대한소화기학회지 2002;39:22 - 32

장기 *Helicobacter pylori* 감염 마우스 모델 수립과 위암 발생에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 *H. pylori* 연구 그룹

김성우 · 차충근 · 한상욱 · 김영배 · 이원홍 · 주희재 · 조용관 · 조성원 · 김명욱 · 함기백

Long-term Evaluation of Mouse Model Infected with *Helicobacter pylori* and Influence of *Helicobacter pylori* Infection on Gastric Carcinogenesis

Sung Woo Kim, M.D., **Choong Keun Cha**, M.D., **Sang Uk Han**, M.D., **Young Bae Kim**, M.D., **Won Heung Lee**, M.D., **Hee Jae Joo**, M.D., **Yong Kwan Cho**, M.D., **Sung Won Cho**, M.D., **Myung Wook Kim** M.D., and **Ki Baik Hahm**, M.D.

Ajou Helicobacter pylori Research Group, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background/Aims: This study was aimed to evaluate the long-term outcome of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in mouse model and to know the influence of *H. pylori* infection on gastric carcinogenesis. **Methods:** Four-week-old specific pathogen free C57BL/6 mice (n=115) were infected with SS1, the mouse-adapted *H. pylori* strain. In the 4, 8, 16, 24, 36, 50 and 80 weeks after the bacterial inoculation, the *H. pylori*-infected mice were sacrificed. **Results:** After 80 weeks of infection, most of *H. pylori*-infected mice developed hyperplastic gastritis, but did not show any evidence of adenoma, dysplasia or carcinoma. Proliferating cell nuclear antigen-positive cells were most abundant at 50 weeks and tended to decrease at 80 weeks. Apoptosis was noted at 8 weeks after *H. pylori* infection, showing 7-8 apoptotic cells/high power field and tended to increase with the lapse of time. Normally observed neutral mucin was decreased with the lapse of time and it was remarkably decreased at 50 weeks after *H. pylori* infection. However, acidic mucin was remarkably noted from 50 weeks after the infection. **Conclusions:** SS1-infected mice seem to be suitable for *H. pylori*-related research and *H. pylori* itself does not induce gastric cancer in normal wild-type mice model in a long-term study, which could be explained by the balance between cell proliferation and apoptosis. **(Korean J Gastroenterol 2002;39:22-32)**

Key Words: *Helicobacter pylori*, C57BL/6 mice, Gastric carcinogenesis, Apoptosis, Cell proliferation

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 최근 20년 동안 위염 및 위궤양을 포함한 다양한 위질환의 직접적인 원인균으로 인정되고 있다. *H. pylori* 감염이 위염의 원인일 것이라는 사실은 이미 1920년대부터 주장되어 왔으나, 당시에는 음식으로부터 이입되어 소화되지 않은 균일 뿐, 병리학적 의미는 없다고 생각하였고,[1] 대부분의 학자들은 이 균의 의미를 무시하여 왔다. 그러나 1982년 Warren과 Marshall에 의하여 위염 환자의 위점막에서 최초로 분리, 배양에 성공한 이래[2] *H. pylori* 균주는 만성 위염, 소화성 궤양 및 위암의 원인 요인으로 주목을 받고 있다.[3] *H. pylori*가 사람의 위에서 상기의 병변을 유발하는 것에 대해서 논란이 일자, 균의 동정자인 Marshall 박사는 직접 자신이 동정한 균주를 흡입하여 자신의 위에서 위염이 유발되었다는 사실을 밝혀냈다. 그러나 사람을 이용하여 *H. pylori*에 의한 위질환의 발병기전을 밝히기에는 제한이 있으므로 동물의 감염을 통한 모델의 개발이 필요하다.[4]

현재까지 돼지나 개, 원숭이, 심지어 치이타를 이용한 *H. pylori* 감염을 유도한 실험들이 있었으나 이러한 동물들은 시간과 비용이 많이 들며, 대량으로 다양한 실험을 진행하

접수: 2001년 5월 4일, 승인: 2001년 10월 22일
연락처: 김명욱, 442-749, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지, 아주대학교 의과대학 외과학교실
Tel: (031) 219-5201, Fax: (031) 219-5755
E-mail: kimmw@madang.ajou.ac.kr

기에는 어려운 점이 많고 또한 인간의 조직병리학적 변화와는 많은 차이를 보였다.[5-7] 따라서 보다 재현성이 높고 관찰 기간이 짧으며, 인간의 위조직 변화와 유사한 병변을 유발시킬 수 있는 동물모델이 필요하게 되었는데, 이러한 조건을 만족시키는 동물로는 설치류가 이상적인 것으로 알려져 있다.

1990년부터 *H. felis*를 이용한 동물모델이 개발되었는데, *H. felis*는 고양이의 위장에서 분리되어 *H. pylori*와 상당히 유사한 구조를 지닌 균으로서 쥐의 위장에서도 비교적 잘 자라 생쥐 감염의 모델로도 사용되고 있다.[8] 그러나 *H. felis*에 의한 위병변은 인간의 위점막에서 발생한 병리학적 변화와는 다소 차이가 있으므로 흔히 사용될 수 있는 이상적인 모델이라고 할 수는 없었다.[9] 이런 중에 1997년 Lee 등[10]은 10년간 위궤양을 앓아오던 여성의 위점막에서 *H. pylori*를 성공적으로 분리, 배양하여 Lausanne criteria를 만족시키는 SS1 (Sidney strain 1)이라 명명된 균주를 배양한 후, 이를 C57BL/6과 BALB/C 등의 마우스에서 높은 집락형성을 시킬 수 있다고 보고하였다. 마우스 모델 이외에도 *H. pylori*의 동물모델로는 Mongolian gerbil, ferret, 고양이 및 개 등이 보고되고 있으나 현재는 Mongolian gerbil, 마우스 및 ferret이 가장 많이 이용되고 있다.

H. pylori 감염이 과연 위암을 유발할 수 있는가 하는 문제는 1994년 세계보건기구의 IARC회의에서 *H. pylori*를 group I carcinogen 즉, 명확한 발암인자로 규명하여 발표하기는 하였으나 현재까지 이의 정의에 대해서는 다소 회의적이라 할 수 있다.[11] 왜냐하면 역학적 조사 결과 *H. pylori*를 위암 발암인자로 규정하기는 하였지만 오히려 전혀 관계가 없다는 보고도 있으며[12,13] 동물모델에서도 일본의 한두 연구기관에서는 위암 발생이 관찰되었다는[14] 연구 결과가 발표되었지만 명확한 인과관계를 설명하기에는 아직까지 논란이 되고 있다.

본 연구에서는 마우스를 이용해 *H. pylori* 감염 모델을 수립하고, 과연 마우스 모델에서 *H. pylori* 감염이 위암이나 이와 연관된 병변을 유발시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 생후 4주된 C57BL/6 마우스에 *H. pylori* SS1 균주를 감염시켜 80주까지 시간 경과에 따른 위병변의 병리학적 고찰, 위점막 증식 상태, 세포사멸(apoptosis)의 변화 및 점액의 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

실험에 이용된 대상 동물은 4주령의 specific pathogen free (SPF) C57BC/6 (Charles River, Tokyo, Japan)였고, 사료는 멸균 소독된 휴리나 사료(Hae Eun International Co., Seoul, Korea)를 주었으며 실험실 환경 적응을 위해 2주간 사육하면서 건강 상태가 양호하다고 판단되는 것들만 골라 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 마우스는 총 115마리였으며, 대조군으로 35마리를 사용하였다. 동물실험실은 12시간의 밤낮이 잘 구분되는 시설이 이용되었고 실내 온도 및 습도를 적정 수준으로 유지시켰으며 음용수는 소독하여 제한없이 공급하였다.

