

위선암에서 *Helicobacter pylori* 독성인자와 유전자 아형의 관련성

동아대학교 의과대학 내과학교실

신중민 · 한상영 · 금동주 · 김광진 · 지삼룡 · 홍기봉 · 이종훈 · 최석렬 · 신우원

The Relationship of the *Helicobacter pylori* Virulence Factor Gene Subtype in Gastric Adenocarcinoma

Jong Min Shin, M.D., Sang Young Han, M.D., Dong Joo Keum, M.D., Kwang Jin Kim, M.D., Sam Ryong Jee, M.D., Gi Bong Hong, M.D., Jong Hun Lee, M.D., Seok Ryeol Choi, M.D. and Woo Won Shin, M.D.

Department of Internal Medicine, Dong-A University Hospital, Busan, Korea

Purpose: The *H. pylori* *cagA* gene, *vacA* gene and *iceA* gene are considered to be important virulence factors that have been implicated in the development of gastric adenocarcinoma. It was reported that the presence of IS605 elements may be responsible for rearrangements and lead to partial or total deletions of the *cag* pathogenicity island (PAI) and the virulence of *cag* PAI may be changed. However, different results regarding the association between these virulence factors and clinical disease have been reported from different geographic regions. This study evaluated the relationship between *H. pylori* virulence factors such as *cagA*, *vacA*, *iceA*, IS605 and gastric adenocarcinoma.

Materials and Methods: *H. pylori* isolates were obtained from 54 infected patients (24 cases of gastric adenocarcinoma, 30 cases of control). *H. pylori* isolates were identified by PCR with *ureC* gene and 16S rRNA. PCR was performed to examine *cagA*, *vacA*, *iceA* and IS605 genotypes.

Results: Significant difference was found in the negative rates of *cagA* between gastric adenocarcinoma group and control (62.5% vs. 33.3% $P=0.033$). No significant difference was found in the prevalence of *iceA*, *vacA* between gastric

adenocarcinoma and control. The genotype of *cagA*⁺ *vacA* s1-m1 *iceA*1 was predominant in *H. pylori* isolates irrespective of the clinical outcome. IS605 in PAI was not found in gastric adenocarcinoma group and control. The positive rates of IS605 in genome were 33.3% in gastric adenocarcinoma group and 36.7% in control ($P>0.05$). In gastric carcinoma, the positive rate of *cagA*⁺/IS605⁺ was lower than in control (12.5% vs. 40.0%, $P=0.025$) and the positive rate of *cagA*/IS605 was higher than in control (54.2% vs. 23.3%, $P=0.02$).

Conclusion: *H. pylori* virulence factors had not related significantly with gastric adenocarcinoma. Further study is needed to examine the specificity of *H. pylori* strains. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2002;2:12-19)

Key Words: *Helicobacter pylori*, *cagA*, *vacA*, *iceA*, IS605
중심 단어: 헬리코박터 파이로리, *cagA*, *vacA*, *iceA*, IS605

서 론

1983년 Warren과 Marshall이 위 생검 조직에서 발견한 S자 형의 판곡된 세균의 배양에 성공하여 *Campylobacter*와 유사한 세균을 발견하고 이 균이 만성 위염의 중요한 원인균이라고 발표하였다. 이것을 계기로 위염, 소화성 궤양, 위암, 위림프종 등 여러 질환을 규명하는 데 새로운 전기를 가져왔다.(1)

*H. pylori*는 전 세계 인구의 60%가 감염되어 있을 것으로 추정되는데, 위암은 감염자 중 일부에서만 발병하며 어떠한 기전으로 위암을 일으키는지에 관해서는 정확히 알려진 바가 없다. 최근 독성인자를 가진 *H. pylori*에 감염된 경우에 한하여 위암이 일어날 것이라는 가정 하에 특정 독성인자를 가진 *H. pylori*와 위암과의 연관성을 찾고자 하는 연구가 진행되고 있다.

독성인자 중에는 *cagA* (cytotoxin associated gene A), *vacA* (vacuolating cytotoxin A), *iceA* (induced by contact with epithelium) 유전자가 주목을 받으면서 위암과의 관련성에 대한 보고가 나오고 있다.(2-4) 최근에는 *H. pylori*의

책임저자 : 한상영, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지
동아대학교병원 내과, 601-715
Tel: 051-240-5625, Fax: 051-240-2087
E-mail: syhan@daunet.donga.ac.kr

본 논문의 연구비 일부는 동아대학교 의과대학 학술연구비에서 지원을 받았음.

접수일 : 2002년 1월 11일, 게재승인일 : 2002년 2월 27일

pathogenicity island (PAI)의 *cagI*과 *cagII*사이에 single-copy로 존재하는 insertion sequence인 IS605의 존재유무와 *H. pylori*의 병독성과의 연관성에 대한 연구가 최근에 진행 중이다.

