Corynebacterium glutamicum 균주에서 생성된 Threonine 아미노산의 헬리코박터 파일로리에 대한 위점막 세포 보호 작용

안정민¹, 김양수², 홍영기², 하봉수², 손미서¹, 함기백^{1,3}

CHA Bio Complex 암예방연구센터¹, CJ BIO 기술 마케팅팀², 차 의과학대학교 분당차병원 소화기센터³

Anti-*Helicobacter pylori*, Anti-apoptotic, and Cytoprotective Effects of Threonine Synthesized from *Corynebacterium glutamicum* in Gastric Epithelial Cells

Jeong Min An¹, Yang Soo Kim², Young Gi Hong², Bong Soo Hah², Mi Seo Sohn¹, Ki Baik Hahm^{1,3}

CHA Cancer Prevention Research Center, CHA Bio Complex¹, Pangyo, CJ BIO Research & Marketing Team², Seoul, Digestive Disease Center, CHA University Bundang Medical Center, CHA University³, Seongnam, Korea

Background/Aims: Among irritants causing gastric ulcer, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) might be pivotal, after which eradication became essential way in either inhibiting ulcerogenesis or preventing ulcer recurrence. Since threonine is essential in either mucus synthesis or cytoprotection, we hypothesized that the dietary threonine from *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) can mitigate the cytotoxicity of *H. pylori* infection.

Materials and Methods: RGM-1 cells were challenged with 100 multiplicity of infection *H. pylori* for 6 hours, during which threonine alone or combination with *Corynebacterium* sp. was administered and compared for anti-*Helicobacter*, anti-inflammation, anti-oxidative, and cytoprotective actions.

Results: Threonine alone or combination of threonine and *C. glutamicum* yielded significant bacteriostatic outcomes. The increased expressions of interleukin (*IL*)-1 β , *IL*-8, *Cox*-2, and *iNOS* mRNA after *H. pylori* infection were significantly decreased with either threonine alone or the combination of threonine and *C. glutamicum*. The elevated expressions of NF- κ B, HIF-1 α , and *c-jun* after *H. pylori* infection were all significantly decreased with the combination of threonine and broth from *C. glutamicum* ($P < 0.05$), leading to significant decreases in 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate ($P < 0.01$). Tracing further host antioxidative response, the attenuated expression of heme oxygenase-1, Nrf2, and dehydrogenase quinone-1 after *H. pylori* infection was significantly preserved with combination of threonine and *C. glutamicum*. *H. pylori* infection led to significant increases in apoptosis accompanied with Bcl-2 decreases and Bax increases, while the combination of threonine and *C. glutamicum* significantly attenuated apoptosis, in which attenuated EGF, TGF- β , and VEGF were significantly regulated, while β -catenin did not change.

Conclusions: Threonine synthesized from *C. glutamicum* significantly alleviated the cytotoxicity of *H. pylori* in gastric epithelial cells. (Korean J *Helicobacter* Up Gastrointest Res 2019;19:245-256)

Key Words: *Corynebacterium glutamicum*; Cytoprotection; *Helicobacter pylori*; Oxidative stress; Threonine

서 론

위 조직 배양을 통한 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균의 검출은 실로 혁명적인 발견이다. 기존의 pH 2나 3 정도인 아주 강력한 위산 환경에서는 어느 균도 군락화할 수 없을 것이라는 일반적인 믿음에도 불구하고 헬리코박터 파일로리 배양의 성공과 함께 배양된 균주가 위, 십이지장 궤양이나 위염과 같은 위 질환과의 연관성을 규명한 업적으로 호주의 Marshall 박사와 Warren 교수는

2005년 노벨 의학생리학상을 받게 되었다.^{1,3} 이러한 성과는 임상에서 위 및 십이지장 궤양의 발생은 물론 재발과 합병증의 방지를 위해서는 반드시 헬리코박터 파일로리를 제균시켜야만 한다는 사실로 이어져, 기존의 “No acid, No ulcer”라는 소화성 궤양의 병태생리를 완전히 변화시키는 그야말로 혁명적인 발견이라 칭할 수 있다.⁴⁻⁶

비록 위암 간의 연관에서는 헬리코박터 파일로리 감염이 세계보건기구에서 제1급 발암인자로 정의되기는 하였지만, 반대로 헬리코박터는 하나의 공생체일 수 있다. 또 완전한 제균은 사실상 불가능하며, 많은 임상에서 모든 균을 꼭 제균을 시켜야 한다는 명확한 결론이 아직까지는 내려지지 않아 지금도 이를 규명하기 위한 수많은 연구가 진행되고 있다. 하지만 위, 십이

Received: June 7, 2019 Revised: June 25, 2019 Accepted: June 25, 2019

Corresponding author: Ki Baik Hahm
Digestive Disease Center, CHA University Bundang Medical Center, 59 Yatap-ro, Bundang-gu, Seongnam 13496, Korea
Tel: +82-31-780-5000, Fax: +82-31-780-5219, E-mail: hahmkb@cha.ac.kr

Copyright © 2019 Korean College of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research

© The Korean Journal of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research is an Open-Access Journal. All articles are 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.

