대한소화기학회지 2002;39:204 - 215

위상피세포주에서 타우린 포합 담즙산에 의한 Nuclear Factor-Kappa B 매개 Interleukin-8의 발현

연세대학교 원주의과대학 내과학교실, 연세대학교 의과대학 약리학교실*, 내과학교실†

김현수 · 이동기 · 서정인 · 백순구 · 권상옥 · 김혜영* · 김원호†

Taurine-conjugated Bile Acids Induce Nuclear Factor-Kappa B Mediated Interleukin-8 Activation in Gastric Epithelial Cell Lines

Hyun Soo Kim, M.D., **Dong Ki Lee**, M.D., **Jung In Seo**, M.D., **Soon Koo Baik**, M.D., **Sang Ok Kwon**, M.D., **Hye-young Kim**, M.D.*, and **Won Ho Kim**, M.D.†

Department of Internal Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju; Departments of Pharmacology and Internal Medicine†, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background/Aims: The molecular mechanism of gastric epithelial injury induced by bile acid remains poorly understood. The aims of this study were to examine whether IL-8 was expressed by the stimulation of human gastric epithelial cells (AGS and Kato III) with taurine-conjugated bile acids, taurocholic acid (TC) or taurochenodeoxycholic acid (TCDC), and to evaluate the role of Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) on the expression of IL-8. **Methods:** After the gastric epithelial cells were treated with TC or TCDC, time courses of NF-κB binding activity and IL-8 secretion were determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and ELISA. To evaluate the role of NF-κB on the expression of IL-8, IL-8 levels were assessed after pretreatment with rebamipide or pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), known as NF-κB inhibitors, or phosphorothioate-modified anti-sense (AS) oligonucleotides (ODN) for p50 subunit of NF-κB. **Results:** TC or TCDC stimulation increased IL-8 secretion in a time and dose-dependent manner. Moreover, AGS and Kato III cells treated with TC or TCDC dose-dependently induced a prominent NF-κB binding complex within 60 min. Pre-incubation of the cells with PDTC (100 μM), rebamipide (0.1 and 0.5 mM) or AS-ODN caused significant decreases in IL-8 secretion induced by TC or TCDC. **Conclusions:** NF-κB mediated IL-8 expression may play an important role in the taurine-conjugated bile acid-induced gastric epithelial injury and may present a plausible molecular mechanism for the bile reflux gastritis. **(Korean J Gastroenterol 2002;39:204-215)**

Key Words: Taurine-conjugated bile acids, NF-κB, Interleukin-8, Gastric epithelial cell lines

서 론

잔위염은 위 유문부를 절제하는 위부분절제술이나 위-공장우회술 후에 나타나는 가장 흔한 합병증의 하나로 담즙을 포함하는 장관 내용물의 역류가 주요한 원인으로 알려져 있다.[1,2] 담즙산을 포함하는 담즙에 위점막이 노출되면

접수: 2001년 8월 3일, 승인: 2001년 12월 28일
연락처: 이동기, 220-701, 강원도 원주시 일산동 162번지
원주기독병원 소화기내과
Tel: (033) 741-0932, Fax: (033) 745-6782
E-mail: gidept@wonju.yonsei.ac.kr
※ 본 연구는 연세대학교 학술연구비와 (주)한국오츠카제약 연구비의 보조로 이루어졌음.

융모성 선와의 증식, 선조직의 낭종화, 점막 근판층의 부종과 점막 모세혈관의 혈관부종 등의 뚜렷한 조직학적인 변화가 수술 후 문합부를 중심으로 발생하며[3,4] 이러한 변화는 위내 담즙산의 농도가 높을수록 심하게 나타나 담즙산이 위점막 손상의 주요한 원인 물질임을 시사한다.[4]

전기생리학적 연구를 통해 기존에 알려진 담즙 매개 위상피세포 손상은 담즙 고유의 세정 효과(detergent effect)에 의하여 위상피세포막 구성 성분인 지질, 인지질, 콜레스테롤을 용해시키고 위점막 투과도를 증가시켜 위내 수소 이온(hydrogen ion, H^+)의 역확산을 유도하고 결과적으로 위점막 방어벽(gastric mucosal barrier)을 파괴시킨다.[5-7] 또한 담즙은 위점막 방어의 중요 역할을 담당하는 당단백 점액을 분해시켜 위산에 의한 점막 손상을 촉진시킨다.[8] 이러한 담즙 작용은 대부분 위상피세포 외부의 위 내강에서 마이셀(micelle)을 형성함으로써 일어난다. 반면 담즙산이 직접 위상피세포로 들어가(intracellular entry) 위점막 손상을 유발시킨다는 동물실험 연구 결과도 보고되고 있다.[5,9,10] 담즙산의 세포내 작용 근거로는 타우로콜릭산(taurocholic acid, TC)이 레시틴(lecithin)과 결합하여 마이셀을 형성하는 임계농도 이하에서도 위내 수소 이온의 역확산이 발생하고, 마이셀을 형성하는 임계농도 이상의 고농도에서도 지속적인 위점막 손상이 유발되는 점, 그리고 위산에 용해된 고농도의 TC가 세포막 성분의 손상을 거의 유발하지 않고 위점막의 방어벽을 손상시킨다는 사실을 들 수 있다.[9] 또한 래트 모델에서 TC의 경구 투여는 호중구와 호산구 등의 급성 및 만성 염증성 세포의 침윤을 촉진시킨다.[11,12] 따라서 이는 위상피세포 내에 담즙산 자극에 따른 세포 신호전달 경로가 있음을 시사하나 수술 후 잔위에서 담즙 역류의 특징적인 현상에 따른 여러 임상 및 실험 연구 결과에도 불구하고 분자생물학적 세포 손상기전에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

Nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 산화적 스트레스[13] 및 염증성 신호[14] 등의 세포 외 신호에 반응하여 발현되는 여러 유전자의 활성을 조절하는 Rel계 전사조절인자로 세포의 증식, 형질 변환, 종양 발생 등의 발암 과정에 관여한다.[15-18]

또한 NF-κB는 interleukin-8 (IL-8)[19]을 포함한 친염증성 싸이토카인인 IL-1β, IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α)의 발현을 관장하는 전사 촉진(promotor)부위에 결합하여 이들의 전사조절에 핵심적인 역할을 한다.[20,21] IL-8은 위 상피세포주에서 지속적으로 분비되는 C-X-C 케모카인(chemokine)의 일종으로 만성 위염의 병인에 중요한 염증 매개인자로 밝혀져 있다.[22]

본 연구는 위 상피세포주에서 타우린 포합(conjugation) 담즙산 자극 후 NF-κB의 활성도와 IL-8 발현의 변화를 알아보고자 하였다. 또한 담즙산 매개 IL-8 발현에서 NF-κB의 역할을 알아보고자 항산화 기능을 통하여 NF-κB의 활성화를 초기에 억제하는 레바미피드나 pyrollidine dithiocarbamate (PDTC)를 전처리하거나 antisense (AS)-oligonucleotide (ODN)를 위 상피세포주에 트랜스펙션(transfection)한 후 담즙산 매개 NF-κB의 활성화와 IL-8 발현의 변화를 분석하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 세포 배양

인체에서 기원한 위암세포주인 AGS 세포주(gastric adenocarcinoma, ATCC CRL 1739)와 Kato III 세포주(gastric adenocarcinoma, ATCC HTB 103)를 한국세포주은행(서울, 대한민국)으로부터 분양받아 10% 우태아혈청(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)과 항생제(페니실린 100 U/mL와 스트렙토마이신 100 μg/mL)가 함유된 RPMI-1640 배지(pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 배양하였다. 세포 배양은 37℃, 5% 이산화탄소 농도의 배양기에서 유지하였다.