이런 독성인자의 유전자형과 위암과의 관련설에 대한 여러 연구의 보고가 있지만, 보고자에 따라 다른 결과를 보이고 있다.(5,6)

본 연구는 위암환자에서 *H. pylori* 독성인자인 *cagA*, *vaca*, *iceA* 및 IS605의 유전자형을 분석하여 각 독성인자의 유전자형과 위암과의 관련성을 알아보고자 하였다.

방 법

동아대학교병원 소화기내과에 2001년 4월부터 8월까지 상부위장관 증상을 주소로 내원하였거나, 위장관에 대한 정기검진을 목적으로 내원하여 위내시경 검사를 받은 102명의 환자(위암 36명, 대조군 66명)를 CLO검사, 세균배양 검사 및 중합효소연쇄반응검사(PCR)를 하여 *H. pylori* 감염이 확인된 60명 중 PCR에서 양성으로 나온 54명을 대상으로 하였다. 한편 과거 *H. pylori*에 대한 제균요법을 받은 환자 또는, 최근 1개월 이내에 H₂ 수용체 차단제, NSAID, proton pump 억제제, 항생제 및 bismuth 제제를 복용한 환자는 제외하였다.

환자는 검사 전에 최소한 8시간 이상 금식하였고, 내시경 시술 전 내시경과 생검 기구들을 세정제로 세척한 후 2% glutaraldehyde로 소독하였으며, 조직생검 검자는 각 대상자마다 각각 소독된 검자를 사용하였다.

신속 요소분해효소검사는 위전정부와 체부에서 채취한 조직 절편 각 1개씩을 CLO 검사키트(Ballard Medical Products, Draper, Utah, USA)에 담아 실온에서 관찰하여 24시간 이내에 시약의 색깔이 원래의 노란색에서 분홍색으로 변한 경우를 양성으로 판정하였다.

세균배양검사는 내시경 검사에서 얻은 검체를 멸균된 슬라이드 두 장으로 조직을 잘게 갈아서 혈액한천배지, 초코렛배지, Brucella agar 배지에 접종하여 Campy pouch (Becton Dickinson Co., Sparks, Maryland, USA)에 넣어 37°C 항온기에서 7일 동안 배양하였다. 무색의 작은 집락을 관찰하여 그람음성 간균이고 카탈라아제와 요소분해효소 검사를 시행하여 모두 양성이면 *H. pylori*로 판정하였다.

중합효소연쇄반응검사(PCR)는 PBS에 보관된 위 생검 조직을 핵용해 시약 500µL, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 120µL 및 protease K (20 ng/mL) 18µL를 혼합한 용액에 넣고 60°C 항온수조에서 하룻밤 동안 반응시켜서 투명해질 때까지 용해시켰다. 이 용액에 단백침전 시약 200µL를 넣고 잘 섞은 후 원심분리하여 상층액을 취했다. 이 상층액에 isopropanol 동량을 넣고 잘 섞은 후, 1분간 원심분리하

여 DNA pellet를 취하였다. Pellet을 70% 에탄올로 세척·건조시킨 후, 3차 멸균증류수 100µL에 녹여서 -60°C에 보관하였다. 분광광도계(Pharmacia Biotech, Cambridge, England)로 DNA 양을 측정하였다.

*H. pylori*의 존재유무 검사를 위하여, *ureC*와 *16s rRNA*의 유전자에 대하여 각각 PCR을 실시하여 양성으로 나온 검체를 대상으로 *H. pylori* 독성인자 유전자를 검출하였다.

1) *UreC* PCR

사용한 Primer는 5'-AAGCTTTTATAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'와 5'-AAGCTTACTTTCTAAGACTAACGC-3'였다. 반응액은 template DNA 1µL, 각 primer 20 pmol, 0.2 mM dNTP (Takara, Shuzo Co., Shiga, Japan), 10× PCR buffer 2.5µL (Perkin-Elmer, Norwalk, USA, MgCl₂ 불포함), 25 mM MgCl₂ 2µL 및 Taq polymerase 2 unit (Takara, Japan)를 혼합하여 총 25µL로 반응시켰다. PCR반응은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)를 사용하였으며, 95°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 95°C에서 2분간 denaturation, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension의 조건으로 35 cycle을 실시하고, post-extension을 72°C에서 5분간 시행하였다.

