

Helicobacter pylori *cagE* 유전자 다형성이 위상피세포주에서 Interleukin-8 유도능에 미치는 영향

이수민 · 이학성 · 이인석¹ · 조유경¹ · 한혜원¹ · 오정환¹ · 박재명¹ · 최명규¹ · 정인식*

가톨릭대학교 의과대학 연구원 소화기연구소, ¹가톨릭대학교 의과대학 소화기 내과

Received September 21, 2004 / Accepted October 26, 2004

Investigation of *Helicobacter pylori* *cagE* Locus Diversity on Interleukin-8 Induction in AGS Cell-line. Su-Min Lee¹, Hak-Sung Lee¹, In-Suk Lee², Yu-Kyung Cho², Hae-Won Han², Jung-Hwan Oh², Jae-Myung Park², Myung-Gyu Choi² and In-Sik Chung¹. ¹Catholic Research Institute of Medical Science, ²Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701 – *Helicobacter pylori* infection is highly prevalent, as high as 2/3 of whole population infected, in Korea. *H. pylori* infection initiates inflammation by induction of interleukin-8 through type IV secretion of CagA. It was recently suggested that induction failure of IL-8 is not associated with defect in *cag* PAI but associated with *cagE* locus diversity. This study was designed to investigate ability of IL-8 induction according to sequence variation within the *cagE* gene, *cagA* TP motifs and *vacA* m-types *in vitro* study using AGS cell-line, and to evaluate its association with different clinical outcome. Seventy-four *H. pylori* stains were isolated from 23 patients with gastric cancer (Ca), 24 subjects with gastritis (G) and 27 patients with duodenal ulcer (Du) in Kangnam St. Mary's Hospital, Seoul, Korea. *cagE* gene diversity was confirmed by the PCR-RFLP methods with *MboI/NlaIII* and tyrosine phosphate motifs (TPMs) of *cagA* was determined TPM-A and C by using *DdeI/Tsp5091* restriction enzyme and TPM-B was determined by Real time PCR the method of Owen et al. and IL-8 was measured by ELISA assay. IL-8 activity was positively detected in 59 among 74 strains (79.7%). IL-8 secretion was significantly increased in *MboI* A and *MboI* B type compared to *MboI* C type and in *MboI/NlaIII* A-C and B-C type than C-C type. IL-8 activity was not associated with either the number or composition of *cagA* tyrosine phosphorylation motifs and *vacA* m-type. There was no significant difference in IL-8 activity among patient groups. *cagE* gene diversity is thought to be mainly associated with the induction of IL-8 in *H. pylori* infection.

Key words – *H. pylori*, *cagE*, IL-8, *cagA* TPMs

Helicobacter pylori (이하 *H. pylori*)는 소화성 궤양의 주요 인자 및 위염의 원인균으로 알려져 있으며[17] 세계 각국에 걸쳐 감염률이 매우 높은 균이다. *H. pylori* 균주 자체 유전자의 세포 독성 차이와[15] 숙주 인자나 환경적 요소로 질병 유발 기전을 설명하고 있으나[5] 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 현재까지 알려진 *H. pylori*의 주요 병독 인자로서는 *vacA*와 *cagA* 두 가지 유전자가 가장 주목을 받고 있다. CagA 단백질은 31개의 유전자를 가진 *cag* pathogenicity island (이하 *cag* PAI)라고 불리는 약 40 kb의 영역으로 구성된 DNA의 대표적 산물이다[6,12,7]. *H. pylori* 균주를 *cag* PAI의 유무에 따라 *cag* PAI를 가진 1형(type I)과 *cag* PAI가 없는 2형(type II)으로 나누는데 1형의 병원성이 더 강한 것으로 알려져 있다[12]. *cag* PAI는 *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis* 등의 세균에서 발견되는 것과 유사한 4형 분비구조(type IV secretion system)를 encoding하고 있다[14]. 4형 분비구조는 *E. coli*에서 세균간에 DNA를 전달하는데 관여하

