

의학 석사학위 논문

*Helicobacter pylori*와 연관된 저등급 위
MALT 림프종의 상피세포에서 BCA-1의
발현 증가 및 세포자멸사의 감소

아주대학교 대학원

의학과

차충근

*Helicobacter pylori*와 연관된 저등급 위
MALT 림프종의 상피세포에서 BCA-1의
발현 증가 및 세포자멸사의 감소

지도교수 함 기 백

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

차 충 근

차충근의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 조성원 인

심사위원 함기백 인

심사위원 조혜성 인

아주대학교 대학원

2005년 06월 22일

***Helicobacter pylori*와 연관된 저등급 위 MALT 림프종의 상피세포에서 BCA-1의 발현 증가 및 세포자멸사의 감소**

배경 및 목적 *Helicobacter pylori*(*H. pylori*) 감염은 저등급 악성도 MALT 림프종 발생의 주된 원인들중 하나로 알려져 있으나, *H. pylori*에 감염된 환자들 중 소수만이 MALT 림프종으로 진행되는 이유는 아직 명확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서 저자들은 위상피세포에서 B cell attracting chemokine-1(BCA-1)의 발현증가 및 apoptosis의 조절이상인 *H. pylori*와 연관된 위염이 MALT 림프종으로 전환되는데 인과적으로 작용한다는 사실을 새롭게 제시하고자 한다.

연구대상 및 방법 20명의 *H. pylori* 양성 위염 환자, 18명의 *H. pylori* 음성 위염 환자, 그리고 39명의 *H. pylori* 양성 저등급 MALT 림프종 환자들로부터의 조직블록을 이용해 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5에 대한 *in situ* hybridization 및 세포자멸사를 보기 위한 TUNEL 염색을 각각 시행하였다. *H. pylori* 박멸로 MALT 림프종의 완전 관해가 유도된 28명의 환자에서 치료 전후의 BCA-1 및 CXCR5의 변화를 *in situ* hybridization을 이용해 관찰하였다. 또한, 사람의 위 상피세포 및 B 림프구를 *H. pylori*와 동시에 배양하여 *H. pylori* 감염이 BCA-1 및 CXCR5의 발현에 미치는 직접적 영향을 RT-PCR을 이용해 조사하였다.

결과 BCA-1과 CXCR5의 발현이 *H. pylori* 양성 위염 및 *H. pylori* 음성 위염 환

자보다 *H. pylori* 양성 저등급 MALT 림프종 환자에서 유의하게 높았으며, *H. pylori*의 성공적 제균치료로 MALT 림프종의 관해가 유도된 뒤에는 다시 이들의 발현이 유의하게 감소함을 보였다. *H. pylori*에 의한 위염의 상피세포에서 세포자멸사가 상향조절된 것에 비해 *H. pylori*와 연관된 MALT 림프종에서는 세포자멸사가 유의하게 감소된 소견을 보였다. 배양된 위 상피세포에서는 *H. pylori* 감염에 의해 BCA-1의 발현이 직접적으로 유도되었다.

결론 *H. pylori*에 감염된 위상피에서 BCA-1의 발현 증가 및 *apoptosis*의 조절이상 이 MALT 림프종의 발생에 기여할 것으로 생각된다.

핵심어 : *Helicobacter pylori*, Mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma, BCA-1, CXCR5, 세포자멸사

차 례

국문요약	1
차례	3
그림차례	5
표차례	6
I. 서론	7
II. 연구대상 및 방법	10
A. 연구대상	10
B. 방법	11
1. MALT 림프종 진단을 위한 일차항체 및 면역조직화학법	11
2. <i>In situ</i> hybridization	12
3. RNA 분리(<i>isolation</i>) 및 RT-PCR	13
4. 세포자멸사(<i>apoptosis</i>) 및 증식(<i>proliferation</i>)의 검출	14
5. <i>Apoptotic index</i> (AI)	14
6. 통계처리	15
III. 결과	16
A. 저등급 악성도 MALT 림프종의 조직학적, 면역학적 특성	16
B. <i>H. pylori</i> 양성 위염과 저등급 악성도 MALT 림프종에서 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5 발현의 차이	18
C. <i>H. pylori</i> 박멸을 통한 MALT 림프종의 관해 후 BCA-1 및 CXCR5의 변화	20
D. MALT 림프종의 형성과 세포자멸사(<i>apoptosis</i>)	21

E. <i>H. pylori</i> 감염에 의한 BCA-1과 CXCR5 mRNA의 실험실적 유도	24
IV. 고찰	26
V. 결론	30
참고문헌	31
영문요약	37

그림 차례

Fig 1. <i>Immunohistological analysis of human gastric biopsy specimen of low grade MALT lymphoma</i>	17
Fig 2A. <i>Representational figures of in situ hybridization of BCA-1 and CXCR5</i>	18
Fig 2B. <i>Analysis of BCA-1 and CXCR5 expression</i>	19
Fig 2C. <i>Analysis of BCA-1 and CXCR5 expression before and after the eradication of H. pylori in low grade MALT lymphoma</i>	21
Fig 3A. <i>Representational figures of TUNEL staining and immunohistochemical staining of MiB antibody</i>	22
Fig 3B. <i>Analysis of apoptosis and proliferation status in H. pylori-associated gastritis and MALT lymphoma</i>	23
Fig 4. <i>In vitro induction of BCA-1 mRNA and CXCR5 mRNA after H. pylori infection</i>	25

표차례

<i>Table 1. Patients characteristics</i>	10
--	----

I. 서론

정상적으로는 림프조직이 존재하지 않는 위에서 MALT 림프종의 발생은 *H. pylori* 감염의 결과로 인한 *mucosa associated lymphoid tissue*(MALT)의 획득이 선행된다. 저등급 MALT 림프종은 림프절 외 B세포 림프종(*extranodal B-cell lymphoma*)의 한 부류로서, 주로 B세포로 구성되며 임상적, 병리학적, 그리고 분자생물학적 측면에서 공통된 특징을 보인다(Nakamura S 등, 1997; Parsonnet J 등, 1994). 위 MALT 림프종의 위점막 거의 대부분에서 *H. pylori*를 발견할 수 있으며 이는 *H. pylori* 만성위염과 MALT 림프종의 연관성을 제시한다. 실험실적으로 MALT 림프종의 종양세포가 *H. pylori*의 특정 균주에 반응해 증식하고(Lehours P 등, 2004), *H. pylori* 제균치료 후 MALT 림프종이 소멸됨을 보여준 결과들은, 이 미생물이 위에서 림프종의 지속적 성장을 위한 항원적 또는 화학주성적(*chemogenic*) 자극을 제공한다는 가설에 이르게 했다(Wotherspoon AC 등, 1991; Cavalli F 등, 2001; Stolte M 등, 2002). 그러나, 왜 일부분의 환자들에서만 *H. pylori* 감염이 B세포 화학주성과 증식으로 전환되어 MALT 림프종이 발생하는지는 정확히 밝혀지지 않았다.

조직학적으로, MALT 림프종은 1) 림프상피병변(*lympho-epithelial lesion*)을 이루는 상피내 중심세포양 세포(*centrocyte-like cell*); 2) 점막 및 점막하 조직내 반응성 림프소절(*reactive lymphoid follicle*); 3) 소림프구 및 중심세포양 세포의 반점형(*patchy*) 침윤으로 인한 외투층(*mantle zone*)의 다양한 폐색(*obliteration*); 4) 형질세포의 현저한 침윤 등의 특징을 보인다(Cheng H 등, 2003; Remstein ED 등, 2000; Isaacson PG와 Noetion AJ, 1994; Isaacson PG, 1994; Isaacson PG, 1995; Spencer J와 Wotherspoon AC, 1997; Wotherspoon AC, 1998). 제시된 가설들에 의하면, *H.*

pylori 감염이 지속될 때 MALT의 림프계 세포들이 현저히 증식하여 림프 소구 과다형성(*lymphoid follicular hyperplasia*)을 일으키고, 이들 활성화된 세포들은 분자생물학적 종양발생 과정을 거쳐 종양세포로 전환될 수 있고, 전구세포들은 서로 다른 병리적 기전들, 즉, 세포유전학적 변화(*cytogenetic change*), 염색체 이상, 자가면역 클론의 유도, 또는 세포자멸사(*apoptosis*) 조절이상 등에 의해 촉발된 자율적이고 억제불가능한 성장과 함께 서서히 악성 림프종으로 전환된다(Banerjee SK 등, 1997; Steller H, 1995; Chan WY 등, 1998). 그러나, MALT 림프종 발생의 정확한 분자생물학적 기전과 *H. pylori*에 감염된 환자들 중 소수에서만 MALT 림프종이 발생하는 이유는 아직 불명확하다.

