

RESEARCH UPDATE

만성위염, 장상피화생, 위암 환자의 위점막 상재균 변화의 차이에 대한 고찰

김은진, 백광호

한림대학교 의과대학 춘천성심병원 내과학교실

Review on Gastric Mucosal Microbiota Profiling Differences in Patients with Chronic Gastritis, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer

Eun Jin Kim and Gwang Ho Baik

Department of Internal Medicine, Hallym University Chuncheon Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

Article: Differences in Gastric Mucosal Microbiota Profiling in Patients with Chronic Gastritis, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer Using Pyrosequencing Methods. (*Helicobacter* 2014;19:407-416)

요약: 위는 위산 분비로 인한 낮은 pH 때문에 보편적으로 세균들이 서식하기에 좋은 환경이 아니라고 알려져 있다. 또한 분석에 필요한 살아있는 미생물의 추출 및 배양이 어려웠기 때문에 위의 상재균총(microbiota)에 대한 연구가 활발하게 진행되지 못하였다.¹ 그러나 최근 수십 년 동안 새로운 고도의 DNA 처리 표준 계열법(high-throughput DNA sequencing methods) 및 관련 기술의 개발로 상재균총학(microbiomics)과 메타유전체학(metagenomics)이 괄목할 만한 성장을 이루었고,² 이로 인하여 위장관의 상재균총에 대한 관심이 높아지고 있으며, 다양한 질병과 연관되는 상재균총의 변화에 대하여 연구가 활발히 진행되고 있다.

*Helicobacter pylori*는 위에 서식하는 대표적인 상재균으로 만성위염을 유발하고, 이는 위축성위염 및 장상피화생으로 진행하도록 한다. 위축성위염이나 장상피화생은 위암의 전암성 병변으로 알려져 있다.³ 그러나 *H. pylori* 음성 환자에서 만성위염이 발생하고, 쥐를 통한 동물모델에서도 확인되고 있어 *H. pylori*는 만성위염을 일으키는 원인균 중 하나일 뿐이

라는 가설들이 제시되고 있으며, *H. pylori*균과 *H. pylori* 이외의 균의 상호관계 및 위산 억제제 투여로 인한 상재균총의 변화에 대한 많은 관심이 모아지고 있다.⁴ 이에 Eun 등⁵은 위 내시경을 통해 31명의 만성위염, 장상피화생, 위암 환자의 위점막 조직을 얻어냈고 genomic DNA를 통해 16S rRNA gene의 variable V5 region을 증폭시켜 polymerase chain reaction (PCR) 산물을 추출하였다. 이 PCR 산물을 454 high-throughput sequencer를 이용하여 sequencing하여 세균의 상재균총의 조성, 다양성, 풍부한 종의 차이를 비교하였다. 그 결과는 위암군에서 *H. pylori*-containing *Epsilonproteobacteria* 강(class)이 가장 풍부하였고, 상대적으로 *Bacilli* 강이 만성위염군보다 통계적으로 유의하게 증가되었다. 과(family) 수준에서 *Helicobacter*-우성균을 분석하였을 때 위암군에서 만성위염과 장상피화생군보다 *Helicobacteraceae* 과가 적었고, 반대로 *Streptococcaceae* 과는 더 풍부함을 확인할 수 있었다. UniFrac distance를 이용하여 *Helicobacter*-우성균의 unweighted pair group method with arithmetic

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 백광호, 200-704, 춘천시 석주로 77, 한림대학교춘천성심병원 내과

Correspondence to: Gwang Ho Baik, Department of Internal Medicine, Hallym University Chuncheon Sacred Heart Hospital, 77 Sakju-ro, Chuncheon 200-704, Korea. Tel: +82-33-240-5810, Fax: +82-33-255-4291, E-mail: baikgh@hallym.ac.kr

Financial support: None. Conflict of interest: None.

mean (UPGMA) clustering을 비교하였을 때 만성위염군과 위암군은 확연히 분리되었으나, 장상피화생군은 두 군 사이에서 분포되고 있었다. 마지막으로 전반적인 위 상재균총의 균 등성과 다양성은 위암군에서 다른 두 군보다 증가되어 있었다. 결론으로, *Helicobacter*-우성 환자들에게서 위암의 위점막 상재균총 조성은 만성위염 및 장상피화생 환자의 위점막 상재균총 조성보다 확연히 차이가 나는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 변화는 위암 발생에 영향을 미칠 것으로 판단된다고 보고하였다.