고, *B. pertussis*에서 pertussis toxin을 분비하는 역할을 하는 것처럼 일반적으로 세포간의 물질이나 신호를 전달하는 기능을 한다. *H. pylori* 에서도 이와 유사하게 여러 독성인자의 분비를 담당할 것으로 생각된다. 대부분의 *cagA* 유전자 양성 균주는 CagA 단백을 만들어내며 *cag* PAI의 다른 모든 유전자를 가지고 있고, 반면에 *cagA* 음성 균주는 *cag* PAI의 모든 유전자가 없는 것으로 알려져 *cagA* 유전자의 존재 유무는 *cag* PAI와 관련된 균주 독성 증가의 표지자로 이용되어왔다. 그러나 최근의 연구에서는 *cagA* 유전자를 가지고 있으나 *cag* PAI가 부분적으로 결손 되어있는 균주가 있고 이들은 *cagA* 유전자가 있음에도 불구하고 CagA 단백을 만들지 못하며 위점막 상피세포주로 부터의 interleukin-8 (이하 IL-8)분비도 현저히 감소되어 있어 *cagA* 유전자의 존재가 *cag* PAI와 관련된 균주 독성의 확실한 표지자가 될 수 없다는 반론이 제시되고 있다[4]. Jenks 등[6]은 *cagA* 유전자를 가진 *H. pylori* 64 균주 중 89%인 57 균주에서만 전체 *cag* PAI를 가지고 있었다고 보고하였으며 Maeda 등[7]은 일본인에서 분리한 63개의 *H. pylori* 균주를 분석한 결과 모든 균주들이 *cagA* 유전자를 가지고 있었으나 이중 4균주(6%)

***Corresponding author**

Tel : 82-2-590-2701, Fax : 82-2-590-2387

E-mail : isc@catholic.ac.kr

에서 *cag* PAI가 부분적으로 결손되어 있었다고 보고하였다. CagA 단백질의 기능은 확실히 밝혀져 있지 않으나 CagA 단백질 type IV secretion system을 통해 위상피세포 내로 들어가 인산화 되면서 세포 내 다른 단백질과의 상호작용에 의해 세포의 성장 및 증식에 관여하는 tyrosine phosphorylation과 관련된 신호 전달 과정이 이루어진다는' 보고도 있다[9]. 그러나 최근에는 Interleukin-8 분비는 CagA 단백질 유무에 독립적이며 다른 대부분의 *cag* PAI 유전자군에 의존적이라고 추정되어지고 있다. 특히 4형 분비구조의 주요한 구조적 요소인 *cagE*에 의해 *cagA*가 숙주세포 내부로 이동되는 것으로 보고 되고 있다[16,1].

본 연구에서는 한국인에서 분리한 *H. pylori* 균주 간의 IL-8 유도능의 차이 정도를 AGS 세포를 이용하여 검토하였고, 이러한 차이가 PCR-RFLP 방법으로 분류된 *cagE* 유전자 간의 다양성과 연관성이 있는가를 검토하고자 하였다[11]. 또한 Ordenbreit 등[9]에 의한 *cagA* tyrosine phosphorylation motifs (TPMs)의 분류에 의한 연관성[10] 및 *vacA* mid-region allelic 변이와 IL-8 유도능 연관성을 검토하고자 하였다[2].

재료 및 방법

대상

2003년 4월부터 2004년 1월까지 본 대학 부속 강남성모병원 내시경검사를 받은 환자들 중 *H. pylori* 감염 양성으로 확인된 위암 23명(31.0%), 위염 24명(32.6%), 십이지장궤양 27명(36.4%) 총 74명을 대상으로 하며, 최근 1개월 내에 항생제 혹은 스테로이드 복용한 환자는 제외하였다. 위암 환자군의 평균 연령은 57.05 ± 11.33 세, 남자 15명, 여자 8명이었으며, 위염 환자는 49.92 ± 6.48 세, 남자 10명, 여자 14명 그리고 십이지장 궤양 환자는 50.47 ± 11.32 세, 남자 15명, 여자 12명으로 위암 환자군의 연령층이 더 높았고, 위염 군에서 여성의 비율이 높았다($p < 0.05$).

방법

H. pylori 검체 채취

상부 위장관 내시경검사를 받고 위암, 위염, 십이지장궤양으로 확인된 환자의 위 점막에 phenol red 용액을 산포하여 *H. pylori*의 감염을 확인하여 채취하였다. 각 환자의 위점막을 Columbia blood agar base, Tryptic soy agar와 BCS가 첨가된 배지에 끓여서 37°C 배양기에서 5일간(10% CO₂, 포화 습도) 배양시킨 후, 배양된 colony를 genomic DNA purification kit (Wizard genomic, promega, USA)를 사용하여 DNA를 추출하여 -20°C에서 보관하였다.

