

Helicobacter pylori 감염
위 상피세포에서 IL-8 생성에 대한
NF- κ B의 역할 및 Thiol 화합물의 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

서 정 연

Helicobacter pylori 감염 위상피세포에서
IL-8 생성에 대한 NF- κ B의 역할 및
Thiol 화합물의 영향

연세대학교 대학원
의과학사업단
서 정 연

Helicobacter pylori 감염 위상피세포에서
IL-8 생성에 대한 NF- κ B의 역할 및
Thiol 화합물의 영향

지도 김 혜 영 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

서 정 연

서정연의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

연세동산을 첫발을 들여놓았을 때가 엇그제 같은데, 벌써 백양로가 붉게, 푸르게, 그리고 노랗게 변했다가 앙상한 가지만 남는 것을 열 번도 넘게 지켜보았습니다. 이렇게 오랜 세월이 지났음을 가만히 되돌아켜 보아야만 실감할 수 있는 것은 그간의 세월이 고난과 역경보다는 오히려 즐거운 추억으로 가득하다고 기억되기 때문인 듯 합니다.

시작부터 시종일관 자상하게 이끌어주신 많은 선생님들 덕분에 지금 여기에 이러한 모습으로 존재할 수 있습니다. 가장 가까운 곳에서 항상 진지한 학문적 태도 보여주시며 아낌없는 격려와 사랑으로 저를 이끌어주신 김혜영 선생님께 진심으로 감사를 드립니다. 세심한 배려와 모든 도움을 아끼지 않으셨던 김경환 선생님, 끊임없는 충고와 세심한 지도를 주신 이민구 선생님, 송시영 선생님, 이광훈 선생님께 감사드립니다. 끝없는 관심과 충고로 이끌어주신 안영수 선생님, 김동구 선생님, 유경자 선생님, 정광철 선생님, 장정원 선생님, 서정택 선생님께도 감사드립니다.

5년간의 약리학 교실에서의 시간이 그리움으로 남으리라 생각되는 것은 여러모로 많은 도움을 아끼지 않았던 교실원들이 있기 때문입니다. 실험이 잘되면 잘되는 대로 안되면 안되는 대로 자신의 일처럼 진지한 토론을 아끼지 않고, 힘겨울 때는 힘이 되어 준 교실원들 모두에게 감사의 마음을 전하며 졸업의 기쁨을 함께 하고자 합니다.

마지막으로 지금껏 해온 이 모든 일들이 가능하게끔 한없는 이해와 사랑으로 돌보아주신 부모님께 감사드리고 지훈, 영호, 은주와 더불어 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

2001년 12월

목 차

| | |
|--|----|
| 국문요약 | 1 |
| I. 서 론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 7 |
| 1. 세균 균주 및 배양 | 7 |
| 2. 위 상피세포 배양 및 <i>H. pylori</i> 자극실험 | 7 |
| 3. IL-8 단백질 정량 | 8 |
| 4. 세포 핵추출액 준비 | 9 |
| 5. 젤 지연 분석법 | 9 |
| 6. 지질과산화물 측정 | 10 |
| 7. Western blotting | 11 |
| 8. Luciferase reporter assay | 11 |
| 9. 세포내 활성산소종 측정 | 12 |
| 10. 단백질 함량 측정 | 12 |
| 11. 통계처리 | 12 |
| III. 결 과 | 13 |
| 1. <i>H. pylori</i> 에 의한 IL-8 단백질과 지질과산화물 생성 | 13 |
| 2. <i>H. pylori</i> 에 의한 세포내 활성산소종의 변동 | 14 |
| 3. <i>H. pylori</i> 자극에 의한 전사조절인자의 활성변동 | 14 |
| 4. 전사조절 인자의 아형과 결합 특이성 | 15 |
| 5. Luciferase reporter assay를 통한 전사조절인자의 역할 | 17 |
| 6. Thiol 화합물의 영향 | 18 |
| 7. NO 공여물질의 영향 | 20 |
| IV. 고 찰 | 24 |
| V. 결 론 | 28 |

| | |
|------------|----|
| 참고문헌 | 29 |
| 영문초록 | 38 |

그 립 차 례

| | |
|--|----|
| 그림 1. <i>H. pylori</i> 로 인한 시간에 따른 IL-8 단백질과 지질과산화물(LPO) 생성 효과 | 13 |
| 그림 2. <i>H. pylori</i> 로 자극한 위 상피세포에서 활성산소종의 생성 .. | 14 |
| 그림 3. <i>H. pylori</i> 에 의한 NF- κ B, AP-1 활성화와 I κ B- α 단백질 발현의 변동 | 15 |
| 그림 4. <i>H. pylori</i> 에 의해 유도되는 NF- κ B의 아형과 결합 특이성 .. | 16 |
| 그림 5. <i>H. pylori</i> 에 의해 유도되는 AP-1의 아형과 결합 특이성 .. | 17 |
| 그림 6. 전사조절인자들이 <i>H. pylori</i> 에 의해 유도되는 IL-8 발현에 미치는 영향 | 18 |
| 그림 7. <i>H. pylori</i> 에 의해 유도되는 IL-8 단백질 생성에 대한 NAC와 GSH의 영향 | 19 |
| 그림 8. <i>H. pylori</i> 에 의해 유도되는 NF- κ B와 AP-1의 활성화에 미치는 NAC와 GSH의 효과 | 19 |
| 그림 9. NO 공여물질에 의한 시간별 IL-8 단백질의 유리 | 20 |
| 그림 10. 시간에 따른 NF- κ B와 AP-1 활성화에 대한 SIN-1의 투여효과 | 21 |
| 그림 11. 시간에 따른 NF- κ B와 AP-1 활성화에 대한 NDC-18의 투여효과 | 22 |
| 그림 12. SIN-1에 의해 유도되는 IL-8 발현에 대한 전사조절인자들의 영향 | 22 |
| 그림 13. NDC-18에 의해 유도되는 IL-8 발현에 대한 전사조절인자들의 영향. | 23 |

Helicobacter pylori 감염 위상피세포에서 IL-8 생성에 대한 NF- κ B의 역할 및 Thiol 화합물의 영향

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 위궤양과 위암과 같은 여러 위장관 질환을 일으키는 주된 위험 요소 중 하나로 알려졌지만 그 정확한 기전은 명확히 규명되지 않았다. Redox에 의해 활성이 민감하게 조절되는 전사 조절인자인 Nuclear factor κ B (NF- κ B)와 activator protein-1 (AP-1)은 염증유발 cytokine 또는 흡착인자와 같이 염증에 관여하는 인자의 발현에 관여하는 것으로 생각하고 있다. 인체의 위 상피세포인 AGS에서 *H. pylori*가 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 발현시킴을 선행연구에서 보고한 바 있다. 본 연구는 *H. pylori*, nitric oxide (NO), NF- κ B 또는 AP-1의 활성 변동과 염증유발 cytokine인 interleukin-8 (IL-8) 단백질 사이의 연관성을 밝히고, 항산화 효과를 갖는 thiol 화합물인 glutathione (GSH)과 N-acetylcysteine (NAC)이 NF- κ B, AP-1과 IL-8 단백질 생성에 미치는 효과를 규명하고자 하였다. 인체 위 상피세포인 AGS에 *H. pylori*를 100:1의 비율로 처리하고, 배지 내에 유리되는 IL-8과 지질과산화물의 양을 각각 효소결합면역흡착법과 분광광도법으로 측정하여 시간에 따른 증가를 관찰하였다. 또한 형광염료인 5-(6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate로 위 상피세포를 염색한 후, confocal microscopy를 이용하여 *H. pylori*를 투여하고 시간이 증가함에 따라 활성산소종이 증가함을 확인하였다. NF- κ B와 AP-1의 활성 변동은 *H. pylori* 자극으로 증가함을 젤 지연 분석법을 통해 관찰하였다. 항산화 효과를 갖는 thiol 화합물인 NAC와 GSH의 병용투여로 NF- κ B와 AP-1의 활성 변동과 IL-8 단백질 유리가 농도 의존적으로 억제되었다. NO 공여물질인 SIN-1과 NOC-18의 투여로 위 상피세포에서의 NF- κ B와 AP-1의 활성변동이

증가하고 IL-8 단백질의 유리가 시간 의존적으로 증가하였다. 각 전사조절 인자들의 결합부위의 한 염기를 치환한 DNA를 transfection한 위 상피 세포로 luciferase reporter assay를 수행한 결과 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1이 *H. pylori* 또는 NO 공여물질에 의하여 유도되는 IL-8의 발현에 반드시 필요함을 확인하였다. 이상의 결과를 통하여 *H. pylori*로부터 발생된 활성산소종 또는 활성질소종은 염증유발 cytokine인 IL-8의 발현을 유도하며, 이 과정에는 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성 증가가 반드시 필요하다는 결론을 얻었다. Thiol 화합물인 NAC 또는 GSH는 *H. pylori*에 의한 NF- κ B와 AP-1 활성 증가를 억제함으로써, *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 단백질 생성을 감소시켜 위점막의 염증성 손상에 대하여 보호작용을 나타낼 것으로 생각된다.

