

## *Helicobacter pylori* 연관 철분 결핍성 빈혈과 *H. pylori pfr* 유전자 다형성과의 관련성

인하대학교 의과대학 소아과학교실, <sup>1</sup>병리학교실

이 지 은 · 최 연 호 · 황 태 숙<sup>1</sup>

### A Possible Relation of the *Helicobacter pylori pfr* Gene to Iron Deficiency Anemia?

Ji Eun Lee, M.D., Yon Ho Choe, M.D. and Tae Sook Hwang, M.D.<sup>1</sup>

Department of Pediatrics and <sup>1</sup>Department of Pathology, Inha University Hospital, Incheon, Korea

**Purpose:** *H. pylori* infection is thought to contribute to iron-deficiency anemia, especially during puberty. The ferritin protein Pfr of *H. pylori* is homologous to eukaryotic and prokaryotic ferritins. The purpose of this study was to analyze the *H. pylori pfr* status in gastric biopsy specimens according to clinical data, including antral gastritis with or without iron-deficiency anemia.

**Methods:** A total of 26 *H. pylori*-positive patients aged from ten to 18 years were categorized into subgroups based on the presence or absence of iron-deficiency anemia. All of them had antral gastritis. Sixteen patients were proved to have iron-deficiency anemia by hematological study, two of which had a duodenal ulcer. The other ten patients showed normal hematological findings. DNA isolation was performed from each of the gastric biopsy specimens. PCR amplification of the *pfr* gene coding was done using two sets of primers. The *pfr* region, 501 bp, was generated by linking the sequences of the two PCR products. The nucleotide and protein sequences were compared between the *pfr* regions from Korean *H. pylori* strains and the NCTC 11638, 26695, and J99 strain, which were obtained from the Genbank. Sequence comparisons were also performed for the *pfr* regions between the iron-deficiency anemia (+) and (-) groups.

**Results:** Analysis of the complete coding region of *pfr* gene revealed three sites of mutation. The Ser39Ala mutation was found in 100% (26/26), Gly111Asn in 26.9% (7/26), and Gly82Ser in 11.5% (3/26). There were no significant differences in the mutations of the *pfr* regions between the iron deficiency anemia (+) and (-) groups.

**Conclusion:** The mutation in the *pfr* gene did not relate with the clinical phenotype, iron deficiency anemia. Further studies are needed on the aspects of host side or other complex factors to elucidate

접수 : 2001년 2월 9일, 승인 : 2001년 2월 26일

책임저자 : 최연호, 400-103, 인천광역시 중구 신흥동 3가 7-206, 인하대병원 소아과

Tel: 032-890-3658, Fax: 032-890-2844, E-mail: yhchoe@inha.ac.kr

anemia. Further studies are needed on the aspects of host side or other complex factors to elucidate the mechanisms by which the *H. pylori* infection might lead to iron deficiency anemia. (**J Korean Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 4: 28~33**)

**Key Words:** *Helicobacter pylori*, Ferritin, *pfr* gene, Iron-deficiency anemia, Polymorphism

## 서 론

사춘기 청소년에서 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)로 인한 전정부 위염이 철분 결핍 빈혈과 관련이 있는 것으로 알려져 왔는데 몇몇 증례 보고를 제외하고는 1990년대 후반기에 들어서야 *H. pylori*와 철분 결핍 빈혈간의 관련이 체계적으로 연구되어 왔다<sup>1~7</sup>. 저자들은 1997년에 철분 결핍 빈혈과 *H. pylori* 감염이 함께 있는 사춘기 소아들을 대상으로 이중맹검 위약-대조시험을 시행해서 *H. pylori* 감염이 철분 결핍 빈혈에 기여할 수 있고 철분 결핍 빈혈 치료 시 철분 투여에도 반응하지 않을 때 이러한 감염여부를 의심해야 한다고 발표한 바 있으며<sup>4</sup>, 저자들의 또 다른 치료연구에서도 유사한 결과가 얻어졌다<sup>5</sup>.

