Korean Journal of Life Science
Vol 10. No. 6. 630~639, 2000

Helicobacter pylori 감염 환자에서 Western blot 법에 의한 혈청내 세포독성 유전자의 발현에 관한 연구

김대인 · 이 구 · 서정일 · 이창우 · 김정란[1] · 하경임[2] · 이규춘[3] · 남경수[4] · 양창헌*

동국대학교 의과대학 내과학교실, [1]병리학교실
[2]임상병리학교실, [3]신경외과학교실, [4]약리학교실

Diagnostic Significance of Cytotoxic Genes Expression by Western blotting of Serum in *Helicobacter pylori Infection*

Dae In Kim, Goo Lee, Jung Ill Shu, Chang Woo Lee, Jung Ran Kim[1], Gyoung Yim Ha[2], Kyu Chun Lee[3], Kyung Soo Nam[4] and Chang Heon Yang*

Departemt of Internal Medicine, [1]Departemt of Pathology, [2]Departemt of Clinical Pathology, [3]Departemt of Neurosurgery and [4]Departemt of Pharmacology, College of Medicine Dongguk University. Kyong ju, 780-714, Korea

Abstract

The gastric pathogen *Helicobacter pylori(H. pylori)* establishes long-term chronic infection that can lead to atrophic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer. *H. pylori,* which express cytotoxic genes is now recognized as a cause of peptic ulcer and is also a major risk factor for the development of gastric adenocarcinoma. We performed this study 1) to assess the detection rate of *H. pylori* according to direct investigation of bacteria of gastric biopsy specimen and two serologic tests of GAP test and Helico blot 2.0 system in the symptomatic and non-symptomatic group 2) to evaluate and compare the efficacy of two serologic tests of GAP test and Helico blot 2.0 system for the diagnosis of *H. pylori* infection. Forty-nine patients were positive for *H pylori* infection based on direct investigation of bacteria by histology. The detection rates of *H. pylori* were significantly lower in gastric cancer than in other gastroduodenal disease($p<0.05$). The concordance of two serologic tests of GAP test and Helico blot 2.0 system is poor. There was no statistically significant difference between the expression rate of CagA and VacA in the symptomatic and non-symptomatic group. Although Helico blot 2.0 system may not displace GAP test, it was a very sensitive serologic test for the diagnosis of *H. pylori* infection and it was used to detect IgG antibodies to *H. pylori*-specific antigens, including CagA, VacA and the various urease subunit. Our data suggest that further investigation is needed to determine whether or not the serologic expression of cytotoxic gene may be clinical usefulness of diagnostic methods in the gastroduodenal disease.

Key words – *H. pylori,* Western blotting, CagA, VacA

*To whom all correspondence should be addressed
Tel. (054) 770-8206, Fax: (054) 770-8500
E-mail · chhyang@hanmail.net

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 1983년 오스트레일리아의 *Warren*과 *Marshall*[26]에 의해 처음으로 위점막에서 분리 동정된 이후 위염, 위궤양[15], 십이지장궤양, 위암[18] 및 위림프종 등과 같은 소화성 질환의 원인중의 하나로 밝혀져 만성 소화성 질환이 세균 감염에 의해 발생됨을 밝히고 항균제 치료를 도입하는 계기를 마련하였다. 그러나 *H. pylori* 감염 환자들중 일부만이 임상적인 질환을 초래하며 무증상부터 소화성 궤양과 위암까지 다양한 임상결과를 나타내고 그 기전 또한 아직 불분명하여 최근 *H. pylori* 연구의 주된 관심은 감염에 따른 임상결과의 다양성의 원인을 규명하는데 모아지고 있다. 이러한 다양성의 원인으로는 첫째, *H. pylori* 균주간의 병원성의 차이(균주의 병리인자)이고 둘째, 균에 대한 개인의 숙주 반응 또는 감수성의 차이(숙주적 인자)이며 셋째, *H. pylori* 감염의 자연경과를 변화(modulation)시키는데 관여하는 환경적 보조요인의 차이(환경적 인자)가 주된 가능성으로 제시되고 있다[2]. *H. pylori*의 병원성에 관여하는 것으로 알려진 단백질(유전자)은 110-128 kD의 CagA (cagA,cytotoxin-associated gene), 87 kD의 VacA (vacA,vacuolating cytotoxin), 66 kD의 Heat Shock Protein 60 (hsp), 62-65 kD의 ureaseB (ureB), 63 kD의 adhesin (-), 60 kD의 Catalase (-), 56 kD의 flagellin (flaA), 30 kD의 adherence (-), 30 kD의 ureaseA (ureA), 20 kD의 adhesin (hpaA) 등이 대표적인 것인데, urease, flagella, 등은 모든 균주에서 생성되는데 반해, CagA와 VacA는 일부 균주에서만 생성되어 *H. pylori*의 병원성의 요인으로 가장 주목을 받고 있다[5].

*H. pylori*의 감염을 진단하기 위한 방법으로 *H. pylori*의 특이단백에 대한 항체를 Western blot법으로 검사하는 혈청학적 검사법이 개발되어 있고 이 방법은 *H. pylori*의 임상적 질환 유발의 병인[19,25]이 된다고 알려진 세포독성 유전자인 cagA 및 vacA의 특이단백에 대한 항체를 검출할 수 있다. 이들 세포독성 유전자는 증상이 있는 환자에서 66% 이상으로 높게 발현되는 반면 무증상 보균자에서는 50% 이하에서 이들 세포독성 유전자가 발현되었다고 알려져 있다[3].