핵심되는 말: *Helicobacter pylori*, IL-8, AGS, Activator protein-1 (AP-1), Nuclear factor κ B (NF- κ B), Thiol 화합물

Helicobacter pylori 감염 위 상피세포에서 IL-8 생성에 대한 NF- κ B의 역할 및 Thiol 화합물의 영향

<지도 김 혜 영 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

서 정 언

1. 서 론

한국인 성인의 80% 이상이 감염된 것으로 알려져 있는 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)는 그람 음성의 나선체 미생물로서,¹ 인체 위점막 상피에 군집을 이룬다.² *H. pylori*는 소화성 궤양, 위선암 및 위림프종 발생의 위험인자로 인식되고 있으며^{3,4} *H. pylori*를 박멸한 경우 소화성 궤양이 회복된다는 보고는 *H. pylori*가 소화성 궤양의 중요한 병인임을 제시하고 있다.^{5,6} *H. pylori* 군집은 위의 전정부에서 주로 발견되나 위체부 및 십이지장에서도 발견된다.⁷ *H. pylori* 감염의 초기단계엔 고유판 내 호중구가 증가하고, 만성적으로 진전된 상태에서는 림프구, 형질세포, 호산구 등의 증가가 관찰된다.⁸ 호중구의 증가는 위점막의 염증 및 손상을 유발하며⁹ 이 과정에 호중구의 응집과 혈관내피로의 흡착 및 이로 인한 국소혈류의 감소가 일어난다.¹⁰ 활성화된 호중구는 과산화물, 과산화수소, 차아염소산 등의 활성산소종 및 myeloperoxidase와 단백분해효소 등의 분비를 증가시킴으로써 조직손상을 유도한다.¹¹ 또한 미세혈관 밖으로 이동한 호중구는 근접 조직으로 침투하여 위점막을 파괴한다.¹² *H. pylori* 감염환자에서

호중구의 활성 증가는 Interleukin-8 (IL-8)을 비롯한 cytokine의 관여 가능성을 제시해주고 있다.¹³ 특히 IL-8은 자체로서 호중구에 대한 강력한 주화인자로서 세포손상 및 염증반응을 악화시킬 것으로 보고되고 있다. 위점막 이외에도 *H. pylori*는 십이지장 조직에서 interferon- γ , IL-1 α , IL-1 β 및 IL-8를 증가시킴이 보고되어 있다.^{14,15}

Lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 혈구세포에서 peroxynitrite가 IL-8의 발현을 매개한다는 보고는 활성질소종 또한 염증유발물질인 IL-8을 유도할 수도 있음을 암시하고 있다.¹⁶ 위 상피세포에서 *H. pylori*에 의해 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현되고 nitrite 생성이 증가함이 관찰되었고,¹⁷ 많은 실험자들이 다양한 세포에서 nitric oxide (NO)가 IL-8의 생성을 조절한다고 보고하였다.¹⁸⁻²⁰

Nuclear factor κ B (NF- κ B)는 세포 활성화에 반응하는 유전자의 발현을 조절하는 특이한 핵 전사인자이다.²¹ 세포신호전달계의 마지막 단계로서 NF- κ B는 면역글로블린, 면역수용체, 세포흡착분자, cytokine, 면역성장인자 등 면역 및 염증반응에 관계하는 물질의 유전자 발현을 조절한다. NF- κ B는 비자극 상태의 세포에서는 억제인자인 I κ B와 결합체를 이룬 상태로 세포질에 존재하다 세포가 자극을 받았을 때 비활성 결합체로부터 I κ B가 분리되어 활성화되며, 분리과정에 protein kinase들과 단백질분해효소들이 관여한다.^{22,23} NF- κ B가 핵 안으로 이동되어 κ B enhancer DNA motif에 결합되면 NF- κ B는 활성화되어 주요단백의 합성을 촉진한다.²⁴ TNF 및 다른 물질에 의한 NF- κ B 활성화는 산화조건에 의해 유도되며,^{25,26} 외인성 환원제인 N-acetyl-cysteine (NAC)이나 glutathione (GSH)은 tumor necrosis factor (TNF)로 유도된 NF- κ B의 활성화를 억제한다.²⁷ 또한 세포내 thiol redox status가 NF- κ B 활성을 결정하는 중요한 인자로 제시되고 있는데 T cell에서 NF- κ B 활성 억제가 GSH의 결핍과 관련되고²⁸ 효과적인 NF- κ B의 활성을 위해서는 적정 수준의 세포내 glutathione disulfide (GSSG)가 필요하다. Phorbol 12-myristate

13-acetate (PMA)와 TNF에 의한 NF- κ B 활성 증가는 L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO)와 NAC로 GSH의 수준을 변화시켰을 때 영향 반응이 보고되어²⁹ NF- κ B의 활성 변동과 thiol 화합물과의 연관성이 제시되었다. 최근까지의 보고들을 종합하면 *H. pylori* 감염에 의한 활성 산소종의 증가는 거의 확실한 것으로 여겨지며³⁰ *H. pylori* 감염에 의한 활성산소종의 증가는 산화성 조건에서 활성화되는 NF- κ B를 매개로 한 염증매개 cytokine의 생성에 기여하리라 생각된다. 또 다른 핵전사인자인 AP-1은 NF- κ B과 유사하게 활성산소종에 의해 활성이 증가하고 세포내의 redox 상태에 의해 민감하게 활성이 조절되는 전사조절로 하나로 알려져 있다.^{31,32}

산화환원 반응이 잘 일어나는 특성으로 인하여 thiol 화합물은 세포내에서 항산화 작용을 나타내며 대표적인 내인성 thiol 화합물로 GSH과 NAC이 있다. NAC에 의한 산화성 손상에 대한 보호 효과는 각질세포와 과립세포에서 보고된 바 있다.^{33,34} 추정되는 NAC에 의한 보호 기전으로는 산화 환원에 의하여 민감하게 조절되는 전사조절인자인 AP-1 및 NF- κ B의 활성을 억제하고³⁵ 발암유도 유전자 (proto-oncogene)인 c-jun, c-fos 및 c-myc의 mRNA 상승을 억제하는 효과 등이 제시되고 있고,³⁶ GSH의 전구물질로써 주로 GSH를 통한 세포방어 효과를 나타낸다고 보고되고 있다.³⁷ GSH는 GSH peroxidase의 기질로서 과산화수소 및 hydroperoxide를 해독한다.³⁷ GSH가 위점막 방어에 중요한 역할을 함은 GSH가 다른 조직에 비하여 위점막에 고농도로 존재한다는 사실로³⁸ 추정할 수 있다. 허혈/재관류 및 과산화수소로 유도한 위점막 내 GSH의 감소는 NO 및 mucus 감소, 지질과산화물 증가, 조직괴사 등의 위점막의 산화성 손상과 비례한다.³⁹ 이는 내인성 항산화 물질로서 GSH의 중요성을 암시하며, 또한 위점막 보호물질인 prostaglandin의 세포보호작용에 GSH가 관여한다는 사실 등이 이를 뒷받침하여 준다.⁴⁰ *H. pylori* 감염으로 인체 위상피세포인 AGS 세포에서 배지 내 유리되는 지질과산화물의 축적과

IL-8 생성이 비례하여 증가하며, 이와 같은 현상은 활성산소종이 IL-8 생성을 매개함을 나타내준다.^{41,42} 또한 *H. pylori*에 의한 NF- κ B의 활성 증가가 항산화제인 mannitol, dimethylthiourea 및 rebarnipide에 의하여 억제됨은 활성산소종이 NF- κ B를 활성화시키고, 그에 따라 IL-8의 생성을 유도 할 수 있음을 암시한다. 본 연구에서는 *H. pylori* 감염에 의한 IL-8 생성에 대한 핵전사인자인 NF- κ B의 역할을 알아보며, thiol 화합물 (GSH 및 NAC)이 *H. pylori* 감염에 의한 위 상피세포의 염증성 손상에 대해 방어효과가 있는 지 규명하고자 하였다.

II . 재료 및 방법

1. 세균 균주 및 배양

H. pylori NCTC 11637은 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)에서 구입하여 2%(v/v) fetal calf serum을 함유한 brucella broth에서 호기조건으로 37 ℃로 유지한 배양기에서 18 시간동안 150 rpm으로 흔들면서 배양하였다.

2. 위 상피세포 배양 및 *H. pylori* 자극실험

사람의 위암 세포주인 AGS (gastric adenocarcinoma, ATCC CRL 1739)는 ATCC에서 구입하여 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin과 100 g/ml streptomycin으로 조성된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포는 1×10^5 cell/well 또는 2.2×10^5 cell/well로 세포 배양접시에 심어 2 일 동안 배양하였다. 배양 중인 위 상피세포는 항생제가 함유되지 않은 신선한 배지로 2회 세척하고, 세균은 원심분리로 broth culture로부터 수확한 후 항생제가 들어있지 않는 배지에 재분산하였다. 위 상피세포와 세균의 비율이 1:100이 되도록 *H. pylori*를 배지에 첨가하여 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 8 시간, 12 시간, 16 시간, 24 시간 동안 각각 배양하였다. Thiol 화합물의 영향은 세균세포를 함유한 배지에 1 - 20 mM의 GSH 혹은 NAC를 첨가하여 4 시간 및 16 시간 동안 위 상피세포를 배양한 후 상층액에서 50 μ l을 취하여 IL-8 단백을 정량하여 관찰하였다. 세포는 핵 추출액을 만들어 젤 지연 분석법으로 NF- κ B와 AP-1의 활성변동을 살펴보고, I κ B- α 의 단백질 합성은 Western blotting을 수행하여 알아보았다. 대조군은 *H. pylori*를 함유하지 않은 배지를 배양 전과 각 배양시간에 수집하여 배지 내 유리된 IL-8 단백질의 양을 정량하고 세포 내 NF- κ B 활성 변동을 측정하여 비교하였다.

