대한소화기학회지 1999;34:21 - 34

*Helicobacter pylori*에 의한 위암세포주 사멸

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병연구소, 임상병리학교실*

김원호 · 여말희 · 이꽃실 · 이용찬 · 박인서 · 이경원*

Helicobacter pylori-induced Apoptosis in Gastric Cancer Cell Lines

Won Ho Kim, M.D., **Marie Yeo,** M.S., **Kkot Sil Lee,** M.D., **Yong Chan Lee,** M.D., **In Suh Park,** M.D. and **Kyungwon Lee,** M.D.*

Departments of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology and Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background/Aims: *Helicobacter pylori (H. pylori)* is associated with active gastritis and peptic ulce disease. Mechanism for *H. pylori*-induced gastric epithelial damage is still incompletely understood However, the increase of apoptotic cells in *H. pylori*-infected mucosa suggested that apoptosis could be a major mechanism for cellular damage. As an effort to clarify the mechanism, we investigated whether *H. pylori* directly induce apoptosis in gastric cancer cells in vitro. **Methods:** Cultured *H pylori* (ATCC 43504) were suspended as 10⁹/mL. IL (interleukin)-8 was measured by enzyme linked immunosorbent assay. Cell survival was assessed by MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay. Apoptosis was detected and confirmed by demonstration of DNA frag mentation and morphologic changes. **Results:** *H. pylori* induced IL-8 production as well as decrease of cell survival in gastric cancer cell lines in a time- and concentration-dependen way. Addition o *H. pylori* to gastric cancer cells induced apoptosis. Such induction was not organ specific. Heat o formalin treatment of *H. pylori* almost completely inhibited IL-8 production but only partially blocked apoptosis. *H. pylori*- induced apoptosis was potentiated by interferon-γ pretreatment in HT-29 bu not in AGS and KATO III. **Conclusions:** These results suggest that *H. pylori* affects on gastric epithelial cell growth by direct induction of apoptosis. **(Kor J Gastroenterol 1999;34:21 - 34)**

Key Words: *Helicobacter pylori*, Apoptosis, Interleukin-8

접수: 1998년 12월 24일, 승인: 1999년 2월 26일
연락처: 김원호, 120-752, 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: (02) 361-5410, Fax: (02) 393-6884
E-mail: kimwonho@yumc.yonsei.ac.kr
※ 본 연구는 1997년 교육부 유전공학연구비(GE97-112)의 보조로 이루어졌음.

서 론

*Helicobacter pylori*는 위염뿐만 아니라 위 및 십이지장궤양의 일차적 발병 원인으로 알려져 있으며 위암의 발생에도 관여하리라 추정되어 많은 관심을

끌고 있다.[1-4] *H. pylori*에 의한 상피세포 손상의 기전은 *H. pylori*가 위산에 대한 위점막상피세포의 저항력을 감소시키거나[5,6] *H. pylori*가 세포주성 물질과 사이토카인 생산을 유도하고 이에 따라 활성화된 백혈구가 점막의 손상을 초래하기 때문이라고 생각하고 있다.[7,8] *H. pylori*에 감염된 위조직에서 몇몇 사이토카인과 inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA가 발현되고,[4,9-13] 위암세포주에 *H. pylori*를 감염시키면 각종 사이토카인뿐만 아니라 chemokine과 세포접합분자의 발현이 증가된다는 사실은 두 번째 가설을 뒷받침하는 소견이다.[14-17] 한편 *H. pylori*가 암모니아 및 urease 등의 세포독성을 갖는 물질을 분비하여 상피세포의 손상을 일으킨다는 보고가 있는데,[18-20] 최근에 이르러 *H. pylori*에 감염된 위조직에는 정상에 비하여 사멸 세포(apoptotic cell)가 많고 *H. pylori*를 박멸한 후에는 사멸 세포가 감소한다는 관찰에 근거하여 점막 손상의 기전으로 상피세포의 사멸이 거론되기 시작하였다.[2,4,21,22]

세포 사멸(apoptosis, programmed cell death)은 선택적인 세포 소실을 일으키는 생리적인 과정으로 세포 내의 genomic DNA가 endonuclease에 의하여 약 180 염기 크기의 oligomer로 잘라지는 것이 사멸의 특징적인 소견이다. 사멸 과정 중의 세포는 괴사 세포에 반하여 크기가 작고, chromatin과 세포질 내의 소기관이 농축되어 막에 둘러싸인 사멸체(apoptotic body)를 형성하며, 이어 주위 세포에 의하여 신속하게 제거된다. 이 과정에서 원형질막은 파열되지 않으므로 세포 내 물질이 세포 주위에 유출되지 않아 염증반응을 일으키지 않는다.[23,24] 세포 사멸은 ATP 형태의 에너지를 필요로 하는 능동적인 과정으로서 자외선, 열, 세포 성장 인자의 결핍, 수용체에 대한 배위자(ligand)의 결합, 반응기 산소대사물, DNA 손상 등 세포에 대한 여러 자극에 의하여 유발된다. 사멸에 관여하는 세포 내의 신호전달경로는 확실히 규명되지 않았으나 자극 및 세포의 종류에 따라 다양하리라고 추측되고 있다.[25-27] 세포 사멸의 역할에 대한 연구는 주로 발생학 및 면역학적인 측면에서 이루어져 왔으나 최근에는 상피세포계와 표피의 지속적인 molding 및 악성 종양 등 여러 질환의 병태생리에도 관여함이 알려졌다.[28,29] 상피세포 재생 과정에서의 세포 사멸은 정상적으로 일어나는 과정 중의 하나이지만 과도한 사멸은 병적이다.[24,30-32] 현재까지 *H. pylori*에 의한 상피세포의 사멸 조절기전은 밝혀져 있지 않다. 즉, *H. pylori*가 암모니아와 urease 등의 유독한 물질을 분비하여 세포독성을 유도할 가능성도 있으며 살아 있는 *H. pylori*가 상피세포의 사멸을 직접적으로 유도할 가능성도 있다. 또한 *H. pylori*에 의하여 자극된 위상피세포가 사이토카인을 분비하고 이에 따라 활성화된 중성구 및 림프구가 세포 손상을 일으킬 가능성도 있다. 따라서 본 연구의 목적은 최근에 발표된 *H. pylori*에 의한 상피세포 사멸 연구 모델[22]을 이용하여 *H. pylori*에 의한 상피세포의 사멸 유발기전을 알아봄으로써 *H. pylori*에 의한 위질환의 병인론적인 기전을 규명하고 나아가서는 *H. pylori* 감염 질환의 예방과 치료에 일조하는 데 있다.

대상 및 방법

1. 대상 세포 및 배양

위암세포주로는 KATO III (MTB-38, European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wilts)와 AGS (ATCC CRL 1739, Rockville, MD)를, 대장암세포주로는 HT-29 (ATCC HTB38), DLD-1 (ATCC CCL-221) 및 HCT-15 (ATCC CCL-225)를 40 μg/mL gentamicin과 10% 열 비활성화 우태아혈청(fetal calf serum:FCS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)으로 5% CO_2, 37℃에서 배양하였으며 *H. pylori*를 첨가하여 배양할 때에는 항균제가 함유되지 않은 배지를 이용하였다.