지장 궤양과 같은 양성 질환에서는 헬리코박터 파일로리의 활동을 제한하거나 감염에 따른 제반 병태생리를 조절하고, 염증 호전을 위한 제균 치료를 하는 것이 어느 다른 위 점막 자극인자에 대한 것보다 우선되는 치료 목표로 확립되었다.^{7,8} 비록 위암과의 연관성에 대해서는 아직까지는 약간 상반된 배경에도 불구하고, 위 질환을 유발시킬 수 있는 여러 가지 공격인자, 즉 위산, 흡연, 알코올, 스트레스, 담즙산, 각종 약물 등 다양한 요인 중에서는 헬리코박터 파일로리 제어 또는 제균이 여전히 큰 비중을 가지고 있다.⁹ 인간의 경우 약간 명확하지는 않지만 헬리코박터 균주에 대한 조절 가이드라인이 있는 것에 비하여 가축이나 동물에서는 이런 가이드라인이 없고, 아직도 상당한 수준의 폐사가 문제가 되고 있는 돼지의 예와 같이 헬리코박터 파일로리 감염이 심각하게 건강을 해치는 요인이라 할 수 있다. 그러므로 사람 이상으로 축산 동물에게 헬리코박터 파일로리 감염은 또 하나의 해결되어야 하는 시급한 미충족 의료 수요(unmet medical needs)인 것이다.^{10,11}

그런데 이러한 증가된 공격인자와 함께 헬리코박터 파일로리 감염 시에는 방어인자의 약화가 궤양의 발생 및 악화 등에도 관여하는데 실 예를 들면, 위점액의 약화나 위점막 세포 재생의 지연 그리고 불충분한 세포 보호 작용 등도 위 질환 발생에 중요하기 때문에 임상에서는 헬리코박터 파일로리의 조절과 함께 이들 방어인자 증강이 치료의 또 다른 축을 차지한다.^{12,13} 즉, 위점액의 유지, 위점막 상피세포의 재생 및 유지, 위혈류량 유지 및 위 보호신경 강화 및 prostaglandin (PG) 유지 등이 아주 중요한 방어인자 체계인데, 이 중에서 특히 위점액 생성 및 점액 속 PG 유지가 아주 근본적이며, 더 구체적으로는 PG를 포함한 위점액 생성 증가가 중요하다고 하겠다.¹⁴

저자들은 이미 구속 및 침수 스트레스(water immersion restraint stress)에 노출시켜 위궤양을 유발시킨 모델에서 threonine 과립이 점액 생성 증가 및 항염증/항산화 작용 등에 근거하여 유의한 항궤양 효과를 나타내는 것을 증명하였다.¹⁵ 이에 헬리코박터 파일로리 감염 시 threonine 과립의 보호 효과는 물론 threonine을 만들어 내는 *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*)을 포함한 *Corynebacterium* species (sp.) 균주와의 병합 투여에 따라 항헬리코박터 파일로리 효과는 물론 각종 헬리코박터 파일로리 연관 병태생리학적 반응이 감소되는 지 등을 규명하고, 또한 threonine 과립은 현재 사람을 대상으로 하는식이 성분보다는 가축이나 동물들에게서 위장 보호 효과가 인정되어 사료 등으로 사용되고 있는 바,¹⁶⁻¹⁸ 본 연구를 통하여 헬리코박터 파일로리 감염에 대한 threonine 과립의 위장 보호 효과에 대하여 더 확실한 근거를 제공하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 세포 배양

정상 wistar rat 위점막 세포주인 RGM-1 세포는 10%의 fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's modified essential medium (DMEM)과 Ham F12 혼합배지에서 37°C 세포 배양기(95% air, 5% CO₂)로 배양하였다. 본 세포주는 일본 Tsukuba 대학의 Matsui 교수에 의하여 수립되었는데 동의 후에 본 연구를 위하여 제공되었다.

2. 헬리코박터 파일로리 균주 및 세포 감염

이 실험에 사용된 헬리코박터 파일로리 균주(cytotoxin-associated gene A⁺ 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 (optical density [OD] 600=1)이 될 때까지 10% CO₂ 조건에서 진탕 배양하였다. 세포에서의 감염 다중도(multiplicity of infection, MOI)는 100:1로 사용하였다. 항헬리코박터 파일로리능 측정에는 disk diffusion assay와 균주 배양액의 OD 측정을 통한 성장 상태를 측정하는 두 가지 방법을 모두 사용하였다. 본 연구를 개시하기 전 배경 연구로 시행한 Supplementary Fig. 1에서와 같이 disk 주위의 항헬리코박터 파일로리능에 의한 용혈(hemolysis) 결과에 따라 생성 관찰되는 투명한 halo를 측정하였다. Threonine의 농도에 따라 아주 다양한 크기의 항헬리코박터 파일로리능에 의한 투명한 halo가 형성되었고, 이 실험을 3번 이상 반복하여 평균적 항헬리코박터 효능을 규정하였다. 저자들은 예비 연구를 통하여 다양한 농도의 threonine의 항헬리코박터 파일로리 효능을 헬리코박터 파일로리 배양 전용 blood agar plate에서 측정하여 본 결과 항헬리코박터 효능을 60%, 65% 및 70% 농도에서 관찰을 하였기에, 본 연구에서는 threonine을 생성하는 *C. glutamicum* 균주와의 병합 투여에 따른 제반 헬리코박터 제균 기능을 연구한 것이다. 본 연구에서는 이러한 배경 연구에 기반하여 Table 1에 제시한 것과 같이 총 8개의 군으로 구분하여 threonine 단독과 여러 가지 *Corynebacterium* sp.와의 병합으로 군을 구성하였다.