Thiol 화합물 효능 연구 실험의 실험을 위해 ① 대조군, ② *H. pylori* 자극군, ③ *H. pylori* + NAC 투여군, ④ *H. pylori* + GSH 투여군으로 나누어 실행하였다.

3. IL-8 단백질 정량

효소결합면역흡착검사용 plates를 인체 IL-8 단백질(R&D, Minneapolis, MN, U.S.A.)에 대한 생쥐 단일항체로 하룻밤 동안 처리하였다. Plate를 0.05% Tween 20을 포함하는 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) (TBST)로 3회 세척하고 10% fetal calf serum을 함유한 배지로 37 ℃에서 90 분간 blocking한 다음 배지를 제거하고 *H. pylori* 자극 실험에서 취한 배지를 well에 첨가하였다. 30 ℃에서 90 분간 plate를 배양한 후 TBST로 well을 3회 세척하고 IL-8 단백질에 특이적인 goat polyclonal immunoglobulin G (R&D system, Minneapolis, MN, U.S.A.) 희석액을 각 well에 첨가하여 37 ℃에서 60 분간 배양하였다. TBST로 well을 다시 3회 세척하고 alkaline phosphatase가 붙어있는 rabbit anti-goat immunoglobulin G를 첨가하였다. Plate를 37 ℃에서 60 분간 배양한 후 well을 상기 방법으로 세척하고, 기질용액은 0.5 mM MgCl₂를 포함한 1 M diethanolamine buffer (pH 9.5) 1 ml에 1 mg disodium *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하여 준비하여, 각 well에 100 µl의 기질 용액을 첨가하여 상온에서 10-15 분간 더 배양하였다. 3 M NaOH를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 파장 450 nm에서의 흡광도를 효소결합면역흡착검사 측정기로 측정하여 IL-8 단백질을 정량하였다. 이때 정제된 인체 재조합 IL-8 단백질을 표준으로 사용하였다.

4. 세포 핵추출액 준비

핵 단백질은 Lee 등⁴³의 방법에 따라 얻었다. 요약하면 세포를 8.8×10^6 이 되게 모은 후 차가운 PBS 용액으로 씻어주고 1 packed cell volume (PCV)의 저장성 완충액 A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 $\mu g/ml$ leupeptin, 1 $\mu g/ml$ aprotinin)에 부유시켰다. 부유시킨 세포들은 얼음 위에서 10 분간 놓아둔 후 27-gauge의 바늘에 5번 통과시켜 세포막을 파괴하고 원심분리를 하여 얻은 핵을 완충액 A로 두 번 씻어주었다. 그 후 핵 침전물에 2/3 PCV의 차가운 완충액 B (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25% glycerol, 1 $\mu g/ml$ leupeptin, 1 $\mu g/ml$ aprotinin)를 넣어 얼음 위에 30 분간 세워두고 자주 진탕해 주어 핵 단백질이 추출되도록 하였다. 차가운 2/3 PCV의 완충액 C (10 mM HEPES, pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 $\mu g/ml$ leupeptin, 1 $\mu g/ml$ aprotinin)를 튜브에 첨가한 후, 4 ℃에서 15 분간 최대속도로 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이와 같이 얻은 핵 추출액은 젤 지연 분석법을 시행하기 전까지 -70 ℃에서 보관하였다. 시료의 단백질 함량은 Bradford 법⁴⁴으로 정량하였다.

5. 젤 지연 분석법

전사조절 단백질인 NF- κ B와 AP-1의 활성 변동은 Xu 등의 방법⁴⁵을 변형하여 젤 지연 분석법 (electrophoretic mobility shift assay)으로 확인하였다. [γ -³²P]-ATP를 소식자로 표지한 0.0175 pmole NF- κ B consensus oligonucleotide (5-AGTTGAGGGGACTTTOCCAGGC-3)와 1 μg 의 poly dI-dC를 포함한 20 μl 의 binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glycerol)를 5 μg 의 핵 단백질과 섞어주었다. 얼음 위에서 30 분간 반응시킨 다음, 반응물을 6% non-denaturing

gel에 부하하였다. 부하 전 200 V에서 1 시간 먼저 전기영동한 후, 부하 후 180 V에서 2 시간 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝나면 젤을 건조시킨 후 자가방사법으로 기록하였다. Competition assay는 소식자가 표지되지 않은 NF- κ B oligonucleotide나 mutant NF- κ B oligonucleotide (염기 G를 C로 치환: 5-GTTGAGGGGACTTTOCCAGGC-3) 또는 다른 비특이적 oligonucleotide를 표지한 소식자보다 100배 많이 첨가하여 반응시켜 젤 지연 분석법을 수행하였다. *H. pylori*에 의하여 활성화되는 NF- κ B 아형을 결정하기 위한 supershift assay는 NF- κ B 아형인 p50 또는 p65에 대한 항체 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 각각 1 μ 씩 핵 단백질과 30 분 동안 반응시킨 후 결합반응과 젤 지연 분석법을 위와 동일하게 실시하였다.

AP-1의 활성 변동은 [γ - 32 P]-ATP를 소식자로 표지한 0.0175 pmole의 AP-1 consensus oligonucleotide (5-CGCTTGATAGTCAGCCGGA-3)를 이용하는 것 이외에는 NF- κ B의 활성 변동을 확인할 때와 동일한 방법으로 확인하였다. AP-1을 구성 형태는 아형 c-fos와 c-jun에 대한 항체를 이용하여 supershift assay로 분석하였다.

6. 지질과산화물 측정

지질과산화물은 Yagi 등의 방법을⁴⁶ 응용하였다. 요약하면 20% acetic acid (pH 3.5)를 총 부피의 15%가 되도록 측정할 배지에 첨가하고 30 분간 3,000 x g의 속도로 원심분리하여 얻은 상층액 0.2 ml을 8% sodium dodecyl sulfate 0.15 ml과 0.8% 2-thiobarbituric acid와 잘 섞은 다음 95 $^{\circ}$ C에서 15 분간 가열하였다. 발색된 지질과산화물은 2 ml의 *n*-butanol을 혼합한 후 15 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이를 excitation 515 nm, emission 553 nm의 파장에서 분광측정기 (SPF-500C, SLM instruments, Urbana, IL, U.S.A.)로 측정하였다. 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 표준물질로 이용하여 지질과산화물의 양을 정량하였다.

7. Western blotting

차가운 PBS로 세포를 두 번 씻은 다음 50 mM Tris, pH 7.2, 2 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.2 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin이 포함된 단백 추출 완충액을 넣고 얼음 위에서 10 분간 방치하였다. 그 후 세포와 단백 추출 완충액을 모두 회수하여 15,000 x g의 속도로 10 분간 원심분리한 후 상층액을 얻어 단백을 정량하였다. 50 µg의 단백질을 10% polyacrylamide gel에 부하한 후 전기영동으로 전개한 다음 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 3% 탈지분유로 blocking한 후 1:1000의 비율로 희석한 IκB-α 일차항체 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, U.S.A.)와 반응시켰다. 신호의 검출을 위해 이차항체로 horse radish peroxidase가 붙어있는 immunoglobulin G를 사용하였고, 발광반응의 측정에 enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)을 사용하였다.

8. Luciferase reporter assay

Confluence가 60%에 도달하도록 10% FBS가 포함된 RPMI 배지에서 1-2 일 동안 배양한 위 상피세포에 mutant NF-κB reporter, mutant AP-1 reporter, mutant C/EBP reporter를 DOTAP (Roche Molecular Biochemicals, Sandhofer, Mannheim, Germany)을 사용하여 각각 transfection 하였다. 각 well당 pRL-TK control plasmid 50 ng과 reporter construct 1 µg을 각각 사용하였다. 6 µl의 DOTAP을 14 µl의 HBS buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH, 7.4)에, 2 µl의 plasmid construct를 8 µl의 HBS에 각각 희석하고 함께 합하여 15 분간 실온에서 방치하였다. 그 다음 1 ml의 신선한 배지에 섞어 위 상피세포 배양 배지로 바꾸어 주었다. transfection한 세포는 37 ℃에서 16 시간 배양한 다음 항생제가 없는 배지로 새로 바꾸어주고 *H. pylori*를 100:1의 비율이 되도록

록 24 시간동안 처리하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척하고 250 μ l의 추출 완충액 (Promega, Madison, WI, U.S.A.)으로 세포 내용물을 추출하였다. 이 용액을 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 \times g로 2 분간 원심분리하여 상층액을 얻어 상층액에 있는 luciferase 활성을 dual luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하여 luminometer (EG&G Berthold, München, Germany)로 측정하였다.

9. 세포내 활성산소종 측정

0.1% poly-L-lysine이 처리된 슬라이드 위에서 배양된 위 상피세포는 해당 시간만큼 *H. pylori* 자극을 준 다음 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 없는 PBS로 두 번 세척하고 5 μ mole의 5-(6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Molecular probes, Eugene, Oregon, U.S.A.)로 10 분간 염색시킨 뒤 PBS로 두 번 세척하고 confocal microscopy로 생성되는 활성산소종을 측정하였다.

10. 단백질 함량 측정

젤 지연 분석법과 Western blotting의 수행에 필요한 단백질 함량은 Bradford 등의 방법⁴⁴으로 측정하였다.