2. 담즙산 자극 후 세포의 생존능과 증식지표

담즙산 자극 전후 AGS 세포주와 Kato III 세포주에서 세포의 생존능은 MTT [3.(4,5-dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay와 thymidine incorporation assay를 통하여 정량적으로 측정하였다. 배양된 세포에서 세포를 수거하여 tryphan blue를 처리한 뒤 용적당 세포 수를 계산하여 96 well-plate에 1×10^4/mL 세포를 분주하여 70% 80% 융합상태의 단층세포가 되도록 24시간 배양하였다. TC나 TCDC를 세포 배양액에 용해시켜 혈청이 없는 배지에 희석하여 2 μL의 pore size에 여과시키고 각각 0.5-5 mM, 0.1 1 mM의 농도로 96 well-plate에 첨가하였다. 양성 대조군으로 triton ×100 detergent를 40 μL 처리하였다. 시간에 따라 대조군과 담즙산 처리한 well의 세포배양액을 버리고 20 μL의 MTT를 96 well-plate에 첨가하였고 37℃에서 5-6시간 배양 후에 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 50% *N*,*N*-dimethylformamide가 함유된 75 μL의 lysate buffering solutin을 각 well에 첨가하여 37℃에서 overnight하였다. 2-3시간 동안 96 well-plate를 잘 혼합하여 595 nm 파장에서 발광도를 정량적으로 측정하였다. 담즙산 처리 24시간 후 세포의 생존능이 50% 감소하는 농도의 근사값을 최고농도로 설정하여 각 세포주에 최적 농도의 담즙산을 희석하여 시간별로 처리한 후에 Hansen 등[23]의 방법에 따라 처리하였다. Thymidine incorporation assay는 96 well-plate에 각 조건에 맞게 well당 1 μCi의 [^{3}H]-thymidine (NEN Life science, Boston, MA, USA)을 넣은 뒤 37℃, 10% 이산화탄

소 배양기에서 1-2시간 배양하였다. 세포수집기(Harvester)를 이용하여 각 샘플을 여과지에 부착시킨 뒤 여과지를 cocktail solution (Beckman, San Francisco, CA, USA)과 섞은 후에 liquid scintilation counter (Beckman)을 이용하여 측정하였다.

3. ODN의 준비

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

4. Cationic liposome을 이용한 ODN의 트랜스펙션

AGS 세포주에 AS-ODN과 S-ODN의 세포내 전달을 안정되게 하기 위하여 cationic liposome인 DOTAP [N-{1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl}-N,N,N trimethyl ammonium methyl-sulfate] (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany)을 이용하였다.[24] 1 mg/mL 농도의 DOTAP 24 μL, 25 μM농도의 ODN 32 μL, 그리고 HEPES buffered saline (pH 7.4, 20 mM HEPES, 150 mM HCl) 56 μL를 혼합하여 DOTAP과 ODN의 최종 농도가 각각 15 μL/mL, 0.5 μM이 되도록 하였으며 37℃에서 15분간 처리하였다. 최종 혼합물을 6-well plate내 우태아 혈청과 항생제가 함유된 배지에 2×10^5/mL씩 분주된 AGS 세포주에 직접 첨가하여 56시간 배양하였고 이후 80% 전후의 confluency를 확인하였다. 트립신을 이용하여 세포주를 부유시켜 수거한 뒤 24-well plate에 6×10^5/mL 농도로 다시 분주하여 ODN의 최종 농도가 0.5 μM이 되도록 세포에 첨가한 후 16시간 동안 배양하였으며 70-80%의 confluency를 확인하였다. 이후 항생제 없는 우태아 혈청 첨가 배지로 교환하여 각각 AS-ODN과 S-ODN으로 처리한 세포주에 TC (Sigma)나 taurochenodeocy cholic acid (TCDC, Sigma)로 자극 후 NF-κB의 활성도와 IL-8의 발현을 분석하였다.

5. IL-8단백의 정량적 측정과 자극 조건

두 종의 위상피세포주(AGS와 Kato III)가 50-60%의 subconfluency를 유지한 상태에서 담즙산 자극 24시간 전에 배지를 교환하였으며 실험 전에 70% confluency 이상의 단층세포군을 형성한 상태에서 TC (0.5, 5 mM)와 TCDC (0.1, 1 mM) 처리 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 후에 세포 상층액에서 ELISA를 이용하여 IL-8의 농도를 측정하였다. 96 well polystyrene plate에 mouse anti-human IL-8 monoclonal antibody (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 4 μg/mL로 희석된 것을 100 μL씩 넣고 실온에서 16시간 가량 반응시켰다. PBS용액(0.05% tween 20, pH 7.4)으로 3회 세척 후 1% BSA (PBS) 300 μL씩을 넣고 실온에서 한 시간 반응시켰다. Standard (31.25 2,000 pg/mL)와 각 조건별 상층액 sample을 100 μL씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. HRP-steptavidin conjugate (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 1：2,000으로 PBS에 희석하여 각 well에 100 μL씩 놓고 30분간 반응시켰다. PBS용액으로 세척 후 ABTS substrate kit (Zymed)를 사용하여 발색하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과의 분석 및 표준곡선은 softmax 프로그램 (Molecular devices, Garden Grove, CA, USA)을 이용하였다. 또한 TC와 TCDC 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF-κB의 역할을 알기 위하여 NF-κB의 억제제인 레바미피드 [rebamipide: 0.1, 0.5 mM; 2-(4-chlorobenzoylamino)-3-{2(1H)-quinolinon-4-yl} propionic acid] (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd. Tokushima, Japan)와 PDTC를 2시간 전처리한 후 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)로 자극하여 24시간 후 IL-8의 농도를 측정하였다. 또한 대조군 세포주와 더불어 AS-ODN와 S-ODN 처리한 AGS 세포주에서 TC(5 mM)와 TCDC (1 mM)로 자극 24시간 후 IL-8을 측정하여 비교하였다.

6. 핵단백질의 추출

AGS와 KATO III 세포주에서 핵단백의 추출은 Schreiber 등[25]의 방법을 이용하였다. 각각의 세포주를 10 cm petri dish에 분주하여 TC와 TCDC로 자극한 후 시간별로 세포를 원심분리하여 얼음 위에서 Tris-buffered saline (PBS; pH 7.9)으로 세척하였고 다시 400 μL의 버퍼A용액(10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCI, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM aprotinin, 14 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, and 80 μg of benzamidine/mL)에 재부유하였다. 얼음 위에서 15분 놓아 두고 Nonidet P-40(최종 농도, 1.0%)를 처리하여 10초간 잘 혼합하였다. 혼합물은 30초간 원심 분리(1,300 ×g)한 뒤 침전물을 50 μL의 버퍼C용액 {20 mM HEPES(pH 7.9), 0.4 M NaCI, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM aprotinin, 14 mM leupeptin, 1 mM pepstatin, and 80 μg benzamindine/mL}에 재부유하였다. 부유물은 4℃에서 15분간 강하게 섞어준 후 상층액을 수거하여 −80℃에 저장하였다. 실험 전에 핵단백의 정량은 Bradford[26]의 방법에 따랐다.

7. NF-κB 활성도 측정을 위한 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 자극 조건

NF-κB 결합 부위의 염기서열을 가진 ODN [5'-AGT

TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3'(Promega Corp., Madison, WI, USA)]을 T4 polynucleotide kinase (GIBCO BRL)을 이용하여 동위원소 표지자인 [^{32}P] dATP(Amersham, Piscataway, NJ, USA)로 표지하였다. Bio-Rad사의 정제 컬럼(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 결합되지 않은 [^{32}P] dATP를 정제한 뒤 말단에 [^{32}P] dATP가 표지된 프루브를 버퍼에 수집하였다. 1 μg의 핵단백을 12% glycerol, 12 mM HEPES (pH 7.9), 4 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.04 μ/L의 poly (dI-dC) (Behringer Mannheim), 0.4 mM PMSF와 Tris-EDTA 버퍼액이 함유된 버퍼에 배양하였다. 각각의 조건에 의해 만들어진 표본에 [^{32}P]가 결합된 프루브를 첨가하고 얼음 위에서 10분간 배양하였다. 이 혼합물을 0.5× Tri borate EDTA버퍼를 이용하여 비변성의 6% polyacrylamide gel에 상온에서 부하하여 30 mA에서 전기영동을 시행하였다.[27] 전기영동 후에는 젤을 80°C에서 건조시켜 암실 −70°C 조건에서 6 18시간 동안 방사선 필름에 노출시켰다. NF-κB의 구성을 확인하기 위해 두 종류의 Rel 단백인 p50과 p65에 대한 래비트의 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 핵 추출물로부터 supershift assay를 시행하였다. 항p50 또는 항p65 항체 2.5 μg을 30분간의 배양과 동시에 DNA 프루브와 함께 첨가하였다. NF-κB의 억제제인 레바미피드(0.1, 0.5 mM)와 PDTC 10 mM을 2시간 전처치한 후 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)로 자극 30분 후의 NF-κB의 활성도를 측정하여 비교하였다. 또한 TCDC (1 mM)로 자극 30분 후 대조군 세포주와 더불어 AS-ODN와 S-ODN을 트랜스펙션한 AGS 세포주에서 NF-κB의 활성도를 측정하여 비교하였다.

