

## *Helicobacter pylori*의 *in vivo* 연구를 위한 ethanol-pretreating animal model의 개발

이진욱 · 김승희 · 박탄우<sup>1</sup> · 김옥진<sup>1,\*</sup>

서울대학교 의과대학 실험동물학교실, <sup>1</sup>원광대학교 생명자원과학대학 동물질병연구소  
(게재승인: 2006년 9월 19일)

### Establishment of ethanol-pretreating animal model to study *Helicobacter pylori* infection

Jin-Uk Lee, Seung-Hee Kim, Tan-Woo Park<sup>1</sup>, Okjin Kim<sup>1,\*</sup>

College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

<sup>1</sup>College of Life Science and Natural Resources,

Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Accepted: September 19, 2006)

**Abstract :** A stable and reliable *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection animal model would be necessary for evaluating vaccine efficacy and helpful for understanding the pathological mechanism of the organism. The aim of the present study is to investigate the effect of ethanol treatment prior to *H. pylori* inoculation on associated gastric mucosal injury and to establish ethanol-pretreating animal model to study *H. pylori* infection. Male Mongolian gerbils were used for the study. *H. pylori* was orally inoculated after 12 h fasting. 3 h prior to *H. pylori* inoculation, a group of gerbils was orally treated with absolute ethanol, 60% and 40% ethanol respectively. Another group of animals was treated either with *H. pylori* culture media alone or with different concentrations of ethanol plus culture media. Gerbils were killed 4 or 8 weeks after *H. pylori* inoculation. The colonization of *H. pylori* was confirmed by both histological examination and rapid urease test. Mucosal damage was evaluated grossly and histologically according to the criteria. The colonization of *H. pylori* and pathological changes in gastric mucosa of the animals were also observed. Although no significant change to the gastric mucosa was observed in the animals treated either with *H. pylori* culture media alone or with different concentrations of ethanol plus culture media, persistent *H. pylori* infection was seen in the mucosa and mucosal leucocyte infiltration and severe epithelial damage was observed in the *Helicobacter* and ethanol+*Helicobacter* groups after 4 weeks. The gross and histological scores were higher in the ethanol+*Helicobacter* than in the *Helicobacter* alone group. As the results, ethanol-pretreatment with 60% concentration induced severe pathogenic changes by *H. pylori* infection in 5 weeks-old Mongolian gerbils. These results suggested that ethanol-pretreatment before *H. pylori* inoculation could increase the severity of gastric mucosal inflammation and enhance the colonization of *H. pylori*. The established ethanol-pretreating animal model would contribute to screen new drugs against *H. pylori* and be used as an useful tool for various animal experiments with *H. pylori* strains.

**Key words :** ethanol, *Helicobacter pylori*, mongolian gerbil, pathogenicity

---

\*Corresponding author: Okjin Kim  
College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea  
[Tel: +82-63-850-6668, Fax: +82-63-850-7308, E-mail: kimoj@wonkwang.ac.kr]

## 서 론

*Helicobacter pylori*(*H. pylori*)는 급성 및 만성 위염, 소화불량, 흡수장애증, 저산증, 위궤양, 십이지장궤양, 위암 및 위림프종을 유발하는 병원체로 알려져 있다 [4-6, 20]. 균과 위궤양과의 관련성에 대한 가설이 1975년 제기된 바 있지만, Marshall과 Warren에 의하여 만성 활동성 위염 환자의 위 유문부 점막 생검조직에서 나선형의 반곡형 그람음성 간균을 관찰하고 분리 배양에 성공한 것은 1984년의 일이었다 [14]. 국내 정상 성인의 *H. pylori* 감염률은 약 60-75% 정도로 서구 여러 나라에 비교하여 매우 높은 *H. pylori* 보균율을 보이고 있다 [2]. 그러나 높은 *H. pylori* 감염율에도 불구하고 대부분의 감염자에서 증상이 없고 감염자 중 20% 정도의 일부 환자에서만 위십이지장 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다 [13]. 감염된 환자들에서 임상 증상들의 발현에 대한 이러한 불일치한 현상들을 *H. pylori*의 병원성 차이(병독인자, virulence factor), 위내 환경적 요인에 따른 차이(환경인자, environmental factor) 또는 균에 대한 개인의 유전적 감수성 차이(숙주인자, host factor) 때문이라는 가설이 제시되고 있다 [12, 17]. 이들 가설을 밝히기 위해서는 *H. pylori*와 숙주 간의 면역현상, 병리기전 등에 대한 연구가 필수적이지만 임상에서 감염환자의 역학자료가 제한되어 있기 때문에 연구가 매우 어려운 상황이다. Hirayama 등 [9]이 *H. pylori* ATCC 43504 strain을 mongolian gerbil에 감염시켜 병리소견이 사람의 것과 유사하다는 것을 보고한 이후로 현재 *H. pylori*의 *in vivo* 실험은 mongolian gerbil을 사용하여 주로 수행되고 있다 [8]. *H. pylori*에 감염된 mongolian gerbil은 사람의 위 및 십이지장에서 유발되는 병변과 유사한 상피세포의 병변과 염증 및 궤양 소견 [18]을 보이는 것뿐만 아니라 다른 동물모델에서는 관찰할 수 없는 만성감염의 유지에 의한 위암 유발 [8, 18]이 가능한 것으로 보고되고 있다. Mongolian gerbil이 *H. pylori* ATCC 43504 strain에 의하여 위점막에 colonization이 이루어지고 만성감염이 유발되는 것은 사실이지만 임상분리균주들에 대한 colonization 여부에 대하여는 단정할 수 없으며, gerbil에 *H. pylori* 감염에 의한 위십이지장 궤양 병변의 발현은 수개월 이상의 기간이 소요되는 것으로 알려져 있어 mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이를 알아본다는 것은 장기간의 시간 소요가 요구되어지는 문제점을 안고 있다 [8]. 따라서 보다 안정적이고 신뢰할 수 있는 동물모델의 개발이 *H. pylori* 균주들의 감염실험을 위하여 요구되어지고 있다. 한편, 설치류를 이용한 위염 및 위궤양 유발을 위하여 랫드를 이용한 에탄올 모델이 위염 및 위궤양 치료제의 *in vivo* 약

