

ORIGINAL ARTICLE

# *Helicobacter pylori* 감염 위 점막 조직에서 단백질 발현 양상에 대한 연구

강호석<sup>1</sup>, 홍성노<sup>3</sup>, 박혜림<sup>2</sup>, 권미정<sup>2</sup>, 이준행<sup>3</sup>, 김재준<sup>3</sup>

한림대학교 의과대학 한림대학교성심병원 내과학교실<sup>1</sup>, 병리학교실<sup>2</sup>, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내과학교실<sup>3</sup>

## Proteomics Analysis for *Helicobacter pylori*-infected Gastric Mucosa

Ho Suk Kang<sup>1</sup>, Sung Noh Hong<sup>3</sup>, Hye Rim Park<sup>2</sup>, Mi Jung Kwon<sup>2</sup>, Jun Haeng Lee<sup>3</sup> and Jae J. Kim<sup>3</sup>

Departments of Internal Medicine<sup>1</sup> and Pathology<sup>2</sup>, Hallym University Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Anyang, Department of Internal Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul<sup>3</sup>, Korea

**Background/Aims:** *Helicobacter pylori* infection is linked to the development of gastric cancer. *H. pylori*-associated gastric inflammation is considered to be the first important step in the histogenesis of such neoplasia. However, studies that compare proteome of gastric mucosa infected with or without *H. pylori* are lacking.

**Methods:** We employed proteomics analysis on the endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa obtained from two groups (30 cases): healthy subjects without *H. pylori* infection (15 cases), and gastritis patients with *H. pylori* infection (15 cases). The pooled proteins obtained from gastric mucosa infected with or without *H. pylori* were separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by a computer-aided program. The altered protein expressions were then identified by mass spectrometry and validated by Western blotting and immunohistochemistry.

**Results:** On mass spectrometry using MALDI TOF<sup>TM</sup> Analyzer, the up-regulation of Keratin 1, ezrin, adenosine triphosphate (ATP) synthase subunit alpha mitochondrial isoform c, Keratin type I cytoskeletal 19, and Keratin type I cytoskeletal 9 were identified; in contrast, 71 kd heat shock cognate protein, ATP synthase subunit alpha mitochondrial precursor, and annexin IV were down-regulated. Among them, membrane cytoskeleton linker ezrin was validated using Western blot and immunohistochemistry.

**Conclusions:** Expression of ezrin was significantly different between the gastric mucosa with and without *H. pylori* infection. Therefore, ezrin could be considered a promising potential molecular marker for detecting *H. pylori* infection in gastric mucosa. (Korean J Gastroenterol 2014;64:10-17)

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Proteomics; Ezrin; Stomach neoplasms; Gastritis

## 서론

*Helicobacter pylori* 감염은 부인할 수 없는 위점막 손상의 가장 주요한 원인이다.<sup>1</sup> *H. pylori*가 처음으로 동정되기 전에는 위산분비 증가에 의한 화학적 염증이거나 직접적 손상이 위점막 염증의 제일 주요한 요인으로 간주되어 위산분비 조절에

임상적 관심이 맞추어져 있었다.<sup>2</sup> 하지만, 위산분비가 높지 않음에도 불구하고 위궤양을 비롯한 위점막 염증이 존재하여 위산만으로는 위암의 발생과 진전을 설명할 수 없었으며, 병리학적 위염의 존재에 대한 정확한 의미를 부여할 수 없었다. *H. pylori*가 동정된 이후 위점막 손상의 가장 주요한 원인이자 위암 발암 과정을 시작하는 요인으로 입증되어 *H. pylori*

Received January 17, 2014. Revised May 7, 2014. Accepted May 16, 2014.

© 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: 홍성노, 135-710, 서울시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 소화기내과

Correspondence to: Sung Noh Hong, Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea. Tel: +82-2-3410-3409, Fax: +82-2-3410-3849, E-mail: gjsnhong@gmail.com

Financial support: This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2012R1A1A1005646). Conflict of interest: None.

에 대한 질환 연관 병태생리는 물론 유전성 다형성, 세균 독성 물질, 세균 다양화, 위장 이외 질환과의 연관성까지도 매우 많은 연구가 진행되었다.<sup>1,3-6</sup>

그럼에도 불구하고, 아직까지는 모든 *H. pylori*를 제균해야 하는지, 발암 과정에 대한 보다 뚜렷한 기전 및 이를 바탕으로 어떻게 예방해야 하는지 등 해결되지 않은 면이 많다.<sup>7-10</sup> 이러한 문제를 극복하기 위해 -omics (생물학적 대단위)적인 접근이 시도되었으며, *H. pylori*에 감염된 위점막의 단백질 분석은 발암 과정과 연관되는 분자표지인자 등을 파악하는 데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.<sup>11</sup> 따라서, 본 연구는 내시경 조직검사로 얻은 *H. pylori* 감염 환자의 위점막에 대해 단백질 분석을 실시하여 *H. pylori* 감염과 연관되어 발현에 차이를 보이는 단백질을 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 검체 모집과 선별

