

Helicobacter pylori 감염 위상피세포에서 Rosiglitazone이 세포성장과 p27 및 Skp2 발현에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

김성수 · 조영석 · 김형근 · 신옥란* · 채현석 · 최명규 · 정인식

The Effect of Rosiglitazone on the Cell Proliferation and the Expressions of p27 and Skp2 in *Helicobacter pylori* Infected Human Gastric Epithelial Cells

Sung-Soo Kim, M.D., Young-Seok Cho, M.D., Hyung-Keun Kim, M.D., Ok-Ran Shin, M.D.*, Hiun-Suk Chae, M.D., Myung-Gyu Choi, M.D., and In-Sik Chung, M.D.

Departments of Internal Medicine and Pathology*, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), a member of the ligand-activated nuclear receptor superfamily, exhibit anti-tumoral effects and are associated with *de novo* synthesis of proteins involved in regulating the cell cycle and cell survival/death. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is an etiologic agent for gastric adenocarcinoma, and raises the cell turnover of gastric epithelium. The aim of this study was to investigate the effect of PPAR γ ligand rosiglitazone on the cell proliferation and the expressions of p27 and Skp2 protein in *H. pylori* infected gastric epithelial cells. **Methods:** We examined the expression of PPAR γ by Western blot in *H. pylori* infected AGS human gastric epithelial cells. The effect of rosiglitazone on the survival of *H. pylori* infected AGS cells was assessed by cell viability assay. After the treatment of rosiglitazone in *H. pylori* infected AGS cells, the expressions of p27 and Skp2 were assessed by Western blot. **Results:** The expression of PPAR γ protein was increased in *H. pylori* infected AGS cells. Cell growth was inhibited and decreased in dose- and time- dependent manner in *H. pylori* infected AGS cells treated with rosiglitazone. A decrease in Skp2 expression and a reciprocal increase in p27 expression were found in dose- and time-dependent manner in *H. pylori* infected AGS cells treated with rosiglitazone. **Conclusions:** Rosiglitazone inhibited the growth of *H. pylori* infected AGS cells. Rosiglitazone attenuated Skp2 expression, thereby promoting p27 accumulation in *H. pylori* infected human gastric epithelial cells. Further studies will be needed to find the effects of accumulation on cell turnover in *H. pylori* infection and the role in the *H. pylori*-associated gastric carcinogenesis. (**Korean J Gastroenterol** 2010;55:225-231)

Key Words: *Helicobacter pylori*; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; p27; S-Phase kinase-associated proteins

접수: 2009년 10월 30일, 승인: 2009년 12월 30일
연락처: 조영석, 480-717, 경기도 의정부시 금오동 65-1
가톨릭대학교 의정부성모병원 소화기내과
Tel: (031) 820-3658, Fax: (031) 847-2719
E-mail: yscho@catholic.ac.kr

Correspondence to: Young-Seok Cho, M.D.
Department of Internal Medicine, Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 65-1, Geumo-dong, Uijeongbu 480-717, Korea
Tel: +82-31-820-3658, Fax: +82-31-847-2719
E-mail: yscho@catholic.ac.kr

서 론

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 는 핵 수용체군(nuclear receptor superfamily)의 일종으로 배위자(ligand)에 의하여 활성화되는 전사인자이다.¹ PPAR γ 배위자는 주로 비인슐린의존형 당뇨병의 치료제로 사용되어 왔지만, 최근 지방육종,² 유방암,³ 전립샘암,⁴ 대장암,⁵ 위암,⁶ 간암⁷ 등 여러 악성종양의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. PPAR γ 배위자에 의한 PPAR γ 활성화는 세포주기정지를 유도하거나 세포자멸사를 증가시키는 기전을 통해 항암효과를 나타낸다.⁸

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 만성 위염, 소화성 궤양, 위선암 및 MALT 림프종의 중요한 원인으로 *H. pylori*의 지속적인 감염은 세포 전환율(cell turnover)에 변화를 일으키는데 위선암의 발생에는 이러한 위상피세포 증식과 세포자멸사의 불균형이 관여하는 것으로 알려져 있다.⁹ *H. pylori*는 세포주기 조절인자에도 영향을 미치는데, 위상피세포에 *H. pylori*를 감염시키면 p27 유전자 전사에 영향을 미치지 않으면서 프로테아좀 의존 p27 단백질 분해가 증가하는 것으로 알려져 있다.¹⁰ 인체에서는 *H. pylori* 감염으로 인해 장상피화생으로 진행할수록 p27 단백질이 감소되며 이는 cyclin D1의 증가와 연관이 있고 제균 치료 후 p27 단백질이 정상으로 회복된다.^{11,12} 또한 *H. pylori*에 의한 만성위염에서 p27 단백질의 감소는 Skp2와 c-myc 단백질의 증가와 연관이 있는 것으로 알려져 있다.¹³