2) *16S rRNA* PCR

사용한 primer의 염기서열은 5'-CTGGAGAGACTAAGCCTCC-3'와 5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'였다. 반응액은 template DNA 1µL, 각 primer 20 pmol, 0.2 mM dNTP (Takara, Japan), 10× PCR buffer 2.5µL (Perkin-Elmer, USA), Taq polymerase 2 unit (Takara, Japan)를 혼합하여 총 25µL로 반응시켰다. GeneAmp PCR system 9600

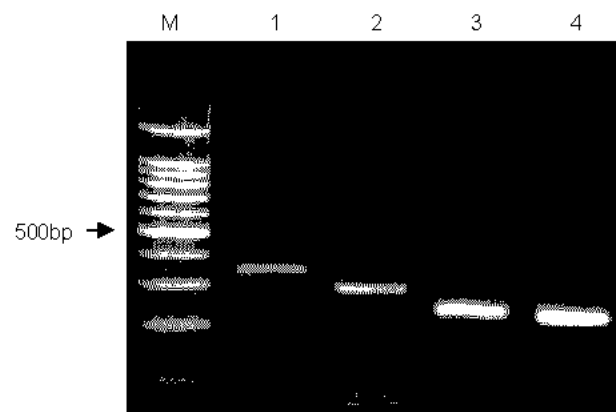


Fig. 1. Electrophoresis after PCR amplification of *H. pylori cagA* and *iceA* using primers. Lane M contains 100 bp DNA ladder. *cagA* (F1/B1) (349 bp, lane1); *cagA* (D008/R008) (298 bp, lane2); *iceA1* (247 bp, lane3); *iceA2* (229 bp, lane4).

(Perkin-Elmer Centus Corp., USA)을 사용하여 94°C에서 3분간 pre-denaturation 후, 95°C에서 20초간 denaturation, 60°C에서 15초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension의 조건으로 30 cycle을 실시하고, 72°C에서 5분간 post-extension을 시행하였다.

3) *cagA*

두 종류의 primer (Table 1)를 이용하여 PCR을 실시하였다(F1/B1 primers, D008/R008 primers)(Fig. 1). 반응액은 template DNA 1μL, 각 primer 20 pmol, 0.2 mM dNTP, 10×CR buffer 2.5μL (Perkin-Elmer, USA, MgCl₂ 불포함), Taq polymerase 2 unit (Tagara, Japan) 및 25 mM MgCl₂ 2μL를 혼합하여 총 25μL로 반응시켰다. 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension하는 cycle을 35회 반복하고, 72°C에서 5분간 post-extension을 시행하였다.

4) *vacA*

s1, s2, m1, m2의 검출을 위한 primer (Table 1)를 이용하여 PCR을 실시하였다(Fig. 2). 반응은 template DNA 1μL, 각 primer 20 pmol, 0.2 mM nNTP, 10×PCR buffer 2.5μL (Perkin-Elmer, USA, MgCl₂ 포함) 및 Taq polymerase 2 unit

(Takara, Japan)를 혼합하여 총 25μL로 반응시켰다. s1, s2는 94°C에서 3분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturaton, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간

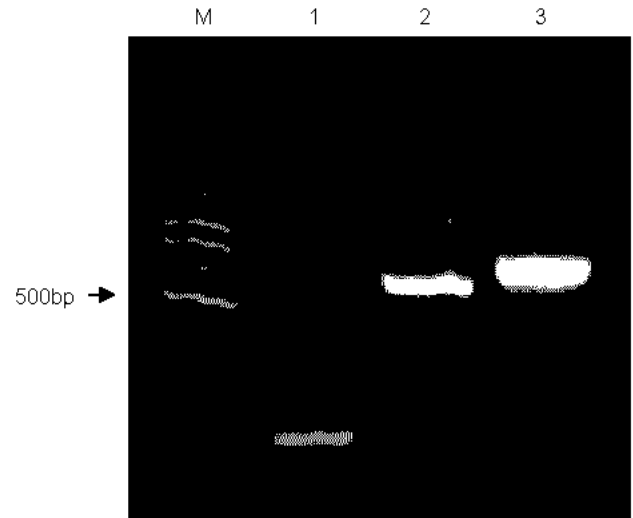


Fig. 2. Electrophoresis after PCR amplification of *H. pylori vacA* gene using primers. Lane M contains 100 bp DNA ladder. *vacA* s1 (259 bp, lane1); *vacA* m1 (570 bp, lane2); *vacA* m2 (645 bp, lane3).