결 과

1. 타우린 포합 담즙산 자극 후 세포의 생존능과 증식지표

AGS 세포주와 Kato III 세포주에서 TC나 TCDC 처리 24시간 후 담즙산의 농도별 세포의 생존능을 MTT assay와 [^{3}H] thymidine incorporation assay를 통하여 측정하였다. MTT assay 결과 AGS 세포주와 Kato III 세포주에서 모두 TC나 TCDC에 농도 의존적으로 세포 생존능이 감소하였다 ($p<0.01$, Fig. 1). 고농도(TC; 5 mM, TCDC; 1 mM)의 담즙산 처리 후 대조군에 비하여 AGS 세포주의 생존능은 각각 26.5%와 23.4%이었으며 Kato III 세포주의 생존능은 20.5%와 24.9%이었다. Thymidine incorporation assay를 통한 AGS 세포주와 Kato III 세포주의 증식지표는 TC 자극 후 저농도(0.5 mM)에서 오히려 증가하였으나 고농도(≥2.5 mM)에서는 증식지표가 감소하여 농도에 따라 서로 다른 결과를 보였다(Fig. 2). TC와 달리 TCDC 자극은 AGS 세포주와 Kato III 세포주 모두에서 농도 의존적으로 세포 증식지표가 감소하였다($p<0.01$, Fig. 2).

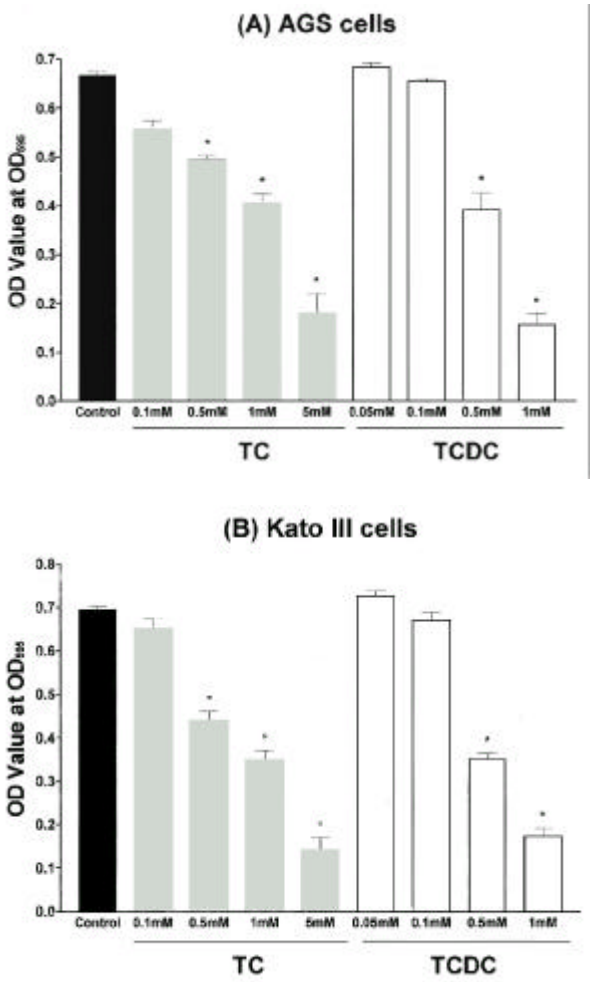

Fig. 1. Effect of TC or TCDC on survivals of AGS (A) and Kato III cells (B), determined by MTT assay. MTT positive viable cells expressed as the absorbance values at 595 nm. Treatment of TC or TCDC resulted in a dose-dependent suppression of both AGS and Kato III cells survival after 24 hours in culture. Each bar represents the mean standard error of three separate experiments (+$p<0.01$ vs. control).

2. 타우린 포합 담즙산 자극 후 시간 및 농도별 IL-8의 발현

AGS 세포주에서 각각 저농도(TC; 0.5 mM, TCDC; 0.1 mM)와 고농도(TC; 5 mM, TCDC; 1 mM)의 TC나 TCDC를 처리 후 시간별 IL-8의 농도를 측정하였다. AGS 세포주에서 저농도 TC 처리 후 상층액에서 측정한 IL-8은 12시간까지는 TC를 처리하지 않은 세포주(대조군 세포주)와 차이가 없었으나 24시간 후에 대조군 세포주에 비하여 증가하였다($p<0.01$, Fig. 3). 고농도 TC 처리 후 IL-8의 농도는

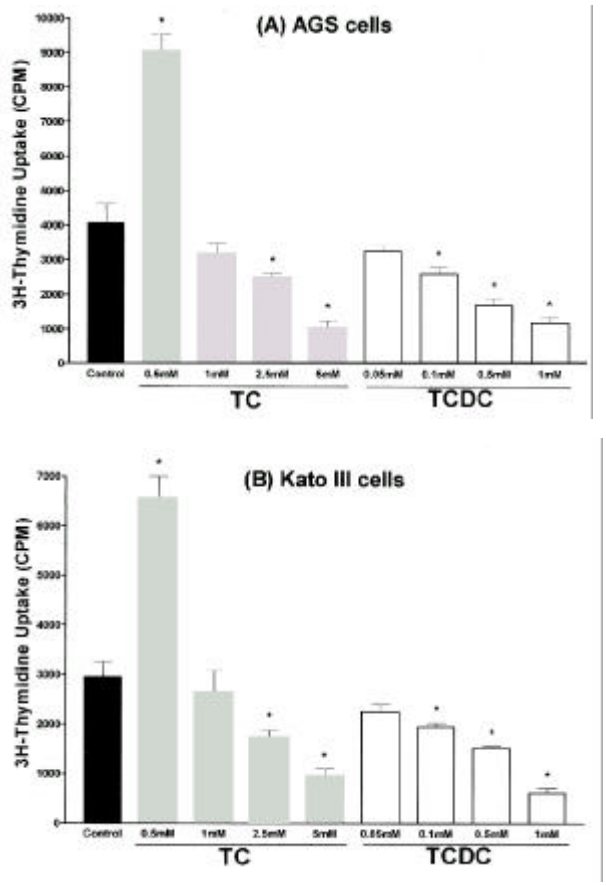

Fig. 2. Effect of TC or TCDC on cell proliferations of AGS (A) and Kato III cells (B), determined by thymidine incorporation assay. High concentration (>2.5 mM) of TC resulted in a significant decrease of cell proliferation, but low concentration (0.5 mM) of TC increased the cell proliferation in both cells. Treatment of TCDC resulted in a dose-dependent suppression of cell proliferation after 24 hours in culture. Each bar represents the mean standard error of three separate experiments (*p<0.01 vs. control).