2. *H. pylori* 균의 배양

Lausanne criteria[15]를 만족시키는 균으로 알려진 *H. pylori* SS1을 서면 동의를 얻어 냉동 상태로 Lee 그룹[10]에서 구하였다. 일부를 해동하여 이 균의 특성을 알아보기 위하여 modified Gram's stain을 시행하여 소 멍에 모양으로 만곡된 그람음성 간균의 형태를 보이고 oxidase, catalase 및 urease 양성인 것을 확인한 후, 액화질소에 보관하여 이후 배양 절차를 거쳐 마우스에 감염시켰다. 균 투입 6일전 냉동 균주를 해동시켜 brain heart infusion용액에 150 μL를 부은 후, horse blood 및 skirrow media가 함유된 *H. pylori* 배양 agar plate에 균주를 심은 후 상품화된 미호기성 조건 발생 kit인 CampyPack plus (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)를 장착시킨 상태에서 혐기병에 넣고 밀폐한 다음 37℃ 이산화탄소배양기에 넣어 5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2의 조건으로 5일간 배양하였다. 5일 후 *H. pylori*의 집락형성을 확인한 후 이를 10% 우태아혈청이 섞인 brain heart infusion broth (Difco, Detroit, MI, USA)에 집락을 따서 shaking incubator에 넣고 미호기성 조건에서 4일간 추가 배양하였다.

3. 마우스로의 균 투입

4일 후 배양된 brain heart infusion용액에서 분광광도계를 이용하여 균수를 확인하고 이를 희석하여 100 mL당 1×10^9 CFU가 되도록 균수를 조절하였다. 실험 마우스는 *H. pylori* 균 감염 1일전 절식판을 미리 깔아놓아 절식된 상태에서 마우스용 위관을 이용하여 한 마리당 100 μL (1×10^9 CFU/mL)의 *H. pylori*를 주입하였고, 이러한 감염 절차는 이틀 간격으로 3번 반복 투여하였다. 이 때 대조군으로 사용된 35마리의 마우스는 생리식염수를 동량 주입하였고 상호감염의 기회를 제공하지 않도록 별도의 동물실에 분리 기거시켰다.

4. 마우스 위절제 및 병리학적 관찰

시술 후 *H. pylori*를 감염시킨 생쥐는 4주, 8주, 16주 후에 각각 10마리씩을, 24주, 36주, 50주 후에 각각 20마리씩을, 80주 후에는 25마리를 희생시켰으며 대조군에서도 같은 시기마다 각각 5마리씩을 희생시켜 육안 관찰 및 사진 촬영 후에 95% 에탄올에 고정시켰다. 마우스의 희생은 안구를 적출하여 5 mL의 전혈을 EDTA tube에 보관시킨 후 경추골절의 방법으로 고통 없이 희생시켰다. 이 때 *H. pylori* 감

염의 상태를 알아보기 위하여 조직의 일부를 아주 작게 절제하여 CLO검사를 시행하였다. 4시간 동안 알코올에 고정시킨 후 포매하여 4 μm 간격으로 잘라 H&E 염색 및 Warthin-Silver 염색을 실시하여 균의 존재 및 병리학적 소견을 관찰하였다.

5. 면역화학검사

Paraffin block을 4 μm 간격으로 절제하여 probe-on slide에 부착시킨 후 xylene 용액에 20분간 담궈 탈파라핀화를 시켰다. 이후 graded alcohol용액(100%, 95%. 70%)에 2분간 슬라이드를 담궈 rehydration시키는 과정을 거친 후 내인성 peroxidase 활성도를 약화시키기 위하여 1% H_2O_2가 함유된 methanol용액에 4시간 동안 담궜다. 마우스 조직에 비특이성 항체의 부착을 줄이기 위하여 Vector Laboratory사에서 제작된 MOM kit를 사용하였는데 여기에는 mouse IgG가 함유되어 있고, 이 용액에서 1시간 동안 실온에 작용시킨 후 항체 anti-PCNA, PC-10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:500 희석액을 첨가하여 4℃에서 18시간 반응시켰다. 이후 PBS에 세척한 후 biotinylated anti-mouse IgG를 20분간 반응시키고 vectastain ABC reagent (Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA, USA)를 이용하여 발색시키고 Hematoxylin용액으로 대조염색을 시행하였다. PCNA-LI (PCNA-labeling index)는 3부분의 조직 부위에 각각 500개의 세포를 세어 이중 PCNA염색에 양성인 세포의 수를 백분율로 구하여 이를 평균한 값을 백분율로 표시하였다.[16]

6. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl tromsterase-mediated dUTP biotin nick end label)

세포사멸을 검출하기 위해 Oncor사의 ApopTag를 사용하였다. 우선 4 μm로 절제된 포매 조직을 탈파라핀화시킨 후 20 μg/mL의 proteinase K를 처리하여 15분간 37℃에서 반응시켰다. 그 다음 내인성 peroxidase를 억제시키기 위하여 2% H_2O_2용액에 20분간 반응시킨 후 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)효소가 함유된 용액을 37℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 이후 anti- digitoxigen peroxidase로 반응시킨 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine)를 발색제로 사용하여 apoptotic nuclei를 염색하고 methyl green용액으로 대조염색을 시행하였다. Apoptosis labeling index도 PCNA-LI와 동일한 방법으로 3부분의 조직 부위에서 양성 핵을 100개의 핵으로 백분율을 구한 후 이를 모두 평균한 수를 백분율로 표시하였다.[17]

7. 점액 염색

점액 염색은 Alcian blue at pH2.5/periodic acid Schiff (AB/PAS)를 시행하였다. 이 염색은 점액의 산도가 산성화되면 파랗게 염색된다.

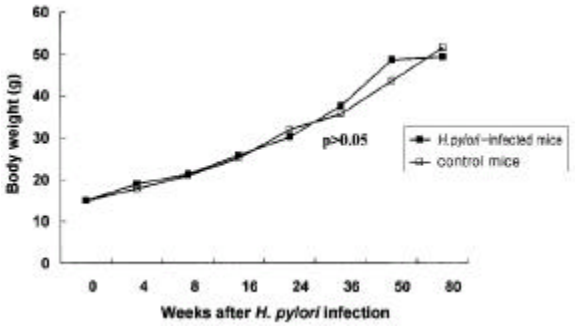

Fig. 1. Serial changes of body weight of C57BL/6 mice treated with *H. pylori*. There are no significant differences in body weight for 80 weeks between *H. pylori* infected group and control group.

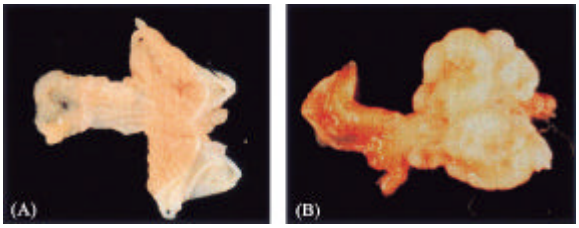

Fig. 2. Gross morphology of normal stomach and *H. pylori*-infected stomach of 80-week-old C57BL16 mice. (A) Normal control mice show no pathological changes. (B) *H. pylori*-infected mice developed hyperplastic gastritis without any evidence of adenoma, dysplasia or carcinoma.

8. 통계 처리

통계학적 의의를 알아보기 위해서 Student t test와 Cox-ranked regression test를 시행하였으며 p 값이 0.05 이하를 의의가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. *H. pylori* 감염 마우스 모델 수립

새로운 환경에 잘 적응시킨 C57BL/6 마우스를 대상으로 사흘 간격으로 1×10^9 CFU/mL의 *H. pylori* SS1 균주를 주입시켰으며 모든 실험 동물에 성공적으로 감염시킬 수 있었다. *H. pylori* 감염 4주 및 8주 후에 각 군별 무작위로 마우스를 추출하여 희생시킨 후 위조직을 배양하고 CLO검사를 시행하였는데, 감염시킨 모든 마우스에서 *H. pylori*가 배양, 확인되었으며 대조군에서는 *H. pylori*가 전혀 검출되지 않았다. 감염시킨 후 80주까지 연속적으로 측정한 마우스의 체중은 대조군과 *H. pylori* 감염군 사이에 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 1). *H. pylori* 감염 6주째의 평균 체중은 19.5±0.6 g이었으며 80주령의 표준 체중은 50.5±0.8 g이었다.