효 검사를 위하여 자주 이용되고 있다 [16, 19]. 그러나 mongolian gerbil에서 에탄올에 의한 위염 및 위궤양 유발 양상에 대한 유용한 자료들은 많지 않은 실정이다. 알콜은 위점막 손상을 유발하는 인자들 중의 하나이며 고농도 알콜의 섭취는 acute gastric mucosal lesions (AGML)으로 위점막 상피세포의 손상 뿐 아니라 점막의 손실도 유발하는 것으로 알려져 있다 [11]. 알콜과 *H. pylori*는 단독으로는 분명한 위장관 손상의 위해인자이지만 이들 두개 인자가 복합적으로 작용할 때에 위염 여부에 대한 해석에 대하여는 연구그룹에 따라 불일치한 결과들이 보고되고 있다 [3, 21]. 따라서 알콜 섭취 후 *H. pylori* 감염에 대한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 *H. pylori* 동물실험을 위한 안정적이고 신뢰할 수 있는 동물모델 개발을 개발하고자 수행되었다. 또한 본 연구를 통하여 알콜섭취에 의한 AGML이 *H. pylori*감염에 끼치는 영향에 대하여 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

서울대학교 의과대학 실험동물실에서 특정병원체부재 (specific-pathogen free)의 상태로 계통이 유지되고 있는 mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)을 4주령에 공급받아 1주일 동안 순화사육한 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 온도는  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ , 소음 60 phone 이하, 조명시간 08:00-20:00(1일 12시간), 환기 시간당 10-12회의 SPF 환경에서 사육되었으며, 사료는 실험동물전용사료(퓨리나, 한국)를 2.0 Mrad의 방사선으로 멸균시켜 자유급식 시켰으며, 음수는 자외선 멸균수를 자유 급수하였다.

### *H. pylori* 배양

*H. pylori*(ATCC 43504, American Tissue Culture Collection, USA) 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종 후, 10% CO<sub>2</sub>, 100% 습도가 유지되는 37°C 항온기에서 3일간 배양하였다. 배양된 *H. pylori*를 멸균된 PBS(pH 7.2)가 들어있는 튜브에 모은 후, 1 ml 당  $2.0 \times 10^9$  colony-forming unit(CFU)의 균 수를 포함하게 준비하여 실험에 사용하였다.

### Ethanol-pretreating 효과 평가

1주일간의 순화사육 후 5주령의 건강한 수컷 mongolian gerbil을 시험에 사용하였다. Ethanol-pretreating에 의한 위점막의 변화를 평가하고자 100%, 60%, 40% 및 20% ethanol을 각 농도 투여군으로 군 분리하여, 각 군 당 6두를 사용하여 군 구성을 수행하였다. 분류된

mongolian gerbil을 12시간 절식시킨 후, 각 농도별로 에탄올 0.5 ml 씩을 각각의 개체에 경구 투여하고 각 군당 2두씩 1시간, 2시간 및 3시간 후에, 각각의 동물들을 ether 마취 하에 치사시킨 후 위를 적출하여 위 내강에 알콜 잔류 여부를 알아보고 육안 및 병리조직학적 검사를 수행하여 위점막의 변화를 알아보았다.

Ethanol-pretreating에 의한 위점막 변화가 *H. pylori* 감염에 끼치는 영향을 알아보기로 각 군당 10두의 동물들을 사용하여 PBS 적용 후 culture media 투여군(PBS + media), PBS 적용 후 *H. pylori* 감염군(PBS + Hp), 100% ethanol 적용 후 culture media 투여군(100% ETOH + media), 60% 에탄올 적용 후 culture media 투여군(60% ETOH + media), 40% ethanol 적용 후 culture media 투여군(40% ETOH + media), 100% ethanol 적용 후 *H. pylori* 감염군(100% ETOH + Hp), 60% ethanol 적용 후 *H. pylori* 감염군(60% ETOH + Hp), 40% ethanol 적용 후 *H. pylori* 감염군(40% ETOH + Hp)의 8개 군으로 나누어 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 5주령 mongolian gerbil을 12시간 절식 시킨 후 각 군별로 PBS 또는 정해진 농도의 에탄올을 개체 당 0.5 ml씩 경구투여하고 3시간 후, 군에 따라 media 또는 1 ml 당  $2.0 \times 10^9$  CFU의 균 수가 포함되게 준비된 *H. pylori* 배양액을 두당 0.5 ml씩 마우스용 존대를 이용하여 경구로 투여 하여 *H. pylori* 감염을 유발하였다. 투여 후 각 군의 동물들은 6시간의 절식 후 사료를 급여하였다. 절식 동안에 음수는 자유 급여할 수 있도록 하였다. 각 군의 동물들은 4주 및 8주 후에 각 군의 5마리씩을 12시간 절식시킨 후 ether 마취 하에 치사시킨 후 위와 십이지장을 적출하여 육안병변 점수를 구하고, 추가적인 병리조직학적 검사를 통하여 조직병변의 점수를 산정하였다. 또한, 각 개체의 위 유문부 점막 일부를 무균 채취하여 *H. pylori*의 colonization을 확인하기 위한 신속요소분해효소검사를 수행하였다.