B cell attracting chemokine-1(BCA-1)은 *H. pylori*에 감염된 점막으로 림프구들을 끌어들이 수 있으며, 결국 MALT 형성 및 MALT 림프종 발생을 일으킬 수 있는 가능한 매개체로 제시되었다(Carlsen HS 등, 2002; Mazzucchelli L 등, 1999). Chemokine이 림프조직 형성에 관여할 수 있다고 처음 알려진 것은 혈액내 B 림프구 및 Burkitt 림프종의 세포에서 높게 발현되고 chemokine의 수용체로 추정되는 BLR-1(Dobner T 등, 1992) 또는 MDR15(Barella L 등, 1995)에 관한 연구로부터 시작되었다. 이후로, Mazzucchelli L 등(Mazzucchelli L 등, 1999)이 정상 림프 조직에서 귀소(homing) chemokine으로 작용하는 BCA-1이 만성 *H. pylori* 위염에서 유도되며 이들이 림프소구의 형성 및 MALT 림프종의 발생에 주로 관여할 것이라고 주장하였다. 그러나, 그들은 BCA-1이 *H. pylori* 감염 후 림프소절 생성에 연관이 있다는 사실만 확인하였다.

MALT 림프종 발생에 기여하는 또다른 기전으로 Banerjee SK 등(Banerjee SK 등, 2000)은 세포 증식뿐 아니라 세포자멸사에 의한 세포사(*cell death*)의 조절이 *H. pylori*와 연관된 위염이 MALT 림프종으로 전환되고 발전하는데 있어 중요하다고

하였다. 그들은 *H. pylori*와 연관된 MALT에서 *Cdc2/cdk1*이나 *cyclin B1* 같은 몇몇 세포 주기 조절 유전자(*cell cycle regulator gene*)의 높은 발현과 낮은 세포자멸사 활성이 MALT 림프종 발생의 고위험군을 예측하는 잠재적 예후 인자일 수 있다고 하였다. 일단 이러한 변화가 일어나면 *t(11;18)(q21;q21)* 또는 *t(1;14)(p22;q32)*와 같은 염색체 변화가 MALT 림프종의 진행에 관여할 것으로 생각된다(Barella L 등, 1995).

본 연구에서 저자들은 위상피에서 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5의 발현 및 세포자멸사의 조절장애가 *H. pylori* 감염의 결과를 결정지어 MALT 림프종으로의 진행에 기여할 수 있는지 알아보기 위해 *H. pylori* 양성 위염, *H. pylori* 음성 위염, 그리고 *H. pylori*와 연관된 저등급 MALT 림프종 환자들에 대해서 각각 BCA-1, CXCR5, 그리고 세포자멸사 DNA의 조각들(*fragments*)에 대한 *in situ hybridization*을 시행하였다.

II. 연구대상 및 방법

A. 연구대상

조직 표본은 *H. pylori*에 의한 만성 활동성 위염 환자 20명(평균연령 55세), 대부분 비스테로이드성소염제(NSAID)에 의해 유발된 *H. pylori* 음성 위염 환자 18명(평균연령 54세), 그리고 *H. pylori* 양성 저등급 MALT 림프종 환자 39명(평균연령 48세)으로부터 내시경 검사중 채취하였다. 위염은 조직학적으로 modified Sydney classification에 따라 평가되었고, 저등급 MALT 림프종은 표준적인 조직학적 기준

Table 1. Patients characteristics

	<i>H.pylori</i> (-) Gastritis(n=18)	<i>H.pylori</i> (+) Gastritis(n=20)	<i>H.pylori</i> (+) MALToma(n=39)
Male:Female	11 : 7	12 : 8	21 : 18
Mean ages	54.1±5.8	55.0±6.1	48.3±5.5
Endoscopic findings			
<i>Mucosal erythema</i>	12	13	2
<i>Erosive changes</i>	6	7	6
<i>Granular mucosa</i>	-	-	5
<i>Ulceration</i>	-	-	17
<i>Depressed lesion</i>	-	-	6
<i>Protruding lesion</i>	-	-	3
Treatment			
<i>H.pylori eradication</i>	18	20	39(28*)
<i>Resection**</i>			7
<i>Radiotherapy</i>			1
<i>Chemotherapy</i>			3

* denoted the patients showing complete remission after the eradication of *H.pylori*

** means endoscopic mucosal resection(5 cases) or gastrectomy(2 cases)

과 특수 면역조직화학적 방법에 따라 진단되었다(Fig. 1). 39명의 MALT 림프종 환자들 중 28명의 환자들은 H^+ 펌프 억제제(*proton pump inhibitor*)를 기본으로 한 삼제 혹은 사제병합요법으로 *H. pylori*를 박멸치료한 후 시행한 내시경검사 및 조직병리학적 검사결과 완전관해(*complete remission*)를 보였다. *H. pylori* 항생제 치료요법에 저항성을 보인 나머지 11명의 환자들은 내시경 검사상 조기위암 유사 병변이나 현성(*overt*) 악성 림프종, 그리고 궤양이 호전되지 않는 등의 소견을 보여 위절제술이나 항암제, 방사선 치료를 받았다(Table 1). 염증의 활성도는 *H. pylori* 감염에 의해 밀접하게 영향을 받으며, 이는 chemokine의 발현에 영향을 줄 수 있으므로 *H. pylori*에 의한 만성 활동성 위염 환자와 유사한 *gastritis index*를 보이는 *H. pylori* 음성 위염 환자들을 선정하였으며, *gastritis index*는 아주대병원에서 근무하는 독립적인 두 명의 병리학자에 의해 Updated sydney system에 따라 평가되었다.

B. 방법

1. MALT 림프종 진단을 위한 일차항체 및 면역조직화학법

MALT 림프종의 진단을 위해 면역조직화학 염색을 시행하였으며 단클론항체(*monoclonal antibodies*)로는 CD3 T lymphocytes(clone PS1; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK), CD20 B lymphocytes(clone MJ1; Novocastra), CD43 Leukocytes(clone DF-T1; DAKO A/S, Glostrup, Denmark), Pancytokeratin(clone 5D3 and LP34; Novocastra Laboratorie), Kappa (clone kp53; Novocastra Laboratories) and Lambda(clone HP6054; Novocastra Laboratories)를 사용하였다.

면역조직화학 검사를 위해 10% buffered formalin에 고정하여 제작한 파라핀 절

편을 탈파라핀과 함수과정을 거치고 5% *urea*를 섞은 100mM *Tris-buffered saline*(pH 7.6)에 담귀 850W *microwave oven*에서 8분간, 그리고 5분간 2차례 더 가열하였다. 조직절편을 *Tris-buffered saline*으로 세척하고 일차 항체들과 함께 각각 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 항체들은 0.5% *casein sodium salt*(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 포함한 *Tris-buffered saline*과 5% *goat serum*이나 *rabbit serum*로 희석하였다. 일차항체에 노출시킨 뒤, 조직절편들을 *biotinylated rabbit anti-mouse Ig*(DAKO A/S) 1:200 희석액(일차항체 희석시와 동일한 *buffer* 사용) 또는 *biotinylated donkey anti-goat Ig*(Binding site, Birmingham, UK) 1:100 희석액과 반응시키고, 이어서 *streptavidin conjugated alkaline phosphatase*(DAKO A/S)를 *Tris-buffered saline*으로 1:200 희석해 반응시켰다. 조직절편들은 3,3'-diaminobenzidine(DAB, sigma)로 발색시키고 *hematoxylin*으로 대조염색을 시행하였다.

2. *In situ* hybridization

BCA-1 염기배열의 24nt에서 344nt에 해당하는 *biotin-labeled* BCA-1 *probe*를 *in vitro* transcription을 이용해 만들었다(Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). 파라핀 절편들은 파라핀을 제거하고 *graded alcohol*로 함수하였다. 1mg/mL *proteinase K*로 37°C에서 30분간 반응시켜 단백을 제거하고 *Phosphate buffered saline*(PBS)에서 5분간 0.1M *glycine*으로 고정하였다. 조직 슬라이드들을 4% *paraformaldehyde*로 후고정시키고 *graded alcohol*에서 탈수과정을 거쳤으며, 이어서 상온에서 0.1M *triethanolamine*(pH 8.0)으로 3분간, 그리고 0.1M *triethanolamine*(pH 8.0)과 4% *acetic anhydride* 혼합액으로 10분간 처리하였다. 물로 세척하고 *graded alcohol*로 탈수시킨 뒤, 슬라이드를 대기중에 건조시키고

BCA-1 또는 CXCR5 mRNA *probe*와 반응시켰다. *Hybridization* 용액(10% dextran sulfate, 50% deionized formamide, 300 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA, 1x Denhardt's solution, and 100 mM DTT)에 희석시킨 *sense* 또는 *antisense probe*와 함께 45°C에서 하룻밤 동안 *in situ hybridization*을 시행하였다. *Hybridization* 시행 후, 절편들을 10 mM DTT, 50% formamide, 1 mM EDTA (pH 8.0), 그리고 2x SSC 용액으로 54°C에서 30분간 세척하고, 2x SSC와 10mM DTT 혼합액으로 두 차례 더 세척하였다. 이어서 슬라이드들을 100,000 U/mL RNase T1 (Boehringer Mannheim GmbH)과 1,000 U/mL RNase A (Boehringer Mannheim GmbH)로 37°C에서 30분간 처리하였다. 추가세척 후, 조직들은 탈수와 대기중 건조를 거친 후 NBT-BCIP 용액에 담그고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였다. mRNA 발현의 강도는 0; none, 1; mild intensity, 4; dense intensity, 그리고 2 and 3는 intermediate intensity between 1 and 4로 각각 점수화 하였다. 또한 관심있는 유전자 mRNA의 존재를 암시하는 파란 색조의 반응강도를 측정하여 점수화에 고려하였다. 점수는 환자군을 모르는 세 명의 병리의사에 의해 결정한 뒤 평균하였다.

