

Helicobacter pylori 감염에 의한 위 상피
세포에서의 chemokine 유전자 발현에
대한 핵 전사인자 및 신호 변환 체계 연구

연세대학교 대학원

의과학사업단

서 지 혜

Helicobacter pylori 감염에 의한 위 상피
세포에서의 chemokine 유전자 발현에
대한 핵 전사인자 및 신호 변환 체계 연구

지도교수 김 혜 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

서 지 혜

서지혜의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

푸르름이 더해가는 계절, 설레임과 두려움을 안고 실험실에 들어온지 벌써 2년이라는 시간이 흘렀습니다. 누구나 새로운 시작은 힘이 든다는 걸 알기에 부단한 노력으로 한정된 시간동안 많은 것을 얻고자 최선을 다했으나, 지나고 나니 2년이라는 시간은 결코 긴 시간이 아니었습니다. 실험실에 늦게까지 교실원들과 실험하던 일과 원하는 결과물이 나오지 않아 밤늦게 백양로 벤치에 앉아 낙담하던 일들은 저의 기억속에 소중한 추억으로 남을 것 같습니다. 이제 2년여의 기간동안 실험하며 고민했던 결과들이 이렇게 한편의 논문으로 완성이 되니 얼마나 가슴이 떨리는지 모르겠습니다. 이 일이 가능했던 것은 약리학교실 선생님들과 많은 교실원들의 도움이 있었기 때문입니다.

먼저 가장 가까운 곳에서 학문에 대한 열정을 보여주시고 아낌없는 사랑과 격려를 해주신 김혜영 선생님께 감사드립니다. 지친 실험실 생활에서도 좋은 말씀으로 여유로운 마음을 갖도록 도와주신 김경환 선생님, 세심한 지도를 해주시는 송시영 선생님, 이민구 선생님께도 감사드립니다. 또한 올바른 학문의 길로 이끌어주신 안영수 선생님, 김동구 선생님, 유경자 선생님, 장정원 선생님, 서정택 선생님께도 깊은 감사 드립니다. 또한 항상 기본원리에 충실하고 실험에 임하기를 강조하시며 실험 하나하나를 세심하게 가르쳐주신 임주원 선생님께 감사드립니다. 관심어린 충고와 격려로 같이 지내온 정연언니, 상희언니, 이장원 선생님, 옆에서 가장 많이 도와준 지훈, 그리고 지연, 혜연, 신영에게도 감사의 마음 전합니다. 언제나 힘이 되주신 강경홍 선생님, 김미정 선생님, 홍수종 선생님께도 감사 말씀 드립니다.

마지막으로 이 자리에까지 올수 있도록 한없는 사랑과 이해로 감싸주신 이 세상에서 가장 사랑하는 아버지, 어머니 그리고 동권오빠, 동국오빠, 규현언니, 한민씨, 윤지와 이 기쁨을 같이하고 싶습니다.

2002년 6월

목 차

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	8
1. Bacteria strain 및 배양조건	8
2. 위 상피세포 배양 및 <i>H. pylori</i> 자극실험	8
3. 중합효소연쇄반응을 통한 <i>H. pylori</i> 병독인자 유전자 형 확인	8
4. Urease 활성도 측정	9
5. H ₂ O ₂ 측정	9
6. Chemokine 단백 측정	9
7. Chemokine mRNA 측정	9
8. 세포 핵추출액 준비	10
9. 젤 지연 분석법	11
10. Western blotting법	12
11. 유전자의 Transfection	12
12. MAPKinase 억제제 처치	13
13. 통계처리	13
III. 결 과	
1. <i>H. pylori</i> 의 병독인자인 <i>cagA</i> , <i>vacA</i> , <i>iceA</i> 유전자	

형 확인	14
2. <i>H. pylori</i> 의 urease 활성도 측정	15
3. <i>H. pylori</i> 에 의한 세포내 활성산소종의 변화	15
4. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 IL-8 , MCP-1 mRNA 및 단백질 발현변화	16
5. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 전사조절인자의 활성 변화	17
6. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 MAPKinase 군의 활성 변화	18
7. Chemokine 유전자 발현에 대한 MAPKinase, ras 및 핵전사 인자 활성과의 상관 관계	19
8. Chemokine 유전자 발현에 대한 ERK 및 p38 활성과의 상관 관계	21
IV. 고찰	23
V. 결론	25
참고문헌	26
영문초록	30

그림 차례

그림1. <i>H. pylori</i> strain 에 따른 병독인자인 <i>cagA</i> , <i>vacA</i> , <i>iceA</i> 유전자형 확인	15
그림2. <i>H. pylori</i> 내의 urease 활성도 측정	16
그림3. <i>H. pylori</i> 로 자극한 위 상피세포에서의 H ₂ O ₂ 생 성	17
그림4. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 IL-8 과 MCP-1 mRNA 및 단백의 발현 효과	18
그림5. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 NF-κB, AP-1 및 C/EBP 활성 변화	19
그림6. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 MAPKinase 활성 변화	20
그림7. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 chemokine 유전자 발현증가에 대한 MAPKinase, ras 및 전사조절인 자와의 상관관계	22
그림8. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 세포내 chemokine 유전자 발현증가에 대한 ERK 및 p38과의 상관관계 ..	23

국문요약

***Helicobacter pylori* 감염에 의한 인체 위 상피세포에서의 chemokine 유전자 발현에 대한 핵전사인자 및 신호 변환 체계 연구**

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 다양한 위장관질환을 일으키는 원인균으로 알려져 있다. *H. pylori*는 지역과 사회, 경제적 여건에 따라 유병률의 많은 차이를 보이며 국가별로 *H. pylori* strain의 유전자형에 차이를 보인다고 알려져 있다. 산화, 환원에 의하여 활성이 민감하게 조절되는 핵전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1은 친염증성 chemokine인 IL-8과 MCP-1 생성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 표준형 *H. pylori* 균주인 NCTC11637과 한국인 환자의 점막에서 분리한 *H. pylori* 균주인 HP99를 인체 위 상피세포주인 AGS에 감염시켜 균주 차이에 의한 세포의 핵전사조절인자 및 Mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 활성을 규명하고자 하였다. 아울러 이들 균주에 대한 chemokine 유전자 발현의 차이와 chemokine 유전자 발현에 대한 핵전사인자 및 MAPK 활성의 상관관계를 규명하고자 하였다. 먼저 *H. pylori* strain의 차이를 규명하기 위하여 이들 균주의 병독인자인 *cagA*, *iceA*, *vacA*의 유전자형을 확인한 바 두 균주의 *vacA* 유전자형이 서로 달랐다. Urease 활성도 및 이들 균주에 의한 AGS 세포의 H₂O₂의 생성량을 측정된 결과, NCTC 균주의 urease 활성도 및 AGS 세포의 H₂O₂ 생성량은 HP99의 균주에 비하여 높았다. 또한 이들 *H. pylori* 균주 감염에 의한 AGS 세포의 chemokine인 IL-8 및 MCP-1 mRNA 발현과 단백질 생성, NF- κ B와 AP-1의 활성도 및 MAPK (ERK, JNK, p38)의 활성도를 측정하였다. 그 결과 NCTC11637 및 HP99 *H. pylori* 균주 모두 AGS 세포의 NF- κ B 활성과 IL-8 생성 증가에 있어서는 비슷하였

