

나혜경 교수지도

석사학위 청구논문

위 점막세포에서
15-hydroxyprostaglandin
dehydrogenase 발현에 대한
*Helicobacter pylori*의 영향

2012년

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

이영욱

위 점막세포에서
15-hydroxyprostaglandin
dehydrogenase 발현에 대한
Helicobacter pylori의 영향

나혜경 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2011년 11월

성신여자대학교 대학원
식품영양학과
이영욱

인 준 서

이영욱의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 _____ (印)

심사위원 _____ (印)

심사위원 _____ (印)

성신여자대학교 대학원

논문 개요

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 in vitro, in vivo, 임상 실험에서 위염의 원인으로 규명되었으며, 나아가 위암 발달의 주요인자로 알려져 있다. 많은 실험적 역학적 연구 결과에 따르면 염증반응은 발암과정과 밀접하게 연관되어 있으며, 염증반응 시 Cyclooxygenase (COX-2)라는 효소에 의해 아라키돈산 경로가 활성화 된다. 비정상적인 COX-2의 발현으로 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성이 증가되는데, 이러한 현상은 다양한 암세포 및 암조직에서 관찰되고 있다. 보고된 연구 결과에 따르면, *H. pylori*로 감염된 위 상피세포에서 COX-2의 발현과 PGE₂ 생성이 증가됨이 보고되었다. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)는 PGE₂를 15-keto-PGE₂로의 전환을 촉진함으로써 PGE₂를 불활성화 시키는 효소이다. 연구 보고에 의하면 대장암, 유방암, 폐암에서 15-PGDH의 발현 수준이 정상조직에 비해 현저히 낮으며, 15-PGDH knock out 마우스가 15-PGDH wild type 마우스에 비해 발암물질에 의한 대장암 유발에 더욱 민감함이 보고되었다. 반면에 15-PGDH의 과발현이 암세포의 세포사멸, 전이 및 침윤과정을 저해함으로써 종양억제인자로서의 15-PGDH 역할이 제시되고 있다. 그러나 아직까지 *H. pylori* 감염에 의한 15-PGDH의 발현 조절에 대한 기전연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 Rat의 위 점막 상피세포인 RGM-1 세포에 *H. pylori*를 감염시킨 후 15-PGDH의 발현 정도를 확인하고 이의 분자적 작용 기전을 살펴보고자 하였다. *H. pylori*를 감염에 대한 RGM-1 세포의 세포독성 정도를 MTT assay를 통해 시간별로 분석하였다. 결과 대조군에 비하여 24시간에 6.4%, 48시간에 26.6%로 세포 성장억제하였다. 따라서 RGM-1 세포에 *H. pylori* 감염을 최대 24시간으로 정하고 모든 실험을 진행하였다. *H. pylori* 감염으로 인한 15-PGDH 발현 정도

를 확인하기 위하여 western blot analysis와 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 단백질과 mRNA 발현 모두 대조군에 비해 *H. pylori* 처리한 RGM-1 세포에서 시간 의존적으로 감소하는 경향을 나타냈으며, 24시간대에 15-PGDH 발현이 최대로 감소하는 것으로 나타났다. *H. pylori* 감염으로 감소된 15-PGDH 발현 감소에 어떤 전사인자가 관여하는지 살펴보기 위해 15-PGDH promoter deletion mutant plasmid를 RGM-1 세포에 transfection 한 후 luciferase activity를 측정하였다. 그 결과 *H. pylori* 감염으로 인한 15-PGDH 발현 감소에 15-PGDH 프로모터에 존재하는 E twenty six (Ets) 계열의 전사인자가 관여할 것으로 사료되었다. 따라서 Ets 계열의 주요 전사인자인 Elk-1의 인산화정도를 살펴본 결과 *H. pylori* 처리에 의해 Elk-1의 인산화가 감소됨을 확인하였다. 15-PGDH 발현 변화에 mitogen-activated protein kinases (ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPKs)이 관여하는지 알아보기 위하여 이들 발현 및 인산화 정도를 western blot analysis를 통해 확인하였다. 결과 *H. pylori* 감염으로 인해 ERK1/2와 JNK1/2의 인산화 되었으며, ERK1/2의 약물학적 억제제인 U0126에 의해 *H. pylori*에 의해 감소된 15-PGDH의 발현이 회복됨을 확인하였다. Curcumin은 항염증, 간장보호, 소화기 및 심혈관계에 대한 보호 작용, 항혈소판응집, 혈중지질강하, 항산화, 항돌연변이, 항종양, 항균작용 등을 가지고 있는 생리활성물질이다. 이에 본 연구에서는 *H. pylori*에 감염된 RGM-1 세포에 curcumin 처리 시 *H. pylori*에 대한 보호효과를 확인하였으며, western blot analysis를 통해 15-PGDH 발현 정도를 살펴보았다. curcumin과 *H. pylori*를 co-treated 한 결과 curcumin이 농도 의존적으로 15-PGDH 발현을 증가시킴을 확인하였다. 위의 결과를 통해 curcumin이 *H. pylori*에 의해 유도된 15-PGDH 발현 감소에 보호효과가 있음을 알 수 있다.

목 차

논문개요

I .	서론.....	1
II .	본론.....	8
1.	연구재료 및 연구방법.....	8
1)	연구재료.....	8
2)	세포배양.....	9
3)	Bacteria strains and <i>Helicobacter pylori</i> culture.....	10
4)	MTT assay.....	11
5)	RT-PCR.....	13
6)	Western blotting.....	14
7)	Luciferase assay.....	15
8)	통계분석.....	16

2.	연구결과.....	17
1)	RGM-1 세포에 대한 <i>Helicobacter pylori</i> 의 세포독성효과	17
2)	RGM-1 cell에서 15-PGDH의 발현에 대한 <i>Helicobacter pylori</i> 의 영향.....	19
3)	15-PGDH mRNA 발현에 대한 <i>Helicobacter pylori</i> 의 영향.....	21
4)	<i>Helicobacter pylori</i> 에 의한 15-PGDH 조절기전.....	23
5)	<i>Helicobacter pylori</i> 에 의한 Ets 발현.....	24
6)	<i>Helicobacter pylori</i> 에 의해 유도된 15-PGDH 발현 감소에 대한 항산화제 및 MAPK 저해제의 영향.....	27
7)	<i>Helicobacter pylori</i> 에 의해 감염된 RGM-1 cell에 curcumin 처리 시 15-PGDH 발현에 대한 영향.....	31
III.	결론 및 고찰.....	33

IV. 참고문헌

Abstract

List of Figures

- Figure 1. Role of *Helicobacter pylori* in stomach
- Figure 2. The biosynthesis and degradation of prostaglandins by COX-2 and 15-PGDH, respectively.
- Figure 3. The chemical structure of curcumin, a yellow coloring ingredient of turmeric.
- Figure 4. Effects of *Helicobacter pylori* on the viability of RGM-1 cells.
- Figure 5. Effects of *Helicobacter pylori* on expression of 15-PGDH in RGM-1 cells.
- Figure 6. Effects of *Helicobacter pylori* on mRNA level of 15-PGDH in RGM-1 cells.
- Figure 7. Effects of *Helicobacter pylori* on transcriptional activity of 15-PGDH in RGM-1.

- Figure 8. Effects of *Helicobacter pylori* on phosphorylation of Elk-1 in RGM-1 cells.
- Figure 9. Effects of *Helicobacter pylori* on phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in RGM-1 cells.
- Figure 10. Effects of MAPKs inhibitors on *Helicobacter pylori* - induced down regulation of 15-PGDH expression.
- Figure 11. The proposed molecular mechanisms on *Helicobacter pylori*-induced down regulation of 15-PGDH expression in RGM-1 cell.
- Figure 12. Effects of curcumin on the *Helicobacter pylori*-induced down regulation of 15-PGDH expression in RGM-1 cell.