2. 병리학적 변화

1) 육안적 변화

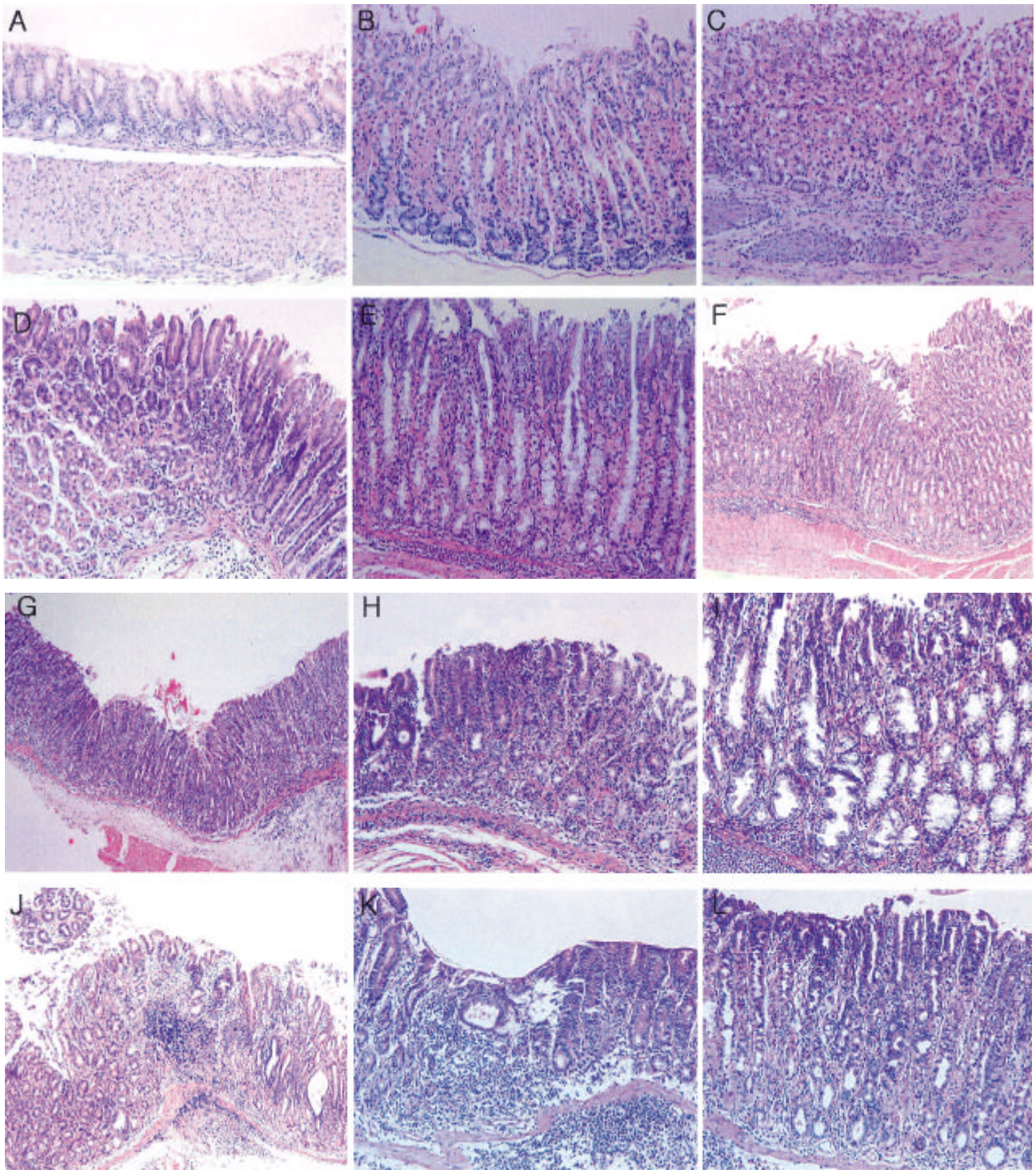

Fig. 3. Serial histopathological changes in *H. pylori*-infected C57BL/6 mice. (A - B) Normal control mice show no significant pathological changes at 80 weeks of age. (C - D) Inflammatory cell infiltration in the submucosa and lamina propria is noted in the fundus and the antrum at 8 weeks, respectively. (E - F) Mononuclear cell infiltration is increased and atrophy of gland is noted in the fundus at 16 and 24 weeks. (G) Loss of gland is increased in the antrum at 36 weeks. (H - I) Hypertrophy of the mucosa in noted in the fundus and the antrum at 50 weeks. (J - L) Hypertrophic gastritis is decreased in the fundus and the antrum at 80 weeks (H&E stain, ×100).

대조군의 위는 시간 경과에 따라 유의한 육안적 변화를 관찰할 수 없었다. *H. pylori* 감염군에서도 80주 관찰기간까지 종양형성이나 궤양 등의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으나 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 대조군에 비해 *H. pylori* 감염군에서 위벽이 비후되어 있다. 또한 위점막에서 위주름의 현저한 비후가 감염 후 36주부터 시작되어 대조군에 비해 유의한 차이가 있음을 관찰할 수 있었는데, 이는 감염 후 50주 및 80주에 더욱 더 현저한 변화를 보였다. 일부 *H.*

Table 1. Summary of Pathological Responses in Mice Infected with *H. pylori* during 80 Weeks

Finding	4 wk (n=10) No.	8 wk (n=10) No.	16 wk (n=10) No.	24 wk (n=20) No.	36 wk (n=20) No.	50 wk (n=20) No.	80 wk (n=25) No.
Neutrophils in lamina propria	10	10	10	20	20	20	25
Neutrophils in epithelium	6	7	10	20	20	20	25
Lymphoid cells in epithelium	0	2	10	20	20	20	25
Submucosal abscess	3	8	10	20	20	20	25
Crypt abscess	1	2	10	20	20	20	25
Mucosal atrophy	0	3	10	20	20	20	25
Neutral mucin at mucosal surface	10	10	10	20	20	15	11
Bacteriology	10	10	10	20	18	15	9