중합효소연쇄반응(PCR) 및 PCR-RFLP를 이용한 *cagE* 다형성 확인

cagA 유전자는 Forward 시발체 5'-GAT AAC AGG CAA

GCT TTT GAA G-3', Reverse 시발체 5'-CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A-3'를 사용하여 349-bp로 증폭시켜 확인하였으며, *vacA* 서브타입 m1/m2는 5'-CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG-3', 5'-GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG-3'를 이용하여 PCR을 수행한 후 결정하였다. *cagA*의 TPMs 결정을 위해 각각의 기준에 보고[11]된 시발체를 제작하여 A type과 C type을 10 pmoles 시발체 각각 2 µl, 10 배의 완충액 2.5 µl, 10 mM dNTP 0.5 µl, Taq DNA 중합효소(5 unit/µl) 0.2 µl, DNA주형 2 µl 그리고, 증류수를 섞어 총 25 µl의 반응 양이 되도록 하여 95°C 5분간 DNA를 변성시킨 후 95°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분으로 총 35주기 시행하였고 마지막 주기에서 72°C 5분의 조건으로 PCR를 시행하여 획득된 PCR 산물을 *DdeI* 제한효소를 사용하여 37°C 4시간 반응, *Tsp509I* (Biolabs Inc, England)를 사용하여 65°C 4시간에서 각각 반응시켜 절단한 후 3% 한천 젤에서 전기영동시켜 A 타입 및 C 타입을 결정하였다. B 타입의 결정을 위해서는 Real-time PCR을 이용하였다. *cagE* 다형성 확인을 위해서 10 pmoles의 forward primer *cagE748-F* (5'-ATG CGA GCC TAT AAT GAG AA-3')과 reverse primer *cagE2268-R* (5'-CCA TTA GGA TCA TTG TGG TC-3') 각각 1 µl와 10배의 완충액 2.5 µl, 10 mM dNTP 0.5 µl, Taq DNA 중합효소(5 unit/µl) 0.2 µl, DNA주형 2 µl, 증류수를 섞어 총 25 µl의 반응 양이 되도록 하여 94°C 5분간 DNA를 변성시킨 후 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 2분은 1주기로 하여 총 30주기를 시행하였으며, 마지막 주기에서 72°C 10분으로 반응시켜 증폭하여 PCR 산물을 *MboI* 및 *NlaIII* 제한효소로 37°C 3시간 반응시켜 절단한 후 UV 투조기로 확인 하였다.

Real-time PCR

TPM-B 타입 결정을 위해 fluorescent dye Cy5'-AAT AAT GGA CTC AAA AAC AGC ACA GA-3'biotin으로 만들어진 탐침자를 사용하여, 200 µM deoxynucleoside triphosphate (50 mM Tris-HCL, 3 mM MgCl₂, SYBR Green 1 diluted 1/10,000), 2 pmole forward primer, 10 pmole reserve primer, 5 pmole 탐침자 그리고 0.8 unit의 Platinum Taq DNA polymerase의 혼합물 18 µl와 DNA 주형 2 µl를 95°C 10초간 DNA를 변성시킨 후 48 to 51°C 10초, 72°C 10초 동안 총 50주기를 시행하였다.

위암 세포주 배양

AGS 위암 세포주(한국세포주은행)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) solution과 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켰다.

위암 세포주에 *H. pylori* 감염

각 질환에서 분리된 균주를 2×10^7 로 균수로 조정된 후 항생제가 제거된 배지에서 1×10^5 AGS 위암 세포주에 감염시킨 후 5% CO₂, 37°C 배양기에서 6시간 동안 공동 배양한 후

AGS 세포주를 모아 단백질을 추출하였다.

세포증식 및 세포상해 측정

96 well에 1×10^3 /well의 위암 세포주를 분주하여 24-96시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 항생제를 포함하지 않은 배지를 첨가한 다음 2×10^5 개의 *H. pylori*를 감염시켜 6시간 동안 37°C배양기(5% CO₂, 포화습도)에서 배양 시킨 후, Premix WST-1 (Permixon WST-1 cell proliferation assay system, takara, japan) 발색 시약을 1well 당 10 µl씩 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂에서 30분간 반응시킨 후 Microplate (ELISA) reader를 이용하여 420 nm와 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IL-8 사이토카인 정량

96 well에 AGS 세포주를 분주한 다음 일정 시간 동안 배양한 후, 항생제를 첨가하지 않은 새로운 배지를 분주 하여 *H. pylori*를 감염시켜 6시간 동안 배양시킨 후 1000 g에서 15분간 원심분리 한 다음 상층액을 분리한 후 Calibrator Diluent RD5P (1X) (quantikine human IL-8 immunoassay kit, R&D systems, USA)로 10배씩 희석시켜 각각의 실험군을 만들었다. 이때 사용된 표준용액으로는 Calibrator Diluent RD5P (1X) 5 mL로 녹인 10 ng IL-8 표준용액으로 연속적 희석법에 의해 표준 정량화 하였다. 최소 측정 농도는 10 pg/mL 이었다. 각 well에 각각의 시료를 50 µl 씩 분주한 후 밀봉하여 커버로 덮은 다음 2시간 동안 실온에서 배양시켰다. 수세용액으로 4번씩 수세한 다음 IL-8 Conjugate 용액을 분주하여 1시간 반응시킨 후 다시 4번 수세하고 기질용액을 넣어 다시 30분간 반응 시킨 후 정지용액을 첨가한 후 30분 이내에 450 nm와 540 nm로 Microplate (ELISA) reader를 사용하여 측정하였다.

