

*Helicobacter pylori*에 감염된 위상피세포에서 Skp2의 변화

†정혜연

승의여자대학 식품영양과

Changes in Skp2 in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells

†Hae-Yun Chung

Dept. of Food and Nutrition, Soongui Women's College, Seoul 100-751, Korea

Abstract

It has been suggested that *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infections can promote the development and progression of gastric cancer through the modulation of cell cycle regulators such as p27^{Kip1} and Skp2. p27^{Kip1} is a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor that blocks the G1/S transition necessary for cell cycle progression. Skp2 is a component of the ubiquitin ligase complex called SCF^{Skp2} (SKP1-Cullin-F-box), which specifically binds and promotes the degradation of p27^{Kip1}. A low level of p27^{Kip1} and a high level of Skp2 have been reported in many types of cancers, including gastric cancer. In addition, a decrease in p27^{Kip1} has been reported in *H. pylori*-infected specimens. However, data on Skp2 in *H. pylori* infections are limited. This study examines the changes in the status of Skp2 in *H. pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. For this, we stimulated AGS cells with *H. pylori* (NCTC 11637) at the ratio of 300:1 (bacterium:cell) for 6 hours. The results of an immunoprecipitation analysis, followed by a western blot, indicate that the interaction between Skp2 and 14-3-3 was elevated 3 hours after the *H. pylori* treatment. In addition, there was an increase in cytoplasmic Skp2 after 3 hours, whereas there was no change in the nuclear level. Since it has been reported that interaction with 14-3-3 and the subsequent cytoplasmic translocation of Skp2 can increase its protein stability, increases in the interaction with 14-3-3 and the cytoplasmic Skp2 after the *H. pylori* treatment can increase the level of Skp2 in AGS cells. This phenomenon may explain, at least to some extent, the mechanism underlying the relationship between *H. pylori* infections and gastric carcinogenesis.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric epithelial cell, Skp2, 14-3-3

서론

위암은 전세계적으로 가장 흔한 암 중 하나이며, 한국에서 발생자 수가 가장 많은 암이기도 하다(보건복지부 2011; Konturek 등 2006). 위암의 가장 흔한 형태인 선암종은 임상적, 조직학적 특징에 따라 장형과 미만형의 두 가지 종류로 분류된다(Lauren 1965). 이 중 장형이 더 흔하며 주로 환경적 요인에 의해 발생하는데, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 감염은 위암 발생에 기여하는 주요 환경 요인 중의 하나이다(Peek 등 2002). *H. pylori* 감염이 암의 발생 및 진행에 관련되어 있다는

것은 잘 밝혀져 있지만, *H. pylori*에 의한 위암 발생의 분자적 기전은 잘 밝혀져 있지 않다. 하나의 이론은 세포주기 조절인자들인 p27^{Kip1}, p53, p21 등의 변화에 의해 위상피세포의 세포주기가 변화한다는 것이다(Kim 등 2006; Gamboa-Dominguez 등 2007).

이들 중 p27^{Kip1}은 사이클린 의존성 인산화효소(cyclin dependent kinase, CDK) 억제인자로서 세포주기를 조절하는 사이클린 E/CDK2 복합체에 결합하여 G1에서 S기로 진행되는 과정을 차단한다(Chetty 2003). 따라서 p27^{Kip1}의 단백질 수준이 나 기능이 저하되면 세포증식을 초래할 수 있으며, 이 단백질

† Corresponding author: Hae-Yun Chung, Dept. of Food and Nutrition, Soongui Women's College, Seoul 100-751, Korea. Tel: +82-2-3708-9119, Fax: +82-2-3708-9121, E-mail: hchung02@sewc.ac.kr

의 감소는 위암, 갑상선암, 난소암 등 여러 암에서 보고된 바 있다(Baldassarre 등 1999; Masciullo 등 1999; Myong 2003).