I. 서론

*Helicobacter pylori*는 그램 음성이고, 나선형 모양이며, 미산소(microaerophilic) 박테리아로써 만성 위염, 소화성 궤양, 위암과 위의 림프종의 원인으로 알려져 있다. *H. pylori* 감염은 전 세계 인구의 약 40-80%이 차지하며, 십이지장궤양 환자의 90-100%에서 감염되어 있고, 감염된 사람들의 대부분은 위염을 동반하고 있는 것으로 알려져 있다[1, 2]. 또한 우리나라의 경우에도 상부 위장관 증상이 없는 성인의 56%가 감염이 된 것으로 나타나고 있다[3]. *H. pylori*는 인체 위 점막에서 친화성을 가지고 있으며 위 상피 세포에 부착되어 있거나 위 점액 내에 존재한다[4]. *H. pylori*에 의한 위 점막의 염증은 다양한 염증 세포의 침윤 및 활성화와 위 상피세포의 손상 및 변성을 동반 한다(Fig. 1). 또한 인체 내에서의 *H. pylori* 증식은 다양한 점막 면역반응을 일으키나 항체 생산이 균을 제거하지 못해 이러한 비효과적인 면역반응이 세균의 지속적인 증식과 더불어 만성적 염증으로 나타나는 것으로 보고되고 있다[5]. *H. pylori* 감염으로 인한 만성 위염은 위의 선암에서 가장 위험한 요인으로 잘 알려져 있으며, 위 장관에서 발생하는 암의 주요 원인이기도 하다[6]. *H. pylori* 감염은 위의 장상피화생(intestinal metaplasia)에도 밀접히 연루되어 있음이 인체와 Mongolian gerbils을 이용한 연구에서 보고되었다[7, 8]. Kalia 등[9]은 *H. pylori*에 의한 만성 염증이 위암 발달에 관여함을 제시하였다. Mongolian gerbils에 *H. pylori*균만을 경구 투여한 결과 26주 후 장상피화생이 관찰되었고 62주 후 37%에서 위암이 관찰되었다. 이에 *H. pylori*에 의한 감염으로 인해 염증뿐만 아니라 암도 유발되었음을 확인했다[10]. 위축증(gastric atrophy), 장상피화생(intestinal

metaplasia), 형성 장애(dysplasia), 선암(adenocarcinoma)과 같은 질병들이 Mongolian gerbil의 조직병리학 실험 결과에서도 인간과 유사한 것으로 입증되었다[11].

종양의 생성과 관련된 효소인 Cyclooxygenase (COX-2)는 위종양에서 아라키돈산이 prostanid로 전환하는데 있어 중요한 효소로 작용하며, 염증과 종양형성에서 있어서도 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[12, 13]. 최근 연구 보고에 의하면 *H. pylori*로 인한 위염과 위암 조직에서 COX-2 단백질의 발현이 정상 위 점막 조직과 비교했을 때 증가하는 것으로 나타났다[14]. COX-2 단백질의 발현은 위궤양과 *H. pylori* 감염으로 인한 위염에서 발견되었으며, COX-2에 의한 역할이 위 점막의 손상과 염증 반응에서 강하게 시사하고 있다[15-17]. C57BL/6 mice 모델에서 *H. pylori*를 24주 동안 infection 시킨 후 COX-2의 발현 변화를 살펴본 결과 *H. pylori*를 처리하지 않는 군에 비하여 COX-2의 발현이 증가하는 것으로 나타났다[18]. 또한 in vitro 실험연구에 의하면 인체 위 상피세포인 AGS 세포주에 *H. pylori*를 감염 시킨 결과 염증 유발 단백질인 COX-2, NF- κ B, iNOS의 활성화와 발현이 높았음을 입증하였다[19, 20]. 따라서 *H. pylori*의 감염으로 인한 COX-2의 발현증가는 위염 발달과 관련이 높음을 시사한다.

또한 프로스타글란딘은 아라키돈산으로부터 COX에 의해 생산되며 항상성(homeostasis), 생식(reproduction), 그리고 면역반응(immune response)을 포함한 많은 생물학적 기능에 의해 조절 되는 것으로 알려져 있다[21]. 상피종양세포로부터 생성된 중요한 prostanoid는 prostaglandin E₂ (PGE₂)로써, PGE₂는 암세포의 세포 증식을 유도하며 apoptosis에 저항성을 갖게 하고, 혈관신생 및 침윤과정을 촉진함으로써 암화과정을 촉진한다[22]. 특히, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)는 프로스타글란딘 분해 과정의 첫 번째 단계를 촉매 하는 효소로서, PGE₂를 15-keto-PGE₂로의 전환을 촉진한다[23].(Fig.2). 다양한 암종에서 15-PGDH의 mRNA와 단

백질 발현 수준이 감소되는 것을 발견하였다. 대장암에서는 15-PGDH knock out mice의 조직에서 PGE₂의 단백질 레벨이 증가하였으며[24], 인체 대장암조직에서는 15-PGDH 단백질 발현과 활성화 및 mRNA 발현이 감소되었다[25, 26]. 유방암에서도 종양억제 유전자로서의 15-PGDH의 역할이 제시되었다. 인체 유방암조직에서 15-PGDH의 mRNA 발현이 감소하는 것으로 나타났으며[27], 위암 표본에서 면역 조직 화학(immuno-histochemistry)에 의한 결과로는 77%-80%가 15-PGDH 단백질의 발현이 감소되었다[28-30]. 최근 연구에서는 대장암, 유방암, 폐암에서 15-PGDH의 종양 억제 활성이 제안되었는데, 이런 질병에서 15-PGDH는 발현 수준이 감소되거나 발현되지 않았다[31-35]. 이러한 연구들을 토대로 하여 염증 및 발암과정에 있어서의 15-PGDH의 발현 정도가 중요한 분자적 지표가 될 수 있음을 시사한다.

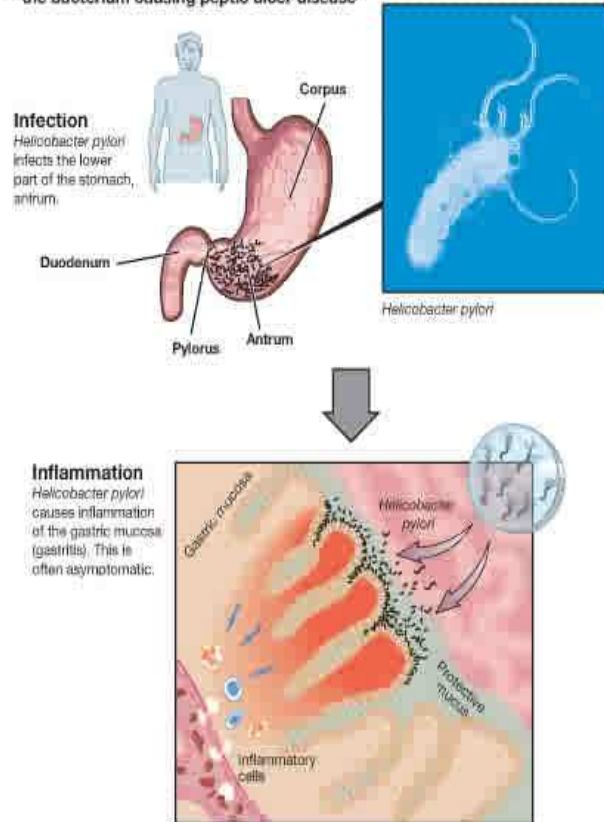
카레의 주원료인 강황 (薑黃; *Curcuma longa* L.)은 생강과 (Zingiberaceae)에 속하며 인도가 원산지이고 열대아시아지역에서 재배되는 다년생식물이다[36]. 약리적인 효과는 항염증, 간장보호, 소화기 및 심혈관계에 대한 보호 작용, 항혈소판응집, 혈중지질강하, 항산화, 항돌연변이, 항종양, 항균작용 등이 있으며 이러한 약리적인 효과의 주성분은 curcumin으로 알려져 있다[37, 38, Fig.3]. 전통적으로 curcumin은 항종양제로서 약물치료에 효과적으로 사용되어 왔으며[39], 다양한 암 세포에서 세포확산을 저해하고 암 예방을 위해 사용되었다[40]. curcumin의 항염증(anti-inflammatory) 효과를 in vivo실험 연구 결과 입증했다. 대장암이 유발된 마우스에 curcumin을 주입시킨 결과 대장 점막 종양에서 phospholipase A2가 50% 감소되었고, PGE₂의 레벨이 약 40% 가까이 감소되었다[41]. 대장암 환자들의 경우에는 curcumin을 조제약품(36-180mg/day)으로 하여 oral섭취시킨 결과 COX-2 발현과 PGE₂의 분비가 농도 의존적으로 감소됨을 증명하였다[42].

Helicobacter pylori 감염에 의한 COX-2와 PGE₂ 의 분자적 기전과 그 역할을 확인한 연구들은 있지만, *H. pylori* 감염과 15-PGDH의 발현에 관하여 수행된 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 Rat의 위 점막세포인 RGM-1 세포에서 *H. pylori* 를 infection 시킨 후 15-PGDH의 발현과 그 분자적 기전을 알아보하고자 한다. 또한 강황 성분인 curcumin의 항염증 효과를 토대로 *H. pylori* 에 의해 유도된 위염 보호효과를 확인하고자 한다.

Helicobacter pylori

– the bacterium causing peptic ulcer disease



– The Nobel Committee for Physiology or Medicine

Fig. 1. Role of *Helicobacter pylori* in stomach.