3. RNA 분리(isolation) 및 RT-PCR

*H. pylori*로 처리한 여섯 개의 서로 다른 위상피세포들과 네 개의 서로 다른 말초 B 림프구들로부터 TRIzol 시약(Life technologies, Milan, Italy)을 이용해 전체 RNA를 분리해 내고, 전체 RNA 중 2µg을 M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, MD)를 이용해 제조사의 메뉴얼에 따라 역전사하였다. Premix Ex Taq kit (Takara, Chiba, Japan)를 이용해 다음에 열거한 특정 *primer*들로 PCR을 시행하였다: 5'-GGG CTC GAG AGA ATG AAG AAG TTC ATC-3' and 5' -GGG CTG

CAG GGG AAT CTT TCT TCT CTT-3' for BCA-1, 5'-TTA GAA TTC GAC TCA CAG CCG GCA CAG C-3' and 5'-GTG AGC CCT TAG GAT CCC AGC-3' for CXCR5; 5'-TTG TTG CCA TCA ATG ACC CC-3' and 5'-TGA CAA AGT GGT CGT TGA GG-3' for GAPDH. PCR 반응은 94°C에서 1분, 55°C (BCA-1), 60°C(CXCR5), 또는 55°C(GAPDH)에서 1분, 그리고 72°C에서 1분 30초의 온도주기로 총 28회 시행하였다. PCR product는 1% agarose gel에 주입한 뒤 ethidium bromide로 염색하였다.

4. 세포자멸사(apoptosis) 및 증식(proliferation)의 검출

세포고사는 TdT FragEL DNA fragmentation detection kit (Oncogene Research Products)를 이용해 시각화하였으며, 염색 과정은 제작사의 지침에 따라 조정하였다. 파라핀에 고정된 조직을 탈파라핀, 함수, 그리고 1x PBS(pH 7.4)로 세척한 뒤 proteinase K(20mg/mL in 1x PBS)로 상온에서 20분간 분해한 후 세척하였다. 조직절편을 equilibration buffer에서 10분간 반응시킨 후, terminal deoxynucleotidyltransferase(TdT) 효소로 37°C에서 1시간동안 처리하였으며 methyl green으로 대조염색하였다.

5. Apoptotic index(AI)

모든 슬라이드들은 환자의 임상적, 조직학적 소견을 모르는 상태에서 세번에 걸쳐 점수화하였다. AI의 평가는 *H. pylori* 음성 위염 환자, *H. pylori* 양성 만성 위염 환자, 그리고 저등급 MALT 림프종 환자들로부터 얻은 파라핀 고정된 위 조직들을 이용해 시행하였다. 정상부위와 병변부위의 AI를 결정하기 위해, TUNEL로 염색한 절편들을 저배율(100x)로 검색하여 lamina propria 부위의 apoptotic hot

spot(TUNEL 양성 림프구가 최대인 부위), *organized mucosal lymphoid tissue*(즉, *germinal center*, *mantle zone*, *marginal zone*), 그리고 *intraepithelial lymphocytes* 로 분류하였다. 이후, 400x 시야에서 TUNEL 양성 세포의 수에 따라 AI를 평가하였다. 적어도 다섯 개의 *hot spot*을 선정해 평균값을 계산하였으며, 각각의 슬라이드로부터 적어도 500개의 세포핵들이 계산에 포함되었다. 정보는 전체 세포수의 평균 백분율로 나타내었다. 세포의 사진들은 Zeiss 사진현미경으로 촬영하였다. 유사한 방법으로 MiB 항체를 이용한 면역화학조직 염색으로 *proliferation index*를 평가하였다.

6. 통계 처리

자료 분석은 χ^2 , *Pearson's correlation coefficient*, *regression analysis*, 그리고 *Student's t-test*를 이용하였다. 모든 통계 분석에는 SPSS와 *Sigma Stat for personal computer*를 이용하였고, *p value*가 0.05 미만인 경우를 유의한 값으로 인정하였다.

III. 결 과

A. 저등급 MALT 림프종의 조직학적, 면역학적 특성

H. pylori 양성 위염 표본에서 *lymphoid follicle*을 동반한 만성 활동성 위염이 관찰되었다. *H. pylori*는 hematoxylin and eosin(H&E) 또는 modified Giemsa 염색을 통해 점막 표면에서 확인되었다. H&E와 modified Giemsa 염색 결과 *H. pylori*가 발견되지 않고, *urea breath test*와 *rapid urease test*에서 각각 음성이 나온 경우를 *H. pylori*와 연관되지 않은 위염으로 분류하였다. 저등급 MALT 림프종의 진단은 위내시경소견, 표준적인 조직학적 기준, 그리고 면역조직화학법(Fig. 1)을 통해 이루어졌다. 조직학적으로는, 증식하는 종양세포들 및 중심세포와 유사한 세포들이 반점형(patchy) 또는 미만형으로 점막의 심층부를 포함한 고유판(lamina propria)과 점막하층을 침윤하여 점막 위축이 초래되었다. 이러한 세포들의 형태는 소림프구(*small lymphocyte*), 소분할세포(*small-cleaved cell*), 그리고 아주 풍부하고, 잘 구분되는 세포질을 갖는 단핵구모양 세포(*monocytoid cell*)까지 다양하였다. 이들 종양세포들은 CD20(Fig.1d)과 CD43(Fig. 1e) 단클론항체에 양성반응을 보였으나, CD3 항체(Fig. 1c)에는 음성반응을 보였다. 더불어, 이들 세포들은 Kappa 또는 Lambda 항체(Fig. 1g)에 대한 면역조직화학 염색에 대해 단클론적인 발현을 보였다. 또한, 종양 세포들은 샘상피(*glandular epithelium*)를 침윤하여 림프상피병변을 형성하였으며, *pancytokeratin-3* 항체(Fig. 1f)를 이용한 면역조직화학 염색상에서 강한 반응을 보였다. 형질세포(*plasma cell*)의 왕성한 침윤과 함께 림프소절(*lymphoid follicle*)의 과다형성(*hyperplasia*)도 관찰되었다. 대부분의 경우에서 주변 점막들로부터 만성 활동성 *H. pylori* 위염이 관찰되었다.

