creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학박사학위논문

골수유래 성체줄기세포의 노화에 따른 내인성 대사체 발현 연구

Study on alterations in endogenous metabolites based on senescence of human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells

2014년 8월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석전공
이 슬 지

약학박사학위논문

골수유래 성체줄기세포의 노화에 따른 내인성 대사체 발현 연구

Study on alterations in endogenous metabolites based on senescence of human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells

지도교수 권 성 원

이 논문을 약학박사학위논문으로 제출함

2014년 8월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

이 슬 지

이슬지의 박사학위논문을 인준함

2014년 8월

위 원 장 박 정 일 (인)

부위원장 성 상 현 (인)

위 원 홍 순 선 (인)

위 원 최 용 석 (인)

위 원 권 성 원 (인)

국 문 초 록

중간엽줄기세포는 제한된 증식력을 가지고 있어 암세포화 가능성이 없으며 윤리적으로 문제가 되지 않아 연구 및 임상에 다양하게 이용되고 있다. 그러나 개체로부터 얻을 수 있는 수가 적어 필연적으로 체외(*in vitro*)에서 증폭이 요구되며 이 과정에서 줄기세포의 특징을 유지하는 고도의 배양 기술이 필요한 점이 응용 단계에서의 한계로 지적되어 왔다. 이에 따라 본 연구는 체외 배양 과정에서 중간엽줄기세포의 분화능과 활성 변화를 확인하고 조절하는 기술을 확보하기 위하여 수행되었다. 배양 중 노화에 따른 줄기세포 특성 변화를 확인할 지표물질(marker)를 선별하기 위하여 사람 골수유래 클론성 중간엽줄기세포(human bone marrow- derived clonal mesenchymal stem cell)의 세포 노화(cellular senescence)를 유도하여 발현이 변화하는 내인성 대사체를 UPLC/Q-TOFMS를 기반으로 확인하였다. 검출된 대사체 중 후보지표물질(marker candidate)을 선별하기 위하여 linear mixed effects model을 적용하여 배치(batch)와 시간(passage)의 영향을 보정하였으며 t-test와 F-test를 이용하여 평균과 분산에 대한 검정을 각각 수행하였다. 선별된 후보지표물질의 동정을 위하여 대표적인 표준품과 충돌에너지(collision energy)에 따른 스펙트럼 패턴을 통해 구조 분석을 한 결과, 노화에 따라 발현이 변화하는 대사체가 몇몇 라이소포스파티

딜콜린(lysophosphatidylcholine)과 라이소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine) 임을 동정하였다. 본 연구를 통하여, 중간엽줄기세포가 노화될 때에 발현이 변화하는 내인성 대사체를 확인하였고 이의 기전에 대한 가설을 제시하였다. 이는 중간엽줄기세포의 노화의 진행을 확인하는 지표물질로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 노화의 과정이 세포내의 어떤 기전과 연관되는지를 이해하는 데에 이용될 수 있다.

주요어:
사람 골수유래 클론성 중간엽줄기세포(human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cell),
세포노화(cellular senescence),
라이소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine),
라이소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine)

학번: 2009-21705

목 차

국문초록 ····· i

목 차 ····· iii

List of Figures ····· v

List of Tables ····· viii

I. 서 론····· 1
1. 중간엽줄기세포····· 1
2. 노화····· 3
3. 대사체학····· 5

II. 실 험 방 법 ····· 7
1. 실험재료, 시약 및 기기 ····· 7
1-1. 재료 및 시약 ····· 7
1-2. 분석기기 ····· 7
2. 실험 모델 설계 ····· 8
3. 중간엽줄기세포의 배양 ····· 9
3-1. 중간엽줄기세포의 분리와 노화 진행 ····· 9
3-2. 중간엽줄기세포의 특성 확인 ····· 9
3-3. β-Gal 염색, 면역형광염색 분석 ····· 10
3-4. RT-PCR ····· 11
4. 내인성 대사체의 분석····· 12
4-1. 중간엽줄기세포 중 내인성 대사체 추출 ····· 12

4-2. UPLC Q-TOF MS 분석 ····· 12
4-3. 데이터 전처리 ····· 13
5. 통계분석 ····· 15
6. 선별된 대사체의 동정 ····· 16
6-1. 표준품을 이용한 표준 MS/MS 스펙트럼 작성 ····· 16
6-2. 시료 MS/MS 스펙트럼과 비교 ····· 17

III. 결 과 ····· 18
1. 중간엽줄기세포의 분리와 특성 확인····· 18
2. 중간엽줄기세포의 노화 확인····· 20
3. 내인성 대사체의 분석····· 22
4. 주성분분석(PCA; principal component analysis)····· 24
5. 통계분석····· 26
6. 노화 지표 내인성 대사체의 동정····· 31

IV. 고 찰 ····· 47

V. 결 론 ····· 53

VI. 참 고 문 헌 ····· 54

Abstract ····· 58

List of Figures

Figure 1. Experimental design.

Figure 2. Characterization of hcMSC isolated from human BM.

Figure 3. Characteristics of hcMSC during cellular senescence.

Figure 4. Total Ion Chromatogram of hcMSC by UPLC Q-TOF MS.

Figure 5. Principal component analysis (PCA) plot.

Figure 6. Histogram and scatter plot of the predicted means and standard deviations according to the linear mixed model.

Figure 7. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 16:0 standard (Collision energy: 10- 50 eV).

Figure 8. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 18:0 standard (Collision energy: 10~50 eV).

Figure 9. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 16:0 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

Figure 10. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 18:0 which is an endogenous metabolite that shows change

in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

Figure 11. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 18:1 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

Figure 12. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 20:4 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

Figure 13. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 22:5 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

Figure 14. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 16:0 standard (Collision energy: 5~25 eV).

Figure 15. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 18:0 standard (Collision energy: 5~25 eV).

Figure 16. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 22:4 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of

hcMSC (Collision energy: 5~25 eV).

Figure 17. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 22:5 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 5~25 eV).

Figure 18. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 22:6 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 5~25 eV).

Figure 19. Expression comparison of eight selected marker candidates.

List of Tables

Table 1. The primer sequences used for RT-PCR analysis

Table 2. List of candidate senescence markers for metabolomics

Ⅰ. 서 론

1. 중간엽줄기세포

줄기세포는 태생기의 전능세포를 의미하는 것으로 어떤 조직으로든 발달할 수 있는 세포를 의미한다. 대표적인 줄기세포는 인간배아를 이용한 배아줄기세포와 성체줄기세포가 있다. 이 중 성체줄기세포는 신체의 각 조직에 소량으로 존재하는 세포로, 특정한 조직을 구성하는 세포이며 이의 대표적인 예로 다분화성 조혈모세포와 중간엽줄기세포가 있다. 이러한 성체줄기세포는 몸이 항상 건강한 상태로 유지되는 데에 필요한 세포를 제공하며 어떤 손상이 발생하였을 때 다른 장기에 있던 줄기세포까지 모여 손상된 조직으로 분화하는 분화의 우연성을 가짐으로써 그 기능을 한다. 중간엽줄기세포는 배아줄기세포와 다르게 제한된 증식력을 가지고 있으므로 암세포화 가능성이 없으며 수정란의 파괴가 없어 윤리적으로도 문제가 되지 않는다. 이에 따라 중간엽줄기세포의 연구는 이미 임상의 적용이 가능한 단계까지 왔으며 빠른 연구의 진행을 보이고 있다. 다만 개체로부터 얻을 수 있는 줄기세포의 수가 적고 배양이 어려우며 특정 세포로만 분화가 가능한 단점이 있어 연구의 한계가 있다.

중간엽줄기세포 연구를 진행함에 있어서 가장 큰 한계로 지적되는

부분은 개체로부터 얻을 수 있는 양이 적어 체외 상에서 인위적인 증폭이 필연적으로 요구되며 이때에 세포의 활성과 특징을 유지하고 관리하기가 어렵다는 점이다. 이에 따라 층분리 배양법을 통하여 클론성 줄기세포를 분리, 배양해내는 기술이 개발되었으며 이를 통해 동질한 세포를 확보하고 질을 관리할 수 있게 되었다. 이의 후속 연구로서 추가로 요구되는 부분은 동질성을 확보한 세포를 배양하는 과정에서 세포의 노화가 진행되는 과정을 조절하는 것이며 이에 따라 본 연구가 수행되었다.

1-1. 줄기세포와 노화

노화과정에서 줄기세포의 활성이 감소한다고 알려져 있다. 예를 들어 근육줄기세포의 경우 노화된 근육에서 자기복제 능력의 손상으로 인해 그 수가 줄어드는 현상이 관찰되었다. 줄기세포가 그 수를 유지하는 것에는 자기복제능력이 중요한데, 이 과정에 줄기세포 주변세포가 관련되어 있는지 그리고 그 기작은 무엇인지는 알려져 있지 않다. 다만 Chakkalakal et al. 는 노화된 근육줄기세포 주변세포인 근섬유세포가 FgF2 를 발현하며, 이것이 근육줄기세포의 자기복제능력을 저해하는 것을 발견하였다(Chakkalakal et al., 2012). 실험적으로 주변세포의 Fgf signaling을 늘리거나 줄이면, 근육줄기세포의 quiescence를 조절함으로써, 그 개수에 직접적인 영향을 미침을 보고하였다.

