

## 위선암에서 *Helicobacter pylori* 감염과 Interleukin-1 $\beta$ 다형성의 역할에 대한 연구

단국대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>서울대학교 의과대학 외과학교실, <sup>2</sup>인제대학교 서울백병원 한국위암센터

이주호 · 윤여규<sup>1</sup> · 최국진<sup>1</sup> · 김진복<sup>2</sup>

### The Roles of *Helicobacter pylori* Infection and Interleukin-1 $\beta$ Polymorphism in Gastric Cancer

Joo-Ho Lee, M.D., Yoe-Kyu Youn, M.D.<sup>1</sup>, Kuk Jin Choe, M.D.<sup>1</sup> and Jin-Pok Kim, M.D., Hon FACS<sup>2</sup>

**Purpose:** Recently the theory has been developed that host genetic factor affects interleukin (IL)-1 $\beta$  might exert an influence on the divergent clinical outcomes. We evaluated the roles of *H. pylori* infection and polymorphism of IL-1 $\beta$  in the carcinogenesis of gastric adenocarcinoma.

**Methods:** Gastric cancer tissues from 68 patients, peripheral blood from 43 controls, and various gastric cancer cell lines (MKN45, MKN74, SNU620, SNU638, SNU216, SNU601, and AGS) were used. Single nucleotide polymorphism (SNP) of IL-1 $\beta$ -31 and the length of tandem repeat of IL-1RN were analyzed by PCR and automatic DNA sequencer. IL-1 $\beta$  mRNA expressions from gastric cancer tissues were measured using semiquantitative RT-PCR and compared according to SNP of IL-1 $\beta$ -31. We also investigated the IL-1 $\beta$ -31 SNP from various cancer cell lines and measured IL-1 $\beta$  mRNA and protein expressions using semiquantitative RT-PCR and ELISA. We constructed reporter systems for IL-1 $\beta$ -31T/T and IL-1 $\beta$ -31C/C and the responses to antigen PMA and *H. pylori* were compared.

**Results:** We couldn't find any significant difference in the frequencies of IL-1 $\beta$ -31 SNP and IL-1RN polymorphism between the gastric cancer and control groups. IL-1 $\beta$  mRNA and protein expression were significantly more highly responsive to PMA at IL-1 $\beta$ -31 T/T type as compared with those of C/T or C/C type when studied in gastric cancer cell lines, although we couldn't find any significant difference of IL-1 $\beta$  mRNA expression according to IL-1 $\beta$ -31 SNP

when studied in gastric cancer tissue. When we compared the activities of reporter systems, the basal luciferase activity, response to PMA, and response to *H. pylori* of reporter genes was 1.30-fold, 1.32-fold, and 1.62-fold higher respectively in pIL-1 $\beta$  T/T type as compared with pIL-1 $\beta$  C/C type.

**Conclusions:** These findings indicate that SNP of IL-1 $\beta$  exerts an influence on the expression of IL-1 $\beta$  and there is a significant difference in response to environmental factors. They also suggest that the host with IL-1 $\beta$ -31 T/T type has a higher risk of hypochlorhydria, gastric atrophy, and after all gastric cancer in response to *H. pylori* infection. However the relationship between polymorphism of IL-1 $\beta$  and gastric adenocarcinoma require further study. (*J Korean Surg Soc* 2002;62:209-217)

**Key Words:** Interleukin-1 $\beta$ , *Helicobacter pylori*, Gastric adenocarcinoma

**중심 단어:** Interleukin-1 $\beta$ , *Helicobacter pylori*, 위선암

Department of Surgery, Dankook University College of Medicine, <sup>1</sup>Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, <sup>2</sup>Korea Gastric Cancer Center, Seoul Paik Hospital, Inje University, Chongnam, Korea

### 서 론

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)의 감염은 다양한 위장관 병변과 연관되어 있다고 알려져 있으나 대부분의 보건자들은 아무런 병변을 일으키지 않는 반면 일부의 감염자들에서만 병변을 일으킨다. 이러한 *H. pylori*의 다양하고 예측하기 어려운 병인을 설명하기 위하여 지금까지 주로 세균의 병독성의 차이로 이를 설명하려는 시도가 활발히 이루어져 왔으나 아직 명확한 결과를 얻지 못하고 해결해야 할 숙제로 남아 있다.(1-6) 사람의 위장관 상피세포는 세균감염에 대하여 여러 cytokines을 발현하여 위장관 점막에서의 염증반응을 촉발하고 지속시킴으로써 세균 감염에 대한 인체의 면역반응에 관여한다. *H. pylori*의 감염은 염증반응과 산분

책임저자 : 이주호, 충남 천안시 안서동 산 16-5  
☎ 330-714, 단국대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 041-550-3930  
E-mail: gsljh@anseo.dankook.ac.kr

접수일 : 2001년 12월 3일, 게재승인일 : 2002년 3월 6일  
이 연구는 2001학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

비에서 특이한 반응성을 보이는데 위 전정부 염증에 관련되어 위산증가나 십이지장궤양을 발생시키거나, 저산증 상태로 위 전체의 염증, 위축성 위염, 장상피화생이 발생한다.(7-8) 이런 반응은 숙주인자인 유전자 체계, 감염 시 나이, 영양상태, 상호 작용하는 세균감염, 식이와 흡연 등 환경인자, *H. pylori*의 독성인자 등이 관여할 것으로 생각된다.

*H. pylori*에 감염된 위 조직에서 Interleukin (IL)-1, IL-8, TNF, IL-6 등의 cytokine이 *in vivo* 혹은 *in vitro*에서 생성됨이 보고되고 있으며 국내에서도 *H. pylori*에 감염시킨 위의 상피세포주로부터 IL-8 뿐만 아니라 IL-1이 감염 초기부터 발현하기 시작하여 수시간 지속되었고, GM-CSF, TNF, MCP-1 등의 친염증성 cytokine들은 감염 후반부에 발현됨이 보고되었다.(9-13)

