

Helicobacter pylori 독소에 의한 세포의 공포형성에 미치는 생약혼합물의 영향

권동렬 · 채 감 · 손윤희¹ · 남경수^{1*}

상해 중의약대학 중의내과, ¹동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소

Effect of LewEIFang on HeLa Cell Vacuolation Induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin

Dong-Yeul Kwon, Cai Gan, Yun-Hee Shon¹ and Kyung-Soo Nam^{1*}

Department of Internal Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032,
People's Republic of China, ¹Department of Pharmacology, College of Medicine and
Intractable Disease Research Center, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract – *Helicobacter pylori* infection is associated with type B gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. The vacuolation of cells induced by *H. pylori* is thought to be essential for the initiation and maintenance of gastric infection. The roles of *H. pylori* cytotoxin, urease, and ammonia in the vacuolation of HeLa cells were determined. Ammonium chloride augmented the neutral red uptake induced by *H. pylori* toxin. Acetohydroxamic acid (AHA) failed to block the neutral red uptake induced by *H. pylori* toxin. LewEIFang significantly prevented the vacuolation of HeLa cells induced by *H. pylori* toxin or *H. pylori* toxin and ammonium chloride. Further investigation is required to determine the mechanisms of LewEIFang for the inhibition of vacuole formation of eukaryotic cells in response to the *H. pylori* toxin.

Key words – *Helicobacter pylori*, vacuolation, urease, ammonia, LewEIFang

*Helicobacter pylori*는 B형 위염의 중요한 발병원인자이며 소화성 궤양의 일차적 발병원인으로 위암의 발생에도 관여한다고 알려져 있다.¹⁾ *H. pylori* 감염자 중 증상이 전혀 없는 환자와, 만성위염, 소화성 궤양 및 위암 등의 임상증상이 있는 환자로 나뉘지는데 이러한 결과는 감염숙주의 염증반응 및 면역반응의 차이점 이외에 *H. pylori* 균주의 차이에 의한 것이라는 보고가 있다.²⁾

H. pylori 감염의 병태생리학적 현상 즉, 조직의 염증과 손상에 대한 기전은 아직 완전히 설명되지 않고 있다. 그러나 이 균에 의한 많은 양의 urease 생성이 위 감염의 시작과 유지에 중요하다고 생각하고 있으며, urease에 의해 생성된 암모니아는 낮은 pH인 위산의 치사적 효과로부터 균을 보호할 뿐만 아니라 위의 상피세포를 손상시킨다.³⁾ 그리고 다른 독성인자는 *H. pylori*의 특정균주에서만 생성되는 분자량이 약 90 kD인 vacuolating cytotoxin(Vac A)과 분자량이 약

120~140 kD인 cytotoxin-associated protein(Cag A)이다.⁴⁾ 이러한 독성인자의 생성 유무에 의해 *H. pylori* 균주는 두 종류를 나뉘지는데 Vac A와 Cag A를 생성하는 균을 type I 또는 cytotoxic 균주로 분류하고, Vac A와 Cag A를 생성하지 않는 균을 type II 또는 noncytotoxic 균주로 분류하다. 특히 근래에는 조직 손상의 중요한 인자로서 *H. pylori*의 공포형성 toxin에 대한 많은 연구가 진행중이다. 공포형성 toxin은 *in vitro*에서 *H. pylori*의 약 50~60%에서 생성되며, 감염 환자에서 이 독소에 대한 중화 항체(neutralizing antibody)가 발견되므로 *in vivo*에서도 생성됨이 증명되었다.⁵⁾ 근래에는 *H. pylori*의 공포형성(vacuolation) 활성이 cytotoxin뿐만 아니라 urease활성에 의해서 나타나며 특히 urease 활성에 의해 urea에서 생성되어 세포 손상을 유도하는 암모니아도 세포 공포형성에 관여한다는 주장⁶⁾이 있으므로 본 논문에서는 *H. pylori* 60190 균주의 cytotoxin, urease 활성과 ammonia가 세포 공포형성에 미치는 영향을 탐구하고, 또한 *H. pylori* 감염과 관련된 위장병 치료에 효과가 있다고 알려