2. 노화

세포의 노화는 모든 개체에서 나타나는 능동적이고 보편적인 현상으로 현재까지 원인과 결과에 대한 다양한 연구와 가설이 제시되었다. 그러나 도출한 가설들 모두는 모든 종에서 적용되지 않거나 현상들을 모두 설명할 수 없는 한계가 있어 추가적인 연구가 필요하다. 세포성 노화(cellular senescence)는 세포의 복제능과 활성 전반의 변화에 의해 나타나는 표현형으로, DNA와 단백질 그리고 내인성 대사체 전반에 걸쳐 복잡하게 조절 받게 된다(Hayflick and Moorhead, 1961). 따라서 세포의 내인성 발현 네트워크의 전반적인 연구를 통해 세포의 노화(senescence) 기전을 총괄적으로 파악하는 것이 필요하며 이를 토대로 세포의 노화를 밝혀야만 나아가 개체의 노화(aging)를 이해하는 것이 가능하다. 이러한 접근법은 현재 타 연구팀에 의하여 진행중인 개체를 직접 노화시켜 진행하는 노화 동물모델 연구보다 시간적 경제적으로도 훨씬 효율적이며 줄기세포의 관리에 적용함에 있어서도 보다 합리적인 방법이 될 것이다.

2-1. 세포노화와 개체노화

세포노화 (cellular senescence)란 세포배양 시 대략 50번 정도의 분열 후에는 더 이상 세포가 분열하지 않는 현상을 의미한다. 따라서 replicative senescence 혹은 이 현상을 처음 보고한(Hayflick and Moorhead, 1961) Leonard Hayflick의 이름을 따서 Hayflick 현상이라고도 불린다. 노화세포는 장기간 분열하지 않고 살아있으며, 일반적으로 G1기에서 정지되어 있다고 알려져 있다. 이는 G0기에서 정지한 세포들과는 다르게 growth factor 등으로 자극을 해도 다시 세포분열을 하지 않는다. 따라서 세포주기 조절기능과도 밀접한 관련이 있으며, 개체내의 암 발생을 억제하는 기능을 수행하고 있다고 생각된다(Rodier and Campisi, 2011). 이런 세포 노화와 개체노화는 서로 연관성이 있을 것이라 추정되어 왔지만 그 분자적 기작이나 연관성은 아직 명확하게 증명되지 않은 상태였다. 그것을 알아보기 위하여 Baker et al (Baker et al., 2011)은 세포노화의 biomarker 유전자인 p16Ink4a의 promoter에 세포사멸유전자를 발현시킴으로써(INK-ATTAC; p16IInk4a - Apoptosis Through Targeted Activation of Caspase), 노화가 일어난 조직에서 노화세포를 특이적으로 제거했을 때, 조직의 기능을 살펴보았다. 놀랍게도 저자들은 조직에서 노화된 세포들을 제거함으로써 대표적인 노화증세인 백내장과 근육 소실이 발생하지 않았으며 운동능력도 더 뛰어

남을 관찰하였다. 이것은 비단 세포노화와 개체노화의 관계를 처음으로 보였다는 것 외에도, 노화된 세포를 제거하는 것은 노화관련 질환이나, 나아가 인류의 건강한 생명연장의 수단으로 쓰일 수 있는 가능성을 제공하였다는 점에서 의미가 있다.

3. 대사체학

'-omics' 의 하나인 대사체학(metabolomics)은 유전자나 단백질의 변화 유무를 연구하는 유전체학(genomics)이나 단백질체학(proteomics)과 같이 대사체의 발현을 총체적으로 이해하는 연구 분야이다. 일반적으로 대사체(metabolite)는 'phenotype을 가장 잘 나타내는 정량할 수 있는 소분자'를 의미하므로, 전체적인 내인성 대사체의 profile은 그 자체로서 또는 유전체, 단백질의 발현과 연관된 지식의 정보와 조합하여 phenotype에 관한 자세한 정보를 제공한다. 'Metabolome'이라는 용어는 세포 부유물(cell suspension) 혹은 생체액(biological fluid) 안에 존재하는 작은 분자량 (100 – 1000)을 갖는 대사체의 집단체를 말한다. 이에 따라 'Metabolomics'는 세포 또는 조직 중 내인성 대사체의 거동, 분비 변화 등을 체계적으로 확인 · 정량하고, 그 결과로부터 다양한 생리 · 병리적 상태와 연관 된 대사체 네트워크를 해석하는 연구 분야이다(ter Kuile and Westerhoff, 2001).

3-1. 대사체학과 노화

영국 Imperial College Nicholson 교수팀은 노령화에 따른 생체대사 과정을 연구하였다. 개에게 칼로리 제한식, 일반식 군으로 나누어 키운 후, 혈청에서의 대사체 변화를 NMR을 이용하여 분석하였다. 음식물 섭취 방법에 따라서 노령기의 에너지 대사에 관여하는 대사체들이 차이가 있음을 확인하였다(Richards et al., 2013).

한국식품연구원 연구팀은 쥐의 연령별 대사체의 변화를 UPLC-QTOF-MS로 분석하였다. 간대사와 연관이 있는 120여종의 대사체들의 변화, 즉 지방대사체들, 에너지대사에 관여하는 대사체들 및 nucleic acid 대사체들의 변화를 관찰하였고, energy dysregulation, hypoxanthine 및 xanthine 대사체는 나이에 따라서 증가했다. 이 결과는 energy dysregulation 및 free radicals이 노화와 연관이 있다는 이론을 입증하였다(Son et al., 2012).

Ⅱ. 실 험 방 법

1. 실험재료, 시약 및 기기

1-1. 재료 및 시약

1-palmitoyl (C16:0) lysophosphatidylcholine (LPC), 1-stearoyl (C18:0) LPC, 1-palmitoyl (C16:0) lysophosphatidylethanolamine (LPE), 1-stearoyl (C18:0) LPE 는 Advanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였다.

1-2. 분석기기

UPLC system (Waters) 와 micrOTOF-QII mass spectrometer (Bruker Daltonics) 를 사용하였다.

2. 실험 모델 설계

연구의 대상은 발현의 사슬에서 가장 하위에 위치하여 네트워크가 가장 복잡하나 표현형을 가장 직접적으로 설명할 수 있는 내인성 대사체로 하였다. 단일 세포로부터 배양을 시작한 중간엽줄기세포를 이용하여 노화 전후의 내인성 대사체의 발현 변화를 봄으로서 외부 요인을 최대한 배제하고 노화에 의한 변화만을 측정하였다. 또한 개체 간 편차를 고려하기 위하여 두 명의 사람에서 각기 줄기세포주를 얻어 전 과정을 두 번 반복 진행하여 신뢰도를 확보하였다. 실험결과의 해석을 위하여 통계 알고리즘을 적용하였고 선별된 대사체의 해석과 기전연구를 수행하였다.

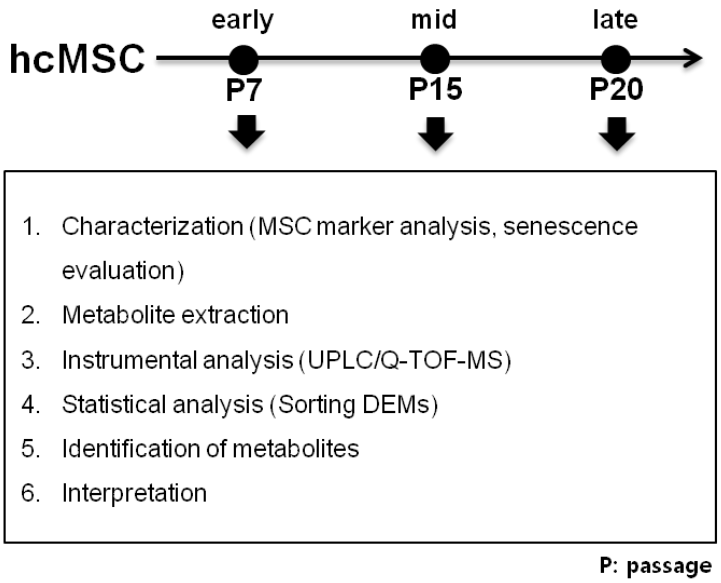

Figure 1. Experimental design.

3. 중간엽줄기세포의 배양

다음의 중간엽줄기세포의 배양 및 특성 확인 과정은 인하대학교 병원 송순욱 교수 팀에서 진행하였다.

3-1. 중간엽줄기세포의 분리와 노화 진행

중간엽줄기세포 (human clonal mesenchymal stem cells)를 골수로부터 채취하여 (approved by the Inha University School of Medicine Institutional Review Board under IRB Registration Number 10-51) 층분리 배양법 (subfractionation culturing method) 으로 분리하였다. 분리된 중간엽줄기세포는 10% heat-inactivated FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics-antimycotics를 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified essential medium)의 배지에서 5% CO_2 배양기에 넣어 배양하였다. passage 20까지 배양하여 세포의 노화를 유도하였다(Song et al., 2008).