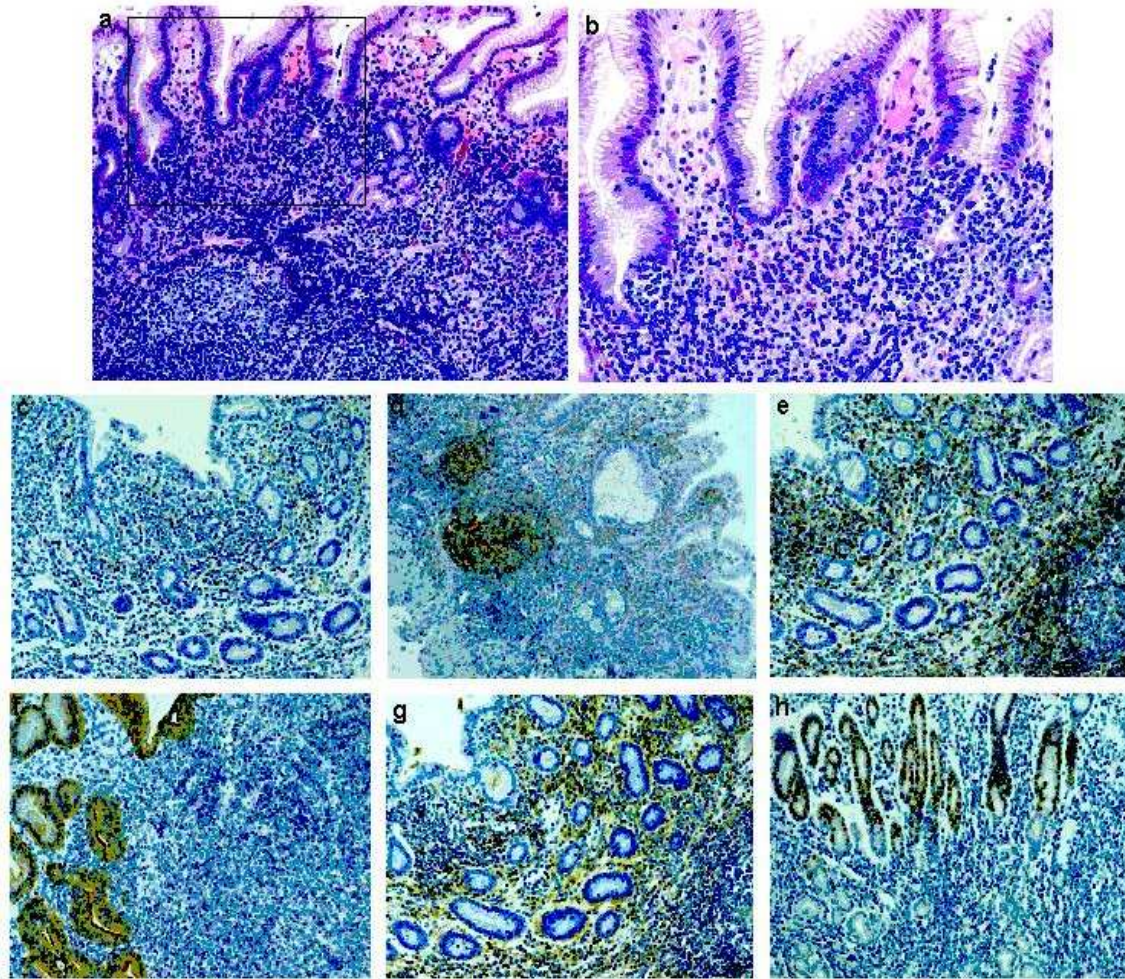


Fig. 1. Immunohistological analysis of human gastric biopsy specimen of low grade MALT lymphoma. Histopathology(a,b) and immunohistochemical staining with CD 3(c), CD 20(d), CD43(e), pancytokeratin-3(f), lambda(g), and MiB(h), respectively all are suggestive of low grade MALT lymphoma with endoscopic findings.

B. *H. pylori* 양성 위염과 저등급 MALT 림프종에서 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5 발현의 차이

BCA-1의 발현이 저등급 MALT 림프종의 생성에 기여하는지 여부와 *H. pylori*가 그 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, *H. pylori* 양성 위염, *H. pylori*와 연관된 MALT 림프종, 그리고 대조군인 *H. pylori* 음성 위염 환자들 각각의 위조직에서 *in situ* hybridization을 이용해 BCA-1 mRNA의 발현을 검사하였다(Fig. 2A). 발현의 정도를 평균치로 표현한 결과 Fig. 2B와 같았다. *H. pylori* 음성(Fig. 2A, a) 및 양성(Fig. 2A, b) 위염 환자들의 조직에서는 BCA-1 발현이 위선 상피세포 및 고유판에서 모두 희미하거나 약한 정도로 나타났다. 저등급 MALT 림프종 환자들에서는

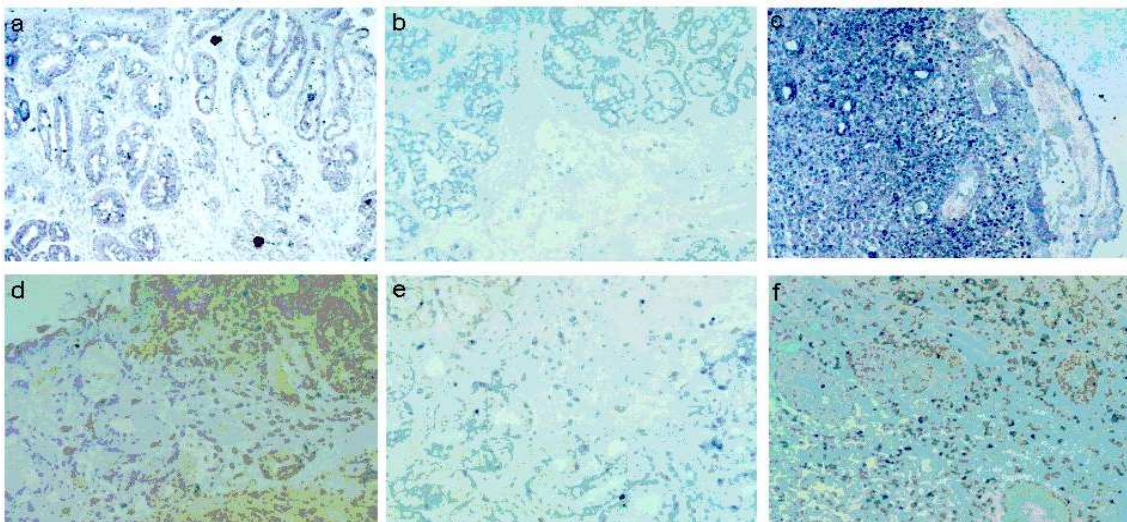


Fig. 2A. Representational figures of *in situ* hybridization of BCA-1 and CXCR5. *In situ* hybridization of BCA-1 was performed in *H. pylori* negative gastritis(a), *H. pylori* positive gastritis(b), low grade MALToma(c) and *in situ* hybridization of CXCR5 in *H. pylori* negative gastritis(d), *H. pylori* positive gastritis(e), and MALToma(f)(x100 magnification).

BCA-1의 발현이 확인하였으며, 대부분 위점막 상피세포 및 침윤된 B 림프구들에
 서 관찰되었다(F2A. c). BCA-1 발현의 강도를 비교한 Fig. 2B를 보면, *H. pylori*
 감염 여부와 무관하게 위염보다 저등급 MALT 림프종에서 BCA-1의 발현이 유의
 하게($p<0.01$) 더 높게 나타났으며, 이들은 주로 상피세포와 종양조직의 림프구에 분

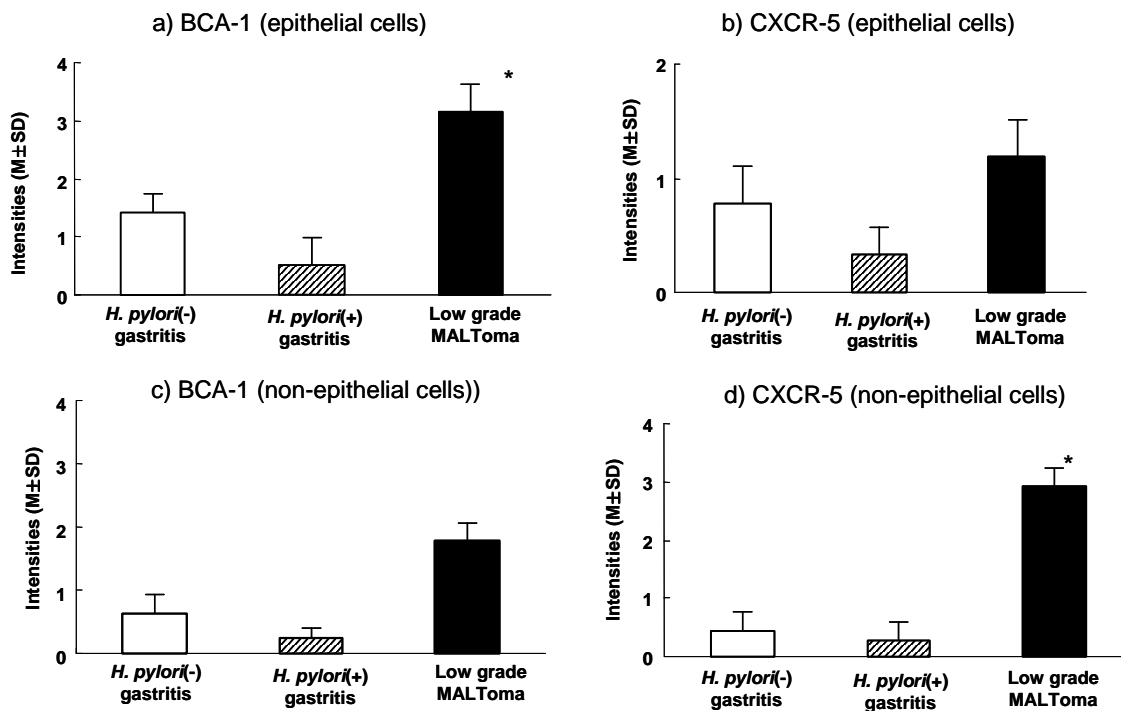


Fig. 2B. Analysis of BCA-1 and CXCR5 expression. Expression of BCA-1 mRNA in epithelial cells(a) and non-epithelial cells(c) and the expression of CXCR5 mRNA in epithelial cells(b) and non-epithelial cells(d) were represented as a mean intensity. * indicated that a statistical significance is $p<0.01$.

