

사람섬유아세포의 Transforming growth factor- β 1과 Nitric oxide 생성에 미치는 *Helicobacter pylori* 항원의 효과

박무인* · 박선자 · 구자영 · 김광혁¹

고신대학교 의과대학 내과학교실
¹미생물학교실

Effects of *Helicobacter pylori* Antigen on Producton of Transforming growth factor- β 1 and Nitric oxide in Human Fibroblast

Moo In Park*, Seun Ja Park, Ja Young Koo, Kwang Hyuk Kim¹

Department of Internal Medicine, ¹Microbiology, Kosin Medical College, Kosin University

Abstract

Cytokines are hormone-like proteins which mediate and regulate inflammatory and immune responses. Transforming growth factor- β (TGF- β) plays an important role in the control of the immune response and wound healing, and in the development of various tissues and organs. Nitric oxide(NO) is a major messenger molecule regulating immune function and blood vessel dilation and serving as a neurotransmitter in the brain and peripheral nervous system. Also, NO is to be a potent mutagen that causes mutation in the p53 tumor suppressor gene in early phases of human gastric carcinogenesis. The purpose of this study was to investigate the effect of *Helicobacter pylori* lysates, lipopolysaccharide (LPS), and *Staphylococcus enterotoxin B*(SEB) on production of TGF- β 1 and NO by human fibroblasts.

Primary cultured human fibroblasts were incubated with *H. pylori* lysates(Hp), LPS, SEB, Hp+LPS, Hp+SEB, Hp+LPS+SEB. Culture supernatants that were collected at 24, 48, and 72 hr were assessed for TGF- β 1 by enzyme-linked immunosorbent assay and NO production by quantification of nitrite ion.

TGF- β 1 production in fibroblasts exposed with Hp, LPS or SEB for 48 hrs was enhanced, but for 72 hrs inhibited. Its production by double exposure such as Hp+LPS, Hp+SEB, Hp+LPS+SEB was lowered in comparison with single exposure of Hp in cases of 24 and 48 hrs incubation, but for 72 hrs decreased in Hp vacuolating toxin(+), increased in Hp vacuolating toxin(-).

NO production in fibroblasts increased at all doses of LPS. But its production by exposure of SEB increased or decreased according to dose and incubation time. Also, NO production by Hp vacuolating toxin(+) increased at all doses, but its production by Hp vacuolating toxin(-) decreased. Its production by double exposure such as Hp+LPS, Hp+SEB, Hp+LPS+SEB decreased in comparison with single exposure of Hp. Therefore, quantities of TGF- β 1 and NO released by human fibroblasts shows differences according to kinds of stimulants. Also, in case stimulated with same

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (051) 240-6278, Fax : (051) 248-5686
E-mail : mipark@ns.kosinmed.or.kr

kinds of stimulants, its productions exhibit quantitative differences according to exposure times. These results suggest that the decrease of TGF- β 1 in fibroblasts by mixed exposure with Hp producing vacuolating toxin and bacterial toxins such as LPS and SEB may effect negatively in healing of host tissue and the increase of NO by infection of *H. pylori* may relate to the increased susceptibility for human gastric carcinogenesis

Key words – *H. pylori*, LPS, SEB, TGF- β 1, nitric oxide

서 론

Transforming growth factor- β (TGF- β)는 Roberts 등[33]에 의해서 Moloney murine sarcoma virus로 형질전환된 3T3세포의 산물로서 발견되었으며 섬유아세포를 비롯하여 비교적 다양한 세포들에서 생성되고 있다. 즉, myocytes, chondrocytes, astrocytes, 상피세포 등이 포함된다[27]. 또한 사람 glioblastoma와 같은 세포에서도 분리되어 tumor-inducing factor-1(TIF-1)으로 동정된 바 있으며[19] 소뼈에서 분리되어 cartilage-inducing factors(CIF-A와 CIF-B)로서 분리된 바 있다[36]. 분자적구조의 관찰결과 CIF-A는 TGF- β 1과 동일하였으며 CIF-B는 TGF- β 2임이 밝혀졌다[23]. 발견초기에는 TGF- β 가 악성형질전환이나 종양형성에 관련성을 가지고 있는 것으로 주로 언급되었으나 현재는 종양세포뿐만 아니라 정상 혹은 형질전환된 대부분의 세포들에서 생물학적 활성들을 나타내며 많은 세포생리적 과정을 조절하는 것으로 알려지고 있다[4,10,20]. 따라서 TGF- β 에 의한 생물학적 반응은 복잡할 뿐만 아니라 세포의 종류와 생리적 조건들에 따라서 바뀌게 된다. 더욱이 TGF- β 는 면역반응과 상처치유의 조절, 조직과 기관들의 발육 등에서 중요한 역할을 담당하고 있다[34,37]. 이와같이 TGF- β 의 다기능성에 대하여 많은 보고들이 있는 가운데서도 내인성 TGF- β 의 발현은 종양발육에서 중요한 역할을 담당할 것이라는 증거들이 늘어나고 있는데, 이는 TGF- β 1의 발현이 종양에서 증가되어 나타나고 있다는 보고들(시험관 혹은 생체실험)이 이를 뒷받침하고 있다[12,15,18,29,41]. 현재까지 종양발육에 대한 TGF- β 의 관련성은 TGF- β 발현이 증가됨에 따라 암의 유발보다는 종양세포의 증식율이 상승될 가능성과 국소적으로 면역억제력의 증가로 인한 종양발육에 유리한 조건이 주어질 가능성이 언급되고 있다[3,9].