11. 통계처리

모든 자료는 평균값 \pm 표준오차(mean \pm S.E.)로서 표현하고, 각 실험군간의 변화 양상을 분산분석으로 비교 검토하여 P 값이 의의가 있을 때에는 Fisher's least significant difference법으로 각 군의 값을 비교하였다. 또한 Student's t-test가 알맞을 때에는 그 방법을 이용하고, 어느 경우이던지 p 값이 0.05이하일 때에는 의의있는 변동으로 규정하였다.

III. 결 과

1. *H. pylori*에 의한 IL-8 단백질과 지질과산화물의 생성

인체 위 상피세포인 AGS에 *H. pylori* 자극을 준 다음 배지 내 유리 되는 염증유발 cytokine인 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 와 IL-8 단백질의 양을 검색하였던 선행연구에서 *H. pylori* 자극에 의해 IL-8 단백질만이 증가하였다.⁴² 그러므로 IL-8 단백질만을 중심으로 살펴본 본 실험에서 *H. pylori*에 의해 배지 내에 유리된 IL-8 단백질과 지질과산화물이 시간 의존적으로 증가하였다(그림 1). 유리된 IL-8 단백질과 지질과산화물의 양은 서로 비례적으로 증가하였으므로 *H. pylori*에 의한 위 상피세포에서 IL-8 단백질을 생성하는 과정에 산화적 스트레스가 관여할 것이라고 추정할 수 있었다.

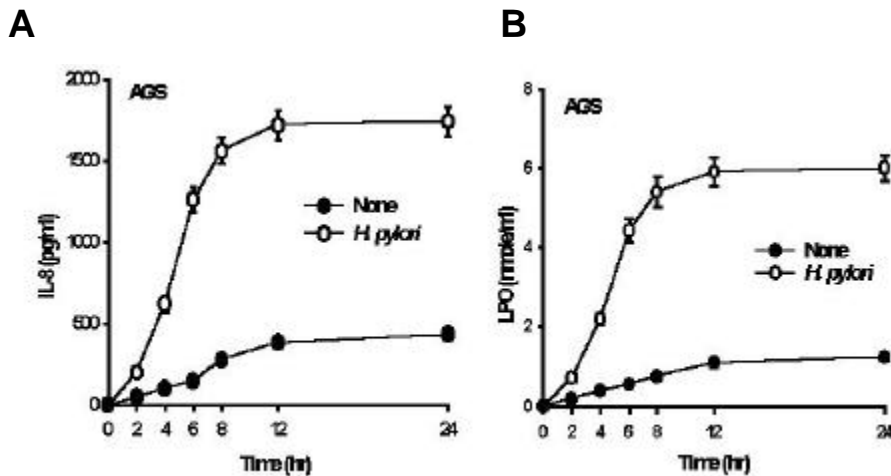


그림 1. *H. pylori*로 인한 시간에 따른 IL-8 단백질과 지질과산화물 (LPO) 생성 효과. *H. pylori*로 위 상피세포를 자극함으로써 시간에 따라 배지 내에 유리되는 IL-8 단백질(A)과 지질과산화물(B)이 모두 증가하여 12 시간에 plateau를 나타내었다. ○은 세포에 *H. pylori*를 100:1의 비율이 되도록 처리한 군이며 ●은 *H. pylori*의 자극이 없는 대조군을 나타낸다. IL-8과 지질과산화물의 양은 평균±표준오차로 표시하였다.

2. *H. pylori*에 의한 세포내 활성산소종의 변동

H. pylori 자극에 의해 위 상피세포 내에서 활성산소종이 발생하는지를 알아보기 위하여 활성산소종과 반응하여 형광을 내는 염료인 5-(6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate로 세포를 염색하여 confocal microscopy로 관찰하였다. 시간이 증가함에 따라 *H. pylori*로 자극한 위 상피세포에서 활성산소종이 증가를 확인하였다(그림 2).

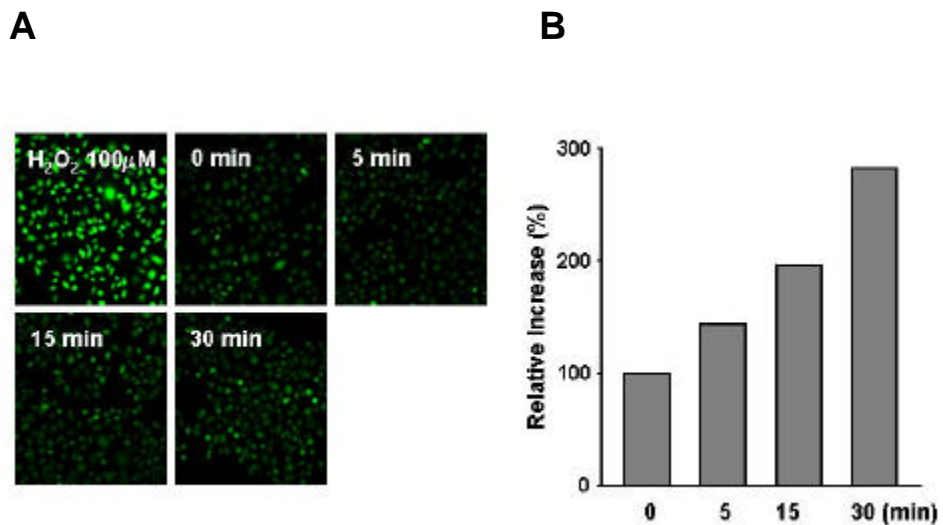


그림 2. *H. pylori*로 자극한 위 상피세포에서의 활성산소종 생성. *H. pylori*로 자극한 위 상피세포를 활성산소종과 반응하여 형광을 내는 염료인 5-(6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate로 염색하여 측정된 confocal micrograph(A)와 이때 나타난 형광의 상대적 증가 정도(B)를 통하여 *H. pylori*에 의해 시간에 따라 위 상피세포에서 활성산소종이 증가함을 관찰할 수 있다.

3. *H. pylori* 자극에 의한 전사조절인자의 활성변동

세포내 redox 상태에 의해 민감하게 그 활성이 조절되는 것으로 알려진 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성 변동을 *H. pylori*에 의해 위 상피세포에서 증가함을 젤 지연분석법으로 관찰하였다. *H. pylori* 자극 이전에는 기준으로 검출되던 NF- κ B와 AP-1의 활성변동은 2 시간,

4 시간에 최고로 증가하였다(그림 3A, 3B). 비자극 상태의 NF- κ B와 결합하고 있어 NF- κ B의 활성을 억제하는 I κ B- α 단백질은 자극에 의해 인산화되어 proteasome에 의해 분해된다. I κ B- α 에서 떨어져 나온 NF- κ B는 핵으로 이동하고 DNA에 결합하여 유전자의 전사를 조절한다. 위 상피세포에 발현된 I κ B- α 단백을 Western blotting으로 확인한 결과 *H. pylori*로 자극한 1 시간 후부터 분해되어 단백질의 발현양이 감소하고 인산화된 형태로 변화하였다. 이로서 NF- κ B의 활성이 변동되기 이전에 I κ B- α 가 먼저 인산화 됨을 확인하였다(그림 3C).

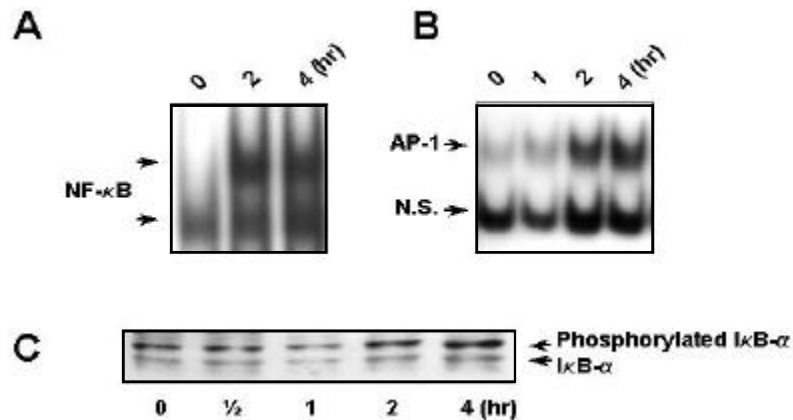


그림 3. *H. pylori*에 의한 NF- κ B, AP-1 활성과 I κ B- α 단백질 발현의 변동. *H. pylori*로 위 상피세포를 자극한 다음 해당 시간에 얻은 핵 추출물을 NF- κ B (A)와 AP-1(B)의 활성 변동을 젤 지연 분석법으로 관찰한 결과 자극 2 시간부터 증가하였다. Western blotting 분석으로 I κ B- α 단백질(C)이 자극 1 시간부터 점차 분해되어 감소함을 관찰하였다.

4. 전사조절 인자의 아형과 결합 특이성

*H. pylori*에 의해 활성이 증가하는 NF- κ B와 AP-1이 어떠한 아형으로 구성되어 있는지 확인하기 위하여 supershift assay를 수행하였다. NF- κ B의 아형인 p50과 p65에 대한 항체를 각각 *H. pylori*로 자극한 위 상피세포에서 얻은 핵 추출액과 반응시켜 검출한 NF- κ B의 두 띠 중,

위의 띠가 p50에 대한 항체와 p65에 대한 항체와 반응하여 위로 이동하였으므로 p65/p50 heterodimer임을 확인하였다. 아래 띠는 p50에 대한 항체에 의해서만 위로 이동함으로써 p50/p50 homodimer임을 확인하였다(그림 4A). 이와 유사하게 활성이 증가된 AP-1의 구성 아형을 확인하기 위해 c-jun, c-fos에 대한 항체를 각각 위 상피세포에서 얻은 핵 추출물과 반응시켜 실험한 결과, AP-1의 띠가 사라짐을 확인하였다. 그러므로 *H. pylori*에 인하여 위 상피세포에서 활성이 증가되는 AP-1이 c-jun/c-fos로 구성된 heterodimer임을 규명하였다(그림 5A).