*H. pylori*의 19 kDa ferritin 단백질인 Pfr은 진핵생물과 원핵생물의 ferritin과 동일하며<sup>8</sup>, heme을 함유하지 않는다<sup>9</sup>. Heme을 함유한 ferritin은 bacterioferritins (Bfr's)으로 나타내는 반면, heme을 함유하지 않은 원핵생물의 ferritin은 Pfr's로 나타낸다<sup>10</sup>. *E.coli*에서 *H. pylori pfr* 유전자를 과잉 발현시키면 철의 축적을 유발시키고 축결정 봉입체(paracrystalline inclusion)를 형성하게 한다<sup>8</sup>. 일부 *H. pylori* 균주의 세포질에서 이와 유사한 구조가 발견되었고 ferritin 단백질을 함유하고 있다는 것이 알려졌다. Bereswill 등은 *H. pylori*의 철분 대사에서 ferritin 유전자의 역할을 밝히기 위해 *pfr* 유전자의 구조와 변이 분석을 최근에 시행했다<sup>11</sup>. 그들은 non-heme-iron ferritin이 철분을 함유하는 세포내의 물질 형성에 관여하며 *H. pylori*의 철분에 대한 저항

성에 영향을 미친다고 결론지었다.

*H. pylori* 감염이 철분 결핍 빈혈을 유발한다는 기전이 아직 확실하지는 않지만 이러한 관련성에 대해 3가지 가능한 가정을 할 수 있다. 첫째, *H. pylori* 감염은 대부분 위 산도를 저하시키기 때문에 철분 흡수에 장애를 줄 수 있다<sup>12</sup>. 둘째, *H. pylori*의 성장에 철분이 필요하기 때문에 철분의 수요가 증가된다<sup>13</sup>. 셋째, *H. pylori* 위염이 철분을 격리시키는 장소로 작용한다<sup>3</sup>.

*H. pylori*의 nonheme iron은 특화된 세포질 구역에서 19 kDa ferritin 단백질인 Pfr로 저장될 수 있기 때문에 Pfr 기능의 연구는 철분 결핍 빈혈과 관련하여 필요하다. 또한 돌연변이를 포함한 *pfr* 유전자에 대한 연구가 현시점에서 필요한 것으로 여겨진다. 저자들은 *H. pylori* 양성인 전정부 위염환자의 위 생검 표본에서 철분 결핍 빈혈의 유무에 따라 *H. pylori pfr* 유전자를 분석하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

*H. pylori*에 대한 혈청 IgG Ab 양성인 26명의 환자를 대상으로 하였고 이들의 연령분포는 10~18세였다. 그중 16명은 혈액 검사를 통해 철분 결핍 빈혈을 진단 받았으며 철분 결핍 빈혈의 정의는 ferritin <12 ng/ml, transferrin saturation <15%이고 hemoglobin <12 g/dl로 하였다. 대상 모두를 위장관 내시경으로 검사하였고 *H. pylori* 감염 여부는 생검 표본으로 검사하는 2가지 방법인 urease 활성도와 조직화학적 검사를 통해 알아보았다.

*H. pylori* 양성은 CLO 검사(Delta West, Perth,

Australia)가 양성되면서 Giemsa 염색에서 균이 확인되는 것으로 정의하였다. 내시경에서 얻은 조직으로 CLO 검사와 Giemsa 염색을 한 결과 모든 대상이 *H. pylori* 양성이었다. 철분 결핍 빈혈을 가진 환자 중 두 명이 십이지장 궤양이 있었다. 24명의 전정부 위염 환자들은 위나 십이지장 점막에서 출혈의 흔적을 발견하지 못했고 대변 잠혈 검사(monoclonal antibody to human hemoglobin, Kit OC Haemodia; Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan)에서 모두 음성이었다. 본 연구에서는 *H. pylori* 감염이 있는 26명 환자들의 전정부 생검 표본을 모두 분석에 사용하였고 이들은 철분 결핍 빈혈이 있으면서 *H. pylori* 양성인 환자 14명과 철분 결핍 빈혈이 없는 환자 10명, 십이지장 궤양이 있는 환자 2명으로 구성되었다.