H. pylori 감염 시 p27^{Kip1}의 단백질 수준이 감소한다는 사실은 여러 학자에 의해 보고된 바 있다. Shirin 등(2000)은 위상피세포 실험을 통해 만성적인 *H. pylori* 감염과 p27^{Kip1} 단백질 발현 사이에 음의 상관관계가 존재함을 보여주었고, Yu 등(2001)은 장상피화생 환자에서 *H. pylori*를 제거했을 때 p27^{Kip1} 단백질 발현이 회복되는 것을 관찰하였다. *H. pylori*가 p27^{Kip1} 단백질 수준을 저하하는 기전에 대해서는 여러 가지 이론이 제기되었는데, 한 연구에서는 *H. pylori*로 처치한 위상피세포에서 p27^{Kip1}의 mRNA 발현이 30% 가량 감소함을 관찰하였고, 다른 연구에서는 p27^{Kip1}의 단백질 분해가 촉진됨을 보여주었다(Shirin 등 2000; Eguchi 등 2003). 그러나 p27^{Kip1} 단백질 수준을 조절하는 주요 기전은 유비퀴틴 의존성 단백질분해이며, p27^{Kip1}의 분해 과정에는 S phase kinase associated protein (Skp2)이 주요 역할을 담당한다(Martin 등 1995; Philipp-Staheli 등 2001).

Skp2는 F-box 함유 단백질 패밀리의 일원으로서 Skp1-Cullin-Fbox protein^{Skp2}(SCF^{Skp2}) 유비퀴틴 연결효소 복합체를 구성하는데 참여한다. SCF^{Skp2}에서 Skp2는 p27^{Kip1}, p21, p130/pRb2, E2F1, cyclin E, c-Myc, p57^{Kip2} 등의 기질을 인식하고 결합함으로써 이들이 유비퀴틴화 되도록 한다. 유비퀴틴으로 표식된 단백질은 프로테아좀에서 분해되므로 Skp2는 결국 이들 단백질이 분해되도록 촉진하는 역할을 하게 되는 것이다(Bornstein 등 2003; Kamura 등 2003). 따라서 Skp2의 수준이 높으면 p27^{Kip1} 분해가 촉진되고 세포주기의 진행이 빨라지므로 Skp2는 원암유전자로 구분되며, 구강암, 유방암, 림프종 등의 조직에서 Skp2의 증가가 보고되었다(Latres 등 2001).

H. pylori 감염 시 p27^{Kip1}의 역할에 대해서는 상당한 양의 연구 결과가 발표되었으나, p27^{Kip1}을 조절하는 Skp2의 역할에 대해서는 자료가 부족한 편이다. 따라서 본 연구에서는 *H. pylori*에 의한 세포주기 조절에서 중요한 역할을 담당하는 Skp2에 대해 연구하고자 하였다. 특히 Skp2는 14-3-3과의 결합과 이에 따른 세포질로의 이동에 의해 단백 분해가 조절된다는 연구 결과가 있으므로, 본 연구에서는 위상피세포에 *H. pylori*를 처치한 후 Skp2와 14-3-3의 결합 및 Skp2의 세포 내 이동에 대해 살펴보았다.

연구방법

1. 세균주, 세포주와 배양조건

NCTC 11367 균주의 *H. pylori*는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 초콜렛우무

평판(Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)에 접종한 후무산소배양통(BBL Campy Pouch[®] System, Becton Dickinson Microbiology Systems)을 이용하여 미세산소 환경에서 배양하였다.

인간 위상피세포 AGS(위 선암종, ATCC CRL 1739)는 American Type Culture Collection에서 구입하여 10% FBS, 2 g/l 중탄산염나트륨, 1% 항생제를 첨가한 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

10 cm 배양접시에 5×10⁶개의 AGS세포를 시딩하고, 접시의 80%를 덮을 때까지 키운 후, 무항생제 배지에 현탁한 *H. pylori*를 세균과 세포의 비율이 300:1이 되도록 첨가하여 추가 배양하였다.

2. 면역침전법

*H. pylori*를 처치한 위상피세포에서 Skp2와 14-3-3의 결합을 살펴보기 위해 14-3-3에 대하여 면역침전법을 실시하였다. AGS세포에 *H. pylori*를 처치한 후 시간에 따라 회수하고, 추출용액(100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 10% glycerol, 1 μg/ml 단백질분해효소 억제제)을 넣어 균질화한 후 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 정량 후 1 mg의 단백질을 취하고 anti-14-3-3 항체를 더하여(2 μg/ml) 4°C에서 2시간 동안 진탕하였다. 여기에 protein G agarose를 첨가하고 하룻밤 동안 진탕한 후 원심분리하여 protein G agarose에 결합한 14-3-3 결합 단백질을 회수하였다. 면역침전법을 위하여 14-3-3의 여러 아이소형 중 σ형의 항체를 사용하였다.