젤 지연 분석법으로 검출된 띠가 NF- κ B 혹은 AP-1에 특이적인 띠인지 확인하기 위하여 각각 competition assay를 수행하여 NF- κ B와 AP-1의 결합 특이성을 확인하였다(그림 5B).

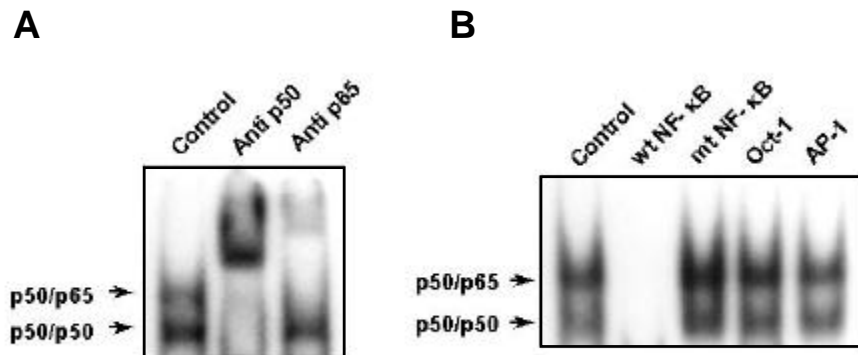


그림 4. *H. pylori*에 의해 유도되는 NF- κ B의 아형과 결합 특이성. (A) NF- κ B의 아형인 p65와 p50에 대한 항체를 이용한 supershift assay를 통하여 NF- κ B는 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer로 구성되었음을 확인하였다. (B) 방사성 동위원소를 붙이지 않은 wild type NF- κ B oligonucleotide, mutant NF- κ B oligonucleotide, Oct-1 oligonucleotide와 AP-1 oligonucleotide를 이용한 competition assay는 검출한 띠가 NF- κ B에 특이한 결합띠임을 보여주었다.

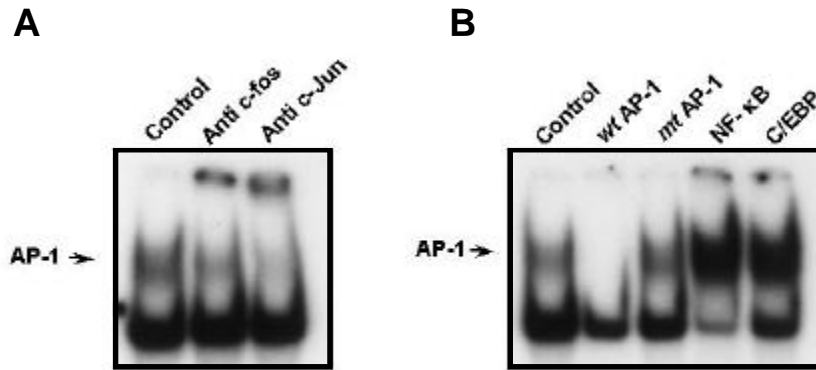


그림 5. *H. pylori*에 의해 유도되는 AP-1의 아형과 결합 특이성. (A) AP-1의 아형인 c-jun과 c-fos에 대한 항체를 이용한 supershift assay로 *H. pylori*에 의하여 활성이 증가하는 AP-1 결합체가 c-jun/c-fos heterodimer임을 확인하였다. (B) 방사성 동위원소를 붙이지 않은 wild type AP-1 oligonucleotide, mutant AP-1 oligonucleotide, NF- κ B oligonucleotide와 C/EBP oligonucleotide를 이용한 competition assay로 AP-1 결합체의 특이성을 확인하였다.

5. Luciferase reporter assay를 통한 전사조절인자의 역할

IL-8 유전자의 promoter 부위에 결합위치가 존재한다고 보고된 전사 조절인자들이 *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 발현에 미치는 역할을 알아보기 위해 각 전사조절인자가 결합하는 부위의 염기서열중 한 염기를 치환시킨 DNA를 위 상피세포에 transfection한 다음 *H. pylori*로 자극하고 luciferase reporter assay를 수행하였다. *H. pylori*에 의해 증가된 luciferase의 형광은 NF- κ B의 결합부위와 AP-1 결합부위를 변이시킨 위 상피세포에서만 유의적으로 감소하였고 C/EBP 결합부위를 변이시킨 세포에서는 형광의 감소를 보이지 않아 *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 유전자 발현에 C/EBP가 아닌 NF- κ B와 AP-1가 필수적인 요소임을 규명하였다(그림 6).

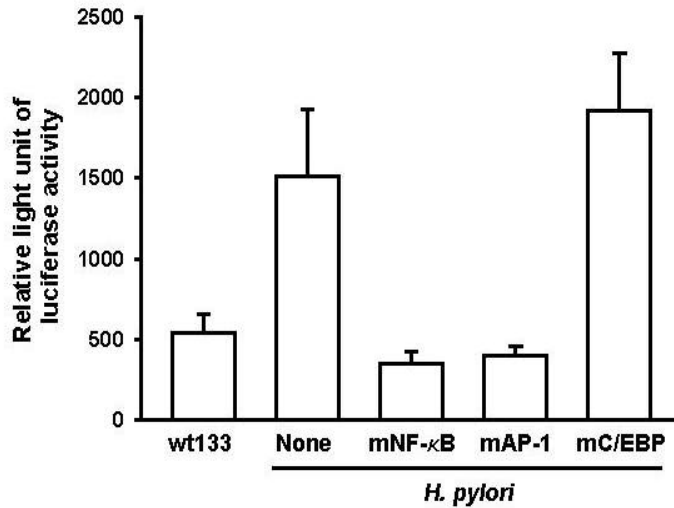


그림 6. 전사조절인자들이 *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 발현에 미치는 영향. 각 전사조절인자들의 결합 부위를 변이시킨 DNA를 transfection한 위 상피세포에 *H. pylori*를 24 시간 동안 처리하여 얻은 세포 추출액으로부터 luciferase 활성을 측정하였다. *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 유전자 발현에 전사조절인자 NF-κB과 AP-1이 필수 불가결한 요소임을 확인하였다.

6. Thiol 화합물의 영향

H. pylori 자극으로 인해 증가된 IL-8 단백질의 양이 thiol 화합물로 항산화 성질을 갖고 있는 것으로 알려진 GSH이나 NAC을 병용투여로 용량 의존적으로 감소하였고(그림 7), *H. pylori*에 의해 증가한 NF-κB와 AP-1의 활성변동은 NAC과 GSH을 투여에 의하여 억제됨을 관찰하였다(그림 8).

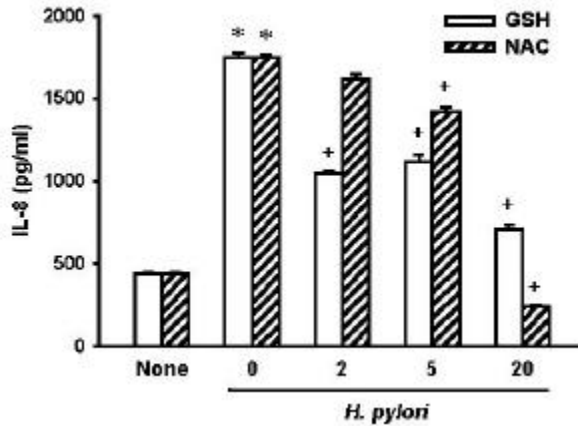


그림 7. *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 단백질 생성에 대한 NAC와 GSH의 영향. *H. pylori*로 인하여 위 상피세포에서 유리가 증가한 IL-8 단백질은 NAC와 GSH의 병용투여로 농도 의존적인 감소를 나타내었다. NAC와 GSH는 mM 단위로 처리하였다.

* 대조군에 비하여 $P < 0.05$, + *H. pylori* 투여군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성을 나타낸다.

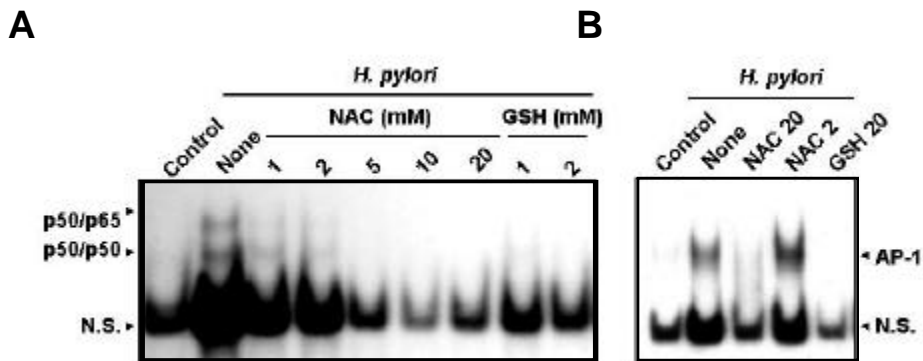


그림 8. *H. pylori*에 의해 유도되는 NF- κ B와 AP-1의 활성에 미치는 NAC와 GSH의 효과. *H. pylori*로 유도된 NF- κ B(A) 또는 AP-1(B)의 활성 증가는 NAC 혹은 GSH의 병용투여로 농도 의존적인 활성이 감소하였다.