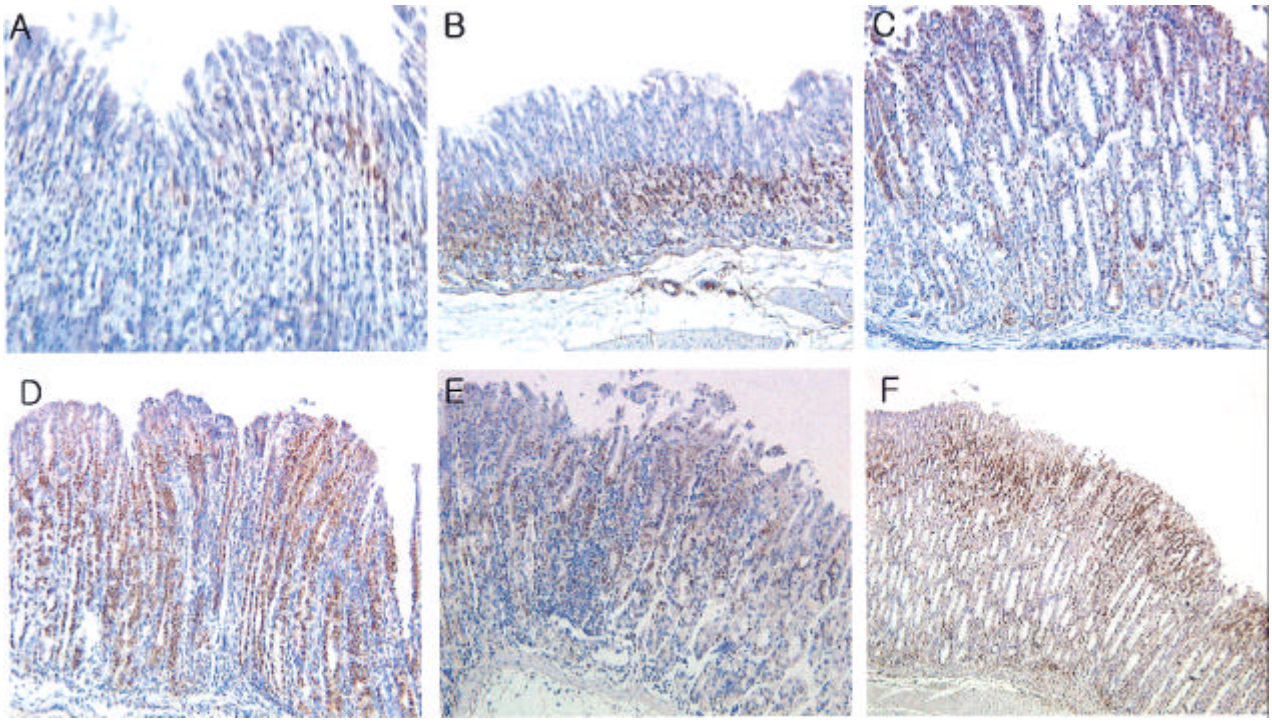

Fig. 4. Serial changes of immunohistochemical staining of PCNA in *H. pylori*-infected C57BL/6 mice. PCNA-positive cells were increased and migrated to upper part of gastric gland as time passed. They reached their peak at 50 weeks, and tended to decrease at 80 weeks. (A-F) PCNA of normal control (A) and *H-pylori* infected C57BL/6 mice at (B) 16 weeks, (C) 24 weeks, (D) 36 weeks, (E) 50 weeks, and (F) 80 weeks after the infection (PCNA immunohistochemical stain, ×100).

*pylori*를 감염시킨 마우스에서는 16주 및 24주째 위에 미란성 병변이 관찰되기도 하였다.

2) 병리학적 변화

대조군에서는 80주까지 관찰한 소견에서도 뚜렷한 병리학적 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3A, B). *H. pylori* 감염군의 감염 8주째 위저부(Fig. 3C) 및 전정부(Fig. 3D) 관찰에서 정도의 차이는 있으나 모든 마우스에서 경한 염증반응 이외의 특이 사항은 없었다. 염증반응은 호중구 외에도 단핵세포들로 구성된 염증세포의 침윤이 점막하뿐만 아니라, 위고유층에서도 관찰되며 선와염의 소견도 관찰되었다. 감염 16주째(Fig. 3E) 및 24주째(Fig. 3F)에는 만성 위염의 특징인 단핵세포들의 비중이 더욱 증가하였고, 이러한 세포들의 침윤에 의하여 위선이 파괴되는 위축의 소견이 모든 위점막에서 보였다. 염증 변화들은 감염 후 36주부터 매우 심해졌으며 위선의 소실이 더욱 증가되었다(Fig. 3G). 이와 함께 위점막의 증식이 현저하게 증가되어 감염 후 50주째(Fig. 3H, 3I) 최고조에 도달하며, 80주째(Fig. 3J, 3K, 3L)에는 증식성 위염의 소견이 다소 감소됨을 알 수 있었다. 일부에서는 장상피화생의 소견과 선와농, 위상피세포내 림프구 침윤 등의 소견과 함께 림프소절의 형성을 관찰할 수 있었다. 그러나 감염 후 80주째까지 선종, 이형성 또는 암화의 증거는 마우스

Table 2. Gastric Epithelial Kinetics during Long-term *H. pylori* Infection

	0 wk	4 wk	16 wk	50 wk	80 wk
Pathologic diagnosis	Normal	Acute gastritis	Chronic gastritis	Chronic gastritis	Atrophy
Bacteria	↔	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑
Proliferation	↔	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Apoptosis	↔	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
Mucin production	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑

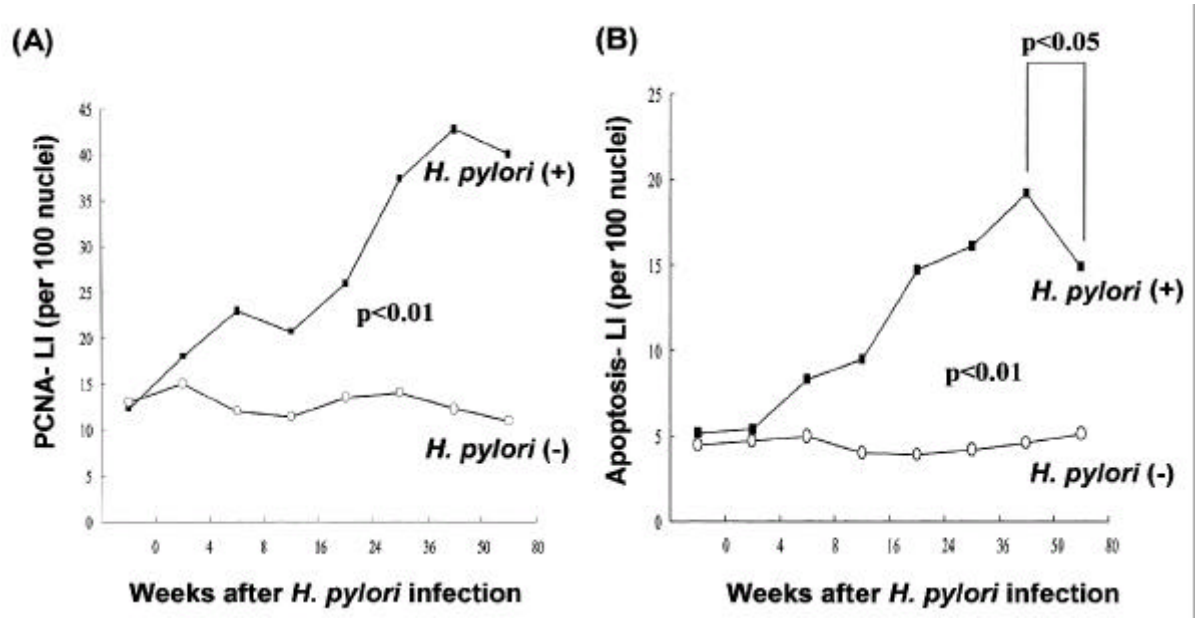

Fig. 5. Serial changes of proliferating cell nuclear antigen-labeling index (PCNA-LI) and apoptosis-labeling index (apoptosis-LI) of C57BL/6 mice infected with *H. pylori*. (A) PCNA-LI increased markedly between 16 weeks and 50 weeks in the *H. pylori*-infected group ($p < 0.01$) compared with the control group showing no change. (B) Apoptosis of 2-3 cells per high power field of microscopy was noted in control group. Apoptosis started at 8 weeks after the infection, showing 7-8 apoptotic cells/high power field and tended to increase as time passed.

모델에서는 전혀 관찰되지 않았다. 이상의 병리학적 변화를 요약하면, 위 고유층과 상피세포에서 호중구의 침윤은 감염 후 4주째부터 관찰되어 지속되지만 위상피세포에서 림프구의 침윤 및 선와농은 감염 후 16주째부터 현저히 발견되었고, 뚜렷한 위축성 변화 역시 16주째부터 흔하게 관찰되었다(Table 1).