3. 세포질과 핵 분획 추출

H. pylori 처치 후 세포질과 핵에 존재하는 Skp2의 양을 파악하기 위해 우선 세포질과 핵 분획을 추출하였다. AGS 세포에 *H. pylori*를 처치한 후 시간에 따라 회수하고 저장성 완충액에 현탁하여 원심분리하였다. 상층액인 세포질 분획을 수집하여 -80°C에 보관하였다. 침전은 저장성 완충액으로 세척한 후 추출 완충액에 현탁하여 원심분리하였다. 상층액을 핵추출물로 수집하였고, 각 분획의 단백질농도는 Bradford 법을 사용하여 측정하였다(Lim 등 2008).

4. 웨스턴 블롯

면역침전법을 통해 얻은 14-3-3 σ 결합단백질과 세포질 및 핵 분획 추출물을 대상으로 웨스턴 블롯을 실시하여 Skp2의 양을 측정하였다. 각 30 μg의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드겔에서 전기영동하고, 겔에 있는 단백질을 Hybond-PVDF 막(Amersham Inc., Arlington Heights, IL, USA)으로 옮긴 후 5% 탈지분유를 포함한 TBST 차단완충액으로 차단하였다. 그 후

Skp2 1차 항체를 포함한 TBST에 막을 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 1차 항체와 반응이 끝난 막을 다시 horse radish peroxidase-conjugated 2차 항체에 반응시킨 후 ECL system (Amersham)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *Helicobacter pylori* 처치 후 AGS 세포에서 Skp2와 14-3-3 결합의 변화

NIH 3T3 등의 세포에 자극을 주었을 때 Skp2와 14-3-3의 결합이 증가한다는 보고가 있으므로(Lin 등 2009) 본 연구에서도 *H. pylori* 처치 시 AGS 세포에서 Skp2와 14-3-3의 결합이 증가하는지를 살펴보았다. AGS 세포에 *H. pylori*를 1:300의 비율로 처리한 후 σ 형의 14-3-3에 대해 면역침전법을 실시하여 14-3-3 결합단백질을 분리한 후, 이를 Skp2에 대하여 웨스턴 블롯을 실시하여 두 단백질의 결합을 관찰하였다. 그 결과, *H. pylori* 처치 후 3시간 이후에 Skp2와 14-3-3의 결합이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

14-3-3은 β , γ , ϵ , σ , ζ , τ , η 등 7개의 아이소형으로 존재하며, 동중이합체 혹은 이질이합체의 형태로 다른 단백질과 결합하는데, 이들은 결합 단백질의 구조를 변화시켜 그들의 기능적 모티프를 감추거나 혹은 드러냄으로써 그들의 위치, 안정성 또는 활성을 조절한다고 알려졌다(Yaffe 등 1997; Yaffe 2002).

본 연구의 결과, *H. pylori* 처치 후 AGS 세포에서 14-3-3과 Skp2의 결합이 증가한 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 Skp2의 세포 내 위치 혹은 안정성 등을 변화시키는 역할을 할 것이라고 추측된다.

2) *Helicobacter pylori* 처치 후 AGS 세포에서 Skp2 단백질 위치의 변화

Skp2는 본래 핵단백질이지만 14-3-3과 결합한 Skp2 단백질은 세포질로 이동한다는 보고가 있으므로, 본 연구에서도 *H. pylori* 처치 후 AGS 세포에서 14-3-3과 결합한 Skp2가 세포질로 이동하는지를 관찰하였다. AGS 세포에 *H. pylori*를 1:300의 비율로 처리하고, 세포질과 핵 분획을 추출한 후 웨스턴 블롯 실험을 통해 Skp2 단백질의 세포 내 위치를 분석하였다. 그 결과, *H. pylori* 처치 후 세포질 내 Skp2의 양이 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 핵 추출물의 Skp2 수준은 크게 변화하지 않았는데, 이는 Skp2가 기본적으로 핵단백질로서 *H. pylori* 감염 시 일부가 세포질로 이동했다 하더라도 그 변화가 현저하지 않기 때문으로 추측된다(Fig. 2).