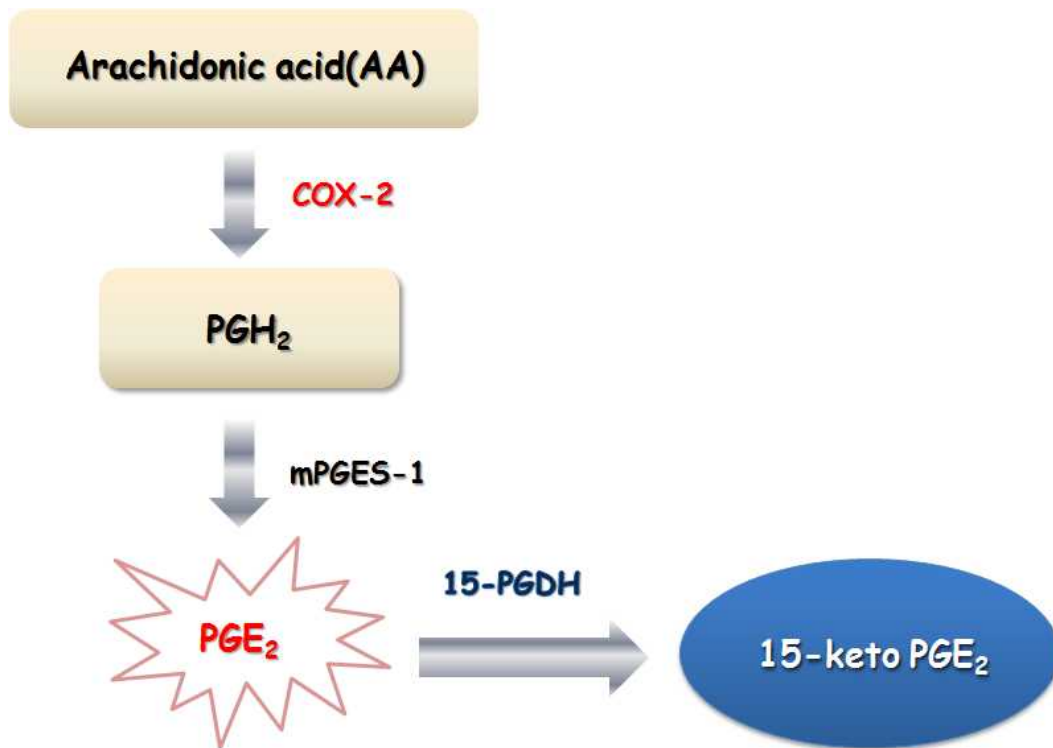


Fig. 2. The biosynthesis and degradation of prostaglandins by COX-2 and 15-PGDH, respectively.

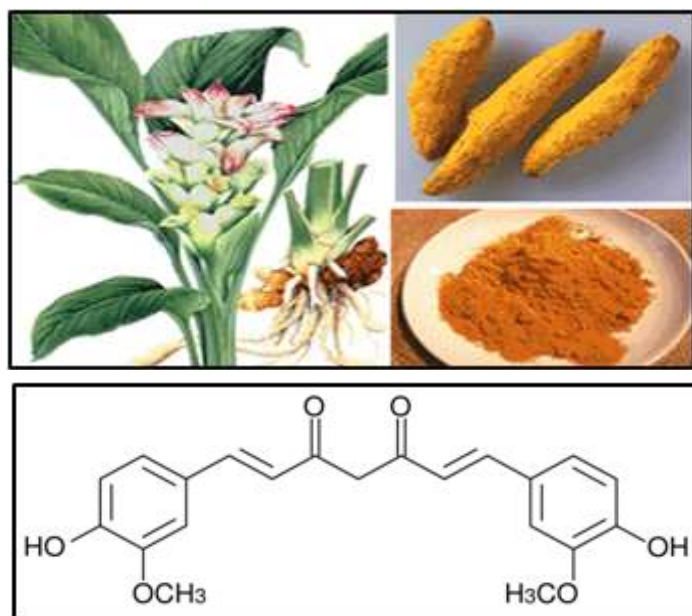


Fig. 3. The chemical structure of curcumin, a yellow coloring ingredient of turmeric.

II. 본론

1. 연구재료 및 연구방법

1) 연구재료

본 연구에 사용한 Rat 위 점막 정상 세포주 RGM-1은 가천의대에서 분양받아 사용하였다. *Helicobacter pylori*는 한국의 이길여 암당뇨연구기관의 함기백 교수님으로부터 제공 받아 사용하였다. Curcumin은 Cayman Chemical co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구매하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구매하였다. 15-PGDH 는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구매하였다. Western blotting을 위한 Secondary antibody는 Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA)에서 구매하였고, ECL chemiluminescent kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)에서 구매하였다. Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 시약은 Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)의 제품을 사용하였다. Polyvinylidene difluoride membranes은 Gelman Laboratory (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구매하였다.

2) 세포배양

Rat 위 점막 정상 세포주 RGM-1을 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 첨가된 DMEM 배양액을 사용하여, 95%의 습도가 유지되는 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양 하였다. 세포는 2-3일에 한번 씩 계대배양 하였다.

세포의 stock은 plate의 배지를 제거한 후 PBS로 두 번 세척 후, 0.5% Trypsin을 3ml 분주하고 CO₂ incubator 안에서 약 3분간 incubation 시켰다. 3분후에 DMEM배지 3ml을 분주하여 Trypsin의 작용을 멈추고 50ml conical tube에 세포를 모아 1,200rpm에서 3분간 원심분리 해주었다. 배지를 제거한 후 80% FBS와 10%의 DMSO, 10% 배지를 첨가하여 Cryo tube에 1ml씩 분주하여 -70°C에서 4시간 동안 보관하였다가 -180°C의 액체 질소 탱크에 넣어 사용 전 까지 보관 하였다.

3) Bacteria strains and *Helicobacter pylori* culture

*H. pylori*는 37°C의 미호기성 상태에서 sheep blood와 항생제(dent supplement) (Oxoid, Basingstocke, UK)가 포함된 5% TSA(v/v)에서 배양되었다. 미호기성의 상태는 5% O₂ , 10% CO₂ , 85% N₂ 의 조건인 CampyPack을 추가하고 37°C로 일반적인 incubation 상태이다. 2상 배양(biphasic culture)을 하는 동안 *H. pylori*는 TSA에 soy broth와 10% FBS를 보충하여 5일 동안 미호기성 상태에서 접종되었다. *H. pylori*의 특징적인 균 형태학은 현미경 관찰법 단계에서 확인되었으며, *H. pylori*를 이용하기 전까지는 -70°C에 보관되었다.

4) MTT assay

*H. pylori*에 의한 RGM-1 세포의 생존율을 측정하기 위해서 MTT assay를 측정하였다. MTT assay는 세포의 증식을 측정하기 위한 방법으로 표준 비색분석법(standard colorimetric assay)이라고도 한다. 일반적으로 hemocytometer를 이용하여 생존 세포수를 세거나 광학밀도 (optical density)를 측정하는 방법이 사용되지만 많은 양을 측정 시에는 시간과 노력이 필요 이상으로 요구되고 부정확한 결과를 가져올 수 있다. 이를 대체하기 위해 개발된 MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용 (dehydrogenases)에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl- tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 보라색을 띄는 비수용성의 MTT- formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로써 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증식을 측정할 수 있다. 보라색이 진할수록 세포가 많이 살아 있는 것이다. 보라색 crystal은 물에 녹지 않기 때문에 DMSO를 넣어야 한다. 따라서 formazan을 녹이기 위해 media를 제거하고 넣게 된다. 보라색 crystal(formazan)은 DMSO에 용해되고 흡광도 (Optical Density)는 500-600nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직선적인 상관관계를 나타내게 된다. 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 그러나 측정할 well의 세포의 농도가 너무 낮거나 높은 범위에 있으면 살아있는 세포의 농도와 흡광도 사이의 직선적인 비례관계가 성립되지 않게 되므로 최적의 세포농도를 결정하는 과정을 거쳐야 한다.

세포주를 48 well plate에 300 μ l씩 첨가하여 24 시간동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양한 후, *H. pylori*를 1×10⁸CFUs (Colony Forming Units)의 농도로 제조하여 24시간과 48시간동안 RGM-1 세포에 처리하였다. 배양

한 후 배지를 제거하고 MTT용액을 300 μ l 씩 첨가하여 두 시간 동안 배양하였다. Formazan을 확인한 후 배지를 완전히 제거하고 well 바닥에 형성된 Formazan을 녹이기 위해 300 μ l의 DMSO를 첨가하고 10분간 녹여준 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 *H. pylori*를 처리하지 않은 대조군 과 비교하여 세포성장 억제율을 나타내었다.

5) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

*H. pylori*가 단백질 발현뿐만 아니라, mRNA 발현에도 영향을 주는지 알아보기 위해 RNA를 분리하였다. 1~3 µg의 RNA에 oligo DT 1 µL를 포함하여 총량이 11 µL가 되도록 DEPC (diethyl pyrocarbonate) water를 첨가한 후 72°C에서 10분간 incubation하고 여기에 reaction buffer (5×RT buffer 4 µL, 2.5µM dNTP 4 µL) 8 µL를 첨가하여 42°C에서 2분간 incubation하고, RT enzyme 1 µL를 첨가하여 42°C에서 50분, 72°C에서 15분간 incubation하였다. Autoclave water, band master, 10X buffer, dNTP, primer A,B, template DNA, Taq polymerase 를 혼합하여 94°C에서 2분간 1주기를 시행한 후 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 35주기를 반복 수행하여 DNA를 증폭하였다. Primers는 reverse transcription을 위해서 사용되었다: 15-PGDH 5'-GGCATAATCGGATTCACACG-3' (forward) 5'-CGAGGCCGTGATCTTCATAA-3'(reverse) 그리고 GAPDH, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward) 5'-ACGGATACATTGGGGGTAGG-3' (reverse) . Primers는 transcription을 위해서 사용되었다. 증폭된 DNA를 회수하여 1% agarose gel로 전기영동을 실시하여 결과를 확인하였다.

6) Western blot analysis

*H. pylori*가 처리된 RGM-1 세포는 60mm dish에서 0, 3, 6, 12, 24시간 동안 배양한 후 cold phosphate-buffered saline (PBS)와 함께 harvest되었고, lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP-40, protease inhibitors] 와 함께 1시간 동안 ice안에서 방치되었다. 후에 4°C에서 13,000 g로 15분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 그리고 BCA protein assay kit (Pierce; Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 샘플은 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 실시하였고, 분리된 단백질을 전기적 방법으로 2시간 동안 200mA에서 polyvinylidene difluoride membrane (Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA) 으로 transfer한 후, membrane을 blocking buffer (1XPBS, 0.1% Tween-20, 5% skim milk)에 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBST buffer로 10분간 3번 씩 washing 해주었다. PBST에 3% skim milk 와 1:1000으로 일차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight 시키고 다시 한번 15분간 3번씩 PBST로 washing 해준 후 anti-rabbit 2차 항체를 사용해 1시간 동안 반응 시킨 뒤 ECL 시스템을 이용하여 발색시키고 필름에 감광시켰다.

7) Luciferase assay

위 정상세포 RGM-1 세포는 12well plate에 배양하였다. 배양세포의 밀도가 50%에 도달하였을 때 새로운 배양액으로 교체하고 37°C의 CO₂ 배양기에 두었다가 1시간 뒤에 transfection 과정을 시행하였다. Transfection에 사용할 DNA는 1µg 농도로 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen USA) 100 µl에 혼합하였다. 이 후 lipofectin (Invitrogen, USA) 10 µl를 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA) 100 µl에 혼합하여 실온에 20분간 두었다. 이후 DNA용액과 lipofectin용액을 혼합하여 실온에서 15분간 두었다. 동시에 배양세포를 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA)로 세척하였다. 마지막으로 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA) 800 µl를 DNA lipofectin 혼합액 200 µl에 첨가하여 세포에 가하였다. 이후 37°C의 CO₂ 배양기에 24시간 동안 두었다가 serum 함유 DMEM 배양액 1mL로 교환하여 24시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 이후 배양된 세포를 PBS 용액으로 2회 세척하고 세포용해액 100 µl씩을 가하여 -70°C에서 15초간 두었다. 이 후 cell scraper로 세포를 긁어모아서 얼음위의 micro tube에 모았다 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액을 새로운 micro tube에 옮기고 12 well의 luminometer microwell plate에 한 well당 20 µl를 가하였다. 이후 luciferase assay 시약 A와 시약 B (BD Pharmingen, USA)를 증류수 10 mL씩에 녹여서 Berthold microplate luminometer (Berthold Detection Systems, Germany)를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

8) 통계분석

모든 자료는 평균±표준오차로 나타내었고 T-Test로 분석을 실시하여 유의성을 검증하였다.

2. 연구결과

1) RGM-1 세포에 대한 *Helicobacter pylori*의 세포독성영향

Rat 위 점막 정상 세포인 RGM-1 세포주에 *H. pylori*를 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units)의 농도로 24시간과 48시간으로 infection 한 후 MTT assay를 이용하여 cell viability를 측정하였다. 결과, *H. pylori*를 infection 한 후 시간에 따른 RGM-1 세포의 viability가 큰 차이를 나타내지 않았다. 24시간 처리 시에는 6.4%, 48시간 처리 시에는 26.6%의 세포증식 억제가 나타났다(Fig. 4).

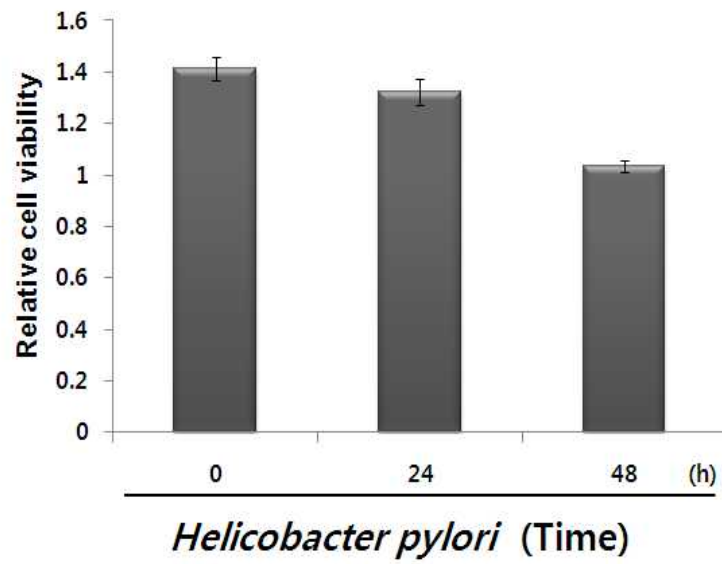


Fig. 4. Effects of *Helicobacter pylori* on the viability of RGM-1 cells. RGM-1 cells were treated with *H. pylori* for indicated time period.

2) RGM-1 cell에서 15-PGDH의 발현에 대한 *Helicobacter pylori*의 영향.

RGM-1 세포에 *Helicobacter pylori*를 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) 농도로 각각 0, 3, 6, 12, 24시간으로 처리한 후 15-PGDH 발현 변화를 Western blot analysis를 통해 확인하였다. 그 결과 15-PGDH 발현이 시간에 따라 감소하는 것으로 나타났다. (Fig. 5)

이 결과 RGM-1 세포에 *H. pylori*를 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) 농도로 24시간 처리 시 15-PGDH 발현이 최대로 감소됨을 알 수 있었다.

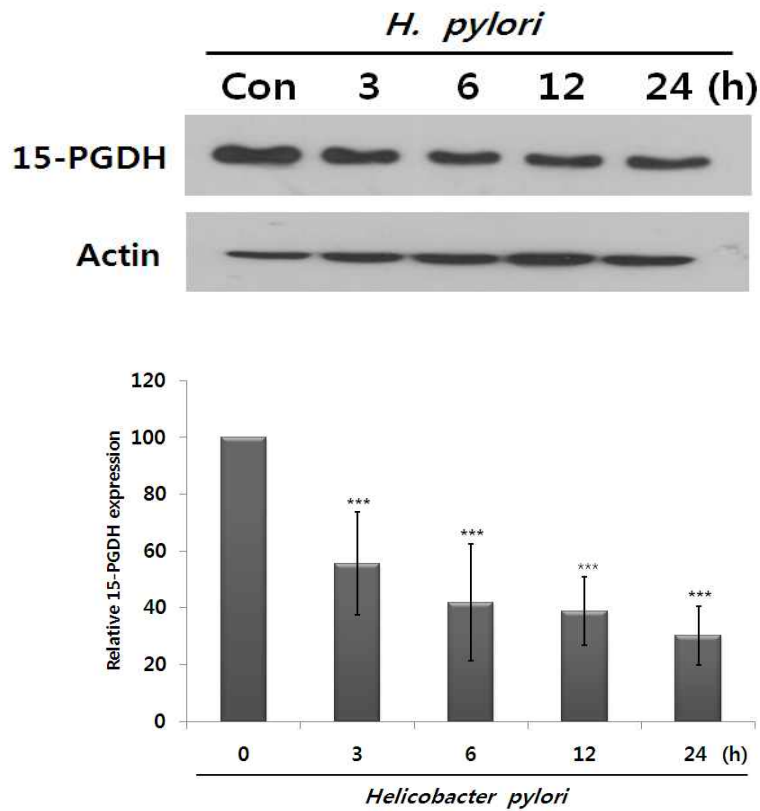


Fig. 5. Effects of *Helicobacter pylori* on expression of 15-PGDH in RGM-1 cells. RGM-1 cells were treated with 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) of *H. pylori* for 0h, 3h, 6h, 12h, 24h. Actin was used as an equal loading control for normalization. *** $p < 0.001$.