7. NO 공여물질의 영향

이전의 연구¹⁷에서 *H. pylori* 자극으로 위 상피세포에서 iNOS가 발현함을 관찰한 바 있으므로 iNOS로부터 만들어진 NO가 *H. pylori*에 의한 신호 전달에 관여할 것으로 생각되어 다음의 실험을 수행하였다. NO 공여물질로 300 μ M의 NOC-18과 SIN-1을 각각 위 상피세포에 처리하여 유리되는 IL-8 단백양을 관찰한 결과 시간 의존적인 증가를 관찰하였다(그림 9).

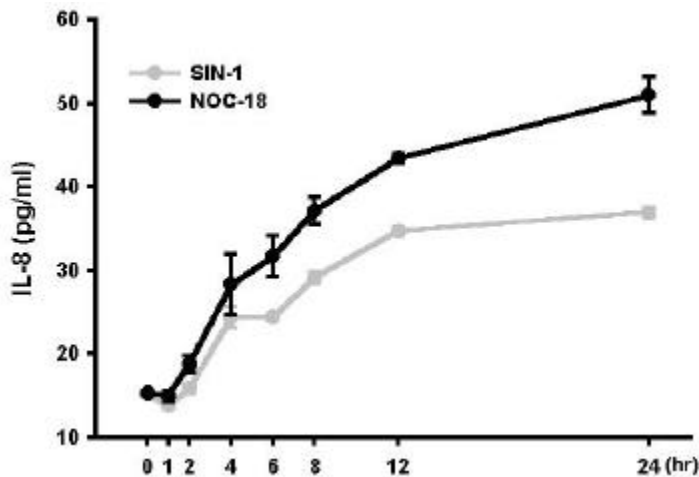


그림 9. NO 공여물질에 의한 시간별 IL-8 단백질의 유리. NO 공여물질인 SIN-1과 NOC-18을 위 상피세포에 투여한 결과 배지 내에 유리되는 IL-8 단백질이 시간에 따라 증가함을 알 수 있었다. NO 공여물질은 각 300 μ M의 농도로 사용하였다.

IL-8 발현에 관여하는 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성화에 대한 NO 공여물질의 효과를 살펴보았다. NO 공여물질 투여로 인하여 NF- κ B와 AP-1 활성화는 모두 1 시간, 2 시간대에 이르러 증가하였다(그림 10, 11). 이와 같은 결과로 활성화질소종은 활성산소종과 유사하게 NF- κ B와 AP-1의 활성을 유도함으로써 IL-8 생성을 증가시킴을 확인하였다. IL-8 발현에 관여하는 전사조절인자의 결합부위를 변이시킨 DNA

를 transfection한 위 상피세포에 SIN-1 혹은 NOC-18을 처리하여 luciferase reporter assay를 수행한 결과, NO 공여물질에 의한 IL-8 유전자 발현에 NF- κ B와 AP-1의 활성이 필요함을 관찰하였다(그림 12, 13).

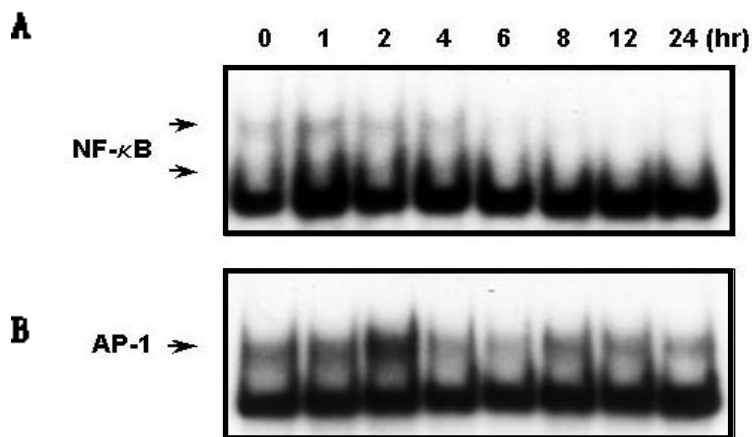


그림 10. 시간에 따른 NF- κ B와 AP-1 활성에 대한 SIN-1의 두어효과. 300 μ M의 SIN-1을 처리한 위 상피세포에서 NF- κ B(A)의 활성 및 AP-1(B)의 활성은 1 시간과 2 시간에 크게 증가하였다.

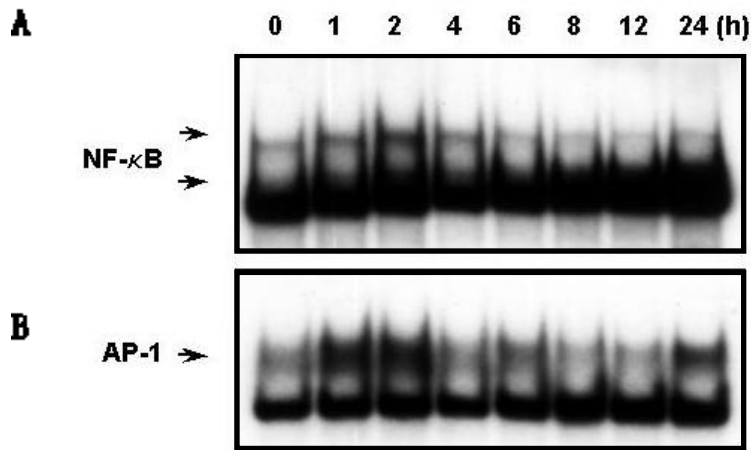


그림 11. 시간에 따른 NF-κB와 AP-1 활성에 대한 NOC-18의 두어효과. 300 μM의 NOC-18을 처리한 위 상피세포에서 시간에 따른 NF-κB(A)의 활성 또는 AP-1(B)의 활성은 1 시간과 2 시간에 크게 증가하였다.

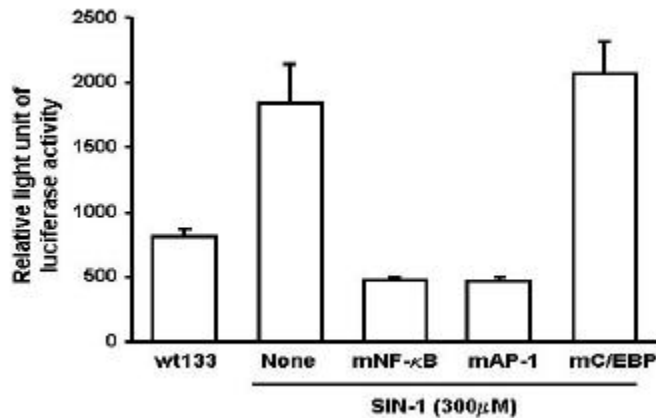


그림 12. SIN-1에 의해 유도되는 IL-8 발현에 대한 전사조절인자들의 영향. 각 전사조절인자들의 결합 부위를 변이시킨 DNA를 transfection한 위 상피세포에 300 μM SIN-1을 24 시간 동안 처리하여 얻은 세포 추출액으로부터 luciferase 활성을 측정하였다. SIN-1에 의해 유도되는 IL-8 유전자 발현에 전사조절인자 NF-κB와 AP-1이 필수적임을 관찰하였다.

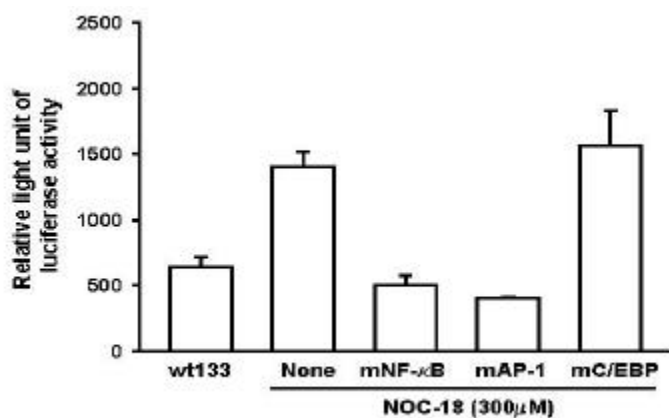


그림 13. NOC-18에 의해 유도되는 IL-8 발현에 대한 전사조절인자들의 영향. 각 전사조절인자들의 결합 부위를 변이시킨 DNA를 transfection한 위 상피세포에 300 μ M NOC-18을 24 시간 동안 처리하여 얻은 세포 추출액으로부터 luciferase 활성을 측정하였다. NOC-18에 의해 유도되는 IL-8 유전자 발현에 전사조절인자 NF- κ B과 AP-1이 필요한 요소임을 확인하였다.