Nitric oxide(NO)는 사이토카인이나 미생물의 영향을 받아 대식세포, 호중구, 혈관내피세포, 활막표층세포, 활막섬

유아세포, 연골세포 등에서 생성되는 반응질소중간체(reactive nitrogen intermediates, RNI)로서 nitric oxide synthase(NOS)가 산소와 결합하여 L-알지닌을 산화시켜 NO가 생성된다. 생성된 NO는 생체내에서 혈관이완물질, 신경전달물질, 면역기능조절물질로서 작용할 뿐만 아니라 패혈증이나 염증반응에 관련하게 된다. 즉, 면역염증반응을 통한 항미생물작용 혹은 항암작용을 일으키는 것으로 알려져 있으며 이러한 독작용은 미토콘드리아 기능 억제, FeS 함유 효소기능 저하, DNA손상 등의 작용에 의하여 나타나기 때문에 과량의 NO생성시 정상조직에 손상을 주게 된다. 내피세포나 혈관 연조직세포들은 감염과정에서 내독소(endotoxin), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 혹은 interferon- γ (IFN- γ) 등에 반응하여 NO를 생성할 수 있다[11,44,42,28,22,21,1,2,5]. NO의 방출은 현재 패혈성환자에서 저혈압과 속의 주요인자로 생각되고 있다[6,31]. 사이토카인에 의해서 활성화된 순환성 대식세포 또한 NO를 생성함으로써 세포독성에 관련을 갖고 있다[7,8,14,16,17,24,30,38,39,44]. 호중구 또한 NO를 생성한다는 것은 쥐의 백혈구 실험들에서 보고되고 있다[35].

Marshall 등[25]에 의해서 그람음성, 미호기성, 만곡형 간균인 *Helicobacter pylori*가 1983년 호주에서 처음 분리된 이래로 이 균은 위내에 서식하면서 만성위염, 위십이지장궤양, 위암 등과 관련을 가지고 있는 것으로 간주되고 있다[13,26,32,43].

본 실험에서는 초대배양한 정상인의 섬유아세포에 위궤양의 원인균인 *H. pylori* 항원을 노출시켰을 때 생성되어 나타나는 transforming growth factor- β (TGF- β 1)와 nitric oxide(NO)를 정량분석하여 *H. pylori* 감염시 생체내 섬유아세포가 나타내는 이들 물질생성에 대한 생물활성을 이해하고자 한다. 또한 이들 세포에 *H. pylori* 항원이나, 그람 양성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide (LPS), 그람 양성균인 황색포도상구균의 staphylococcal enterotoxin B(SEB)

를 단독 노출 혹은 혼합 노출시켜 배양시켰을 때 나타나는 TGF- β 1과 NO를 정량적으로 분석함으로써 독소의 종류 및 배양시간에 따른 차이를 알아내어 감염으로 인한 섬유아세포로부터의 TGF- β 1과 NO생성양상을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

섬유아세포의 배양

정상인의 피부로부터의 조직절편, 경부로 부터의 조직절편 2-5 mm³ 를 무균적으로 생검하여 1 mm³ 크기로 절편한 후 조직을 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 10 % 추가하여 만든 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco, Grand Island, USA) 2 ml을 적하한 60 mm 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, USA)에 정치하고 멸균된 cover slip으로 고정된 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에 넣어 3-4일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 약 3주 후에 배양용 접시 전체에 단층으로 형성된 섬유아세포로부터 배지를 흡입하여 버리고 인산완충염수로 1회 세척한 후 0.25% trypsin 0.3 ml을 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 박리된 세포들은 10% FCS EMEM 으로 재부유시켜 TGF- β 1 및 NO생성세포로 사용하였다.

섬유아세포 배양상층액의 준비

LPS, SEB 및 *H. pylori* 항원의 준비

*H. pylori*균은 세포공포독소생성양성(KR2067) 혹은 음성(KMC96)인 균주로 구분하여 brain heart infusion agar (brain heart infusion agar with 0.1% yeast extract and 5% human packed red blood cell)에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일 동안 배양한 다음 균만을 수거하였다. 수거된 균을 PBS로 3회 원심세척하였다. 세척된 균액은 100watt에서 30초씩 3회 초음파분쇄하여 단백질량을 실시한 후 사용하였다. Lipopolysaccharide(LPS)와 *Staphylococcus enterotoxin B*(SEB)는 Sigma 사(Sigma, St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

TGF- β 1 및 NO의 생성

부유시킨 섬유아세포(2.5×10^5 /ml) 1 ml씩을 24 wells 배양판(Corning, NY, USA)에 분주한 후 ml 당 LPS 0.01,

0.1, 1.0 μ g, SEB 0.01, 0.1, 1.0 μ g, *H. pylori* 분해물 0.01, 0.1, 1.0 μ g을 각각 작용시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24, 48, 72시간 동안 배양하여 배양상층액을 수거하였다. 용량별 시험 well은 triplicate로 시행하였다. 수거된 배양상층액은 300 g에서 30분간 원심시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하면서 TGF- β 1과 NO생성 효과측정에 사용하였다.

