

위장관 검체에서 분리한  
*Helicobacter pylori*의  
중합효소연쇄반응에 의한  
CagA 분류

연세대학교 보건환경대학원  
의생명과학전공  
안 병 락

위장관 검체에서 분리한  
*Helicobacter pylori*의  
중합효소연쇄반응에 의한  
*CagA* 분류

지도 김 종 배 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 6 월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

안 병 락

안 병 략 의 석사 학위 논 문 을 인 준 함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연 세 대 학 교 보 건 환 경 대 학 원

2006년 6 월 일

## 감 사 의 글

소중한 한편의 논문을 시작으로 새로운 길을 열어 주시는 하나님께 감사드리며.....

이 논문이 나오기까지 실험하는 내내 지도와 격려를 아끼지 않으신 김종배 교수님께 존경의 마음과 함께 감사를 드립니다. 또한 학기 내내 늦은 밤까지 배움의 지혜를 일깨워 주셨던 양용석 교수님, 오옥두 교수님, 김태우 교수님, 박용석 교수님, 이해영 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

대학원 생활을 원활하게 도와주시고 지속적인 배움의 길을 일깨워주신 임병혁 선생님, 동고동락을 같이 해 주신 이경철 선생님, 조용희 선생님, 이성덕 선생님, 그리고 앞서서 졸업하신 신진수 선생님, 이채진 선생님, 성기만 선생님, 유경래 선생님, 한 학기 늦게 지만 늘 같이 함께한 이영기 선생님께 고마운 전합니다. 처음부터 끝까지 논문 실험과 많은 정보와 지식을 주신 이규상 선생님, 넘쳐나는 실험실 일로 바쁜 가운데 일일이 실험 할 수 있도록 챙겨준 임관훈 선생님, 실험에 사용된 검체를 허락해주시고 모아주신 용인세브란스병원 문병수 원장님, 정혜원 과장님, 환자 검사에 분주한 가운데 정성스럽게 도와준 용희진 선생님, 박은주 선생님께 고마운 마음을 전합니다. 직장생활을 하면서 학교생활을 마칠 수 있었던 것은 용인세브란스 진단검사의학과원들이 있었기에 가능했습니다. 김희정 교수님, 최재대 과장님, 이순연 선생님, 우흥련 선생님, 김임경 선생님께 다시 한 번 감사드립니다.

야간근무와 학교생활로 가족들과 함께하는 시간이 부족하여 늘 미안하게 생각합니다. 사랑하는 나의 아내 은숙, 아빠 보다 더 열심히 하는 아들 광진, 혼자서도 자기 일을 스스로 잘 하는 딸 유진, 졸업하는 모습을 지켜보지 못하고 하늘나라에 계시는 아버님, 늘 곁에서 기도하고 힘이 되어준 사랑하는 어머님께 깊은 감사의 마음을 전하며 모든 분들께 저의 작은 결실을 바칩니다.

2006년 6월 **안 병 탁** 드림

## 목 차

표 및 그림 목차 .....	ii
약 기 호 표 .....	iv
국문 요약 .....	v
제 1 장 서 론 .....	1
제 2 장 재료 및 방법 .....	5
1. <i>Helicobacter</i> 표준균주 및 대조균주 .....	5
2. 환자 및 임상 검체 수집 .....	5
3. Urease test .....	5
3-1 Rapid urease test .....	5
3-2 Urease broth test .....	5
4. <i>Helicobacter pylori</i> 배양 .....	6
5. 검체로부터 DNA 추출 .....	6
6. Oligonucleotide primers .....	7
7. 중합효소 연쇄반응 .....	7
제 3 장 연구 성적 및 결과 .....	13
1. 대상 환자의 질환 .....	13
2. Genus <i>Helicobacter</i> CLO test 및 배양 .....	14
3. <i>Helicobacter</i> genus 특이염기서열, <i>H. pylori</i> 특이염기서열, <i>cagA</i> 의 검출 .....	15
4. Western- <i>cagA</i> 의 검출 .....	16
5. East Asian- <i>cagA</i> 의 검출 .....	17
6. Western- <i>cagA</i> 과 East Asian- <i>cagA</i> 의 multiplex PCR .....	18
제 4 장 고 찰 .....	21
제 5 장 결 론 .....	24
참 고 문 헌 .....	25
영 문 요 약 .....	30

## 표 및 그림 목차

Table 1. The sequences of PCR primers used for detection of genus <i>Helicobacter</i> -specific, <i>H. pylori</i> -specific, <i>cagA</i> , Western- <i>cagA</i> , and East Asian- <i>cagA</i> .....	11
Table 2. The PCR conditions used for detection of Genus <i>Helicobacter</i> -specific, <i>H. pylori</i> -specific, <i>cagA</i> , Western- <i>cagA</i> , and East Asian- <i>cagA</i> .....	12
Table 3. Clinical profile of the studied groups .....	13
Table 4. Discrimination between East Asian- <i>cagA</i> and Western- <i>cagA</i> in isolates from gastric biopsies .....	19, 20
Figure. 1. Nucleotide sequence of Western- <i>cagA</i> type (GenBank accession number: AB19095) in the 3' region of the <i>cagA</i> gene .....	9
Figure. 2. Nucleotide sequence of East Asian- <i>cagA</i> type (GenBank accession number: AB190945) in the 3' region of the <i>cagA</i> gene .....	10
Figure. 3. PCR amplification of Western- <i>cagA</i> specific primer set, WF2-WR1 .....	16
Figure. 4. PCR amplification of East Asian- <i>cagA</i> specific primer set, EF1-ER1 .....	17
Figure. 5. Multiplex PCR amplification of Western- <i>cagA</i> and East Asia- <i>cagA</i>	

*specific primer set*, WF2-EF1-WR ..... 18

## 약 기 호 표

ATCC : American Type Culture Collection

*bp* : base pair

*cagA* : cytotoxin associated gene A

*cag* PAI : *cag* pathogenicity island

EPIYA : Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala

ESS : East Asian specific sequence

*H. pylori* : *Helicobacter pylori*

IARC : International Agency for Research on Cancer

Kb : kilo base

NIBC : National Center for Biotechnology Information

PCR : polymerase chain reaction

SHP-2 : Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase

T<sub>m</sub> : melting temperature

*VacA* : vacuolating cytotoxin

WSS : Western specific sequence



## 국문 요약

### 위장관 검체에서 분리한 *Helicobacter pylori*의 중합효소 연쇄반응에 의한 CagA 분류

*H. pylori*의 CagA 단백질은 제4형 분비계를 이용하여 위상피세포 내로 주입되고 타이로신 인산화가 되어 SHP-2와 결합을 하면서 신호전달체계를 교란시키고 세포의 증식, 분화, 자사멸, 형태변화에 영향을 미친다. 이러한 작용은 서양지역에서 분리한 균주보다 동아시아지역에서 분리한 균주에서 SHP-2와 더 높은 결합력을 보이고 있어 다양한 위장질환의 중요한 역할을 하는 것으로 추정하고 있다. 본 실험에서는 위장관 검체로부터 원인세균을 분리 배양하여 PCR 방법으로 Western *cagA type*과 East Asian *cagA type*을 분리, 동정하였다. 2005년 8월에서 11월까지 경기도 용인시에 소재하는 연세대학교 의과대학 부속 용인세브란스병원에서 위장관 검체로 부터 분리한 73균주를 대상으로 고안한 primers set를 이용하여 각각의 subtype을 결정하였다. Multiplex PCR를 이용하여 보다 신속하게 분리, 동정할 수 있고 또한 WSS가 포함되는 C영역의 반복되는 횟수를 확인할 수 있었다. 임상분리균주 중 Western *cagA type*은 4.1%로 낮으며 East Asia *cagA type*은 94.5%로 대부분을 차지하고 있었으며, 임상 질환군에서도 chronic gastritis는 94.9%, gastric ulcer는 100%, duodenal ulcer는 88.9%로 매우 높은 분포율을 보이고 있다.