3-2. 중간엽줄기세포의 특성 확인

중간엽줄기세포의 특성을 확인하기 위하여 세포 표면의 마커의

발현과 분화능을 확인하였다. 세포의 표면 마커들은 유세포 분석법을 통해 확인하며 anti-CD14, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-HLA Class I, anti-HLA-DR, and anti-PODXL 항체를 사용하였다. 분화능을 확인하기 위하여 3개의 세포 유형으로 각각 분화를 시도하였다. 비만세포 (adipocytes)로 분화시키기 위하여 4-well plate에 6 X 10^4 cells/well 의 밀도로 넣은 후 분화배지에서 배양하여 4-5일 후에 비만세포로 분화하는 것을 확인하였다. 세포는 4% 포름알데히드로 고정한 후 oil red O 로 염색하여 확인하였다. 골세포로 분화시키기 위하여 같은 방식으로 배양을 진행하며 3주 후에 alizarin red S 염색을 통해 확인하였다. 연골조직으로 분화시키기 위하여 펠렛 배양법을 사용하며 3주 후에 safranin O 염색을 통하여 확인하였다.

3-3. β-Gal 염색, 면역형광염색 분석

노화에 따라 증가하는 SA-β-gal(senescence-associated β-galactosidase) 활성을 보기 위하여 kit을 이용하여 줄기세포를 염색하였다. 광학현미경을 통하여 염색 결과를 확인하여 세포의 노화 여부를 검증하였다. 또한 별도의 시료를 고정 후 노화 마커인 caveolin-1을 면역 형광염색한 후 공초점 현미경으로 확인하여

면역형광염색법을 수행하였다.

3-4. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

노화관련 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 시료로부터 추출한 RNA는 kit을 이용하여 cDNA로 합성하며 PCR을 통해 확인하였다. PCR 프라이머 시퀀스는 및 조건은 Table 1과 같다.

Genes	Primers	Primer Seqeunce (5' →3')	Ta (℃)	Cycle	Product Size (bp)
$p16^{INK4a}$	forward reverse	ATG GAG CCT TCG GCT GAC TGG C TGC GGG CAT GGT TAC TGC CTC	63	30	411
$p19^{ARF}$	forward reverse	TCT CAC ACC CTT GGA GCT GG CAA CGT GCA CAC TTC AGG TC	60	30	265
PCNA	forward reverse	TCA CTC CGT CTT TTG CAC AG TGT AAA CCT GCA GAG CAT GG	56	35	401
Caveolin-1	forward reverse	TAG CCC TGG CAG ACC TCT TA AAT ACA CCT GGC CTT GTT GC	54	35	218
GAPDH	forward reverse	AAC GGA TTT GGT CGT ATT GG TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA	56	25	507

Table 1. The Primer sequences used for RT-PCR Analysis

4. 내인성 대사체의 분석

4-1. 중간엽줄기세포 중 내인성 대사체 추출

배양한 중간엽줄기세포에 차가운 아세톤 600 μL를 넣고 섞은 후 액체 질소에 1분간 넣어 얼렸다가 실온에서 녹인 후 10분간 초음파 추출을 하는 과정을 3번 반복하였다. -20℃ 에 1시간 보관 후 13,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상징액을 취하였다. 남은 잔여물에 메탄올/물/포름산 (86.5/12.5/1.0) 혼합액을 400 μL 넣고 섞은 후 10분간 초음파 추출을 수행하였다. -20℃ 에 1시간 보관 후 13,000 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상징액을 이미 얻은 상징액과 합하여 건조하였다. 잔여물에 95% 아세토니트릴 100 μL를 넣어 섞은 후 그의 상징액을 기기분석을 위한 시료로 하였다.

4-2. UPLC Q-TOF MS 분석

Waters UPLC와 Acquity™ UPLC column (BEH C18, 1.7 μm, 2.1 mm X 100 mm) 그리고 micrOTOF-QII mass spectrometer를 사용하였다. 이동상으로 0.1% 포름산을 포함한

물과 0.1% 포름산을 포함한 아세토니트릴을 각각 사용하며 유속 0.2 mL/min, 컬럼 온도 40℃ 에서 분석하였다. 분석 과정에서 기기적인 편차를 보정하기 위하여 시료를 임의의 순서로 분석하였으며 전체 시료의 혼합물을 QC (quality control) 시료로써 반복 분석하여 재현성을 확인하였다(Dunn et al., 2011; Hu et al., 2011). 질량분석기의 분석 범위는 50 ~ 1000 m/z로 하며 모세관 전압 (capillary voltage) 4.5 kV, 분무기 압력 (nebulizer pressure) 1.2 Bar 로 조절하였다. 건조 가스 유속은 8.0 L/min 이며 quadrupole과 collision cell을 최적화하여 quadrupole 이온 에너지를 15.0 eV, collision 에너지를 10.0 eV로 하였다. collision 가스로 고순도 질소 가스를 사용하고 정확성을 확보하기 위하여 리튬 포름산을 시료 주입 전에 주입하여 보정하였다.

4-3. 데이터 전처리

측정된 결과는 MZmine 2.5 소프트웨어를 이용하여 보정하였다(Pluskal et al., 2010). Peak detection 단계를 위하여 'Mass detection' 'chromatogram builder', 'peak deconvolution' 기능을 수행하였다. 'Mass detection' 단계를 통하여 MS 스펙트럼을 m/z와 intensity의 2차원 결과로 변환하였으며 이 때 noise level은 'Centroid algorithm' 을

통하여 10^3로 설정하였다. ‘chromatogram builder’ 단계를 통하여 변환 결과를 크로마토그램으로 작성하였으며 이때에 파라미터는 다음과 같았다: minimum height – 1.5 X 10^3, m/z tolerance – 0.05. ‘peak deconvolution’ 단계를 통하여 피크를 개별적으로 인식하였으며 파라미터는 다음과 같았다: function – Savitzky–Golay, minimum peak height – 1.5 X 10^3, threshold level – 80%. ‘peak alignment’ 단계는 ‘RANdom SAmple Consensus (RANSAC) aligner’ 방법을 선택하였으며 파라미터는 다음과 같았다: m/z tolerance – 0.05, absolute retention time (RT) tolerance – 0.1 min, RANSAC iterations – 10 000. 최종결과는 .csv 로 변환하여 저장하였으며 주성분분석 (principal component analysis; PCA) 으로 그 경향을 확인하였다.

5. 통계분석

정리된 UPLC Q-TOF MS 분석 결과에 대하여 노화 전후에 발현이 변화한 대사체를 선별하는 통계분석 과정을 수행하였다. 통계분석과정은 두 단계로 진행하였다. 먼저, 중간엽 줄기세포의 노화에 따라 대사체의 발현이 어떻게 변화하는지를 확인하였다. Batch와 passage, random effect를 보정하기 위하여 linear mixed effects model을 적용하였으며 평균과 분산의 측면에서 대사체가 변화하는지 확인하였다. 그 후에 발현이 변화한 대사체만을 선별하기 위하여 평균과 분산 검정을 위하여 각각 t-test와 F-test를 적용하였다.

6. 선별된 대사체의 동정

6-1. LPC와 LPE 표준품을 이용한 표준 MS/MS 스펙트럼 작성

Waters UPLC와 Acquity™ UPLC column (BEH C18, 1.7 μm, 2.1 mm X 100 mm), 그리고 micrOTOF-QII mass spectrometer를 사용하였다. 1-Palmitoyl (C16:0) lysophosphatidylcholine (LPC), 1-stearoyl (C18:0) LPC, 1-palmitoyl (C16:0) lysophosphatidylethanolamine (LPE), 1-stearoyl (C18:0) LPE 표준품은 모두 chloroform/methanol/water (65:35:8)에 녹여 판매되었다. 이를 methanol 로 (1→10)희석하여 분석하였다. precursor ions $[M+H]^+$는 다음과 같이 설정하였다: LPC 16:0 - 496.3397, LPC 18:0 - 524.3710, LPE 16:0 - 454.2928, LPE 18:0 - 482.3241. Collision energy는 LPC의 경우 10, 20, 30, 40, 50 eV, LPE의 경우 5, 10, 15, 20, 25 eV 로 순차적으로 적용하였다(Wagner and Richling, 2010; Lee et al., 2013). 모든 MS 와 MS/MS base peak chromatograms (BPCs), spectra, m/z error는 DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics)를 이용하여 < 5 ppm 로 조정하였으며 기타 분석 UPLC의 분석 조건은 시료의 분석 조건과 동일하였다.

6-2. 선별된 대사체의 MS/MS스펙트럼과 비교

표준품과 동일한 조건에서 시료 중 대상 대사체에 대하여 MS/MS분석을 수행하였다. LPC와 LPE는 MS/MS 스펙트럼 상에서 각각 184 m/z의 피크와 141 Da의 neutral loss를 고유의 특징으로 가지므로(Liebisch et al., 2013) 이를 기준으로 종류를 확인하였으며 precursor ion의 m/z를 기준으로 분자량 정보를 얻어 LIPID MAPS (http://www.lipidmaps.org) 데이터 베이스를 통해 동정하였다.

