

헬리코박터 파일로리에 감염된 위 상피세포에서 DNA 이중나선절단 관찰

장영준, 변상원, 김형근, 조영석, 김성수, 김진일, 김재광, 정은선¹

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실¹

DNA Double Strand Breaks in Gastric Epithelium with *Helicobacter pylori* Infection

Young Jun Chang, Sang Won Byun, Hyung Keun Kim, Young Seok Cho, Sung Soo Kim, Jin Il Kim, Jae Kwang Kim and Eun Sun Jung¹

Departments of Internal Medicine and Pathology¹, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: DNA double strand breaks (DSB) is one of the critical types of DNA damage. If unrepaired, DSB is accumulated in the nucleus of cells, the cells become apoptotic or transform to tumor by way of genomic instability. Some of malignant cancers and its premalignant lesions were proven to have DSB in their nuclei. There was no report that *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), the gastric carcinogen, induce DNA DSB in gastric epithelium *in vivo*. The aim of this study was to investigate whether *H. pylori* induce DSB in the gastric epithelial cells of chronic gastritis.

Methods: Immunohistochemical stains were performed for the DSB markers, phospho-53BP1 and γ H2AX, in the gastric epithelium derived from 44 peptic ulcer disease patients before and after *H. pylori* eradication. DNA fragmentation assay was performed in the cell line to investigate the DNA damage by *H. pylori* infection.

Results: The mean expression score of γ H2AX was significantly higher in the *H. pylori* infected gastric epithelium as compared to the *H. pylori* eradicated gastric epithelium (8.8 ± 5.5 vs. 6.2 ± 5.3 respectively; $p=0.008$). The expression score of phospho-53BP1 between before and after eradication of *H. pylori* was not statistically different, but tended to be higher in *H. pylori* infection. DNA fragmentation was developed significantly more in the cell lines after infection with *H. pylori*.

Conclusions: DSB of DNA damage was typical feature of *H. pylori* infection in the gastric epithelium. (Korean J Gastroenterol 2012;60:79-85)

Key Words: Gastric mucosa; *Helicobacter pylori*; DNA breaks, double stranded; Gamma-H2AX protein, human; 53BP1 protein, human

서 론

헬리코박터 파일로리는 B형 및 C형 간염 바이러스에 의한 간세포암, 유두종 바이러스(human papilloma virus)에 의한 자궁경부암 등과 함께 세균성 발암인자로서 위암 발생에 중요한 역할을 하고 있다.^{1,2} 역학적인 연구, 동물 실험 및 많은 실험실 연구를 통해 헬리코박터 파일로리가 위암 발병인자로 알려져 있지만 아직 분자생물학적 기전에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다.³⁻⁵ 헬리코박터 파일로리의 위암 발병 기전에

대해서는 다양한 가설이 있으며, 헬리코박터 파일로리 감염 시 발생하는 유전자 손상은 위 상피세포 유전체의 안정성을 위협하고 상피세포에서 유전자 부조화 복구(mismatch repair) 단백질과 염기 절제 복구 단백질 발현의 감소, 활성산소(reactive oxygen species)의 증가로 인한 유전자 손상 및 돌연변이, 위의 성장인자와 펩티드의 변화, 위산 분비 등 위 내 환경의 변화, 세포사멸 및 세포 증식의 증가 등이 직접, 간접적으로 암 발생에 역할을 할 것으로 알려져 있다.^{4,6-12} 또한 헬리코박터 파일로리 감염 동물 모델에서 위 상피세포의 유전

Received March 15, 2012. Revised April 13, 2012. Accepted April 13, 2012.

© 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: 김성수, 480-717, 의정부시 천보로 271, 가톨릭대학교 의정부성모병원 소화기내과

Correspondence to: Sung Soo Kim, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea Uijeongbu St. Mary's Hospital, 271 Cheonbo-ro, Uijeongbu 480-717, Korea. Tel: +82-31-820-3000, Fax: +82-31-847-2719, E-mail: kimss@catholic.ac.kr

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 (2010-0024303). Conflict of interest: None.