포되어 있었다. 또한 이들 chemokine의 표적을 알아보기 위해 BCA-1의 수용체인 CXCR5의 발현을 조사한 결과, CXCR5는 *H. pylori* 감염과 무관하게 위염조직에서는 그 발현이 뚜렷하지 않았으나, 저등급 MALT 림프종에 침윤된 림프구들에서는 그 발현이 분명하게 관찰되었다. CXCR5의 발현은 상피세포보다 림프구에서 세 배 더 강하게 나타났고, 이는 형질전환된 조직의 chemokine 증가가 위점막으로의 림프구 침윤을 일으킴을 보여준다(Fig. 2B, d). 요약하면, 본 연구에서는 *H. pylori*와 연관된 MALT 림프종에서 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5의 발현이 모두 증가됨을 보여주었고, 이러한 변화는 *H. pylori*에 감염된 숙주가 MALT 림프종으로 진행될지의 운명을 결정짓는다 하겠다. 이들 chemokine은 림프구 뿐 아니라 위상피세포에서도 생산되나, 그 수용체가 림프구에서만 확연히 발현된다는 사실은, *H. pylori*가 감염된 위점막 상피세포의 BCA-1 발현을 자극하고, 이로 인해 *H. pylori*에 감염된 위점막으로 림프구를 동원할 수 있게 됨을 보여준다. *H. pylori* 감염은 MALT 림프형성(lymphogenesis) 이외에도, 림프구에서의 CXCR5 유도를 통해, 결과적으로, 림프구들의 위점막으로의 귀순(homing) 및 주변 림프구들의 활성화를 도움으로써 MALT 림프종의 진행에 기여할 것으로 본다.

C. *H. pylori* 박멸을 통한 MALT 림프종의 관해 후 BCA-1 및 CXCR5의 변화

H. pylori 박멸은 일반적으로 저등급 MALT 림프종의 일차 선택치료로 인정되어 있으므로, 저자는 *H. pylori* 박멸로 MALT 림프종의 완전 관해가 유도된 28명의 환자에서 BCA-1 및 CXCR5의 치료 전후의 변화를 관찰하였다. 위상피세포의 BCA-1 및 림프구의 CXCR5 발현 모두 MALT 림프종의 소멸 후 통계적으로 유의하게 감소하였으며(Fig. 2C, $p < 0.01$), 이는 MALT 림프종의 발생 과정상, *H. pylori* 감염이 BCA-1 및 CXCR5의 발현과 밀접한 관련이 있음을 보여준다.

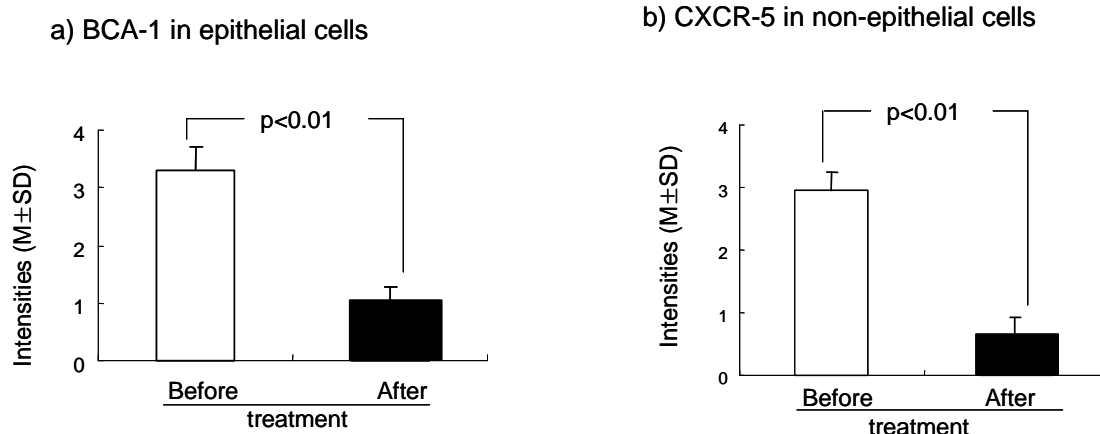


Fig. 2C. Analysis of BCA-1 and CXCR5 expression before and after the eradication of *H. pylori* in low grade MALT lymphoma. The changes of BCA-1 and CXCR5 mRNA after the remission of low grade MALT lymphoma with the eradication of *H. pylori* through proton pump inhibitor based triple therapy. Note that BCA-1 expression in gastric epithelial cells and CXCR5 expression in lymphocytes were all statistically significantly decreased after eradication of *H. pylori*.

D. MALT 림프종의 형성과 세포자멸사

악성 림프종에서 *bcl-2*와 같은 항세포자멸사(*anti-apoptotic*) 물질이 일반적으로 증가되어 있으며, 이는 림프종의 비정상적 클론 증식을 위해 세포자멸사의 감소가 필요함을 보여준다. 그러므로, *H. pylori*와 연관된 위염과 MALT 림프종 간의 세포자멸사 및 증식에 관한 비교가 필요하다 하겠다. TUNEL 염색을 통해 세포자멸사의 정도를 *Apoptotic Index(AD)*로 점수화하고, MiB 항체를 이용한 면역조직화학 염색을 이용해 증식의 정도를 *Proliferation Index(PD)*로 나타내었다(Fig. 3A).

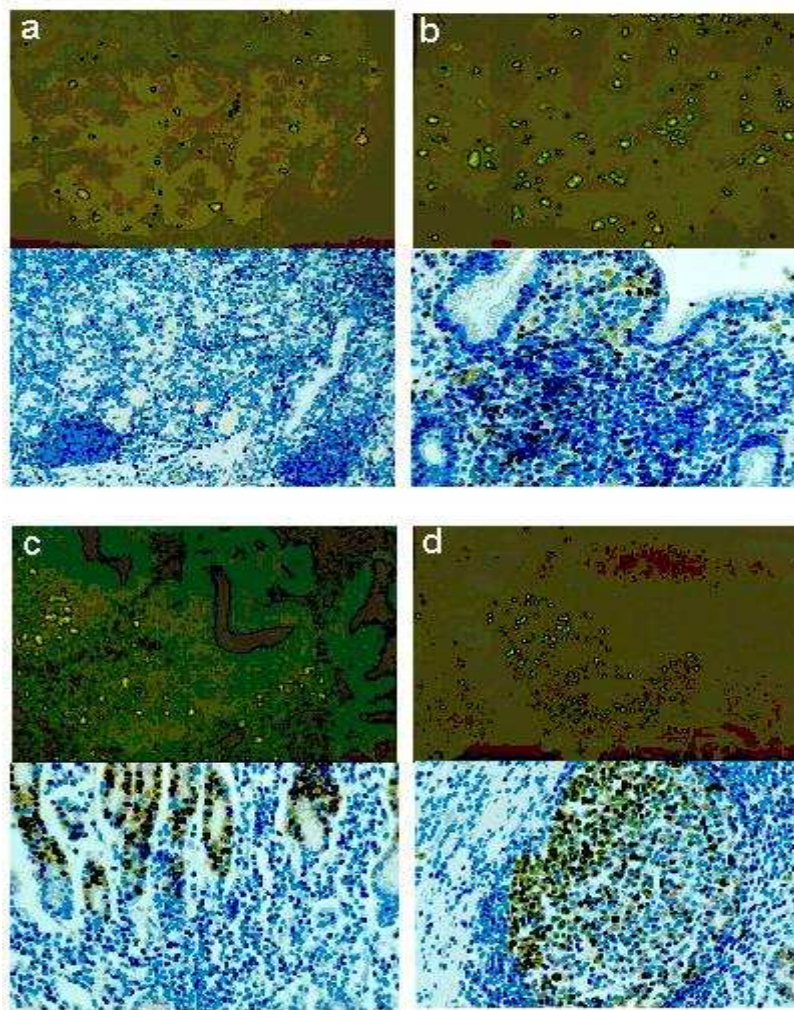


Fig. 3A. Representational figures of TUNEL staining and immunohistochemical staining of MiB antibody. TUNEL staining(upper) and immunohistochemical staining of MiB antibody(lower) were performed to detect apoptotic death and proliferation of cells during evaluation of MALToma. *a* denotes *H. pylori*-negative gastritis, *b* is *H. pylori*-associated gastritis, and *c* and *d* are patients of MALToma(x100 magnification).