Table 1. PCR primers for amplification of *cagA*, *vacA*, *iceA* and IS605

Region amplified	Primer designation	Primer sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	Location (5' end)
<i>cagA</i>	F1	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	346	19,119
	B1	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA		
<i>cagA</i>	D008	TAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	298	20,179
	R008	TAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		
<i>vacA</i> s1	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259	797
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacA</i> s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	286	284
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacA</i> m1	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	570	2071
	VAG-R	GCGTCTAAATAATTCCAAGG		
<i>vacA</i> m2	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	645	639
	VAG-R	GCGTCTAAATAATTCCAAGG		
<i>iceA1</i>	iceA1-F	GTGTTTTTAAACCAAAGTATC	247	857
	iceA1-R	CTATAGCCAGTCTTCTTTGCA		
<i>iceA2</i>	iceA2-F	GTTGGGTATATCACAATTTAT	229 or 334	
	iceA2-R	TTGCCCTATTTCTAGTAGGT		
IS605 in genome	ISF	CTTAACCAAATCAAGCACC	1077	2990
	ISR	GCTAGATCCAATATGTTGCC		
IS605 in PAI	CTBf	ACATTGAGTAATCGTGCAGG	2071	2071
	CTBr	ACTCACAAGCTGTCTTAACG		

extension의 조건으로 35 cycle을 반응시키고 72°C에서 5분간 post-extension을 시행하였다. m1, m2는 94°C에서 3분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 35 cycle을 반응시키고 72°C에서 5분간 post-extension을 시행하였다.

5) *iceA*

iceA1, *iceA2*의 반응조성과 PCR system은 *vacA*와 동일하며, 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 54°C에서 1분간(*iceA2*는 54.5°C) annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 35 cycle을 반응시키고 72°C에서 5분간 post-extension을 시행하였다.

6) IS605 in genome and PAI

반응은 template DNA 2μL, 각 primer 20 pmol, 0.2 mM nNTP, 10×PCR buffer 2.5μL (Perkin-Elmer, USA, MgCl₂ 포함) 및 Taq polymerase 2.5 unit (Takara, Japan)를 혼합하여 총 25μL로 반응시켰다. 반응은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 1분, 51°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 30 cycle을 반응시키고 72°C에서 2분간 post-extension을 시행하였다.

*H. pylori*의 감염 유무는 세균배양검사, CLO검사, PCR검사 중 하나 이상에서 양성인 경우를 감염 양성으로 판정

Table 2. *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *H. pylori* in gastric biopsy specimen from 54 patients

	GA (n=24) No. (%)	Control (n=30) No. (%)	Total (n=54) No. (%)	p value
<i>cagA</i> (%)				
<i>cagA</i> ⁺	9 (37.5)	20 (66.7)	29 (53.7)	NS
<i>cagA</i> ⁻	15 (62.5)	10 (33.3)	25 (46.3)	0.033*
<i>vacA</i> (%)				
s1~m1	21 (87.5)	25 (83.3)	46 (85.2)	NS
s1~m2	3 (12.5)	5 (16.7)	8 (14.8)	NS
<i>iceA</i> (%)				
<i>iceA1</i> ⁺ <i>iceA2</i> ⁻	16 (66.7)	24 (80.0)	40 (74.1)	NS
<i>iceA1</i> <i>iceA2</i> ⁺	0 (0)	2 (6.7)	2 (3.7)	NS
<i>iceA1</i> ⁺ <i>iceA2</i> ⁺	6 (25.0)	3 (10.0)	9 (16.7)	NS
<i>iceA1</i> <i>iceA2</i> ⁻	2 (8.3)	1 (3.3)	3 (5.6)	NS
IS605 in genome				
IS605 ⁺	8 (33.3)	11 (36.7)	19 (35.2)	NS
IS605 ⁻	16 (66.7)	19 (63.3)	35 (64.8)	NS
IS605 in PAI				
IS605 ⁺	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
IS605 ⁻	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS

GA, gastric adenocarcinoma; *P<0.05, compared GA vs. control

하였다. 통계 분석은 통계 소프트웨어인 SPSS for windows (ver 10.0.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 검정은 Pearson Chi-square test와 Fisher's exact test를 사용하였으며, P값이 0.05 미만은 통계적 유의성이 있는 것으로 정의하였다.

결 과

1) *cagA*의 발현

전체 *cagA* 양성인 경우는 29명이었으며 위선암에서 9명(37.5%), 대조군에서 20명(66.7%)으로 위선암에서는 *cagA* 음성인 경우가 더 많았다(P=0.033)(Table 2).

2) *vacA*의 발현과 아형 분석

vacA 중 m 아형은 위선암군에서 m1 21명(87.5%), m2 3명(12.5%)이었고, 대조군에서 m1 25명(83.3%), m2 5명(16.7%)로 각 군간의 통계적 유의성은 없었다(P=0.913). s 아형은 전 예에서 s1형이었고, s2형은 전 예에서 없었다. s1-m1형이 위선암군이 21명(87.5%), 대조군에서 25명(83.3%)으로 가장 흔한 유형이었고, 아형에 따른 질환 발현과의 관련성은 없었다(P=0.668)(Table 2).