자 변이 빈도가 증가하며, 유전자 복구 단백질이 부족한 경우 위암 발병의 원인이 될 수 있다.^{13,14}

DNA 이중나선절단(double strand breaks)은 DNA 손상의 한 형태로서 방사선 조사, 저산소, 종말체(telomere) 손상, 유전체 통합(genome integrity) 유전자의 돌연변이, myc, ras, mos, cyclin E, cdc25A 및 E2F1 등과 같은 발암유전자, 그리고 성장인자 등의 자극에 의한 세포 복제 과부하로 인해 발생한다.⁶ 정상세포 및 전구암 세포의 DNA에서 이중나선절단이 발생하면 비상동 말단 연결(non-homologous end joining), 상동 재조합(homologous recombination)과 같은 복구 기전에 의해 복구되거나, p53에 의해 사멸한다.^{15,16} 그러나 복구에 실패하면 많은 유전자 손실, 염색체 이상, 유전자 변이, 유전체 불안정, 그리고 암의 발생을 유도할 수 있다.^{17,18} 최근 알려지고 있는 DNA 이중나선 절단의 표지자는 γ H2AX, p53 결합 단백질 1 (53BP1), ataxia-telangiectasia-mutated (ATM), BRCA1 등이 있으며, 이 단백질들의 면역화학염색을 통하여 세포의 DNA 이중나선절단 유무를 민감하게 관찰할 수 있게 되었다.¹⁹

저자들은 위 샘암 및 샘종 조직에서 DNA 이중나선절단을 관찰하여, 위암 및 위 전구병변인 샘종에서 정상 조직에 비해 DNA 이중나선절단의 발생이 현저히 증가하는 것을 이 학회지에 보고한 바 있다.²⁰ 이번 연구에서는 위암의 발병인자로 알려진 헬리코박터 파일로리 감염 시 DNA 이중나선절단이 증가할 것으로 가정하고 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자에서 제균 전, 후에 상피세포의 DNA 이중나선절단 변화를 관찰하였으며 헬리코박터 파일로리에 의한 DNA 손상을 관찰하기 위해 헬리코박터 파일로리에 감염된 세포주에서 DNA 분절(fragmentation)을 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

제균 치료 전후의 γ H2AX와 phospho-53BP1 단백질의 발현을 관찰하기 위해 헬리코박터 파일로리 제균 치료에 성공한 총 44명의 환자를 대상으로 하였으며, 이들의 평균나이는 61세(23-87세)였고 남자가 36명이었다. 위궤양 27명, 십이지장궤양 환자는 17명으로 상복부 동통을 주소로 의정부성모병원에 내원하여 상부위장관 내시경검사에서 진단되었던 환자들이었다. 헬리코박터 파일로리 제균 치료 전과 제균 치료 2개월 후의 내시경 검사 시 위전정부에서 각각 2점의 생검을 했다. 조직은 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 면역염색에 이용하였다. 헬리코박터 파일로리의 진단은 Warthin-Starry silver 염색으로 하였다. 대상 환자의 헬리코박터 파일로리 제균은 양성자펌프억제제(lansoprazole 또는 rabeprazole)와 amoxicillin, clarithromycin의 삼제요법을 7일간 사용하였

으며, 제균 여부는 요소호기검사로 하였다. 이번 연구는 의정부성모병원 의학연구 윤리 심의위원회의 승인을 받았다(UC11SISI0015).

2. 면역조직화학염색

위 점막 생검의 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 절편하여 다음과 같이 면역조직화학염색을 하였다. 자일렌(xylene)을 이용하여 탈 파라핀화시키고 100%, 95%, 90%, 70%의 알코올을 단계별로 사용하여 탈수과정을 거친 후 조직 내 항원 노출을 위하여 10 mM 구연산 완충액(citrate buffer, pH 6.0)을 사용하여 15분간 저주파 처리를 하였다. 조직 내 내인성 과산화효소의 활성을 제거하기 위하여 3% H₂O₂로 15분간 처리하였다. DNA 이중나선절단 표지자로 알려진 γ H2AX (1 : 300 희석; Abcam, Cambridge, MA, USA)와 phospho-53BP1 (ser25, 1 : 800 희석; Novus, Littleton, CO, USA) 항체를 4°C에서 밤새 반응시킨 후 Avidin-Biotin-peroxidase Complex (ABC) method (Invitrogen, Camarillo, CA, USA)로 면역염색을 하였다. 그 후에 hematoxylin (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA)으로 대조염색 후 현미경으로 염색 정도를 관찰하였다.

