

사람의 피부상피세포에서 황색포도상구균의 독소인자인 Staphylococcal Protein A의 염증반응 촉진효과

권현진¹ · 김연정² · 장성희² · 배보경³ · 윤화영^{3,4*} · 이희우^{3*}

¹대구파티마 병원 진단검사실, ²서울의료원 부설연구소, ³서울대학교 수의과대학 수의과학연구소,

⁴서울대학교 수의과대학 내과학교실

Stimulatory Effect of Staphylococcal Protein A on Inflammatory Response in Human HaCaT Keratinocytes

Hyun-Jin Kwon¹, Yeon-Jung Kim², Sung-Hee Jang², Bo-Kyoung Bae³,
Hwa-Young Yoon^{3,4*}, and Hee-Woo Lee^{3*}

¹Department of Laboratory Medicine, Daegu Fatima Hospital, Daegu 701-600, Republic of Korea

²Seoul Medical Center Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 135-740, Republic of Korea

³Research Institute for Veterinary Science, ⁴Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

(Received December 7, 2011 / Accepted December 16, 2011)

Staphylococcus aureus is a major human pathogen that is associated with various types of local and systemic infection. Staphylococcal protein A (SPA), a highly expressed surface component of *S. aureus*, may have a role in virulence such as activating inflammation and interfering with immune clearance. We examined the effect of recombinant SPA on inflammatory response in human HaCaT keratinocytes. The recombinant SPA protein was prepared using the pET-28a Vector System in *Escherichia coli*. The expression of pro-inflammatory related adhesion molecules and cytokines in HaCaT cells incubated for 6, 12, and 24 h with SPA (2 µg/ml) was analyzed by comparative RT-PCR or ELISA. The expression of E-selectin, ICAM-1, MCP-1, IL-6 and IL-8 was significantly increased in HaCaT from 6 to 24 h after treatment with SPA. SPA showed the effect on the adhesion-promoting ability of U937 monocytes to HaCaT cells. Our data demonstrate that SPA stimulates inflammatory response of HaCaT cells, implicating an important factor for exacerbation of skin inflammation of immunologic disease.

Keywords: adhesion, HaCaT keratinocytes, inflammatory response, staphylococcal protein A, U937 monocytes

황색포도상구균은 호기성 혹은 통성혐기성 그람양성 세균으로 사람의 피부나 점막에 집락을 형성하며 높은 보균율로 인하여 인체에 매우 흔한 감염증을 일으킨다(3). 장독소(enterotoxin), 혈장응고효소(coagulase), 백혈구 사멸소(leukocidin) 및 staphylococcal protein A (SPA) 등을 포함하는 많은 병원인자들을 생성하는 그람 양성 구균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 뱀루지, 농가진 및 표피박탈 증후군과 같은 피부감염질환과 폐렴을 일으킬 뿐만 아니라 많은 장기에서 농양, 장염, 위장염, 독소 증후군, 심장내막염 및 패혈증을 일으

키며(3), 최근에는 내인성 아토피피부염을 일으키는 병인요인으로 작용한다(15, 17, 18, 19). 50% 이상이 그람양성균인 황색포도상구균에 의해 유발되는 패혈증(sepsis)은 사이토카인 폭풍이라 일컬어지는 'cytokine storm'을 유도하면서 세포, 기관 및 조직에 손상을 입힘으로써 높은 사망률과 심각한 후유증을 동반하여 막대한 인적, 경제적 손실을 초래하는 세균감염 질환이다(4, 9).

염증반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍

* For correspondence. (H.Y. Yoon) E-mail: hyyoun@snu.ac.kr; Tel.: +82-2-880-1266; Fax: +82-2-880-1266, (H.W. Lee) E-mail: dinks@snu.ac.kr; Tel.: +82-2-880-1294; Fax: +82-2-880-1266

반, 부종 발열 통증 등 외적 증상이 나타난다. 정상인 경우 염증반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상(과민성 질환, 만성 염증)이 되며, 수혈, 약물투여, 장기이식 등 치료과정에서도 장애요인이 된다. 황색포도상구균의 감염에 의한 피부 염증반응은 표피의 피부상피세포가 손상을 입고 RANTES, TNF- α 와 IL-4를 유리시킴으로써 혈관내피세포에 유착 분자 ICAM-1, VCAM-1과 E-selectin 발현을 유도하여 림프구, 대식세포/표피의 수지상세포와 호산구를 침윤시키고 이어서 히스타민, 류코트리엔과 단백질분해효소 등 염증 세포들의 생산물들을 유리하여 피부 염증반응을 지속시키기 때문에 급고 더 가렵게 되는 악순환이 시작된다(2, 16, 24). 따라서 면역학적으로는 알레르겐과 미생물 항원에 만성적인 노출, Th2 세포 자극, 알레르겐 특이 IgE 생산, 단핵구로부터 PGE2와 IL-10 생산 증가, 비만세포의 탈과립, 호산구 침윤, 세포고사(apoptosis)의 지연 그리고 굵음으로써 피부상피세포에 염증성 매체 출현 등 복합적인 작용이 관여한다. 최근에 많은 종류의 병원인자를 생성하는 병원성 세균들은 일부 항원성을 가진 인자들이 Toll-like receptor (TLR)을 통해 면역반응이 유발된다는 사실이 최근 밝혀지면서 면역세포의 과민반응으로 인한 독성이 심한 염증증인들이 과분비되는 염증반응 기전에 대한 연구가 활발히 진행되었다(6, 20). 황색포도상구균이 생성하는 Staphylococcus toxin α (SEA), Staphylococcus toxin β (SEB) 및 toxin shock syndrome toxin (TSST-1)과 같은 장독소는 사람의 조직 내에서 염증반응을 유발 시킬 뿐만 아니라 세포사멸을 유도함으로써 치명적인 장기 손상을 초래한다는 사실이 밝혀졌다(5, 10, 14, 21). 황색포도상구균의 감염을 통해 면역세포의 과민반응으로 독성이 심한 염증인자(inflammatory factors)들이 과 분비되고, 여러 장기에 치명적인 손상을 일으킨다는 보고에 따라 그 작용기전의 명확한 규명이 중요한 과제로 인식되고 있다. 최근의 연구에서 황색포도상구균의 Staphylococcal protein A (SPA)가 피부조직에 있는 상피세포에서 생성된 IL-18 사이토카인이 CD4+ T 세포를 활성화하여 IFN- γ , IL-3, IL-13 등을 분비하게 함으로써 히스타민과 비만세포의 침윤을 초래함으로써 아토피피부염과 같은 피부염증질환을 일으킨다는 보고가 있었으며(23), 각막의 상피세포의 염증반응을 촉진한다는 연구 결과에 따라 염증질환에 중요한 병원인자로 추정되었다(11, 23). 따라서, 황색포도상구균에 의한 피부감염 염증질환과 관련된 병인기전의 이해를 돕기 위해서 황색포도상구균이 분비하는 많은 종류의 병원인자들 중 SPA가 사람의 피부상피세포의 염증반응 관련인자들의 발현을 분석하여 염증반응에 대한 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양