다. 그러나 HP99 균주가 감염된 AGS 세포의 AP-1 활성화, MCP-1 발현 및 MAPK (ERK, JNK, p38)의 활성화는 NCTC11637 균주로 감염된 AGS 세포에서보다 높았다. *H. pylori* 균주에 의한 AGS 세포의 IL-8 및 MCP-1 발현 증가가 어떤 핵전사인자에 의하여 매개되는지 여부 및 MAPK의 관여를 여부를 알아보기 위하여, I κ B α mutant 유전자인 MAD3 또는 c-jun 및 ras의 dominant negative 유전자인 TAM67, rasN-17 유전자를 세포내로 transfection 시켜 각각 NF- κ B, AP-1 그리고 ras의 활성화를 억제시키거나, MEK1/2의 억제제인 U0126 과 p38 억제제인 SB203580을 처리하여 ERK 및 p38의 활성화를 각각 억제시킨 후 IL-8 및 MCP-1 발현을 측정하였다. *H. pylori*에 의한 IL-8의 발현 증가는 주로 *H. pylori*에 의하여 증가하는 NF- κ B에 의하여 매개되며, MCP-1 발현 증가에는 AP-1 및 MAPK의 상위단계에 있는 ras에 의하여 매개된다. 그리고 *H. pylori*에 의하여 증가하는 IL-8 및 MCP-1 발현 증가는 MAPK 중 ERK 및 p38에 의하여 주로 매개된다. 결론적으로 *H. pylori* 감염에 의한 위 상피세포의 핵전사조절인자, MAPK의 활성화 및 chemokine의 발현 증가는 균주에 따라 다르게 나타나며, *H. pylori* 균주에 의하여 증가하는 chemokine의 발현도 핵전사조절인자 및 MAPK에 의하여 서로 다르게 조절된다.

핵심되는 말: *Helicobacter pylori*, IL-8, MCP-1, 위 상피세포, AP-1, Nuclear factor kappa B(NF- κ B), Mitogen-activated protein kinase(MAPK)

Helicobacter pylori 감염에 의한 인체 위 상피세포에서의
chemokine 유전자 발현에 대한 핵전사인자 및
신호 변환 체계 연구

<지도교수 김 혜 영 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

서 지 해

I. 서 론

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 나선형 미생물로서,¹ 1983년 호주의 Marshall과 Warren에 의하여 최초로 발견 분리 되었으며, 각종 위장관 질환의 원인균으로 추정되고 있다. 특히 *H. pylori*는 International Agency for Research on Cancer(IARC)에서 발암물질(definite carcinogen group)로 분류되면서 많은 연구가 이루어지고 있다.

*H. pylori*는 만성 B형 간염, 소화성 궤양, 위선암 및 위림프종 발생의 위험인자로 인식되고 있으며² *H. pylori*를 박멸한 경우 소화성 궤양이 회복됨은 *H. pylori*가 소화성 궤양의 중요 병인임을 제시하여 준다.³ *H. pylori* 군집은 위의 전정부에서 주로 발견되나 위체부 및 십이지장에서도 발견된다.⁴ 위염이 생기면 위점막이 약해지고 gastrin과 산분비가 증가하며, 위산은 *H. pylori*에 의해 손상된 위점막을 공격하여 위궤양이 발생하는 것으로 추정된다. 특히 Goodwin 등이 'leaking roof 가설'을 주장하여 증가된 위산이 십이지장에 유입되면 십이지장 구부에 위상피화(gastric

metaplasia)가 나타나고 이곳에 *H. pylori*가 감염되어 십이지장염이 생김으로써 점막의 방어인자가 약화되고, 역시 위산의 공격을 받아 궤양이 생기는 것으로 추측된다.⁵

*H. pylori*가 비침습성 세균임에도 불구하고 위점막에 염증반응을 일으키는 기전은 직접적 기전과 간접적 기전 2가지로 나눌수 있다. 직접적 기전은 *H. pylori*에서 분비되는 여러 세포독성인자가 위상피세포에 손상을 주는 것과⁶, urease에 의하여 생성된 암모니아가 위점막 손상을 일으키는 것⁷, 그리고 *H. pylori*로부터 호중구를 끌어들이 수 있는 화학주성 인자가 점막 내로 흡수되어 혈액 내 호중구의 점막 침윤을 유도하는 것⁸ 등이다. 간접적 기전은 위상피세포에서 CXC chemokine 중 대표적인 것으로 호중구를 끌어들이는 단백질인 IL-8과 CC chemokine 중 대표적인 것으로 단백구를 끌어들이는 단백질인 MCP-1 등의 chemokine 분비가 증가되어 염증세포가 침윤하는 것이다.⁹

*H. pylori*의 특성 중의 하나는 매우 강한 urease 활성도를 갖고 있다는 점이다. 이 urease로 요소를 분해하여 암모니아를 생성해 냄으로서 산도가 매우 높은 위장 속에서 생존해 나갈 수 있으며 한편으로 이 암모니아가 위점막을 손상시킬 가능성이 있다.¹⁰ *H. pylori*에 의한 소화기 질환은 환경적인 요소 이외에 *H. pylori* 자체의 병독인자에 의하여 나타난다고 알려져 있으며 현재까지 알려진 *H. pylori*의 주요 병독인자 중에는 87kD의 vacuolating cytotoxin(VacA)과 128kD의 cytotoxin associated gene A(CagA)단백질 그리고 induced by contact with epithelium gene (IceA) 단백질들이 가장 주목을 받아 왔으며 이들 세포독성 인자들과 임상결과에 대한 연관성에 관해 많이 연구되고 있다.¹¹

세포독소를 생산하는 균주와 생산하지 않는 균주는 vacA 유전자 염기서열에 차이가 있다. vacA 유전자에 대한 분석에 의하면 유전학적 mosaicism이 존재하며 특정 유전자형(s1/m1)이 세포독소 및 CagA 단백질의 표현과 관련이 있다.¹² Vacuolating cytotoxin 발견에 이어 이와 관련

이 있는 cytotoxin associated gene A(cagA)라는 유전자가 크로닝되었으며 *H. pylori*가 이 유전자의 산물인 CagA 단백질을 생산한다는 것이 확인되었다.¹³ 서구의 경우 분리된 *H. pylori*의 60-70%가 cagA 유전자 양성이며, 십이지장 궤양 환자로부터 분리된 *H. pylori*는 대조군에 비하여 cagA 유전자 양성 빈도가 높고, 이에 대한 단백질을 발현한다.¹⁴ 병독인자를 갖고 있는 *H. pylori*가 그렇지 않은 *H. pylori*보다 더 많은 양의 IL-8을 분비한다는 연구도 발표되었다.¹⁵

최근에는 cagA 유전자와 인접해서 cytokine의 유도와 관계있는 두 가지 유전자가 규명되어 각각 pic A(permiss induction of cytokines)와 pic B가 규명되었으며 IL-8의 생성에 관여한다.¹⁶ 현재까지 국내에서 분리된 균중 cagA 발현율은 40-97%로 다양하게 보고되어 있다.¹⁷ Chemokine은 림프구와 대식세포 등의 면역세포 및 인체 내 여러 장기의 상피세포 등으로부터 분비되어 우리 몸안의 면역반응에 관여하는 단백질이다. 사람의 위장관 상피세포는 세균이나 독소와 같은 외부 침입원에 대한 물리적 장벽 및 전해질 흡수와 분비와 같은 기본적인 역할 뿐만 아니라, 세균감염에 대하여 여러 chemokine을 발현함으로써 인체의 면역반응에 관여한다. *H. pylori*에 감염된 위조직에서도 IL-8, MCP-1, TNF- α , IL-6 등의 chemokine이 in vivo 혹은 in vitro에서 생성됨이 보고되었다.¹⁸ 국내에서도 *H. pylori*를 감염시킨 위상피세포주가 IL-8 뿐만 아니라 IL-1이 감염 초기부터 발현하기 시작하여 수 시간 지속되었고, GM-CSF, TNF- α , MCP-1 등의 친염증성 chemokine들은 감염 후반부에 발현됨이 보고되었다.¹⁹ 위 점막 손상기전의 하나로 활성산소가 관심을 끌고 있으며, 위암 발생기전의 하나로 주장되고 있다. 균이 위점막세포에서 집락을 형성하여 위염을 일으킬 때 다량의 호중구 침윤을 관찰할 수 있으며, 이로 인하여 만성 활동성 간염을 일으키지만 위점막에서 돌연변이를 일으킬 수 있는 것은 활성산소종에 의한 것이라고 주장되고 있다. 염증 반응으로 생성된 산소 유리기가 강력한 돌연 변이성 물질로 작용하여 DNA 손상을 초래하