3. PCNA 변화

H. pylori 감염 후 병리학적 소견상 유의한 증식성 위염의 소견이 관찰기간 경과에 따라 현저한 변화를 보였는데 이를 확인하기 위하여 PCNA 면역화학염색을 시행하고 labeling index를 측정하였다. 시간 경과에 따라 PCNA 양성 세포의 수는 물론, PCNA 양성 세포가 위선 상부 부위까지 이동하고 있음을 알 수 있었으며, PCNA 양성 세포는 감염 후 50주째에 최고조에 달하며 80주째에는 다소 감소되는 경향을 보였다(Fig. 4). PCNA-LI는 Fig. 5에 표시하였는데 *H. pylori*를 감염시키지 않은 대조군에서는 시간 경과에 따라 PCNA-LI의 변화를 보이지 않는 반면, *H. pylori* 감염군에서는 감염 후 16주째부터 50주째까지 가파른 상승을 보여 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보였고(Fig. 5A, $p<0.01$), 병리학적 소견과 일치하게 감염 후 80주째에는 약간 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과로 마우스의 *H. pylori* 감염은 시간 경과에 따라 유의한 증식성 위염을 유발시키지만 암화의 증거는 관찰되지 않았다(Table 2).

4. 세포사멸의 변화

*H. pylori*를 감염시키지 않은 대조군에서는 현미경하 조직관찰시 시야당 2-3개 정도의 세포사멸 소견을 관찰할 수 있었으나 Fig. 5B에서 볼 수 있는 바와 같이 *H. pylori* 감염 후에는 고배율 시야당 7-8개 정도의 세포사멸을 관찰할 수 있었고, 이는 시간경과에 따라 증가하는 양상을 보였다(Table 2). PCNA-LI는 *H. pylori*를 감염시키지 않은 대조군에서는

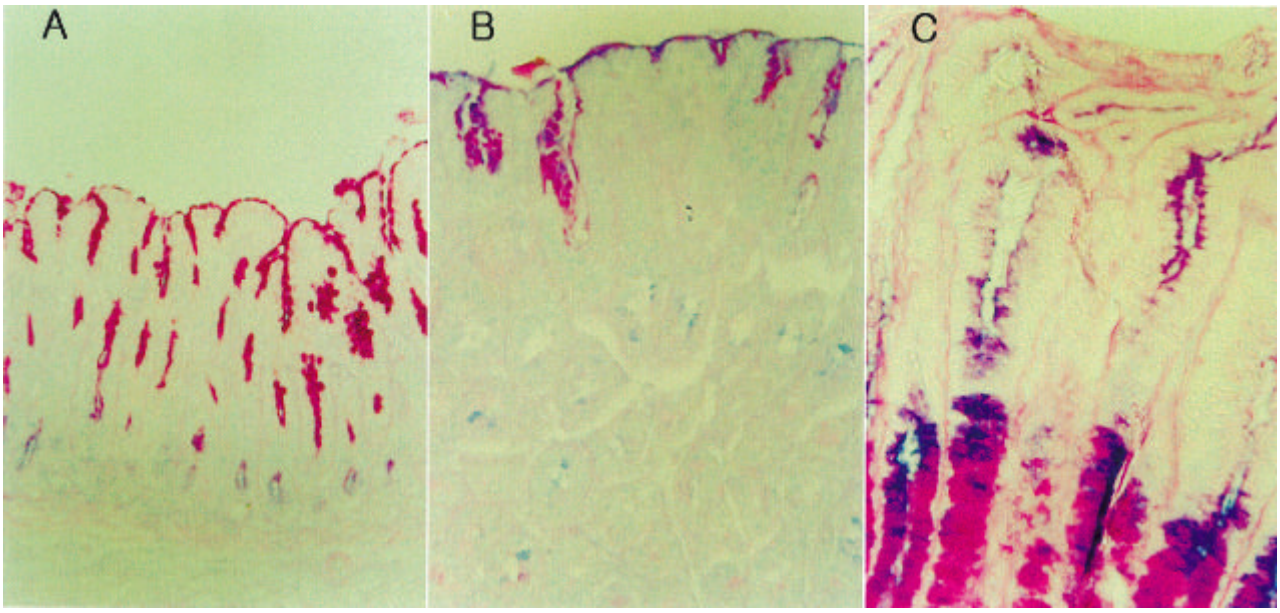

Fig. 6. Pictures of Alcian blue/PAS staining for mucin in C57BL/6 mice infected with *H. pylori*. After *H. pylori* infection, the neutral mucin reduced markedly, but the acidic mucin increased strikingly. (A) Mucin of normal C57BL/6 mice (×100). (B) Mucin of C57BL/6 mice at 36 weeks after *H. pylori* infection (×100). (C) Mucin of C57BL/6 mice at 80 weeks after *H. pylori* infection (×200).

시간 경과에 따라서 apoptosis-LI의 유의한 차이가 없었으나, *H. pylori* 감염군에서는 감염 후 4주째부터 세포사멸이 증가하고 감염 후 50주째에 최고조에 달하여 PCNA-LI와 비슷한 양상을 보였으며 *H. pylori* 감염군과 대조군 사이에는 유의한 통계학적 차이가 보였다. 그리고 PCNA-LI와 apoptosis-LI 사이에는 유의한 상관관계를 관찰할 수 있었다($p<0.01$).

5. 점액 변화

H. pylori 감염 후 점액의 변화는 정상일 때 보이는 중성 점액은 현저하게 감소되는 반면 산성 점액은 현저하게 증가되는 뚜렷한 변화(Fig. 6)를 관찰할 수 있었다(Table 2).

고 찰

본 연구에서는 C57BL/6 마우스에 SS1 *H. pylori*를 감염시켜 *H. pylori* 감염 마우스 모델을 수립하였고, 이들 생쥐를 감염 후 80주째까지 유지하면서 시간 경과에 따른 위의 병리학적 소견을 장기간 관찰하였다. 이 결과 만성 위염, 만성 위축성 위염 및 증식성 위염의 소견을 관찰할 수 있었으나 위선종 및 위암의 증거는 관찰되지 않았다. 따라서 *H. pylori*는 세계보건기구 IARC에서 규정한 group I carcinogen[11]으로서의 역할에는 미흡한 것으로 결론지었다.

H. pylori 감염 후 80주까지의 변화를 Table 2에 요약하였는데, 세균학적인 면에서 *H. pylori*의 집락형성은 4주째부터 관찰되고 16주째부터 유의한 병리학적 변화를 보여 가장 많은 수의 세균 집락이 관찰되며, 이후 50주째 및 80주째에는 위축이 진행되면서 세균 집락도 감소되었다. SS1을 사용하였을 경우 집락형성이 높았던 이유는 위궤양 환자에서 분리 배양한 *H. pylori*를 마우스에 먹인 후 감염을 유발시킨 위점막에서 다시 분리 배양한 균을 다시 마우스에 먹이는 방법으로 여러 번 계대배양하여 마우스의 위점막에 적응시킨 균이었기 때문일 것이다.[10] 또한 3번에 걸쳐 1×10^9 CFU/mL의 농도로 충분한 균주를 투입하여 *H. pylori*가 많이 자랄 수 있도록 충분한 환경을 제공하였기 때문이기도 하다. 실제 SS1 균주를 1.2×10^7 CFU/mL의 농도로 한 번만 쥐에 투입하여도 100%의 집락을 얻었다는 보고도[18] 있으므로 SS1 균주는 *H. pylori* 감염 동물모델의 재료로서 상당히 유용하다고 생각한다. 본 연구에서 사용한 실험 동물은 specific pathogen free (SPF) C57BL/6 마우스로서 SS1 균주가 가장 잘 자랄 수 있는 마우스로 알려져 있다.[9] 보고에 따르면 SS1 균주는 C57BL/6 마우스의 전정부에서 가장 집락형성이 높고 체부나 위저부로 갈수록 낮아졌지만 BALB/C 마우스에서는 집락형성이 전반적으로 낮고 전정부와 체부의 경계 부위에서 가장 높았다. 또한 *H. felis*를 C57BL/6, BALB/C, C3H/He 등 여러 종류의 마우스에 감염시켰을때 마우스의 종류에 따라 염증의 차이를 보이고 C57BL/6 마우스에서 염증이 가장 심하다는 보고도 있었다.[19] 이처럼 마우스의 종(strain)에 따라 집락형성이 차이를 보이는 이유는 마우스마다 면역기능의 차이가 있기 때문이며, 해부학적인 장소에 따른 차이를 보이는 이유는 국소적인 산도의 차이 때문일 것이다.