HaCaT 피부상피세포와 U937 단핵구는 ATCC (American Type of Cell Collection, USA)에서 각각 분양 받아, 10% 우

태아혈청(FBS; Hyclone, USA), 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 DMEM 배지(Life Technologies, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

아토피피부염 환자의 병변조직에서 황색포도상구균의 분리

아토피피부염 환자의 병변조직의 일부를 잘게 자른 다음 collagenase (10 μ g/ml)가 첨가된 PBS에 부유시키고 37°C에서 한 시간 반응시켰다. 황색포도상구균을 분리하기 위해 선택배지인 마니톨 한천배지에 부유물을 도말한 후 37°C에서 하루동안 배양하여 황색포도상구균을 분리하여 본 연구에 이용하였다.

아토피피부염 환자로부터 병변부위 채취 및 조직학적 분석

2003~2004년에 경북대학교 병원 피부과에 내원한 환자 중 샘플 채취 및 이용 동의서를 받은 9명의 아토피피부염을 가진 성인환자를 대상으로 경북대학교 임상시험 심사위원회로부터 승인을 받고 실험을 진행하였다. 아토피피부염을 가진 환자의 병변조직을 일부 채취하여 4% 포르말린 용액에 4시간 고정한 후 파라핀에 넣어 불력을 만들었다. 5 μ m 두께로 절단한 다음 3-aminopropyltriethoxy-saline에 코팅된 슬라이드에 부착시킨 후 Haematoxylin-Eosin (H-E) 염색과 SPA에 대한 면역조직화학요법을 다음과 같이 진행하였다. 0.3% H₂O₂가 포함된 PBS에 20분간 실온에서 반응시켜 endogenous peroxidases를 제거하고 polyclonal mouse anti-SPA (Santa-Cruz, USA) 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 16시간 반응시키고 PBS로 세 번 세척한 후 biotin conjugated donkey anti-mouse IgG (Santa-Cruz, USA) 2차 항체를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후 ABC 용액을 첨가하여 실온에서 한 시간 반응시켰다. 0.025% 3,3-diaminobenzidine 용액에 넣어 발색시킨 후 현미경 관찰을 실시한 후 사진 촬영하였다.

재조합 SPA 단백질 제작

황색포도상구균 분리주에서 genomic DNA를 분리 키트(QIAGEN, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. BamHI과 XhoI 제한효소 부위가 각각 부착된 primer쌍 (Forward primer: 5'-CACCGTGGATCCATGATGACTTTA CAAATACATACAG-3', Reverse primer: 5'-CACCGTCTC GAGTTATAGTTCGCGACGACGCTCCA-3')를 제작하여 PCR 반응을 통해 spa 유전자를 증폭을 실시하였다. BamHI과 XhoI 제한효소를 처리한 후 pET-28a 발현벡터에 삽입한 후 E. coli strain DH5 α 에 형질전환을 실시하였다. 형질전환 균주로부터 플라스미드를 추출한 후 spa 유전자의 삽입을 PCR 반응, 제한효소를 처리 및 염기서열분석을 통하여 확인하였다. spa가 삽입된 pET-28a 발현벡터를 E. coli strain BL21/DE3에 형질전환을 실시하였다. 형질전환 균주를 흡광도 0.6-1까지 배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 재조합 SPA 단백질을 과발현시켰다. 과발현된 SPA 단백질은 12% SDS-PAGE를 통해 확인한 후 Ni-NTA agarose gel (QIAGEN)을 이용하여 정제하였

다. 정제된 단백질은 12% SDS-PAGE를 통해 확인한 후 BioRad reagent (BioRad, USA)를 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 정제된 단백질은 lipopolysaccharide (LPS)의 오염을 방지하기 위해 제조회사의 방법에 의거하여 5 ml polypropylene column에 1 mg/ml의 polymixin B이 첨가된 polymixin B-Agarose (Sigma-Aldrich, USA) 10 ml을 정착시키고 1 mg의 정제단백질 용액을 통과 시킨 후 본 실험에 사용하였다.

재조합 SPA 단백질이 사람 피부상피세포의 독성능에 미치는 효능분석

10% FBS가 포함된 200 μ l의 DMEM 배지가 들어있는 96 well plate에 5×10^3 개의 HaCaT 피부상피세포를 하루동안 배양한 후 100-2000 ng/ml의 다양한 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 24 및 48시간 배양하였다. 각 well당 20 μ l의 WST-1 reagent를 첨가하고 5% CO₂가 들어있는 37°C 배양기에서 2시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과의 재현성을 확인하기 위해 총 3회 개별실험을 진행하였다.