3. MTT assay를 통한 세포 생존 측정

세포를 48-well dish에 1×10⁴개/well로 도포한 다음 DMEM 배지에서 배양하였다. 이후 각각의 시약을 일정 시간

처리하여 MTT solution (최종 농도 1 mg/mL)을 가하고 2시간 동안 반응한 후 dimethyl sulfoxide로 용해시킨 후 540 nm에서 OD를 microplate reader로 측정하였다.

4. 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)를 사용하였다.

5. 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 ethyleneglycol-bis[β -aminoethylether]-N, N'-tetraacetic acid, 1 mM dithio-

Table1. List of Primer Sequences Used for RT-PCR Analysis

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<i>IL-1β</i>	CAG GCT CCG AGA TGA ACA ACA AA	TGG GGA ACT CTG CAG ACT CA
<i>IL-8</i>	CAG ACA GTG GCA GGG ATT CA	TTG GGG ACA CCC TTT AGC AT
<i>Cox-2</i>	GAA ATG GCT GCA GAG TTG AA	TCA TCT AGT CTG GAG TGG GA
<i>iNOS</i>	CTC ACT GGG ACT GCA CAG AA	TGT TGA AGG GTG TCG TGA AA
HO-1	GAC AGC ATG TCC CAG GAT TT	GGT TCT GCT TGT TTC GCT CT
HSP70	GAG TTG AGC GGC ATC CCG CC	GTC CTA GAT TCA CAC CTG GAG
GAPDH	GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA	TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT

RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; IL, interleukin; HO-1, heme oxygenase-1; HSP70, heat shock protein 70; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Fig. 1. Changes in the inflammatory mediators according to group. (A) RT-PCR for *IL-1 β* and *IL-8* mRNA. (B) RT-PCR for *Cox-2* and *iNOS* mRNA. All results from triplicate measurement. (C) Western blot for *Cox-2* and *iNOS*. All groups treated with threonine show the attenuating effect of *H. pylori*-induced *Cox-2*. (D) Western blot for p-NF- κ B p65. Among the NF- κ B components, significant changes are noted in NF- κ B p65 activation with *H. pylori* infection, of which activations are significantly repressed with threonine and *Corynebacterium glutamicum*. *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; MOI, multiplicity of infection; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; IL, interleukin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

threitol, 1 mM Na₃VO₄, Protease Inhibitor Cocktail tablet [Boehringer, Mannheim, 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.

6. 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) for oxidative stress

24 well plate에 5×10^5 /well의 RGM-1 세포를 분주하고 37°C 세포 배양기(95% air, 5% CO₂)에서 밤새 배양 후 각각의 시약을 일정 시간 처리하였다. DMEM으로 세포를 씻어낸 후 10 µg/mL DCF-DA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 배지에 첨가하여 인큐베이터에서 30분 동안 배양하였

다. 배양 후 4°C의 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻어낸 세포를 형광 현미경으로 관찰 및 촬영하였다.

7. TUNEL staining

DNA 분절 현상을 TUNEL의 방법으로 조사하기 위하여 세포를 Lab-Tek chamber slide에 1×10^5 개/chamber로 분주한 다음 37°C 세포 배양기(95% air, 5% CO₂)로 배양하였다. 이후 각각의 시약을 일정 시간 처리한 후 apoptosis detection kit (invitrogen, Denver, CO, USA)를 사용하여 제조회사의 실험 방법대로 시행하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 4% paraformaldehyde를 첨가하여 상온에서 20분간 고정하였다. PBS로 다시 2회 세척 후 0.1% triton X-100을 4°C에서 5분간 처리하고 terminal deoxynucleotidyl transferase와 nucleotide mixture를 혼합하여 만든 용액으로 37°C에서 빛을 차단한 후 60분간 반응시켰다. PBS로 세척하고 난 후, 형광 현미경으로 세포자멸사를 관찰하였다.

Fig. 2. Changes related to oxidative stress according to group. (A) Western blot for HIF-1α. (B) Western blot for c-Jun and c-Fos. (C) Confocal imaging for DCF-DA, ×400, lower graphs show mean counter of DCF positive cells in ×400 field. *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; MOI, multiplicity of infection; DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate.

8. 통계 분석

모든 실험값은 t-test를 통한 방법으로 통계 검증하였고, $P < 0.05$ 이상일 경우를 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

결 과

1. 과립 threonine과 *C. glutamicum* 병합에 의한 헬리코박터 파일로리 연관 각종 염증 매개인자의 감소와 이를 전사하는 NF- κ B 전사인자 비활성화

Fig. 1A와 1B에서와 같이 6시간 동안 100 MOI 헬리코박터 파일로리를 위점막 상피세포에 감염시킨 경우 염증 매개인자인 *IL-1 β* , *IL-8*, *Cox-2*, *iNOS* mRNA가 유의하게 증가됨을 관찰할 수 있었다($P < 0.01$). Western blot으로 단백질에서도 유의한 증가를 관찰할 수 있었으며, 이러한 변화는 이를 중개하는 NF- κ B p65와 같은 전사인자의 활성화 증가와 연관성이 있었다($P < 0.05$; Fig. 1). 그러나 이러한 배경 하에 threonine이나 threonine을 생성할 수 있는 *Corynebacteria* sp.와의 측정을 통하여 관찰한 각각 그룹 간의 변화는 Fig. 1에서 보여주듯이 대조군에 비하여 threonine 투여군에서 모두 유의한 변화를 보여,

Cox-2, *iNOS*는 물론 NF- κ B 비활성화로 이어졌고($P < 0.05$), 특히 group 6과 7에서 가장 유의한 변화를 보여주어 이러한 결과는 threonine 단독이나 이를 생성할 수 있는 *Corynebacterium* 균주의 broth와의 병합으로 더욱 두드러지는 결과에 기초하여 threonine이 위점막 상피세포에서 항헬리코박터 기능을 유도함을 알 수 있었다.

