

ORIGINAL ARTICLE

헬리코박터 파일로리 감염 연관 위질환 발생시 형질전환인자-베타 저해신호로서 Smad7의 역할

이호재, 박종민¹, 함기백^{1,2}

가천대학교 의과대학 생화학교실, CHA 의과학대학교 CHA 바이오컴플렉스 CHA 암예방연구센터¹, 분당차병원 소화기센터²

Role of Inhibitory Transforming Growth Factor- β Signal Smad7 in *Helicobacter pylori*-associated Gastric Damage

Ho-Jae Lee, Jong Min Park¹, and Ki Baik Hahn^{1,2}

Department of Biochemistry, Gachon University School of Medicine, Incheon, CHA Cancer Prevention Research Center, CHA Bio Complex, CHA University¹, Digestive Disease Center, CHA Bundang Medical Center², Seongnam, Korea

Background/Aims: Transforming growth factor-beta (TGF- β) is a cytokine implicated in the susceptibility, development, and progression of gastrointestinal cancer and certain other neoplasms. In the later stages of cancer, TGF- β not only acts as a bystander of host-immune response, but also contributes to cell growth, invasion, and metastasis. In the current study, we generated gastric mucosal cells that stably express Smad7, and explored the *Helicobacter pylori*-associated biological changes between mock-transfected and Smad7-transfected RGM1 cells.

Methods: RGM1 cells stably transfected with Smad7 were infected with *H. pylori*, and molecular changes in apoptotic markers and inflammatory mediators were examined. Several candidate genes were explored in Smad7-overexpressing cells after *H. pylori* infection.

Results: Overexpression of Smad7 in RGM1 cells significantly increased the *H. pylori*-induced cytotoxicity compared to mock-transfected cells. Exaggerated increases in inflammatory mediators, cyclooxygenase 2, inducible NO synthase, and augmented apoptosis were noted in Smad7-overexpressing cells, whereas mitigated heme oxygenase 1 was noted in Smad7-overexpressing cells. These phenomena were reversed in cells transfected with Smad7 siRNA.

Conclusions: These data suggest that inhibition of Smad7 is a possible target for mitigating *H. pylori*-associated inflammation. (Korean J Gastroenterol 2016;68:186-194)

Key Words: *Helicobacter pylori*; Transforming growth factor beta; Smad7; Gastritis

서 론

Transforming growth factor-beta (TGF- β)는 항염증, 세포 항증식 및 암 억제 활성 등 다양한 기능을 가지고 있는 성장인자이다.^{1,2} 이전의 연구에서 TGF- β 신호의 제어에 의해

자가면역 체장염이나 염증성 대장질환과 같은 염증질환의 발생과 *Helicobacter pylori* 감염에 따른 암의 발생을 촉진 시킬 수 있음을 보고하였다.³⁻⁵ 이는 이미 규명된 TGF- β 의 암 억제, 항염증 및 항섬유화작용 등을 설명하는 결과이다. 또한 *H. pylori* 감염은 bone morphogenic protein (BMP) 신호에

Received August 3, 2016. Revised September 2, 2016. Accepted September 27, 2016.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2016. Korean Society of Gastroenterology.

교신저자: 함기백, 13496, 성남시 분당구 야탑로 59, 분당차병원 소화기센터

Correspondence to: Ki Baik Hahn, Digestive Disease Center, CHA Bundang Medical Center, 59 Yatap-ro, Bundang-gu, Seongnam 13496, Korea. Tel: +82-31-780-5005, Fax: +82-31-881-7185, E-mail: hahmkb@cha.ac.kr

Financial support: This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPIET) through High Value-added Food Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (116015-03-1-CG000).
Conflict of interest: None.

의한 CDX2나 SOX2의 발현 증가를 통해 장형화생을 유발하며,⁶ 이외에도 sonic hedgehog 신호를 통해 장형화생⁷ 및 점막증식⁸을 유발하는 것으로 보고하였다.

최근 *H. pylori* 감염은 TGF- β 또는 BMP 신호전달의 매개체인 Smad 단백질을 통해 속주 세포에 영향을 주는 것으로 보고하고 있으나^{9,10} 현재까지 *H. pylori* 감염에 따른 위염과 위암의 발생에 있어 Smad의 역할에 대해서는 보고가 많지 않다. 이는 TGF- β 가 암 발생에 미치는 영향이 암의 종류와 발생 단계에 따라 차이가 있고,¹¹⁻¹⁶ TGF- β 신호 전달도 전형적(canonical) 및 비전형적 신호 전달 체계(non-canonical pathway), 그리고 다른 신호 전달과의 상호 간섭 현상(cross-talk)이 나타나기 때문이다.¹⁷⁻¹⁹

TGF- β 신호 전달의 내인성 억제인자로 작용하는 Smad7은 TGF- β 에 의한 항염증 활성에 있어 중요한 매개인자로 작용할 뿐만 아니라,²⁰ 다른 신호 전달계 간의 조절에 있어서도 중요한 상호 간섭 매개체로 작용하고 있다.²¹ 이 연구에서는 *H. pylori* 감염에 따른 세포사멸과 염증 반응에 있어 Smad7의 역할을 알아보기 위하여, 정상 위점막 세포주인 RGM1에서 Smad7를 과발현 또는 발현을 억제시킨 상태에서 세포 독성과 염증매개물질의 발현에 대하여 분석하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

정상 rat 위점막 세포주인 RGM1 세포는 10%의 fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's modified essential medium (DMEM)과 Ham F12 혼합배지에서 37°C 세포배양기(95% air, 5% CO₂)로 배양하였다.