이에 저자는 *H. pylori*의 감염률이 높은 우리나라에서 위·십이지장 질환 환자와 무증상 보균자에서 Helico blot 2.0을 이용하여 *H. pylori*의 검출 및 세포독성 유전자인 cagA와 vacA의 발현율을 관찰하여 *H. pylori* 감염군에서 이들이 어떤 진단적 의의를 가지는 지를 알아 보고자 하였다. 또한 위점막에서 헤마톡실린-에오진 염색 및 면역조직화학염색에 의한 *H. pylori* 직접 검출과 비침습적 방법인 혈청내에서 항-H. pylori IgG EIA 검사와 비교하여 Helico blot 2.0 검사법의 진단적 가치를 살펴보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

대상군의 선정 및 특성

본 연구는 1997년 3월부터 1998년 3월까지 상부위장관 증상을 주소로 동국대학교 의과대학부속 경주병원을 내원한 환자들 중 내원전 2주이내에 항생제나 소염제를 복용한 적이 없고 위 내시경검사를 시행하여 위·십이지장 질환으로 진단된 환자 93례를 증상군으로 하였다. 무증상군으로는 상부위장관 증상이 없고 병력상 소화성 궤양이나, 알콜리즘, 전신 질환이나 각종 장기의 기질성 질환 등이 없으면서, 최근 2주내에 항생제 및 스테로이드나 비스테로이드성 소염제를 복용한 적이 없는 건강인 13례를 선정하였다. 증상군은 93례 중 남자는 63예, 여자는 30예이었고, 평균 연령은 56.7세였다. 질환별로는 위염 20례(21.5%), 위궤양 21례(22.6%), 십이지장궤양 17례(18.3%), 위암 35례(37.6%)였다. 무증상군은 13례 중 남자는 5례, 여자는 8례이었고, 평균 연령은 32.0세였다(Table 1).

위점막 조직채취 및 병리조직학적 검사

위내시경검사를 시행하여 위체부에서 1개, 위유문부로부터 2 cm이내의 위전정부에서 2개 등 3개의 위점막 조직절편을 채취하였다. 궤양이 있는 경우에는 병변부위에서도 최소한 2개의 조직검체를 추가로 채취하였다. 채취한 조직절편을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하여 4 ㎛의 두께로 3-4개의 연속 절편을 만든 후 통상적인 방법으로 헤마톡실린-에오진 염색을 하였으며 면역조직화학적 검사를 시행하기 위해서 절편을 만든후 charged & precleanced slide (*Fisher Biotech®, Fisher sci Co.*)에 부착시키고 충분히 건조시켰다. 탈파라핀과 함수과정을 거친 파라핀 절편을 10 mM citrate 완충액(PH 6.0)에 담군 후 121°C에서 15분간 가압 가열하였다. 조직내 내인성 과산화

Table 1. Age and sex distribution of 106 study subjects.

Age (year)	Male			Female			Mean±SD	Total(M/F)
	10~39	40~69	70~	10~39	40~69	70~		
Symtomatic group	17	32	14	5	17	8	56.7±16.7	93(63/30)
Gastritis	6	5	0	3	4	2	49.0±15.6	20(11/ 9)
Gastric ulcer	4	12	4	0	0	1	55.0±16.9	21(20/ 1)
Duodenal ulcer	6	6	4	0	1	0	51.3±19.6	17(16/ 1)
Gastric cancer	1	9	6	2	12	5	64.6±12.4	35(16/19)
Non-Sx group*	2	2	1	9	0	0	32.0±16.6	13(5/ 8)
Total	19	34	15	13	17	8	53.6±18.5	106(68/38)

Non-Sx group* : Non-symptomatic group.

효소(endogenous peroxidase)의 작용을 억제하기 위하여 3% H_2O_2에서 15분간 처리하고 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 차단 혈청으로 15분 동안 전처치하였다. 일차 항체인 항-H. pylori 다클론 항체(B471, DAKO, Denmark)를 PH 7.4에서 1 : 200으로 희석시킨 뒤 4°C를 유지하는 소실(chamber)에서 밤새 부치시킨 후 LSAB (K680, DAKO)를 이용하여 이차항체(biotinylated universal antibody)와 peroxidase labelled streptavidin을 biotin과 결합시킨 후 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) 용액으로 발색하였다. 모든 절편을 Meyer 헤마톡실린으로 대조 염색하였으며 액성 봉입제(immumount®, shandon)로 봉입하여 검경하였다. 헤마톡실린-에오진 염색에 점막 표층과 점액내에 자색의 굽은 나선형 구조의 균체가 보이거나(Fig. 1) 면역조직화학적 검사에서 적색 및 갈색의 나선형의 균체가 관찰되는 경우를 양성으로 간주하였다(Fig. 2).

EIA법에 의한 항-Helicobacter IgG(GAP 검사법)

조사대상군에서 *H. pylori*에 대한 IgG 항체의 정성 분석을 위하여 [13] 내시경검사 직후 채혈한 혈청으로 항-Heli-

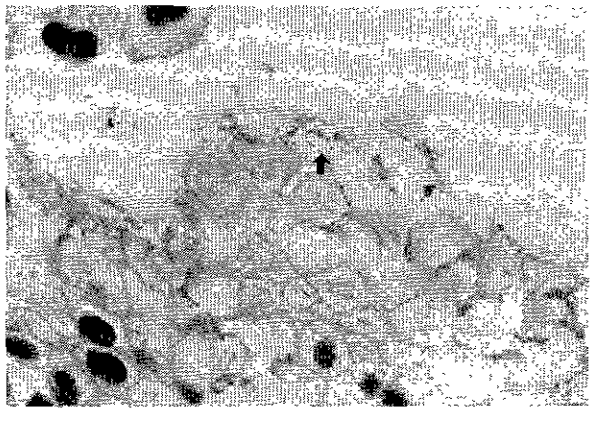

Fig. 1. *Helicobacter pylori* was observed as amphophilic rods or curved bacteria (arrow) lying in mucus layer along the surface of foveolar epithelium (H&E stain, ×1000).

Fig. 2. Immunohistochemical stain shows large numbers of *Helicobacter pylori* (arrow) carpeting the epithelium and lying free in mucus layer (×1000).

cobacter IgG EIA 검사(Roche, Swiss)를 시행하였다. 결과 판정은 항체 역가가 16 U/mL 이상인 경우를 양성으로, 그 이하인 경우를 음성으로 하였다.