IV . 고 찰

전세계 인구의 절반 이상이 감염되어 있는 것으로 알려진 *H. pylori* 는 위암이나 위궤양의 위험 요소이고 WHO에 의해 발암물질로 분류되어 있다. *H. pylori*로 감염된 환자의 위점막에서 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α 가 증가하고^{47,48} *H. pylori*에 감염된 십이지장 조직에서 interferon- γ , IL-1 α , IL-1 β 및 IL-8 생성이 증가되어¹⁵ *H. pylori*에 의한 위 손상에 염증 반응이 관여함이 보고되었다. 이어서 *H. pylori*가 위 손상을 일으키는 가능한 기전으로 *H. pylori*가 호중구와 단핵구를 유인하는 주화인자를 분비하기 때문인 것으로 설명하고 있다.⁴⁹ 유인된 호중구는 반응성이 강한 활성산소를 생성하여 위점막 세포의 손상을 야기한다.⁵⁰ 이와는 달리 호중구의 침윤정도가 같음에도 불구하고 *H. pylori*가 감염된 위궤양 환자의 점막에서 감염되지 않은 환자의 점막에서보다 많은 활성산소가 발견되어 호중구 이외에도 다른 활성산소의 발생원이 있을 것으로 여겨진다.⁵¹ 또한 활성산소가 *H. pylori*와 위 상피세포와의 접촉에 의해 생성된다는 보고 등 위점막 손상을 야기할 것으로 생각되는 활성산소의 발생 근원에 대한 연구들이 진행되고 있다.^{52,53} 본 실험에서 호중구 없이 *H. pylori* 자극만으로도 위 상피세포에서 활성산소와 배지내 유리된 지질과산화물이 증가하는 결과를 얻었으며, 이는 *H. pylori*로부터 분비된 주화물질에 의해 유인된 호중구가 활성산소를 발생시켜 위 손상을 야기한다고 알려진 그간의 통념을 반박하는 결과이다.

선행 연구를 통해 *H. pylori* NCTC 11637은 위 상피세포에서 IL-8 단백질의 생성을 유도하였으나, IL-1 α , IL-1 β , IL-6와 TNF- α 의 생성을 촉진하지는 못하였다.⁴² 이상의 결과들을 통해 *H. pylori*에 의한 위점막 손상에서 IL-8 이외의 다른 cytokine이 증가한다는 보고^{47,48}는 위 상피세포와 *H. pylori*의 접촉으로 인한 직접적인 결과가 아니고 IL-8에 의해

유인된 호중구가 갖는 주화성과 같은 이차적 반응에 의한 상피세포 손상에 의한다고 생각된다.

지금까지의 연구들은 *H. pylori* 자극으로 위 상피세포에서 IL-8의 생성이 증가하는 과정에 NF- κ B의 활성화가 필수적인 요소일 것이라고 제시하고 있다.^{64, 65} NF- κ B는 면역이나 염증관련 자극에 의하여 다양한 유전자의 활성을 조절하는 전사조절인자로서 활성화된 NF- κ B의 전형적인 형태는 p65와 p50의 heterodimer이거나 homodimer 혹은 다른 Rel 단백질과의 dimer도 존재한다.⁶⁶ 본 연구에서는 *H. pylori*에 의해 활성화되는 NF- κ B가 p65/p50 heterodimer와 p50 homodimer 두 개의 띠로 구성되어 있음을 확인하였다.

IL-8 생성은 주로 전사 수준에서 조절되고 전사조절인자인 NF- κ B가 IL-8 유전자 발현을 조절하는 주된 인자이다.^{64,67,68} 또한 전사조절인자 AP-1과 C/EBP 또한 IL-8의 발현에 있어 그 활성이 증가함이 보고되었다.⁶⁹⁻⁶¹ 이는 IL-8 유전자의 promoter 부위에 NF- κ B, AP-1와 C/EBP의 결합위치가 존재하는 사실로도 추측할 수 있다.⁶¹ 본 연구에서 젤 지연 분석법을 통해 전사조절인자들의 활성을 살펴본 결과 *H. pylori*에 의해 NF- κ B와 AP-1의 활성은 증가하나 C/EBP의 활성은 변화하지 않았다. 각 전사조절인자가 결합하는 부위의 한 염기를 변이시킨 DNA 구조를 transfection시킴으로써 IL-8의 발현에 직접적으로 관여하는 전사조절인자들을 확인한 결과 NF- κ B와 AP-1이 IL-8의 발현에 관여함을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 자극의 종류와 세포에 따라 IL-8 발현에 관여하는 전사조절인자가 다를 수 있으며, *H. pylori* 자극에 의하여 위 상피세포에서 유도되는 IL-8의 발현에 NF- κ B와 AP-1이 활성이 관여함을 규명하였다.

산화성 스트레스가 NF- κ B의 활성을 유도하는 사실에 대해서는 많은 보고가 일치하지만 AP-1의 활성이 변동되는지에 대하여서는 세포와 자극에 따라 상반된 결과가 보고되고 있다.³¹ 세포내 redox 상태는 GSH,

GSH peroxidase 및 catalase 등의 redox 물질들에 의하여 조절된다. 최근 세포내의 redox가 전사조절인자와 신호전달경로의 활성을 조절하는 것으로 밝혀지고 있다. 전사조절인자 AP-1과 NF- κ B는 그 구조 내에 conserved cysteine residues를 갖고 있고 이 residue의 redox regulation이 그 활성을 직접 조절하고 있다. 그러므로 본 실험에서는 여러 항산화 물질 중 thiol기를 갖는 물질인 NAC와 GSH를 이용하여 *H. pylori*에 의한 IL-8 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 본 연구의 결과 *H. pylori*에 의해 증가되는 IL-8 단백질과 NF- κ B와 AP-1 활성 증가는 NAC와 GSH의 투여로 감소하였다. 이와 같은 결과는 *H. pylori*에 의한 산화성 스트레스가 NF- κ B와 AP-1의 활성을 유도하며 IL-8의 발현을 유도함을 제시한다. 그러나 NF- κ B와 AP-1의 활성의 상위에는 MAP kinase 등 다른 신호 전달계가 존재하고 있음이 보고되었다.^{43,62,63} 다양한 자극에 의해 활성화되어 신호를 핵으로 전달하는 MAP kinase의 활성 경로는 *H. pylori* 균주에 따라 다름이 보고되었다. Keates 등⁶⁴에 따르면 cytotoxic associated gene (cag)을 갖는 *H. pylori*가 cag⁻ *H. pylori*보다 위 상피세포에서 더 많은 IL-8 단백을 유리시키고 MAP kinase의 강한 활성을 유도하였다. 본 실험에 사용한 *H. pylori* NTCT 11637 균주를 사용한 연구 결과로는 ERK, p38 kinase와 JNK의 인산화가 보고되었다. MEK1의 특이적 억제제인 PD98059와 p38 MAP kinase의 특이적 억제제인 SB203580를 투여한 경우 *H. pylori*에 의해 증가한 IL-8 단백질이 유의적으로 감소한다는 보고는 *H. pylori*에 의해 유도되는 IL-8 유전자 발현이 MAP kinase 경로의 활성화에 의해 매개됨을 제시하는 결과이다.

*H. pylori*가 위 상피세포에서 iNOS의 발현을 유도하고 이 과정에 NF- κ B의 매개가 필요하다는 선행 연구를¹⁷ 바탕으로, 본 연구에서는 NO가 IL-8 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰하였다. SIN-1과 NOC-18을 NO 공여물질로 위 상피세포에 직접 투여한 결과, 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성 증가와 IL-8 단백질의 증가를 관찰하였다. 전사

조절인자의 결합부위를 변이시킨 DNA를 transfection한 위 상피세포에 NO 공여물질을 투여하여 luciferase reporter assay를 수행한 결과, NO에 의한 IL-8 유전자 발현에 전사조절인자 중 C/EBP가 아닌 NF- κ B와 AP-1이 활성이 필요하다는 사실을 확인하였다. 그러므로 NO가 *H. pylori*에 의한 IL-8 생성의 신호전달 기전에 관여할 것으로 생각된다.

결론적으로 *H. pylori*는 산화적 스트레스를 발생하여 위 상피세포로부터 IL-8 단백을 유도하고 이 과정은 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성증가로 매개된다. 또한 이 과정은 NO에 의해서도 유도되므로 *H. pylori*에 의한 위 상피세포에서의 IL-8의 발현에는 활성산소종과 활성 질소종의 매개가 모두 관여할 것으로 생각된다. 항산화 효과를 갖는 thiol 화합물인 NAC와 GSH는 전사조절인자의 활성을 억제함으로써 염증매개 IL-8 생성을 감소시켜 *H. pylori*에 의한 위 손상에 보호효과를 나타낼 것으로 생각된다.

V. 결 론

*Helicobacter pylori*에 의한 위 상피세포 손상의 기전연구는 인체의 위 상피세포인 AGS세포와 *H. pylori* NTCT 11637 균주를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 사람의 위 상피세포인 AGS 세포는 호중구의 매개 없이도 *H. pylori*에 의해 염증 매개 cytokine인 IL-8을 생성한다.

2. IL-8의 생성에는 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성화가 필요하며, *H. pylori*에 의해 유리되는 활성산소종은 이들 전사조절인자들의 활성을 유도한다.

3. Thiol 화합물은 *H. pylori*에 의해 유도되는 NF- κ B와 AP-1의 활성화와 IL-8의 생성을 억제한다.

4. 활성질소종은 NF- κ B와 AP-1의 활성화를 유도함으로써 IL-8 생성에 관여한다.