III. 결　과

1. 중간엽줄기세포의 분리와 특성 확인

두 명의 기증자로부터 골수를 취하여 중간엽줄기세포를 분리하여 배양하였다. 연구에 사용된 두 줄기세포 D103과 D106 모두 플라스틱 배양 플레이트에서 fibroblast-like shapes 을 보였다(Figure 2A). 줄기세포로서의 특성을 확인하기 위하여 알려진 중간엽 줄기세포의 surface marker인 CD44, CD73, CD90, CD105, HLA Class I, PODXL 를 확인한 결과 높은 수준의 발현이 확인되었으며 내피세포 또는 조혈세포의 마커인 CD14, CD34, CD45, HLA-DR 는 음성으로 나타났다(Figure 2B). 분화능을 확인하기 위하여 각 비만세포(visualized by oil red O), 골세포(visualized by alizarin red S), 연골세포(visualized by toluidine blue) 로 분화시키는 배지를 적용하여 분화를 시도하였으며 각 경우에서 적절한 염색결과를 확인하여 분화능에 이상이 없음을 증명하였다(Figure 2C).

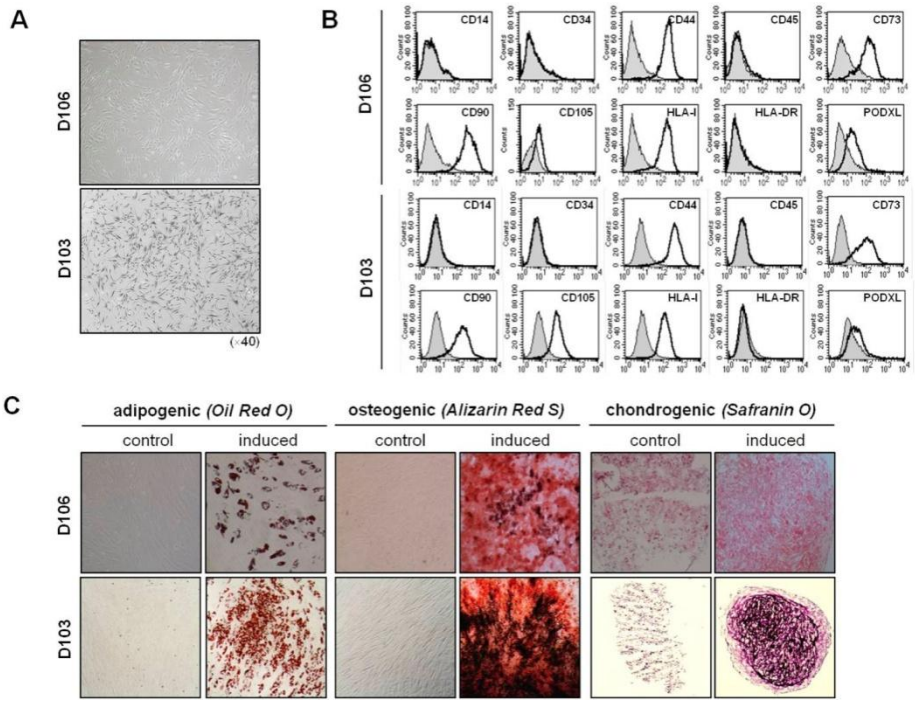

Figure 2. Characterization of hcMSC isolated from human BM.

(A) Cell morphology of hcMSC.

(B) Flow cytometric analysis of MSC markers.

(C) Multilineage potential of hcMSC; adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation. Magnification, 40X and 100X.

2. 중간엽줄기세포의 노화 확인

두 중간엽줄기세포 주를 계대 배양하며 노화를 유도하였다. 노화의 과정에서 발생하는 대사체의 발현을 확인하기 위하여 각각 passage 7, 15, 20에서 시료를 채집하여 저장하였으며 이 과정에서 노화 여부를 확인하기 위한 β-Gal 염색을 수행하였다(Figure 3A). 그 결과 passage 7과 15에서는 노화가 크게 진행되지 않은 것을 확인하였으며 passage 20의 세포는 강하게 염색이 되어 노화가 상당히 진행되었음을 확인하였다. 마찬가지로 caveolin-1 염색을 통하여 노화를 확인한 결과 passage 7과 15과 달리 passage 20에서 노화가 진행된 것을 확인하였다(Figure 3B). 노화의 다른 증거로서 RT-PCR을 수행한 결과 passage가 증가함에 따라 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)의 발현은 감소하였으며 CDK inhibitor gene 인 $p16^{INK4a}$ 와 $p19^{ARF}$ 의 발현은 증가하였다(Figure 3C). 면역형광염색 분석 결과를 통하여 또한 노화의 진행을 확인시켜 주었으며 그 과정에서 줄기세포가 줄기세포 고유의 특성을 잃지 않음을 보여주었다(Figure 3D).

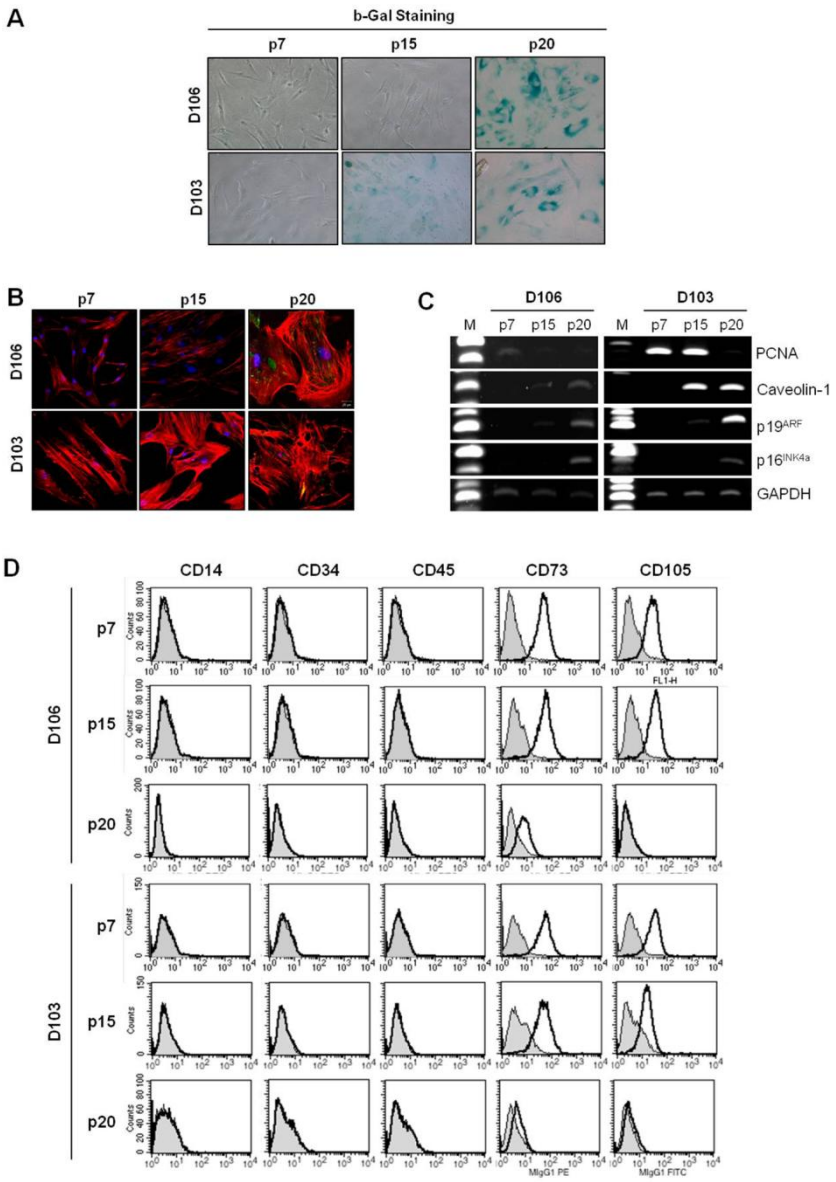

Figure 3. Characteristics of hcMSC during cellular senescence.

(A) β-gal staining.

(B) Immunofluorescence staining for caveolin-1.

(C) Molecular markers of gene expression by RT-PCR.

(D) Flow cytometric analysis of MSC markers to compare the expression changes during passages.

3. 내인성 대사체의 분석

노화에 따른 내인성 대사체의 발현 변화를 profiling하기 위하여 passage 7, 15, 20의 cell 을 각각 추출하여 분석하였다. 결과의 재현성 확보를 위하여 각 분석 조건에서 반복수는 3회로 하였으며 개체차를 보정하기 위하여 2명의 다른 기증자로부터 줄기세포주를 얻어 전체 실험을 2번 반복하였다. 크로마토그램 (Figure 4) 상에서 두 배치의 결과는 양적인 측면에서 작은 차이는 있으나, 비슷한 시간대의 주요 피크들과 노화에 따른 같은 경향성을 보였다. 예를 들어 두 배치의 결과는 모두 passage 20에서 7 이나 15에 비해 주요 피크들의 intensity와 편차가 증가하는 경향을 보였다. 이를 보다 확실하게 확인하기 위하여 주성분 분석(PCA; principal component analysis)을 수행하였다.