H. pylori 감염 모델로 흔히 BALB/C 마우스를 많이 이용하여 왔지만 BALB/C 마우스에 SS1 균주를 감염시켰을 때에

는 특히 전정부에서의 집락형성이 C57BL/6 마우스의 5% 정도밖에 되지 못하였고 만성 위염이나 위축의 정도가 C57BL/6 마우스에 비해 적게 발생된다.[9,20] 따라서 집락형성이 높고 인간의 병리 소견과 유사한 결과를 얻기 위해서는 C57BL/6 마우스가 적합하다는 결론을 얻을 수 있었다. *H. pylori* strain SS1은 c*ag A*와 v*ac A*가 양성이고 C57BL/6 마우스에 감염시킨 결과 10^6~10^7 CFU/g tissue 농도의 집락을 보였고, 계대배양에서도 안정적이었고 위상피세포에 강하게 유착(adhesion)되었으며, 8개월 동안 감염시켰을 때 심한 위축성 위염 소견을 보였다.[10] 이러한 특징은 표준화 동물모델이 갖춰야 하는 조건인 Lausanne criteria[15]를 만족시킴을 의미한다. 본 연구에서는 100%의 집락형성을 보이고 시간 경과에 따라 *H. pylori*에 의한 염증 소견이 현저하게 증가하였다. 결론적으로 SS1 *H. pylori*를 이용한 동물모델은 재현성이 높아 *H. pylori*를 이용한 위염, 위궤양의 연구나 *H. pylori*의 치료 연구에 많은 도움을 줄 수 있는 것으로 생각된다.

아직까지 본 연구에서와 같이 마우스 동물모델에서 실험동물의 수명이 다하는 시기까지 장기간 위의 병리 소견을 관찰한 보고는 국내외적으로 없었다. 유사한 보고로 Mongolian gerbil에서 시간 경과에 따른 위의 병리 소견을 관찰한 것이 있지만 이는 52주째까지의 보고이며, 또 다른 보고는 감염 후 80주째에만 관찰이 이루어졌다. 따라서 마우스 모델에서의 장기 추적관찰 결과는 본 연구가 최초이다. 위에 언급한 Mongolian gerbil에서의 관찰 결과와 본 연구 결과를 상호 비교하기 위하여 우선 Mongolian gerbil에서의 변화를 살펴보면,[21] 생후 7주된 SPF Mongolian gerbil에 ATCC사의 *H. pylori* 43504 균주를 1×10^9 CFU/mL씩 구강으로 감염시킨 후 9주, 11주, 15주, 19주, 33주, 45주, 59주째 희생시켜 병리 소견을 관찰하였을 때, 감염 2주에는 뚜렷한 위병변이 관찰되지 않았으나 감염 4주 후에는 벽세포와 주세포가 감소되기 시작하였으며 전정부 점막에 경한 염증반응이 시작되었다고 하였다. 침윤된 염증세포는 주로 다핵형 백혈구였으며 소와 미세농양을 형성하기도 하였으나 뚜렷한 *H. pylori*의 집락형성은 관찰되지 않았고 특징적으로 BrdU labeling이 현저하게 증가되었다고 하였다. 감염 8주 및 12주째에 염증 소견은 더욱더 현저해지고 만성 염증의 소견을 보이며 다양한 크기의 미란이 다발적으로 발생되고 림프 소절의 형성이 나타나며 전정부 위선이 증대되고 점액 함유가 증가되었다. 감염 후 26주째 및 38주째에 위궤양과 위의 증식성 병변이 나타나며 궤양은 주로 이행대(transitional zone)에서 발생되며 궤양 주변에 심한 염증 소견이 관찰되었다. 위의 증식성 병변은 주로 유문부 및 전정부에 나타나며 위저부에서도 증식성 위염 및 용종이 관찰되었고, 장상피화생은 *H. pylori* 감염 후 26주째에 관찰되기 시작하여 52주째까지 서서히 증가된다고 하였다. 이상의 소견과 본 연구에서 관찰된 마우스에서의 병리 소견은 매우 유사하다. 그러나 마우스 모델에서는 위궤양이나 위용종이 발견되지 않았으며 장상피화생은 Mongolian gerbil과 같이 감염 후 24주째에 관찰되기 시작하나 시간 경과에 따라 유의하게 증가되는 소견은 없었다. 특이한 점은 두 모델 모두 위에 증식성 병변을 유발했다는 것이다. *Helicobacter* 감염 후 위의 증식성 병변 모델로는 *H. felis* 감염 후 증식성 위염을 보인 ferret model을 들 수 있다.[22] 그러므로 본 연구 모델을 포함한 마우스, Mongolian gerbil 및 ferret 모두에서 유의한 BrdU나 PCNA labeling index의 증가가 보고되고 있다. 그런데 이중 ferret 모델은 증식성 위염이 진행된 후에 위축성 위염으로 이행되고 시간이 경과하면 위선암이 발생되는 것으로 보고되고 있는데, 연구결과는 주로 MNNG나 MNU와 같은 발암물질을 전처치한 후 *H. pylori*를 감염시킨 연구로서 연구자들의 선행연구나 Mongolian gerbil에서의 여러 연구 결과 모두에서 *H. pylori* 감염 자체는 명확한 발암인자라기보다는 암 유발 촉진인자 즉 promoter의 역할을 할 것이라는 주장이 더욱 받아들여지고 있다.[23-25] 본 연구자 등도 선행연구에서 TGF-β 수용체가 결함되어 있는 형질 전환 마우스에 *H. pylori* ATCC 43504를 감염시킨 후 36주째에 위암이 발생된다는 연구 결과로 미루어 *H. pylori* 감염이 명확한 위암의 initiator라기보다는 promoter로서 역할을 할 것으로 생각된다. 단, 균주에 감염된 숙주의 유전적 감수성이 선행되어 있는 경우에 암의 유발을 개시하는 것으로 생각된다.[26] 본 연구에서 생후 80주째까지의 관찰 결과에서도 위선종이나 위암의 명확한 증거는 관찰되지 않았다. 그러나 위암의 발생에 영향을 줄 수 있는 위축성 위염이나 유의한 점액의 변화 및 장상피화생이 관찰되어 *H. pylori* 감염이 생쥐에게는 전암병소를 유발하는 것으로 결론지었다. Mongolian gerbil의 경우 감염 후 50주째 및 80주째에 위암이 발생되었다는 보고가 있다.[27] 그러나 일부에서는 *H. pylori*가 Mongolian gerbil에 위암을 유발시키지 못한다고 보고하면서 전술한 바와 같이 MNU나 MNNG와 같은 발암물질을 먼저 투여하고 이후 *H. pylori*를 감염시켰을 때 유의한 위암 발생이 증가된다고 보고한 바 있다.[24-28] 이들의 주장에 의하면 *H. pylori* 감염 후 보고된 Mongolian gerbil의 위암 병리조직이 암으로서 뚜렷한 근거가 약하고 재연실험에서 증명해주지 못하였으며 Mongolian gerbil이라는 동물이 워낙 불안정하여 암화의 증거로는 부족하다는 것이다. 반면에 본 연구에서 사용된 마우스 모델은 쉽게 *H. pylori* 감염이 되지 않고 일반적인 발암물질 투여에도 암화에 저항성을 보이기 때문에, 일단 암화가 발생될 수 있다면 뚜렷한 원인-결과 관계를 규명하기에 다른 모델보다도 매우 우수하다고 하겠다. 또 마우스 모델은 Mongolian gerbil에 비하여 많이 연구되어 있고 여러 가지 항체 및 유전자 조사가 많이 되어 있어 병리학적 소견 분석 이외에 *H. pylori* 감염에 따른 여러 가지