*교신저자(E-mail) : namks@mail.dongguk.ac.kr

Table 1. Composition of LWF

	Medicinal plants
포공영	Taraxaci Herba cum Radix
단삼	Salviae Radix
봉출	Zedoariae Rhizoma
당귀	Angelicae gigantis Radix
백출	Atractylodis Rhizoma alba
복령	Hoelen
감초	Glycyrrhizae Radix
황련	Coptidis Rhizoma
반하	Pinelliae Tuber

진 생약혼합물, 약위방(藥胃方, Lewweifang, 이하 LWF로 약함)이 *H. pylori*에 의해 형성된 세포 공포형성에 미치는 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 생약은 중국 상해중의약대학 내과에서 사용하고 있는 표준품을 제공받아 실험에 사용하였으며 약위방을 구성하는 생약은 Table 1과 같다.

시약 - RPMI 1640 medium, dimethylsulfoxide (DMSO), neutral red, 99% ethyl alcohol anhydrous, acetohydroxamic acid (AHA), urea, phenol red, NH₄Cl, proteinase K, bovine serum albumin (BSA), carbol fuchsin, ammonium sulfate는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서, bacto agar, brucella broth는 Difco사 (Detroit, MI, USA)에서, fetal bovine serum (FBS)은 Jeil Biotechnology Institute (Daegu, Korea)의 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

시료 조제 - 약위방의 생약과 정제수의 비율을 1 : 4로 가한 뒤 rotary evaporator에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 감압농축하여 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 µm, Whatman, Germany)로 여과하고 동결 건조하였다.

세포배양 - 한국세포주은행(KCLB, 서울)에서 분양 받은 자궁경부암세포 HeLa를 10% FBS와 penicillin G (25 unit/ml), streptomycin (0.25 µg/ml)이 포함된 RPMI 1640을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다. 이 세포는 액체질소의 기체상태(-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 실험에 사용하였다.

***H. pylori* 배양** - *H. pylori* 60190(ATCC 49503)은 ATCC에서 구입하였다. *H. pylori*를 10% FBS와 vancomycin (10 µg/ml), colistin (300 unit/ml)과 amphotericin B (2.5 µg/ml)

이 첨가된 brucella broth 한천배지에 접종하여 37°C와 10% CO₂ 조건에서 배양하여 멸균된 면봉으로 균체를 모아 실험에 이용하였다. 고체배지에서 얻은 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 brucella broth 배지에 접종하고, 혼합가스(10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂)로 충전된 jar (microaerobic environment, Difco, USA)를 사용하여 37°C, 120 rpm 조건에서 배양하여 실험에 이용하였다. 본 실험에 사용한 균은 그람염색법으로 그람음성 간균의 형태를 관찰하고 oxidase, catalase 및 urease 양성임을 확인하고 실험을 진행하였다.

***H. pylori* toxin 제조** - *H. pylori* toxin 제조는 Leunk 등⁷⁾의 방법을 수정하여 실시하였다. 즉 액체배지에서 72시간 배양하여 얻은 *H. pylori*를 16,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고 상층액의 단백질 성분은 100% 포화 ammonium sulfate를 이용하여 침전시켰다. 16,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 침전물은 phosphate-buffered saline (PBS)으로 부유시켜 dialysis membrane (molecularporous membrane, m.w. cutoff 12,000~14,000)으로 투석하고 0.2 µm로 여과 (Gelman, USA)하여 -70°C에 보관하여 사용하였다.