3) 15-PGDH mRNA 발현에 대한 *Helicobacter pylori*의 영향

MTT 분석방법과 Western blotting을 통해 15-PGDH 발현 감소를 보인 *H. pylori*를 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) 농도로 0h, 3h, 6h, 12h, 24h 동안 RGM-1 세포에 처리하여 RNA 분리 하여 RT-PCR을 수행하였다. 결과 *H. pylori* 처리 시간이 증가됨에 따라 15-PGDH mRNA 발현이 점점 감소되었다.(Fig. 6).

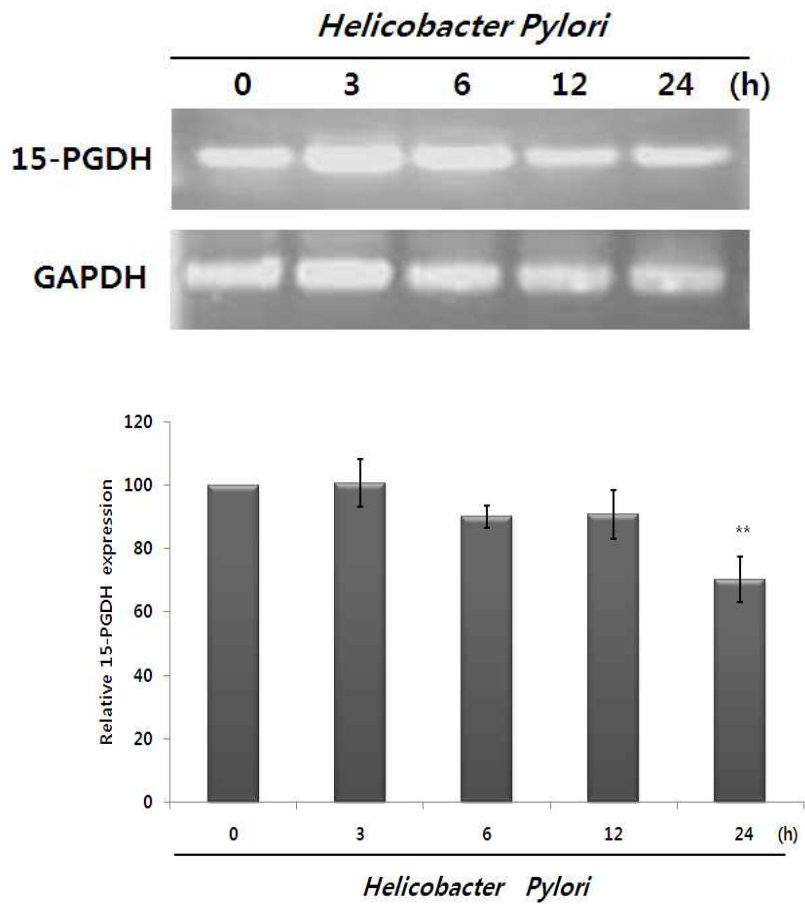


Fig. 6. Effects of *Helicobacter pylori* on mRNA level of 15-PGDH in RGM-1 cells. The expression of 15-PGDH mRNA level was determined by quantitative RT-PCR. The level of GAPDH mRNA was used as an internal control. **p<0.05.

4) 15-PGDH 전사인자 활성화에 대한 *Helicobacter pylori*에 의한 조절 기전

종양 억제 단백질으로써 15-PGDH의 역할이 점차 밝혀짐에 따라, 이 단백질의 발현을 조절하는 기전에 대한 연구들이 이어지고 있다. 그 기초적 연구의 일환으로 15-PGDH의 유전자 구조와 염기서열에 대해 보고되었다. 15-PGDH의 5'-flanking region 2.4 kb안에 activating protein-1 (AP-1), cAMP-responsive element binding protein (CREB), C/EBP α, β 와, Ets family member가 결합할 수 있는 binding site (Fig. 7A)가 있고, 이들 전사인자가 binding site에 결합함으로써 15-PGDH의 발현이 조절된다.

본 연구에서는 *H. pylori*에 의해 15-PGDH 발현 감소에 어떠한 전사인자가 관여하는지 알아보기 위하여 24시간 (Fig. 7B)동안 *H. pylori*를 처리한 후 luciferase assay를 실시하였다. *H. pylori*는 15-PGDH 전체 promoter 부위가 들어있는 플라스미드 (-2368)로 변형된 세포에서 32%의 luciferase 최대 활성 감소를 보였으며, 2개의 AP-1 binding site가 소멸된 -388 플라스미드에서 13.8%의 활성 감소를 보였다. 이어 2개의 CREB 와 2개의 AP-1 전사인자가 결합하는 binding site가 없는 -1024와 Ets binding site가 제거된 -203 플라스미드에서는 대조군과 비슷한 활성 정도를 나타냈다. 이 결과로 보아, *H. pylori* 감염에 의한 15-PGDH 발현 감소에 Ets와 AP-1 전사인자가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 진다.

5) Elk-1 의 인산화에 대한 *Helicobacter pylori*의 영향

Ets 계열의 대표적인 전사인자인 Elk-1에 대한 *H. pylori*의 영향을 알아보기 위해 RGM-1 세포에 0, 3, 6, 12, 24시간동안 *H. pylori*를 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) 농도로 처리하였다. 결과 *H. pylori*에 의해 Ets의 중요한 transcription factor인 Elk-1의 인산화가 저해됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

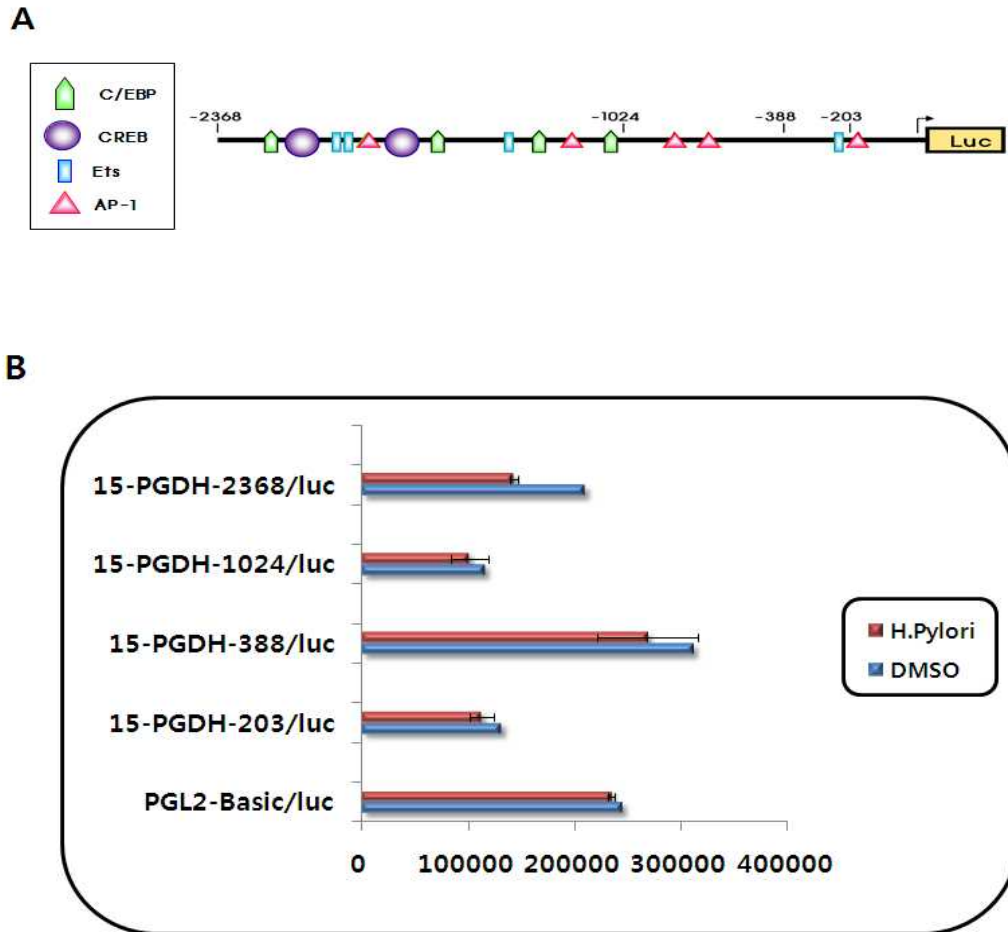


Fig. 7. *Helicobacter pylori*-induced activation of the 15-PGDH promoter. (A) A schematic representation of the 15-PGDH promoter. (B) RGM-1 cells were co-transfected with 1 μ g of 15-PGDH promoter deletion constructs (-2368, -1024, -388 and -203) ligated to luciferase gene for 24h and cells were lysed with reporter lysis buffer for the measurement of luciferase activity. Fold induction in the luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity.