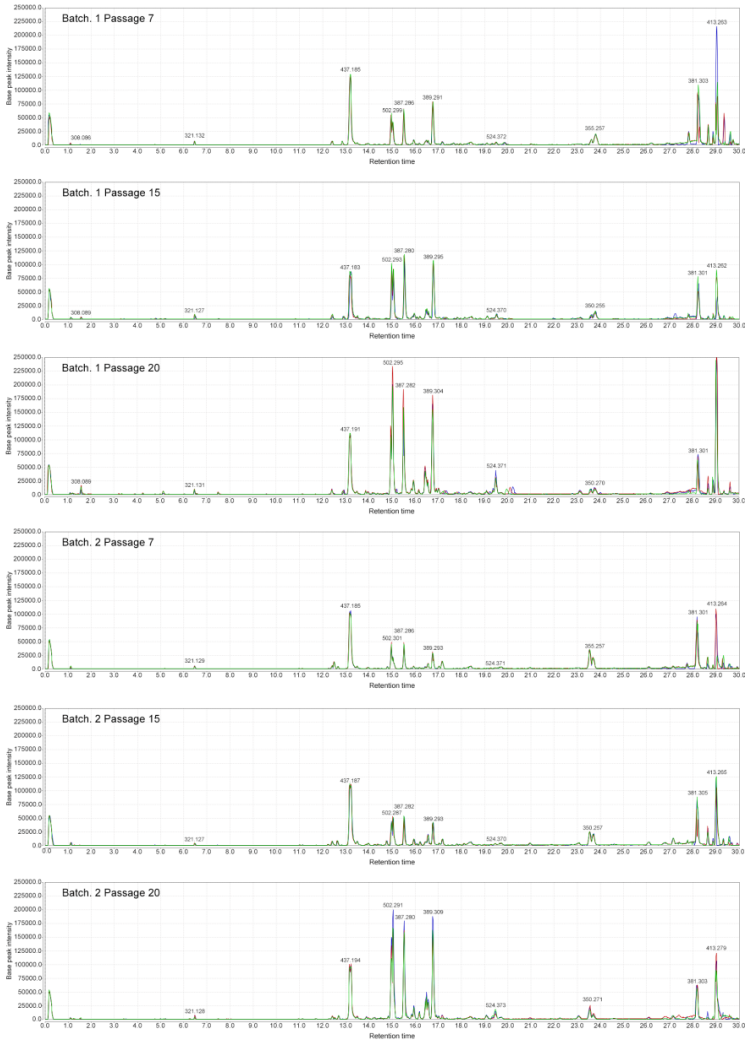

Figure 4. Total Ion Chromatogram of hcMSC by UPLC Q-TOF MS. While culturing was carried out, the cells in passage 7, 15 and 20 were analyzed. Two MSC lines, D103 (batch 1) and D106 (batch 2), were obtained from each of the two different donors and the entire experiment was repeated twice. The experiment was carried out in triplicate per passage and the results were expressed by overlapping in one chromatogram. The measurement range of m/z values was 50 to 1000. Repeat1, repeat2 and repeat3 were presented in blue, red and green, respectively.

4. 주성분분석 (PCA; principal component analysis)

PCA는 노화 전후 중간엽줄기세포의 내인성 대사체 조성(composition)의 변화를 한눈에 확인하기 위하여 수행하였다(Figure 5). PCA는 다변량 데이터를 주성분1 (principal component 1; PC1)과 주성분2 (principal component 2; PC2)로 축약하여 2차원으로 나타내었다. 각각의 시료는 각기 다른 색의 점으로 표현되었으며 PC1과 PC2의 값에 따라 위치하였다. 노화 단계에 따라 그룹을 표시한 결과 passage 7에서 15, 20으로 변하는 동안 점이 방향성 있게 움직이는 것을 확인하였다. 또한 두 배치에서 모두 노화가 진행되기 전 (passage 7, 15)에 비하여 노화 후 (passage 20)에 세 반복 간 편차가 증가한 경향을 확인하였다. 층분리 배양법을 통하여 배양되는 중간엽줄기세포는 단일세포로부터 시작된 클론 세포로서 배양 과정에서 고유의 특성을 균질하게 유지하는 장점이 있다. 그럼에도 불구하고 노화가 발생한 passage 20의 시료가 세포 간 균질성을 잃은 것은 노화의 과정이 내인성 대사체 발현의 항상성을 유지하지 못하게 하며 진행되는 것임을 보여준다. 이에 따라 노화가 진행되면 세포간 불균질성(heterogenous)이 발생한다는 것을 가정하고 이가 통계적으로 유의적인 수준인지 확인하기 위하여 다음과 같이 통계분석을 수행하였다.

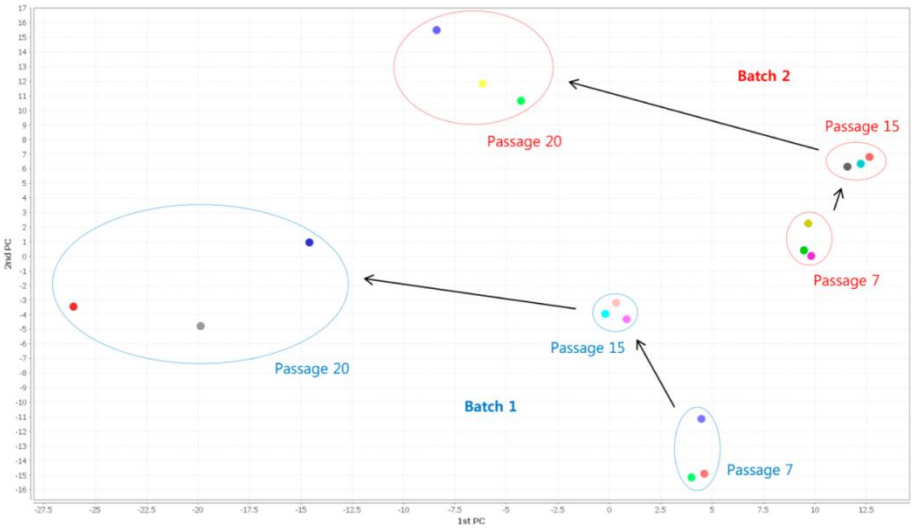

Figure 5. Principal component analysis (PCA) plot. PCA was performed for all profiled metabolites. One spot represents a single sample. In the plot, it can be observed that samples from passage 20 (after senescence) were shifted left compared with those from passages 7 and 15 (before senescence), indicating that the average value of passage 20 was either increased or decreased when compared with the other passages. Simultaneously, each triplicate of passage 20 was spread in the plot, indicating an increase in dispersion.

5. 통계분석

Passage 20 에서 대사체의 분산(표준편차) 또는 평균이 증가하는 경향이 있는지 판단하기 위해, 먼저 다음과 같은 linear mixed effects model 을 고려하였다.

$$X_{jtr}^{i} = \mu + \alpha_i + \eta_j + \beta_t + \epsilon_{jtr}$$

$$i = 1,2;\ \ j = 1,2,\ldots,539;\ \ t = 1,2,3;\ r = 1,2,3;$$

위에서 X_{jtr}^{i}는 r 번째 반복 수(repetition, n=3) 중 j 번째 배치에 대한 t 번째 passage (P) 시료에서 j 번째 peak 의 intensity 이다. α_i 는 fixed batch effect 이며 $\eta_j \sim iid\, N(0, \sigma_\eta^2)$ 는 random effect 이다. β_t는 fixed time (or passage) effect 이다. 모든 random effect 와 measurement error 는 독립적인 것으로 가정되었다. 또한 $\alpha_1 = 0$, $\beta_1 = 0$로 가정하였으므로 결과적으로 시간이 지남에 따른 평균의 변화에 대한 가설은 $H_0^X: \beta_3 = 0$이다.

