

## *Helicobacter pylori*로부터 유래된 항원의 anti-*H. pylori* 항체에 관한 연구

박창호\* · 배만종<sup>1</sup>

대구바이오산업지원센터, <sup>1</sup>한양대학교 한방바이오식품과학과

Received January 31, 2008 / Accepted February 15, 2008

**Study on Anti-*Helicobacter pylori* Antibody of Sparated Antigen from *H. pylori*.** Chang-Ho Park\* and Man-Jong Bae<sup>1</sup>. Daegu Bio Industry Center, Daegu 704-801, Korea, <sup>1</sup>Department of Oriental Medicine Biofood Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea - This study has been carried out to secretion antibodies for the purpose of preventing the infection of *Helicobacter pylori* and using them as a supplement for treatment. This experiments have been separated antigens from *H. pylori* and observed into antibody production and the agglutination of *H. pylori* for the separated antigens. As major antigenic proteins separated from *H. pylori*, the following could be verified: 12 kinds of band for whole cell (WC), seven kinds of band for outer membrane protein (OMP), three kinds of band for crude urease, and one kind of band for lipopolysaccharide (LPS). The IgG anti-*H. pylori* antibody of separated antigens showed 77.9±6.4 µg/ml for WC (L), 84.9±6.4 µg/ml for OMP, and 123.8±2.9 µg/ml for crude urease, at the same antigen concentration of 20 µg/100 ull, which showed the most at the crude urease. And it turned out that the IgA antibodies were generated with 2.5±0.32 µg/ml for WC (L), 2.0±0.43 µg/ml for OMP, and 1.3±0.25 µg/ml for crude urease, which demonstrated the most for WC (L) antigens. As a result of verifying the immunogenicity of antigenic protein through the Western blotting, major antigenic substances could be confirmed as follows: 10 kinds for WC, six kinds for OMP and three kinds for crude urease. The agglutination values on the *H. pylori* of the antibody were 2<sup>5</sup>, 2<sup>5</sup>, 2<sup>6</sup> and 2<sup>7</sup> at the antigen serums of anti-WC (H), anti-WC (L), anti-OMP and anti-crude urease, respectively, which indicated the highest for the antigen serum of anti-crude urease. The urease activation-inhibiting absorbance of antigen serum created by each antigen was 0.14±0.01 for WC (H), 0.16±0.01 for WC (L), 0.18±0.03 for OMP, and 0.18±0.04 for urease, demonstrating a significant inhibiting effect, compared with 0.26±0.02 of the control group.

**Key words :** *Helicobacter pylori*, anti-*H. pylori* antibody, whole cell, outer membrane protein, lipopolysaccharide, urease

### 서 론

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)는 우측 나선형 몸통과 4~8개의 유초성 편모(flagella)를 가진 그람 음성 단균으로서 [4] 위 점막세포 사이사이에서 urease를 분비하면서 서식[16]하고 있다. 1983년 오스트레일리아의 Marshall과 Warren에 [27] 의해 최초로 활동성 위염환자에서 분리 동정된 이후 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 위 림프종 및 위암을 일으키는 것으로 밝혀졌고, 1994년 International Agency for Research on Cancer (IARC)에서 *H. pylori*가 확실한 발암물질로 발표 [12]되었다. 이처럼 *H. pylori* 감염은 상부 위장관 질환의 중요한 원인 인자로 인식되고 있는데 선진국에서는 감염률이 낮은 반면 개발도상국이나 후진국에서는 높은 감염률을 보이고 지역적 또는 인종간의 큰 차이를 보여 경제 수준이나 위생 및 환경 상태에 의하여 좌우되는 것으로 알려져 있다.

*H. pylori*가 비침습성 세균임에도 불구하고 위 점막에 염

증반응을 일으키는 직접적 기전은 *H. pylori*에서 분비되는 여러 세포독성인자가 위 상피세포에 손상을 주는 것과 urease에 의하여 생성된 암모니아가 위 점막 손상을 일으키는 것 [23], *H. pylori*로부터 호중구를 끌어들이 수 있는 화학구성 인자가 점막 내로 흡수되어 혈액 내 호중구의 점막침윤을 유도하는 것[14] 등이다. 간접적 기전으로는 위 상피세포에서 IL-8 등의 chemokine의 분비가 증가되어 염증세포가 침윤하는 경우도[26] 있다. 한편 *H. pylori*의 병원성에 대한 연구가 진행됨에 따라 균주의 다양성이 밝혀지고 있으며, 현재 CagA (cytotoxin-associated protein, 110~128 kDa protein) 및 VacA (vacuolating cytotoxin, 87 kDa protein)는 일부 균주에서만 발견되지만 *H. pylori*에 의한 임상적 질환에 관여하는 병원인자로 보고되고[1] 있다.

본 연구에서는 *H. pylori*의 감염을 예방하기 위한 수단으로 동물을 통한 피동면역용 항체생산과 더불어 면역기법에 응용할 동물용 백신개발에 기초자료로 확인하고자 하였다. 그 방법으로 *H. pylori*로부터 항원을 분리하고, 분리된 항원으로부터의 항체생산 및 *H. pylori*에 대한 응집활성을 알아보 고자 하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-602-1827, Fax : +82-53-602-1898

E-mail : 9224017@daum.net

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 *H. pylori*는 한국유전자은행(KCTC 12083)에서 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. 배지에 사용된 항생제는 *H. pylori* selective supplement (Oxoid, SR0147E, England), 그람염색에 사용된 시약은 crystal violet (Becton Dickinson, USA), carbol fuchsin (Becton Dickinson, USA)를 구입하였다.

