

## The Effects of Staphylococci on the Degranulation of Human Mast Cell-1

In-Taek Jang<sup>1,2</sup>, Miso Yang<sup>1</sup>, Eun-Kyeong Jo<sup>1</sup>, Hwa-Jung Kim<sup>1</sup> and Jeong-Kyu Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Cancer Research Institute, <sup>2</sup>Department of Medical Science, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Atopic dermatitis (AD) is characterized by disturbances in epidermal barrier functions and the hyperactive immune response. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) can be cultured from 90% of AD skin lesions and can exacerbate or contribute to the persistent skin inflammation in AD by secreting toxins with superantigenic properties. Superantigens can induce mast cell (MC) degranulation after penetrating the epidermal barrier. The role of MCs in AD is suggested by the increase in the MC number and MC activation. MCs are activated for degranulation and mediator release by allergens that cross-link IgE molecules or by microbial products. Therefore, MCs may be critically involved in the pathogenesis of AD. However, the understanding mechanisms of MC degranulation by *S. aureus* in relation to AD have still not been fully elucidated. In this study, we found that live *S. aureus* or methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) but not heat-killed bacteria induced MC degranulation. The heat-treatment partially inhibited MC degranulation by conditioned media (CM) of *S. aureus* or MRSA. The calcium chelator ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) did not block MC degranulation induced by live *S. aureus* or MRSA, but EGTA-treatment partially inhibited MC degranulation by CM from *S. aureus* or MRSA. These results suggest that live *S. aureus* and MRSA can degranulate MCs via direct interaction which may be important role in AD.

**Key Words:** Staphylococci, Mast cell,  $\beta$ -hexosaminidase, Atopic dermatitis

### INTRODUCTION

아토피피부염(atopic dermatitis, AD)은 심한 가려움과 재발성 습진을 특징으로 하는 만성염증성 피부질환이다. 대부분 유아기에 시작되며 아이들의 유병률은 15~30%이지만 성인에서도 5~10%가 발생한다 (1). 아토피피부염의 발병기전은 알레르기반응이 기본이며, 또한 상피장벽 보호 기능 결손의 역할에 대한 관심이 증가되고 있다 (2). 피부

는 표피의 각질세포와 진피의 결합조직으로 구성되며 진피 층 내에는 비만세포, 수지상세포 및 큰포식세포 등이 산재되어 있다. 이 중 비만세포는 고친화력의 IgE 수용체를 발현하고 있어 이 결합항체에 항원이 교차결합 하면 세포과립이 세포 외로 방출되어 알레르기를 일으킨다. 또한 비만세포는 병원체연관분자유형인지수용체들을 발현하고 있어 미생물 또는 미생물산물을 인지하고 이에 대한 반응에 따라 선천 및 적응면역을 유도하여 감염을 제어할 수도 있다. 비만세포는 포식세포로서 비만세포 세포질막

Received: July 3, 2017/ Revised: August 2, 2017/ Accepted: August 14, 2017

\*Corresponding author: Jeong-Kyu Park, M.D., Ph.D. Department of Microbiology, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea.

Phone: +82-42-580-8244, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: jekpark@cnu.ac.kr

\*\*This work was supported by research fund of Chungnam National University.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

에 세균이 결합되면 포식하여 초기 엔도솜, 후기 엔도솜 그리고 리소솜에 융합되어 포식리소솜 내에서 세균을 사멸시킨다 (3, 4).

고전적으로 비만세포 탈과립은 알레르기 항원이 FcεRI에 결합되면 Lyn 티로신키나제가 immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)을 인산화 시킴으로 시작된다. 이어서 spleen tyrosine kinase (Syk) 티로신키나제가 LAT를 활성화시키고 PLCγ가 LAT에 결합되면 IP3와 DAG가 생성되며, IP3는 세포질 내 칼슘을 증가시키고 DAG는 PKC를 활성화한다. 이들에 의하여 과립들이 비만세포의 세포막에 융합되어 탈과립이 이루어진다. 그러나 신경펩타이드(neuropeptide), 아편주사제(opioids), 물리적자극(physical stimuli)과 집먼지진드기 항원 등에 의한 비만세포의 탈과립은 IgE 매개에 비존재적이다. 또한 세균감염도 비만세포에서 매개체(mediators)를 방출하기 때문에 세균감염이 알레르기 발달에 영향을 줄 수 있다 (5). 세균에 의한 탈과립의 경우 *Streptococcus pneumoniae*에 의한 비만세포의 탈과립은 탈과립에 4시간 정도 요구되어 IgE 매개 탈과립에서 관찰되는 것처럼 빠르지 않으며, 비병원성 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*은 비만세포의 탈과립을 유도하지도 않는다 (5). 그러므로 모든 세균이 탈과립을 일으키지 않을 뿐만 아니라 즉시 유도하지도 않아 세균에 의한 비만세포의 반응은 균 특이성이 있다.