p27^{Kip1}은 cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI)로 세포주기를 조절하는 cyclin E/cdk2복합체에 결합하여 G1기에서 S기로 진행되는 과정을 차단하는 역할을 한다.¹⁴ 또한 p27^{Kip1}은 세포의 비정상적인 성장을 억제하는 종양 억제 유전자로 작용하는데 대장암, 유방암, 전립샘암, 폐암, 뇌하수체 암종 뿐만 아니라 위암에서도 발현이 감소되고 종양의 진행과 역상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.^{15,16} p27^{Kip1}은 인체 종양의 다른 발암억제 유전자와는 달리 유전자 상의 돌연변이나 유전자 소실이 거의 없고 mRNA로의 발현에도 거의 변화가 없다. p27 단백질 발현은 전사후 단계에서 ubiquitin-proteasome 경로에 의하여 매개되는 단백질 분해 기전에 의하여 조절된다.¹⁷ Ubiquitin-proteasome 경로는 주로 생리적인 상태에서 세포 내 단백질의 선택적인 단백질 분해에 관여하는데 이는 세포 내의 스트레스 상태에서의 lysosome에 의한 비특이적인 단백질 분해와 대별된다고 볼 수 있다.¹⁴ Ubiquitin으로 표식된 단백질은 proteasome 내에서 분해되는데 ubiquitin 표식 과정은 E1, E2, E3의 3가지 효소에 의하여 수행된다. 이 중 E3는 E2효소가 결합된 표적 단백질에 ubiquitin을 최종적으로 결합시키는 ligase로서의 역할을 한다. p27 단백질에 대한 ubiquitin ligase 활성도는 Skp1, cullin-1, rbx-1과 p27 specific

F-box protein인 S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2)로 구성된 SCF 복합체(complex)에 의해 제공된다.¹⁵ 이 중 Skp2는 p27과 상호작용하여 p27을 SCF 복합체로 동원하여 ubiquitin 표식 고정과 단백질 분해를 일으키는 중요한 역할을 한다.¹⁶ Skp2 유전자 결손 쥐에서 p27이 축적되는 것으로 보아 Skp2가 생체 내에서 p27 분해에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.¹⁷

이에 본 연구에서는 PPAR γ 배위자인 rosiglitazone이 *H. pylori*를 감염시킨 위상피세포 성장에 미치는 영향을 알아보고, *H. pylori* 감염 위상피세포에서 PPAR γ 단백질 발현과 rosiglitazone 처리가 p27 단백질과 skp2 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. *H. pylori* 배양

*H. pylori*균주는 ATCC 43504를 이용하였다. *H. pylori*는 5% (vol/vol) bovine calf serum (PAA Laboratories, Inc., Parkerford, PA, USA)과 항생제(amphotericin B 2.5 μ g/mL, vancomycin 10 μ g/mL, trimethoprim 5 μ g/mL, polymyxin B 2.5 IU/mL, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)가 첨가된 Brucella broth (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI, USA)에서 *H. pylori*가 1×10^8 CFU/mL (OD₆₀₀=1)이 될 때까지 10% CO₂ 조건에서 진탕배양하였다.

2. AGS 세포 배양 및 *H. pylori* 감염

실험에 사용된 AGS 세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입한 ATCC CRL 1739를 이용하였다. 세포주는 Ham's F-12 (pH 7.4, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)의 배양액을 이용하였고 열불활성화한 우태아혈청(HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA)을 10% (v/v)로 섞어 항생제(100 unit/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin)를 혼합한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 계대배양하였다. 항생제가 포함되지 않은 배양액으로 AGS 세포를 48시간 배양한 후 세포:균수의 비율이 1:100이 되도록 *H. pylori*를 감염시켰다. 상피세포의 배양은 실험에 따라 6-well cell culture plate 또는 100 mm cell culture plate를 사용하였고 *H. pylori* 균수의 측정은 McFarland scale을 이용하였다.

