

## Proton Pump Inhibitor에 의한 *Helicobacter pylori*의 혈관형성 억제 효과

아주대학교 의과대학 <sup>1</sup>외과학교실, <sup>2</sup>간 및 소화기질환 유전체센터

진성호<sup>1</sup> · 이화영<sup>1</sup> · 김동규<sup>2</sup> · 조용관<sup>1</sup> · 함기백<sup>2</sup> · 한상욱<sup>1</sup>

**목적:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 감염이 숙주의 혈관형성을 유도하는 작용은 잘 알려져 있으나, 이러한 혈관형성 유도작용을 억제하는 기전이나 치료법은 아직 연구되지 않았다. 이에 저자들은 HP 감염이 위 점막의 혈관형성에 미치는 영향과 이에 대한 gastric proton pump inhibitor (PPI)의 강력한 억제 효과를 규명하기 위해 본 연구를 시행하였다.

**대상 및 방법:** *H. pylori* 양성인 20명의 위염 환자와 음성인 18명의 위염 환자를 대상으로 내시경생검으로 수집한 위 점막의 CD34의 발현을 조사하였다. Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1  $\alpha$ )와 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현은 RT-PCR로 측정하였다. *H. pylori* 감염이 human umbilical vein endothelial cell의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 *in vitro* 혈관형성 실험을 시행하였다.

**결과:** 면역조직화학 염색 검사상 *H. pylori* 음성 위염에서보다 *H. pylori* 양성 위염에서 위 점막층의 CD34 양성 혈관이 유의하게 많이 발현되었으며, 이러한 결과는 HIF-1  $\alpha$ 의 발현과 밀접한 상관관계를 보였다. *H. pylori*에 감염된 위 점막 세포의 조건화된 배지는 human umbilical vein endothelial cell의 세관 형성을 자극하였다. 그리고 *H. pylori* 박멸 치료에 사용되는 PPI가 HP 유도성 혈관형성을 현저히 억제하는 효과를 발견하였고, PPI의 작용은 *H. pylori* 유도성 혈관형성의 주된 신호전달 경로인 MAP kinase ERK1/2의 인산화를 억제함으로써 이루어졌다.

**결론:** PPI가 *H. pylori* 유도성 혈관형성을 억제한다는 결과는 *H. pylori*가 관련된 암 발생의 예방을 위하여 PPI를 사용한 항혈관형성 치료가 사용될 수 있음을 제시한다.

**중심 단어:** *Helicobacter pylori*, 위암, 암발생, 혈관형성, Proton pump inhibitor

책임저자: 한상욱, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지  
아주대학교 의과대학 외과학교실, 442-749  
Tel: 031-219-5200, Fax: 031-219-5755  
E-mail: hansu@ajou.ac.kr

접수일: 2005년 8월 18일, 게재승인일: 2005년 9월 7일  
본 연구는 보건복지부 보건과학기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제교유번호: 01-PJ10-PG6-01GN14-0007)  
2005년 대한위암학회 제4회 춘계학술대회 아벤티스 우수논문 발표상 수상하였음.  
제6회 국제위암학회 우수포스터상 수상하였음.

### 서 론

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)로 인한 만성 지속성 위의 염증은 위 선암이나 mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) 림프종 같은 위암의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다는 것은 이미 일반적으로 알려진 사실이나, (1,2) 장기간의 *H. pylori*에 의해 유도된 위의 염증이 어떻게 암을 유발하며 또한 종양 세포들의 생존에 유리한 친암성 미세 환경(pro-cancer microenvironment)을 조성하는지에 대한 정확한 분자기전은 아직 확실히 규명되지 못하고 있다. *H. pylori* 감염에 의한 위암 발생에 대한 설명 가능한 기전으로 1) 많은 양의 oxidative stress의 부하로 인한 종양 돌연변이 유발, (3,4) 2) 세포 번식의 촉진과 세포자멸사의 억제, (5,6) 3) 세포 이동에 필요한 환경을 제공하는 단백질 분해효소와 성장 인자의 생산, (7,8) 4) 강력한 숙주 혈관형성 유도작용 (9-12) 등이 포함되는 것으로 보고되었다.

일부 저자들은 *H. pylori*와 연관된 염증이나 발암 과정에 관련 있는 숙주의 다양한 세포 작용들 중 *H. pylori*에 의해 유도된 혈관형성 성장인자들에 의해 위 점막에서 혈관형성이 강력하게 유도되는 것이 가장 중요할 것이라고 보고하였다. (9-12) Kitadai 등(11)과 Cox 등(12)은 c-DNA microarray 분석의 대용량 처리 기술을 이용하여 *H. pylori* 감염이 IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenin, urokinase-type plasminogen activator (uPA), 그리고 metalloprotease-9와 같은 여러 가지 혈관형성인자들과 단백질분해효소들을 유도한다는 것을 발견하였고, Strowski 등(11)도 *H. pylori*가 MAP kinase 신호전달 경로를 통해 숙주의 VEGF 유전자 발현을 자극한다고 보고하였다. 이러한 기존의 연구들은 *H. pylori*가 위암의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 숙주의 혈관신생을 유도할 수 있음을 시사한다. 그러나 아직까지 *H. pylori*의 숙주 혈관형성 유도작용을 치료의 표적으로 삼은 연구는 시도되거나 발표되지 않았다.