2. *H. pylori* 배양

Cytotoxin/*cagA* 양성 표준균주인 ATCC 43504 (NCTC 11637)를 이용하였다. *H. pylori*의 배양을 위하여 혈액한천배지를 이용하였다. 접종 후 37℃의 미호기성 조건에서 3-5일간 배양하여 균을 분리하였다. 세균동정 후 균의 계대배양 횟수가 10회를 넘지 않는 범위 내에서 *H. pylori*를 대량으로 배양하였다. 세균은 10 mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4)에 McFarland의 제3관 탁도(1×10^9 세균/mL)로

적정한 다음 10%의 FCS를 첨가하고 액체질소 탱크 또는 영하 70℃ 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다. 세균부유액의 세균수는 부유액을 단계적으로 희석하여 혈청한천배지에 하룻밤 배양한 후 집락수를 세어 확인하였다.

3. 세포독성 및 생존율의 측정

MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다.[33] 요약하면 96-well microtiter plate (Costar, Cambridge, MA)에 배양한 세포(10⁴/well)를 항균제가 함유되지 않은 배양액으로 세척한 후 세균 대 세포수 비 0, 2, 20, 200, 600, 1,200이 되도록 항균제가 함유되지 않은 배양액으로 *H. pylori*를 희석하여 첨가하고 일정한 시간 동안 다시 배양하였다. 배양액을 제거하고 well당 50 μL의 2 μg/mL MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액(Sigma)을 첨가한 후 4시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이어 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 상층액을 제거하고 well당 50 μL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후 10분간 진탕하고 570 nm에서의 optical density (OD)를 측정하였다. 이 때 Triton X-100을 첨가하여 세포를 용해시킨 well의 OD를 total OD로 하였다.

세포 생존율은 다음의 공식으로 산출하였다.

$$\%\text{Survival} = \frac{\text{sample OD} - \text{total OD}}{\text{spontaneous OD} - \text{total OD}} \times 100$$

4. DNA fragmentation의 분석

세포를 10 mM Tris (pH 7.6), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.2% SDS 및 200 μg/mL proteinase K로 구성된 용해완충액으로 42℃에서 서서히 흔들면서 밤새 용해시킨 후 4℃, 16,000 x *g*에서 20분간 원심분리하여 취한 상층액으로부터 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, Sigma)과 chloroform을 이용하여 저분자량 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 0.3 M sodium acetate를 함유하는 ethanol로 침전시킨 후 원심분리하여 핵산 침사를 얻었다. 핵산 침사를 0.2 U RNase A (Sigma)를 첨가한 10 mM Tris 1 mM EDTA (pH 8.5) 용액에 녹인 다음 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.[34,35]

5. IL (interleukin)-8의 측정

세포 배양 상층액의 IL-8은 효소면역법(ELISA)으로 측정하였다. 요약하면 96 well의 microtiter plate에 borate buffered saline (1.03% H_3PO_4, 0.73% NaCl; BBS)로 200배 희석한 goat anti-human IL-8 polyclonal immunoglobulin G (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 well당 100 μL씩 넣고 밤새 부착시킨 후 10 mM PBS (pH 7.4)/0.05% (v/v) Tween 20으로 3회 세척하였다. 0.5% BSA/PBS 로 비특이성 반응을 차단한 후 측정하고자 하는 반응배지액과 표준용액(recombinant human IL-8, R&D Systems)을 가하고 실온에서 2시간 자극시켰다. PBS/Tween으로 3회 세척한 후 0.5% BSA/PBS로 400배 희석한 rabbit anti-human IL-8 polyclonal antibody (Endogen, Cambridge, MA)를 well 당 100 μL씩 가하고 실온에서 2시간 반응시켰다. PBS/Tween으로 3회 세척한 후 alkaline phosphatase가 conjugate 되어 있는 goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson Laboratories, Avondale, PA)의 1,000배 희석액 100 μL를 가하여 30분간 반응시켰다. PBS/Tween으로 3회, Tris/NaCl으로 3회 세척한 후 기질로 1 mg/mL disodium p-nitrophenyl phosphate (Life Technologies, Gaithersburg, MD)를 가하고 15분간 반응시켰다. 증폭제 [3% 2-propanol, 1 mM iodonitrotetrazolium violet, 75 μg/mL, alcohol dehydrogenase 및 50 μg/mL diaphorase; Life Technologies]를 가하고 10분 후 ELISA 판독기로 492 nm에서 OD를 측정하였다.

6. 전사인자 활성도의 측정(Electrophoretic mobility shift assay)

세포의 핵 추출물은 다음과 같은 방법에 의하여 얻었다. Tris-buffered saline (TBS)로 세척한 세포를 핵 추출 완충액[10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT 및 7가지의 protease inhibitor (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 μg/mL aprotinin, 5 μg/mL antipain, 100 μM ben

zanidine, 5 μg/mL leupeptin, 5 μg/mL soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor, pH 7.9)에 부유시켜 얼음 위에 15분간 둔 다음 최종 농도 0.625%가 되도록 Nonidet P-40을 첨가하였다. Tube를 10초간 vortex 한 다음 12,500 x *g*에서 5분간 원심분리하여 얻은 핵 침전물을 완충액[20 mM HEPES (4-{2-hydroxyethyl}-1-piperazineethanesulfonic acid), 400 mM NaCl, 1 mM EGTA (ethylene glycol-bis-{β-aminoethyl ether}-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 1 mM DTT 및 7가지 protease inhibitors, pH 7.9)]에 부유시켜 얼음 위에서 15분간 흔들고 12,500 x *g*에서 20분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질을 정량한 다음 -70℃에 보관하였다. 전사인자 결합 부위의 NF-*k*B 탐침은 5'-TAA CAA ACA GGG ATT TCA CCT ACA T-3'의 염기서열로 DNA 합성기로 제작하였다. 탐침은 [γ-P32]ATP (Amersham)와 T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 표지(label)하였다. 핵 추출물 3-6 μg, 20,000 cpm의 표지된 탐침 및 2 μg의 poly dI/dC를 10 mM Tris, 50 nM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT 및 5% v/v glycerol로 구성된 완충액(pH 7.5)과 함께 섞은 후 얼음 위에서 60분간 반응시키고 4% polyacrylamide gel에 전기영동하고 gel을 말린 후 autoradiography 하였다.

결 과

1. 위암세포주에서 *H. pylori*에 의한 IL-8 생산과 전사인자 활성화

위암세포주인 AGS와 KATO III 세포에서 *H. pylori*는 투여한 세균의 수에 비례하여 IL-8의 생산을 증가시켰으며(Fig. 1), electrophoretic mobility shift assay 결과 AGS 세포에서 *H. pylori*는 투여한 세균의 수에 비례하여 NF-kB binding activity를 증가시켰다(Fig. 2).