IL-1 유전자는 430-kilobase 크기로 2번 염색체 장완에 존재하는 IL-1A, IL-1B, IL-1RN의 3가지 유전자들의 복합체로서 친염증성 cytokine인 IL-1a, IL-1 $\beta$ , IL-1ra를 지시한다.(14) 이들 중 IL-1 $\beta$ 는 *H. pylori* 감염에 의해 upregulation 되어 염증반응을 증폭시키며, H<sup>+</sup> pump 길항제의 100배, H2 길항제의 6000배의 강력한 위산분비 억제제로 작용하여 위산의 분비 및 *H. pylori*의 서식 환경에 커다란 영향을 준다.(15-18) 따라서 IL-1 $\beta$ 의 합성능 및 작용기전에 대한 연구는 *H. pylori*의 위암발생기전의 연구에 매우 중요하다. 최근 El-Omar 등은 IL-1 유전자의 다형성, 즉 세균에 감염된 사람의 유전적 소인의 차이로 *H. pylori* 감염에 따른 질병의 다양성을 설명하려는 연구결과를 발표하였다.(19) 즉, IL-1 $\beta$  유전자 promoter 내 -511, -31 및 +3954번 염기에 diallelic polymorphism (C형과 T형)이 존재하며 IL-1RN의 경우는 두번째 인트론에 penta-allelic 86-bp tandem repeat (VNTR - 1 allele: 4 repeats; 2 allele: 2 repeats; 3 allele: 5 repeats; 4 allele: 3 repeats; 5 allele: 6 repeats)가 존재하는데, IL-1 loci 내 pro-inflammatory genotype인 IL-1 $\beta$ -31 T+와 IL-1 RN\*2/\*2의 경우 *H. pylori* 감염에 의한 IL-1 $\beta$ 의 생산이 증폭되며 이에 따라 위산분비가 억제되어 만성적인 저산증 상태가 되고 이에 여러 가지 환경적인 요소가 함께 작용하여 위암 발생의 위험을 높일 것이라는 연구결과를 발표하였다. 이는 *H. pylori*의 병독성으로만 질병의 다양성을 규명하려 했던 지금까지의 연구 흐름과 다른 새로운 시도로 생각된다. 이에 본 연구에서는 정상인 대조군 및 위암 환자군의 위선암 조직에서 IL-1 $\beta$ 유전자의 promoter 내의 single nucleotide polymorphism 및 IL-1 RN의 polymorphism을 조사하고, 유전형에 따른 IL-1 $\beta$ 의 합성능을 비교 분석하고, *H. pylori* 및 항원에 대한 IL-1 $\beta$ 유전자의 promoter 유형에 따른 반응성을 평가하여 위선암의 발생기전에서 IL-1 $\beta$ 의 다형성의 역할을 규명하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 연구대상

2000년 7월부터 12월까지 인제대학교 서울백병원 한국 위암센터에서 위선암으로 절제된 원발성 위암환자 68명의 위암조직을 연구의 대상으로 하였으며, 정상인 43명의 혈액을 대조군으로 설정하였다. 또한 위암 세포주 MKN45, MKN74, SNU620, SNU638, SNU216, SNU601, AGS를 이용하였다.

### 2) 연구방법

#### (1) IL-1 $\beta$ -31의 single nucleotide polymorphism (SNP) 및 IL-1ra의 polymorphism

① **IL-1 $\beta$  promoter의 SNP;** IL-1 $\beta$  유전자의 5'-flanking region에 Genbank에서 검색하고 이 중 전사 조절 부위를 선정 후, IL-1 $\beta$  유전자의 5'-flanking region을 증폭시키기 위해 전사부위의 중간지점에 정방향과 역방향의 primer를 Primer 3 프로그램을 이용하여 디자인하고 제작하였다(5'-GCAAGCTCCAGAAGTAGAG-3', 5'-AGGTCGTAGTACTACTATTG-3'). PCR을 표준방법으로 수행하여 분리된 Genomic DNA에서 원하는 부위를 증폭하여 얻은 PCR product를 0.8 % agarose gel에서 확인하였다. PCR product를 QIAquick gel extract kit를 사용하여 정제하여 바로 sequencing용 primer set와 inner primer를 사용하여 automatic DNA sequencer로 분석하였다.

② **IL-1 $\beta$  ra의 polymorphism;** 분리된 genomic DNA을 사용하여 forward primer 5'-CCC CTC AGC AAC ACT CC-3', reverse primer 5'-GGT CAG AAG GGC AGA GA-3'을 이용하여 Ex Taq을 이용하여 표준방법으로 PCR을 수행한 후, 2.0% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 반복단위체의 길이를 조사하였다. Allele는 100 bp DNA ladder를 사용하여 결정하였는데, allele 1=4 repeats (432 bp), allele 2=2 repeats (260 bp), allele 3=5 repeats (518 bp), allele 4=3 repeats (356 bp), allele 5=6 repeats (604 bp)라고 하였다.

(2) 위암 환자의 위암조직과 정상조직에서 IL-1 $\beta$  mRNA의 RT-PCR: 분리된 total RNA을 M-MLV reverse transcriptase, oligo (dT) primer, RNasin ribonuclease inhibitor를 사용하여 표준화 방법에 따라 역전사 반응 시행하여 cDNA를 얻었다. PCR을 수행하기 전에, 우선 IL-1 $\beta$  mRNA에 대한 5'과 3' primer를 각각 Primer 3 프로그램을 이용하여 디자인하고 제작하였다. PCR 시행 결과 형성된 DNA 산물은 576 bp가 되도록 하였다. 각 실험군에 대해 DNA Taq Polymerase, 10X Taq buffer, 그리고 dNTP Mixture와 함께 95°C-1분 (denaturation), 52°C-30초(annealing), 72°C-40초(extension)로 30 cycle의 PCR을 수행하였다. PCR 생성물은 1% agarose

gel상에서 100 V로 30분 정도 전기영동을 하였다. Marker는 1 Kb marker를 사용하였다. 이 결과는 gel을 EtBr에 염색한 후 UV-illuminator상에서 관찰하였다. 영상밀도계로 각 PCR 밴드의 peak에 해당하는 부위를 구하고 밀도측정 프로그램을 이용하여 밴드의 강도를 측정하여 각 유전형에서 발현되는 mRNA의 측정치를 비교하였다.

(3) 여러 가지 위암 세포주에서 IL-1 $\beta$ -31의 다형성에 따른 PMA 처리 전, 후 IL-1 $\beta$  단백질과 mRNA의 정량적 분석: 위암 세포주 MKN45, MKN74, SNU620, SNU638, SNU-216, SNU601, AGS에 대해 IL-1 $\beta$ -31의 SNP를 상기 기술한 방법으로 각 세포주의 IL-1 $\beta$ -31의 유전형(C/C, C/T, T/T형)을 조사하고, PMA 처리 전후의 각 유전형에 따른 mRNA와 단백질의 정량적 분석을 시행하였다. 상기 기술한 방법으로 20 ng/ml의 PMA 처리 전과 처리 후 24시간에 mRNA의 RT-PCR을 시행하였으며, 단백질의 정량적 분석은 ELISA 표준 방법으로 시행하였다.