최근 10년간 proton pump inhibitor (PPI)와 두 가지의 항생제(주로 clarithromycin과 amoxicillin)를 함께 복용하는 삼제요법이 *H. pylori* 박멸치료의 표준이 되었다. (13,14) Gastric

proton pump inhibitor는 2-pyridyl methyl/sulfinyl이 치환된 벤지미다졸 유도체( $\alpha$ -substituted 2-pyridyl methyl/sulfinyl benzimidazole derivative)인 전구약물로 활성화되기 위해서는 산성 환경에서 양성자부가(protonation)를 필요로 하며, 산성인 위의 내강에 선택적으로 축적되고, 위벽세포의 소관(canalliculi of parietal cells)에 존재하는  $H^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit의 cysteine residue와 공유 결합하여 위산의 분비를 억제한다.(13,14) 위벽세포의  $H^+/K^+$ -ATPase는 내강의  $K^+$ 를 세포질의  $H^+$ 와 교환하여 위의 산성화를 일차적으로 담당하는 효소이다.(15) PPI로 위산 분비를 억제하는 것은 위 내강의 pH를 높여서 *H. pylori*를 박멸하는데 기여하게 된다. 적절히 높아진 위 내강의 pH로 인해 항생제에 대한 *H. pylori*의 감수성이 증가하게 되는데, 이는 항생제의 최저억제농도가 주변 pH에 매우 의존적이기 때문이다.(16-19)

그러나 저자들은 PPI가 MAP kinase 활성화를 유의하게 억제함으로써 위암 세포에서만 세포자멸사를 선택적으로 유발한다는 새로운 발견을 발표한 바 있으며,(20) 또한 Strowski 등(11)이 *H. pylori*가 MAP kinase 경로를 통해 숙주의 VEGF 유전자 발현을 자극한다고 보고하였으므로, 저자들은 *H. pylori*의 혈관형성 유도 과정에서 PPI가 MAP kinase 억제를 통하여 항혈관형성 작용(anti-angiogenic action)을 나타낼 것이라는 가설을 세웠다. 본 연구에서 저자들은 *H. pylori* 감염이 IL-8, hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1  $\alpha$ ), VEGF와 같은 혈관형성인자들을 강력히 유도함으로써 위 점막의 혈관형성을 촉진한다는 것을 확인하였고, 이러한 혈관형성 유도작용을 PPI가 MAP kinase 경로의 비활성화를 통하여 억제함을 발견하였다.

## 방 법

### 1) 조직 표본 검사

조직 표본은 위내시경상 병소가 없으며 *H. pylori* 감염이 없는 평균연령 48세인 5명의 소화불량 환자와 *H. pylori* 양성이며 활동성 만성위염이 있는 평균연령 55세인 20명의 환자, 그리고 *H. pylori* 음성으로 대부분 non-steroidal anti-inflammatory drugs로 인한 위염 혹은 다른 원인으로 발생한 위염이 있는 평균연령 54세의 18명의 환자들을 대상으로 내시경생검으로 수집하였다. 대상 환자들의 *H. pylori* 감염 여부는 생검 조직을 H&E 염색 및 Giemsa 염색 후 조직학적 검사, 신속 요소 반응 검사(rapid urease test), 그리고 요소 호기 검사를 각각의 환자에서 시행하여, 모든 검사 결과가 음성일 때 *H. pylori* 음성으로 판명하였고 상기 검사들 중 두 개 이상에서 양성으로 나왔을 경우 *H. pylori* 양성으로 분류하였다. 위염은 두 명의 병리의사가 독립적으로 조직 검사하여 modified Sydney classification에 따라 위염의 정도를 등급화하여 점수로 환산하였다.(21)

### 2) 면역조직화학 염색을 통한 위 점막 혈관밀도 조사

위염 환자의 위 점막에서 혈관형성의 정도를 분석하기 위해 CD34<sup>+</sup> 혈관내피세포의 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색을 시행하기 위하여 10% 완충 포르말린으로 고정하였고, 준비된 절편을 탈파라핀화시킨 뒤 함수시켰고, 5% 요소가 첨가된 100 mM의 Tris buffer (pH 7.6)에 파라핀이 제거된 절편을 넣고 850 W 전자레인지에서 5분간 끓였으며 같은 방법으로 각각 5분씩 2번 더 반복하였다. 그 후 이 절편들을 Histostain-Plus kit (Zymed Laboratories Inc. San Francisco, CA, USA)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 염색하였다. CD34 혈관내피세포 표지자에 대한 1차 항체는 Novocastra Laboratories (clone QBEnd/10, United Kingdom)에서 구입하였다. 절편들을 헤마톡실린으로 대비 염색하였고, 서로 떨어진 세 곳에서 100배율 시야로 CD34 양성 혈관의 개수를 세어 평균하여 mean  $\pm$  SEM으로 표시하여 20명의 *H. pylori* 양성 환자와 18명의 *H. pylori* 음성 환자의 혈관밀도를 비교하였다.

### 3) 세포 배양과 세균 균주 및 시약

인간 위 상피 세포주인 AGS 세포를 humidified 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 10% FBS와 100 units/ml 페니실린이 첨가된 RPMI 1640 배지(Gibco BRI, Grand Island, New York, USA)에 배양하였다. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)는 문헌에 기술된 바와 같이 제대정맥을 아교질분해효소로 처리하여 획득하였고,(22) HUVEC 세포들은 20% 송아지 혈청과 90  $\mu$ g/ml 헤파린(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), 그리고 50  $\mu$ g/ml 혈관내피세포 성장인자가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 젤라틴이 덮힌 배양 접시에서 배양되었다.

CagA<sup>+</sup>/VacA<sup>+</sup>인 *H. pylori* 표준 균주(ATCC 43504)를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 입수하였고, 냉동 보관된 *H. pylori*를 7% 양 혈액을 함유하고 있는 혈액우무평판에 파종한 뒤 미호기성 상태(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>)를 발생시키는 kamy pouch (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) 안에 37°C로 5일간 거치해서 냉동 상태에서부터 회복시켰다. 접종을 위해 *H. pylori*를 PBS에서 재부유화시켜 A<sub>450</sub>에서 1.2 units이 되게 하였고, 이는 세균농도 5  $\times$  10<sup>8</sup> CFU/ml에 해당하는 것이며, 5  $\times$  10<sup>8</sup> CFU/ml 농도의 AGS 세포와 함께 배양하였다.

Pantoprazole (PPZ) 용액은 Altana Pharma AG (Konstanz, Germany)에서 구입하였고. 세포배양 실험에는 PD98059 (ERK 1/2 inhibitor, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), SB203580 (p38 inhibitor, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), PDTC (1-pyrrolidinecarbodithioic acid, ammonium salt, NF- $\kappa$ B inhibitor, Calbiochem, La Jolla, CA,

USA), 그리고 BAY11-7082 (NF- $\kappa$ B inhibitor, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)가 사용되었다.