아토피피부염 환자의 병소 표피와 진피에는 건강한 피부에 비하여 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)의 균집락이 많다. *S. aureus*는 표피를 관통할 수 있으며 세균의 단백질 분해효소에 의하여 표피관통이 촉진될 수 있다. 건강한 피부에서는 드물게 발견되는 *S. aureus*가 90% 이상의 아토피피부염 환자 병소에서 발견된다 (6). *S. aureus* δ-toxin 매개 비만세포의 탈과립에 IgE가 필요하지는 않지만 IgE는 항원이 없는 상태에서 δ-toxin에 의한 비만세포의 탈과립을 촉진한다 (7). 아토피피부염 환자에서 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)의 발견율이 정상인의 1~3%에 비하여 11~34%로 높다. MRSA는 아토피피부염의 재발과 악화를 시키는데 침습성과 초항원의 생산이 *S. aureus*에 비하여 더 많은 것이 원인으로 보고되고 있다 (8). 건강한 사람의 피부에 우세하게 존재하는 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)는 피부손상 후에 발생하는 염증을 억제할 수 있으며 정상균무리에 의한 면역무반응의 유지, 피부 T세포 발달의 조절 및 항미생물 펩티드의 생산을 유도하며 선천면역을 강화시킨다 (9). 그러나 아토피피부염 환자에

서는 *S. epidermidis*가 아토피피부염을 악화시킨다는 보고도 있다 (10). *S. aureus* δ-toxin에 의한 비만세포 탈과립은 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)와 칼슘 유입에 의존적이지만 IgE 교차결합에 의한 탈과립의 기전과는 다르게 비만세포 탈과립에 spleen tyrosine kinase (Syk)는 요구되지 않는다 (7). 이와 같이 *S. aureus*가 아토피피부염의 원인으로 잘 알려져 있으나 비만세포의 탈과립에 대한 기전은 아직 잘 모르고 있다.

본 연구에서는 아토피피부염과 관련이 적은 *S. epidermidis*와 아토피피부염의 원인으로 잘 알려져 있는 *S. aureus* 및 MRSA가 사람비만세포(human mast cell-1, HMC-1)의 탈과립에 미치는 영향을 관찰하여 포도알균속에 의한 사람비만세포의 탈과립 기전을 분석하고자 하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### 사람비만세포주 배양

HMC-1을 조직배양플라스크(Coming, Coming, NY, USA)를 이용하여 10% FBS (Hyclone, Logan, UT, USA), 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza, Walkersville, MD, USA)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양조건에서 배양하였다. 매 3일마다 절반씩 새로운 배양배지로 교체하였다 (11).

### 균주 배양 및 균배양액

*S. aureus* ATCC 25923 (Antimicrobial disk susceptibility test strain), *S. epidermidis* ATCC 12228 (Microbial assay for antibiotics) 및 *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA)를 10 ml의 Tryptic Soy Broth (TSB; Becton & Dickinson, Sparks, MD, USA)로 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 균액을 3,000 rpm에서 10분간 원심하였다. 상청액을 0.2 µm의 여과기로 여과하여 균배양액(conditioned media, CM)으로 하였다. 침사균은 5 ml의 TSB에 다시 부유하여 4시간 더 배양하여 대수 증식기 균을 얻었다. 이 균을 3,000 rpm에서 10분간 원심하고 침사균을 PBS로 600 nm에서 흡광도(optical density; OD) 600=0.1 ( $4 \times 10^7$ /ml), OD600=0.5 ( $8 \times 10^7$ /ml) 및 OD600=1 ( $4 \times 10^8$ /ml)로 조정하였다. 이 균액을 3,000 rpm에서 10분간 원심한 후 침사균을 항균제가 없는 DMEM (10% FBS 포함) 또는 Tyrode's buffer로 부유하여 사용하였다 (12, 13).

