

Helicobacter pylori 감염 위상피세포에서 MicroRNA 발현 변화

가톨릭대학교 의과대학 부천성모병원¹, 의정부성모병원², 성빈센트병원³ 내과학교실

김창환¹, 김성수², 김태호¹, 정우철³, 김재광¹

MicroRNA Profile in the *Helicobacter pylori*-infected Gastric Epithelial Cells

Chang Whan Kim¹, Sung Soo Kim², Tae Ho Kim¹, Woo Chul Chung³, Jae Kwang Kim¹

Departments of Internal Medicine, ¹Bucheon St. Mary's Hospital, ²Uijeongbu St. Mary's Hospital, ³St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea, Korea

Background: The expression of miRNAs in response to *Helicobacter pylori* infection has not been well explored. The aims of this study were to evaluate the *H. pylori* associated miRNAs in the gastric epithelial cells.

Methods: We investigated gastric epithelial cell-line (HS3C) exposed *H. pylori* over 3 months and AGS cell-line (AGS) exposed *H. pylori* for 6 hour. After the extraction of miRNA from these cell-lines, microarray and real time PCR were performed to confirm the alteration of expression.

Results: All 12 miRNAs chosen for real-time PCR are based on the result of microarray and their potential functions related to *H. pylori* infection. miR-21, miR-221, miR-222 were upregulated in the *H. pylori* infected AGS cell for 6 hours and HS3C cells. miR-99b, miR-200b, miR-203b and miR-373 were downregulated in the *H. pylori* infected AGS cell for 6 hours and HS3C cells. miR-23a, miR-23b, miR-125b, miR-141 and miR-155 were upregulated in HS3C cell line but not in *H. pylori* infected AGS cell for 6 hours.

Conclusion: miR-21, miR-99b, miR-125b, miR-200b, miR-203b, miR-221, miR-222, and miR-373 are supposed to be related with oncogenesis of *H. pylori* infection. Further studies are needed for the evaluation of the function of these confirmed miRNAs.

Key Words: *Helicobacter pylori*, microRNA, microarray, real-time PCR

서론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 인간에서 암을 일으키는 인자로 밝혀진 첫 세균으로 간암을 일으키는 B형과 C형 간염 바이러스, 자궁경부암을 일으키는 인유두종 바이러스 (human papilloma virus) 등과 같이 위상피세포에 만성적인 염증을 유발하여 위암을 일으키는 것으로 알려져 있다.¹ 그러

나, *H. pylori*와 위암 발병의 분자생물학적 기전에 대해서는 아직 명확하지 않다. 즉, 숙주(인간)의 유전적 소인으로 Interleukin 1-β 및 수용체의 다형성(polymorphism)과, *H. pylori* 균주의 소인으로 병원성 단백질인 CagA, VacA, BabA2 등이 위암 발병의 위험도와 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있고,^{2,3} *H. pylori*에 감염 시 활성산소의 증가로 인한 DNA 손상 및 돌연변이, 위의 성장인자와 펩티드의 변화, 위산분비 등 위내 환경의 변화, 상피 세포에서 불일치 복구(mismatch repair) 단백질 발현의 감소, 세포자멸사 및 세포 교체(turnover)의 증가 등도 *H. pylori* 발암 기전으로 거론되고 있지만 명확하지 않다.³

최근 특정 유전자의 발현에 영향을 주는 원인으로 세포내 microRNA (miRNA)의 변화가 주목받고 있는데, 인간 유전자의 약 30%가 miRNA의 표적이 된다고 밝혀져 상당히 많은

Received: Nov. 2, 2017, Accepted: Dec. 3, 2017

Corresponding author: **Jae Kwang Kim**, MD

Department of Internal Medicine, Bucheon St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 327, Sosa-ro, Bucheon 14647, Korea

Tel: +82-32-340-2114, Fax: +82-32-340-2667

E-mail: jkkim4881@hanmail.net

*Chang Whan Kim and Sung Soo Kim had equal contribution for this manuscript.