TGF- β 1의 측정

TGF- β 1의 측정은 Human TGF- β 1 DuoSet ELISA kit (Genzyme, Cambridge, USA)을 이용하였다.

Standard TGF- β 1과 시료의 활성화

비활성화상태의 표준 TGF- β 1과 시료의 활성화를 위하여 표준 TGF- β 1(100 ng/ml)은 20 μ l, 배양상층액은 200 μ l 씩을 각각 취하여 희석액으로 희석한 다음 1N HCl을 작용한 후 1N NaOH로 중화시켰다.

TGF- β 1의 정량분석

미리 TGF- β 1에 대한 모노클론항체를 96 wells microplate에 100 μ l 씩 적하하여 4°C 냉장고에서 하루밤 방치시킨 후 세척용 완충액으로 충분히 세척하였다. 1% 소혈청 알부민이 포함된 액 250 μ l 씩을 각 well에 작용하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 활성화된 시료 100 μ l 씩을 적하하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 HRP-conjugated 항체액 100 μ l 씩을 적하하여 다시 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 기질액(tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) 100 μ l 씩을 적하하여 다시 실온에서 10분 동안 방치한 다음 stop액(2N H₂SO₄) 100 μ l 씩을 가하였다. 흡광도는 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

NO의 측정

NO는 공기중에서 수 초 내에 nitrite ion으로 산화되기 때문에 실제로는 nitrite ion의 농도를 측정하였다. Nitrite ion의 측정은 다음과 같이 시행하였다. 수거한 시료 0.1 ml 씩을 96 wells microplate(Corning, NY, U.S.A.)로 옮긴 다음 Griess 시약[1% sulfanilamide (Sigma, St. Louis, USA)

/0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (Sigma, St. Louis, USA)/2.5% phosphoric acid(Junsei, Osaka, Japan)] 0.1 ml 씩을 작용시킨 후 실온에서 10분 동안 방치하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA.)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (Hayashi, Tokyo, Japan)로 작성하였다.

통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 구간간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 p 값이 0.05 이하일 때 유의 있는 차로 간주하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 혐유아세포에 *H. pylori* 항원을 노출시켰을 때 생성되어 나타나는 TGF- β 1과 NO를 정량분석하여 *H. pylori* 감염시 생체내 혐유아세포가 나타내는 이들 물질의 생성능을 관찰함으로써 *H. pylori*와 혐유아세포의 관계를 이해하고자 하였다. 또한 이들 세포에 *H. pylori* 항원이나, 그람 음성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide (LPS), 그람 양성균인 황색포도상구균의 staphylococcal enterotoxin B(SEB)를 단독 노출 혹은 혼합 노출시켜 배양시켰을 때 나타나는 TGF- β 1과 NO를 정량적으로 분석함으로써 독소의 종류 및 배양시간에 따른 차이를 알아봄으로써 중복 감염으로 인한 혐유아세포로부터의 TGF- β 1과 NO생성양상을 관찰하고자 하였다.

LPS를 작용시켜 TGF- β 1의 생성변화를 봤을 때 투여량이 낮을 때(0.01, 0.1 μ g/ml)에는 배양중간시점(48 시간)에서 상승되었고 투여량이 높을 때에는 배양초기(24 시간)에 상승되었지만 배양후기(72 시간)에는 투여량이 낮을 때와 마찬가지로 LPS 비노출군보다 감소하고 있다. 이와 같은 경향은 SEB를 작용시켰을 때에도 유사하게 나타났다. 즉 장시간 세균독소노출에 의해서 혐유아세포에서의 TGF- β 1의 생성이 저해되었다고 볼 수 있다. 세포공포독소(Vac)생성 양성인 *H. pylori* 균 분해물을 낮은 투여량(0.01 μ g/ml)로 작용시켰을 때 24시간 째 와 72시간 째 에서 대조군보다 유의한 감소를 보이고 있다. 그러나 투여량이 높아지게 되면 48시간 째에서 상승효과를 보이고 72시간 째에서