해설: 위는 위로는 구강, 식도와 연결되어 있고 아래로는 십이지장과 연결되어 있으나, 위산 분비로 인하여 식도나 십이지장과는 구별되는 생태학적 환경을 보이고 있다. 구강, 인두, 식도, 호흡기계통 등을 통해 유입되는 세균은 위의 낮은 pH로 인하여 대부분 멸균될 것으로 기대되었으나, 1981년 Lancet에 게재된 연구⁶에서 전통적인 세균 배양법을 이용하여 *Streptococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus*와 같은 다양한 종류의 세균들을 분리하였고, 이후 다양한 방법들을 통해 위에 서식하는 *H. pylori* 외의 다양한 세균들이 분리되었다 (Table 1).^{1,7-17}

이전의 연구들에서는 전통적인 배양법 또는 분자생물학적인

기술로 *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* 등을 검출하였다.^{7,8,10} 16S rRNA transcript amplification sequencing이 개발되고 난 후에 활발하게 대사가 진행되는 세균들을 더 많이 분리해낼 수 있었고, UniFac 분석에서는 *Actinobacteria*의 감소 및 *Campylobacter concisus*의 증가를 확인할 수 있었다.¹⁶ 흥미롭게도 *H. pylori*는 PCR 분석 및 16S RNA gene sequencing에서 존재하기는 하였으나, 위액의 상재균총 중 가장 우세한 종은 아니었다. 그러나 위점막에서는 확실히 가장 우세했으며, 이는 *H. pylori*가 위의 점막층에 서식하기 때문일 것으로 생각된다.¹⁸

*H. pylori*는 전세계적으로 약 50%의 인구의 위에 서식하고 있는 그람음성 *bacillus*이다. *H. pylori*는 위에 존재하는 다른 평균보다 더 많이 연구되었고, 만성위염, 소화성궤양, 위선암 및 위말트림프종의 주요한 원인균임이 밝혀졌다.¹⁹ 생체 내 및 실험실 연구에서 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*를 포함하는 probiotics가 *H. pylori*의 부착, 군집, 성장을 예방한다고 밝혀졌으며, 몽골리안을 대상으로 한 연구에서는 몇몇 *Lactobacillus* 종은 *H. pylori*의 서식을 막는 반면 *Eubacterium limosum*은 *H. pylori*의 서식을 촉진한다고 발표하였다.^{20,21} Hu 등⁴은 위점막 조직 샘플을 통한 세균 배양을

Table 1. Characterization of Bacteria Present in the Stomach

Dominant bacteria type	Specimen	Detection method	Reference
Gram-negative bacteria and <i>Pseudomonas</i>	Aspirate	Culture	Meshkinpour et al. (1981) ⁷
Streptococci, bifidobacteria/lactobacilli, and micrococci/staphylococci	Aspirate	Culture	Sjöstedt et al. (1988) ⁸
<i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> and <i>Stomatococcus</i>	Mucosa	TTGE	Monstein et al. (2000) ⁹
<i>Veillonella</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., and <i>Clostridium</i> sp.	Aspirate	Culture	Dias et al. (2006) ¹⁰
Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, and Fusobacteria phylum	Mucosa	16S rDNA sequence	Bik et al. (2006) ¹¹
<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> , and <i>Prevotella</i>	Mucosa	T-RFLP + 16SrDNA sequence	Dicksved et al. (2009) ¹²
Firmicutes phylum and <i>Streptococcus</i> genus	Mucosa	16S rDNA sequence + qPCR	Li et al. (2009) ¹³
Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and SR1 phylum	Mucosa	16S rDNA sequence	Stearns et al. (2011) ¹⁴
<i>Ureaplasma</i> , Firmicutes phylum, <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aspirate	16S rDNA sequence	Millisavljevic et al. (2013) ¹⁵
Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria Actinobacteria, Proteobacteria	Aspirate	16S rDNA sequence + transcript sequence	von Rosenvinge et al. (2013) ¹⁶
<i>Streptococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> and <i>Lactobacillus</i>	Mucosa + aspirate	Culture + 16S rDNA sequence	Delgado et al. (2013) ¹⁷