인간 유전자의 발현이 miRNA에 의해 조절 되고 있는 것으로 추정하고 있다.^{4,5} 이러한 miRNA의 중요한 기능 중 하나는 종양형성과의 연관성이다.^{6,7} 즉 모든 조직은 각기 다른 상태의 miRNA 성상을 가지고 있는데, 어떤 조직에서 이러한 miRNA 발현의 변화는 암 발생과 연관되어 있다는 것이다.⁸ 더욱이 최근 폐암, 유방암, 교모세포종, 두경부 편평세포암, 위암, 간암, 갑상선암, 전립선암 등 많은 종양에서 특정 miRNA의 발현이 암 발생과 연관되어 있다는 보고가 증가하고 있다.⁸⁻¹¹

암 발생에 더불어 인간 miRNA의 기능으로는 인체 내의 miRNA가 바이러스의 침입으로부터 인체를 보호한다는 것이다. C형 간염 바이러스와 primate foamy virus type 1 (PFV-1) 감염에서 miRNA는 항체가 만들어지기 전 단계의 초기 인체 면역 시스템에 해당하는 역할을 하는 것이 관찰되었다.^{12,13} 이와는 별도로 Kaposi's sarcoma-associated herpes virus, Epstein-Barr virus, SV-40 virus 등에서는 바이러스가 인체 감염 시 스스로 바이러스 유래의 miRNA를 만들어 숙주세포 내로 침투시켜 바이러스의 침입을 용이하게 한다는 보고도 있다.¹⁴⁻¹⁶ 즉 병원체가 인체에 침입할 때 자기에게 유리한 세포 내 여건을 조성하기 위해 인간의 miRNA 성상을 변화시킬 수도 있다는 것이다. 이러한 최근의 연구들은 아직까지 밝혀지지 않은 많은 인간의 miRNA가 *H. pylori*와 같은 병원체와의 감염에 직·간접적으로 관여할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

현재까지 *H. pylori* 감염 위상피세포에서 증가된 2종의 miRNA가 보고되어 있으나,^{10,17} 아직 *H. pylori* 감염 시 수많은 miRNA 중에서 어떤 miRNA가 *H. pylori* 감염과 관련이 있는지를 규명한 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 microarray와 real-time PCR을 이용하여 *H. pylori*가 인간 위 상피세포의 miRNA 발현에 어떠한 영향을 주는지를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 배양

본 연구에서 *H. pylori*의 체내 감염 모델로 HS3C 위상피세포주(Dr. Steven F. Moss로부터 제공받았다)를 이용하였다. 이 세포주는 AGS 위상피세포주를 *H. pylori*에 3개월 이상 감염 얻어진 단일 클론 세포주로 p27 단백질의 감소나 세포자멸사에 대한 내성의 획득 등 원래의 위 상피세포와 유전자 발현에서 상당히 다른 양상을 보여 *H. pylori*에 감염된 위상

피세포의 연구에 이용되고 있다.¹⁸ 그리고 또 다른 감염군으로 6시간 동안 *H. pylori*를 감염시킨 AGS 세포주를 이용하였고, 대조군으로 AGS 인간 위상피세포주(CRL-1739; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 사용하였다.

AGS 인간 위상피세포주와 HS3C 세포주는 75-cm² tissue culture flask (BD Biosciences, San Jose, CA)에서 항생제 없이 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Rockville, ME)이 포함된 Ham's F-12 medium에서 37°C 온도와 5% CO₂ 농도를 유지하였다.

2. *H. pylori* 균주 및 배양 조건

H. pylori strain60190 (ATCC49503)을 공배양(coculture) 실험에 사용하였다. 균주를 37°C 온도와 5% CO₂ 농도의 조건에서 5% sheep blood가 포함된 trypticase soy agar (BD Biosciences)에서 유지하였다. 공배양을 위해 균주를 48시간 동안 계대배양하여 McFarland standard의 흡광도 비교를 통해 현탁액을 희석하여 농도를 맞추었다. 모든 감염 실험에서 *H. pylori* 세균과 위상피세포주는 200:1의 비율로 진행하였다.

3. miRNA Microarray

AGS 세포주, 6시간 동안 *H. pylori*를 감염시킨 AGS 세포주, 그리고 HS3C 세포주는 각각의 세포주로부터 전체 RNA를 추출하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 각각의 동결세포주에서 TRIzol (Invitrogen, Paisley, UK)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였고, 전체 RNA 추출과정은 다음과 같다. 각각의 세포주를 Trizol 반응액 1 mL을 첨가하고 homogenizer를 이용하여 분쇄하고, 200 µL의 chloroform을 첨가하여 14,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 섞어 상온에서 10분간 반응시키고 나서 14,000 rpm으로 원심분리하여 전체 RNA를 침전시킨 후, 75% ethanol로 세척하여 전체 RNA를 분리하였다. 추출한 전체 RNA는 NanoDrop spectrophotometer (Nano Drop, Wilmington, DE)로 OD260/280을 측정하여 그 비율이 1.8 이상인 것을 microarray 실험에 유용한 순도 높은 전체 RNA로 판정하였다. 이 후 Purelink miRNA Isolation Kit (Invitrogen)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 전체 RNA로부터 miRNA를 추출하였고, 추출된 miRNA의 순도는 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Germany)를 이용하여 검사하였다.