3. *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 PPAR γ 단백질 발현 및 rosiglitazone 처리 후 p27과 Skp2 단백질 발현

H. pylori 감염 AGS세포에서 PPAR γ 의 단백질 발현을 알아보기 위하여 Western blot 방법으로 측정하였다. 또한 AGS 세포에 *H. pylori*를 감염시킨 후 rosiglitazone을 농도별로 처

리하여 p27 단백질과 Skp2 단백질 발현에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Western blot을 시행하였다. PPAR γ 배위자인 rosiglitazone (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Worthing, UK)은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 약제를 용해시켜 사용시까지 -20°C 에 보관하였다. *H. pylori*를 감염시켜 배양한 AGS 세포 및 *H. pylori* 감염 후 rosiglitazone을 처리하여 배양한 AGS 세포를 추출완충액 (50 mM Tris, pH 7.5, 40 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 g/mL Leupeptin, 2 mM DTT 및 1 mM PMSF)으로 현탁하고 얼음에 10분 간 넣은 후 10분 간 원심분리 ($14,000\times g$, 4°C)하였다. 분리한 세포질 추출물의 단백질 양을 Bradford 방법으로 측정 후 95°C 에서 5분 간 가열한 후 12% SDS-polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 1시간 동안 전기 영동하고 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell BioScience, Inc., Keene, NH, USA)에 단백질을 이동시켰다. Membrane을 5% 탈지분유가 함유된 TBS-T (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.5% Tween 20)로 30분 간 차단하고 1:1,000으로 희석된 1차 항체를 4°C 에서 밤새 포적시킨 후 TBS-T로 3회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 1차 항체로 PPAR γ 단백질 발현을 알아보기 위하여 anti-PPAR γ rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. p27 단백질 발현을 위해서는 anti-p27^{Kip1} mouse monoclonal antibody (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA)를 사용하였고, Skp2 단백질 발현을 알아보기 위하여 1차 항체로 anti-Skp2 polyclonal antibody (Zymed)를 사용하였다. HRP가 결합된 2차 항체를 1:1,000의 비율로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 10분 간 3회 세척하여 결합하지 않은 항체를 제거하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham International PLC, Bucks, UK) 용액을 처리한 후 X-ray 필름에 감광하여 분석하였다. 동량의 단백질이 전개되었는지의 여부는 anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich)를 통하여 확인하였다. 단백질 발현을 정량화하기 위하여 스캐닝 밀도계(scanning densitometry)를 이용하여 단백질 띠(band)를 측정하여 수치화하였고, β -actin 단백질 띠에 대한 비율로 나타내었다.

4. *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 rosiglitazone 처리 후 살아있는 세포 수 분석

Rosiglitazone이 *H. pylori* 감염 AGS 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 96-well flat bottom microtiter plate의 각 well에 5×10^3 개의 *H. pylori* 감염 AGS 세포를 24시간 동안 배양한 후 rosiglitazone을 농도별로 처리하여 배양하였다. 이후 Cell Proliferation Reagent WST-1 kit (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 살아있는 세포 수를 분석하였다. 이 분석법은 살아있는 세포

에서 mitochondrial dehydrogenase에 의해 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1)가 분해되는 것을 측정하여 살아있는 세포의 수나 증식 정도 및 활성 등을 측정하는 방법이다.¹⁸ 각 well의 흡광도는 450 nm에서 Microculture plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 생존율은 아무 처리도 하지 않은 *H. pylori* 감염 AGS 세포를 대조군으로 하여 상대적인 백분율로 나타내었다.

5. 통계 분석

통계 수치는 평균 \pm 표준편차로 표현하였고, 대조군과 실험군의 차이는 Student's t-test를 이용하여 평가하였다. 통계적 유의성은 $p<0.05$ 을 기준으로 하였다.

결 과

1. *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 PPAR γ 발현

Western blot 분석으로 확인한 결과, 아무 처리도 하지 않은 AGS 세포에서 PPAR γ 단백질이 발현되었다. *H. pylori*를 감염시켜 48시간 동안 배양한 후 AGS 세포에서 PPAR γ 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 1).

2. Rosiglitazone이 *H. pylori* 감염 AGS 세포 성장에 미치는 영향

AGS 세포에 *H. pylori*를 감염시켜 24시간 동안 배양한 후 rosiglitazone으로 처리하였을 때 DMSO만 처리한 군과 비교하여 용량 및 시간 의존적으로 *H. pylori* 감염 AGS 세포 성장이 억제되었다. 세포 성장 억제는 rosiglitazone $1\mu\text{M}$ 을 처리한 경우 48시간부터 성장이 억제되었고, rosiglitazone $10\mu\text{M}$ 및 $100\mu\text{M}$ 의 경우에는 24시간부터 억제되었다(Fig. 2).