Lin 등(2009)에 따르면 평상시 Skp2는 주로 핵에 존재하는데, Akt에 의해 Ser72가 인산화되면 Skp2가 14-3-3과 결합하

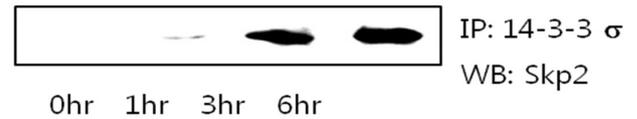


Fig. 1. Interaction of Skp2 and 14-3-3 σ in AGS cells treated with *H. pylori*. Whole cell extracts were prepared from *H. pylori*-treated AGS cells and were immunoprecipitated (IP) with the 14-3-3 σ antibody. The immunoprecipitates were analyzed by Western blot analysis (WB) using Skp2 antibody.

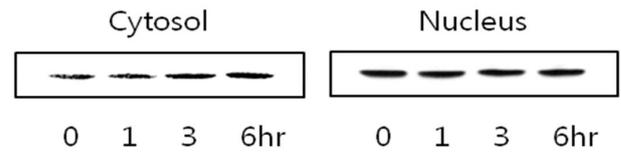


Fig. 2. Cytosolic translocation of Skp2 after *H. pylori* treatment. After treatment with *H. pylori*, cytoplasmic and nuclear extracts were prepared from the cells at each time point. Skp2 protein levels in cytoplasmic and nuclear extracts were determined by Western blot.

여 세포질로 이동한다고 한다. 이에 대해 Poon 등(2005)은 Akt에 의한 Skp2의 인산화부위(Ser72)가 핵지향 배열(nuclear localization sequence, NLS)에 인접해 있으므로, 인산화된 Skp2에 14-3-3이 결합하면 NLS를 가리게 되어 세포질로의 이동이 촉진된다고 설명하였다. Skp2는 ApC/C^{dh1}과의 결합에 의해 파괴되는데, C^{dh1}은 주로 핵에 존재하므로 Skp2가 세포질로 이동하면 Skp2의 파괴가 감소되고 따라서 Skp2의 양이 증가한다(Gao 등 2009).

정상적인 세포에서는 세포주기의 G₀와 G₁기에 p27^{Kip1}의 때 이른 분해와 이에 따른 세포주기 진행을 막기 위해 Skp2 단백질의 분해를 증가시킨다. 즉, 이 시기에는 ApC/CC^{dh1} 유비퀴틴 연결효소에 의한 Skp2의 유비퀴틴화와 분해가 증가됨으로써 p27^{Kip1}의 수준이 높게 유지된다(Bashir 등 2004; Wei 등 2004). 그런데 이와 같은 단백질 분해 과정에 이상이 생기면 Skp2의 양이 증가하고 세포주기가 비정상적으로 진행될 수 있다.

본 연구의 결과, *H. pylori* 처치 후 AGS 세포에서 Skp2가 세포질로 이동하는 것이 밝혀졌는데, 이는 Skp2의 분해를 방해함으로써 Skp2의 양을 증가시킬 수 있다.

결론

*H. pylori*에 감염된 위 조직에서 p27^{Kip1}이 감소되어 있음은 여러 연구에서 보고된 바 있다. 반면, Skp2에 대한 연구는

상대적으로 드문 편이며, 연구결과도 상반된 경우가 많다. Eguchi 등은 위상피세포에 *H. pylori*를 처치하였을 때 p27^{Kip1} 뿐만 아니라 Skp2 단백질량도 감소하였다고 보고하였다 (Eguchi 등 2003). 반면, Kim 등(2006)은 정상 조직에 비해 *H. pylori*에 감염된 위조직에서 더 높은 수준의 Skp2 단백질과 낮은 수준의 p27^{Kip1}을 관찰하였다. 그런데, 이 때 각 단백질의 mRNA 수준에는 변화가 없었다고 한다. 이런 결과로부터 Kim 등(2006)은 이들 단백질의 수준이 단백질 합성이 아니라 분해를 통해 조절된다고 추측하였다.