통계처리

대상 환자간의 연령비교 및 성비는 Student t-test를 사용하였으며, 제한효소에 의해 분류된 그룹과 IL-8 유도능과의 연관성은 SPSS 프로그램 및 Sigma Stat 프로그램을 이용하여 One way ANOVA로 검정 하였으며, 통계적 유의성은 P 값이 0.05 미만일 때로 인정하였다.

결 과

질환에 따른 IL-8 유도능

각기 질환에서 분리된 *H. pylori* 균주를 AGS 세포주에 감염시킨 후 IL-8 유도능을 측정한 결과 59균주(79.7%)에서 양성이었으며, 15균주는 IL-8 분비량이 200 pg/mL 미만으로 음성으로 판단하였다. *cagE* 유전자가 결핍된 3균주에서는 IL-8 분비량이 80 pg/mL 미만이었다.

질환에 따른 IL-8 유도능을 검토한 결과 질환에 따라 다소 차이는 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 (Fig. 1).

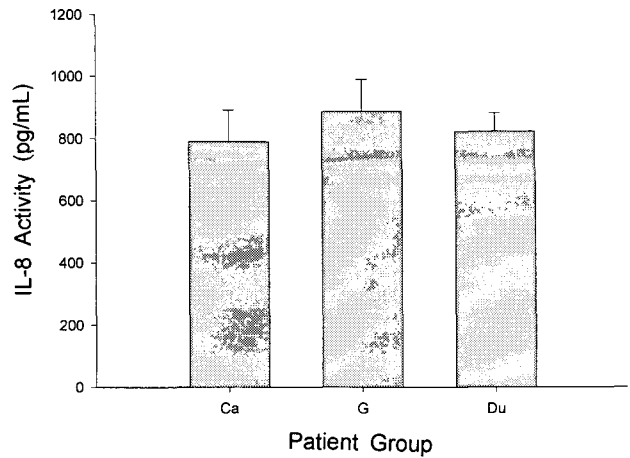


Fig. 1. Induction of IL-8 production by strains of *H. pylori* in each groups. There was no significant differences in production of IL-8 among each groups. (Ca: Cancer, G: Gastritis, Du: Duodenal ulcer)

***cagE* 다양성에 따른 IL-8 유도능**

cagE 유전자는 십이지장궤양 환자에서 분리한 *H. pylori* 3개의 균주를 제외한 모든 균주에서 확인되었다. PCR-RFLP 방법에 의한 분석은 *cagE* 유전자의 다형성을 나타냈다. 즉 1,520-bp의 *cagE* PCR 결과물은 *MboI* 제한효소에 의해 5개의 유전자형을 나타냈으며, 이중에 3개의 유전자형의 빈도가 높았다. A 형은 960-, 470- 그리고 90-bp로 절편화 되었고, B형은 556-, 517- 그리고 447-bp로 절편화 되었으며, C형은 964- 및 556-bp의 길이로 절편화되었다. 한편 제한효소 *NlaIII*에 의한 *cagE* 유전자의 절단은 9개의 유전자형을 보였으며 이중에 3개 유전자형의 빈도가 높았다. C형은 527-, 371-, 358-, 128-, 96-, 36- 및 4bp의 절편으로 염기서열 분석결과로부터 예측되어졌으며, D형은 530-, 360, 320, 130 및 90-bp 그리고 E형은 443-, 371-, 358-, 132-, 96-, 84- 및 36-bp로 예측되어졌다. 가장 작은 절편들은 전기영동 후에는 거의 보이지 않았다 (Fig. 2).

MboI 제한효소 처리에 분류된 유전자형과 IL-8 유도능과의 연관성은 A형 및 B형에서 C형에 비해 통계적으로 유의하게 높은 경향을 보였다(Fig. 3). 그러나 *NlaIII* 제한효소에 의한 분류에 따라서는 통계적인 차이를 나타내지 않았다. *MboI* 및 *NlaIII* 제한효소 조합에 의해 6가지의 RFLP 형을 나타냈다. Owen 등[10]이 보고한 내용과는 다르게 국내에서 분리된 *H. pylori*의 경우는 B-C (48/74)와 C-C (10/74)의 빈도가 가장 높았다(Table 1). 또한 *cagE* 유전자형에 의한 IL-8 유도능은 A-C 형 및 B-C 형이 C-C 형 보다 통계적으로 유의하게 높은 IL-8 유도능을 나타냈다(Fig. 4). 즉 균주 다양성의 관점에서는 *MboI* 제한 효소에 의한 분류 및 *MboI/NlaIII* 조합에 의한 *cagE* 유전자형의 몇몇 군에서 IL-8 유도능 정도와 PCR-RFLP 에 의해 분류된 형태 사이에서 직접적인 연관성을 갖는 것으로 나타났다.