감소폭이 좁아지거나 오히려 그 생성이 증가하고 있다. 이는 Vac(+) *H. pylori* 균분해물의 양적 변화에 따라 TGF- β 1의 생성이 차이를 나타낼 수 있음을 의미한다. 세포공포독소(Vac) 음성인 *H. pylori* 균 분해물을 작용시켰을 때에는 48시간째에서의 증가와 72시간 째에서의 감소가 모든 dose에서 나타났다. 따라서 *H. pylori* 균 분해물에 의해서도 노출된 양이나 시간에 따라 TGF- β 1의 생성억제가 나타남을 보인 결과로 해석된다. Vac(+) *H. pylori*균 분해물과 LPS를 중복으로 작용시켰을 때의 TGF- β 1의 생성변화는 균 분해물 단독 노출에 비하여 모든 시간대에서 감소를 보인다. SEB와의 중복노출에 의해서는 48시간까지 증가를 보이다가 72시간에는 다시 감소를 보인다. LPS 및 SEB와의 중복노출에서는 배양초기에는 증가하지만 48시간 째부터 낮아지게 된다. 이는 *H. pylori* 균 분해물이 혐유아세포에 작용될 때 다른 세균의 독소가 혼재됨으로서 TGF- β 1의 생성이 더욱 억제될 수 있음을 보여준 결과로 생각된다. Vac(-) *H. pylori*균 분해물과 LPS를 중복으로 작용시켰을 때의 TGF- β 1의 생성변화는 균 분해물 단독 노출에 비하여 48 시간 째 까지 감소를 보이고 있다. SEB와의 중복노출에 의해서는 단독노출에 비하여 48시간까지 감소를 보이다가 72시간에는 증가를 보인다. LPS 및 SEB와의 중복노출에서도 48 시간까지 감소를 보이다가 72시간에는 증가를 보인다. 따라서 Vac(-) *H. pylori*균 분해물의 경우는 중복노출에 의해서 72시간 째 에 모두 증가를 보임으로서 Vac(+) *H. pylori* 균 분해물의 경우와는 다른 양상을 나타냈다(Table 1, 2, 3, Fig. 1,2).

NO의 생성변화는 LPS를 작용시켰을 때는 모든 시간대에서 증가를 보였지만 SEB를 작용시켰을 때는 dose 별 차이를 나타냈다. 즉 낮은 투여량(0.01 μ g/ml)을 작용시켰을 때는 모든 시간대에서 증가를 보인 반면 높은 투여량(0.1, 1.0 μ g/ml)을 작용시켰을 때는 24시간 째 에서 증가하다가 48, 72시간 째에서는 감소를 보이고 있다. 따라서 세균독소들의 차이 혹은 같은 독소일지라도 양의 차이에 따라 NO생성에 변화를 나타낼 수 있음을 의미한다 하겠다. Vac(+) *H. pylori* 분해물을 작용시켰을 때에는 낮은 투여량(0.01 μ g/ml)에서 배양시간이 길어지게 되면 감소를 나타낸 반면 0.1이나 1.0 μ g/ml로의 dose증가가 있게되면 시간이 지나면서 생성이 증가됨을 볼 수 있다. 따라서 *H. pylori*의 만성 감염하에서 균에 영향을 받은 혐유아세포로부터의 NO생성

Table 1. Production of TGF- β 1 in cultures of human fibroblast with toxins and *Helicobacter pylori* lysates (0.01 μ g/ml)

	Production of TGF- β 1 (unit : ng/ml)		
	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	3.648 \pm 0.049**	4.160 \pm 0.042**	4.476 \pm 0.214**
SEB	3.605 \pm 0.028**	4.033 \pm 0.110**	3.960 \pm 0.005**
Hp Vac(+)	2.859 \pm 0.076**	3.483 \pm 0.006**	3.965 \pm 0.166**
Hp Vac(-)	3.078 \pm 0.166	3.887 \pm 0.083**	4.199 \pm 0.165**
Control	3.249 \pm 0.021	3.380 \pm 0.055	5.436 \pm 0.165

Human fibroblasts were cultivated with toxins (LPS, lipopolysaccharide; SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*) and *Helicobacter pylori* [Hp Vac(+), *H. pylori* producing vacuolating toxin; Hp Vac(-), *H. pylori* not producing vacuolating toxin] lysates each 0.01 μ g/ml for 24, 48, and 72 hr. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data are mean \pm SD.

** : $p < 0.01$ when compared with the control

Table 2. Production of TGF- β 1 in cultures of human fibroblast with toxins and *Helicobacter pylori* lysates (0.1 μ g/ml)

	Production of TGF- β 1 (unit : ng/ml)		
	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	3.380 \pm 0.069	5.119 \pm 0.283**	5.709 \pm 0.214
SEB	3.161 \pm 0.117	4.866 \pm 0.110**	5.689 \pm 0.041
Hp Vac(+)	3.127 \pm 0.069	4.082 \pm 0.097**	4.759 \pm 0.076**
Hp Vac(-)	3.551 \pm 0.021**	4.209 \pm 0.248**	3.249 \pm 0.021**
Control	3.249 \pm 0.021	3.380 \pm 0.055	5.436 \pm 0.165

Human fibroblasts were cultivated with toxins (LPS, lipopolysaccharide; SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*) and *Helicobacter pylori* [Hp Vac(+), *H. pylori* producing vacuolating toxin; Hp Vac(-), *H. pylori* not producing vacuolating toxin] lysates each 0.1 μ g/ml for 24, 48, and 72 hr. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data are mean \pm SD.