*H. pylori*의 outer membrane protein (OMP) 분리에는 sodium laurylsarcosine (Sigma L9150, USA), lipopolysaccharide (LPS) 분리는 LPS extraction kit (Intron biotechnology, Korea), 분리된 항원의 농도측정은 단백질정량 Kit (Sigma 690-A), 분자량 측정 maker는 SeeBlue® Plus2 Pre-stained standard (Invitrogen, LC5925, USA)를 구입하여 사용하였다.

항체 생산에 이용된 adjuvant는 Freund's complete adjuvant (FCA, Sigma F-5506), Freund's incomplete adjuvant (FIA, Sigma F-5881)를 사용하였으며, 항체분석을 위하여 2차 항체는 anti-mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate (Sigma A2418)와 anti-mouse IgA (whole molecule), alkaline phosphatase conjugate (Sigma A4937)를 이용하였고, 항체함량 측정을 위한 표준품으로 mouse IgG (Sigma I5381)를 사용하였다. 발색 기질용액은 10% diethanolamine buffer, 1% phosphatase substrate (Sigma N2765)를 이용하였고, Western blotting에 사용된 시약은 NC membrane (Nitrocellulose, Gelman Sciences Co., USA)과 Lumi-Phos WB (PIERCE 34150, USA) substrate를 사용하였다. 기타 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급으로 사용하였다.

### *H. pylori* 배양 및 균주확인

한국유전자은행으로부터 분양받은 *H. pylori*는 37°C, CO<sub>2</sub> 농도 10% 환경에서 5% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (*H. pylori* selective supplement)가 포함된 Brucella agar plate에서 2~3일 간격으로 계대배양 하였다. 계대배양으로 활성화된 균주는 Brucella broth에서 48~72시간동안 액체배양[12,24] 하였다. 균주확인을 위한 Gram 염색법은 4단계 순서로 진행되는데 우선 crystal violet으로 1분간 염색한 후 gram iodine으로 1분간 염색한다. Ethanol에 1분간 세척한 후 carbol fuchsin으로 10분간 염색한다[14]. 모든 과정이 끝난 후 건조하여 광학 현미경(×1,000)으로 morphology를 관찰하여 균주 및 오염상태를 확인하였다. Urease 활성검사는 urea broth (pH 6.8, Yeast extract 0.1 mg/ml, monopotassium phosphate 9.1 mg/ml, dipotassium phosphate 9.5 mg/ml, urea 20 mg/ml, phenol red 0.01 mg/ml)를 1 ml씩 Eppendorf-tube에 분주하여 냉장 보관하였고, tube에 *H. pylori*를 접종시켜 색이 붉게 변화는 것으로 균주를 확인하였다.

### Whole cell 항원분리

Whole cell (WC) 항원은 먼저 액체 배양된 균주를 4°C, 4,000× g로 30분간 원심분리 하여 회수한다. 회수된 균주는 10 mM Tris HCl (pH 8.5)-2 mM EDTA로 4°C, 4,000× g로 30분간 원심분리 하여 1회 세척 후 멸균된 증류수에 현탁시킨다. 세척된 균은 얼음물에서 30초간 4회 sonicate (pulse 20, duty cycle 50)한 다음 syringe filter (0.45 μm)로 여과하였다. 여과된 WC의 농도는 Lowry법을 이용한 단백질정량 kit로 측정하여 사용 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다[3].

### Outer membrane protein 항원분리

액체 배양된 균주를 10 mM Tris HCl (pH 8.5) - 2 mM EDTA로 4°C, 4,000× g로 30분간 원심분리로 1회 세척한 후 차가운 증류수에 현탁하였다. 강하게 vortex (2,500 rpm, 1 min)한 후 원심분리(25,000× g, 15 min, 4°C)된 침전물을 얼음물에서 30초간 4회 sonicate (pulse 20, duty cycle 50)한다. 파쇄된 균은 4°C, 10,000× g로 10분 동안 원심분리 한 다음 상층액을 4°C, 100,000× g로 1시간동안 원심분리한다. 침전물을 1%(w/v) sodium laurylsarcosine이 함유된 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 현탁시킨 후 4°C, 10,000× g로 10분 동안 원심분리하는 과정을 1회 반복한다. 최종 침전물은 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 현탁시키고 syringe filter (0.45 μm)로 여과한다. 여과된 OMP 항원은 sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 12%)로 분자량을 확인하였고, 농도는 Lowry법을 이용한 단백질정량 kit로 정량하여 사용 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다[8,19].

### Crude urease 항원분리

액체 배양된 균주를 10 mM Tris HCl (pH 8.5)-2 mM EDTA로 4°C, 4,000× g로 30분간 원심분리로 1회 세척한 후 차가운 증류수에 현탁하였다. 강하게 vortex (2,500 rpm, 1 min)한 후 원심분리(25,000× g, 15 min, 4°C)된 상층액을 crude urease 항원으로 사용하였다[8,20]. 분리된 crude urease는 SDS-PAGE (12%)로 분자량을 확인하였고, 항원 농도는 Lowry법을 이용한 단백질정량 kit로 정량하여 사용 전까지 -70°C에 냉동보관 하였다[13].

### Lipopolysaccharide 항원분리

LPS는 그람음성 균의 외막에 존재하는 성분이다. 일반적인 추출법으로는 오랜 시간이 걸리고 복잡한 방법의 hot phenol-water extraction법[1]이 이용되고 있다. 본 실험에서는 *H. pylori*의 LPS 추출을 위하여 LPS extraction kit를 이용하였다. 분리된 LPS는 SDS-PAGE (12%) 은염색법[6]으로 분자량을 확인하였다.

