

HeLa세포에서 *Helicobacter pylori* 독소에 의한 공포형성에 미치는 무의 효과

손윤희 · 서정일¹ · 정유진¹ · 박인경 · 김호창 · 황철원² · 김철호³ · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소,

¹동국대학교 의과대학 내과학교실, ²한동대학교 생명공학부

³동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실

Effect of Radish on HeLa Cell Vacuolation Induced by *Helicobacter pylori* Cytotoxin

Yun-Hee Shon, Jung-Ill Surh¹, Yu-Jin Chung¹, In-Kyung Park, Ho-Chang Kim,
Cheorl-Weon Hwang², Cheorl-Ho Kim³, and Kyung-Soo Nam*

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center,

¹Department of Internal Medicine, College of Medicine,

²Department of Environmental Microbiology, Handong University, Pohang 791-780, Korea

³Department of Biochemistry and Molecular Biology,

College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract – *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is associated with type B gastritis, peptic ulcer disease, 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. *H. pylori* toxin induced vacuolation of HeLa cells. Korean and Japanese radishes significantly prevented the vacuolation of HeLa cells induced by *H. pylori* toxin. The urease activity in vacuolated cells was also decreased with Korean and Japanese radishes. *H. pylori* toxin-induced vacuolation was inhibited by vacuolar type ATPase inhibitors (bafilomycin and N-ethylmaleimide). However, further investigation is required to determine the mechanisms of radish for the inhibition of vacuole formation of eukaryotic cells in response to the *H. pylori* toxin.

Key words – Radish (*Raphanus sativus* L.), *Helicobacter pylori*, vacuolation, urease, ammonia

*Helicobacter pylori*는 B형 위염의 중요한 발병인자이며 소화성 궤양의 일차적 발병원인으로 위암의 발생에도 관여한다고 알려져 있다.¹⁾ *H. pylori* 감염의 병태생리학적 현상 즉, 조직의 염증과 손상에 대한 기전은 아직 완전히 설명되지 않고 있다.

그러나 *H. pylori*에 의한 많은 양의 urease 생성이 위염의 시작과 유지에 중요하다고 생각하고 있으며, urease에 의해 생성된 암모니아는 낮은 pH인 위산의 치사적 효과로부터 균을 보호할 뿐만 아니라 위의 상피세포를 손상시킨다고 알려져 있다.²⁾ 다른 독성인자로는 *H. pylori*의 특정균주에서만 생성되는 분자량이 약 87 kD인 vacuolating cytotoxin

(Vac A)과 분자량이 약 120~140 kD인 cytotoxin-associated protein (Cag A)로 알려져 있다.³⁾ 이러한 독성인자의 생성 유무에 의해 *H. pylori* 균주는 두 종류를 나뉘는데 Vac A와 Cag A를 생성하는 균을 type I 또는 cytotoxic 균주로 분류하고, Vac A와 Cag A를 생성하지 않는 균을 type II 또는 noncytotoxic 균주로 분류한다. 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.⁴⁾ 근래에는 *H. pylori*의 공포형성(vacuolation) 활성이 cytotoxin 뿐만 아니라 urease활성에 의해서 나타나며 특히 urease 활성에 의해 urea에서 생

*교신저자(E-mail) : namks@dongguk.ac.kr
(FAX) : 054-770-2477

성되어 세포손상을 유도하는 암모니아도 세포 공포형성에 관여한다는 주장⁵⁾이 있으므로 본 연구에서는 *H. pylori* 60190 균주에 의한 감염시 위 염증발생의 원인 중 cytotoxin 및 urease 활성과 ammonia가 세포 공포형성에 미치는 영향을 조사하였다.

무는 십자과(*Raphanus sativus* L.)에 속하는 작물로서 그 씨는 예로부터 건위, 소화불량 및 거담약으로 응용되어 왔다. 그러나 무 자체에 관해서는 생육조건과 생산성 연구에 치중해왔으며, 그 생리 및 약리활성에 관한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 위장병 치료에 효과가 있다고 알려진 무(한국 품종 및 일본 품종)를 대상으로 *H. pylori*에 의해 형성된 HeLa 세포 공포형성에 미치는 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 한국품종의 무(이하 한국 무)는 국내에서 가장 많이 김장용 무로 시판되는 *Raphanus sativus* L. *Chongwoun*을 재배지인 포항시 신평면 농가에서 수확기인 2003년 11월 중순 구입하여 사용하였으며, 일본품종의 무(이하 일본 무)는 *Raphanus sativus* L. *Makino*를 같은 시기에 경주시내 시장에서 구입 사용하였다.