Skp2는 14-3-3 단백질과의 결합에 의해 세포 내 위치와 단백질 분해가 조절된다는 사실이 보고된 바 있는데, 본 연구에서도 *H. pylori* 감염 시 AGS 세포에서 Skp2와 14-3-3의 결합이 증가하는 것으로 드러났으며, 세포질에 축적된 Skp2의 양도 약간 증가하였다. *H. pylori* 감염시, Skp2가 14-3-3과 결합하고 세포질로 이동하면 APC/C^{dh1}에 의한 Skp2의 유비퀴틴화와 단백질 분해가 감소되므로 Skp2의 단백질량이 증가할 수 있다. Skp2가 증가하면 세포주기가 촉진되고 세포자멸사가 억제되는데, 이는 모두 암 발생 증가로 이어질 수 있다. 따라서 본 연구결과는 *H. pylori* 감염 시, Skp2와 14-3-3의 결합 및 Skp2의 세포질 이동이 증가함으로써 위암 발생을 촉진할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국과학기술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-353-F00019).

참고문헌

보건복지부 암등록통계(통계청 지정통계 11744호)
Baldassarre G, Belletti B, Bruni P, Boccia A, Trapasso F, Pentimalli F, Barone MV, Chiappetta G, Vento MT, Spiezia S, Fusco A, Viglietto G. 1999. Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *J Clin Invest* 104: 865-874
Bashir T, Dorrello NV, Amador V, Guardavaccaro D, Pagano M. 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(C^{dh1}) ubiquitin ligase. *Nature* 428:190-193
Chetty R. 2003. p27 protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. *J Clin Gastroenterol* 37:23-27
Eguchi H, Herschenhou N, Kuzushita N, Moss SF. 2003. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27(kip1) in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 63:4739-

4746
Gamboa-Dominguez A, Seidl S, Reyes-Gutierrez E, Hermannstädter C, Quintanilla-Martinez L, Busch R, Höfler H, Fend F, Lubber B. 2007. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p27^{Kip1}, p53 and E-cadherin expression in gastric cancer. *J Clin Pathol* 60:756-761
Gao D, Inuzuka H, Tseng A, Wei W. 2009. Akt finds its new path to regulate cell cycle through modulating Skp2 activity and its destruction by APC/C^{dh1}. *Cell Division* 4:11
Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. 2006. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after *H. pylori* eradication in chronic gastritis. *Mod Pathol* 19:49-58
Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. 2006. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 57: 51-65
Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, Pagano M. 2001. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *PNAS* 98:2515-2520
Laurèn P. 1965. Two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64:31-49
Lim JW, Kim KH, Kim H. 2008. NF- κ B p65 regulates nuclear translocation of Ku70 via degradation of heat shock cognate protein 70 in pancreatic acinar AR42J cells. *Intl J Biochem Cell Biol* 40:2065-2077
Lin H, Wang G, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. 2009. Phosphorylation-dependent regulation cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 11:420-432
Martin E, Cacheux V, Cavé H, Lapierre JM, Le Paslier D, Grandchamp B. 1995. Localization of the CDKN4/p27^{Kip1} gene to human chromosome 12p12.3. *Hum Genet* 96:668-670
Masciullo V, Sgambato A, Pacilio C, Pucci B, Ferrandina G, Palazzo J, Carbone A, Cittadini A, Mancuso S, Scambia G, Giordano A. 1999. Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 59: 3790-3794
Myong NH. 2003. Immunohistochemical study of p27^{Kip1} expression in gastric adenomas and early gastric carcinoma -analysis of 65 cases-. *Korean J Pathol* 37:325-332
Peek RM Jr, Blaser MJ. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2:28-37
Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. 2001. p27(Kip1): regulation

- and function of a haploin sufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 264:148-168
- Poon IK, Jans DA. 2005. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* 6:173-186
- Shirin H, Sordillo EM, Kolevska TK, Hibshoosh H, Kawabata Y, Oh SH, Kuebler JF, Delohery T, Weghorst CM, Weinstein IB, Moss SF. 2000. Chronic *Helicobacter pylori* infection induces an apoptosis-resistant phenotype associated with decreased expression of p27(kip1). *Infect Immun* 68:5321-5328
- Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG. 2004. Degradation of the SCF component Skp2 in cell cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 428:194-8
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gambelin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC. 1997. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91:961-971
- Yaffe MB. 2002. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513:53-57
- Yu J, Leung WK, Ng EK, To KF, Ebert MP, Go MY, Chan WY, Chan FK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. 2001. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 15:1505-1511
-
- 접 수 : 2011년 12월 12일
최종수정 : 2012년 1월 11일
채 택 : 2012년 2월 9일