

## Regulation in the Expression of Virulence Factors of *Helicobacter pylori* by the Interaction between AGS Cells and *H. pylori*

Yu-Ri Kim<sup>1</sup>, Wongwarut Boonyanugomol<sup>2</sup>, Won-jun An<sup>1,3</sup>, Trinh Minh Phuong<sup>1,3</sup>, Jin-Sik Park<sup>1</sup>,  
 Min-Kyoung Shin<sup>1,3,4,5</sup>, Seung-Chul Baik<sup>1,4</sup>, Woo-Kon Lee<sup>1,4,5</sup>, Myung-Je Cho<sup>1,4,5</sup>, Hyung-Lyun Kang<sup>1,4,5\*</sup>,  
 Myunghwan Jung<sup>1,3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Sciences and Liberal Arts, Mahidol University, Amnatcharoen Campus, Amnatcharoen, Thailand

<sup>3</sup>BK21 Center for Human Resource Development in the Bio-Health Industry, Department of Convergence Medical Science, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea

<sup>4</sup>Institute of Health Science, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea

<sup>5</sup>Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

### Corresponding

Hyung-Lyun Kang, Professor

Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, 15, Jinju-daero 816beon-gil, Jinju, Gyeongnam 52727, Republic of Korea

Phone : +82-55-772-8085

E-mail : gangssi@gnu.ac.kr

Myunghwan Jung, Associate Professor  
 Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, 15, Jinju-daero 816beon-gil, Jinju, Gyeongnam 52727, Republic of Korea

Phone : +82-55-772-8082

E-mail : mjung@gnu.ac.kr

Received : November 30, 2022

Revised : December 7, 2022

Accepted : December 8, 2022

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Copyright © 2022 Journal of Bacteriology and Virology

©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/>).

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) was defined as a Class 1 pathogenic carcinogen by WHO causing chronic inflammation in the stomach, thereby increasing the risk of gastric cancer. Various virulence factors are involved in the mechanism of gastric cancer caused by *H. pylori* infection. These virulence factors usually show different expression levels depending on the environment of *H. pylori*, which can affect the risk of gastric cancer. In this study, the differences in the expression levels of major virulence factors of *H. pylori* depending on the environment were investigated by comparing expression levels of *H. pylori* cultured with AGS or alone. As a result, there was no difference in the expression of adhesins of *alpA*, *sabA*, and *babA* even after co-culture with AGS cells. In addition, the co-culture environment did not induce a difference in the expression levels of *flaA* and *ureB*. On the other hand, *H. pylori* co-cultured with AGS cells showed low expression levels of *cagA*, *groEL*, and *oipA* and high expression of *vacA* compared to *H. pylori* cultured alone. Our results suggest that not only the presence or absence of virulence factor genes but also differences in expression levels should be considered when evaluating the risk of gastric cancer after *H. pylori* infection based on the virulence factors.

**Key Words:** *H. pylori*, Virulence factors, Gene expression, AGS cells

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)는 나선형의 그람음성 균으로 사람의 위점막에서만 서식하며 각종 위질환을 유발하는 병원체로서 전세계 인구의 50% 이상이 보균자인 것으로 추정되고 있다 (1, 2). 국내 선행연구에서 보고된 소아기 *H. pylori* 항체 양성률과 *H. pylori* 감염 후 대부분 만성 감염으로 이어지는 것을 고려할 때 국내 40대 이상의 연령에서는 90% 이상이 보균자로 추정된다 (3-6). 특히 *H. pylori*는 세계보건기구(World Health Organization)에 의해 지정된 1급 발암병원체로서 국내의 높은 위암 유병률의 주요 원인으로 알려져 있다 (4).

국제암연구기관(International Agency for Research on Cancer)이 2020년에 발간한 보고서에 의하면 *H. pylori*는 가장 주요한 발암병원체로서 감염에 의한 전세계 암 발생의 36.3%가 *H. pylori*에 의한 것으로 조사되었다(<https://gco.iarc.fr/causes/infections>). 하지만 모든 *H. pylori* 보균자에서 위암이 발생하지는 않으며 실제 보균자의 10~15%에서만 위암이 발생하는데 (7, 8) 이는 *H. pylori* 감염과 더불어 *H. pylori*의 병원성 인자, 환자와 병원체의 상호작용, 환자의 유전적 요인 등이 위암 발생 기전에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다 (7-11).

이에 암발생의 위험도를 증가시키는 *H. pylori* 병원성 인자에 대한 연구가 활발히 진행되어 *H. pylori*의 다양한 유전형과 함께 다양한 병원성 인자들이 규명되고 있다. 가장 대표적인 병원성 인자는 장상피화생을 유도하여 위암 발생 위험을 증가시키는 *cagA*와 *vacA*이다. *cagA*와 *vacA*는 직접 세포독성을 보이고 만성 염증을 유발함으로써 장상피화생을 유발하는 것으로 보고되었다 (1, 12-15). 그 밖에 위점막 상피세포에 서식이 가능하도록 운동성을 부여하는 편모(*flaA*) (16, 17), 낮은 수소이온농도지수 환경의 위에서 생존할 수 있도록 해주는 요소분해효소(*ureB*) (18, 19), 상피세포 부착에 관여하는 부착인자(*alpA*, *babA*, *sabA*, *oipA*) (20-23), 항산화인자(퍼옥시레독신, *ahpC*) (24) 및 최근 상피세포 염증유도 기능이 확인된 *groEL* (25, 26) 등은 *H. pylori* 감염에 따른 위암 발생 기전에 중요한 병원성 인자로 밝혀졌다.