3. 단백질 발현지수(expression score)

실험의 목적과 방법을 모르는 조직병리 전문의가 상피세포 내 γ H2AX와 phospho-53BP1 단백질의 발현을 관찰하였다. 발현 양상은 전체 관찰 상피세포의 10% 이상이 발현되는 조직으로 정의하였다. 발현율은 전체 관찰된 점막에서 염색 비율을 관찰하여 0 (0%), 1 (1-24%), 2 (25-49%), 3 (50-74%), 4 (75% 이상)로 분류하였고, 발현 강도는 가장 발현이 잘된 점막 부위에서 염색된 정도에 따라 0은 염색 안됨, 1은 매우 약한 염색, 2는 약한 염색, 3은 중간 정도 염색, 그리고 4는 강한 염색으로 분류하였다. 그리고 발현율과 발현 강도를 곱해 0부터 16까지 발현지수를 등급화하였다.²¹

4. 세포주 및 헬리코박터 파일로리 배양

위암세포주는 AGS (CRL-1739; ATCC, Manassas, VA, USA)를 구입하여 사용하였다. 또한 헬리코박터 파일로리의 감염 모델로서 사용한 HS3C 세포주는 AGS를 헬리코박터 파일로리에 수 개월간 감염시켜 얻어진 세포주로서, 장기간 헬리코박터 파일로리에 감염되면서 p27 발현 감소나 세포사멸에 대한 내성 등 위암 세포에서 보이는 형질을 획득하여 헬리코박터 파일로리 감염과 관련된 위 상피세포의 연구에 많이 이용되어 왔다.²² AGS와 HS3C 세포주는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)이 함유된 Ham's F-12 배양액에서 항생제 없이 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

헬리코박터 파일로리는 ATCC 49503을 이용하였으며, 5% sheep blood가 포함된 Trypticase Soy Agar (TSA II; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 항생제 없이 10% CO₂, 37°C에서 배양하였다. McFarland standard의 흡광도를 이용해서 헬리코박터 파일로리와 위 상피세포의 비율을 300 : 1로 하여 감염 실험을 진행하였다.

5. DNA 분절 분석

헬리코박터 파일로리 감염에 의한 세포주의 DNA 분절 현상을 관찰하기 위해서, AGS 세포주, HS3C 세포주 및 헬리코박터 파일로리에 직접 감염된 AGS 세포주에서 각각 1×10^6 개의 세포를 phosphated buffered saline에 세척 후 500 g에서 5분간 원심분리하였다. TE lysis buffer를 처리하여 세포를 분해하고, RNase A와 proteinase K를 처리하여 RNA와 단백질의 오염을 방지하였다. Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여

분절된 총 DNA를 얻은 후 12% polyacrylamide gel에 전기영동하여 DNA 분절을 확인하였다.

6. 통계 분석

헬리코박터 파일로리 제균 전과 후의 γ H2AX와 phospho-53BP1 단백질의 발현지수의 차이는 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Wilcoxon-signed ranks 법을 사용하여 분석하였고, 모든 통계에서 p값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 헬리코박터 파일로리 감염과 위 상피세포 내 이중나선절단 변화