---

핵심되는 말: *H. pylori*, CagA, SHP-2, Western, East Asian, subtype,  
multiplex PCR

## 제 1 장 서 론

*Helicobacter pylori*(이하 *H. pylori*)는 Gram 음성, 나선형이며 끝단에는 양편모 또는 단편모의 형태를 가지고 있고 미호기성(microaerophilic)으로 37°C 조건에서 성장하는 균주이다. 적어도 전세계 인구의 50% 이상 감염률을 나타내며 특히 우리나라 인구의 80%가 감염되어 있으며 감염된 대부분에서 chronic gastritis를 일으키고 15~20%는 gastric ulcer나 duodenal ulcer로 악화되고 1%미만에서 gastric cancer로 진행시키는 중요한 위험 인자로 인정하고 있다(17, 21, 29).

1983년에 Marshall과 Warren은 활동성 만성위염환자의 위점막에서 만곡형 간균을 관찰하고 인공배지에서 처음으로 순수 분리 배양하는데 성공하면서 인체 위염의 일차적인 원인균임을 증명하였다(15, 16). 1994년에는 World Health Organization (WHO) 산하기관 International Agency for Research on Cancer(IARC)로부터 Group I carcinogen으로 지정되었지만(11) *H. pylori*는 위 점막에서 장기간 서식하면서 다양한 질환을 유발하여 과거의 병인론과 발병기전으로 이해하기 어려웠다. 최근에 분자생물학적인 병리기전이 보고되면서 발병결정인자(pathogenic determinant)에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

*H. pylori*는  $1.56 \times 10^6$  bp 길이의 유전체를 가지며 약 1,500개의 유전자를 함유하고 있고(21), 이 중 47개 유전자는 세균의 생존에 필수적인 단백질을 암호화하며 다른 대부분의 인자는 숙주 상피세포 내로의 이동, 부착 및 생존에 관련되고 더 나가 질환의 유무 및 진행 예후에 중요한 결정인자로 작용한다. 주로 알려진 virulence factor로 cytotoxin associated gene A (*cagA*)에 의한 숙주세포의 하위 신호전달체계를 활성화 또는 교란시키고 vacuolating cytotoxin (*vacA*)은 숙주세포 내에서 공포(vacuole)를 형성하여 조직손상을 초래하고 면역세포의 사멸 및 염증 사이토카인 분비를 증가시켜 면역계를 교란시키는 보고가 있다(4, 8, 19, 20).

Urase의 강한 생산능력은 urea를 CO<sub>2</sub>와 NH<sub>3</sub>로 가수분해하여 강산을 중화시키므로 이 세균의 생존에 결정적인 기여를 하고 편모는 운동 단백질인 FlaA와 FlaB

가 발달되고 *collagenase*를 분비하여 두꺼운 점막층을 쉽게 이동하여 군집을 형성한다(14, 22). *H. pylori*의 BabA는 상피세포 막의 *fucosylated Lewis B blood group antigen*에 *adhesion factor*로 작용하고 있다(7). 이러한 모든 *risk factor*는 위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위암으로 악화시키는 발병결정인자로 주목되고 있다. 특히 *cagA gene*을 통해 발현되는 *CagA protein*은 면역원성이 높은 단백질로서 *H. pylori*의 *virulence factors*로 가장 많이 연구가 이루어진 것 중에 하나이다. *cagA* 양성인 *H. pylori strains*은 *atrophic gastritis*와 *gastric cancer*로 발전되는 유의성이 높은 *factor*로 보고되고 있다. 하지만 *H. pylori cagA* 양성에 따른 임상 결과로는 광범위한 지지를 받지 못하고 있으며 동아시아지역에서 *H. pylori cagA* 양성균주의 높은 보급률에도 불구하고 질환군에서 유의성의 차이가 없다는 보고(28)는 암의 발병기전에 있어서 다른 여러 가지 *factor*가 작용하고 있음을 시사한다.

최근 연구에서 *CagA*에 대한 생물학적인 활성에 차이가 있는 *East Asian type* 과 *Western type* 확인으로 숙주세포의 SHP-2와 *CagA*의 결합력 차이가 *gastric carcinoma* 발병률에 있어서 서로 다른 차이를 뒷받침하고 있다(9). *cag pathogenicity island (cag PAI)*는 *H. pylori*의 병원성을 결정하는 가장 중요한 인자로 인식되며 총 40 kb 길이로 31개의 유전자와 감염된 세포의 숙주내로 분비할 수 있는 *type IV secretion system*을 암호화한다. *CagA* 단백질은 *cag PAI*의 말단에 위치하며 120~145 kDa의 다양한 크기를 가지고 있다(5, 8). *CagA* 단백질은 *type IV secretion system*에 의하여 *bacterial* 막을 통과하여 다른 세포나 세포 밖으로 대량의 다양한 분자복합체를 이동시킨다(3). *CagA*의 *carboxyl* 말단에는 특정 아미노산 서열이 잘 보존된 *Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifs*가 다수 존재하며 숙주세포의 *c-Src, Fyn, Yes* 같은 *Src family kinase*에 의해 *tyrosine*이 *phosphorylation*된다(16, 19). *Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-2)*는 세포에서 *spreading, migration, adhesion*의 조절에 능동적으로 관여하는 역할을 하는데(9), 최근에 *phosphorylation-dependent* 방식인 SHP-2와 인산화한 *CagA*와 복합체를 형성하여 숙주세포의 하위 신호전달체계와 조절을 방해하고 교란함으로써 세포성장과 세포자사멸(*apoptosis*), 세포형태변화

(hummingbird phenotype)을 일으키고 염증 사이토카인의 생산 등에 관련된 신호 전달 체계를 유도한다(8). *H. pylori*는 다른 지리적인 분포에 따라 병원성에 차이가 있는 집단으로 나뉘지고 Asian에서 부터 분리된 균주는 *cagA gene fragments*가 다른 지역에서 분리된 균주와 비교하여 핵산의 염기서열이 다르게 구별된다(1, 9). *CagA protein* 크기의 차이는 3'영역의 특정염기서열이 반복되는 수와 관련되고 *phosphorylation* 부위도 이와 같은 위치에서 일어난다(10, 23).