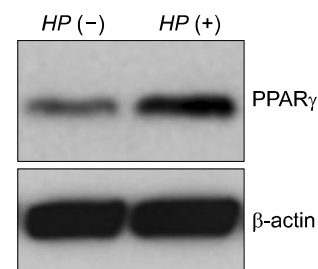


Fig. 1. PPAR γ protein expression in *H. pylori* non-infected and infected AGS cells. Western blot analyses were performed using anti-PPAR γ monoclonal antibody. The PPAR γ protein and β -actin as control expression was detected in *H. pylori* non-infected and infected AGS cells. *H. pylori* infection increased PPAR γ protein expression.

3. Rosiglitazone이 *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 p27과 Skp2 단백 발현에 미치는 영향

아무 처리도 하지 않은 AGS 세포에서 Western blot방법으로 p27 단백질과 Skp2 단백질 발현을 측정하여 densitometry를 이용하여 분석하였을 때 시간에 따른 변화를 보이지는 않았다(Fig. 3A). AGS 세포에 *H. pylori*를 감염시켜 24시간 동안 배양한 후 rosiglitazone 100 μ M을 48시간 동안 처리하였을 때 시간 의존적으로 p27 단백질 발현은 증가하였고 Skp2 단백질 발현은 감소하였다(Fig. 3B). Rosiglitazone을 각각 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M의 농도로 48시간 동안 처리한 후 용량 의존적으로 p27 단백질 발현이 증가하였고(Fig. 4A), Skp2 단백질 발현은 감소하였다(Fig. 4B).

고 찰

이번 연구에서는 *H. pylori*를 감염시킨 AGS 세포에서 PPAR γ 발현을 확인하고, PPAR γ 배위자인 rosiglitazone을 이용한 PPAR γ 활성화가 세포주기 조절인자인 p27 발현에 미치는 영향과 p27 단백질 분해에 관여하는 Skp2 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 이번 연구 결과 *H. pylori* 감염은 AGS 세포에서 PPAR γ 발현을 증가시켜, 이전 연구¹⁹에서 *H. pylori* 위염 환자의 위생검조직에서 PPAR γ 발현이 증가한다는 결과를 AGS 세포에서 다시 입증하였다. *H. pylori*를 감염시켜 배양한 후 rosiglitazone을 처리하였을 때 AGS 세포 성장이 억제되었다. 또한 rosiglitazone 처리는 *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 p27 단백질 발현을 증가시키고 Skp2 단백질 발현을 억제하였다. 이러한 결과는 기존에 보고되었던 PPAR γ 활성화가 악성 종양에서 세포주기 조절인자에 영

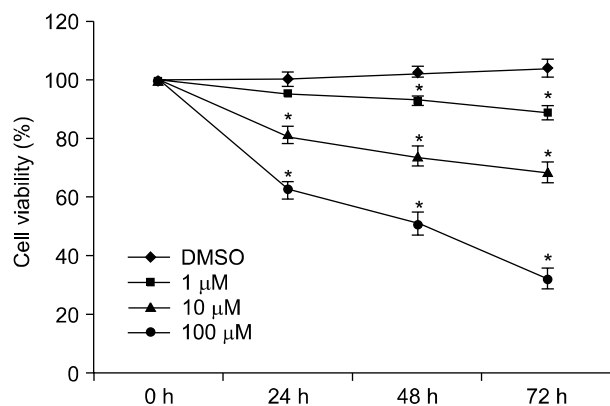


Fig. 2. Effects of rosiglitazone on *H. pylori* infected AGS cell proliferation. Cell proliferation was determined using the WST-1 assay. Rosiglitazone inhibited cell proliferation in *H. pylori* infected AGS cells in a dose- and time-dependent manner (* $p < 0.01$, when compared to vehicle only).

향을 미치는 기전으로 *H. pylori* 감염에서도 영향을 미쳐 세포 전환율을 변화시킬 수 있음을 시사한다.