#### 4) Western blot 검사

PPZ을 처리한 세포들의 전체 단백질을 추출하였고 12% SDS-PAGE겔에서 전기영동을 시행하였으며, 그리고 semi-dry transfer system (Hoeffer Phamacia Biotech, San Francisco, CA)을 이용하여 PVDF 막으로 이동시켰다. PVDF 막은 5% 무지방 건조우유로 차단되었고 phospho-ERK, NF- $\kappa$ B p65,  $\alpha$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)에 해당하는 표지항체로 각각 탐침되었다.

#### 5) 면역형광염색 검사

분산된 단일 세포들은 6정-세포배양평판안의  $22 \times 22 \times 1 \text{ mm}^3$  커버글라스에서 1정당  $2 \times 10^5$  cells씩 배양되었고, 24 시간동안 배양된 후에 세포들은 영하 20도의 메탄올에 5분간 담겨 고정된 뒤 실온에서 1% Triton X-100/ PBS 용액에 10분간 용해되었다. 세포들은 5% BSA로 30분간 차단되었고 항-CD31 항체(5% BSA에 1 : 100으로 희석, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 2시간 동안 탐침되었다. 동일초점 현미경(confocal microscope, Olympus, BX50F, Tokyo, Japan)으로 검사하기 위해 Cy3-접합 이차 항체가 사용되었다.

#### 6) 역전사-중합효소 연쇄반응

TRIzol 시약(Life technologies, Milan, Italy)의 적절한 사용으로 세포들의 전체 RNA가 처리되어 분리되었고, 전체 RNA 중  $2 \mu\text{g}$ 은 M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, WI, USA)로 역전사되었다. 중합효소 연쇄반응에 사용된 primer는 Premix Ex Taq kit (Takara, Chiba, Japan)가 사용되었고 다음과 같은 염기서열을 갖고 있었다. HIF-1  $\alpha$ 용은 5'-CTC AAA GTC GGA CAG CCT CA-3'과 5'-CCC CGC AGT AGG TT CTG CT-3'이었고, VEGF용은 5'-TCG GGC CTC CGA AAC CAT G-3'과 5'-GGT TCC CGA AAC CCT GAG G-3'이었으며, GAPDH용은 5'-TTG TTG CCA TCA ATG ACC CC-3'과 5'-TGA CAA AGT GGT CGT TGA GG-3'이었다. PCR 반응은 94°C에서 1분간, 그리고 55°C (HIF-1  $\alpha$ 과 GAPDH) 또는 60°C (VEGF)에서 1분간, 그리고 72°C에서 1분간씩 28주기를 반복하였다. PCR 산물은 1% 아가로오즈 겔에서 용해되었고 ethidium bromide로 염색되었다.

#### 7) *in vitro* 혈관형성 실험

24시간 동안 *H. pylori*와 함께 혹은 단독으로 배양된 위 상피 AGS 세포로부터 조건화된 배지를 수집하여  $5000 \times \text{g}$ 에서 30분간 원심 분리하였다. 상청액은 HUVEC 혈관내피 세포 배지와 1 : 1로 희석하였다. 희석된 배지는 *H. pylori*를 제거하기 위해  $0.4 \mu\text{m}$  구멍의 필터(Millipore, Massachusetts,

MA, USA)를 통해 걸러진 후에 HUVEC 세포 배양에 첨가되었으며 배지는 3일마다 교환하였다. 9일 후에 HUVEC 세포들이 세관을 형성하는 것이 현미경으로 관찰되었으며 혈관내피세포 표지자인 CD31의 면역형광염색 검사를 통해 혈관형성을 증명하였다.

## 결 과

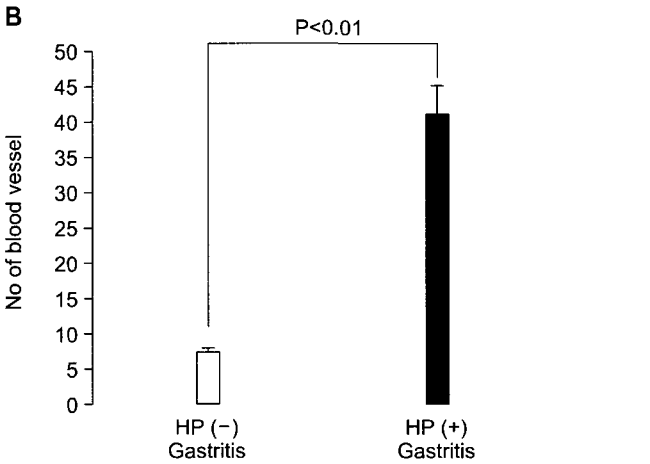
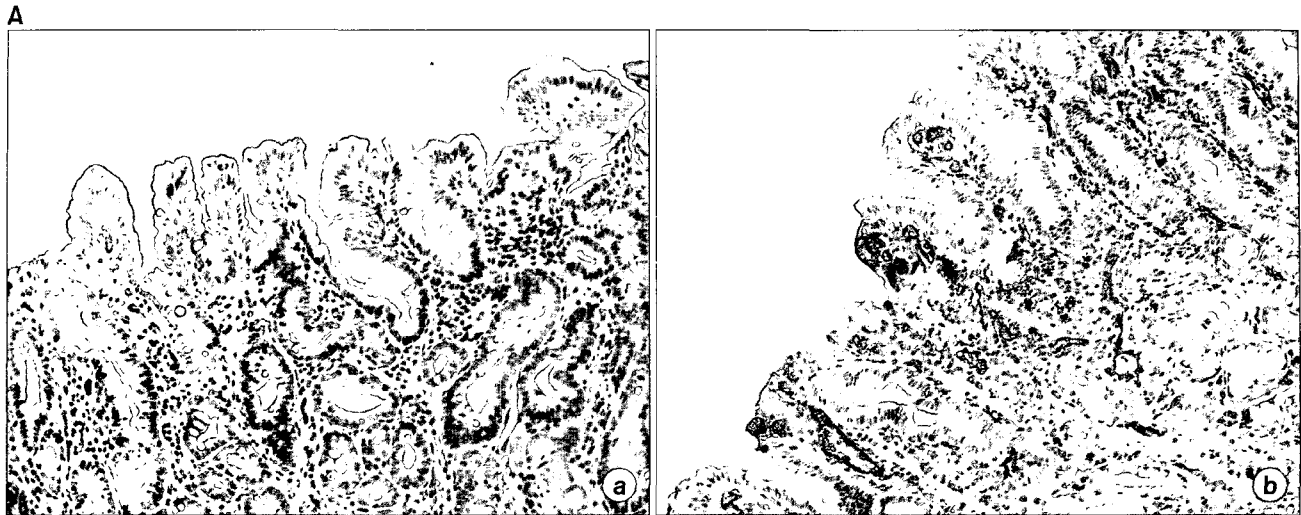
### 1) *H. pylori* 양성과 음성 위염 환자에서 CD34<sup>+</sup> 혈관 발현의 차이