2. 과립 threonine과 *C. glutamicum* 병합에 의한 헬리코박터 파일로리 연관 oxidative stress 약화 효과

Fig. 2A와 2B는 헬리코박터 파일로리 감염 후 oxidative stress와 연관된 HIF-1 α 와 acute phase response를 전사하는 *c-Fos*와 *c-Jun*의 변화를 Western blot으로 측정된 것으로, 헬리코박터 파일로리 감염(6시간, 100 MOI)에 의하여 유의하게 acute phase response gene이 증가하며, 동시에 HIF-1 α 의 증가를 관찰할 수 있었다. 반면에 threonine 단독이나 생성 균주와의 병합 투여에 따라 유의한 변화를 보여주었는데, 구체적으로 특히 group 6과 group 7에서 아주 유의한 HIF-1 α 의 감소를 보인 반면에 *c-Jun*과 *c-Fos*는 group 3에서 유의한 감소를, *c-Fos*의 경우에는 반대로 group 6에서 유의한 증가를 보여서

Fig. 3. Changes in the phase 2 host defense genes including its transcription factor Nrf2. (A) RT-PCR for HO-1 and HSP70 mRNA. (B) Western blot for Nrf2 in nuclear fractions. Significantly increased nuclear translocations of Nrf-2 are noted in group 6~8. (C) Western blot for GST-pi, HO-1, and NQO-1. *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; MOI, multiplicity of infection; HO-1, heme oxygenase-1; HSP70, heat shock protein 70; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione-s-transferase; NQO-1, dehydrogenase quinone-1; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

이러한 acute phase responder의 핵내 이동의 변화는 threonine 투여가 헬리코박터 파일로리 감염에 즉각적인 생체 반응을 보여주는 식이인자일 수 있음을 시사하는 소견이라 하겠다. 이러한 생체 반응, 특히 oxidative stress를 시각화하기 위하여 DCF-DA probe를 활용한 DCF 발현 반응을 confocal imager로 분석한 Fig. 2C의 결과를 보면 헬리코박터 파일로리 감염 후 유의하게 증가된 DCF는 group 1, 3과 6에서 통계적으로 유의하게 감소됨을 관찰할 수 있었다($P<0.05$). 결론적으로 threonine 단독이나 이를 생성하는 *Corynebacterium*의 투여는 헬리코박터 파일로리에 의한 oxidative stress나 hypoxia response를 즉각적으로 대처함을 알 수 있었다.

3. 과립 threonine과 *C. glutamicum* 병합에 의한 헬리코박터 파일로리 연관 Nrf-2 매개 세포 보호 작용

Fig. 3A에서는 대표적인 host cytoprotective factor인 항산화 기능을 보이는 heme oxygenase-1 (HO-1)과 heat shock protein 70 (HSP70) mRNA를 헬리코박터 파일로리 감염 후와 각 군 간의 발현 변화를 살펴본 바, 헬리코박터 파일로리 감염 후 발생하는 oxidative stress 및 세포 사멸에는 HO-1 및 HSP70 mRNA의 유의한 감소가 관찰되었으나($P<0.001$), 반면에 Fig. 3A와 3B에서 관찰되듯이 group 6에서 유의한 Nrf2 증

Fig. 4. Changes in the apoptotic executors and TUNEL showing apoptotic cells. (A) Western blot for Bax and Bcl-2. (B) TUNEL *in situ* hybridization, $\times 200$ (upper), and mean apoptotic index according to group (lower). *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; MOI, multiplicity of infection.

가에 따른 HO-1의 증가를 볼 수 있었다($P<0.001$). HSP70의 변화는 group 7 및 group 8에서 두드러지게 증가하였다. 그러므로 HO-1을 포함한 다른 glutathione-s-transferase 및 NADH dehydrogenase quinone-1 (NQO-1)과 같은 HO-1에 포함되는 전반적인 host defense anti-oxidative response에 대한 변화를 추가하여 측정하여 본 바, Fig. 3C에서와 같이 threonine 단독이나 *Corynebacterium*과의 병합은 Nrf-2 기반의 HO-1 반응에 주로 기반하는 항산화 작용을 보이며, 이는 항헬리코박터 파일로리에 주효하는 분자생물학적 반응임을 확인할 수 있었다.

4. 과립 threonine과 *C. glutamicum* 병합에 의한 헬리코박터 파일로리 연관 세포 사멸 저해 효능

헬리코박터 파일로리 감염은 세포 사멸의 유의한 증가에 의하여 점막 손상 및 궤양을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. Fig. 4A에서도 헬리코박터 파일로리 감염 후에는 세포 사멸 억제 단백질 Bcl-2의 감소와 세포 사멸 유전자인 Bax의 증가를 관찰할 수 있었고, 이를 *in situ*로 증빙하기 위한 Fig. 4B의 TUNEL 염색에서도 통계적으로 유의한 apoptosis의 증가가 헬리코박터 파일로리 감염 이후에 관찰되었으나($P<0.01$), 반면에 threonine 단독이나 *Corynebacterium* 동시 투여군에서는 통계적으로 유의한 apoptosis의 감소를 관찰할 수 있었다($P<0.001$; Fig. 5A).