#### 육안병변의 점수 산정

각 시험 군별로 에탄올 투여 후 적출된 위는 위의 대만부를 따라 절개하여 펼친 후에 실체현미경( $\times 10$ )을 사용하여 병변을 관찰하고, 육안 병변의 점수를 산정하였다. 육안병변의 점수는 각 병변의 가로길이  $\times$  세로길이 ( $\text{mm}^2$ )의 총합으로 계산하였다. 각 개체의 점수를 구한 후 각 군별로 평균 점수를 구하였다.

#### 병리조직학적 검사

위점막의 병리조직학적 검사를 위하여 적출된 위의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정 하고, 선위(glandular stomach) 부위를 가로 방향으로 5 mm 간격으로 잘라, 개

체 당 3개 부위를 선정하였고, 이 때 선별된 부위들은 다른 개체들 간에 서로 동일한 부위가 되도록 주의하여 선정하였다. 선정된 부위들의 조직들은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀포매한 후, 4  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 hematoxylin and eosin(H&E) 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다. 각 조직 소견의 병변에 대한 평가를 수행하여 0: no lesion, 1: mild, 2: moderate, 3: severe로 점수를 나누어 기록하고, 개체당 3개 부위의 점수의 합을 구하여 개체의 histologic lesion score를 구한 후, 각 군의 평균 점수를 구하였다.

#### 신속요소분해효소검사

신속요소분해효소검사는 무균적으로 적출한 위 유문부 2부위와 위체부의 점막 1부위 씩의 조직을 채취하여 ASAN Helicobacter Test(아산제약, 한국)에 각각을 넣고 제조회사의 설명서에 따라 배양하여 노란색 배지가 적색으로 변하는 경우를 양성으로 판정하였다(Fig. 2). 검사과정을 간략히 설명하면 미리 실온에 방치한 시약을 노란색 한천 겔이 보이도록 스티커를 벗긴 후 무균 바늘을 사용하여 위점막조직을 겔 속에 밀어 넣고 스티커를 다시 덮은 후 동물번호와 시간을 기입하고 37°C의 따뜻한 곳에서 2시간 동안 반응시키며 반응 후 1시간 및 2시간에 판독하였다. 판독의 결과 노란색에서 적색까지 색깔의 등급을 3단계(Yellow: 0, Orange: 1, Pink: 2, Red: 3)로 나누어 각각의 점수를 구하고 개체 당 3개 부위의 점수의 합을 구하여 개체의 신속요소분해효소검사 점수를 구한 후, 각 군의 평균 점수를 구하였다.

## 결 과

Ethanol-pretreating에 의한 위점막의 변화를 평가하고자 100%, 60%, 40% 및 20% ethanol을 적용 후 1시간, 2시간 및 3시간에 위점막의 변화를 평가한 결과는 Table 1과 같았다. 에탄올 투여 후 1시간에는 농도에 상관없이 투여된 에탄올이 다량 위 내강에 저류되어 있었다. 에탄올 경구투여에 의하여 유발된 위 병변은 선위 부위에 암적색 출혈 병변을 동반한 궤양 병소의 산재가 특징적이며, 에탄올 농도의 증가와 상관적으로 궤양 병소들의 면적들도 증가되는 것을 알 수 있었다. 100% 에탄올 적용에 의하여 매우 심한 위궤양 병변들이 유발되었으며, 위 내강 내에 투여 알콜과 암적색 혈액응고괴를 포함한 삼출물들이 차있는 소견이 관찰되었다. 60% 및 40% 에탄올 적용에 의하여 유도된 병변들은 그 정도가 100% 에탄올 적용에 비하여 현격하게 감소되었다. 에탄올 투여에 의한 점막의 병변은 조직학적으로 궤양, 미란, 위점막 부종 등의 AGML 소견이 관찰되었다. 20%

**Table 1.** Gastric changes after inoculation of different concentration of ethanol

Gastric lesions	100% ETOH			60% ETOH			40% ETOH			20% ETOH		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Alcohol in the lumen	+++*	+	-	+++	+	-	+++	+	-	+	-	-
Bleeding clots in the lumen	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ulcer	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
Erosion	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
Edema	+++	++	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-

\*Lesion grade: +++; severe, ++; moderate, +; mild, -; no lesion

**Table 2.** Gross lesion scores of stomach after ethanol administration with or without *H. pylori* infection

Group	Inoculation <sup>a</sup>		Gross lesion scores <sup>b</sup>	
	Pretreatment	<i>H. pylori</i>	4 weeks (n = 5)	8 weeks (n = 5)
I	PBS	No <sup>c</sup>	0	0
II	PBS	Yes	1.8 ± 0.58	2.3 ± 1.25
III	100% ETOH	No	0	0
IV	60% ETOH	No	0	0
V	40% ETOH	No	0	0
VI	100% ETOH	Yes	1.3 ± 0.74	2.1 ± 1.07
VII	60% ETOH	Yes	12.7 ± 1.53	23.8 ± 2.51
VIII	40% ETOH	Yes	6.0 ± 0.97	6.8 ± 1.46

<sup>a</sup>Pretreatment was conducted 3 h before *H. pylori* inoculation.

<sup>b</sup>Gross lesion scores were calculated with the sum of macroscopic lesions.

<sup>c</sup>The animals of this group were inoculated culture media alone instead of *H. pylori*.

에탄올 투여에 의해서는 위점막의 변화를 관찰하기 어려웠다. 에탄올 투여 후 2시간 후에 관찰된 결과들은 1시간에 관찰된 개체에 비교하면 소량이지만 위 내강에는 투여된 에탄올로 추정되는 물질들이 저류되어있었으며, 각 개체들의 병변들은 투여 1시간에 관찰한 병변들과 유사하였다(Table 1). 에탄올 투여 후 3시간 후에 관찰된 결과들은 위 내강에서 투여된 에탄올로 추정되는 물질들은 발견되지 않았으며, 각 개체들의 병변들은 현저히 경감된 것을 알 수 있었다(Table 1).