최근에 *CagA*는 *gastric cancer*로 널리 알려진 동아시아(East Asia) 지역에서 분리된 것은 Western *CagA*의 반복되는 핵산의 염기서열에 상응하는 영역에서 차이가 있는 것으로 보고되고, *tyrosine*이 *phosphorylation*이 된 후 Western specific sequence (WSS)보다 East Asian specific sequence (ESS)는 SHP-2와 더 강한 결합력이 있어 *transforming activities*가 높은 것으로 보고되었다(9). *CagA* 단백질 중 EPIYA motif가 포함된 아미노산 서열이 EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C, EPIYA-D 나뉘지며 서양(Western) 지역에서 분리된 균주는 EPIYA-A-B-C, EPIYA-A-B-C-C, EPIYA-A-B-C-C-C로 반복되는 형태가 주류를 이루고 있는 반면에 동아시아(East Asian) 지역에서는 EPIYA-A-B-D 형태가 주류이다(10).

숙주세포의 기능을 방해하는 *CagA*의 *virulence factor*는 SHP-2와 결합하는 정도에 의하여 결정되고, *CagA phosphorylation* 부위 다양성은 아마도 다른 *H. pylori* 균주와 상호작용 등에 의한 임상적인 예후의 중요한 변수로 결정되는 것으로 생각된다. 그러므로 질환의 진행 예측과 제균 치료에 있어서 기초방침을 위하여 East Asian-*cagA*과 Western-*cagA* 사이에 구분하는 것이 중요하다고 생각한다.

최근 *CagA*의 East Asian과 Western type 여부를 확인하는 방법으로 주로 EPIYA-C와 EPIYA-D 영역 중에서 92 bp 크기 해당하는 핵산 염기서열 증폭을 시도하였다. 그러나 위에서 사용한 primer들은 중합효소연쇄반응으로 East Asian-*cagA*인 경우는 증폭산물의 크기와 양이 작아 gel electrophoresis에서 구분하기 어려웠고 Western-*cagA*은 증폭산물의 경우는 확인이 되지 않는 문제점이 있으며 또한 국내에서는 두 아형에 대하여 보고되어진 자료와 위장질환과의 유의성 관계를 분석한 자료가 미약하다.

본 연구에서는 이러한 문제점을 개선하여 새로운 *primers*을 고안하고 실용화된 중합효소 연쇄반응으로 *cagA*의 *Western type*과 *East Asian type*을 분리하였으며 또한 국내에서의 두 아형에 대한 분포도를 알아보려고 하였다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. *Helicobacter* 표준균주 및 대조균주

본 실험에 사용한 표준균주는 *H. pylori* American Type Culture Collection (ATCC)43504와 경상대학교 의과대학 부속병원에 내원한 환자에서 분리 동정한 HP51균주를 사용하였다.

### 2. 환자 및 임상 검체 수집

2005년 8월에서 11월까지 경기도 용인시에 소재하고 있는 연세대학교 의과대학 부속 용인세브란스병원에 내원하여 진단 목적으로 내시경을 시행 받은 환자의 위 전정부에서 생검조직을 채취하여 Rapid urease test(CLO™ Kimberly-Clark, Roswell, U.S.A)를 시행하고, 원인 세균배양검사, *Helicobacter*속 특이 PCR, *H. pylori* 특이 PCR에 의해서 확인한 73균주를 사용하였다. 임상환자의 질환은 내시경시술 소견과 조직병리결과 바탕으로 위염 39예, 위궤양 16예, 십이지장궤양 18예이며 성별 및 연령에 따른 질환의 분포는 Table 3과 같다.

### 3. Urease test

#### 3-1 Rapid urease test

위 전정부에서 채취한 조직 한 개의 절편을 즉시 상품화된 gel 검사키트 (CLO™ Kimberly-Clark, Roswell, U.S.A)에 접종하여 37°C에 배양하면서 1차 판독은 20분 후에 자홍색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였고 2차 판독을 24시간이 지난 후 다시 확인하였다.

#### 3-2 Urease broth test

배양된 *colony*를 생화학적 동정검사를 확인하기 위해서 *Bacto Urea broth Base Dehydrated*(증류수  $l$  당 1 g *Bacto pepton*, 1 g *Bacto dextrose*, 5 g *sodium chloride*, 2 g *potassium phosphate monobase*, 20 g *urea Difco*, 0.012 g *Bacto phenol red*)로 조제방법에 따라 만들어 배양된 *colony*를 접종하여 자홍색으로 변하는 집락을 양성으로 판정하였다.

#### 4. *Helicobacter pylori* 배양

위내시경에서 채취한 위생검 조직은 즉시 *homogenizer*를 사용하여 완전히 분쇄하고 분쇄액을 *Müller-Hinton agar(BBL)*, 10% *bovine serum*, *supplement*(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *vancomycin*, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *nalidixic acid*, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *amphotericin B*, 8 IU/ $\text{ml}$  *polymyxin B*)가 혼합된 배지에 접종한 후 5~10%  $\text{CO}_2$ , 100% 습도유지하고 37°C에서 3~5일간 배양하여 단일 집락(대략 1 mm크기의 희미한 우유빛, 작은 모래알 성상)을 택하여 *urease broth test*, *oxidase test* 양성 확인 후 동일조건으로 증균하였다.

분리된 균주는 성장상태의 보존을 위해 10% *bovine serum* 과 20% *glycerol*이 첨가된 *Müller-Hinton broth*에 *suspension*하여 -196°C의 액체질소에 보관하였다. 또한 *plate*에 남아 있는 균을 모아 *genomic DNA*를 *extraction*하여 -80°C 이하에 보관하였다가 본 실험에 사용하였다.

-196°C의 액체질소에 보관중인 대조검체는 37°C에 급속 해동시켜 임상검체와 동일한 방법으로 배양하였다.

#### 5. 검체로부터 DNA 추출

위생검 조직으로부터 분리배양한 집락을 *AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit* (*Bioneer Co.*, *Daejeon*, *Korea*)를 이용하여 시행하였으며 균주  $10^4 \sim 10^8$ 을 *proteinase K*와 *binding buffer*로 혼합한 후 60°C에서 10분 동안 *incubation*시키고 *isopropanol*를 넣었다. 이후 *binding column tube*에 옮긴 후 완전히 침전시킨 후 2회 반복하여 세척하고 마지막으로 *Elution solution*으로 *genomic DNA*를 추출하였

다. 그 외 kit사용에 있어서 주의사항은 제조회사의 술식에 따랐다. 대조검체도 위와 같은 동일한 방법으로 진행하였다.

## 6. Oligonucleotide primers

*H. pylori cagA* 유전자 보유상태를 확인하기 위하여 Genus *Helicobacter* 특이 염기서열 중합효소 연쇄반응에는 Fox JG(6) 등이 사용한 primer, *H. pylori* 특이 중합효소 연쇄반응에는 Jong-Bae Kim(12) 등이 사용한 primer, *H. pylori cagA* 특이 중합효소 연쇄반응에는 Kidd Me(13) 등이 사용한 primer를 사용하고 핵산 염기서열과 PCR에 필요한 조건은 Table 1에 나타내었다. Fig 1, Fig 2와 같이 EPIYA-motif가 포함된 염기서열을 A, B, C, D 영역으로 구분할 때 일정한 규칙을 가지고 있다. 대부분 첫 번째(A)와 두 번째(B) motif는 모두 가지고 있으며 *cagA*-Western인 경우 A, B에 이어서 C 영역이 1~3회 반복하게 되고 East Asian-*cagA*인 경우는 A, B에 이어서 D group이 오게 된다(9). Western *CagA*-specific, SHP-2 binding sequence (WSS) 한 것과 East Asian *CagA*-specific, SHP-2 binding sequence(ESS)에 특이한 primer를 위하여 각각 C 영역, D영역에 특이적인 forward primer 위치를 찾고 reverse primer는 두 type의 공통영역 위치에서 PCR에서 구분할 수 있는 크기를 찾았다.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해서 Western type primer는 accession number AB015413를 기초로 40개 염기서열과 East Asian type primer는 accession number AB190945를 기초로 하여 27개 염기서열을 Multiple sequence alignment를 시행하고 이를 바탕으로 Oligo program Version 6(Wojciech & Piotr RyChilk, West Lascade, U.S.A)를 이용하여 PCR primer를 고안하고 주문 제작 (Bioneer Co., Daejeon, Korea)하여 사용하였다.