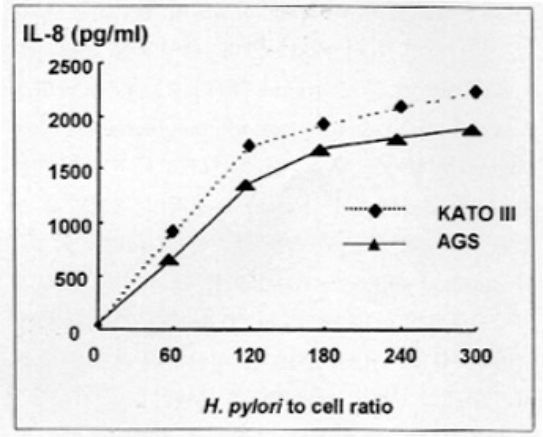

Fig. 1. *H. pylori* induced IL-8 protein production of gastric cancer cells. IL-8 productions by AGS and KATO III cells, measured by ELISA, increased dose-dependently.

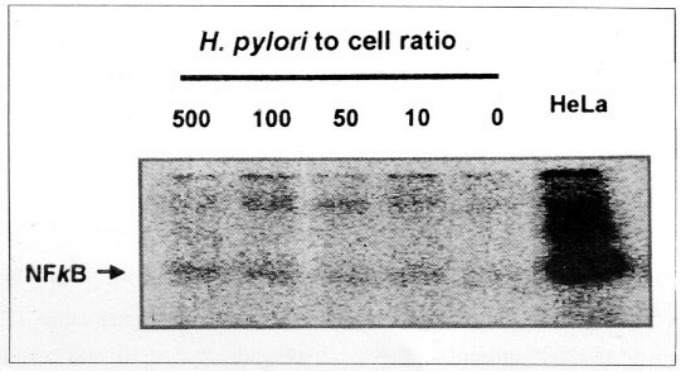

Fig. 2. *H. pylori* dose-dependently activated NF-kB in AGS cells. NF-kB activation was measured by electrophoretic mobility shift assay at *H. pylori* to AGS cell ratio of 500 (lane 1), 100 (lane 2), 50 (lane 3), 10 (lane 4), 0 (lane 5) and HeLa cells as a positive control (lane 6).

2. *H. pylori*가 위암 및 대장암세포주의 세포 생존에 미치는 영향

한편 *H. pylori*를 위암세포주에 첨가하여 배양하면 투여한 세균의 수에 비례하여 MTT assay로 측정한 세포의 생존율이 감소하였다. IFN-γ 전처치가 *H. pylori*에 의한 세포 생존율 감소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96-well plate에 well당 10⁴개의 위암세포를 넣고 밤새 배양하여 세포가 부착되게 한 다음 40 ng/mL의 IFN-γ에 6시간 동안 노출시키고 세척한 후 다시 밤새 배양하였다. 그 후 *H. pylori*를 첨가하고 24시간째에 MTT assay로 세포 생존율을 측정한 결과 IFN-γ 전처치가 *H. pylori*에 의한 위암세포주의 세포 생존율 감소 효과를 증강시키지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 세균 대 세포 비 600에서 이러한 세포 생존율 감소 효과는 6시간째부터 나타나기 시작하여(세포 생존율 평균 77.8%) 24시간째에 뚜렷하게 관찰되었으며(세포 생존율 평균 64.5%) 48시간까지 증가하였다(세포 생존율 평균 34.0%). *H. pylori*-매개 세포 생존율의 감소 효과에 장기 선택성이 있는지 알아보기 위하여 위암세포주인 AGS와 KATO III 뿐만 아니라 각종 대장암세포주에 *H. pylori*를 첨가하고 배양한 결과 대장암세포주인 HT-29, WiDr 및 DLD-1에서 MTT assay로 측정한 세포 생존율의 감소가 위암세포주인 AGS 및 KATO III와 유사하여 *H. pylori*-매개 세포 생존율 감소 효과에는 장기 선택성이 없음을 알 수 있었다(Fig. 4).

3. 위암 및 대장암세포주에서 *H. pylori*에 의한 세포 사멸

세포를 수거하여 propidium ioide를 첨가한 다음 유세포 분석기로 붉은 형광을 측정하면 세포막 투과성의 변화를 알 수 있으며 세포의 크기가 작아지고 투과성이 증가하면 사멸 세포로 판정할 수 있다. 위암세포주에 대한 *H. pylori*의 세포 사멸 유발 효과는 MTT assay에서와 같은 농도와 시간 동안 전처치한 IFN-γ에 의하여 증강되지 않은 반면 대장암세포주인 HT-29에서는 IFN-γ 전처치가 세포 사멸을 증가시켰다(Fig. 5). 세포로부터 추출한 저분자량 DNA를 agarose gel에 전기영동하는 방법으로 *H. pylori* 투여 후 세포 생존율의 감소가 DNA fragmentation을 동반하는 세포 사멸인지 알아본 결과, 위암세포주인

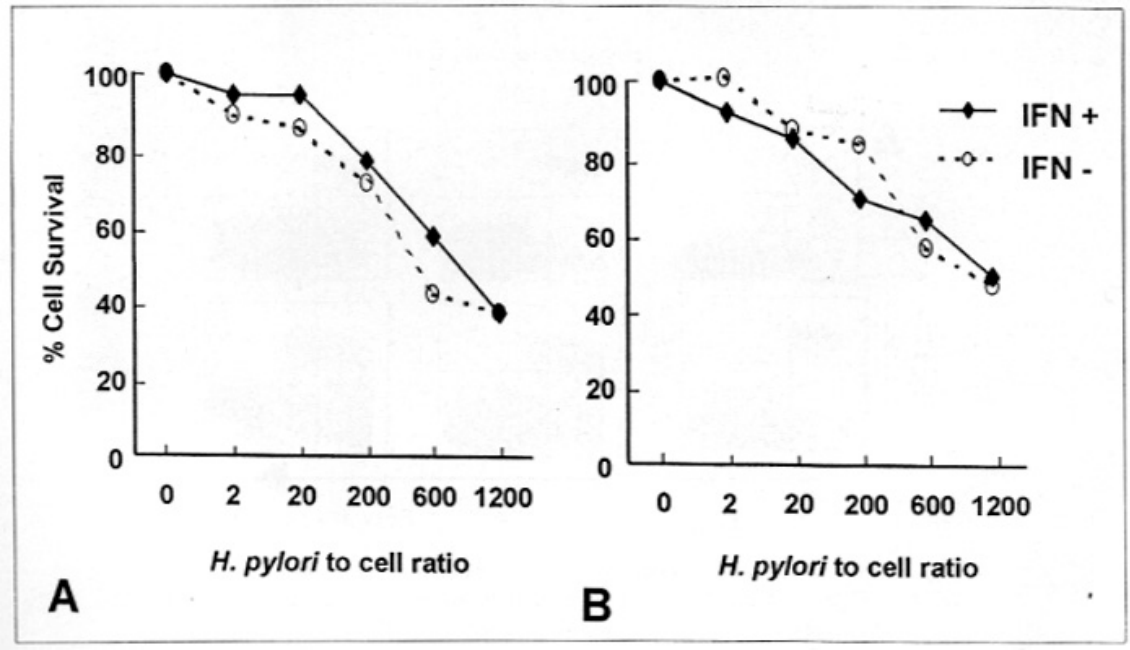

Fig. 3. *H. pylori* induced decrease of cell survial of AGS (A) and KATO III (B). Indicated bacteria to cell ratio of *H. pylori* were added to gastric cancer cells and cocultured for 24 hours, then cell survival was measured by MTT assay.