시간이 지남에 따라 표준 편차의 일관성을 검사하기 위해 또다른 linear mixed model 을 적용하였으며, 이 때에 관찰된 데이터에 단 몇 개의 표본만 있고, 주로 intensity 가 0(zero)이라는 점을 고려하여 표준 편차에 대한 선형 모델에서, 우리는 Cui 등이 제안했듯,

표준편차 추정치의 로그를 이용했다. 이에 따라 표준 편차에 대한 모델은 다음과 같다.

$$Y_{jt}^{i} = \mu^{*} + \alpha_{i}^{*} + \eta_{j}^{*} + \beta_{t}^{*} + \epsilon_{jt}^{*}$$

$$i = 1,2;\ \ j = 1,2,\ldots,539;\ \ t = 1,2,3;$$

위에서 Y_{jt}^{i}는 $log\, s_{ijt}^{2}$이고 s_{ijt}^{2}는 i 번째 배치에 대한 t 번째 passage 에서 j 번째 변수의 편차 추정치이다. 또한 로그로 정리한 편차 추정치 $log\, s_{ijt}^{2}$는 다음과 같이 정의된다.

$$log\, s_{ijt}^{2} = \frac{1}{G}\left(\sum_{j=1}^{G} log(\Sigma_{ijt}/\nu)\right) - E\left(log\frac{\chi_{\nu}^{2}}{\nu}\right) + \left(1 - \frac{(G-3)\, Var(log\frac{\chi_{\nu}^{2}}{\nu})}{\sum_{j=1}^{G}\left(log\, \Sigma_{ijt} - \overline{S_{i.t}^{*}}\right)^{2}}\right)_{+} \times \left(log\, \Sigma_{ijt} - \overline{S_{i.t}^{*}}\right)$$

위에서 *G=539* 는 변수(peak)의 수이다. Σ_{ijt}는 i 번째 배치에 대한 t 번째 passage 에서 j 번째 변수의 residual sum of squared errors (SSE)이다. $\overline{S_{i.t}^{*}} = \frac{1}{G}\sum_{j=1}^{G} log\, \Sigma_{ijt}$ 그리고 Σ_{ijt}/s_{ijt}^{2} 는 독립적으로 카이제곱 분포와 동일하게 분포되며, ν는 자유도이다.

평균에 대한 모델과 비슷하게, α_i^* 는 fixed batch effect 이며 $\eta_j^* \sim iid\, N(0, \sigma_\eta^2)$ 는 random effect 이고 β_t^* 는 fixed time (or passage) effect 이며, $\epsilon_{jt}^* \sim iid\, N(0, \sigma_\epsilon^2)$ 는 measurement error 이다. 모든 random effect 와 measurement error 는 독립적인 것으로 가정되었다. $\alpha_1^* = 0, \beta_1^* = 0$ 을 가정하였고, 표준 편차의 일관성을 판단하기 위해 $H_0^Y: \beta_3^* = 0$ 을 검증하였다.

분석 결과, passage 20 에서 평균 및 표준 편차가 p-value < 0.001 임을 확인하였다. 이를 보다 쉽게 확인하기 위하여 histogram 과 scatter plot 을 작성하였다(Figure 6). 검정, 빨강, 녹색으로 passage 7, 15, 20 을 각각 나타내었을 때 passage 20 이 7, 15 와 다른 평균과 표준편차를 가짐을 확인할 수 있었으며 passage 7 과 15 간에 유의미한 차이는 거의 없었다.

이를 바탕으로 각 대사체의 평균이나 표준편차 면에서 시간이 지남에 따라 변화가 일어나는지의 여부를 추가로 검증하였다. i 번째 peak 의 평균의 변화를 검증하기 위해 다음과 같은 통계를 고려하였다.

$$T_i = \frac{\sqrt{3}(\bar{X}_i^3 - \bar{X}_i^2)}{S_{23}}, \qquad i = 1, \ldots, 539$$

S_{23}^2는 passage 15 와 20 의 편차를 의미하며 $\bar{X}_i^2$ 와 $\bar{X}_i^3$는 passage 15 와 20 각각의 평균이다. 마찬가지로, 표준 편차 내 변화를

검정하기 위해, 다음을 확인하였으며 S_{3i}^2 와 S_{2i}^2는 passage 15 와 20 간의 편차를 의미하였다.

$$F_i = \log(\, S_{3i}^2 / S_{2i}^2 \,), \qquad i = 1, \ldots, 539$$

Null hypothesis (평균이나 표준 편차에 변화 없음) 하에서, 이론적으로 통계 $\mathrm{T_i}$는 10 의 자유도를 지닌 t-분포를 따랐고 $F_i/2$는 Fisher 의 z-분포를 따랐다. 본 분석에서, 우리는 여러 가설 검증 중 동시에 일어나는 multiple testing errors 를 통제하기 위해 Efron 에 의한 empirical bayes(EB) (Efron et al., 2001; Efron, 2004) 절차를 이용하였다. EB 절차에서, empirical null distribution 가 theoretical null distribution 보다 더 적합하였으며, R-package 'fdrtool'을 통해 평균이 0(zero)이고 편차가 각각 $\hat{\sigma}_{T_i}^2$ 와 $\hat{\sigma}_{F_i}^2$ 인 normal distribution 에서, 관찰된 통계치인 F_i s 와 T_i s 로 부터 가설을 추정할 수 있었다.

결과적으로, 노화 관련 대사체를 선별하기 위하여 통계검정을 통하여 $|T_i| \geq \hat{\sigma}_{T_i} \times Z_{(1-\frac{\alpha}{2})}$ 에서 $\alpha = 0.05$ 인 변수 i^{th} 를 선별하였다. $Z_{(1-\frac{\alpha}{2})}$ 는 표준 정상 분포의 $100\left(1-\frac{\alpha}{2}\right)$ 백분율이다. 마찬가지로, 표준 편차의 경우, $|F_i| \geq \hat{\sigma}_{F_i} \times Z_{(1-\frac{\alpha}{2})}$ 에서 $\alpha = 0.05$ 인 변수 i^{th} 를 선별하였으며 모든 유의미한($\alpha = 0.05$) 변수 중, 최종적으로 다음과 같은 특정 패턴을 보여주는 것들을 선별하였다; (i) passage 15 와

20 간에 평균 및 표준편차의 변화가 유의미한 수준인 것, (ii) passage 7 과 15 간에 평균 및 표준편차의 변화 없음. 이에 따라 $T_2 \geq \hat{\sigma}_{T_2} \times Z_{(1-\frac{\alpha}{2})}$ 와 $|T_1| \leq \hat{\sigma}_{T_1} \times Z_{(1-\frac{\alpha}{2})}$ 모두를 만족하는 변수를 최종적으로 정리하고 이에 대한 동정(identification)을 진행하였다.

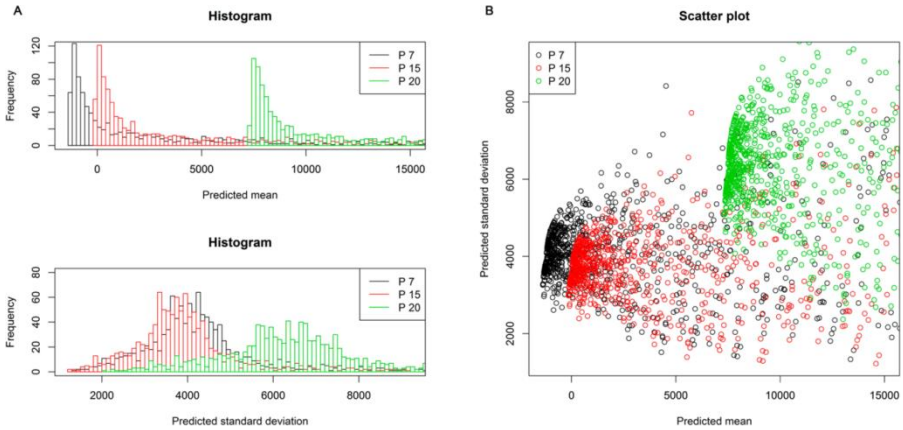

Figure 6. Histogram and scatter plot of the predicted means and standard deviations according to the linear mixed model. (A) In the histogram, black, red, and green lines represent passages 7, 15, and 20, respectively. We see a significant increase in the mean between passages 7 and 15 and between passages 15 and 20. The difference between the means of passages 15 and 20 is significantly larger than that between passages 7 and 15. We also see the same pattern in changes of the standard deviation. There is a significant increase from passage 15 to passage 20. (B) Scatter plot of predicted means by standard deviations are plotted below. Black, red, and green dots represent passages 7, 15, and 20, respectively. The increasing patterns between passages 15 and 20 as observed in the histograms are shown.