**SDS-PAGE**

*H. pylori*로부터 분리된 항원의 분자량은 SDS-PAGE로 측정하였다. 0.5 M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide를 함유한 4.0%(v/v) 농축겔(stack gel)을 사용하고, 분리겔(separating gel)은 1.5 M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide을 함유한 12%(v/v) 겔을 사용하였다. 분리된 항원단백질은 50 µg/µl (DW)를 sample buffer로 1:4 비율로 희석하여 각 well에 20 µl씩 loading하였다. Marker는 SeeBlue® Plus2 Pre-stained standard를 5 µl씩 loading하였다. 전기영동 후 은염색법으로 단백질 band를 확인하였다[11].

**실험동물**

실험동물은 효창사이언스(주)(대구, 한국)에서 BABL/c 수컷 6주령 18-20 g을 구입하여 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였으며, 5마리씩 배치하여 사육하였다. 사육실은 실험동물 환경조건인 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10~12회/hr, 명암주기 12시간으로 유지하였다. 순화시기 및 시험기간 중 실험동물은 고형사료(퓨리나코리아(주))와 음수를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

**면역**

실험동물은 각 군당 5마리씩 나누어 Table 1과 같이 나누어 면역하였고, 면역횟수는 2주 간격으로 총 3회 실시하였다. 1차 면역은 각 항원 단백질(20 µg/100 µl)을 Freund's complete adjuvant 100 µl 와 1:1 비율로 emulsion하여 등 쪽 피하에 200 µl씩 투여하였다[10,18]. 2, 3차 면역은 1차 면역 후 2주 간격으로 각 단백질 항원과 Freund's incomplete adjuvant를 동량 같은 방법으로 투여하였다.

**항체역가 측정(ELISA)**

효소와 결합시킨 항체를 이용하여 항원과 항체를 정성 또는 정량하는 방법으로 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용하여 *H. pylori*로부터 분

리된 각종 항원에 대한 mouse 혈청의 항체활성을 측정하였다. 최종면역 후 1주 지난 mouse를 CO<sub>2</sub> 가스로 마취하여 채혈한 혈액을 실온에서 3시간 응고시킨 다음 원심분리 하여 항혈청을 얻었다. 분리된 항혈청은 -70°C에 보관 후 항체역가 분석에 이용하였다[21]. WC 항원을 immunoglobulin 96 well plate에 단백질 농도 200 µg/100 µl씩 coating하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 항원 coating시 mouse IgG를 standard로 coating하였다. 각 well을 washing buffer (10 mM PBS pH 7.4, 0.5% Tween 20)로 3회 세척 후 blocking액(PBS pH 7.4, 5% skim milk)을 150 µl넣고 실온에서 30분 이상 방치 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 항원에 의해 생산된 혈청항체를 washing buffer에 단계별로 희석한 다음 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에 2시간 방치 후 세척하였다. Alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG (whole molecule)와 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgA (whole molecule)를 2차 항체로 각각 1:15,000과 1:30,000으로 희석하여 100 µl씩 분주하고 실온에 1시간동안 방치하였다. 3회 세척 후 기질용액(10% diethanolamine buffer, 1% phosphatase substrate)을 100 µl씩 넣은 후 30분 반응 후 3 N-NaOH 50 µl을 가하여 반응을 정지시켰다. 반응정지 후 ELISA reader로 405 nm 파장에서 IgG와 IgA항체의 역가를 측정하였다[29].

**항원성 측정(Western blotting)**

*H. pylori* 항원에 의해 생성된 anti-*H. pylori* 항체가 항원에 특이적으로 반응하는지를 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. *H. pylori* whole cell을 sonicator로 파쇄하여 원심분리(4,000 rpm, 5 min, 4°C)한 상등액을 sample buffer와 1:4 비율로 희석하여 각 well에 20 µl씩 loading후 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나면 Fig. 4와 같이 NC membrane에 transfer하여 Western blotting하였다. 1차 항체는 mouse 항혈청을 항원에 결합시키고, 2차 항체는 anti-mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate를 1:40,000 비율로 희석하여 반응시켰다. Alkaline phosphatase 검출용 화학발광 기질인 Lumi-Phos WB substrate를 사용하여 3분 반응시켜 X-ray 필름상에 감광시켜 항원물질을 확인하였다[8].

**Anti-*H. pylori* 항체에 의한 *H. pylori*균 응집반응**

*H. pylori*를 PBS buffer (pH 7.4)에 현탁시켜 OD=1.0 (405 nm)으로 조절하여 well당 100 µl씩 coating 후 2시간동안 실온에 incubation하였다. Anti-*H. pylori* 항혈청(antiserum)을 생리식염수로 공비 2배로 10단계 희석하여 각 well당 100 µl씩 분주하고 2시간 동안 incubation 후 응집정도를 ×400배 광학현미경으로 관찰하였다[14].

Table 1. Experimental design and number of mice per group

Group <sup>a</sup>	No. of mice	Immunity period (weeks)		
		0	2	4
Normal	5	saline	saline	saline
Control	5	saline+FCA <sup>b</sup>	saline+FIA <sup>c</sup>	saline+FIA
WC (H)	5	WC (H)+FCA	WC (H)+FIA	WC (H)+FIA
WC (L)	5	WC (L)+FCA	WC (L)+FIA	WC (L)+FIA
Urease	5	Urease+FCA	Urease+FIA	Urease+FIA
OMP	5	OMP+FCA	OMP+FIA	OMP+FIA

<sup>a</sup>Mice were divided into six experimental groups: WC (H), whole cell high dose (60 µg/100 µl); WC (L), whole cell low dose (20 µg/100 µl); Urease, 20 µg/100 µl; OMP, 20 µg/100 µl.

<sup>b</sup>FCA: Freund's complete adjuvant.

<sup>c</sup>FIA: Freund's incomplete adjuvant.