### $\beta$ -hexosaminidase 탈과립 측정

HMC-1 세포를 Tyrode's buffer (136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.05 mM  $\text{MgCl}_2$ , 11.9 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.42 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5.55 mM glucose; pH 7.3)로 2회 세척한 후 세포수를  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하였다. 세포를 Eppendorf tube (ET)에 400  $\mu\text{l}$ 씩( $4 \times 10^5/\text{well}$ ) 분주하였다. 원심분리한 후 120  $\mu\text{l}$ 를 취하여 버리고 균액 120  $\mu\text{l}$ 를 넣어 2시간 동안 자극하였다. 원심분리한 후 상청액을 96 well microtiter plate (Corning)에 옮겨  $\beta$ -hexosaminidase 탈과립을 측정하였다. 침사세포를 0.2% Triton X-100으로 세포를 용해한 후 microtiter plate에 옮겨 세포 내 잔여과립으로 하였으며 탈과립과 합하여 총과립으로 하였다. 상청액  $\beta$ -hexosaminidase를 0.2% Triton-X 100으로 비만세포를 용해하여 얻은  $\beta$ -hexosaminidase와 상청액  $\beta$ -hexosaminidase를 합한 것의 비율로 산정하여 탈과립을 %로 평가하였다.  $\beta$ -hexosaminidase 탈과립의 측정은 96 well microtiter plate에 각각의 검사액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣고 0.1 M sodium citrate (pH 4.5)에 1.3 mg/ml의 p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 넣어 만든 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 각 well에 0.4 M glycine (pH 10.7)을 50  $\mu\text{l}$ 씩 첨가시켜 효소반응을 정지시켰다. OD 405 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 OD를 측정하였다 (14).

### HMC-1 탈과립 억제 실험

포도알균속 세균 자극에 의한 탈과립 기전을 관찰하기 위하여 균과 배양액을 각각 100°C에서 30분간 열처리하여 사용하였다. 또한 HMC-1을 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA; 4 mM, Sigma-Aldrich)로 각각 30분간 전 처리한 후 각 균과 균배양액으로 1시간 동안 자극하였다 (15).

### Staphylococci에 의한 HMC-1 세포독성시험

HMC-1 세포를 cDMEM의 새 배지로 교체하고 24시간 배양한 후 FBS와 항균제를 첨가하지 않은 DMEM (plain DMEM) 500  $\mu\text{l}$ 로 세포를 세척하여 항균제를 제거하였다. 세포를  $5 \times 10^5$  cells/ml로 맞추어 ET에 400  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^5$  cell) 씩 분주하였다. 원심하여 상층액을 버리고 균액 400  $\mu\text{l}$ 로 대체한 후 부유하였다. 180×g, 8분간 원심하여 균이 세포에 접촉하게 한 후 1.5시간(90분) 배양하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용

액을 시험관에 첨가하여 형성된 formazan을 DMSO로 용해한 후 96 well plate에 옮겨 OD를 측정하는 MTT assay를 하였다 (16).

### 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계처리는 One-way ANOVA with Tukey 방법을 사용하여 그룹간의 상관관계를 비교하였으며  $p$ 값이 0.05 이하인 경우( $p < 0.05$ )를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