Western blot에 의한 *H. pylori* 특이단백(Helico blot 2.0 검사법)

조사대상군 모두에서 *H. pylori* 특이단백에 대한 항체를 검출하기 위하여 Western blot 법을 이용한 Helicoblot 2.0 kit (Genelabs Diagnostics, Singapore) [8]를 사용하였다. 방법을 간단히 요약하면 *H. pylori*의 특이단백인 CagA(116 kD), VacA (87 kD), urease subunit (35 kD), urease H (30 kD), urease A (26.5 kD) 및 urease E (19.5 kD) 및 혈청대조 밴드를 나타낼 수 있는 Western blot strip을 tray의 각 well에 넣고 세척완충액(wash buffer) 2 ㎖로 침전시켜 실온에서 5분간 교반기(rotating platform)에서 부치한 후 세척완충액을 완전히 제거하였다. Working blotting 완충액 2 ㎖로 Western blot strip을 침전시킨 후 혈청 20 ㎕를 첨가하여 tray의 두껑을 덮고 교반기에서 1시간동안 실온에 방치한 후 각 well의 용액을 완전히 제거하고 세척완충액으로 3회 수세하였다. Conjugate 용액(goat anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase) 2 ㎖를 각 well에 분주한 후 두껑을 덮고 교반기에서 1시간동안 실온에 방치한 후 Conjugate 용액을 완전히 제거하고 증류수로 3회 세척하였다. 기질액(solution of 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate and nitroblue tetrazolium) 2 ㎖를 각 well에 분주한 후 두껑을 덮고 교반기에서 15분간 실온에 방치한 후 기질액을 완전히 제거하고 증류수로 3회 세척하였다. Western blot strip을 주의하여 꺼내 종이수건으로 덮어 말린 후 worksheet에 봉입하였다. Western blot strip에서 *H. pylori*에 대한 특이단백인 CagA (116 kD), VacA (87 kD), urease subunit (35 kD), urease H (30 kD), urease A (26.5 kD) 및 urease E (19.5 kD) 및 혈청대조 밴드를 관찰하였다. 결과 판정은 19.5 kD, 26.5 kD, 30 kD 밴드중 두 개의 밴드가 나타나던지 또는 35 kD, 87 kD, 116 kD 벤드중 하나가 나타나면 양성으로, 벤드가 나타나지 않던지 그 외의 다른 밴드가 나타나면 음성으로 판정하였다. *H. pylori*의 세포독성 유전자 발현유무를 관찰하기 위하여 CagA (116 kD) 위치에 밴드가 나타나면 cagA (cytotoxin-associated gene) 양성으로, VacA (87 kD) 위치에 밴드가 나타나면 vacA (vacuolating cytotoxin) 양성으로 판정하였다(Fig. 3).

H. pylori 감염의 검사결과에 따른 분류

H. pylori 감염 여부는 상부위장관 증상을 호소한 증상군은 위내시경에 의한 조직채취, 병리조직학적 검사, 혈중 GAP 검사법 및 Western blot법을 모두 시행하였으며 무증상군은 혈청학적 검사인 GAP 검사법 및 Western blot법을 실시하였으며 조직채취를 이용한 검사는 시행하지 않았다. 증상군에서 *H. pylori* 감염 양성은 위점막 조직검사에서 균주가 확인된 경우와 항-Helicobacter IgG 항체(GAP 검사법)가 양성인 예를 모두 포함하였다. 위점막 조직검사와 항-Helicobacter IgG 항체 검사가 모두 음성인 경우 감염 음성으로 판정하였다. 무증상군은 항-Helicobacter IgG 항체 검사가 양성 반응을 보이는 경우에 *H. pylori* 감염 양성으로 판정하였다. 통계처리는 SPSS PC$^+$를 사용하여 분석하였으며 chi-square test와 Fisher's exact test를 시행하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다. 두 검사법간의 일치도에 대해 κ 값을 구하였다. κ 값이 0.4 미만을 일치도 낮음(poor), κ 값이 0.4 이상 0.75 미만을 일치도 좋음(fair or good), κ 값이 0.75 이상을 일치도 아주 좋음(excellent)으로 하였다.

결 과

조직검사에 의한 *H. pylori*의 양성률

증상군에서 *H. pylori*가 위점막에서 직접 검출된 예는 총 49예(52.9%)로 남자가 35례, 여자가 14례이었고, 평균 연령은 52.9세였다. 질환에 따른 *H. pylori* 양성률을 보면 위염은 21례 중 12례(57.1%), 위궤양은 21례 중 15례(71.4%), 십이지장궤양은 16례 중 10례(62.5%), 그리고 위암은 35례 중 12례(34.3%)에서 검출되어 각 질환 중 위암환자에서 유의하게 낮게 검출되었다($p<0.05$ by chi-square test).

EIA법에 의한 항-Helicobacter IgG 양성률(GAP 검사법)

증상군에서 항-Helicobacter IgG 항체 양성률은 63.4%로 조직검사보다 높았다. 질환별 양성률은 위염은 21례 중 13례(62.0%), 위궤양은 21례 중 17례(81.0%), 십이지장궤양은 16례 중 9례(56.3%), 그리고 위암은 35례 중 20례(57.1%)에서 양성으로 위암에서는 조직검사(34.3%)에 비해 높은 양