① IL-1 $\beta$  단백질의 정량(ELISA); 다양한 위암 세포주를 2일간 배양하여 20 ng/ml PMA를 처리하여 24시간 후, 배양액 내의 IL-1 $\beta$ 의 양을 정량하였다. 용액 내의 IL-1 $\beta$ 에 대한 정량 방법은 IL-1 $\beta$  Emax ImmunoAssay System (Promega 사)를 사용하여 ELISA 표준방법으로 수행하였다. 96 well plate의 well에 100  $\mu$ l의 IL-1 $\beta$  Coat mAb 1x carbohydrate coating buffer를 첨가하여 12시간 동안 4°C에 방치하여 IL-1 $\beta$  mAb가 코팅된 plate를 준비하였다. 각 well에 270  $\mu$ l의 IL-1 $\beta$  Block 1x Buffer처리하여 35분간 37°C에 방치하였다. 100  $\mu$ l의 시료를 첨가하여 90분 동안 실온에서 현탁 방치한 후, TBST washing buffer로 5회 세척하였다. 100 $\mu$ l의 Anti-IL-1 $\beta$  Ab을 첨가하여 120분간 실온에서 현탁 방치한 후, TBST washing buffer로 5회 세척하였다. 100  $\mu$ l의 IL-1 $\beta$  HRP Conjugate를 첨가하여 120분간 실온에서 현탁 방치한 후, TBST washing buffer로 5회 세척하였다. 100  $\mu$ l의 TMB One Solution을 첨가하여 15분 동안 실온에 방치한 후, 100  $\mu$ l의 1N hydrochloric acid를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이를 450 nm에서 흡광도를 측정하여 그 값을 구하였으며 IL-1 $\beta$  표준곡선에 적용하여 IL-1 $\beta$ 의 양을 계산하였다.

#### (4) IL-1 $\beta$ promoter의 기능 분석

① IL-1 $\beta$  promoter의 클로닝; IL-1 $\beta$  유전자의 5'-flanking region에서 IL-1 $\beta$ 의 발현에 중요한 역할을 수행하는 -31 site를 포함하는 PCR산물을 얻을 수 있도록 primer를 Primer3 프로그램을 사용하여 디자인하고 여기에 Kpn I과 Hind III 두 가지 효소인식 부위를 붙여서 제작하였다. DNA 염기서열 결정에 이용하기 위해 전사부위의 중간지점에 정방향과 역방향의 primer를 제작하였다. PCR에 의한 Genomic DNA 증폭하여 얻은 PCR product를 1.5% agarose gel에서 확인하였다. PCR product를 QIAquick gel extract kit를 사용하여 정제하여 바로 sequencing용 primer set와 inner primer를 사용하여 automatic DNA sequencer로 분석하였다.

Agarose gel 전기영동으로 증폭된 유전자 산물의 크기가 기대한 것과 일치하는지를 확인한 후 Qiagen II gel extraction kit를 이용하여 gel을 정제한 후 PCR 산물과 클로닝 벡터인 TOPO 벡터를 Kpn I과 Hind III의 제한효소로 클로닝할 원하는 부위를 절단하였다. 클로닝한 후 EcoR I과 Hind III로 잘라서 0.8% agarose gel에서 원하는 유전자 산물이 삽입되었는지를 확인하고 클로닝된 유전자의 염기서열을 automatic DNA sequencer로 분석하여 확인하였다.

② Reporter Gene Construction; 원하는 유전형을 갖는 plasmid DNA는 Hind III로 자른 후 Klenow와 dNTP로 처리하여 blunt형으로 만들고, BamH I으로 다시 절단하였다. 절단된 DNA를 전기영동하고 IL-1 $\beta$  promoter region을 잘라서 DNA prepmate kit를 사용하여 gel extraction하였다. 이를 Sma I과 Bgl II로 절단된 pGL3 Basic Luciferase vector에 ligation하였다. 이후 Hanahan방법으로 transformation을 실시하고 colony를 miniprep하여 Hind III와 Kpn I으로 잘라서 insert를 확인하였다.

③ IL-1 $\beta$  promoter 유형에 따른 기본 전사능, 항원 및 *H. pylori* 감염에 대한 반응성; 6 well tissue culture plate에 293T cell (human embryonic kidney cell)을  $5 \times 10^5$ 세포를 넣고 10% FCS이 함유된 DMEM medium에 16시간 배양한다. 각각의 well에는 IL-1 $\beta$  promoter luciferase fusion (pGL3-IL-1 $\beta$  plasmid) 0.6 $\mu$ g과  $\beta$ -galactosidase 50 ng (CMV- $\beta$  gal)을 lipofectamin plus transfection 시약을 사용하여 transfection하였다. 3일간 배양한 후 유전형에 따른 promoter의 활성을 측정하였다. Promoter 유형에 따른 항원에 대한 반응성은 transfection시킨 다음 24시간이 경과한 후 20 ng/ml Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)를 첨가하여 48시간 동안 자극한 후 promoter 활성의 변화를 측정하였다. 또한 promoter 유형에 따른 *H. pylori*에 대한 반응성은 transfection시킨 다음 24시간이 경과한 후 cagA 및 vacA (+)인 *H. pylori* (ATCC 43504)를  $1 \times 10^6$  cfu/ml을 접종하여 48시간 동안 자극한 후 promoter활성도 변화를 측정하였다. 배양이 끝난 세포를 수확하여 luciferase assay kit (Promega사)를 이용하여 표준화방법으로 luciferase와  $\beta$ -galactosidase activity를 측정하였으며  $\beta$ -galactosidase activity를 이용하여 형질전환 정도를 판별하여 각 그룹들 간에 normalization시켰다. 각 실험군에 대해 3회 Transfection을 수행하여 실험결과를 얻었다.

(5) 시약: DNA 및 RNA의 분리는 QIAGEN사에서 isolation buffer set 및 column을 구입하여 사용하였다. RT-PCR을 하기 위해 Promega사(Madison, WI, USA)의 M-MLV reverse transcriptase, oligo (dT) primer, RNasin ribonuclease inhibitor를 사용하였다. PCR을 위한 polymerase는 NEB사(Beverly, MA, USA)의 vent DNA polymerase를 사용하였으며 primer는 GENOSYS사(Woodlands, TX, USA)에 제작을 의뢰하여 사용하였다. 염기서열의 결정에는 ABI PRISM Dye terminator cycle sequencing kit 및 ABI PRISM 310 DNA sequenc-

ing analysis program을 사용하였다. Agarose gel로부터 DNA 절편의 정제는 Genomed사 (USA)의 Jet Sorb G사 Extract Kit 를 사용하였다. 기타의 시약은 주로 Sigma사(St. Louis, MO, USA), BM사, Merk사(Rahway, NJ, USA)에서 구입하여 사용 하였다.