시약 - RPMI 1640 medium, dimethylsulfoxide (DMSO), neutral red, 99% ethyl alcohol anhydrous, urea, phenol red, proteinase K, bovine serum albumin (BSA), carbol fuchsin, bafilomycin, ouabain, N-ethylmaleimide, omeprazole, ammonium sulfate는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서, bacto agar, brucella broth는 Difco (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 - 무를 채판에 갈아 무즙을 만들고 이를 4°C에서 4,000 rpm 10분으로 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이를 여과지(Watman No.1)를 사용하여 흡입여과하고 여액을 다시 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 동결건조한 뒤 실험에 사용하였다. 모든 조작은 4°C에서 행하였으며, 실험에 사용할 때에는 membrane filter (0.22 µm, Whatman, Germany)를 사용하여 여과 멸균하였다.

세포배양 - 한국세포주은행(KCLB, 서울)에서 분양받은 위암세포 KATO III 및 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 기체상

태(-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 등⁶⁾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 - Cover⁷⁾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 제조하였다. 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 alcohol를 넣어 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

***H. pylori*의 urease 활성 측정** - Urease 활성도는 Mobley 등⁸⁾와 Senior 등⁹⁾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 독소에 의한 공포형성 - *H. pylori* toxin을 처리한 HeLa 세포는 neutral red dye를 축적하여 toxin의 농도가 높을수록 흡광도가 증가하였다(Fig. 1). 그러나 *H. pylori* toxin 원액이나 2배 희석시켜 처리한 HeLa세포에서는 4배 희석시킨 toxin 처리보다 neutral red uptake가 더 낮게 측정되었다(Fig. 1). 원액이나 2배 희석시킨 toxin으로 처리한 세포를 현미경으로 관찰하면 cell culture wells에 부착한 세포의 수가 감소된 것으로 관찰되었다.

무가 공포형성에 미치는 영향 - 한국 무와 일본 무를 사용하여 *H. pylori* toxin이 진핵세포에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 무는 *H. pylori*에 의

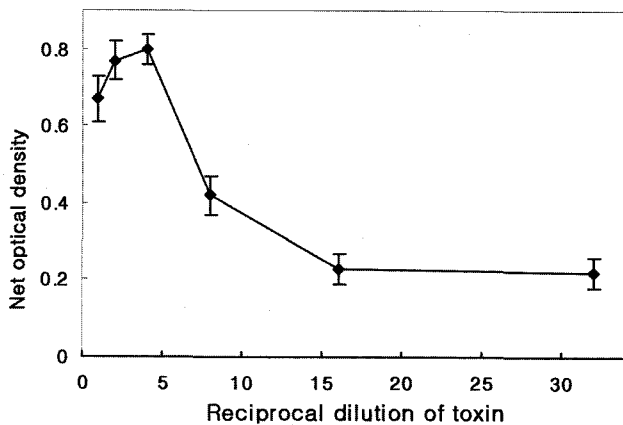


Fig. 1. Induction of HeLa cells neutral red uptake by *H. pylori* toxin. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean (n = 3).

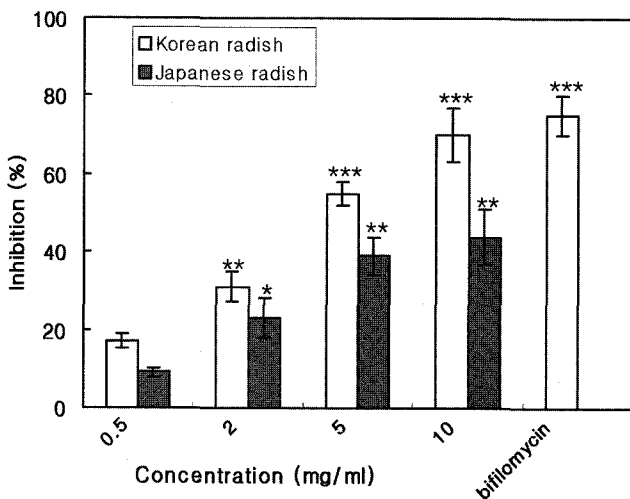


Fig. 2. Effect of Korean and Japanese radishes on HeLa cells neutral red uptake induced by *H. pylori* toxin. The values are mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005 as compared to control.