위염 환자의 위 조직은 내시경 검사시 내시경생검으로 수집하였고 H&E 염색을 시행하여 조직학적 검사를 시행하였다. 위염의 정도 자체가 혈관형성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 저자들은 modified Sydney classification(21)에 따라 위염의 정도가 비슷한 20명의 *H. pylori* 양성 위염 환자와 18명의 *H. pylori* 음성 위염 환자를 최종적으로 선택하였다. *H. pylori* 감염에 따른 혈관형성의 차이를 평가하기 위해 CD34 혈관내피세포 표지자에 대한 특이항체를 이용하는 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색 검사상 *H. pylori* 음성 위염에서(Fig. 1A, a)보다 *H. pylori* 양성 위염에서(Fig. 1A, b) 위 점막층의 CD34 양성 혈관이 유의하게 많이 발현되는 것으로 나타났다. 각 표본별로 세 곳에서 동일배율 시야에서 관찰되는 혈관의 개수를 세어 평균값을 Fig. 1B에 나타냈다. *H. pylori* 음성 위염에서는 100배율 시야에서 평균  $7.2 \pm 0.8$ 개의 혈관이 관찰된 반면, *H. pylori* 양성 위염에서는  $40.9 \pm 4.4$ 개의 혈관이 관찰됨으로써 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $P < 0.01$ ). 그리고 *H. pylori* 양성 위염에서 관찰된 혈관들은 *H. pylori* 음성 위염에서 관찰된 혈관들보다 더 두껍고 직경이 컸다. 또한 흥미롭게도 점막층에서 관찰된 혈관보다 점막하층의 간질층에서 관찰된 혈관이 오히려 더 많았으나 *H. pylori* 양성 위염이나 음성 위염에서 점막하층의 혈관 개수는 차이를 보이지 않았다. 이러한 소견은 *H. pylori*가 감염된 위 점막에서 발생된 혈관형성은 *H. pylori* 감염과 연관돼 있다는 것을 시사한다.

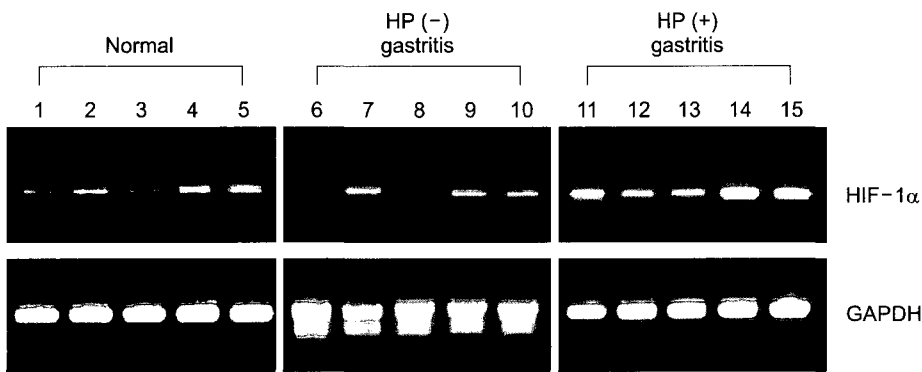
따라서 저자들은 강력한 혈관형성 전사 인자인 HIF-1  $\alpha$ 의 발현에 차이가 있는지를 조사하였다(Fig. 2). 대조군으로는 위내시경상 병소가 없으며 *H. pylori* 감염이 없는 기능성 소화불량으로 진단된 5명의 환자들부터 생검한 위 조직을 사용하였다. HIF-1  $\alpha$  mRNA의 발현을 검사하여 정상 위 조직과 비교했을 때, *H. pylori* 음성 위염에서는 차이를 보이지 않았으나 *H. pylori* 양성 위염에서는 대조군보다 HIF-1  $\alpha$  mRNA의 발현이 현저하게 증가되었으며, 이러한 결과는 HIF-1  $\alpha$ 가 *H. pylori*의 혈관형성 유도작용에 핵심적으로 관여한다는 것을 나타낸다.