**Anti-*H. pylori* 항체에 의한 urease 활성억제 효과검색**

*H. pylori* 각 항원에 의해 생성된 항혈청으로 *H. pylori*의 urease활성 억제능을 측정하였다. Urease 활성억제능은 *H. pylori* 현탁액[OD=1.0 (405 nm), saline] 50 µl에 2<sup>6</sup>배 희석된 각각의 항혈청 50 µl와 2시간 동안 반응 후 urea broth (Yeast extract 0.1 mg/ml, monopotassium phosphate 9.1 mg/ml, dipotassium phosphate 9.5 mg/ml, urea 20 mg/ml, phenol red 0.01 mg/ml) 100 µl가 들어있는 immunoglobulin 96 well plate에 놓고 30분경과 후 urea의 분해에 따른 phenol red의 color intensity의 변화를 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 측정하였다[14].

**통계학적 분석**

본 실험에서 얻은 측정치에 대한 통계처리는 SPSS (SPSS 12.0KO for Windows)를 이용하여 평균치와 표준편차를 구하였고, 유의성검증은 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의수준 p<0.05일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**Whole cell 분리**

세균항원은 일반적으로 항혈청 제조와 분석을 위하여 일반적으로 두 가지 형태가 사용되어 왔다. 한 가지 형태는 정제된 항원과 세균세포(bacterial cell), 편모(flagellum) 또는 캡막(capsule) 으로부터 분리된 것이 있고, 또 다른 형태는 일반적으로 열, formalin, acetone 또는 alcohol로 사멸된 whole cell이 있다[7].

본 연구에서는 *H. pylori*를 처리하여 나타나는 균체 단백질의 종류를 알아보고 그 중 면역원성(immunogen)을 나타내는 항원성 단백질을 알아보고자 하였다. *H. pylori*의 WC 단백질은 SDS-PAGE로 분자량을 측정된 결과 12종류의 주요단백질 band를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

**Crude outer membrane protein 분리**

세균의 OMP는 백신항원으로 많이 개발하여 사용되어 왔으며[13,19], *H. pylori*로부터 분리된 OMP는 분자량이 다른 7종류의 주요 단백질로 분리되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

**Crude urease 분리**

Urease는 짧은 chain의 urease A와 긴 chain의 urease B로 두 가지의 subunit 구조로 구성되어 있으며[25], 활성 urease 효소를 생산하기 위해서는 적어도 5개의 추가 단백질을 더 필요로 하는 것으로 알려져 있다. 또한 면역학적 연구에서 urease에서 정제된 urease B는 높은 면역원(immunogenic)이

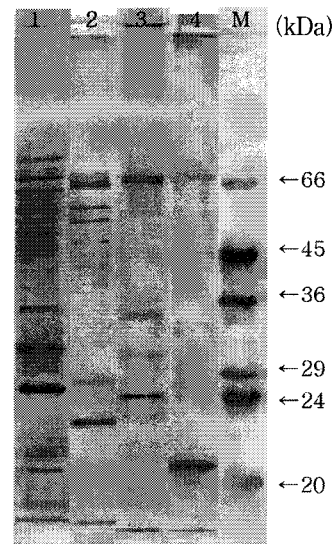


Fig. 1. Silver-stained gel after SDS-PAGE patterns of the several antigens which separated from the *H. pylori*. Lane 1, separated WC; Lane 2, separated OMP; Lane 3, separated crude urease; Lane 4, separated LPS; Lane M, makers.

되는 것으로 보고되고 있다[18,19].

*H. pylori*로부터 분리정제된 urease에서도 분자량이 32 kDa인 urease A와 62 kDa인 urease B 두 가지 subunit로 나누어지는 것으로 보고되고[13] 있으며, 본 실험방법에 의해 분리된 crude urease는 25, 36, 64 kDa의 분자량을 갖는 3종류의 단백질 band를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

**Lipopolysaccharide 분리**

LPS는 그람음성균의 외막에 존재하는 성분으로써 체내에 들어오면 혈압을 저하시키며, 발열, 호중구 감소증, 혈액 응고, 쇼크 등의 endotoxin으로 작용할 수 있다. 또한 LPS에 의하여 대식세포가 IL-1과 TNF를 분비하거나, LPS가 보체의 대체경로를 활성화 시키거나, B 임파구를 형질세포로 분화시키는 작용을 한다[25].

*Pasteurella haemolytica*에서 분리된 LPS는 20~24 kDa 정도에 위치하는 것으로 보고되고[25], 본 실험에서 *H. pylori*로부터 분리된 LPS는 20 kDa 부위에 한 종류의 band가 형성되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

**IgG 항체생성**

IgG는 감마(γ) 사슬을 가진 immunoglobulin으로 포유동물의 3/4를 차지하여 가장 많은 양을 차지한다[26] 항체의 작용 중에서 독성물질이나 바이러스에 결합하여 그것을 무해화하는 작용 및 백혈구의 식살균 작용의 보조기능을 하는 중화항체, 음식항체 대부분은 IgG에 속한다[25]. *H. pylori*로부터 분리된 각항원에 대한 IgG항체 함량을 측정된 결과

Fig. 2와 같이 나타났다. 항원의 종류에 따라 생성된 IgG항체 생성량은 WC (H) 113.5±0.4 µg/ml, WC (L) 77.9±6.4 µg/ml, OMP 84.9±6.4 µg/ml, Urease 123.8±2.9 µg/ml로 나타났으며, 동일 항원농도에서의 IgG항체 생성은 urease 항원이 123.8±2.9 µg/ml으로 가장 많은 양을 생산하였다.