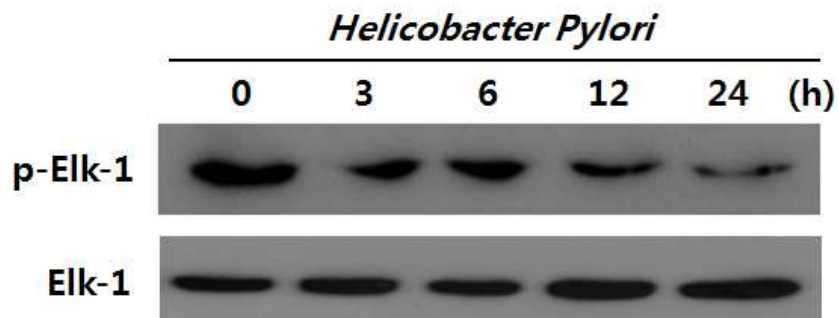


Fig. 8. Effects of *Helicobacter pylori* on phosphorylation of Elk-1 in RGM-1 cells.

6) *Helicobacter pylori*에 의해 유도된 15-PGDH 발현 감소에 대한 MAPK 저해제의 영향

*H. pylori*에 의한 15-PGDH의 발현감소변화에 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 활성화가 관여하는지 살펴보기 위해 *H. pylori*에 의한 ERK, JNK, p38 인산화 정도를 살펴보았다. 결과 *H. pylori*에 의한 ERK와 JNK의 인산화됨을 확인하였다(Fig. 9).

*H. pylori*에 의해 증가된 ERK와 JNK의 인산화가 15-PGDH 발현 감소에 관여하는지 알아보기 위해 MAPKs 억제제를 처리한 후 15-PGDH의 발현을 Western blotting을 통해 측정하였다. ERK는 억제제의 단독 처리에 의해 15-PGDH 발현이 증가했으며, 억제제와 *H. pylori*를 co-treatment 한 결과 또한 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다. JNK는 억제제 단독 처리 시 15-PGDH 발현이 증가되었지만, *H. pylori*와 억제제를 co-treatment 한 결과에서는 발현 변화를 나타내지 않았다(Fig. 10). 따라서 *H. pylori* 감염에 의한 15-PGDH 발현에 있어서 ERK가 관여하는 것으로 생각되어 진다.

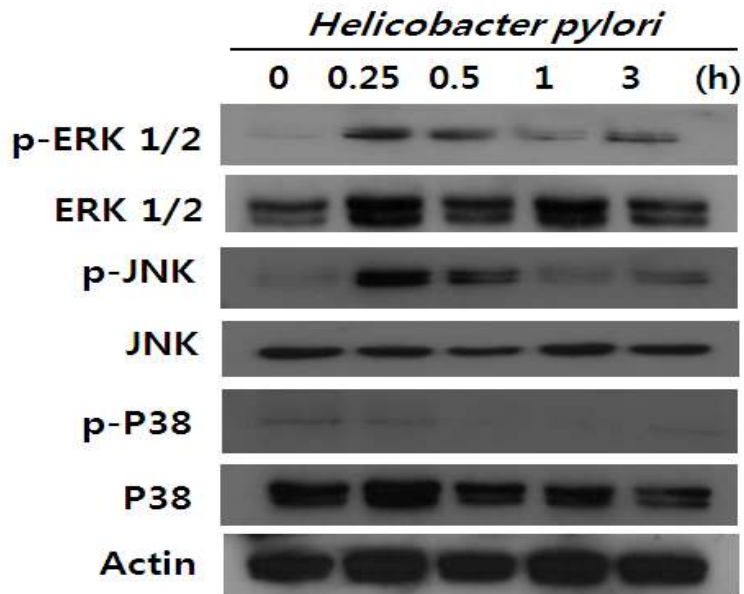


Fig. 9. Effects of *Helicobacter pylori* on MAPKs in RGM-1 cells. The cells were treated with *H. pylori* 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) for indicated time and then proteins were blotted with ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38 and actin antibody.

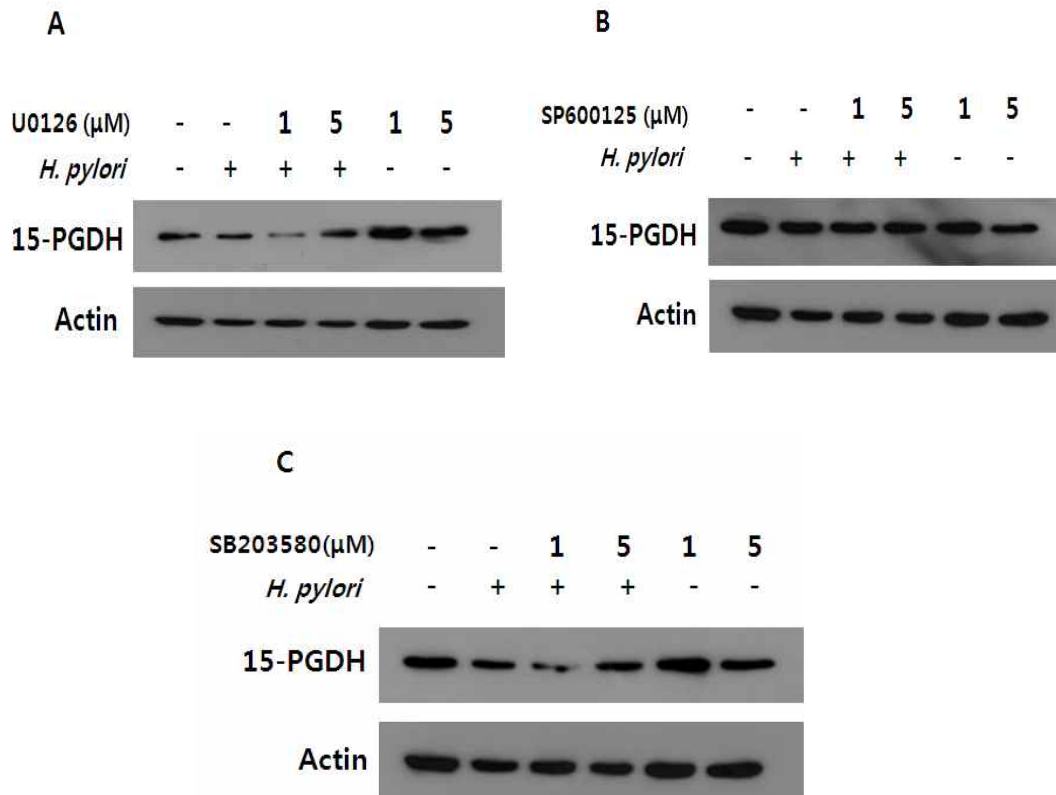


Fig. 10. Effects of MAPKs inhibitors on *Helicobacter pylori* - induced down regulation of 15-PGDH expression. RGM-1 cells were pretreated with MAPKs inhibitors such as U0126 (A) SP600125 (B), or SB203580 (C) for 2 hour, and co-treated *H. pylori* 1×10^8 CFUs (Colony Forming Units) for 24h. Total cell lysates were subjected to Western blotting with anti-PGDH. The same blot was reprobed with anti- β -actin as an internal control.

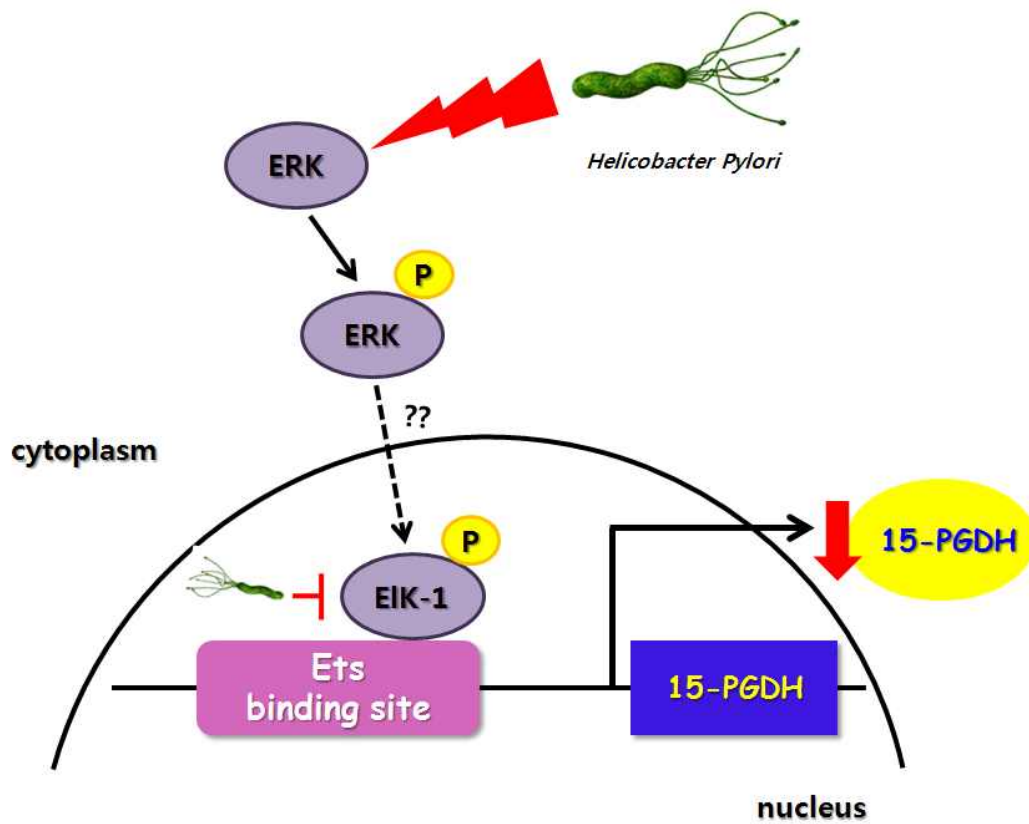


Fig. 11. The proposed molecular mechanisms on *Helicobacter pylori*-induced down regulation of 15-PGDH expression in RGM-1 cell.