H. pylori 감염에 의한 위생염의 발생에는 세포 증식과 세포자멸사의 불균형이 관여한다. 비침습적인 세균인 *H. pylori*가 이러한 불균형을 유발하는 데에는 *H. pylori*에 의해 활성화되는 신호전달 경로가 중요한 역할을 한다. *H. pylori*에 감염된 위상피세포주에서 ERK1/2, p38, JNK46 및 JNK54 MAP kinase가 활성화되며, 이러한 신호전달 경로의 활성화는 세포자멸사를 조절하는 것으로 알려져 있다.²⁰ 한편, *H. pylori* 감염은 직접적으로 세포주기 조절인자에 영향을 미치는데 cyclin D1의 활성화와 이에 따른 세포주기의 진행은 악성 변화에 관여하는 중요한 인자이다.²¹ cyclin D1 발현의 증가 외에 CDKI인 p16^{Ink4a}, p53 발현의 증가와 p27^{Kip1} 발현

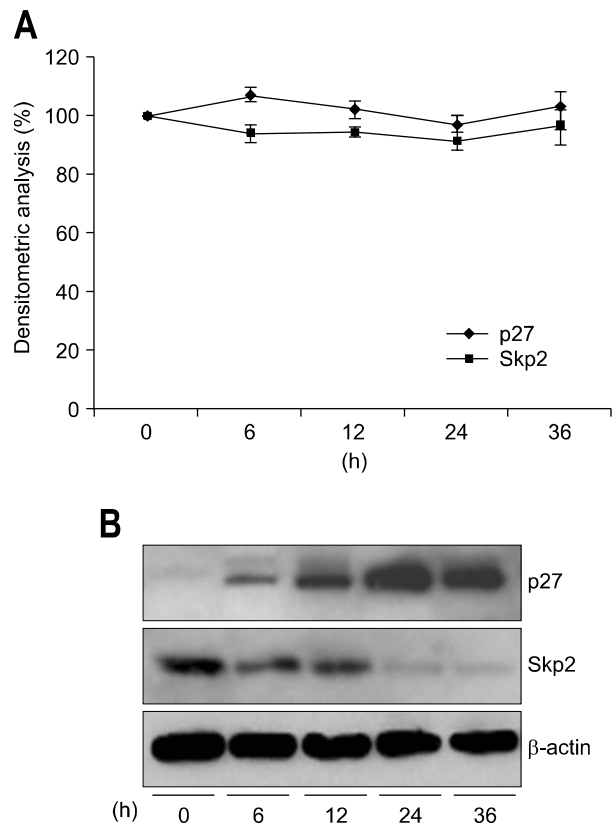


Fig. 3. (A) p27 and Skp2 expression in non-treated AGS cells. Western blot analyses were performed using anti-p27 monoclonal antibody and anti-Skp2 polyclonal antibody. By densitometric analysis, the p27 protein and Skp2 protein expression was detected at several time points after normalization for β -actin. (B) p27 and Skp2 expression in *H. pylori* infected AGS cells by rosiglitazone. The p27 protein, Skp2 protein and β -actin as control expression was detected in *H. pylori* infected AGS cell at several time points after treatment with 100 μ M rosiglitazone for 48 h. Rosiglitazone decreased Skp2 expression and increased p27 expression in *H. pylori* infected AGS cells in time-dependent manner.