항원 투여농도가 60 µg/100 µl인 WC (H)와 20 µg/100 µl인 WC (L)에서의 IgG항체 생성량이 각각 113.5±0.4 µg/ml, 77.9±6.4 µg/ml로 나타났다. 따라서 같은 항원에서 3배의 농도인 WC (H)가 WC (L)에 비해 항체생성량에 있어서는 항원 농도에 비례하여 생성되지 않는 것으로 나타났다. 이에 반하여 urease 항원은 동일한 농도의 다른 항원들보다 가장 많은 IgG항체를 생성하였고, 항원농도가 3배인 WC (H)항원의 항체생성량과 비교할 때 유의적인 차이는 없었으나 많은 항체를 생산하는 것으로 조사되었다.

따라서 각 항원에 대한 IgG항체 생성측면에서 urease 항원이 123.8±2.9 µg/ml로 가장 많은 항체를 생산하는 것으로 볼 때 면역원성이 가장 큰 것으로 사료된다.

**IgA 항체생성**

IgA 항체는 소화기관 혹은 장관, 호흡기, 생식관 등의 상피에서 분비되어 세균, 바이러스 및 기타 병원체의 부착을 방지하는데 큰 역할을 한다. IgA의 주합성 장소와 작용 부위는 신체의 점막이며, IgA를 분비하는 형질세포는 주로 상피의 기저막 아래에 있는 고유판(Lamina propria)이라 부르는 결합조직에 주로 분포하고 있다. IgG가 신체내의 세포의 방어인 반면에 IgA의 주 기능은 상피세포로 침입하는 감염원을 방어하는 것이다. IgA 항체는 세균 또는 독소가 상피세포에 부착하는 것을 방지하여 다양한 병원체에 대한 일차방어 작용을 나타낸다[20].

위염환자에서 위조직의 세균 감염으로 IgA가 코팅되며,

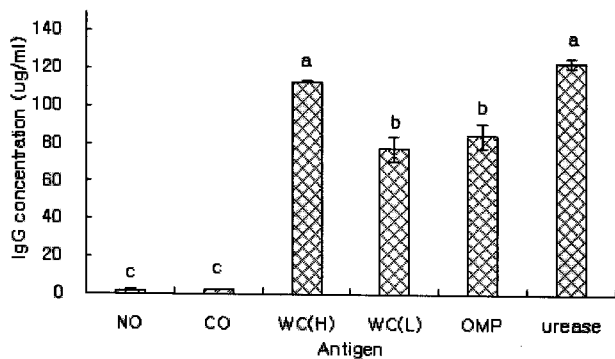


Fig. 2. Changes of IgG levels in mice serum during the immunization period. Antigens were divided into six experimental groups : NO, normal; CO, control; WC (H), whole cell high dose (60 µg/100 µl) antigens; WC (L), whole cell low dose (20 µg/100 µl) antigens; OMP antigens, 20 µg/100 µl; Urease antigens, 20 µg/100 µl.

그 다음으로 위염이 활발해진 감염환자에서 IgG와 IgM이 코팅되는 것으로 보고되고 있다. 그러한 각각의 항체반응으로 감염을 치료할 수는 없지만<sup>84)</sup>, *H. pylori* 분리된 urease A와 B로 면역된 mouse혈청이 면역되지 않은 mouse에 비해 10배 이상의 IgA 항체반응을 나타내는 것으로 보고되고 있다[28]. 또한 *Salmonella* vaccine에 의한 urease A와 B는 체액성과 점막성 면역반응을 유발하고, 동시에 *H. pylori* 감염에 대한 방어 효과도 있는 것으로 나타나있다[20].

따라서 본 실험에서는 *H. pylori*로부터 분리된 각 항원에 대한 IgA항체 함량을 측정된 결과 다음과 같다. 생성된 IgA 함량은 같은 항원농도 20 µg/100 µl에서 WC (L) 2.5±0.32 µg/ml, OMP 2.0±0.43 µg/ml, Urease 1.3±0.25 µg/ml로 IgA 항체 생성은 WC (L) 항원이 가장 많은 것으로 조사되었다. 항원농도 60 µg/100 µl인 WC (H)와 20 µg/100 µl인 WC (L)의 IgA 항체 생산에 있어서는 각각 2.5±0.18 µg/ml과 2.5±0.32 µg/ml로 나타났으며, 항원 농도에 따른 IgA 항체에는 차이를 나타내지 않았다. 상대적으로 crude urease 항원이 1.3±0.25 µg/ml으로 가장 적은 IgA 항체 생성량을 나타내었다(Fig. 3).

**면역원성 확인**

항원인 *H. pylori*의 WC, OMP, crude urease를 SDS-PAGE로 분자량 측정결과 각각 12개, 7개, 3개의 주요 단백질 band를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 각 항원단백질에 대한 면역원성을 알아보기 위하여 생산된 각 항혈청으로 Western blotting을 실시하였다. 그 결과 각 항체에 대한 항원성 물질은 WC 항원 10종류, OMP 항원 6종류, crude urease 항원 3종류의 단백질이 면역원성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

특히, *H. pylori* urease는 subunit A와 B로 나누어지며, 각각 30.5 kDa과 62.5 kDa의 분자량을 나타내는 것으로 알려져

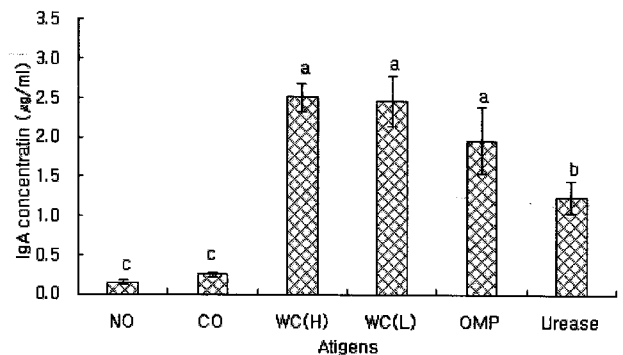


Fig. 3. Changes of IgA levels in mice serum during the immunization period. Antigens were divided into six experimental groups: NO, normal; CO, control; WC (H), whole cell high dose (60 µg/100 µl) antigens; WC (L), whole cell low dose (20 µg/100 µl) antigens; OMP antigens, 20 µg/100 µl; Urease antigens, 20 µg/100 µl.