2. *H. pylori* 균주 및 세포감염

이 실험에 사용된 *H. pylori* 균주(cytotoxin-associated gene A [CagA]+strain, NCTC 11637)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다. 균주는 5% bovine calf serum과 항생제가 첨가된 Brucella broth에서 1×10⁸ CFU/mL (OD₆₀₀=1)가 될 때까지 10% CO₂ 조건에서 진탕 배양하였다. 세포에서의 감염 다중도(multiplicity of infection, MOI)는 100:1로 사용하였다.

3. Smad7 과발현 세포주 수립

Smad7 단백질을 안정적으로 발현하는 세포주의 제작은 Clontech (Palo Alto, CA, USA)의 pLPCX retroviral vector를 사용하였다. 바이러스는 Flag epitope이 tagged된 Smad7 DNA construct를 pLPCX vector에 삽입한 pLPCX-Flag-Smad7 vector를 Phoenix A packaging 세포에 형질 주입(transfec-

tion)하여 제조하였다. 이것을 RGM-1 세포주에 감염시킨 후, puromycin (1 µg/mL)을 2주간 처리하여 Smad7이 발현되는 세포를 선별하였다. 동일한 방법으로 pLPCX vector를 포함하는 RGM-1 세포를 control 세포로 사용하였다.

4. MTT assay를 통한 세포 생존측정

세포를 48-well dish에 1×10⁴개/well로 도포한 다음 DMEM 배지에서 배양하였다. 이후 각각의 시약을 일정 시간 처리하여 MTT solution (최종농도 1 mg/mL)을 기하고 2시간 동안 반응한 후 dimethyl sulfoxide로 용해시킨 후 540 nm에서 optical density를 microplate reader로 측정하였다.

5. Flow cytometry를 통한 apoptosis 측정

각각의 실험군에 대한 Annexin V (PharMingen, San Diego, CA, USA) 염색은 flow cytometer (FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)와 CellQuest program (Becton Dickinson)을 사용하여 1-2×10⁴개의 세포들에서 측정하였다. 중복 세포들은 FL3A (PI) vs. FL3W (PI) 도수 분포도에서 제외하였다. 자료의 분석은 WinList 4.0과 Modifit LT 3.0 software program (Verity Software House, Topsham, ME, USA)을 이용하였다.

6. Western blot 분석

배양된 세포를 phosphate buffered saline 용액으로 세척한 후, cell lysis buffer (150 mM NaCl, 0.5% triton×100, 50 mM tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, Protease Inhibitor Cocktail tablet [Boehringer, Manneim, Germany])로 용해시켜 protein lysate를 만들었다. 이것을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 전기 영동한 후 전개시킨 단백질을 PVDF membrane (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA)에 옮겨 각각의 primary antibody와 secondary antibody로 반응시킨 후, chemoluminescence system을 이용하여 분석하였다.

7. Reverse transcription PCR 분석

RNA는 TRIzol (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 이용하여 추출하였으며, 추출된 RNA는 moloney murine leukemia virus 역전사효소(Perkin Elmer, Morrisville, NC, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. PCR 분석에 사용된 각각의 primer 서열은 Table 1에 나타내었으며, internal standard로서 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)을 사용하였다.

Table 1. List of Primer Sequences Used for RT-PCR Analysis

Gene	Forward	Reverse
Xbp-1	5'-AACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3'	5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3'
Gadd34	5'-CCCTCCAACCTCTCTTCAG-3'	5'-CAGCCTCAGCATTCCGACAA-3'
Ddit3	5'-GAAAGCAGAACCGGGTCCAAT-3'	5'-GGATGAGATATAGGTGCCCC-3'
Smad7	5'-GGGCCTTTTGGGGAGAGGCG-3'	5'-GTCCTGAACATGCGGGGCGAG-3'
Cox2	5'-GAAATGGCTGCAGAGTTGAA-3'	5'-TCATCTAGTCTGGAGTGGGA-3'
Nox2	5'-TTTCCCAGGCAACCAGACG-3'	5'-TAGCGGGGCTTCAGAATGG-3'
TNF- α	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTCTCAA-3'	5'-TCTAAGGTAATTGGGCAGGTTGACCTC-3'
Ho1	5'-GACAGCATGTCCCAGGATT-3'	5'-GGTTCTGCTTGTTCGCTCT-3'
Il6	5'-CTTCCAGGCCAGTTGCCCTCT-3'	5'-GAGAGCATTGGAAGTTGGG-3'
Gapdh	5'-GGTCTGAGTATGTCGTGGA-3'	5'-TTCAGCTCTGGATGACCTT-3'