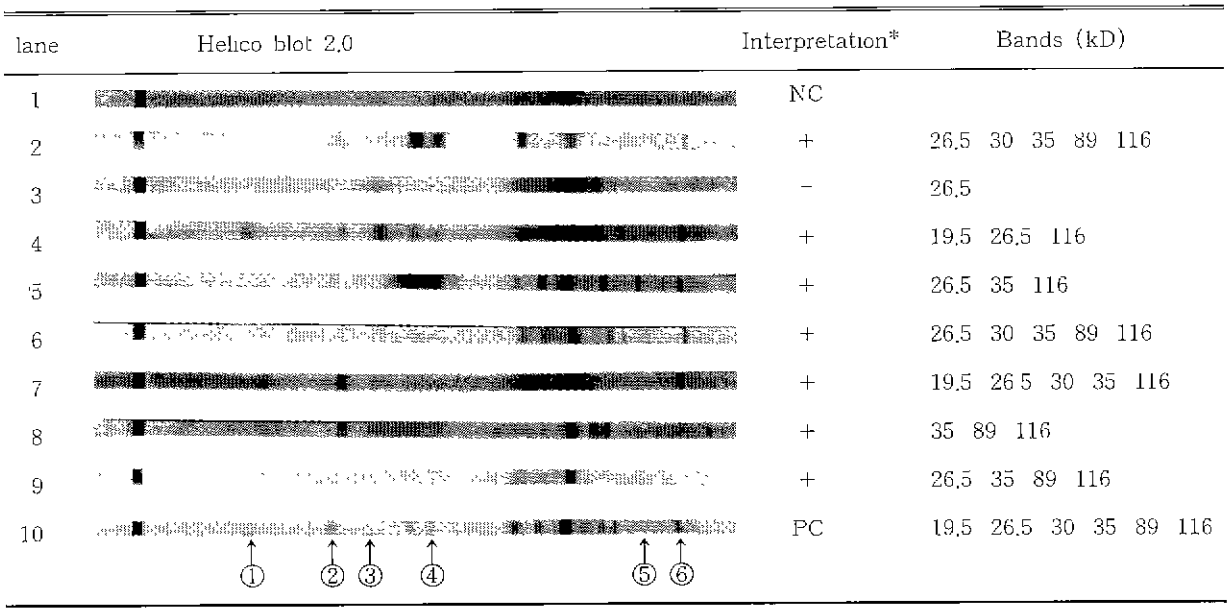

Fig. 3. The result of helico blot 2.0 by western blot kit for the detection of IgG antibodies to *Helicobacter pylori*-specific antigens in serum. Lane 1, negative control; Lane 2, gastritisl; Lane 3,4, gastric ulcer; Lane 5,6, duodenal ulcer; Lane 7,8, gastric cancer; Lane 9, non-symptomatic group; Lane 10, positive control.
*positive, any two bands from among 19.5, 26.5 and 30 kD or any one band at 35, 89 and 116 kD; **NC, negative control; PC, positive control.

성률을 보였으며 그 외 위염 및 위궤양의 위장병변은 대체로 조직검사보다 약간 높은 양성률을 보였다. 그러나 십이지장궤양은 비슷하거나 다소 낮은 양성률을 보였으며 각 질환 사이에서는 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2). 무증상군에서 항-Helicobacter IgG 항체는 13례중 8례(61.5%)에서 양성으로 증상군(63.4%)과 무증상군 사이에 통계적 유의성은 없었다.

Western blot에 의한 *H. pylori* 특이단백(Helico blot 2.0 검사법)의 검출

증상군에서 *H. pylori* 특이단백의 양성률은 91.4%로 조직검사나 GAP 검사에 비하여 가장 높은 양성률을 보였다. 질환별 양성률은 위염은 21례 중 18례(85.7%), 위궤양은 21례 중 21례(100%), 십이지장궤양은 16례 중 16례(100%)에서 양성으로 소화성 궤양환자는 전예에서 양성이었으며 위

Table 2. Detection rates of *H. pylori* according to direct investigation of bacteria by immunohistochemical and H&E stain and two serologic tests of GAP and Helico blot 2.0 system

Group	Number	IHC*(%)	GAP**(%)	Helico†(%)
Symptomatic groub	93	49(52.9)	59(63.4)	85(91.4)
Gastritis	21	12(57.1)	13(62.0)	18(85.7)
Gastric ulcer	21	15(71.4)	17(81.0)	21(100)
Duodenal ulcer	16	10(62.5)	9(56.3)	16(100)
Gastric cancer	35	12(34.3)	20(57.1)	30(85.7)
Non-symptomatic group	13	None	8(61.5)	9(69.2)

IHC*: immunohistochemical stain.
GAP**: IgG antibodies to *Helicobacter pylori*.
Helico†: Helico blot 2.0 system.

암은 35례 중 30례(85.7%)에서 양성이었다(Table 2). 무증상군에서 항-H. pylori 특이단백은 13례중 9례(69.2%)에서 양성으로 증상군(91.4%)에서 무증상군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$ by Fisher's exact test).

증상군에서 *H. pylori*의 감염군의 CagA 발현율은 81.7%였고 질환별로는 위염은 18례 중 15례(83.3%), 위궤양은 18례 중 14례(77.8%), 십이지장궤양은 14례 중 12례(85.7%), 그리고 위암은 21례 중 17례로 81.0%를 보여 각 질환에서 서로 비슷한 정도의 발현율을 보여 각 군간의 유의한 차이는 없었다(Table 3). 무증상군에서 8례 중 7례(87.5%)에서 양성으로 증상군(81.7%)과 무증상군 사이에 유의한 차이는 없었다.

증상군에서 *H. pylori*의 감염군의 VacA 발현율은 31.0%로 CagA 발현에 비해 유의하게 발현되었으며 질환별로는 위염은 18례 중 4례(22.2%), 위궤양은 18례 중 5례(27.8%), 십이지장궤양은 14례 중 5례(35.7%), 그리고 위암은 21례 중 8례(38.1%)를 보여 십이지장궤양환자와 위암환자에서 다소 높은 발현율을 보였으나 각 질환간의 유의한 차이가 없었다. 무증상군은 8례 중 2례(25.0%)에서 양성으로 증상군(31.0%)에서 다소 높게 발현되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