**결 과**

**1) IL-1β-31의 single nucleotide polymorphism (SNP) 및 IL-1ra의 polymorphism**

43명의 정상대조군 및 68명의 위암환자군에서 IL-1β-31의 SNP를 조사한 결과 IL-1β-31의 유전형 C/C는 정상 대조군은 33%인 14명, 위암환자군은 35%인 24명, C/T형은 전자는 37%인 16명, 후자는 41%인 28명, T/T형은 전자는 30%인 13명, 후자는 24%인 16명으로 정상대조군 및 위암환자군 사이에 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 1, Table 1).

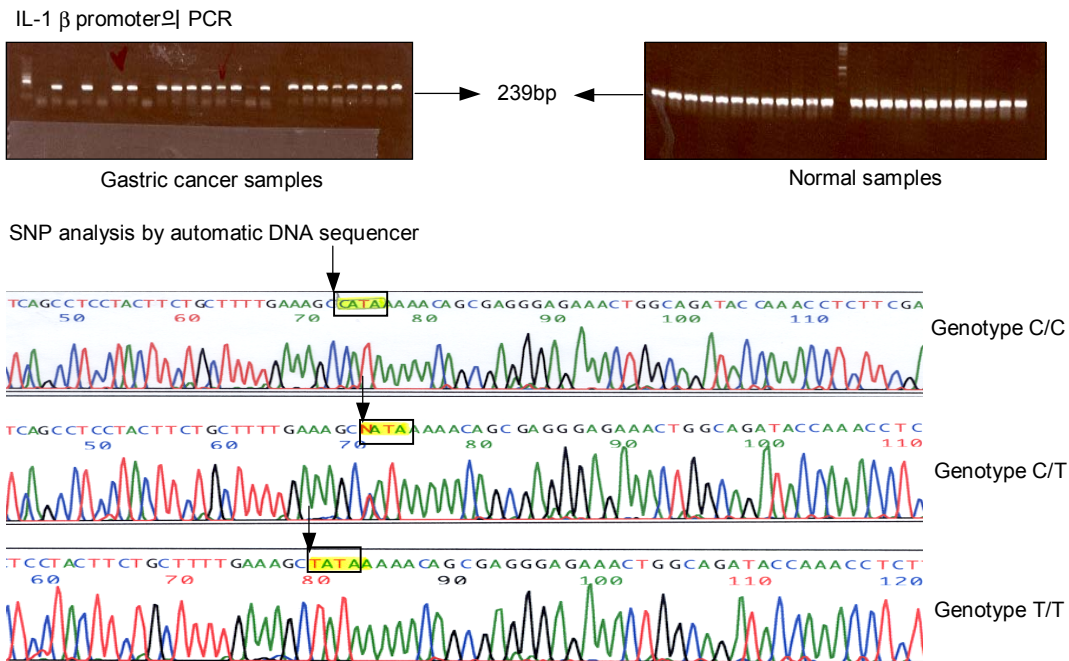
IL-1RN의 두 번째 인트론 내에 penta-allelic 86-bp tandem repeat (VNTR)의 유형을 조사하기 위해 primer를 제작하였으며 정상대조군 43명, 위암환자군 68명에서 분리한 DNA를 template로 하여 PCR을 수행하여 전기영동하였다. 조사한 대상의 IL-1RN의 haplotype은 1/1유형은 84명(76%), 1/2유형은 14명(13%) 및 1/3,4,5유형은 13명(12%)이었으며 정상대조군 및 위암환자군을 살펴보면 1/1유형이 각 79% 및 74%로 가장 높은 분포를 보였다. 1/2 및 1/3,4,5유형은 두 군 간에 유의한 차이가 있었다(P=0.046) (Fig. 2, Table 1).

**2) 위암환자의 위암조직과 정상조직에서 IL-1β mRNA의 정량적 RT-PCR**

68명 위암환자군의 정상부위 및 위암부위에서 IL-1β mRNA의 발현양상을 RT-PCR을 수행한 후 전기영동하여 상응하는 밴드의 강도를 밀도측정 프로그램을 이용하여 측정하였다. IL-1β-31 C/C형은 평균 2.5, IL-1β-31 C/T형은 2.3, IL-1β-31 T/T형은 2.8으로 유전형에 따른 mRNA의 발현 정도의 차이를 발견할 수 없었으며, 일반적으로 위암 조직에서 많이 발현되고 있었다. 조사한 대상 68명에서 62명(91%)은 위암부위에서 IL-1β가 많이 발현되었으며 정상부

**Table 1.** Comparison of the frequencies of IL-1β-31 single nucleotide polymorphism and IL-1RN polymorphism between gastric cancer and control group

Locus	Genotype	Normal (N=43)	Cancer (N=68)	Total (N=111)
IL-1β-31	C/C	14 (33%)	24 (35%)	38 (34%)
	C/T	16 (37%)	28 (41%)	44 (40%)
	T/T	13 (30%)	16 (24%)	29 (26%)
IL-1RN	1/1	34 (79%)	50 (74%)	84 (76%)
	1/2	2 (5%)	12 (17%)	14 (13%)
	1/3,4,5	7 (16%)	6 (0.9%)	13 (13%)
	2/2	0	0	0



**Fig. 1.** PCR for IL-1β 5'-flanking region and analysis of IL-1β-31 single nucleotide polymorphism using automatic DNA sequencer.

위의 발현정도는 평균 1.95 정도이고 위암부위는 3.0 정도로 위암부위가 평균 1.5배 정도 많이 발현되었다.

