Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
2000; 5(3): 154-159

구형 *Helicobacter pylori*의 중성구 매개 산화활성

울산대학교 의과대학 내과학교실, [1]약리학교실, 서울대학교 의과대학 [2]약리학교실

홍원선 · 김혜원[1] · 이학성[1] · 명승재 · 정훈용
양석균 · 김진호 · 민영일 · 정명희[2]

Neutrophil-Mediated Oxidative Activity of Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*

Weon-Seon Hong, Hae Won Kim[1], Hak-Sung Lee[1], Seung Jae Myung, Hwoon-Yong Jung, Suk-Kyun Yang, Jin Ho Kim, Young Il Min and Myung-Hee Chung[2]

Departments of Internal Medicine and [1]Pharmacology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul 138-736, Korea
[2]Department of Pharmacology, Seoul National University School of Medicine, Seoul 110-744, Korea

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is now recognized as the major etiologic agent of chronic gastritis and plays an active role in the pathogenesis of peptic ulcer and gastric cancer. One of the characteristic features of *H. pylori* infection is the infiltration of neutrophils and their production of oxygen-derived free radicals (OFRs) in gastric epithelium. *H. pylori* exists in two forms, spiral and coccoid form. Although spiral form is known to cause the mucosal injury by increased OFRs, it is still unclear whether coccoid form causes the OFR-mediated mucosal injury. Coccoid forms were induced by incubating spiral forms of two strains of *H. pylori*, ATCC 43504 (NCTC 11637) and DU-3, a clinical isolate from a patient with duodenal ulcer, in Brucella broth media for 84 hr. Spiral forms were obtained after 36 hr incubation. The levels of OFRs were determined by luminol-dependent chemiluminescence (ChL). There was no significant difference in the production of ChL between spiral and coccoid forms of ATCC 43504 and DU-3. On the other hand, the heat-killed *H. pylori* did not activate neutrophils to produce OFRs. These results suggest that not only spiral form but also coccoid form may contribute to OFR-mediated gastric mucosal injury.

Key Words: *H. pylori*, Spiral form, Coccoid form, Oxygen-derived free radicals

책임저자 : 홍원선, ㉾ 138-736, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실
Tel: 02-2224-3194, Fax: 02-485-5782, E-mail: wshong@www.amc.seoul.kr

서 론

위선암(gastric adenocarcinoma, 위암)은 우리나라의 암사망원인 중 가장 많은 원인으로 위암의 대부분은 발암물질에 의해 발생한다. 위암을 일으키는 대표적인 발암물질은 N-nitroso 화합물과 이종환식 아민(heterocyclic amine), 소금(salt)과 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)이다.[1] *H. pylori*는 미호기성 그람 음성 나선균(microaerophilic gram negative spirochetes)으로 1994년 WHO의 International Agency for Research on Cancer (IARC)에서는 *H. pylori*를 사람 위암에 대한 제 1군 발암물질(group 1 carcinogen, definite carcinogen)로 분류하였다.[2] 현재까지 이 균이 위암발생과 밀접한 관계가 있다는 것은 많은 역학조사, 동물실험과 임상연구에서 충분히 증명되었다.[3~6] 따라서 *H. pylori*를 제균하여 위암을 예방하려는 화학적 암예방에 대한 연구가 현재 세계 여러 곳에서 진행되고 있다.[7]

*H. pylori*는 여러 기전으로 위암을 일으키는데, 대표적인 기전은 *H. pylori*가 활성산소(oxygen-derived free radicals, OFRs)의 생산을 촉진하여 암을 발생시키는 것이다. OFRs가 과도하게 생산되면 위점막 상피세포의 DNA에 돌연변이가 발생되는데 이러한 세포는 암세포로 형질전환이 일어나기 쉽다.[8~12] OFRs는 주로 중성구(neutrophils)에서 생산되는데, *H. pylori*에 감염된 위점막 세포는 interleukin-8 (IL-8)과 같은 화학주성인자(chemotactic factor) 생산을 유도하여 다량의 중성구를 위벽으로 이동시킨다.[13~16] *H. pylori*는 이 중성구로부터 OFRs의 생산을 촉진하여 위점막 세포를 손상시키고 위암발생에도 관여하는 것이다.[17]

