5,6] 생리적인 포합 과정 후 담즙산은 pKa값이 감소하여[7] 산성 pH 환경과 담즙과 장관 내용물에 포함되어 있는 칼슘 이온의 존재 하에서 용해도가 증가한다.[8] 장관 내 pH 환경에서 담즙 내 이온화 현상의 증가는 수동적 확산에 의한 담즙산의 장 흡수를 감소시킴으로써 고농도를 유지하여 지질 분해 산물의 효과적인 용해와 흡수를 돕게 된다.[8] 정상적으로 담즙산은 십이지장에서 식이에 따라 다양한 농도(2 10 mM)로 존재하며 장관 내의 담즙산이 위로 역류하여 나타나는 위 점막의 손상 정도는 담즙산 성분에 따라 다양하다.[9,10] 즉 담즙산의 용해도는 pH 환경에 따라 다양하여 위장관 내의 pH가 증가하면 용해도가 증가한다.[8] 글리신과 타우린 포합 담즙산의 pKa값은 각각 4.3 5.2와 1.8 1.9이어 타우린 포합 담즙산은 글리신 포합 담즙산에 비하여 위 내의 산성 환경에서 잘 침전되지 않고 위 점막 손상을 잘 유발한다.[6,8] 십이지장으로 분비되는 다양한 담즙산 중에서 타우로콜릭산(TC)은 래트에서 혈관 확장을 통한 내인성 위 점막 방어인자인 prostaglandin $I_2$의 합성을 억제하여 위 점막 방어벽을 손상시키고

미란성 위염을 유발한다.[11,12] 또한 담즙산의 소수성(lipophilicity)이 클수록 위 점막 손상은 심하게 유도된다.[13] 따라서 TC보다 소수성이 강한 타우로케노데옥시콜릭산(TCDC)은 강한 세포독성을 나타낸다.[13] 따라서 본 연구에서는 수술 후 잔위에서 비교적 고농도로 나타날 수 있는 타우린 포합 담즙산인 TC와 TCDC를 이용하여 실험을 진행하였다.

전기생리학적 연구를 통해 기존에 알려진 담즙 매개 위 상피세포 손상은 담즙산 고유의 세정 효과(detergent effect)에 의한 것으로 알려져 있다. 즉 담즙염은 위 상피세포막 구성 성분인 지질, 인지질, 콜레스테롤을 용해시키고 위 점막 투과도를 증가시켜 위 내 수소 이온(hydrogen ion: $H^+$)의 역확산을 유도하고 결과적으로 위 점막 방어벽(gastric mucosal barrier)을 파괴시킨다.[14-16] 또한 담즙은 위 점막 방어의 중요역할을 담당하는 당단백 점액을 분해시켜 위산에 의한 점막손상을 촉진시킨다.[17] 이러한 담즙 작용은 대부분 위 상피세포 외부의 위 내강에서 마이셀(micelle)을 형성함으로써 일어난다. 반면 이러한 세포 외 작용과 더불어 담즙산이 직접 위 상피세포로 들어가(intracellular entry) 위 점막 손상을 유발시킨다는 동물실험 연구결과도 보고되고 있다.[14,18,19] 담즙산의 세포 내 작용 근거로는 타우로콜릭산이 레시틴(lecithin)과 결합하여 마이셀을 형성하는 임계농도 이하에서도 위 내 수소 이온의 역확산이 발생하고, 마이셀을 형성하는 임계농도 이상의 고농도에서도 지속적인 위 점막 손상이 유발되는 점, 그리고 위산에 용해된 고농도의 TC가 세포막 성분의 손상을 거의 유발하지 않고 위 점막의 방어벽을 손상시킨다는 사실을 들 수 있다.[18] 따라서 이는 위 상피세포 내에 담즙산 자극에 따른 세포 신호전달 경로가 있음을 시사하나 수술 후 잔위에서 담즙 역류의 특징적인 현상에 따른 여러 임상 및 실험 연구결과에도 불구하고 분자생물학적 세포손상기전에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

NF-κB는 Rel계 전사조절 인자의 하나로 산화적 스트레스[20] 및 염증성 신호[21,22] 등의 세포 외 신호에 반응하여 발현되는 여러 유전자의 활성을 조절한다. 최근 보고에 따르면 NF-κB 유전자 산물은 세포의 증식, 형질변환, 종양발생에도 관여하는 것으로 밝혀져 있다.[23,24] 또한 NF-κB는 본 연구에서 실험하고자 하는 interleukin-8 (IL-8)[25-27]을 포함한 친염증성 싸이토카인인 IL-1β,[28] IL-6,[29] tumor necrosis factor-α (TNF-α)[28]의 발현을 관장하는 전사 촉진(promotor)부위에 결합하여 이들의 전사조절에 핵심적인 역할을 한다. 또한 IL-8은 위 상피세포주에서 지속적으로 분비되는 C-X-C 케모카인(chemokine)의 일종으로 만성 위염의 병인에 중요한 염증 매개인자로 밝혀져 있다.[30]

본 연구는 위 상피세포주에서 타우린 포합 담즙산 자극 후 IL-8 발현의 변화를 알아보고 담즙산 매개 IL-8 발현에서 NF-κB의 역할을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 항산화 기능을 통하여 NF-κB의 활성화를 초기에 억제하는 레바미피드나 PDTC를 전처리하거나 AS-ODN을 위 상피세포주에 트랜스펙션한 후 담즙산 매개 NF-κB의 활성화와 IL-8 발현의 변화를 분석하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포 배양

인체에서 기원한 위암세포주인 AGS세포주(gastric adenocarcinoma, ATCC CRL 1739)와 Kato III세포주(gastric adenocarcinoma, ATCC HTB 103)를 한국 세포주은행(서울, 대한민국)으로부터 분양받아 10% 우태아혈청(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)과 항생제(페니실린 100 U/ml와 스트렙토마이신 100 μg/ml)가 함유된 RPMI-1640 배지(pH 7.4)(Sigma, St. Louis, Missouri. USA)에서 배양하였다. 세포 배양은 37°C, 5% 이산화탄소 농도의 배양기에서 유지하였다.

### 2. ODN의 준비

단일 쇄의 ODN은 GIBCO (GIBCO BRL)사에 주문하여 제작하였다. ODN은 세포 내 핵분해 효소(nuclease)에 의한 분해를 줄이기 위해 phosphorothioate로 변형시켰으며 AS-ODN 또는 S-ODN은 NF-κB의 subunit인 p-50 mRNA의 ATG 시발 코돈(start codon)에 대한 상보적인 서열로 p50 AS-ODN의 염기서열은 5'-GGA TCA TCT TCT GCC ATT CTG-3'이었으며 p50 S-ODN의 염기서열은 5-CAG AAT GGC AGA AGA TGA TCC-3'이었다.

### 3. Cationic liposome을 이용한 ODN의 트랜스펙션

AGS 세포주에 AS-ODN과 S-ODN의 세포 내 전달을 안정되게 하기 위하여 cationic liposome인 DOTAP {N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-N,N,N trimethyl ammonium methylsulfate} (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany)을 이용하였다.[31] DOTAP은 15 μl/ml의 농도로 적절한 ODN과 혼합하여 ODN의 최종 농도가 0.5 μM이 되도록 하였으며 37°C에서 15분간 처리하였다. 최종 혼합물을 6-well plate에 $2\times10^5$/ml씩 분주된 AGS 세포주에 직접 첨가하여 56시간 배양하였다. 트립신을 이용하여 세포주를 부유시켜 수거한 뒤 24-well plate에 $6\times10^5$/ml 농도로 다시 분주하여 ODN의 최종 농도가 0.5 μM이 되도록 세포에 첨가한 후 16시간 동안 배양하였다. 이후 항생제 없는 배지로 교환하여 각각 AS-ODN과 S-ODN으로 처리한 세포주에 TC나 TCDC로 자극 후 NF-κB의 활성도와 IL-8의 발현을 분석하였다.

### 4. IL-8단백의 정량적 측정과 자극 조건

두 종의 위 상피세포주(AGS와 Kato III)가 subconfluency를 유지한 상태에서 담즙산 자극 24시간 전에 배지를 교환하였으며 TC (0.5, 5 mM)와 TCDC (0.1, 1 mM) 처리 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 후에 세포 상층액에서 ELISA (enzyme-liked immunosorbent assay) 방법을 이용하여 IL-8의 농도를 측정(ELISA kit, R&D System, Minneapolis, MN, USA)하였다. 96 well polysty-

rene plate에 mouse anti-human IL-8 monoclonal antibody (R&D) 4 ug/ml로 희석된 것을 100 μl씩 넣고 실온에서 16시간 가량 반응시켰다. PBS용액(0.05% tween 20, pH 7.4)으로 3회 세척 후 1% BSA(PBS) 300 μl씩을 넣고 실온에서 한시간 반응시켰다. Standard (31.25 2,000 pg/mL)와 각 조건별 상층액 sample을 100 μl씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. HRP-steptavidin conjugate (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 1 : 2,000으로 PBS에 희석하여 각 well에 100 μl씩 놓고 30분간 반응시켰다. PBS용액으로 세척 후 ABTS substrate kit (Zymed)를 사용하여 발색하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과의 분석 및 표준곡선은 softmax 프로그램을 이용하였다. 또한 NF-κB의 억제제인 레바미피드[rebamipide: 0.1, 0.5 mM; 2-(4-chlorobenzoylamino)-3-{2(1H)-quinolinon-4-yl} propionic acid](Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd. Tokushima, Japan)와 PDTC를 2시간 전처리한 후 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)로 자극하여 24시간 후 IL-8의 농도를 측정하였다. TC와 TCDC 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF-κB의 역할을 알기 위하여 대조군 세포주와 더불어 AS-ODN와 S-ODN 처리한 AGS 세포주에서 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)로 자극 24시간 후 IL-8을 측정하여 비교하였다.