6. 노화 지표 내인성 대사체의 동정

선별한 대사체를 중심으로 동정을 시도하였다. 결과의 신뢰도 확보를 위하여 QC(quality control) 시료에서 상대표준편차(RSD)가 20% 이하로 재현성이 있는 것으로 측정된 대사체만을 대상으로 스펙트럼을 기반으로 한 구조분석을 수행하였다. MS/MS 결과, 선별된 모든 대사체에서 lipid 계열 특유의 spectrum pattern이 확인되었다. 내인성 lipid는 구조에 따라 triacylglycerol 과 같은 simple lipid 와 phospholipids, glycolipids와 같은 complex lipids로 폭넓게 나뉘어진다. 또한 이러한 계통은 화학 구조나 head group 등을 기준으로 subclass로 나눌 수 있다. 따라서 이러한 구조적 특이성을 바탕으로 MS/MS spectrum을 통해 lipids를 동정할 수 있었다(Jungalwala et al., 1984). 먼저, MS/MS spectrum 중 LPC의 m/z 184를 갖는 $[phosphocholine]^+$ 피크(Barber et al., 2012)와 LPE의 141 Da 크기의 neutral loss 특징(Avadhani et al., 2006)을 통하여 lipid의 계열을 유추하였다. Positive-ion mode 에서 LPC product-ion은 phosphocholine head group을 통해 나타난 m/z 184의 피크를 항상 가진다(Liebisch et al., 2002). 또한 구조적인 특징으로 인하여 collision energy에 따른 고유의 MS/MS spectrum pattern 변화를 가진다. 따라서 대표적인 LPC인 16:0과 18:0 LPC의 표준품을

확보하여 collision energy에 따른 MS/MS spectrum 패턴을 확인한 후 (Figure 7, 8) 이 결과와 precursor ion의 m/z를 종합하여 줄기세포내의 LPC를 동정하였다. 선별된 대사체 중 spectrum의 특징이 LPC와 일치하는 대사체는 5개로 precursor ion 의 m/z과 종합하여 각각 544.343-20:4 LPC, 570.346-22:5 LPC, 496.340-16:0 LPC, 522.355-18:1 LPC, 524.367-18:0 LPC 로 확인하였다(Figure 9~13). 또한 LPE는 positive-ion mode 에서 m/z 141의 neutral loss 를 특징으로 가진다. 따라서 [precursor ion - 141 Da] 위치의 peak의 존재를 통하여 LPE 여부를 확인할 수 있다. 이 또한 구조적인 특징으로 인하여 collision energy (10, 20, 30, 40, 50 eV)에 따른 고유의 MS/MS spectrum pattern 변화를 가지므로 대표적인 LPE인 16:0과 18:0 LPE의 표준품을 확보하여 collision energy(5, 10, 15, 20, 25 eV)에 따른 MS/MS spectrum 패턴을 확인한 후(Figure 14, 15) 이 결과와 precursor ion의 m/z를 종합하여 줄기세포 내의 LPE를 동정하였다. 선별된 대사체 중 spectrum의 특징이 LPE와 일치하는 대사체는 3개로 precursor ion 의 m/z과 종합하여 각각 526.291-22:6 LPE, 528.310-22:5 LPE, 530.322-22:4 LPE로 확인하였다(Figure 16~18). 이로서 선별된 대사체가 8개의 lipids 임을 구조적으로 명확히 동정하였으며(Table 2) 각 대사체의 노화에 따른 발현 정도를 확인하였다(Figure 19).

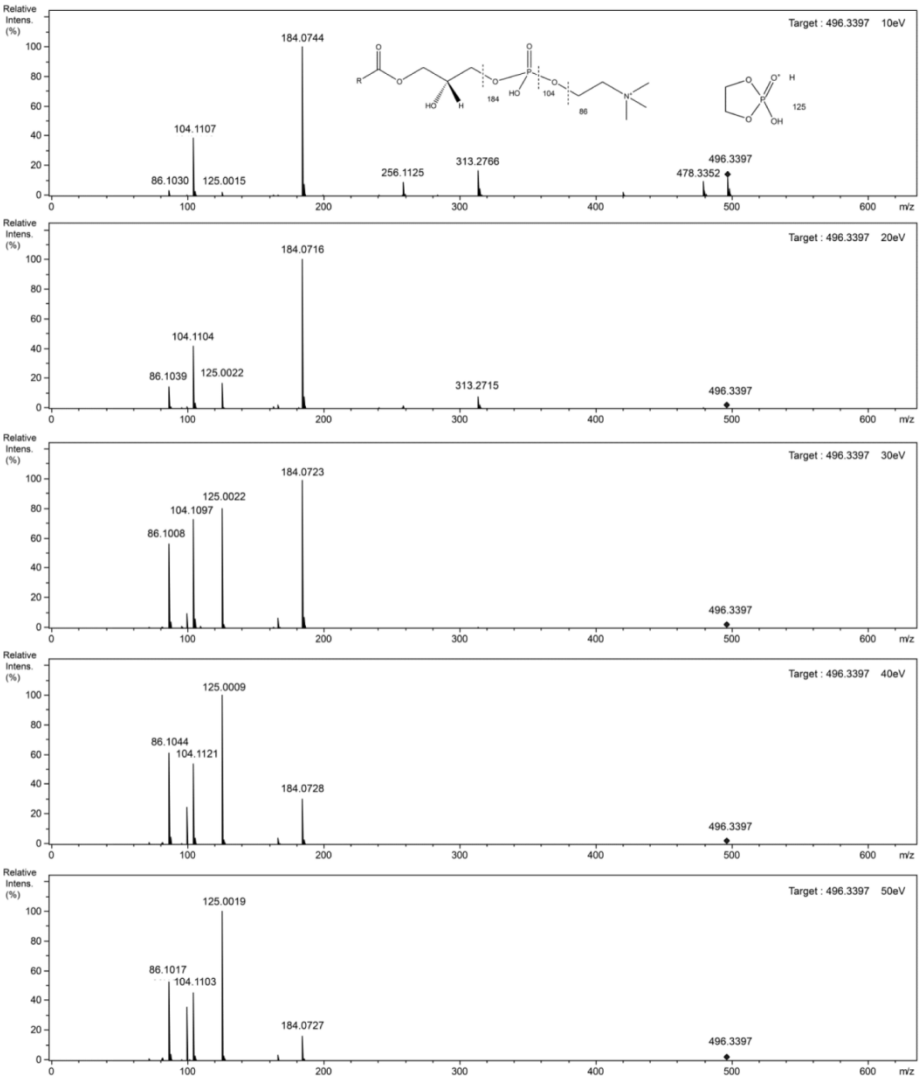

Figure 7. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 16:0 standard (collision energy: 10－50 eV).

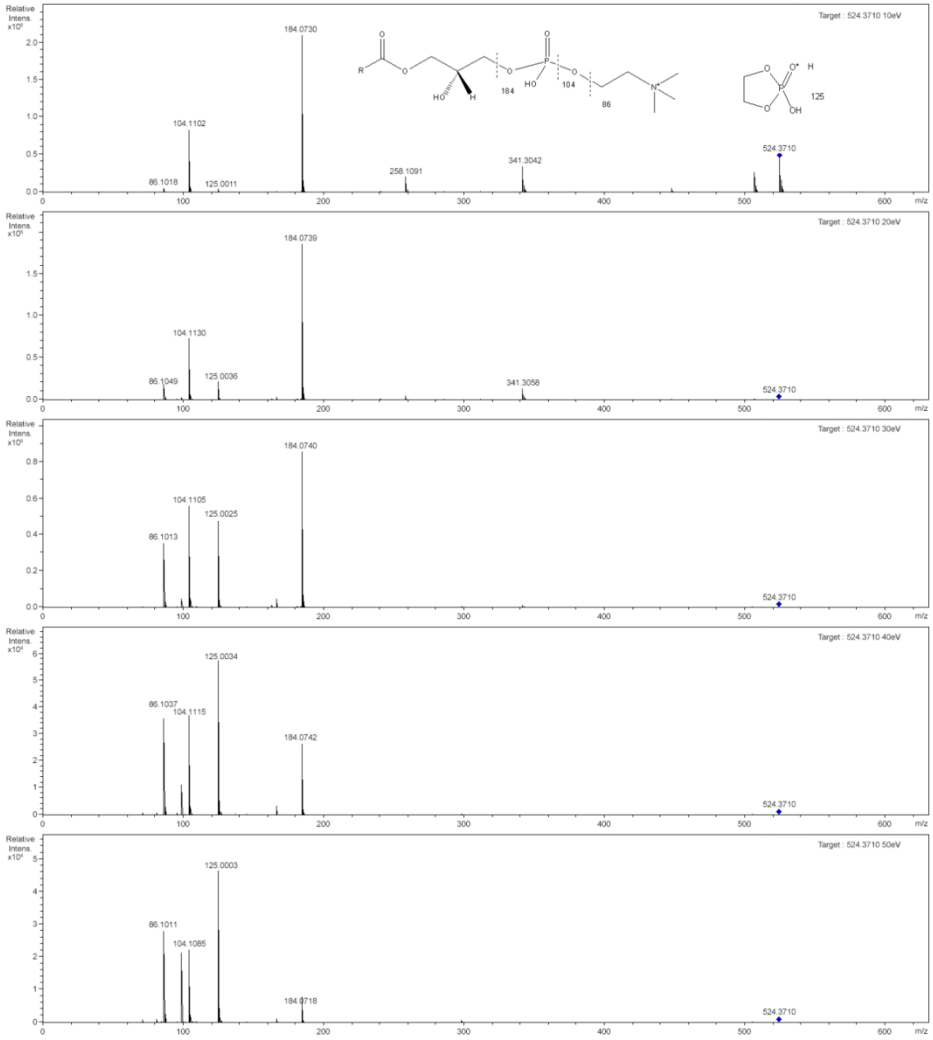

Figure 8. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 18:0 standard (Collision energy: 10~50 eV).