재조합 SPA 단백질이 사람 피부상피세포의 염증반응에 미치는 효능분석

10% FBS가 포함된 2 ml의 DMEM 배지가 들어있는 6-well plate에 2×10^5 개의 HaCaT cells을 하루동안 배양한 후 2 μ g/ml의 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 6, 12 및 24 시간 배양하였다. RT-PCR 분석을 위해 배양된 세포를 회수한 후 total RNA를 분리하고 흡광도 260 nm에서 정량분석을 실시하였다. 분리한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후 PCR 반응을 수행하여 염증관련 부착인자인 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin과 염증관련 사이토카인인 IL-6, IL-8 및 MCP-1의 발현을 분석하였다. 또한 배양상등액을 회수하여 염증관련 사이토카인인 MCP-1, IL-6 및 IL-8에 대한 ELISA 분석을 실시하였다. RT-PCR 및 ELISA 분석결과의 재현성을 확인하기 위해 총 3회 개별실험을 진행하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

세포에서 total RNA의 분리는 total RNA extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하였다. Scraper를 이용하여 1×10^6 개의 세포를 바닥에서 떼어낸 후, extraction solution 1 ml를 첨가하여 16,000 \times g (4°C)에서 10분간 원심분리를 하였다. 조심스럽게 상등액을 새 tube에 옮기고 chloroform 200 μ l를 첨가한 다음 부드럽게 혼합하였다. 16,000 \times g (4°C)에서 10분간 원심분리를 한 후, 상등액(400 μ l)을 새 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 부드럽게 혼합하였다. 16,000 \times g (4°C)에서 5분간 원심분리를 한 후, 조심스럽게 상등액을 제거하였다. Pellet에 75% 에탄올을 첨가한 후 15초 동안 혼합하고 9,300 \times g (4°C)에서 5분간 원심분리를 하였다. 조심스럽게 상등액을 제거하고 pellet을 공기 중에 완전히 건조시킨 후 RNA pellet에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 증류수 20 μ l를 넣어 RNA를 용해시켰다. 추출한 RNA는 흡광 광

도계 (SmartSpec TM3000, BioRad)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다. 5 μ g의 total RNA를 주형으로 사용하여 oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Gibco-BRL, USA) 1 μ l를 혼합하고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음 위에서 5분간 보관하였다. 5 \times first-strand buffer (Promega, USA) 4 μ l, 0.1 M dithiothreitol (DTT, Promega) 2 μ l와 10 U/ μ l의 RNase inhibitor (Invitrogen, USA) 1 μ l, 2.5 mM deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP, Promega) mix 4 μ l, 그리고 200 U/ μ l의 M-MLV reverse transcriptase (M-MLV RT, Gibco-BRL) 1 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간, 70°C에서 15분간 반응시키고, 4 mg/ml의 RNase H 1 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 같은 양의 chloroform을 첨가하여 30초간 강하게 진탕하고 16,000 \times g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 새 tube에 옮기고 -20°C에 보관하였다. 역전사 효소를 이용하여 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 5 μ l의 5x PCR reaction buffer (Promega), 2 μ l의 2.5 mM dNTP mix, 0.5 μ l의 유전자에 특이적인 시발체(Table 1)를 각 10 pmol/ μ l와 0.125 μ l의 Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)를 혼합하였다. 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 다음 GAPDH는 94°C에서 30초, 57°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초간 25회 반복시켰고 E-selectin, ICAM-1, MCP-1, IL-6 및 IL-8은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초간 35회 반복하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 ethidium bromide (0.5 μ g/ml)가 포함된 1.5% agarose (BioWhittaker Molecular Applications, USA) gel에 6 \times gel loading buffer (Intron)로 loading하여 100 V에서 전기 영동하였다. UV illuminator (Vilber Lourmate, Marne-La-Vallée, France)를 통해 증폭된 DNA를 확인하여 Photo-Documentation Camera (Fisher Scientific, USA)로 촬영하였다.

ELISA 분석

2% FBS가 포함된 2 ml DMEM 배지가 들어있는 6-well plate에 2×10^5 개의 HaCaT 피부상피세포를 하루동안 배양한 후 2 μ g/ml의 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 12 및 24시간 배양하여 상등액을 회수하였다. IL-6와 IL-8의 생성량은 제조회사(R&D Systems, USA)의 방법에 의거한 ELISA kit를 이용하여 분석하였다.

피부상피세포와 단핵구간의 부착능 분석

DMEM (2% FBS)이 들어있는 6-well plate에 1×10^5 개의 HaCaT 피부상피세포를 첨가하여 하루동안 부착시켜 배양하고 2 μ g/ml의 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 하루동안 반응시켰다. 4×10^6 개의 U937 단핵구를 각 well에 첨가하여 4시간 반응시키고 부착하지 않은 U937 단핵구를 제거하기 위해서, RPMI 1640 (Serum-free)으로 3번 세척한 후 현미경으로 관찰 후 부착된 monocytes를 회수하고 세포수를 측정하였다. 또한 결과의 재현성을 위해 3회 개별실험을 진행하였다.