### 5. 핵단백질의 추출

AGS와 KATO III 세포주에서 핵단백의 추출은 Schreiber 등[32]의 방법을 이용하였다. 각각의 세포주를 10 cm petri dish에 분주하여 TC와 TCDC로 자극한 후 시간별로 세포를 원심분리하여 얼음 위에서 준비된 Tris-buffered saline (PBS; pH 7.9)으로 세척하였고 다시 400 μl의 버퍼 A 용액(10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCI, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM aprotinin, 14 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, and 80 μg of benzamidine/ml)에 재부유하였다. 얼음 위에서 15분 놓아 두고 Nonidet P-40 (최종 농도, 1.0%)를 처리하여 10초간 잘 혼합하였다. 혼합물은 30초간 원심 분리(1,300 ×*g*)한 뒤 침전물을 50 μl의 버퍼 C용액{20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 M NaCI, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM aprotinin, 14 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, and 80 μg benzamindine/ml}에 재부유하였다. 부유물은 4°C에서 15분간 강하게 섞어준 후 상층액을 수거하여 −80°C에서 aliquots상태로 저장하였다. 실험 전에 핵단백의 정량은 Bradford[33]의 방법에 따랐다.

### 6. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)법에 의한 NF-κB 활성도 측정과 자극 조건

NF-κB의 겔 이동 ODN인 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3' (Promega Corp., Madison, WI, USA)의 염기 서열을 가진 ODN을 T4 polynucleotide kinase (GIBCO BRL)을 이용하여 동위원소 표지자인 [$^{32}$P] dATP (Amersham, Piscataway, NJ, USA)로 표지하였다. Bio-Rad사의 정제 컬럼(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 결합되지 않은 [$^{32}$P] dATP를 정제한 뒤 말단에 [$^{32}$P] dATP가 표지된 프루브를 버퍼에 수집하였다. 1 μg의

핵단백을 12% glycerol, 12 mM HEPES (pH 7.9), 4 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.04 μ/L의 poly(dI-dC) (Behringer Mannheim), 0.4 mM PMSF와 Tris-EDTA 버퍼액이 함유된 버퍼에 배양하였다. 합성된 프루브를 첨가하여 각각의 조건에 의해 만들어진 표본을 얼음 위에서 10분간 배양하였다. 이 혼합물을 0.5× Tri borate EDTA버퍼를 이용하여 비변성의 6% polyacrylamide gel에 상온에서 부하하여 30 mA에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후에는 젤을 80°C에서 건조시켜 암실 영하 70°C 조건에서 6 18시간 동안 방사선 필름에 노출시켰다.[28] NF-κB의 구성을 확인하기 위해 두 종류의 Rel 단백인 p50과 p65에 대한 래비트의 항체를 이용하여 핵 추출물로부터 supershift assay를 시행하였다. 항p50 또는 항p65 항체 2.5 μg을 30분간의 배양과 동시에 DNA 프루브와 함께 첨가하였다. NF-κB의 억제제인 레바미피드(0.1, 0.5 mM)와 PDTC 10 mM을 2시간 전처치한 후 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)로 자극 30분 후의 NF-κB의 활성도를 측정하여 비교하였다. 또한 TCDC (1 mM)로 자극 30분 후 대조군 세포주와 더불어 AS-ODN와 S-ODN 트랜스펙션한 AGS 세포주에서 NF-κB의 활성도를 측정하여 비교하였다.

## III. 결 과

### 1. 타우린 포합 담즙산 자극 후 시간 및 농도별 IL-8의 발현

AGS 세포주에서 각각 저농도(TC; 0.5 mM, TCDC; 0.1 mM)와 고농도(TC; 5 mM, TCDC; 1 mM)의 TC나 TCDC를 처리 후 시간별 IL-8의 농도를 측정하였다. AGS 세포주에서 저농도 TC 처리 후 상층액에서 측정한 IL-8은 12시간까지는 TC를 처리하지 않은 세포주(대조군 세포주)와 차이가 없었으나 24시간 후에 대조군 세포주에 비하여 증가하였다($p<0.01$, 그림 1). 고농도 TC 처리 후 IL-8의 농도는 12시간 이후부터 현저히 증가하여 24시간 후에는 3.3배에 이르렀다($p<0.01$, 그림 1). 저농도의 TCDC를 처리하였을 때 IL-8 발현의 변화는 없었으나 고농도 처리 후에는 8시간 이후부터 증가하기 시작하여 24시간 후에는 4.9배에 이르렀다($p<0.01$, 그림 1).

### 2. 담즙산 자극 후 시간에 따른 NF-κB 활성도의 변화

AGS와 Kato III 세포주에 고농도의 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)를 처리한 후 시간별 NF-κB 활성도의 변화를 평가하였다. 또한 담즙산에 의해 활성화된 NF-κB 구성을 확인하기 위해 두 종류의 NF-κB 구성 단백인 p50과 p65에 대한 항체를 이용하여 supershift assay (그림 2)를 시행하였다. TC와 TCDC를 처리하지 않은 대조군 세포주에서 NF-κB의 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer가 약하나마 지속적으로 발현됨을 확인하였고 기저상태에서 p50/p65 heterodimer에 비하여 p50/p50 homodimer의 밴드가 진하게 나타나 p50 subunit이

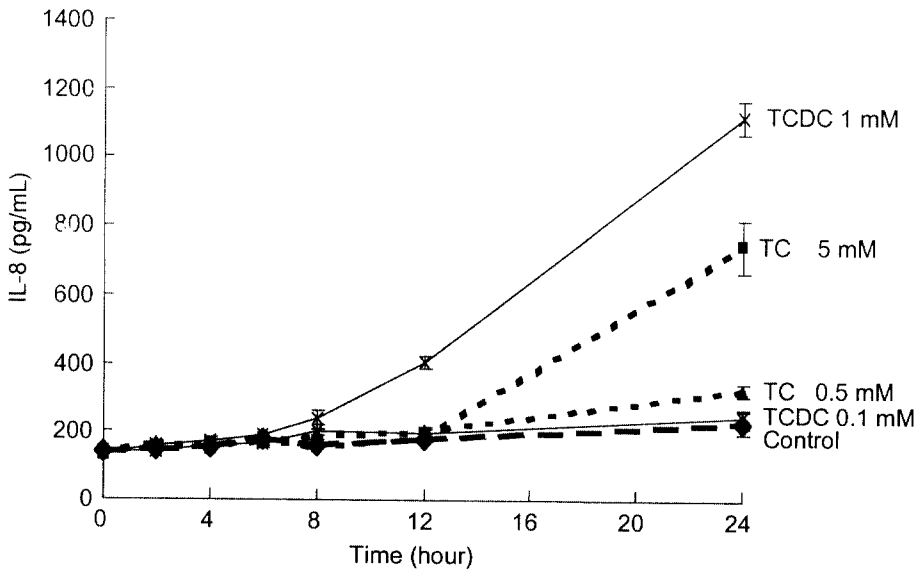


**그림 1.** 담즙산 자극 후 시간별 IL-8의 농도 변화. AGS 세포주에서 TC를 처리하였을 때 저농도(0.5 mM)와 고농도(5 mM)에서 모두 12시간 후부터 IL-8의 농도가 증가하기 시작하여 24시간 후에는 각각 1.4배와 3.3배에 이르렀다($p<0.01$, $p<0.01$). TCDC는 저농도(0.1 mM)를 처리하였을 때 대조군 세포주와 비교하여 시간별 차이를 보이지 않았으나 고농도(1 mM) 처리 후에는 IL-8의 농도가 8시간 이후부터 증가하기 시작하여 24시간 후에는 4.9배에 이르렀다($p<0.01$).

이들 세포주에서 나타나는 NF-κB의 주된 구성 성분임을 알 수 있었다(그림 3, 4). AGS 세포주에 TC나 TCDC를 처리하였을 때 NF-κB p50/p65 heterodimer의 결합활성은 15분 후부터 증가하여 각각 60분과 30분 후에 최고로 활성화되었고 120분 후부터 감소하였다(그림 3). Kato III 세포주에서는 TC나 TCDC 처리 후 NF-κB p50/p65 heterodimer의 결합활성이 15분 후부터 증가하여 30분 후에 최대로 활성화되었고 120분 이후부터 감소하였다(그림 4).