AGS 뿐만 아니라 대장암세포주인 HT-29에서도 특징적인 "ladder pattern"을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 위암세포주인 AGS에 *H. pylori*를 첨가한 후 주사전자현미경(scanning electron microscopy; SEM)으로 관찰한 결과, 대부분의 *H. pylori*는 열악한 환경에서 취하는 형태인 coccoid form으로 AGS 세포에 부착되어 있었으며(Fig. 7), 투과전자현미경(transmission electron microscopy; TEM)으로 관찰한 결과, 위암세포의 세포질 내에 다수의 공포(vacuole)와 핵 내에 크로마틴 농축 소견이 관찰되어(Fig. 8) *H. pylori*가 위암세포의 사멸을 유발함을 확인할 수 있었다.

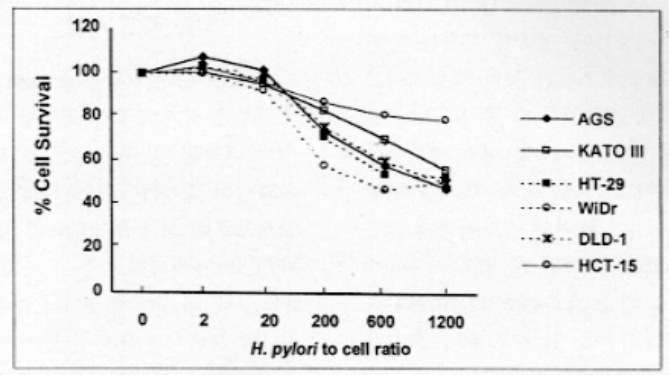

Fig. 4. *H. pylori*-induced decrease of cell survival was not organ-specific. Indicated bacteria to cell ratio of *H. pylori* were added to gastric cancer cell lines as well as various colon cancer cell lines and cocultured for 24 hours, then cell survival was measured by MTT assay.

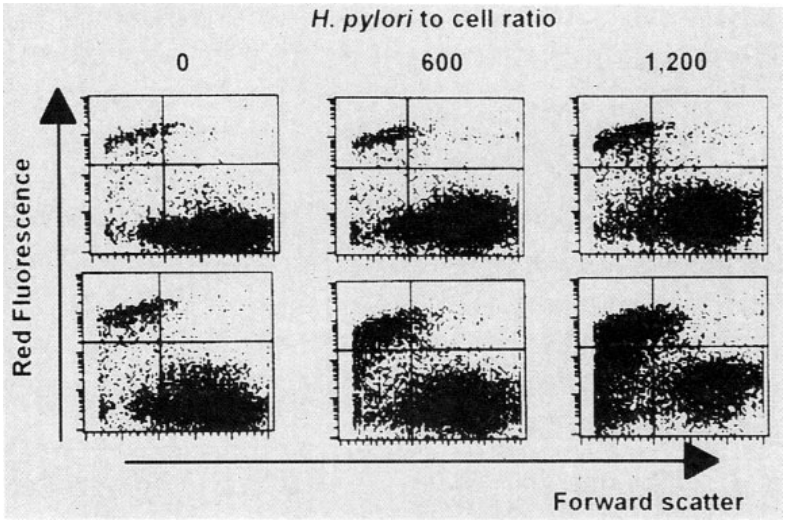

Fig. 5. IFN-γ pretreatment potentiated *H. pylori*-induced apoptosis in colon cancer cell line HT-29. Indicated bacteria to cell ratio of *H. pylori* were added and cocultured with control (upper row) and IFN-γ pretreated (lower row) HT-29 cells for 16 hours. Propidium iodide was added to suspension of harvested cells. Using flow cytometer, cell size was measured by forward scatter and cytoplasmic membrane permeability was measured by red fluorescence.

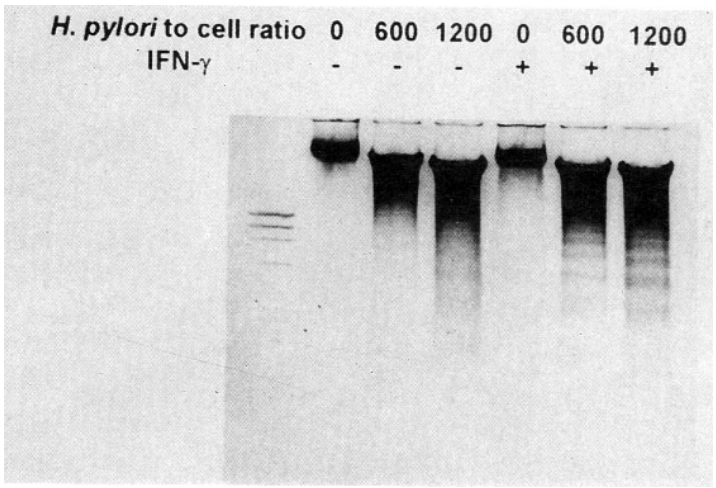

Fig. 6. *H. pylori* induced DNA fragmentation of colon cancer cell line HT-29. DNA was extracted from control and cells cocultured for 48 hours with indicated bacteria to cell ratio of *H. pylori* was electrophresed on 1.2% agarose gel.

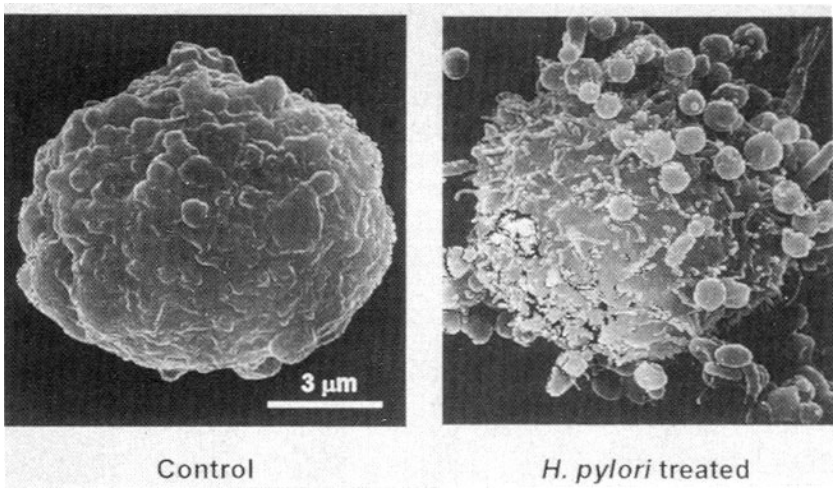

Fig. 7. *H. pylori* tightly adhered to gastric cancer cell line AGS. AGS cells were incubated with *H. pylori* (bacteria to cell ratio of 600) for 3 hours. Harvested cell pellets were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylated buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol gradient and coated with gold (Hitachi S-800, ×6,000).