헬리코박터 파일로리 제균 전과 후에 위 상피세포에서 면역화학염색을 통해 DNA 이중나선절단의 표지자인 γ H2AX과

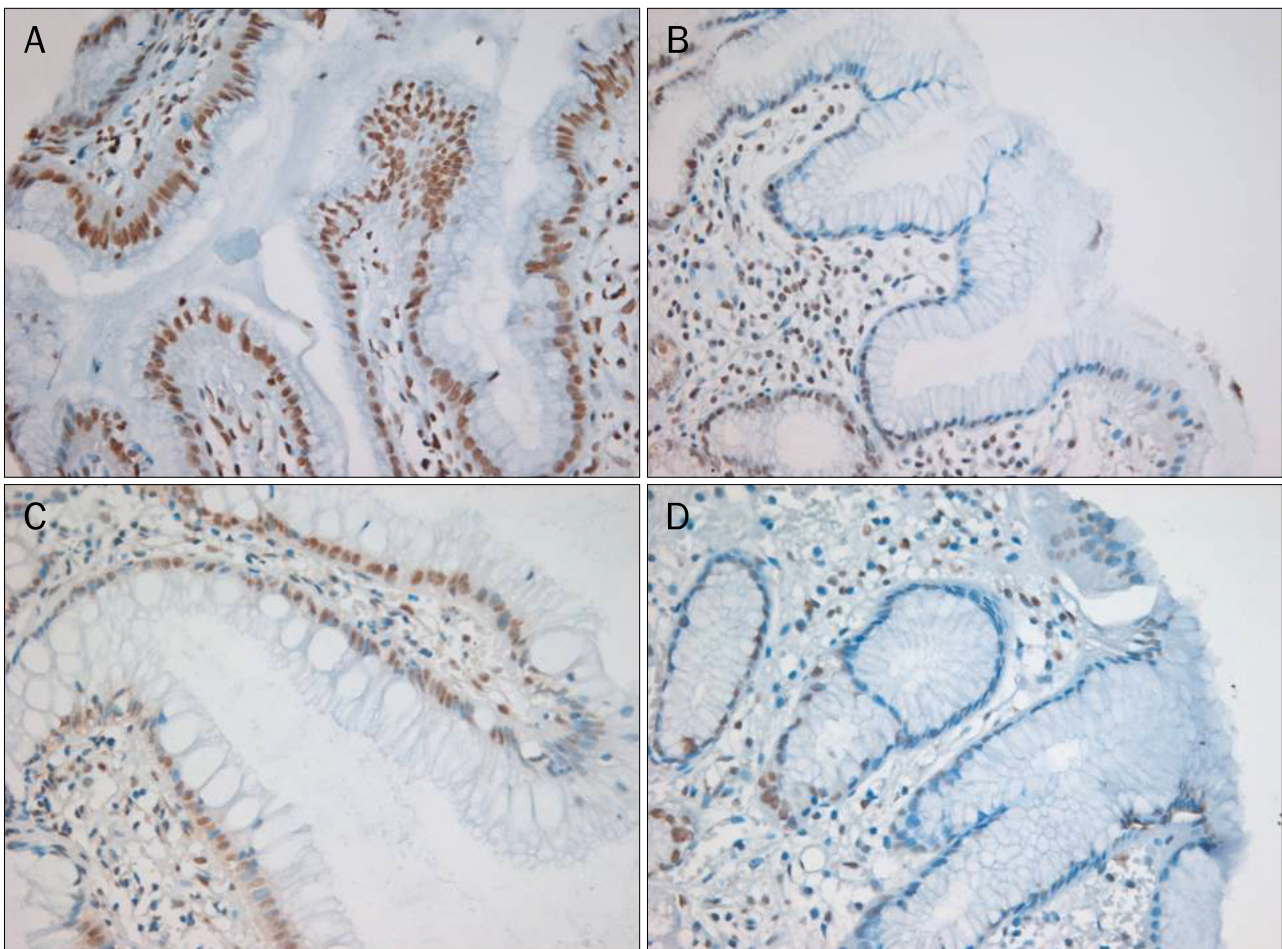


Fig. 1. Immunohistochemistry for γ H2AX and phospho-53BP1 proteins were detected in the nuclei of epithelial and interstitial inflammatory cells of the gastric mucosa ($\times 200$). (A) γ H2AX before *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication. (B) γ H2AX after eradication. (C) Phospho-53BP1 before eradication. (D) Phospho-53BP1 after eradication. Expression of γ H2AX reduced in gastric epithelial cells after the eradication of *H. pylori* and phospho-53BP1 tended to be decreased after *H. pylori* eradication.

Table 1. Mean Expression Score of γ H2AX and Phospho-53BP1 before and after *Helicobacter pylori* Eradication

Mean expression score	Patient (n)	Before eradication	After eradication	p-value
γ H2AX	44	8.8 \pm 5.5	6.2 \pm 5.3	0.008
Phospho-53BP1	37	7.2 \pm 4.9	5.5 \pm 5.4	0.095

Values are presented as mean \pm SD.