3) 위암세포주의 IL-1 $\beta$ -31의 SNP 조사 및 PMA 처리 전 후의 단백질과 mRNA에 대한 정량적 분석

위암세포주 MKN45, MKN74, SNU620, SNU638, SNU216, SNU601, AGS에 대해 IL-1 $\beta$ -31의 SNP를 조사한 결과, 5개 세포주(MKN45, MKN74, SNU620, SNU216, SNU601)가 T/T 유형이고 C/C유형은 1개(SNU638), C/T유형은 1개(AGS)가 존재하였다. 이 중 T/T유형인 MSN74, C/C유형인 SNU638, C/T유형인 AGS 등 3개의 위암 세포주에 대해 PMA처리 전, 후의 mRNA에 대한 RT-PCR 및 intensity를 측정 한 값을 비교한 결과 PMA 처리 전 MSN74, SNU638, AGS에서의 측정

치는 각각 1.2, 1.1, 1.0에서 PMA 처리 후 측정치는 각각 14.2, 3.3, 2.4로 T/T 유형인 MSN74에서의 반응성이 가장 높았다. 또한 배양액에서의 IL-1 $\beta$  단백질의 반응성을 조사한

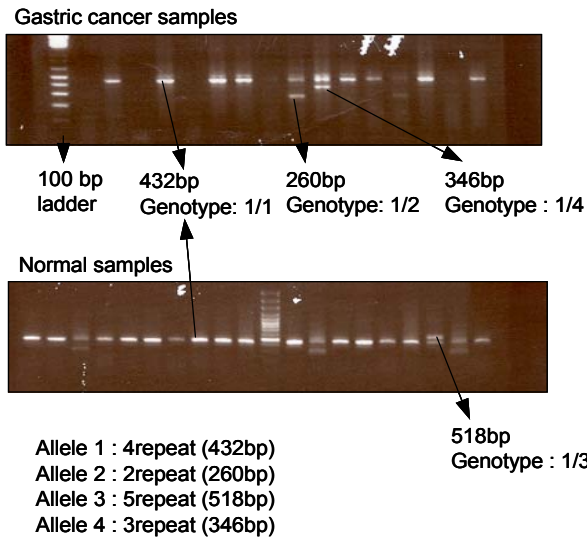


Fig. 2. Analysis of IL-1RN polymorphism by PCR and electrophoresis.

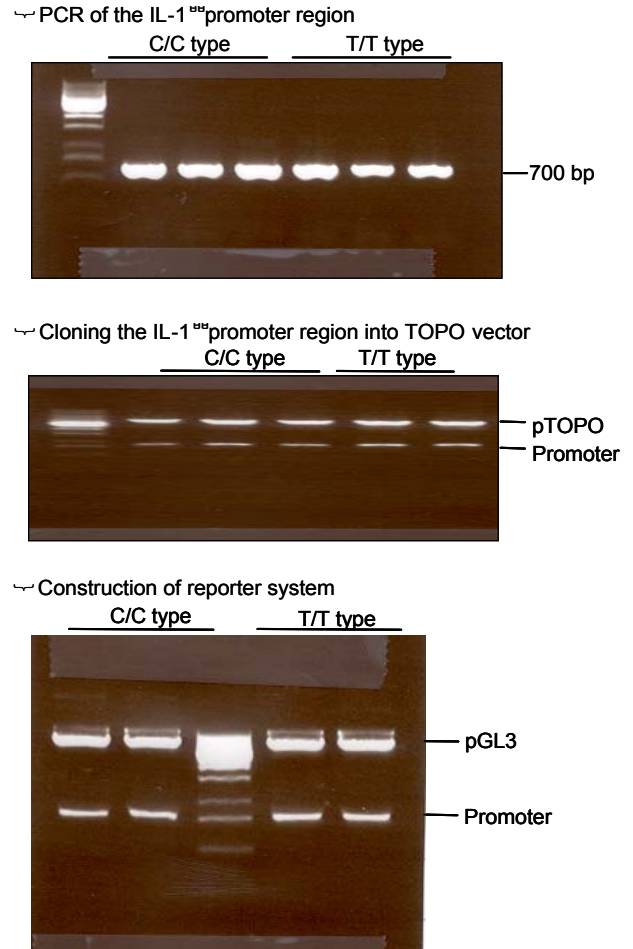


Fig. 4. Cloning of IL-1 $\beta$  promoter region and construction of reporter system for IL-1 $\beta$ -31 T/T type and C/C type.

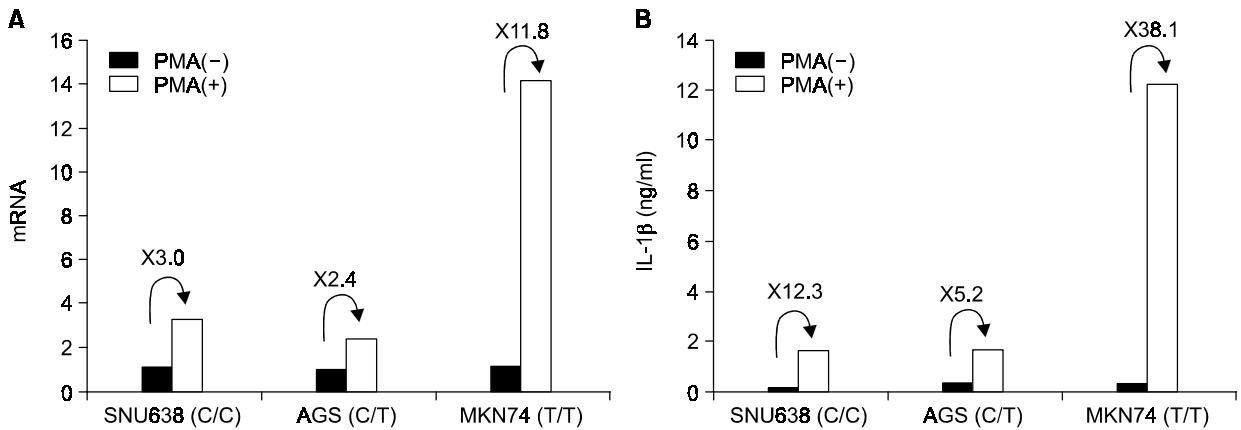


Fig. 3. Comparison of the responses to PMA according to IL-1 $\beta$ -31 single nucleotide polymorphism in gastric cancer cell lines. (A) RT-PCR for IL-1 $\beta$  mRNA and estimated band intensity using densitometer (B) ELISA for IL-1 $\beta$  protein.

결과, 전사수준에서 반응성을 그대로 반영하여, PMA 처리 전 MSN74, SNU638, AGS에서의 측정치는 각각 0.32, 0.13, 0.33에서 PMA 처리 후 측정치는 각각 12.2, 1.6, 1.7로 T/T 유형인 MSN74에서의 반응성이 가장 높았다(Fig. 3).