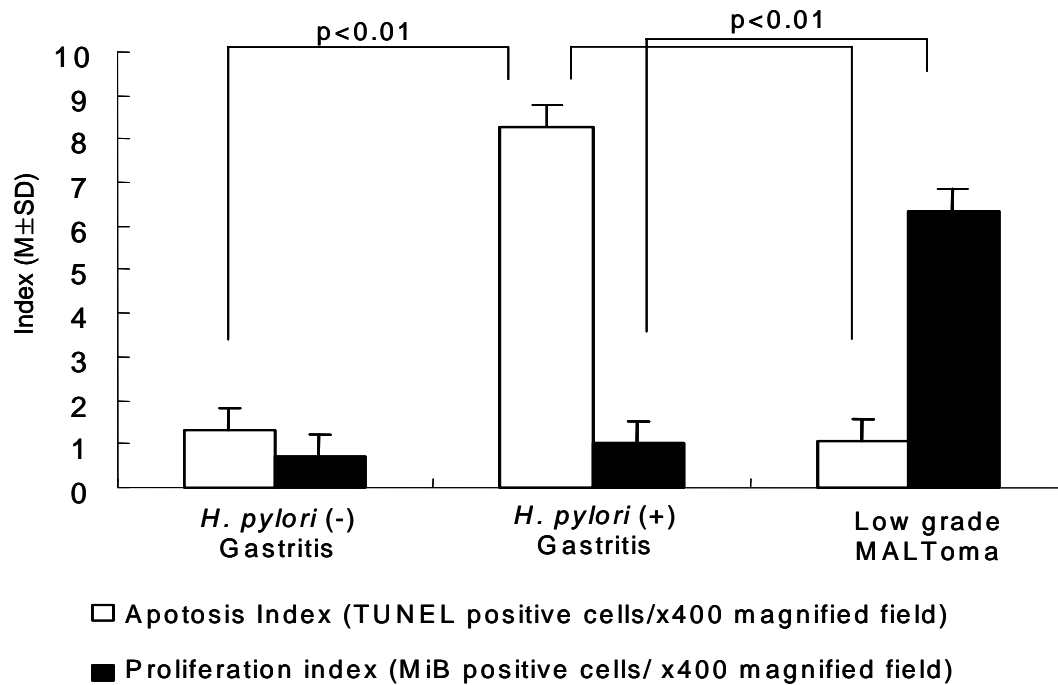


Fig. 3B. Analysis of apoptosis and proliferation status in *H. pylori*-associated gastritis and MALT lymphoma. Level of apoptosis and proliferation in gastric mucosa were presented as mean apoptotic index(AI) and proliferation index(PI). While MiB+ proliferating cells were detected predominantly in gastric gland epithelial cells, apoptotic cells were clearly up-regulated in *H. pylori*-associated gastritis, but most apoptotic cells were only observed in lymphocytes in MALToma with prominent loss in gastric epithelial cells. The PI was reversibly observed with AI.

H. pylori 음성 위염, *H. pylori* 양성 위염, 그리고 *H. pylori*와 연관된 MALT 림프종 환자들의 파라핀 절편들로부터 얻어진 위점막 상피세포내의 세포자멸사를 조사한 결과, 평균 AI 점수상 1.3 ± 0.3 %, 8.1 ± 0.2 %, 그리고 1.0 ± 0.3 %로 각각 측정되었다. 통계분석 결과, *H. pylori* 양성 위염이 *H. pylori* 음성 위염보다 AI가 월등히 높은 것으로 나왔다($p < 0.01$). 그러나, *H. pylori* 감염으로 인한 이러한 상피 세포자멸사의 확연한 증가는 MALT 림프종 상피에서 유의하게 감소되어 있었으며, 이는 *H. pylori* 감염에도 불구하고 MALT 림프형성에는 상피 세포자멸사의 감소가 관여함을 보여준다. 저자들은 부가적으로 *H. pylori*와 연관된 위염 및 MALT 림프종에서 MiB 항체를 이용한 면역조직화학염색을 통해 PI를 조사하였다. 분석 결과 MiB+ 증식 세포들은 주로 저등급 MALT 림프종의 상피세포와 종자층(germinal layer)의 림프구에서 발견되었다(Fig. 3A, 3B). MALT 림프종에서 BCA-1 발현과 상피 세포자멸사 사이에는 유의한 역상관관계가 있었다($p = 0.002$, $r = 0.884$). 결과적으로, 상피세포에서 세포자멸사의 감소와 증식작용의 증가가 BCA-1의 유도와 동반하여 저등급 MALT 림프종이 발생되기 쉬운 환경을 제공할 것으로 생각된다.

E. *H. pylori* 감염에 의한 BCA-1과 CXCR5 mRNA의 실험실적 유도

저자는 RT-PCR을 이용해 *H. pylori* 감염이 위상피세포에서 BCA-1 및 CXCR5의 발현에 미치는 직접적 영향을 조사하였다(Fig. 4). *H. pylori*를 사람의 위 상피세포와 동시배양 했을 때 6개의 세포 계열중 5개에서 유의한 BCA-1 mRNA의 발현이 유도되었으며, 그 중 AGS, MKN-45, 그리고 SNU601의 세 개의 세포 계열에서는 6시간 동안의 *H. pylori* 감염에 의해 BCA-1의 현저한 유도를 보였다. 사람의 B 림프구에서도 절반가량에서 *H. pylori*로 처리 후 BCA-1 mRNA가 유도되었으나, 상피세포보다 발현 강도가 약했다. BCA-1의 발현과는 반대로, CXCR5의 경우 상피

세포에서는 *H. pylori* 감염에도 불구하고 미약하게 발현되었으나, B 림프구에서는 *H. pylori* 처리 후 CXCR5의 유의한 발현을 보였다. 이들 결과는 *H. pylori*가 상피 세포에서 BCA-1을 유도할 수 있고 B 림프구의 CXCR5 발현을 촉진한다는 것을 보여주며, 이는 *H. pylori* 감염 후 상피세포내의 부적절한 BCA-1 발현과 세포자멸사의 조절이상인 MALT 림프종의 발생에 기여한다는 이전의 생체내 증거들을 뒷받침해 준다고 하겠다.

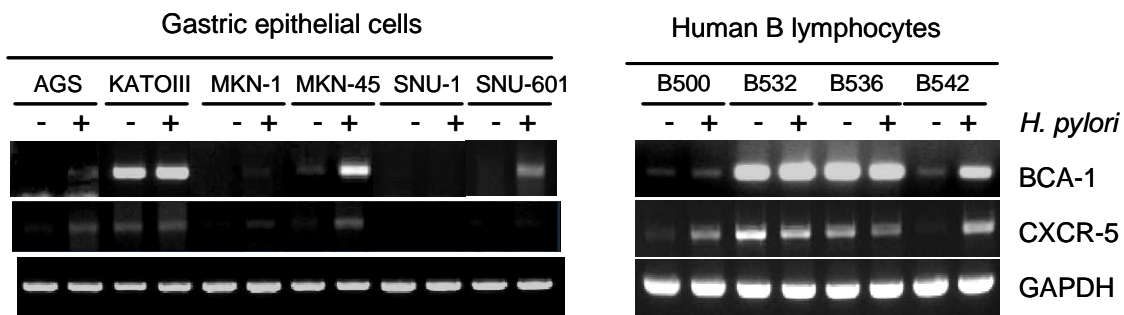


Fig. 4. *In vitro* induction of BCA-1 mRNA and CXCR5 mRNA after *H. pylori* infection. Six human gastric epithelial cells and four different B lymphocytes were co-cultured with *H. pylori* for 6h at the concentration of 5×10^7 CFU/ml. Total RNA was extracted from the cells, reverse transcribed, and performed PCR with specific primers corresponding to BCA-1, CXCR5, and GAPDH, respectively.

IV. 고찰

1991년부터 여러 연구를 통해 위 림프종에서 *H. pylori* 감염의 높은 유병율이 기술되어 왔다. Wotherspoon 등(Wotherspoon AC 등, 1991)은 110명의 위 MALT 림프종 환자들 중 101명에서 *H. pylori* 균을 확인하였으며, Eidt 등(Eidt S 등, 1994)은 연구대상인 121명의 위 MALT 림프종 환자 전체에서 *H. pylori* 균을 발견하였다. Fischbach 등(Fischbach W 등, 1993)은 133명의 원발성 위 림프종환자들 중 74명(56%)에서, 그리고, 저등급 MALT 림프종 환자들 중 77%에서 *H. pylori* 균이 발견되었음을 보고하였다. 이들 연구결과는 *H. pylori*가 MALT 림프종의 유발 인자임을 뒷받침하는 것이다. 또한 *H. pylori* 감염과 MALT 림프종 발생간의 상관관계는 *H. pylori*를 박멸치료 한 뒤 위 림프종의 관해가 유도됨을 통해 입증되었다.