Ethanol-pretreating에 의한 위점막 변화가 *H. pylori* 감염에 끼치는 영향을 알아보기로 에탄올 투여 후 3시간에 *H. pylori* 감염시킨 후 4주와 8주에 위점막의 변화를 평가한 결과는 Table 2와 Table 3과 같다. *H. pylori* 세균의 colonization은 감염 후 4주와 8주 모두 *Helicobacter*

**Table 3.** Histopathologic lesion scores of stomach after ethanol inoculation with or without *H. pylori* infection

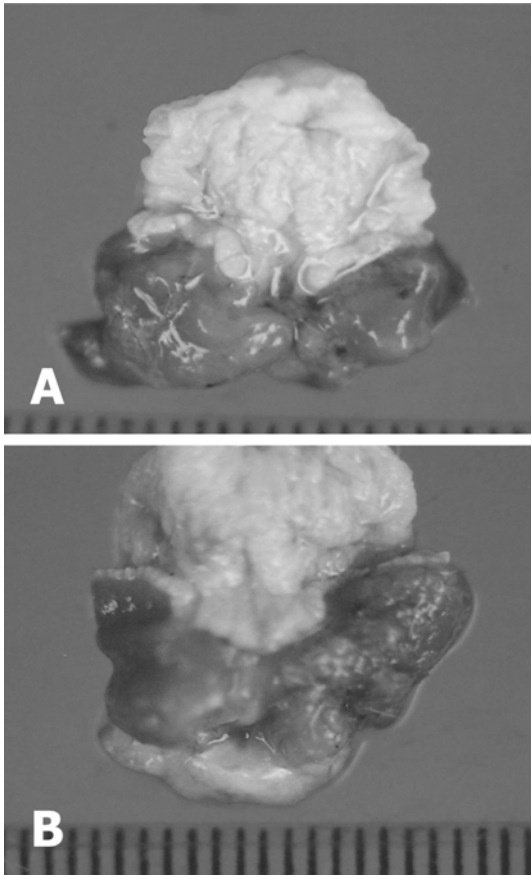
Group	Inoculation <sup>a</sup>		Histologic lesion scores <sup>b</sup>	
	Pretreatment	<i>H. pylori</i>	4 weeks (n = 5)	8 weeks (n = 5)
I	PBS	No <sup>c</sup>	0	0
II	PBS	Yes	2.4 ± 0.55	2.8 ± 0.45
III	100% ETOH	No	1.6 ± 0.55	0.9 ± 0.45
IV	60% ETOH	No	1.4 ± 0.55	0.8 ± 0.55
V	40% ETOH	No	1.2 ± 0.45	0.4 ± 0.45
VI	100% ETOH	Yes	2.0 ± 1.41	2.6 ± 1.52
VII	60% ETOH	Yes	4.8 ± 1.64	7.2 ± 1.64
VIII	40% ETOH	Yes	3.6 ± 1.34	4.8 ± 1.64

<sup>a</sup>Pretreatment was conducted 3 h before *H. pylori* inoculation.

<sup>b</sup>Histologic lesion scores were calculated with the sum of histologic grades of 3 tissues in each animal.

<sup>c</sup>The animals of this group were inoculated culture media alone instead of *H. pylori*.

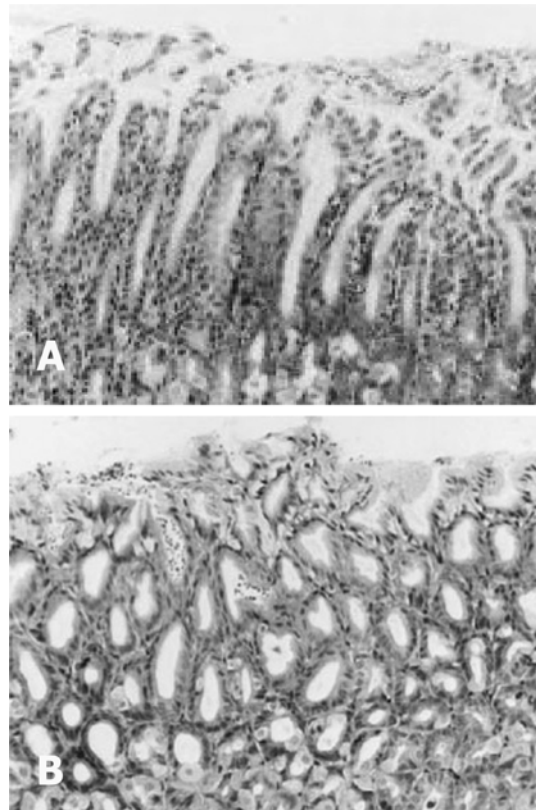
감염군들인 PBS + Hp, 100% + Hp, 60% ETOH + Hp 및 40% ETOH + Hp 군의 동물들에서 신속요소분해효소검사와 조직학적으로 위점막의 세균 콜로니들로 확인할 수 있었다. 이들 결과로부터 *Helicobacter* 감염군들은 투여된 *H. pylori* 세균이 소실되지 않고 *gerbil*들의 위 점막에 정착하여 colonization되어 있음을 알 수 있었다. PBS + media, PBS + Hp, 100% ETOH + media, 60% ETOH + media, 40% ETOH + media, 100% ETOH + Hp, 60% ETOH + Hp, 40% ETOH + Hp의 8개 군으로 나누어 수행된 실험결과 에탄올만 투여된 군들의 동물들에서 에탄올 투여 후 2시간에 관찰되었던 AGML 관련 소견은 4주 및 8주에 육안적으로 관찰할 수 없었다(Table 2). PBS + Hp 군과 100% ETOH + Hp 군의 동물들은 4



**Fig. 1.** Gross findings of stomach 8 weeks after *Helicobacter pylori* infection with or without ethanol pretreatment. A. PBS + *H. pylori*. There were several inflammatory lesions on the gastric mucosa. B. 60% ethanol + *H. pylori*. There were hyperplastic and inflammatory changes on the gastric mucous layer. H&E, ×400.