한 공포형성을 농도 의존적으로 저해하는 효과를 나타내었다. 특히 무의 농도 2 mg/ml, 5 mg/ml과 10 mg/ml에서는 통계적으로 유의성(p < 0.01과 p < 0.005) 있는 억제효과를 관찰할 수 있었으며, 특히 무 10 mg/ml 농도에서는 bafilomycin과 거의 같은 억제효과를 보여주었다(Fig. 2). 일본 무도 실험에 사용한 모든 농도에서 공포형성 억제효과가 있었으나 한국 무보다는 저해효과가 26~47% 낮게 측정되었다.

ATPase 저해제가 공포형성에 미치는 영향 - *H. pylori* toxin에 의한 공포는 세포막의 비정상적인 이온수송(ion transport)에 의해 형성될 가능성이 있으며 ATPase 저해제들이 공포형성에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 vacuolar ATPase 저해제(bafilomycin과 *N*-ethylmaleimide)가 *H. pylori* toxin에 의한 공포형성을 저해하였으며, bafilomycin이 *N*-ethylmaleimide보다 그 저해효과가 더 높았다. 그러나 Na^+ - K^+ ATPase 저해제인 ouabain과 H^+ - K^+ ATPase 저해제인 omeprazole은 *H. pylori* toxin에 의한 공포형성에 영향을 미치지 않았다(Table I).

H. pylori의 urease활성 측정 - *H. pylori* toxin의 공포형성이 urease 활성과 관계가 있는지를 확인하기 위하여 toxin의 urease 활성을 측정된 결과, *H. pylori* toxin은 효소활성이 1.34 nmol NH_3 /min/mg protein이며 무(10 mg/ml) 처리시 0.2 nmol NH_3 /min/mg protein으로 감소되어 효소활성 저해효과가 관찰되었다. 일본 무도 urease 활성을 억제하였으나 한국 무보다는 억제효과가 낮았다(Fig. 3).

고 찰

H. pylori 균주들의 50~60%가 *in vitro*에서 세포 공포형성을 유도함이 증명되었다.⁴⁾ 또한 *H. pylori*에 감염된 사람의 위 점막에서 상피성 공포가 관찰되었으며,¹⁰⁾ *H. pylori*의 공

Table I. Inhibition of *H. pylori* toxin-induced vacuolation by ATPase inhibitors

Inhibitor	Predominant class of ATPase inhibited	Concentration	Inhibition (%)
Bafilomycin	Vacuolar type	25 nM	75 \pm 5
		50 nM	83 \pm 9
<i>N</i> -Ethylmaleimide (NEM)	Vacuolar type	50 μ M	68 \pm 9
		100 μ M	80 \pm 9
Ouabain	Na^+ - K^+ type	100 μ M	1 \pm 0.1
		200 μ M	7 \pm 0.3
Omeprazole	H^+ - K^+ type	100 μ M	0
		200 μ M	0

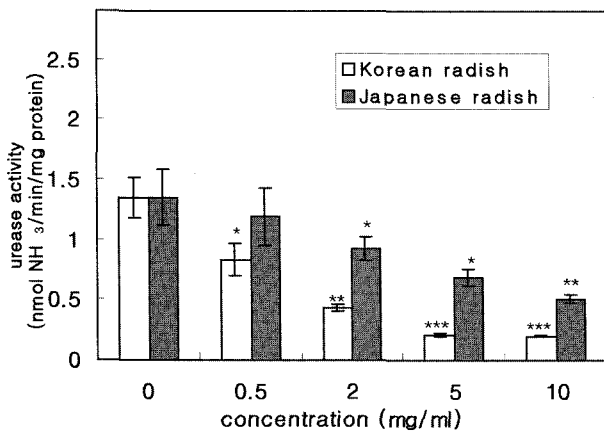


Fig. 3. Effect of Korean and Japanese radishes on urease activity of *H. pylori* toxin-treated HeLa cells. The values are mean \pm SD (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 as compared to control.

포형성 균주에 감염된 새끼돼지의 점막에서도 공포가 형성되었고,¹¹⁾ *H. pylori*에 감염된 환자의 혈청은 공포형성 활성을 중화시킨다¹²⁾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.¹³⁾ 특히 neutral red는 세포의 lysosome에 결합하는 것으로 알려져 있으므로,¹⁴⁾ 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.¹⁵⁾ 이전의 결과에서도 ammonium chloride가 *H. pylori* toxin에 의한 공포형성을 증가시키는 효과가 있었으므로¹⁶⁾ lysosomes이 균의 toxin과 ammonium chloride의 영향을 받는 세포 소기관일 가능성이 크다.