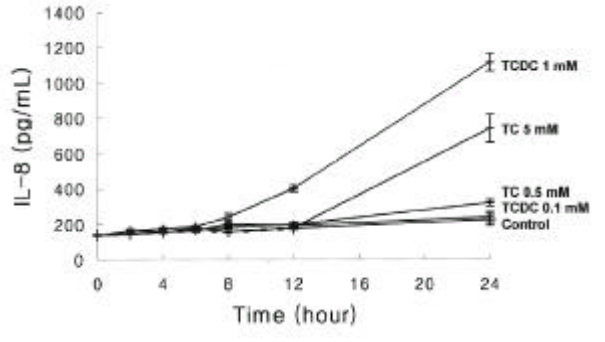

Fig. 3. Time courses of IL-8 production in AGS cells following stimulation with TC or TCDC. TC or TCDC significantly enhanced IL-8 production in a time-dependent manner. A statistically significant increase in IL-8 production was evident 12 hours after treatment with high concentration of TC or TCDC and continued during the subsequent 12 hours.

12시간 이후부터 현저히 증가하여 24시간 후에는 3.3배에 이르렀다($p<0.01$, Fig. 3). 저농도의 TCDC를 처리하였을 때 IL-8 발현의 변화는 없었으나 고농도 처리 후에는 8시간 이후부터 증가하기 시작하여 24시간 후에는 4.9배에 이르렀다($p<0.01$, Fig. 3).

3. 담즙산 자극 후 시간에 따른 NF-κB 활성도의 변화

AGS와 Kato III 세포주에 고농도의 TC (5 mM)와 TCDC (1 mM)를 처리한 후 시간별 NF-κB 활성도의 변화를 평가하였다. 또한 담즙산에 의해 활성화된 NF-κB 구성을 확인하기 위해 두 종류의 NF-κB 구성 단백인 p50과 p65에 대한 항체를 이용하여 supershift assay (Fig. 4)를 시행하였다. TC와 TCDC를 처리하지 않은 대조군 세포주에서 NF-κB의 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer가 약하나마 지속적으로 발현됨을 확인하였고 기저 상태에서 p50/p65 heterodimer에 비하여 p50/p50 homodimer의 밴드가 진하게 나타나 p50 subunit이 이들 세포주에서 나타나는 NF-κB의 주된 구성 성분임을 알 수 있었다(Fig. 5, 6). AGS 세포주에 TC나 TCDC를 처리하였을 때 NF-κB p50/p65 heterodimer의 결합활성은 15분 후부터 증가하여 각각 60분과 30분 후에 최고로 활성화되었고 120분 후부터 감소하였다(Fig. 5A). Kato III 세포주에서는 TC나 TCDC 처리 후 NF-κB p50/p65 heterodimer의 결합활성이 15분 후부터 증가하여 30분 후에 최대로 활성화되었고 120분 이후부터 감소하였다(Fig. 5B).

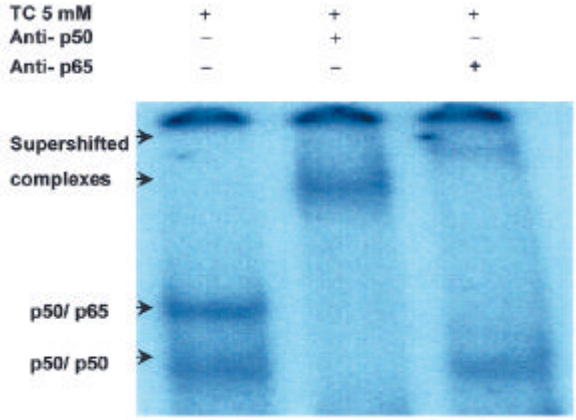

Fig. 4. Supershift assay. Supershift studies were performed to determine the Rel protein composition (p50, p65) of TC or TCDC-induced NF-κB dimers in AGS cells (30 min). The upper activated NF-κB band undergoes a partial supershift with anti-p50 (lane 2) and a nearly complete supershift with anti-p65 (lane 3). These results indicated that TC or TCDC resulted in nuclear translocation of two activated NF-κB dimers: the p50/p65 NF-κB heterodimer and p50/p50 homodimer.

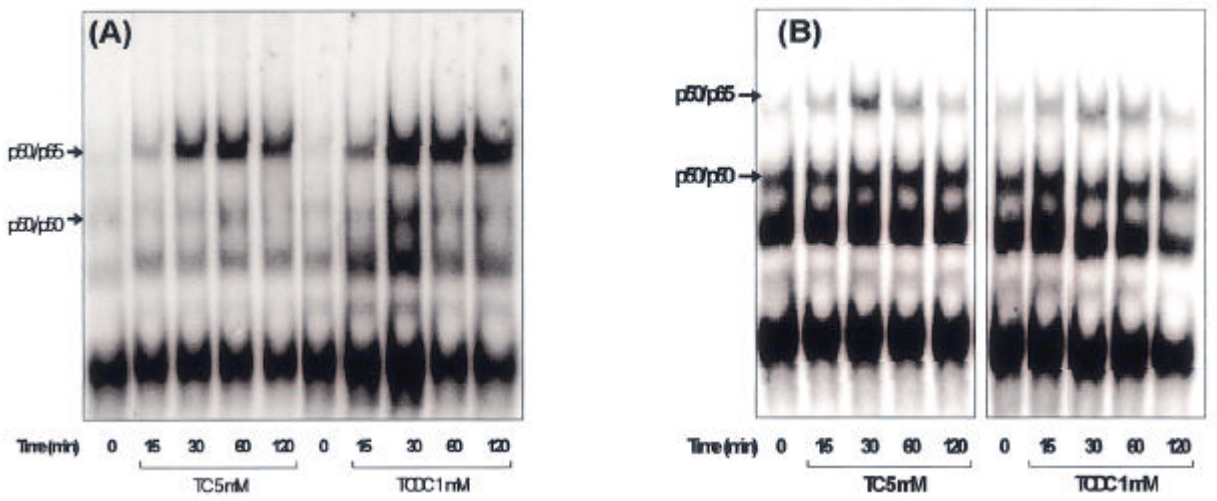

Fig. 5. Time courses of NF-κB activation in AGS (A) and Kato III (B) cell lines. TC and TCDC treatments significantly activate NF-κB binding activity in a time-dependent manner. NF-κB binding complex was detected early at 15 min, observed in higher levels at 30-60 min, and decreased 120 min after TC or TCDC stimulation in both cell lines.

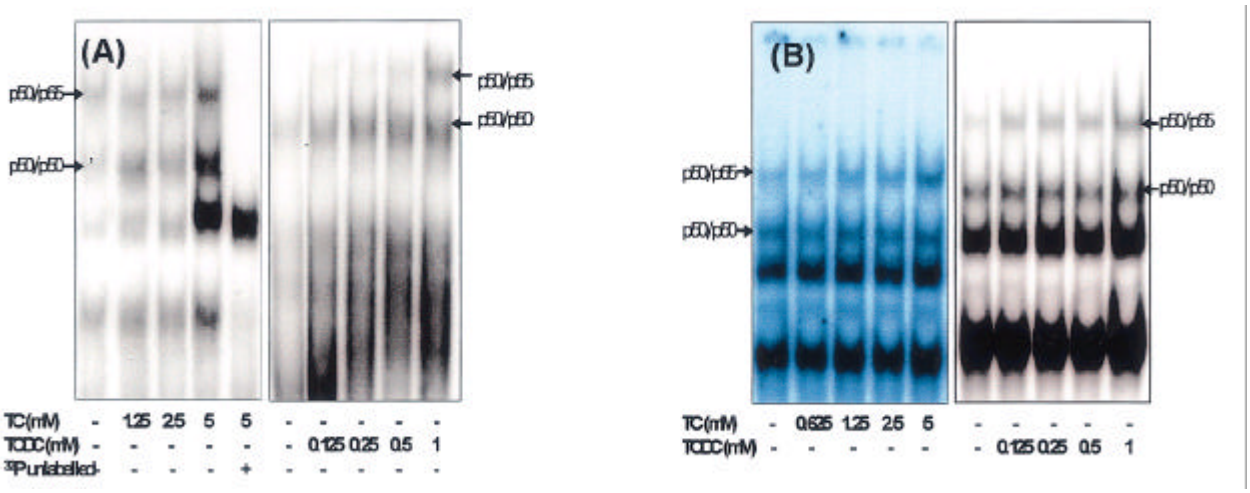

Fig. 6. Changes of NF-κB binding activity according to the concentrations of TC or TCDC in AGS (A) and Kato III (B) cell lines. With the higher concentrations of TC or TCDC stimulation, NF-κB binding activities gradually increase in both cell lines. The specificity of this inducible NF-κB-binding factor was confirmed by competition analysis with a 100-fold excess of unlabeled probe (wild-type NF-κB oligonucleotides, A; lane 5).