### 2) PPI에 의한 *H. pylori* 유도성 혈관형성의 억제

*H. pylori* 감염이 위 점막에 미치는 직접적인 영향을 규명



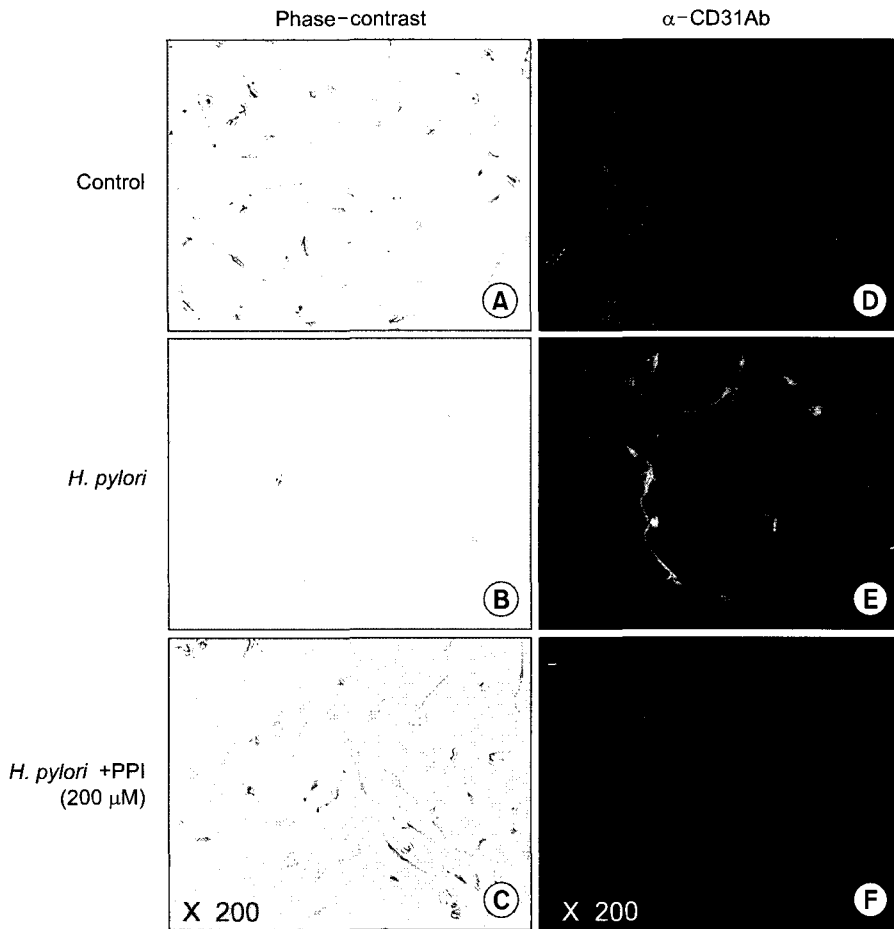
**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of CD34 endothelial cell marker. (A) Immunohistological analysis of CD 34 positive blood vessels in gastric biopsy specimen of *H. pylori*-negative gastritis (a,  $\times 100$ ) or *H. pylori*-positive (b,  $\times 100$ ). Specimens obtained from *H. pylori*-negative gastritis or *H. pylori*-positive gastritis during an endoscopic examination were performed immunohistological analysis with anti-CD 34 antibodies. Arrows indicates CD 34<sup>+</sup> blood vessels stained by dark red color and counterstaining shown as blue colors with hematoxylin staining. (B) Mean scorings of blood vessels stained with CD34. Number of blood vessels in equal dimension was counted in triplicates per each sample and represented means  $\pm$  SD. Note that statistically significant differences showed as P value ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 2.** Expression of HIF-1  $\alpha$  mRNA. RT-PCR of HIF-1  $\alpha$  was done with total RNA isolated from *H. pylori*-negative gastritis (n=5), *H. pylori*-positive gastritis (n=5), and normal stomach (n=5). HIF-1  $\alpha$  expressions were significantly higher in gastric mucosa of *H. pylori* positive gastritis than *H. pylori* negative gastritis in spite similar expression of GAPDH.

하기 위해 저자들은 시험관내 혈관형성 실험을 시행하였다. *H. pylori*에 감염되거나 또는 단독으로 배양된 AGS 세포의 조건화된 배지를 HUVEC 세포의 배양 플라스크에 첨가하여 혈관내피세포의 형태 변화를 관찰하였다. 9일이 지난 후, 감염된 AGS 세포의 배지가 첨가된 HUVEC 세포들은 (Fig. 3B) 대조군에(Fig. 3A) 비하여 유의하게 긴 모양으로 변화하였고 또한 세관 구조를 형성하였다. 그리고 CD 31

면역형광 염색 검사를 통하여 감염된 AGS 세포의 배지가 첨가된 HUVEC 세포들의 CD 31 발현이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다(Fig. 3E), 반면에 감염되지 않은 배지의 첨가는 HUVEC 세포들의 세관 형성이나 CD 31 혈관내피세포 표지자의 발현을 자극하지 못하였다(Fig. 3D). 시험관내 혈관형성 실험으로 밝혀진 결과들은 *H. pylori* 감염이 감염된 위 상피 세포로부터 여러 가지 혈관형성 유도인자들의 분

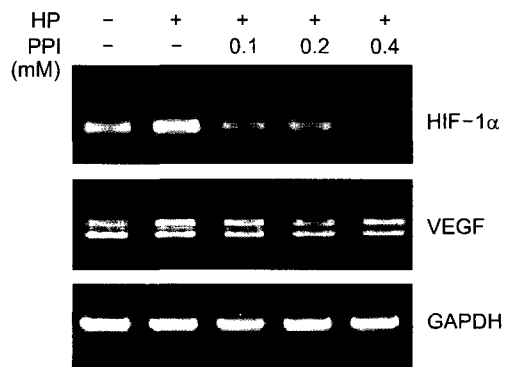


**Fig. 3.** *In vitro* angiogenesis assay. The conditioned media was obtained from human gastric AGS cells treated with control (A & E), *H. pylori* alone (B & F), and *H. pylori*/ PPZ (200  $\mu$ M, C & G) and added to the basal culture medium of HUVEC cells. After 9 day culture, morphological change of HUVEC cells were observed under the phase-contrast microscopy (A, B, & C,  $\times$ 400). Immunofluorescence staining was performed to detect expression of CD 31 endothelial cell marker and evaluated by a fluorescence microscopy (D, E, & H,  $\times$ 400 magnification).

비를 촉진함으로써 혈관내피세포의 성장과 분화를 유도할 수 있음을 강력히 시사하는 것이다. 더군다나 AGS 세포에 200  $\mu$ M의 PPZ를 전처리하면 HUVEC 세포들의 세관 형성과 (Fig. 3C) CD 31의 발현이(Fig. 3F) 현저히 억제되는 흥미로운 결과를 얻게 되었다. 이러한 결과는 *H. pylori*의 시험관내 혈관형성 유도작용을 PPZ가 억제한다는 것을 증명하는 것이며, 또한 PPI를 이용한 항혈관형성 치료가 향후 *H. pylori*의 발암 작용에 대한 유망한 치료법으로 사용될 가능성을 시사하는 것이다.