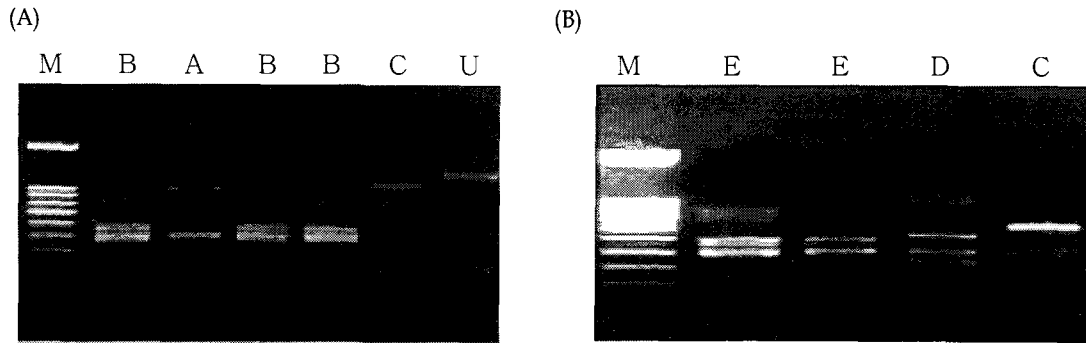


Fig. 2. *H. pylori* *cagE* PCR-RFLP patterns. (A) *cagE* PCR *MboI* digest. A: consisted of 960-, 470- and 90-bp fragments; B: consisted of 556-, 517- and 447-bp fragments; C: consisted of 946- and 556-bp fragments; U: uncut *cagE* PCR amplicon; M: Marker (B) *cagE* PCR *NlaIII* digest. C: consisted of 527-, 371-, 358-, 128-, 96-, 36- and 4-bp fragments; D: consisted of 530-, 360-, 320-, 130-, 90-bp fragments; E: consisted of 443-, 371-, 358-, 132-, 96-, 84-, 36-bp fragments; M: Marker. The some smallest fragments were often not visible after electrophoresis.

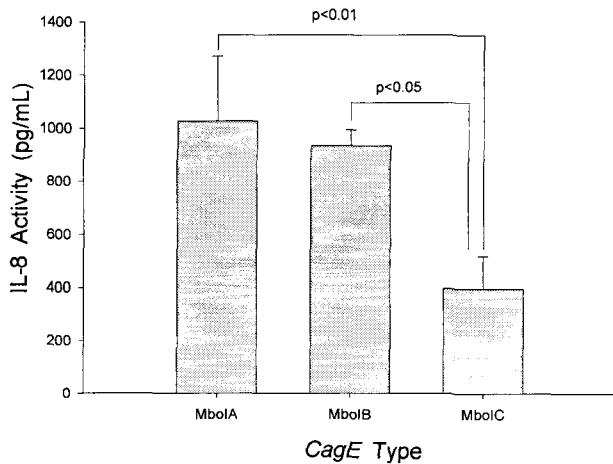


Fig. 3. Comparison of IL-8 activities according to *cagE* patterns, categorized by *MboI* restriction enzyme. Five genotypes were identified by *MboI* restriction of the 1,520-bp PCR amplicon. Three genotypes were found frequently. IL-8 secretion activity was significantly increased in *MboI* A and *MboI* B types than *MboI* C type.

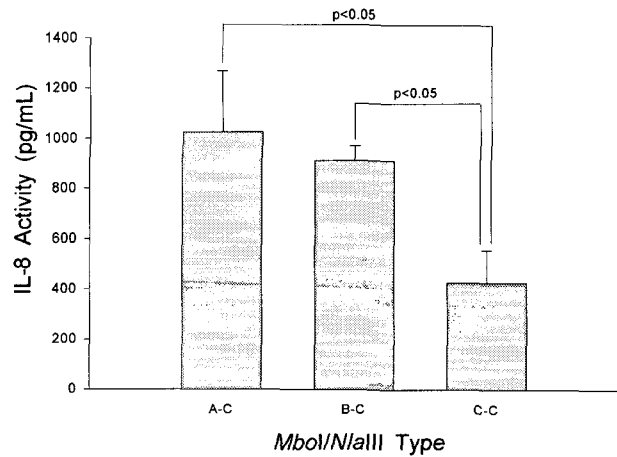


Fig. 4. Comparison of IL-8 activity according to combination *cagE* patterns, classified by *MboI/NlaIII* restriction enzyme. Profiles were combined to 8 distinct (*MboI/NlaIII*) RFLP types. Three types, B-C, C-C and A-C were the most dominant expression. In comparison of these three types, type A-C and B-C show significant high IL-8 secretion activity than type C-C.