4. 담즙산의 농도에 따른 NF-κB 활성도의 변화

AGS와 Kato III 세포주에서 TC (1.25 5 mM)와 TCDC (0.125 1 mM)를 처리한 30분 후 농도별로 NF-κB의 활성도를 EMSA 방법으로 평가하였다. AGS 세포주에서 TC나 TCDC의 농도가 증가할수록 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 증가하였다(Fig. 6A). Kato III 세포주에서 TC나 TCDC 농도가 증가할수록 NF-κB p50/ p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer가 모두 활성화되었다(Fig. 6B). 한편 TC나 TCDC를 처리한 AGS 세포주로부터 얻은 핵단백에 ^{32}P방사능표지자를 부착하지 않은 고농도의 프루브를 처리하여 경쟁반응을 시켰을 때 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성이 완전히 억제되었다(Fig. 6A, lane 5).

5. NF-κB 억제제 전처리 후 담즙산 자극에 의한 NF-κB 활성도의 변화

AGS 세포주에서 NF-κB의 억제제인 레바미피드(0.1 1 mM)와 PDTC 100 μM의 2시간 전처리가 고농도의 TC (5 mM)나 TCDC (1 mM) 자극(30분)에 의한 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. TC 자극 후 증가하였던 NF-κB p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활

성은 전처치한 레바미피드의 농도가 증가할수록 억제되었으며 p50/p65 heterodimer의 억제가 p50/p50 homodimer보다 뚜렷하였다(Fig. 7). PDTC를 전처리한 후 TC를 처리하였을 때 p50/p65 heterodimer와 p50/p50 homodimer의 결합활성은 거의 완전히 억제되었다(Fig. 7). 또한 S-ODN을 트랜스펙션한 AGS 세포주에 비하여 AS-ODN을 트랜스펙션한 세포주에서 p50 subunit 밴드의 부분적인 억제가 관찰되었다(Fig. 8).

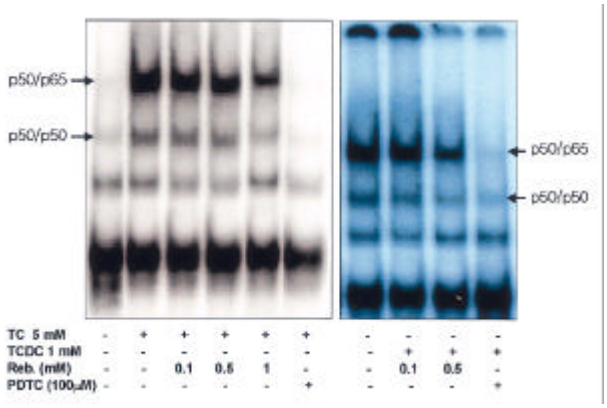

Fig. 7. Effects of rebamipide or PDTC on TC or TCDC-induced NF-κB binding activity. Pretreatment of rebamipide decreased NF-κB complex formation in a dose-dependent manner and PDTC pretreatment completely blocked TCDC-induced activation of NF-κB binding activity in AGS cells.

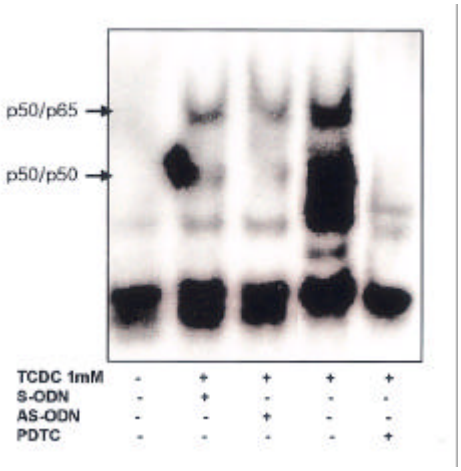

Fig. 8. Effects of p50 AS-ODN transfection on TCDC-induced NF-κB binding activity. In AGS cells, transfection with p50 AS-ODN showed significant inhibition of TCDC-induced NF-κB binding activity, compared with p50 S-ODN transfected cells.

6. NF-κB 억제제 또는 p50 subunit에 대한 AS-ODN 처리 후 담즙산 자극에 따른 IL-8 발현

타우린-포합 담즙산 매개 IL-8의 활성화에 미치는 NF-κB의 역할을 알기 위하여 NF-κB의 억제제인 레바미피드(0.1, 0.5 mM)와 PDTC (100 μM) 를 2시간 전처리한 후 TC (5 mM)나 TCDC (1 mM)로 24시간 자극한 후의 IL-8을 측정하였다. AGS 세포주에서 TC 자극에 의한 IL-8의 농도는 레바미피드를 0.1 mM로 전처치하였을 때 49% (530 pg/mL vs. 272 pg/mL, $p<0.01$), 0.5 mM에서는 56% (530 pg/mL vs. 233 pg/mL, $p<0.01$)의 의미 있는 감소를 보였으나, 전처치한 레바미피드 농도에 따른 차이는 보이지 않았다. 또한 PDTC를 전처리하였을 때에도 IL-8의 농도는 의미 있게 감소하였다($p<0.01$, Fig. 9). 레바미피드로 전처치한 후 TCDC로 자극한 경우에는 농도별로 각각 61% (0.1 mM)와 68% (0.5 mM)의 감소를 보였으며($p<0.01$, $p<0.01$, Fig. 9), PDTC를 전처리하였을 때도 유의하게 감소하였다($p<0.01$, Fig. 9). AS-ODN으로 처리한 AGS 세포주에서 TC나 TCDC 자극 24시간 후 IL-8의 농도는 S-ODN로 처리한 세포주에 비하여 모두 의미있게 감소하였다($p<0.05$, $p<0.05$, Fig. 9).

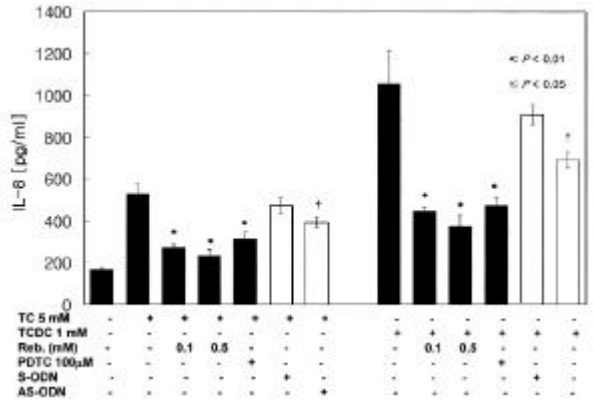

Fig. 9. Effects of NF-κB inhibitions on TC or TCDC induced IL-8 production in AGS cells. Rebamipide or PDTC caused significant decreases in TC or TCDC induced IL-8 production (*$p<0.01$ vs. positive control). AS-ODN transfected AGS cells showed significant inhibition of TC or TCDC induced IL-8 production, compared with S-ODN transfected cells ($p<0.05$).

Kato III 세포주에서 TC 자극 24시간 후 IL-8의 농도는 대조군 세포주의 573 pg/mL에 비하여 3.2배 증가하였다. 레바미피드를 전처치하였을 때 농도별로 각각 43% (0.1 mM)와 57% (0.5 mM)의 의미 있는 감소를 보였으며($p<0.01$, $p<0.01$), PDTC를 전처리하였을 때 IL-8의 농도는 534 pg/mL로 유의하게 감소하였다($p<0.01$, Fig. 10). TCDC로 자극한 경우 IL-8의 농도는 대조군 세포주에 비하여 2배 증가하였다(Fig. 10). 레바미피드 0.1 mM 전처치시에 IL-8의 농도는 차이가 없었으나 0.5 mM 전처치시에는 30% 감소하였으며 (1115 pg/mL vs. 778 pg/mL, $p<0.01$) PDTC를 전처리하였을 때 IL-8의 농도는 671 pg/mL로 의미 있게 감소하였다 ($p<0.01$, Fig. 10).