HeLa세포의 공포형성 측정 - Cover⁸⁾의 neutral red uptake 방법으로 실험을 하였다. 즉, 0.5% neutral red를 0.9% NaCl 용액에 용해시킨 후 여과지(Whatman No.1)로 여과시켜 stock 용액을 만든다. 0.5% neutral red 염색액은 실험하기 전에 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지로 10배 희석하여 사용하였다. 96-well plate에 접종한 HeLa 세포 (1×10⁴ cells/well)와 시료를 18시간 반응시키고 반응액을 제거한 후 100 µl의 염색액으로 4분간 염색하였다. 150 µl의 0.2% BSA가 포함된 냉각된 0.9% NaCl 용액으로 각 well을 2번 세척하고 100 µl의 acidified alcohol (0.37% HCl에 포함된 70% ethanol)를 넣어 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

***H. pylori*의 urease 활성 측정** - Urease 활성도는 Mobley 등⁹⁾과 Senior 등¹⁰⁾의 spectrophotometric urease assay로 측정하였다. 즉, *H. pylori* toxin 30 µl와 250 µl의 urea broth (7 µg of phenol red/ml과 250 mM urea)를 반응시켜 흡광도의 변화값을 측정하였다.

통계학적 처리 - 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험에 대한 통계적 유의성 검정은 Student's *t*-test를 수행하여 결정하였다.

결 과

H. pylori toxin을 처리한 HeLa 세포는 neutral red dye를

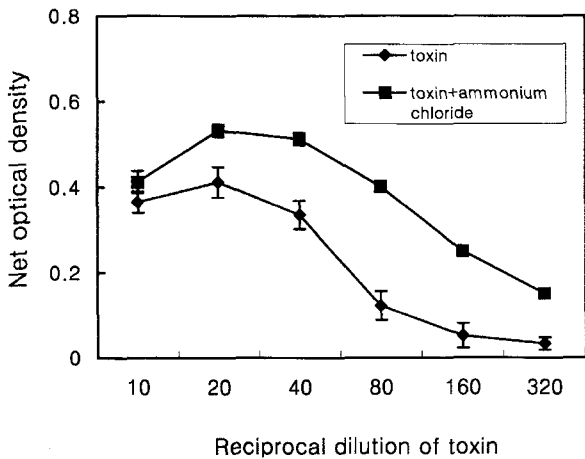


Fig. 1. Induction of HeLa cells neutral red uptake by *H. pylori* toxin and potentiation by ammonium chloride of HeLa cells neutral red uptake induced by *H. pylori* toxin. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n = 3). Where a bar is not shown, it was obscured by the symbol used to indicate the data point.

축적하여 toxin의 농도가 높을수록 흡광도가 증가하였다 (Fig. 1). 그러나 *H. pylori* toxin을 10배 희석시켜 처리한 HeLa 세포에서는 20배나 40배 희석시킨 toxin 처리보다 neutral red uptake가 더 낮게 측정되었는데 (Fig. 1), 10배 희석시킨 toxin으로 처리한 세포를 현미경으로 관찰하면 cell culture wells에 부착한 세포의 수가 감소된 것으로 관찰되었다. 이는 10배 희석한 고농도의 toxin 처리에 의한 세포 성장의 저해나 well에서의 세포의 분리현상에 의한 neutral red uptake 감소의 결과로 여겨진다.

또한 *H. pylori* toxin과 ammonium chloride를 함께 처리 시 toxin만의 처리보다 세포의 neutral red uptake가 훨씬 더 높았다 (Fig. 1). 이러한 높은 dye uptake 현상은 20배 희석시킨 toxin에서부터 측정되어 80배 희석에서 최대의 효과를 측정할 수 있었다. 그리고 높은 toxin 농도 (20배 혹은 40배 희석)에서의 neutral red uptake가 plateau현상을 보였으므로 최대의 dye uptake가 일어났음을 알 수 있었다. 이러한 neutral red assay의 결과와 일치하여, 현미경을 통한 관찰 (data not shown)에서도 toxin과 ammonium chloride의 동시 처리에 의해 유도된 공포형성이 toxin만에 의한 것보다 훨씬 더 높게 나타남을 관찰할 수 있었다.