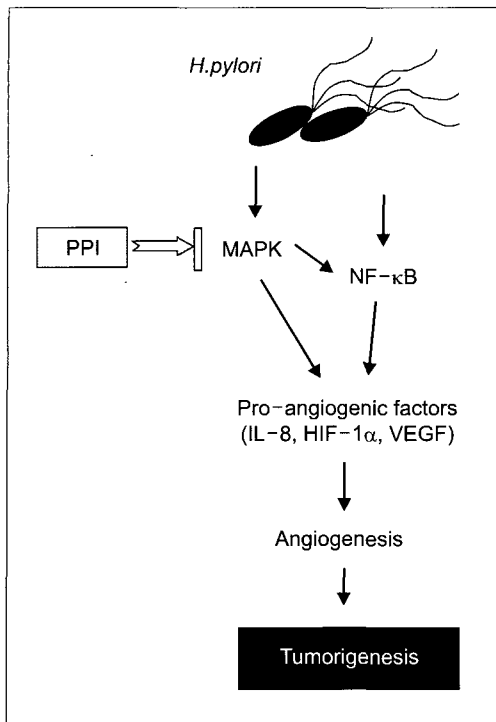
**3) *H. pylori*에 감염된 위 상피로부터 혈관형성 유도인자들의 생성과 PPZ에 의한 억제**

*H. pylori*에 감염된 후 AGS 세포로부터 혈관형성 유도인자들로 잘 알려진 VEGF와 IL-8의 분비가 유의하게 증가하였고, 분비량은 *H. pylori*에 감염된 시간에 비례하여 증가하였으며, VEGF (1,597  $\pm$  94 pg/ml)와 IL-8 (1,019  $\pm$  278 pg/ml)의 최대 분비량은 24시간 동안 감염된 AGS 세포에서 관찰되었다(data not shown). 그리고 혈관형성 유도인자들의 mRNA 발현을 역전사-중합효소 연쇄반응 검사로 조사하였다(Fig. 4). HIF-1  $\alpha$ 의 표적 유전자 중 하나인 VEGF mRNA



**Fig. 4.** Effects of PPZ on the expressions of IL-8, HIF-1  $\alpha$  and VEGF. AGS cells were treated with different doses of pantoprazol (PPZ) for 16 h prior to *H. pylori* inoculation for 8 h. Total RNA extracted from the cells was performed RT-PCR analysis of HIF-1  $\alpha$  and VEGF.

의 발현은 *H. pylori*에 감염된 지 16시간 후에 유도되었고 이것은 HIF-1  $\alpha$ 의 발현 시간과 일치하였다. 이러한 실험 결과들을 종합해 볼 때 위 상피 세포에서 *H. pylori*의 감염이 혈관형성 성장인자의 합성을 자극하며, 생성된 혈관형성



**Fig. 5.** The contributive mechanism of *H. pylori* to host angiogenesis and a possible role of pantoprazol (PPZ) on its inhibition. *H. pylori* infection triggered significant inductions of angiogenic growth factors like IL-8, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF through the activation of MAP kinase and NF- $\kappa$ B. PPZ prevented the synthesis of angiogenic factors via interrupting the host cell signal of MAP kinase activated by *H. pylori* infection. Since these angiogenic signals were known to be involved in *H. pylori*-associated gastric inflammation and carcinogenesis, the inhibition of angiogenesis with PPZ can provide the chance of cancer chemoprevention.

성장인자는 혈관내피세포의 혈관형성을 발생시킨다는 것을 추론할 수 있었다.

이러한 혈관유도인자의 증가는 PPZ 전처치에 의해 현저하게 억제되었다. 또한 PPZ 전처리는 VEGF 합성에도 상당한 조절 효과를 보였다. PPZ에 의한 혈관형성 유도인자들의 억제는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 PPZ에 의해 유도인자들의 mRNA 전사 또한 감소된 결과로 재입증되었고, PPZ의 용량이 400  $\mu$ M일 때 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF의 발현 정도가 *H. pylori*에 감염되지 않은 대조군과 유사한 정도로 억제되었다.

### 고 찰

위 점막에 *H. pylori*가 감염되면, MAP kinase ERK1/2와 NF- $\kappa$ B와 같이 신호전달에서 가장 실무적인 효소들이 활성화되고, 이 효소들은 IL-8, HIF-1 $\alpha$ , 그리고 VEGF 등과 같은 혈관형성 유도인자들의 전사를 활성화시킨다. *H. pylori*에 의해 유도된 혈관형성 유도인자들의 증가는 위 점막 혈관

내피세포의 소환과 활성화를 자극하여 위 점막층에서 현저한 신생혈관형성을 일으키게 되고, 신생혈관은 위 점막을 염증의 발생이나 위암의 발생에 취약하게 만들고 또한 이들의 발생에 유리한 환경을 제공할 수 있다. *H. pylori* 감염으로 유발된 만성적으로 지속되는 위의 염증은 위암의 발생과 진행의 선행요인이 될 수 있으며, *H. pylori* 유도성 혈관형성은 다른 원인의 발암작용과 함께 *H. pylori*와 관련된 위암의 발생에 관여할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구를 통하여 저자들은 *H. pylori* 감염과 혈관형성의 직접적 상관관계를 증명하였으며, PPI 처치가 *H. pylori* 유도성 혈관형성에 대한 억제효과가 있음을 처음으로 발견하였다. PPI 처치는 *H. pylori*가 감염된 위 상피세포에서 IL-8, VEGF, HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 효과적으로 억제하였고, 이러한 현상은 *H. pylori* 감염으로 유도된 MAP kinase 신호의 비활성화를 통하여 일어난다(Fig. 5). 따라서 이러한 증거들은 현재까지 주로 위-식도 역류성 질환 및 *H. pylori* 제균 치료에 사용되는 PPI를 항혈관형성 치료제로 사용함으로써 *H. pylori*와 관련된 위암의 발생을 안전하게 예방할 수 있는 새로운 치료방침을 세울 수 있도록 희망을 주고 있다.