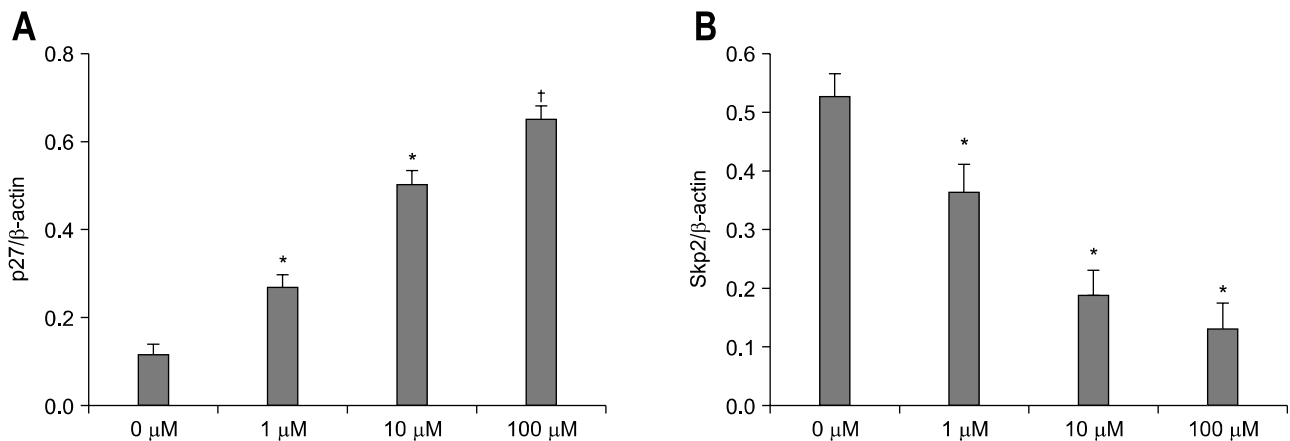


Fig. 4. p27 (A) and Skp2 (B) expression in *H. pylori* infected AGS cells by rosiglitazone. The expression levels of p27 protein and Skp2 protein were shown as densitometric values for the ratio of p27/ β -actin and Skp2/ β -actin, respectively. After 48 h, rosiglitazone decreased Skp2 expression and increased p27 expression in *H. pylori* infected AGS cells in dose-dependent manner. (* $p < 0.01$, † $p < 0.001$, respectively, compared to the control).

의 감소가 *H. pylori* 감염에 의한 세포 증식과 세포자멸사에 관여하는 것으로 알려져 있다.²² 이번 연구에서도 AGS 세포에 *H. pylori*를 감염시켰을 때 p27 단백질 발현이 감소하여 기존의 보고와 유사한 결과를 보였다. p27^{Kip1}은 종양억제 유전자로 대장암, 유방암, 전립샘암, 폐암, 뇌하수체 암종뿐만 아니라 위암에서도 발현이 감소되고 종양의 진행과 역상관계가 있는 것으로 알려져 있다.^{15,16} 악성 종양에서 p27 발현 감소는 주로 ubiquitin-proteasome 경로에 의하여 매개되는 단백질 분해의 증가에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.²³ 그러나 이러한 기전 외에도 전사단계에서의 조절(transcriptional regulation), 촉진자 메틸화(promoter methylation), mRNA 분해, p27 단백질의 세포질 분리(cytoplasmic sequestration) 및 프로테아좀 비의존성 단백질분해 등이 관여한다.¹⁴ *H. pylori* 감염에서 p27 단백질 발현이 감소하는 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 위상피세포에 *H. pylori*를 단기 노출시킨 연구에서 p27 mRNA 발현에는 변화가 없었으며, p27 단백질은 ubiquitin 비의존성, 프로테아좀 의존성 경로를 통해 감소하는 것으로 알려졌다.¹⁰ 그러나 만성 *H. pylori* 감염 모델에서는 mRNA 발현의 감소를 동반하여 p27 발현 감소는 전사 후 단계에서의 조절뿐만 아니라 전사단계에서의 조절에도 관여하는 것으로 생각된다.^{11,24} 또한 *H. pylori*에 의한 만성 위염에서 p27 단백질의 감소는 Skp2와 c-Myc 단백질의 증가와 연관이 있다.¹³ Skp2는 p27 외에도 c-Myc,²⁵ p57^{Kip2},²⁶ Smad4²⁷ 및 E2F-1²⁸ 등 여러 세포 내 단백질 발현을 ubiquitination을 통해 조절하여 프로테아좀 의존성 단백질분해를 증가시킨다. Skp2는 임파종, 구강편평상피암, 대장암 및 위암에서 증가하며, p27 발현과 역상관관계를 보인다.²⁹ 그러나 Skp2 발현의 증가가 ubiquitination을 통하여 p27 단백질의 분해를 증가시키는 지 또는 Skp2가 다른 기전을 통해 p27에 영향을 미치는

지는 확실하지 않다. 최근에는 종양억제 유전자인 Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)이 Skp2 발현을 조절하여 p27 발현에 영향을 미치며, 위암에서 PTEN과 p27 발현의 감소는 Skp2 발현 증가와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.³⁰