Mice immune responses following *H. pylori* vaccination

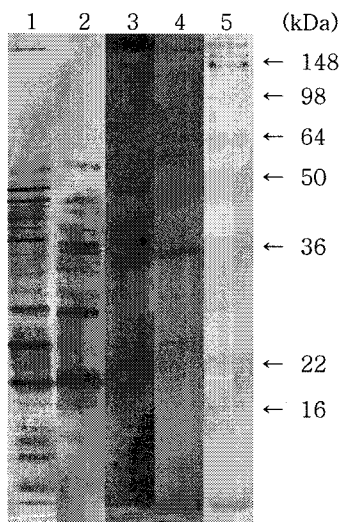


Fig. 4. Western blots of anti-sera from mice given separated *H. pylori* antigens. Lane 1, whole cell SDS-PAGE pattern; Lane 2, anti-whole cell serum; Lane 3, anti-OMP serum; Lane 4, anti-crude urease serum; lane 5, standard protein markers.

있다. *H. pylori* 단클론(monoclonal) 항체에서 면역성이 urease B는 약하나, urease A는 강한작용을 하는 것으로 보고되고 있다[19]. 본 실험방법에 의해 분리된 crude urease는 25, 36, 64 kDa의 분자량을 가진 단백질 모두가 면역원성을 가지는 것을 볼 수 있었다. 그리고 36, 64 kDa 분자량을 가진 단백질 band가 urease A, B subunit인 것으로 사료된다.

**항균활성**

**Anti-*H. pylori* 항체에 의한 *H. pylori* 응집반응**

특이 항혈청에 의한 박테리아의 응집은 미생물의 세포표면, 헤파막 또는 편모 항원에 의해 유래된 항혈청의 유무에 의해 기인된다. 응집반응은 박테리아 항원성 조성, 감염성질환의 진단을 위한 임상실험, 박테리아 분류를 위한 분류학상으로 기본연구를 위한 연구실험으로 사용된다[7]. 응집반응은 항체를 첨가하여 특정 항원(세균)을 응집시키는 것을 뜻한다. 육안 또는 현미경으로 관찰할 수 있으며, 항원 또는 항체 측정에도 사용된다. 현재는 세포나 입자 표면에 항원기만 있으면 대부분의 항체는 응집을 일으키는 것으로 알려져 있다 [21]. *H. pylori* 백신으로 미리 면역된 mouse에서 질병예방 효과는 나타나지 않았으나, 세균의 양을 줄일 수 있으며, 위염 염증과 관련된 균체의 colonization의 감소와 제거현상이 나타나는 것으로 보고되고 있다[10].

본 실험에서는 *H. pylori*에서 분리된 각 항원으로 생성된 항혈청의 *H. pylori*에 대한 응집정도를 알아보기 위해 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 5). 각 항혈청을 단계별로 희석하

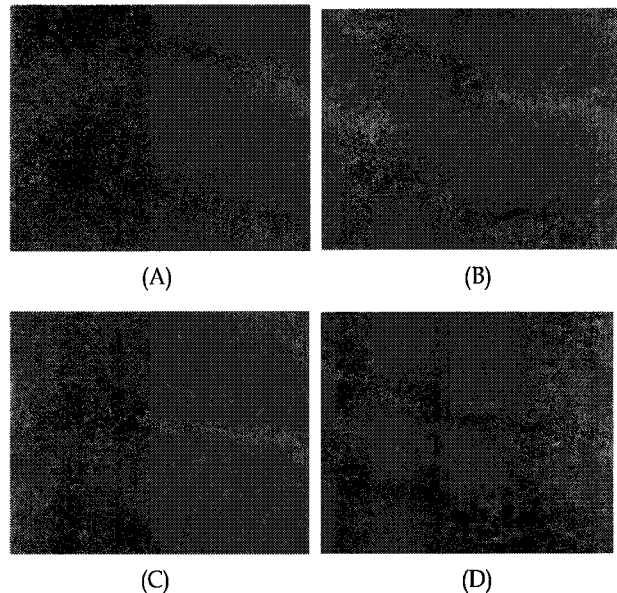


Fig. 5. Agglutination of *H. pylori* by anti-*H. pylori* antibody. *H. pylori* strains show change of agglutination after treatment anti-WC serum (B), anti-OMP serum (C) and anti-urease serum (D) when compared with normal serum (A). Magnification;  $\times 400$ .

여 *H. pylori*과 반응시켜 광학현미경으로 관찰하였을 때 절반 이상 응집반응을 나타내는 희석배수를 응집가로 결정 하였다. 따라서 면역되지 않은 항혈청에서는 응집반응이 일어나지 않았으나, WC, OMP, crude urease에 의해 생성된 항혈청에 대해 모두 높은 응집가를 나타내었다. 그리고 응집가 이상의 항혈청 희석에서도 응집정도는 약했으나 균의 활동성이 현저히 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 항체의 *H. pylori*에 대한 응집정도를 나타내는 응집가(Agglutination value)는 anti-WC (H), anti-WC (L), anti-OMP, anti-urease 항혈청에서 각각  $2^5$ ,  $2^5$ ,  $2^6$ ,  $2^7$ 으로 나타났으며, 상대적으로 anti-urease 항혈청이 높은 응집가를 나타내었다(Table 2).