여 재생능력을 둔화시켜 돌연변이가 생길 수 있다는 것이다.²⁰

Nuclear factor κ B(NF- κ B)는 세포 활성화에 반응하는 유전자의 발현을 조절하는 특이한 핵전사인자이다.²¹ 세포신호전달계의 마지막 단계로서 NF- κ B는 면역 및 염증반응에 관계하는 물질 (면역글로블린, 면역수용체, 세포흡착분자, cytokine, immune growth factor, acute phase 단백질)의 유전자 발현을 조절한다. NF- κ B는 비자극 상태의 세포에서는 세포질 내에 존재하며 억제성 소단위인 I κ B와 결합체를 이루고 있다. 세포가 자극을 받았을 때 비활성 결합체로부터 I κ B가 분리되어 활성화되며, 분리 과정에 protein kinase들과 protease들이 관여한다. NF- κ B가 핵 안으로 이동되어 κ B enhancer DNA motifs에 결합될 때 비로소 NF- κ B는 활성을 나타내어 유효단백질(effector protein) 합성을 촉진한다. TNF 및 다른 물질에 의한 NF- κ B의 활성화는 산화조건(proxidative condition)에 의해 매개된다. 최근까지의 보고들을 종합하면 *H. pylori* 감염에 의해 활성 산소종이 증가하며 이 증가는 염증매개 chemokine 생성에 기여하며, 이를 위한 신호변환과정에 NF- κ B의 관여 가능성이 높다. AP-1은 과산화 수소나 다른 활성산소종에 의해 활성화됨이 보고되어 세포내의 산화,환원 상태에 의해 민감하게 활성이 조절되는 전사조절인자 중 하나이다.²³ 여러 종류의 외부 자극에 의해 활성화되어 세포 표면에서 핵으로 신호를 전달하여 유전자 발현을 조절하는 세포내 신호전달물질인 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) group은 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPKinase의 3가지로 분류되고, 세포의 증식, 생존, chemokine생성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁴ *H. pylori*에 의한 AP-1 활성이 ERK 인산화를 통하여 일어나며,²⁵ MAPK가 chemokine 유전자 발현과 NF- κ B 활성화의 전단계 매개자로서의 역할들에 대한 일련의 보고들을 통해,^{26,27} *H. pylori*가 MAPK group의 활성화에 변화를 유도하여 전사 조절 인자나 염증성 물질의 발현 같은 하위 신호를 전달하는 가능성을 암시하고 있다.

본 연구는 한국인 환자의 점막에서 분리한 *H. pylori* 균주인 HP99와 표준형 *H. pylori* 균주인 NCTC 11637를 대상으로 이들 균주에 의한 위 상피세포인 AGS 세포의 핵전사인자 및 MAPK의 활성화 및 염증성 chemokine인 IL-8 및 MCP-1 발현을 비교하고, 또한 이들 균주에 의한 chemokine 발현 변화에 대하여 AGS 세포의 핵전사인자 및 MAPK 활성화와의 상관 관계를 규명하여 *H. pylori* strain들의 차이에 의한 위점막손상 기전을 이해하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Bacteria strain 및 배양조건

표준형 NCTC 11637 *Helicobacter pylori*는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 구입하였으며 한국인에게서 가장 많이 감염된 것으로 알려진 한국형 HP99 *H. pylori*는 서울대학교 의과대학 간 연구소에서 분리하여 확인한 것을 사용하였다. *H. pylori* chocolate agar plate에 streaking하여 campy pouch안에서 15-18시간동안 호기조건으로 37°C에서 150 rpm으로 흔들면서 배양하였다.

2. 위 상피세포 배양 및 *H. pylori* 자극실험

사람의 위암 세포주인 AGS (ATCC CRL 1739)는 ATCC에서 구입하여 10% fetal bovine serum(FBS), 100U/ml penicillin과 100 g/ml streptomycin를 함유한 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포는 6×10^5 cell/well로 6-well tissue culture plate에 seeding하며 1일간 배양하고 항생제가 함유되지 않은 신선한 배지로 2회 세척한 후 chocolate agar로부터 bacterial cell를 떼어내어 원심분리하여 harvest한 후 항생제가 들어있지 않는 배지에 재분산하고 배양하고 있는 세포에 bacterium/cell 비율이 500:1이 되도록 조정된 bacterial cell을 배양액에 첨가하여 배양하였다.

3. 중합효소연쇄반응법을 통한 *H. pylori* 병독인자 유전자형 확인

H. pylori genomic DNA는 QIAGEN genomic DNA kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하여 제작자의 설명에 따라서 분리하였으며, 중합효소연쇄반응은 Yoshio의 방법¹¹에 따랐다.

4. Urease 활성도 측정

NCTC11637 및 HP99 *H. pylori* 균주를 brucellar broth media에 부유시킨 뒤 37°C shaker에서 15-18시간동안 배양하였다. O.D값을 1.0 (=bacteria 10^9 cells) 으로 같게 희석 한 후 원심분리하여 얻은 침전물을 phosphate buffered saline (PBS)로 씻어준 뒤 urea buffer [(100mM urea (Biorad), 0.9% NaCl, 0.2mM phenol red (The Coleman & Bell Co.,Norwood.O.,U.S.A)] 로 잘 부유하여 spectrophotometry를 이용해 560nm에서 측정하였다. 표준효소로는 Jack bean urease type VI (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

5. H₂O₂ 측정

위 상피세포에 HP99 와 NCTC11637 *H. pylori* 를 처치한 뒤 세포의 배양액을 취하여, 배양액 내로 유리되는 H₂O₂ 함량을 측정하였다. 배양액 내 유리된 H₂O₂ 함량은 Thurman (1982)²⁷의 방법을 변형하여 발색법으로 측정하였다.

6. Chemokine 단백질 측정

AGS 세포에 HP99와 NCTC11637 *H. pylori*를 처치하고 12시간 후에 세포의 배양액을 취하였다. 배양액 내의 human IL-8과 MCP-1양은 ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN, USA), MCP-1 (Biosource, Nivelles, Belgium)를 사용하였으며 표준물질로는 purified human recombinant IL-8과 MCP-1을 사용하였다.

7. Chemokine mRNA 측정

Chemokine mRNA 발현은 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)을 이용하여 측정하였

으며, 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 최종양이 25 μ l가 되도록 맞추어 넣고 37 °C에 1시간동안 반응시켜 cDNA를 합성했다. RNA 160ng과 동량의 cDNA를 각 IL-8 또는 MCP-1에 특이한 primer와 β -actin에 특이한 primer 및 Tag polymerase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 중합효소반응법을 하였다. 중합효소반응법은 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초로 25-30 cycle로 IL-8 또는 MCP-1에 대한 mRNA를 증폭시켰다. IL-8의 primer sequences는 5' -ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' (forward primer), 5' -TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3' (reverse primer) 이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 297 염기쌍이었다. MCP-1의 primer sequences는 5' -AAGCTGTGATCTTCAAGACCATTG-3' (forward primer), 5' -TTAAGGCATAATGTTTCACATCAACAA-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 269 염기쌍이었다. β -actin의 primer sequences는 5' -ACCAACTGGGACGACATGGAG-3' (forward primer), 5' -GTGAGGATCTTCATGAGGTAGTC-3' (reverse primer)이었으며, 중합효소반응 생성물의 크기는 349 염기쌍이었다. 중합효소반응법을 한 후 중합효소반응 생성물을 0.5 μ g/ml ethidium bromide를 함유한 1.5% agarose 겔에 부하시킨 뒤 전기영동하여 UV 투조상에서 IL-8 또는 MCP-1 mRNA에 대한 발현양을 측정하였다.