## 7. 중합효소 연쇄반응

PCR 반응의 mixture은 template DNA 2  $\mu$ l에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를



각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs를 최종농도가 200  $\mu\text{M}$ 이 되도록 넣었다. 그 후 10x buffer(10 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 2  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase 0.5 U을 첨가하고 각각 primer set 40 pmol/ $\mu\text{l}$ 를 최종 반응 농도가 4 pmol이 되도록 넣은 후 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 반응조건은 table 2.에서와 같이 thermal cycler(GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, U.S.A.)를 사용하여 DNA를 증폭하였다.

반응이 종료된 후 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide를 첨가한 agarose gel에 전기영동하여 ultraviolet trans-illuminator(Vilber louramat, Mame La Valle, France)로 각각의 증폭 산물을 확인하였다.

2605 AAGAAAGAATTGAATGAGAAATTTAAAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGA **A**  
 CTCGAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAATAAAAAAGAAA

2701 ACAGGACAAGTAGCTAGCCCTGAAGAA**CCCATTTACGCT**CAAGTTGCTAAAAA **B**  
 GGTGAATGCAAAAATGACCGACTCAATCAAGCAGCAAGTGGTTGGGTGGTG  
 TAGGGCAAGCGGGC

2821 TTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCGAT **C**  
 CAGTTAGCCCTGA**ACCCATTATGCT**ACGATTGATGATCTCGGCGGACCT

2923 TTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCGAT **C**  
CAGTTAGCCCTGA**ACCCATTATGCT**ACGATTGATGATCTCGGCGGACCT

3025 TTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCGAT **C (WSS)**  
CAGTTAGCCCTGA**ACCCATTATGCT**ACGATTGATGATCTCGGCGGACCT

3127 TTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCA  
 AGGAATCAAGAATTGGCTCAGAAAATTGACAATCTCAGTCAAGCGGTATCAGA  
 AGCTAAAGCAGGTTTTTTAGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAG  
 ATTCTACAAAATACAATTCTGTGAATCTATGGGTTGAAAAGTGCAAAAAAAGTGC  
 CTGCTAGTTTGTGAGCGAAACTAGACAATTACGCTACTAA**CAGCCACACACGCA**  
 TTAATAGCAATATCCAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGACCGGTATGCTA  
 ACGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCA  
 TAATGTGGGAAGCGTTCCTTTGTCAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCAGAA  
 GAATATGAAAAGATTATTCTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAAGTTGAACAATGC  
 TGTA  
 AAAAGACGTTAAGTCTAGCTTTACGCAATTTTAGCCAATGCATTTTCTACA  
 GGATATTACTCTTGCGGAGGGAAAATGCGGAGCATGGAATCAAAAATGTAA  
 TACAAAAGGTGGTTTCCAAAATCTTAA

**Figure 1.** Nucleotide sequence of *Western-cagA* type (GenBank accession number: AB015413) in the 3' region of the *cagA* gene. Each position of forward and reverse primers is underlined and 5 EPIYA motifs position is indicated as bold type letter.

2569 AGGAAAGAATTGAACGAGAAAATTATTTGGAAATCCAATAACAATAATAATGGA  
CTCAAAAACAGCACAGAGCCTATTTACGCTAAAGTTAATAAAAAGAAA **A**

2671 GCAGGACAAGCAGCTAGCCCTGAAAGAGTCTATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGT  
GAGTGCAAAAATTGACCAACTCAACGAAGCTACATCAGCAATAAATAGAAAAATTG **B**

2782 ACCGGATTAACAAAATTGCATCAGCAGGTAAGGAGTG ←  
GGCAATTTCAAGTGGAGCAGGGCGATCAGCTAGCCCTGAACCCATTTACGCTACA **D (ESS)**  
ATTGATTTTGATGAGACAAATCAAGCAGGC

2905 TTCCCTTTAGGAGAAGTGCTGCAGTTAATGATCTCAGTAAAGTAGGGCTTCA  
AGGGAACAAGAATTGACTCGTAGAATTGGCGATCTCAATCAGGCGGTATCAGA  
AGCTAAAACAGGTCATTTTGACAACCTAGAACAAAAGATAGATGAACTCAAAG  
ATTCTACGAAAAAGAAATGCTTTGAAAGTTATGGGCTGAAAGCACGAAACAAGTG  
CCTACTGGTTGCAAGGCGAAATTGGACAATTACGCTACTAACAGCCACACACGC  
ATTAATAGCAATGTCCAACATGGAAACAATCAATGAAAAAGCGACCGGCATGCT  
AACGCAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCAC  
ATAATGTGGGAAGCGCTCATTGTCAGAGTATGATAAAATTGGATTCAACCAAA  
AGAATATGAAAGATTATTCTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAAGT ←  
TGAACAATGCCGTAAAAGACATTAAGTCTAGCTTTGTGCAATTTTAAACCAATA  
CATTTTCTACAGGAGCTTACAACCTTGATGAAGCAAAATGTGGAACATGGAGTCA  
AAAACACTACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA

**577 bp**

*Figure 2. Nucleotide sequence of East Asian-cagA type (GenBank accession number: AB190945) in the 3' region of the cagA gene. Each position of forward and reverse primers is underlined and 3 EPIYA motifs position is indicated as bold type letter.*

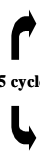
**Table 1.** The sequences of PCR primers used for detection of genus *Helicobacter*-specific, *H. pylori*-specific, *cagA*, *Western-cagA*, and *East Asian-cagA*

	Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Expected Size of PCR Product	References
<i>Helicobacter</i> spp.	C97 C05	GCT ATG ACG GGT ATC C ACT TCA CCC CAG TCG CTG	1200 bp	6
<i>H. pylori</i>	HPU185 HPU826	CCT ACG GGG GAA AGA TTT AT AGC TGC ATT ACT GGA GAG ACT	642 bp	12
<i>cagA</i>	F1 B1	GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG GG CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A	349 bp	13
<i>Western-cagA</i>	WF2 WR1	ATG ATC TCG GCG GAC GAC CTT T TGC GTG TGT GGC TGT TAG TAG	285 bp	This study*
<i>East Asian-cagA</i>	EF1 ER1	GCA TCA GCA GGT AAA GGA GTG ACT TGG TGG AAA ACT TGA ACG	577 bp	This study**

\* Nucleotide position in the *cagA* gene of *H. pylori*(GenBank accession no. AB015413)