지금까지 알려진 250여 개의 인간 miRNA를 검출하기

위하여 mirVana miRNA Probe Set (Applied Biosystems, Foster City, CA)의 DNA oligonucleotide probes를 이용하여 제작한 Custom Microarray (Digital Genomics, Seoul, Korea)를 이용하였다. 이때 사용한 probe는 miRNA registry (Griffiths-Jones 2004)에 등재된 각각의 miRNA의 염기서열을 이용하여 제작하였다. 미리 순수 분리하여 준비된 miRNA는 mirVana miRNA Labeling Kit (Applied Biosystems)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 Cy3와 Cy5를 이용하여 각각 AGS 세포주와 *H. pylori* 감염세포주에 표지(labeling)하였고, miRNA Hybridization Buffer (Applied Biosystems)를 형광표지된 miRNA에 첨가한 뒤 3분간 95°C로 가열하고 밀폐된 카세트 내에서 42°C로 12-16시간 동안 hybridization을 시행하였다. 수세와 건조 후 GenePix 4000B array scanner (Axon instruments, Union City, CA)를 이용하여 scan image를 얻어 GenePix software (Axon)로 영상을 분석하였다.

4. Real-time PCR

동결세포주 50 mg에 Trizol 반응액(Invitrogen)를 넣고 전체 RNA를 추출한 후 Bioanalyzer 2,100 (Agilent)를 이용하여 RNA의 상태를 점검 하였다. miRNA cDNA는 TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 각각의 추출한 전체 RNA를 역전사하여 합성하였으며, 합성 과정은 다음과 같다. 100 mM dNTPs 0.15 µL, multi reverse transcriptase 1 µL (50 U/µL), 10X buffer 1.5 µL, RNase inhibitor 0.19 µL, nuclease-free water 4.16 µL를 섞어서 master mix를 제조하였고, 이 master mix 7 µL에 primer 3 µL, 전체 RNA 5 µL를 첨가하여 얼음에 5분간 방치하여 둔 후, 16°C에서 30분, 42°C에서 30분간 cDNA를 합성한 뒤 85°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

miRNA microarray 결과 대조군에 비해 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 대조군인 AGS 위상피세포주에 비해 평균 감도가 약 2.7배(log ratio 1) 이상 증가 또는 감소를 보이는 유전자 9개와 최근 연구가 활발한 3개의 유전자를 선별하여 총 12개의 miRNA를 대상으로 real-time PCR을 시행하였다. 각각의 반응에 사용한 primer는 Table 1에 나타내었다.

Real-time PCR은 ABI 7900 (Applied Biosystems)을 이용하였으며, 내성표준(internal standard)으로는 housekeeping gene 인 hsa-miR-16를 사용하였다. 반응액은 2X TaqMan Universal Master Mix 10 µL, TaqMan probe 1 µL, cDNA 1 µL, 증류수 8 µL를 첨가하여 총 20 µL로 만들어 95°C에서 10분간 전변성 반응 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을

Table 1. Primer sequences used in real-time PCR

Gene name	Primer sequences (5'→3')
hsa-miR-125b	UCCCUGAGACCCUUAACCCUGUG
hsa-miR-155	UUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUUUGA
hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUCC
hsa-miR-23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
hsa-miR-99b	CACCCGUAGAACCAGCCUUGCG
hsa-miR-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
hsa-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA
hsa-miR-203	GUGAAAUGUUAGGACCACUAG
hsa-miR-221	AGCUACAUCUGUCUGGGUUUC
hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
hsa-miR-373	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU
has-miR-16*	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG

* endogenous control.

한 회(cycle)로 40회 반응시켜 PCR을 시행하였다.

결과 분석은 SDS (Sequence detection system, Applied Biosystems)을 이용하여 각 시료에서의 Ct값을 구하였다. 또한 대조군 시료를 단계별 희석하여 각 miRNA의 표준곡선을 작성하였고, 이를 기준으로 하여 *H. pylori* 감염 위상피세포주 시료의 상대적 정량값을 3회 반복 측정하였다.

결 과

1. miRNA Microarray 결과

HS3C 위상피세포주와 *H. pylori*를 6시간 감염시킨 AGS 위상피세포주에서 대조군인 AGS 위상피세포주에 비해 평균 감도가 2.7배(log ratio 1.0) 이상 증가 또는 감소가 있는 유전자를 선별하였다. 대조군에 비해 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 높게 발현된 miRNA는 18개였으며, 낮게 발현된 miRNA는 39개였다(Fig. 1, Table 2). 이 중 최근 다른 연구에서 그 기능이 밝혀지고 있는 9개(miR-21, miR-23a, miR-23b, miR-155, miR-141, miR-99b, miR-200b, miR-203, miR-373)의 miRNA를 선택하였고, 여기에 최근 연구가 활발한 3개의 miRNA (miR-125b, miR-221, miR-222)를 추가하여 모두 12개의 miRNA를 선별하였다.