** : $p < 0.01$ when compared with the control

은 균의 양과 시간에 의존하여 증가될 것으로 생각된다. 이와는 다르게 Vac(-) *H. pylori* 분해물 0.01 μ g/ml을 작용시켰을 때는 dose 및 시간에 의존하지 않고 전반적으로 감소율을 나타내고 있다. 이러한 결과의 특징은 vacuolating toxin 생성주와 비생성주 사이의 차이일 가능성이 높다. 그러나 Vac(+) *H. pylori*균 분해물에 LPS 등을 중복하여 작용시켰을 때는 균 단독으로 작용시켰을 때에 비하여 NO의 생성이 저하됨을 볼 수 있다. 이는 Vac(+) *H. pylori*균 분해물에 의

Table 3. Production of TGF- β 1 in cultures of human fibroblast with toxins and *Helicobacter pylori* lysates (1.0 μ g/ml)

	Production of TGF- β 1 (unit : ng/ml)		
	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	4.199 \pm 0.099**	3.873 \pm 0.131**	4.486 \pm 0.351**
SEB	3.921 \pm 0.173**	4.949 \pm 0.042**	3.926 \pm 0.083**
Hp Vac(+)	3.283 \pm 0.055	4.535 \pm 0.035**	5.519 \pm 0.021
Hp Vac(-)	3.380 \pm 0.055	5.436 \pm 0.165**	2.859 \pm 0.034**
Control	3.249 \pm 0.021	3.380 \pm 0.055	5.436 \pm 0.165

Human fibroblasts were cultivated with toxins (LPS, lipopolysaccharide; SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*) and *Helicobacter pylori* [Hp Vac(+), *H. pylori* producing vacuolating toxin; Hp Vac(-), *H. pylori* not producing vacuolating toxin] lysates each 1.0 μ g/ml for 24, 48, and 72 hr. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data are mean \pm SD.

** : $p < 0.01$ when compared with the control

Table 4. Production of nitric oxide in cultures of human fibroblast with toxins and *Helicobacter pylori* lysates (0.01 μ g/ml)

	Concentration of nitrite ion (μ M/L)		
	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	8.8 \pm 0.1**	13.4 \pm 0.4**	13.2 \pm 0.1**
SEB	7.8 \pm 0.1**	10.8 \pm 0.4**	12.8 \pm 0.3**
Hp Vac(+)	6.9 \pm 0.2	7.6 \pm 0.1**	9.2 \pm 0.2
Hp Vac(-)	6.7 \pm 0.1	8.1 \pm 0.1**	11.7 \pm 0.1
Control	6.7 \pm 0.1	9.0 \pm 0.1	11.5 \pm 0.1

Human fibroblasts were cultivated with toxins (LPS, lipopolysaccharide; SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*) and *Helicobacter pylori* [Hp Vac(+), *H. pylori* producing vacuolating toxin; Hp Vac(-), *H. pylori* not producing vacuolating toxin] lysates each 0.01 μ g/ml for 24, 48, and 72 hr. Nitrite ion concentration was measured in the culture supernatant. Data are mean \pm SD.

** : $p < 0.01$ when compared with the control

한 NO생성이 다른 세균의 독소들에 의해서 간섭이 유도되었음을 의미한다 하겠다. Vac(-) *H. pylori* 분해물에 다른 세균독소를 중복하여 작용시켰을 때에는 LPS나 SEB의 경우 처음과 중간(24, 48시간)에서 단독노출 때보다 증가를 보이다가 시간이 더 경과되면서 감소를 보이고 있다. 그러나 LPS와 SEB를 함께 중복노출 시켰을 때에는 시간에 관계하지 않고 감소를 보였다. 따라서 Vac(-) *H. pylori* 분해물에 의한 NO생성은 감소되었지만 이 경우 LPS나 SEB의 가

Table 5. Production of nitric oxide in cultures of human fibroblast with toxins and *Helicobacter pylori* lysates (0.1 μg/ml)

	Concentration of nitrite ion (μM/L)		
	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	7.4±0.1**	10.7±0.2**	12.4±0.4**
SEB	7.7±0.2**	8.5±0.2*	9.7±0.1**
Hp Vac(+)	9.6±0.1**	10.9±0.1**	12.3±0.1**
Hp Vac(-)	5.8±0.2**	7.1±0.2**	10.6±0.2**
Control	6.7±0.1	9.0±0.1	11.5±0.1

Human fibroblasts were cultivated with toxins (LPS, lipopolysaccharide; SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*) and *Helicobacter pylori* [Hp Vac(+), *H. pylori* producing vacuolating toxin; Hp Vac(-), *H. pylori* not producing vacuolating toxin] lysates each 0.1 μg/ml for 24, 48, and 72 hr. Nitrite ion concentration was measured in the culture supernatant. Data are mean±SD.

*: p<0.05 when compared with the control

** : p<0.01 when compared with the control

Table 6. Production of nitric oxide in cultures of human fibroblast with toxins and *Helicobacter pylori* lysates (1.0 μg/ml)

	Concentration of nitrite ion (μM/L)		
	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	6.9±0.4	9.7±0.1**	12.2±0.1**
SEB	7.1±0.1*	7.6±0.4**	9.4±0.1**
Hp Vac(+)	7.2±0.4	10.1±0.1**	14.8±0.1**
Hp Vac(-)	6.7±0.1	7.7±0.1**	10.0±0.3**
Control	6.7±0.1	9.0±0.1	11.5±0.1

Human fibroblasts were cultivated with toxins (LPS, lipopolysaccharide; SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*) and *Helicobacter pylori* [Hp Vac(+), *H. pylori* producing vacuolating toxin; Hp Vac(-), *H. pylori* not producing vacuolating toxin] lysates each 1.0 μg/ml for 24, 48, and 72 hr. Nitrite ion concentration was measured in the culture supernatant. Data are mean±SD.