\*\*Nucleotide position in the *cagA* gene of *H. pylori*(GenBank accession no. AB190945)

Table 2. The PCR conditions used for detection of Genus *Helicobacter*-specific, *H. pylori*-specific, *cagA*, Western-*cagA*, and East Asian-*cagA*

	<i>Helicobacter</i> spp	<i>H. pylori</i>	<i>cagA</i>	Western- <i>cagA</i>	East Asian- <i>cagA</i>	Multiplex* PCR
Initial denaturation 95 °C	2' 30	2' 30	5' 00	5' 00	5' 00	5' 00
35 cycle 	Denaturation 95 °C	1' 00	1' 00	30	30	30
	Annealing Tm (°C)	55 °C	52 °C	57 °C	55 °C	57 °C
	Extension 72 °C	1' 00	1' 00	30	30	30
Additional extension 72 °C	1' 30	1' 30	30	30	30	30
TBE Agarose gel (%)	15' 00	15' 00	7' 00	10' 00	10' 00	10' 00
	1.5 %	2.0 %	2.0 %	2.0 %	2.0 %	2.0 %

\* Multiplex PCR, Western-*cagA* and East Asian-*cagA* primer set as WF2-EF1-WR1

## 제 3 장 연구 성적 및 결과

### 1. 대상 환자의 질환

본 실험에 사용된 분리 균주에 대한 환자의 질환은 위염 39예(53%)로 가장 많았고, 다음은 십이지장궤양이 18예(25%), 위염이 16예(22%)였다. 위염은 남자(22예, 48%)보다 여자(17예, 63%)에서 높게 나타났으며 십이지장궤양은 여자(4예, 15%)보다 남자(14예, 30%)가 높게 나타났다(Table 3).

Table 3. Clinical profile of the studied groups

	Chronic gastritis	Gastric ulcer	Duodenal ulcer
Number of isolates	39 (53%)	16 (22%)	18 (25%)
Mean age of patients	50	54	47
Female	17 (63%)	6 (22%)	4 (15%)
Male	22 (48%)	10 (22%)	14 (30%)

## 2. *Helicobacter* genus-specific CLO test 및 배양

위 전정부로부터 생검조직 151 검체를 채취하여 CLO test에서 양성 54%(82/151), 음성 46%(69/151)로 나타났으며 배양한 모든 검체 중 48.3%(73/151)에서 *Helicobacter pylori*를 분리할 수 있었다.

### 3. *Helicobacter* genus 특이염기서열, *H. pylori* 특이염기서열, *cagA*의 검출

분리배양으로부터 얻은 임상검체 73주 *Helicobacter* genus 특이 염기서열, *H. pylori* 특이염기서열, *cagA* 유전자를 확인하기 위하여 이미 알려져 있는 각각의 primers(Table 1.)를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. *Helicobacter* spp.는 1200 bp, *H. pylori*는 642 bp, *cagA*는 349 bp 각각의 예상하였던 특이 염기서열을 양성대조균주 ATCC 43504, HP51, 임상검체에서 증폭산물을 확인하였으며 *Helicobacter* spp., *H. pylori*는 100%(73/73), *cagA*는 94%(69/73)로 검출되었다 (Table 4.).



#### 4. *Western-cagA*의 검출

*Western type*를 결정하기 위하여 고안한 *primer*(Table 1.)를 사용하여 PCR을 시행하였으며 한 개의 WSS영역은 102 bp 크기이며 보통 1~3번 반복하므로 ATCC 43504에서 예상하였던 285 bp, 387 bp, 489 bp의 산물의 C-C-C type을 검출하여 하였다(Figure. 3). *H. pylori*로 확인 된 73주를 모두 시행하여 Figure. 3에서 같이 285 bp(YS6, 7, 53), 387 bp(YS6) 각각의 *Western-cagA type*으로 확인하였으며 또한 WSS영역의 반복 횟수를 통하여 C-C type(YS6), C type(YS7, 53) 각각 확인하였다. 본 실험에 사용된 임상검체에서 *Western-cagA*의 보균율은 4.1%(3/73)로 나타났다(Table 4). Figure. 3에서 증폭되지 않은 Lane 2(HP51, D-type), Lane 6(YS51, A-B type), Lane 7~12(YS14, 32, 79, 81, 73, 74)은 *East Asian-cagA type* 검출 과정에서(Figure. 4) 확인이 되었다.

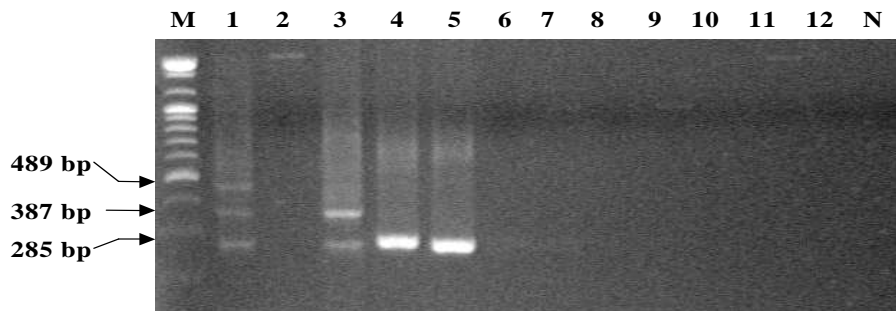


Figure. 3. PCR amplification of *Western-cagA* specific primer set, WF2-WR1. Lane M, DNA molecular size standard[(100-bp ladder marker) (Bioneer Co., Taejun, Korea)]; Lane 1, ATCC43504(C-C-C type); Lane 2, HP51(D type); Lane 3, YS6(C-C type); Lane 4, YS7(C type); Lane 5, YS53(C type); Lane 6~12, YS51, 14, 32, 79, 81, 73, 74; Lane N, Negative control(autoclaved water).

## 5. East Asian-*cagA*의 검출

East Asian type를 결정하기 위하여 고안된 primer(Table 1.)를 사용하여 PCR을 시행하였으며 ESS영역을 포함한 예상하였던 577 bp(D type)의 산물을 양성대조검체 HP51에서 검출하였다(Figure. 4.). 본 실험에 사용된 검체에서 East Asian-*cagA*의 보균율은 94.5%(69/73)로 나타났다(Table 4.).

Figure. 4에서 증폭되지 않는 Lane 2(ATCC43504, C-C-C type), Lane 3(YS6, C-C type), Lane 4(YS7, C type), Lane 5(YS53, C type), Lane 6(YS51, A-B type)은 Western-*cagA* type 검출 과정에서(Figure. 3) 확인이 되었다.