### 3. 담즙산의 농도에 따른 NF-κB 활성도의 변화

AGS와 Kato III 세포주에서 TC (1.25 5 mM)와 TCDC (0.125 1 mM)를 처리한 30분 후 농도별로 NF-κB의 활성도를 EMSA방법으로 평가하였다. 또한 TC나 TCDC를 처리한 AGS 세포주에서 EMSA를 하였을 때 나타나는 NF-κB의 특이 밴드의 구성을 확인하기 위하여 $^{32}$P방사능 표지자 부착하지 않은 고농도의 프루브를 처리하여 경쟁반응을 시켰을 때 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 완전히 억제되었다(그림 5; lane 5). AGS 세포주에서 TC나 TCDC의 농도가 증가할수록 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 증가하였다(그림 5). Kato III 세포주에서는 TC의 농도가 1.25 mM이었을 때 가장 활성화되었다가 2.5 mM 이상의 농도에서는 오히려 감소하였는데

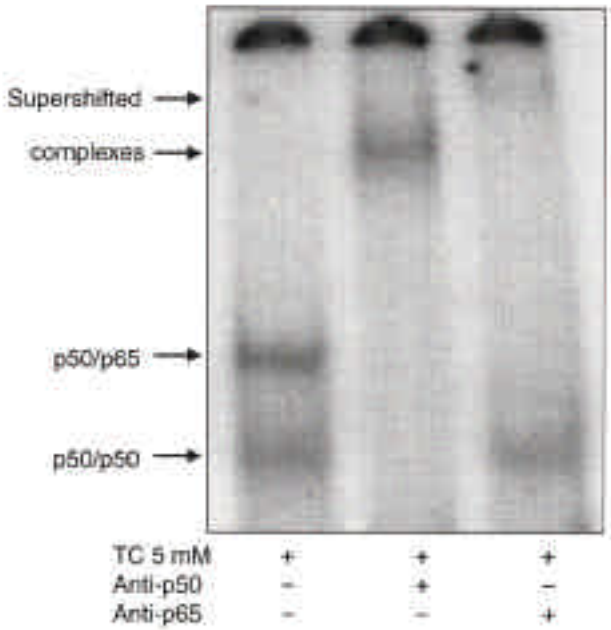


**그림 2.** NF-κB의 p50과 p65 subunit에 대한 항체를 이용한 supershift assay. AGS 세포주에 TC 5 mM를 처리한 후 EMSA를 시행하면서 NF-κB의 p50 subunit에 대한 차단 항체(anti-p50항체)를 처리하였을 때 증가되었던 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer 결합활성이 모두 억제되었고 anti-p65항체를 처리하였을 때는 p50/p65 heterodimer만 억제되어 TC자극 후 활성화되는 NF-κB의 구성성분이 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer임을 확인하였다.

이는 고농도의 TC를 처리하자마자 AGS 세포주와는 달리 부유세포인 Kato III 세포주에서 담즙산의 세정 작용에 의하여 세포막을 곧바로 파괴시켜 세포수가 급격히 감소하여 나타나는 현상으로 생각하였다. Kato III 세포주에서 TCDC는 농도가 증가할수록 NF-κB p50/p65 heterodimer가 활성화되었다(그림 6).

### 4. NF-κB억제제 전처리 후 담즙산 자극에 의한 NF-κB 활성도의 변화

AGS 세포주에서 NF-κB의 억제제인 레바미피드(0.1 1 mM)와 PDTC 100 μM의 2시간 전처리가 고농도의 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM) 자극에 의한 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. TC자극 후 증가하였던 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성은 전처치한 레바미피드의 농도가 증가할수록 억제되었으며 p50/p65 heterodimer의 억제가 p50/p50 homodimer보다 뚜렷하였다(그림 7). TCDC 자극 후 증가하였

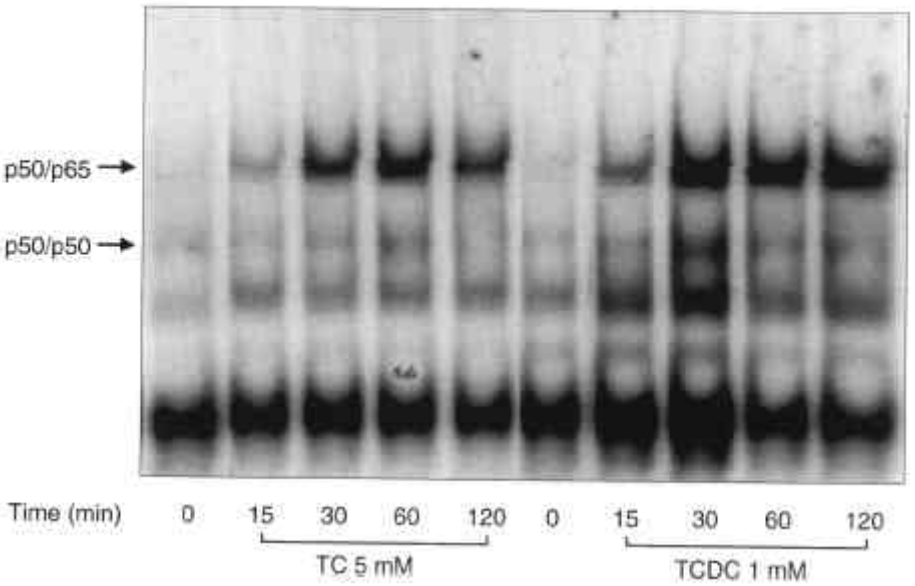


**그림 3.** AGS 세포주에서 담즙산 자극 후 시간별 NF-κB의 활성도 변화. TC나 TCDC자극 후 NF-κB의 p50/p65 heterodimer가 각각 60분과 30분 후에 최대로 활성화되었다가 120분 후부터는 활성도가 감소하였다. p50/p50 homodimer도 비슷한 양상이었으나 p50/p65 heterodimer에 비하여 활성도의 증가는 미미하였다.

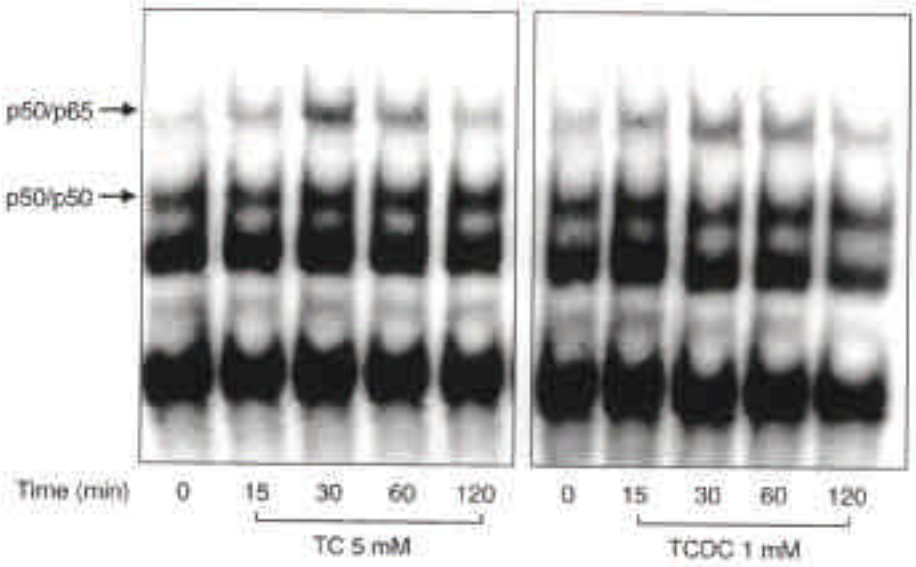


**그림 4.** Kato III 세포주에서 담즙산 자극 후 시간별 NF-κB의 활성도 변화. TC나 TCDC자극 후 NF-κB의 p50/p65 heterodimer가 모두 30분 후에 최대로 활성화되었다가 120분 후부터는 활성도가 감소하였다. p50/p50 homodimer는 기저상태에서도 발현이 증가되어 있었고 TC나 TCDC자극 후 결합 활성은 변화되지 않았다.