이에 LWF가 *H. pylori* toxin이 진핵세포에 미치는 영향에 변화를 줄 수 있는지 살펴보았다. LWF 100~10,000 µg/ml 농도에서 HeLa 세포에 독성이 없었으므로 0~5,000 µg/ml을 세포에 처리하였을 때, Fig. 2에서와 같이 LWF는 *H. pylori*에 의한 공포형성을 농도의존적으로 저해하는 효과가 있었다. 특히 LWF 농도 1,000, 2,500과 5,000 µg/ml에서는

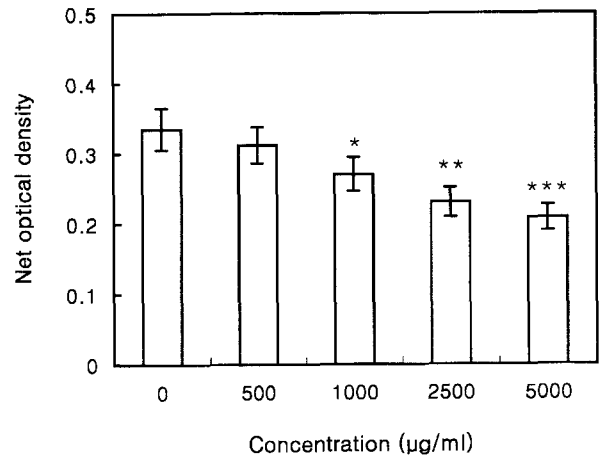


Fig. 2. Effect of LWF on HeLa cells neutral red uptake induced by *H. pylori* toxin. The values are mean±SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 as compared to control.

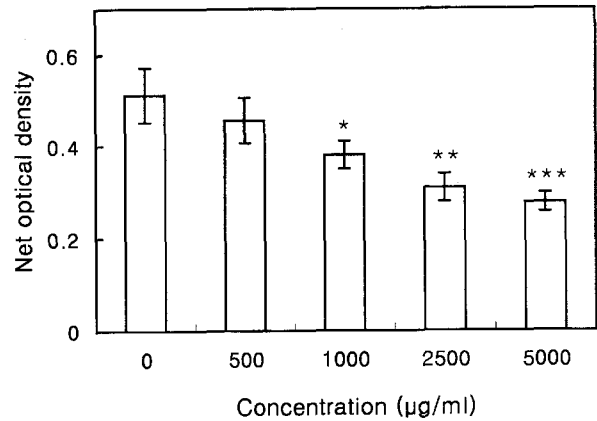


Fig. 3. Effect of LWF on the potentiated neutral red uptake by ammonium chloride in *H. pylori* toxin-treated HeLa cells. The values are mean±SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 as compared to control.

통계적으로 유의성 있는 억제효과를 측정할 수 있었다. 또한 ammonium chloride에 의해 공포형성 효과가 증가된 상태에서도 LWF의 저해효과를 측정할 수 있었다 (Fig. 3).

다음으로 *H. pylori* toxin에 의해 유도된 공포형성에 urea와 AHA가 미치는 영향을 조사하였다. *H. pylori* toxin과 위액의 최대 urea 농도인 10 mM urea를 함께 처리한 세포가 toxin만을 처리한 세포보다 더 높은 neutral red uptake 현상이 관찰되었다 (Fig. 4). 그리고 세포를 *H. pylori* toxin, urea와 AHA를 함께 처리하면 toxin만을 처리한 효과와 비슷한 neutral red uptake로 감소하였다 (Fig. 4). 그러나 urease 억제제인 AHA에 의해 완전한 neutral red uptake 억제현상이 나타나지 않은 것은 공포형성이 단지 urease활성에 의해서만 나타난 것이 아님을 시사하고 있다.

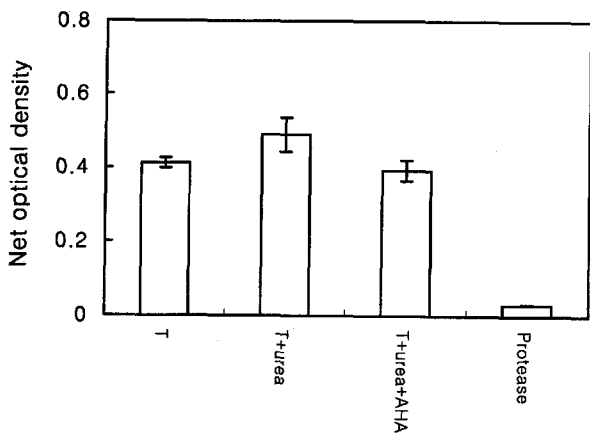


Fig. 4. Effects of urea, urea and AHA, and protease on HeLa cell neutral red uptake induced by *H. pylori* toxin. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean ($n=3$). Where a bar is not shown, it was obscured by the symbol used to indicate the data point. T: toxin, AHA: acetohydroxamic acid (500 $\mu\text{g/ml}$), protease: proteinase K (50 $\mu\text{g/ml}$ at 37°C for 30 min)