**4) IL-1 $\beta$  promoter 유형에 따른 기본 전사능, 항원 및 *H. pylori* 감염에 대한 반응성**

**1) IL-1 $\beta$  promoter의 클로닝:** IL-1 $\beta$  promoter의 유형을 -31 site의 염기에 따라 T/T형 혹은 C/C형 두 가지 유형에 해당하는 유전형인 사람에서 분리한 DNA를 이용하여 -31 site의 염기를 포함하도록 디자인 제작된 primer를 이용하여 PCR 증폭하여 염기서열을 결정하였다. promoter 활성 측정은 luciferase를 이용한 promoter의 활성 측정용 플라스미드인 pGL 벡터를 이용하였다. 확인된 IL-1 $\beta$  유전형을 갖는 PCR산물을 primer에 있는 제한효소 부위를 활용하여 pGL 벡터에 클로닝하여 제한효소를 이용하여 그 결과를 확인하였다(Fig. 4).

**2) IL-1 $\beta$ 의 유전형에 따른 luciferase의 활성도 비교:** 293T 세포에 pIL-1 $\beta$ -31 C/C, pIL-1 $\beta$ -31 T/T 및 pCMV- $\beta$  gal를 transfection시켜 72시간 배양한 후, luciferase와  $\beta$ -galactosidase activity를 측정하여  $\beta$ -galactosidase activity를 이용하여 transfection 효율을 상호 비교하여 luciferase 활성을 보정하였다. 이를 3회 반복하여 얻은 결과를 비교한 결과, 비교군의 평균값은 0.12, IL-1 $\beta$ -31 C/C는 2.47, IL-1 $\beta$ -31 T/T는 3.23순으로 IL-1 $\beta$ -31 T/T 유전형인 promoter활성이 IL-1 $\beta$ -

31 C/C보다 1.3배 높았다(Table 2).

**3) IL-1 $\beta$ 의 유전형에 따른 PMA 처리 전후의 luciferase의 활성도 비교:** 293T세포에 pIL-1 $\beta$ -31 C/C, pIL-1 $\beta$ -31 T/T 및 pCMV- $\beta$  gal를 transfection시켜 24시간 배양하여 20 ng/ml Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)를 처리하여 48 시간 배양한 후, luciferase와  $\beta$ -galactosidase activity를 측정하여  $\beta$ -galactosidase activity를 이용하여 transfection 효율을 상호 비교하여 luciferase 활성을 보정하였다. 이를 3회 반복하여 얻은 결과를 비교한 결과, 비교군의 평균값은 4.95, IL-1 $\beta$ -31 C/C는 30.20, IL-1 $\beta$ -31 T/T는 57.30순으로 IL-1 $\beta$ -31 T/T 유전형인 promoter활성이 IL-1 $\beta$ -31 C/C보다 1.9배 높았다. IL-1 $\beta$  promoter의 유전형에 따른 PMA를 처리 전후의 luciferase 활성의 변화율을 조사해 보면 비교군의 평균값은 9.0배, IL-1 $\beta$ -31 C/C는 11.8배, IL-1 $\beta$ -31 T/T는 15.57배순으로 IL-1 $\beta$ -31 T/T 유전형인 promoter활성이 IL-1 $\beta$ -31 C/C에 비해 1.32배 많이 증폭되었다(Table 2).

**4) IL-1 $\beta$ 의 유전형에 따른 *H. pylori* (cagA+vacA+: ATCC43504)의 감염 전후의 luciferase의 활성도 비교:** 293T세포에 pIL-1 $\beta$ -31 C/C, pIL-1 $\beta$ -31 T/T 및 pCMV- $\beta$  gal를 transfection시켜 24시간 배양하여 10<sup>6</sup> cfu/ml *H. pylori* (cagA+vacA+: ATCC43504)를 처리하여 48시간 배양한 후, luciferase와  $\beta$ -galactosidase activity를 측정하여  $\beta$ -galactosidase activity를 이용하여 transfection 효율을 상호 비교하여 luciferase 활성을 보정하였다. 이를 3회 반복하여 얻은 결과를 비교한 결과, 비교군의 평균값은 6.82, IL-1 $\beta$ -31 C/C

**Table 2.** Basal luciferase activities and responses to PMA & *H. pylori* infection of reporter genes for IL-1 $\beta$ -31 T/T type and C/C type

		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	Mean	
Basal Activities						
Control		0.12	0.12	0.20	0.15	
IL-1-31C/C		0.46	4.51	2.43	2.47	
IL-1-31T/T		0.71	5.84	3.14	3.23	
Responses to PMA						
Control	PMA (-)	0.49	0.58	0.59	0.55	↻ ×9.0
	PMA (+)	3.52	4.05	7.29	4.95	
IL-1B-31C	PMA (-)	1.27	1.90	4.52	2.56	↻ ×11.8
	PMA (+)	6.42	33.74	50.42	30.20	
IL-1B-31T	PMA (-)	1.67	2.36	7.02	3.68	↻ ×15.6
	PMA (+)	15.21	64.02	92.67	57.30	
Responses to <i>Helicobacter pylori</i>						
Control	<i>H.p</i> (-)	0.35	0.46	0.52	0.44	↻ ×15.5
	<i>H.p</i> (+)	4.49	5.88	10.08	6.82	
IL-1B-31C	<i>H.p</i> (-)	1.12	2.02	3.58	2.56	↻ ×18.9
	<i>H.p</i> (+)	9.92	50.75	84.24	48.30	
IL-1B-31T	<i>H.p</i> (-)	1.53	3.54	7.16	3.68	↻ ×30.6
	<i>H.p</i> (+)	15.18	127.24	195.5	112.64	



는 48.30, IL-1 $\beta$ -31 T/T는 112.64순으로 IL-1 $\beta$ -31 T/T유전형인 promoter의 활성이 IL-1 $\beta$ -31 C/C보다 2.33배 높았다. IL-1 $\beta$  promoter 유전형에 따른 *H. pylori* 감염 전후의 luciferase 활성의 변화율을 조사해 보면 비교군의 평균값은 15.5배, IL-1 $\beta$ -31 C/C는 18.9배, IL-1 $\beta$ -31 T/T는 30.6배순으로 IL-1 $\beta$ -31 T/T유전형 promoter의 활성이 IL-1 $\beta$ -31 C/C에 비해 1.62배 높게 증폭되었다(Table 2).