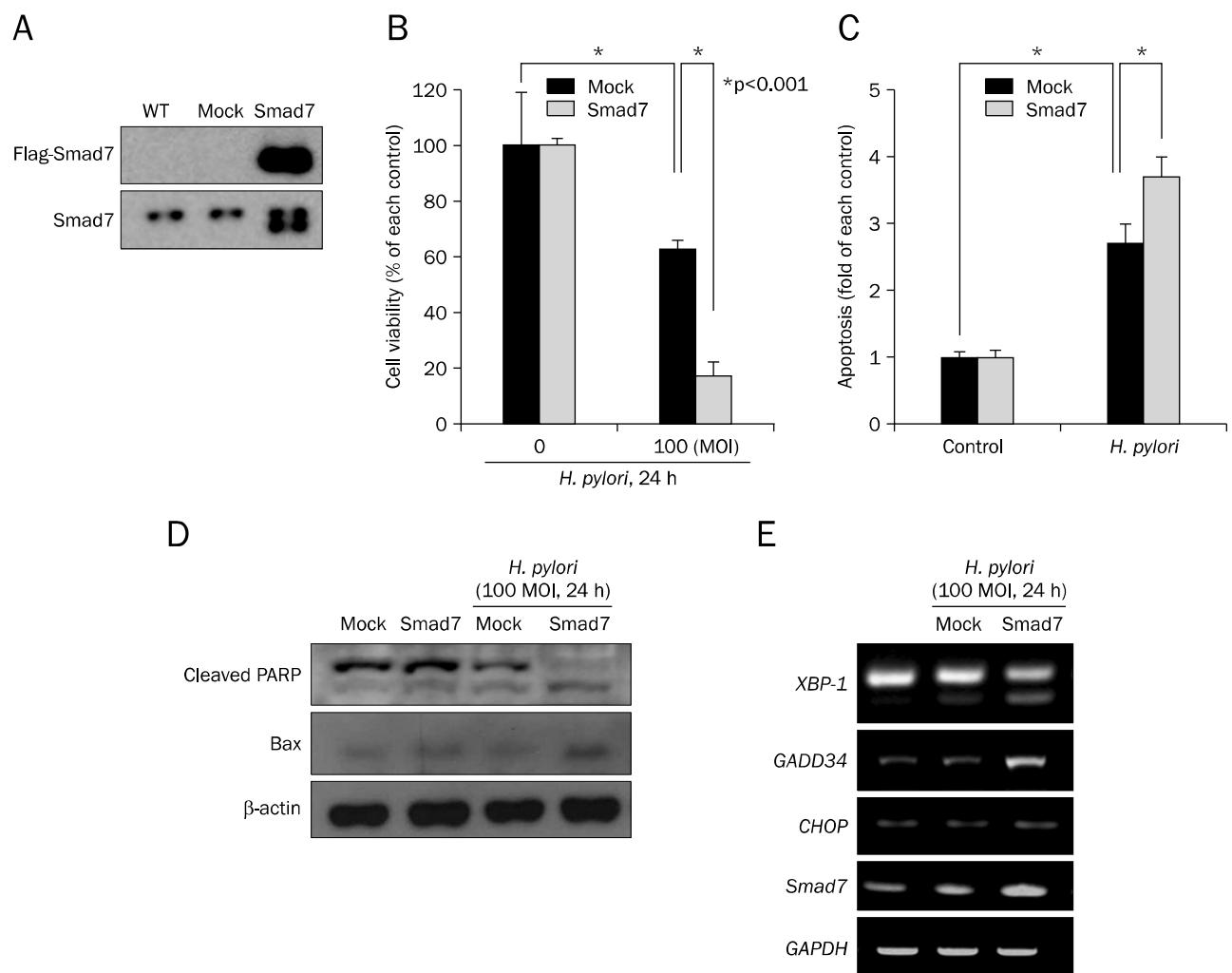


Fig. 1. Cytotoxicity against *Helicobacter pylori* in Smad7 overexpressed cells. (A) Stable expression of Smad7 in RGM1 cells was detected with Flag-tag (upper) and Smad7 (lower) antibodies. (B) MTT assay in mock- or Smad7-transfected RGM1 cells after treatment with 100 multiplicity of infection (MOI) *H. pylori*. (C) mock- or Smad7-transfected RGM1 cells were treated with *H. pylori* (100 MOI) for 24 hours, followed by Annexin V staining. Cells were stained with Annexin V-FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Bars represent mean \pm SD (n=3). (D) Western blot analysis of PARP and Bax after treatment with 100 MOI *H. pylori* in mock-transfected or Smad7-transfected RGM1 cells. (E) Expression of XBP-1, GADD34, CHOP, and Smad7 mRNA after treatment with 100 MOI *H. pylori* in mock-transfected or Smad7-transfected RGM1 cells.

8. Microarray for genes implicated in Smad7-regulation after *H. pylori* infection

Microarray 분석을 위한 RNA는 TRIzol을 이용하여 추출하였으며, total RNA로부터 cDNA를 만든 후 Agilent Whole Genome 8x60K arraykit (GenoCheck, www.genoccheck.com)를 이용하여 수행하였다. 통계적으로 의미 있는 유전자에 대해서 Panther Classification System (www.pantherdb.org)을 이용하여 수행하였다.

9. 통계 분석

모든 결과값은 독립적으로 세 번 반복 실험 후 통계 처리하였으며, 실험에 얻어진 값들의 평균±표준편차로 기술하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성 검증은 SPSS Statistics ver. 20.0 (IBM Co., Seoul, Korea) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석한 후 Duncan's multiple range test와 Scheffe's multiple range test를 사용하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 처리군 간의 유의성을 검증하였다.

결과

1. 세포 손상

RGM1에서 Smad7 retrovirus 감염을 통해 Smad7이 과발현됨을 확인하였다(Fig. 1A). Mock-transfected RGM1 세포와 Smad7-transfected RGM1 세포에서 *H. pylori*를 24시간 동안 감염시킨 후 세포 독성을 확인한 결과, RGM1 세포에서 *H. pylori*의 감염은 세포 독성을 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히 Smad7 과발현 세포의 경우 mock-transfected 대조군 세포보다 더욱 통계적으로 유의한 세포 독성의 증가($p < 0.01$)를 보였다(Fig. 1B). Smad7 과발현 세포에서의 세포 독성 증가가 apoptosis와 관련이 있는지를 알아보기 위하여 PI와 Annexin V를 이용하여 flow cytometry 분석을 시행하였고, Smad7 과발현 세포주에서 통계적으로 유의한($p < 0.01$) apoptosis의 증가가 발생하였다(Fig. 1C). *H. pylori*의 감염에 의해 apoptosis가 일어남을 apoptosis executor인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 cleavage와 proapoptotic marker 단백질인 Bax의 발현을 조사한 결과, control RGM1 세포주(mock)보다 Smad7 과발현 세포주에서 cleaved PARP와 Bax의 발현이 증가하였다(Fig. 1D). RGM1 세포에서 *H. pylori* 감염에 의해 endoplasmic retic-