PPAR γ 는 다양한 인체 암에서 발현되며, 15d-PGJ₂를 비롯한 PPAR γ 배위자는 세포증식 억제와 세포자멸사를 촉진함으로써 종양세포 성장을 억제할 수 있는 물질로 알려져 있다.⁸ 이번 연구에서 rosiglitazone 처리는 *H. pylori* 감염 AGS 세포의 성장을 억제하였다. Gupta 등³¹은 15d-PGJ₂ 또는 rosiglitazone을 전처치한 후 *H. pylori*를 AGS 세포에 감염시켰을 때 *H. pylori*에 의해 유도되는 세포자멸사가 감소되며, 이는 *H. pylori*에 의한 nuclear factor (NF)- κ B 활성화의 억제와 관련됨을 보고하였다. 그러나 이 연구에서는 AGS 세포를 rosiglitazone으로 전처치한 후 *H. pylori*를 감염시켰고 세포 생존율과 세포주기에 미치는 영향을 분석하지 않아 본 연구의 결과와는 직접적인 비교가 어려울 것으로 생각한다. 이 연구에서 저자들은 PPAR γ 활성화가 정상 위 점막에서는 항 염증 작용과 세포자멸사의 억제를 통해 보호 작용을 하고, 위암에서는 세포자멸사를 유도하며 세포 성장을 억제할 것으로 추정하였으나 이에 대한 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.³² 최근 연구에서 PPAR γ 배위자인 troglitazone이 간암세포에서 CDK1인 p21^{WAF1/Cip1}과 p27^{Kip1}의 발현을 증가시키는 기전으로 G1 세포주기 정지를 일으키는 것으로 보고하였다.^{7,33} 이 연구에서 p21 mRNA의 증가가 있었던 반면, p27^{Kip1}은 mRNA의 변화를 일으키지 않고 단백질 발현만 감소하여 p27 단백질 분해의 감소가 주된 기전으로 제시되었다. 또한 단백질 분해 감소는 Skp2의 하향조절과 연관이 있었다. 이에 이번 실험에서는 기존에 보고된 *H. pylori*

감염에 의한 p27 단백질 발현 감소가 rosiglitazone 처리로 영향을 받는 지와 p27 분해에 관여하는 Skp2 발현과의 상관관계를 알아보기 위하여 *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 rosiglitazone을 처리한 후 p27 단백질과 Skp2 단백질 발현을 측정하여 용량 및 시간 의존적으로 p27 단백질 발현이 증가하고 Skp2 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등¹³이 인체 *H. pylori* 위염에서 *H. pylori* 제균 치료 후 p27 단백질 발현이 증가하고 Skp2 단백질 발현이 감소한다는 결과를 보여준 연구와 일치하였다. 그러나 이번 실험에서 PPAR γ 억제제를 이용하거나 PPAR γ 유전자가 결여된 동물을 이용한 실험을 병행하지는 못하였기 때문에 rosiglitazone이 PPAR γ 의존 경로를 통해 작용하였는지는 확인할 수 없었다. 또한 rosiglitazone 처리가 *H. pylori* 감염 위상피세포의 세포주기와 세포자멸사에 미치는 영향도 확인하지 못한 것이 이번 연구의 제한점이라고 할 수 있다.

결론으로 *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 PPAR γ 단백질 발현이 증가한다. Rosiglitazone 처리는 *H. pylori* 감염 AGS 세포 성장을 억제하고, Skp2 단백질 발현이 감소하여 p27 단백질의 분해를 감소시키는 기전으로 p27 단백질 발현이 증가한다. 향후 인체 *H. pylori* 감염에서 PPAR γ 배위자가 세포주기 조절인자에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

목적: Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)는 핵 수용체로 PPAR γ 배위자는 세포주기 조절인자와 세포자멸사에 관련된 인자의 발현에 영향을 미쳐 악성 종양의 성장을 억제할 수 있다. *H. pylori* 감염에 의한 위샘암의 발생은 위상피세포 증식과 세포자멸사의 불균형이 관여한다. 이에 저자들은 *H. pylori* 감염 위상피세포에서 rosiglitazone이 세포 성장에 미치는 영향과 p27 단백질과 Skp2 단백질 발현에 미치는 영향을 보고자 하였다. **대상 및 방법:** 위상피세포주인 AGS 세포에 *H. pylori*를 감염시킨 후 PPAR γ 발현은 Western blot을 이용하여 측정하였다. Rosiglitazone을 처리한 후 *H. pylori* 감염 AGS 세포의 생존율을 측정하였다. *H. pylori*를 감염시킨 AGS 세포에서 rosiglitazone을 처리한 후 p27 단백질과 Skp2 단백질 발현은 Western blot을 이용하여 측정하였다. **결과:** *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 PPAR γ 발현이 증가하였다. Rosiglitazone 처리는 *H. pylori* 감염 AGS 세포 성장을 용량 및 시간 의존적으로 억제하였다. Rosiglitazone은 *H. pylori* 감염 AGS 세포에서 용량 및 시간 의존적으로 p27 단백질 발현을 증가시켰고 Skp2 단백질 발현을 감소시켰다. **결론:** Rosiglitazone은 *H. pylori* 감염 AGS 세포의 성장을 억제하였다. 또한 p27 단백질 발현을 증가시켰고, 이는 p27 단백질