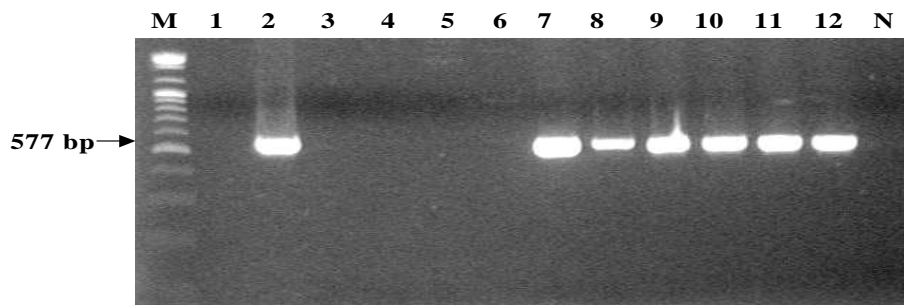


Fig. 4. PCR amplification of East Asian-*cagA* specific primer set, EF1-ER1. Lane M, DNA molecular size standard[(100-bp ladder marker) (Bioneer Co., Taejun, Korea)]; Lane 1, ATCC43504; Lane 2, HP51(D type); Lane 3~6, YS6, 7, 53, 51: Lane 7, YS14(D type); Lane 8, YS32(C type); Lane 9, YS79(D type); Lane 10, YS81(D type); Lane 11, YS73(D type); Lane 12, YS74(D type); Lane N, Negative control(autoclaved water).

## 6. Western-*cagA* 과 East Asian-*cagA*의 multiplex PCR

Western과 East Asian type를 한 번의 PCR를 시행하여 구별하고자 각각의 forward primers WF2, EF1과 공통의 reverse primer WR1를 사용하여(Table 1.) PCR를 시행하였다. Figure. 5.에서 Western type으로 예상한 285 bp(ATCC43504, YS6, 7), 387 bp(ATCC43504, YS6), 489 bp(ATCC43504)를 각각 확인하였으며 반복 횟수를 통하여 C-C-C type(ATCC43504), C-C type(YS6), C type(YS7)으로 1~3회 반복되는 경우의 예를 Figure. 3과 같이 동일한 결과를 확인하였다. East Asian-*cagA* type으로 ESS영역이 포함된 373 bp(HP51, YS79, 81)의 예상한 증폭산물을 확인하였으며 Western-*cagA* type과 크기가 다른 산물을 얻어 구분할 수 있었다.

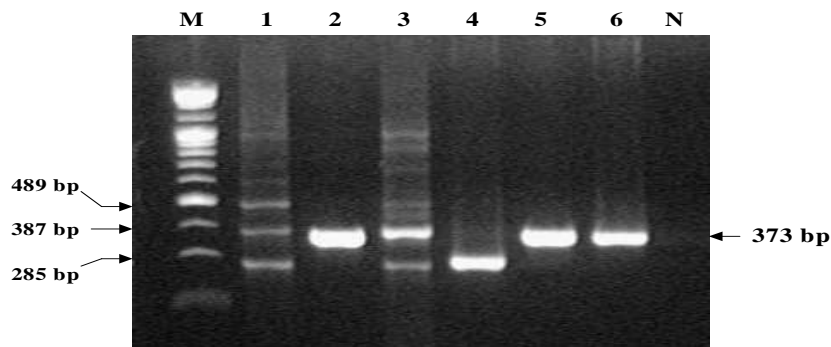


Figure. 5. Multiplex PCR amplification of Western-*cagA* and East Asia-*cagA* specific primer set, WF2-EF1-WR1. Lane M, DNA molecular size standard[(100-bp ladder marker)(Bioneer Co., Taejun, Korea)]; Lane 1, ATCC43504(C-C-C type); Lane 2, HP51(D type); Lane 3, YS6(C-C type); Lane 4, YS7(C type); Lane 5, YS79(D type); Lane 6, YS81(D type); Lane N, Negative control(autoclaved water).

Table 4. Discrimination between East Asian-*cagA* and Western-*cagA* in isolates from gastric biopsies

YS No.	Age	Sex	Diagnosis *	CLO test	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. pylori</i>	<i>cagA</i>	East Asian /Western **
1	53	F	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
2	45	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
3	66	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
4	23	F	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
5	58	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
6	54	M	CG	+	+	+	+	Western (C-C)
7	46	F	CG	+	+	+	+	Western (C)
8	44	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
9	45	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
10	44	F	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
11	41	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
12	49	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
13	61	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
14	55	M	CG	+	+	+	(-)	East Asian (D)
15	60	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
16	60	F	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
17	47	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
18	35	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
19	54	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
21	49	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
24	49	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
26	45	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
27	49	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
28	64	F	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
32	42	M	CG	+	+	+	(-)	East Asian (D)
33	68	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
35	44	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
36	46	F	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
37	62	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
38	48	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
39	79	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
40	50	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
41	48	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
42	46	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
43	54	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
44	56	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
45	40	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
46	45	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
47	68	F	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
48	40	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
49	46	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
50	25	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)

\* CG, chronic gastritis; GU, gastric ulcer; DU, duodenal ulcer.

\*\* D, East Asian-*cagA* type; C, Western-*cagA* type; -, A-B type

continued

YS No.	Age	Sex	Diagnosis *	CLO test	<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. pylori</i>	<i>cagA</i>	East Asian /Western **
51	47	M	DU	+	+	+	+	AB type (-)
52	69	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
53	49	M	DU	+	+	+	+	Western (C)
54	48	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
55	59	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
56	59	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
57	37	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
58	70	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
59	60	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
60	39	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
61	48	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
62	40	M	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
63	50	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
64	47	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
65	45	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
66	59	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
67	41	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
68	51	F	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
69	40	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
70	48	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
71	28	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
72	48	M	DU	+	+	+	+	East Asian (D)
73	35	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
74	44	F	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
75	70	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
76	52	F	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
77	59	F	GU	+	+	+	+	East Asian (D)
78	55	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
79	52	M	CG	+	+	+	(-)	East Asian (D)
80	46	M	CG	+	+	+	+	East Asian (D)
81	70	M	GU	+	+	+	(-)	East Asian (D)

\* CG, chronic gastritis; GU, gastric ulcer; DU, duodenal ulcer.

\*\* D, East Asian-*cagA* type; C, Western-*cagA* type; -, A-B type

## 제 4 장 고 찰

*H. pylori*에 감염되면 대부분이 만성위염을 유발하며 이들 환자중 15~20%는 위궤양이나 십이지장궤양으로 악화되고 1% 미만에서 위선암이 발생한다(17). 이와 같이 임상표현형은 경미한 무증상 위염에서 위암에 이르기까지 매우 다양하게 나타나는 것은 다양한 인자들과 상호작용에 의해 질환의 표현형이 결정됨을 암시한다. 세계적으로 *H. pylori*에 감염된 집단에서 나타나는 병원성 질환의 임상 표현형이 지리적인 분포도에 따라 유의한 차이가 있으며 서구(Western) 지역에서 보다 동아시아(East Asian) 지역에서 더욱 높은 위암발병률이 보고되고 있다(3).

동아시아에서 높은 비율을 차지하고 있는 *cagA*의 양성율이 질병과의 관계에서 유의성이 있다고 보고되고 있지만 병리기전을 이해하기에는 광범위한 지지를 받지 못하고 있어 본 실험에서는 *cagA* 양성균주에서 서로 다른 아형을 구별하고 국내에서의 분포도를 확인하여 다양한 임상표현형을 이해하는데 기초가 되고자 하였다. 서양에서 분리한 균주와 동아시아에서 분리한 균주 사이에 *cagA*의 염기서열이 구별이 되며(1) 이러한 염기서열이 위 질환에서 염증의 정도, 위염의 활성도, 위축과 위암의 발생이 East Asian-*cagA* 양성 균주를 가지고 있는 경우에 *cagA* 음성 또는 Western-*cagA* 양성 균주를 가지고 있는 환자에서 보다 더 높은 발병률을 나타내고 있는 것으로 추정되고 있다(2).