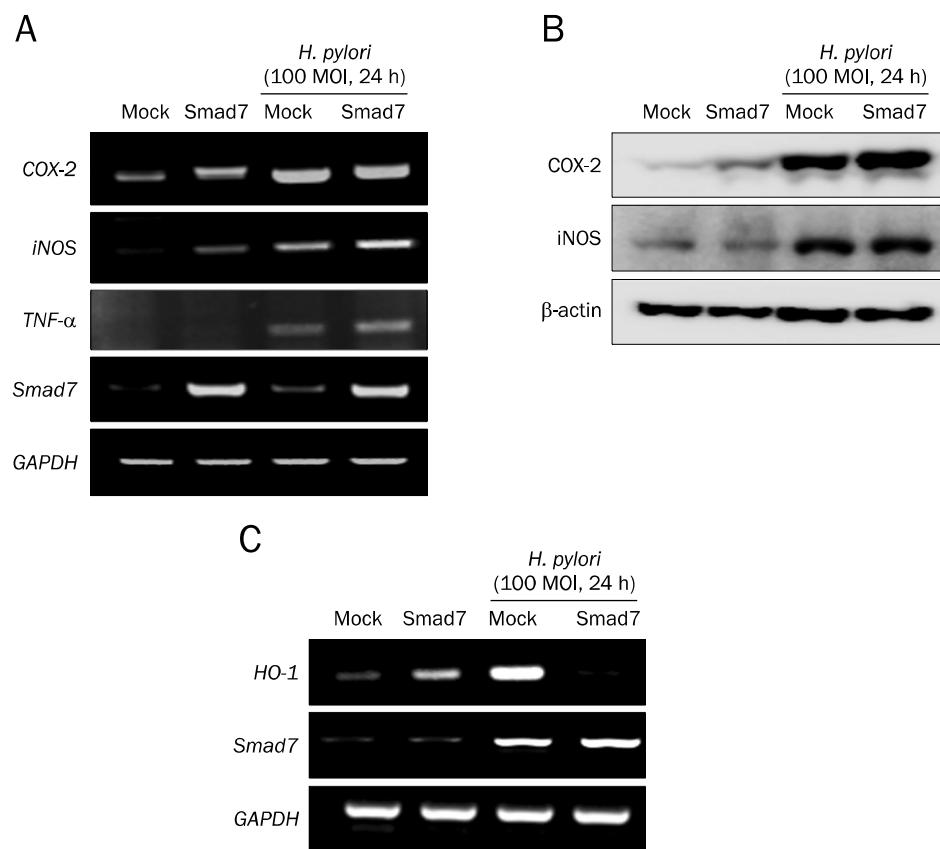


Fig. 2. Inflammation mediators against *Helicobacter pylori* in Smad7 over-expressed cells. (A) Expression of Cox-2, iNOS, TNF- α , and Smad7 mRNA after treatment with 100 multiplicity of infection (MOI) *H. pylori* in mock-transfected or Smad7-transfected RGM1 cells. (B) Western blot analysis of COX-2 and iNOS after treatment with 100 MOI *H. pylori* in mock-transfected or Smad7-transfected RGM1 cells. (C) Expression of HO-1 and Smad7 mRNA after treatment with 100 MOI *H. pylori* in mock-transfected or Smad7-transfected RGM1 cells.

ulum (ER) stress가 유발되는지를 확인하기 위하여 XBP-1, GADD34, CHOP의 mRNA 발현을 RT-PCR로 분석한 결과, Smad7 과발현 세포에서 *H. pylori* 감염에 의해 ER stress가 증가되었다(Fig. 1E).

2. 염증 반응

Mock-transfected 세포와 Smad7-transfected RGM1 세포에 *H. pylori* 감염에 따른 염증유발 인자의 mRNA 발현을 조사한 결과, control RGM-1 세포에서의 *H. pylori* 감염은 *Cox-2*, *iNOS*, *TNF-α* mRNA의 발현이 증가하였으며(p