분자생물학적 관찰이 용이하고, knock out (KO)이나 형질전환 마우스 모델이 유용하다는 장점을 가지고 있다. 실제로 C3H/He 마우스에 *H. pylori*를 감염시킨 결과 H^+-K^+ ATPase에 대한 면역반응이 나타난 자발성 자가면역성 위염이 발생되었다는 보고,[29] BALB/C 마우스에 *H. felis*를 감염시켰을 때 MALToma가 발생되었다는 보고,[30] IL-10 KO 마우스에 *H. felis*를 감염시켜 본 결과 아주 심한 증식성 위염이 발생하였다는 보고,[31] APC 유전자 결함 마우스에 *H. felis*를 감염시켰더니 위 세포증식 및 염증이 줄었다는 보고,[32] IFN-*r* KO 마우스에 *H. pylori*를 감염시켰더니 전혀 염증반응이 유도되지 않았다는 보고[33] 등 다양한 wild type 마우스나 KO 마우스를 이용한 실험이 유용하다는 점을 알 수 있다.

본 연구와 같이 장기간 *H. pylori* 감염 실험 동물의 생명이 다할 때까지 관찰한 또 다른 연구로 고양이를 대상으로 한 보고가 있는데, 연구 결과는 연구자들의 마우스 모델과 매우 유사하다. 즉 3년간 고양이에게 *H. pylori*를 감염시킨 결과 위암의 발생보다는 주로 위축성 위염 및 증식성 위염을 보여 이들 연구가들도 본 연구 결과와 유사하게 결론적으로 전암병소가 *H. pylori* 감염에 의하여 증가되는 것으로 보고하였다.[34] *H. pylori*에 의한 상피세포 손상의 기전은 *H. pylori*가 위산에 대한 위점막 상피세포의 저항력을 감소시키거나, 혹은 *H. pylori*가 세포주성 물질인 사이토카인 생성을 유도하고 이에 따라 활성화된 백혈구가 점막의 손상을 초래하기 때문이라고 생각되고 있다.[35,36] *H. pylori*에 감염된 위조직에서 몇몇 사이토카인과 iNOS mRNA가 발현되고, 위암세포에 *H. pylori*를 감염시키면 각종 사이토카인뿐만 아니라 IL-8이나 RANTES 같은 chemokine과 세포접합분자의 발현이 증가된다는 사실은 두 번째 가설을 뒷받침해주는 소견이다.[37] *H. pylori*의 또 다른 점막 손상의 한 기전으로 세포사멸을 들 수 있는데, *H. pylori*가 감염된 위조직에서는 정상보다 세포사멸이 증가하고 *H. pylori*를 박멸한 후에는 세포사멸이 감소한다는 관찰에 근거하여 세포사멸이 *H. pylori*에 의한 점막 손상의 중요한 기전으로 간주되고 있다.[38] 이와 동반하여 *H. pylori* 감염시에는 본 연구에서도 관찰할 수 있었던 바와 같이 세포증식이 활성화되어 이 결과 증식성 위염이 유발된다. 그러므로 *H. pylori* 감염 후 시간 경과에 따른 이들 세포증식 및 세포사멸의 변화를 관찰하는 것은 매우 의의 있는 일이다. 본 연구에서는 *H. pylori* 감염 후 시간 경과에 따라 세포증식 및 세포사멸이 모두 다 유의하게 증가되고 있다. 만일 세포증식은 진행되고 세포사멸에 어떠한 장애가 발생한다면 이는 암화의 진전에 크게 도움을 줄 것이다.[39] 왜냐하면 대장암의 발생에서 이미 잘 밝혀져 있는 바와 같이 세포사멸의 장애는 세포의 과증식 및 축적을 유발하며 탈분화 과정과 함께 암화에 매우 중요한 역할을 하기 때문이다. 본 연구에서 80주까지의 경과 관찰에서 위암이 발생되지 않은 이유는 바로 세포증식과 세포사멸이 다같이 증가되어 있었고 이들 사이의 균형이 유지되었기 때문일 것으로 생각된다. 특히 *H. pylori* 감염에 의해 유도되는 세포사멸은 위축성 위염을 유발하여 이 때 세포사멸에 의한 세포손실은 anti-canalicular 형태와 연관된다는 사실에서 *H. pylori* 감염에 의해 자가면역 위염이 발생될 수 있고, 이는 세포사멸 유도와도 연관된다는 보고[40]도 있다. 실험 동물에서 *H. pylori* 감염에 따른 세포사멸 유도 실험은 아직까지 없었으며 *H. pylori* 대신 *H. pylori*의 lipopolysaccharide를 쥐에 투여한 후 유의한 위염의 발생과 함께 상피세포의 세포사멸을 보고한 연구[41]도 있다. 본 연구와 같이 동물모델에서 시간적 경과에 따른 세포사멸 변화를 관찰한 연구는 처음이다. 실제 실험적으로 증명되지는 않았으나 *H. pylori* 감염시 세포증식과 세포사멸이 균형을 유지할 경우에는 염증 이외에 암이나 궤양이 발생되지 않으나, 세포증식보다 세포사멸 반응이 유의하게 증가될 경우에는 소화성 궤양이, 반대로 세포증식이 유의하게 증가될 경우에는 암화가 가능하겠다는 가설 및 실험적 결과가 보고[42]된 바 있다. 본 연구에서는 점액의 변화를 시간 경과에 따라 관찰하였다. 산성 점액의 변화가 유의하게 관찰되었는데, 이는 *H. pylori* 집락형성과도 유의성을 보여 점액의 변화가 *H. pylori* 생존은 물론 암화의 한 초급단계로도 생각되며 이에 대한 연구는 향후 더 진행될 것이다.

이상의 고찰 결과, *H. pylori*를 감염시킨 C57BL/6 마우스는 인체에서와 유사한 병리 소견을 보이는 좋은 *H. pylori* 연구 모델이며, *H. pylori* 감염은 위암을 유발시킬 수 있는 group I carcinogen으로서의 역할은 다소 미흡한 것으로 판단되고, 세포증식 및 세포사멸의 균형이 *H. pylori* 감염에 의한 운명을 결정짓는 중요한 요인이라고 생각된다. *H. pylori*는 최근 20년 동안 위염 및 위궤양을 포함한 다양한 위질환의 원인균으로 밝혀져 정확한 병인 및 위암 유발 여부에 대해서는 현재까지 다양한 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구를 위해서는 특히 모델 수집이 용이하고, 비용이 적게 들며 인체에서와 유사한 병리 소견을 보이는 이상적인 동물모델의 개발이 필요한데, 본 연구에서는 C57BL/6 마우스 모델을 개발하여 이상의 조건을 만족시킬 수 있는 우수한 모델임을 밝혀냈으며 이들의 장기 관찰 결과 *H. pylori*는 다른 동물모델과 같이 정상 야생형 마우스에서는 위암을 유발시키지 않는다는 사실과 이를 위해서 세포증식과 세포사멸 간의 균형이 중요하다는 사실을 밝힐 수 있었다. 그리고 비록 *H. pylori*는 마우스 모델에서는 위암을 유발시키지는 않으나 증식성 위염이나 만성 위축성 위염과 같은 전암병소를 유발시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