8. 세포 핵추출액 준비

핵 단백질은 Lee 등²⁸의 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 27-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 핵 단백질이 추출되도록 하였다. 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 상등액을 취하였다. 이와 같이 얻은 핵 추출물을 새로운 튜브에 분주하고 70°C에서 보관하였다. 시료의 단백질 농도는 Bradford 법으로 정량하였다.²⁹

9. 젤 단백질 분획 이동법

핵전사조절 단백질인 NF-κB의 활성화 정도는 Xu 등의 방법³⁰을 변형한 젤 단백질 분획 이동법(electrophoretic mobility shift assay)을 통해 확인하였다. [³²P]-ATP를 소식자로 표지한 NF-κB consensus oligonucleotide (5' -AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC-3') 0.0175 pmoles (>10⁴ CPM)와 1 µg의 poly dI·dC를 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 gel을 건조시킨 후 자가 방사법으로 기록하였다.

AP-1 및 C/EBP의 활성화는 각각 AP-1 consensus oligonucleotide (5'-CGCTTGAT AGTCAGCCGGAA-3') 및 C/EBP consensus oligonucleotide (5'-GTACACATTGCACAATCTTA-3')를 이용하는 것 외에는 NF- κ B DNA binding activity를 확인할 때와 동일한 방법으로 수행하였다.

10. Western blotting법

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 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin이 포함된 단백질 추출 완충액을 넣고 얼음 위에서 10분간 방치하였다. 그 후 추출 완충액을 회수하여 15,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 단백질 정량을 하였다. 100 μ g의 단백질을 10% polyacrylamide 겔 전기영동으로 분리하고, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 3% 탈지분유로 blocking한 후 1:1000의 I κ B- α (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), phospho-SAPK/JNK, phospho-p44/42 MAPkinases, phospho-p38 MAPkinase, SAPK/JNK, p44/42 MAP kinases, p38 MAPkinase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)와 1:2000 anti-rabbit 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 chemiluminiscence kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)를 사용하였다.

11. 유전자의 Transfection

위 상피세포는 6×10^5 cell/well로 6-well tissue culture plate에 seeding하여 6-7 시간동안 37°C에서 배양하였다. NF- κ B, AP-1과 chemokine의 관계를 알아보기 위하여 ras 및 c-jun의 발현을 억제하는 dominant

negative mutant gene인 rasN17 , TAM67 각각과 NF- κ B 활성화에 필요한 I κ B 인산화를 억제하는 I κ B mutant gene인 MAD3 유전자 그리고 control vector로는 pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Netherland)를 DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-N,N,Ntrimethyl ammonium methylsulfate) (Boehringer-Mannheim, Pentzberg, Germany)을 이용하여 15-18 시간동안 37°C에서 transfection 시키고 *H. pylori*를 처치하였다. 12 시간 처치한 후 배양액내 human IL-8과 MCP-1을 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였으며, chemokine mRNA 발현은 역전사 중합효소반응법으로 측정하였다.

12. MAPKinase 억제제 처치

위 상피세포는 6×10^5 cell/well로 6-well tissue culture plate에 seeding 하여 6-7 시간동안 37°C에서 배양한 뒤 MEK1/2 의 억제제인 U0126 과 p38 억제제인 SB203580를 처치하여 ERK 및 p38의 활성을 억제 시킨 뒤 *H. pylori*를 처치하였다. 12시간 처치한 후 배양액내 human IL-8과 MCP-1을 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정 하였으며, chemokine mRNA 발현은 역전사 중합효소반응법으로 측정하였다.

13. 통계처리

모든 값은 "평균값 \pm 표준오차(mean \pm S.E.)"로서 표현하고, 각 실험 군 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* 의 병독인자인 *cagA*, *vacA*, *iceA* 유전자형 확인

H. pylori 균주에서 genomic DNA를 분리하여 병독인자인 *cagA*, *vacA* 및 *iceA*에 대한 중합효소연쇄반응법을 행한 결과, NCTC11637 및 HP99 균주 모두 positive *cagA*, *vacAm2*, *iceA1*로서 동일한 유전자형을 가지고 있으나 *vacAs* subtype의 경우 NCTC11637은 *vacAs1c*를 HP99 균주는 *vacS1b*로 같지않게 나타남으로서 (그림1) 두 균주의 병독인자의 유전자형이 서로 다름을 확인하였다.

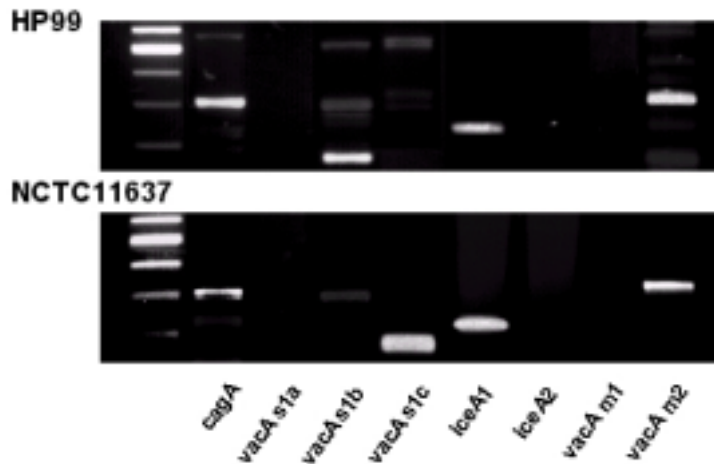


그림1. *H. pylori* strain 에 따른 병독인자인 *cagA*, *vacA*, *iceA* 유전자형 확인. HP99와 NCTC11637 *H. pylori* 균주의 genomic DNA를 분리한 후 병독인자에 대한 primer로 PCR를 하여 병독인자인 *cagA* 와 *vacA*의 signal region 과 middle region, *iceA* 유전자형을 확인하였다.

2. *H. pylori*의 urease 활성도 측정

*H. pylori*는 매우 강한 urease 활성도를 가지고 있으며 이 urease로 urea를 분해하여 암모니아를 생성함으로써 산도가 높은 위장속에서도 생존해 나갈수 있고, 이 암모니아가 위 점막 손상기전에 관여한다고 알려져 있다.^{19,20,21} *H. pylori* 균주 내의 urease 활성도를 측정한 결과 NCTC11637 균주의 urease 활성도가 HP99 균주의 활성도에 비하여 10배 정도 높게 측정되어 두 균주의 urease 활성도가 서로 다름을 확인하였다(그림 2).

<i>H. pylori</i>	Urease activity (Units/10 ⁸ cells)
HP99	0.36 ± 0.02
NCTC11637	3.36 ± 0.70

그림2. *H. pylori*내의 urease 활성도 측정. NCTC11637 및 HP99 *H. pylori* 균주를 배양한 후 원심분리하여 이들 균주를 모은 뒤 균주에 urease 원충용액을 넣고 spectrophotometer를 이용하여 560nm에서의 흡광도를 측정하였다. 그리고 urease 활성도는 urease 표준물질을 이용하여 계측하였다. Urease의 활성도는 평균값±표준오차로 표시하였다.