2. Real-time PCR 결과

Microarray 결과 선별된 12개의 miRNA에 대한 발현 양상을 HS3C 위상피세포주와 *H. pylori*를 6시간 감염시킨 위상피세포주에서 확인하기 위해 대조군인 AGS 위상피세포주에

서 housekeeping gene 인 has-miR-16과 12개의 miRNA의 cDNA를 각각 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625배로 순차적으로 희석하여 PCR을 시행한 후 각각의 표준 곡선을 작성하였다.

H. pylori 감염 위상피세포주에서 miRNA의 농도는 각각

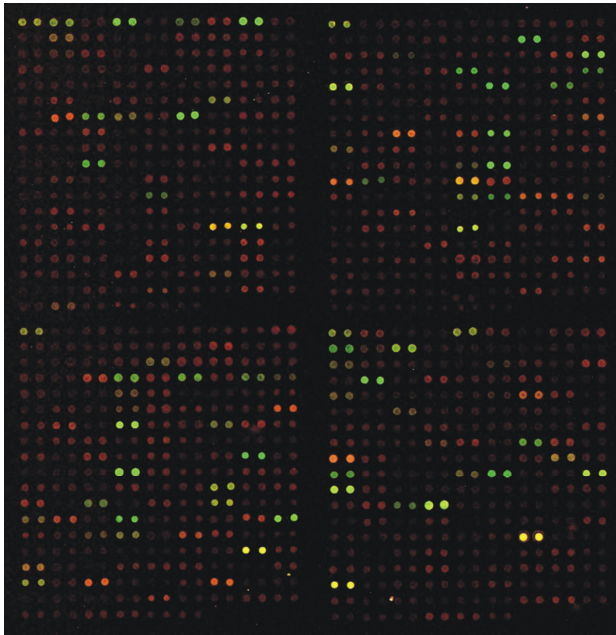


Fig. 1. Images displaying miRNA microarray of the *H. pylori* infected AGS cells. When the *H. pylori* infected AGS cells and non-infected AGS cells are labeled with Cy5-dUTP and Cy3-dUTP, respectively, the upregulated genes in the *H. pylori* infected AGS cells are seen as red fluorescence (Cy-5) and downregulated genes as green fluorescence (Cy-3). Cy5-dUTP, Cyanie 5 deoxyuridine-triphosphate; Cy3-dUTP, Cyanie 3 deoxyuridine-triphosphate.

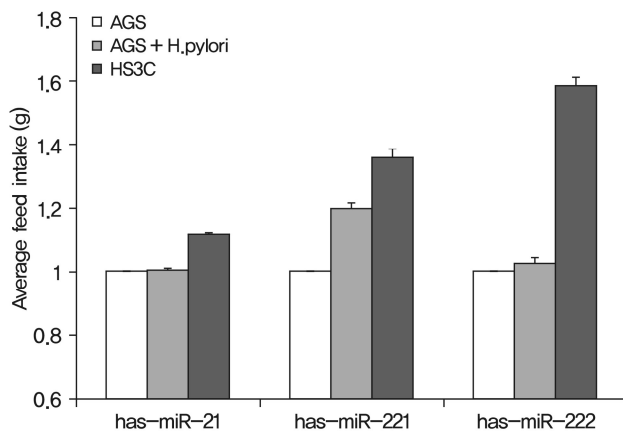


Fig. 2. Relative fold increase of miRNA expressions of miR-21, miR-221 and miR-222 in *H. pylori* infected gastric epithelial cell lines compared to the non-infected AGS cell line. Relative expression level of miRNA was determined by TaqMan real-time PCR, and all data were normalized by housekeeping gene (has-miR-16).

의 표준 곡선을 참조하여 has-miR-16을 각 유전자의 기준으로 하여 정량하였으며, AGS 군에서의 각 miRNA를 기준(1로 정함)으로 상대적인 정량을 하였다. Microarray 분석에서 감소된 것으로 보였던 miR-21, miR-221, miR-222은 real-time PCR에서 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 모두 증가되어 있었다(Fig. 2). miR-99b, miR-200b, miR-203b, miR-373는 microarray 분석에서와 같이 real-time PCR에서도 *H. pylori* 감염 위상피세포주 모두에서 감소되어 있었다(Fig. 3). miR-23a, miR-23b, miR-125b, miR-141, miR-155는 *H. pylori*에 6시간 동안 감염된 AGS 위상피세포주에서 감소되었으나,