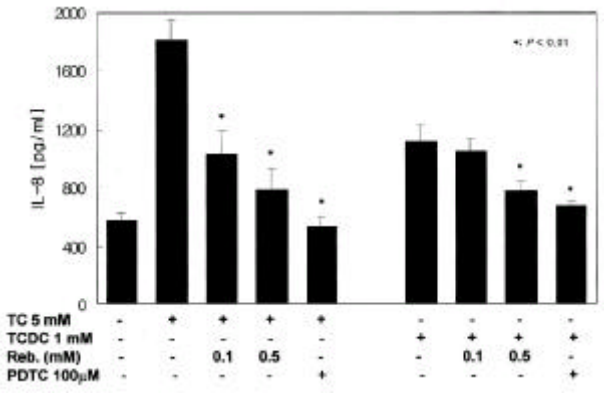

Fig. 10. Effects of NF-κB inhibitions on TC or TCDC induced IL-8 production in Kato III cells. Rebamipide of 0.5 mM significantly inhibited IL-8 production (*p<0.05 vs. positive control), but rebamipide of 0.1 mM showed no significant inhibition of TCDC induced IL-8 secretion. PDTC caused significant decreases in TC or TCDC induced IL-8 secretion (*p<0.01 vs. positive control).

고 찰

위의 부분절제술을 시행받은 환자에서 장관-위 역류(enterogastric reflux)는 수술 후 잔위염의 주요한 원인이 된다.[1,2] 수술 후 잔위의 위-장관 문합부를 중심으로 나타나는 내시경적인 소견과 특징적인 병리조직학적 소견[4]은 잔위염이 과도한 장관-위 역류와 관련된 뚜렷한 독립적인 질환임을 시사한다. 장관- 위 역류에 의한 증상이 있는 환자가 무증상의 환자보다 총담즙산의 농도가 높고, 수술 후 잔위의 인체 모델이나 개 동물 모델에서 담즙산의 농도와 양이 증가할수록 잔위염의 정도가 심하다는 연구 결과는 역류된 담즙 성분 중에서 담즙산이 중요한 위점막 손상 물질임을 의미한다.[28]

정상인에서 담즙산은 십이지장 내에서 식이에 따라 다양한 농도(2 10 mM)로 존재하며 장관 내의 담즙산이 위로 역류하여 나타나는 위점막의 손상 정도는 담즙산 성분에 따라 다양하다.[29,30] 담즙산은 간에서 2.5 : 1의 비율로 글리신(glycine)이나 타우린(taurine) 포합(conjugation) 과정을 거쳐 다양한 종류의 1차 담즙산 형태로 십이지장으로 분비된다.[31] 담즙산은 pH가 감소할수록 용해도가 감소하므로[32] 정상적인 위내 강산성 환경에서는 대개 침전된다. 하지만 위 부분절제술 후와 같이 장관-위 역류가 있어 위내 pH가 증가하게 되면 타우린 포합 담즙산은 글리신 포합 담즙산에 비하여 pKa값이 낮아(1.8 1.9 vs 4.3 5.2)[33] 위내 산성 환경에서 잘 침전되지 않고 위점막 손상을 잘 유발한다.[31] TC는 래트에서 혈관 확장을 통한 내인성 위점막 방어인자인 prostaglandin I_2의 합성을 억제하여 위점막 방어벽을 손상시키고 미란성 위염을 유발하는 것으로 알려져 있다.[34] 또한 소수성(lipophilicity)이 TC보다 강한 TCDC는 위상피세포 독성을 가져 심한 위점막 손상을 나타낸다.[35] 따라서 본 연구에서는 수술 후 잔위에서 비교적 고농도로 나타나는 타우린 포합 담즙산인 TC와 TCDC를 이용하여 실험을 진행하였다.

담즙염이나 담즙산은 세포막의 구성 성분인 지질을 용해(detergent effect)시켜 위점막을 대개 1분 내에 빠르게 손상시킨다.[9,10] 담즙에 의한 위점막 손상기전은 담즙이 위 세포막 투과도를 증가시켜 위 상피세포 내로 수소 이온의 역확산과 세포내 소디움 이온의 위내 확산이 증가되고 위 점막의 pH가 저하되어 점막 방어벽이 파괴된다.[5] 담즙염과 달리 담즙산은 이러한 기전과 더불어 위상피세포 신호전달경로를 통한 세포 손상을 유발시킬 가능성이 동물 실험을 통하여 제기되어 담즙산에 의한 위상피세포 손상이 마이셀 형성에 따른 세포막 지질의 용해뿐 아니라 다른 세포 손상을 매개하는 신호전달경로가 있음을 뒷받침한다.[5,9] 담즙산은 *in vitro*에서 세포막의 성분인 지질과 단백에 결합하는 것으로 밝혀져 있고 이러한 결합은 마이셀을 형성하는 임계농도 이하에서도 발생하여 세포막의 효소 활성이나 투과도를 변화시킨다.[34] 따라서 이러한 연구 결과는 담즙산이 위상피세포에 축적되어 세포내 pH를 감소시키거나 세포질 내의 소기관에 축적되어 세포대사를 저해하며 이 과정에서 담즙산 매개 손상을 유도하는 세포내 신호전달체계가 존재할 가능성을 강력히 시사한다.[34]

NF-κB는 p50 (NF-κB1), p52, Rel A, c-Rel 또는 rel-B의 조합으로 구성되는 Rel계 전사조절인자이다. NF-κB는 바이러스, 세균, mitogen, 염증성 싸이토카인, 산소자유기를 내는 물질 등의 자극에 의하여 세포질 내에서 활성화되어 세포 외 자극을 핵 내로 전달한다.[13,14] 휴지기 상태에서 세포질 내의 억제 단백인 IκB와 비공유 결합의 형태로 존재하는 NF-κB는[13] 활성화 자극에 의하여 IκB와 분리되어 핵내로 이동하고 목표 유전자의 DNA 결합 부위에 결합하여 유전자의 전사를 조절하게 된다. IL-8은 C-X-C 케모카인의 일종으로 백혈구의 이동과 활성화를 유도하여 다양한 염증성 질환의 병인에 중요한 역할을 담당한다.[19] 위상피세포주에서 IL-8은 주요한 숙주 염증매개 물질로 알려져 있으며 친염증성 싸이토카인인 IL-1β, TNF-α 등의 자극에 의해서도 활성화된다.[36] 또한 IL-8은 최근 *in vitro*와 *in vivo*에서 혈관내피세포의 화학주성과 증식을 유도하는 잠재적인 혈관생성인자로 보고되고 있다.[37] 다양한 인체 암 세포주나 고형암에서 IL-8의 발현이 보고되었고[38,39] 동물실험을 통해서는 인체 악성 흑색종 세포주의 혈관생성과 전이를 촉진하는 것으로 밝혀졌다.[38] 특히 Kitadai 등[40]은 nude mice에 이식한 인체 위암 세포주의 혈관생성 정도와 IL-8의 단백발현 정도 간의 유의한 상관성을 보고하여 IL-8이 위암의

전이 과정에서 중요한 혈관생성인자로 작용할 가능성을 시사하였다. 이러한 IL-8의 유전자 발현에는 NF-κB나 activation protein-1 (AP-1) 등의 전사 활성화 인자가 핵심적인 역할을 한다.[19] 또한 NF-κB의 억제제는 인체 난소암 세포주에서 혈관생성을 촉진하는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)와 IL-8의 발현을 억제하는 것으로 밝혀져 종양의 성장과 전이에 NF-κB 매개 IL-8의 활성화가 중요한 세포 신호전달경로로 작용함을 시사하였다.[41] 이러한 NF-κB는 일부 위암 세포주에서 지속적으로 일정한 수준으로 핵 내에서 p50/p65 heterodimer나 p50/p50 homodimer의 형태로 관찰된다. 특히 본 실험에서 이용된 AGS 세포주에서 *Helicobacter pylori* 자극에 의하여 NF-κB의 고전적인 subunit으로 알려진 p50/p65 heterodimer나 p50/p50 homodimer가 핵 내에서 증가되고 NF-κB 매개에 의한 친염증성 싸이토카인인 IL-8단백의 발현이 증가되어 위상피세포주에서 중요한 세포 신호전달경로로 작용함을 알 수 있다.[42,43]