통해 *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*와 *Staphylococcus*를 확인하였는데 이 균들은 상부 호흡기 계통의 대표적인 원인균으로서, *H. pylori* 감염이 대개는 non-*H. pylori* 세균과 함께 동반된다고 보고하였다. 또 다른 연구에서는 non-*H. pylori* 세균 및 그 부산물들이 지속적으로 항원으로 작용하여 *H. pylori* 감염으로 인한 면역 작용을 촉진시키고, *H. pylori*와 non-*H. pylori* 세균의 공통 감염이 위축성위염으로의 진행을 조장한다고 밝혔다.²² 그러나 이와는 대조적으로 급성 또는 만성 *H. pylori* 감염이 위의 위 상재균총의 구성을 바꾸지 않았다는 보고가 있으며,²³ 인간의 위 상재균총을 이용한 16S rDNA sequencing analysis에서도 *H. pylori* 양성환자와 음성환자 간에 위 상재균총의 유의한 차이를 보이지 않았다.¹¹ 위의 결과들을 종합해 볼 때 *H. pylori*의 위 내 서식은 다른 위 상재균을 변화시켰으나, 대부분의 연구들이 동물 모델에 근거하고 있고, 균 배양방법 또한 제한점이 많았다. 따라서 인간 위 세균총의 조성 및 *H. pylori*의 서식이 위 세균총에 미치는 영향에 대해서는 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

위의 상재균은 숙주의 생리학적 상태에 따라 변화한다. 최근의 연구들에 따르면 위 상재균총이 특정 질병에 따라 달라진다고 보고하고 있다.²⁴ 만성위염은 *H. pylori* 감염과 관련이 있다고 알려져 있고, 16S rDNA clone library 접근방법을 통해 만성위염에서 *H. pylori*가 가장 풍부한 종임을 밝힌 연구가 있으며,¹¹ Li 등¹³은 위염을 유발하는 *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*의 5가지 종이 상재균 클론의 70.5%를 차지하는 우세한 종임을 보고하였다. Dicksved 등¹²은 위 세균총 분석을 통해 위암 환자군과 소화불량 및 정상 점막을 보이는 환자 간에 위 상재균총의 차이가 없다고 보고한 반면, Eun 등⁵은 위점막 생검에서 16S rRNA sequencing을 통하여 만성위염, 장상피화생, 위암의 위 상재균총의 조성이 달랐다고 보고하였다. 이들은 high-throughput sequencing platform, 454 GS FLX Titanium을 이용하여 균을 확인하였고, *H. pylori*-containing *Epsilonproteobacteria* 강(class)의 조성이 가장 풍부하고, 위암군에서 *Bacilli* 강이 만성위염군에 비하여 상대적으로 증가되어 있음을 보고하였다. 또한 *Helicobacter*-우성군을 과(family)로 분석하였을 때, 위암군에서 만성위염군 및 장상피화생군보다 유의하게 *Epsilonproteobacteria* 강과 *Helicobacteraceae* 과가 덜 풍부했고, *Bacillus* 강과 *Streptococcaceae* 과는 더 풍부함을 확인할 수 있었다. 위암군에서 만성위염군에 비해 *Helicobacteraceae* 과가 덜 풍부한 데에는 *H. pylori*가 위암의 발병에 중요한 역할을 하지만, 이미 위축이나 화생이 발생한 전암 병변에서는 *H. pylori*가 서식하기 어려운 상태로 해석할 수 있겠다. 그러나 *Helicobacter* 비우성군에서는 세 균 사이의 상재균총에 유의한 차이는 없었다. 더욱이

Helicobacter 우성군의 UPGMA clustering을 보았을 때 위암군과 만성위염군은 확실히 분리되나, 장상피화생군은 두 군이 분리되지 않는 것으로 보아 *H. pylori* 감염은 위암의 발전에 직접적인 영향을 미친다기보다는 위점막 위축과 무위산 상태를 유발하는 것이 더 중요한 요소임을 확인하였다.

이 연구는 그 동안 시행되었던 연구들과 비교하였을 때 high throughput sequencing platform, 454 GS FLX Titanium을 이용하였고, 이는 방대한 parallel sequencing 기술로 보다 짧은 시간에 많은 서열을 얻을 수 있는 고도의 기술이 필요한 과정이 수행되었다는 점에서 설득력이 있을 수 있겠다. 그러나 이 연구에는 다음과 같은 제한점이 있다. 첫째, 비교적 적은 수의 환자(31명; 위암 11명, 만성위염 10명, 장상피화생 10명)를 대상으로 연구가 시행되어 통계적인 신뢰도가 떨어질 수 있다. 둘째, *H. pylori* 감염 상태를 평가함에 있어서 전통적인 방법인 신속요소분해 검사(rapid urease test)와 조직병리를 이용하였는데, 이 두 가지 방법으로 31명의 환자 중 18명이 *H. pylori* 양성으로 13명이 음성으로 확인되었으나 16S rRNA gene sequencing에 근거한 구성에서는 단지 9명만 *Helicobacteraceae* 과가 1% 미만인 것으로 확인되어, 전통적인 방법과 상재균총 구성의 불일치를 보였다. 저자들은 이와 같은 불일치의 원인으로 적은 표본 크기와 *H. pylori*의 반상 분포 등을 나열하였다. 아직까지 *H. pylori* 감염을 확인하는 여러 가지 방법 중 100%의 신뢰도 검사가 없는 실정이므로 어쩔 수 없는 결론일 수 있으나, 적은 표본 크기에 대하여는 추후 더 많은 표본으로 이러한 불일치를 줄이는 노력이 필요하겠다. 이 연구의 결론으로 *Helicobacter* 우성 환자에서 질병에 따른 위 상재균총 조성의 차이가 아마도 위암 발생에 역할을 하지 않을까 추측하고 있으나, 그 기전에 대하여는 아직도 밝혀지지 않은 상태로 추가적인 연구의 필요성에 대하여 제시하고 있다.