**Urease 활성억제 효과검색**

Urease 활성억제 효과는 urease 작용에 대한 항체의 억제

Table 2. Agglutination value of by anti-*H. pylori* antibody

Antibody	Agglutinating dilution fold of anti- <i>H. pylori</i> antibody
Negative control	-
Anti-WC (L) serum	$2^5$
Anti-WC (H) serum	$2^5$
Anti-OMP serum	$2^6$
Anti-uresae serum	$2^7$

*H. pylori* (100  $\mu$ l, OD 1.0 at 405 nm in PBS) and same volume of diluted antibody were mixed in immunoglobulin 96 well plate for 2 hr at RT. The aggregation was detected by simple visual inspection.

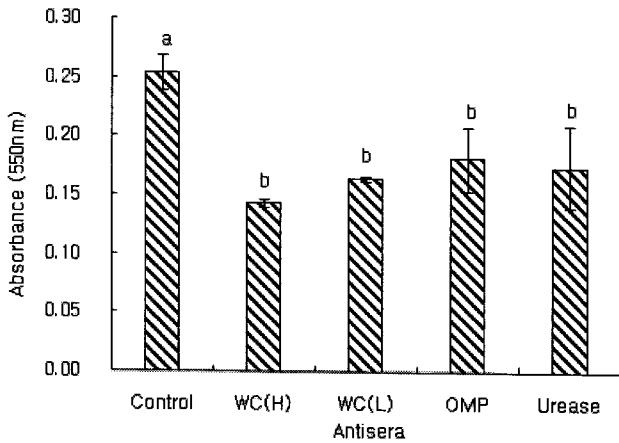


Fig. 6. Inhibition of *H. pylori* urease activity by various against separated *H. pylori* antigen in mice antisera. Antisera were divided into five experimental groups : WC(H), whole cell high dose (60 µg/100 µl) antisera; WC (L), whole cell low dose (20 µg/100 µl) antisera; OMP (20 µg/100 µl) antisera; Urease (20 µg/100 µl) antisera.

효과가 커질수록 요소가 적게 분해되어 pH 증가가 적을 것이며, phenol red는 오렌지색이 유지되어 흡광도(OD)가 상대적으로 낮은 성질을 이용하였다[29].

각 항혈청에 대한 urease 활성억제를 나타내는 흡광도 (OD=550 nm)가 WC (H) 0.14±0.01, WC (L) 0.16±0.01, OMP 0.18±0.03, crude urease 0.18±0.04로 대조군 0.26±0.02와 비교할 때 유의적으로 낮게 나타났다. 각각의 항혈청에 대한 urease 활성 억제에 대해서는 유의적인 차이를 볼 수 없었으나, 각 항혈청과 양성대조군과 비교할 때 urease 활성 억제효과가 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

### 요 약

축산물을 이용하여 생산된 특이항체는 세균성감염에 의한 설사병 치료와 충치예방에 효과가 있고, 특히 계란을 이용한 IgY (Immunoglobulin Yolck)는 비교적 산과 열에 안정하다는 실험결과가 보고되어[22] 있다. 식품분야에 특이항체를 식품소재로 산업화에 활용한 빈도는 아직 미미한 상태에 있으나, 최근 면역학, 단백질공학, 생명공학 등의 발전과 기술 향상으로 식품 소재로서의 활용성이 점차 높아질 것으로 기대된다.

본 연구에서는 *H. pylori*의 감염을 예방하고 치료보조제로 사용할 목적으로 포유동물을 통한 피동면역용 항체를 생산하고자 하였다. *H. pylori*로부터 항원을 분리하고, 분리된 항원에 대한 항체생산 및 *H. pylori*의 응집정도를 알아보았다.

*H. pylori*로부터 분리된 주요 항원 단백질은 WC, OMP, crude urease, LPS 각각 12개, 7개, 3개, 1개 종류의 band를 확인할 수 있었다. 분리된 항원의 IgG 항체 생성은 동일한 항원농도인 20 µg/100 µl에서 각각 WC (L) 77.9±6.4 µg/ml,

OMP 84.9±6.4 µg/ml, crude urease 123.8±2.9 µg/ml로 crude urease 항원이 가장 많은 것으로 나타났다. 그리고 IgA 항체 생성은 WC (L) 2.5±0.32 µg/ml, OMP 2.0±0.43 µg/ml, crude urease 1.3±0.25 µg/ml로 IgA 항체 생성은 WC (L) 항원이 가장 많은 것으로 나타났다. Western blotting을 통하여 항원 단백질의 면역원성 알아본 결과 WC 10종류, OMP 6종류, crude urease 3종류의 주요 항원성 물질을 확인할 수 있었다.

항체의 *H. pylori*에 대한 응집정도를 나타내는 응집가는 anti-WC (H), anti-WC (L), anti-OMP, anti-crude urease 항혈청에서 각각 2<sup>5</sup>, 2<sup>5</sup>, 2<sup>6</sup>, 2<sup>7</sup>으로 나타났으며, 상대적으로 anti-crude urease 항혈청이 가장 높은 응집가를 나타내었다. 각 항원에 의해 생성된 항혈청의 urease활성 억제에 대한 흡광도(OD=550 nm)는 WC (H) 0.14±0.01, WC (L) 0.16±0.01, OMP 0.18±0.03, Urease 0.18±0.04로 대조군 0.26±0.02와 비교할 때 유의적인 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 *H. pylori* 항원의 분리와 분리된 항원의 항체 생성능, *H. pylori*의 응집가, urease 활성억제 측면에서 WC 및 crude urease항원 모두 높은 항체역가를 나타내었다.