7) *Helicobacter pylori*에 의해 감소된 15-PGDH 발현에 대한 curcumin의 영향

*H. pylori*에 감염된 RGM-1 세포에 curcumin 처리 시 15-PGDH의 발현변화를 확인하기 위하여 Western blot analysis를 수행하였다. 그 결과 *H. pylori*에 감염된 RGM-1 세포에 curcumin에 처리 시 농도 의존적으로 15-PGDH 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 12). 따라서 생리활성 물질인 curcumin이 *H. pylori*에 의해 감소된 15-PGDH 발현을 회복함으로써 항염증, 항암효능을 갖을 것으로 사료된다.

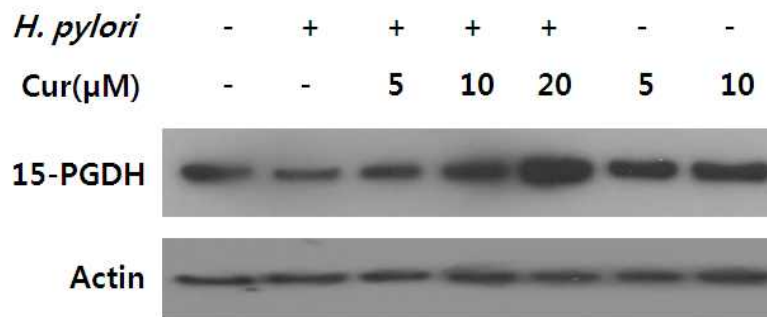


Fig. 12. Effects of curcumin on the *Helicobacter pylori*-induced down regulation of 15-PGDH expression in RGM-1 cell.

Ⅲ. 결론 및 고찰

본 연구에서는 Rat 위 정상세포에 *Helicobacter pylori*를 감염시킨 후 15-PGDH의 발현과 이에 대한 분자적 기전을 연구 하였다. 또한 *H. pylori*로 유도된 위 정상세포에서 생리활성물질로 알려진 curcumin에 대한 보호 효과를 연구 하였다. 종양억제 유전자로 알려진 15-PGDH는 다양한 암 조직에서 발현이 감소되었으며, 이 효소가 종양억제 효능을 가질 수 있음을 여러 연구결과에서 보고하였다.

본 연구에서는 western blot 실험으로 *H. pylori*로 감염된 RGM-1 세포의 15-PGDH 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 *H. pylori*에 의해 시간 의존적으로 발현이 감소하였으며, mRNA 레벨도 감소하였다. 선행 연구 보고에 의하면 RGM-1 세포에 *H. pylori*를 infection 시킨 후 시간 의존적으로 COX-2 발현이 증가 하였으며, 24시간대에 최대로 발현이 증가됨을 나타냈다. 또한 PGE₂ 합성도 시간에 따라 증가됨을 확인 하였다[43]. 이를 토대로 COX-2와 PGE₂ 그리고 15-PGDH의 분자적 상관관계를 확인 할 수 있었다.

15-PGDH의 상위 signal을 확인하기 위하여 *H. pylori*로 인한 MAPK (mitogen activated protein kinase)의 인산화 발현정도를 확인 하였다. MAPK의 활성화는 *H. pylori* 감염으로 인한 위 상피세포에서 보고된바 있다. MAPK의 중요한 subfamily들은 동물세포에서 확인되었으며, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH₂-terminal protein kinase (JNK) 와 p38로 규명되었다[44, 45]. 또한 ERK1/2, JNK, p38과 같은 MAPK는 염증반응에서 발현이 되며, 이는 염증반응에 대표적인 pathway이다[46]. 이에 본 연구에서는 *H. pylori*로 인한 위 정상세포에서 MAPK의 활성을 확인하였으며, phospho-ERK1/2와 phospho-JNK 활성화로 MAPK가 15-PGDH의 감소에 영향을 줄 수 있음을 확인 하였다. 또한 MAPK inhibitor를 *H.*

*pylori*와 co-treatment를 한 결과 ERK의 inhibitor 단독 처리 시 15-PGDH의 발현을 증가시켰다. 결론적으로 *H. pylori*로 유도된 위 정상세포의 15-PGDH 발현 감소는 MAPK의 ERK의 인산화와 관련이 있음을 나타내었다.

15-PGDH의 promotor에는 activating protein-1 (AP-1), Ets (E-twenty six), cAMP-responsive element binding protein (CREB)와 같은 전사인자들이 결합할 수 있는 부위가 존재하며, C/EBP α , β 와 AP-1, Ets family member에 의해 15-PGDH의 발현이 조절됨이 보고되었다[47]. 분자적 생물학 작용의 연구조사에서 Ets는 transcription factors의 가장 큰 families 중 하나이며, 가장 대표적이다[48]. Ets-domain transcription factors는 조절 유전자를 통한 유전자들의 특정한 신경 조직 활성화에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[49]. 이 중 Elk-1(Ets-like gene-1)은 Ets에 binding할 수 있는 중요한 transcription factors 중 하나이며, 특정 유전자의 전사활성화를 증가시킨다[50]. 선행연구에 의하면 유방암과 위암에서 15-PGDH 발현 저하는 유전자 promotor 부위가 주요한 원인으로 제시되고 있다[51, 52]. 따라서 본 연구에서 *H. pylori* 감염으로 인한 15-PGDH promotor의 활성 정도를 확인 하였으며, 그 결과 Ets 활성이 감소됨을 나타냈다. 또한 인산화 된 Elk-1의 발현도 감소됨을 나타냈다.

H. pylori 감염과 관련해서, *H. pylori*에 감염된 인체 위 상피세포인 AGS 세포에서는 CagA의 transcription 유전자인 Ets의 활성화에 영향을 주는 것으로 나타났다[53]. 이로 인해 본 연구의 15-PGDH promotor인 Ets의 활성 감소가 15-PGDH의 발현 감소 기전에 영향을 줄 것으로 예상된다.

Curcumin은 발암의 개시와 촉진단계를 예방하는 것으로 알려져 있으며 [54], 항염증에 관여한다는 연구 결과들이 다수 보고 되었다[55, 56]. 위 선암의 상피 세포인 MKN-45 세포주에 *H. pylori*를 감염 시킨 후 curcumin을 처리 한 연구에서 AID 효소 발현이 농도 의존적으로 감소 하였다. AID

효소는 위암 발달에 중요한 기전으로 알려져 있다[57]. 따라서 curcumin에 의해 위암발달을 감소시킨다고 보고되었으며, 이에 본 연구에서도 *H. pylori*를 감염시킨 Rat의 위 정상세포에 curcumin을 처리 했다. 그 결과 curcumin의 농도 의존적으로 15-PGDH 발현이 증가됨을 확인하였고, 이에 curcumin이 *H. pylori*의 감염에 있어서 항염증 효능이 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구 결과 *Helicobacter pylori*로 유도된 Rat 위 정상 세포인 RGM-1 세포에 Ets signaling pathway와 MAPK (ERK1/2) pathway를 통해 15-PGDH의 발현을 감소시킨 것으로 사료된다. 이는 *H. pylori*에 의한 15-PGDH의 새로운 기전으로 제시 될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 curcumin이 *H. pylori*의 처리로 감소된 15-PGDH 발현을 회복시킨 결과를 토대로 curcumin이 *H. pylori*에 대한 염증 예방에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 더 나아가 *H. pylori*에 대한 curcumin의 보호효과로 15-PGDH 발현을 토대로 분자적 기전과 관련된 지속적인 연구가 진행 되어야 할 것이다.