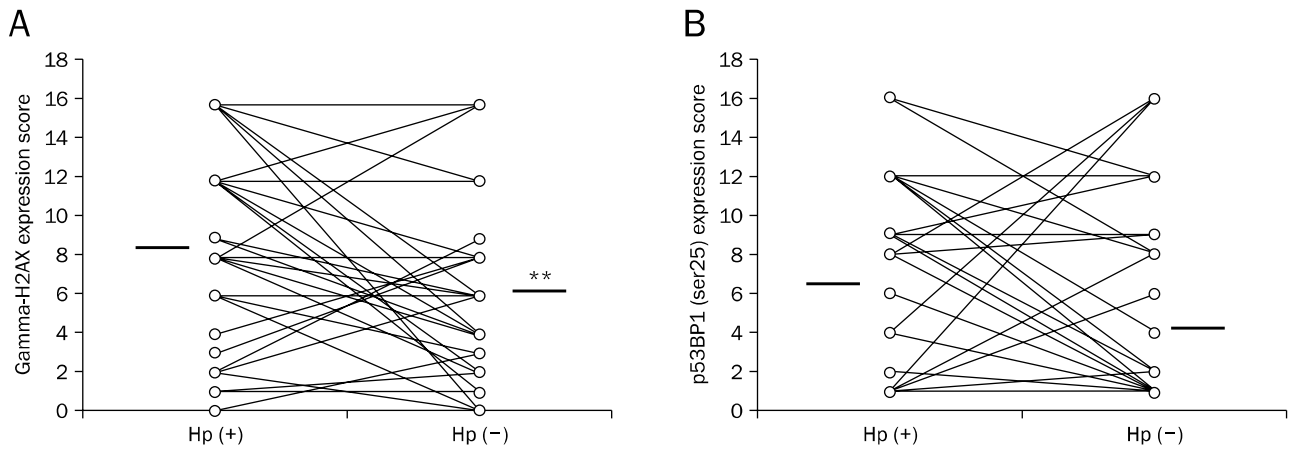


Fig. 2. Change of γ H2AX and phospho-53BP1 expressions in the gastric epithelial cells of 44 patients following eradication of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). (A) The percentage of epithelial cells expressing γ H2AX reduced significantly after eradication of *H. pylori*. (B) Gastric epithelial cells expressing phospho-53BP1 tended to be decreased after *H. pylori* eradication. The thick black bars indicate the mean values (**p < 0.01). Hp, *H. pylori*.

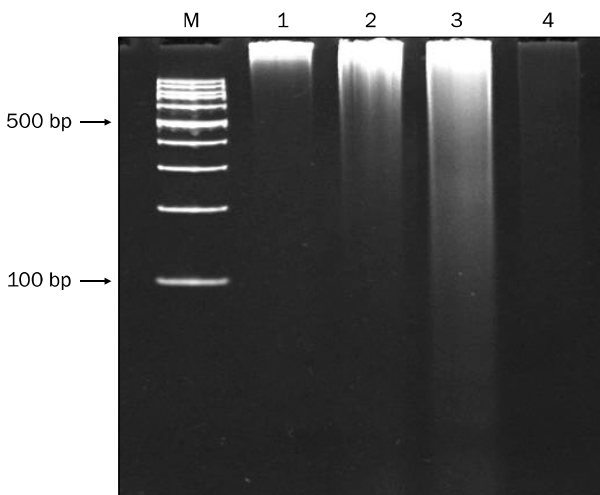


Fig. 3. The induction of DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infected AGS cells. Lane 2 and lane 3 in which *H. pylori* were infected induced DNA fragmentation in cells. Lane 1 indicated AGS, lane 2 was HS3C, lane 3 was AGS infected by *H. pylori*, and lane 4 was *H. pylori* only. M indicates molecular marker.

phospho-53BP1의 발현을 관찰한 결과, 헬리코박터 파일로리 감염은 위 상피세포에 DNA 이중나선절단을 유발하는 것으로 나타났다(Fig. 1). γ H2AX의 평균 발현지수는 헬리코박터 파

일로리 제균 전과 후가 각각 8.8 \pm 5.5, 6.2 \pm 5.3로, 헬리코박터 파일로리 제균 후 γ H2AX는 통계적으로 유의하게 감소되었다 (p=0.008; Table 1, Fig. 2). Phospho-53BP1 단백질의 평균 발현지수는 헬리코박터 파일로리 제균 전과 후가 각각 7.2 \pm 4.9 과 5.5 \pm 5.4로 통계적 차이는 없었지만 제균 치료 후 phospho-53BP1 단백질의 발현이 감소하는 경향을 보였다(Table 1, Fig. 2). γ H2AX와 phospho-53BP1 모두 핵 내 단백질로서 위 상피세포의 핵에 발현되었으며, 일부 점막 내 간질 세포의 핵에도 발현되는 것이 관찰되었다.

2. 헬리코박터 파일로리 감염과 위 상피세포주에서 DNA 분절 분석

장기간 헬리코박터 파일로리에 감염되었던 HS3C 세포주와, 헬리코박터 파일로리를 6시간 감염시킨 AGS 세포주는 감염되지 않았던 AGS 세포주에 비해 DNA 분절이 현저히 많이 발생하였다(Fig. 3). 헬리코박터 파일로리에 감염된 세포주는 12% polyacrylamide gel에서 전기 영동한 결과 500 bp이하의 작은 DNA 분절이 많이 발생하였다. 또한 장기간 헬리코박터 파일로리에 감염되어 형질 변환된 HS3C 세포주에 비해 단기간 헬리코박터 파일로리에 접촉시켰던 AGS 세포주에서 DNA 분절이 더 많이 발생하는 경향을 보였다.