본 연구는 건국대학교병원 헬스케어센터에서 선별검사를 위해 상부위장관내시경 검사를 받은 수진자 중에서 내시경 조직검사를 시행받고 일부 조직 검체를 건국대학교병원 인체유래물은행에 기탁을 동의한 수진자의 위점막 조직을 위전정부 또는 위하체부의 전벽에서 얻어 진행되었다. 위탁된 조직 검체는 연구 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동 보관되었다. *H. pylori* 감염은 Giemsa 염색을 통한 조직학적 평가와 신속 요소분해효소검사(CLOtest<sup>®</sup>; Delta West, Australia, manufactured by Korea Green Cross Medical Science, Eumseong, Korea) 모두에서 양성으로 나온 경우 *H. pylori* 감염이 있다고 정의하였다.<sup>12</sup> 이를 기준으로 *H. pylori* 양성 위점막 조직 15예와 *H. pylori* 음성 위점막 조직 15예를 분양받았다. 단백질 분석 후 *H. pylori* 감염에 따라 발현의 차이를 보이는 단백질의 검증은 한림대학교성심병원에서 진단 목적으로 상부위장관검사를 받은 환자의 위점막 검체를 이용하였다. 본 연구는 한림대학교성심병원 임상시험연구윤리위원회에서 승인받았다.

### 2. 단백질 분리와 2차원 전기 영동

냉동 보관되었던 검체는 *H. pylori* 감염군과 비감염군(대조군)별로 통합되어 초음파 분쇄를 시행한 후에 10% trichloroacetic acid가 포함된 acetone용액에  $-20^{\circ}\text{C}$  이하로 하루 동안 냉동 보관하였다. 이후 용액을 원심 분리 후 상층액을 제거한 후에 다시 동량의  $-20^{\circ}\text{C}$  acetone을 첨가하여 10분간 기다린 후, 고형성분을 제거하기 위하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 한 시간 동안 원심 분리하였다. 부유물을 새로운 튜브로 옮기고 Bradford 방법으로 단백질의 농도를 측정하였다.<sup>13</sup> 얻어진 단백질은 lysis buffer에 녹여 180 mm immobilized pH gradient strip

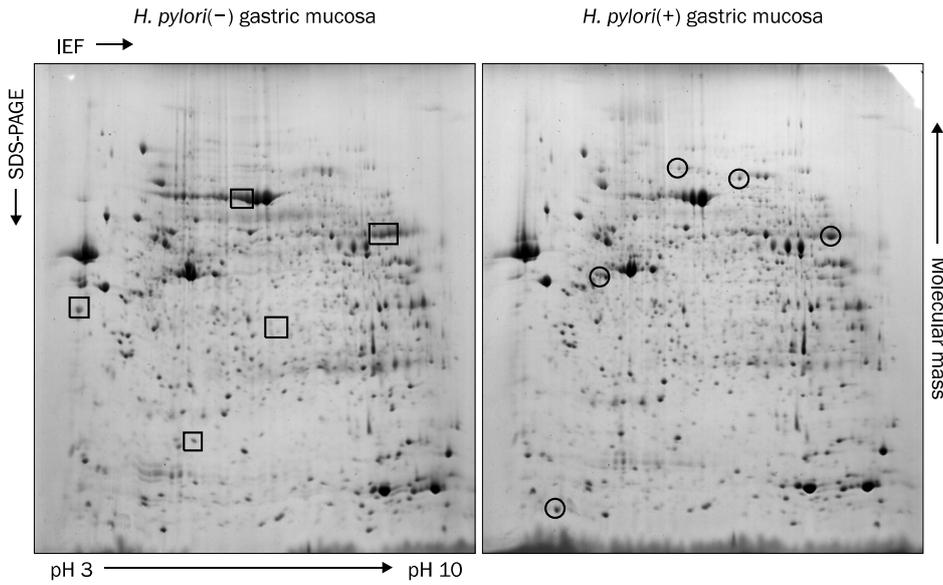
(Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 넣고 rehydration 과정을 10시간 가량 시행했다. Rehydration 후 isoelectric focusing (IEF)을 100 V에서 한 시간, 300 V에서 한 시간, 600 V에서 한 시간, 1,000 V에서 한 시간, 2,000 V에서 한 시간, 3,500 V에서 22시간 동안 시행하였다. IEF가 끝난 후 strip을 6 M urea, 20% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% bromophenol blue (BPB), 10 mM tributyl phosphine이 함유된 용액에서 equilibration을 시행하였다. 이후 strip을 증류수로 씻고 건조시킨 후 12% SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) 겔 위에 중층시켰다. 나머지 공간은 전기영동 완충액에 녹인 0.7% low melting agarose로 충전하였다. 전기영동 완충액을 채운 후 28 mA에서 BPB가 겔의 제일 아래에 닿을 때까지 하룻밤 전기영동을 실시하였다.