결론적으로 *H. pylori*에 의해 발생한 산화적 스트레스는 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성증가를 증가시켜 염증 유발 단백질인 IL-8의 발현을 유도하며, 이 과정은 *H. pylori*에 의해 발현이 유도되는 iNOS로부터 생성된 NO에 의해서도 촉진될 수 있을 것으로 생각된다. Thiol 화합물인 NAC와 GSH는 산화적 스트레스로 유도되는 NF- κ B와 AP-1의 활성을 억제하고 IL-8 생성을 감소시킴으로써 *H. pylori*에 의한 위 손상에 보호효과를 줄 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-5.
2. Blaser MJ. Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1987;93:371-83.
3. Crabtree JE, Shall cross TM, Heatley PV, Wyatt JJ. Mucosal tumor necrosis factor and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991;32:1473-7.
4. Dooley CP, Fitzgibbons PL, Chern H, Appleman MD, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in symptomatic persons. *N Engl J Med* 1989;321:1562-6.
5. Hauws EAJ, Tytgat GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990;335:1233-5.
6. Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1989;96:615-25.
7. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990;161:626-33.
8. Chen XG, Correa P, Offerhaus J. Ultrastructure of the gastric mucosa harboring Campylobacter-like organisms. *Am J Clin Pathol* 1989;85:575-82.
9. Ninemann JL. Inflammation and the neutrophil. In: Prostaglandins, Leukotrienes and the Immune Response, New York: Cambridge University Press; 1986, p55-112.

10. Tauber AL, Babior BM. Neutrophil oxygen reduction. The enzymes and the products. *Adv Free Radical Biol Med* 1985;1:265-307.
11. Elsbach P, Weiss J. Oxygen-Independent Antimicrobial Systems of Phagocytes. In: Snyderman R, Goldstein IM, Gallin JL, editors. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York: Raven Press; 1988. p801-818.
12. Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs in a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* 1990;259:G462-7.
13. Fan XG, Chua A, Fan XJ. Increased gastric production of interleukin-8 and tumor necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol* 1995;48:133-6.
14. Mai UE, Perez-Perez GI, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocyte/macrophages by a lipopolysaccharide-independent mechanism. *J Clin Invest* 1991;87:894-900.
15. Fan XG, Chua A, O'Connell M, Kelleher D, Keeling PWN. Interferon-gamma and tumor necrosis factor production in patients with *Helicobacter pylori* infection. In *J Med Sci* 1993;162:408-11.
16. Filep JG, Beauchamp M, Baron C, Pagiette Y. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J Immunol* 1998;161:5656-62.
17. Lim JW, Kim H, Kim KH. NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 2001;31:355-66.

18. Brown Z, Robson RL, Westwick J. L-arginine/nitric oxide pathway: a possible signal transduction mechanism for the regulation of the chemokine IL-8 in human mesangial cells. *Adv Exp Med Biol* 1993;351:65-75.
19. Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ. Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:949-56.
20. Villarete LH, Bernick DG. Nitric oxide regulation of IL-8 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:671-6.
21. Finco TS, Baldwin AS. Mechanistic aspects of NF κ B regulation: The emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* 1995;3:263-72.
22. Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 1988;53:211-7.
23. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 1993;365:182-5.
24. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:63-80.
25. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-58.

26. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Piers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the apoptotic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J* 1993;12: 3095-104.
27. Mihm S, Ennen J, Pessara U, Kurth R, Droge W. Inhibition of HIV-1 replication and NF-kappa B activity by cysteine and cysteine derivatives. *AIDS* 1991;5:497-503.
28. Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenck H, Eck HP, et al. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994;8: 1131-8.
29. Menon SD, Qin S, Guy GR, Tan YH. Differential induction of nuclear NF-kappa B by protein phosphatase inhibitors in primary and transformed human cells. Requirement for both oxidation and phosphorylation in nuclear translocation. *J Biol Chem* 1993;268: 26805-12.
30. Salim AS. The relationship between *Helicobacter pylori* and oxygen-derived free radicals in the mechanism of duodenal ulceration. *Internal Med* 1993;32:359-64.
31. Meyer M, Schrech R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kB and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993;12: 2005-15.
32. Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res* 1994;54:36-40.

33. Laurent T, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Perret C. Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS. Effect of N-acetylcysteine. *Chest* 1996;109:163-6.
34. Garmyn M, Degreef H. Suppression of UVB-induced c-fos and c-jun expression in human keratinocytes by N-acetylcysteine. *J Photochem Photobiol B* 1997;37:125-30.
35. Pinkus H, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13422-9.
36. Li DW, Spector A. Hydrogen peroxide-induced expression of the proto-oncogenes, c-jun, c-fos and c-myc in rabbit lens epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 1997;173:59-69.
37. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: applications in research and therapy. *Pharmacol Ther* 1991;51:155-94.
38. Szabo S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *J Clin Gastroenterol* 1991;13:S21-34.
39. Kim H, Kim KH. Role of nitric oxide on the oxidative damage in isolated rabbit gastric cells exposed to hypoxia/reoxygenation. *Dig Dis Sci* 1998;43:1042-9.
40. Miller TA. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol* 1983;245:G601-23.
41. 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.

42. Kim H, Seo JY, Kim KH. Inhibition of lipid peroxidation, NF κ B activation and IL-8 production by rebarnipide in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. Dig Dis Sic 2000;45:621-8.
43. Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T. MEKK1 activates both I kappa B kinase alpha and I kappa B kinase beta. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:9319-24.
44. 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;72:248-54.
45. 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;235:349-97.
46. Yagi KA. Simple fluorometric assay for lipiperoxide in blood plasma. Biochem Med 1976;15:212-216.
47. Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. Lab Invest 1995;73:760-70.
48. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. *Helicobacter pylori* *cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. Gastroenterology 1996;110:1744-52.
49. Craig PM, Territo MC, Karnes WE, Walsh JH. *Helicobacter pylori* secretes a chemotactic factor for monocytes and neutrophils. Gut 1992;33:1020-3.

50. Graham DY Pathogenic mechanism leading to *Helicobacter pylori*-induced inflammation. Eur J Gastroenterol Hepatol 1992;4: S9-S16.
51. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IP, et al. *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production *in vivo*. Gut 1994;35:179-85.
52. Bagchi D, Bhattacharya G, Stohs SJ. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. Free Radic Res 1996;24:439-50.
53. Zhang Q, Dawodu JB, Etohi G, Husain A, Gemmell CG, Russell RL. Relationship between the mucosal production of reactive oxygen radicals and density of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997;9:261-5.
54. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1099-109.
55. Aihara M, Azuma A, Takizawa H, Tsuchimoto D, Funakoshi Y, Shindo Y, et al. Molecular analysis of suppression of interleukin-8 production by rebarnipide in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric cancer cell lines. Dig Dis Sci 1998;43:174S-80S.
56. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. Cell 1995;80:529-32.
57. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. Infect Immun 1997;65:3218-24.

58. Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* 1996;88:3482-90.
59. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10193-7.
60. Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1990;265:21128-33.
61. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 1994;56:554-8.
62. Nemoto S, DiDonato JA, Lin A. Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappa B-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998;18:7336-43.
63. Matsumoto K, Hashimoto S, Gon Y, Nakayama T, Horie T. Proinflammatory cytokine-induced and chemical mediator-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:825-31.

64. Mitsuno Y, Yoshida H, Maeda S, Ogura K, Hirata U, Kawabe T, et al. *Helicobacter pylori* induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signaling pathway in gastric cancer cells. *Gut* 2001;49:18-22.

abstract

**THIOL COMPOUNDS AND TRANSCRIPTION FACTOR NF- κ B
ON IL-8 PRODUCTION IN *HELICOBACTER PYLORI*-
STIMULATED GASTRIC EPITHELIAL CELLS**

Jeong Yeon Seo

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

(Directed by Associate Professor Hyeyoung Kim)

Even though *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is considered as one of the major risk factors in the pathogenesis of many gastrointestinal diseases such as peptic ulcer and gastric cancer, exact pathogenic mechanisms have not been clarified. Redox sensitive transcription factors, nuclear factor κ B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1), are believed to be involved in the inflammatory events such as gene expressions of proinflammatory cytokines and adhesion molecules. The previous studies showed that inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression was induced in *H. pylori*-stimulated AGS cell. The present study aimed 1) to determine the relations among reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), the activations of NF- κ B and AP-1 as well as the production of proinflammatory cytokine interleukin-8 (IL-8) and 2) to investigate the effects of N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH), known thiol containing free radical scavengers, on the activations of NF κ B and AP-1 activation as well as IL-8

production in *H. pylori*-stimulated gastric epithelial AGS cells. AGS cells, treated with or without NAC and GSH, were incubated in the presence or the absence of *H. pylori* at the ratio of 100:1 (*H.pylori*:AGS). The levels of lipid peroxides (LPO) and IL-8 were measured by colorimetric methods and ELISA, respectively. Production of ROS were determined by confocal microscopy using fluorescence releasing dye, 5-(6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate. DNA binding activities of NF- κ B and AP-1 were detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Involvement of transcription factors on *H. pylori*- or nitric oxide (NO) donors-induced IL-8 expression were investigated by luciferase reporter assay. *H. pylori* stimulation induced DNA binding activities of NF- κ B and AP-1, and increased IL-8 release time-dependently. *H. pylori*-induced alterations were inhibited by treatment with NAC or GSH dose-dependently in AGS cells.

It is concluded that 1) ROS generated from *H. pylori* and nitric oxide may activate NF- κ B and AP-1, resulting in upregulation of proinflammatory cytokine IL-8 in AGS cells, and 2) NAC and GSH may be beneficial to attenuate *H. pylori*-induced damages resulting from their inhibition on the activations of NF- κ B and AP-1 as well as IL-8 productions in AGS cells.

Key Words : *Helicobacter pylori*, IL-8, Activator protein-1 (AP-1), Nuclear factor κ B (NF- κ B), Thiol compound, AGS cells