다양한 제한점에도 불구하고, 이번 연구에서는 추출 및 배양이 어려운 위 상재균총을 확인하기 위해 고도의 기술을 사용하였고, 또한 아직까지 논란이 많은 분야에 대하여 서구에서 제시한 기존 결과에 반론하는 결과를 보여주었다는 점에서 의미가 있겠다.¹² 향후 질병에 따른 위 상재균총의 차이 및 위암 발생에 있어서의 역할과 기전을 확인하기 위하여는 더 많은 수의 환자를 대상으로 하는 연구가 필요할 것이다.

REFERENCES

1. Wu WM, Yang YS, Peng LH. Microbiota in the stomach: new insights. *J Dig Dis* 2014;15:54-61.
2. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZ, et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:599-606.

3. 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.
4. Hu Y, He LH, Xiao D, et al. Bacterial flora concurrent with *Helicobacter pylori* in the stomach of patients with upper gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2012;18:1257-1261.
5. Eun CS, Kim BK, Han DS, et al. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods. *Helicobacter* 2014;19:407-416.
6. Bacteria in the stomach. *Lancet* 1981;2:906-907.
7. Meshkinpour H, Thrupp LD, Shiffler P, Kitts D, Fisher J. Reflux gastritis syndrome. Role of upper gastrointestinal microflora. *Arch Surg* 1981;116:1148-1152.
8. Sjöstedt S, Kager L, Heimdahl A, Nord CE. Microbial colonization of tumors in relation to the upper gastrointestinal tract in patients with gastric carcinoma. *Ann Surg* 1988;207:341-346.
9. Monstein HJ, Tiveljung A, Kraft CH, Borch K, Jonasson J. Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. *J Med Microbiol* 2000;49:817-822.
10. Dias MC, Ribeiro AG, Scabim VM, Faintuch J, Zilberstein B, Gama-Rodrigues JJ. Dietary intake of female bariatric patients after anti-obesity gastropasty. *Clinics (Sao Paulo)* 2006;61:93-98.
11. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:732-737.
12. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson JK, Engstrand L. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J Med Microbiol* 2009;58:509-516.
13. Li XX, Wong GL, To KF, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One* 2009;4:e7985.
14. Stearns JC, Lynch MD, Senadheera DB, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep* 2011;1:170.
15. Milisavljevic V, Garg M, Vuletic I, et al. Prospective assessment of the gastroesophageal microbiome in VLBW neonates. *BMC Pediatr* 2013;13:49.
16. von Rosenvinge EC, Song Y, White JR, Maddox C, Blanchard T, Fricke WF. Immune status, antibiotic medication and pH are associated with changes in the stomach fluid microbiota. *ISME J* 2013;7:1354-1366.
17. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suarez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol* 2013;65: 763-772.
18. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008;134:306-323.
19. Wang ZK, Yang YS. Upper gastrointestinal microbiota and digestive diseases. *World J Gastroenterol* 2013;19:1541-1550.
20. Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. Analysis of the microflora in the stomach of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(Suppl 1):S11-S14.
21. Yin YN, Wang CL, Liu XW, et al. Gastric and duodenum microflora analysis after long-term *Helicobacter pylori* infection in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 2011;16:389-397.
22. Sanduleanu S, Jonkers D, De Bruine A, Hameeteman W, Stockbrugger RW. Double gastric infection with *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* bacteria during acid-suppressive therapy: increase of pro-inflammatory cytokines and development of atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1163-1175.
23. Tan MP, Kaparakis M, Galic M, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection does not significantly alter the microbiota of the murine stomach. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1010-1013.
24. de Vries AC, Kuipers EJ. *Helicobacter pylori* infection and non-malignant diseases. *Helicobacter* 2010;15(Suppl 1):29-33.