*H. pylori*는 나선모양의 나선형(spiral form, bacillary form)과 둥근 모양의 구형(coccoid form)으로 존재하는데, 이 두가지 형은 서로 변할 수 있다.[18~21] 나선형의 *H. pylori*가 위점막 세포로부터 IL-8 분비를 촉진시켜 중성구를 위점막과 점막하층에 모이게 하고, 이 중성구들을 활성화시켜 OFRs를 생산하여 위점막 손상을 일으킨다는 것은 이미 널리 알려졌다. 그런데 구형도 이러한 기능을 갖고 있는지에 대해서는 아직 분명히 밝혀지지 않았다. IL-8에 대해서는 구형은 나선형과는 달리 IL-8 생산을 자극하지 않는 것이 보고되었으나,[15,22] 구형이 OFRs의 생산에 미치는 영향에 대한 직접적인 연구는 저자들이 조사한 바에 의하면 아직까지 보고된 바 없다.

본 연구에서는 나선형과 구형의 *H. pylori*로 사람의 말초 혈액 중성구를 활성화시켜 생산된 OFRs를 측정하여 구형도 나선형처럼 산화 활성(oxidative activity)을 갖고 있는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1) *H. pylori*

*H. pylori*는 1종류의 공식균주와 1종류의 분리균주를 사용하였는데, 공식균주는 ATCC 43504 (NCTC 11637)로 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 분리균주인 DU-3은 본 연구실에서 수립한 균주로 십이지장궤양 환자의 위전정부 점막 절편을 배양하여 얻은 균이다.[15] 본 연구에서는 계대 배양횟수가 10회 미만의 균을 사용하였다.

*H. pylori*는 Brucella broth 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 5% fetal bovine serum (HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA), 0.2% activated charcoal (Sigma Chem Co, St. Louis, MO, USA), 1% cyclodextrin, nalidixic acid (20 mg/L), amphotericin B (2 mg/L)와 vancomycin (6 mg/L)을 첨가하여 배양하였다. 배지에 접종한 *H. pylori*는 100 rpm으로 진탕하면서 37°C, 10% CO_2, 5% O_2, 100% 습도의 부란기에서 배양하였다. 열처리 균은 나선형의 *H. pylori*를 100°C에서 10분간 가열하여 사용하였다. *H. pylori* 균수는 이등[15]이 보고한 방법을 사용하여 측정하였다.

2) 구형 *H. pylori*의 유도

*H. pylori*를 Brucella broth 배지에 접종한 뒤 36시간 배양하여 얻은 균을 나선형 *H. pylori*로, 84시간 배양하여 얻은 균을 구형 *H. pylori*로 사용하였다. 실험에 사용한 나선형과 구형의 균은 현미경 하에서 특징적인 모양을 확인한 뒤 3,500 rpm으로 10분간 원심 분리한 다음 phosphate buffered saline으로 3회 세척하여 2×10^8 cells/ml 농도로 조절한 뒤 실험하였다.

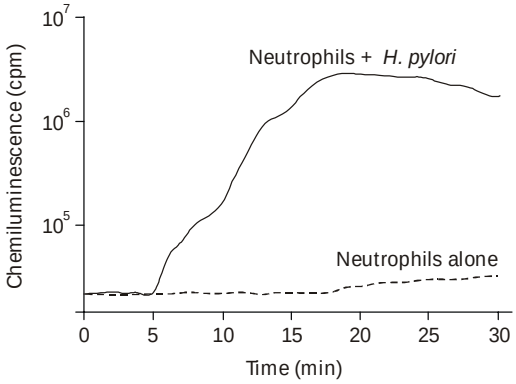

Fig. 1. The representative time course of the effect of spiral form of *H. pylori*, ATCC 43504, on the luminol- dependent Chemiluminescence of human neutrophils. *H. pylori* was added 5 min after the culture of luminol with neutrophils.