분해에 관여하는 Skp2 단백질 발현의 감소와 연관이 있었다. 이러한 p27 단백질 발현 증가가 *H. pylori* 감염에서 세포 전환율에 미치는 영향과 위암 발생과의 연관성에 대해서는 추후 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

색인단어: *Helicobacter pylori*; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; p27; S-Phase kinase-associated proteins

참고문헌

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-839.
2. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:237-241.
3. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8806-8811.
4. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1998;58:3344-3352.
5. Sarraf P, Mueller E, Jones D, et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR-gamma. *Nat Med* 1998;4:1046-1052.
6. Leung WK, Bai AH, Chan VY, et al. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on growth and gene expression profiles of gastric cancer cells. *Gut* 2004;53:331-338.
7. Koga H, Sakisaka S, Harada M, et al. Involvement of p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, and p18^{INK4c} in troglitazone-induced cell cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 2001; 33:1087-1097.
8. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* 2004;4:61-70.
9. Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, et al. *Helicobacter pylori* cagA⁺ strains and dissociation of gastric epithelial proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:863-868.
10. Eguchi H, Herschenhou N, Kuzushita N, Moss SF. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27^{Kip1} in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:4739-4746.
11. Shirin H, Sordillo EM, Kolevska TK, et al. Chronic *Helico-*

- bacter pylori* infection induces an apoptosis resistant phenotype associated with decreased expression of p27^{Kip1}. Infect Immun 2000;68:5321-5328.
12. Yu J, Leung WK, Ng EK, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. Aliment Pharmacol Ther 2001;15:1505-1511.
13. Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after *H. pylori* eradication in chronic gastritis. Mod Pathol 2006;19:49-58.
14. Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27^{Kip1}: regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. Exp Cell Res 2001;264:148-168.
15. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, et al. p27 expression and gastric carcinoma. Nat Med 1997;3:593.
16. Ohtani M, Isozaki H, Fujii K, et al. Impact of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} and apoptosis in tumor cells on the overall survival of patients with non-early stage gastric carcinoma. Cancer 1999;85:1711-1718.
17. Martin E, Cacheux V, Cavé H, Lapierre JM, Le Paslier D, Grandchamp B. Localization of the CDKN4/p27^{Kip1} gene to human chromosome 12p12.3. Hum Genet 1995;96:668-670.
18. Wagner S, Beil W, Westermann J, et al. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis. Gastroenterology 1997;113:1836-1847.
19. Son SH, Kim HK, Ji JS, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelium. Korean J Gastroenterol 2007;49:72-78.
20. Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM Jr, Murray PG, Kelly CP. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag⁺ and cag⁻ *Helicobacter pylori*. J Immunol 1999;163:5552-5559.
21. Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, et al. *Helicobacter pylori* activates the cyclin D1 gene through mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. Infect Immun 2001;69:3965-3971.
22. Shirin H, Sordillo EM, Oh SH, et al. *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. Cancer Res 1999;59:2277-2281.
23. Loda M, Cukor B, Tam SW, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. Nat Med 1997;3:231-234.
24. Eguchi H, Carpentier S, Kim SS, Moss SF. p27^{Kip1} regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. Gut 2004;53:797-804.
25. von der Lehr N, Johansson S, Wu S, et al. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. Mol Cell 2003;11:1189-1200.
26. Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, et al. Degradation of p57^{Kip2} mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10231-10236.
27. Liang M, Liang YY, Wrighton K, et al. Ubiquitination and proteolysis of cancer-derived Smad4 mutants by SCF^{Skp2}. Mol Cell Biol 2004;24:7524-7537.
28. Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF^{SKP2} and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. Nat Cell Biol 1999;1:14-19.
29. Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, et al. Clinical and biological significance of *S-phase kinase-associated protein 2* (*Skp2*) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. Cancer Res 2002;62:3819-3825.
30. Ma XM, Liu Y, Guo JW, Liu JH, Zuo LF. Relation of overexpression of S phase kinase-associated protein 2 with reduced expression of p27 and PTEN in human gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2005;11:6716-6721.
31. Gupta RA, Polk DB, Krishna U, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. J Biol Chem 2001;276:31059-31066.
32. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer 2002;2:28-37.
33. Koga H, Harada M, Ohtsubo M, et al. Troglitazone induces p27^{Kip1}-associated cell-cycle arrest through down-regulating Skp2 in human hepatoma cells. Hepatology 2003;37:1086-1096.