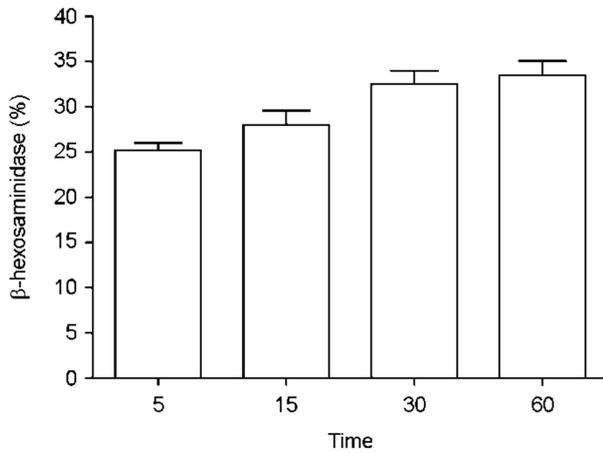
## RESULTS

MRSA 균의 자극 시간이 사람비만세포  $\beta$ -hexosaminidase 방출에 미치는 영향

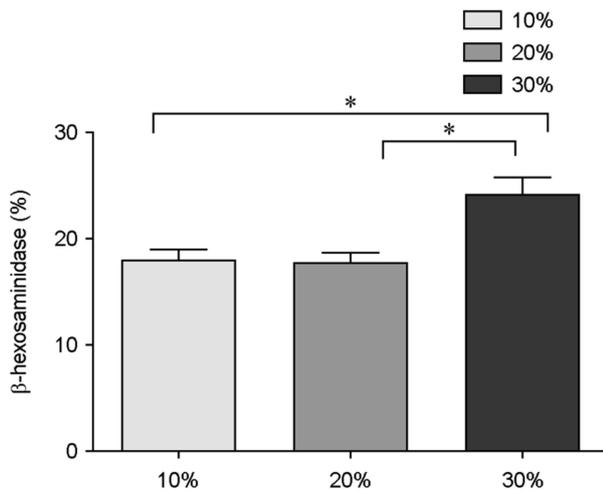
아토피피부염 환자에서 분리되는 *S. aureus*는  $\delta$ -toxin을 많이 생산하며 *S. aureus*의  $\delta$ -toxin은 비만세포 탈과립을 일으킨다 (7). MRSA는 *S. aureus* 보다 침습성이 높고 더 많은 초항원 독소를 생산한다 (8). 그러므로 먼저 MRSA 균이 비만세포 탈과립을 유도하는지 관찰하였다. 비만세포의 기능을 연구하는데 많이 사용되는 HMC-1에 MOI (multiplicity of infection)를 100으로 조정한 MRSA로 5, 15, 30, 60분 동안 각각 자극한 후  $\beta$ -hexosaminidase의 방출을 측정하였다. 자극 후 5분에  $24.6 \pm 2\%$  방출률부터 60분에는  $32.6 \pm 3\%$ 까지 상승하였다(Fig. 1). 따라서 이후 실험에서는 MRSA 자극기간을 60분으로 하였다.

MRSA 배양액이 사람비만세포의  $\beta$ -hexosaminidase 방출에 미치는 영향

*S. aureus* 배양액에는 정상적으로 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의  $\delta$ -toxin이 발견되고, 합성 *S. aureus*  $\delta$ -toxin 펩티드 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 자극으로 비만세포에서 히스타민이 방출됨이 보고되었다 (7). MRSA를 TSB에 24시간 동안 배양하여 상청액 (conditioned media; CM)을 만들고, 이 상청액을 여과법으로 멸균하여 사용하였다. HMC-1 배양액을 기준으로 MRSA 배양액을 10% (v/v), 20%, 30%씩 넣고 1시간 동안 자극한 후  $\beta$ -hexosaminidase의 방출을 측정하였다. 10%에서  $17.7 \pm 2\%$ , 30%에서  $23.8 \pm 3\%$ 까지 상승하였다(Fig. 2). 따라서 이후 실험에서는 MRSA 배양액의 첨가를 30%로 사용하였다.



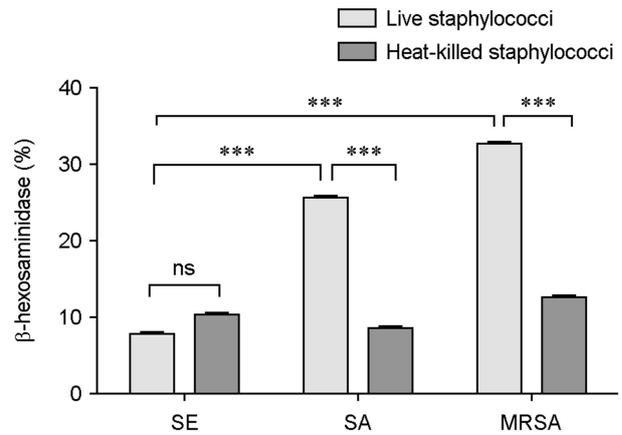
**Figure 1.** MRSA induces HMC-1 degranulation. β-hexosaminidase activity (%) was determined from HMC-1 cultured with MRSA (MOI = 100) for indicated time (minutes). Data represent means ± s.d. of triplicate independent experiments.



**Figure 2.** The conditioned media from MRSA induces HMC-1 degranulation. β-hexosaminidase activity (%) was determined from HMC-1 stimulated with different concentrations of conditioned media of MRSA. Data represent means ± s.d. of triplicate independent experiments. \* $\leq 0.05$ .

열처리한 포도알균이 사람비만세포의 β-hexosaminidase 방출에 미치는 영향

열처리한 *S. aureus*로 HMC-1을 1시간 동안 자극하면 β-hexosaminidase의 방출이 10.7%로 살아있는 *S. aureus*의 26.0%에 비하여 58.8±5%나 탈과립율이 감소되었다. 열처



**Figure 3.** Differences in HMC-1 degranulations between live and heat-killed Staphylococci. β-hexosaminidase activity (%) was determined from HMC-1 stimulated with heat-killed *S. epidermidis* (SE), *S. aureus* (SA) or MRSA, and heat-killed bacteria-induced β-hexosaminidase activity (%) was compared with that of live SE, SA or MRSA. Data represent means ± s.d. of triplicate independent experiments. \*\*\* $\leq 0.001$ . ns, no significance.