IV. 참고문헌

1. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:1 - -13.
2. SuerbaumS, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175 - .86.
3. Yim JY, Kim N, Choi SH, Kim YS, Cho KR, Kim SS, Seo GS, Kim HU, Baik GH, Sin CS, Cho SH, Oh BH. *Seroprevalence of Helicobacter pylori in South Korea. Helicobacter* 12:333-340, 2007
4. Lee YC. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Gastroenterol* 2005;46: 159-65
5. Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2005; 10(Suppl 1):14-20
6. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek JW, Pawlik WW. From nervements and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last centry. *J Physiol Pharmacol* 1005;56:507-30
7. Elfvin A, Bolin I, Von Bothmer C, Stolte M, Watanabe H, Fandriks L, Vieth M. *Helicobacter pylori* induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. *scand J Gastroenterol* 2005;40:1313-20

8. Kodama M, Murakami K, Sato R, Okimoto T, Nishizono A, Fujioka T, *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigations of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005;11:7063-71
9. Kalia N, Bardhan KD, Atherton JC, Brown Nj. Toxigenic *Helicobacter pylori* induces changes in the gastric mucosal microcirculation in rats. *Gut* 2002;51:641-647
10. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology*. 1998 Sep;115(3):642-8.
11. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115:642-648, 1998
12. Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K et al. Localization of cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissue in human. *Gut* 2000;46:782 - 9.
13. Sidong F, Kalathur S. Ramanujam et al. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 1999;116:1319 - 29.
14. Conor JM, Leslie JC, Joel G et al. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1218 - 23.
15. Marshal BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311 - 5.

16. Oshia M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in *Apc* Δ^{716} knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2(COX-2). *Cell* 1996;87:803-809.
17. Gupta RA, DuBois RN, Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001;1:11-21.
18. Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. Involvement of cyclooxygenase-2 in hyperplastic gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Jun;15(6):875-86.
19. Kim H, Lim JW, Kim KH. *Helicobacter pylori*-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor-kappaB. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 706 - .16.
20. Shih YT, Wu DC, Liu CM, Yang YC, Chen IJ, Lo YC. San-Huang- Xie-Xin-Tang inhibits *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 537 - .44.
21. Helliwell RJ, Adams LF, Mitchell MD. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004 Feb;70(2):101-13.
22. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*, 2007. 282(16): p. 11613-7.
23. Ensor, C.M. and H.H. Tai, 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995. 12(2-3): p. 313-9.

24. Yan M, Rerko RM, Platzar P, Dawson D, Willis J, Tong M, Lawrence E, Lutterbaugh J, Lu S, Willson JK, Luo G, Hensold J, Tai HH, Wilson K, Markowitz SD. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17468-17473, 2004
25. Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Shi Q, Daikoku T, Dey SK, DuBois RN. Repression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase involves histone deacetylase 2 and snail in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9331-7.
26. Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai HH, Musiek ES, Milne GL, Katkuri S, DuBois RN. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem.* 2005 Feb 4;280(5):3217-23. Epub 2004 Nov 12.
27. Wolf I, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, Tai HH, Karlan BY, Koeffler HP. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res.* 2006 Aug 1;66(15):7818-23.
28. Liu, Z., et al., Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2008. 29(6): p. 1219-27.
29. Jang, T.J., Y.S. Ji and K.H. Jung, Decreased expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in gastric carcinomas. *Yonsei Med J*, 2008. 49(6): p. 917-22.
30. Thiel, A., et al., 15-hydroxyprostaglandin is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(14): p. 4572-80.

31. Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17468-73.
32. Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai HH, Musiek ES, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* 2005; 280: 3217-23.
33. Ding Y, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai HH. NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 65-72.
34. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12098-102.
35. Wolf I, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7818-23.
36. Kwan-Su Kim. Quantitative Determination and Stability of Curcuminoid Pigments from Turmeric (*Curcuma longa* L.) Root 2005; 50: 211-215.
37. Sharma, R. A., A.J. Gescher, and W.P.Steward.2005. Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer* 41(13): 1955-1968.
38. Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Chapter 52. *Curcuma*

spp. Springer-Verlag. Berlin. p. 401-415.

39. Aggarwal, B.B., A. Kumar, and A.C. Bharti, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 2003. 23(1A): p. 363-98.
40. Kunnumakkara, A.B., P. Anand, and B.B. Aggarwal, Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*, 2008. 269(2): p. 199-225.
41. Rao CV, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res*. 1995;55:259-266
42. Plummer SM, Sharma RA, et, al. Curcuminoid inhibit cyclooxygenase-mediated prostaglandin E2 production and COX-2 expression in human blood. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 2001;42(93):17-18
43. Forman D, Newell DG, Fullerton F *et al*. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991; 302: 1302 - -5.
44. Wang RT, Wang T, Chen K *et al*. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J. Gastroenterol*. 2002; 8: 1103 - -7.
45. Welin M, Holmgren NM, Nilsson P, Enroth H. Statistical model of the interactions between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer development. *Helicobacter* 2003; 8: 72 - -8.

46. Chen, Y.R., G. Zhou, and T.H. Tan, c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Mol Pharmacol*, 1999. 56(6): p. 1271-9.
47. Greenland KJ, Jantke I, Jenatschke S, Bracken KE, Vinson C & Gellersen B 2000. The human NAD⁺-dependent 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase gene promoter is controlled by Ets and activating protein-1 transcription factors and progesterone. *Endocrinology* 141: 581-597
48. Sharrocks, A.D., the ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(11): 827-37.
49. Verger, A. and M. Duterque-Coquillaud, When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays*, 2002. 24(4):362-70.
50. Boros, J., et al., Overlapping promoter targeting by Elk-1 and other divergent ETS-domain transcription factor family members. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(22):7368-80.
51. Wolf I, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7818-23.
52. Thiel A, Ganesan A, Mrena J, Junnila S, Nykanen A, Hemmes A, Tai HH, Monni O, Kokkola A, Haglund C, Petrova TV, Ristimaki A. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 15, 4572-4580, 2009
53. Rieder G, Tessier AJ, Qiao XT, Madison B, Gumucio DL, Merchant JL. Helicobacter-induced intestinal metaplasia in the stomach correlates with Elk-1 and serum response

factor induction of villin. J Biol Chem. 2005 Feb 11;280(6):4906-12. Epub 2004 Dec 2.

54. Surh, Y.J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer, 2003. 3(10): p. 768-80.
55. Carnero, A 2010. The PKB/AKT pathway in cancer. Curr. Pharm. res. 16, 34-44.
56. Huang MT, Newmark HT, and Frenkelk: Inhibitor effect of curcumin on tumorigenesis in mice. J. cell. Biochem. Suppli, 1997; 27: 26-34.
57. Syed Faisal Haider Zaidi, Takeshi Yamamoto, Alaa Refaat, Kanwal Ahmed, Hiroaki Sakurai, Takashi Kondo, Khan Usmanghani, Makoto Kadowaki, Toshiro Sugiyama. Modulation of Activation-Induced Cytidine Deaminase by Curcumin in Helicobacter pylori-Infected Gastric Epithelial Cells. 2009 Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter*, 14: 588-595.

ABSTRACT

Expression of 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase in *Helicobacter pylori*-induced normal Rat Gastric Mucosa Cells

Young Wook, Lee

Department of Food & Nutrition,

The Graduate School,

Sungshin Women's University

Helicobacter pylori (*H. pylori*) has been known to cause gastritis which can promote gastric cancer development. Overexpression of prostaglandin E₂ (PGE₂) has been reported to be implicated in inflammation and carcinogenesis. The intracellular level of PGE₂ is regulated not only by its biosynthesis, but also by its degradation processes. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase(15-PGDH) is the key enzyme that catalyzes the first step in the degradation of PGE₂.

Multiple lines of evidence support the tumor suppressor function of 15-PGDH in colon, breast, stomach, bladder, and pancreatic cancers. In the present study, we have examined the expression of 15-PGDH and chemoprotective effects of curcumin in RGM-1 cells treated with *H. pylori*. We observed that expression of 15-PGDH was down-regulated in *H. pylori* treated RGM-1 cells. By using deletion constructs of 15-PGDH promoter, we found that Ets-binding site is the most essential determinant for 15-PGDH activation in RGM-1 cells. We also observed that *H. pylori* inhibited phosphorylation of Elk-1, a major transcription factor of Ets family. To determine the molecular mechanisms underlying *H. pylori*-induced down regulation of 15-PGDH expression, we investigated the effect of *H. pylori* on phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *H. pylori* treatment induced phosphorylation of ERK1/2 and the inhibitors of ERK1/2 attenuated the down-regulation of 15-PGDH expression in *H. pylori* treated RGM-1 cells. Moreover, we also observed that curcumin, a major ingredient and active compound of turmeric, enhanced expression of 15-PGDH in *H. pylori* treated RGM-1 cells. These results suggest that *H. pylori* infection decreases 15-PGDH expression through down regulation of Ets transcription factor, which may contribute to development of gastritis and gastric cancer.