*: p<0.05 when compared with the control

** : p<0.01 when compared with the control

담으로 인하여 NO생성의 증가를 보임으로서 다른 세균독소와 혼재된 상태 속에서 NO생성이 증가될 가능성을 보인 것이다(Table 4, 5, 6, Fig. 3, 4).

요 약

초대 배양한 사람의 섬유아세포에 *H. pylori* 항원을 노출

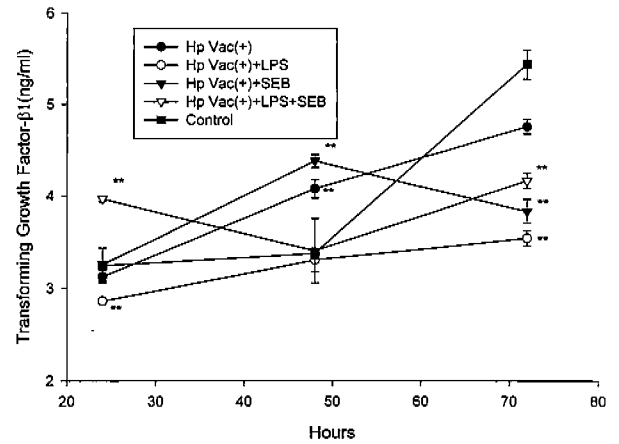


Fig. 1. Production of transforming growth factor-β1(TGF-β1) by fibroblast exposed with 0.1 μg of *H. pylori* Vac(+) lysate, LPS, or SEB each for 24, 48, 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed.

Data represent mean±SD. **p<0.01 when compared with the control.

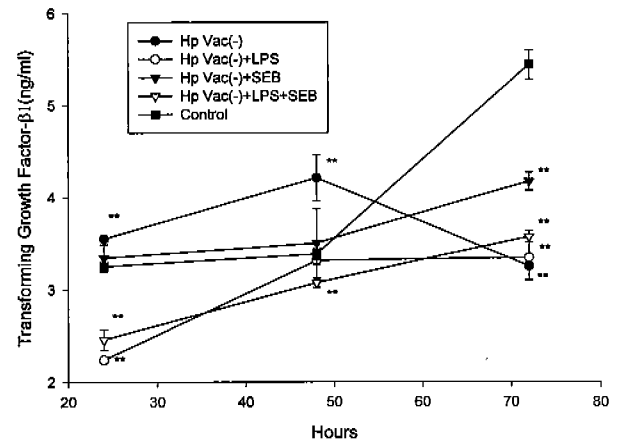


Fig. 2. Production of transforming growth factor-β1(TGF-β1) by fibroblast exposed with 0.1 μg of *H. pylori* Vac(-) lysate, LPS, or SEB each for 24, 48, 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed.

Data represent mean±SD. **p<0.01 when compared with the control.

시켰을 때 생성되는 TGF-β1과 NO를 정량분석함으로써 *H. pylori* 감염시 섬유아세포에 의한 이들 물질의 생성능을 관

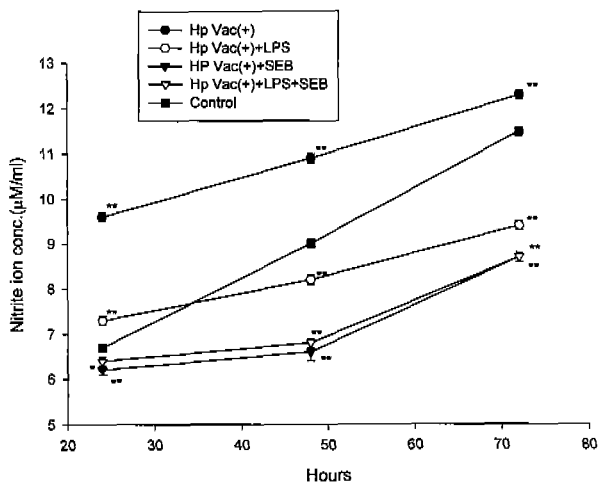


Fig. 3. Production of nitric oxide by fibroblast exposed with 0.1 μ g of *H. pylori* Vac(+) lysate, LPS, or SEB each for 24, 48, 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and nitrite ion was assayed. Data represent mean \pm SD. * p <0.05 and ** p <0.01 when compared with the control.

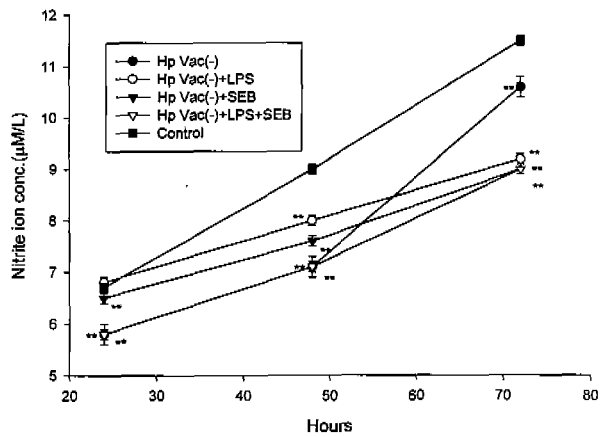


Fig. 4. Production of nitric oxide by fibroblast exposed with 0.1 μ g of *H. pylori* Vac(-) lysate, LPS, or SEB each for 24, 48, 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and nitrite ion was assayed. Data represent mean \pm SD. * p <0.01 when compared with the control.