3. *H. pylori*에 의한 세포내 활성산소종의 변화

AGS 세포에서 *H. pylori* 자극에 의하여 활성산소종이 발생하는 지를 알아보기 위하여 H₂O₂로 발생하는 활성산소를 관찰하였다. AGS 세포를 *H. pylori*로 자극한 다음 배양한 세포의 배양액을 취하여 배양액 내의 H₂O₂를 측정한 결과 4 시간 자극한 AGS 세포의 H₂O₂ 생성에서 NCTC11637 균주에 의한 활성산소 생성이 HP99 균주에 의한 생성보다 높았다(그림 3).

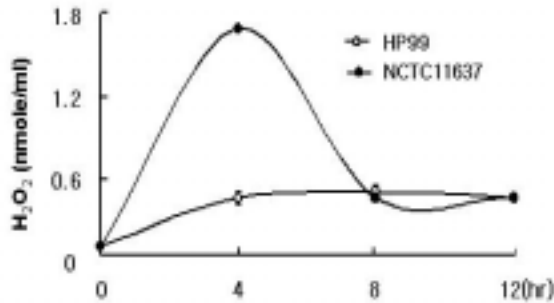


그림3. *H. pylori* 로 자극한 위 상피세포에서의 H₂O₂ 생성. AGS 세포에 *H. pylori*로 자극하고 세포 배양액을 취한 후 배지내 H₂O₂를 측정하였다. H₂O₂ 생성량은 평균값±표준오차로 표시하였다.

4. *H. pylori* 자극에 의한 IL-8 , MCP-1 mRNA 및 단백 발현 변화

H. pylori 위암 조직에서 interferon- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-8, MCP-1 생성이 증가되었으며,¹⁵ 인체 위 상피세포주인 AGS에 *H. pylori* 자극을 주었을 때 세포에서 염증성 cytokine인 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 와 IL-8 및 MCP-1 단백 생성이 증가되었다고 보고 되었다.¹⁶ 본 연구에서는 AGS 세포에 HP99와 NCTC11637 균주를 투여한 다음 해당 시간에서 AGS 세포의 IL-8 또는 MCP-1 mRNA 및 단백질 발현을 각각 역전사 중합효소 연쇄반응법 및 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 실험 결과 *H. pylori*에 의한 IL-8 및 MCP-1 mRNA의 발현에서는 두 균주에 의하여 IL-8 mRNA 발현이 유사하게 증가한데 비하여 MCP-1 mRNA의 발현 증가의 경우에는 HP99 균주에 의한 발현 증가율이 NCTC11637 균주에 의한 발현 증가보다 크게 나타내었다(그림 4A). 그리고 *H. pylori* 자극에 의한 IL-8 및 MCP-1 단백질의 생성 증가도 두 균주에 의한 IL-8 단백질의 유리는 시간 의존적으로 유의하게 증가 되었으나, MCP-1 단백질량의 경우에는 HP99 균주의 자극에 의하여만 시간 의존적으로 유의하게 단백질 생성이 증

가하였다(그림 4B). 그러므로 *H. pylori*에 의한 chemokine의 발현은 *H. pylori* 균주의 차이에 의하여 유사하게 나타나거나 또는 다르게 나타남을 관찰할 수 있었다

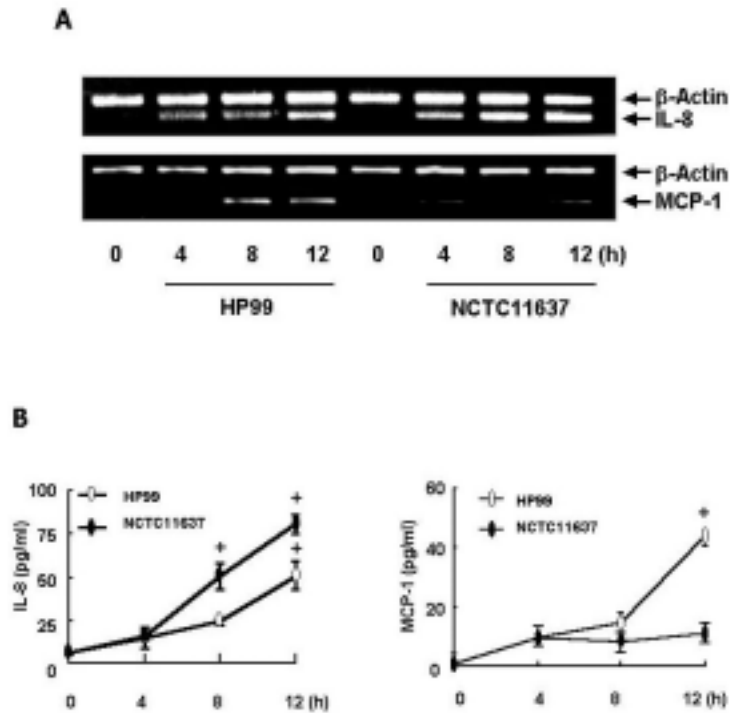


그림4. 두 *H. pylori* 균주의 자극에 의한 IL-8 과 MCP-1 mRNA 및 단백질의 발현. **A.** AGS 세포에 HP99 및 NCTC11637 *H. pylori* 균주로 일정시간 자극을 준 뒤 세포에서 total RNA를 분리하여, 역전사중합효소반응법을 이용하여 IL-8 또는 MCP-1에 대한 mRNA 발현을 측정하였다. **B.** AGS 세포에 HP99 및 NCTC11637 *H. pylori* 균주로 일정 시간 자극을 준 뒤 세포의 배양액을 분리하여, ELISA법을 이용하여 배양액에 있는 IL-8 또는 MCP-1 단백질량을 측정하였다. IL-8과 MCP-1 단백질량은 평균값±표준오차로 표시하였다. *P<0.05 vs none.

5. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 핵전사조절인자의 활성변화

H. pylori 자극에 의한 AGS 세포의 핵전사조절인자의 활성을 젤단백 분획이동법을 이용하여 측정하였다. *H. pylori*의 자극에 의한 AGS 세포의 NF- κ B의 활성은 두 균주들이 유사하게 활성을 증가시켰으며, 1 시간에서 활성 증가가 가장 두드러지게 나타내었다. AP-1의 활성의 경우 HP99 균주에 의한 활성 증가가 NCTC11637 균주에 의한 활성 증가보다 훨씬 크게 나타내어 *H. pylori* 균주의 차이에 의하여 핵전사조절인자인 AP-1의 활성 증가의 차이가 나타내었다. C/EBP의 활성은 HP99와 NCTC11637 *H. pylori* 자극에 활성의 변동이 없었다.

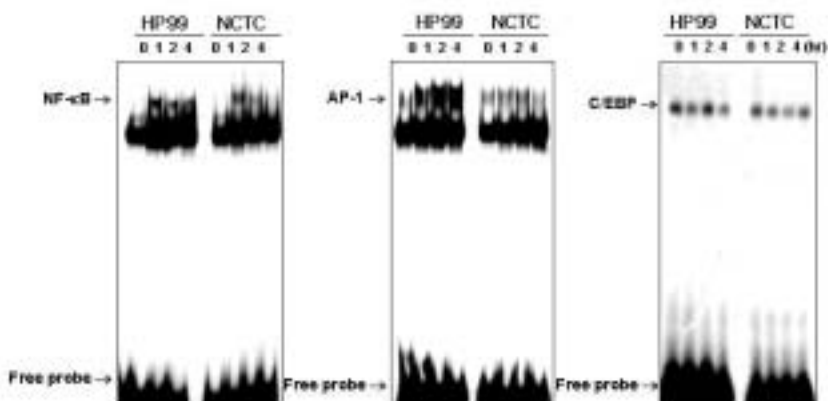


그림5. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 NF- κ B, AP-1, C/EBP 활성 변화. *H. pylori*로 AGS 세포를 일정 시간 자극한 다음 세포에서 핵 추출물을 분리하여 NF- κ B, AP-1, C/EBP에 대한 젤 지연분석법을 시행하여 *H. pylori*에 의한 AGS 세포의 핵전사조절인자의 활성 변화를 측정하였다.

6. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 MAPK 군의 활성 변화

H. pylori 자극에 의한 MAPK 군의 활성 변동을 관찰하기 위하여 *H. pylori*로 일정 시간 동안 자극한 AGS 세포에서 단백을 추출한 뒤 westren blot법을 이용하여 MAPK 군중 ERK, JNK 그리고 p38의 인산화를 관찰하였다. 실험 결과 NCTC11637 및 HP99 균주에 의하여 ERK, JNK 그리고 p38이 인산화되었다(그림 6). 그러나 이들 MAPK의 인산화

즉 활성화 정도는 HP99 균주의 자극에 의한 활성화가 NCTC11637 균주보다 강하게 나타내었다. 그러므로 HP99 균주가 NCTC11637 균주보다 AGS 세포의 MAPK 활성화를 더 크게 시킴을 관찰할 수 있었다.

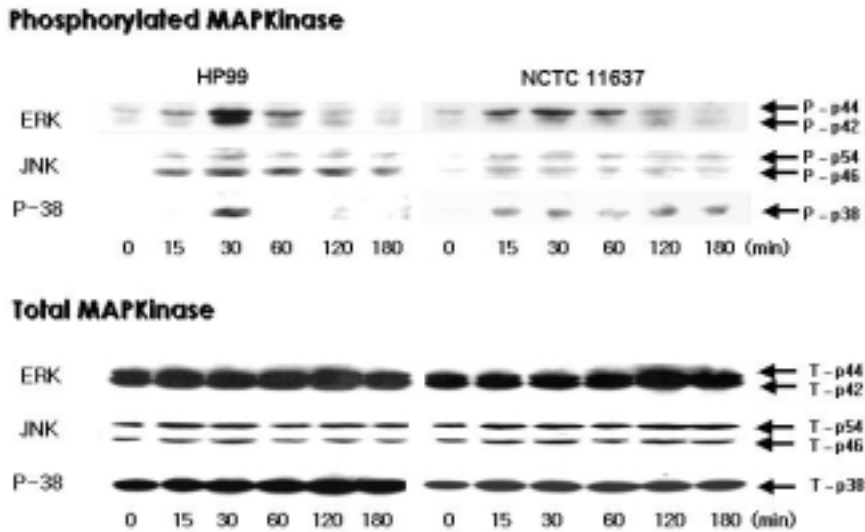
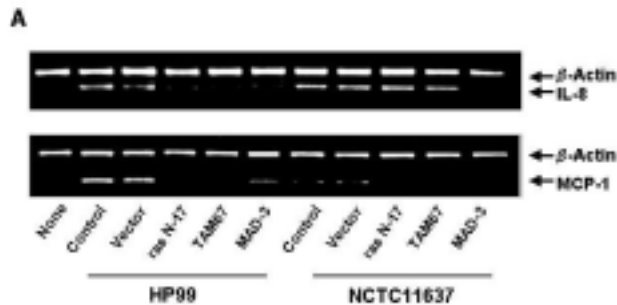


그림6. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 MAPK 활성 변화. AGS 세포에 일정 시간 *H. pylori*로 자극을 준 뒤 세포에서 단백질을 추출하여 인산화된 또는 모든 ERK, JNK, p38에 대한 항체를 이용하여 Western blot 법으로 인산화 또는 ERK, JNK, p38의 총단백량을 측정하였다.

7. Chemokine 유전자 발현에 대한 MAPK, ras 및 핵전사조절인자 활성과의 상관 관계

H. pylori 자극에 의한 IL-8 및 MCP-1의 발현 증가가 MAPK의 ras 그리고 핵전사조절인자인 NF- κ B 및 AP-1에 의하여 매개되는지를 알아보기 위하여 MAPK의 상위 단계인 ras에 대한 dominant negative mutant 유전자인 rasN-17 유전자를 세포에 transient transfection 시켜 ras의 활성 증가를 억제시키거나, I κ B α 의 인산화되는 부위인 serine 32

와 36 부위를 alanine으로 치환함으로써 인산화에 의한 I κ B α 의 분해를 억제시켜 NF κ -B의 활성화를 억제하는 I κ B의 mutant 유전자인 MAD3 유전자 그리고 c-jun의 dominant negative mutant 유전자인 Tam67 유전자를 세포에 transient transfection 시켜 NF- κ B 또는 AP-1의 활성 증가를 억제시킨 뒤 *H. pylori*로 자극시키고 IL-8 및 MCP-1의 mRNA 또는 단백질의 발현 변화를 측정된 결과 두 *H. pylori* 균주에 의한 IL-8 mRNA의 발현 증가는 MAD3 유전자의 transfection에 의하여 억제되었으나, rasN-17 과 TAM67 유전자의 transfection에 의해서는 *H. pylori* 균주에 의한 IL-8 mRNA의 발현 증가가 억제되지 않았다(그림 7A). 그리고 IL-8의 단백질 발현도 mRNA 발현과 유사하게 MAD3 유전자의 transfection에 의해서만 유의하게 억제되었다(그림 7B). 그러므로 *H. pylori* 균주에 의한 IL-8 mRNA의 발현 증가는 NF- κ B에 의하여 매개됨을 알 수 있었다. HP99 균주에 의한 MCP-1의 mRNA 및 단백질 발현 증가의 경우에는 rasN-17 및 TAM67 유전자의 transfection에 억제되었으나, MAD-3 유전자의 transfection에 의해서는 감소율이 작았으며, 유의성이 없었다. 그러므로 HP99 균주에 의한 MCP-1 발현의 증가는 MAPK의 상위단계 조절인자인 ras 및 전사조절 인자인 AP-1에 의하여 조절됨을 관찰할 수 있었다.



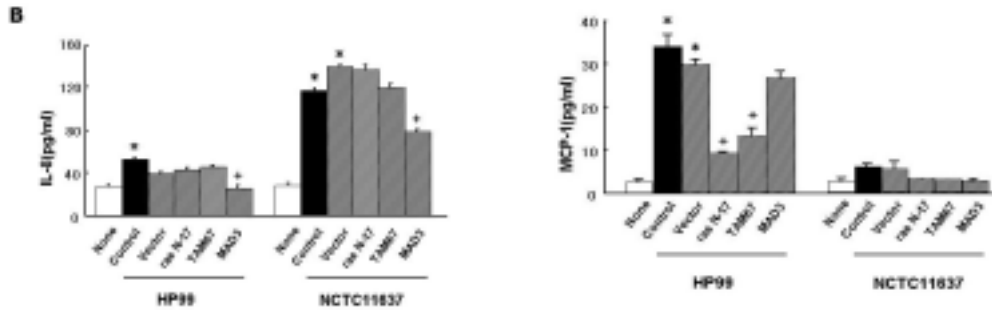


그림 7. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 chemokine 유전자 발현 증가에 대한 MAPK, ras 및 핵전사조절인자와의 상관관계. A. AGS 세포에 rasN17, TAM67 또는 I- κ B mutant 유전자를 함유한 vector 그리고 control vector를 15 시간동안 transient transfection 시키고 *H. pylori*로 12 시간동안 자극한 후 세포의 mRNA를 분리하여, IL-8 또는 MCP-1에 대한 역전사 중합효소연쇄반응법을 시행하였다. B. AGS 세포에 rasN17, TAM67 또는 I- κ B mutant 유전자를 함유한 vector 그리고 control vector를 15 시간 동안 transient transfection 시키고 *H. pylori*로 12 시간 동안 자극한 후 세포의 배양액을 분리하여 배양액내에 있는 IL-8 또는 MCP-1 단백량을 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 단백질량은 평균값 \pm 표준오차로 나타내었다. * $P < 0.05$ vs none, † $P < 0.05$ vs control 또는 vector. none은 *H. pylori*로 자극하지도 않고 transfection 시키지 않은 AGS 세포, Control은 transfection 시키지 않은 AGS 세포, Vector는 Vector 만 transfection 시킨 AGS 세포.