주 및 8주에 일부 동물들의 위점막에 산발적인 국소충혈 및 경도의 염증소견이 국한적으로 관찰되었을 뿐 실체현미경 하에서 뚜렷한 병변을 관찰하기는 어려웠다 (Fig. 1A). 반면 60% ETOH + Hp 군과 40% ETOH + Hp 군의 동물들은 실체현미경 하에서 위점막의 궤양 및 미란, 점막상피의 증식성 병변 등을 볼 수 있었으며, 60% ETOH + Hp 군의 동물들에서 이들 병변은 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 1B). 음성대조군으로 사용된 PBS 적용 후 culture media 투여군(PBS + media)에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았다.

병리조직학적으로도 에탄올만 투여된 군들의 동물들에서 에탄올 투여 후 2시간에 관찰되었던 위점막 상피세포의 괴사 및 탈락과 같은 AGML 관련 소견은 4주에 일부 동물들에서 매우 경미한 소견으로 관찰되었고 8주



**Fig. 2.** Histopathological findings of stomach 8 weeks after *Helicobacter pylori* infection with or without ethanol pretreatment. A. PBS + *H. pylori*. Mild inflammatory cell infiltration in the mucous layer. H&E, ×400. B. 60% ethanol + *H. pylori*. Hyperplastic lesions and inflammatory cell infiltration in the mucous layer. H&E, ×400.

에는 대부분의 동물들에서 병변을 관찰할 수 없었으며 lesion score는 매우 낮았다(Table 3). 이러한 결과로부터 에탄올 단독 인자의 작용에 의한 위점막의 손상은 시간이 경과됨에 따라 정상 위점막 상피세포로 재생되어 대체되어 있음을 알 수 있었다. PBS + Hp 군과 100% ETOH + Hp 군의 동물들은 4주 및 8주에 일부 동물들의 위점막층에 염증세포의 침윤과 점액질분비 증가 소견이 관찰되었다(Fig. 2A). 반면 60% ETOH + Hp 군과 40% ETOH + Hp 군의 동물들은 병리조직학적으로 위점막층에 염증세포의 침윤과 위점막의 궤양 및 미란, 점막상피세포의 증식성 병변 등을 볼 수 있었으며, 60% ETOH + Hp 군의 동물들에서 병변의 정도가 다른 군의 동물들보다 심한 것을 알 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과로부터 에탄올로 손상된 위점막은 이후 감염되는 *H. pylori*의 병원성을 증폭시키는 것으로 판단되었다. 에탄올 투여에 의한 위점막 손상 후 *H. pylori* 감염에 의하여 유

**Table 4.** Results of rapid urease test with gastric mucosal tissues after ethanol inoculation with or without *H. pylori* infection

Group	Inoculation <sup>a</sup>		Rapid urease test <sup>b</sup>			
	Pretreatment	<i>H. pylori</i>	4 weeks (n = 5)		8 weeks (n = 5)	
			1 h	2 h	1 h	2 h
I	PBS	No <sup>c</sup>	0	0	0	0
II	PBS	Yes	3.4 ± 0.55	6.0 ± 0.71	3.6 ± 0.55	6.2 ± 0.45
III	100% ETOH	No	0	0	0	0
IV	60% ETOH	No	0	0	0	0
V	40% ETOH	No	0	0	0	0
VI	100% ETOH	Yes	3.2 ± 0.45	3.4 ± 0.55	3.2 ± 1.30	3.4 ± 0.89
VII	60% ETOH	Yes	6.4 ± 0.55	8.4 ± 0.89	8.2 ± 0.84	8.8 ± 0.45
VIII	40% ETOH	Yes	3.4 ± 0.55	6.2 ± 0.84	5.6 ± 1.14	6.8 ± 0.84

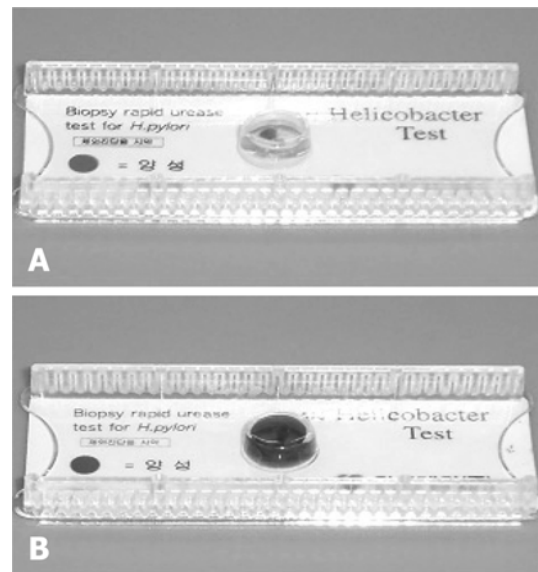
<sup>a</sup>Pretreatment was conducted 3 h before *H. pylori* inoculation.

<sup>b</sup>Test scores were calculated with the sum of color grades of 3 tissues in each animal.

<sup>c</sup>The animals of this group were inoculated culture media alone instead of *H. pylori*.

도되는 병변의 정도는 60% 에탄올, 40% 에탄올, 100% 에탄올 순이었으며 가장 큰 병증을 보여주는 에탄올 모델로는 60% 에탄올을 적용하는 것임을 알 수 있었다 (Fig. 2B). 조직학적으로 위점막의 표면에서 관찰되는 세균들의 수 또한 60% 에탄올 > 40% 에탄올 > 100% 에탄올 순으로 평가되었다. 100% 에탄올 투여 후 *H. pylori* 감염은 연구 시작 전의 예상결과와 다르게 *H. pylori* 단독 감염(PBS + Hp) 동물들과 유사한 정도의 병변과 위점막층의 세균 수를 보여주었다. 같은 군의 동물들에서 4주와 8주의 관찰 시점의 차이와 병변의 차이를 비교하였을 때, 8주에 관찰하는 것이 다소 높은 score들을 보여주었다(Table 3). 음성대조군으로 PBS + media에서는 병리조직학적으로 어떠한 병변도 관찰되지 않았다.