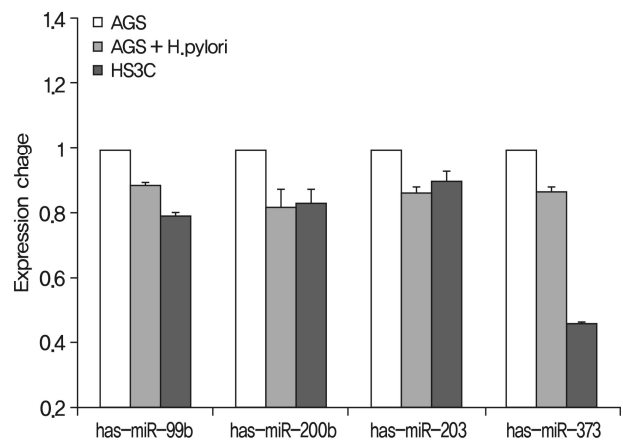


Fig. 3. Decreased expressions of miR-99b, miR-200b, miR-203 and miR-373 in *H. pylori* infected gastric epithelial cell lines compared to non-infected AGS cell line. Relative expression level of miRNA was determined by TaqMan real-time PCR, and all data were normalized by housekeeping gene (has-miR-16).

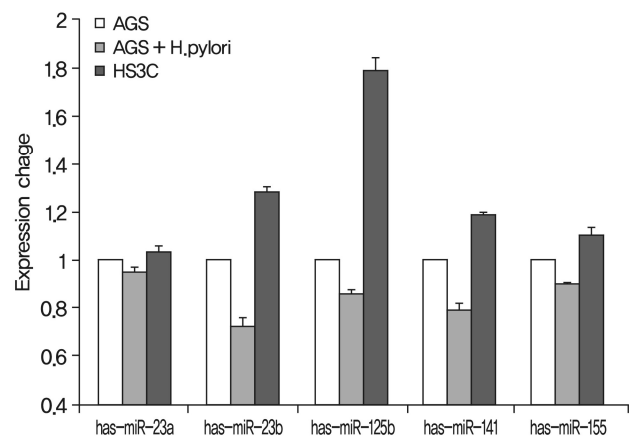


Fig. 4. Overexpressions of miR-23a, miR-23b, miR-125b, miR-141 and miR-155 in HS3C cell line but not in *H. pylori* infected AGS cell lines for 6 hours. Relative expression level of miRNA was determined by TaqMan real-time PCR, and all data were normalized by housekeeping gene (has-miR-16).

Table 2. Microarray analysis of microRNA expression in the *H. pylori* infected gastric epithelial cells

Up regulated		Down regulated	
Gene name	cy5/cy3 log ratio	Gene name	cy5/cy3 log ratio
has-miR-197	2.787432465	hsa-miR-17-5p	-1.510457064
has-miR-296	2.416569549	hsa-miR-324-5p	-1.531156057
has-miR-485-5p	1.988412026	hsa-miR-103	-1.564904848
has-miR-27a	1.974162168	hsa-miR-373*	-1.582079992
has-miR-122a	1.799087306	hsa-miR-141*	-1.621488377
hsa-miR-155*	1.676267408	hsa-miR-106a	-1.657445255
has-miR-220	1.640158155	hsa-miR-18a	-1.703689439
has-miR-198	1.576280258	hsa-miR-30c	-1.722610301
has-miR-26b	1.421694581	hsa-miR-26a	-1.74178261
has-let-7i	1.349365278	hsa-miR-20a	-1.746615764
has-miR-432	1.274410769	hsa-miR-339	-1.780908942
has-miR-518d	1.250961574	hsa-miR-30d	-1.805912948
has-miR-513	1.227124934	hsa-miR-99b*	-1.878321443
has-let-7 g	1.149259365	hsa-miR-193b	-1.894321922
has-miR-202-AS	1.057970069	hsa-miR-21*	-1.954557029
has-miR-153	1.047538389	hsa-miR-185	-2.120294234
has-miR-484	1.046141782	hsa-miR-200a	-2.210896782
has-miR-449	1.007913082	hsa-miR-372	-2.244685096
hsa-miR-125b*	0.439357178	hsa-miR-125a	-2.244685096
		hsa-miR-200b*	-2.388355457
		hsa-miR-22	-2.418889825
		hsa-miR-371	-2.573466862
		hsa-miR-29a	-2.785875195
		hsa-miR-203*	-2.816037165
		hsa-miR-27b	-3.046921047
		hsa-miR-23a*	-3.095419565
		hsa-miR-23b*	-3.412731032
		hsa-miR-222*	-0.418889825
		hsa-miR-221*	-0.123433941

*selected 12 miRNAs for real-time PCR.