Table 1. Distribution of *H. pylori* *cagE* RFLP types according to IL-8 induction activity in AGS cell-line

RFLP type	IL-8 positive	IL-8 negative
<i>MboI/NlaIII</i>	n=59	n=12
A-C	5	1
B-C	43	5
B-D	1	0
B-E	2	0
C-C	5	5
C-E	0	1
Not typeable	0	3

cagA TPMs와 IL-8 유도능과의 연관성

IL-8 유도능에 따른 *H. pylori* *cagA* TPMs의 분포는 Table

2에 나타내었다. IL-8 유도능과 무관하게 TPM-A는 대부분의 균주에서 확인되었으며, motif B는 2개의 균주에서 그리고 motif C는 한개도 확인되지 않았다(Fig. 5). 또한 어떠한 TPMs도 가지지 않은 3개의 균주 중 2개의 균주는 IL-8 유도 능이 있는 균주에서, 1개의 균주는 IL-8 유도능이 없는 균주에서 확인되었다. *cagE* PCR-RFLP 유전자 타입과 TPMs 타입의 조합에 의한 결과 분석에 의해서도 IL-8 유도능 및 질환에 따른 차이는 없었다.

vacA mid-region type과 IL-8 유도능과의 연관성

IL-8 유도능에 따른 *vacA* 유전자 m-type의 분포는 IL-8 유도 능이 있는 균주의 경우 m1 타입 52균주(88.1%) m2 타입 7균주(11.9%) 였으며, IL-8 유도능이 없는 균주에서의 빈도는

Table 2. Distribution of *H. pylori* *cagA* TP motif in relation to IL-8 activity

Strains	No motif detected	A	AB	AC	ABC	B	C
IL-8 positive (n=59)	2	57	2	0	0	2	0
IL-8 negative (n=15)	1	14	0	0	0	0	0

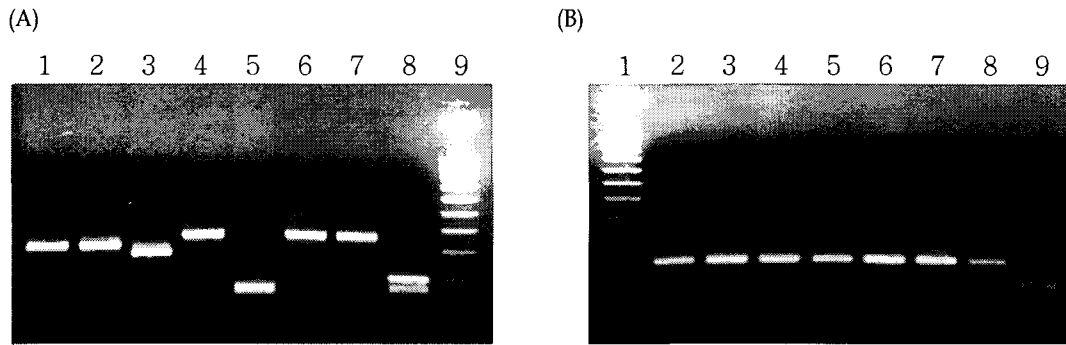


Fig. 5. Examples of PCR-RFLP analysis of *cagA* TPM regions to detect the presence of motifs A and C in *H. pylori* isolates. (A) *DdeI* digestion of the 365-bp amplicon to detect the presence of TPM-A. Lane 1, 2, 3, 4, 6 and 7: positive, lane 5: negative; lane 8: ATCC 43504 TPM-A negative control, lane 9: 100-bp DNA ladder. (B) *Tsp509I* digestion of the 179-bp amplicon to detect the presence of TPM-C. Lane 1: Marker of 100-bp DNA ladder; lane 2-8: negative; lane 9: ATCC 43504 TPM-C positive control.