신생혈관증식(neovascularization)이란 존재하고 있는 혈관내피 전구세포로부터 새로운 혈관이 발생하는 과정을 일컫는 용어로 정상적인 창상의 치유과정이나 염증이나 궤양성 상피 손상의 발병과정에 중요하게 관련되어 있는 일반적인 생리기전이며, 또한 악성 종양의 성장 및 전이에도 결정적으로 관련되어 있다.(23,24) 그리고 VEGF는 강력한 신생혈관형성 작용을 가진 혈관형성 유도인자들 중 하나로 알려져 있다. 비록 지금까지의 연구자들이 주로 VEGF 유전자의 발현 증가가 소화성 궤양이 아무는 데 도움이 된다는 것을 확인하는 데 주안점을 두었지만,(25) 저자들은 본 연구를 통하여 *H. pylori* 감염이 혈관형성 유도인자들의 발현을 상향조절하고 점막층에서 혈관의 침윤을 증가시킨다는 것을 입증하였고, 아마도 이러한 현상이 *H. pylori* 감염 후에 발생하는 위염의 확산과 위암의 증식에도 관련되어 있을 것으로 생각하고 있다.

몇몇 연구자들은 *H. pylori* 감염이 숙주 VEGF-A 유전자의 발현을 촉진하고 또한 *H. pylori* 유도성 혈관형성이 위암의 발생에 결정적 역할을 할 것이라고 보고하였다.(26-28) 그리고 위 선암에서 VEGF 발현이 높은 경우가 자주 관찰되었고,(34,35) 증가된 혈중 VEGF를 특이 항체를 사용하여 중화시키면 위암의 성장이 강력히 감소된다는 연구도 있었다.(28) *H. pylori* 감염과 관련된 혈관형성의 강력한 자극제들로서 *H. pylori*의 VacA toxin(29)이나 중성구나 대식세포로부터 합성되는 reactive oxygen species(30), CagA pathogenicity islands (PAI),(12,14) 그리고 lipopolysacchride 등이 보고되었고, 세균과 숙주의 혈관형성을 연결 시켜주는 몇 가지의 신호경로들도 밝혀졌다. c-DNA microarray 분석의 대용량 처리 기술을 이용하여 위 상피에서 *H. pylori*에 의해

유도되는 유전자들이 더 많이 밝혀졌으며, 이들 중 대부분은 ADAM series, IL-8, VEGF, integrins, VCAM-1, ICAM-1, E-selection, GRO- $\alpha$ , 그리고 IL-6 등과 같이 혈관형성이나 종양 침습에 대표적으로 관련되어 있는 유전자들이었다.

여러 가지의 PPI들 중 Pantoprazole (PPZ)은 2-pyridyl methyl/sulfinyl이 치환된 벤지미다졸 유도체(a substituted 2-pyridyl methyl/sulfinyl benzimidazole derivative)인 전구약물로 활성화되기 위해서는 산성 환경에서 양성자부가(protonation)를 필요로 하며, 산성인 위의 내강에 선택적으로 축적되고,  $H^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit의 cysteine residue와 공유 결합하여 위산의 분비를 억제한다. 이러한 PPI들은 항생제와 함께 *H. pylori* 박멸치료와 위식도 역류질환을 포함하는 여러 종류의 위산과 관련된 질병에 널리 사용되어 왔다.(15) PPI에 의해 위의 pH가 상승하면 휴지기 상태의 *H. pylori*의 대사가 활성화되고 따라서 항생제에 대한 *H. pylori*의 감수성이 더 높아지게 된다.(16-19) 본 연구에서 저자들은 PPI가 항생제에 대한 *H. pylori*의 감수성을 더 높일 뿐만 아니라 *H. pylori*에 의해 유도되는 숙주의 혈관형성에도 직접적인 영향을 미친다는 사실을 처음으로 발견하였다.

이전 연구에서 저자들은 PPI가 MAP kinase ERK1/2의 인산화에 강력한 억제 작용이 있으며 누드 마우스를 이용한 이종이식 모델에서 PPI 투여가 항암 작용이 있음을 보고한 바 있다.(20) 이러한 ERK 인산화에 대한 PPI의 억제 작용은 *H. pylori*에 의해 유도된 혈관형성을 억제하는 데에도 관여하였다. PPI에 의해  $H^+$ 의 분비가 차단되면 위 내강의 세포 외 pH는 높아지고 반대로 세포 내의 pH는 낮아지게 된다. 높아진 세포 외 공간의 pH는 위 상피세포 주위의 저산소성 미세 환경을 개선시킬 수 있고, MAP kinase 활성화를 억제하여 *H. pylori*에 의해 유도된 세포의 신호전달을 방해할 수 있다. MAP kinase 비활성화에 대한 PPZ의 효과를 ERK1/2나 p38 길항제들과 비교한 결과 PPZ의 억제 효과가 더 강하였으며(data not shown), 용량에 비례하여 더욱 강한 억제작용을 나타냈다. 그러나 PPZ가 NF- $\kappa$ B의 전사 활성화에 미치는 영향은 미미하였다.

결론적으로 본 연구는 *H. pylori* 감염이 위 점막세포에서 혈관형성 성장인자들의 분비를 증가시켜 혈관형성을 촉진하며, *H. pylori*에 의해 유도된 혈관형성 작용이 PPI에 의해 유의하게 억제될 수 있다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 *H. pylori* 감염이 숙주의 혈관형성을 자극함으로써 위염의 확산이나 위암의 발생을 촉진시킬 수 있다는 새로운 관점을 제시해 준다. 또한 *H. pylori*에 의한 위 점막의 혈관형성을 억제하기 위한 목적으로 PPI가 항혈관형성 치료제로 사용될 수 있음을 보여주었다.