### 3. 2차원 전기영동 겔의 영상 분석과 단백질 반점 선택

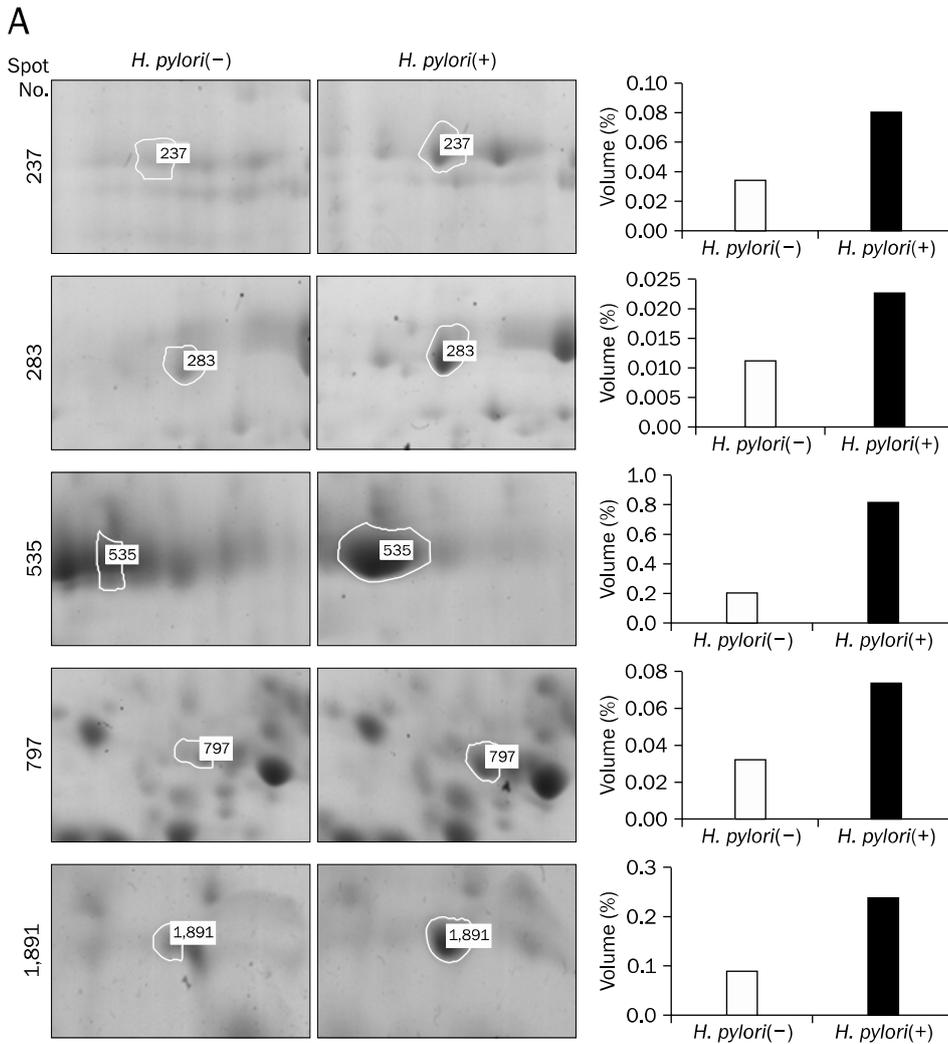
2차원 전기영동 겔의 이미지는 Fluor-S multi Imager (Bio-rad Laboratories)를 사용하여 스캔하고, Image Master 5 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 단백질 반점(spot)의 정위적 및 정량적 분석을 시행하였다. 이를 통해 *H. pylori* 감염군과 대조군 사이의 단백질 발현의 차이가 두 배 이상 나는 단백질 반점을 구분하였다. 이중 상대적 발현 정도의 차이가 큰 순서에 따라서 *H. pylori* 감염군에서 과발현된 단백질 반점 5개와 저발현된 단백질 반점 5개를 선택하였다. 선택된 단백질 반점이 포함된 겔 조각을 잘라내어 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 와 아세트오닐트릴 내에서 10분 동안 교반하였다. 교반 과정을 2-3회 반복한 상층액을 제거하고 건조시켰다. 이후 10  $\mu\text{L}$  trypsin이 포함된 효소반응액에서 rehydration 후 효소 반응액을 제거하고  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 12-16시간 동안 시료를 정치하였다.

### 4. 단백질 질량 분석

시료를 매트릭스 용액에 녹이고 MALDI plate (Opti-TOF<sup>™</sup> 384-well Insert; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 점적한 후 건조 및 세척을 실시하였다. 펩타이드 질량 분석은 20 kV accelerating voltage, 500 laser pulse의 조건으로 MALDI TOF<sup>™</sup> Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 시행하였으며, 질량(m)과 전하(z)의 비(m/z)가 842.5090과 2,211.1046인 trypsin auto-digested peak를 이용하여 spectrum을 교정하였다. Mono-isotopic peptide mass는 Data Explorer 4.4 (PerSeptive Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 질량을 측정하였다. Matrix Science search engine (<http://www.matrixscience.com>)을 이용하여 측정된 펩타이드의 질량을 Swiss-Prot version 49.6 data-



**Fig. 1.** Two-dimensional gel electrophoresis profiles of *Helicobacter pylori*(-) stomach and *H. pylori*(+) nodular gastritis. A total of 100 µg of whole-cell protein from each strain was applied on 170-mm immobilized pH gradient strips with a range of pH 3-10, followed by 12% sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), and visualized by silver staining (up-regulated 5 protein spots [round] and down-regulated 5 protein spots [square] in *H. pylori* infected gastric mucosa are indicated at figure). IEF, isoelectric focusing.



**Fig. 2.** Up- (A) and down (B)-regulated protein spots in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa of 2-dimensional gel electrophoresis map. Circles indicate the differentially expressed proteins whose expression level was at least more than two times higher than the other group. The expression level was determined by the relative spot volume of the proteins compared to the total amount of the protein in the gel, and is expressed as the percentage volume (right panel).

base와 National Center for Biotechnology Information database 자료를 바탕으로 분석하여 단백체를 확인하였다.