## 2. 위 생검 표본에서의 DNA 분리

생검 표본은  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 저장되어  $400\mu\text{L}$ 의 proteinase K용액 (10 mmol/L Tris-HCL [pH 8.5], 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5% sodium dodecyl sulfate, and 0.5 mg/mL proteinase K)에서 균질화되었고  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양되었다. DNA는 phenol/chloroform과 ethanol 침전물로 추출해서 균질액에서 분리되었다.

## 3. *pfr*의 PCR 증폭

*H. pylori* NCTC 11638 *pfr* 유전자 암호(gene coding)의 서열에 근거하여 두 개의 시발체(primer) 세트를 고안하였다<sup>8,11</sup>. 시발체 세트1은 시발체 PFR-L2 (5-AGACA TCATT AAGTT GC-3)와 시발체 PFR-R2 (5-AGATT TCCTG CTTTT AG-3)로 이루어졌고 세트2는 시발체 PFR-L1 (5-TTTTG ACCTA ATTCT CA-3)과 시발체 PFR-R3 (5-CATTT CCTTATTCAC TTGTT CG-3)로 구성되었다. 이 세트들은 각각 490과 234 bp로 이루어진 산물을 만들어 내기 위해 표준 PCR 혼합물에서 따로 사용되었다. 두 세트의 산물은 501 bp의 완전한 *pfr* 유전자 암호를 완성하고자 필요하였다. PCR 반응은 10 mmol/L Tris-HCL (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0

mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu\text{mol/L}$  deoxynucleoside triphosphate, TaKaRa Ex Taq polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan) 0.25 U 등을 함유한 25 $\mu\text{L}$ 의 용액에서 전방과 후방 시발체 10 pmol을 넣고 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)으로 시행되었다. 시발체 세트 1과 세트 2의 배양 조건은 다음과 같다( $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 배양,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 35 cycle,  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 1분,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 90초, 마지막으로  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 배양).

## 4. DNA 서열 분석

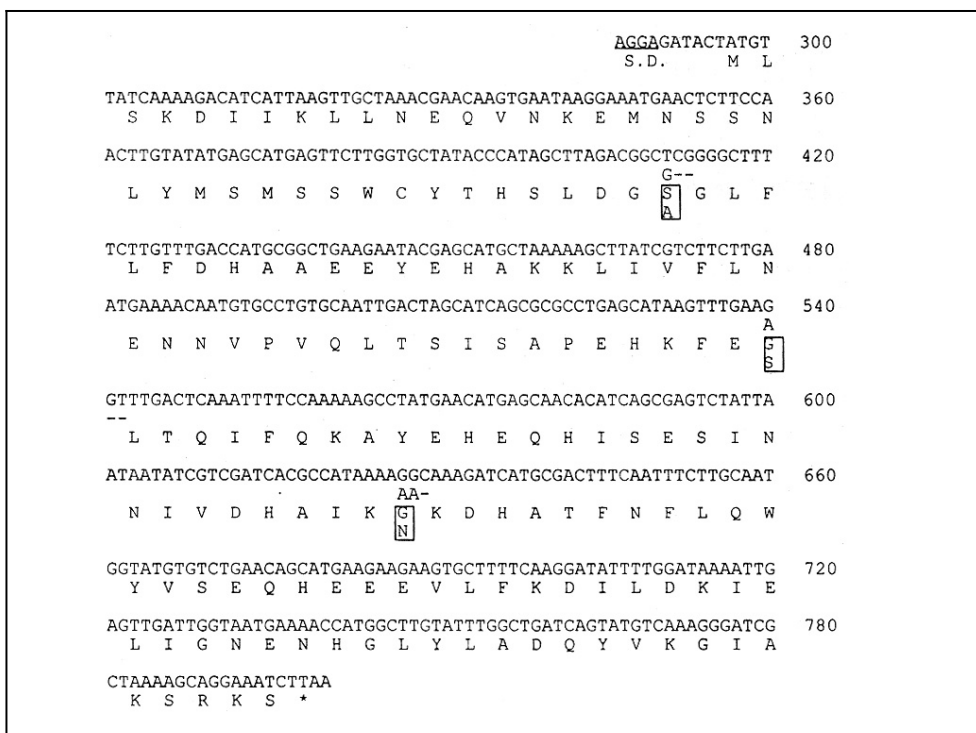
*pfr* 부분의 DNA 서열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)와 Big-Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용한 dideoxynucleotide chain-termination 방법으로 결정하였다. *pfr* 부분은 501 bp로, 두 세트의 시발체로 만든 PCR 산물의 서열을 연결하여 완성하였다. 한국 *H. pylori* 균주에서 얻어진 *pfr* 부분의 nucleotide와 단백질 서열을 Genbank에서 얻은 *H. pylori* NCTC 11638, 26695 그리고 J99와 비교하였다. 서열 비교는 철분 결핍 빈혈이 양성인 군과 음성인 군간의 *pfr* 부위에 대해 행해졌다.