5. 과립 threonine과 *C. glutamicum* 병합에 의한 헬리코박터 파일로리 연관 각종 성장인자의 조절 기능

Fig. 5B에서는 헬리코박터 파일로리 연관 세포 성장, 혈관 성장 그리고 Fig. 5A에서는 상피세포 증식인자에 대하여 살펴 보았다. 이미 보고된 바와 같이 헬리코박터 파일로리 감염 후에는 EGF, PDGFR, TGF- β 및 VEGF의 유의한 증가를 관찰할 수 있었는데($P<0.01$), 이러한 소견은 앞에서 이미 소개된 헬리코박터 파일로리 감염에 따른 염증 증가의 결과로 점막 허혈 (ischemia) 유도에 따른 이차적인 변화와 일치하는 소견이며, 증가된 이들 성장인자는 무분별한 점막 증식이나 암성 염증을 조장할 수 있고, 역으로 열악한 위점막 염증 환경을 반영해주는 결과라 할 수 있다. 이러한 변화와 달리($P<0.01$) threonine 단독이나 *Corynebacterium*과의 병합 투여는 이를 유의성이 있게 조절할 수 있었고, 특히 앞선 연구 결과와 일치하게 group 6이나 group 7에서의 더욱 현저한 변화를 보여, 전체적으로 threonine 투여는 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 제반 염증이나 암화를 완화시킬 수 있다는 결과를 보여주었다. 그러나 β -catenin 활성화에 따른 세포 증식 측면에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았는데(Fig. 5B), 이는 본 연구의 100 MOI, 6시간 감염은 아직 β -catenin의 유의한 변화를 유도하는 phase는 아니기 때문인 것으로 사료되나 nuclear fraction을 활용한 β -catenin의 nuclear transfer 연구에서는 group 6에서 이미 β -catenin nuclear transfer를 이미 6시간에서도 저해시킬 수 있음이 관찰되었다.

Fig. 5. Changes in angiogenic growth factors and β -catenin according to group. (A) Western blot for p- β -catenin in cytoplasmic fraction and β -catenin in nuclear fraction according to group. (B) Western blot for EGF, PDGFR, TGF- β , and VEGF. *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; MOI, multiplicity of infection.

6. 과립 threonine과 각종 *Corynebacterium*의 항헬리코박터 효능

Disc diffusion assay 방법을 사용하여 blood agar plate에서 헬리코박터 파일로리에 대한 bactericidal 효능을 측정하였는데, 이전 예비 실험(Supplementary Fig. 1)에서 threonine 단독으로도 유의한 항헬리코박터 파일로리 효능이 있음을 관찰하였다. 이러한 배경 연구를 근거로 본 연구에서는 threonine을 생성시키는 균주인 *Corynebacteria*와의 병합에 따른 항헬리코박터 파일로리 효능을 측정하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. Threonine 결과를 배경으로 투여시킨 threonine은

*Corynebacterium*에 의하여 생성이 되므로, 다음으로는 *C. glutamicum*, *C. ammoniagenes* 그리고 다른 *Corynebacterium* sp. 각각의 균주 또는 이들 균주를 배양한 broth를 병합하여 Table 2와 같은 조합으로 agar diffusion assay 방법으로 항헬리코박터 파일로리 효능을 비교하여 보았다. Fig. 6A와 같은 threonine 과립의 항헬리코박터 파일로리 효능이 threonine에 특이함을 증빙하기 위한 연구 결과, group 6과 group 7과 같이 threonine 과립과 *C. glutamicum*과 같은 threonine 생성 가능 균주의 broth를 같이 넣은 군에서 가장 유의한 항헬리코박터 파일로리 결과를 얻었다. 이를 좀 더 증빙하기 위하여 얻어진 broth를 1/4, 1/40 그리고 1/100로 희석한 연구에서의

Fig. 6. Disk diffuse assay to analyze the anti-*Helicobacter pylori* factors. (A) Photo showing halo around disc accompanied with the description of each group. All experiments were repeated thrice in order to have mean value. (B) According to representative photo as shown in Fig. 1A, halo around disc in 8 groups were measured and mean values are shown in graph.

Table 2. Group Description to Denote the Anti-*Helicobacter* Properties of Threonine Alone and Combination with *Corynebacterium* Species

Group	Group description
1	Broth from <i>Corynebacterium glutamicum</i>
2	Threonine powder
3	Threonine powder+ <i>Corynebacterium glutamicum</i>
4	Threonine powder+ <i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
5	Threonine powder+ <i>Corynebacterium</i> other species
6	Threonine powder+broth from <i>Corynebacterium glutamicum</i>
7	Threonine powder+broth from <i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
8	Threonine powder+broth from <i>Corynebacterium</i> other species

결과를 통합하여서도 같은 결과를 얻을 수 있어(Supplementary Fig. 2), 이상의 결과는 threonine 과립 단독은 물론 이를 생성하는 균주와의 병용으로 항헬리코박터 효능이 있음을 증빙할 수 있었다.