증상군에서 *H. pylori* 감염군의 urease E(19.5 kD) 발현율은 25.4%였고 질환별로는 위염은 18례 중 3례(16.7%), 위궤양은 18례 중 4례(22.2%), 십이지장궤양은 14례 중 3례(22.2%), 그리고 위암은 21례 중 7례로 33.0%를 보여 VacA 발현보다 낮았으며 각 질환에서 서로 비슷한 정도의 발현율을 보여 각 질환간의 유의한 차이는 없었고 무증상군에서는 한예도 발현되지 않아 0%의 발현율을 보였다. 증상군에서 urease A(26.5 kD) 발현율은 63.4%였고 무증상군에서는 75%였으며 질환별로는 위염은 18례 중 12례(66.7%), 위궤양은 18례 중 15례(83.3%), 십이지장궤양은 14례 중 11례(78.6%), 그리고 위암은 21례 중 17례로 81.0%를 보여 위궤양환자에서 다소 높은 발현율을 보였다. 또 증상군에서 urease H(30 kD) 발현율은 50.7%였으며 무증상군에서는 37.5%로 증상군에서 높게 발현되었고 질환별로는 위염은 18례 중 7례(38.9%), 위궤양은 18례 중 12례(66.7%), 십이지장궤양은 14례 중 7례(50.0%), 그리고 위암은 21례 중 10례로 47.6%를 보여 위궤양 및 십이지장궤양환자에서 다소 높은 경향을 보였으나 각 질환간의 유의한 차이는 없었다. Urease subunit(35 kD) 발현율은 증상군에서 85.9%였고 무증상군에서는 62.5%였으며 위염은 18례 중 14례(77.8%), 위궤양은 18례 중 17례(94.4%), 십이지장궤양은 14례 중 13례(92.9%), 그리고 위암은 21례 중 17례로 81.0%를 보여 다른 세포독성유전자에 비해 높은 발현율을 보였으나 무증상군과 각 질환간의 유의한 차이는 없었다.

GAP 검사법과 Helico blot 2.0 검사법의 상관관계

*H. pylori*를 진단하기 위한 두 혈청학적 검사간의 상관관계는 증상군 93례중 GAP 검사와 Helico blot 검사가 모두 양성인 경우 57례, GAP 검사가 양성이고 Helico blot 검사가 음성인 경우 1례, GAP 검사가 음성이나 Helico blot 검사가 양성인 경우 28례, GAP 검사 및 Helico blot 검사가 모두 음성인 경우 7례로 두 검사법 간의 진단이 일치하는 경우는 64례이였으며 일치도 κ 값은 0.276 로 일치도가 낮

Table 3. Detection rates of IgG antibodies to specific antigens of H. pylori by Helico blot 2.0 system

Group	Number with HP* Infection	Molecular Size in kD					
		19.5[a]	26.5[b]	30[c]	35[d]	89[e]	116[f](%)
Symptomatic group	71	18(25.4)	45(63.4)	36(50.7)	61(71.4)	22(31.0)	58(81.7)
Gastritis	18	3	12	7	14	4	15
Gastric ulcer	18	4	15	12	17	5	14
Duodenal ulcer	14	3	11	7	13	5	12
Gastric cancer	21	7	17	10	17	8	17
Non-Sx group**	8	0(0)	6(75.0)	3(37.5)	5(62.5)	2(25.0)	7(87.5)

a), Urease E; b), Urease A; c), Urease H; d), Urease subunit; e), VacA; f), CagA
HP* : *Helicobacter pylori*
Non-Sx group** : Non-symptomatic group

았다. 무증상군에서는 GAP 검사 및 Helico blot 검사가 양성인 경우 7례, GAP 검사가 양성이고 Helico blot 검사가 음성인 경우 1례, GAP 검사가 음성이고Helico blot 검사가 양성인 경우 2례, GAP 검사와 Helico blot 검사가 모두 음성인 경우 3례로 두 검사법 간의 진단이 일치하는 경우는 10례이였으며 일치도 κ 값은 0.391이었다. 두 검사법에서 진단이 일치하지 않는 경우는 대부분 Helico blot 검사법에서 양성으로 나온 경우였다.

고 찰

*H. pylori*가 1983년 오스트레일리아의 Warren과 Marshall [26]에 의하여 처음 분리 동정된 후 대부분의 만성 위염이 *H. pylori*의 감염에 의하여 생긴다는 것이 알려졌다 [15]. 만성적인 *H. pylori* 감염이 위암의 원인 또는 위험인자라는 것에 대한 충분한 근거 [18]는 위암의 자연사에 대한 연구 및 *H. pylori*와 위암의 관련성에 관한 역학적 연구에서 찾아볼 수 있는데 즉, *H. pylori*의 발견 이전에는 원위부 위암이 발생하기까지 표재성 위염, 위축성 위염, 장상피화생, 이형성(dysplasia)의 일련의 조직병리학적인 변화를 거쳐서 결국 암으로 진행된다고 알려져 왔다 [4]. 이와 같은 일련의 과정에 있어서, *H. pylori*가 표재성 위염뿐아니라 다른 병변과도 관련이 있을 것으로 생각되는데, 조직생검에 의한 많은 연구보고[4,10]에서 *H. pylori*가 암전구병변을 가진 환자들의 정상위조직에서 발견되며 위암환자의 50-100%에서 *H. pylori*가 발견되는 점이 이를 뒷받침해 준다. 특히 위의 발암기전에 있어서 결정적인 것으로 생각되는 위축성 위염[22]에서의 *H. pylori*의 원인적 역할은 세포독소(cytotoxin)을 생산하는 *H. pylori* 균주가 표재성 위염만을 가진 환자에 비해 만성 위축성 위염환자에서 더 흔하다는 보고 [9]에서도 알 수 있다. 현재까지 *H. pylori*에 의한 위암 발암기전에 대하여 몇가지 가설이 제시되었는데, 점액층의 손상, ascorbic acid의 분비 감소, 활성 산소의 생성과 세포증식의 증가가 대표적인 것이다[21,23].