신속요소분해효소검사 결과는 Table 4와 같았으며, *Helicobacter* 감염군들인 PBS + Hp, 100% + Hp, 60% ETOH + Hp 및 40% ETOH + Hp 군의 동물들에서는 *H. pylori* 세균의 감염 후 4주와 8주 모두 양성반응을 관찰할 수 있었다(Table 4). *H. pylori* 세균의 감염이 없는 PBS + media, 100% ETOH + media, 60% ETOH + media 및 40% ETOH + media 군의 동물들은 시약의 기질에 변화가 없어 노란색으로 관찰되었다(Fig. 3A). 양성 검체들의 발색 정도 차이를 비교해본 결과 60% ETOH + Hp가 짧은 시간에 강한 발색반응을 보이는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B). 반면, 100% + Hp 군의 검체들은 PBS + Hp 군의 검체들과 유사한 정도로 발색의 속도가 늦고 발색 정도도 낮아 이들 검체에 *H. pylori*의 세균 수가 60% ETOH + Hp 군과 40% ETOH + Hp보다도 상대적으로 낮게 존재함을 알 수 있었다(Table 4). 같은 군의 동물들에



**Fig. 3.** Rapid urease test of gastric tissue 8 weeks after experiment. A. 60% ethanol + PBS. Negative result. The color of test reagent was not changed after 2 h incubation. B. 60% ethanol + *H. pylori*. Positive result. The color of test reagent became red after 2 h incubation.

서 4주와 8주의 관찰 시점의 차이와 발색 정도 차이를 비교해본 결과 *H. pylori* 감염군들에서 8주에 검사하는 것이 다소 높은 등급들을 보여주었다(Table 4).

## 고 찰

위십이지장 질환 환자에서 항생제를 이용한 *H. pylori*

의 치료는 위염 및 위궤양 재발을 낮출 수 있으나, 항생제 내성 균주들의 출현과, *H. pylori*의 유병율이 높기 때문에 치료 후 주변 감염자들로부터 흔히 재감염이 일어나 *H. pylori*의 완전 박멸은 어려운 것으로 전망되고 있으며, 다른 대안으로 병원성이 높은 균주를 선별적으로 선택하여, 그 균주에 감염된 환자들을 선택적으로 치료하는 방법들이 현실적인 것으로 거론되고 있다 [7, 15]. 따라서 *H. pylori*의 병원성 차이를 알아낼 수 있는 시스템의 개발은 *H. pylori*의 연구에 매우 중요한 의미를 가지고 있으며, 개발된 시스템들을 이용하여 병원성이 높은 균주들의 선별과 연구를 통하여 *H. pylori* 병원성에 관련된 인자들의 발견과 고병원성 *H. pylori* 균주의 확보를 통한 *H. pylori* 백신 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대 되어진다 [7, 15]. 또한, 개발된 시스템을 통하여 고병원성 균주에 관여하는 병독인자를 알아내고 알아낸 인자를 표적으로 하는 약제개발과 그를 통한 효과적인 질병발현 전 치료를 얻어낼 수 있을 것으로 기대되어지며, *H. pylori* 감염증의 역학연구에 있어서도 기존의 역학(epidemiology) 자료와 차별화된 병독인자를 포함한 고병원성 *H. pylori* 감염증의 역학 자료를 산출해 낼 수 있을 것으로 기대하고 있다 [12, 15]. 또한 궁극적으로는 *H. pylori*에 대하여 강력한 체액성 면역과 세포성 면역반응을 유도할 있는 백신이 개발되어야 할 것이다. 성공적인 백신 개발이 이루어진다면 Class I carcinogen으로 분류되는 *H. pylori* 감염의 차단으로 위암을 예방할 수 있는 획기적인 성과를 얻어낼 수 있을 것으로 예상되고 있다 [10, 15]. 암은 1983년 한국인의 사망 원인 1위에 처음 오른 이후 사망률과 발생률 모두 매년 증가하고 있으며, 2002년 중앙암등록통계에 따르면 한국인 전체 암발생 중 위암은 그 발생율이 성인 남성의 1위(24%), 여성의 2위(15.3%)를 차지하는 주요 암으로 분류되고 있다. 한국인의 연간 위암 발생율은 10만 명당 남성 57.9와 여성 25.1로 보고되고 있다 [1, 2, 12]. 한국인의 위암 발생율이 다른 나라 사람들에 비하여 매우 높은 발생율을 보이고 있으며, *H. pylori*에 감염을 또한 매우 높은 국가로 분류되고 있다 [1]. 암에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 효과적인 치료법은 현재까지도 확보되어있지 않은 실정을 감안한다면 *H. pylori* 백신을 통한 cancer prevention은 획기적인 전기를 마련하는 계기가 될 것이다. 그러나 현재까지 유전공학 기술을 이용한 백신이 활발히 연구되고 있으나 상품화된 백신은 없는 실정이다 [7, 15]. 안정적이고 신뢰할 수 있는 *H. pylori* 감염 동물모델의 확립은 개발 중인 백신 후보들의 효력검사 및 *H. pylori* 병리기전 연구에 필수적이다. 또한, *H. pylori* eradication을 위한 치료약제는 metronidazole과 같이 다른 대부분의 세균들에 사용하는

