

*Helicobacter pylori*에서 생성되는 Vacuolating Cytotoxin이 위상피세포에서 Eotaxin 발현에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 미생물학교실, 서울대학교 의과대학 내과학교실 및 간연구소¹,
고려대학교 생명과학부², 중부대학교 생명공학부³

박효간 · 김남인 · 김정목* · 김주성¹ · 오유경² · 김영전³ · 김나영¹ · 정현채¹ · 송인성¹

Expression of Eotaxin in Gastric Epithelial Cells Stimulated with *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin

Hyokhan Park, Nam In Kim, Jung Mogg Kim*, Joo Sung Kim¹, Yu-Kyoung Oh²,
Young-Jeon Kim³, Nayoung Kim¹, Hyun Chae Jung¹ and In Sung Song¹

Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine; ¹Department of Internal Medicine and Institute of Liver Research, Seoul National University College of Medicine; ²School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University; ³Department of Biotechnology, Joongbu University

Received : January 20, 2006

Accepted : February 12, 2006

Helicobacter pylori-infected gastric mucosa is characterized by infiltration of various inflammatory cells such as neutrophils and eosinophils. Although several mechanisms for neutrophil infiltration are well known, there has been little known the role of eotaxin, which is a potent chemoattractant for eosinophils, on the inflammatory process of *H. pylori* infection. The present study was to investigate the mechanisms of eotaxin expression in gastric epithelial cells stimulated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). Stimulation with VacA purified from VacA⁺ *H. pylori* slightly increased eotaxin expression in MKN-45 gastric epithelial cells. In contrast, the combined stimulation with VacA and IL-4 synergistically increased the eotaxin expression as determined by quantitative RT-PCR and ELISA. In MKN-45 cells transfected with an eotaxin promoter-luciferase reporter plasmid, costimulation with VacA and IL-4 induced more luciferase activity than either VacA or IL-4 alone did. However, such up-regulation was significantly decreased in the cells transfected with luciferase reporter plasmid bearing an eotaxin promoter which has a mutation at STAT6 binding site. These results suggest that the up-regulation of eotaxin in VacA-stimulated gastric epithelial cells may be synergistically facilitated by IL-4 via a STAT6-dependent mechanism.

Key Words: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, Eotaxin, STAT6

서 론

*Helicobacter pylori*는 만성 위염, 위·십이지장 궤양 뿐만 아니라, 위암 및 위림프종의 위험도를 증가시키는 균으로 알

려져 있다. 이와 같은 질병과 관계된 *H. pylori*의 독성인자 중에서 분자량 87 kDa인 vacuolating cytotoxin (VacA)은 *H. pylori*에서 분비되는 단백질로 세포질의 공포화 (vacuolation)를 유발하는 단백질이다 (9). 특히 소화성궤양 환자에서 분리한 균주의 약 60%에서 VacA 독소가 생성되는데 반하여, 무증상 보균자에서 분리한 균주에서는 30~50%에서만 생성된다는 보고들은 이 독소가 염증 반응을 유도하는 주요 인자일 가능성을 제시해준다 (10,29). 한편 실험실에서 정제한 VacA 독소는 다양한 생물학적 기능을 나타낸다. 즉, VacA 독

*교신저자: 김정목. 133-791, 서울특별시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: 02-2220-0645, Fax: 02-2282-0645
e-mail: jungmogg@hanyang.ac.kr

소를 구강으로 투여한 마우스에서는 비만세포 (mast cell) 축적을 동반하는 급성 염증이 관찰된다. 이를 근거로 VacA가 비만세포와 결합하여 조직 파괴를 촉진시킬 것이라는 가설이 제기된 바 있다 (35). 또한 MHC class II에 의한 항원 전달을 감소시킴으로써 감염의 만성화에도 기여할 것으로 추측되기도 한다 (24). 이와 같이 VacA는 각종 면역병리기에 관여하기 때문에 백신 개발 (7,32)에도 이용되고 있는 등, VacA에 의한 숙주세포 반응의 규명이 매우 중요한 연구 분야로 대두되고 있다.

*H. pylori*에 감염된 환자의 위조직에는 호중구 (neutrophil)와 호산구 (eosinophil)를 비롯한 다양한 종류의 염증세포가 대량 유입된다 (13,22,39). 이 염증세포들 중에서 호산구는 감염증 또는 종양에 대한 숙주 방어의 중심적인 역할을 수행할 뿐만 아니라, 알레르기성 염증 질환 등에서는 세포 손상을 매개하고 있다 (40). 특히 호산구에 의한 superoxide (O_2^-)와 hydrogen peroxide (H_2O_2)의 생성량은 호중구에 비해 몇 십배 더 높다고 알려져 있다 (34). 따라서 염증 반응에 있어서 호산구는 가장 강력한 세포 독성 세포라고 할 수 있다. 또한 *H. pylori* 감염증에서 superoxide와 hydrogen peroxide에 의한 점막 염증 반응 가설이 제시되고 있는데 (3,4,30), 그 이유는 호산구가 이들 superoxide와 hydrogen peroxide를 대량으로 생성해 내는 세포이기 때문이다. 한편 *H. pylori*에 감염된 위점막 내에서 호산구의 유입이 심할수록 위염의 정도가 심하다는 연구보고는 (22) 호산구가 *H. pylori*에 의한 면역병리기에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사해 준다.

호산구 유입에는 IL-5, eotaxin 등과 같은 chemokine이 관여한다 (40). 이 중에서 eotaxin은 호산구에만 특이하게 작용하는 chemokine으로 CCR4라는 수용체에 결합하여 작용을 나타낸다. 이외에도 eotaxin-2와 eotaxin-3 등도 알려져 있는데, 이들을 eotaxin에 비해 수용체를 활성화시키는 능력이 10배 이상 약하다 (8,18,19). 또한 regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)도 관여할 수 있지만, 호산구에 대한 작용은 eotaxin에 비해 현저히 낮다. 따라서 *H. pylori* 감염증에서 호산구 유입기전을 설명하기 위해서는 eotaxin에 대한 연구가 중요하다. 한편 eotaxin gene의 활성화에 관여하는 signal pathway는 아직까지 명확하게 규명된 바가 없다. 즉, IL-4와 IL-13의 경우 STAT6 (signal transducer and activators of transcription-6) pathway가 관여하는 반면, IL-1 또는 TNF- α 의 경우에는 NF- κ B pathway를 통해 eotaxin이 발현된다는 보고들이 발표되고 있다 (12,20,41). 따라서 *H. pylori* 감염증에서 나타나는 점막 내부의 호산구 유입기전에도 이와 같은 pathway가 관여할 가능성이 높다. 그러나 *H. pylori* 감염증에서의 위상피세포에 의한 eotaxin 발현기전에 대해서는 아직까지 발표된 바가 없다. 본 연구에서