H. pylori 감염 여부를 진단하는 방법은 크게 내시경검사를 통해 얻은 위생검 조직 절편을 이용하여 조직내의 세균을 직접 관찰하거나, 배양검사, rapid urease test (CLO 검사) 및 중합효소 연쇄반응법 등 침습적 방법과 요소호흡검사나 혈청학적 검사를 이용하는 비침습적 방법이 있다. 세균 배양검사는 가장 직접적이며 확실하게 진단이 되고 항생제에 대한 감수성 검사를 병행할 수 있는 장점이 있으나 진단까지의 시간이 길고 생검하는 위치에 따라서 위음성이 생길 수 있어 양성률 및 예민도가 낮아 임상 진단에 널리 이용하기에는 어렵다. 조직에서 헤마톡실린-에오진 염색, Giemsa 염색, Warthin-Starry 은염색, 면역조직 화학염색 등의 방법들과 위상차 현미경을 사용하여 세균을 관찰하는 방법이 있다. 그 중 면역조직 화학염색법에 의한 *H. pylori*의 검출방법은 주위 배경으로부터 세균의 감별이 용이하여 민감도 및 특이도 등이 높아 세균 배양검사에 비하여 높은 양성률을 보인다고 한다[14]. 혈청학적 검사는 세균응집시험, 보체결합시험, 효소면역측정법, immunoblot 검사법 등 *H. pylori*에 대한 항체를 측정하는 여러 가지 방법들이 알려져 있는데 혈액 또는 혈장이 검체로 이용됨으로 환자에게 주는 고통이 적고 간단하며 빠른 결과를 얻을 수 있고 방사선 동위원소같은 위험성이 없을 뿐 아니라 위 전체의 감염 상태를 대변해 주는 장점이 있고 추적 검사가 용이하여 역학 연구에 많이 이용되고 있다. 그 중 효소면역측정법은 정확하고 간편하며 보통 사용하고 있는 검사장비를 이용할 수 있는 장점이 있다. 그러나 이 방법은 *H. pylori* 감염의 초기에는 항체 형성이 되지 않아 위음성으로, 항균요법 직후에는 혈청의 역가가 낮아지지 않아 위양성으로 판정할 수 있어 *H. pylori*의 감별능 검사로는 부적합하므로 진료적인 목적이나 치료와 관련된 검사로 사용하기에는 적합하지 않다. 이런 점을 보완할 수 있는 검사법으로 immunoblot 검사법이 있으며 이는 민감도가 매우 높고 특히 *H. pylori*의 임상적 질환 유발의 병인이 되는 세포독성 유전자인 cagA와 vacA의 특이단백에 대한 항체를 검출할 수 있는 장점을 가지지만 검사방법이 까다롭고 시간이 오래 걸리며 검사비가 고가면서 무증상군에서도 양성률이 높은 단점을 지닌다. 그러나 최근에 immunoblot 검사법이 새로이 개발되어 검사법이 용이하고 비교적 진단까지의 시간이 짧게 걸리는 Helico blot 2.0 검사법이 개발되어 있다 [17]. 본 연구에서 Helico blot 2.0을 이용한 검사상 양성률이 91.4%로 효소면역측정법보다 높았다. 그러므로 이 검사법은 *H. pylori*의 감염을 진단하기 위한 screening 검사로 유용성이 기대되나 이 방법은 검사비가 비싸기 때문에 GAP 검사법을 대치하기에는 아직 미흡하여 향후 이에 대한 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또 Helico blot 2.0

검사법은 증상군에서 91.4%의 높은 양성률을 보였으며 무증상군은 69.2%의 양성률을 보여 증상군에서 무증상군에 비하여 유의하게 높았기 때문에 Helico blot 2.0에서 검출된 세포독성유전자들 중 일부에서 임상증상을 유발시키는 물질이 존재할 가능성이 있으며 향후 시행되는 여러 연구에서 이런 차이를 일으키는 세포독성유전자를 밝혀낼 수 있을 것으로 사료되었다.

*H. pylori*는 전 세계 인구의 반수 이상이 감염되어 있는 세계적으로 가장 널리 그리고 가장 많이 감염되어 있는 균으로 *H. pylori*의 검출률은 지역에 따라 차이가 있고, 민족간, 국가간에 현저한 차이를 보이고 있다. 본 연구에서 위점막 조직검사상 균주가 확인된 경우는 49예(52.9%)였으며 질환별로는 위염 57.1%, 위궤양 71.4%, 십이지장궤양 62.5%, 그리고 위암은 34.3%로서 전체 유병률이 국내[3]의 보고와 비슷하였으나 위암의 경우 매우 낮은 양성률을 보였다. 특히 *H. pylori*는 위암환자에서 유의하게 낮게 검출되었는데 그 이유는 *H. pylori*가 위암의 원인이 아니라기보다 암의 발생으로 인하여 정상적인 조직의 손괴로, *H. pylori*이 생존에 필요한 국소 환경의 변화로 *H. pylori*가 더 이상 생존할 수 없게 되었거나 그 개체수가 감소하여 검출되기 어려웠을 가능성이 있다고 사료되었다.

CagA는 균주의 다양성을 알게된 최초의 단백질[20]로 서구에서는 십이지장궤양과 밀접한 관계가 있는 병리인자로 알려져 있고, cagA 유전자에 의해 코드되며 110-128 kD 분자량의 단백질로서 *H. pylori* 균주의 약 60%가 cagA 유전자를 보유하는 것으로 생각된다[5]. 서구의 보고[8]에 의하면 십이지장궤양 환자의 88-100%, 기능성 소화불량증 환자의 56-60%에서 혈청학적 CagA 발현율을 보여 CagA가 궤양성 질환의 병인에 관여할 것을 시사하고 있다. 그러나 국내에서는 immunoblot법으로 조사한 보고[12]에 의하면 만성 위염 25-87.5%, 위궤양 22-100%, 십이지장궤양 25-100%, 위암 25-100%로 보고되고 있으며 국내 *H. pylori* 감염 환자의 혈청학적 CagA 발현율은 모든 위·십이지장 질환에서 서구에 비해 높으며 질환별 변별력도 없다고 보고되고 있다. 본 연구에서도 CagA 발현율은 무증상군에서 더 높은 발현을 보였으며 각 질환간의 유의한 차이가 없어 질환별 변별력도 없었다. 이런 소견들은 CagA가 궤양과 밀접한 병리인자로 보기 어렵다고 결론지을 수 있으며 서구의 결과와 다른 소견을 보이는 이유는 감염률이 높은 국내의 *H. pylori* 균주가 감염률이 높지 않은 서구와 차이가 있음을 의미한다고 할 수 있다.