약물과 차이가 많기 때문에 동물실험을 이용한 치료약물 후보물질의 *in vivo* 효력검사는 약물 개발과정의 매우 중요한 단계이며, 신뢰할 수 있는 동물모델의 개발 및 사용은 성공적인 약물개발을 위한 관건이다 [8, 15]. 본 연구자들은 에탄올에 의한 위점막 손상이 *H. pylori* 감염에 미치는 영향을 알아보고 그 결과를 이용하여 안정적인 동물모델을 개발하고자 하였다. 알콜과 *H. pylori* 감염의 관계에 대한 연구결과들은 현재 불일치되는 보고들이 나오고 있어 보다 많은 연구가 필요한 실정이다. 본 연구 결과를 통하여 에탄올 투여 후 오랜 시간 동안 위 내강에 에탄올이 잔류되어 있다는 것을 알았다. 본 연구에서 ethanol-pretreating에 의한 *H. pylori* 감염의 영향을 알아보기 위한 실험은 투여된 에탄올이 모두 흡수된 것으로 확인된 3시간 후로 정하였다. 또한 20% 에탄올은 위점막 변화 유발 작용이 낮은 것으로 판명되었기 때문에 ethanol-pretreating 모델에서 배제하였다. 위 내강에 잔류된 에탄올의 존재는 유입된 *H. pylori* 세균을 죽이는 항균작용으로 작용할 가능성이 있다. 따라서 위 내강에 에탄올 잔류가 없는 시기에 *H. pylori* 감염을 유발하는 것은 매우 중요하며, 에탄올 투여 후 3시간에 *H. pylori* 감염을 유발 하는 protocol을 확립하였다. 위 내강에 잔류된 에탄올의 존재는 유입된 *H. pylori* 세균을 죽이는 항균작용으로 가능성이 있다. 알콜과 *H. pylori*에 관한 불일치한 연구 결과들 [3, 21]은 이러한 이유에 기인할 수도 있을 것으로 생각되었다. 따라서 위 내강에 에탄올 잔류가 없는 시기에 *H. pylori* 감염을 유발하는 것이 매우 중요하다는 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 에탄올 투여 후 3시간에 *H. pylori* 감염을 유발 하는 protocol을 확립하였다. 본 연구에서는 에탄올 투여 후 흡수되어 잔류되지 않을 충분한 시간을 확인하고 *H. pylori* 세균을 감염시켰기 때문에 잔류 에탄올에 의하여 투여된 *H. pylori*가 영향을 받지 않았을 것으로 판단되었다. 연구결과 100% ethanol-pretreating model은 60% 및 40% ethanol-pretreating model 보다 병변의 정도가 낮았으며, 조직에서 관찰되는 균의 수도 적어 위점막에 colonization된 *H. pylori* 수도 적을 것으로 추정되었다. 이러한 원인은 고농도 ethanol-pretreating에 의한 AGML의 유발로 대다수의 위점막 상피세포들이 괴사되거나 탈락되어 *H. pylori* 세균의 정착에 부정적인 효과로 작용하였을 것으로 추론되어진다. 본 연구의 결과 60% 및 40% 에탄올로 손상이 유도된 위점막은 이후 감염되는 *H. pylori*의 병원성을 증폭시키고 위점막에 colonization이 잘 이루어지도록 만드는 것으로 판단되었다. 병리조직검사 및 신속요소분해효소검사를 통하여 평가하였을 때 60% 에탄올 투여 후 3시간에 *H. pylori*를 감염시키는 것이 가장 효과적인 동물모델로 생각되었

다. 신속요소분해효소검사는 위점막에 *H. pylori*가 존재하는 경우에 검사시약의 배지에서 균이 증식하면서 요소분해효소를 분비하게 되어 검사시약에 존재하는 요소를 가수분해 시키며 암모니아를 생성하여 시약의 전체 pH가 상승하게 되고 검사시약에 포함되어있는 pH 지시약이 발색하여 적색으로 색깔의 변화가 일어나 손쉽게 결과를 판정할 수 있었다. 신속요소분해효소검사가 검사에 제출된 위점막 *H. pylori*의 존재유무를 판정하는 정성적(qualitative) 자료만 제공하고 정확한 정량적(quantitative)인 정보를 제공하는 목적으로 고안되지는 않았지만, *H. pylori*의 세균 수가 많으면 배양 시 보다 많은 요소분해효소가 배출되기 때문에 검사 시약의 기질을 보다 짧은 시간에 분해하여 강한 적색의 발색 반응을 보이기 때문에 발색 시간의 차이, 발색 정도의 차이로 간접적인 세균의 수 차이를 비교할 수 있었다. 에탄올 투여에 의한 위점막 손상이 어떤 기전에 의하여 *H. pylori*의 감염에 유리한 환경을 만드는지에 대하여는 알려진 바가 없어 이에 대한 연구들이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구 결과로는 에탄올 투여에 의한 위점막 손상 후 *H. pylori* 감염에 의하여 유도되는 병변의 정도의 차이는 60% 에탄올, 40% 에탄올, 100% 에탄올 순으로 가장 큰 차이를 보여주는 에탄올 모델로는 60% 에탄올을 적용하는 것임을 알 수 있었다. 투여 후 급성으로 가장 큰 위점막 손상을 유발하는 것은 농도가 가장 높은 100% 에탄올인데 급성 손상의 정도가 크다고 *H. pylori* 감염에 유리하지는 않다는 것을 본 연구를 통하여 밝힐 수 있었다. 매우 심한 AGML의 경우에 많은 수의 위점막 상피세포가 소실되어 위내 *H. pylori* colonization이 어려운 위내 환경이 조성되는 것으로 추정되며, 보다 정확한 기전에 대한 연구가 필요하다. 이러한 결과들을 바탕으로 5주령의 mongolian gerbil에 60% 에탄올 적용 후 3시간에 뒤에 *H. pylori* 균주들을 감염시키는 ethanol-pretreating animal model을 확립할 수 있었다. 본 연구의 결과들로부터 확립된 ethanol-pretreating animal model은 동물실험을 위해 주로 사용되는 *H. pylori* 단독 감염 모델 보다 안정적으로 *H. pylori* 감염이 유도될 수 있으며, 위점막층에 colonization도 보다 높게 유도될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 보다 짧은 시간에 *H. pylori* 단독 감염 모델 보다 위점막에 병변이 유도되기 때문에 ethanol-pretreating animal model은 *H. pylori* 균주들의 병원성 비교에 매우 유용한 *in vivo* 시스템으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다. 향후, 본 연구를 통하여 개발된 mongolian gerbil을 이용한 ethanol-pretreating animal model을 이용하여 여러 *H. pylori* 임상 분리 균주들의 병원성 차이를 비교하고, 그 결과 분류된 저병원성 균주와 고병원성 균주와의 분자생물학적 차이를 분석할 예정이다.