4. *H. pylori*에 의한 위암세포주 사멸의 조절 기전

*H. pylori*를 가열 처리하거나 formalin 처리했을 때의 효과를 알아보기 위하여 PBS에 부유시킨 *H.pylori* (5×10^8/mL)를 90°C에서 15분간 가열하거나 0.5% formaldehyde을 가하고 4°C에서 밤새 배양한 뒤 세척하고 PBS에 부유시켰다. 가열 처리하거나 formalin 처리한 *H. pylori*의 위암세포주에 대한 IL-8 생산 증강 효과는 대조 *H. pylori*에 비하여 세균 대 세포 비 500에서 각각 70% 및 95% 억제되는 것으로 보아(Fig. 9A) IL-8 생산을 증강시키기 위해서는

살아 있는 세균과 세포 사이의 접촉이 필요하다는 사실을 알 수 있었다. 한편 가열 처리한 *H. pylori*는 처리하지 않은 *H. pylori*와 비슷한 정도의 위암세포 생존율 감소를 유도한 반면에 formalin 처리한 *H. pylori*의 경우에는 세포 생존율 감소 효과가 대조 *H. pylori*에 비하여 세균 대 세포 비 600 및 1,200에서 각각 85% 및 67% 억제되는 것으로 보아(Fig. 9B) *H. pylori*에 의한 위암세포주의 IL-8 생산 증강 효과

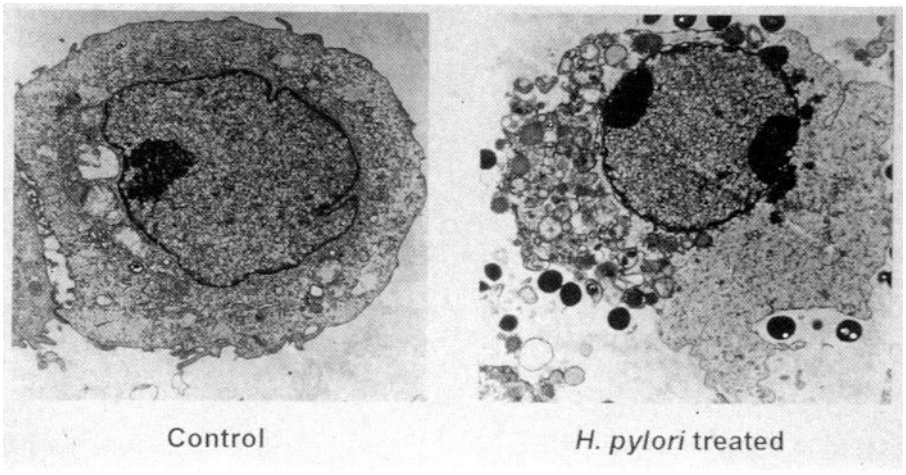

Fig. 8. *H. pylori* induced cytoplasmic vacuolization and chromatin condensation of gastric cancer cell line, AGS. AGS cells were incubated with *H. pylori* (bacteria to cell ratio of 600) for 48 hours. Harvested cell pellets were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylated buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol gradient and embedded in Epon. Then 0.5 m thin cut section was prepared and double stained with uranyl acetate and lead citrate (Phillips CM 10, × 6,000).

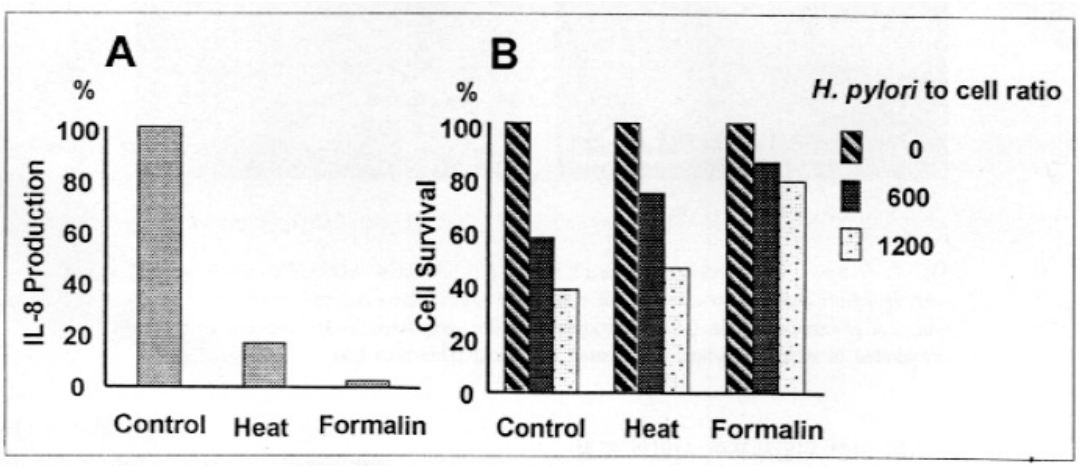

Fig. 9. Effect of heat and formalin treatment of *H. pylori* on IL-8 production (A) and cell survival (B) of AGS cells. (A) Control as well as heat and formalin treated *H. pylori* (bacteria to cell ration of 500) were cocultured with AGS for 16 hours and IL-8 production was measured by ELISA. Values represent percent production of IL-8 compared to control *H. pylori*. (B) Indicated bacteria to cell ratio of H pylori were added to AGS cells and cocultured for 24 hours, then cell survival was measured by MTT assay. Values represent percent cell survival of AGS cells compared to control *H. pylori*.

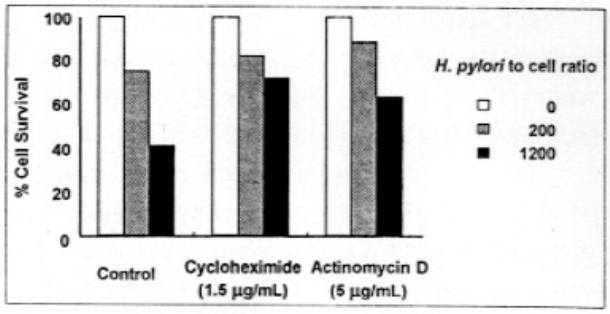

Fig. 10. Cylcoheximide and actinomycin D inhibited *H. pylori*-induced decrease of gastric cancer cell survival. AGS cells were pretreated with 1.5 g/ml of cycloheximide or 5 g/ml of actinomycin D before the addition of indicated bacteria to cell ratio of *H. pylori*, and then cocultured for 24 hours. Cell survival was measured by MTT assay.