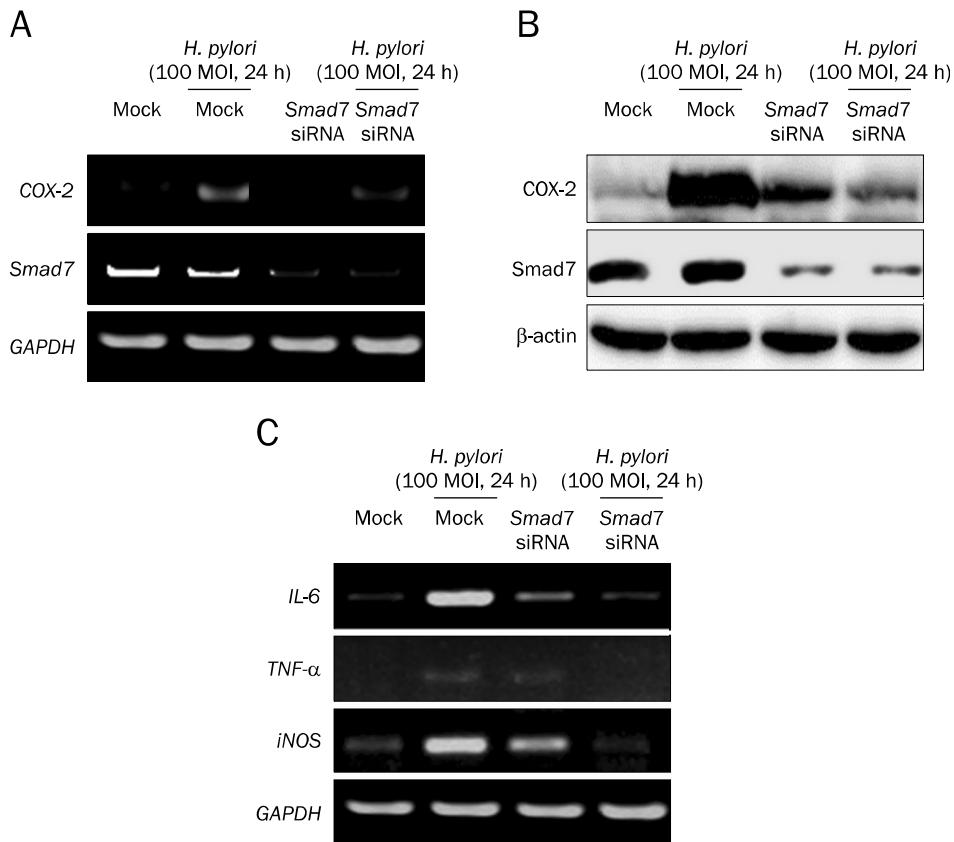


Fig. 3. Inflammation mediators against *Helicobacter pylori* in Smad7 knock-down cells. (A) Target-specific siRNA for Smad7 (Smad7 siRNA) or a negative control RNA (mock) was transfected into RGM1 cells for 24 hours. Expression of Cox-2 and Smad7 mRNA was checked by RT-PCR. (B) Expression of COX-2 and Smad7 were compared between mock-transfected and Smad7 siRNA-transfected cells. (C) Expression of IL-6, TNF-α, and iNOS mRNA were compared between mock-transfected and Smad7 siRNA-transfected cells.

Table 2. Genes Down-regulated in Smad7-overexpressing RGM-1 Cells after *Helicobacter pylori* Infection

<i>H. pylori</i>	Gene symbol	Description	<i>H. pylori</i> /control intensity
0.24766	<i>Mpzl3</i>	Myelin protein zero-like 3	0.78
0.24227	<i>Tmem209</i>	Transmembrane protein 209	0.83
0.23147	<i>Pde2a</i>	Phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	0.69
0.22563	<i>Stc2</i>	Stanniocalcin 2	1.09
0.21645	<i>Tnfrsf21</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	0.69
0.21413	<i>Cdc42se2</i>	CDC42 small effector 2	0.44
0.21286	<i>CD44</i>	CD44 molecule	0.87
0.20468	<i>Dnajc3</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	0.88
0.19036	<i>Cenpk</i>	Centromere protein K	0.72
0.18423	<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.31
0.17253	<i>Riok3</i>	RIO kinase 3 (yeast)	0.88
0.12621	<i>Atf6</i>	Activating transcription factor 6	0.85
0.06935	<i>Abcb1a</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	1.28
0.06903	<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4	1.27
0.04475	<i>Il23a</i>	Interleukin 23, alpha subunit p19	1.27
0.04155	<i>Cox6a2</i>	Cytochrome c oxidase, subunit Vla, polypeptide 2	0.73
0.03243	<i>Derl3</i>	Derl-like domain family, member 3	0.56

Table 3. Genes Up-regulated in Smad7-overexpressing RGM-1 Cells after *Helicobacter pylori* Infection

<i>H. pylori</i>	Gene symbol	Description	<i>H. pylori</i> /control intensity
12.90167	<i>Expi</i>	Extracellular proteinase inhibitor	2.35
9.19571	<i>Stc1</i>	Stanniocalcin 1	2.87
8.39839	<i>Cxcl11</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.36
7.40992	<i>Krt14</i>	Keratin 14	1.64
6.48686	<i>Rab40b</i>	Rab40b, member RAS oncogene family	1.25
6.42740	<i>Terc</i>	Telomerase RNA component	1.26
6.37652	<i>Ubd</i>	Ubiquitin D	1.11
6.10055	<i>Cfb</i>	Complement factor B	1.67
5.95001	<i>Pla2g2a</i>	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	1.32
5.29546	<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	2.10
5.23783	<i>Ppp1r3c</i>	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	3.07
4.84217	<i>Aldoc</i>	Aldolase C, fructose-bisphosphate	1.62
4.70297	<i>Myh11</i>	Myosin, heavy chain 11, smooth muscle	1.75
4.66639	<i>Mxi1</i>	MAX interactor 1	1.41
4.49582	<i>Tnk2</i>	Tyrosine kinase, non-receptor, 2	6.09
4.43258	<i>Smad6</i>	SMAD family member 6	1.00
4.40368	<i>Mapt</i>	Microtubule-associated protein tau	1.36
4.36186	<i>Pitpnc1</i>	Phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1	5.34
4.19300	<i>Rasgrp2</i>	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	1.21
4.15559	<i>Rragd</i>	Ras-related GTP binding D	1.15
4.08929	<i>Ndrg1</i>	N-myc downstream regulated gene 1	2.10
4.06843	<i>Stat1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	1.11
4.06837	<i>Tmem140</i>	Transmembrane protein 140	1.16

<0.01), Smad7^o 과발현 세포주에서는 이러한 염증유발 인자의 발현이 더욱 증가하였다(Fig. 2A). Smad7^o 과발현 세포주에서 *H. pylori* 감염에 의한 *Cox-2*와 *iNOS* mRNA의 발현 증가는 *COX-2*와 *iNOS*의 단백질 발현으로 재확인하였다(Fig. 2B). 한편, Smad7 과발현 세포주에서는 *H. pylori* 감염에 따라 항산화 및 항염증 인자인 heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA의 발현 취소를 관찰하였다(Fig. 2C).