는 *H. pylori*에서 생성될 수 있는 병독인자인 VacA 독소가 위상피세포를 자극했을 때, 호산구 유입에 관여하는 chemokine인 eotaxin의 발현을 증가시켜 염증 반응을 촉진시킬 수 있을 것이라는 가설을 증명하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. Toxigenic *H. pylori*의 배양 및 VacA 독소 정제

VacA 독소를 분비하는 *H. pylori* 60190 (ATCC 49503)을 IsoVitalax, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.003 g/L)와 β -cyclodextrin (0.2%)이 포함된 Brucella broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 접종한 뒤, 37°C 미세호기성 조건 (10% CO_2 , 5% O_2 , 85% N_2)에서 5~6일간 진탕 배양하였다. 이 배양액을 4°C, 12,000 g에서 15분간 원심하고 상청액을 얻은 뒤, 동결 건조법과 초여과법 (ultrafiltration)을 이용하여 상청액을 30배 농축시켰다. 50% ammonium sulfate로 saturation하여 단백질을 침전시킨 뒤, dialysis buffer (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) 용액에 재부유시켰다. 그 뒤, cut-off 14,000 dalton인 dialysis bag에 넣어 dialysis를 3회 시행하였다. Amicon Ultra-15 centrifugal filter (Millipore)를 이용하여 배양여액을 농축하고, 100 mM NaCl이 포함된 60 mM Tris (pH 7.5) 용액 하에서 Superose 6 HR 16/50 column (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 gel filtration chromatography를 시행하였다 (5). 정제한 VacA는 독소 활성을 증진시키기 위하여 기존의 방법대로 150 mM HCl을 이용하여 pH 2.0으로 조정하였다 (6). 이와 같이 정제한 VacA의 순도를 알아보기 위하여 goat anti-VacA monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 immunoblot을 시행한 결과 87 kDa 부위의 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 또한 정제한 VacA가 생물학적 활성을 나타내는지의 여부를 알아보기 위하여 HeLa cell (ATCC CCL2)을 이용하여 bioassay를 시행하였다. 즉, MEM을 기본으로 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 포함한 배지를 이용하여 HeLa cell을 96-well plate에 배양하였다. 약 95%의 confluent를 보인 세포에 기존의 배지를 제거한 뒤, 활성화시킨 VacA (20 μ g/ml, pH 2.0)를 첨가하고, 24시간 배양 후 세포의 vacuolation 유무를 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비해 VacA를 첨가한 세포질에서 뚜렷한 vacuolation을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 한편 lipopolysaccharide (LPS)의 오염 여부를 확인하기 위하여 LPS test kit (quantitative chromogenic limulus amoebocyte lysate; BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)를 이용하여 측정하였으나 정제한 VacA 1 mg/ml에서 LPS activity는 1 endotoxin unit/ml 이하였다.

2. 위상피세포주 배양

실험에 이용한 인체 위상피세포주로는 MKN-45 세포주 (JCRB)였다. 이 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10% FBS와 항생제 (100 unit/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin)를 사용하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3. RNA 추출, 표준 RNA 제작 및 RT-PCR

1) RNA 분리

VacA 또는 recombinant human IL-4 (R&D, Minneapolis, MN,

USA)로 자극한 MKN-45 위상피세포로부터의 RNA는 Trizol reagent (Life Technologies, Grand Island, MD, USA)를 이용하여 추출하였다.

2) 위상피세포에서의 eotaxin mRNA 발현능 확인을 위한 RT-PCR

추출한 RNA를 0.1 µg의 oligo(dT)₁₅와 함께 37°C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 만든 후, PCR thermal cycler (GenAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)로 cDNA를 증폭시켰다. Eotaxin의 경우 94°C에서 45초, 53°C에서 1분 30초 그리고 72°C에서 1분간 시행하였다. 이들의 시행 횟수는 총 35회였다. β-actin에 대한 PCR은 기존의 방법과 동일하게 시행하였다 (1). PCR에 사용한 eotaxin과 β-actin의 primer 염기 서열은 Table 1과 같다. 한편 eotaxin에 대한 양성 대조군으로는 human monocyte cell line인 U-937 cell을 PMA (0.1 µM)로 16시간 자극한 RNA를 이용하였다 (26). 모든 실험은 3회 이상 반복 시행하였다. PCR이 끝난 후, PCR 산물은 2% NuSieve agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)로 전기 영동한 뒤 ethidium bromide 염색으로 확인하였다.

3) 발현된 eotaxin 및 β-actin mRNA의 정량

발현된 eotaxin mRNA와 β-actin mRNA의 정량을 위하여 표준 RNA를 제작하였다. 이 표준 RNA는 기존의 방법대로 역전사의 첫 단계부터 세포에서 추출한 RNA와 동일한 시험관에서 사용 가능하도록 설계하였다. 즉, 표준 RNA는 eotaxin gene을 증폭할 수 있는 sense primer와 antisense primer의 염기 서열이 일렬로 연결되도록 설계하였으며, 이의 PCR 증폭 product 크기가 세포로부터 추출된 RNA에서 증폭된 목표 RNA의 PCR product의 크기에 비해서 약 100 bp 정도 차이 나게 하였다. 이와 같은 설계에 입각하여 제작한 eotaxin에 대한 표준 RNA의 PCR product의 크기는 481 bp이고, β-actin에 대한 표준 RNA의 PCR product의 크기는 746 bp였다 (Table 1). 그 뒤, 세포로부터 추출한 1~2 µg의 RNA와 2~5배로 연속 희석시킨 표준 RNA를 동일한 시험관에서 반응시켜 역전사를 시행하여 기존의 방법대로 발현된 mRNA의 분자수를 정량하였다 (1). 즉, PCR 생성물을 전기 영동으로 분리하고 폴라로이드 필름에 영상을 기록하였다. 이 영상

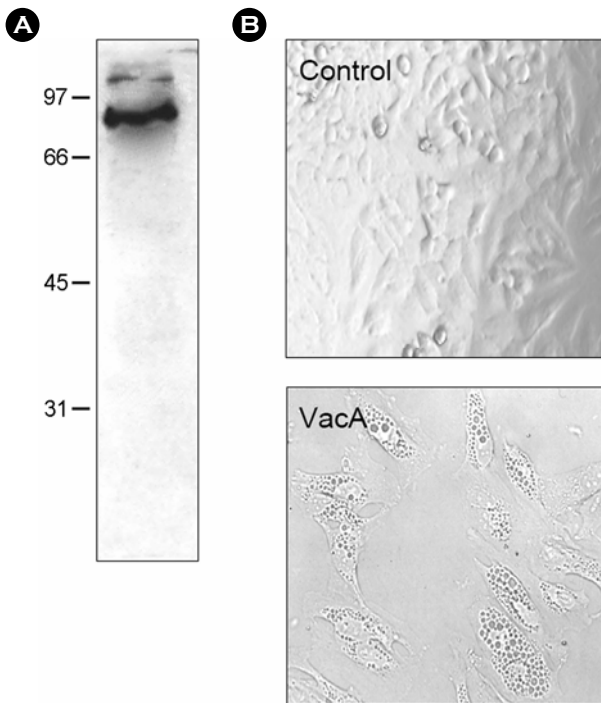


Figure 1. Purification of *H. pylori* vacuolating cytotoxin. (A) Immunoblot analysis of VacA preparations electrophoresed on a 10% acrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and reacted with goat anti-VacA antibody. (B) Vacuolation in HeLa cells treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin. HeLa cells in a 96 well plate were treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin (20 µg/ml) for 24 h. Vacuolation was observed by an inverted microscopy (× 300).