5. Western blot과 면역화학염색

단백체 분석을 통해서 확인된 단백질이 *H. pylori* 감염군과 대조군에서 추출한 단백질에 존재하는지를 확인하기 위해, 추출한 단백질을 정량하고 10% SDS-PAGE를 이용하여 동량의 단백질을 전기영동하였다. 분리된 단백질은 니트로 셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 100 V에서 2시간 동안 전이시켰다. 단백질 분석을 통해서 확인된 단백질에 대한 단클론 항체를 1차 항체로 사용하여 1시간 동안 반응시키고, 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 실온에서 45분간 반응시켰다. 단백질 밴드(band)는 암실에서 ECL detection kit (Abcam, Amersham, UK)로 발현을 시켰다. 각각의 밴드 밀도는 scanning laser densitometer (GS-700; Bio-Rad)를 통해 얻었으며, Molecu-

lar Analyst Software (Bio-Rad)를 이용하여 분석하였다. 면역조직화학 염색은 단백질 분석을 통해서 확인된 단백질이 위점막 조직에서 발현되는지 검증하기 위해 내시경 조직검사 검체를 10% 중성 포르말린에 고정하고, 파라핀 절편을 만들어 슬라이드를 제작하였다. 면역조직화학 염색은 Avidin-Biotin Complex Elite kit (Santa Cruz Biotechnology)를 이용하였다. 조직절편은 파라핀을 제거한 후, 내재성 과산화효소를 제거하기 위해 0.3% 과산화수소에서 20분간 침적하였다. 그 후 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 blocking goat serum을 30분간 반응시켰다. 이를 제거한 후 1차 항체로 1시간 실온에서 반응시킨 후 biotinylated anti-rat IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 실온에서 45분간 반응시켰다. 이어서 Avidin-Biotin Complex reagents (Santa Cruz Biotechnology)로 45분간 실온에서 반응시켰으며, 면역반응이 끝난 조직은 3, 3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) 용액으로 발색시켰다. 각 단계 사이에는 phosphate-buffered saline으로 충분히 세척하였다. 양성반응을 나타낸

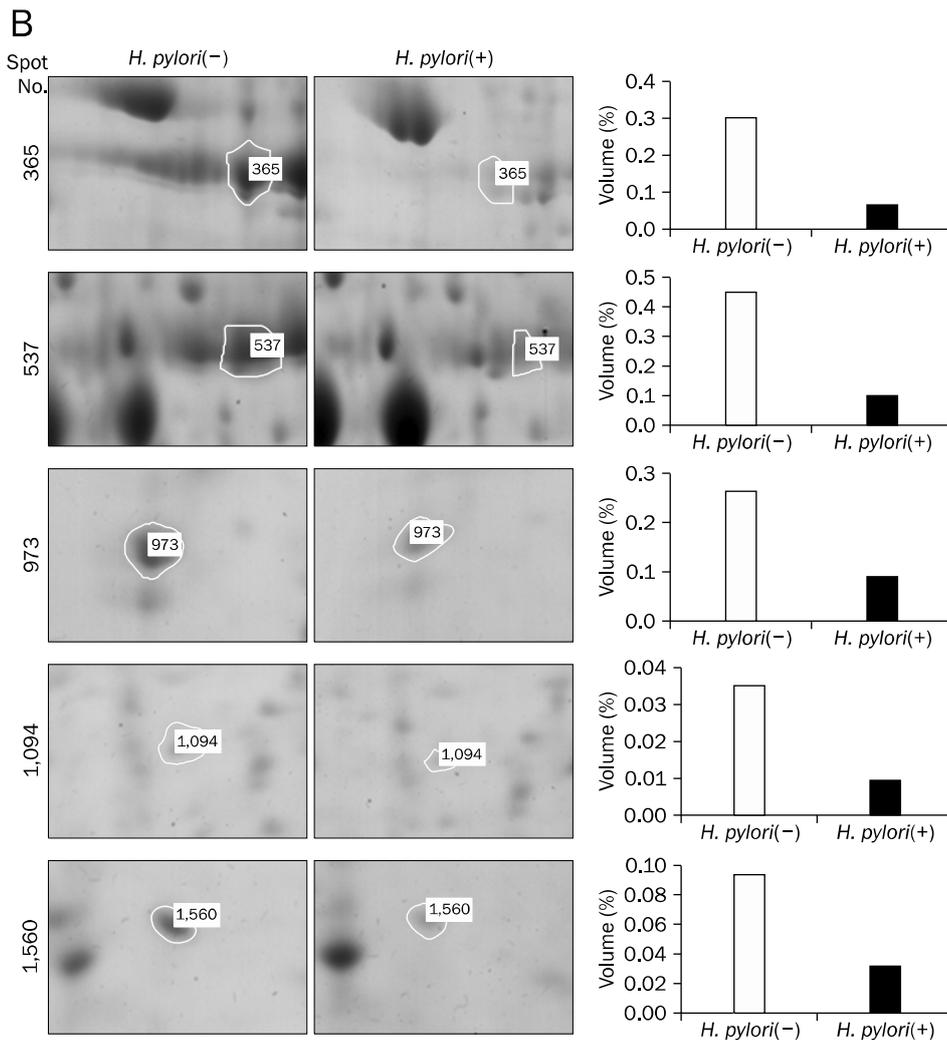


Fig. 2. Continued.