m1 타입은 14균주(93.3%) 그리고 m2타입은 1균주(6.7%) 였다. IL-8 유도능과 m1/m2 서브 타입간에는 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 세포독성의 차이도 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 AGS 세포주에서 IL-8을 유도하는 *H. pylori* 균주의 다양성을 제시하였으며, 각 질환에 따른 IL-8 유도능에는 차이가 없음을 확인 하였다. 본 연구의 주목적은 *cagE* 유전자내의 염기서열 다형성과 IL-8 유도능과의 연관성 검토이다. IL-8 유도능에 있어서 *cag*-PAI의 *cagA* 및 다른 유전자들의 역할은 CagA 단백질이 4형 분비구조에 의해 숙주세포 형태를 변화시키고 EPIYA의 5개의 아미노산을 가진 영역에서 특정 tyrosine 잔기에 대한 CagA 단백질의 인산화에 의해 숙주 AGS 세포주로 전위 되는 것이 확인된 이후로 주요관심사로 연구되어져 왔다[13]. 1형 *H. pylori*의 숙주세포에 대한 부착은 아직 완전히 밝혀지지 않은 *cag* PAI에 의존적 기전 뿐만 아니라 독립적 기전을 포함하여 IL-8을 유도 한다. Fischer 등[4]에 의한 연구는 *cagE* 유전자가 4형 분비구조에 중요한 요소이며 *cagE* 유전자의 비활성화는 CagA 단백질의 전위 및 IL-8의 유도에 부정적인 효과를 나타낸다고 한다. 이에 본 연구에서는 *H. pylori* 분리균주의 염기서열 다양성을 반영하는 특정한 *cagE* PCR-RFLP 형태에 의한 IL-8 유도능 정도와의 관련성 유무를 우선적으로 확인하였다. 비록 몇몇 PCR-RFLP 형태가 IL-8 유도능이 있는 균주와 유도능이 없는 균주에서

공통적으로 관찰되었지만, *cagE* 유전자 다형성 중 *MboI* A 및 B 형태에서 IL-8 유도능이 유의하게 높았다. 제한효소 *NlaIII*에 의한 분류에 있어서는 각 분류간에 유의한 차이가 없었으나 *MboI/NlaIII*에 의한 *cagE* 유전자 조합형에서는 A-C 형 및 B-C 형태가 C-C에 비해서 IL-8 유도능이 유의적으로 높았다. *MboI/NlaIII* PCR-RFLP에 의한 유전자형은 *cagE* 내의 균주 내 다양성을 반영하는 것이며, *cagE*의 특이적 돌연변이는 AGS 세포주에 대한 부착 능력 또는 균주-숙주간 상호작용의 정도를 감소시킴에 의해 IL-8 유도능 결정에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 한편 *cagE* 유전자가 존재하지 않는 3균주는 검체수가 비록 적었으나 *cagE*가 존재하는 다른 균주에 비해 통계적으로 유의있게 낮은 IL-8 유도능을 보여 Canada에서의 결과와 유의성을 보였다[3]. *cagE*는 *H. pylori*의 type IV secretion system을 구성하는 핵심 구성 성분이므로 *cagE*가 존재치 않을 시에는 *H. pylori*가 숙주 세포에 감염시 effector molecule을 integrate 할 수 없게 됨으로써 cell surface와 pedestal formation의 재구성, 전사인자 AP-1의 활성화, ERK/MAP kinase 활성화에 의한 proto-oncogene인 *c-fos* 및 *c-jun*의 발현 등이 유도되지 못하게 됨으로써 *cagE*의 존재가 갖는 의미가 크다고 할 수 있다. 따라서 추후에 이에 대한 연구가 더 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

또한 본 연구에서는 *H. pylori* 분리균들간의 차이를 PCR-based 돌연변이 검출 방법을 이용하여 *cagA* TPMs의 분포 및 빈도를 확인하였다. 대부분의 균주에서는(71/74; 96%) TPM-A 분포가 많았으며, 소수의(2/74; 2.7%) TPM-B 분포가 확인되었고, TPM-C 형태는 전혀 존재 하지 않았다. Oden-

breit 등[9]의 초기 연구에 의하면 CagA 단백 인산화를 위해서는 이러한 형태들 중 한 개의 사이트가 존재해야 한다고 하였으나 최근에는 CagA 단백 인산화를 위해서는 TPM-C 또는 다중 타이로신 인산화 사이트가 TPM-B와 TPM-C 사이의 영역에 존재해야 한다고 보고되고 있다. 심각한 질병과 관련이 있는 TMP-A, B와 달리 TMP-C는 *H. pylori*의 pathogenesis에 중요 역할을 하지 않는다고 보고 되고 있다[8]. 하지만, TPM-A 또는 TPM-A와 TPM-B가 둘 다 존재 하더라도 TPM-C가 부족하게 되면 phosphorylation 활성이 감소된다고 알려져 있다[4,8]. 그러나 본 연구에서는 TPM-C 사이트 자체가 존재하지 않음에도 불구하고 IL-8 유도능이 있는 것으로 확인되어 TPM-C의 존재는 IL-8 유도능과는 무관할 것으로 생각된다.

결론적으로 *cagE* 유전자형 중 몇몇 군은 IL-8 유도능과 관련이 있을 것으로 추정되지만 *cagA* TPMs 간의 다형성은 IL-8 유도능과는 큰 연관성이 없는 것으로 생각된다. 또한 IL-8 유도능은 *vacA* m-allelic 유전자형과도 무관하며 각 질환간의 차이와도 큰 연관성이 없는 것으로 추정된다.