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for RT-PCR analysis of human eotaxin and β-actin

mRNA species	Sense primers	Antisense primers	Size of PCR products (bp)	
			target	standard
eotaxin	5'-TGT GCC GAC CCC AAG AAG AAG T-3'	5'-GAG AGG AGA GGG GGA ACA TTG-3'	376	481
β-actin	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'	5'-CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG-3'	661	746

을 imaging densitometer (GS-670, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 처리하여 각 PCR 밴드의 peak에 해당하는 면적을 구하였다. 그 뒤 세포 RNA로부터 얻은 PCR 면적과 표준 RNA로부터 얻은 PCR 면적비를 이중 로그 스케일을 이용하여 표준 RNA 분자수와 동일한 등전점 (equimolar point)을 구하여 세포 RNA 내에 존재하는 eotaxin mRNA 분자수를 계산하였다.

4. 위상피세포로부터 생성된 eotaxin 단백질 측정

Eotaxin 단백질은 배양상청액을 대상으로 효소면역측정법 (ELISA)으로 측정하였다. 실험에 이용한 ELISA kit는 R&D System 사 (Quantikine, Minneapolis, MN, USA)의 것을 이용하였다.

5. Eotaxin reporter gene 활성 측정을 위한 luciferase assay

6-well dish에 세포를 배양한 다음 Fugene 6 transfection reagent (Roche molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 제조회사의 지침대로 1.5 μg 의 pEotaxin-luciferase 또는 p β -actin-luciferase를 transfection시켰다. Eotaxin reporter gene의 활성을 측정하기 위한 plasmid는 luciferase reporter pGL3 Basic vector (Promega, Madison, WI, USA)를 기본으로 eotaxin promoter region을 포함시킨 것이며 (pEotx. 1363), promoter region 중 QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 STAT6 binding site를 변형시킨 plasmid pEotx.M1은 pEotx. 1363 (GGC TTC CCT GGA ATC TCC CAC A; 이 중 "TTC CCT GGA A"가 STAT6 결합부위에 해당됨)의 TTC를 AGC로 치환시켜 STAT-6의 결합부위를 차단시킬 목적으로 제작되었다. 이들 plasmid들은 미국 Dr. Robert P. Schleimer가 제공해 주었다 (21). Transfection된 세포를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 후, VacA 또는 IL-4로 6시간 동안 작용시켰다. 그 뒤, 세포를 수확하여 기존의 방법대로 세포 파쇄액을 얻었다 (14). 즉, 6-well plate를 얼음 위에 올려놓고 4°C Ca²⁺과 Mg²⁺이 없는 HBSS로 2회 세척한 다음, Promega 회사에서 구입한 reporter lysis buffer 300 μl 를 25분 동안 작용시켰다. 세포 파쇄액의 단백질 함량은 Bradford protein dye reagent (Bio-Rad)를 이용하였다. 이렇게 준비한 세포 파쇄액에 대한 light release는 Luciferase Assay System (Promega)과 luminometer (MicroLumat Plus, Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)를 이용하여 10초 동안 측정된 수치로 정하였다.

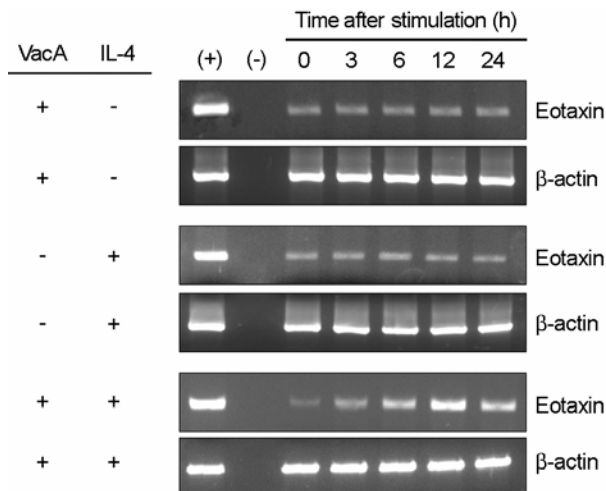


Figure 2. RT-PCR for eotaxin expression in MKN-45 cells treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin and/or IL-4. Confluent monolayers of MKN-45 cells were treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and/or IL-4 (50 ng/ml) for the indicated hours, after which cellular RNA was extracted. In this experiment, tissue culture medium was also supplemented with 5 mM NH₄Cl. The (+) and (-) represent positive and negative controls, respectively.

6. 통계 처리

Eotaxin mRNA 분자수 정량은 평균으로 표시하였고, eotaxin 단백질 및 luciferase 활성도 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 통계 처리는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 계산하였고, $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. *H. pylori* vacuolating cytotoxin 또는 IL-4 자극에 의한 eotaxin 유전자 발현 및 단백질의 생성

VacA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 IL-4 (50 ng/ml)로 위상피세포주인 MKN-45 cell을 자극했을 때, eotaxin mRNA 발현 band는 자극 시간이 증가함에도 불구하고 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 그러나 VacA와 함께 IL-4를 동시에 가했을 경우 eotaxin mRNA 발현 band가 현저히 증가하고 있었다 (Fig. 2). 이와 같은 mRNA 발현을 객관적으로 측정하기 위하여 eotaxin에 대한 표준 RNA를 이용하여 mRNA 분자수를 정량하였다. 그 결과, 자극 초기부터 자극 24시간까지 VacA 또는 IL-4만의 자극으로는 대조군에 비해 매우 미약한 eotaxin mRNA 발현 증가를 관찰할 수 있었다. 즉, 자극 6시간에 대조군에서는 eotaxin mRNA 분자수가 평균 $3.7 \times 10^3/\mu\text{g}$ RNA를 나타내었지만, VacA 단독 자극군에서는 평균 $4.5 \times 10^3/\mu\text{g}$ RNA로 매우 미약한 증가를 나타내었다. 또한 동일