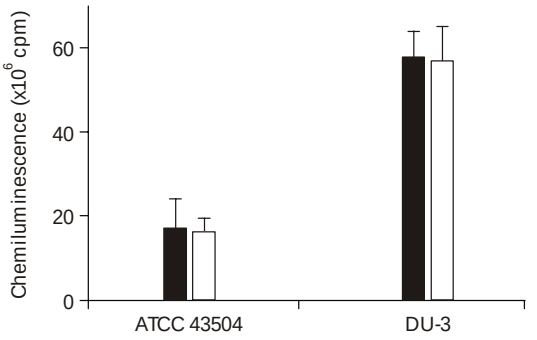

Fig. 2. Luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils activated with spiral (■) and coccoid (□) forms of *H. pylori*, ATCC 43504 and DU-3, a clinical isolate. Data represent the mean±SD of four experiments.

3) 중성구의 분리

4명의 건강한 지원자로부터 말초 혈액 20 ml씩을 채취하여 heparin (20 U/ml blood)이 들어 있는 튜브에 넣고, 2% dextran 용액 15 ml를 넣어 섞은 뒤 실온에서 30분간 방치하였다.[23] 상청액을 채취하여 Histopaque 1077 (Sigma) 5 ml를 밑바닥에 넣고 400×g에서 30분간 원심 분리하였다. 상청액을 흡인하여 제거하고 0.2% NaCl 50 ml를 첨가하여 적혈구를 용해시킨 뒤 원심 분리하여 용혈된 상청액을 제거하고 중성구를 분리하여 Ca^{2+}-free Krebs-Ringer phosphate (KRP) 완충용액에 부유시켰다. 분리한 중성구는 Wright-Giemsa 염색과 trypan blue exclusion 테스트로 95% 이상이 살아 있는 중성구임을 확인하고 실험하였다.

4) 활성산소의 측정

OFRs의 활성을 luminol 화학발광(luminol- dependent chemiluminescence, luminol-dependent ChL) 방법으로 측정하였다.[9,24] Ca^{2+}- free KRP 완충용액 1.9 ml에 중성구 (1×10^5/ml) 100 μl와 luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dioneSigma)을 0.25 μg/ml로 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. *H. pylori*를 1×10^8/ml가 되도록 첨가하여 발생되는 ChL를 Chemiluminescence analyser (Biolumat LB9505, Berthold, Germany)를 사용하여 30분간 측정하였다. Formylmethionyl-leucyl-phenyl-alanine(FMLP)(Sigma)을 1×10^{-7} M로 첨가하였을 때의 ChL를 대조치로 사용하였다.

5) 통계 처리

결과는 평균과 표준편차를 구하여 비교하였으며, Student-*t* test로 $p<0.05$를 유의한 차로 판정하였다.

결 과

1) 나선형 *H. pylori*에 의한 활성산소의 생산

중성구와 luminol이 첨가된 KRP 완충용액에 ATCC 43504를 첨가하니 ChL는 첨가 즉시 증가하기 시작하여 20분 전후에 최고치에 도달하였다(Fig. 1). ATCC 43504를 첨가하지 않은 대조군에서는 ChL의 유의한 변화가 없었다.

2) 나선형과 구형 *H. pylori*에 의한 활성산소의 생산

나선형과 구형의 ATCC 43504와 DU-3이 사람 중성구를 활성화하여 생산하는 OFRs를 luminol-dependent ChL 방법으로 측정하였다. DU-3은 나선형과 구형 모두에서 ATCC 43504보다 ChL치가

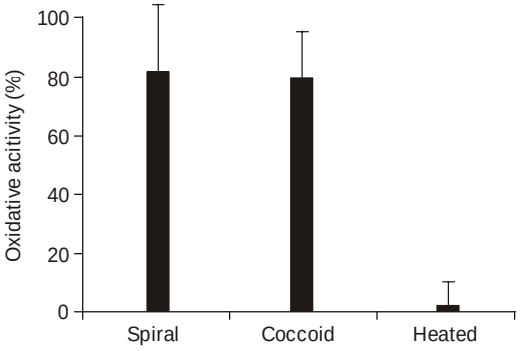

Fig. 3. Oxidative activity of spiral, coccoid and heat-killed *H. pylori*, ATCC 43504, to human peripheral blood neutrophils. The results were expressed as % of the control value generated by 1×10^{-7} M formylmethioninyl-leucinyl-phenylalanine (FMLP). Each column represents the mean±SD of four experiments.