와 생존율 감소 효과는 다른 기전으로 일어난다고 생각하였다. *H. pylori*-매개 위암세포 생존율 감소 효과는 단백질합성억제제인 cycloheximide (1.5 μg/mL)와 전사억제제인 actinomycin D (5 μg/mL)에 의하여 세균 대 세포 비 200에서는 각각 28%, 52% 억제되었고, 세균 대 세포 비 1,200에서는 각각 53%, 37% 억제되어 *H. pylori*-매개 세포 사멸이 일어나기 위해서는 사멸 연관 유전자의 전사에 연이은 단백질의 합성이 필요할 가능성을 시사하였다 (Fig. 10).

고 찰

*H. pylori*에 의한 위염 및 소화성 궤양의 병인론적인 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않지만 *H. pylori*가 점액을 변성시키고 상피세포의 손상을 일으키는 물질을 분비하여 위산에 대한 위점막상피세포의 저항력을 감소시킨다는 가설과[5,6] *H. pylori*가 위점막의 세포주성 물질과 사이토카인 생산을 유도하고 이에 따라 활성화된 백혈구가 위 및 십이지장 점막의 손상을 초래한다는 가설이 있다.[7,8] *H. pylori* 감염은 조직학적으로 위상피 및 점막고유층에 중성구 및 단핵구의 침윤을 특징으로 하고 있으며 이런 염증세포의 침윤이 조직 손상과 궤양 형성에 중요한 인자로 작용하리라 생각되고 있다.[6,36,37] *H. pylori*에 감염된 위조직에서 TNF-α, IL-6, IL-8 등 몇몇 사이토카인 mRNA가 발현된다는 사실이 밝혀졌으며,[9-13] iNOS 발현도 증가함이 보고되어 병태생리에 관여함을 시사하고 있다.[4] 또한 위암세포주에 *H. pylori*를 감염시키면 각종 사이토카인뿐만 아니라 chemokine과 세포접합분자의 발현도 증가된다.[14-17] 본 연구에서도 위암세포주인 AGS와 KATO III에서 투여한 *H. pylori*의 용량과 시간에 비례하여 IL-8의 생산이 증가함을 확인할 수 있었다. 본 교실에서는 *H. pylori*에 의한 IL-8 mRNA 및 단백질의 생산이 protein tyrosine kinase와 protein kinase C 차단제에 의하여 억제됨을 관찰한 바 있고,[38] 본 연구에서도 AGS를 이용한 electrophoretic mobility shift assay에서 투여한 *H. pylori*의 수에 비례하여 NF-kB binding activity가 증가하는 것[39]을 재확인하여 *H. pylori*가 위암세포주의 세포 내 신호전달경로를 활성화시킨다는 것을 알 수 있었다. 실제로 *H. pylori*에 의한 세포 내의 신호전달경로 활성화의 근거로 inositol triphosphate의 증가와 protein kinase C의 활성화가 보고되어 있다.[40-42]

한편 *H. pylori*가 암모니아 및 urease 등의 세포독성을 갖는 물질을 분비하여 상피세포의 손상을 일으킨다는 보고가 있는데,[18-20,43] 최근에 이르러 *H. pylori*에 감염된 위조직에는 정상에 비하여 사멸 세포가 많고 *H. pylori*를 박멸한 후에는 사멸 세포가 감소한다는 관찰에 근거하여 점막의 손상은 상피세포의 사멸에 의한 것임이 알려졌다.[24,21,22] 본 연구에

서 *H. pylori*를 위암세포주에 첨가하여 배양한 결과 투여한 세균의 수에 비례하여 MTT assay로 측정한 세포의 생존율이 감소하였으며, 이러한 세포 생존율 감소 효과는 6시간째부터 나타나기 시작하여 24시간째에 뚜렷하게 관찰되었으며 48시간까지 증가하였다.

*H. pylori*는 사람에서 위의 점막에만 감염되며 여러 종류의 세포주 중 주로 위암세포주에 선택적으로 IL-8의 생산을 유도하는 특성을 가져 선택적으로 위점막에 친화도를 가지고 있음을 시사하고 있다. 본 연구의 결과 *H. pylori*는 위암세포주인 AGS와 KATO III 뿐만 아니라 각종 대장암세포주에서도 세포 생존율의 감소를 유발하여 *H. pylori*-매개 세포 생존율 감소 효과에는 장기 선택성이 없음을 알 수 있었다. 한편 여러 가지의 자극에 의한 세포 사멸을 증강시킨다고 알려져 있는[34] IFN-γ 전처치가 *H. pylori*에 의한 세포 사멸에 미치는 영향을 알아본 결과, 위암세포주에 대한 *H. pylori*의 사멸 유발 효과는 IFN-γ 전처치에 의하여 증강되지 않은 반면 대장암세포주인 HT-29에서는 IFN-γ 전처치가 세포 사멸을 증가 시켰다. IFN-γ에 의한 세포 사멸 증강의 기전은 아직까지 불명확하지만 최근 세포 표면의 MHC class II 분자가에 대한 수용체로 작용하여 세포 사멸을 유발하는 신호를 세포 내로 전달한다는 사실을 보고[44]하였으며, IFN-γ에 의하여 세포 표면에 MHC class II 분자의 발현이 증가하는 것이 세포 사멸 증강의 한 기전일 것임을 시사하였다. 본 연구에서 IFN-γ에 의한 세포 사멸 증강 효과가 세포주에 따라 상이한 결과를 보이는 이유에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

DNA fragmentation은 세포 사멸에서 꼭 나타나는 현상은 아니지만 세포 사멸에 있어서 특징적인 변화의 하나로서 형태학적 또는 분자생물학적인 방법으로 DNA fragmentation을 측정하는 방법이 세포 사멸을 증명하기 위하여 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 세포로부터 추출한 저분자량 DNA를 agarose gel에 전기영동하는 방법으로 *H. pylori* 투여 후 세포 생존율의 감소가 DNA fragmentation을 동반하는 세포 사멸인지 알아본 결과 위암세포주인 AGS 뿐만 아니라 대장암세포주인 HT-29에서도 "ladder pattern"을 관찰할 수 있었으며 투과전자현미경으로 관찰한 결과 위암세포의 세포질 내의 다수의 공포와 핵 내의 크로마틴 농축 소견이 관찰되어 *H. pylori*-매개 세포 생존율 감소는 세포 사멸에 기인함을 확인할 수 있었다. 최근에 발표된 두 편의 논문에서도 세포막 외측에 phosphatidylserine이 노출되는 것을 측정하는 Annexin V assay와 전자현미경으로 *H. pylori*가 상피세포의 사멸을 직접적으로 유발한다고 보고하였다.[45,46]