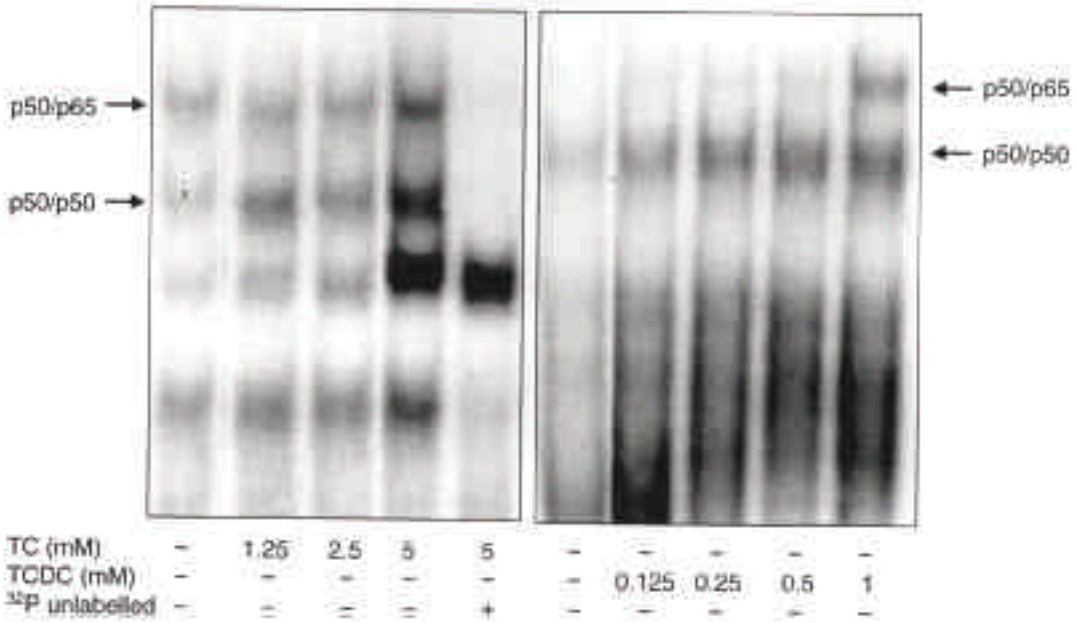


**그림 5.** AGS 세포주에서 담즙산 자극 후 농도별 NF-κB의 활성도 변화. $^{32}$P방사능 표지자 부착하지 않은 프루브를 이용한 경쟁반응에서 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 완전히 억제되었다(lane 5; 경쟁반응). TC나 TCDC의 농도가 증가할수록 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 증가하였다.

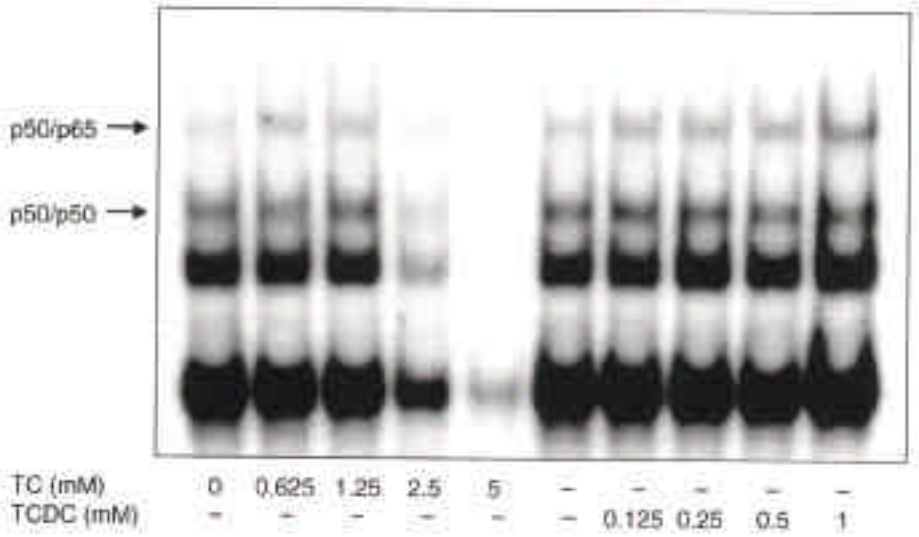


**그림 6.** Kato III 세포주에서 담즙산 자극 후 농도별 NF-κB의 활성도 변화. TC자극 30분 후 TC농도가 1.25 mM이었을 때 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 증가하였다가 2.5 mM 이상 농도에서는 오히려 감소하였다. TCDC는 농도가 증가할수록 NF-κB의 결합활성이 증가하였다.

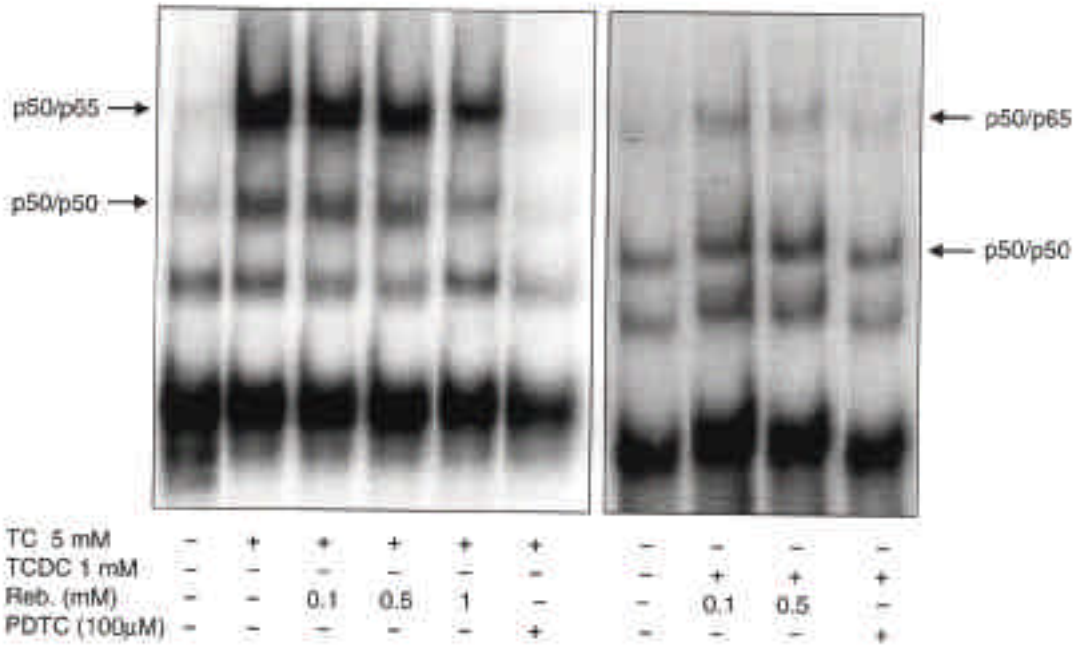


**그림 7.** NF-κB 억제제 전처리 후 담즙산 자극에 따른 NF-κB의 활성도 변화. AGS 세포주에서 레바미피드를 농도별로 전처치한 후 TC나 TCDC로 자극하였을 때 레바미피드의 농도가 증가할수록 p50/p65 heterodimer의 결합활성이 억제되었다(Reb.; 레바미피드). TC로 자극하기 전 PDTC로 전처치한 경우는 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 모두 거의 완전히 억제되었다.

던 NF-κB p50/p65 heterodimer 활성도 또한 레바미피드의 농도가 증가할수록 억제되었으며 p50/p50 homodimer의 활성은 변화가 뚜렷치 않았다(그림 7). PDTC를 전처리한 후 TC를 처리하였을 때 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성은 거의 완전히 억제되었다(그림 7).

### 5. NF-κB p50 subunit에 대한 AS-ODN을 처리한 세포주에서 TCDC자극 후 NF-κB의 활성도 변화

NF-κB의 subunit인 p-50의 전사를 억제하기 위하여 이에 대한 AS-ODN 또는 S-ODN을 처리한 AGS 세포주에서 TCDC (1 mM) 자극 30분 후 대조군 세포주와 더불어 NF-κB의 활성도를 측정하여 비교하였다. S-ODN을 트랜스펙션한 AGS 세포주에 비하여 AS-ODN을 트랜스펙션한 세포주에서 p50 subunit 밴드의 부분적인 억제가 관찰되었다(그림 8).

### 6. NF-κB 억제제나 p50 subunit에 대한 AS-ODN 처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8발현의 변화

타우린 포함 담즙산 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF-κB의 역할을 알기 위하여 NF-κB

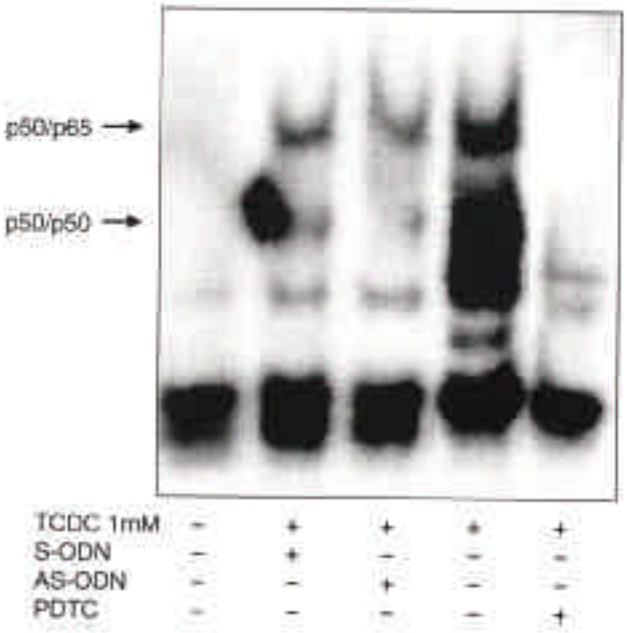


**그림 8.** AGS 세포주에서 NF-κB p50 subunit에 대한 AS-ODN 처리 후 TCDC 자극에 따른 NF-κB의 활성도 변화. AGS 세포주를 NF-κB p50 subunit에 대한 AS-ODN으로 처리하였을 때 S-ODN으로 처리한 세포주에 비하여 TCDC 자극 후 NF-κB p50 subunit 밴드의 부분적인 억제가 관찰되었다.