*H. pylori*의 공포형성 유도기전에 대해서도 잘 알려져 있지 않다. 하지만 Leunk 등¹³⁾은 균의 공포형성 독소(vacuolation cytotoxin)활성에 의해서 나타난다고 하였으며 urease 활성에 의해서도 공포형성이 일어난다는 보고⁵⁾도 있다. 그러나 이전의 연구결과에서 toxin, urea와 acetohydroxamic acid의 동시처리에 의하여 공포형성이 완전히 억제되지 않았으므로¹⁶⁾ urease는 직접적인 공포형성 억제효과보다는 urea에서 암모니아를 생성하고 이 암모니아에 의한 HeLa 세포의 공포형성으로 추정된다.

본 연구결과에 의하면 무는 *H. pylori* toxin의 활성을 억

제하며, 이는 아마도 무가 세포의 공포형성에 영향이 있다고 알려진 vacuolar-type H⁺ ATPase (V-ATPase)의 활성억제와 관계가 있을 것으로 사료된다. 즉, V-ATPase는 proton pumping에 의하여 공포의 산성화를 유도하고 ammonium 같은 세포막 투과성 이온의 축적과 공포막의 pH gradient 형성에 의해 공포의 크기를 확대하는 것으로 추정된다. 이에 무는 적어도 부분적으로나마 V-ATPase의 활성을 억제하여 lysosome의 pH를 증가시켜 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,⁷⁾ 앞으로 toxin이 특이적인 ion transport 나 ion channel 성질을 가지고 있는지 또는 세포내 ion gradients 유지에 필요한 효소들과 상호교류가 있는지에 대한 연구와 이에 대한 무의 영향의 연구는 매우 중요하다고 사료된다.

*In vitro*에서 *H. pylori*가 위 상피세포 증식억제 작용이 보고되었다.^{17,18)} 특히 Leunk 등¹³⁾은 urease 외에 *H. pylori*가 생산해 낸 단백질이 세포독성에 영향이 있다고 보고하였으며, 또한 urease에 의해 urea에서 생성된 암모니아가 세포독성의 원인이라는 보고도 있었다.²⁾ 근래에는 *H. pylori* 단백질 성분의 독성은 세포의 공포형성을 유도하며 암모니아는 세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있고, 공포형성은 세포에 비치사적이나 암모니아에 의해 회복될 수 없는 세포손상이 일어날 수 있으므로 *H. pylori*의 독성 성분과 urease에 의한 *in vitro*에서의 세포사멸 현상이 나타나는 것으로 보인다. 또한, 독성생성 균주가 만성위염 환자보다 소화성 궤양 환자에서 더 많이 분리되므로 이러한 현상이 *in vivo*에서의 소화성 궤양의 발생동안에도 일어날 가능성이 있다. 본 연구결과에서의 무의 위 상피세포 생존율 증가효과는 무가 *H. pylori*에 의해 억제된 위세포 증식의 회복에 직접적으로 영향을 미치거나 urease나 공포형성 독소의 활성 억제에 의해 세포생존율을 증가시킨 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발연구(202068-03-2-HD110)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 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. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. Leunk, R. D. and Morgan, D. R. (1998) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **26**: 93-99.
 7. Cover, T. L. and Blaser, M. J. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**: 10570-10575.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Rubio, C. A. and Kato, Y. (1987) Classification of vacuolated cells in the gastric mucosa. *J. Surg. Oncol.* **34**: 128-132.
 11. Eaton, K. A., Morgan, D. R. and Krakowka, S. (1989) *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Gastroenterology* **98**: A654.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Shau, H. and Dawson, J. R. (1984) The role of the lysosome in natural killing: inhibition by lysosomotropic vital dyes. *Immunology* **53**: 745-751.
 15. 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.
 16. 권동렬, 채갑, 손윤희, 남경수 (2002) *Helicobacter pylori* 독소에 의한 세포의 공포형성에 미치는 생약혼합물의 영향, *생약학회지* **33**: 13-17.
 17. Nakajima, N., Kuwayama, H., Tanaka, N., Nakajima, M. and Eastwood, G.L. (1990) *Campylobacter pylori* filtrate inhibits human epithelial growth factor-stimulated gastric epithelial proliferation *in vitro*. [Abstract] *Gastroenterology* **98**: A94.
 18. Wagner, S., Beil, W., Mai, U. E. H., Lohmuller, M. and Manns, M. (1994) Cocultivation of human gastric epithelial cells and *H. pylori*: an *in vitro* model for the initial step in *Helicobacter pylori* infection. [Abstract] *Gastroenterology* **106**: A791.

(2004년 7월 28일 접수)