위암 발병기전에 관여하는 *H. pylori*의 병원성 인자들은 서식 환경에 따라 발현의 차이를 보이게 된다(7, 12, 27, 28). 이는 같은 병원성 인자를 가진 병원체에 감염되더라도 감염된 환경에 따른 병원성 인자의 발현 차이로 인해 위암 발생 위험도가 달라지게 됨을 의미한다. 이에 *H. pylori* 감염과 위암 발생기전을 규명하기 위해서는 *H. pylori*의 실제 감염환경에서의 다양한 병원성 인자의 발현 비교 분석이 매우 중요하다. 하지만 *in vitro*에서 위점막의 환경(낮은 수소이온농도지수, 연동운동 등)을 구현하기는 어려워 *H. pylori* 감염 및 위암 발병 기전 연구가 힘든 실정이다. 그럼에도 불구하고 AGS 세포(human gastric adenocarcinoma cells)는 위상피세포 유래의 세포주이기에 *H. pylori* 연구에 많이 활용되고 있다 (29-33). 이에 본 연구에서는 AGS 세포와 공생 배양된 *H. pylori*의 병원성 인자 발현정도를 일반 배지에서 성장한 *H. pylori*에서의 병원성 인자 발현과 비교하여 *H. pylori*의 대표 병원성 인자의 발현 수준이 환경에 따라 어떻게 달라지는 분석함으로써 병원성 인자를 바탕으로 한 위암 발생 위험도 평가에 과학적 근거를 제시하고자 한다.

## MATERIALS AND METHODS

### *H. pylori*의 배양과 AGS 세포주 배양

*H. pylori* 26695 균주는 헬리코박터 파이로리 분리균주은행(*Helicobacter pylori* Korean Type Culture Collection, Gyeongsang National University, Jinju, Korea)에서 제공받았다. 액체질소에 보관되었던 균주는 10% 소혈청(ThermoFisher, Waltham, MA, USA)이 첨가된 브루셀라 한천배지(Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종하여 10% CO<sub>2</sub>, 100% 습도 및 37°C 조건에서 재활성화 하였다. 재활성화된 *H. pylori*는 10% 우태아혈청(Gibco, Waltham, MA, USA)과 0.4% 효모추출액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 RPMI-1640 (Gibco) 배지에 박층액체배양법을 이용하여 균주를 계대배양하여 이후 실험에 이용하였다 (34).

본 연구에서 사용한 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입한 위암세포주인 AGS (human female adenocarcinoma, KCLB No. 21739)를 사용하였다. 세포주는 10% 우태아혈청, penicillin (100 U/mL, Sigma-Aldrich), streptomycin (100 µg/mL, Sigma-Aldrich)이 첨가된 RPMI-1640 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 계대배양 하였다.

### *H. pylori*와 AGS 세포의 공동배양

*H. pylori*를 10% 우태아혈청과 0.4% 효모추출액이 첨가된 RPMI-1640 배지에 배양하면서 4시간 간격으로 OD<sub>600</sub>에서 흡광도(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 측정하였다. 흡광도를 통해 분석된 성장곡선의 대수증식기인 24시간 배양된 *H. pylori*를 AGS 세포와 공동배양에 활용하였다.

배양된 AGS 세포를 인산완충용액(pH 7.4)으로 3회 세척 후 10% 우태아혈청과 0.1% 효모추출액이 첨가된 RPMI-1640 배지(항생제 미첨가)로 부유하여 2 × 10<sup>5</sup> cells/mL로 직경 100 mm 세포배양접시(ThermoFisher)에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 박층액체배양으로 24시간 배양된 대수증식기의 *H. pylori*를 세포배양액 접종 후 배지의 최종 OD<sub>600</sub> 흡광도가 0.01, 0.02, 0.04가 되도록 접종하였다. 공동배양된 AGS 세포는 시간대별로 트립신(WelGENE, Gyeongsan, Korea) 처리 후 수거하여 세포 수 및 세포 생존율을 MTT assay (ThermoFisher)를 통해 측정하였다. *H. pylori* 접종 후 세포 생존율의 변화가 매우 미비한 OD<sub>600</sub> 흡광도 0.01 접종량을 공동배양 최종 조건으로 선정하여 이후 실험을 진행하였다(multiplicity of infection, MOI 50).

## H. pylori 공동배양 후 AGS 세포공포 형성 분석

H. pylori에 의한 AGS 세포공포 형성을 분석하기 위해 실시간 세포 영상 촬영을 실시하였다. H. pylori와 공동배양된 AGS 세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 Real time cell image system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 이용하여 24시간 동안 1시간 간격으로 촬영하였다. 세포공포 형성정도는 촬영된 세포 사진의 3회 암맹평가를 통해 이루어졌다.

## H. pylori 병원성 인자의 발현 분석

단독 배양된 H. pylori와 AGS 세포와 함께 배양된 H. pylori를 수거하여 RNA를 추출하였다(Qiagen, Hilden, Germany). 추출된 RNA는 NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher)로 정량 후 reverse transcriptase (Qiagen)을 이용하여 cDNA로 역전사되었다. 이후 Table 1의 primer와 조건으로 cDNA를 PCR로 증폭(SimpliAmp Thermal Cycler, ThermoFisher)하고 전기 영동 후 밴드의 강도를 ImajeJ software (1.53e version, NIH, Bethesda, MD, USA)로 측정하였다. 측정된 전기 영동 밴드는 housekeeping 유전자인 16S rRNA 유전자의 발현량으로 보정(semi-quantitative digital analysis of PCR)하여 AGS 세포 RNA에 의한 실험 오차를 최소화하였다(35). H. pylori와 AGS 세포의 상호작용에 의한 H. pylori 병원성 인자의 발현 변화는 같은 배지에 단독으로 배양된 H. pylori의 병원성 인자 발현과 비교하여 분석하였다.

## 통계 분석

결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였다. SPSS version 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Student's t-test와 repeated measures of ANOVA (Tukey's HSD test for post-test of multiple comparison) 통계분석을 실시하였다. p < 0.05일 경우 유의적인 차이가 있다고 판단하였다.