요 약

목적 : 본 연구에서는 마우스를 이용해 *H. pylori* 감염 모

델을 수립하고 감염 후 80주까지 연속적으로 병리학적 변화를 관찰하여 마우스 모델에서 *H. pylori* 감염이 위암을 유발할 수 있는가를 알아보고자 하였다. 대상 및 방법: 4주령의 specific pathogen free C57BC/6 (n=115)에게 *H. pylori*를 주입하였다. 시술 후 *H. pylori*를 감염시킨 마우스를 각각 4주, 8주, 16주 후에 10마리씩을, 24주, 36주, 50주 후에 20마리씩을, 80주 후에 25마리를 희생시켰으며 대조군에서도 같은 시기마다 각각 5마리씩을 희생시켰다. 결과: *H. pylori* 감염군에서 80주까지 선종, 이형성 또는 암화의 증거는 전혀 관찰되지 않았으나 위벽이 비후되어 있었다. PCNA 양성 세포는 감염 후 50주째에 최고조에 달하며 80주째에는 다소 감소되는 경향을 보였다. *H. pylori* 감염 후에는 고배율 시야당 7-8개 정도의 세포사멸을 관찰할 수 있었고, 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 보였다. *H. pylori* 감염 후 중성 점액은 현저하게 감소되는 반면에 산성 점액은 현저하게 증가되는 변화를 관찰할 수 있었다. 결론: C57BL/6 마우스 모델은 *H. pylori* 감염에 따른 위병변을 연구할 수 있는 우수한 모델임을 밝혀냈으며, 이들의 장기 관찰 결과 *H. pylori*는 정상 야생형 마우스에서는 위암을 유발시키지 않는다는 사실과 위암을 유발시키기 위해서는 세포증식과 세포사멸 간의 균형이 중요하다는 사실을 밝힐 수 있었다.

색인단어: *Helicobacter pylori*, C57BL/6 mice, 위암화, 세포사멸, 세포증식

참 고 문 헌

1. Konjetzny GE. Die Entzundungen des Magens. In: Henke F, Lubarsch O, eds. Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie Volume 4, 2nd ed. Berlin: Springer, 1928:768-1116.
2. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;319:1273-1275.
3. Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H. Long-term *Helicobacter pylori* infection-from gastritis to gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:9-15.
4. Fox JG. *Helicobacter* species and *in vivo* models of gastrointestinal cancer. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:37-60.
5. Esteves MI, Schrenzel MD, Marini RP, et al. *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. Am J Pathol 2000;156:709-721.
6. Saito T, Sasaki O, Matsukuchi T, Iwamatsu M, Tamada R, Inokushi K. Regression of polypoid carcinoma induced by N-methyl-N'-nitro- N-nitrosoguanidine in the stomach of a dog. Gann 1980;71:226-230.
7. Fujimura S, Kogure K, Oboshi S, Sugimura T. Production of tumors in glandular stomach of hamsters by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Cancer Res 1970;30:1444-1448.
8. Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. Infect Immun 1988;56:2843-2850.
9. Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. Gastroenterology 1990;99:1315-1323.
10. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. Gastroenterology 1997;112:1386-1397.
11. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to human. Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:218-220.
12. Crespi M, Citarda F. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: What is the real risk? Gastroenterologist 1998;6:16-20.
13. Crespi M, Citarda F. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. An overrated risk? Scand J Gastroenterol 1996;31:1041-1046.
14. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer Res 1998;58:4255-4259.
15. Michetti P, Wadstrom T, Kraehenbuhl JP, Lee A, Kreiss C, Blum AL. Frontiers in *Helicobacter pylori* research: pathogenesis, host response, vaccine development and new therapeutic approaches. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996;8:717-722.
16. Brenes F, Ruiz B, Correa P, et al. *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium: pre-and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. Am J Gastroenterol 1993;88:1870-1875.
17. Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H, Tsujitani S, Ito H. Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling. Jpn J Cancer Res 1994;85:939-945.
18. Ferrero RL, Thiberge JM, Huerre M, Labigne A. Immune responses of specific pathogen free mice to chronic *Helicobacter pylori* (strain SS1) infection. Infect Immun 1998;66:1349-1355.
19. Mohammadi M, Redline R, Nedrud J, Czinn S. Role of the host in pathogenesis of *Helicobacter*-associated gastritis: *H. felis* infection of inbred and congenic mouse strains. Infect Immun 1996;64:238- 245.
20. Lee A, Chen M, Coltro N, et al. Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori* infection

Zentralbl Bakteriol 1993;280:38-50.
21. Ikeno T, Ota H, Sugiyama A, et al. *Helicobacter pylori*induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. Am J Pathol 1999;154:951-960.
22. Yu J, Russell RM, Salomon RN, Murphy JC, Palley LS, Fox JG. Effect of *Helicobacter mustelae* infection on ferret gastric epithelial cell proliferation. Carcinogenesis 1995;16:1927-1931.
23. Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, et al. *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. Carcinogenesis 1999;20:669-676.
24. Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, et al. *Helicobacter pylori* infection enhances MNU (N-methyl-N-nitrosourea)-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. Cancer Res 1998;58:2067-2069.
25. Tokieda M, Honda S, Fujioka T, Nasu M. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. Carcinogenesis 1999;20:1261-1266.
26. Hahm KB, Lee KM, Lee WH, et al. Loss of TGF- signaling leads to gastrointestinal carcinogenesis. Aliment Pharmacol Ther (in press), 2001.
27. Hirayama F, Takagi S, Iwao E, Yokoyama Y, Haga K, Hanada S. Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. J Gastroenterol 1999;34:450-454.
28. Tatematsu M, Yamamoto M, Shimizu N, et al. Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in drinking water. Jpn J Cancer Res 1988;89:97-104.
29. Alderuccio F, Toh BH. Spontaneous autoimmune gastritis in C_3H/He mice: a new mouse model for gastric autoimmunity. Am J Pathol 1998;153:1311-1318.
30. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. Am J Pathol 1995;147:217-222.
31. Berg DJ, Lynch NA, Lynch RG, Lauricella DM. Rapid development of severe hyperplastic gastritis with gastric epithelial dedifferentiation in *Helicobacter felis*- infected IL-$10^{(-/-)}$ mice. Am J Pathol 1998;152:1377-1386.
32. Fox JG, Dangler CA, Whary MT, Edelman W, Kucherlapati R, Wang TC. Mice carrying a truncated *Apc* gene have diminished gastric epithelial proliferation, gastric inflammation, and humoral immunity in response to *Helicobacter felis* infection. Cancer Res 1997;57:3972-3978.
33. Sawai N, Kita M, Kodama T, et al. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. Infect Immun 1999;67:279-285.
34. Esteves MI, Schrenzel MD, Marini RP, et al. *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. Am J Pathol 2000;156:709-721.
35. Bechi P, Balzi M, Becciolini A, et al. *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. Am J Gastroenterol 1996;91:271-276.
36. Correa P, Miller MJ. *Helicobacter pylori* and gastric atrophy-cancer paradoxes. J Natl Cancer Inst 1995;87:1731-1732.
37. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, an apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. Cancer Res 1996;56:3238-3243.
38. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. Gut 1996;38:498-501.
39. Saegusa M, Takano Y, Wakabayashi T, Okayasu I. Apoptosis in gastric carcinomas and its association with cell proliferation and differentiation. Jpn J Cancer Res 1995;86:743-748.
40. Steininger H, Faller G, Dewald E, Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies. Virchows Arch 1998;433:13-18.
41. Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, Slomiany A, Slomiany BL. Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide.Scand J Gastroenterol 1997;32:203-211.
42. Moss SF. Cellular markers in the gastric precancerous process. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:91-109.