높았다. 그러나 ATCC 43504와 DU-3 모두 나선형과 구형 사이에 ChL치의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 죽은 균이 OFR 생산에 미치는 영향을 규명하고자 ATCC 43504를 열처리하여 죽인 뒤 luminol enhanced ChL를 측정하였는데, 죽은 균은 나선형이나 구형과는 달리 중성구를 활성화시키지 못 하였다(Fig. 3).

고 찰

*H. pylori*는 1983년 오스트레리아의 Marshall과 Warren이 위염환자의 위전정부 점막에서 분리 배양한 그람 음성 균으로 만성 위염의 원인균이며, 위궤양, 십이지장궤양과 위암의 발병에도 깊게 관여하고 있는 균이다.[3~6] 이 균의 감염에 의해 증가되는 위암발생 위험률에 대해서 Danesh[4]는 비교적 연구가 잘 된 10개의 nested case-control 연구를 비교한 결과 약 2.5배(95% CI: 1.9~3.4) 증가한다고 보고하였다. 그런데 감염기간에 따라 위험률에 차이가 있는데, 감염기간이 10년 미만인 경우는 위험률이 2배 전후인데 반해, 10~14년은 4~5배, 14년 이상은 8~9배 증가한다고 보고하였다.[5]

이 균이 위암을 일으키는 기전은 몇가지가 보고되었는데, OFRs의 생성, 비타민 C의 위내 농도 감소, 세포의 교체(epithelial cell turnover)의 증가, 점액층의 손상과 ornithine decarboxylase 활성 증가가 대표적인 것이다.[8,25~27] 그런데 이 변화들은 *H. pylori*에 감염되면 정도의 차이는 있으나 대부분의 예에서 수반되는 변화이다.

*H. pylori*에 감염된 위점막의 조직학적 특징은 중성구와 림프구 같은 염증세포가 위점막 또는 점막하층에 침윤하여 일련의 조직반응을 일으키는 것이다. 이러한 염증세포들이 위점막 손상을 일으키는데 관여하는 대표적인 물질이 IL-8과 OFRs이다.

*H. pylori*는 균주에 따라 차이는 있으나 위점막 세포에 감염되면 IL-8과 같은 많은 종류의 cytokine의 분비를 유도한다. IL-8은 중성구를 위점막에 모이게 하고 활성화시키는 물질인데, 중성구가 활성화되면 막에 존재하는 NADPH oxidase에 의해 superoxide (O_2^-)가 대량 생산된다. O_2^-는 위점막 세포에 존재하는 superoxide dismutase (SOD)에 의해 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2)로 변하는데, H_2O_2는 염산(HCl)의 존재하에서 myeloperoxidase (MPO)에 의해 차아염소산(hypochlorous acid, HOCl)으로 변한다.[8,28] 이 물질은 *H. pylori*가 갖고 있는 요소분해효소(urease)에 의해 생산된 암모니아(ammonia)와 결합하여 monocloramine (NH_2Cl)이라는 세포독성이 강한 OFR을 형성하여 위점막 손상을 유발한다.

본 연구에서는 OFRs 양을 luminol enhanced ChL 방법으로 측정하였는데, 이 방법은 non-enhanced ChL 방법과는 달리 MPO에 의해 만들어진 OFRs 즉 HOCl의 산화 활성(oxidative activity)을 측정하는 것이다. 따라서 O_2^- 또는 H_2O_2의 양이 직접 측정되지는 않으나 이미 언급한 바와 같이 O_2^-는 H_2O_2로, H_2O_2는 HOCl로 대사되기 때문에 간접적으로 이러한 OFRs의 활성도 함께 측정된다. 따라서 중성구의 OFRs 생산능을 평가하는데는 큰 무리가 없으리라 생각된다.[24]