Table 1. Primer sequences used in this study

Target gene	GenBank accession no.	Sequence of primer	PCR product size
E-selectin	BC142677	FP: 5'-ACCTCCACGGAAGCTATGAC-3' RP: 5'-TCCCAGATGAGGTACACTGA-3'	796 bp
ICAM-1	NM000201	FP: 5'-CTGCAGACAGTGACCATCTA-3' RP: 5'-AAAGTGCCATCCTTTAGACA-3'	461 bp
IL-6	M14584	FP: 5'-CCTTCCAAAGATGGCTGAA-3' RP: 5'-CAGGGGTGGTTATTGCATCT-3'	230 bp
IL-8	BC013615	FP: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' RP: TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3'	292 bp
MCP-1	X14768	FP: 5'-TCTCAGTGCAGAGGCTCGCGA-3' RP: 5'-GAGTGAGTGTTCAGTCTTCG-3'	183 bp
GAPDH	NM002046	FP: 5'-AAGTGGATATTGTTGCCATC-3' RP: 5'-ACTGTGGTCATGAGTCCTTC-3'	454 bp

결과

아토피피부염 환자의 병변부위에서 조직학적인 분석을 통해 황색포도상구균의 감염에 의한 염증반응 확인

아토피피부염 환자의 피부병변 조직을 H-E 염색을 실시한 결과 정상조직 대조군에 비해 epidermis region에 과세포증식(hyperplasia)이 일어난 것을 확인할 수 있었고, 혈관으로부터

들어온 염증세포들의 침윤을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A, B). 이러한 결과는 아토피피부염 환자의 피부병변 부위에 염증반응이 있음을 보여준다. 또한 면역조직화확요법을 실시하여 아토피피부염 환자의 조직에서 황색포도상구균의 표면발현 단백질 Staphylococcal protein A (SPA)의 풍부한 발현을 관찰함으로써 아토피피부염 환자의 피부조직에서 황색포도상구균의 감염에 의해 염증반응이 야기되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1C, D).

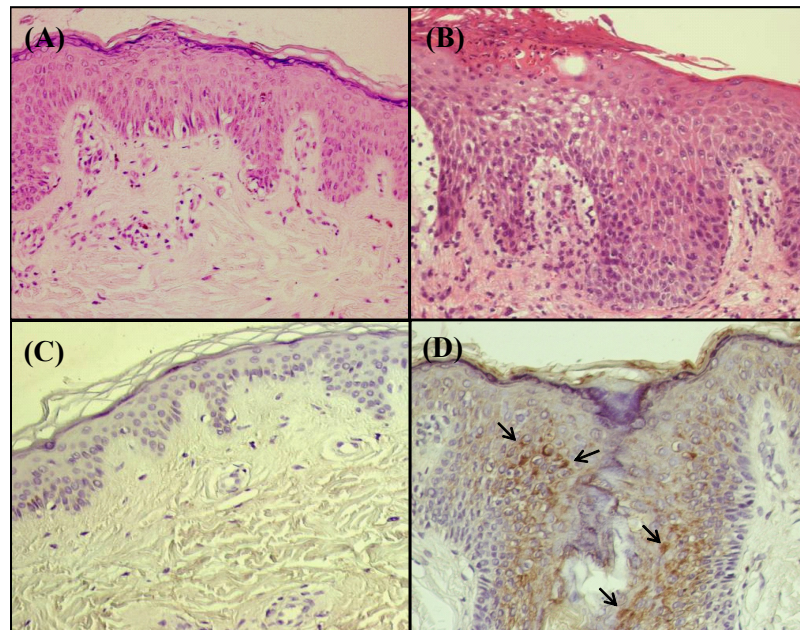


Fig. 1. Haematoxylin-Eosin (H-E) stain and Immunohistochemistry of SPA in *S. aureus*-infected human AD patients. The result of H-E stain shows hyperplasia in *S. aureus*-infected human AD patients (B) compare with control (A). The number of SPA immunoreactive region in patient skin (D) is increased compare to control (C). SPA immunopositive region are detected in epithelium and indicated as arrow. Control: normal human skin.

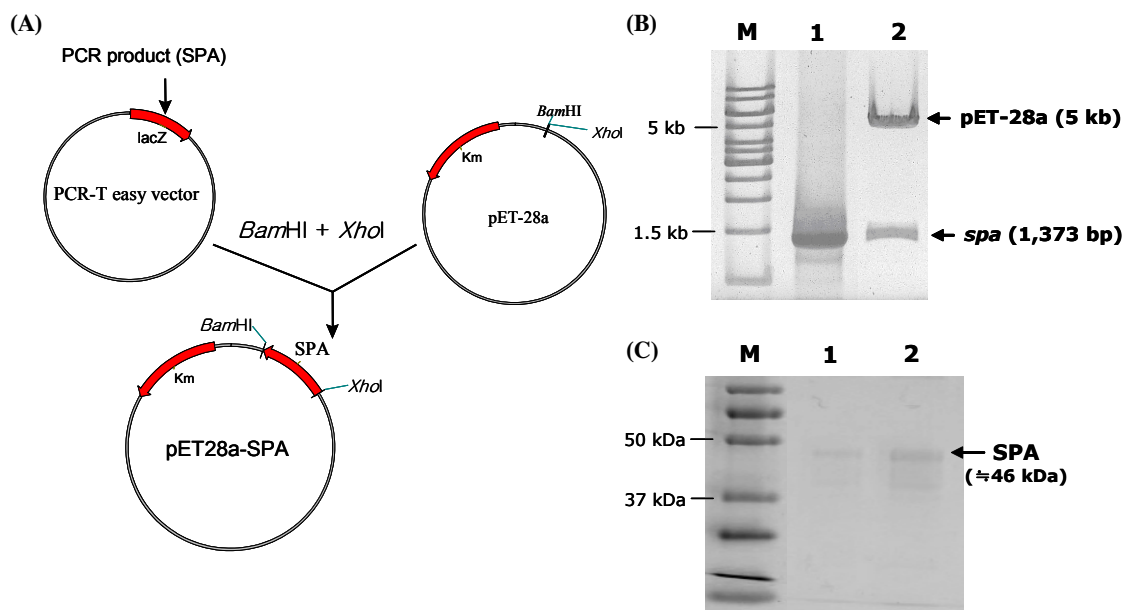


Fig. 2. Generation of recombinant SPA protein in *E. coli* strain BL21/DE3. (A) Construct of pET28a-SPA expression vector. (B) Agarose gel electrophoresis of pET28a-SPA digested with *Bam*HI and *Xho*I. (C) 12% SDS-PAGE of the purified recombinant SPA protein. M: size marker.