VacA는 in vitro에서 *H. pylori* 배양 상청액이 유핵세포의 세포질에 산성의 공포를 만드는 물질로 1988년 Leunk [16]에 의해 최초로 보고 되었고, 이후 다른 연구에서도 확인된 바, 현재 *H. pylori* 균주의 절반정도에서 공포성 세포독소(vacuolating cytotoxin)를 생성한다고 알려져 있다 [24]. 1992년 Cover와 Blaser [6]에 의해 세포독소를 생성하는 균주로부터의 공포성 세포독소 정제가 성공되었으며 87 kD 단백질임이 확인되었다. VacA는 vacA 유전자가 코드하는 것으로 알려져 있으며 cagA 유전자와는 달리 모든 *H. pylori* 균주가 이 유전자를 보유하는 것으로 보고되고 있는데[7] 이와 같이 vacA 유전자 보유율과 활성화된 공포성 세포독소의 발현율에 큰 차이가 존재하는 원인에 대해서는 아직 분명히 밝혀지지 않았으나 유전자의 일부 배열순의 차이에 기인할 수 있음을 시사하는 보고가 있다 [1]. 공포성 세포독소의 활성도는 특수 토끼 항혈청에 의해 중화되며 세포독소에 대한 중화항체는 위암환자를 포함한 다수의 *H. pylori* 감염 환자의 혈청에서 검출되는데[11] Tee등 [24]에 의하면 궤양성 질환의 66%, 기능성 소화불량증의 38%에서 공포성 세포독소를 생산하는 균주가 분리되어 궤양성 질환환자에서 유의하게 많이 분리되는 것으로 알려져 있다. 그러나 국내의 보고[12]에 의하면 VacA 발현율은 만성 위염 33.3-100%, 위궤양 40-100%, 십이지장궤양 50-100%, 위암 51.7-100%로 서로 상이한 다양한 결과를 보이고 있으나 대체적으로 높은 발현율을 보였으며 궤양성질환에 특히 높게 발현되는 경향은 없었다. 본 연구에서 VacA는 서구뿐만 아니라 국내의 모든 보고보다 낮은 발현율을 보였으며 각 질환에 따른 특이한 발현양상을 보이지 않았다.

결론적으로 본 연구에서 상부위장관 증상군과 무증상군에서 *H. pylori* 감염을 진단하기 위한 Helico blot 2.0 검사법은 검출률이 매우 높아 screening 검사로 사용될수 있는 가능성이 있으며 특히 세포독성 유전자인 cagA 및 vacA 등의 특이단백에 대한 항체를 검출할 수 있어 *H. pylori*의 세포독성 유전자와 상부위장관 증상군에서 이들의 역할을 규명하는데 그 유용성이 높으리라 생각되었다. *H. pylori*가 감염된 위·십이지장 질환 증상군과 무증상군에서 cagA 및 vacA의 발현율은 각 질환별로 유의한 통계적 차이가 없었고 30 kD 밴드와 35 kD 밴드는 무증상군에 비하여 증

상군에서 각각 50.7% 및 71.4%의 높은 발현율을 보였으며 특히 위 및 십이지장궤양환자에서 높은 발현율을 보여 앞으로 이 밴드를 중심으로 진단적 의의에 대한 연구가 진행되어야하리라 사료되며 세포독성 유전자의 검출이 위염, 소화성 궤양, 위암 및 위림프종 등을 변별할 수 있는 검사로서의 임상적 유용성이 있는지의 여부에 대해서는 향후 좀 더 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

Helicobacter pylori(H.pylori) 감염이 만성 위염을 일으키고 이 병변이 수 십년 후 위축성 위염과 장화생으로 진행되어 장형 위암을 발생시킨다는 가설이 있은 후 *H. pylori*의 병원성에 대한 연구가 진행됨에 따라 세포독성 유전자를 발현하는 경우 소화성 궤양 및 위암의 발생 위험과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 위 · 십이지장 질환 환자 중에서 *H. pylori* 검출률을 파악하고, *H. pylori*가 검출된 위 · 십이지장 질환 환자군과 무증상 보균자 간의 세포독성 유전자의 발현율 및 진단적 의의를 알아보고자 하였다. 위내시경을 시행하여 진단받은 위염 20례, 위궤양 21례, 십이지장궤양 17례, 위암 35례 등 총 93례를 대상으로 하였다. 이들에 대하여 위점막 병리조직학적 검사, 면역조직화학적 검사 및 EIA법에 의한 항-Helicobacter IgG (GAP 검사법)을 시행하였고 *H. pylori* 감염여부는 위점막 조직검사에서 균주가 확인된 예이거나 GAP 검사법이 양성인 예를 감염 양성으로 판정하였다. 또한 상부위장관 증상을 호소하지 않는 무증상군 13례를 대조군으로 선정하여 GAP 검사법이 양성인 경우를 *H. pylori* 감염 양성으로 판정하였다. H. pylori 감염 양성으로 판정된 79례에 대하여 Western Blot Kit (Helicoblot 2.0, Genelabs Diagnostics, Singapore)를 이용하여 세포독성 유전자의 발현율을 파악하였다. 조직검사에 의한 *H. pylori*의 검출된 예는 총 49예(52.9%)로 질환에 따른 *H. pylori* 양성률을 보면 위염은 57.1%, 위궤양은 71.4%, 십이지장궤양은 62.5%, 그리고 위암은 34.3%로 각 질환 중 위암환자에서 유의하게 낮게 검출되었다($p<0.05$). GAP 검사법이 양성인 증상군은 59예로 질환별 양성률은 위염은 62.0%, 위궤양은 81.0%, 십이지장궤양은 56.3%, 그리고 위암은 57.1%로 각 질환 사이에서는 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 무증상군의 GAP 검사법 양성률은 61.5%로 증상군(63.4%)과 무증상군 사이에 통계적 유의성은 없었다. 증상군에서 Helico blot 2.0 검사법의 양성률은 91.4%로 조직검사나 GAP 검사에 비하여 가장 높은 양성률을 보였고 질환별 양성률은 위염은 85.7%, 위궤양은 100%, 십이지장궤양은 100%에서 양성으로 소화성 궤양환자는 전예에서 양성이었으며 위암은 85.7%, 무증상군에서는 69.2%에서 양성으로 증상군(91.4%)에서 무증상군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$). 각 질환별 CagA의 발현율은 무증상군 87.5%, 위염군 83.3%, 위궤양군 77.8%, 십이지장궤양군 85.7%, 위암군 81.0%로서 각 군간의 유의한 차이는 없었다. 각 질환별 VacA의 발현율은 무증상군 25.0%, 위염군 22.2%, 위궤양군 27.8%, 십이지장궤양군 35.7%, 위암군 38.1%로서 각 군간의 유의한 차이는 없었다. GAP 검사법과 Helico blot 2.0 검사법 간의 진단이 일치하는 경우는 64례로 일치도 κ 값은 0.276 로 일치도가 낮았다.