8. Chemokine 유전자 발현에 대한 ERK 및 p38 활성화의 상관관계

H. pylori 자극에 의한 IL-8 및 MCP-1의 발현 증가가 MAPK의 ERK 및 p38에 의하여 매개되는지를 알아보기 위하여 AGS 세포에 MEK1/2 억제제인 U0126 과 p38 억제제인 SB203580을 처치하여 ERK 및 p38의 활성화 증가를 각각 억제 시킨 후 *H. pylori*로 자극시키고 IL-8 및 MCP-1의 mRNA 또는 단백질 발현 변화를 측정된 결과 두 *H. pylori* 균주에 의한 IL-8 mRNA 및 단백질 발현 증가가 U0126과 SB203580 처치에 의하여 억제되어 *H. pylori* 균주에 의한 IL-8 발현 증가에 MAPK의 ERK 및

p38의 활성이 관여함을 알 수 있었다(그림 8A, 8B). 그리고 HP99 균주에 의한 MCP-1의 발현 증가도 U0126과 SB203580 처치에 의하여 억제되어 *H. pylori* 균주에 의한 MCP-1 발현 증가에 MAPK의 ERK 및 p38의 활성이 관여함을 확인하였다.

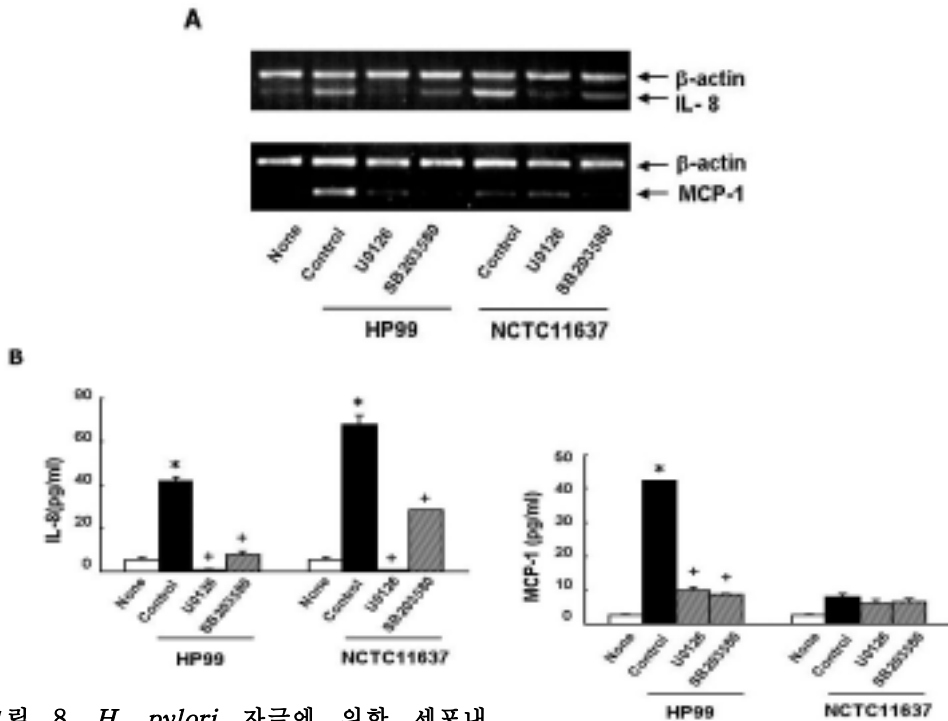


그림 8. *H. pylori* 자극에 의한 세포내 chemokine 유전자 발현 증가에 대한 ERK

및 p38과의 상관관계. **A.** AGS 세포에 U0126 (20 μ M) 또는 SB203580 (20 μ M)를 1시간 전에 처치하고 *H. pylori*로 12 시간동안 자극한 후 세포의 mRNA를 분리하여, IL-8 또는 MCP-1에 대한 역전사 증합효소반응법을 시행하였다. **B.** AGS 세포에 U0126 (20 μ M) 또는 SB203580 (20 μ M)를 1시간 전에 처치하고 *H. pylori*로 12 시간 동안 자극한 후 세포의 배양액을 분리하여 배양액내에 있는 IL-8 또는 MCP-1 단백질량을 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 단백질량은 평균값 \pm 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.

IV. 고 찰

*H. pylori*는 만성 B형 간염, 소화성 궤양, 위선암 및 위림프종 발생의 위험인자로 인식되고 있다. *H. pylori*에 의한 이러한 소화기 질환은 환경적인 요소 이외에 *H. pylori* 자체의 병독인자에 의하여 나타난다고 알려져 있으며 현재까지 알려진 *H. pylori*의 주요 병독인자 중에는 87kd의 Vacuolating cytotoxin(VacA)과 128kd의 Cytotoxin associated gene A(CagA) 그리고 Induced by contact with epithelium gene(IceA) 단백질이 가장 주목을 받아 왔으며^{22,23,24,25} 이들 세포독성 인자들과 임상결과에 대한 연관성에 관해 많은 연구가 이루어지고^{26,27,28,29,30} 최근에는 cagA positive *H. pylori*에 감염된 위 상피세포나 위암조직에서 cagA negative *H. pylori*에 감염되었을 때보다 많은 양의 IL-8을 분비한다고 알려져 있다.^{85,86} 본 연구에서는 ATCC로부터 구입한 표준형 *H. pylori* 균주인 NCTC11637 및 한국인 환자의 위에서 분리한 HP99 균주의 병독인자 중 vacA의 subtype이 서로 다른 것을 확인하였으며, 또한 *H. pylori* 자체의 urease의 활성도 및 위 상피세포의 활성산소종의 생성량도 서로 다르게 나타나 두 *H. pylori* 균주간의 genomic DNA의 sequence 및 단백질 발현이 다르고, 그에 따라서 숙주인 위 상피세포의 반응도 다르게 나타남을 확인할 수 있었다. *H. pylori* 자극에 의한 위 상피세포의 핵전사조절인자 활성 및 chemokine인 IL-8, MCP-1 발현 증가에 있어서, 두 *H. pylori* 균주에 의하여 활성이 증가하는 NF- κ B에 의하여 IL-8의 발현이 조절되었으며, HP99 균주에 의하여 활성이 증가하는 AP-1에 의하여 MCP-1의 발현이 증가하였다. 그러나 본 연구에서 NCTC11637 균주에 의하여 활성이 증가하는 AP-1에 의해서는 MCP-1의 발현이 증가하지 않았다. 이러한 결과는 NCTC11637 균주에 의한 AP-1의 활성 증가가 HP99에 비하여 상대적으로 MCP-1의 발현 증가를 유도하는데 약하게 기여했을 것으로 추론할 수 있다. ERK, JUN 및 p38 활성도는 NCTC11637에 의한 자극 보다

HP99 균주에 의하여 더욱 강하게 유도되었다. 세포신호변환체계인 MAPK는 다양한 자극에 의해 활성화되어 신호를 핵으로 전달하며 *H. pylori* 균주에 따라 MAPK pathway를 활성화하는 능력이 다름을 확인하였다. 위 상피세포에 MAPK인 ERK 및 p38의 활성 증가를 억제했을 때 *H. pylori*에 의한 IL-8 및 MCP-1 발현 증가를 억제하므로 *H. pylori*에 의한 IL-8 및 MCP-1 발현은 MAPK의 신호에 의하여 매개됨을 확인하였다.