재조합 SPA 단백질 제작

pET-28a 발현벡터시스템을 이용하여 재조합 SPA 단백질을 제작하기 위해서 *S. aureus* 균주에서 genomic DNA를 분리하고 PCR 반응을 통해 *spa* 유전자 증폭을 실시한 후 pET-28a 발현벡터에 삽입하였고, 제한효소 *Bam*HI와 *Xho*I를 처리하여 삽입된 *spa* 유전자를 확인하였다(Fig. 2A, B). pET28a-SPA 발현벡터를 *E. coli* strain BL21/DE3에 형질전환시키고 흡광도 1에서 1 mM IPTG를 첨가하여 재조합 SPA 단백질을 과발현시켰다. Ni-NTA agarose gel (QIAGEN)을 이용하여 정제한 후 12% SDS-PAGE를 통해 확인함으로써 재조합 SPA 단백질이 성공적으로 제작 및 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

재조합 SPA 단백질이 사람 피부상피세포의 독성능에 미치는 효능분석

재조합 SPA 단백질이 사람 피부상피세포의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위해서, 5×10^3 개의 HaCaT 피부상피세포를 하루동안 배양한 후 100-2000 ng/ml의 다양한 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 24-48시간 배양한 후 WST-1 assay를 실시하였다. 피부상피세포에 대한 SPA의 세포독성능을 분석한 결과 100-2000 ng/ml의 농도에서는 SPA에 의한 피부상피세포의 세포독성은 거의 관찰되지 않았다(자료 미제시). 이러한 결과는 2 μ g 이하의 농도에서는 SPA가 피부상피세포의 증식억제 및 세포치사에 크게 영향을 미치지 않음을 의미한다.

재조합 SPA 단백질이 혈관내피세포 및 피부상피세포의 염증반응에 미치는 효능분석

SPA가 피부상피세포에서 염증반응에 미치는 효과를 분석하기 위해서 HaCaT 피부상피세포에 2 μ g/ml의 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 6, 12 및 24시간 배양한 후 RT-PCR를 통해 염증관련 부착인자인 E-selectin 및 ICAM-1과 염증관련 사이토카인인 MCP-1, IL-6 및 IL-8의 발현을 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 SPA 처리 6, 12 및 24시간에서 염증관련 부착인자인 ICAM-1 및 E-selectin mRNA 발현의 현저하게 증가였고, 염증관련 사이토카인인 MCP-1, IL-6 및 IL-8 mRNA의 발현 또한 현저하게 증가한다는 사실을 확인하였다(Fig. 3). IL-6 및 IL-8에 대한 ELISA 분석을 통해서도 SPA를 처리한 피부상피세포에서 12 및 24시간째에 IL-6 및 IL-8 단백질의 발현이 현저하게 증가한다는 결과를 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과들은 SPA가 사람의 피부상피세포에서 염증관련 부착인자(ICAM-1 및 E-selectin)와 사이토카인(IL-6과 IL-8)의 발현을 증진시켜 염증반응을 촉진시킨다는 사실을 보여준다.

SPA가 피부상피세포와 단핵구간의 부착능에 대한 효능분석

SPA가 피부상피세포와 단핵구간의 부착능에 대한 효능을 분석하기 위해서, 1×10^5 개의 HaCaT 피부상피세포에 2 μ g/ml의 농도로 재조합 SPA 단백질을 투여하여 하루 동안 반응시킨 후 4×10^6 개의 U937 단핵구를 첨가하여 4시간 반응시킨 후 HaCaT 피부상피세포에 부착된 U937 단핵구의 수를 측정하였다. 재조합 SPA 단백질을 1일 및 2일 동안 처리한 피부상

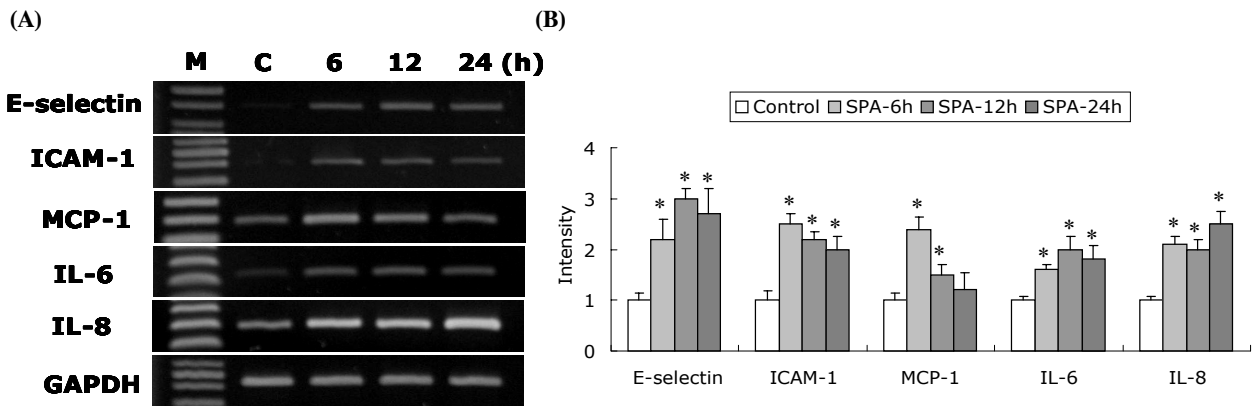


Fig. 3. The effect of recombinant SPA protein on the expression of pro-inflammatory response-related adhesion molecules (E-selectin and ICAM-1) and cytokines (IL-6, IL-8 and MCP-1) in HaCaT keratinocytes by RT-PCR analysis. (A) SPA treatment (2 μ g/ml) for indicated times (6, 12, and 24 h) increased the expression of E-selectin, ICAM-1, MCP-1, IL-6 and IL-8. B. Band densities in each lane were evaluated semi-quantitatively by scanning densitometry. Data are representative of three independent experiments with similar results. Results are ratios of E-selectin, ICAM-1, MCP-1, IL-6 and IL-8 mRNA normalized to GAPDH mRNA expressed as means+SD. * p <0.01 compared with the control value as determined by one-way ANOVA statistical analysis