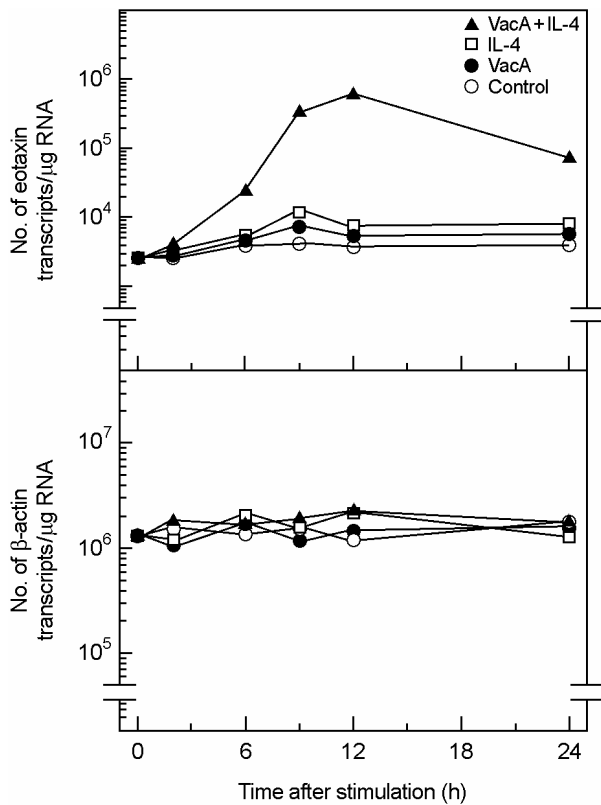


Figure 3. Quantification of eotaxin mRNA molecules in MKN-45 cells treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin and/or IL-4. Confluent monolayers of MKN-45 cells were treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin (5 μg/ml, VacA) and/or IL-4 (50 ng/ml) for the indicated hours, after which cellular RNA was extracted. Quantification of eotaxin and β-actin mRNA molecules was performed as described by Materials and Methods. In this experiment, tissue culture medium was also supplemented with 5 mM NH₄Cl. The values are expressed as the mean of five different experiments.

한 자극 시간대에 IL-4 단독 자극군에서는 평균 5.2×10^3 eotaxin mRNA 분자수/μg RNA로 대조군에 비해서는 약 40%의 증가를 나타내었다. 이에 비하여 동일 시간대에서 VacA와 함께 IL-4를 함께 가했을 경우 발현된 mRNA 분자수는 평균 2.3×10^4 /μg RNA로 VacA 또는 IL-4 단독 자극에 비해 현저한 증가를 나타내었다 (Fig. 3). 이와 같은 synergistic increase는 자극 6시간부터 뚜렷하게 관찰되고 있었고, 자극 12시간에 최고의 수치를 나타내었다. 그러나 β-actin mRNA는 VacA 또는 IL-4 자극군과 비자극군 모두에서 약 1×10^6 transcripts/μg RNA로 일정한 발현을 나타내었다.

발현된 mRNA가 protein 분비까지 이어지는지를 확인하기 위하여, 배양 24시간 후 얻은 상청액을 대상으로 eotaxin의 분비량을 측정하였다. 그 결과 IL-4 (50 ng/ml) 만의 자극으로도 eotaxin 단백질 분비가 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나 VacA와 IL-4를 함께 가했을 때 mRNA 발현과 동일

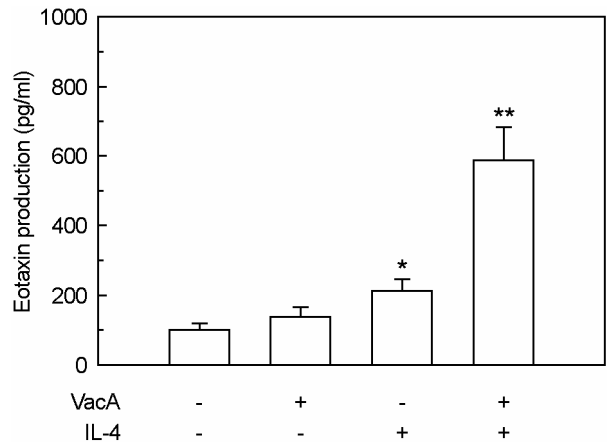


Figure 4. Eotaxin production in MKN-45 cells treated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin and/or IL-4. Culture supernatants of MKN-45 cells were collected 24 h after stimulation with *H. pylori* vacuolating cytotoxin (5 μg/ml, VacA) and/or IL-4 (50 ng/ml). Tissue culture medium was also supplemented with 5 mM NH₄Cl. Protein levels of eotaxin in culture supernatants were determined by ELISA. Data are mean ± SEM (n=5). * $p < 0.05$ versus MKN-45 cells in medium without VacA or IL-4. ** $p < 0.01$ versus MKN-45 cells in medium with VacA alone or IL-4 alone.

하게 VacA 또는 IL-4 단독으로 자극을 가했을 때에 비하여 eotaxin의 분비량이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다 ($p < 0.01$, Fig. 4).

2. *H. pylori* 균과 IL-4를 가한 위상피세포에서의 eotaxin 발현

VacA 자극이 아닌 *H. pylori* 균 자체의 감염에 의해서도 eotaxin이 발현되는지의 여부를 알아보기 위하여 MKN-45 cell에 일정수의 *H. pylori* 균과 함께 IL-4 (50 ng/ml)을 가하였다. 24시간 배양 후 상청액을 대상으로 ELISA를 이용하여 eotaxin의 분비량을 측정하였다. 그 결과 well 당 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} CFU의 *H. pylori* 균과 함께 IL-4를 MKN-45 cell에 가하더라도 eotaxin의 분비량은 대조군 또는 IL-4 단독 자극에 비해 유의한 차이를 나타내지 못하였다. 그러나 동일한 실험 system에서 IL-4와 VacA를 함께 가할 경우에는 앞서와 같이 eotaxin의 분비가 현저하게 증가하고 있었다 (Fig. 5). 이와 같은 결과는 정제한 VacA가 아닌 *H. pylori* 균 자체에 의해서는 IL-4의 동시 자극을 받더라도 위상피세포로부터 eotaxin이 발현되지 않음을 시사해 준다.