조직을 헤마톡실린(hematoxylin; Sigma-Aldrich) 용액으로 대조염색하고, 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

총 30명의 피험자가 모집되었으며 *H. pylori* 양성 환자 15명(남 8명/여 7명)과 음성 15명(남 6명/여 7명)의 검체를 모았다. 각 군에서 성별 및 나이(43.46±4.56세 vs. 41.60±6.48세)에서의 유의한 차이는 없었다.

*H. pylori* 감염군과 대조군의 겔 이미지(proteome map)를 상호 비교한 결과 발현 강도가 서로 다른 다수의 단백질 반점이 확인되었다(Fig. 1). 총 777개의 단백질 반점을 상호 비교하였으며 단백질 발현강도가 2배 이상 차이를 나타내는 단백질 반점 중 *H. pylori* 양성 위점막에서 발현이 가장 증가한 5 단백질 반점과 가장 발현이 감소한 5 단백질 반점을 선택하였다(Fig. 2A, B). MALDI TOF™ Analyzer를 이용하여 이들 10개의 단백질 반점의 질량을 분석하여 보았을 때 Keratin 1, ezrin, ATP synthase subunit alpha mitochondrial isoform c, Keratin type 1 cytoskeletal 19 및 Keratin type I cytoskeletal 9 등이 *H. pylori* 양성 위점막에서 *H. pylori* 음성 대조군에 비하여 발현강도가 높았다. 반면 *H. pylori* 양성 위점막에서 음성 위점막에 비해 낮은 발현 강도를 보인 단백질체는 71 kd heat shock cognate protein, ATP synthase subunit alpha mitochondrial precursor, annexin IV (placental anticoagulant protein II) 등이었다(Table 1).

이들 단백질 중에서 ezrin의 발현을 Western blot과 면역

화학염색을 통해 확인하였다. Western blot에서 *H. pylori* 양성 위점막에서 추출한 단백질에서 ezrin의 발현은 β-actin으로 교정하였을 때 *H. pylori* 음성 위점막에서 추출한 단백질에서 보다 증가되어 있었다(Fig. 3). 면역화학염색에서도 *H. pylori* 양성 위점막과 음성 위점막 모두에서 ezrin이 염색되었지만, 양성 위점막에서 ezrin의 염색 강도가 더 진하게 관찰되었다(Fig. 4). Western blot과 면역화학염색을 통해 ezrin의 발현이 *H. pylori* 양성 위점막에서 증가함을 확인하였다.

## 고 찰

최근의 연구에서는 숙주와 *H. pylori* 사이의 상호 작용을 이해하는 것이 *H. pylori* 양성 위장질환의 병인을 명확하게 하며, 예방 및 치료를 위한 새로운 전략을 세우는 바탕이 될 것이라고 예측하고 있다.<sup>14</sup> 이러한 숙주와 *H. pylori* 사이의 상호 작용에 대한 여러 가지 연구방법 중, 단백질체 분석(pro-

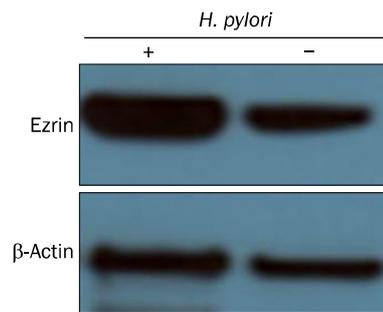


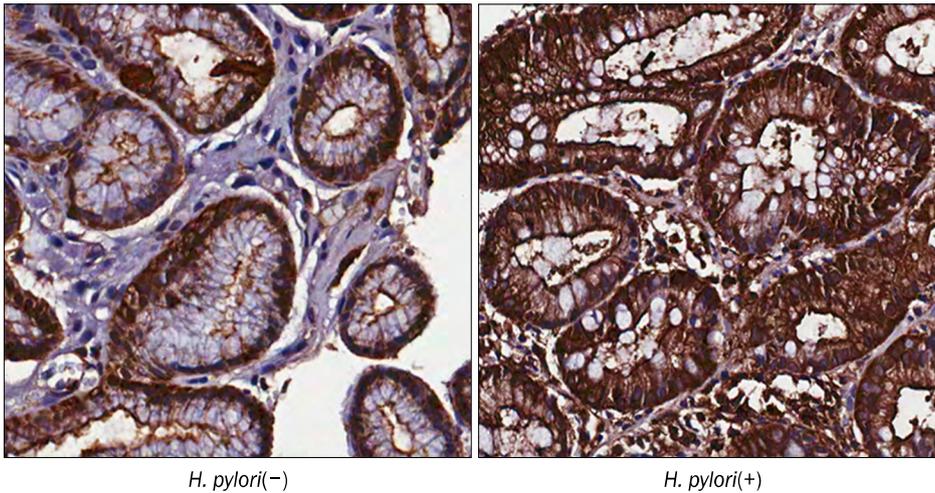
Fig. 3. Western blot for ezrin in gastric mucosa infected with and without *Helicobacter pylori*.