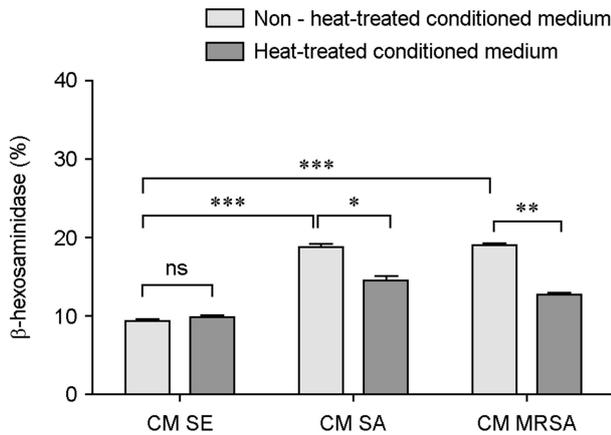
리한 포도알균은 살아있는 *S. epidermidis*에 의한 β-hexosaminidase의 방출율(8.1%)과 유사하였다. 열처리한 MRSA의 β-hexosaminidase의 방출율이 11.8%로 살아있는 MRSA의 33.1%에 비하여 64.4±4%나 감소되었다(Fig. 3). 실험결과 *S. aureus*와 MRSA에 의한 HMC-1의 탈과립이 세균의 열처리에 의하여 억제됨을 확인하였다.

열처리한 포도알균의 배양액이 HMC-1의 β-hexosaminidase 방출에 미치는 영향

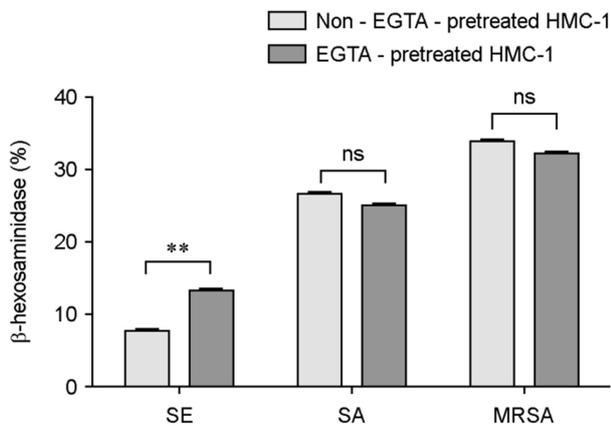
열처리한 *S. aureus*의 배양액으로 HMC-1을 1시간 동안 자극하면 β-hexosaminidase의 방출이 13.7%로 열처리하지 않은 *S. aureus*의 배양액에 의하여 유도된 17.5%에 비하여 21.7±4%가 감소되었다. 열처리된 MRSA의 배양액에 의한 β-hexosaminidase의 방출은 11.8%로 열처리하지 않은 MRSA의 배양액에 의하여 유도된 19.0%에 비하여 37.9±3%가 감소되었다(Fig. 4). 실험결과 *S. aureus*와 MRSA의 배양액에 의한 HMC-1의 탈과립이 열처리에 의하여 일부 억제됨을 확인하였다.

EGTA 전처리가 포도알균에 의한 HMC-1의 β-hexosaminidase 방출에 미치는 영향

HMC-1을 EGTA로 30분간 전 처리한 후, *S. aureus*로

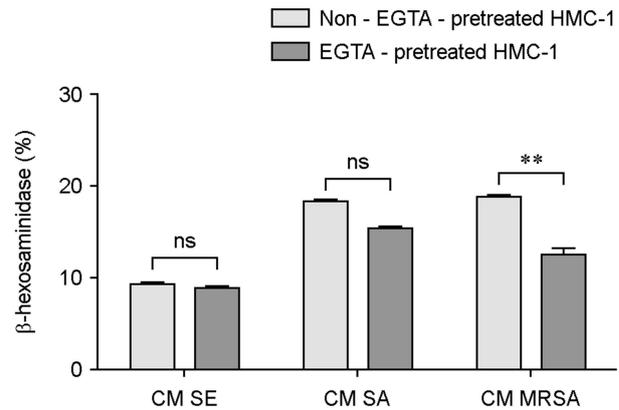


**Figure 4.** Differences in HMC-1 degranulations between conditioned media and heat-inactivated conditioned media from Staphylococci.  $\beta$ -hexosaminidase activity (%) was determined from HMC-1 stimulated with conditioned media (CM) from *S. epidermidis* (SE), *S. aureus* (SA) or MRSA, and conditioned media-induced  $\beta$ -hexosaminidase activity (%) was compared with that of heat-inactivated conditioned media (CM). Data represent means  $\pm$  s.d. of triplicate independent experiments. \* $\leq 0.05$ , \*\* $\leq 0.01$ , \*\*\* $\leq 0.001$ . ns, no significance.