*H. pylori*는 나선형과 구형의 두가지 형태로 존재하는데, 사람의 위속에는 주로 나선형이 존재하나 두가지 형이 동시에 존재하기도 한다. 나선형은 사람의 위나 십이지장 구부에 기생하는 균으로 인체내에서 증식할 수 있는 정상적인 형태의 균이다. 그런데 나선형 *H. pylori*는 사람의 위 또는 십이지장 구부 이외의 장소이거나 위속이라도 주위환경이 생존에 적합하지 않을 때는 구형으로 변한다. 구형은 증

식하지 않고 현재로서는 배양도 불가능하다.[18~20]

과거에는 구형이 되면 증식과 배양이 되지 않기 때문에 죽어가는 과정에 있는 변성형(degenerative form) 또는 이미 죽은 균으로 생각하였으나, 최근에는 부적절한 환경에 적응하기 위한 방어기전 즉 죽어가는 세포가 아니라 휴지기(dormant) 상태의 균이라는 견해가 지배적이다. 실제로 배양시간을 연장하거나, 영양분이 결핍되거나, pH가 변하거나, 활성산소나 항생제에 노출되면 나선형에서 구형으로 변하는 것을 관찰할 수 있다.[19~21]

구형의 생물학적 의의에 대해서는 아직 정설은 없는데, 임상에서는 분구 감염(fecal to oral transmission), 항생제에 대한 내성과 제균 뒤 재발과 관련이 있을 것으로 추측하고 있다. 그러나 구형이 단순히 사멸해 가는 단계의 균인지 아니면 환경적 스트레스 극복을 위한 일종의 방어기전인지에 대해서는 아직 분명히 밝혀지지는 않았다.

나선형의 *H. pylori*는 IL-8의 분비와 같은 다양한 기전으로 위점막 손상을 일으키는 것이 밝혀졌다. 그리고 구형이 되면 IL-8을 분비시키는 자극이 소실되거나 현저히 감소된다는 보고가 있다.[15,22] 그러나 구형 *H. pylori*가 OFRs 분비에 미치는 영향에 대해서는 저자들이 아는 바로는 Gribbon등[29]이 *H. pylori*가 tetrazolium염을 formazan으로 변화시키기 때문에 산화적 효소를 보유하고 있을 것이라는 1편의 보고가 있을 뿐 직접 OFRs를 측정한 연구는 없다.

본 연구의 결과는 나선형과 구형 사이 OFRs 생산능에 차이가 없음을 보여주어, 구형도 나선형과 비슷하게 OFRs에 의해 매개되는 세포손상에 관여할 것을 시사하였다. 그러나 구형이 갖고 있는 생물학적 의의를 명확히 규명하려면 좀 더 체계적인 연구가 필요하다고 생각한다.

결 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 만성 위염과 소화성 궤양의 주된 요인이고, 위암의 발생과 밀접한 관계가 있는 균이다. *H. pylori*에 감염된 위점막의 특징적인 변화는 중성구의 침윤과 침윤된 중성구로부터 활성산소(oxygen-derived free radicals, OFRs)를 생산하는 것이다. *H. pylori*는 나선형(spiral form)과 구형(coccoid form)의 두 종류가 존재한다. 나선형은 OFRs를 생산하여 점막 손상을 유발하는 것이 증명되었지마는 구형도 이런 기전을 갖고 있는지는 아직 밝혀지지 않았다.

나선형의 ATCC 43504와 십이지장 환자에서 분리한 DU-3 균주를 84시간 액체배양하여 구형을 유도하였으며, 나선형은 36시간 배양한 균을 사용하였다. OFRs는 luminol 화학발광(chemilumine-scence, ChL)법으로 측정하였다.

ATCC 43504와 DU-3은 나선형과 구형 사이에 ChL 생산에 차이가 없었다. 한편 열처리로 죽인 ATCC 43504는 OFRs를 생산하도록 중성구를 활성화시키지 못 하였다. 본 연구에서는 구형도 나선형과 비슷한 산화활성을 보여 구형도 나선형과 비슷하게 OFR 생산을 통한 위점막 손상에 관여할 것을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 아산생명과학 연구소 연구비(1998) 지원에 의해 수행되었으며, 연구지원에 감사 드립니다.