의 억제제인 레바미피드(0.1, 0.5 mM)와 PDTC를 2시간 전처리한 후 TC (5 mM)나 TCDC (1 mM)로 자극하여 24시간 후의 IL-8을 측정하였다. AGS 세포주에서 TC자극에 의한 IL-8의 농도는 레바미피드를 0.1 mM로 전처치하였을 때 49% (530 pg/ml vs. 272 pg/ml, $p<0.01$), 0.5 mM에서는 56% (530 pg/ml vs. 233 pg/ml, $p<0.01$)의 의미있는 감소를 보였으나, 전처치한 레바미피드 농도에 따른 차이는 보이지 않았으며 PDTC를 전처리하였을 때 IL-8의 농도는 의미있게 감소하였다($p<0.01$, 그림 9). 레바미피드로 전처치한 후 TCDC로 자극한 경우에는 농도별로 각각 61% (0.1 mM)와 68% (0.5 mM)의 감소를 보였으며($p<0.01$, $p<0.01$, 그림 9) PDTC를 전처리하였을 때도 유의하게 감소하였다($p<0.01$, 그림 9). AS-ODN으로 처리한 AGS 세포주에서 TC나 TCDC자극 24시간 후 IL-8의 농도는 S-ODN으로 처리한 세포주에 비하여 모두 의미있게 감소하였다($p<0.05$, $p<0.05$, 그림 9).

Kato III 세포주에서 TC자극 24시간 후 IL-8의 농도는 대조군 세포주의 573 pg/ml에 비하여 3.2배 증가하였다. 레바미피드를 전처치하였을 때 농도별로 각각 43% (0.1 mM)와 57% (0.5 mM)의 의미있는 감소를 보였으며($p<0.01$, $p<0.01$) PDTC를 전처리하였을 때 IL-8의 농도는 534 pg/ml로 유의하게 감소하였다($p<0.01$, 그림 10). TCDC로 자극한 경우 IL-8의

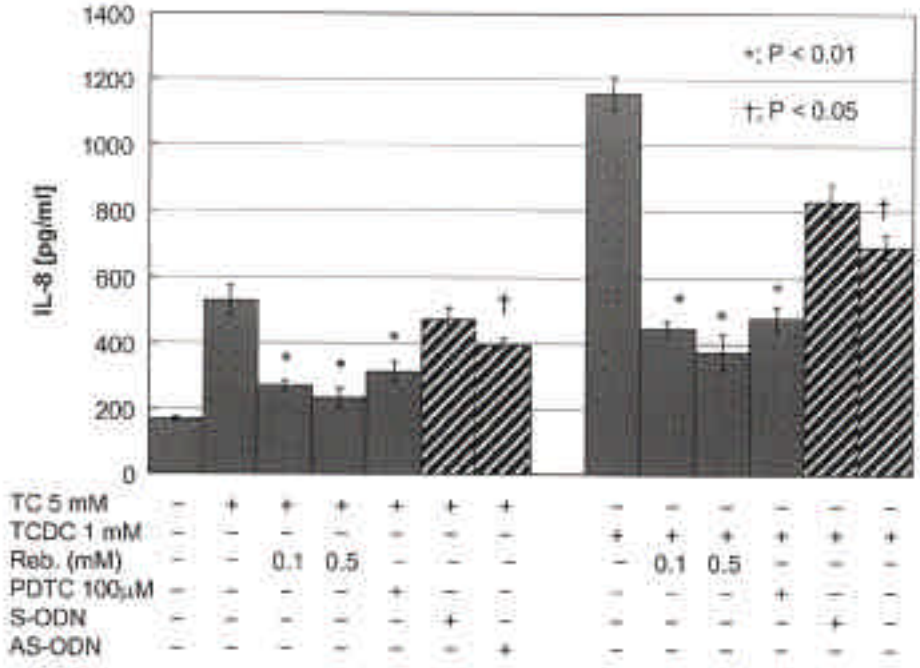


**그림 9.** AGS 세포주에서 NF-κB 억제제나 p50 AS-ODN 처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8발현의 변화. TC 5 mM 자극 후 IL-8의 농도는 대조군 세포주에 비하여 3.2배 증가하였고($p<0.01$) 레바미피드 0.1 mM, 0.5 mM 그리고 PDTC를 전처치하였을 때 각각 49%, 56%, 41% 의미있게 감소하였다($p<0.01$ in all). TCDC 1 mM 자극 후 IL-8의 농도는 대조군 세포주에 비하여 6.9배 증가하였고($p<0.01$) 레바미피드 0.1 mM, 0.5 mM 그리고 PDTC를 전처치하였을 때 각각 61%, 68%, 59% 감소하였다($p<0.01$ in all) (*; TC or TCDC vs. rebamipide or PDTC, dot lanes). AS-ODN로 처리한 세포주에서 TC나 TCDC자극 24시간 후 IL-8의 농도는 S-ODN로 처리한 세포주에 비하여 모두 의미있게 감소하였다($p<0.05$. $p<0.05$) (†; S-ODN vs. AS-ODN, oblique shaded bars).

농도는 대조군 세포주에 비하여 2배 증가하였다(그림 10). 레바미피드 0.1 mM 전처치시에 IL-8의 농도는 차이가 없었으나 0.5 mM 전처치시에는 30% 감소하였으며(1115 pg/ml vs. 778 pg/ml, $p<0.01$) PDTC를 전처리하였을 때 IL-8의 농도는 671 pg/ml로 의미있게 감소하였다($p<0.01$, 그림 10).

## IV. 고 찰

위의 부분절제술을 시행받은 환자에서 장관-위 역류(enterogastric reflux)는 수술 후 잔위염의 주요한 원인이 된다.[1,2] 수술 후 잔위의 위-장관 문합부로부터 위 점막의 발적 및 부종 등의 내시경적인 육안 소견과 더불어 나타나는 특징적인 병리조직학적 소견[34]은 잔위염이 과도한 장관-위 역류와 관련된 뚜렷한 독립적인 질환군임을 시사하며 장관-위 역류의 내용

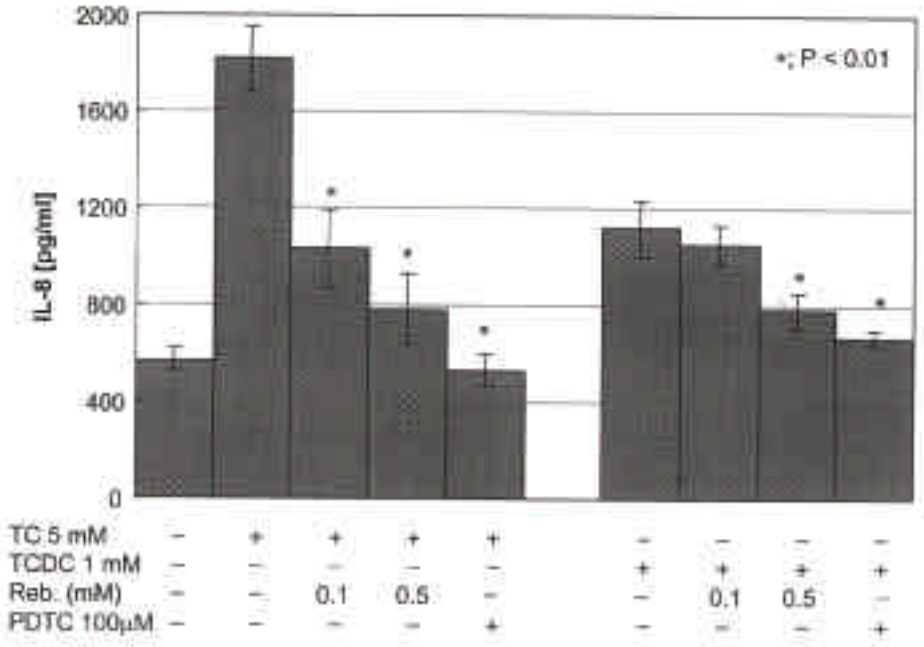


**그림 10.** Kato III 세포주에서 NF-κB 억제제 전처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8발현의 변화. TC 5 mM 자극 후 IL-8의 농도는 대조군 세포주에 비하여 3.2배 증가하였고($p<0.01$) 레바미피드 0.1 mM, 0.5 mM 그리고 PDTC를 전처치하였을 때 각각 43%, 57%, 70% 감소하였다($p<0.01$ in all). TCDC 1 mM 자극 후 IL-8의 농도는 대조군 세포주에 비하여 2.0배 증가하였고($p<0.01$) 레바미피드 0.1 mM, 0.5 mM 그리고 PDTC를 전처치하였을 때 각각 61%, 68%, 59% 감소하였다($p<0.01$ in all)(*; TC or TCDC vs. rebamipide or PDTC).