**Table 1.** Nucleotide sequences of primers and PCR condition

	Gene	Sequence (5'-3')	Annealing	Cycles	Size (bp)
Pathogenesis (virulence)	<i>cagA</i>	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGATC-3' 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA-3'	55	30	349
	<i>vacA</i>	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' 5'-GCGTCTAAATAATTCCAAGG-3'	52	30	259/286
	<i>groEL</i>	5'-AGCGGCTGTTGAAGAAGGTA-3' 5'-CAAATGCCCTTCGTGTTTT-3'	55	30	212
	<i>flaA</i>	5'-GGCGGTCAGGATTTAACAAA-3' 5'-AAATTCACCGTGTTTCTGC-3'	55	30	164
	<i>ureB</i>	5'-TCTTTGGCGTAAAACCCAAC-3' 5'-CATAAGCCGCTTGAGACACA-3'	55	30	177
adhesion	<i>alpA</i>	5'-ACGCTTCTCCAATACC-3' 5'-AACACATCCCCGCATTC-3'	55	30	304
	<i>oipA</i>	5'-CAAGCGCTTAACAGATAGGC-3' 5'-AAGGCGTTTTCTGCTGAAGC-3'	55	30	450
	<i>sabA</i>	5'-GAGCTATTGACCAGCTCAATG-3' 5'-TAGTTTGATTCTGTTCTCATT-3'	50	30	447
	<i>babA</i>	5'-AATCAAAAAGGAGAAAAACATGAAA-3' 5'-GTCCGTGAAAGGGTTGAAAG-3'	55	30	1,098
Antioxidant peroxiredoxin	<i>ahpC</i>	5'-GAAAAAGGCGGTATTGGTCA-3' 5'-GATCACCGCATGCCTTACTT-3'	55	30	163
House keeping	16S rRNA	5'-GGAGGATGAAGGTTTTAGGATTG-3' 5'-TCGTTTAGGGCGTGGACT-3'	55	30	390

## RESULTS

### H. pylori와 AGS 세포 공생배양 조건 확립

H. pylori를 10% 우태아혈청과 0.4% 효모추출액이 첨가된 RPMI-1640 배지에 박층액체배양법으로 배양하며 OD<sub>600</sub> 흡광도를 측정한 결과 H. pylori는 배양 후 12~36시간에서 균 성장에 따른 급속한 흡광도 증가 구간(대수증식기)을 보였다 (Fig. 1). H. pylori를 활용한 연구에서 활발히 증식하는 균주를 이용하는 것이 중요하므로 본 연구에서는 배양 24시간이 지난 균주를 수거하여 AGS 세포 접종(공생 배양) 실험에 이용하였다.

대수증식기 H. pylori를 AGS에 최종 OD<sub>600</sub> 흡광도가 0.01, 0.02, 0.04가 되도록 접종 후 24시간 뒤 세포 생존율을 분석하였다. H. pylori를 접종하지 않은 세포와 비교 시 모든 접종군에서 세포 생존율의 유의적 차이가 관찰되지 않았으나 접종 균수가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 세포 생존율의 변화가 실험 결과에 줄 영향을 최소화하기 위하여 본 연구에서는 접종 H. pylori의 균수를 접종 후 배지의 최종 OD<sub>600</sub> 흡광도가 0.01이 되도록 설정하였으며 이때 MOI는 50 이었다 (Fig. 2).

MOI 50의 H. pylori를 AGS 세포에 접종 시 세포공포 형성 수준을 분석하여 H. pylori와 AGS 세포의 상호작용을 유추하였다. 그 결과 H. pylori 접종 이후 1시간부터 공포형성세포 비율이 대조군에 비해 유의적으로 증가하기 시작하였으며, 16시간부터 공포형성세포의 비율이 급격하게 증가하였고 24시간에는 그 비율이 최고점을 유지하였다( $p < 0.001$ , Fig. 3A).

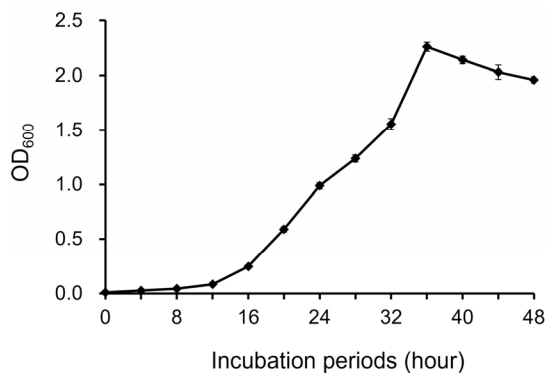


Fig. 1. Growth curve of *H. pylori* 26695 in thin-layer liquid culture in RPMI-1640 containing 10% fetal bovine serum and 0.4% yeast extract.

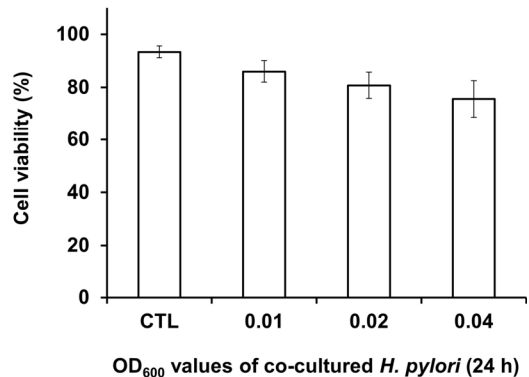


Fig. 2. Viability of AGS cells after 24 h in the co-culture system. *H. pylori* was inoculated with the bacterial density of 0.01, 0.02, and 0.04 OD<sub>600</sub>. CTL, bacterial-free control.