찰하고자 하였다. 또한 이들 세포에 *H. pylori* 항원이나 lipopolysaccharide (LPS), staphylococcal enterotoxin B(SEB)를 단독 노출 혹은 혼합 노출시켜 배양시켰을 때 나타나는

TGF- β 1과 NO를 정량 분석하여 독소의 종류 및 배양시간에 따른 차이를 알아봄으로서 중복 감염으로 인한 섬유아세포로부터의 TGF- β 1과 NO생성양상을 관찰하고자 하였다.

섬유아세포는 장시간(72시간) LPS나 SEB와 같은 세균독소노출에 의해서 TGF- β 1의 생성이 저해되었다. *H. pylori* 균 분해물에 의해서도 노출된 양이나 시간에 따라 TGF- β 1의 생성억제가 나타났다. 세포공포독소양성(Vac+)을 나타내는 *H. pylori*균 분해물과 LPS 및 SEB를 중복으로 작용시켰을 때의 TGF- β 1의 생성은 균 분해물 단독 노출에 비하여 전반적으로 감소를 보였다. 이는 Vac(+) *H. pylori* 균 분해물이 섬유아세포에 작용될 때 다른 세균의 독소가 혼재됨으로서 TGF- β 1의 생성이 더욱 억제될 수 있음을 보여준 결과이다. 그러나 Vac(-) *H. pylori*균 분해물의 경우는 중복노출에 의해서 장시간 배양에서 증가를 보임으로서 Vac(+) *H. pylori*균 분해물의 경우와는 다른 양상을 나타냈다.

NO의 생성변화는 LPS를 작용시켰을 때는 증가를 보였지만 SEB를 작용시켰을 때는 dose 별 차이를 나타냄으로서 세균독소들의 차이 혹은 같은 독소일지라도 양의 차이에 따라 NO생성에 변화를 보였다. Vac(+) *H. pylori* 분해물을 작용시켰을 때에는 NO생성이 증가되었다. Vac(-) *H. pylori* 분해물을 작용시켰을 때는 전반적으로 감소를 나타냈다. 그러나 *H. pylori*균 분해물에 LPS 등을 중복하여 작용시켰을 때는 장시간 배양에서 균 단독으로 작용시켰을 때에 비하여 NO의 생성이 저하되었다.

따라서, 섬유아세포에서의 TGF- β 1과 NO 생성은 자극물의 종류 및 자극물의 복합작용에 따라 양적 변화를 나타냄으로서 때로 질환의 치유를 더욱 어렵게 하는 요인이 될 것으로 보인다. 즉, 세포공포독소를 생성하는 *H. pylori*가 LPS나 SEB와 같은 세균독소와 함께 숙주세포에 작용됨으로서 나타나는 TGF- β 1의 감소는 숙주의 상처치유에 나쁜 영향을 끼칠 가능성이 있으며 *H. pylori*감염으로 인한 숙주세포의 NO생성의 증가는 위암발생의 감수성을 높이는 데에 관련을 가질 가능성이 있을 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Adams, L. B., S. G. Franzblau, Z. Vavrin, J. B. Hibbs and J. L. Krahenbuhl. 1991. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic ac-

- tivity of *Mycobacterium leprae*. *J. Immunol.* **147**, 1642-1646.
2. Adams, L. B., J. B. Hibbs, R. R. Taintor and J. L. Krahenbuhl. 1990. Microbiostatic effects of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii* : Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* **144**, 2725-2729.
 3. Arrick, B. A., A. R. Lopez, F. Elfman, R. Ebner, C. H. Damsky and R. Derynck. 1992. Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *J. Cell. Biol.* **118**, 715-726.
 4. Assoian, R. K., A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller and M. B. Sporn. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **258**, 7155-7160.
 5. Brecht, D. S. and S. H. Snyder. 1992. A novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3-11.
 6. Brecht, D. S. and S. H. Snyder. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 682-685.
 7. Boockvar, K. S., D. L. Granger, R. M. Poston, M. Maybodi, M. K. Washington, J. B. Hibbs and R. L. Kurlander. 1994. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Infect. Immun.* **62**, 1089-1100.
 8. Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo and B. R. Bloom. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **175**, 1111-1122.
 9. Chang, H. L., N. Gillett, I. Figari, A. R. Lopez, M. A. Palladino and R. Derynck. 1993. Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells. *Cancer Res.* **53**, 4391-4398.
 10. Childs, C. B., J. A. Proper, R. F. Tucker and H. L. Moses. 1982. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5312-5316.
 11. Cui, S., J. S. Reichner, R. B. Mateo and J. E. Albina. 1994. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 2462-2467.
 12. Derynck, R., D. V. Goedell, A. Ullrich, J. U. Gutterman, R. D. Williams, T. S. Bringman and W. H. Berger. 1987. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* **47**, 707-712.
 13. Dunn, B. E., H. Cohen and M. J. Blaser. 1997. *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 720-741.
 14. Eigler, A., J. Moeller and S. Endres. 1995. Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264.7. *J. Immunol.* **154**, 4048-4054.
 15. Gomella, L. G., E. R. Sargent, T. P. Wade, P. Anglard, W. M. Linehan and A. Kasid. 1989. Expression of transforming growth factor alpha in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors alpha and beta 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **49**, 6972-6975.
 16. Hibbs, J. B., R. R. Taintor and Z. Vavrin. 1987. Macrophage cytotoxicity : Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473-476.
 17. Higuchi, M., N. Higashi, H. Taki and T. Osawa. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages : Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425-1431.
 18. Ito, N., S. Kawata, S. Tamura, K. Takaishi, Y. Shirai, S. Kiso, I. Yabuuchi, Y. Matsuda, M. Nishioka and S. Tarui. 1991. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **51**, 4080-4083.
 19. Iwata, K. K., C. M. Fryling, W. B. Knott and G. J. Todaro. 1985. Isolation of tumor cell growth-inhibiting factors from a human rhabdomyosarcoma cell line. *Cancer Res.* **45**, 2689-2694.
 20. Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jankowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* **163**, 1037-1050.
 21. Konur, A., S. W. Krause, M. Rehli, M. Kreutz and R. Andreesen. 1996. Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide. *J. Immunol.* **157**, 2109-2115.
 22. Lane, T. E., B. A. Wu-Hsieh and D. H. Howard. 1944. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* **62**, 1940-1945.