참고 문헌

1) 홍원선. 위암의 화학적 예방. 대한예방학회지 2000; 5: 101-112.
2) IARC Working Group. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans; Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, IARC Publications. 1994; vol 61, pp 177-241.
3) Uemura N, Mukai T, Okamoto S, Yamaguchi S, Masuda H, Taniyama K, Sasaki N, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 639-642.
4) Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H. Review article: long-term *Helicobacter pylori* infection-from gastritis to gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12(Suppl 1): 9-15.
5) Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systemic review of the epidemiologic studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13:

851-856.
6) Kuipers EJ. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13(Suppl 1): 3-11.
7) Forman D. Lessons from ongoing intervention studies. In: eds, by RH Hurt and GNJ Tytget *Helicobacter pylori*-Basic Mechanisms to clinical cure, pp 354-361, Great Britain, Kluwer Academic Publishers, 1998.
8) Davies GR, Rampton DS. *Helicobacter pylori*, free radicals and gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 1-10.
9) Han BG, Kim HS, Rhee KH, Han HS, Chung MH. Effects of rebamipide on gastric cell damage by *Helicobacter pylori*-stimulated human neutrophils. *Pharm Res* 1995; 32: 201-207.
10) Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-induced human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996; 56: 1279-1292.
11) Hahm KB, Lee KJ, Choi SY, Kim JH, Cho SW, Yim HY, Park SJ, Chung MH. Possibility of chemoprevention by the eradication of *Helicobacter pylori*: oxidative DNA damage and apoptosis in *H. pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1853-1857.
12) Drake IM, Mapstone NP, Schorah CJ, White KLM, Chalmers DM, Dixon MF, Axon ATR. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H. pylori* infection. *Gut* 1998; 42: 768-771.
13) Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: Quantification of mRNA for interleukin-8, -1α/β, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-α. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 473-480.
14). Crabtree JE. Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 46S-55S.
15) 이미화, 정훈용, 양석균, 김해련, 민영일, 이학성, 김혜원, 홍원선: 위상피세포에서 *Helicobacter pylori* 형태 변화가 Interleukin-8 분비에 미치는 영향. 대한소화기학회지 1999; 33: 757-764.
16) 이용찬, 김원호, 이한영, 문영명, 강진경, 박인서. 위암세포주에서 *Helicobacter pylori*에 의한 Interleukin-8 생산의 조절. 대한소화기학회지 1999; 33: 601-614.
17) Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates HF-kB in gastric epithelial cells. Gastroenterology 1997; 113: 1099-1109.
18) Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, NG CS. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 503-507.
19) Roe IH, Son SH, Oh HT, Choi J, Shin JH, Lee JH, Hah YC. Changes in the evolution of the antigenic profiles and morphology during coccoid conversion of *Helicobacter pylori*. *Korean J Int Med* 1999; 14: 9-14.
20) Catrenich CE, Makin KM. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26(suppl 181): 58-64.
21) 이학성, 최태부. 환경적 스트레스에 의한 *Helicobacter pylori*의 형태변화. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1997; 25: 240-247.
22). Cole SP, Cirillo D, Kagnoff MF, Guiney DG, Eckmann L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. *Infect Immun* 1997; 65: 843-846.
23) Böyun A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 1974; 4: 269- 274.
24) DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemoluminescence of human neutrophils. *J Immunol* 1982; 129: 1589-1593.
25) Alam K, Arlow FL, Ma CK, Schubert TT. Decrease in ornithine decarboxylase activity after eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 888-893.
26) Banerjee S, Hawksby C, Miller S, Dahill S, Beattle AD, McColl KE. *Helicobacter pylori* and its eradication in gastric juice ascorbic acid. *Gut* 1994; 35: 317-322.
27) Rugge M, Cassaro M, Leandro G, Baffa R, Avellini C, Bufo P, Stracca V, Battaglla G, Fabiano A, Guerini A, Dimario F. *Helicobacter pylori* in promotion of gastric carcinogenesis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 950-955.

28) Suzuki M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kurose I, Suzuki H, Kai A, Kudoh Y, Ohashi M, Tsuchiya M. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol* 1992; 263: G719- G725.
29) Gribbon LT, Barer MR. Oxidative metabolism in nonculturabe *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. *Appl Eviron Microviol* 1995; 61: 3379-3384.