## 결론

본 연구의 결과 에탄올로 손상된 위점막은 이 후 감염되는 *H. pylori*의 병원성을 증폭시키는 것으로 판단되었다. 에탄올 투여에 의한 위점막 손상 후 *H. pylori* 감염에 의하여 유도되는 병변의 정도의 차이는 60% 에탄올, 40% 에탄올, 100% 에탄올 순으로 가장 큰 차이를 보여주는 에탄올 모델로는 60% 에탄올을 적용하는 것임을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 5주령의 mongolian gerbil에 60% 에탄올 적용 후 3시간에 뒤에 *H. pylori* 균주들을 감염시키는 ethanol-pretreating animal model을 확립할 수 있었다. 본 연구의 결과들로부터 확립된 ethanol-pretreating animal model은 동물실험을 위해 주로 사용되는 *H. pylori* 단독 감염 모델 보다 안정적으로 *H. pylori* 감염이 유도될 수 있으며, 위점막층에 colonization도 보다 높게 유도될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 보다 짧은 시간에 *H. pylori* 단독 감염 모델 보다 위점막에 병변이 유도되기 때문에 ethanol-pretreating animal model은 *H. pylori* 균주들의 병원성 비교에 매우 유용한 *in vivo* 시스템으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2005-003-E00262)으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Ahn YO, Park BJ, Yoo KY, Kim NK, Heo DS, Lee JK, Ahn HS, Kang DH, Kim H, Lee MS, Park TS. Incidence estimation of stomach cancer among Koreans. J Korean Med Sci 1991, 6, 7-14.
2. Baik SC, Kim JB, Cho MJ, Kim YC, Park CK, Ryou HH, Choi HJ, Rhee KH. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among normal Korean adults. J Korean Soc Microbiol 1990, 25, 455-462.
3. Battaglia G, Di Mario F, Pasini M. *Helicobacter pylori* infection, cigarette smoking and alcohol consumption. A histological and clinical study on 286 subjects. Ital J Gastroenterol 1993, 25, 419-424.
4. Blaser MJ. Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. Gastroenterol 1987, 93, 371-383.
5. Cheng EH, Bermanski P, Silvermith M, Valenstein



- P, Kawanishi H.** Prevalence of *Campylobacter pylori* in esophagitis, gastritis, and duodenal disease. Arch Intern Med 1989, **149**, 1373-1375.
6. **Correa P.** Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 1992, **52**, 6735-6740.
  7. **Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R.** The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. Annu Rev Immunol 2001, **19**, 523-563.
  8. **Hahm KB, Lee KM, Kim YB, Han SU, Kim MW.** Animal models of *Helicobacter pylori* infection. Korean J Gastroenterol 2001, **37**, 399-405.
  9. **Hirayama F, Takagi S, Yokiyama Y, Iwao E, Ikeda Y.** Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. J Gastroenterol 1996, **31**, 24-28.
  10. **International Agency for Research on Cancer.** Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994, **61**, 188.
  11. **Kang JY, Teng CH, Wee A, Chen FC.** Effect of capsaicin and chilli on ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat. Gut 1995, **36**, 664-669.
  12. **Kim JM.** Current researches on the virulence factors of *Helicobacter pylori*. Korean J Gastroenterol 2003, **41**, 77-86.
  13. **Lee SH, Lim CY, Lee KH, Yeo SJ, Kim BJ, Kim SJ, Cho MJ, Rhee KH, Kook YH.** rpoB Gene analysis of *Helicobacter pylori*. J Korean Soc Microbiol 1999, **34**, 401-408.
  14. **Marshall BJ, Warren JR.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. Lancet 1984, **1**, 1311-1315.
  15. **Marshall BJ.** The future of *Helicobacter pylori* eradication: a personal perspective. Aliment Pharmacol Ther Suppl 1997, **1**, 109-115.
  16. **Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T.** Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of tpenone and cimetidine. Jpn J Pharmacol 1991, **57**, 495-505.
  17. **Newell DG.** Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol Suppl 1991, **187**, 31-38.
  18. **Ohkusa T, Okayasu I, Miwa H, Ohtaka K, Endo S, Sato N.** *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. Gut 2003, **52**, 797-803.
  19. **Ramirez RO, Roa CC Jr.** The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini Skeels*) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. Clin Hemorheol Micro-circ 2003, **29**, 253-261.
  20. **Stolte M.** *Helicobacter pylori* gastritis and MALT-lymphoma. Lancet 1992, **339**, 745-746.
  21. **Sugiyama A, Ikeno T, Ishida K, Maruta F, Murakami M, Sato T, Saito H, Ishizone S, Kawasaki S, Ota H, Katsuyama T.** Paradoxial role of *Helicobacter pylori* infection: protective effect against ethanol-induced gastric mucosal injury in Mongolian gerbils. Dig Dis Sci 2001, **46**, 2433-2449.