**Figure 5.** Differences in HMC-1 degranulations between EGTA pretreated HMC-1 and non-EGTA pretreated HMC-1 induced by Staphylococci. HMC-1 was either pretreated with EGTA or not, and  $\beta$ -hexosaminidase activity (%) induced by *S. epidermidis* (SE), *S. aureus* (SA) or MRSA was determined. Data represent means  $\pm$  s.d. of triplicate independent experiments. \*\* $\leq 0.01$ . ns, no significance.

1시간 동안 자극한 후  $\beta$ -hexosaminidase의 방출을 측정된 결과 24.3%로 EGTA를 전 처리하지 않은 *S. aureus*의 26.0%에 비하여 6.5 $\pm$ 2%의 미미한 감소가 측정되었다.



**Figure 6.** Differences in HMC-1 degranulations between EGTA pretreated HMC-1 and non-EGTA pretreated HMC-1 induced by conditioned media (CM) from Staphylococci. HMC-1 was either pretreated with EGTA or not, and  $\beta$ -hexosaminidase activity (%) induced by conditioned media (CM) from *S. epidermidis* (SE), *S. aureus* (SA) or MRSA was determined. Data represent means  $\pm$  s.d. of triplicate independent experiments. \*\* $\leq 0.01$ . ns, no significance.

MRSA의 경우 EGTA로 전 처리된 HMC-1의  $\beta$ -hexosaminidase 방출이 31.5%로 전 처리하지 않은 MRSA의 33.1%에 비하여 4.8 $\pm$ 2%의 미미한 감소가 측정되었다(Fig. 5). 실험결과 *S. aureus*나 MRSA의 균 자체에 의한 HMC-1의 탈과립이 EGTA 전처리에 의하여 억제되지 않음을 확인하였다.

EGTA 전 처리가 Staphylococci의 배양액에 의한 HMC-1의  $\beta$ -hexosaminidase 방출에 미치는 영향

HMC-1를 EGTA로 30분간 전 처리하고 *S. aureus*의 배양액으로 1시간 동안 자극한 후  $\beta$ -hexosaminidase의 방출을 측정된 결과 14.6%로 전 처리하지 않은 *S. aureus*의 17.5%에 비하여 16.6 $\pm$ 2%의 감소가 측정되었다. MRSA의 배양액의 경우 EGTA로 전 처리된 HMC-1의  $\beta$ -hexosaminidase 방출이 11.2%로 전 처리하지 않은 MRSA의 19.0%에 비하여 41.0 $\pm$ 3%의 감소가 측정되었다(Fig. 6). 실험결과 HMC-1을 EGTA로 전 처리한 경우 *S. aureus*나 MRSA의 배양액에 의한 HMC-1의 탈과립이 억제됨을 확인하였다.

## DISCUSSION

성숙비만세포는 혈관주위, 신경 그리고 피부진피에 많이 존재하며 아토피피부염에서는 림프구의 침윤과 함께

비만세포의 탈과립이 관찰된다. 비만세포는 FcεRI에 결합된 IgE에 특이 항원의 교차연결에 의하여 활성화 되면 세포질과립이 세포 외로 분비된다. 세포질과립에는 히스타민, 헤파린 및 단백분해효소(β-hexosaminidase) 등의 매개체들이 있으며 아토피피부염 증상을 매개한다 (17). β-hexosaminidase는 비만세포의 세포질 탈과립을 측정할 수 있는 전형적인 표시자로 알려져 있다 (18). 본 연구에서는 히스타민을 측정하는 대신 β-hexosaminidase를 측정하였다.

피부의 표피에는 상주하는 균이 있으며 진피와 같은 내부피부에도 세균이 지속적으로 발견된다. *S. aureus*는 아토피피부염 병소에서 발견되는 가장 중요한 균이다. 아토피피부염 환자의 90%에서 *S. aureus*가 균집락을 형성하고 이 균들의 50%가 독소를 생산한다. *S. aureus*는 장독소와 toxic shock syndrome toxin-1과 같은 초항원을 생산하여 Th2 반응을 유도하며 IL-4와 IL-13 발현의 증가로 *S. aureus*의 균집락이 증가된다. 또는 이들이 생산하는 serine protease와 lipase는 피부장벽에 손상을 준다 (19, 20).