## REFERENCES

1. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastroin-
2. Stolte M, Bayerdorffer E, Morgner A, et al. *Helicobacter* and gastric MALT lymphoma. *Gut* 2002;50:III19-24.
3. Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* 2003;124:1408-1419.
4. Bagchi D, Bhattacharya G, Stohs SJ. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori* ori. *Free Radic Res* 1996;24:439-450.
5. Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, et al. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:771-778.
6. Gupta RA, Polk DB, Krishna U, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:31059-31066.
7. Betten A, Bylund J, Christophe T, et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 2001; 108:1221-1228.
8. Crawford HC, Krishna US, Israel DA, Matrisian LM, Washington MK, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. *Gastroenterology* 2003;125:1125-1136.
9. Kitadai Y, Sasaki A, Ito M, et al. *Helicobacter pylori* infection influences expression of genes related to angiogenesis and invasion in human gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:809-814.
10. Cox JM, Clayton CL, Tomita T, Wallace DM, Robinson PA, Crabtree JE. cDNA array analysis of cag pathogenicity island-associated *Helicobacter pylori* epithelial cell response genes. *Infect Immun* 2001;69:6970-6980.
11. Strowski MZ, Cramer T, Schafer G, et al. *Helicobacter pylori* stimulates host vascular endothelial growth factor-A (vegf-A) gene expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB J* 2004;18:218-220.
12. Innocenti M, Thoreson AC, Ferrero RL, et al. *Helicobacter pylori*-induced activation of human endothelial cells. *Infect Immun* 2002;70:4581-4590.
13. Horn J. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin Ther* 2000;22:266-280.
14. Sachs G. Proton pump inhibitors and acid-related diseases. *Pharmacotherapy* 1997;17:22-37.
15. Sachs G, Shin JM, Briving C, Wallmark B, Hersey S. The pharmacology of the gastric acid pump: the  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:277-305.
16. Nakao M, Malfertheiner P. Growth inhibitory and bactericidal activities of lansoprazole compared with those of omeprazole and pantoprazole against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1998;3:21-27.
17. Tsuchiya M, Imamura L, Park JB, Kobashi K. *Helicobacter*

- pylori urease inhibition by rabeprazole, a proton pump inhibitor. *Biol Pharm Bull* 1995;18:1053-1056.
18. McGowan CC, Cover TL, Blaser MJ. The proton pump inhibitor omeprazole inhibits acid survival of *Helicobacter pylori* by a urease-independent mechanism. *Gastroenterology* 1994; 107:1573-1578.
  19. Mauch F, Bode G, Malfertheiner P. Identification and characterization of an ATPase system of *Helicobacter pylori* and the effect of proton pump inhibitors. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:1801-1802.
  20. Yeo M, Kim DK, Kim YB, et al. Selective induction of apoptosis with proton pump inhibitor in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:8687-8696.
  21. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis, the updated Sydney system. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181.
  22. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52: 2745-2756.
  23. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:253-265.
  24. Blagosklonny MV. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* 2004;5:13-17.
  25. Baatar D, Jones MK, Tsugawa K, et al. Esophageal ulceration triggers expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and activates vascular endothelial growth factor gene: implications for angiogenesis and ulcer healing. *Am J Pathol* 2002;161: 1449-1457.
  26. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1679-1684.
  27. Maeda K, Kang SM, Onoda N, et al. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999;86:566-571.
  28. Kanai T, Konno H, Tanaka T, et al. Anti-tumor and anti-metastatic effects of human-vascular-endothelial-growth-factor-neutralizing antibody on human colon and gastric carcinoma xenotransplanted orthotopically into nude mice. *Int J Cancer* 1998;77:933-936.
  29. Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-, cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res* 2003;9:2015-2021.
  30. Park JH, Kim TY, Jong HS, et al. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:433-440.



**= Abstract =**

**Suppression of *Helicobacter pylori*-induced Angiogenesis by a Gastric Proton Pump Inhibitor**

Sung-Ho Jin, M.D.<sup>1</sup>, Hwa-Young Lee<sup>1</sup>, Dong-Kyu Kim<sup>2</sup>, Yong-Kwan Cho, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Ki-Baik Hahm, M.D., Ph.D.<sup>2</sup>, and Sang-Uk Han, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, <sup>2</sup>Genomic Research Center for Gastroenterology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Background:** Though infections of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) are closely associated with activation of host angiogenesis, the underlying mechanisms, as well as the strategy for its prevention, have not been identified. Here, we investigated a causal role of *H. pylori* infection in angiogenesis of gastric mucosa and a potent inhibitory effect of a gastric proton pump inhibitor (PPI) on the gastropathy.

**Materials and Methods:** A comparative analysis of CD 34 expression in tissues obtained from 20 *H. pylori*-associated gastritis and 18 *H. pylori*-negative gastritis patients was performed. Expression of HIF-1  $\alpha$  and VEGF were tested by using RT-PCR. To evaluate the direct effect of *H. pylori* infection on differentiation of endothelial HUVEC cells, we carried out an in vitro angiogenesis assay.

**Results:** *H. pylori*-associated gastritis tissues showed significantly higher density of CD34<sup>+</sup> blood vessels than did *H. pylori*-negative gastritis tissues, and the levels were well correlated with expressions of HIF-1  $\alpha$ . Conditioned media from *H. pylori*-infected gastric mucosal cells stimulated a tubular formation of HUVEC cells. We also found a significant inhibitory effect of PPI, an agent frequently used for *H. pylori* eradication, on *H. pylori*-induced angiogenesis. This drug effectively inhibited the phosphorylation of MAP kinase ERK1/2, which is a principal signal for *H. pylori*-induced angiogenesis.

**Conclusion:** The fact that PPIs can down-regulate *H. pylori*-induced angiogenesis suggest that anti-angiogenic treatment using PPI may be a preventive approach for *H. pylori*-associated carcinogenesis. (**J Korean Gastric Cancer Assoc 2005;5:191-199**)

**Key Words:** *Helicobacter pylori*, Gastric cancer, Carcinogenesis, Angiogenesis, Proton pump inhibitor