## 고 찰

*H. pylori*에 감염된 위조직에서는 염증반응과 산분비 양상에서 특이한 반응을 보이는데 여기에는 다양한 cytokine 들이 관련되어 있다. 그중 proinflammatory cytokine인 interleukin-1 $\beta$ 는 숙주와 환경과의 상호작용에 관여하는 가장 중요한 매개체로서 거의 대부분의 세균과 다양한 환경의 변화에 의해 발현이 촉진되며(14) 강력하게 위산분비를 억제하는 것으로 연구 보고되고 있다.(15-18) 또한 Takashima 등은 *H. pylori*에 감염시킨 Mongolian gerbil 모델에서 위에 염증 반응이 심화되며 interleukin-1 $\beta$  mRNA의 발현이 증가하고 위산분비가 감소하는 현상을 보고하면서 *H. pylori* 감염에 의해 발현이 증폭된 interleukin-1 $\beta$ 가 위산분비 억제의 매개체라고 결론지었다.(20) *H. pylori* 감염이 어떻게 위암, 위궤양 등 다양한 임상상을 나타낼 수 있는가에 대한 해답을 얻기 위하여 지금까지 주로 세균의 병독성의 차이로 이를 증명하려는 시도가 주를 이루었으나 아직까지 명확한 설명을 하지 못하고 있다.(21) 최근 El-Omar 등은 interleukin-1 유전자의 다형성, 즉 세균에 감염된 사람의 유전적 소인의 차이로 *H. pylori* 감염에 따른 질병의 다양성을 설명하려는 연구결과를 발표하였다. 이들은 393명의 위암환자와 430명의 정상 대조군을 대상으로 IL-1 $\beta$ 의 전사부위에서 31 base pair 떨어진 곳의 genotype과 IL-1RN의 다형성을 조사한 결과 IL-1 $\beta$ -31T type과 IL-1RN\*2/\*2의 경우 저산증의 위험은 각각 7.5배, 2.1배였으며, 위암의 위험은 각각 1.6배, 2.9배였다. 또한 이들 유전형에 따른 단백질 및 DNA의 상호작용을 electrophoretic mobility shift analysis한 결과 IL-1 $\beta$ -31T allele는 lipopolysaccharide를 처리 전후하여 DNA binding 정도가 5배 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 이들은 IL-1 $\beta$ -31T type과 IL-1RN\*2/\*2의 유전형을 갖은 경우 *H. pylori* 감염에 의한 IL-1 $\beta$ 의 생산이 증폭되며 이에 따라 위산분비가 억제되어 만성적인 저산증 상태가 되고 이에 여러 가지 환경적인 요소가 함께 작용하여 위암 발생의 위험을 높일 것이라는 연구결과를 발표하였다.

이에 본 연구에서는 정상인 43명과 위암환자 68명을 대상으로 IL-1 $\beta$ 와 IL-1RN의 다형성을 조사하였으며 IL-1 $\beta$  promoter의 반응성을 직접적으로 알아보기 위하여 IL-1 $\beta$  promoter의 reporter system을 제작하여 항원 PMA 및 *H. pylori*

감염에 대한 반응성을 측정하였다. 본 연구에서 43명의 정상 대조군 및 68명의 위암 환자군 등 총 111명을 조사 대상으로 IL-1 $\beta$ 와 IL-1RN의 polymorphism을 조사한 결과 IL-1 $\beta$ -31의 유전형 C/C는 정상 대조군은 33%, 위암환자군은 35%, C/T형은 전자는 37%, 후자는 41%, T/T형은 전자는 30%, 후자는 24%이었다. IL-1RN의 다형성은 두 군 모두 1/1형이 가장 많았고 2/2형은 한 명도 없었으며 1/2 형은 위암 환자군에서 높게 나왔다. 본 연구결과는 정상 대조군과 위암 환자군 간에 IL-1 $\beta$ 와 IL-1RN 유전형이 매우 유사한 빈도로 존재하고 있어 위암 환자군에서 IL-1 $\beta$ -31T type과 IL-1RN\*2/\*2의 유전형이 많이 나올 것이라는 기대에 부응하지 못하는 결과이며, 서구인을 대상으로 한 El-Omar의 연구 결과와 결부시켜 보아도 유의한 의미를 찾을 수 없었다. IL-1RN의 allele 2는 여러 가지 자가면역 질환과 염증성 질환에서 빈도가 높고 IL-1 $\beta$ 의 생산에 관여하는 것으로 보고되었고 2/2 유전형의 경우 위암과의 관련성이 보고된 바 있으나,(19,22-23) 본 연구에서 111명의 환자 중 2/2 유전형은 한 명도 발견할 수가 없었다. 이는 El-Omar의 연구 대상과 본 연구 대상의 인종 간의 차이와 대상 시료의 수의 차이가 큰 것도 원인이 있을 수 있어 향후 더 많은 대상으로 검증할 필요가 있겠다. 저자는 본 연구에서 IL-1 $\beta$ 의 유전형에 따른 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현정도의 차이를 규명하고자 위암조직에서 각 유전형에 따른 IL-1 $\beta$  mRNA의 정량적 분석을 시행하였으나 IL-1 $\beta$ -31 C/C형은 평균 2.5, IL-1 $\beta$ -31 C/T형은 2.3, IL-1 $\beta$ -31 T/T형은 2.8로 유전형에 따른 mRNA의 발현정도의 차이를 발견할 수 없었다. IL-1 $\beta$  mRNA의 발현 정도는 IL-1 $\beta$ 의 다형성뿐만 아니라 여러 가지 다른 cytokine이나 다른 세균들, 술, 담배, 식이 습관 등 여러 가지 환경적인 요인들이 영향을 미치게 되는데, (14,24) 본 연구에서 위암 환자의 조직에서 IL-1 $\beta$  mRNA를 측정하는 데 따른 mRNA의 발현에 영향을 미치는 이러한 다른 요인들의 영향을 배제하지 못하여 IL-1 $\beta$  다형성에 의한 순수한 결과를 얻지 못하였을 것으로 추정하여, 여러 가지 위암 세포주에서의 발현양상을 측정하였다. 위암 세포주 MKN45, MKN74, SNU620, SNU638, SNU216, SNU601, AGS에 대하여 먼저 IL-1 $\beta$ -31에 대한 SNP를 조사하여 이 중 MKN74 (T/T) SNU638 (C/C), AGS (C/T)에 대해서 단백질과 mRNA에 대한 정량적 분석을 시행한 결과 T/T형인 MKN74인 경우가 다른 유전형에 비해 항원 PMA에 대한 반응성이 월등히 높음을 확인할 수 있었다.