요 약

한국에서 분리한 *Helicobacter pylori* 균주가 위암 세포주에 IL-8를 유도하는 유도능을 관찰하고자 하였으며, 특히 4형 분비구조의 주요 구성체인 *cagE* 유전자의 다형성에 따라 IL-8 유도능의 차이 및 각 질환에서 분리한 균주에서의 차이가 있는지 검토하고자 하였다. 강남성모병원 내시경검사를 받은 환자들 중 *H. pylori* 감염 양성으로 확인된 위암 23명(31.0%), 위염 24명(32.6%), 십이지장궤양 27명(36.4%) 총 74명을 대상으로 하여 *H. pylori*를 분리한 후 PCR-RFLP 방법을 이용하여 *cagE* 다형성을 확인하였으며, PCR 및 Real-time PCR을 이용하여 *cagA* TPMs를 결정하였다, 또한 분리된 균주를 위암세포주에 감염시켜 상등액을 취하여 ELISA 방법으로 IL-8을 정량화 하였다. 전체 74 개의 분리 균주 중 59개의 균주(79.7%)에서 IL-8 유도능이 있는 것으로 확인되었으며, *cagE* 다형성 중에서 가장 높은 빈도로 관찰되는 형태는 MboI/NlaIII B-C, A-C 및 C-C 타입 이었으며, 이중 A-C와 B-C 형태가 C-C 형태에 비해 유의적으로 높은 IL-8 유도능을 나타냈다. 그러나 *cagA* TPMs의 분류 및 *vacA* m-아형 분류와 IL-8 유도능과는 연관성이 없었다. 비록 본 연구에서 *cagE* 다형성과 IL-8 유도능과 아주 밀접한 연관성이 나타나지는 않았지만 *vacA* m-아형이나 *cagA* TPMs 보다는 *cagE* 다형성이 IL-8 유도능과 연관성이 클 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L.

- Dejonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nicckelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-180.
- Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, M. K. Tummuru, M. J. Blase and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: Association of special *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* **270**, 17771-17777.
- Day, A. S., N. L. Jones, J. T. Lynett, H. A. Jennings, C. A. Fallone, R. Beech and P. M. Sherman. 2000. *cagE* is a virulence factor associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulceration in children. *J Infect Dis* **181**, 1370-1375.
- Fischer, W., J. Plus, R. Buhdorf, B. Gebert, S. Odenbreit and R. Hass. 2002. Activation of *Helicobacter pylori cagA* by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **43**, 961-969.
- Graham, D. Y., H. M. Malaty, D. G. Evans, D. Jr. Evans, P. D. Klein and E. Adam. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* **100**, 1495-1501.
- Jenks, P. J., F. Megraud and A. Labigne. 1998. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. *Gut* **43**, 752-8.
- Maeda, S., H. Yoshida, T. Ikenoue, K. Ogura, F. Kanai, N. Kato, Y. Shiratori and M. Omata. 1999. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* **44**, 336-341.
- Odenbreit, S., J. Puls, W. Fischer and R. Hass. 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol* **3**, 21-31.
- Odenbreit, S., J. Plus, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer and R. Hass. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori cagA* into Gastric Epithelial Cells by Type IV secretion. *Science* **287**, 1497-1500.
- Owen, R. J., I. S. Sally, S. A. Chisholm and S. Rijpkema. 2003. Identification of *cagA* tyrosine phosphorylation DNA motifs in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients by novel PCR-restriction fragment length polymorphism and Real-Time fluorescence PCR assays. *J Clin Microbiol* **41**, 3112-3118.
- Owen, R. J., S. Sharp, A. J. Lawwon, Z. Durrani, S. Rijpkema and M. Kidd. 2003. Investigation of biological relevance of *Helicobacter pylori cagE* and vacuolating cytotoxin genotype on IL-8 incuption in gastric epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **36**, 135-140.
- Slater, E., R. Owen, M. Williams and A. Pounder. 1999. Conservation of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* and association with vacuolating cytotoxin alleles

- and IS605. *Gastroenterology* **117**, 1308-1315.
13. Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fanti and A. Covacci. 2002. C-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **43**, 971-980.
 14. Stein, M., R. Rappuoli and A. Covacci. 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* cagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 1263-1268.
 15. Tummuru, M. K. R., T. L. Cover and M. J. Blaser. 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* **61**, 1799-1809.
 16. Tummuru, M. K. R., S. A. Sharma and M. J. Blaser. 1995. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **18**, 867-876.
 17. Warren, J. R. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. **1**, 1273.