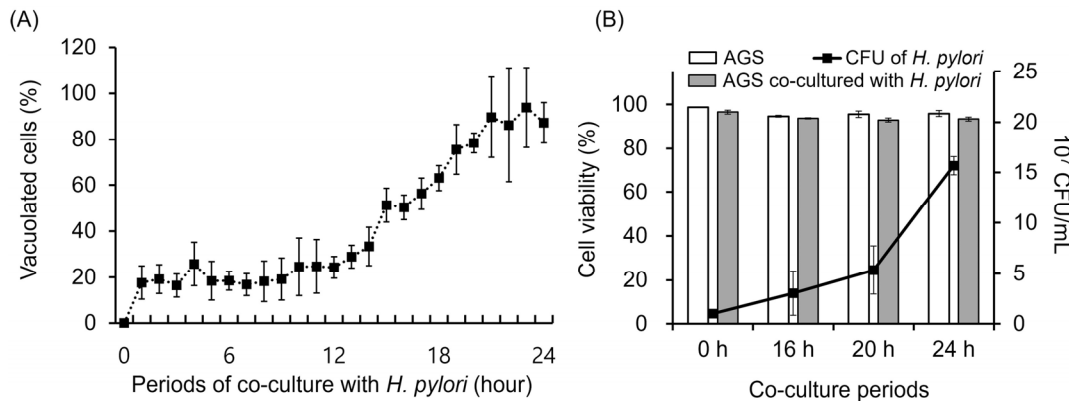


Fig. 3. (A) AGS cell population showing intracellular vacuoles. The cells were co-cultured with MOI 50 of *H. pylori* for 24 h. (B) Viability of AGS cells (bars) and colony forming unit (line) of *H. pylori* after co-culture at MOI 50 (\*\*\*,  $p < 0.001$ ).

대수증식기의 *H. pylori*를 AGS에 최종 OD<sub>600</sub> 흡광도 0.01이 되도록 접종 후 0~24시간의 세포 생존율과 *H. pylori*의 집락형성(colony forming unit, CFU)을 분석한 결과 세포 생존율이 대조군과 같은 수준으로 유지되고 *H. pylori*도 성장을 하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 이에 본 연구에서는 병원체 및 세포의 활성이 모두 확인되는 최종 OD<sub>600</sub> 흡광도 0.01의 *H. pylori* 접종 후 16~24시간에 *H. pylori*와 AGS 세포 간의 부착 등의 상호작용이 가장 활발할 것으로 예측하여 이 시점에서의 *H. pylori*의 병원성 인자 발현정도를 분석하였다.

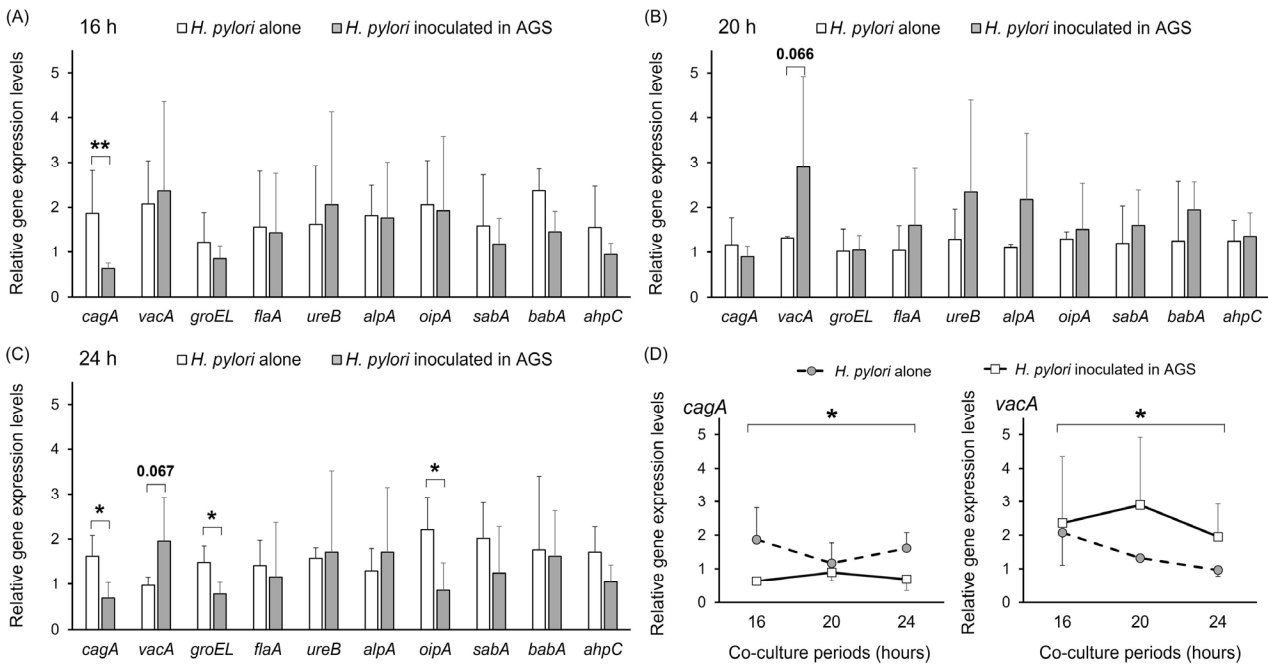
### *H. pylori*와 AGS 세포의 상호작용에 따른 *H. pylori* 병원성 인자 발현 차이 분석

*H. pylori*와 AGS 세포의 상호작용(HP-AGS group, 공생배양)에 의한 *H. pylori* 병원성 인자의 발현 변화는 같은 배지에 단독으로 배양된 *H. pylori*(HP-Alone group)의 병원성 인자 발현과 비교하여 분석하였다. *cagA*의 경우 16~24시간동안 HP-Alone에서 발현이 높았으며 유의성은 16시간과 24시간에서 확인되었다. 세포공포형성에 관여하는 *vacA*의 경우 16~24시간동안 HP-AGS에서 발현이 높았으며, 20시간 및 24시간 때 각각  $p = 0.065$  및  $p = 0.067$ 의 통계적 차이를 보였다. 다른 8개의 병원성 인자는 16시간 및 20시간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 24시간의 HP-Alone에서 유의적으로 높은 수준의 *groEL*, *oipA*의 발현을 보였다 (Fig. 4).