Table 1. Up- and Down-regulated Proteins Analyzed with MALDI TOF™ Mass Spectrometry

	Spot no.	Accession no.	MOWSE score	Masses matched	Protein MW (Da)	Protein name : Human	Up-/Down-regulation fold
Up-regulated spot	237	gi 55956899	87	16	62,255	Keratin 1 [Homo sapiens]	+ 2.4
	283	gi 46249758	168	36	69,313	Ezrin [Homo sapiens]	+ 2.2
	535	gi 4757810	130	22	54,574	ATP synthase subunit alpha mitochondrial isoform c [Homo sapiens]	+ 4.0
	797	gi 24234699	274	35	44,079	Keratin, type I cytoskeletal 19 [Homo sapiens]	+ 2.3
Down-regulated spot	1,891	gi 55956899	103	17	62,255	Keratin, type I cytoskeletal 9	+ 2.9
	365	gi 5729877	91	21	71,082	71 kd heat shock cognate protein [Homo sapiens]	- 4.2
	537	gi 4757810	75	15	59,828	ATP synthase subunit alpha mitochondrial precursor	- 4.2
	973	gi 544492	43	1	62,681	Lymphoid-restricted membrane protein [Homo sapiens]	- 2.8
	1,094	gi 39645467	109	20	36,290	Annexin IV (placental anticoagulant protein II) [Homo sapiens]	- 4.1
	1,560	gi 117938314	66	11	21,023	Unnamed protein product [Homo sapiens]	- 3.0

MALDI-TOF™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

MOWSE, molecular weight search; MW, molecular weight; ATP, adenosine triphosphate.



**Fig. 4.** Immunohistochemistry for ezrin in gastric mucosal infected with and without *Helicobacter pylori* ( $\times 100$ ).

teomics)은 상호 작용의 매개체가 될 수 있는 단백질 발현의 차이를 발견할 수 있어 *H. pylori* 감염과 연관된 위장질환을 연구하는 데 유용한 도구로 사용될 수 있다. 하지만 이에 대한 연구는 대부분 인체위선암세포(AGS 세포)를 이용한 *in vitro* 연구였으며,<sup>15-17</sup> *in vivo*로 시행된 2개의 연구에서는 oxidative-stress-mediated cell damage에 관여하는 단백질<sup>18</sup> 또는 annexin A4가 *H. pylori* 양성 위암의 분자표지인자라고 주장하였다.<sup>19</sup>

본 단백질 분석 연구는 *in vivo* 연구로 *H. pylori* 양성과 음성 위점막의 비교를 통하여 *H. pylori* 양성 위점막에서 ezrin 단백질의 과발현을 확인하였다. 타 연구 결과를 통해 고찰하여 보면, ezrin은 membrane cytoskeleton linker로 ezrin-radixin-moesin family에 속한다. Human ezrin gene은 chromosome 6q25.2-q26에 위치하고 있으며, 총 mRNA의 길이는 3,166 bp이고 585개의 아미노산을 encoding한다. Ezrin 단백질은 주로 세포질에 위치하고 있으나, 분열(migrating)하는 세포에서는 주로 세포벽 쪽에 분포하며,<sup>20</sup> 주로 세포 부착(adhesion), 생존(survival)과 운동(motility) 등의 세포 골격 관련 기능(cytoskeletal-related function)을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>21,22</sup> 최근 들어 ezrin이 종양의 발생과 악화에 기여한다는 보고가 많이 있으며 특히 골육종, 흑색종, 연조직육종, 성상세포종, 폐암과 자궁내막암 등 예후가 좋지 않은 침습암에서 발현이 증가되어 있는 것이 확인되었다.<sup>23-28</sup> Elzagheid 등<sup>29</sup>에 따르면 74명의 진행성 대장암 환자에서 ezrin 단백질 발현을 분석해 보았을 때 62명(83.7%)에서 과발현이 관찰되었고, 이들은 대장암의 나쁜 예후와 관련이 있었다. 위암과 관련해서 2004년 Lim 등<sup>17</sup>은 *H. pylori*-감염 AGS 세포에서 단백질 분석을 하였을 때 ezrin 단백질의 과발현을 발견하였다. 또한, ezrin gene을 RNA interference로 억제(knockdown)시켰을 때 *H. pylori*에 감염된 AGS 세포의 운동과 침투성이