3) *iceA*의 발현과 아형 분석

*iceA*는 *iceA1*⁺/*iceA2*⁻ 40명(74.1%), *iceA1*/*iceA2*⁺ 2명(3.7%), *iceA1*⁺/*iceA2*⁺ 9명(16.7%), *iceA1*/*iceA2*⁻ 3명(5.6%)이었고, 위선암군에서 *iceA1*⁺/*iceA2*⁻ 16명(66.7%), *iceA1*⁺/*iceA2*⁺ 6명(25.0%), *iceA1*/*iceA2*⁻ 2명(8.3%), 대조군에서 *iceA1*⁺/*iceA2*⁻

Table 3. Relationship between combinations of *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes and clinical outcome

	GA (n=24) No. (%)	Control (n=30) No. (%)	Total (n=54) No. (%)	p value
<i>cagA</i> ⁺ s1-m1 <i>iceA1</i>	6 (25.0)	13 (43.3)	19 (35.2)	NS
<i>cagA</i> ⁺ s1-m1 <i>iceA2</i>	0 (0.0)	2 (6.7)	2 (3.7)	NS
<i>cagA</i> ⁺ s1-m1 all+	1 (4.2)	1 (4.2)	2 (3.7)	NS
<i>cagA</i> ⁺ s1-m1 all-	2 (8.3)	1 (4.2)	3 (5.6)	NS
<i>cagA</i> s1-m2 <i>iceA1</i>	0 (0.0)	3 (10.0)	3 (5.6)	NS
<i>cagA</i> ⁺ s1-m2 all+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
<i>cagA</i> ⁻ s1-m1 <i>iceA1</i>	9 (37.5)	7 (23.3)	16 (29.6)	NS
<i>cagA</i> ⁻ s1-m1 <i>iceA2</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
<i>cagA</i> ⁻ s1-m1 all	1 (4.2)	0 (0.0)	1 (1.9)	NS
<i>cagA</i> ⁻ s1-m1 all-	2 (8.3)	1 (3.3)	3 (5.6)	NS
<i>cagA</i> ⁻ s1-m2 <i>iceA1</i>	1 (4.2)	1 (3.3)	2 (3.7)	NS
<i>cagA</i> ⁻ s1-m2 all-	2 (8.3)	1 (3.3)	3 (5.6)	NS

GA, gastric adenocarcinoma.

Table 4. Distribution of *cagA* and IS605 containing strains of *H. pylori* in gastric adenocarcinoma and control

	GA (n=24) No. (%)	Control (n=30) No. (%)	Total (n=54) No. (%)	p-value
<i>cagA</i> ⁺ /IS ⁺	6 (25.0)	8 (26.7)	14 (25.9)	NS
<i>cagA</i> ⁺ /IS ⁻	3 (12.5)	12 (40.0)	15 (27.8)	0.025*
<i>cagA</i> ⁻ /IS ⁺	2 (8.3)	3 (10.0)	5 (9.3)	NS
<i>cagA</i> ⁻ /IS ⁻	13 (54.2)	7 (23.3)	20 (37.0)	0.020*

GA = gastric adenocarcinoma; *P<0.05, compared GA vs. control.

24명(80.0%), *iceA1*⁻/*iceA2*⁺ 2명(6.7%), *iceA1*⁺/*iceA2*⁺ 3명(10.0%), *iceA1*⁺/*iceA2*⁻ 1명(3.3%)로 각 군간의 유의성은 없었고(P=0.267), *iceA1*⁺/*iceA2*⁺가 가장 흔한 유형이었다(Table 2).

4) 게놈과 PAI에서 IS605의 발현

Genome 중 IS605 양성인 경우는 19명(35.2%), 음성인 경우는 35명(64.8%)이었고, 위선암에서 8명(33.3%), 대조군에서 11명(36.7%)로 통계적 유의성이 없었고(P=0.799), PAI 중 IS605는 모든 군에서 음성이었다(Table 2).

5) *cagA*, *vacA*, *iceA* 조합과 질환 발현의 연관성 분석

cagA, *vacA* s-아형, m-아형, *iceA* 분석에 의한 유전자형 조합을 알아본 결과 가장 흔한 아형은 *cagA*⁺ *vacA* s1-m1 *iceA1*으로 전체 54명 중 19명(35.2%)으로 관찰되었으며, 위선암군에서는 *cagA*⁺ *vacA* s1-m1 *iceA1*이 가장 흔한 유형으로 9명(37.5%)이었고 대조군과 통계적 유의성은 없었다(P=0.161)(Table 3).