Repeated measures of ANOVA 분석을 통해 16~24시간 동안의 병원성 인자 발현 변화양상 차이를 비교하였다. HP-AGS는 HP-Alone와 비교 시 낮은 수준의 *cagA* 발현( $p < 0.05$ )과 높은 수준의 *vacA* 발현( $p < 0.05$ )을 보였다 (Fig. 4).

## DISCUSSION

*H. pylori*는 국제보건기구(WHO)에서 지정한 1급 발암 병원체이다 (2). 다양한 *H. pylori*의 병원성 인자가 위암 발생의 위험도를 높이는 것은 것으로 보고되었으나 *H. pylori* 감염과 위암 발생의 명확한 기전은 명확히 규명되지 않았다. 이는 *H. pylori*가 실험동물 감염모델이 명확히 확립되지 않은 난배양성 병원체이며 병원성 인자가 매우 다양하다는 특징 이외에도 병원성 인자의 발현이 서식 환경에 따라 달



**Fig. 4.** (A-C) Comparison of the gene expression levels of virulence factor of *H. pylori* at each time point following the co-culture with AGS or not. (D) Changes in the relative gene expression levels of *cagA* and *vacA* over 16-24 h. *H. pylori* co-cultured with AGS cells showed a lower pattern of *cagA* expression and a higher pattern of *vacA* expression compared to *H. pylori* cultured alone. *H. pylori* was cultured with AGS cells (HP-AGS) or without (HP-Alone) in RPMI-1640 containing 10% fetal bovine serum and 0.1% yeast extracts.

라지고, 병원체가 감염·서식하는 위 조직 환경을 실험적으로 구현하기 힘들기 때문이다. 이러한 어려움을 극복하고 *H. pylori* 감염과 위암 발생의 기전을 규명하고자 많은 연구에서 위암세포주인 AGS (human female gastric adenocarcinoma)를 활용하고 있다 (29-33). AGS는 위상피세포 유래로서 *H. pylori*가 부착하여 증식하는 *in vivo*의 위상피세포의 특징을 가지고 있어 실제 감염에서의 세포와 병원체간 부착에 의한 상호작용 연구에 활용되고 있다.

다양한 선행연구에서 AGS 세포를 활용한 *H. pylori* 감염과 병인기전 연구가 수행되고 있지만 대부분의 연구가 AGS 세포반응 분석에 집중되어져 있고 *H. pylori*-AGS 세포 상호작용이 *H. pylori* 병원체에 미치는 영향 연구는 매우 미비하다 (30-32, 36, 37). 일부 선행연구에서 *H. pylori*-AGS 세포 상호작용에 의한 *H. pylori* 유전자 발현 변화를 분석하였으나 난배양성의 *H. pylori* 특징으로 인해 장기간 공생 배양을 할 수 없어 짧은 공생배양시간(3~6시간 내외) 조건을 활용하고 있다 (30, 32, 33, 37). 하지만 이는 *H. pylori*가 숙주 세포에 부착하기는 충분하나 상호작용에 의한 *H. pylori*의 유전자 등의 변화를 분석하기에는 매우 짧은 시간이다.

이에 본 연구에서는 장시간 공생 배양할 수 있는 조건을 확립하여 *H. pylori*-AGS 세포 상호작용이 *H. pylori*의 대표적인 위암 발생 병원성 인자의 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 난배양성인 *H. pylori*의 공생 배양 시 생존율을 높이고 AGS 세포 자체 성장에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 0.1% 효모추출액을 활용하였다. 0.4% 효모추출액에 첨가된 배지에서 성장한 *H. pylori*는 0.1% 효모추출액이 첨가된 공생 배양 조건에서도 집락형성능(CFU)을 유지하였으며 AGS 세포 성장 역시 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 또한 *H. pylori*에 의한 AGS 세포 공포형성 정도를 분석하여 접종 후 16~24시간 사이에 *H. pylori*-AGS 세포 상호작용이 *H. pylori*에 미치는 영향이 제일 큰 것으로 판단하였고 이 시간대를 바탕으로 *H. pylori* 병원성 인자 발현 변화를 분석하였다 (Fig. 3A).

*cagA*는 *H. pylori* 위암 발생 기전에서 가장 많은 연구가 수행된 병원성 인자로 CagA 단백질이 세포내로 유입되어 세포독성을 나타냄으로써 위암을 유발하는 것으로 알려져 있다 (11, 38). 이 병원성 인자는 *H. pylori*의 철 이온의 농도, NaCl 농도, 수소이온농도지수의 변화 등과 같은 서식환경에 따라 발현이 달라지는 것이 선행연구에서 보고되었으며 본 연구에서도 *H. pylori*-AGS 세포 간의 상호작용이 *cagA*의 발현 차이를 유발하는 것이 확인되었다 (37, 39-41). *cagA* 인자의 발현이 달라지는 명확한 기전은 규명되지 않았지만 선행연구에서 낮은 수소이온농도지수 환경에서 발현이 감소하고 수소이온농도지수, 적절한 철 이온 농도, 높은 NaCl의 농도에서 발현이 증가하는 것을 고려할 때 *cagA*는 *H. pylori*가 성장이 용이한 환경에서 발현이 증가하는 것으로 보인다. 하지만 AGS 세포에 부착한 *H. pylori*의 *cagA* 발현이 부유 된 *H. pylori*보다 발현이 증가함을 보고한 선행연구(29)와는 달리 본 연구에서는 단독으로 배양한 *H. pylori*에서 증가된 *cagA*의 발현이 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 이는 본 연구가 *H. pylori*-AGS 세포의 상호작용에 의한 *H. pylori* 병원성 인자 발현 차이에 초점을 맞추어 공생배양 된 *H. pylori*를 모두 수거하여 RNA 샘플링을 실시하였고, 부착 병원체와 접종 후 일부 부유 병원체를 분리하지 않은 점에서 유발된 차이로 보인다. *cagA*가 위암 발생의 위험도를 증가시키는 병원성 인자임을 고려할 때, 이러한 다양한 연구결과를 바탕으로 *cagA*의 발현을 증가시키는 요인과 기전이 추후에 명확히 규명될 필요가 있을 것으로 생각된다.