3. NH₄Cl 첨가 및 *H. pylori* vacuolating cytotoxin의 산성화가 위상피세포의 eotaxin 발현에 미치는 영향

정제된 VacA에 의한 eotaxin의 발현에 있어서 NH₄Cl 존재 유무 또는 VacA의 산성화가 eotaxin의 발현에 미치는 영향

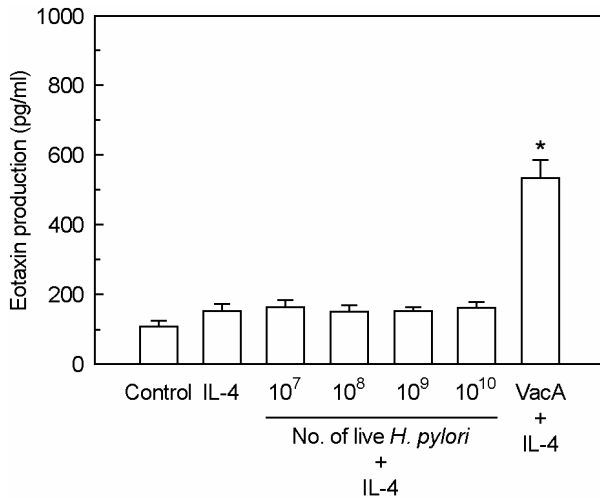


Figure 5. The effects of live *H. pylori* on the eotaxin production in MKN-45 cells treated with IL-4. MKN-45 cells were incubated with IL-4 (50 ng/ml) in the presence of live *H. pylori* or purified VacA (5 µg/ml). Tissue culture medium was also supplemented with 5 mM NH₄Cl. After 24 h of incubation, the levels of eotaxin protein were measured by ELISA. Results are expressed as the mean ± SEM of five experiments. *p<0.05 versus MKN-45 cells in medium with IL-4 alone.

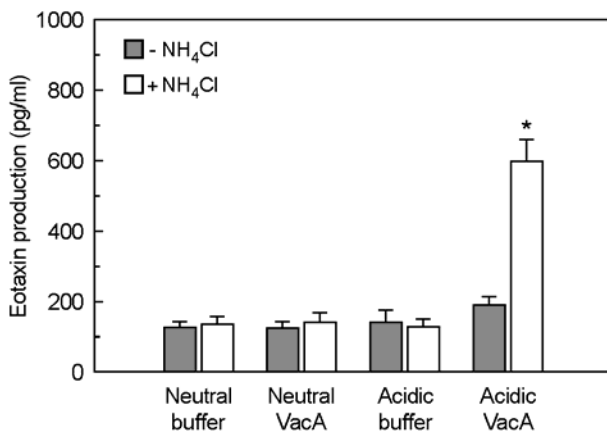


Figure 6. Eotaxin production in IL-4-stimulated MKN-45 cells after incubation with acidified *H. pylori* vacuolating cytotoxin in the presence or absence of ammonium chloride. MKN-45 cells were incubated with IL-4 (50 ng/ml) in the presence of purified VacA (either acid pH or neutral pH, 5 µg/ml), or in the presence of buffer controls. Tissue culture medium was also either supplemented with 5 mM NH₄Cl or not supplemented. After 24 h of incubation, eotaxin production was measured by ELISA. Results are expressed as the mean ± SEM of five experiments. *p<0.05 versus MKN-45 cells in medium without NH₄Cl.

을 관찰하였다. 이를 위하여 MKN-45 cell에 5 mM의 NH₄Cl 과 함께 산성 상태의 VacA (pH 2.0) 또는 중성의 VacA (pH 7.0)를 가하였다. 이와 더불어 앞서와 같이 IL-4 (50 ng/ml)

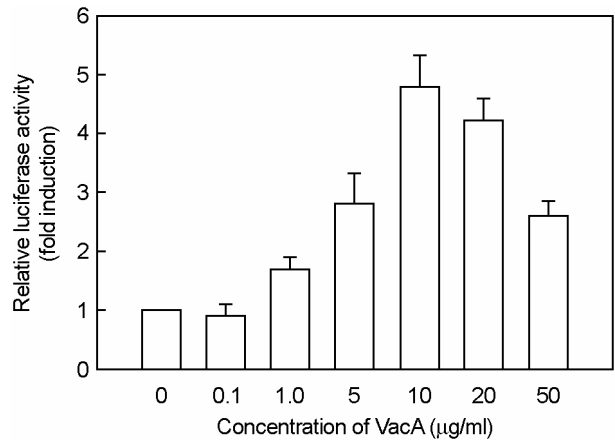


Figure 7. Activation of eotaxin reporter gene in MKN-45 cells stimulated with *H. pylori* vacuolating cytotoxin and IL-4. MKN-45 cells were transfected with pEotaxin-luciferase transcriptional reporter (pEotx.1363). Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with the indicated concentrations of *H. pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) and 50 ng/ml of IL-4 for 6 h. Tissue culture medium was also supplemented with 5 mM NH₄Cl. Data are the mean fold induction in luciferase activity relative to unstimulated control. Values are the mean ± SEM of five experiments.

로 24시간 함께 자극한 후 상청액을 회수하였다. VacA의 산성화는 150 mM HCl을 이용하여 pH 2.0으로 조정하였다. ELISA를 이용하여 eotaxin의 분비량을 측정된 결과, 5 mM의 NH₄Cl을 가하지 않은 군에서는 eotaxin의 분비량이 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내지 못하였다. 또한 pH 7.0을 나타내는 VacA를 가한 군에서는 5 mM의 NH₄Cl를 함께 첨가해 주더라도 대조군에 비해 eotaxin의 유의한 증가를 관찰할 수 없었다 (Fig. 6). 한편 pH 2.0을 나타내는 VacA를 MKN-45 cell이 들어있는 6-well plate에 가하더라도 배양매지의 pH는 별 영향을 나타내지 않았다. 이와 같은 결과로 미루어 정제된 VacA는 산성화 상태에서, 그리고 ammonium chloride와 함께 위상피세포에 작용해야만 eotaxin이 발현될 수 있음을 시사해 준다.