고 찰

그 동안 헬리코박터 파일로리에 의한 유전자 손상에 대해서는 많은 결과가 발표되었고, 중요한 암 발병기전으로 인식되고 있다.^{4,6,7,10-14} 그러나 헬리코박터 파일로리와 DNA 이중나선절단 유발에 관한 보고는 많지 않으며, 최근 발표된 2개의 논문 모두 실험실 논문으로서,^{23,24} *in vivo*에서 이 균이 DNA 이중나선절단을 유발한다는 보고는 아직 없었다. 이에 이번 연구에서는 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자에서 제균 치료 전과 후에 DNA 이중나선절단 표지자의 발현의 변화를 관찰하였으며, 헬리코박터 파일로리 제균 치료 후에 위 상피세포 내 DNA 이중나선절단 표지자의 발현이 감소하는 결과를 보였다. 이 결과는 헬리코박터 파일로리가 세포 내 유전자 손상의 하나인 DNA 이중나선절단을 유발함을 시사한다.

DNA 이중나선절단을 관찰할 수 있는 표지자로 이 연구에서는 γ H2AX와 53BP1을 사용하였다. H2AX는 염색체 내에 존재하는 히스톤 단백질의 일종이며, 염색체의 기본 구성인 뉴클레오솜을 형성한다. 뉴클레오솜은 H2A, H2B, H3와 H4의 4가지 종류의 히스톤 단백질이 8량체를 이루고 146개의 염기 쌍을 연결한다.²⁵ 이 중 H2A 히스톤 단백질은 핵의 진화에 관련되며, H2A, H2B, H2Z와 H2AX의 아형이 존재하고 H2AX는 H2A 히스톤 단백질 구성의 약 10%를 차지한다.²⁶ DNA 이중나선절단이 발생하면 H2AX 카르복시기(COOH) 말단의 139번 serine이 인산화되며, 이 인산화된 H2AX 히스톤 단백질을 γ H2AX이라 한다. γ H2AX의 항체를 이용한 면역화학염색은 DNA 이중나선절단을 민감하게 분간할 수 있는 표지자로 사용되고 있다.²⁷ 53BP1은 아미노산 서열 1485부터 1602번째까지의 아미노산으로 구성된 도메인에서 메틸화된 히스톤 단백질과 반응한다. DNA 이중나선절단이 발생하면, H2AX 히스톤 단백질이 이중나선절단에 의해 γ H2AX로 인산화되면서 mediator of DNA-damage checkpoint 1 (MDC1)과 결합하고, 이것은 히스톤 단백질의 메틸화를 가져오며 ATM을 활성화시키고 53BP1을 인산화시킨다. 이를 통해 p53 암 억제 유전자를 작동시키는 역할을 매개한다.²⁸

악성 암에서 DNA 이중나선절단에 대한 보고는 많지 않지만, Gorgoulis 등¹⁶은 비소세포성 폐암 환자의 조직 중 정상, 과형성, 이형성 조직과 암 조직에서 DNA 이중나선절단을 관찰한 결과, 정상 조직에서는 53BP1, γ H2AX 및 Chk2가 발현되지 않았으나, 폐암 조직을 포함하여 조기 전구암 병변인 이형성 조직에서는 DNA 이중나선절단이 발현됨으로써 DNA 이중나선절단이 암 발생의 초기 단계부터 나타난다고 보고하였다. 본 연구자들은 121예의 악성 위암과 50예의 샘종 조직에서 면역 염색을 통해 DNA 이중나선절단을 관찰한 결과 악

성 위암 조직에서는 정상 조직에 비해 이중나선절단의 표지자인 53BP1, γ H2AX의 발현이 현저히 높는데 반해, 위 샘종 조직에서는 정상조직과 차이를 보이지 않았다.²⁰ 그러나 샘종에서 이형성 등급에 따라 등급 I에 비해 이형성 등급 II와 III에서 DNA 이중나선절단의 발현이 현저히 증가하여 DNA 이중나선절단의 축적이 암 발병과 관련있을 것으로 추정된다.