Chemokine은 순환 중인 림프구를 림프 및 비림프조직으로 이동하게 할 뿐 아니라 염증부위로도 이동하도록 조종한다(Baggiolini M, 1998; Zlotnik A와 Yoshie O, 2000; Cyster JG, 1999). 이들은 아미노 말단부위(*amino-terminal region*)에 보존된 *cystein* 잔류기들(*residues*)의 숫자 및 배열에 의해 CC, CXC, CX3C 그리고 C(X : 보존되지 않은 아미노산 잔류기)의 네 가지의 하위그룹으로 분류되었다(Chan CC 등, 1998; Legler DF 등, 1998; Schaerli P 등, 2000; Forster R 등, 1996). 인간의 B *cell-attracting chemokine-1*(BCA-1)은 B 세포에 특이한 CXC chemokine으로 밝혀졌다(Jenh CH 등, 2001). 쥐에서 인간의 BCA-1에 해당하는 BLC1을 선택적으로 파괴하면, B 세포들이 B 세포 영역으로 진입하지 못하게 되고, 결과적으로 비장 및 Peyer반(Peyer's patch)에서 일차소절(*primary follicle*) 및 종자 중심(*germinal center*)의 불완전한 형성을 보였으며(Forster R 등, 1996), 이는 인간의 BCA-1과 쥐의 BLC1이 B 림프구에 선택적인 효과적 유인물질일 수 있음을 보

여준다 하겠다. 또한, chemokine의 수용체인 BLR1(*Burkitt's lymphoma receptor* 1), 즉 CXCR5는 모든 성숙한 B 세포에서 발현되며, 현재까지 알려진 BCA-1의 유일한 수용체이다. 그러므로, BCA-1과 그 수용체인 CXCR5의 소실은 비장과 Peyer 반의 소절 형성을 방해하는데 충분하다 하겠다.

Mazzucchelli L 등(Mazzucchelli L 등, 1999)은 *H. pylori*에 감염된 만성위염 환자와 *H. pylori*와 연관된 저등급 및 고등급 MALT 림프종 환자들로부터 얻은 위 조직 표본들에서 BCA-1과 SLC(*secondary lymphoid tissue chemokine*)의 발현을 조사한 연구를 통해 중요한 결과를 이끌어 내었다. 이들은 *H. pylori*에 의해 유발된 모든 MALT 조직의 점막 림프구 집합체(*mucosal lymphoid aggregation*)와 이차 림프소절(*secondary lymphoid follicle*)의 외투층(*mantle zone*)에서 BCA-1 및 그 수용체의 높은 발현을 관찰하였다. *H. pylori*로 인한 위염의 모든 표본에서 BCA-1의 확연한 발현을 관찰한 것에 부가적으로, 위전정부와 체부 고유판(*lamina propria*)의 MALT 이외 부위에서도 종종 BCA-1을 발현하는 세포들이 발견되었으며, 심지어 *H. pylori* 음성 위염이나 NSAID에 의해 유발된 위염에서도 발견되었다. 이렇게 증가된 chemokine은 주로 B 림프구나 소포 가지세포(*follicular dendritic cell*)에서 발현되었으며, 위 상피세포, T 림프구, 대식세포, 그리고, CD1a⁺ 세포들에서는 발현되지 않았다.

본 연구에서는 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5가 *H. pylori* 감염 후 발생한 세포자멸사의 조절이상과 함께 저등급 MALT 림프종의 발생과 병인론적 연관성이 있음을 보여주는 새로운 증거를 부가적으로 제시하였다. 저자들은 BCA-1과 그 수용체인 CXCR5가 *H. pylori* 감염에 의해 유의하게 유도되며, 전자는 주로 감염된 상피세포에서, 그리고 후자는 주로 침윤한 B 세포에서 유도됨을 발견하였으며, 이들의 증가된 발현은 감염된 위점막에서 세포 증식 및 세포자멸사를 유의하게 조절하였

고, 이러한 협력 작용의 결과, *H. pylori* 감염이 저등급 MALT 림프종의 발생으로 이어질 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 배양된 인간의 위 상피세포 및 B 림프구를 *H. pylori*에 감염시킨 뒤 관찰한 결과, 위 상피세포에서는 BCA-1이 그리고 B 림프구에서는 CXCR5가 유의하게 유도됨을 실험실적으로 확인하였다. Mazzucchelli L 등(Mazzucchelli L 등, 1999)의 연구 결과와 비교하면, *H. pylori*에 감염된 위점막에서의 BCA-1 유도 양상이 본 연구와는 상당한 차이를 보였다. 본 연구의 결과를 뒷받침하는 문헌들로는 Sjogren 증후군 환자들의 침샘의 만성 염증 조직(Xanthou G 등, 2001) 및 원발성 안구내(intraocular) 림프종 환자들의 눈(Chan CC 등, 1998)으로부터 얻은 상피세포들에서 BCA-1 mRNA의 발현을 보여준 것이나 Carlsen HS 등(Carlsen HS 등, 2002)이 정상적인 장점막 및 염증성 장점막에서 BCA-1 mRNA의 변화를 보기 위해 RT-PCR을 시행한 연구등을 들 수 있다.

종양 발생의 과정은 세포 증식과 세포자멸사간의 균형이 깨져 일어나는 것으로 생각할 수 있다. 같은 원리가 MALT 림프종의 발생에도 작용하였다. Bannerjee SK 등(Banerjee SK 등, 2000)은 세포주기 조절 단백질(*cell cycle regulatory protein*)과 세포자멸사에 의한 세포사가 *H. pylori* 위염이 MALT 림프종으로 전환되는데 어떤 연관이 있는지 연구한 결과, *cdc2/cdk1*과 *cyclin B₁*의 발현이 *H. pylori*와 연관된 위염이 MALT 림프종으로 진행되는 동안 세포증식 및 형질전환(*transformation*) 뿐만 아니라 세포자멸사에 의한 세포사를 조절하는데 활발하게 관여함을 발견하였다.

정상 위에서는 세포자멸사가 생리적 상피 교체(*epithelial turnover*)를 조정하며 약 2% 정도의 상피세포들에서 세포자멸사가 일어나게 된다. 그러나, *H. pylori*와 연관된 위염에서는 위 상피세포의 세포자멸사가 약 8-12%까지 중등도의 증가를 보인다(Von Herbay X와 Rudi J, 2000; Hahm KB 등, 1997). 본 연구에서도 *H. pylori*에 의해 유발된 위염의 상피세포에서 상향 조절된 세포자멸사를 발견하였다. 그러

나, *H. pylori*와 연관된 MALT 림프종 환자들의 표본에서는 세포자멸사가 유의하게 감소하는 결과를 보였다. MALT 림프종 환자들의 위상피세포에서는 세포자멸사가 감소하였으나, MALT 림프종에 침윤된 림프구들에서는 밀집된 세포자멸사에 의한 세포사가 관찰되었다. 이러한 결과는 본 연구에서 BCA-1의 주된 출처가 위상피세포였으므로 상피세포의 증가된 증식 능력으로 인해 B 세포를 유인하는 chemokine이 지속적이고 풍부하게 제공될 수 있게 됨을 의미한다 하겠다. 침윤된 림프구들에서 세포자멸사에 의한 세포사가 크게 증가한 것은 정확한 기전은 알 수 없으나 B 세포의 클론성 팽창(*clonal expansion*) 과정에서 일어난 부수적 결과로 추정된다. 이상과 같은 뚜렷한 세포자멸사의 조절과정들이 *H. pylori*와 연관된 MALT 림프종의 발생에 기여할 것으로 보인다.