4. *H. pylori* vacuolating cytotoxin 자극에 의한 eotaxin reporter gene의 적정 발현 농도 결정

VacA 자극에 의한 eotaxin 적정 발현 농도를 결정하기 위하여 MKN-45 세포에 pEotaxin-luciferase plasmid (pEotx. 1363)를 transfection 시켰다. 그 뒤 VacA 및 IL-4 (50 ng/ml)를 6시간 동안 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 1 µg/ml부터 eotaxin reporter gene의 활성이 증가되기 시작하여 10 µg/ml에서 최대의 활성이 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

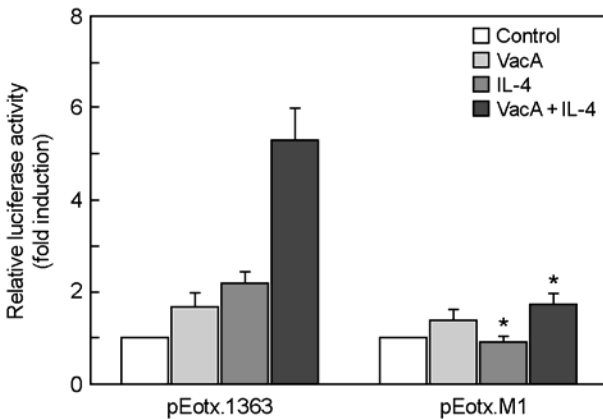


Figure 8. Activation of the eotaxin promoter by STAT6. MKN-45 cells were transfected with either a wild-type eotaxin promoter luciferase reporter plasmid (pEotx.1363) or a plasmid mutated at binding site for STAT6 (pEotx.M1). Forty-eight hours after transfection, cells were incubated with or without VacA (5 µg/ml) and/or IL-4 (50 ng/ml) for 6 h and then harvested. Tissue culture medium was also supplemented with 5 mM NH₄Cl. The luciferase activity normalized to protein concentration and calculated as the fold induction compared with the control vector. The data are presented as the mean ± SEM of five independent experiments. *, p<0.05 compared with pEotx.1363

5. H. pylori vacuolating cytotoxin 및 IL-4로 자극한 위 상피세포에서의 STAT6 pathway에 의한 eotaxin reporter gene의 활성화

VacA에 의한 eotaxin 발현에 STAT6가 관여하는지의 여부를 알아보기 위하여, pEotx.1363과 eotaxin promoter region 중 STAT6 binding site를 변형시킨 plasmid pEotx.M1을 MKN-45 cell에 transfection 시킨 뒤, VacA 또는 IL-4로 6시간 자극하고 eotaxin reporter gene의 활성을 측정하였다. 그 결과 STAT6 binding site가 온전히 보존된 eotaxin promoter를 갖고 있는 pEotx.1363을 transfection 시킨 세포를 대상으로 VacA만의 자극을 가한 group에서는 eotaxin reporter gene의 활성이 대조군에 비해 약 70% 증가하고 있었다. 또한 IL-4만으로 자극을 가한 경우에는 대조군에 비해 약 120%의 증가를 나타내었다. 이 때 VacA와 IL-4로 함께 자극을 가했을 경우에는 대조군에 비해 약 5.3배의 fold-increase를 보여 주었다. 이와 같은 증가율은 단독 자극에 비해 synergistic한 증가를 의미하고 있다. 이에 비하여 STAT6 binding site를 mutation 시킨 plasmid pEotx.M1을 transfection 시킨 group에서는 VacA에 의해 증가된 활성이 약 40% 정도 감소한 반면 IL-4에 의해 증가된 활성은 대조군 수준으로 100% 감소되었다. 또한 VacA와 IL-4로 함께 자극을 가한 group에서는 90% 이상 매우 높게 감소하여 VacA 자극에 의한 수준으로 감소하였다 (Fig. 8). 이와 같은 결과는 VacA 자극에 의한 eotaxin 발현

에 STAT6 pathway가 관여하고 있음을 시사해 준다.

고찰

VacA는 분자량이 약 87 kDa으로 세포질의 공포화 (vacuolation)를 유발하는 단백질이다 (9). 이와 같은 VacA는 서구에서 분리한 H. pylori 균주 중 약 50%에서 생성된다고 보고되어 있고 (10,29), 우리나라에서 분리한 균주의 경우에서도 약 80% 정도에서 VacA를 생성하고 있다 (15). H. pylori 내부에서 VacA는 140 kDa의 전구물질 (precursor) 형태로 합성된다. 이러한 전구물질은 Sec 구조에 의존하여 세균 내막을 통과한 후, 이어서 이 전구물질의 구조 성분인 40 kDa의 C-terminal의 autotransporter에 의해 형성된 pore (β-barrel 형)를 통하여 외막을 통과하면 87 kDa 크기의 독소가 된다 (28). 분비된 VacA는 위상피세포의 수용체에 결합되고, endocytosis에 의해 endosome으로 이동한 후, 각종 이온 채널이 작용하게 되어 결국 수분이 유입되어 커다란 공포화로 진행되는 것으로 추측하고 있다 (25,33). 또한 세포 내에서 VacA 단백질은 다양한 생물학적 기능을 나타낸다 (9,37). 본 연구에서 VacA는 IL-4와 함께 위상피세포에서 eotaxin을 발현시킬 수 있었다. 이와 같은 현상은 표준합성 RNA를 이용한 eotaxin mRNA 발현 분자수 측정과 ELISA를 이용한 단백질 분비 측정의 결과에서 분명히 확인할 수 있었다. 특히 reporter gene을 이용한 본 연구에서 VacA와 IL-4에 의한 위상피세포에서의 eotaxin 활성화를 재확인할 수 있었다. 즉, VacA만의 자극으로는 eotaxin reporter gene의 활성이 대조군에 비해 약 70% 증가하였고, IL-4만의 자극으로는 대조군에 비해 약 120%의 증가를 나타내었다. 한편 VacA와 IL-4로 함께 자극을 가했을 경우에는 5.3배의 증가를 보여 단독 자극에 비해 synergistic increase를 나타내었다. 이와 같은 결과들은 VacA의 자극을 받더라도 IL-4의 동시 자극을 받지 않을 경우에는 eotaxin 발현이 생물학적으로 유의한 level로 증가할 수 없음을 의미하기도 한다. 따라서 VacA⁺ H. pylori에 감염된 위점막에서는 점막 내부에 존재하는 면역세포와의 상호작용이 병리기전 발현에 중요한 역할을 하고 있음을 시사해 준다.

H. pylori에 감염된 환자의 위조직에는 호산구가 비감염자에 비해 매우 높게 증가해 있다는 보고들을 고려해 볼 때 (13,22,39), 호산구 유입기전은 H. pylori 감염에 의한 위장점막 병리기전 연구에 매우 중요하다고 할 수 있다. 이와 같은 호산구 유입에는 IL-5, eotaxin 등과 같은 chemokine이 관여한다 (40). 이 중에서 eotaxin은 호산구에만 특이하게 작용하는 chemokine으로 CCR4라는 수용체에 결합하여 작용을 나타낸다. 이외에도 eotaxin-2와 eotaxin-3 등도 알려져 있지만,

이들을 eotaxin에 비해 수용체를 활성화시키는 능력이 10배 이상 약하다 (8,18,19). 또한 RANTES도 관여할 수 있지만, 호산구에 대한 작용은 eotaxin에 비해 현저히 낮다. 이와 같은 고찰들을 토대로 본 연구에서는 *H. pylori* 감염증에 의한 호산구 유입기전을 설명하기 위하여 eotaxin의 연구에 초점을 맞추었다.