*vacA*는 세포 공포형성을 유도하는 병원성 인자로 대부분의 *H. pylori*가 보유하고 있다. *vacA*는 세포표면 투과성을 변화시키고 신호전달 체계 이상을 유발하여 세포자멸사를 유발함으로써 위암 발생 위험도를 증가시키는 것을 알려져 있다 (11, 38, 42). 본 연구에서는 *H. pylori*-AGS 세포의 상호작용에 의해서 *H. pylori*의 *vacA* 발현이 16-24시간 동안 높은 수준으로 유도되는 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 4,  $p < 0.05$ ). 세포공포형성 비율이 급격히 증가했던 24시간 쯤에 *vacA*의 발현차이가 가장 큼을 확인할 수 있었다. 단독 배양과 비교 시 AGS 세포와의 공생배양에 의한 상호작용으로 인해 *vacA*의 발현이 증가됨을 확인할 수 있는 결과로 선행연구 결과와 일치하였다 (29).

GroEL은 *H. pylori*에서 분비되어 철분과 결합하는 특징을 가지는 단백질로 알려져 있다 (43). 또한 heat shock proteins으로서 대식 세포 등을 자극하여 만성 염증을 유발하는 항원으로 *H. pylori*에 다량 존재하는 항원이다 (25). 그럼에도 불구하고 *groEL*의 위암 발병기전 역시 거의 알려진 바 없으며, 최근에 들어서야 *groEL* 항원에 대한 양성 혈청 환자에서 위암의 위험도가 유의적으로 높은 것이 확인되었다 (44-46). 본 연구에서는 *groEL*의 발현이 16 및 20시간에는 없었으나 24시간 때에 유의적으로 *H. pylori*-AGS 공생배양 조건에서 발현이 감소한 것이 확인되었다. 본 연구에서 24시간때에 *H. pylori*-AGS 세포 공생배양에서 *H. pylori*의 병원성 부착인자(adhesin)인 *oipA* ( $p < 0.05$ ), *subA*, *babA*의 발현이 감소하였는데 이는 *groEL*의 발현과 부착인자 발현의 밀접한 상관관계를 보고한 선행연구와 일치하는 결과이다 (47). 하지만 위암과의 높은 상관관계가 새롭게 보고된 *groEL*의 발현변화와 병인기전은 후속연구에서 좀더 자세히 다뤄져야 할 필요성이 있다.

*H. pylori*의 초기 위 조직 정착 및 병인기전에서 편모(*flaA*), 요소분해요소(*ureB*), 각종 부착인자(*alpA*, *oipA*, *sabA*, *babA*), 및 항산화인자(*ahpC*)는 매우 중요한 역할을 한다. 위에 침투한 *H. pylori*는 강산의 위 환경에서 *ureB*를 통해 위산과 병원체의 접촉부위를 중화하고 편모를 통해 수소이온농도지수가 중성인 위점막으로 이동한 후 부착인자를 이용해 상피세포와 위점막 사이에 정착하게 된다. 또한 항산화인자를 이용하여 숙주 활성산소 등을 중화하여 면역반응으로부터 스스로를 보호한다 (7, 38, 48, 49). 이중 *flaA*는 구조단백질로서

식환경에 따라 발현이 크게 달라지지 않는 것으로 보고된 병원성 인자이다 (50). *ureB*와 *ahpC*는 수소이온농도지수와 활성산소와 같은 서식환경변화에 따라 발현이 달라지는 인자이나 본 연구에서는 수소이온농도지수의 환경과 활성산소 등의 환경이 동일하여 발현차이를 보이지 않은 것으로 생각된다 (24, 51). 부착인자(*alpA*, *oipA*, *sabA*, *babA*) 역시 환경에 따라 발현이 달라지는 것으로 알려진 병원성 인자이다. 본 연구에서는 *oipA*는 24시간째 유의적으로 *H. pylori*-AGS cells의 상호작용에 의해 발현이 감소한 것이 확인되었다. *oipA*의 발현은 *cagA*의 발현과 상관관계가 있는 것으로 보고되었는데 (21, 52) 본 연구의 24시간째 *H. pylori*-AGS 세포에서의 유의적인 발현 감소는 같은 시간대의 *cagA* 발현 감소와 관련이 있는 것으로 생각된다. *alpA*, *sabA*와 *babA* 역시 병원체의 외막에 발현되는 병원성 부착인자로 서식 환경에 따라 발현이 크게 변화는 것으로 알려져 있다. 그 중 *alpA* (20, 23, 53)와 *sabA* (21)는 주로 수소이온농도지수의 변화에 의해서 발현이 달라지는 것이 보고되었는데 본 연구의 배양 환경에서는 두 병원성 인자의 발현을 다르게 유도할 만큼의 수소이온농도지수 변화가 없었을 것으로 판단된다. *babA*는 서식 환경에 따라 발현이 매우 크게 달라지는 병원성 인자이다 (22). *babA*는 공생배양에 의한 세포 상호작용 보다는 Le<sup>b</sup> 항원 발현 여부, 염증의 상태 등의 환경에 의해서 주로 발현이 달라지는 인자로 생각되어진다 (54, 55). 선행연구에서 제시한 것과 같이 본 연구에서도 *babA*의 발현차이는 관찰되지 않았다. 이는 세포와의 부착 및 상호작용의 서식 환경이 *babA*의 발현 차이를 유도할 수 있는 요인이 되지 못함을 시사한다. 추가로, *babA*의 발현은 위암 발생 위험도를 21.7배 증가시키는 것으로 보고된 주요 병원성 인자이다 (56). 그럼에도 불구하고 병원체의 서식 환경에 의해 발현이 on/off 방식으로 조절되는 특징을 보이고 있어 (22) *babA* 발현의 차이를 유발하는 요인 분석이 추후 연구에서 반드시 수행되어야 할 것으로 보인다.