3. Smad7 발현 억제에 따른 염증 반응

Smad7의 발현 억제는 *H. pylori* 감염에 의한 염증 반응이 증가하는지를 확인하기 위해 control siRNA (mock)와 Smad7 specific siRNA를 형질 주입하여 염증인자를 분석하였다. RGM1 세포에서 Smad7 siRNA를 통한 발현 억제는 *Cox-2* mRNA의 발현이 감소하였고(Fig. 3A), 이는 Western blot을 통해서 확인하였다(Fig. 3B). 이외의 *H. pylori* 감염과 연관된 다른 염증 매개인자인 *IL-6*, *TNF- α* , 그리고 *iNOS* mRNA의 변화를 살펴본 결과, Smad7의 발현 억제로 인하여 염증매개 인자의 mRNA 발현이 증가하지 않았다(Fig. 3C).

4. 유전자 분석

Smad7의 과발현 세포주에 *H. pylori*를 100 MOI로 24시간 감염시킨 후 발현이 변화되는 유전자를 microarray로 분석한 결과, 통계적으로 유의하게 감소하는 유전자로는 myelin protein zero-like3, transmembrane protein 209, phos-

phodiesterase 2A, stanniocalcin 2, TNFSF21, Cdc42, CD44 등이 있었으며(Table 2), 반대로 통계적으로 유의하게 증가하는 유전자로는 extracellular proteinase inhibitor, stanniocalcin 1, CXCL11, keratin 14, Rab40b 등을 확인하였다(Table 3).

고 찰

저자들은 이전의 연구에서 *H. pylori* 감염에 의한 위염의 전파 및 악화, 그리고 위염 연관 위암 발생의 기전으로, 암 억제인자로 알려진 TGF- β 신호의 억제는 신호 전달계의 변화와 함께 염증 및 암화의 촉진과 연관됨을 보고한 바가 있다. 이번 연구에서는 이러한 신호전달에 있어 *H. pylori* 감염이 TGF- β 의 억제 신호인 Smad7의 증가와 연관되어 있음을 증명하였다.

*H. pylori*의 감염은 위점막 조직에서 직접적인 접촉을 통해 다양한 염증유발인자의 발현을 유도하여 염증 반응을 촉진하며, *H. pylori*가 가지고 있는 cytotoxin-associated gene A (CagA), vacuolating toxin (VacA) 등과 같은 독성인자는 염증 반응 뿐만 아니라, 위 상피세포에서 ER stress를 유발하여 세포 독성을 일으키는 것으로 최근 보고되었다.²² 특히 Smad7 과발현 세포에서의 *H. pylori* 감염은 ER stress를 증가시켰으며, 이러한 결과로 Smad7 과발현 세포주에서 apoptosis에 의한 세포 독성이 증가됨을 알 수 있었다. 한편,

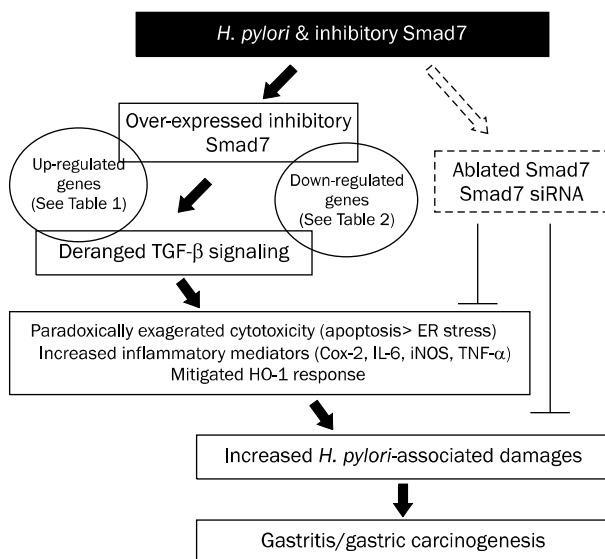


Fig. 4. Schematic summary. The current study raises hope that inhibiting Smad7 can be a strategy to alleviate *Helicobacter pylori*-induced gastric damage.
ER stress, endoplasmic reticulum stress.

Smad7 과발현주에서 *H. pylori* 감염 후 HO-1의 발현 감소는 Smad7의 과발현에 의해 항염증 사이토카인인 TGF-β의 작용을 억제시킨 것으로 해석된다. 또한 Smad7의 과발현 세포에서 *H. pylori*의 감염에 따라 변화하는 유전자의 분석으로 위 점막 세포주에서 TGF-β 신호전달의 억제인자로 작용하는 Smad7의 과발현은 *H. pylori* 감염에 따른 세포 독성 및 염증 매개인자의 증가와 관련이 있었다(Fig. 4).

이번 연구는 이미 염증성 대장질환에서 Smad7의 antisense oligonucleotide를 통한 Smad7 발현 억제를 통해 항염증 약제로 매우 효과적인 임상결과를 보이는 Morgensen 약물 연구²³⁻²⁵에서와 유사한 연구결과를 보였다. *H. pylori*에 감염된 환자의 조직에서 TGF-β 신호 전달의 중요한 매개단백질인 Smad3 활성화가 억제되고 이러한 결과로 Smad7의 발현이 증가하는 것으로 나타난다는 보고²⁶에서와 같이, *H. pylori* 감염 환자에서 억제된 TGF-β의 신호전달을 정상적인 상태로 조절할 수 있는 약물은 TGF-β 고유의 항염증 활성을 유도할 수 있을 것이다.