## 5. 통계 분석

철분 결핍 빈혈이 양성인 군간의 *pfr* 다형성(polymorphism) 차이를 평가하기 위해 Fisher's Exact test를 사용하였고 *P*값이 0.05 미만일 경우를 유의한 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 SAS 통계 소프트웨어(version 6.12)를 사용하여 분석하였다.

## 결 과

*pfr* 유전자의 암호 부위(coding region)를 완전히 분석한 결과 세 곳에서 다형성이 발견되었다(Fig. 1). Frazier 등이 밝힌 DNA 서열 순서에서 411 위치의 T가 본 연구에서 G로 바뀌었고 540, 627, 628 위치의 G가 A로 바뀌었다<sup>8</sup>. Ser39Ala 돌연변이는 100% (26/26), Gly111Asn은 26.9% (7/26), Gly82Ser



**Fig. 1.** Nucleotide sequence of the *H. pylori* NCTC 11638 *pfr* gene coding and polymorphism in the Korean *H. pylori* *pfr* gene. Numbering of nucleotides followed the originally published *H. pylori* NCTC 11638 *pfr* gene coding.

**Table 1.** Mutations Found in Korean *H. pylori* *pfr* Gene Coding, and Comparison with *H. pylori* NCTC 11638, *H. pylori* 26695, and *H. pylori* J99. All amino acids except at these three positions were identical.

Position	39	82	111
Korean strains	Ala (100%)	Gly (88.5%), Ser (11.5%)	Gly (73.1%), Asn (26.9%)
NCTC 11638	Ser	Gly	Gly
<i>H. pylori</i> 26695	Ala	Gly	Gly
<i>H. pylori</i> J99	Ala	Gly	Ser

**Table 2.** Comparison of Mutants between Iron Deficiency Anemia (+) and (-) Groups

	Iron deficiency anemia (+)	Iron deficiency anemia (-)	P value
Ser39Ala	14/14 (100%)	10/10 (100%)	NS
Gly111Asn	5/14 (35.7%)	2/10 (20%)	0.653
Gly82Ser	3/14 (21.4%)	0/10 (0%)	0.239

NS: non significant

은 11.5% (3/26)로 나타났다(Table 1). 철분 결핍 빈혈이 양성인 군과 음성인 군간의 *pfr* 부위의 돌연변이는 의미 있는 차이가 없었다(Table 2).

## 고 찰

본 연구의 결과 *pfr* 유전자의 다형성은 철분 결핍 빈혈과 같은 임상표현형과 관련이 없다는 것을 보여준다. 저자들은 철분 결핍 빈혈이 있거나 혹은 없는 전정부 위염의 위 생검 표본에서 *H. pylori pfr* 상태를 분석한 결과 유전자 변이와 임상적인 현상간의 상관 관계가 있다는 증거를 발견하지 못했다. Gly82Ser은 철분 결핍 빈혈군에서만 발견되었지만 표본의 수가 너무 적어서 이러한 유전자형의 임상적인 관련성을 평가할 수 없었다. 다른 *pfr* 유전자형의 임상적인 의미를 알아보기 위해서는 각기 다른 인종들에서 얻은 많은 수의 *H. pylori pfr* 유전자형들을 비교하는 것이 필요한 것으로 보인다.