고 찰

이상의 연구 결과를 Fig. 7에 간략히 정리 및 요약하였는 바, 헬리코박터 파일로리 감염은 *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-2*, *Cox-2*, *iNOS*, NF- κ B 활성, *c-Jun*과 *c-Fos* 증가 그리고 HIF-1 α 의 증가에 기반하여 급성/만성 위염은 물론 만성 위축성 위염이나 전암 병변에 해당하는 암화를 유도한다. 이러한 병태생리를 증강시키는 또 다른 기전으로 Nrf-2, HO-1, 각종 growth factors 등과 같은 cyto-protection의 약화에 따라 임상적으로는 위, 십이지장 궤양 발생 증가 및 궤양의 치유가 늦어지고, oxidative stress 급증에 따른 세포 보호 감소 그리고 실질적인 apoptosis의 증가와 이후의 적절한 세포 성장 조절의 실패에 따른 암화의 단초가 제공이 되는

것으로 아주 잘 밝혀져 있다.¹⁻³ 본 연구에서는 이러한 방어인자의 감소와 같은 배경에 대하여 threonine 단독 투여는 물론 이를 생성하는 균주인 *Corynebacterium*, 특히 *C. glutamicum*의 병용 투여는 가장 유용한 항헬리코박터 파일로리 효능과 함께 위에 열거한 감염에 따른 제반 병태생리학적 기전을 효율적으로 저해하여 줌을 증빙할 수 있어, 이를 응용하면 threonine은 헬리코박터 파일로리 감염이나 기타의 여러 가지 위점막 자극 물질의 증가 상황에서 이를 효율적으로 방어가 가능한 치료제로서의 가능성이 있다고 하겠다.

그러므로 이를 인체 질환에도 응용이 가능하나 이미 인간은 threonine를 함유한 많은 음식이나 식품을 충분히 섭취하기 때문에, 이러한 감염에 따른 근본적인 영양 공급과 같은 대책이 거의 없는 동물이나 가축의 사료로의 활용 등으로 기대가 되겠다.^{11,12}

위장의 방어인자 중 가장 최전선에 있고 중요하며 pH 2, 3 과 같은 강산의 위산을 중화시킬 수 있는 방어기전이 바로 mucin의 합성인데, HCO₃⁻를 보유하고 pepsin 단백 분해를 억

Fig. 7. Schematic presentation explaining the effects of threonine and *C. glutamicum*. *H. pylori* infection leads to gastritis, peptic ulcer disease, and carcinogenesis, during which increased mutagenic inflammation and oxidative stress, attenuated cytoprotection, and retarded/deranged regeneration prevail. Consequent to these disasters triggered by *H. pylori*, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, and dysplasia develop, due to which *H. pylori* infection had been defined as a class I carcinogen. In this background, threonine granules alone or combination with threonine-producing bacteria, *C. glutamicum* affords significant regulating action mechanisms. Our study proves the merits of threonine as important regulating agent against *H. pylori* infection in veterinary or clinical medicine. *C. glutamicum*, *Corynebacterium glutamicum*; *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; IL, interleukin; HO-1, heme oxygenase-1; HSP, heat shock protein.

제시될 수 있고, 인지질의 불수용 성질을 유지시켜주며, 점액 gradient를 만들어 주는 유용한 점액질이 방어기전 중에 아주 중요하다 하겠다. 이러한 위 mucin은 위표면 점막세포나 위경부 점액세포에서 생성되며, 폴리머를 형성하기 위하여 disulfide bridge로 접목된 glycoprotein subunit으로 구성되어 있는데, 이때 당쇄로 구성된 아미노산 뼈대가 구조상 가장 중요하다. 이 축에서 바로 threonine이 주요 구성원이므로, threonine의 섭취는 이러한 당화 반응의 증가 및 축형성으로 양질의 mucin이 생성되게 하므로 전체적으로 위 방어인자의 증가를 가져오게 된다. 이러한 축의 작용에 대해서는 아직 규명되지 못하고 있었으나, 저자들은 수침 및 구속 스트레스 모델이나 다른 화학적 자극 모델 연구에서 추가적인 방어인자 증강 기능을 규명한 바 있다.^{15,16,19-21}

안정성이 높고 더 많은 효능이 기대되는 threonine을 생성 가능한 *C. glutamicum*은 L-threonine 생성을 하는 아주 중요한 균주인데, 이러한 기술은 이미 2000년경에 완성이 되었다. 세균이 아미노산 생성에 필요한 펩타이드를 충분히 섭취하고 이를 처리함으로써, 본 연구에서 타킷을 하는 L-threonine 이외에도 L-lysine, putrescine과 같은 다양한 아미노산은 물론 광치료에 사용되는 aminolevulinic acid 등도 만들 수 있게 되었다. 그러므로 이러한 기술은 본 연구에서 사용되는 L-threonine을 아주 높은 순도로 대량 생산이 가능하게 함으로써 본 연구에서 제시한 위장 보호 효능은 물론 세포 재생 등에 다양하게 사용이 가능하고, 더 나아가서 위장 이외의 다양한 재생을 요하는 질병에도 사용이 가능하게 되었다.²²⁻²⁵