HS3C에서는 증가되어 *H. pylori* 감염과의 상관성을 판단할 수 없었다. 그러나, 이중에 miR-125b는 HS3C에서 대조군에 비해 1.78±0.05배로 높게 측정되었다(Fig. 4).

고 찰

miRNA는 21-23개의 뉴클레오티드로 이루어진 극히 작고 단백질을 생산하지 않는 non-coding RNA로 주로 표적 mRNA를 분해하거나 발현을 억제하여 단백질의 발현을 조절한다.¹⁹ 생물정보학적 분석에 의하면 인간유전자의 약 30%가 miRNA의 표적이 될 것으로 추정되는데, 이것은 상당히 많은 유전자의 발현이 miRNA에 의해 조절을 받는다는 것을 의미한다.^{4,5} 현재까지 발견되어 등록된(<http://www.microrna.org>) 인간 miRNA는 677개이나 컴퓨터를 이용한 염기 서열 분석에 의하면 약 200개의 유전자를 표적으로 하는 약 1,000

개 정도의 miRNA가 존재할 것으로 추정하고 있다.

miRNA의 형성은 DNA로부터 RNA 중합효소(polymerase) II에 의해 전사된 길이가 1 kb 이상 되는 긴 일차전사체인 pri-miRNA (primary RNA)로 부터 시작된다.^{20,21} 이 pri-miRNA는 핵 내에서 RNase III 효소인 Drosha에 의해 약 70 뉴클레오티드 크기의 stem-loop 구조를 가진 pre-miRNA (precursor miRNA)가 된다.²² 이 과정에 Drosha는 이중 나선 RNA에 붙는 단백질인 Pasha 또는 DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8)과의 상호작용으로 잘라야 할 RNA 염기 서열의 위치를 정확하게 찾아서 절단하여 pre-miRNA를 만든다.^{23,24} 이렇게 만들어진 pre-miRNA는 Ran-GTP 의존적 수송체인 Exportin 5에 의해서 세포질로 이동하게 되고,^{25,26} Dicer라는 RNase III 효소에 의해서 헤어핀 구조가 잘려지면 서 miRNA: miRNA duplex (20-25 bp)라는 이중 나선 RNA (dsRNA)가 만들어진다.^{27,28} Dicer는 dsRNA-binding domain

인 TRBP (TAR RNA-binding protein)과 PACT (PKR activator)와 중합체를 형성하여 dsRNA와 결합하여 두 개의 단일 가닥 RNA로 분해한다. 이 중 하나의 최종 miRNA를 선택하여 argonaute 단백질군을 포함한 단백질과 결합시켜 RISC (RNA-induced silencing complex)라고 불리는 복합체를 형성한다.^{27,28} 이렇게 만들어진 RISC 내의 최종 miRNA (mature miRNA)는 약 22개 내외의 뉴클레오티드로 이루어져 있고, 상보적으로 결합하는 염기서열을 가진 표적 mRNA의 3'비번역 영역(untranslated region, 3'UTR)에 결합한다. 이렇게 miRNA-RISC 복합체와 결합된 mRNA는 분해(degradation)되거나 유전자 해독 과정이 억제(translational repression)된다.^{29,30}

miRNA는 세포의 분화 증식에서 역할을 하며 면역 반응의 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다.³¹ miRNA는 암세포에서도 흔히 증가해있거나, 감소해 있어 종양유전자 또는 종양억제인자 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁶⁸ 또한 인체 감염시 miRNA는 항체가 만들어지기 전에 초기 인체 면역 시스템에 해당하는 역할을 하여 바이러스의 침입으로부터 인체를 보호하거나,^{12,13} 바이러스가 인체 감염시 스스로 바이러스 유래의 miRNA를 만들어 침입을 용이하게 하기도 한다.^{14,16} 따라서 *H. pylori* 감염시 숙주세포 내에서도 miRNA는 많은 변화를 유도하여 만성 염증을 유지하며, 발암과정에 다양한 역할을 할 것으로 추정하고 있다.