Smad7을 과발현시킨 세포에서 *H. pylori*에 대한 염증 반응과 세포사멸이 현저히 증가되어 위점막 세포 손상이 유발될 수 있으나, 반대로 Smad7 siRNA를 이용한 Smad7의 발현 억제는 *H. pylori* 감염에 따른 염증 반응을 약화시킬 수 있음을 증명하였다. 이번 연구에서는 *H. pylori* 감염에 따른 위 상피세포에서의 세포 독성과 염증 반응을 중심으로 Smad7의 역할을 규명하였으나, Monteleone 등²⁷은 크론병과 같은 만성염증성 대장질환에서 상피세포나 침윤 T 림프구 모두에서

Smad7이 과발현되어 있으며, 이를 antisense로 억제시켰을 때 염증이 약화되었다고 보고하였는데, 염증성 장질환 환자의 장조직에서도 같은 현상²⁸⁻³¹이 관찰되었다. 또한 Smad7의 과발현은 염증성 대장질환의 주요 전사인자인 NF-κB의 활성화 와도 연관됨을 보고하였고, 위나 장과 같은 장기 이외에도 신장 섬유화 및 신장염에도 Smad7이 주요하게 작동함을 보고한 바 있다.³² 이러한 연구결과는 Smad7 발현을 억제할 수 있는 anti-sense oligonucleotides에 의한 대장염 동물모델에서의 효능³³의 단계를 넘어서 염증성 대장질환 환자에서도 성공적인 임상효능을 발표한 바 있다.

저자들은 TGF-β 신호매개의 Smad2 또는 Smad3가 아닌 dominant negative TGF-β receptor를 과발현시킨 동물 모델을 통해 TGF-β 작용의 결손으로 인한 염증성 대장질환의 약화, 자가면역성 체장염의 발생과 바렛 식도나 *H. pylori* 감염에 대한 감수성의 증가에 따른 위식도암 및 염증성 대장암의 발생이 증가된다는 연구결과를 보고한 바 있다.¹⁻⁵ 이러한 비이상적인 TGF-β 신호 전달은 TGF-β receptor의 haplo-insufficiency state에 의해 염증의 약화 및 암 발생으로 이어질 수 있는데, 다른 연구자들도 구강염,³⁴ *H. pylori* 연관 위염 및 위암 발생,^{35,36} probiotics의 작용,³⁷ gastrin 발현³⁸ 등에 Smad7이 미치는 영향에 대하여 보고한 바가 있다.

이번 연구에서는 *H. pylori* 감염에 있어 Smad7의 역할에 대하여 조사하였으나, Nguyen 등¹⁰의 연구에 의하면 *H. pylori* 독성인자 CagA는 Smad3와 특이적으로 결합하여 TGF-β에 의해 유도되는 IL-8, CXCL1, CXCL3 등과 같은 염증 매개인자들의 발현 억제를 못하게 함으로써 *H. pylori*에 의한 염증 반응을 증대시킬 수 있고, 더불어 이러한 항염증 사이토카인인 TGF-β나 그 수용체 활성을 억제시켜 *H. pylori* 감염에 따른 면역 감시체계를 교란시킨다는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 Jo 등³⁹의 연구에 의하면 *H. pylori* 감염 환자에서 TGF-β 수용체의 발현이 감소되어 있으며, *in vitro* 연구에서 *H. pylori* 감염 24시간 이내에 유의한 TGF-β 발현이 감소되고 이러한 현상은 24시간 이후에 회복이 되는데, 이는 *H. pylori*에 속주에 유의한 염증전파를 위해 속주를 속이는 “stupid host defense response”일 수 있다고 보고하였다. 한편, 세포 보호 기능을 하는 Nrf2가 결손된 생쥐에서는 *H. pylori* 감염이 약화된다는 결과(저자 등의 미발표 자료)와 *H. pylori* 감염 후 활성산소 유도에 의한 자가탐식 저해가 주로 암 줄기세포에서 유발되어 *H. pylori* 증식에 유리한 반응을 초래한다는 보고⁴⁰ 등을 비추어 볼 때, *H. pylori* 감염에 의해 위염이나 위암으로 진전되는 비율이 1% 이내로 낮지만 심각한 위염이나 위암이 발생하는 경우에는 *H. pylori*에 의한 속주 간의 반응이 매우 중요하다는 사실을 알 수 있다.

결론으로 *H. pylori*가 class I carcinogen이기 때문에 위암

발생을 예방하기 위해서는 제균이 일차적인 예방 및 치료 방안이 될 수 있으나, 염증성 대장질환에서와 같이 Smad7 antisense oligonucleotide가 유망한 치료제로 임상시험 중인 점에 비추어 볼 때 TGF- β 신호의 조절인자로 작용하는 Smad7을 제어할 수 있는 약물의 개발은 *H. pylori*에 의한 세포 손상이나 염증을 제어할 수 있는 새로운 전략으로 제시될 수 있을 것이다.

요 약

목적: *Helicobacter pylori* 감염에 따른 세포 독성과 염증 반응에 있어 형질전환인자-베타에 의한 항염증 활성의 중요한 매개인자로 작용하는 Smad7의 역할을 알아보자 하였다.