6) *cagA*와 IS605 조합과 질환 발현의 연관성 분석

위선암군에서는 대조군에 비해 *cagA*⁺/IS605⁻ 경우가 적었으며(12.5% vs. 40.0%, P=0.025) *cagA*⁺/IS605⁺ 경우가 훨씬 많았다(54.2% vs. 23.3%, P=0.02)(Table 4).

고 찰

*H. pylori*는 1983년 Warren과 Marshall(1)이 분리 배양한 이래 각종 위십이지장 질환의 병인에 관여하는 것으로 보고하고 있으며,(7) *H. pylori*는 인체의 위점막에 장기간 서식하여 만성활동성위염을 만들지만 감염된 모든 개체가 아닌 일부에서만 궤양성 질환을 유발하고 감염된 소수에서 위암이 발생한다. 하지만, 어떤 기전으로 다양한 질환을 일으키는지는 정확히 알지 못한다. 따라서 최근의 *H. pylori* 연구의 주된 관심은 감염에 따른 임상결과의 다양

성의 원인을 규명하는 데 모아지고 있다. 이러한 다양성의 원인으로서는 현재 3가지의 주된 가능성이 제시되고 있다.(8) 첫째, *H. pylori*의 세균학적 병원성의 차이(균주의 병리 인자), 둘째, 균에 대한 개개인의 숙주 반응 또는 감수성의 차이(숙주적 인자), 셋째, *H. pylori* 감염의 자연 경과를 변화(modulation)시키는 데 관여하는 환경적 보조요인의 차이(환경적 인자)가 제시되고 있는데, 그중에서 균주의 병리 인자 중 대표적인 것으로는 *urease*, *flagella* 등이 있으나, 이들은 모든 균주에서 공통적인데 반해, 일부 균주에서만 생성되는 병리인자로는 *cagA*, *vacA* 및 *iceA* 등이 알려져 있다.(3,7,9)

cagA 유전자는 120 내지 140 kDa의 고분자량의 단백질을 전사하며 *H. pylori* 균주의 약 60%에서만 존재하고 모든 균주에 다 존재하지는 않는다.(10,11) *cagA*는 위점막에 국소염증반응을 더 심하게 일으켜 *cagA*가 양성인 *H. pylori*에 의한 위염의 경우 *cagA*가 음성인 *H. pylori*에 의한 위염에 비해 병리조직학적으로 염증세포침윤이 더 심하고 interleukin-8 (IL-8)과 같은 cytokine 분비가 더 많이 일어난다고 보고되어(12) 독성인자로서의 *cagA*의 역할이 중요시되고 있다. 그러나 *cagA*-isogenic mutation에 의해서도 IL-8 유도가 감소하지 않는 것으로 보아 IL-8 유도에 직접적인 역할을 하지 않는 것으로 보인다.(13) *cagA*의 유병률에 대해서는 보고자에 따라서 다르며 지역적인 특성이나 검사 방법에 따라서 많은 차이를 보이고 있다. 미국에서 분리된 *H. pylori*의 50~60%가 *cagA* 양성이며 보다 심한 염증을 유발하는 것으로 보고되고 있다.(14) 또한 미국으로 이민한 일본인들을 대상으로 한 연구에서 *H. pylori*에 감염된 환자 중 위암 환자군에서 *cagA* 양성률이 보다 높다고 보고하였다.(15) 반면에 Matsukura 등(16)은 *cagA* 양성률이 위염 74%, 십이지장궤양 80%, 위궤양 82% 그리고 위암에서 77%로 차이가 없었다는 보고를 하고 있다. 우리나라의 경우는 일부 보고(17)에서 유의성이 있다고 하였으나 대부분의 보고에서는 유의성이 없었다.(18-21) 본 연구에서는 *cagA* 양성인 *H. pylori*가 위암과는 무관한 것으로 나타났는데 이는 위암의 발생에는 균주의 병리인자 외에 숙주적 인자와 환경적 인자가 관여하는 것으로 생각된다.

Leunk 등(22)과 Cover 등(23)은 *H. pylori*의 배양 여파액 내에서 HeLa 세포주, CHO 세포주 등 여러 세포주에 공포화를 유발하는 물질을 발견하고 공포화 세포독소라 하였고 그 분자량이 약 87 kDa이라고 하였다. 1992년 Cover와 Blaser(24)가 *tox+* 균주로부터의 공포화 세포독소 정제에 성공하였으며, 이 단백을 코딩하는 유전자도 밝혀져 *vacA* 유전자로 알려져 있다. *cagA* 유전자와는 달리 모든 *H. pylori* 균주가 *vacA* 유전자를 보유하는 것으로 보고되고 있다.(25) 하지만 전체 *H. pylori* 균주의 약 50~60%만 공포화 세포독소(vacuolating cytotoxin)를 생성하는 균주(*tox+*)임이 밝혀졌다.(26,27) 이와 같이 *vacA* 유전자 보유