최근의 보고에 의하면 헬리코박터 파일로리는 직접 상피세포주에 DNA 이중나선절단을 유발한다. AGS 위 상피세포주 및 U2OS 골육종 세포주에 헬리코박터 파일로리를 감염시키면 DNA 이중나선절단의 표지자인 53BP1, MDC1 및 γ H2AX 등의 발현이 증가하며, 감염을 중지시키면 이들 표지자의 발현이 감소한다. 이 때 CagA나 VacA 등 병원성 단백질의 발현과는 무관한 것으로 나타났다.²² 또 다른 실험논문을 보면 역시 세포주에 헬리코박터 파일로리가 감염되면 DNA 이중나선절단의 표지자인 Chk1, Chk2, γ H2AX 및 phospho-p53의 발현이 증가하며, DNA 분절현상이 나타난다.²³ 그러나 헬리코박터 파일로리에 감염된 위 점막조직에서 DNA 이중나선절단을 관찰한 보고는 아직 없었으며, 이번 연구 결과 위 점막에서 DNA 이중나선절단은 헬리코박터 파일로리 감염 시 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 위 상피세포에서 γ H2AX의 발현은 헬리코박터 파일로리 감염에 따라 현저히 발현되었으나, phospho-53BP1의 발현은 헬리코박터 파일로리 감염 시 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 이는 대상 환자 수가 더 많았으면 유의한 결과를 얻었을 것으로 예상된다.

DNA 분절분석은 특정 상황에 의해 손상된 DNA의 양을 측정하는 실험으로, 일반적으로 세포사멸 분석에 많이 이용된다. DNA 분절분석이 이중나선절단을 분석하는 데 특이적인 검사법은 아니지만 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 DNA 손상 정도를 비교하기 위해 DNA 분절분석을 이용하였다. 실험 결과 헬리코박터 파일로리 감염은 직접 세포주에 DNA 분절을 유발하였다. 이는 헬리코박터 파일로리에 감염되면 이중나선절단을 포함한 DNA 손상이 많이 일어나며, 손상된 유전자의 복구가 저하되어 세포사멸을 증가시킨다는 것을 보여준다. 이번 실험에서 장기간 헬리코박터 파일로리에 감염되어 형질 변환된 HS3C 세포주에 비해 단기간 헬리코박터 파일로리에 접촉시켰던 AGS 세포주에서 DNA 분절이 더 많이 발생하는 경향을 보였다. 이 결과에 대한 명확한 설명은 어려우나, 헬리코박터 파일로리에 감염된 후 시간이 경과하면서 처음에 비해 DNA 분절 정도가 회복되는 것을 보고한 연구가 있다.²³ 또한 HS3C 세포주는 고농도의 헬리코박터 파일로리에 3개월 이상 감염된 후 살아남았으므로 이 세포주를 다양한 DNA 손상에 어느 정도 적응된 세포주로 간주하여 6시간의 단기간에 헬리코박터 파일로리에 감염된 세포주에 비해 DNA 유전자 손상의 정도는 더 적을 수 있다고 추측해 볼 수 있다.

헬리코박터 파일로리 감염 시 DNA 이중나선절단이 축적되는 이유에 대해서는 명확하지 않으나, 첫째, 장기간 감염이 유지되면 세포 내 DNA 복구 능력 이상의 이중나선절단이 축적될 수 있고 둘째, 감염으로 인해 신체 방어기전으로서의 세포사멸에 이상이 발생할 경우 DNA 이중나선절단이 축적될 수 있다. 이러한 원인들에 의해 DNA 이중나선절단이 복구되지 않고 유지되면 유전자 불안정성을 유발하며, 발암유전자의 발현 등으로 이어져 암 발생에 중요한 역할을 한다.⁶

결론적으로 헬리코박터 파일로리 감염은 환자의 위 상피세포에 DNA 이중나선절단을 유발하며, 이러한 환경은 암 유발 유전자의 불안정성을 유도하여 유전자 돌연변이의 가능성을 높이고 여러 복합적 요인들과 함께 위암 발병에 역할을 할 것으로 생각한다. 그러나 헬리코박터 파일로리 비감염 위점막에서의 단백질의 변화를 함께 비교하지 않은 점이 이번 연구의 제한점이며, 향후 나이와 성별이 대비되는 헬리코박터 파일로리 음성군과도 DNA 이중나선절단의 변화를 비교해야 할 것이다.