한국 균주의 변화된 아미노산을 3개의 표준 균주들(NCTC 11638, *H. pylori* 26695, *H. pylori* J99)의 아미노산과 비교했을 때 위치 39, 82, 111을 제외한 모든 아미노산은 동일했다<sup>8,15,16</sup>. 39, 82, 111의 위치에서 변화된 아미노산은 단백질의 기능에 장애를 주지 않는 것으로 여겨지는데 위의 위치들은 다른 표준 균주의 위치와 비교했을 때 변하기 쉬운 것으로 나타났기 때문이다.

한 연구에서 혈청 ferritin과 hemoglobin이 성인의 *H. pylori* 감염과 관련 있으며, 혈청 ferritin 값은 *H. pylori*에 대한 IgG Ab가 양성인 사람들에서 감소한다고 하였다<sup>17</sup>. 그들은 이러한 관련에 대해 두 가지 가정을 세웠는데 첫째, *H. pylori* 감염증은 위 산도저하를 동반하기 때문에 철분 흡수에 장애를 가져온다는 것이며<sup>18</sup> 둘째, *H. pylori*의 성장에 철분이 필요하기 때문에 *H. pylori* 감염증은 철분에 대한 수요를 증가시킨다는 것이다<sup>19</sup>. 최근의 다른 연구에서는 *H. pylori*와 철분 결핍 빈혈의 관련성에 대하여 위장관 출혈이나 철분의 흡수 장애로 인한 것이 아니라 *H. pylori* 위염이 철분을 격리시

키는 장소로 작용하기 때문이라고 가정하였다<sup>3</sup>.

*pfr* 유전자에 대한 저자들의 분석에 근거하여 *H. pylori* 감염이 철분 결핍 빈혈을 유발한다는 기전을 명료하게 밝히기 위해서는 다른 복합적인 인자나 숙주측면의 관점에서 다른 연구가 향후 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**목 적:** *H. pylori* 감염은 특히 사춘기에서 철분 결핍 빈혈의 유발에 관여하는 것으로 여겨진다. *H. pylori*의 ferritin 단백질인 Pfr은 진핵생물과 원핵생물의 ferritin과 동일하다. 본 연구는 철분 결핍 빈혈이 있거나 혹은 없는 *H. pylori* 양성 전정부위염 환자의 위 생검 표본에서 *H. pylori pfr* 유전자를 비교 분석하고자 하였다.

**방 법:** 총 26명의 *H. pylori* 양성 전정부위염 환자(10~18세)들을 철분 결핍 빈혈의 유무에 따라 두 군으로 나뉘었다. 16명의 환자가 혈액학적 검사를 통해 철분 결핍 빈혈이 있는 것으로 밝혀졌고 그들 중 2명이 십이지장 궤양이 있었다. 다른 10명은 정상적인 혈액학적 검사 소견을 보였다. 각각의 위 생검 표본에서 DNA 분리가 이루어졌다. 2개의 시발체 세트를 사용해서 *pfr* 유전자 암호의 PCR 증폭이 행해졌고 *pfr* 부위인 50 bp는 2개의 PCR 산물을 연결하여 완성하였다. nucleotide와 단백질 서열이 한국의 *H. pylori* 균주와 Genbank에서 구한 NCTC 11638, 26695, J99 균주의 *pfr* 부위 사이에서 비교되었다. 또한 철분 결핍 빈혈 양성인 군과 음성인 군 사이의 *pfr* 부위에 대한 서열의 비교가 행해졌다.

**결 과:** *pfr* 유전자의 암호 부위를 완전히 분석한 결과 3곳에서 다형성이 발견되었다. Ser39Ala 돌연변이는 100% (26/26)에서 발견되었고 Gly111Asn은 26.9% (7/26), Gly82Ser은 11.5% (3/26)였다. 철분 결핍 빈혈이 양성인 군과 음성인 군간의 *pfr* 부위의 다형성은 의미 있는 차이가 없었다.