피세포와 단핵구와의 부착능을 조사한 결과 SPA는 피부상피세포와 단핵구와의 부착능을 2배 이상 증가시켰다(Fig. 5). 이러한 결과는 SPA가 피부상피세포에서 염증관련 부착단백질(E-selectin 및 ICAM-1)의 발현을 증가시킴으로써 단핵구와의 부착능을 증진시킨다는 사실을 보여준다.

고찰

본 연구에서는 피부에 심각한 염증을 유발한 아토피 환자의 병변조직에서 황색포도상구균의 감염을 확인할 수 있었고, 그 황색포도상구균이 염증반응을 강력하게 촉진시키는 독력인자(virulence factor)들을 가지고 있음을 예견할 수 있었다. 그래서 본 연구에서는 황색포도상구균에 의한 피부 염증질환과

관련된 병인기전의 규명을 위한 기초연구로서 황색포도상구균이 분비하는 많은 종류의 병원인자들 중 SPA가 사람의 피부상피세포의 세포독성에 미치는 영향을 조사하였고, 피부상피세포에서 염증반응 관련인자들의 발현에 미치는 효과를 조사하였다. 최근의 연구보고에 의하면 황색포도상구균에서 분비되는 세포막에서 생성된 소포들(the membrane-derived vesicles, MVs) 속에는 SPA 단백질이 과량 포함되어 있으며, 인체 후두 상피세포인 HEp-2 세포에 과량의 MVs를 처리하면 세포사멸을 초래한다는 결과를 보고하였다(8). 이 연구결과에 의하면 MVs에 의해 SPA가 세포안으로 유입되고 그로 인해 세포사멸로 유도될 수 있다는 것이다. 이러한 연구결과를 통해 짐작해보면 본 연구결과에서는 100-2,000 ng/ml의 농도의 SPA는 피부상피세포의 독성에 영향을 미치지 않았지만 5-50 μ g 이

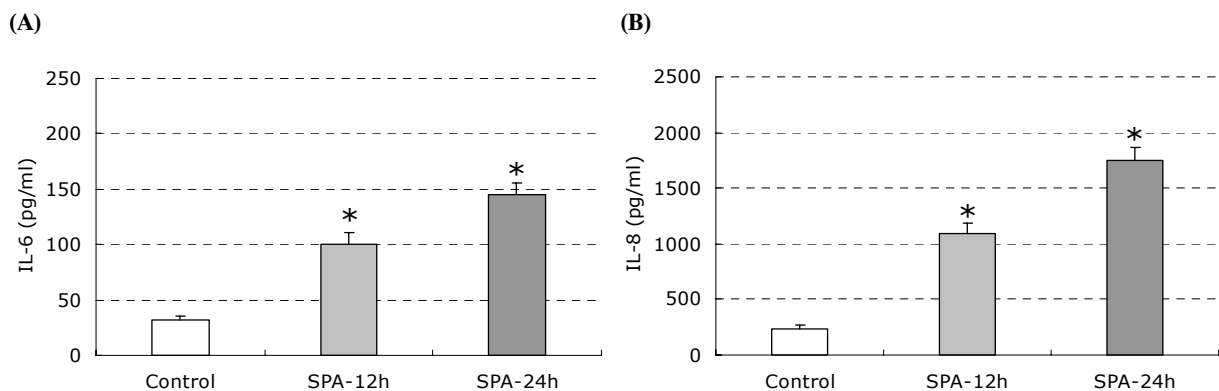


Fig. 4. The effect of recombinant SPA protein on the expression of IL-6 and IL-8 protein in HaCaT keratinocytes by ELISA. SPA treatment (2 μ g/ml) for indicated times (12 and 24 h) increased the expression of IL-6 and IL-8 protein. The results are representative of three independent experiments with similar results. Data are expressed as means+SD. * p <0.01 compared with the control value as determined by one-way ANOVA statistical analysis.

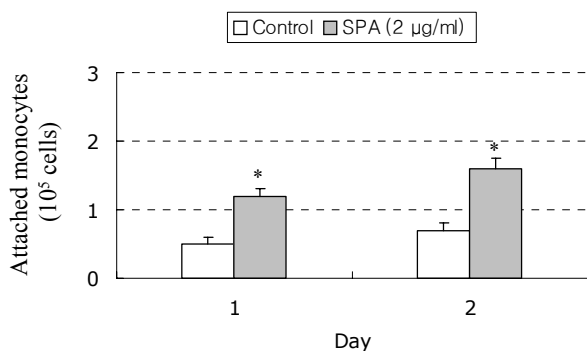


Fig. 5. Quantitative adherence assay of U937 monocytes to HaCaT keratinocytes. U937 monocytes were seeded onto HaCaT keratinocytes after treatment with SPA (2 µg/ml) for 1 and 2 days and then incubated for 3 h. The number of adherent U937 monocytes to HaCaT keratinocytes was determined by cell counting. HaCaT keratinocytes after treatment with SPA showed a significant increase in the numbers of attached U937 monocytes. Data are representative of three independent experiments with similar results. Results are the mean±SD of triplicates. * $p < 0.01$ compared with the control value as determined by one-way ANOVA statistical analysis.

상 과량의 SPA를 처리하면 피부상피세포의 세포사멸을 초래할 수 있음을 시사해준다.