올과 활성화된 세포독소(*vacA* 단백질) 자체의 발현에 큰 차이가 존재하는 원인에 대해서는 아직 분명히 밝혀지지 않았으나 유전자의 일부 배열순의 차이에 기인할 수 있음을 시사하는 보고가 있다.(28) *vacA* 유전자는 신호서열부(signal sequence)에 대한 부호화 영역인 s-region과 중간부(middle region)에 해당하는 m-region을 내포하고 있으며, (29) s-region에는 s1 및 s2의 대립유전자형이 있으며 s1의 경우 s1a, s1b, s1c의 3가지 아형이, m-region의 경우 m1 및 m2의 대립유전자형이 알려져 있다.(30) In vitro 상태에서 공포화세포독소 발현에 대해 그 동안 많은 연구보고가 있었음에 비해 in vivo 세포독소 발현에 대해서는 논란이 많았으나 최근의 in vivo 동물실험(31) 및 혈청학적 방법을 이용한 간접적인 in vivo 인체 실험(32)에 의하면 세포독소의 in vivo 발현에 대해서도 긍정적으로 보고하고 있다. Gnotobiotic piglet에 tox+*H. pylori* 균주를 처리하여 위 점막 상피세포의 공포화가 증가됨을 관찰한 보고가 있다.(33) 인체의 in vivo 세포독소 발현 여부를 간접적으로 87 kDa 단백질에 대한 혈청학적 반응으로 평가한 결과, 기존의 in vitro 세포독소 발현율과 유사한 양상의 항체 검출률을 보고하였고, 최근의 한 연구에서는 동일대상으로 동시에 in vivo (혈청학적 방법) 및 in vitro에서의 세포독소 발현의 상관관계를 분석한 결과 유의한 것으로 보고하고 있다.(32)

국내보고에 의하면 *vacA* 양성률은 85~100%이며 위암에서 대조군과 차이가 없었으며 아형과도 무관하였으며, (18,33,34) 가장 흔한 아형은 S1c-m1이었다. 본 연구에서도 모든 *Helicobacter pylori* 균주가 *vacA* 유전자 양성이었다 가장 흔한 아형은 s1-m1이었으며 s2형은 없었다. 또한 *vacA*형과 위암과는 무관하였다.

최근의 연구에서 *H. pylori*가 위상피세포에 부착되면 이 자극에 의해 새로운 대립 형질이 발현된다는 가설하에 독성 발현과 관계된 새로운 독성인자인 *ice* 유전자가 발표되면서 소화성 궤양질환과 관련이 있다고 보고되었으며, restriction endonuclease와 유사한 구조를 가진다고 한다. *iceA* 유전자에는 *iceA1* 및 *iceA2*의 대립유전자형이 존재함이 밝혀졌다.(35) 본 연구에는 최근에 보고된 다른 연구 결과(6,18,36)와 같이 *cagA* 상태 또는 *vacA* 및 *iceA* 대립유전자형과 임상질환 사이에 연관성을 확인할 수 없었다.

*H. pylori*의 pathogenicity island(PAI)는 40 kb의 크기로 균주의 독성을 유발하는 부위로 추정되어 그중 *cagA*에 대한 연구는 많이 있었다. *cag* PAI는 non-*Helicobacter* source에서 유래된 것으로 이 부위가 존재하는 경우에는 더 많은 독성이 있는 것으로 추정되며, 크게 두 부분으로 나뉘는데, upstream *cagII* region은 최소 14개의 유전자를 갖고 있고, downstream인 *cagI*에는 16개의 유전자를 포함하고 있다.(37) Censini 등(18)은 또 *H. pylori*를 *cagPAI* 상태와 IS605에 따라 typeI strain과 typeII strain으로 나누었는데

cag PAI 내의 유전적 조합과 다양성에 의해 감염된 개체의 병독성에 변화를 일으키며, *cag* PAI가 없는 경우에는 최소의 독성만을 보인다고 주장하였다. *cag* PAI의 *cagI*과 *cagII* 사이에 single-copy로 존재하는 insertion sequence인 IS605의 존재유무 검사결과 본 연구에서는 발견되지 않았고, 유전자의 다른 부위(IS605 in genome)에서는 위선암에서 8명(33.3%), 대조군에서는 11명(36.7%)이 발견되었으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.799$). *cagA*와 IS605 조합과 질환 발현을 분석한 결과 *cagA*/IS인 경우 대조군에 비해 유의하게 높았다($P=0.020$). *cagA* 양성인 경우에는 병독성이 높아 상부위장관 질환이 많이 발생한다고 알려져 있는데, 본 연구에서는 *cagA*/IS인 경우에 위암이 많이 발생하는 것으로 결과가 나왔는데, 이는 *cagA*와 IS605 외에도 다른 유전적 인자, 숙주 요인 및 환경인자 등이 관여할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 위선암과 *H. pylori* 독성인자인 *cagA*, *vacA*, *iceA*와의 관련성은 없었다. 또한, *vacA* 유전자형의 조합과 *iceA* 대립유전자형에 따른 위선암과의 유의한 연관성도 없었다. IS605는 type II strain (*cagA*/IS605)은 위선암과 연관성이 많았다. 위암의 발생에는 여러 요인들이 관여할 것으로 생각되며 향후 한국인에 감염된 균주의 특이성에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