본 연구를 통해 *H. pylori* 감염에서 위암 발생 위험도를 높이는 것으로 알려진 대표적인 병원성 인자 10개의 발현 수준이 *H. pylori* 서식 환경에 따라, 특히 AGS 세포와의 공생 환경에서 어떻게 달라지는지 확인할 수 있었다. AGS 세포와 공생 배양된 *H. pylori*는 단독 배양된 *H. pylori*에 비해 높은 *vacA* 발현 수준과 낮은 *cagA* 수준으로 보여주었다. *oipA*를 제외한 부착인자와 대표적인 병원성 인자인 *flaA*와 *ureB*에서는 발현의 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 *cagA*와 *vacA*를 제외한 다른 병원성 인자와 부착 인자들은 *H. pylori*가 서식 세포와 접촉을 하더라도 발현에 크게 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 유전자들은 세포 접촉 자체만의 환경 변화보다는 수소이온농도지수 변화, 염증 면역의 발현 여부, 서식 세포의 특이 항원 발현 여부 등에 더 큰 영향을 받는 것으로 판단된다.

상기의 결과들은 병원성 인자를 활용한 *H. pylori* 감염 후 위암 발생 위험도를 평가할 때 병원성 인자 유전자의 유무와 함께 유전자 발현 차이를 고려해야 함을 시사한다. 또한 위암 발생 요인의 유전자를 지닌 *H. pylori*에 감염되었음에도 불구하고 위암이 발생하지 않는 사례에 과학적 근거로 활용될 수 있을 것이다. 이는 향후 효과적이고 정확한 위암 위험도 및 예후 판단에 활용되어 세계 1위의 위암 발생국이라는 오명을 씻는데 일조할 수 있으리라 생각된다.

## ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구는 한국연구재단 기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2013R1A1A2060887, 2019R111A3A01059312, 2021R111A3059179).

## REFERENCES

- 1) Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:321-33.
- 2) Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:205-14.
- 3) Youn HS, Baik SC, Cho YK, Woo HO, Ahn YO, Kim K, et al. Comparison of *Helicobacter pylori* infection between Fukuoka, Japan and Chinju, Korea. *Helicobacter* 1998;3:9-14.
- 4) Shin A, Kim J, Park S. Gastric cancer epidemiology in Korea. *J Gastric Cancer* 2011;11:135-40.
- 5) Kim N, Park RY, Cho SI, Lim SH, Lee KH, Lee W, et al. *Helicobacter pylori* infection and development of gastric cancer in Korea: long-term follow-up. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:448-54.
- 6) Ko JS, Kim KM, Oh YL, Seo JK. *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Korean children. *Pediatr Int* 2008;50:628-31.

- 7) Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastro Hepatol* 2010;7:629-41.
- 8) Kalali B, Mejías Luque R, Javaheri A, Gerhard M. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators Inflamm* 2014;2014:426309.
- 9) Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis* 2013;14:341-9.
- 10) Axon A. *Helicobacter pylori* and public health. *Helicobacter* 2014;19 Suppl 1:68-73.
- 11) Kalali B, Mejías Luque R, Javaheri A, Gerhard M. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators Inflamm* 2014;2014:426309.
- 12) Ando T, Wassenaar TM, Peek Jr RM, Aras RA, Tschumi AI, van Doorn LJ, et al. A *Helicobacter pylori* restriction endonuclease-replacing gene, *hrgA*, is associated with gastric cancer in Asian strains. *Cancer Res* 2002;62:2385-9.
- 13) Choe YH, Kim PS, Lee DH, Kim HK, Kim YS, Shin YW, et al. Diverse *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori* in Korea and clinical correlation. *Yonsei Med J* 2002;43:351-6.
- 14) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
- 15) Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:479-86.
- 16) Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J* 2016;39:14-23.
- 17) Skene C, Young A, Every A, Sutton P. *Helicobacter pylori* flagella: antigenic profile and protective immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50:249-56.
- 18) Miller EF, Maier RJ. Ammonium metabolism enzymes aid *Helicobacter pylori* acid resistance. *J Bacteriol* 2014;196:3074-81.
- 19) Schwartz JT, Allen LAH. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *J Leukoc Biol* 2006;79:1214-25.
- 20) Loh JT, Shum MV, Jossart SD, Campbell AM, Sawhney N, McDonald WH, et al. Delineation of the pH-responsive regulon controlled by the *Helicobacter pylori* ArsRS two-component system. *Infect Immun* 2021;89:e00597-20.
- 21) Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006;55:775-81.
- 22) Ansari S, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* BabA in adaptation for gastric colonization. *World J Gastroenterol* 2017;23:4158-69.
- 23) McGowan CC, Necheva AS, Forsyth MH, Cover TL, Blaser MJ. Promoter analysis of *Helicobacter pylori* genes with enhanced expression at low pH. *Mol Microbiol* 2003;48:1225-39.
- 24) O'Riordan AA, Morales VA, Mulligan L, Faheem N, Windle HJ, Kelleher DP. Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine* 2012;30:3876-84.
- 25) Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, et al. *Helicobacter pylori* virulence factors—mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells* 2020;10:27.
- 26) González-López MA, Velázquez-Guadarrama N, Romero-Espejel ME, de Jesús Olivares-Trejo J. *Helicobacter pylori* secretes the chaperonin GroEL (HSP60), which binds iron. *FEBS Lett* 2013;587:1823-8.