이러한 실험결과를 통해 HP99와 NCTC11637 *H. pylori* 균주의 자극에 의한 chemokine 생성에 있어서의 차이는 다른 핵전사조절인자에 의하며 이는 상위단계인 MAPK cascade의 활성화 정도가 다름에 기인한 것으로 생각된다.

V. 결 론

*Helicobacter pylori*에 의한 위상피세포 손상의 기전 연구는 인체의 위 상피세포주인 AGS를 대상으로 하여 한국형 *H. pylori*인 HP99 균주 및 표준형 *H. pylori*인 NCTC11637 균주를 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HP99 및 NCTC11637 *H. pylori* 균주의 병독인자의 유전자형은 각각 *cagA*-positive *vacAs1b*-m2 *iceA1*과 *cagA*-positive *vacAs1c*-m2 *iceA1*이다.
2. *H. pylori* 균주의 urease 활성도 및 AGS 세포의 활성산소종 생성 유도는 NCTC11637 균주가 HP99 균주보다 높다.
3. HP99 및 NCTC11637 *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 IL-8 발현을 증가시키며, 이 유전자의 발현 증가는 NF- κ B 활성화에 의하여 조절받는다.
4. HP99 *H. pylori* 균주는 AGS 세포의 MCP-1 발현을 증가시키며, 이 유전자의 발현 증가는 AP-1 활성화에 의하여 조절받는다.
5. *H. pylori*에 의한 IL-8과 MCP-1 발현 증가에 ERK 및 p38 MAPK의 활성이 관여한다.

결론적으로 *H. pylori* 균주의 genomic DNA sequence 및 urease 같은 단백질의 생성 차이에 의하여 숙주인 위 상피세포의 활성 산소종의 생성 뿐만 아니라 핵전사조절인자 활성화 및 chemokine 발현의 차이를 유도하게 되며, 또한 MAPK의 신호 변환에도 차이를 나타나게 되어, *H. pylori* 자체의 유전적 변화에 의하여 *H. pylori*에 의한 소화기 질환의 양상이 변화하게 됨을 유추할 수 있었다.

참고문헌

1. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-1275
2. Blaser MJ. Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1987;93:371-83
3. Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1989;96:615-25
4. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990;161:626-633
5. Goodwin CS. Duodenal ulcer, Campylobacter pylori, and the "leaking roof" concept. *Lancet* 1988;24-31;2(8626-8627):1467-9
6. Miehle S, Yu J, Schuppler M, Frings C, Kirsch C, Negraszus N, Morgner A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Helicobacter pylori vacA, iceA, and cagA status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96(4):1008-13.
7. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Fusamoto H, Kamada T, sato N. Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia. *Gastroenterology* 1992;102:1881-1888
8. Yoshikawa T, Naito Y. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radic Res* 2000;33(6):785-94
9. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in Helicobacter pylori infection. *Gut* 1998;42(5):609-17

10. Anders P. Andersen, David A. Elliott, and Moira Lawson. Growth and Morphological Transformation of *Helicobacter pylori* in Broth Media. *J. Clin. Microbiol* 1997;35(11):2918-2922
11. Yoshio Y, Tadashi K, Oscar G, Jong kim, Kei K, David Graham Relationship between *Helicobacter pylori* iceA,cagA, and vacA status and clinical outcome: Studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol* 1999;37:2274-2279.
12. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Blaser MJ, Quint WG. Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes. *J Clin Microbiol* 2000;38(6):2464
13. Evans DJ Jr, Evans DG. *Helicobacter pylori* CagA: analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of CagA as a virulence factor. *Helicobacter* 2001;6(3):187-98
14. Demirturk L, Ozel AM, Yazgan Y, Solmazgul E, Yildirim S, Gultepe M et al. CagA status in dyspeptic patients with and without peptic ulcer disease in Turkey: association with histopathologic findings. *Helicobacter* 2001;6(2):163-8
15. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995;48(1):41-5
16. Tummuru MK, Sharma SA, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995;18(5):867-76
17. Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB et al.

- Genotyping CagA, VacA subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* 2001;16(5):579-84 .
18. Mori N, Ueda A, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Yoshimura T et al. Induction of monocyte chemoattractant protein 1 by *Helicobacter pylori* involves NF- κ B. *Infect Immun* 2001; 69(3):1280-6.
 19. Jung HC , Kim JM , song IS , kim CY . *Helicobacter pylori* induces array pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells:Quantification of mRNA for interleukin-8, -1 α/β , granulocyte -macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor- α . *J gastroenterol. Hepatol* 1997;12:473-480
 20. Smoot DT, Elliott TB, Verspaget HW, Jones D, Allen CR, Vernon KG et al. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis* 2000; Nov;21(11):2091-5
 21. Finco, TS, and Baldwin, AS. Mechanistic aspects of NF κ B regulation: The emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* 1995;3: 263-272
 22. Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Cytokine -stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9943 - 9947
 23. Salim AS. The relationship between *Helicobacter pylori* and oxygen- derived free radicals in the mechanism of duodenal ulceration. *Internal Medicine* 1993;32(5):359-64

24. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372 (6508):739-46
26. Mitsuno Y, Yoshida H, Maeda S, Ogura K, Hirata U, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. *Helicobacter pylori* induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signaling pathway in gastric cancer cells. *Gut* 2001;49:18-22
26. Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem* 2000 ;275(21):16064-72
27. Thurman RG, Ley HG, Scholz R. Hepatic microsomal ethanol oxidation. *Eur J Biochem* 1972;24:420-430
28. Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T. MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9319-24
29. 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
30. 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

Abstract

NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION FOR CHEMOKINE EXPRESSION IN *HELICOBACTER PYLORI* -STIMULATED GASTRIC EPITHELIAL CELLS

Ji Hye Seo

*Department of Brain Korea 21 Project for Medical Science,
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by assistant professor Hyeyoung Kim)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a major cause of chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma. HP99 and NCTC11637 are *H. pylori* strains which are isolated from gastric mucosa from the patients in Korea and Australia respectively. Predominant genotype of *H. pylori* showed the discrepancy for activating transcription factors NF- κ B and AP-1 and stimulating the expression of chemokines, IL-8 and MCP-1 in AGS cells. *iceA*, *vacA* and *cagA* of *H. pylori* genes were genotyped by PCR. After treatment of *H. pylori* to AGS cells, activation of transcription factors were assessed by EMSA. Chemokine levels for mRNA and protein were determined by RT-PCR and ELISA. MAPK(ERK, JNK, p38) activation was assessed by Western blot. Both *H. pylori* strains resulted in NF- κ B activation and IL-8 expression. However, HP99 showed high AP-1 activation, MCP-1 expression and MAPKinase activation as compared to NCTC11637. *H. pylori* induced chemokine expression was inhibited in the cells transfected with mutant genes for ras, c-jun and I- κ B. The specific MAPK inhibitors, U0126 (20uM; MAPKinase kinase (MEK1/2)) and SB203580 (20uM; p38 inhibitor), reduced both *H. pylori*-induced IL-8 and MCP-1 production.

In conclusion, different genotype of *H. pylori* strains showed different

signaling pathway for activation of transcription factors and MAP Kinase, resulting in different chemokine expression in gastric epithelial cells.

Key Words : *Helicobacter pylori*, IL-8, MCP-1, Nuclear factor kappa B(NF- κ B), AP-1, MAPKinase