### References

1. Aebischer, T., A. Schmitt, A. K. Walduck and T. F. Meyer. 2005. *Helicobacter pylori* vaccine development: facing the challenge. *Inter. J. Med. Microbiol.* **295**, 343-353.
2. Britton, S, E., Papp-Szabo, J. Simala-Grant, L. Morrison, D. E. Taylor and M. A. Monteiro. 2005. A novel *Helicobacter pylori* cell-surface polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **340**, 1605-1611.
3. Burr, D. H., D. Rollins, L. H. Lee, D. L. Pattarini, S. S. Walz, J. H. Tian, J. L. Pace, A. L. Bourgeois and R. I. Walker. 2005. Prevention of disease in ferrets fed an inactivated whole cell *Campylobacter jejuni* vaccine. *Vaccine* **23**, 4315-4321.
4. Ermak, T. H., P. J. Giannasca, R. Nichols, G. A. Myers, J. Nedrud, R. Weltzin, C. K. Lee, H. Kleanthous and T. P. Monath. 1998. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J. Exp. Med.* **188**, 2277-2288.
5. Felley, C. P., I. Corthésy-Theulaz, J. L. Rivero, P. Sipponen, M. Kaufmann, P. Bauerfeind, P. H. Wiesel, D. Brassart, A. Pfeifer, A. L. Blum and P. Michetti. 2001. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J. Gastrol. Hepatol.* **13**, 5-29.
6. Fomsgaard, A., M. A. Freudenberg and C. Galanos. 1993. The modification of the silver stain method in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels for detecting lipopolysaccharides. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **28**, 193-198.
7. Garvey, J. S., C. E. Natalie and H. S. Dieter. 1980. Methods

- in immunology, a laboratory text for instruction and research. W. A. Benjamin, Inc., Canada.
8. Hamstra, H. J., B. Kuipers, D. Schijf-Evers, H. G. Loggen and J. T. Poolman. 1995. The purification and protective capacity of *Bordetella pertussis* outer membrane protein. *Vaccine* **13**, 747-752.
  9. Hazell, S. L. and A. Lee. 1986. *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. *Lancet*. **11**, 15-17.
  10. Hogan, J. S., D. A. Todhunter, G. M. Tomita, K. L. Smith and P. S. Schoenberger. 1992. Opsonic activity of bovine serum and mammary secretion after *Esherichia coli* J5 vaccination. *J. Dairy Sci.* **75**, 72-77.
  11. Hu, L. T. and H. L. Mobley. 1990. Purification and N-Terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect immun.* **58**, 992-998.
  12. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994. *Helicobacter pylori*. in: Schistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*: views and expert opinions of IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 61-241.
  13. Jauho, E. S., U. Boas, C. Wiuff, K. Wredstrom, B. Pedersen, L. O. Andresen, P. M. Heegaard and M. H. Jakobsen. 2000. New technology for regiospecific covalent coupling of polysaccharide antigens in ELISA for serological detection. *J. Immunol. Med.* **242**, 133-143.
  14. Kim, B. J., B. H. Kang, T. Y. Kim, T. H. Kim, and K. W. Kim. 1997. Production and characterization of IgY specific to *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 612-616.
  15. Koivunen, M. E., M. Christophe, W. N. John, R. H. William and D. H. Bruce. 2003. Purification and characterization of a methylen urea-hydrolyzing enzyme from *Rhixobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*). *Soil Biol. Biochem.* **35**, 1433-1442.
  16. Marshall, B. J. and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **323**, 1311-1315.
  17. Michetti, P., I. Corthésy-Theulaz, C. Davin, R. Haas, A. C. Vaney, M. Heitz, J. Bille, J. P. Kraehenbuhl, E. Saraga and A. L. Blum. 1994. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection With *Helicobacter pylori* urease. *Gastrol.* **107**, 1002-1011.
  18. Nagy, B. 1980. Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibaillosis. *Infect Immun.* 21-24.
  19. Newell, D. G., H. McBride and A. D. Pearson. 1984. The identification of outer membrane proteins and flagella of *Cmpylobacter jejuni*. *J. Gene Microbiol.* **130**, 1201-1208.
  20. Oscar, G. G., B. Lucas, Z. Yan, P. Klaus, H. Rainer and F. M. Thomas. 1998. Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* **16**, 460-471.
  21. Rahn, W., R. W. Redline and T. G. Blanchard. 2004. Molecular analysis of *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation in naive versus previously immunized mice. *Vaccine* **23**, 807-818.
  22. Roe, E. H., S. W. Nam, M. R. Yang, J. T. Kim and J. H. Shin. 2002. The promising effect of Egg Yolk antibody (Immunoglobulin Yolk) on the treatment of *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *Kor. J. Gastrol.* **39**, 260-268.
  23. Sabarth, N., R. Hurwitz, T. F. Meyer and D. Bumann. 2002. Multiparameter selection of *Helicobacter pylori* antigens identifies two novel antigens with protective efficacy. *Infect Immun.* **11**, 6499-6503.
  24. Smythies, L. E., J. N. Miroslav, B. W. Ken, D. M. Casey and D. S. Phillip. 2005. Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease protect mice against *H. pylori* infection. *vaccine.* **23**, 901-909.
  25. Sreevatsan, S., T. R. Ames, R. E. Werdin, H. S. Yoo and S. K. Maheswaran. 1996. Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle. *Vaccine* **14**, 147-154.
  26. Sutton, P. 2001. Theoretical article-*Helicobacter pylori* vaccines and mechanisms of effective immunity: Is mucus the key? *Immunol. Cell Biolo.* **79**, 67-73.
  27. Warren, J. R. and B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **11**, 1273-1275.
  28. Wyatt, J. I., B. J. Rathbone and R. V. Heatley. 1986. Local immune response to gastric *Campylobacter* in non-ulcer disease. *J. Clin. Pathol.* **39**, 863-870.
  29. Yoon, Y. S., S. H. Lee, N. I. Baek, H. Y. Kim and C. H. Park. 2004. Inhibition of cell growth and urease activity of *Helicobacter pylori* by medicinal plant extracts. *Kor. J. Biotechnol.* **19**, 187-191.