요 약

목적: DNA 이중나선절단(double strand break)은 DNA 손상의 한 형태로서 방사선 조사, 종말체 손상, 유전체 통합, 유전자의 돌연변이, 그리고 성장인자 등의 자극에 의한 세포 복제 과부하로 인해 발생한다. 정상세포의 DNA에서 이중나선절단이 발생하면 자체 복구 기전에 의해 복구된다. 그러나 복구에 실패하는 경우 p53을 통해 사멸하거나, 혹은 많은 유전자 손실과 유전체 불안정을 통해 암 발생을 유도할 수 있다. 위암 발병인자인 헬리코박터 파일로리는 위 상피세포에 이중나선절단을 포함하여 다양한 유전자 손상을 일으키며, 이는 위암 발병 기전의 하나로 알려져 있다. 그러나 아직 헬리코박터 파일로리 감염 시 환자의 위 점막에서 DNA 이중나선절단을 관찰한 보고는 없었다. 저자들은 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자의 위 상피세포에서 제균 전과 후에 이중나선절단을 관찰하여 헬리코박터 파일로리의 역할을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 헬리코박터 파일로리에 감염된 44명 환자의 제균 전과 후의 위점막 생검 조직에서 이중나선절단의 표지자인 γ H2AX, phospho-53BP1의 발현을 면역조직화학염색으로 비교하였다. 또한 DNA 분절분석을 통해 헬리코박터 파일로리에 감염된 세포주에서 DNA 손상 정도를 관찰하였다.

결과: γ H2AX의 평균 발현지수는 헬리코박터 파일로리 제균 전과 후가 각각 8.8 ± 5.5 , 6.2 ± 5.3 로서 헬리코박터 파일로리 제균 후 γ H2AX이 통계적으로 유의하게 감소되었다($p=0.008$). Phospho-53BP1단백의 평균 발현지수는 헬리코박터 파일로리 제균 전과 후가 각각 7.2 ± 4.9 과 5.5 ± 5.4 로서 통계적 차이는

없었지만 제균 치료 후 phospho-53BP1단백의 발현이 감소하는 경향을 보였다. 장기간 헬리코박터 파일로리에 감염되었던 HS3C 세포주와, 헬리코박터 파일로리를 6시간 감염시킨 AGS 세포주는, 감염되지 않았던 AGS 세포주에 비해 DNA 분절이 현저히 많이 발생하였다.

결론: 위 점막 상피세포에서 헬리코박터 파일로리는 DNA 이중나선절단을 유발한다.

색인단어: 위 점막; 헬리코박터 파일로리; DNA 이중나선절단; gamma-H2AX; 53BP1

REFERENCES

1. 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.
2. Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:90-97.
3. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001;121:823-829.
4. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37.
5. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 2004;4:688-694.
6. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008;319:1352-1355.
7. Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. CagA protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1697-1702.
8. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38:498-501.
9. Peek RM Jr, Wirth HP, Moss SF, et al. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 2000;118:48-59.
10. Machado AM, Figueiredo C, Seruca R, Rasmussen LJ. *Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806:58-65.
11. Machado AM, Figueiredo C, Touati E, et al. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res* 2009;15:2995-3002.
12. Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:542-553.
13. Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* 2003;124:1408-1419.
14. Meira LB, Bugni JM, Green SL, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2516-2525.
15. Boland CR, Luciani MG, Gasche C, Goel A. Infection, inflam-

- mation, and gastrointestinal cancer. *Gut* 2005;54:1321-1331.
16. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human pre-cancerous lesions. *Nature* 2005;434:907-913.
 17. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5678-5694.
 18. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:957-867.
 19. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, DiTullio RA Jr, Stavridi ES, Halazonetis TD. The DNA damage checkpoint and human cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000;65:489-498.
 20. Kim JH, Kim SS, Byun SW, et al. Double strand break of DNA in gastric adenoma and adenocarcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2010;55:19-25.
 21. 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.
 22. Eguchi H, Herschenhous N, Kuzushita N, Moss SF. *Helicobacter pylori* increases proteasome-mediated degradation of p27(kip1) in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:4739-4746.
 23. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, et al. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14944-14949.
 24. Jang SH, Lim JW, Morio T, Kim H. Lycopene inhibits *Helicobacter pylori*-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free Radic Biol Med* 2012;52:607-615.
 25. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:127-135.
 26. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:162-169.
 27. Takahashi A, Ohnishi T. Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett* 2005;229:171-179.
 28. FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF. 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans* 2009;37: 897-904.