*S. aureus*의 δ-toxin은 피부비만세포를 표적으로 하여 탈과립을 유도하며 염증을 증가시킬 수 있다 (7). 비록 δ-toxin에 의한 비만세포의 탈과립에 IgE가 요구되지는 않더라도 IgE는 항원 없이 δ-toxin에 의한 비만세포 탈과립을 증가시켰다 (7). MRSA는 항원의 생산이 *S. aureus*보다 많아 아토피피부염을 더 악화시킨다 (21). 본 연구에서는 제일 먼저 다수의 toxin을 분비하는 MRSA의 배양액이 HMC-1의 세포질 탈과립에 미치는 영향을 관찰하였다. 10%의 배양액을 포함하는 경우보다 30%에서 더 높게 탈과립을 관찰할 수 있었다. 이어서 살아 있는 MRSA 균만으로도 사람비만세포주에서 탈과립을 일으킬 수 있는지 조사하였다. 5분부터 60분까지 시간별로 MRSA 균과 HMC-1을 같이 배양하였다. 같이 배양하는 시간에 비례하여 탈과립의 증가를 관찰할 수 있었다. 이 결과에 따라 비만세포의 자극은 균배양액은 30%로 하였으며 균배양액 및 균만으로 자극하는 기간은 1시간으로 하였다.

생후 1년된 영아의 피부에 *S. epidermidis*의 균집락이 관찰되면 아토피피부염의 발생을 막는 효과가 있다는 보고 (9)가 있으나 아토피피부염이 진행 중인 병소에서도 *S. epidermidis*의 균집락이 증가된다 (10)는 보고도 있어 아토피피부염에서 *S. epidermidis*의 역할이 불분명하다. *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 MRSA의 배양액과 살아 있는 각 균이 HMC-1의 세포질 탈과립에 미치는 영향을 각각 조사하였다. *S. epidermidis*는 사람비만세포의 자연방출과 유

사하고 *S. aureus* 및 MRSA에 비하여 현저히 낮은 탈과립이 관찰되었다. 그러므로 *S. epidermidis*는 비만세포 세포질 탈과립을 유도하지 않는 것으로 평가되었다.

*S. aureus*의 δ-toxin에 의한 비만세포 탈과립을 칼슘( $Ca^{2+}$ )의 유입과 phosphoinositide 3 kinase (PI3-K)의 활성이 관여하지만, IgE 교차결합에 의하여 매개되는 것과 달리 Syk가 필요하지 않다. 그러나 칼슘 차단제인 EGTA에 의하여 δ-toxin에 의한 비만세포 탈과립은 차단되었다 (7). 본 연구에서도 HMC-1을 칼슘 chelator인 EGTA로 30분간 전 처리하고 *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 MRSA의 각각 배양액 30%로 1시간 자극하였다. MRSA 배양액은 탈과립이 41.1% 감소되었으며 *S. aureus* 배양액은 16.6%의 감소가 관찰되었다. 그러나 MRSA 균과 *S. aureus* 균으로 자극한 경우는 각각 4.8%와 6.5%의 미미한 감소효과가 관찰되어 *Staphylococcus* 균에 의한 비만세포 탈과립에는 칼슘 유입이 관여하지 않는다고 생각되었다. *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 MRSA의 배양액과 균을 100°C에서 30분간 열처리한 후 각각 30%의 배양액과 MOI 100의 각균으로 비만세포를 자극하였다. MRSA의 배양액은 열처리 하지 않은 경우에 비하여 37.9%의 탈과립이 감소되었으며 *S. aureus*는 21.7%의 감소가 있었다. 그러나 MRSA 균은 60.4%의 감소를 보였으며 *S. aureus* 균은 58.8%의 감소를 보였다. 열처리에 의하여 배양액 및 균 모두에서 탈과립이 억제되었으나 배양액의 경우보다 균을 열처리한 사균에서 현저한 탈과립 감소효과가 관찰되었다.

이와 같은 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다. *S. aureus*와 MRSA는 HMC-1의 탈과립을 유도하였다. 그러나 열처리된 사균은 탈과립을 유도하지 않았다. *S. aureus*나 MRSA의 배양액의 경우 사람비만세포를 EGTA로 전처리한 경우 탈과립이 억제되었으나 살아있는 *S. aureus*나 MRSA는 사람비만세포를 EGTA로 전처리하여도 탈과립이 억제되지 않았다.