감소하는 것으로 나타났다.<sup>30</sup> 따라서 Lim 등<sup>17</sup>은 *H. pylori* 감염으로 인한 ezrin 과발현이 위암에서 중요한 역할을 한다고 주장하였으며, 이는 ezrin이 radixin과 moesin 등과 같은 단백질과 함께 위상피 세포의 세포-세포 또는 세포-세포 외 매트릭스의 부착을 증가시켜 악성세포의 침투성을 감소시킨다고 생각되지만, 오히려 ezrin의 과발현이 세포의 합성과 분해의 불균형을 유발하여 세포 극성(polarity) 변화를 가져오고 결국 이것이 종양 세포의 이동, 부착, 침투를 유발한다고 하였다.<sup>17</sup> Lam 등<sup>31</sup>에 의하면 150명의 위암 환자들에게서 ezrin 발현을 분석하였을 때 33명(22.0%)에서 ezrin 저발현, 92명(61.3%)에서 중등도 발현, 25명(16.7%)에서 과발현되어 있는 것을 보고하였다. 그리고 ezrin이 위암의 분화도 및 병기와 관계가 없으며 림프절 전이와만 관계있다는 연구도 있었지만,<sup>32</sup> Zhao 등<sup>33</sup>과 Li 등<sup>34</sup>은 ezrin 양성 위암 조직에서 환자의 나이가 많을수록, 병변의 크기가 클수록(5 cm 이상), 병리 소견이 diffuse type의 Lauren 분류일수록, 침습 깊이가 깊을수록 또는 림프절 전이 또는 원격 전이가 있을수록 ezrin 과발현이 유의하게 관찰됨을 발견하였다. 26개의 정상 위점막, 23개의 이형성 위점막, 277개의 위암의 조직에서 ezrin 발현의 여부를 관찰한 최근의 연구에서는,<sup>20</sup> ezrin 발현율이 정상 위점막(19.2%)에 비하여 이형성 위점막(65.5%) 또는 위암(79.8%)에서 높다는 것을 밝혔다. 특히 전이성 위암의 경우 비전이성 위암에 비하여 발현율이 높으며(91.3% vs. 35.1%,  $p < 0.01$ ), 위암의 병기와도 유의한 관계가 있다고 하였다(stage 0: 35.9%, stage IA: 25.5%, stage IB: 45.1%, stage II: 78.7%, stage III: 91.5%, stage IV: 100%). 그리고 3년간 추적 관찰하였을 때 무병 생존율(disease free survival)과도 유의한 상관 관계가 있었다(92.0% vs. 34.9%). 따라서 ezrin 과발현은 *H. pylori* 감염과 관계있으며, gastric carcinogenesis를 촉진(aggravation)시키고, 림프절 전이 또는 원격 전이 등 위암의 나쁜

에후에 관여한다고 생각할 수 있겠다. 여기에 본 연구의 결과를 같이 고려하였을 때, ezrin의 과발현 시기는 위암이 발생한 후가 아닌 일반적인 *H. pylori* 위염의 시기부터라고 볼 수 있겠다. 하지만 모든 위암 환자나 *H. pylori* 위염 환자에서 ezrin 과발현이 관찰되지 않는 이유와 그 비율이 얼마인지에 대해서는 본 연구에서는 알 수가 없었다. 따라서 향후 ezrin의 과발현에 관여하는 환경 유전학적 숙주 요인과 *H. pylori* 균주 간에 ezrin 발현율의 차이가 있는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이번 연구에서는 ezrin 이외에 Keratin 1, ATP synthase subunit alpha mitochondrial isoform c, 71 kd heat shock cognate protein와 annexin IV의 발현이 증가 또는 감소됨을 발견하였다. 하지만 keratin은 검체의 contamination에 의한 것이며, ATP synthase subunit alpha mitochondrial isoform c과 71 kd heat shock cognate protein은 cell membrane의 유지에 기본적으로 관여하는 단백질로 판단하여 임상적으로 의미 있는 단백질 발현으로 생각하지 않았다. 반면 이번 연구에서는 annexin A4가 *H. pylori* 양성 위점막에서 음성 위점막에 비해 낮은 발현 강도를 보이는 것을 발견하였는데, annexin A4는 calcium-dependent phospholipid binding protein인 annexin family 중 하나이며 확실한 역할은 알려져 있지 않지만 exocytotic 및 endocytotic pathways를 따라 나타나는 membrane-related events에 관여한다고 알려져 있다. 하지만 이번 연구의 결과와는 다르게 Lin 등<sup>39</sup>의 연구에서는 *H. pylori* 양성인 위암에서 *H. pylori* 양성인 정상 조직에 비하여 annexin A4의 과발현이 관찰되었다. 이에 Lin 등<sup>36</sup>은 annexin A4는 *H. pylori* 인한 점막 손상을 repair하고 세포 성장 속도를 촉진시키는 역할을 하며, 따라서 장기간의 *H. pylori* 감염으로 인한 plasma membrane의 수복 과정은 annexin A4의 과발현을 가져오고 이는 oncogenic potential에 관련된 역할을 할 것이라고 주장하고 있다. 따라서 본 연구의 결과와 함께 고찰해 보았을 때, annexin A4에 대한 추가적인 연구가 추후 필요할 것으로 생각된다.

이번 연구의 장점은 MALDI TOF<sup>TM</sup> Analyzer를 이용한 질량 분석, Western blot과 면역화학염색 등으로 ezrin 과발현을 다양한 방법으로 확인한 것이다. 하지만 *H. pylori* 감염에 대한 균주 간의 다양성을 고려하지 않았으며, 샘플수가 적은 점이 이번 연구에서 보완할 점이다. 따라서 좀 더 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되지만, *H. pylori* 감염 위점막에서는 세포 부착과 이동에 관여하는 ezrin 단백질의 활성화는 흥미로운 결과이다. 그러므로 ezrin은 향후 *H. pylori* 연관 위염의 분자표지인자 등으로 사용될 수도 있으며, 위암과의 연관성을 고려하여 보았을 때 위암의 잠재적인 예후 인자 및 치료 방법의 개발에 도움이 될 것으로 기대된다.