본 연구의 RT-PCR와 ELISA 분석의 결과에서 보여준 SPA에 의한 피부상피세포에서 염증관련 부착단백질(E-selectin, ICAM-1 및 VCAM-1)과 사이토카인(IL-6, IL-8, 및 MCP-1)들의 발현의 증가는 염증반응의 유발을 확인할 수 있는 근거가 된다. 왜냐하면 염증관련 사이토카인들은 단핵구와 면역세포들을 불러오는 신호전달을 수행하는 역할을 하며 염증관련 부착단백질들에 의해 상호결합을 함으로써 염증을 야기하기 때문이다. SPA가 기도조직에 있는 상피세포에서 IL-8의 생성을 증가시킴으로써 염증반응을 증진시킨다는 이전 연구보고에서 보면 상피세포에서 SPA에 의한 IL-8 생성의 증가는 SPA가 TNF- α 를 생성함으로써 그 수용체(TNF receptor)를 통해서 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 신호과정을 거쳐 IL-8의 생성을 유도하였을 뿐만 아니라 또 다른 수용체를 통해서도 IL-8의 생성을 증가시켰음을 제시하였다(7). 이러한 연구결과는 SPA가 사람의 피부상피세포에서 IL-8의 생성을 촉진시킨다는 본 연구의 결과를 뒷받침해주는 좋은 근거자료가 된다. 게다가 본 연구에서는 SPA가 피부상피세포에서 IL-8의 생성을 촉진할 뿐만 아니라 IL-6와 MCP-1의 생성을 촉진한다는 새로운 사실을 보여주었다. IL-6은 염증반응의 결과를 확인할 수 있는 대표적인 사이토카인이며 면역세포들을 불러오고 활성화시키는데 중요한 역할을 수행하며, MCP-1은 단핵구를 불러오기 위한 신호전달을 수행하는 케모카인으로 염증반응을 매개하는 대표적인 신호전달인자이다. 또한 SPA에 의한 피부상피세포와 단핵구와의 상호 부착력의 증진을 보여주었는데 이러한 결과는 SPA가 피부상피세포에 염증반응 매개

부착인자인 E-selectin 및 ICAM-1의 발현을 증진시킴으로써 이러한 부착단백질이 단핵구와의 결합에 관여했다는 사실을 제시한다. 따라서 SPA에 의한 피부상피세포의 염증관련 부착단백질(E-selectin 및 ICAM-1)과 사이토카인(IL-6, IL-8, 및 MCP-1)들의 발현 증가는 SPA가 피부상피세포의 염증반응을 유도 및 촉진한다는 사실을 보여주는 결과이다. 이전의 연구 보고들에 의하면 상피세포를 포함한 조직세포들은 황색포도상구균과 같은 그람양성 균종들은 인지하는 몇 개의 수용체가 있으며 그 중에서 대표적으로 Toll like receptor 2 (TLR2)가 관여한다고 알려져 있다(12, 13, 22). 특히 Gomez 등(7)은 SPA가 TNF receptor 1 (TNFR1)을 통해서 사람의 기도에 있는 상피세포의 염증을 유발한다고 보고하였고, Kumar 등(11)은 황색포도상구균에서 발현되는 SPA가 각막의 상피세포의 염증반응을 유발한다고 보고하였는데, 이러한 연구결과들은 SPA가 조직세포에서 발현되는 TNFR1을 통해서 염증반응을 유도한다는 사실을 시사해준다. 또한 최근에는 SPA가 사람 피부상피세포의 TNFR1과 강한 결합을 통해 NK- κ B를 활성화시키고 염증관련 유전자의 발현을 증진시킨다는 연구결과를 보고하였다(1). 이러한 이전의 연구결과와 마찬가지로 본 연구 결과에서도 SPA가 혈관내피세포에서 염증관련 부착단백질(E-selectin 및 ICAM-1)과 사이토카인(IL-8, IL-12 및 MCP-1)의 발현을 증가시킴으로써 염증반응을 유도 및 촉진한다는 연구결과들은 SPA가 피부상피에서 발현되는 TNFR1을 통해서 염증반응을 유도하는 중요한 염증반응 유도인자라는 사실을 뒷받침해준다. 또한 SPA는 황색포도상구균의 거의 모든 균종에서 생산되는 중요한 표면단백질이고 조직세포에 작용해서 염증반응과 질병을 야기할 수 있을 거라 생각되기 때문에 본 연구결과에서 보여준 SPA가 피부상피세포의 염증을 유발한다는 결과는 황색포도상구균에 의한 병인기전 연구에 중요한 근거자료가 될 수 있다. 결론적으로 본 연구의 결과는 아토피 피부염 환자에서 분리한 황색포도상구균으로부터 SPA 재조합 단백질을 제작하였고, *in vitro*에서 염증반응과 관련된 중요한 부착단백질 및 사이토카인의 발현조사를 통하여 SPA가 염증반응 촉진인자로서의 역할을 확인하였을 뿐만 아니라 황색포도상구균의 감염으로 인한 병인기전을 뒷받침해주는 중요한 근거자료로서 활용될 수 있을 것이다.