본 연구 결과 두 종류의 위상피세포주에서 타우린 포합 담즙산 처리 60분 이내의 초기에 NF-κB의 p50/p50 homodimer에 비하여 p50/p65 heterodimer가 주로 활성화되었고 이에 의하여 IL-8의 발현이 증가함을 관찰하였다. 최근의 연구에 의하면 NF-κB p65 subunit은 NF-κB p50 subunit과 달리 transactivation domain을 함유하여 κB 부위에서 전사를 활성화시킨다.[44] 따라서 담즙산 자극에 의한 NF-κB의 p50/p65 heterodimer 매개에 의한 IL-8 발현의 활성화는 위상피세포에서 염증의 증폭에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 담즙산에 의한 위점막 손상의 임상적 모델인 수술 후 잔위염 환자에서 특징적으로 나타나는 융모성 선와의 증식이나 점막 모세혈관의 혈관확장 등[4]의 조직병리 소견은 본 연구 결과와 연관지어 담즙산에 의한 NF-κB 매개 IL-8의 활성화에 따른 2차적인 변화일 가능성을 추론할 수 있다. 특히 수술 후 잔위에서 오랜 기간이 경과된 후에 위-공장 문합부의 용종이나 잔위암의 발생이 정상인보다 흔한 사실의 일부를 설명해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 NF-κB의 억제제인 레바미피드와 PDTC의 전처리를 통하여 타우린 포합 담즙산 자극에 의하여 유도되는 NF-κB 및 IL-8 발현의 변화를 평가하였다. NF-κB의 활성화는 과산화수소 등의 반응성 산소기를 포함한 산화적 스트레스에 의하여 유도되며[13] N- acetylcysteine과 같은 항산화제에 의하여 활성화가 억제된다.[45] 레바미피드는 다양한 궤양 유발 자극으로 활성화된 반응성 산소기를 소거하고 친염증성 싸이토카인의 생산을 억제함으로써[46] 위점막의 급성 손상을 억제하는 효과적인 약제로 알려져 있다.[47] 본 연구에서 레바미피드는 위상피세포주에서 타우린 포합 담즙산 자극에 의하여 유도된 NF-κB 매개 IL-8의 활성화를 각각 0.1, 0.5 mM 농도에서 유의하게 억제하였고 이러한 농도는 인체에서 상용량을 복용하여 위점막 내에서 관찰되는 농도로 약물동력학 연구 결과 밝혀져 있다.[48] 따라서 레바미피드는 타우린 포합 담즙산에 의한 위상피세포 손상 과정에서 NF-κB의 활성화 억제를 통한 친염증성 싸이토카인인 IL-8 단백의 발현을 억제할 수 있는 효과적인 약제로 생각하였다. PDTC는 반응성 산소기를 소거함으로써 NF-κB의 상위 조절성 결합 부위에 작용하여 NF-κB 매개 전사 활성화를 억제한다.[47] 본 연구 결과 PDTC는 타우린 포합 담즙산에 의한 NF-κB의 p50/65 heterodimer 및 p50/p50 homodimer의 결합활성도를 거의 완전히 억제하였고 IL-8 단백의 발현도 효과적으로 억제하였다. 따라서 타우린 포합 담즙산에 의한 위상피세포 손상은 NF-κB 매개 IL-8 발현의 활성화를 통한 세포 신호전달경로가 관여함을 확인하였고 NF-κB 활성화의 상위 기전으로 반응성 산소기가 관여할 가능성을 간접적으로 알 수 있었다.

AS-ODN은 15 25개의 염기쌍으로 이루어진 합성 분자물질로 목표 유전자에서 전사된 mRNA에 상보적인 단일 사슬의 DNA로 구성된다. AS-ODN은 상보적인 구조를 가진 목표 mRNA에 염기쌍을 이루어 duplex 구조를 형성하여 유전자 발현을 억제한다.[49] 목표 유전자의 발현을 억제하는 기전으로는 유전자 전사나 번역 과정의 입체적인 억제, mRNA의 processing이나 splicing 과정의 차단, 또는 Rnase H의 활성화를 통한 mRNA의 변성 등으로 알려져 있다.[50] ODN의 다른 이점으로는, 인산화 결합 부위의 비연결성 산소(nonbridging oxygen)를 황(sulfur)으로 대체시켜 phosphorothioate 변형 형태의 ODN을 합성할 수 있는데 이는 내인성 핵분해 효소(nuclease)로부터의 파괴에 저항성을 가져 인위적인 기능 개선이 가능하다.[51] 따라서 AS-ODN은 단일 유전자나 전사 산물에 결합하여 해당 유전자의 발현을 효과적으로 억제하고 부작용을 최소화한다. 본 연구에 사용한 위상피암 세포주에서는 NF-κB dimer인 p50/65 heterodimer와 p50/p50 homodimer가 발현되는 것으로 알려져[43,52,53] 본 연구에서 이용된 NF-κB의 p50 subunit에 대한 AS-ODN은 NF-κB의 발현과 NF-κB가 조절하는 유전자를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각하였다. 실험 결과 AS-ODN으로 처리한 AGS 세포주는 S-ODN으로 처리한 세포주에 비하여 TC 또는 TCDC 자극 후 NF-κB p50 subunit의 활성도와 IL-8의 단백 발현이 효과적으로 억제되어 담즙산에 의한 위상피세포주 손상이 NF-κB 매개 IL-8의 활성화 경로에 따른 것임을 재차 확인하였다.

결론적으로 타우린 포합 담즙산에 의한 위상피세포주 손상 과정은 NF-κB 매개 IL-8의 활성화가 중요한 역할을 하며 이러한 세포 신호전달경로는 위부분절제술 후의 담즙

역류성 잔위염의 주요한 분자생물학적 기전으로 생각되었다. 또한 타우린 포합 담즙산에 의한 NF-κB 매개 IL-8의 활성화는 수술 후 잔위에 나타나는 위상피세포의 증식성 변화와 더불어 잔위의 용종이나 암 발생 과정을 설명할 수 있는 가능성있는 세포 신호전달경로로 생각되며 이와 관련되어 향후 많은 연구가 진행되기를 기대한다.

요 약

목적: 담즙은 세정 작용에 의하여 상피세포막의 구성 성분인 지질을 용해시키고 수소 이온을 세포 내로 역류시켜 점막 방어벽을 손상시키는 것으로 알려져 있으나 담즙산 매개 위상피세포 손상에 관여하는 세포 신호전달경로에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 본 연구는 간에서 합성되어 장으로 분비되는 담즙산 중에서 비교적 고농도로 존재하는 타우로콜릭산(TC)과 타우로케노데옥시콜릭산(TCDC)을 이용하여 위상피세포주를 자극한 후 대표적 친염증성 싸이토카인으로 알려진 interleukin-8 (IL-8)의 발현 여부와 IL-8 유전자의 핵심적인 전사조절인자로 알려진 nuclear factor kappa B (NF-κB)의 억제제를 이용하여 IL-8의 발현에 대한 NF-κB의 역할을 규명하고자 하였다. **대상 및 방법**: AGS와 Kato III 위상피세포주에 TC와 TCDC를 각각 고농도와 저농도로 투여한 뒤 시간별로 NF-κB 및 IL-8의 발현을 정량적으로 분석하였고 NF-κB의 억제제인 레바미피드와 PDTC를 전처리하거나 NF-κB의 anti-sense (AS) oligonucleotide (ODN)를 위상피세포주에 트랜스펙션한 후 NF-κB의 활성도와 IL-8의 발현의 변화를 분석하였다. **결과**: AGS와 Kato III 위상피세포주에 TC나 TCDC 자극 후 IL-8의 농도는 시간별, 농도별로 증가하였고 TC와 TCDC 자극 24시간 후 각각 3.3배, 4.9배의 증가를 나타내었다. AGS와 Kato III 세포주에서 TC나 TCDC 자극 15분 후부터 NF-κB의 활성도가 증가하기 시작하여 30 60분 사이에 최대로 활성화되었다가 120분 후부터는 감소하였다. 담즙산의 농도가 증가할수록 NF-κB의 활성도가 높았다. AGS와 Kato III 세포주에서 NF-κB의 억제제인 레바미피드와 PDTC를 전처리하였을 때와 AGS 세포주에서 NF-κB의 p-50 subunit에 대한 AS-ODN 처리를 통하여 NF-κB 활성을 억제하였을 때 NF-κB의 활성화 감소와 더불어 IL-8의 발현이 유의하게 감소하였다. **결론**: 타우린 포합 담즙산에 의한 위상피세포 손상의 세포 신호전달경로로 NF-κB 매개에 의한 IL-8의 발현의 활성화가 중요한 역할을 하며 담즙 역류성 위염의 가능성 있는 분자생물학적 기전으로 생각하였다.