물인 담즙염과 담즙산은 위 점막 세포의 손상에 관여하는 핵심물질로 밝혀져 있다.[3,4] 장관-위 역류에 의한 증상이 있는 환자가 무증상의 환자보다 총담즙산의 농도가 높고, 수술 후 잔위의 인체 모델이나 개 동물 모델에서 담즙산의 농도와 양이 증가할수록 잔위염의 정도가 심하다는 연구 결과는 장관-위 역류에서 담즙산이 중요한 위 점막 손상 물질임을 의미한다.[35,36]

담즙의 위 점막 손상 기전에 관한 위 상피세포의 전기생리학적 변화[18]나 조직학적인 변화[37]에 대한 연구 결과에 따르면 담즙염이나 담즙산은 세포막의 구성 성분인 지질을 용해시키는 세정효과(detergent effect)에 의하여 위 점막을 대개 노출 1분 내에 빠르게 손상시킨다.[19] 이러한 세포막 손상은 세포막 투과도를 증가시키고 결과적으로 수소 이온의 위 상피세포 내로의 역확산과 위 상피세포로부터 소디움 이온의 위 내 확산을 초래하여 위 점막의 pH를 저하시킴으로써 점막 방어벽을 파괴시킨다.[14] 담즙염과는 달리 담즙산은 담즙염의 세포 외 손상 기전과 더불어 위 상피세포 내로 들어가 세포 손상을 유발시킬 가능성이 동물 실험을 통하여 제기되었다.[14,18] TC는 pKa값보다 낮은 pH에서도 마이셀을 형성하며 이

온 형태가 아닌 양성자(proton) 형태로 위 상피세포 내로 들어가지 않고 위 점막 방어벽을 손상시킨다.[14] 또한 고농도의 TC가 레시틴과 결합하여 혼합 마이셀을 형성하더라도 위 점막의 인지질을 충분히 용해시키지 못하여 수소 이온의 역확산과 소디움 이온의 위 내 확산을 불완전하게 유도한다는 사실은 담즙산에 의한 위 점막의 투과도 변화가 세포막 지질의 용해뿐 만 아니라 다른 기전이 있음을 뒷받침한다.[14] 위 상피세포로 잘 흡수되지 않는 이온형 TC 성분이 혼합물의 10%만 차지해도 담즙염에서 관찰되는 위 점막 방어벽 손상을 유발하고 레시틴에 용해되어 마이셀을 형성하는 TC의 임계 농도와 상관없이 위 점막이 손상된다는 연구결과는 담즙산이 위 내에서 마이셀을 형성하지 않고 위 점막이나 상피세포 내로 들어가 세포 손상을 유발할 가능성을 의미한다.[14] 담즙산은 *in vitro*에서 세포막의 성분인 지질과 단백에 결합하는 것으로 알려져 있다.[38] 뿐만 아니라 이러한 담즙산의 결합은 마이셀 형성의 임계 농도 이하에서도 발생하여 세포막의 효소 활성이나 투과도를 변화시킨다.[38] 개 모델을 이용한 Heidenhain pouch에서 TC는 농도와 무관하게 수소 이온의 역확산과 소디움 이온의 위 내 확산을 증가시키는 사실은 마이셀 형성이 담즙산에 의한 위 방어벽 손상에 필수적인 요소는 아니며 고농도의 담즙산이 담즙염에 비해 pouch로의 흡수율이 빠름은 위강 내의 이온화 형태 담즙산의 작용과 달리 위 점막에 담즙산이 흡수되어 점막 손상을 일으킴을 뒷받침한다.[14] 따라서 이러한 연구결과는 담즙산이 위 상피세포에 축적되어 세포 내 pH를 감소시키거나 세포질 내의 소기관에 축적되어 세포대사를 저해하고 이 과정에서 담즙산 매개 손상을 유도하는 세포 내 신호전달 체계가 존재할 가능성을 강력히 시사한다.[38]

NF-κB는 p50 (NF-κB1), p52, Rel A, c-Rel 또는 rel-B의 조합으로 구성되는 Rel계 전사조절 인자의 하나로 다양한 세포에서 바이러스, 세균, mitogen, 염증성 싸이토카인, 산소 자유기를 내는 물질 등의 세포 외 자극에 의하여 세포질과 핵간의 신호 전달을 매개한다.[20-22] NF-κB는 휴지기 상태에서 세포질 내의 억제 단백인 IκB와 비공유 결합의 형태로 heterodimer나 homodimer로 존재한다.[20,39] 세포 외 자극에 의하여 IκB와 분리되어 활성화된 NF-κB는 핵 내로 이동하여 목표 유전자의 DNA결합 부위에 결합하여 유전자의 전사를 조절하게 된다. 최근 보고에 따르면 NF-κB 유전자 산물은 세포의 증식, 형질변환, 종양발생에 관여하여 발암과정에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다.[23,24,40-42] NF-κB의 활성화는 세포 생존반응을 매개하여 종양 세포의 세포고사를 억제하고[43-45] NF-κB를 억제하는 super-repressor형태의 IκBα나 dominant-negative IκBα의 인위적 발현은 종양촉진 유전자인 Bcr-Abl 매개에 의한 세포형질변환을 차단시키고[41] 친염증성 싸이토카인의 발현을 억제하며 두경부 암에서 종양성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다.[42] 또한 NF-κB의 활성화는 전혈관생성인자(proangiogenic factor)로 알려진 IL-8의 발현을 증가시켜 종양세포의 성장에 관여하게 된다.[46,47] 이러한 NF-κB는 일부 위암 세포주에서 지속적으로 일정한 수준으로 핵 내에서 p50/p65 heterodimer나 p50/p50 homodimer의 형태로 관찰된다. 특히 본 실험에서

이용된 AGS 세포주에서 *Helicobacter pylori*자극에 의하여 p50/p65 heterodimer나 p50/p50 homodimer가 핵 내에서 증가되고 NF-κB 매개에 의한 친염증성 싸이토카인인 IL-8 단백의 발현이 증가되어 위 상피세포주에서 중요한 세포신호 전달 경로로 작용함을 알 수 있다.[48-50]

IL-8은 C-X-C 케모카인의 일종으로 백혈구의 이동과 활성화를 유도하여 다양한 염증성 질환의 병인에 중요한 역할을 담당하며[51] 위 상피세포주를 포함한 다양한 세포주에서 발현된다.[52] 위 상피세포주에서 IL-8은 중성구의 동원을 포함한 주요한 숙주 염증매개 물질로 알려져 있으며 친염증성 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α 등의 자극에 의하여 활성화된다.[25-27] 최근 IL-8은 *in vitro*와 *in vivo*에서 혈관내피세포의 화학 주성과 증식을 유도하는 잠재적인 혈관생성인자로 보고되고 있다.[46,53] 이에 대한 근거로 여러 종류의 인체 암 세포주나 고형암에서 IL-8의 발현이 보고되었고[54-56] 동물 실험을 통해서는 인체 악성 흑색종 세포주의 혈관생성과 전이를 촉진하는 것으로 밝혀졌다.[54,57] Kitadai 등[57]은 nude mice에 이식한 인체 위암세포주의 혈관생성정도와 IL-8의 단백 발현정도 간의 유의한 상관성을 보고하여 IL-8이 위암의 전이과정에서 중요한 혈관생성인자로 작용할 가능성을 시사하였다. 이러한 IL-8의 유전자 발현에는 NF-κB나 activation protein-1 (AP-1)등의 전사 활성화 인자인자가 핵심적인 역할을 한다.[26] 인체 난소암 세포주와 nude mice에 이식한 난소암 세포주에서 NF-κB의 억제제는 혈관생성을 촉진하는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)와 IL-8의 발현을 억제하는 것으로 밝혀져 종양의 성장과 전이에 NF-κB 매개 IL-8의 활성화가 중요한 세포 신호전달 경로로 작용함을 시사하였다.[58] 본 연구 결과 두 종류의 위 상피세포주에서 타우린 포합 담즙산 처리 60분 이내의 초기에 NF-κB의 p50/p50 homodimer와 p50/p65 heterodimer가 활성화되고 12시간 이후 시간 및 농도별로 IL-8의 발현이 증가함을 관찰하였다. 또한 담즙산에 의한 위 점막 손상의 임상적 모델인 수술 후 잔위염 환자에서 특징적으로 나타나는 융모성 선와의 증식이나 점막 모세혈관의 혈관확장 등[60]의 조직병리소견은 본 연구 결과와 연관지어 담즙산에 의한 NF-κB 매개 IL-8의 활성화에 따른 2차적인 변화일 가능성을 추론할 수 있다. 특히 수술 후 잔위에서 오랜 기간이 경과된 후에 위-공장 문합부의 용종이나 잔위암의 발생이 정상인보다 흔하다는 사실의 일부를 설명해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 NF-κB의 억제제인 레바미피드와 PDTC의 전처리를 통하여 타우린 포합 담즙산 자극에 의하여 유도되는 NF-κB 및 IL-8 발현의 변화를 평가하였다. NF-κB의 활성화는 과산화수소 등의 반응성 산소기를 포함한 산화적 스트레스에 의하여 유도되며[20] N-acetylcysteine과 같은 항산화제에 의하여 활성화가 억제된다.[61] 레바미피드는 다양한 궤양유발 자극으로 활성화된 반응성 산소기를 소거하고 친염증성 싸이토카인의 생산을 억제함[61]으로써 위 점막의 급성 손상을 억제하는 효과적인 약제로 알려져 있다.[62] 본 연구에서 레바미피드는 위 상피세포주에서 타우린 포합 담즙산 자극에 의하여 유도된 NF-κB 매개 IL-8