본 연구에서 *H. pylori* 균 자체를 위상피세포주인 MKN-45 cell에 감염시켰을 때, eotaxin의 발현은 관찰할 수 없었다. 또한 *H. pylori* 균 자체와 IL-4를 동시에 가하더라도 eotaxin의 발현 증가를 확인할 수 없었다. 그러나 앞서 언급한 대로 *H. pylori*로부터 정제한 VacA 독소와 함께 IL-4를 MKN-45 cell에 작용시켰을 때, eotaxin의 발현이 증가한다는 결과는 위상피세포로부터 eotaxin 발현에는 *H. pylori* 균 자체보다는 VacA 독소가 관여하고 있음을 시사해 준다고 할 수 있다. VacA 독소가 위상피세포로부터 IL-4를 생성할 수 있는지의 여부는 확인된 바 없다. 그런데 *H. pylori*가 위상피세포에 감염되었을 때 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)의 발현이 증가한다 (2). MCP-1은 IL-4를 생성해 낼 수 있는 단핵세포의 유입에 관여하는 chemokine이다. *H. pylori* 감염된 위조직에서도 단핵구가 비감염자에 비해 많이 증가하고 있을 뿐만 아니라, 특히 위조직 내부에 있는 세포들이 IL-4를 생성해 낼 수 있다는 보고 (27)로 미루어 VacA⁺ *H. pylori* 감염증에서 IL-4가 위상피세포에 함께 작용할 수 있음을 이론적으로 추정할 수 있다. 그렇지만 아직까지 VacA⁻ *H. pylori*에 감염된 환자에 비하여 VacA⁺ *H. pylori*에 감염된 환자의 위점막 조직에서 호산구가 현저히 증가하고 있다는 보고는 발표된 바 없다. 이와 같은 연구는 VacA에 의한 eotaxin의 발현 증가와 이에 의한 호산구 유입 증가라는 일련의 가설을 증명하는데 매우 중요한 과제이므로, 이에 관한 연구가 필요하리라 생각한다.

IL-4는 Janus kinase-1 (JAK1)과 JAK3라는 수용체를 통해 STAT6라고 불리는 세포질 내의 전사인자를 인산화시킨다 (31). 인산화된 STAT6는 dimeric 형태를 나타내며, 핵내로 이동하여 STAT6에 특이적인 조절인자를 갖고 있는 유전자를 활성화시키게 된다 (11,23). 호흡기 상피세포를 비롯한 다양한 세포에서 STAT6가 활성화된다는 보고가 있지만 (21, 31), 아직까지 위상피세포에서의 STAT6 활성화에 관해서는 알려진 바가 거의 없다. 본 연구에서 STAT6 binding site를 mutation 시킨 reporter gene을 transfection 시킨 MKN-45 cell에서는 VacA에 의해 증가된 eotaxin reporter gene의 활성이 약 40% 정도 감소한 반면, IL-4에 의해 증가된 활성은 대조군 수준으로 100% 감소되었다. 또한 VacA와 IL-4로 함께 자극을 가한 group에서는 90% 이상 매우 높게 감소하여 VacA 자극에 의한 수준으로 감소하였다. 이와 같은 결과는 VacA

자극에 의한 eotaxin 발현에 있어서 STAT6 pathway가 관여하고 있음을 시사해 주고 있다. 그러나 이와 같은 추정은 간접적 확인에 불과하다. 따라서 본 연구실에서는 인산화된 STAT6 단백질과 핵 내의 STAT6 전사인자를 Western blot과 electrophoretic mobility shift assay 등의 방법을 이용해 확인하고 있다. 이와 같은 연구결과가 확인된다면 앞서 제시한 가설을 보다 확실하게 증명할 수 있을 것으로 기대한다.

VacA와 IL-4에 의하여 발현이 증가된 eotaxin은 호산구의 유입에 관여할 것으로 추정된다. *H. pylori*에 감염된 환자의 위조직에는 호산구가 비감염자에 비해 매우 높게 증가해 있음을 알 수 있다 (13,22,29). 또한 *H. pylori*에 감염된 위점막 내에서 호산구의 유입이 심할수록 위염의 정도가 심하다는 연구보고는 (22) 호산구가 *H. pylori*에 의한 면역병리기전에 매우 중요하게 관여하고 있음을 제시해 준다. 호산구는 감염증 또는 종양에 대한 숙주 방어의 중심적인 역할을 수행할 뿐만 아니라, 알레르기성 염증 질환 등에서는 세포 손상을 매개하고 있다 (40). 특히 호산구에 의한 superoxide (O₂⁻)와 hydrogen peroxide (H₂O₂)의 생성량은 호중구에 비해 몇십배 더 높다는 점에 비추어 (34) 호산구는 가장 강력한 세포 독성 세포라고 할 수 있다. 이와 더불어 *H. pylori* 감염증에서 superoxide와 hydrogen peroxide에 의한 점막 염증 반응 가설이 제시되고 있다 (3,4,30). 또한 호산구는 탈과립 과정을 통해 eosinophil peroxidase (EPO), myeloperoxidase (MPO), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil-derived neurotoxin (EDN) 등과 같은 과립단백질을 분비한다 (38). 이와 같은 과립단백질은 조직 독성이 매우 강하기 때문에 염증 반응에 직접적으로 관여한다. 특히 EPO는 호산구의 respiratory burst 동안에 생성되는 hydrogen peroxide (H₂O₂)의 산화 능력을 증강시켜 세포 독성을 촉진시킨다 (38). 또한 EPO는 nitrite (NO₂)를 substrate로 하여 nitrotyrosine를 형성할 수 있다 (42). 그런데 *H. pylori*는 매우 강력한 urease 활성을 지니고 있고 (36), 이 균의 감염에 의해 위상피세포에서도 nitric oxide를 생성해 낼 수 있다 (16,17). 따라서 *H. pylori*에 감염될 경우 위점막 내에서는 nitrite의 농도가 높아지게 된다. 결국 *H. pylori* 감염에 의해 점막 내로 유입된 호산구에서 생성된 EPO가 nitrite를 분해함으로써 염증 반응을 더욱 촉진시킬 수 있음을 시사해 준다. 이와 같은 고찰과 더불어 본 연구결과들은 *H. pylori* 병독인자인 VacA가 단핵구로부터 생성되는 IL-4와 함께 위상피세포를 자극하여 eotaxin의 발현을 증가시키고, 이어서 eotaxin은 호산구의 유입을 촉진시킴으로써 점막 염증 반응을 더욱 증폭시킬 것이라는 가설의 일부를 증명하고 있다고 할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-041-E00086).