색인단어: 타우린 포합 담즙산, NF-κB, Interleukin-8, 위상피세포주

참 고 문 헌

1. Ritchie WP Jr. Alkaline reflux gastritis: an objective assessment of its diagnosis and treatment. Ann Surg 1980; 192:288-298.
2. Ritchie WP Jr. Alkaline reflux gastritis: a critical reappraisal. Gut 1984;25:975-987.
3. Ritchie WP Jr, Cheng JW, Delaney JP. Changes in parietal and chief cell populations following vagotomy and antrectomy. Surg Forum 1969;20:319-20.
4. Dixon MF, O'Connor HJ, Axon AT, King RF, Johnston D. Reflux gastritis: distinct histopathological entity? J Clin Pathol 1986;39:524-530.
5. Duane WC, Wiegand DM. Mechanism by which bile salt disrupts the gastric mucosal barrier in the dog. J Clin Invest 1980;66:1044-1049.
6. Thomas AJ, Nahrwold DL, Rose RC. Detergent action of sodium taurocholate on rat gastric mucosa. Biochim Biophys Acta 1972;282:210-213.
7. Lillemoe KD, Kidder GW, Harmon JW, et al. Tauroursodeoxycholic acid is less damaging than taurochenodeoxycholic acid to the gastric and esophageal mucosa. Dig Dis Sci 1983;28:359-364.
8. Slomiany BL, Aono M, Murty VL, Piasek A, Slomiany A. Effect of bile acids on the glycoprotein constituent of gastric mucus. J Appl Biochem 1984;6:308-313.
9. Duane WC, Wiegand DM, Sievert CE. Bile acid and bile salt disrupt gastric mucosal barrier in the dog by different mechanisms. Am J Physiol 1982;242:G95-G99.
10. Schweitzer EJ, Harmon JW. Experimental gastritis: are the detergents on or in the mucosa? Am J Physiol 1986;G870-872.
11. Kishimoto S, Kobuke K, Kobayashi H, et al. Further study of mucosal repair by sulfacone in experimental gastritis. J Clin Gastroenterol 1990;12(Suppl.1):181S-186S.
12. Mochizuki S, Matsumoto M, Wakabayashi S, Kosakai K, Tomiyama A, Kishimoto S. Therapeutic effect of egualen sodium (KT1-32), a new antiulcer agent, on chronic gastritis induced by sodium taurocholate in rats. J Gastroenterol 1996;31:785-792.
13. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. EMBO J 1993;12:2005-2015.
14. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-κB: ten years after. Cell 1996;87:13-20.
15. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. J Mol Med 1996;74:749-769.

16. Sharma HW, Narayanan R. The NF-kappa B transcription factor in oncogenesis. Anticancer Res 1996;16:589-596.
17. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr. A requirement for NF-kappa B activation in Bcr-Abl-mediated trasnsformation. Genes Dev 1998; 12:968-981.
18. Duffey DC, Chen Z, Dong G, et al. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-κBα of NF-κB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression and tumor growth in vivo. Cancer Res 1999;59:3468-3474.
19. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. J Leukocyte Biol 1994;56:554-558.
20. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS Jr. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. Mol Cell Biol 1993;13:3301-3310.
21. Zhang Y, Broser M, Rom W. Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF IL 6 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3632.
22. Hayashi S, Sugiyama T, Amano K, et al. Effect of rebamipide, a novel antiulcer agent, on *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1895-1899.
23. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989;119:203-210.
24. Lappalainen K, Urtti A, Soderling E, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Syrjanen S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. Biochem Biophys Acta 1994;1196:201-208.
25. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. Nucleic Acids Res 1989;17:6419.
26. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Angl Biochem 1976;72: 248-254.
27. Li JJ, Westergaard C, Ghosh P, Colburn NH. Inhibitors of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response. Cancer Res 1997;57:3569-3576.
28. Cabrol J, Navarro X, Sancho J, Simo-Deu J, Segura R. Bile reflux in postoperative alkaline reflux gastritis. Ann Surg 1990;211:239-243.
29. Masci E, Testoni PA, Fanti L, Guslandi M, Zuin M, Tittobello A. Duodenogastric reflux: correlations among bile acid pattern, mucus secretion, and mucosal damage. Scand J Gastroenterol 1987;22:308-312.
30. Ritchie WPJr, Felger TS. Differing ulcerogenic potential of dihydroxy and trihydroxy bile acids in canine gastric mucosa. Surgery 1981;89:342-347.
31. Northfield TC, McColl I. Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. Gut 1973;14:513-518.
32. Gu JJ, Hofmann AF, Ton-Nu HT, Schteingart CD, Mysels KJ. Solubility of calcium salts of uncojugated and conjugated natural bile acids. J Lipid Res 1992;33:635-646.
33. Fini A, Roda A. Chemical properties of bile acids. IV. Acidity constants of glycine-conjugated bile acids. J Lipid Res 1987;28:755-759.
34. Kishimoto S, Ogawa M, Takaba N, et al. Experimental model of gastritis induced by sodium taurocholate in rats. Hiroshima J Med Sci 1986;35:143-147.
35. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochem Biophys Acta 1975;415:29-79.
36. Lindholm C, Quiding-Jarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. Local cytokine response in Helicobacter pylori-infected subjects. Infect Immun. 1998;66:5964-5971.
37. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science 1992;258:1798-1801.
38. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. Cancer Res 1994;54:3242-3247.
39. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. J Gastroenterol 1994;29:423-429.
40. Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, et al. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. Br J Cancer 1999;81:647-653.
41. Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor-kappa B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. Cancer Res 2000;60: 5334-5339.

42. 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.
43. Kim H, Seo JY, Kim KH. Inhibition of lipid peroxidation, NF-κB activation and IL-8 production by rebamipide in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. Dig Dis Sci 2000;45:621-628.
44. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune response. Annu Rev Immunol 1998;16:225-260.
45. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, et al. Rebamipide attenuates indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation by inhibiting activation of leukocytes in rats. Dig Dis Sci 1997;42:319-325.
46. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. Eur J Pharmacol 1987;142:23-29.
47. Naito Y, Yoshikawa T, Iinuma S, et al. Local gastric and serum concentrations of rebamipide following oral administration to patients with chronic gastritis. Arzneimittelforschung 1996;46:698-700.
48. Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage conony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. Blood 1996;88:3482-3490.
49. Milligan JF, Matteucci MD, Martin JC. Current concepts in antisense drug design. J Med Chem 1993;36:1923-1937.
50. Crooke ST. Therapeutic applications of oligonucleotides. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1992;32:329-376.
51. Brown DA, Kang SH, Gryaznov SM, et al. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxy- nucleotides on specific protein binding. J Biol Chem 1994;269:26801-26805.
52. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997;113:1099-1109.
53. Kim H, Seo JY, Kim KH. Effects of mannitol and dimethylthiourea on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production in gastric epithelial cells. Pharmacology 1999;59:201-211.