*H. pylori*를 병원성에 따라 분류함으로써 치료 및 예후 추정에 도움을 얻으려는 노력의 결과로 cytotoxin associated gene (CagA) 및 vacuolating cytotoxin (VacA) 발현 여부에 따라 *H. pylori*를 두 가지 유형으로 분류하는 것이 일반적이다. CagA 또는 VacA 양성 *H. pylori*가 소화성 궤양과 높은 연관을 가진다고 알려져 있으며,[9,47] CagA 양성 균주가 음성 균주에 비하여 상피세포의 사이토카인 생산을 더욱 잘 유도한다는 사실도 보고되었다.[14,17] 그러나 CagA와 VacA 발현은 *H. pylori*의 병원성과 아무 연관이 없다는 상반된 견해도 있으며, 병원성과 관계되는 다른 인자, 특히 세균 표면인자(surface factor)를 찾으려는 시도가 계속되고 있다. *H. pylori* 배양상층액, 열사멸된 세균, 또는 sonificate[48,49]는 위상피세포의 사이토카인 생산을 유도하지 못하는 것으로 알려져 있으며, 전자현미경 소견[40] 등으로 미루어 보아 *H. pylori*가 상피세포의 사이토카인 생산을 유도하기 위해서는 살아 있는 세균과 상피세포간의 직접적인 접촉이 필요하리라 생각되고 있다. *H. pylori*와 상피세포간의 접촉시 사이토카인 생산을 자극하는 세균 표면인자로 CagA 단백,[14] flagella,[48] urease,[50] lipopolysaccharide (LPS),[51] cytotoxin 등이 거론되고 있다. 그러나 살아 있는 *H. pylori* 뿐만 아니라 세균으로부터 추출한 LPS, 수용성 표면단백(water extractable surface protein) 및 urease 등을 배양된 세포에 투여하였을 때에도 사이토카인이 생산된다는 상반된 보고도 있어[16,51] 이에 대한 규명이 기대되고 있다. 본 연구의 결과, 가열하거나 formalin 처리한 *H. pylori*의 위암세포주에 대한 IL-8 생산 증강 효과는 대조 *H. pylori*에 비하여 각각 70% 및 95% 억제되는 것으로 보아 IL-8 생산을 유도하기 위해서는 살아

있는 세균과 세포 사이의 접촉이 필요하다는 사실을 알 수 있었다. 반면에 가열 처리한 *H. pylori*는 처리하지 않은 *H. pylori*와 비슷한 정도의 위암세포 생존율 감소를 유도하였고 formalin 처리한 경우에는 생존율 감소 효과가 상당히 억제되는 것으로 보아 *H. pylori*에 의한 위암세포주의 IL-8 생산 유도 효과와 생존율 감소 효과는 동일한 기전으로 일어나는 것이 아님을 시사하였다. 또한 *H. pylori*-매개 위암 세포 생존율 감소 효과는 단백질합성억제제인 cycloheximide와 전사억제제인 actinomycin D에 의하여 세균 대 세포 비 200에서는 각각 28%, 52% 억제되었고, 세균 대 세포 비 1,200에서는 각각 53%, 37% 억제되어 *H. pylori*-매개 세포 사멸이 일어나기 위해서는 사멸 연관 유전자의 전사에 연이은 단백질의 합성이 필요하리라는 추측이 가능하였다.

본 연구의 결과 *H. pylori*가 상피세포의 사멸을 직접적으로 유발할 수 있다는 사실이 분명하게 되었다. 그러나 본 연구에서 주사전자현미경으로 관찰한 *H. pylori*는 대부분 열악한 환경에서 취하는 형태인 coccoid form으로 AGS 세포에 부착되어 있었으므로 생체 내의 감염과는 상황이 다를 수 있다는 사실과 *H. pylori*가 어떤 기전으로 상피세포의 사멸을 유발하는지 전혀 알려져 있지 않다는 사실을 고려한다면 이 분야에 대한 추후의 지속적인 연구가 기대된다.

요 약

목적: *Helicobacrer pylori* (*H. pylori*)는 활동성 위염과 위 및 십이지장궤양의 발병 원인으로 알려져 있으나 *H. pylori*에 의한 상피세포 손상의 기전은 아직까지 분명하지 않다. 최근 *H. pylori*에 감염된 점막 손상의 기전으로 상피세포의 사멸이 거론되고 있다. 따라서 본 연구에서는 *H. pylori*가 상피세포의 사멸을 직접적으로 유발할 수 있는지 알아보고자 하였다. 대상 및 방법: *H. pylori*는 cytotoxin/cagA 양성 표준균주인 ATCC 43504 (NCTC 11637)를 이용하였다. 세포 생존율은 MTT assay로 측정하였으며, 세포 사멸은 agarose gel에서의 DNA fragmentation과 전자현미경에서의 형태학적인 변화로 확인하였다. IL-8은 ELISA로 측정하였으며 NF-kB의 활성화는 electrophoretic mobility shift assay로 평가하였다. 결과: 위암세포주인 AGS와 KATO III에서 *H. pylori*는 투여한 세균의 수에 비례하여 IL-8의 생산을 증가시켰다. *H. pylori*는 투여한 세균의 수에 비례하여 위암세포의 생존율을 감소시켰으며 세포 사멸을 유도하였다. *H. pylori*-매개 세포 생존율 감소효과에는 장기 선택성이 없었다. 가열하거나 formalin 처리한 *H. pylori*의 위암세포주에 대한 IL-8 생산 증강 효과는 대조 *H. pylori*에 비하여 각각 70% 및 95% 억제된 반면에 가열 처리한 *H. pylori*는 처리하지 않은 *H. pylori*와 비슷한 정도의 위암세포 생존율 감소를 유도하였고, formalin 처리한 경우에는 생존율 감소 효과가 상당히 억제되었다. *H. pylori*-매개 위암세포 생존율 감소 효과는 단백질 합성억제제인 cycloheximide와 전사억제제인 actinomycin D에 의하여 억제되었다. 결론: 본 연구의 결과 *H. pylori*가 상피세포의 사멸을 직접적으로 유발할 수 있다는 사실이 분명하게 되었다. 그러나 본 연구에서 주사전자현미경으로 관찰한 *H. pylori*는 대부분 열악한 환경에서 취하는 형태인 coccoid form으로 AGS 세포에 부착되어 있었으므로 생체 내의 감염과는 상황이 다를 수 있다는 사실과 *H. pylori*가 어떤 기전으로 상피세포의 사멸을 유발하는지 전혀 알려져 있지 않다는 사실을 고려하여 추후의 지속적인 연구가 기대된다.

색인단어: *Helicobacter pylori*, 세포 사멸(apoptosis), Interleukin-8

참 고 문 헌

1. Bechi P, Balzi M, Becciolini A, et al. *Helicobacte pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa possible implications for gastric carcinogenesis. Am J Gastroenterol 1996;91:271-276.
2. Correa P, Miller MJ. *Helicobacter pylori* and gastric atrophy-cancer paradoxes. J Natl Cancer Inst 1995 87:1731-1732.
3. Lynch DA, Axon AT. *Helicobacter pylori*, gastric cancer and gastric epithelial kinetics: a review. Eu J Gastroenterol Hepatol 1995;7(suppl 1):S17-S23.

4. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. Cancer Res 1996;56:3238-3243.
5. Cover TL, Puryear W, Perez-Perez GI, Blaser MJ Effect of urease of HeLa cell vaculoation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. Infect Immun 1991; 59:1264-1270.
6. Slomiany BL, Slomiany A. Mechanism of *Helico bacter pylori* pathogenesis: focus on mucus. J Clin Gastroenterol 1992;14(suppl 1):S114-S121.
7. Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced in flammation. Gastroenterology 1992;102:720-727.
8. Yoshida N, Granger DN, Evans DJ Jr., et al Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. Gastroenterology 1993;105:1431-1440.
9. Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JI Mucosal tumor necrosis factor alpha and interelukin 6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. Gut 1991;32:1473-1477.
10. Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JI, Stachl U, Lindley IJ. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. Scand J Immuno 1993;37:65-70.
11. Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, et al Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* in fected, normal, and neoplastic gastroduodenal mu cosa. J Clin Pathol 1994;47:61-66.
12. Gionchetti P, Vaira D, Campieri M, et al. Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylor* positive dyspeptic patients. Am J Gastroenterol 1994;89:883-887.
13. Moss SF, Legon S, Davies J, Calam J. Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. Gut 1994;35:1567-1570.
14. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, et al. *Helico bacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA posi tive phenotype. J Clin Pathol 1995;48:41-45.
15. Fan XG, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW, Kelleher D Up-regulation of CD44 and ICAM-1 expression on gastric epithelial cells by *H. pylori*. APMIS 1995 103:744-748.
16. Huang J, O'Toole PW, Doig P, Trust TJ. Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1995;63: 1732-1738.
17. Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. Infec Immun 1995;63:1681-1687.
18. Konishi H, Ishibashi M, Morshed MG, Nakazawa T Cytopathic effect of *Helicobacter pylori* on cultured mammalian cells. J Med Microbiol 1992;37:118-122
19. Megraud F, Neman-Simha V, Brugmann D. Furthe evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells Infect Immun 1992;60:1858-1863.
20. Nakajima N, Kuwayama H, Iwasaki A, Arakawa Y Lansoprazole reverses *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial cell growth. J Clin Gastroentero 1995;20(suppl 2):S90-S92.
21. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR Induction of gastric apoptosis by *Helicobacter pylori*. Gut 1996;38:498-501.
22. Fan X, Crowe S, Bamford K, van Houten N, Reye V, Ernst PB. *H. pylori*-mediated apoptosis of gastric epithelial cells. Immunol Cell Biol 1997;75(S1): A119.
23. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide Science 1995;267:1445-1449.
24. **김원호. 세포 사멸과 질병. 녹십자의보** 1996;24:275-288.
25. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvemen in Ca^{2+}-dependent T cell-mediated cytotoxicity. J Exp Med 1993;177:195-200.
26. Hong SP, Ha SH, Park IS, Kim WH. Induction o apoptosis in colon cancer cells by nonsteroida anti-inflammatory drugs. Yonsei Med J 1998;39: 287-295.
27. Mountz JD, Zhou T, Wu J, Wang W, Su X, Chen J. Regulation of apoptosis in immune cells. J Clin Immunol 1995;15:1-16.

28. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death apoptosis and killer genes. Immunol Today 1993 14:582-590.
29. Haake AR, Polakowska RR. Cell death by apoptosis in epidermal biology. J Invest Derm 1993;101:107-112.
30. Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B Oberhammer F, Wagner A. Programmed cell death and its protective role with particular referene to apoptosis. Toxicol Lett 1992;64-65:569-574.
31. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-1462.
32. Watson AJ. Necrosis and apoptosis in the gastroin testinal tract. Gut 1995;37:165-167.
33. **김원호, 이관식, 문영명 등. 배양된 위암 세포에 대한** desferrioxamine **및 항암제의 병합 효과. 대한소화기병학회지** 1993;25:46-60.
34. **김원호, 하성호, 강진경, 박인서.** Interferon-γ **가 대장암세포주** HT-29**의** Fas **매개 세포 사멸에 미치는 영향. 대한소화기학회지** 1997;29:620-631.
35. **김원호, 하성호, 강진경, 박인서. 대장암 세포주에서** Fas **매개 세포 사멸**(apoptosis)**의 분자적 조절 기전 세포 사멸 관련 유전자 발현 및** protein kinase C**와** protein phosphatase**의 역할. 대한대장항문학회지** 1997;13:301-315.
36. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Eng J Med 1989;320:365-376.
37. Mooney C, Keenan J, Munster D, et al. Neutrophi activation by *Helicobacter pylori*. Gut 1991;32: 853-857.
38. **이용찬, 김원호, 문영명, 강진경, 박인서, 이경원** *Helicobacter pylori***에 의한 위암세포주의** interleu kin-8 **생산의 신호전달. 대한소화기학회지** 1998;32 (suppl 1):68.
39. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helico bacter pylori* infection activates NF-kB in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1099-1109.
40. Dytoc M, Gold B, Louie M, et al. Comparison o *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escheri chia coli* adhesion to eukaryotic cells. Infect Immun 1993;61:448-456.
41. Pucciarelli MG, Russchkowski S, Trust TJ, Finlay BB. *Helicobacter pylori* induces an increase in inosi tol phosphates in cultured epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 1995;129:293-299.
42. Beil W, Obst B, Wagner S, Sewing KF. The *Helicobacter pylori* fatty acid cis-9,10-metyleneocta decanoic acid stimulates protein kinase C and in creases DNA sythesis of gastric HM02 cell. Br Cancer 1998;77:1852-1856.
43. Wadstrom T, Hirmo S, Boren T. Biochemical as pects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. Aliment Pharmacol Ther 1996;10(suppl 1):17-27.
44. Fan X, Crowe SE, Behar S, et al. The effect of clas II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism fo T helper cell type 1-mediated damage. J Exp Med 1998;187:1659-1669.
45. Chen G, Sordillo EM, Ramey WG, et al. Apoptosi in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacte pylori* and accompanied by increased expression of BAK. Biochem Biophys Res Comm 1997;239:626-632.
46. Wagner S, Beil W, Westermann J, et al. Regulation of epithelial cell growth by *Helicobacter pylori* evidence for a major role of apoptosis. Gastroen terology 1997;113:1836-1847.
47. Figura N, Guglielmetti A, Rossolini A, et al. Cyto toxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. J Clin Microbio 1989;27:225-226.
48. Ohta-Tada U, Takagi A, Koga Y, Kamiya S, Miw T. Flagellin gene diversity among *H. pylori* strains and IL-8 secretion from gastric epithelial cells Scand J Gastroenterol 1997;32:455-459.
49. Wagner S, Paerow A, Mai UEH, Beil W, Bischof SC, Manns M. Effect of *H. pylori* and cytokines on interleukin 8 secretion by human gastric epithelia cells in vitro. Gastroenterology 1995;108:A938.
50. Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ,

Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. Gastroenterology 1996;112:419-425.

51. Mai UE, Perez-Perez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blser MJ, Smith PD. Soluable surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. J Clin Invest 1991;87:894-900.