한편, *H. pylori* toxin의 공포형성이 urease 활성과 관계가 있는지를 확인하기 위하여 toxin의 urease 활성을 측정된 결과, *H. pylori* toxin은 효소활성이 $51.28 \pm 12.32 \mu\text{M/min}/\mu\text{g}$ protein인 것에 비해, LWF (2,500 $\mu\text{g/ml}$) 처리시 $42.76 \pm 9.66 \mu\text{M/min}/\mu\text{g}$ protein로 16.6% 감소로 매우 낮은 활성 저해효과가 측정되었다. 이에 반하여 urease 활성 측정시 사용한 농도와 같은 농도의 LWF (2,500 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의하여 공포형성은 유의성 있는 저해효과가 있었으므로(Fig. 2) 이 결과 또한 urease가 공포형성에는 큰 영향이 없음을 증명하였다.

Neutral red uptake와 관계한 *H. pylori* toxin에 단백질분해효소(protease)의 영향을 결정하기 위하여 toxin을 protease K와 반응시킨 후 neutral red uptake를 측정된 결과, 그 흡광도가 0.032 ± 0.001 이고 toxin만을 처리한 조절군의 흡광도는 0.335 ± 0.03 이었다(Fig. 4). 그러므로 단백질분해효소에 의해 toxin의 neutral red uptake와 관계한 활성, 즉 공포형성 활성이 상실됨을 알 수 있었다.

고 찰

H. pylori 균주의 50~60%가 *in vitro*에서 세포 공포형성을 유도함이 증명되었다.⁵⁾ 또한 *H. pylori*에 감염된 사람의 위 점막에서 상피성 공포가 관찰되었으며,¹¹⁾ *H. pylori*의 공포형성 균주에 감염된 새끼돼지의 점막에서도 공포가 형성되었고,¹²⁾ *H. pylori*에 감염된 환자의 혈청은 공포형성 활성

을 증화시킨다¹³⁾는 증거들이 있었으므로 *in vivo*에서도 *H. pylori*에 의해 공포형성이 유도됨을 알 수 있다.

그러나 *H. pylori*에 의해 형성된 공포(vacuoles)의 특징에 대해 자세히 알려져 있지 않고, 다만 전자현미경 연구에 의하면 공포는 막으로 싸여 있고 electron-lucent reticular 물질과 작은 세포막으로 쌓인 함유물을 가지고 있다는 보고가 있었다.¹⁴⁾ 특히 neutral red는 세포의 lysosome에 결합하는 것으로 알려져 있으므로,¹⁵⁾ neutral red의 *H. pylori*에 의한 공포로의 빠른 결합은 공포 구조가 낮은 pH를 가진 크기가 커진 lysosome이나 그와 비슷한 구조물임을 암시한다. Ammonia는 다른 lysosome 친화물질로서 *in vitro*에서 세포의 lysosomal swelling을 유도할 수 있다.¹⁶⁾ 본 논문의 결과에서도 ammonium chloride가 *H. pylori* toxin에 의한 공포형성을 증가시키는 효과가 있었으므로 lysosomes이 균의 toxin과 ammonium chloride의 영향을 받는 세포소기관일 가능성이 크다.