IL-1 $\beta$  promoter의 유전형이 유전자의 발현 양상에 미치는 영향을 평가하기 위해 유전형에 따른 두 종류의 promoter에 대해 PMA 처리 및 *H. pylori*의 감염 등에 따른 활성의 변화를 측정하였다. TATA sequence는 RNA를 합성하는 RNA polymerase가 결합하는 부위로 IL-1 $\beta$  promoter에서는 -31 site에서 C에서 T로의 전이가 있다. 이들 유전형에 따른 luciferase활성 변화정도는 IL-1 $\beta$ -31T의 경우는

3.23이고 C의 경우는 2.47으로 T형에서 높게 나왔다. PMA 처리 후 IL-1 $\beta$ 유전형에 따른 promoter활성 측정 결과는 평균 비교군에서 9배, C형에서 11.8배, T형에서 15.6배로 IL-1 $\beta$ -31T 유전형의 promoter활성의 변화율이 IL-1 $\beta$ -31C보다 1.32배 높았으며 *H. pylori*의 감염에 의한 IL-1 $\beta$ 유전형에 따른 promoter활성 측정 결과 역시 비교군에서 평균 15.5배, IL-1 $\beta$ -31C는 18.87배, IL-1 $\beta$ -31T는 30.61의 순으로 IL-1 $\beta$ -31T유전형 promoter의 활성의 변화율이 IL-1 $\beta$ -31C보다 1.62배 높았다. 이는 IL-1 $\beta$ -31T유전형이 IL-1 $\beta$ -31C보다 항원, 특히 *H. pylori* 감염에 민감하게 반응한다는 것을 극명하게 보여주고 있으며 El-Omar 등이 보고한 내용, 즉 IL-1 $\beta$ -31T형에서 lipopolysaccharide를 처리 전후하여 DNA binding 정도가 IL-1 $\beta$ -31C형에 비해 크게 증가한다는 보고와 일치하는 결과이다. 따라서 IL-1 $\beta$ -31T형인 사람은 *H. pylori* 감염 등에 의해 IL-1 $\beta$ -31C형인 사람보다 더 많은 IL-1 $\beta$ 를 합성 분비하여 위산 분비를 억제하여 저산증과 위축성 위염을 일으켜 위암 발생의 위험성이 높을 것이라는 가설을 가능하게 한다고 하겠다.

**결 론**

IL-1 $\beta$ -31의 SNP에 따른 promoter활성을 연구한 결과, IL-1 $\beta$  promoter의 유전형에 따라 promoter 활성의 차이가 있으며 또한 promoter 활성은 외부요인에 따라 반응성에 차이가 있음을 확인하였다. 즉 IL-1 $\beta$  promoter의 유전형이 IL-1 $\beta$ -31T 유형인 경우는 다른 유형에 비해 IL-1 $\beta$  mRNA 및 단백질의 발현량이 더 많고 PMA나 *H. pylori* 등 외부인자에 대한 반응성 또한 유의하게 높았다. 결국 *H. pylori*에 감염될 경우 IL-1 $\beta$ -31T 유형인 사람이 IL-1 $\beta$ -31C 유형인 사람보다 더 많은 IL-1 $\beta$ 이 발현된다고 할 수 있다. 따라서 사람의 IL-1 $\beta$ 의 기능에 관련된 유전적인 요소는 IL-1 $\beta$ 의 발현에 영향을 미친다는 현상을 확인할 수 있었으며, IL-1 $\beta$ -31T인 경우 *H. pylori* 감염에 의해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가하여 위산분비가 억제되어 저산증이 유발되고 염증이 확장되어 위축성 위염, 장상피화생, 그리고 결국 위암의 위험인자로 작용할 수 있다고 유추 해석할 수 있겠다. IL-1 $\beta$  및 IL-RN의 다형성을 43명의 대조군 및 68명의 위암 환자군에서 조사한 결과, 각 군 간의 유의한 차이를 발견할 수 없었는데 이러한 결과는 연구 대상의 인종 간의 차이와 대상 시료의 수의 차이가 큰 것도 원인이 있을 수 있어 향후 더 많은 대상으로 검증할 필요가 있겠으며 앞으로 이들과 위암 발생과의 인과관계는 구체적으로 입증할 필요가 있다고 하겠다.

**REFERENCES**

1) Figura N, Valassina M, Roviello F, Pinto F, Lenzi C, Giannace

R, et al. *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* types and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000;120:324-5.  
 2) Wilkinson M. *Helicobacter pylori*: an overview. *Br J Biomed Sci* 2001;58:59-60.  
 3) Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;107:611-20.  
 4) Miehlke S, Yu J, Schuppler M, Frings C, Kirsch C, Negraszus N, et al. *Helicobacter pylori vacA*, *iceA*, and *cagA* status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *J Clin Pathol* 2001;54:367-70.  
 5) Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999;37:2274-9.  
 6) Hansson LE, Nyren O, Hsing AW, Bergstrom R, Josefsson S, Chow WH, et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* 1996;335:242-49.  
 7) El-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 1995;109:681-91.  
 8) El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, et al. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology* 1997;113:15-24.  
 9) Jung HC, Kim JM, Song JS, Kim CY. *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1, and tumor necrosis factor-alpha. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:473-80.  
 10) Ito R, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Tahara E. Expression of interleukin-6 and its effect on the cell growth of gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:953-8.  
 11) Kabir S, Daar GA. Serum levels of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in patients with gastric carcinoma. *Cancer Lett* 1995;95:207-12.  
 12) Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* 1998;152:93-100.  
 13) Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between cytokines and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:937-41.  
 14) Dianello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.  
 15) Wolfe MM, Nompleggi DJ. Cytokine inhibition of gastric acid secretion-a little goes a long way. *Gastroenterology* 1992;102:2177-8.  
 16) McColl KE, El-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:



- 
- 687-703.
- 17) Beales IL, Cala J. Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998;42:227-34.
- 18) Mahr S, Neumayer N, Gerhard M, Classen M, Prinz C. IL-1 beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NK-kappaB, and Box protein. *Gastroenterology* 2000;118:515-24.
- 19) El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402.
- 20) Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 2001;48:765-73.
- 21) Graham DY, Yamaoka Y. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter* 2000;5(suppl 1):S3-9.
- 22) Santtla S, Savinainen K, Hurme M. Presence of interleukin-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 1998;47:195-8.
- 23) Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H, Di Giovine FS, Vecchi M, Kam L, et al. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;117:806-13.
- 24) El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001;48:743-7.
-