*H. pylori cagA* 3' 영역에서 특정한 핵산의 염기서열(Figure 1. 2)이 존재하며 EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) motifs 를 포함한 다양한 크기와 횟수가 일정하게 반복되어 있다. 이러한 아형들은 A영역, B영역은 공통으로 가지고 있고 서양지역에서는 C영역을 동아시아 지역에서는 D영역을 가지고 있다. *cagA*의 EPIYA motifs 포함된 핵산염기서열이 각각의 A-type, B-type, C-type, D-type으로 구분할 수 있다. Western-*cagA* type은 주로 A-B-C, A-B-C-C, A-B-C-C-C, East Asian-*cagA* type은 A-D, A-B-D, A-A-B-D, B-A-B-D, A-B-B-D, A-B-A-B-D, A-B-D-B-D, A-B-D-A-B-D, Non-Western East Asian-*cagA*

*type*은 A-B-B으로 조합되어 나타난다(2). *cagA*에 모두 존재하는 A-*type*과 B-*type*은 EPIYA motifs에서 tyrosine이 인산화가 되어 숙주세포의 SHP-2와 결합능력이 거의 없으며 C-*type* 과 D-*type*은 높은 결합능력을 보여주고 있고 C-*type*이 1개 보다 2~3개 반복되는 균주에서 높은 결합능력을 보이고 D-*type*을 가진 균주에서는 이 보다 더욱 높은 결합능력이 세포의 hummingbird phenotype으로 나타난다(9). 이러한 자료를 바탕으로 보면 한 지역에서 더 높은 병독성이 있는 CagA proteins을 가진 *H. pylori*가 East Asian 지역에서 위암의 발생에서 영향이 있음을 뒷받침 하고 있다.

2005년 8월에서 11월까지 연세대학교 의과대학 부속 용인세브란스병원 소화기 내과에 내원하여 내시경을 시행 받은 환자에서 *H. pylori* 73균주를 분리 배양하여 Genus *Helicobacter* 특이 염기서열, *H. pylori*, *cagA*를 확인하고 *cagA*의 아형 분포도를 확인하기 위하여 Western-*cagA* primer set인 WF2, WR1과 East Asian-*cagA* primer set EF1, ER1으로 PCR에서 예상한 산물을 확인하였다. Western-*cagA* type은 4.1%(3/73)의 낮은 분포율을 보였다. 이 중에서 1개의 균주에서는 C-C(YS6) type으로 검출되고 2개의 균주에서는 C type으로 검출이 (YS7, 53) 되었으며 양성대조균주 ATCC43504에서는 C-C-C type이 Western-*cagA* primer set으로 반복 되는 횟수 까지 알 수 있었다. 기본적으로 하나의 C type 산물이 285 bp이며 1회 반복되는 크기의 102 bp 만씩 증가하게 된다(Figure 3). East Asian-*cagA* type 분포율은 94.5%(69/73)로 대부분을 차지하였으며 임상질환과의 관계에서 gastric ulcer에서 100%(16/16), chronic gastritis에서 94.9%(37/39), duodenal ulcer에서 88.9%(16/18)로 모든 질환에서 높은 분포율을 가지고 있었다. Azuma *et al.*: (2004)에 의하면 East Asian-*cagA* 음성인 균주와 Western-*cagA* 양성인 균주보다 East Asian CagA 양성인 균주에서 염증의 정도, 위염의 활동성, 위염의 위축성이 더욱 높게 나타났다(2).

*H. pylori cagA*의 PCR검사에서는 94.5%(69/73)로 검출되었으나 *cagA*음성인 4개의 균주(YS14, 32, 79, 81)는 East Asian-*cagA* type의 정확한 증폭산물을 검출하였다. 본 실험실에서 고안된 primer는 NIBC BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)에서 확인이 되었으며 이 것은 *cagA* gene의 다양한 변화로 볼

때 아마도 본 실험에 사용한 *cagA primer*(13)는 해당 산물을 증폭하지 못한 것으로 추정한다. YS51 균주는 양쪽 모두에서 검출되지 않았다. Azuma *et al.*(2), Yamazaki *et al.*(24)에서 보고된 바와 같이 A-B, A-B-B *type*로 추정할 수 있다. 위에서 사용된 *primers*를 기본으로 두 아형을 쉽게 진단 할 수 있는 *multiple PCR*을 시행하였다. 두 아형의 특이적인 *forward primer* WF2, EF1을 사용하고 *reverse primers* 는 두 아형이 공통되는 부분이기 때문에 두 개의 *primers* WR1, ER1 중에 변별력이 우수한 WR1을 사용하였다. Figure 5.와 같이 *Western-cagA type*은 Figure 3.과 동일한 산물을 얻었으며 *East Asian-cagA type*에서는 577 bp 보다 작은 크기의 373 bp 산물을 통하여 구별할 수 있었다.

최근 *cagA*의 두 아형을 구분할 수 있는 검사법은 C 영역과 D 영역 중에서 92 bp 크기 해당하는 핵산 염기서열 증폭을 시도하였다. 그러나 전통적인 중합효소 연쇄방법으로 *East Asian-cagA*인 경우는 증폭산물의 크기와 양이 작아 *gel electrophoresis*에서 구분하기 어려웠고 *Western-cagA*은 증폭산물이 확인 되지 않는 문제점이 있었다.

본 실험의 결과를 종합해 보면 위장관 검체에서 분리한 *H. pylori-cagA*의 아형 분류를 위해 새로 고안한 *Western-cagA*와 *East Asian-cagA primers set*를 사용하여 분류할 수 있었으며 또한 *multiplex* 이용과 WSS의 반복되는 수를 확인 할 수 있었다. 위생검 조직에서 분리한 *H. pylori* 73균주에서 *Western-cagA type*은 4.1%의 낮은 분포율을 보였으며 *East Asian-cagA type*에서는 94.5%로 매우 높은 분포율을 확인 할 수 있었다. 그러나 임상질환군 관계에서는 유의한 차이가 없었으며 앞으로 다양한 지역에서 *CagA* 아형 분류를 하여 여러 임상질환 연구에 활용할 필요가 있다고 사료된다.



## 제 5 장 결 론

2005년 8월에서 11월까지 경기도 용인시에 소재하고 있는 연세대학교 의과대학 부속 용인세브란스병원에서 내시경 시술을 시행한 환자로 부터 *H. pylori* 73균주를 분리 배양하였다. 그리고 중합효소 연쇄반응을 이용하여 *CagA* 아형 분류를 시도하였다.

*Western-cagA type* 과 *East Asian-cagA type*의 핵산 염기서열을 증폭할 수 있는 *primers set*를 고안하여 72균주에서 아형을 분류하였다. *East Asian-cagA type*이 94.5%의 높은 분포율을 보였으며 반면에 *Western-cagA type*은 4.1%의 낮은 분포율을 보였다. *cagA* 양성이었으나 분류되지 않은 1균주에 대해서는 A-B, A-B-B *type*으로 분류할 수 있었으며 또한 4균주에서 *cagA* 음성이었으나 아형 분류에서는 *East Asian-cagA type*(D *type*)로 판정하였다. *Western-cagA type*로 판정한 3균주 가운데 2균주에서 C *type*, 1균주에서 C-C *type*, ATCC43504에서 C-C-C *type*의 반복되는 WSS 횟수를 확인 할 수 있었다.