그러나 현재까지 *H. pylori* 감염과 관련된 miRNA에 대한 연구는 아직 미미하여 miR-21과 miR-155에 대한 2개의 연구가 보고되어 있을 뿐이다. Zhang 등의 연구에 의하면 miR-21은 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 증가되어 있고, 종양억제 유전자인 RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs)를 억제하여 위암의 발암과정에 관여한다고 한다.¹⁰ 또한 Xiao 등의 연구에 의하면 miR-155는 *H. pylori* 감염에서 증가되어 있는데, 이는 interleukin-8 (IL-8)와 growth-related oncogen-a (GRO-a) 등을 감소시켜 염증반응을 억제하는 역할을 한다고 한다.¹⁷ 본 연구에서 miR-21은 HS3C 세포주에서는 증가해 있었으나, *H. pylori*에 6시간 동안 감염시킨 AGS 위상피세포주에서는 변화가 없었고, miR-155는 HS3C 세포주에서는 증가해 있었으나, *H. pylori*에 6시간 동안 감염시킨 AGS 세포주에서는 감소해 있었다. 이것은 6시간의 비교적 짧은시간 동안 *H. pylori* 감염으로는 이 두 miRNA가 충분히 발현되지 않고, 3개월 이상 *H. pylori* 감염시킨 HS3C 세포주처럼 충분히 긴 시간동안 *H. pylori*에 감염된 이후에 발현되기 때문으로 추정한다.

최근 위암을 포함한 몇몇 종양에서 miR-221과 miR-222가 유전자 집합체(cluster)로 함께 작용하여 세포주기의 진행을 차단하는 p57이나 p27kip1을 억제하여 종양의 증식과 전이를 유발한다는 것이 밝혀졌다.³² 본 연구에서도 miR-221과 miR-222가 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서도 증가되어 있어 miR-221/222 유전자 집합체는 *H. pylori*의 감염으로부터 위암의 발암기전에 관여할 것으로 추정한다.

Huang 등의 연구에 의하면 miR-373은 전이성 유방암 세포에서 증가되어있는데, 이는 세포 간 유착에 중요한 역할을 하여 종양의 전이를 방지하는 당단백질인 CD44를 감소시켜 종양의 침윤과 전이를 유발하는데 관여한다고 한다.⁹ Yang 등은 전립선암 세포주와 수술로 제거한 전이가 없는 전립선암에서는 오히려 감소되어 있는 경향이 많지만, miR-373을 암세포주에 주입하여 형질전환(transfection) 시켰을 때 CD44를 감소시켜 전립선암의 침윤과 전이를 유발한다고 보고하였다.¹¹ 본 연구에서 miR-373는 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 감소되어 있는 것을 관찰하였는데, 위암의 발생 과정 특히 침윤과 전이에 관련하여 miR-373이 어떤 역할을 하는지에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각한다.

miR-200b를 포함한 miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429)는 transforming growth factor (TGF)- β 에 의해 유발되는 상피-중간엽 세포이행(epithelial-mesenchymal transition, EMT)을 감소시키는 역할을 하고 있으며, 이러한 miRNA군의 감소가 유방암에서 관찰되고 종양의 형성에 중요한 역할을 한다.³³ *H. pylori*도 상피-중간엽 세포이행에서와 유사한 상피세포의 변화를 유발한다. 즉, CagA가 위상피세포 내로 *H. pylori*에 의해 주입되면 위상피세포의 세포와 세포간의 연결이 붕괴되고, 침부-기저외측부 극성(apical-basolateral polarity)이 깨어지는 등의 형태가 변화되는데, 이것은 상피-중간엽 세포이행과 유사하며,³⁴ 본 연구의 결과 확인된 *H. pylori* 감염 위상피세포에서 miR-200b의 감소가 이와 관련이 있을 가능성이 있다.

miR-203은 간암과 만성 골수성 백혈병에서 miR-203 유전자의 메틸화로 인해 miR-203에 의해 억제되어 있던 종양형성인자들이 활성화 되어 발암과정에 관여한다고 알려져 있다.³⁵ *H. pylori* 감염시 여러 유전자의 메틸화가 관찰되고 암화과정에 역할을 하는 것은 잘 알려져 있다.³⁶ 그러므로 본 연구 결과 감소된 miR-203도 이러한 유전자의 메틸화에 의한 감소로 추정할 수 있다.

miR-99b는 자궁내막양 선암종에서 감소되어있고, 다발성 골수종에서는 발현이 증가되어 있다는 보고가 있으나, 아직

정확한 그 기능과 역할은 알려져 있지 않다.^{37,38} 본 연구에서 miR-99b는 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 감소되어 있었는데, 어떤 기능과 역할을 하는지에 대한 규명이 필요하다.

miR-125b는 Le 등의 연구에 의하면 miR-125b를 제거한 세포에서는 p53 단백을 증가시켜 세포자멸사를 유도함을 관찰하여 miR-125b는 p53 단백을 조절하는데 관여한다고 한다.³⁹ 본 연구 결과 miR-125b는 *H. pylori* 감염으로 인한 세포자멸사에 대한 내성을 가진 HS3C 세포주에서 증가되어 있었는데, 이것은 *H. pylori* 감염으로 유발되는 암화 과정에 발현되는 p53 단백질과 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다.