대상 및 방법: 정상 위점막 세포주 RGM1에서 Smad7을 과발현 또는 발현을 억제시킨 상태에서 *H. pylori*를 감염시킨 후 세포사멸 인자의 변화와 염증 유발인자의 발현을 세포생물학적 방법으로 분석하였다.

결과: 위점막 세포주에서 Smad7의 과발현은 *H. pylori* 감염에 의한 세포사멸을 증가시켰다. 감염에 의한 COX-2, iNOS, TNF- α 등의 염증 유발인자의 발현 또한 대조 세포주에 비해 Smad7 과발현 세포주에서 증가하였으며, 이러한 염증 유발인자의 발현은 Smad7 발현 억제에 의해 감소되었다.

결론: 형질전환인자-베타 신호의 저해인자로 작용하는 Smad7이 *H. pylori* 감염에 의한 세포손상 및 위염 억제를 위한 새로운 치료표적으로 제시될 수 있을 것으로 생각된다.

색인단어: *Helicobacter pylori*; 형질전환인자-베타; Smad7; 위염

REFERENCES

1. Im YH, Kim HT, Kim IY, et al. Heterozygous mice for the transforming growth factor-beta type II receptor gene have increased susceptibility to hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:6665-6668.
2. Hahm KB, Cho K, Lee C, et al. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999;23:222-227.
3. Hahm KB, Lee KM, Kim YB, et al. Conditional loss of TGF-beta signalling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16 Suppl 2:115-127.
4. Hahm KB, Im YH, Parks TW, et al. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-198.
5. Hahm KB, Im YH, Lee C, et al. Loss of TGF-beta signaling contributes to autoimmune pancreatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1057-1065.
6. Camilo V, Barros R, Sousa S, et al. *Helicobacter pylori* and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells. *Carcinogenesis* 2012;33:1985-1992.
7. Shiotani A, Kamada T, Yamanaka Y, et al. Sonic hedgehog and CDX2 expression in the stomach. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23 Suppl 2:S161-S166.
8. Lee KM, Lee JS, Jung HS, Park DK, Park HS, Hahm KB. Late reactivation of sonic hedgehog by *Helicobacter pylori* results in population of gastric epithelial cells that are resistant to apoptosis: implication for gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2010; 287:44-53.
9. Barros R, Pereira B, Duluc I, et al. Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J Pathol* 2008;215:411-420.
10. Nguyen TT, Kim SJ, Park JM, Hahm KB, Lee HJ. Repressed TGF- β signalling through CagA-Smad3 interaction as pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Clin Biochem Nutr* 2015;57:113-120.
11. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2013;13:788-799.
12. Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:328-341.
13. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:790-811.
14. Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010;10:415-424.
15. Park S, Kim WS, Choi UJ, et al. Amelioration of oxidative stress with ensuing inflammation contributes to chemoprevention of *H. pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:549-560.
16. Han SU, Kim YB, Joo HJ, et al. *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis in a mice model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:253-261.
17. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:970-982.
18. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:1011-1022.
19. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 807-821.
20. Hong S, Lim S, Li AG, et al. Smad7 binds to the adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2. *Nat Immunol* 2007;8:504-513.
21. Yan X, Chen YG. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *Biochem J* 2011;434:1-10.
22. Akazawa Y, Isomoto H, Matsushima K, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to *Helicobacter pylori* VacA-induced apoptosis. *PLoS One* 2013;8:e82322.
23. Monteleone G, Neurath MF, Ardizzone S, et al. Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *N Engl J Med* 2015;372:1104-1113.
24. Monteleone G, Di Sabatino A, Ardizzone S, et al. Impact of patient characteristics on the clinical efficacy of mongersen (GED-0301), an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in active

- Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;43:717-724.
25. Ardizzone S, Bevvivino G, Monteleone G. Mongersen, an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in patients with active Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2016;9:527-532.
 26. Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Palmieri G, et al. Induction and regulation of Smad7 in the gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2004;126:674-682.
 27. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108: 601-609.
 28. Monteleone G, Mann J, Monteleone I, et al. A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation. *J Biol Chem* 2004;279:3925-3932.
 29. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunol* 2004;25:513-517.
 30. Monteleone G, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT. TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol* 2008;1 Suppl 1:S50-S53.
 31. Monteleone G, Caruso R, Pallone F. Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2012;18: 5664-5668.
 32. Wang W, Huang XR, Li AG, et al. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1371-1383.
 33. Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, et al. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF-beta1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology* 2006; 131:1786-1798.
 34. Han G, Bian L, Li F, et al. Preventive and therapeutic effects of Smad7 on radiation-induced oral mucositis. *Nat Med* 2013;19: 421-428.
 35. Yuasa Y. Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:592-600.
 36. Beswick EJ, Pinchuk IV, Earley RB, Schmitt DA, Reyes VE. Role of gastric epithelial cell-derived transforming growth factor beta in reduced CD4+ T cell proliferation and development of regulatory T cells during *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2011;79:2737-2745.
 37. Yang YJ, Chuang CC, Yang HB, Lu CC, Sheu BS. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori*-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFkB pathways. *BMC Microbiol* 2012;12:38.
 38. Datta De D, Bhattacharjya S, Maitra M, et al. IL1B induced Smad 7 negatively regulates gastrin expression. *PLoS One* 2011; 6:e14775.
 39. Jo Y, Han SU, Kim YJ, et al. Suppressed gastric mucosal TGF-beta1 increases susceptibility to *H. pylori*-Induced gastric inflammation and ulceration: a stupid host defense response. *Gut Liver* 2010;4:43-53.
 40. Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, et al. Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe* 2012;12:764-777.