*Multiplex PCR*을 이용하여 *cagA*을 쉽게 분류 할 수 있었으며 두 아형의 *forward primers* 와 *reverse primer*는 공통적인 하나만을 사용하여 서로 다른 길이의 증폭산물을 확인하였다. *East Asian-cagA type* 양성은 각각 위염 94.9%, 위궤양 100%, 십이지장 궤양 88.9%로 높은 분포도를 차지하고 있지만 임상질환별 관계에서는 유의한 차이는 없었으며 위 결과는 이전에 보고된 자료와 같이 동아시아지역에서의 높은 분포도로 존재하고 있다는 것을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

1. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan Z, Suerbaum S, Thomson SA, van der Endo A and van Doorn LJ (1999) : *Recombination and clonal groupings within Helicobacter pylori from different geographical regions. Mol. Microbiol*, 32: 459-470.
2. Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Murama-tsu A, Suto, H, Ito Y, Dojo, M, Yamazaki Y, Kuriyama M, Keida Y, Higashi H and Hatakeyama M (2004) : *Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of Helicobacter pylori CagA protein and gastric atropy and cancer. J. Infect. Dis*, 189: 820-827.
3. Covacci A, Telford JL, DelGiudice G, Parsonnet J and Rappuori R (1999) : *Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science*, 284: 1328-1333.
4. Cover TL, Krishna US, israel DA, Peek RM Jr (2003) : *Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. Cancer Res*, 63: 951-957.
5. Evans DJ Jr, Evens DG (2001) : *Helicobacter pylori CagA: analysis of sequence diversity in relation to phoshorylation motifs and implications for the role of CagA as a virulence factor. Helicobacter*, 6: 187-198
6. Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I (1998) : *Hepatic Helicobacter species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis,*

*Gastroenterology*, 114: 755-763

7. Guruge JL, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, Berg DE, Gordon JI (1998) : *Epithelial attachment alters the outcome of Helicobacter pylori infection. Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 925-3930

8. Hatakeyama M (2004) : *Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. Nat Rev Cancer*, 4: 688-694

9. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T and Hatakeyama M (2002) : *Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 14428-14433.

10. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma, T, Asaka M and Hatakeyama M. (2002) : *SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. Science*, 295: 683-686.

11. International Agency for Reserch on Cancer Working Group (1994) : *Schistosomes liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the evalution of carcinogenic risks to humans. IARC Monogr, Eval, Carcinog, Risks Hum*, 61: 1-124.

12. Jong-Bae Kim, Geun-Hee Kim, Hong Kim, Hyun-Seok Jin, Young-Sam Kim, Soo-Hyun Ha and Dong-Ki Lee (2000) : *A Novel PCR Primers HPU185 and HPL826 Based on 16S rRNA Gene for Detection of Helicobacter pylori. The Journal of the Korean Society for Microbiology*, Vol, 35: No. 4

13. Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA (1999): *Heterogeneity in the Helicobacter pylori genes vacA and cagA: associated with gastroduodenal disease in South Africa?*. *Gut*, 45: 499-503.
14. Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW, Trust TJ (1991) : *Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in Helicobacter pylori flagella*. *J Bacteriol*, 173: 937-946.
15. Marshall BJ and Warren JR (1983) : *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chrome gastritis*. *Lancet*, 1: 1273-1283
16. Marshall BJ, Warren JB (1984) : *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. *Lancet*, 1: 1311-1314
17. Peek RM Jr, Blaser MJ (2002) : *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. *Nat Rev Cancer*, 2: 28-37
18. Stein M, Rappuoli R and Covacci A (2000) : *Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1263-1268.
19. Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T, Ra C (2002) : *VacA, a vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines*. *J Immunol*, 168: 2603-2607.
20. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J,

Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC (1997) : The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388: 539-547.

21. Uemura N, Okamoto A, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, and Schlemper RJ (2001) : *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, 345(11): 784-9

22. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G (2000) : A  $H^+$ -gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287: 482-485.

23. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K, Graham DY and Kim JK (1999) : Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology*, 117: 342-349.

24. Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, Yamazaki Y, Yamakawa A, Tokudome S, Hideaki H, Hatakeyama M, Azuma T (2005) : Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44: 261-268.

25. Yamazaki S, Yamakawa A, Ito, Y., Ohtani, M., Higashi, H., Hatakeyama, M. and Azuma, T. (2003) : The *CagA* protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J. Infect. Dis*, 187: 334-337.
26. Yu D, Qu C, Henegariu O, Lu X and Feng G (1998) : Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J. Biol. Chem*, 273: 21125-21131.
27. Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Ito Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M, Si J and Azuma T (2004) : The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 40: 81-87.
28. 손희정, 김재준, 이화영, 김영호, 이풍렬, 고광철, 백승운, 이종철, 최규완 (1999) : 상부 위장관 질환에서 *Helicobacter pylori cagA* Gene의 검출 *대한소화기학회지*, 33: 594-600
29. 이광호, 조명제, 김종배, 최상경, 김영채 (1988) : 위내시경 생검체에서 분리한 *Campylobacter pylori*의 미생물학적 특성. *대한미생물학회지*, 제23권: 제1호.
30. 이동기, 백순구, 권상옥, 김현수, 김종배, 김근희, 김홍, 하수현 (2001): 한국인 담식 환자로부터 Polymerase Chain Reaction을 이용한 *Helicobacter*속 세균 검출. *대한소화기학회지*, 38: 193-202

## ***Abstract***

### ***Classification of CagA Type in Helicobacter pylori Strains Isolated from Gastrointestinal Tract using Polymerase Chain Reaction***

An, Byoung Rak

*Dept. of Biomedical Life Science*

*The Graduate School of Health and Environment*

*Yonsei University*

*H. pylori CagA protein uses type IV secretion system to be injected into gastric epithelial cells to undergo tyrosine phosphorylation, and is combined with SHP-2(Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase) to disturb signal transmission system, affecting cell's proliferation, differentiation, apoptosis, and formation of hummingbird phenotype.*

*This reaction manifests higher bonding capacity in East Asian isolates, than in Western geographic isolates, which leads to the presumption that it plays an important role in diverse sets of gastrointestinal diseases. In this experiment a total of 73 H. pylori strains isolated from Korean gastrointestinal tract were examined the distribution of Western cagA type and East Asian cagA type using PCR(Polymerase Chain Reaction).*

*Experiment was conducted at the Yong-In Severance Hospital attached to Yonsei University College of Medicine, from August to November 2005. With multiplex PCR, designed in this experiment, it was possible to identify the*

frequency of repetition for C domain that includes WSS(Western specific sequence). Distribution ratio of Western *cagA* type is low with 4.1%, and that of East Asia *cagA* type comprises the most with 94.5%. The relationship of *CagA* type of *H. pylori* and the gastrointestinal disease progression should be further more studied.

---

Key words: *H. pylori*, *CagA*, *SHP-2*, Western, East Asian, subtype, multiplex PCR