23. Lea, R. G., K. C. Flanders, C. B. Harley, J. Manuel, D. Banwatt and D. A. Clark. 1992. Release of a transforming growth factor(TGF)-beta2-related suppressor factor from postimplantation murine decidual tissue can be correlated with the detection of a subpopulation of cells containing RNA for TGF-beta2. *J. Immunol.* **148**, 778-787.
24. Liew, F. Y., S. Millott, C. Parkinson, R. M. Palmer and S. Moncada. 1990. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* **144**, 4794-4797.
25. Marshall, B. J. and J. R. Warren. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **I**, 1273.
26. Mitchell, H. M., S. L. Hazell, T. Kolesnikow, J. Mitchell and D. Formmer. 1996. Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with a cogA-positive strain of *H. pylori*. *Infect. Immun.* **64**, 1166-1172.
27. Miyazono, K., P. ten Dijke, H. Ichijo and C. H. Heldin. 1994. Receptors for transforming growth factor- β . *Adv. Immunol.* **55**, 181-220.
28. Morin, A. M. and A. Stanboli. 1994. Nitric oxide synthase localization in cultured cerebrovascular endothelium during mitosis. *Exp. Cell. Res.* **211**, 183-188.
29. Niitsu, Y., Y. Urushizaki, Y. Koshida, K. Terui, K. Mahara, Y. Kohgo and I. Urushizaki. 1988. Expression of TGF-beta gene in adult T cell leukemia. *Blood* **71**, 263-266.
30. Nunoshiba, T., T. DeRojas-Walker, S. R. Tannenbaum and B. Demple B. 1995. Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 794-79.
31. Palmer, R. M. J., A.G. Ferrige and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
32. Rautelin, H., B. Blomberg, H. Fredlund, G. Jarnerot and D. Dainelsson. 1993. Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. *Gut* **34**, 599-603.
33. Roberts, A. B., M. A. Anzano, L. C. Lamb, J. M. Smith and M. B. Sporn. 1981. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor : isolation from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5339-5343.
34. Roberts, A. B., M. B. Sporn, R. K. Assoian, J. M. Smith, N. S. Roche, L. M. Wakefield, U. I. Heine, L. A. Liotta, V. Falanga, J. H. Kehrl and A. S. Fauci. 1986. Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4167-4171.
35. Schmidt, H. H. W., R. Seifert and E. Bohme. 1989. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL 60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. *FEBS lett.* **244**, 357-360.
36. Seyedin, S. M., T. C. Thomas, A. Y. Thompson, D. M. Rosen and K. A. Piez. 1985. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2267-2271.
37. Sporn, M. B., A. B. Roberts, H. H. Shull, J. M. Smith and J. M. Ward. 1983. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing *in vivo*. *Science* **219**, 1329-1331.
38. Sternberg, J., N. Mabbott, I. Sutherland and F. W. Liew. 1994. Inhibition of nitric oxide synthesis leads to reduced parasitemia in murine *Trypanosoma brucei* infection. *Infect. Immun.* **62**, 2135-2137.
39. Stuehr, D. J. and M. A. Marletta. 1987. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . *J. Immunol.* **139**, 518-525.
40. Tayeh, M. A. and M. A. Marletta. 1989. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654-19658.
41. Travers, M. T., P. J. Barrett-Lee, U. Berger, Y. A. Luqmani, J. C. Gazet, T. J. Powers and R. C. Coombes. 1988. Growth factor expression in normal, benign, and malignant breast tissue. *Br. Med. J.* **296**, 1621-1624.
42. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson and E. Balish. 1995. Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect. Immun.* **63**, 1142-1144.
43. Wotherspon, A. C. 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastric and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* **338**, 1175-1176.
44. Zhang, X., E. W. Alley, S. W. Russell and D. C. Morrison. 1994. Necessity and sufficiency of beta interferon for nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **62**, 33-40.

(Received March 13, 2001; Accepted March 3, 2001)