REFERENCES

- Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;i:1273-1275.
- Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1994;62:1557-1565.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998;115:58-66.
- Xiang Z, Bugnoli M, Ponzetto A, et al. Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (*cagA*) of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:739-745.
- Fallone CA, Barkun AN, Gotke MU, et al. Association of *Helicobacter* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal disease. Am J Gastroenterol 2000;95:659-669.
- Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999;37:2274-2279.

7. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implication for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 1996;41:85-117.
8. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* phenotypes associated with peptic ulceration. *Scand J Gastroenterol* 1994;29(Suppl 205): 1-5.
9. IARC Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Helicobacter pylori*. in: Schistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*: views and expert options of an IACR Working Group on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC 1994;61:177-240.
10. Tummuru MR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993;61:1799-1809.
11. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5791-5795.
12. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. *Helicobacter pylori* *cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;110:1744-1752.
13. Sharma SA, Tummuru MKR, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin & response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect Immun* 1995;63: 1681-1687.
14. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with *cagA* positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995;48:41-49.
15. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleantous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55:2111-2115.
16. Matsukura N, Onda M, Kato S, et al. Cytotoxin genes of *Helicobacter pylori* in chronic gastritis, gastroduodenal ulcer and gastric cancer: An age and gender matched case-control study. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:532-536.
17. 노임환, 임창영, 김정원 등. 위암을 포함한 위장질환에서의 *H. pylori*의 cytotoxin (*vacA*)과 *cagA* 유전자의 발현과 분석. *대한내과학회지* 1995;47(suppl 1):S8.
18. 이진우, 정 석, 김인환 등. 상부위장관질환과 *Helicobacter pylori* 독성인자 유전자 아형의 연관성. *대한소화기학회지* 2001;38:89-97.
19. 김학양, 김중혁, 김용범 등. 한국인 위암 발생의 원인 인자로서 *Helicobacter pylori* *cagA*의 역할에 관한 연구. *대한소화기학회지* 1998;31:160-166.
20. 송은정, 정숙향, 김유철 등. 위선암 발생에 있어 *Helicobacter pylori* 감염 및 *cagA* 유전자 발현의 역할. *대한소화기학회지* 1999;33:321-330.
21. 정성애, 김도영, 정혜경, 이한주, 이선영, 문일환. 한국인의 위암조직에서 *Helicobacter pylori* *cagA* 유전자의 역할. *대한소화기내시경학회지* 1999;19:550-556.
22. Leunk RD: Production of a cytotoxin by *Helicobacter pylori*. *Rev Infect Dis* 1991;13:S686-689.
23. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. *ASM News* 1995;61:21-26.
24. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992;267:10570-10575.
25. Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergency of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994;269: 10566-10573.
26. Figura N, Gugliemetti P, Rossolini A, et al. cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989;27:225-226.
27. Tee W, Lambert JR, Dwyer B. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract disease. *J Clin Microbiol* 1995;33:1203-1205.
28. Garner JA, Cover TL. Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. *J Infect Dis* 1995;172:290-293.
29. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;112:92-99.
30. van Doorn LJ, Figueirredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2597-2603.
31. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1989; 57:1119-1125.
32. Cover TL, Cao P, Lind CD, Tham KT, Blaser MJ. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. *Infect Immun* 1993;61: 5008-5012.
33. 최경현, 이상호, 장명웅. 위암환자에서 *Helicobacter pylori*의 vacuolating cytotoxin 발현율에 관한 연구. *대한소화기학회지* 1997;30:454-461.
34. 이준호, 김학양, 배영덕 등. 한국인 위암 발생에서 *Helicobacter pylori* *vacA*의 역할에 관한 연구. *대한소화기내시경학회지* 2000;21:602-607.
35. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue, et al. Adherence to gastric epithelial cells induced expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:531-537.
36. Pan ZJ, Berg DE, van der Hulst RW, et al. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis*

- 1998;178:220-226.
37. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue, et al. Structure of *cag* pathogenicity island and Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999;44:336-341.
38. Censini A, Censini S, Bugnoli, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14648.
-