- 27) Fujimoto S, Ojo OO, Arnqvist A, Wu JY, Odenbreit S, Haas R, et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:49-58.
- 28) Kennemann L, Brenneke B, Andres S, Engstrand L, Meyer TF, Aebischer T, et al. In vivo sequence variation in *HopZ*, a phase-variable outer membrane protein of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2012;80:4364-73.
- 29) Raghwan, Chowdhury R. Host cell contact induces *Fur*-dependent expression of virulence factors *cagA* and *vacA* in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2014;19:17-25.
- 30) Kawahara Y, Hirashita Y, Tamura C, Kudo Y, Sakai K, Togo K, et al. *Helicobacter pylori* infection modulates endogenous hydrogen sulfide production in gastric cancer AGS cells. *Helicobacter* 2020;25:e12732.
- 31) Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF- $\kappa$ B and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab Invest* 2004;84:49-62.
- 32) Backert S, Gressmann H, Kwok T, Zimny Arndt U, König W, Jungblut PR, et al. Gene expression and protein profiling of AGS gastric epithelial cells upon infection with *Helicobacter pylori*. *Proteomics* 2005;5:3902-18.
- 33) Kim N, Marcus EA, Wen Y, Weeks DL, Scott DR, Jung HC, et al. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun* 2004;72:2358-68.
- 34) Joo JS, Park KC, Song JY, Kim DH, Lee KJ, Kwon YC, et al. A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010;15:295-302.
- 35) Antiabong JF, Ngoepe MG, Abechi AS. Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Vet World* 2016;9:935-9.
- 36) Sukri A, Hanafiah A, Kosai NR, Mohammed Taher M, Mohamed R. New insight on the role of *Helicobacter pylori* *cagA* in the expression of cell surface antigens with important biological functions in gastric carcinogenesis. *Helicobacter* 2022;27:e12913.
- 37) Loh JT, Torres VJ, Cover TL. Regulation of *Helicobacter pylori* *cagA* expression in response to salt. *Cancer Res* 2007;67:4709-15.
- 38) Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncol* 2014;10:1487-500.
- 39) Karita M, Tummuru MK, Wirth HP, Blaser MJ. Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* *cagA* expression. *Infect Immun* 1996;64:4501-7.
- 40) Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, Tompkins LS, Falkow S. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003;71:3529-39.
- 41) Ernst FD, Bereswill S, Waidner B, Stoof J, Mäder U, Kusters JG, et al. Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* *Fur*-and iron-regulated gene expression. *Microbiology* 2005;151:533-46.
- 42) Foegeding NJ, Caston RR, McClain MS, Ohi MD, Cover TL. An overview of *Helicobacter pylori* *VacA* toxin biology. *Toxins (Basel)*. 2016;8:173.
- 43) Mendoza JA, Ignacio JL, Buckley CM. The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori* exhibits chaperone and ATPase activities at elevated temperatures. *BioChem* 2021;1:19-25.
- 44) Blase JL, Campbell PT, Gapstur SM, Pawlita M, Michel A, Waterboer T, et al. Prediagnostic *Helicobacter pylori* antibodies and colorectal cancer risk in an elderly, caucasian population. *Helicobacter* 2016;21:488-92.
- 45) El Hafa F, Wang T, Ndifor VM, Jin G. Association between *Helicobacter pylori* antibodies determined by multiplex serology and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Helicobacter* 2022;27:e12881.

- 46) Jala I, Almanfaluthi ML, Laha T, Kanthawong S, Tangkawattana S, Saichua P, et al. *Helicobacter pylori* GroEL seropositivity is associated with an increased risk of *Opisthorchis viverrini*-associated hepatobiliary abnormalities and cholangiocarcinoma. *Korean J Parasitol* 2021;59:363-8.
- 47) Yamaguchi H, Osaki T, Taguchi H, Hanawa T, Yamamoto T, Kamiya S. Relationship between expression of HSP60, urease activity, production of vacuolating toxin, and adherence activity of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 1998;33:6-9.
- 48) Reyes VE, Peniche AG. *Helicobacter pylori* deregulates T and B cell signaling to trigger immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 2019;421:229-65.
- 49) Šterbenc A, Jarc E, Poljak M, Homan M. *Helicobacter pylori* virulence genes. *World J Gastroenterol* 2019;25:4870-84.
- 50) De la Cruz MA, Ares MA, Von Bargen K, Panunzi LG, Martinez-Cruz J, Valdez Salazar HA, et al. Gene expression profiling of transcription factors of *Helicobacter pylori* under different environmental conditions. *Front Microbiol* 2017;8:615.
- 51) Akada JK, Shirai M, Takeuchi H, Tsuda M, Nakazawa T. Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* 2000;36:1071-84.
- 52) Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *hopH* gene polymorphisms. *J Infect Dis* 2006;194:1346-55.
- 53) Marcus EA, Sachs G, Scott DR. Acid-regulated gene expression of *Helicobacter pylori*: insight into acid protection and gastric colonization. *Helicobacter* 2018;23:e12490.
- 54) Styer CM, Hansen LM, Cooke CL, Gundersen AM, Choi SS, Berg DE, et al. Expression of the BabA adhesin during experimental infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2010;78:1593-600.
- 55) Kable ME, Hansen LM, Styer CM, Deck SL, Rakhimova O, Shevtsova A, et al. Host determinants of expression of the *Helicobacter pylori* BabA adhesin. *Sci Rep* 2017;7:46499.
- 56) Lee DH, Ha JH, Shin JI, Kim KM, Choi Jg, Park S, et al. Increased risk of severe gastric symptoms by virulence factors *vacAs1c*, *alpA*, *babA2*, and *hopZ* in *Helicobacter pylori* infection. *J Microbiol Biotechnol* 2021;31:368-79.