의 활성화를 각각 0.1, 0.5 mM농도에서 효과적으로 억제하였다. 이러한 농도는 인체에서 상용량을 복용함으로써 위 점막 내에 0.01 1 mM의 임상적으로 효과적인 농도에 이르는 것으로 약물동력학 연구 결과 밝혀져 있다.[63] 따라서 레바미피드는 타우린 포합 담즙산에 의한 위 상피세포 손상과정에서 NF-κB의 활성화 억제를 통한 친염증성 싸이토카인인 IL-8 단백의 발현을 억제할 수 있는 효과적인 약제로 생각하였다. 이와 더불어 레바미피드가 *Helicobacter pylori*의 위 상피세포 부착을 억제하는 것[27]과 유사한 기전으로 담즙산의 위 상피세포 노출을 억제하는 것도 가능성 있는 기전으로 생각하였다. PDTC는 반응성 산소기를 소거하는 기전에 의하여 NF-κB의 상위 조절성 결합 부위에 작용하여 NF-κB매개 전사 활성화를 억제한다.[64] 본 연구 결과 PDTC는 타우린 포합 담즙산에 의한 NF-κB의 p50/65 heterodimer 및 p50/p50 homodimer를 거의 완전히 억제하였고 IL-8 단백의 발현도 효과적으로 억제하였다. 따라서 타우린 포합 담즙산에 의한 위 상피세포 손상에 NF-κB 매개를 통한 IL-8의 활성화가 중요한 세포 신호전달 경로임을 확인하였고 NF-κB활성화의 상위 기전으로 반응성 산소기가 관여할 가능성을 간접적으로 알 수 있었다.

AS-ODN은 15 25개의 염기쌍으로 이루어진 합성 분자물질로 목표 유전자에서 전사된 mRNA에 상보적인 단일 사슬의 DNA로 구성된다. AS-ODN은 상보적인 구조를 가진 목표 mRNA에 염기쌍을 이루어 duplex 구조를 형성함으로써 유전자 발현을 억제한다.[65] AS-ODN이 목표 유전자의 발현을 억제하는 기전으로는 유전자 전사나 번역과정의 입체적인 억제, mRNA의 processing이나 splicing 과정의 차단, 또는 Rnase H의 활성화를 통한 mRNA의 변성 등이다.[66] ODN 처리의 다른 이점으로는 인산화 결합 부위의 비연결성 산소(non-bridging oxygen)를 황(sulfur)으로 인위적으로 대체시켜 phosphorothioate 변형 ODN을 형성함으로써 내인성 핵분해 효소(nuclease)로부터의 파괴를 줄여 효과적으로 기능을 개선시킬 수 있다.[67] 따라서 AS-ODN은 단일 유전자나 전사 산물에 결합하여 해당 유전자의 발현을 구조적으로 억제하고 부작용을 최소화한다. 본 연구에서 사용한 위 상피암세포주의 활성화에는 NF-κB dimer인 p50/65 heterodimer와 p50/p50 homodimer가 관여하는 것으로 알려져 있어[68,69] 본 연구에서 이용된 NF-κB의 p50 subunit에 대한 AS-ODN은 NF-κB의 발현과 NF-κB가 조절하는 유전자를 가장 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각하였다. 실험 결과 AS-ODN으로 처리한 AGS 세포주는 S-ODN으로 처리한 세포주에 비하여 TC 또는 TCDC 자극 후 NF-κB p50 subunit의 활성도가 억제되었고 IL-8의 단백 발현도 효과적으로 억제되어 담즙산에 의한 위 상피세포주 손상이 NF-κB 매개 IL-8의 활성화 경로에 따른 것임을 재차 확인하였다.

본 연구 결과를 요약하면 타우린 포합 담즙산에 의한 위 상피세포주 손상과정은 NF-κB 매개 IL-8의 활성화가 중요한 역할을 하며 이러한 세포 신호전달 경로는 위 부분절제술 후의 담즙 역류성 잔위염의 주요한 분자생물학적 기전으로 생각되었다. 또한 타우린 포합 담즙산에 의한 NF-κB 매개 IL-8의 활성화는 수술 후 잔위에 나타나는 위 상피세포의 증식성

변화와 더불어 잔위의 용종이나 암 발생 과정을 설명할 수 있는 가능성있는 세포 신호전달 경로로 생각되며 이와 관련되어 향후 많은 연구가 진행되기를 기대한다.

## V. 결 론

담즙의 장관-위 역류는 위의 유문부를 제거하는 위부분 절제술 후에 발생하는 가장 흔한 수술 후 합병증으로 위 상피세포에 손상을 유발한다. 위로 역류된 담즙의 성분인 담즙산이 위 상피세포 손상을 유도하는 세포 신호전달 경로를 알아보고자 간에서 합성되어 십이지장으로 분비되는 담즙산 중에서 고농도로 존재하는 타우로콜릭산과 타우로케노데옥시콜릭산으로 위 상피세포주를 자극한 후 위 상피세포의 증식, 형질변환, 종양발생에 관여하며 IL-8 유전자의 핵심적인 전사조절 인자로 알려진 NF-κB의 활성화 여부와 이에 따른 IL-8의 발현 여부를 평가하고자 하였다. 또한 레바미피드나 PDTC를 전처리하거나, NF-κB의 p50 subunit에 대한 AS-ODN 처리를 통한 NF-κB의 활성억제를 통하여 IL-8의 발현에 대한 NF-κB의 역할을 알아보고자 하였으며 다음의 연구 결과를 얻었다.

1. AGS와 Kato III 위 상피세포주에 TC나 TCDC 자극 후 IL-8의 농도는 시간별, 농도별로 증가하였고 TC와 TCDC 자극 24시간 후 각각 3.3배, 4.9배의 증가를 나타내었다.
2. AGS와 Kato III 세포주에서 TC나 TCDC 자극 15분 후부터 NF-κB의 활성도가 증가하기 시작하여 30 60분 사이에 최대로 활성화되었다가 120분 후부터는 감소하였다. 담즙산의 농도가 증가할수록 NF-κB의 활성도가 높았다.
3. AGS와 Kato III 세포주에서 NF-κB의 억제제인 레바미피드와 PDTC를 전처리하였을 때와 AGS 세포주에서 NF-κB의 p-50 subunit에 대한 AS-ODN처리를 통하여 NF-κB활성을 억제하였을 때 NF-κB의 활성화 감소와 더불어 IL-8의 발현이 유의하게 감소하였다.

따라서 본 연구는 타우린 포합 담즙산에 의한 위 상피세포 손상의 세포 신호전달 경로로 NF-κB 매개에 의한 IL-8의 발현의 활성화가 중요한 역할을 함을 밝힌 최초의 연구로써 향후 위 절제수술 후 발생하는 잔위염이나 잔위암 등의 병인연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각하였다.

## 참 고 문 헌


1. Ritchie WP Jr. Alkaline reflux gastritis: an objective assessment of its diagnosis and treatment. Ann Surg 1980;192:288-98.
2. Ritchie WP Jr. Alkaline reflux gastritis: a critical reappraisal. Gut 1984;25:975-87.
3. Ritchie WP Jr, Cheng JW, Delaney JP. Changes in parietal and chief cell populations following vagotomy and antrectomy. Surg Forum 1969;20:319-20.

4. Dixon MF, O'Connor HJ, Axon AT, King RF, Johnston D. Reflux gastritis: distinct histopathological entity? J Clin Pathol 1986;39:524-30.
5. Northfield TC, McColl I. Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. Gut 1973;14:513-8.
6. Dowling RH. The enterohepatic circulation. Gastroenterology 1972;62:122-40.
7. Fini A, Roda A. Chemical properties of bile acids. IV. Acidity constants of glycine-conjugated bile acids. J Lipid Res 1987;28:755-9.
8. Gu JJ, Hofmann AF, Ton-Nu HT, Schteingart CD, Mysels KJ. Solubility of calcium salts of uncojugated and conjugated natural bile acids. J Lipid Res 1992;33:635-46.
9. Masci E, Testoni PA, Fanti L, Guslandi M, Zuin M, Tittobello A. Duodenogastric reflux: correlations among bile acid pattern, mucus secretion, and mucosal damage. Scand J Gastroenterol 1987;22:308-12.
10. Ritchie WP, Felger TS. Differing ulcerogenic potential of dihydroxy and trihydroxy bile acids in canine gastric mucosa. Surgery 1982;89:342-7.
11. Kishimoto S, Ogawa M, Takaba N, Kambara A, Okamoto K, Shimizu S, et al. Experimental model of gastritis induced by sodium taurocholate in rats. Hiroshima J Med Sci 1986;35:143-7.
12. Stern AI, Hogan DL, Isenberg JI. Effect of sodium taurocholate on human gastric mucosa at acid and neutral pH's. Gastroenterology 1984;87:1272-6.
13. Quist RG, Ton-Nu HT, Lillienau J, Hofmann AF, Barrett KE. Activation of mast cells by bile acids. Gastrotenterology 1991;101:446-56.
14. Duane WC, Wiegand DM. Mechanism by which bile salt disrupts the gastric mucosal barrier in the dog. J Clin Invest 1980;66:1044-9.
15. Thomas AJ, Nahrwold DL, Rose RC. Detergent action of sodium taurocholate on rat gastric mucosa. Biochim Biophys Acta 1972;282:210-3.
16. Lillemoe KD, Kidder GW, Harmon JW, Gadacz TR, Johnson LF, Bunte RM, et al. Tauroursodeoxycholic acid is less damaging than taurochenodeoxycholic acid to the gastric and esophageal mucosa. Dig Dis Sci 1983;28:359-64.
17. Slomiany BL, Aono M, Murty VL, Piasek A, Slomiany A. Effect of bile acids on the glycoprotein constituent of gastric mucus. J Appl Biochem 1984;6:308-13.
18. Duane WC, Wiegand DM, Sievert CE. Bile acid and bile salt disrupt the gastric mucosal barrier in the dog by different mechanisms. Am J Physiol 1982;242:G95-9.
19. Duane WC. Experimental gastritis: are the detergents on or in the mucosa? Am J Physiol 1986;G870-2.
20. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. EMBO J 1993;12:2005-15.
21. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-κB: ten years after. Cell 1996;87:13-20.

22. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-κB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med 1997;336:1066-71.
23. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation, and function of NF-kappa B. Annu Rev Cell Biol 1994;10:405-55.
24. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. J Mol Med 1996;74:749-69.
25. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, and Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. J Leukocyte Biol 1994;56:554-8.
26. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K. Tumor necrosis factor and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-κB-like binding sites of the interleukin 8 gene. J Biol Chem 1992;267:22506-11.
27. Aihara M, Azuma A, Takizawa H, Tsuchimoto D, Funakoshi Y, Shindo Y, et al. Molecular analysis of suppression of interleukin-8 production by rebamipide in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric cancer cell. Dig Dis Sci 1998;43:174S-80S.
28. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. Mol Cell Biol 1993;13:3301-10.
29. Zhang Y, Broser M, Rom W. Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF IL 6 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3632.
30. Hayashi S, Sugiyama T, Amano K, Isogai H, Isogai E, Aihara M, et al. Effect of rebamipide, a novel antiulcer agent, on *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1895-9.
31. Lappalainen K, Urtti A, Solderling E, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Syrjanen S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. Biochem Biophys Acta 1994;1196:201-8.
32. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffiner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. Nucleic Acids Res 1989;17:6419.
33. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Angl Biochem 1976;72:248-54.
34. Dixon MF, O'Connor HJ, Axon ATR, King RF, Johnston D. Reflux gastritis: distinct histopathological entitiy? J Clin Pathol 1986;39:524-30.
35. Cabrol J, Navarro X, Sancho J, Simo-Deu J, Segura R. Bile reflux in postoperative alkaline reflux gastritis. Ann Surg 1990;211:239-43.
36. Bechi P, Amorosi A, Mazzanti R, Dei R, Bianchi S, Mugnai L, et al. Reflux-related gastric mucosal injury is associated with increased mucosal histamine content in humans. Gastro-

enterology 1993;104:1057-63.
37. Black RB, Hole D, Rhodes J. Bile damage to the gastric mucosal barrier: the influence of pH and bile acid concentration. Gastroenterology 1971;61:178-84.
38. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochem Biophys Acta 1975;415:29-79.
39. Kopp EB, Ghosh S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. Adv Immunol 1995; 58:1-27.
40. Sharma HW, Narayanan, R. The NF-kappa B transcription factor in oncogenesis. Anticancer Res 1996;16:1589-96.
41. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr. A requirement for NF-kappa B activation in Bcr-Abl-mediated trasnsformation. Gene Dev 1998;12:968-81.
42. Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, et al. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-κBα of NF-κB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression and tumor growth in vivo. Cancer Res 1999;59:3468-74.
43. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. Science 1996;274:787-9.
44. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. Science 1996;274:784-7.
45. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science 1996;274:782-4.
46. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science 1992;258:1798-801.
47. Hu DE, Hori Y, Fan TP. Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. Inflammation 1993; 17:135-43.
48. Huang J, O'Toole PW, Doig P, Trust TJ. Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1995;63:1732-8.
49. Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. Gastroenterology 1995;111:419-25.
50. Kim H, Seo JY, Kim KH. Inhibition of lipid peroxidation, NF-κB activation and IL-8 production by rebamipide in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. Dig Dis Sci 2000;45:621-8.
51. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. J Immunol 1989;143:1366-71.
52. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Mastushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family. Annu Rev Immunol 1991;6:617-48.

53. DeMarco D, Junkel SL, Strieter RM, Basha M, Zurier RB. Interleukin-1 induced gene expression of neutrophil activating protein (interleukin-8) and normocyte chemotactic peptide in human synovial cells. Biochem Biophys Res Commun 1991;174:411-6.
54. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. Cancer Res 1994;54: 3242-7.
55. Singh RK, Gutman M, Reich R, Bar-Eli M. Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin-8. Cancer Res 1995;55:3669-74.
56. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. J Gastroenterol 1994;29:423-9.
57. Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, et al. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. Br J Cancer 1999;81:647-53.
58. Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Filder IJ. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. Cancer Res 2000;60:5334-9.
59. Houghton PW, Mortensen NJ, Thomas WE, Cooper MJ, Morgan AP, Burton P. Intragastric bile acids and histological changes in gastric mucosa. Br J Surg 1986;73:354-6.
60. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:1672-6.
61. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Harada N, Johno M, Okabe H, et al. Rebamipide attenuates indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation by inhibiting activation of leukocytes in rats. Dig Dis Sci 1997;42:319-25.
62. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiysma H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. Eur J Pharmacol 1987;142:23-9.
63. Naito Y, Yoshikawa T, Iinuma S, Miyazaki R, Yagi N, Yoshida N, et al. Local gastric and serum concentrations of rebamipide following oral administration to patients with chronic gastritis. Arzneimittelforschung 1996;46:698-700.
64. Ziegler-Heitbrock HW, Sternsdorf T, Liese J, Belohradsky B, Weber C, Wedel A, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. J Immunol 1993;151:6986-93.
65. Milligam JF, Matteucci MD, Martin JC. Current concepts in antisense drug design. J Med Chem 1993;36:1923-37.
66. Crooke ST. Therapeutic applications of oligonucleotides. Annu Rev Pharmacol Toxicol

1992;32:329-76.
67. Brown DA, Kang SH, Gryaznov SM, DeDionisio L, Heidenreich O, Sullivan S, et al. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. J Biol Chem 1994;269:26801-5.
68. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1099-109.
69. Kim H, Seo JY, Kim KH. Effects of mannitol and dimethylthiourea on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production in gastric epithelial cells. Pharmacology 1999;59:201-11.

**Abstract**

## Taurine-conjugated bile acids induce NF-κB mediated interleukin-8 activation in gastric epithelial cell lines

**Hyun Soo Kim**

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

(Directed by Professor Won Ho Kim)


Entero-gastric reflux of bile is an invariable consequence of operations that remove or by-pass the pylorus and has been known to induce significant gastric epithelial injury. However, the molecular mechanism of bile acid induced gastric epithelial injury remains poorly understood. The aims of this study were to examine whether IL-8 was expressed by the stimulation of taurine conjugated bile acids, taurocholic acid (TC) or taurochenodeoxycholic acid (TCDC), in human gastric epithelial cells (AGS and Kato III) and to evaluate the role of NF-κB on the expression of IL-8. Time courses of bile acids induced secretion of IL-8 were measured with ELISA in supernatants of cultured cells. After high or low dose of TC or TCDC treatment, time courses of changes in NF-κB binding activity were determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). To evaluate the role of NF-κB on the expression of IL-8, IL-8 levels were assessed after pretreatment with rebamipide (an antioxidant), PDTC (a known NF-κB inhibitor), or phosphorothioate-modified anti-sense (AS) oligonucleotides (ODN) for p50 subunit of NF-κB. The secretions of IL-8 were increased with TC (0.1 5 mM) or TCDC (0.05 1 mM) stimuli in a time and dose-dependent manner (12 24 hr). TC (5 mM) and TCDC (1 mM) caused approximately 3.3 and 4.9-fold increases in IL-8 secretion, respectively. Moreover, AGS and Kato III cells treated with TC or TCDC dose-dependently induced a prominent NF-κB binding complex within 60 min. Pre-incubation of the cells with PDTC (100 μM) rebamipide (0.1 and 0.5 mM) or AS-ODN caused significant decreases in IL-8 secretion induced by TC or TCDC. These results demonstrate that NF-κB mediated IL-8 expression may play an important role in the taurine-conjugated bile acid-induced gastric epithelial injury and may present a plausible molecular mechanism for the bile reflux gastritis seen in patients with partial gastrectomy.

---

Key Words: Taurine-conjugated bile acids, Nuclear factor kappa B, Interleukin-8, Gastric epithelial cell lines