적요

황색포도상구균은 사람에게서 염증을 동반한 다양한 형태의 국소적 또는 전신적 감염을 일으키는 주요 병원균이며, 황색포도상구균에서 풍부하게 발현되는 Staphylococcal protein A (SPA)는 염증의 활성화나 면역 반응의 회피와 관련된 강력인자로서 작용할 수 있다. 본 연구에서는 사람의 HaCaT 피부상피세포에서 재조합 SPA 단백질을 이용하여 염증반응에 대한 효과를 조사하기 위해서 pET-28a 발현벡터시스템을 이용하여 성공적으로 재조합 SPA 단백질을 제작하였고, 이 단백질(2 µg/ml)을 6, 12 및 24시간 처리한 HaCaT 피부상피세포에서 RT-PCR 및 ELISA를 이용하여 염증관련 부착인자 및

사이토카인의 발현을 분석하였다. SPA 처리 후 6시간에서 24 시간까지 E-selectin, ICAM-1, MCP-1, IL-6 및 IL-8의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다. 또한 SPA는 HaCaT 피부상피세포에 대한 U937 단핵구의 부착력을 증진시켰다. 따라서, 본 연구의 결과는 SPA가 HaCaT 피부상피세포의 염증반응을 촉진시킨다는 사실을 보여주었으며, 황색포도상구균에 의한 피부염증질환에 있어서 중요한 병원성인자로서의 역할을 수행한다는 사실을 시사해준다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(KRF-313-2008-2-E00618)에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

- Classen, A., B.N. Kalali, C. Schnopp, C. Andres, J.A. Aguilar-Pimentel, J. Ring, M. Ollert, and M. Mempel. 2011. TNF receptor 1 on human keratinocytes is a binding partner for staphylococcal protein A resulting in the activation of NFκB, AP-1, and downstream gene transcription. *Exp. Dermatol.* 20, 48-52.
- Donnarumma, G., I. Paoletti, E. Buommino, M.A. Tufano, and A. Baroni. 2004. Alpha-MSH reduces the internalization of *Staphylococcus aureus* and down-regulates HSP 70, integrins and cytokine expression in human keratinocyte cell lines. *Exp. Dermatol.* 13, 748-754.
- Dryden, M.S. 2010. Complicated skin and soft tissue infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 35-44.
- Edwards, A.M., J.R. Potts, E. Josefsson, and R.C. Massey. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* 6, e1000964.
- Fernandez, S., E.D. Cisney, S.I. Hall, and R.G. Ulrich. 2011. Nasal immunity to staphylococcal toxic shock is controlled by the nasopharynx-associated lymphoid tissue. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 667-675.
- Fournier, B. and D.J. Philpott. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 521-540.
- Gómez, M.I., A. Lee, B. Reddy, A. Muir, G. Soong, A. Pitt, A. Cheung, and A. Prince. 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* 10, 842-848.
- Gurung, M., D.C. Moon, C.W. Choi, J.H. Lee, Y.C. Bae, J. Kim, Y.C. Lee, S.Y. Seol, D.T. Cho, S.I. Kim, and J.C. Lee. 2011. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One* 6, e27958.
- Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 813-822.
- Kim, K.H., J.H. Han, J.H. Chung, K.H. Cho, and H.C. Eun. 2006. Role of staphylococcal superantigen in atopic dermatitis: influence on keratinocytes. *J. Korean Med. Sci.* 21, 315-323.
- Kumar, A., A.M. Tassopoulos, Q. Li, and F.S. Yu. 2007. *Staphylococcus aureus* protein A induced inflammatory response in human corneal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 955-961.
- Kumar, A., J. Zhang, and F.S. Yu. 2004. Innate immune response of corneal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 3513-3522.
- Kumar, A., J. Zhang, and F.S. Yu. 2006. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect.* 8, 380-389.
- Lin, Y.C., M.J. Anderson, P.L. Kohler, K.L. Strandberg, M.E. Olson, A.R. Horswill, P.M. Schlievert, and M.L. Peterson. 2011. Proinflammatory exoprotein characterization of toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 50, 7157-7167.
- Lübbe, J. 2003. Secondary infections in patients with atopic dermatitis. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4, 641-654.
- Macias, E.S., F.A. Pereira, W. Rietkerk, and B. Safai. 2011. Superantigens in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 64, 455-472.
- Nada, H.A., N.I. Gomaa, A. Elakhras, R. Wasfy, and R.A. Baker. 2011. Skin colonization by superantigen-producing *Staphylococcus aureus* in Egyptian patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and serum interleukin-4 level. *Int. J. Infect. Dis.* (in press).
- Niebuhr, M., M. Gathmann, H. Scharonow, D. Mamerow, S. Mommert, H. Balaji, and T. Werfel. 2011. Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. *Infect. Immun.* 79, 1615-1622.
- Ortega-Loayza, A.G., S.A. Diamantis, P. Gilligan, and D.S. Morrell. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* cutaneous infections in a pediatric dermatology tertiary health care outpatient facility. *J. Am. Acad. Dermatol.* 62, 804-811.
- Rocha-de-Souza, C.M., B. Berent-Maoz, D. Mankuta, A.E. Moses, and F. Levi-Schaffer. 2008. Human mast cell activation by *Staphylococcus aureus*: interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha release and the role of Toll-like receptor 2 and CD48 molecules. *Infect. Immun.* 76, 4489-4497.
- Schubert, S., H. Schwertz, A.S. Weyrich, Z.G. Franks, S. Lindemann, M. Otto, H. Behr, H. Loppnow, A. Schlitt, M. Russ, and et al. 2011. *Staphylococcus aureus* α-toxin triggers the synthesis of B-cell lymphoma 3 by human platelets. *Toxins (Basel)* 3, 120-133.
- Sun, Y., A.G. Hise, C.M. Kalsow, and E. Pearlman. 2006. *Staphylococcus aureus*-induced corneal inflammation is dependent on toll-like receptor 2 and myeloid differentiation factor 88. *Infect. Immun.* 74, 5325-5332.
- Terada, M., H. Tsutsui, Y. Imai, K. Yasuda, H. Mizutani, K. Yamanishi, M. Kubo, K. Matsui, H. Sano, and K. Nakanishi. 2006. Contribution of IL-18 to atopic-dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8816-8821.
- Veltrop, M.H., J. Thompson, and H. Beekhuizen. 2001. Monocytes augment bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor activity in bacterium-infected human vascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 69, 2797-2807.