헬리코박터 감염에 의한 위장병의 발생은 감염 시기 및 감염에 따른 숙주의 반응에 따라 아주 다양한데, 일반적으로는 급성/만성 위염을 유발한다. 이때 지나친 자가면역 반응, 특히 림프구 반응으로 점막관련림프조직(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) 림프종이 발생하며, 반면에 위산 분비 조절 장애를 유발할 경우 십이지장 궤양이 그리고 지나친 염증 반응 악화 및 지속으로는 위산 파괴를 초래하는 결과로 만성 위축성 위염 및 진전에 따른 위암이 발생할 수 있다. 그런데 이러한 숙주 반응의 공통점은 감염 및 집락화 결과로 산화적 손상, 동반되는 지나친 염증 반응 그리고 이의 병인이 지속되는 숙주의 세포 보호 악화 등이 기본적으로 발생한다는 것이다. 이러한 배경으로 임상에서는 소화성 궤양 발생 및 재발, MALT 림프종과 같은 지나친 림프구 반응 그리고 위암 발생과 연관된 재발 방지 등을 위한 목표로만 제균 적응증이 제정되어 있지만, 병태생리학적 측면에서는 감염 및 심한 염증과 면역 변화에 따른 초기 반응에 대한 적절한 제어가 아주 중요하다 하겠다. 그러므로 이러한 배경 하에 사람은 물론 자극 물질에 대한 지나친 질환 반응으로 폐사를 하거나 위장 질환이 병발하

고, 특히 스트레스를 이겨내는 기전이나 환경을 능동적으로 대처할 수 없는 동물들에게는 사료에 포함을 시키거나 별도로 공급하는 방법으로 threonine을 선제적 투여(preemptive administration)하는 것이 아주 적절할 것이다.^{26,27}

Threonine 투여의 결과로 아주 유용한 항염증 작용, 항산화 작용, 항변이 작용 결과를 본 연구에서 규명하였고, 이전의 연구에서도 스트레스 연관 위 손상 모델에서도 점액 생성 증가는 물론이고 항산화, 항세포 사멸 그리고 세포 재생 촉진 등의 공통된 효과를 이미 관찰하여¹⁶ threonine의 투여가 동물의 위 손상 예방이나 치유에 사용이 가능할 것으로 사료되며, 더 나아가 사람에서도 응용이 기대된다고 하겠다. 위점액은 표면 위점막세포와 위경부 점액분비세포에서 활발하게 분비되어 최전선의 위 방어인자로 작용을 하는데, 그 생성 과정을 살펴보면 바로 본 연구에 사용된 threonine 아미노산을 기반으로 리보솜에서 당단백이 생성되어 glycoside sugar chain을 소포체에서 구성하여, oligomerization 기전을 통하여 성숙되면서 분비가 진행이 된다.

제균 이외의 접근 방법으로 헬리코박터 파일로리에 의한 여러 가지의 세포 독성을 약화시키거나 세포 변성을 유도하는 각종 기전을 제어할 수 있는 식품이나 비제균의 방법으로는 다양한 식물화합물(phytochemicals)이 함유된 식품이나 분리된 식물화합물을 이용할 수 있어, 저자들은 과거 20여년 동안 홍삼, 감초, 녹차, 강황, 쑥 추출물 등 아주 다양한 접근을 통한 연구들을 발표한 바 있는데, 이들의 공통적인 특징은 세포 모델은 물론 질환 모델 기반의 유효성에서도 아주 우수한 결과를 찾을 수 있었다.^{28,29} 그렇지만 이러한 접근의 한계로는 아주 충분한 근거중심의학적 결과가 부족하다는 것과 이들 물질들은 독성학에서 제기되는 hormesis의 원칙을 따른다는 것이다. 즉, 약물과 같이 아주 특정한 농도나 투여 시에는 효능을 보이기는 하나 용량 의존적이지 않아 어떤 경우에는 고용량에서 오히려 낮은 효과나 부작용을 보인다는 점과 이들의 효능을 극대화하기 위한 적절 용량 및 투여 방법 등에 대한 구체적인 결과가 없으므로 임상시험의 수준도 낮지만 일관성이 있는 결과를 제시할 수 없다는 것이다. 그런데 반하여 본 연구에 사용된 threonine의 경우는 이러한 단점을 모두 불식시킬 수 있었고, 본 연구에서 제시한 것과 같은 헬리코박터 파일로리 감염에 따른 병태생리를 모두 유효하게 조절이 가능하며, 여러 조건에서 일치된 결과가 나온다는 장점과 안정성이 높은 아미노산이므로 현재로는 특이한 대책이 없는 동물이나 가축의 사료로 충분히 가치가 높을 수 있다.

이상의 결과를 요약하면 헬리코박터 파일로리를 모두 제거하거나 이를 효율적으로 억압하기 위한 제반 노력은 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 급성/만성 위염의 치료는 물론, 소화성

궤양, MALT 림프종이나 위선암의 예방, 최근에는 각종 위장 외의 여러 질환들의 원인으로 규명되고 있어 점차 이 균주에 의한 연관 질환의 치료로 적응증이 확대되고 있다. 이러한 위장 외 질환의 가능한 병인으로 헬리코박터 파일로리 exosome에 의한 가능성과 molecular mimicry에 의한 자가 반응으로 밝혀져 있으나 아직까지 사람에서도 규명되지 못한 상황에서 동물이나 가족들에서 먼저 고려되어야 할 사항은 아니다. 이러한 배경에서 본 연구진들이 규명한 threonine 과립은 향후 동물의 사료에 사용되거나 단독으로 보충해줄 수 있는 아주 유용한 성분임을 규명하였고 다행히도 단백질 재조합 방법 등의 현저한 발전으로 본 연구와 같이 *C. glutamicum*과 같은 균주의 활용으로 헬리코박터 파일로리는 물론 이외의 다양한 위장 자극 물질들에 대항하는 아주 좋은 치료법일 수 있음을 입증할 수 있었다.