결론으로, 본 연구를 통해 *H. pylori* 감염 위상피세포주에서 miR-21, miR-221, miR-222의 증가와 miR-99b, miR-200b, miR-203b, miR-373의 감소를 확인할 수 있었으며, miR-125b는 HS3C 세포주에서 증가되어 있음을 알 수 있었다. *H. pylori* 감염으로 인한 위암의 발암과정에서 이들 miRNA의 기능과 역할을 규명하는 것이 필요하며, 본 연구의 결과는 이러한 후속 연구의 토대가 될 것으로 기대한다.

요 약

위암 발병에 관여하는 *Helicobacter pylori*는 위상피세포 내에서 많은 miRNA의 변화를 유도하여 발암과정에 역할을 할 것으로 추정하고 있다. 현재까지 *H. pylori* 감염 시 상피세포에서 miRNA 변화에 대해 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구의 목적은 *H. pylori*에 감염된 위상피세포에서 miRNA의 발현 변화를 관찰하고자 하였다.

*H. pylori*에 6시간 동안 감염시킨 AGS 위상피세포주와 AGS 세포주에 3개월 이상 장기간 *H. pylori*를 감염시켜 얻은 세포주(HS3C)를 대상으로 하였다. 대상 세포주로부터 miRNA만을 분리한 후, custom microarray를 이용하여 발현 변화를 관찰하였다. 또한 microarray에서 유의한 증감이 관찰된 목표 유전자를 선별하여 real-time PCR을 이용하여 정량적 변화를 확인하였다.

miRNA microarray 분석 결과를 토대로 변화가 관찰된 12개의 miRNA를 선별하였다. Real-time PCR 검사로 miRNA의 변화를 검정한 결과, miR-21, miR-221, miR-222은 6시간 동안 감염시킨 AGS 위상피세포주와 HS3C 세포주 모두에서 증가되어 있었다. miR-99b, miR-200b, miR-203b, miR-373은 6시간 동안 감염시킨 AGS 위상피세포주와 HS3C 세포주 모두에서 감소되어 있었다. miR-23a, miR-23b, miR-125b, miR-141, miR-155는 *H. pylori*에 6시간 동안 감염된 AGS

위상피세포주에서 감소되었으나, HS3C에서는 증가되어 있었다.

H. pylori 감염 위상피세포주에서 miR-21, miR-99b, miR-125b, miR-200b, miR-203b, miR-221, miR-222, miR-373의 발현 변화는 위암의 발생기전에 관여할 것으로 추정되며, 각각의 기능과 역할의 규명에 대해서는 후속 연구가 필요하다.

REFERENCES

- Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:90-97.
- Machado JC, Pharoah P, Sousa S, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001;121:823-829.
- Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115:787-798.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
- Caldas C, Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med* 2005;11:712-714.
- Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 2005;122:6-7.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
- Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008;10:202-210.
- Zhang Z, Li Z, Gao C, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest* 2008; 88:1358-1366.
- Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2:361-369.
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309:1577-1581.
- Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005;308: 557-560.
- Cai X, Lu S, Zhang Z, Gonzalez CM, Damania B, Cullen BR. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5570-5575.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004;304:734-736.
- Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005;

- 435:682-686.
17. Xiao B, Liu Z, Li BS, et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis* 2009;200: 916-925.
 18. Eguchi H, Carpentier S, Kim SS, Moss SF. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004;53:797-804.
 19. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
 20. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-4060.
 21. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:376-385.
 22. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-419.
 23. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 2004;14:2162-2167.
 24. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-235.
 25. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a Ran-GTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004;10:185-191.
 26. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303:95-98.
 27. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834-838.
 28. Macrae IJ, Zhou K, Li F, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 2006;311:195-198.
 29. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
 30. Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122:553-563.
 31. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008;9:839-845.
 32. Lambeth LS, Yao Y, Smith LP, Zhao Y, Nair V. MicroRNAs 221 and 222 target p27Kip1 in Marek's disease virus-transformed tumour cell line MSB-1. *J Gen Virol* 2009;90:1164-1171.
 33. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601.
 34. Wessler S, Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 2008;16:397-405.
 35. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008; 13:496-506.
 36. Kaise M, Yamasaki T, Yonezawa J, Miwa J, Ohta Y, Tajiri H. CpG island hypermethylation of tumor-suppressor genes in *H. pylori*-infected non-neoplastic gastric mucosa is linked with gastric cancer risk. *Helicobacter* 2008;13:35-41.
 37. Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood* 2009;114:e20-e26.
 38. Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev* 2009;18:50-55.
 39. Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 2009;23:862-876.