**결 론:** *pfr* 유전자의 다형성은 철분 결핍 빈혈과 같은 임상표현형과 관련이 없었다. *H. pylori* 감염

이 철분 결핍 빈혈을 유발한다는 기전을 명료하게 밝히기 위해 숙주측면의 연구나 혹은 다른 복합적 인자를 고려한 연구가 향후 필요할 것으로 보인다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Dufour C, Brisigotti M, Fabretti G, Luxardo P, Mori PG, Barabino A. *Helicobacter pylori* gastric infection and sideropenic refractory anemia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1993;17:225-7.
- 2) Marignani M, Angeletti S, Bordi C, Malagnino F, Mancino C, Fave GD, et al. Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol 1997; 32:617-22.
- 3) Barabino A, Dufour C, Marino CE, Claudiani F, Alessandri AD. Unexplained refractory iron-deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* gastric infection in children: further clinical evidence. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999;28:116-9.
- 4) Choe YH, Kim SK, Son BK, Lee DH, Hong YC, Pai SH. Randomized placebo-controlled trial of *Helicobacter pylori* eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents. Helicobacter 1999;4:135-9.
- 5) Choe YH, Lee JE, Kim SK. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on sideropenic refractory anaemia in adolescent girls with *Helicobacter pylori* infection. Acta Paediatr 2000;89:154-7.
- 6) Annibale B, Marignani M, Monarca B, Antonelli G, Marcheggiano A, Martino G, et al. Reversal of iron deficiency anemia after *Helicobacter pylori* eradication in patients with asymptomatic gastritis. Ann Intern Med 1999;131:668-72.
- 7) Choe YH, Kim SK, Hong YC. *Helicobacter pylori* infection with iron deficiency anemia and subnormal growth at puberty. Arch Dis Child 2000;82:136-40.
- 8) Frazier BA, Peifer JD, Russell DG, Falk P, Olsen AN, Hammar M, et al. Paracrystalline inclusions of a novel ferritin containing nonheme iron, produced by the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: evidence for a third class of ferritins. J Bacteriol 1993;175: 966-72.
- 9) Doig PJ, Austin W, Trust TJ. The *Helicobacter pylori* 19.6-kilodalton protein is an iron-containing protein resembling ferritin. J Bacteriol 1993;175:557-60.
- 10) Stiefel EI, Grossman MJ, Hinton SM, Minak-Bernero V, George GN, Prince RC, et al. Bacterioferritin: a hemoprotein member of the ferritin family. Adv Exp Med Biol 1994;356:157-64.
- 11) Bereswill S, Waidner U, Odenbreit S, Lichte F, Fassbinder F, Bode G, et al. Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. Microbiology 1998;144: 2505-16.
- 12) Gutierrez O, Melo M, Segura AM, Angel A, Genta RM, Graham DY. Cure of *Helicobacter pylori* infection improves gastric acid secretion in patients with corpus gastritis. Scand J Gastroenterol 1997;32:664-8.
- 13) Husson MO, Legrand D, Spik G, Leclerc H. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: Importance of human lactoferrin. Infect Immun 1993;61:2694-7.
- 14) Looker AC, Dallman PR, Carrol MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. J Am Med Assoc 1997;277:973-6.
- 15) Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997;388:539-47.
- 16) Alm RA, Ling SL, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999;397:176-80.
- 17) Milman N, Rosenstock S, Andersen L, Jorgensen T, Bonnevie O. Serum ferritin, hemoglobin, and *Helicobacter pylori* infection: a seroepidemiologic survey comprising 2794 Danish adults. Gastroenterology 1998;115:268-74.
- 18) Gutierrez O, Melo M, Segura AM, Angel A, Genta RM, Graham DY. Cure of *Helicobacter pylori* infection improves gastric acid secretion in patients with corpus gastritis. Scand J Gastroenterol 1997;32:664-8.
- 19) Husson MO, Legrand D, Spik G, Leclerc H. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: Importance of human lactoferrin. Infect Immun 1993;61:2694-7.