*S. aureus*가 아토피 피부염의 병인에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 (22) 있지만 *S. aureus*를 치료하여도 아토피피부염이 해결되지 않아 (23) *S. aureus*가 아토피피부염의 병인과 진행에 얼마나 관여하는지에 대하여는 더 연구가 필요할 것으로 생각된다. *S. aureus*는 α-hemolysis와 fibronectin binding protein A의 발현을 증가시키고 비만세포의 β-integrins의 발현도 증가시켜 *S. aureus*가 비만세포에 부착한 후 세포 내로 들어 갈 수 있으며 세포 내 사멸 기전을 회피하여 장기간 살 수 있다 (24). 살아 있는 *S.*

*aureus*가 비만세포로 내부로 들어가 살면서 비만세포 세포질의 탈과립을 유도하기 때문에 사균 *S. aureus*는 세포질 탈과립에 영향을 줄 수 없었으며 세포질 탈과립 기전은 칼슘 유입과 다른 기전이 관여할 것으로 생각되었다. 또한 세포 외 *S. aureus*의 치료에도 불구하고 아토피피부염이 해결되지 않는 것은 세포 내에 *S. aureus*가 생존하면서 세포질 탈과립을 일으키기 때문으로 생각되었다.

## REFERENCES

- 1) Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab* 2015;66:8-16.
- 2) Wollina U. Microbiome in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2017;10:51-6.
- 3) St John AL, Abraham SN. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol* 2013;190:4458-63.
- 4) Flanagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:355-66.
- 5) Wesolowski J, Paumet F. The impact of bacterial infection on mast cell degranulation. *Immunol Res* 2011;51:215-26.
- 6) Park KD, Pak SC, Park KK. The Pathogenetic Effect of Natural and Bacterial Toxins on Atopic Dermatitis. *Toxins (Basel)* 2016;9:1-19.
- 7) Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Muñoz-Planillo R, Hasegawa M, et al. *Staphylococcus*  $\delta$ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature* 2013;503:397-401.
- 8) Sun D, Ong PY. Infectious Complications in Atopic Dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2017;37:75-93.
- 9) Naik S, Bouladoux N, Linehan JL, Han SJ, Harrison OJ, Wilhelm C, et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 2015;520:104-8.
- 10) Higaki S, Morohashi M, Yamagishi T, Hasegawa Y. Comparative study of staphylococci from the skin of atopic dermatitis patients and from healthy subjects. *Int J Dermatol* 1999;38:265-9.
- 11) Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, et al. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS One* 2014;9:e86106.
- 12) Johnzon CF, Rönnberg E, Guss B, Pejler G. Live *Staphylococcus aureus* Induces Expression and Release of Vascular Endothelial Growth Factor in Terminally Differentiated Mouse Mast Cells. *Front Immunol* 2016;7:247.
- 13) Swindle EJ, Brown JM, Rådinger M, DeLeo FR, Metcalfe DD. Interferon- $\gamma$  enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to *Staphylococcus aureus*. *Immunology* 2015;146:470-85.
- 14) Tsai CC, Kuo TY, Hong ZW, Yeh YC, Shih KS, Du SY, et al. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein induces release of histamine and interleukin-6 through G protein-mediated MAPKs and PI3K/Akt pathways in HMC-1 cells. *Virulence* 2015;6:755-65.
- 15) Joly F, Vigrain I, Bossant MJ, Bessou G, Benveniste J, Ninio E. Biosynthesis of paf-acether. Activators of protein kinase C stimulate cultured mast cell acetyltransferase without stimulating paf-acether synthesis. *Biochem J* 1990; 271:501-7.
- 16) Yang M, Jang IT, Kim HJ, Park JK. *Bacillus* spp. or *Bacillus* spp.-derived membrane vesicles induce the intrinsic pathways of apoptosis of human colon cancer cell lines. *J Bacteriol Virol* 2016;46:84-92.
- 17) Wesolowski J, Paumet F. The impact of bacterial infection on mast cell degranulation. *Immunol Res* 2011;51:215-26.
- 18) Yamada N, Matsushima H, Tagaya Y, Shimada S, Katz SI. Generation of a large number of connective tissue type mast cells by culture of murine fetal skin cells. *J Invest Dermatol* 2003;121:1425-32.
- 19) Wollina U. Microbiome in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2017;10:51-6.
- 20) Laouini D, Kawamoto S, Yalcindag A, Bryce P, Mizoguchi E, Oettgen H, et al. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:981-7.
- 21) Sun D, Ong PY. Infectious Complications in Atopic Dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2017;37:75-93.
- 22) Williams JV, Vowels BR, Honig PJ, Leyden JJ. *S. aureus* isolation from the lesions, the hands, and the anterior nares of patients with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 1998; 15:194-8.
- 23) Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:244-53.
- 24) Goldmann O, Tuchscher L, Rohde M, Medina E.  $\alpha$ -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of  $\beta$ 1 integrin. *Cell Microbiol* 2016;18:807-19.