결론적으로, *H. pylori*는 위 점막에서 MALT 조직의 획득을 유발할 수 있으며, 이러한 환자들 중 위상피세포에서 BCA-1의 발현이 증가하고 침윤된 림프구에서는 CXCR5의 발현이 증가되어 *H. pylori*에 감염된 위점막에 더 많은 B 림프구들을 동원하게 되는 과정을 거치는 일부 환자집단에서 림프조직이 MALT 림프종의 전구 세포를 제공하고 결국 MALT 림프종의 발생에 이르게 될 것으로 생각된다. 이러한 chemokine의 변화와 동반해서 세포자멸사의 조절이상이 클론성 팽창의 기회를 제공하게 된다. 발생이 시작된 MALT 림프종은 보다 강하게 하향 조절된 세포자멸사 뿐 아니라 여러 가지 발암 과정들, 즉 세포유전학적 변화(*cytogenetic change*), 염색체 이상, 그리고 자가면역 클론의 유도 등에 의한 형질전환 과정을 통해 단계적으로 악성 림프종으로 변하는 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 처음으로 *H. pylori*가 감염된 위상피세포에서 생체내 및 실험실적으로 BCA-1을 유도할 수 있음을 증명하였고, *H. pylori*에 감염된 위상피세포에서 BCA-1의 발현 증가와 함께 세포자멸사의 조절이상으로 인해 비정상적으로 증가된 증식상태가 MALT 림프종의 발생에 기여할 수 있을 것으로 생각되며, 이는 *H. pylori*에 감염된 환자에서 감염에 대한 숙주의 상피 반응(*epithelial response*)이 저등급 악성도 MALT 림프종의 발생 여부를 결정할 수 있음을 보여준다 하겠다. 이외에도 $t(11;18)(q21;q21)$ 이나 $t(1;14)(p22;q32)$ 과 같은 염색체 변화(Liu H 등, 2001) 등이 MALT 림프종의 진행에 기여할 것이다. 이상을 요약하여 *H. pylori*와 연관된 저등급 MALT 림프종의 병인론을 추정해보면, 위 상피세포에서 BCA-1의 발현 증가와 세포자멸사의 감소로 인해 *H. pylori*에 감염된 위 점막으로 B 림프구의 동원이 촉진되고 지속적으로 증가될 것이며, 이어서 MALT 증식이 일어나고, 이는 위 악성 림프종으로 진행될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-8, 1998
2. Banerjee SK, Weston AP, Persons DL, Campbell DR. Non-random loss of chromosome 3 during transition of *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT to B-cell MALT lymphoma revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Lett.*, 121, 83-90, 1997
3. Banerjee SK, Weston AP, Zoubine MN, Campbell DR, Cherian R. Expression of cdc2 and Cyclin B₁ in *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT and MALT lymphoma. *Am J Pathol*, 156, 217-25, 2000
4. Barella L, Loetscher M, Tobler A, Baggiolini M, Moser B. Sequence variation of a novel heptahelical leukocyte receptor through alterative transcript formation. *Biochem J*, 309, 773-9, 1995
5. Carlsen HS, Baekkevold ES, Johansen FE, Haraldsen G, Brandtzaeg P. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut*, 51, 364-71, 2002
6. Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, Zucca E. MALT lymphomas. *Hematology*, 241-258, 2001
7. Chan CC, Shen D, Hackett JJ, Buggage RR, Tuaille N. Expression of chemokine receptors, CXCR4 and CXCR5, and chemokines, BLC and SDF-1, in the eyes of

patients with primary intraocular lymphoma. *Ophthalmology*, 110, 421-6, 1998

8. Chan WY, Wong N, Chan AB, Chow JH, Lee JC. Consistent copy number gain in chromosome 12 in primary diffuse large cell lymphoma of the stomach. *Am J Pathol*, 152, 11-6, 1998
9. Cheng H, Wang J, Zhang CS, Yan PS, Zhang XH, Hu PZ, Ma FC. Clinicopathologic study of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in gastroscopic biopsy. *World J Gastroenterol*, 9, 1270-2, 2003
10. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*, 286, 2098-102, 1999
11. Dobner T, Wolf I, Emrich T, Lipp M. Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma. *Eur J Immunol*, 22, 2795-9, 1992
12. Eidt S, Stolte M, Fischer R. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol*, 47, 436-439, 1994
13. Fischbach W, Bohm S, Wilms S. Magenlymphome. *Deutsh Arztebla*, 90, 1797-804, 1993
14. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific

anatomic compartments of the spleen. *Cell*, 87, 1037-47, 1996

15. Genta RM, Hamne HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol*, 24, 577-83, 1993
16. Hahm KB, Lee KJ, Choi SY, Kim JH, Cho SW, Yim H, Park SJ, Chung MH. Possibility of chemoprevention by the eradication of *Helicobacter pylori*: oxidative DNA damage and apoptosis in *H. pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 92, 1853-7, 1997
17. Isaacson PG, Noetion AJ. Mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) and the MALT lymphoma concept. *Extranodal Lymphoma*. Edited by Isaacson PG, Noeton AJ. Newyork, Chhurchill Livingstone, 5-14, 1994
18. Isaacson PG. Gastrointestinal lymphoma. *Hum Pathol*, 25, 1020-29, 1994
19. Isaacson PG. Primary gastric lymphoma. *Br J Biomed Sci*, 52, 291-6, 1995
20. Jenh CH, Cox MA, Hipkin W, Lu T, Pugliese-Sivo C, Gonsiorek W, Chou CC, Narula SK, Zavodny PJ. Human B cell-attracting chemokine1 (BCA-1; CXCL13) is an agonist for the human CXCR3 receptor. *Cytokine*, 15, 113-21, 2001
21. Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell attracting chemokine1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues,

selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med*, 187, 655-60, 1998

22. Lehours P, Menard A, Dupouy S, Bergey B, Richey F, Zerbib F, Ruskone-Fourmestreaux A, Delchier JC, Megraud F. Evaluation of the association of the nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun*, 72, 880-888, 2004
23. Liu H, Ye H, Dogan A, Ranaldi R, Hamoudi RA, Bearzi I, Isaacson PG, Du MQ. T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood*, 98, 1182-1187, 2001
24. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Scharli P, Laissue JA, Baggiolini M, Ugucioni M. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest*, 104, R49-54, 1999
25. Mc Donnell TJ. Cell division versus cell death: A functional model of multistep neoplasia. *Mol Carcinog*, 8, 209-13, 1993
26. Nakamura S, Aoyagi K, Iwanaga S, Yao T, Tsuneyoshi M, Fujishima M. *Helicobacter pylori* and primary gastric lymphoma. *Cancer*, 79, 3-11, 1997
27. Pan H, Yin C, Van Dyke T. Apoptosis and cancer mechanisms. *Cancer surv*, 29, 305-27, 1997

28. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann JH, Friedman GD. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, 330, 1267-71, 1994
29. Remstein ED, James CD, Kurtin PJ. Incidence and subtype specificity of API2-MALT1, fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol*, 156, 1183-8, 2000
30. Salam I, Durai D, Murphy JK, Sundaram B. Regression of primary high grade gastric B-cell lymphoma following *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13, 1375-8, 2001
31. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*, 192, 1553-62, 2000
32. Spencer J, Wotherspoon AC. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Cancer Surv*, 30, 213-31, 1997
33. Steller H, Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267, 1445-9, 1995
34. Stolte M, Bayerdorffer E, Morgner A, Alpen B, Wundisch T, Thiede C, Neubauer A. *Helicobacter* and gastric MALT lymphoma. *Gut*, 50, 19-24, 2002
35. Von Herbay X, and Rudi J. Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microsc*

Res Tech, 48, 303-11, 2000

36. Weber DM, Dimopoulos MA, Anandu DP, Pugh WC, Steinbach G. Regression of gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue with antibiotic therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 107, 1835-8, 1994
37. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*, 338, 1175-6, 1991
38. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 342, 575-7, 1993
39. Wotherspoon AC. Gastric lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Med*, 49, 289-99, 1998
40. Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *Arthritis Rheumatism*, 44, 408-418, 2001
41. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7, 2000

- ABSTRACT -

**Increased BCA-1 Expression and Attenuated Apoptosis in Epithelial Cells
in *Helicobacter pylori*-associated Low Grade Gastric MALT Lymphogenesis**

Choong Keun Cha

**Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University**

(Supervised by Professor Ki-Baik Hahm)

Background : *Helicobacter pylori*(*H. pylori*) infection is one of the major causes of the pathogenesis of low grade gastric MALT lymphoma(MALToma), but the reason why only a few patients with *H. pylori* infection developed MALToma was not clearly explained yet. Here, we provide novel finding that up-regulated expressions of B cell attracting chemokine-1(BCA-1) and deranged apoptosis in gastric epithelial cells are causally involved in the transformation of *H. pylori*-associated gastritis to MALT lymphoma.

Materials and method : Using tissue blocks from 20 patients with *H. pylori*-positive gastritis, 39 patients with *H. pylori*-positive low grade MALT lymphoma, and 18

patients with *H. pylori*-negative gastritis, *in situ* hybridization for BCA-1 and its receptor, CXCR5, and TUNEL staining for apoptosis were done, respectively. We tested a change of BCA-1 and CXCR5 using *in situ* hybridization after *H. pylori* eradication in 28 patients, after which the complete remissions of MALToma were achieved. Also, we evaluated the direct influence of *H. pylori* infection on expression of BCA-1 and CXCR5 mRNA in gastric epithelium using RT-PCR.

Results : The expression of BCA-1 and CXCR5 was significantly higher in patients with *H. pylori*-positive MALToma than *H. pylori*-positive gastritis or *H. pylori*-negative gastritis, of which expressions were significantly reduced in the remission of MALToma after the successful eradication of *H. pylori*. Significant attenuations of epithelial apoptosis were observed in *H. pylori*-associated MALToma compared to abundant apoptotic activities after *H. pylori* infection. *H. pylori* infection directly induced the expression of BCA-1 in the cultured gastric epithelial cells.

Conclusion : The increased BCA-1 expression and dysregulated apoptosis in *H. pylori*-infected gastric epithelium might contribute to development of MALT lymphoma.

Key words: *Helicobacter pylori*, Mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma, BCA-1, CXCR5, Apoptosis.