*H. pylori*의 공포형성 유도기전에 대해서도 잘 알려져 있지 않지만, Leunk 등¹⁴⁾은 균의 공포형성 독소(vacuolation cytotoxin)활성에 의해서 나타난다고 주장하였으나 urease 활성에 의해서도 공포형성이 일어난다는 주장⁹⁾도 있다. 그러나 본 연구결과에 의하면 toxin, urea와 AHA의 동시처리에 의하여 공포형성이 완전히 억제되지 않았고, *H. pylori* toxin의 urease 효소활성도 공포형성 억제효과가 높았던 농도의 LWF 처리로 *H. pylori* toxin의 urease 효소활성에는 현저한 감소효과가 없었으므로 urease는 직접적인 공포형성 억제효과보다는 urea에서 암모니아를 생성하고 이 암모니아에 의한 HeLa 세포의 공포형성으로 보인다.

본 논문의 결과에 의하면 LWF는 *H. pylori* toxin의 활성을 억제하였다. 이는 아마도 LWF가 세포의 공포형성에 영향이 있다고 알려진 vacuolar-type H^+ -ATPase (V-ATPase)의 활성억제와 관계가 있을 것이다. 즉, V-ATPase는 proton pumping에 의하여 공포의 산성화를 유도하고 ammonium 같은 세포막 투과성 이온의 축적과 공포막의 pH gradient 형성에 의해 공포의 크기를 확대하였을 것이다. 이에 LWF는 적어도 부분적으로나마 V-ATPase의 활성을 억제하여 lysosome의 pH를 높여서 공포형성을 억제하거나 proton transport system을 변화시켜 공포조직의 유지를 방해한 듯 하다. 특히 분리정제된 *H. pylori*의 vacuolating toxin이 여러 종류의 ATPase pumps와 ion channels의 N-말단 부분의 염기서열이 같다는 것이 증명되었으므로,⁸⁾ 앞으로 toxin이 특이적인 ion transport나 ion channel 성질을 가지고 있는지 또는 세포내 ion gradients 유지에 필요한 효소와 상호교류가 있는지에 대한 연구와 이에 대한 LWF의 영향의 연구는 매우 중요하다고 사료된다.

인용문헌

1. Mannick, E. E., Bravo, L. E. and Zarama, G. (1996) Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.* **56**: 3238-3243.
2. Cover, T. L. and Cao, P. (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolation cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* **269**: 10566-10569.
3. Smoot, D. T., Mobley, H. L. T., Chippendale, G. R., Lewison, J. F. and Resau, J. H. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **58**: 1992-1994.
4. Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1995) Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**: 94-98.
5. Cover, T. L., Dooley, C. P. and Blaser, M. J. (1990) Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* **58**: 603-610.
6. Xu, J. K., Goodwin, C. S., Cooper, M. and Robinson, J. (1990) Intracellular vacuolization caused by the urease of *Helicobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* **161**: 1302-1304.
7. Leunk, R. D. and Morgan, D. R. (1998) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **26**: 93-99.
8. Cover, T. L. and Blaser, M. J. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**: 10570-10575.
9. Mobley, H. L. T., Jones, B. D. and Jerse, A. E. (1986) Cloning of urease gene sequences from *Providencia stuartii*. *Infect. Immun.* **54**: 161-169.
10. Senior, B. W., Bradford, N. C. and Simpson, D. S. (1980) The urease of proteus strains in relation to virulence for the urinary tract. *J. Med. Microbiol.* **13**: 507-512.
11. Rubio, C. A. and Kato, Y. (1987) Classification of vacuolated cells in the gastric mucosa. *J. Surg. Oncol.* **34**: 128-132.
12. Eaton, K. A., Morgan, D. R. and Krakowka, S. (1989) *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Gastroenterology* **98**: A654.
13. Leunk, R. D., Ferguson, M. A., Morgan, D. R., Low, D. E. and Simor, A. E. (1990) Antibody to cytotoxin in infection by *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1181-1184.
14. Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G. and Morgan, D. R. (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **26**: 93-99.
15. Shau, H. and Dawson, J. R. (1984) The role of the lysosome in natural killing: inhibition by lysosomotropic vital dyes. *Immunology* **53**: 745-751.
16. Ohkuma, S. and Poole, B. (1981) Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *J. Cell. Biol.* **90**: 656-664.

(2001년 12월 15일 접수)