참 고 문 헌

- 1) 김정목, 강신재, 조수진, 정훈용, 오유경, 김영전: *Bacteroides fragilis* 장독소 자극을 받은 인체 장상피세포에서의 cyclooxygenase-2의 발현. *J Bacteriol Virol* **32**: 147-157, 2002.
- 2) 김정목, 정현채, 조양자, 송인성, 김정룡: *Helicobacter pylori*의 실험적 감염에 의하여 유발되는 인체 위상피세포에서의 proinflammatory cytokine 유전자의 발현 양상 및 정량. *대한미생물학회지* **30**: 651-663, 1995.
- 3) Baek HY, Lim JW, Kim H, Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim KH: Oxidative stress-related proteome changes in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Biochem J* **379**(Pt 2): 291-299, 2004.
- 4) Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ: Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **149**: 121-129, 2003.
- 5) Cover TL, Hanson PI, Heuser JE: Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* **138**: 759-769, 1997.
- 6) de Bernard M, Papini E, de Filippis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R, Montecucco C: Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J Biol Chem* **270**: 23937-23940, 1995.
- 7) Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R: The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* **19**: 523-563, 2001.
- 8) Forssmann U, Uguccioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M, Baggiolini M: Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med* **185**: 2171-2176, 1997.
- 9) Gebert B, Fischer W, Haas R: The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 205-220, 2004.
- 10) Go MF: Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **16** (Suppl 1): 3-15, 2002.
- 11) Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL: An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 STAT. *Science* **265**: 1701-1706, 1994.
- 12) Jedrzkiewicz S, Nakamura H, Silverman ES, Luster AD, Mansharamani N, In KH, Tamura G, Lilly CM: IL-1beta induces eotaxin gene transcription in A549 airway epithelial cells through NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L1058-L1065, 2000.
- 13) Kikuchi T, Kato K, Ohara S, Sekine H, Arikawa T, Suzuki T, Noguchi K, Saito M, Saito Y, Nagura H, Toyota T, Shimosegawa T: The relationship between persistent secretion of RANTES and residual infiltration of eosinophils and memory T lymphocytes after *Helicobacter pylori* eradication. *J Pathol* **192**: 243-250, 2000.
- 14) Kim JM, Jung HY, Lee JY, Youn J, Lee CH, Kim KH: Mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 dependent signals are essential for *Bacteroides fragilis* enterotoxin-induced enteritis. *Eur J Immunol* **35**: 2648-2657, 2005.
- 15) Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY: Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean strains do not influence proinflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence clinical outcome. *J Gastroenterol* **35**: 898-906, 2000.
- 16) Kim JM, Kim JS, Jung HC, Oh YK, Chung HY, Lee CH, Song IS: *Helicobacter pylori* infection activates the NF-kB signaling pathway to induce iNOS and protect human gastric epithelial cells from apoptosis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver* **285**: G1171-1180, 2003.
- 17) Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY: Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon-gamma in polarized nitric oxide secretion. *Helicobacter* **7**: 116-128, 2002.
- 18) Kitaura M, Suzuki N, Imai T, Takagi S, Suzuki R, Nakajima T, Hirai K, Nomiya H, Yoshie O: Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem* **274**: 27975-27980, 1999.
- 19) Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, Hanai N, Furuya A, Ohta K, Matsushima K, Yoshie O, Yamamoto K, Hirai K: Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells.

- lial cells. *Cell Immunol* **225**: 91-100, 2003.
- 20) **Matsukura S, Stellato C, Georas SN, Casolaro V, Plitt JR, Miura K, Kurosawa S, Schindler U, Schleimer RP**: Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**: 755-761, 2001.
 - 21) **Matsukura S, Stellato C, Plitt JR, Bickel C, Miura K, Georas SN, Casolaro V, Schleimer RP**: Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells. *J Immunol* **163**: 6876-6883, 1999.
 - 22) **McGovern TW, Talley NJ, Kephart GM, Carpenter HA, Gleich GJ**: Eosinophil infiltration and degranulation in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Dig Dis Sci* **36**: 435-440, 1991.
 - 23) **Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U**: Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol* **16**: 5811-5820, 1996.
 - 24) **Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, Montecucco C**: Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* **187**: 135-140, 1998.
 - 25) **Montecucco C, Rappuoli R**: Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 457-466, 2001.
 - 26) **Nakamura H, Haley KJ, Nakamura T, Luster AD, Lilly CM**: Differential regulation of eotaxin expression by TNF-alpha and PMA in human monocytic U-937 cells. *Am J Physiol* **275**: L601-L610, 1998.
 - 27) **Orsini B, Ottanelli B, Amedei A, Surrenti E, Capanni M, Del Prete G, Amorosi A, Milani S, D'Elis MM, Surrenti C**: *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with reduced expression of interleukin-4 (IL-4) mRNA and modulation of the IL-4delta2 mRNA isoform in human gastric mucosa. *Infect Immun* **71**: 6664-6667, 2003.
 - 28) **Papini E, Zoratti M, Cover TL**: In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicon* **39**: 1757-1767, 2001.
 - 29) **Perez-Perez GI, Peek RM, Legath AJ, Heine PR, Graff LB**: The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol* **50**: 833-845, 1999.
 - 30) **Pesci EC, Pickett CL**: Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene* **143**: 111-116, 1994.
 - 31) **Pfitzner E, Kliem S, Baus D, Litterst CM**: The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* **10**: 2839-2850, 2004.
 - 32) **Prinz C, Hafsi N, Voland P**: *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol* **11**: 134-138, 2003.
 - 33) **Reyrat JM, Pelicic V, Papini E, Montecucco C, Rappuoli R, Telford JL**: Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol Microbiol* **34**: 197-204, 1999.
 - 34) **Slungaard A, Vercellotti GM, Walker G, Nelson RD, Jacob HS**: Tumor necrosis factor alpha/cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium. *J Exp Med* **171**: 2025-2041, 1990.
 - 35) **Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T, Ra C**: Cutting edge. VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J Immunol* **168**: 2603-2607, 2002.
 - 36) **van Vliet AH, Kuipers EJ, Stoof J, Poppelaars SW, Kusters JG**: Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect Immun* **72**: 766-773, 2004.
 - 37) **Wada A, Yamasaki E, Hirayama T**: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration. *J Biochem* **136**: 741-746, 2004.
 - 38) **Walsh GM**: Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr Opin Hematol* **8**: 28-33, 2001.
 - 39) **Whitney AE, Guarner J, Hutwagner L, Gold BD**: *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults: comparative histopathologic study. *Ann Diagn Pathol* **4**: 279-285, 2000.
 - 40) **Williams TJ, Jose PJ**: Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem Immunol* **78**: 166-177, 2000.
 - 41) **Wong CK, Zhang J, Ip WK, Lam CW**: Intracellular signal transduction in eosinophils and its clinical significance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **24**: 165-186, 2002.
 - 42) **Wu W, Chen Y, Hazen SL**: Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem* **274**: 25933-25944, 1999.