CONFLICT OF INTEREST

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

ORCID

Ki Baik Hahm <https://orcid.org/0000-0002-2971-7166>

REFERENCES

- Goh KL. Lessons learnt from the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Malaysia: JGHF Marshall and Warren lecture 2017. *J Gastroenterol Hepatol* 2018;33:1177-1184.
- Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJ, et al. Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven-year follow-up. *Lancet* 1994;343:258-260.
- Forbes GM, Warren JR, Glaser ME, Cullen DJ, Marshall BJ, Collins BJ. Long-term follow-up of gastric histology after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11:670-673.
- Dhungat JV. Barry Marshall and Robin Warren: *H. pylori* in peptic ulcer. *J Assoc Physicians India* 2016;64:104.
- Fock KM, Graham DY, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* research: historical insights and future directions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:495-500.
- Copeland CE, Stahlfeld K. Two tall poppies and the discovery of *Helicobacter pylori*. *J Am Coll Surg* 2012;214:237-241.
- Sugano K, Hiroi S, Yamaoka Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Asia: remembrance of things past? *Gastroenterology* 2018;154:257-258.
- Rugge M, Genta RM, Di Mario F, et al. Gastric cancer as preventable disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15:1833-1843.
- Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2019; 380:1158-1165.
- De Witte C, Ducatelle R, Haesebrouck F. The role of infectious agents in the development of porcine gastric ulceration. *Vet J* 2018;236:56-61.
- Swaby H, Gregory NG. A note on the frequency of gastric ulcers detected during post-mortem examination at a pig abattoir. *Meat Sci* 2012;90:269-271.
- Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 2008;135: 41-60.
- Tarnawski A, Ahluwalia A, Jones MK. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. *Curr Pharm Des* 2013;19:126-132.
- Atay S, Tarnawski AS, Dubois A. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;61:105-124.
- An JM, Kang EA, Han YM, et al. Dietary threonine prevented stress-related mucosal diseases in rats. *J Physiol Pharmacol* 2019;70:467-478.
- Faure M, Mettraux C, Moennoz D, et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. *J Nutr* 2006;136:1558-1564.
- Dong X, Quinn PJ, Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine. *Biotechnol Adv* 2011;2:11-23.
- Ichikawa T, Ishihara K, Saigenji K, Hotta K. Stimulation of mucin glycoprotein biosynthesis in rat gastric mucosa by gastrin. *Biochem Pharmacol* 1993;46:1551-1557.
- Hayashida H, Ishihara K, Ichikawa T, et al. Expression of a specific mucin type recognized by monoclonal antibodies in the rat gastric mucosa regenerating from acetic acid-induced ulcer. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:467-473.
- Ikezawa T, Goso Y, Ichikawa T, et al. Appearance of specific mucins recognized by monoclonal antibodies in rat gastric mucosa healing from HCl-induced gastric mucosal damage. *J Gastroenterol* 2004;39:113-119.
- Feng L, Zhang Y, Fu J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid. *Biotechnol Bioeng* 2016;113:1284-1293.
- Nguyen AQ, Schneider J, Reddy GK, Wendisch VF. Fermentative production of the diamine putrescine: system metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolites* 2015; 24:211-231.
- Xu J, Han M, Zhang J, Guo Y, Zhang W. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for the L-lysine production by increasing the flux into L-lysine biosynthetic pathway. *Amino Acids* 2014;46:2165-2175.
- Dong X, Quinn PJ, Wang X. Microbial metabolic engineering for L-threonine production. *Subcell Biochem* 2012;64:283-302.
- Diesveld R, Tietze N, Fürst O, et al. Activity of exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and their use to increase L-threonine production. *J Mol Microbiol Biotechnol*

- 2009;16:198-207.
26. Simic P, Sahm H, Eggeling L. L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 2001;183:5317-5324.
27. Jeong M, Park JM, Han YM, et al. Dietary prevention of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer with kimchi. Oncotarget 2015;6:29513-29526.
28. Jeong M, Park JM, Han YM, et al. Dietary intervention of artemisia and green tea extracts to rejuvenate *Helicobacter pylori*-associated chronic atrophic gastritis and to prevent tumorigenesis. Helicobacter 2016;21:40-59.
29. Park SH, Kangwan N, Park JM, Kim EH, Hahm KB. Non-microbial approach for *Helicobacter pylori* as faster track to prevent gastric cancer than simple eradication. World J Gastroenterol 2013;19:8986-8995.

Group	Description
CMC	Non-treated
99	99% threonine powder
60	60% threonine powder
65	65% threonine powder
70	70% threonine powder
75	75% threonine powder

Supplementary Fig. 1. Disk diffusion assay under *Helicobacter pylori* culture, hemolysis status according to different doses of threonine.

Supplementary Fig. 2. Disk diffuse assay to analyze the anti-*H. pylori* of threonine alone and combination with synthesizing bacteria with dilutional broth from each group; comparison with non-treated samples. The mean halo in each group in a different subdivision ($\times 1/4$, $\times 1/40$, and $\times 1/100$ dilution). *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; MOI, multiplicity of infection.