## 요 약

**목적:** *H. pylori*는 위점막 손상과 위암 발암 과정을 시작하는 요인으로 생각된다. 이번 연구는 *H. pylori* 감염 위점막의 단백질 분석(proteomics)을 통해 *H. pylori* 감염과 연관되어 발현에 차이를 보이는 단백질을 확인하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 상부위장관검사를 이용하여 *H. pylori* 양성 위점막 조직 15예와 *H. pylori* 음성 위점막 조직 15예를 얻었다. 이에 대해 단백질 분리, 2차원 전기영동, 그리고 단백질 질량 분석을 시행하였다.

**결과:** *H. pylori* 양성 위점막에서 Keratin 1, ezrin, ATP synthase subunit alpha mitochondrial isoform c, Keratin type I cytoskeletal 19 등의 단백질이 과발현됨을 확인하였고, 반면 71 kd heat shock cognate protein, ATP synthase subunit alpha mitochondrial precursor, annexin IV 등이 저발현됨을 확인하였다. 이들 단백질 중 Western blot과 면역화학염색을 통해 ezrin의 발현이 *H. pylori* 양성 위점막에서 증가함을 다시 한번 확인하였다.

**결론:** 이번 연구는 ezrin 단백질이 향후 *H. pylori* 연관 위염의 분자표지인자 등으로 사용될 수 있음을 제시하였다.

**색인단어:** 헬리코박터 파일로리; 단백질 분석; 이즈린; 위암; 위염

## REFERENCES

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-1315.
2. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9 (Suppl 2):33-39.
3. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994;89(8 Suppl):S116-S128.
4. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-1186.
5. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127-1131.
6. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789.
7. Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:653-659.
8. Lochhead P, El-Omar EM. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:281-297.
9. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007;133:659-672.
10. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 poly-

- morphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402.
11. Wu MS, Chow LP, Lin JT, Chiou SH. Proteomic identification of biomarkers related to *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease: challenges and opportunities. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1657-1661.
  12. Hong SN, Jo S, Jang JH, et al. Clinical characteristics and the expression profiles of inflammatory cytokines/cytokine regulatory factors in asymptomatic patients with nodular gastritis. *Dig Dis Sci* 2012;57:1486-1495.
  13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
  14. Wu MS, Chen CJ, Lin JT. Host-environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development of new approaches to prevent and treat gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1878-1882.
  15. Cho SO, Lim JW, Jun JH, Kim KH, Kim H. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate expressed proteins differentially in human gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci* 2010;55:1550-1564.
  16. Chan CH, Ko CC, Chang JG, et al. Subcellular and functional proteomic analysis of the cellular responses induced by *Helicobacter pylori*. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:702-713.
  17. Lim JW, Kim H, Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim KH. Cellular stress-related protein expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1624-1634.
  18. Baek HY, Lim JW, Kim H, et al. Oxidative-stress-related proteome changes in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Biochem J* 2004;379:291-299.
  19. Lin LL, Chen CN, Lin WC, et al. Annexin A4: a novel molecular marker for gastric cancer with *Helicobacter pylori* infection using proteomics approach. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:619-634.
  20. Jin J, Jin T, Quan M, Piao Y, Lin Z. Ezrin overexpression predicts the poor prognosis of gastric adenocarcinoma. *Diagn Pathol* 2012;7:135.
  21. Pujuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 2003;14:2181-2191.
  22. Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* 1992;103:131-143.
  23. Ren L, Hong SH, Cassavaugh J, et al. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene* 2009;28:792-802.
  24. Geiger KD, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2000;157:1785-1793.
  25. Deng X, Tannehill-Gregg SH, Nadella MV, et al. Parathyroid hormone-related protein and ezrin are up-regulated in human lung cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:107-119.
  26. Weng WH, Ahlén J, Aström K, Lui WO, Larsson C. Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2005;11:6198-6204.
  27. Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, et al. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Lett* 2002;179:79-86.
  28. Mäkitie T, Carpén O, Vaheiri A, Kivelä T. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2442-2449.
  29. Elzagheid A, Korkeila E, Bendardaf R, et al. Intense cytoplasmic ezrin immunoreactivity predicts poor survival in colorectal cancer. *Hum Pathol* 2008;39:1737-1743.
  30. Fan LL, Chen DF, Lan CH, Liu KY, Fang DC. Knockdown of ezrin via RNA interference suppresses *Helicobacter pylori*-enhanced invasion of gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2011;11:746-752.
  31. Lam EK, Wang X, Shin VY, et al. A microRNA contribution to aberrant Ras activation in gastric cancer. *Am J Transl Res* 2011;3:209-218.
  32. Bal N, Yildirim S, Nursal TZ, Bolat F, Kayaselcuk F. Association of ezrin expression in intestinal and diffuse gastric carcinoma with clinicopathological parameters and tumor type. *World J Gastroenterol* 2007;13:3726-3729.
  33. Zhao J, Zhang X, Xin Y. Up-regulated expression of Ezrin and c-Met proteins are related to the metastasis and prognosis of gastric carcinomas. *Histol Histopathol* 2011;26:1111-1120.
  34. Li L, Wang YY, Zhao ZS, Ma J. Ezrin is associated with gastric cancer progression and prognosis. *Pathol Oncol Res* 2011;17:909-915.
  35. Lin LL, Huang HC, Ogihara S, et al. *Helicobacter pylori* disrupts host cell membranes, initiating a repair response and cell proliferation. *Int J Mol Sci* 2012;13:10176-10192.