Helico blot 2.0 검사법은 검출률이 매우 높아 screening 검사로 사용될 수 있는 가능성이 있고 특히 세포독성 유전자인 cagA 및 vacA 등의 특이단백에 대한 항체를 검출할 수 있어 이들의 역할을 규명하는데 그 유용성이 높으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Atherton, J. A., P. Cao, R. M. Peek, M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **270**, 17771-17777.
2. Blaser, M. J. 1994. *Helicobacter pylori* phenotypes associated with peptic ulceration. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**, 1-5.
3. Cho, M. J., W. K. Lee, Y. S. Jeon, H. W. Nam and S. Y. Cho. 1995. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Molecules and Cells.* **5**, 508-513.
4. Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, D. Zavala, E. Fontham, G. Zarama, S. Tannenbaum, T. Collazos and B. Ruiz. 1990. Gastric precancerous process in a high risk population; Cohort follow-up. *Cancer Res.* **50**, 4737-4740.
5. Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang and N. Figura. 1993. Molecular characterization of

the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cyto-toxicity and duodenal ulcer. *Proct. Narl. Acad. Sci. USA.* **90**, 5791-5795.

6. Cover, T. L. and M. J. Blaser. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**, 10570-10575.
7. Cover, T. L., M. K. R. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson and M. J. Blaser. 1994. Divergency of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori strains*. *J. Biol. Chem.* **269**, 10566-10573.
8. Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, G. M. Sobala, G. Miller, D. S. Tompkins, J. N. Primrose and A. G. Morgan. 1993. Systemic and mucosal humoral reponses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut.* **34**, 1339-1343.
9. Fox, J. G., P. Correa, N. S. Taylor, N. Thompson, E. Fontham, F. Janney, M. Sobhan, B. Ruiz and F. Hunter. 1992. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 1554-1560.
10. Guarner, J., A. Mohar, J. Parsonnet and D. C. Halperin. 1993. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and other preneoplastic gastric lesions in Chiapas. *Mexico Cancer.* **71**, 297-301.
11. Hirai, M., T. Azuma, S. Ito, T. Kato, Y. Kohli and N. Fujiki. 1994. High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* **56**, 56-60.
12. Kim, K. C., H. J. Park, H. W. Lee, J. K. Jung, J. P. Chung, K. S. Lee, C. Y. Chon, S. I. Lee and I. S. Park. 1997. Relation of serum gastrin and pepsinogen levels to serologic recognition of CagA and VacA in *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Gastroenterol.* **29**, 25-34.
13. Lee, J. H., S. J. Park, J. W. Ku, D. H. Kim, C. H. Yang, S. C. Kim, C. W. Lee and G. I. Ha. 1994. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Gastroenterol.* **26**, 39-46.
14. Lee, J. I., J. R. Kim, J. H. Lee and G. I. Ha. 1996. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric and duodenal biopsy specimens by immunohistochemical stain. *Korean J. Pathol.* **30**, 873-885.
15. Leung, K. M., P. Hui, W. Y. Chan and T. M. Thomas. 1992. *Helicobacter pylori*-related gastritis and gastric ulcer. *Am. J. Clin. Pathol.* **98**, 569-74.
16. Leunk, R. D. 1991. Production of a cytotoxin by *Helicobacter pylori*. *Rev. Infect. Dis.* **13**, S686-689.
17. Mitchell, H. M., S. L. Hazell, Y. Y. Li and P. J. Hu. 1996. Serological Response to Specific *Helicobacter pylori* Antigens: Antibody against Cancer in a Developing Country. *Am. J. Gastroenterol.* **91**, 1785-1788.
18. Nomura, A., G. N. Stemmermann, P-H. Chyou, I. Kato, G. I. Perez-Perez and M. J. Blaser. 1991. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma in a population of japanese-Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1132-1136.
19. ovacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura and R. Rappuoli. 1993. Molecular characterisation of the 120kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 5791-5795.
20. Perez-Perez, G. I. and M. J. Blaser. 1987. Conservation and diversity of *Campylobacter pyloridis* major antigens. *Infect. Immun.* **55**, 1256-1263.
21. Sarosiek, J., D. A. Peura, R. L. Guerrant, B. J. Marshall, W. Laszewicz, A. Gabryelewicz and R. W. McCallum. 1991. *Helicobacter pylori* and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1127-1131.
22. Sipponen, P. and K. Seppala. 1992. Gastric carcinoma: failed adaptation to *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* **27(suppl)**, 33-38.
23. Sobala, G. M., J. E. Crabtree, M. F. Dixon, C. J. Schorah, J. D. Taylor, B. J. Rathbone, R. V. Heatley and A. T. Axon. 1991. Acute *Helicobacter pylori* Infection:Clinical features. local and systemic immune response, gastric mucosal histoloty and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut.* **32**, 1415-1418.
24. Tee, W., J. R. Lambert and B. Dwyer. 1995. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1203-1205.
25. Tummuru, M. K. R., T. L. Cover and M. J. Blaser. 1993. Cloning and expression of an high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori* Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**, 1799-1809.
26. Warren, J. R. and B. J. Marshall, 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**, 1273-1275.