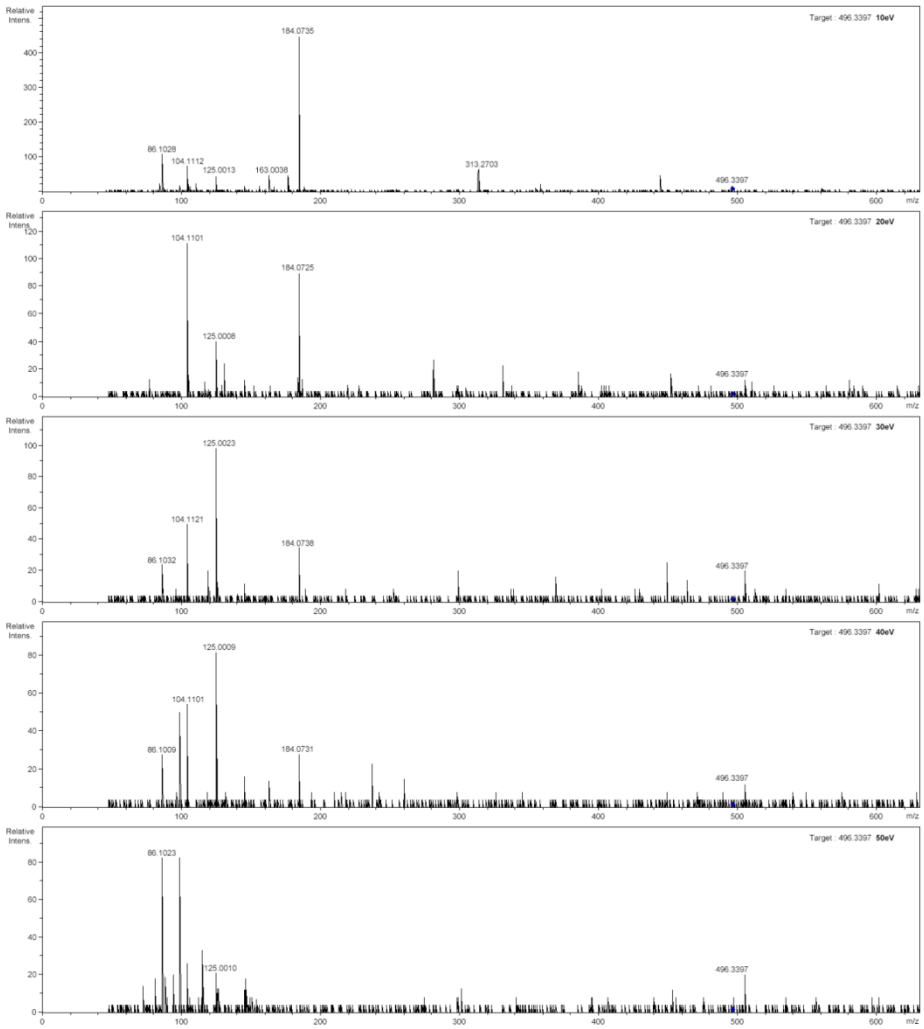

Figure 9. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 16:0 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

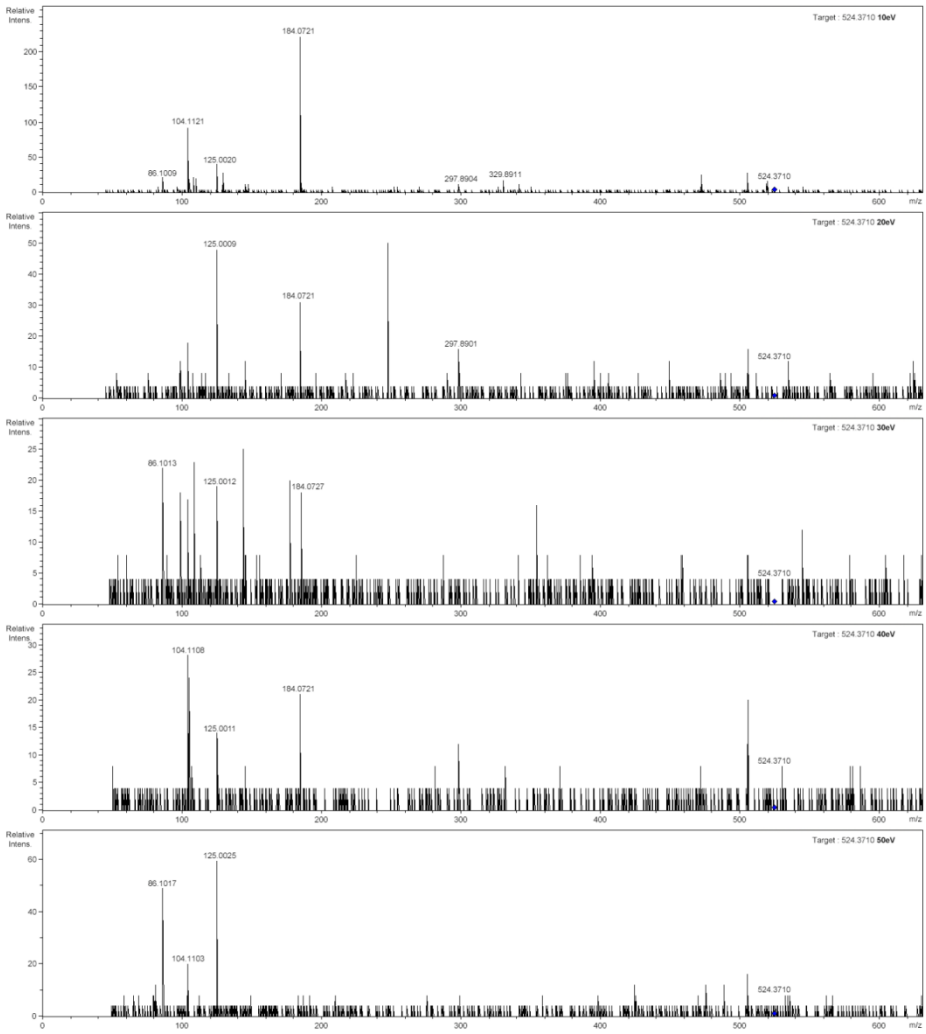

Figure 10. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 18:0 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

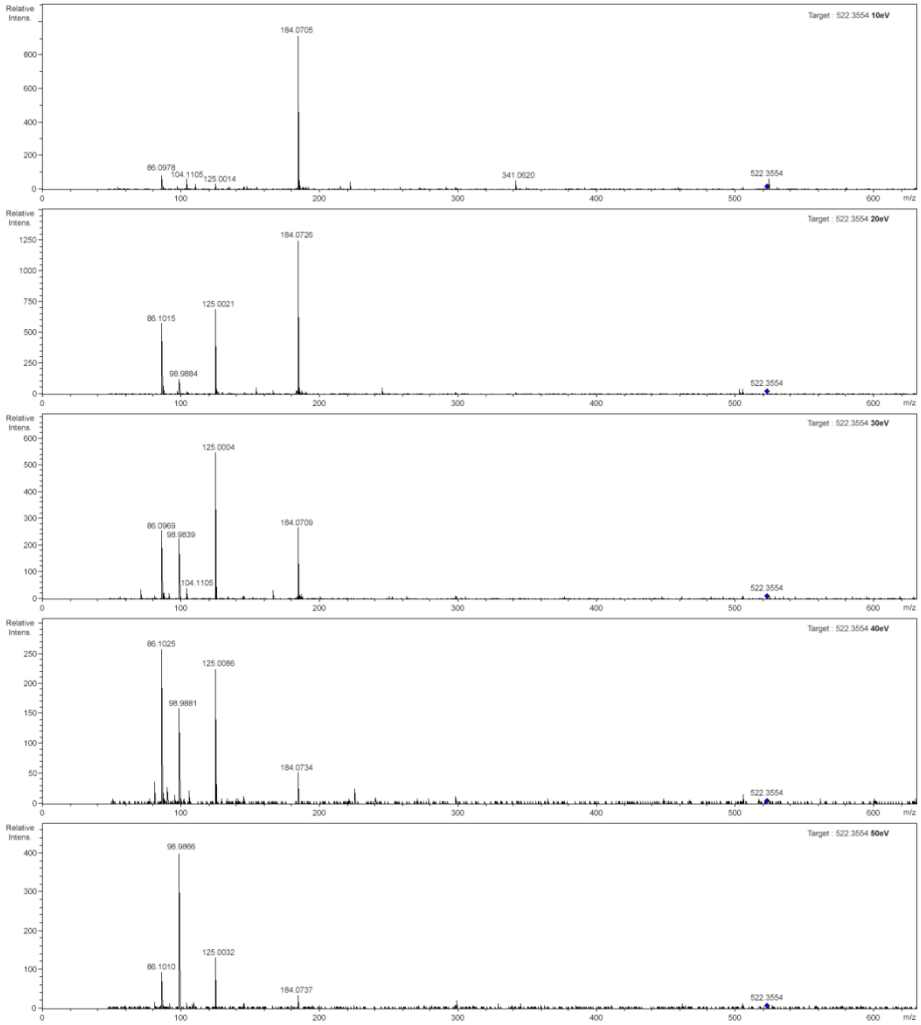

Figure 11. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 18:1 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

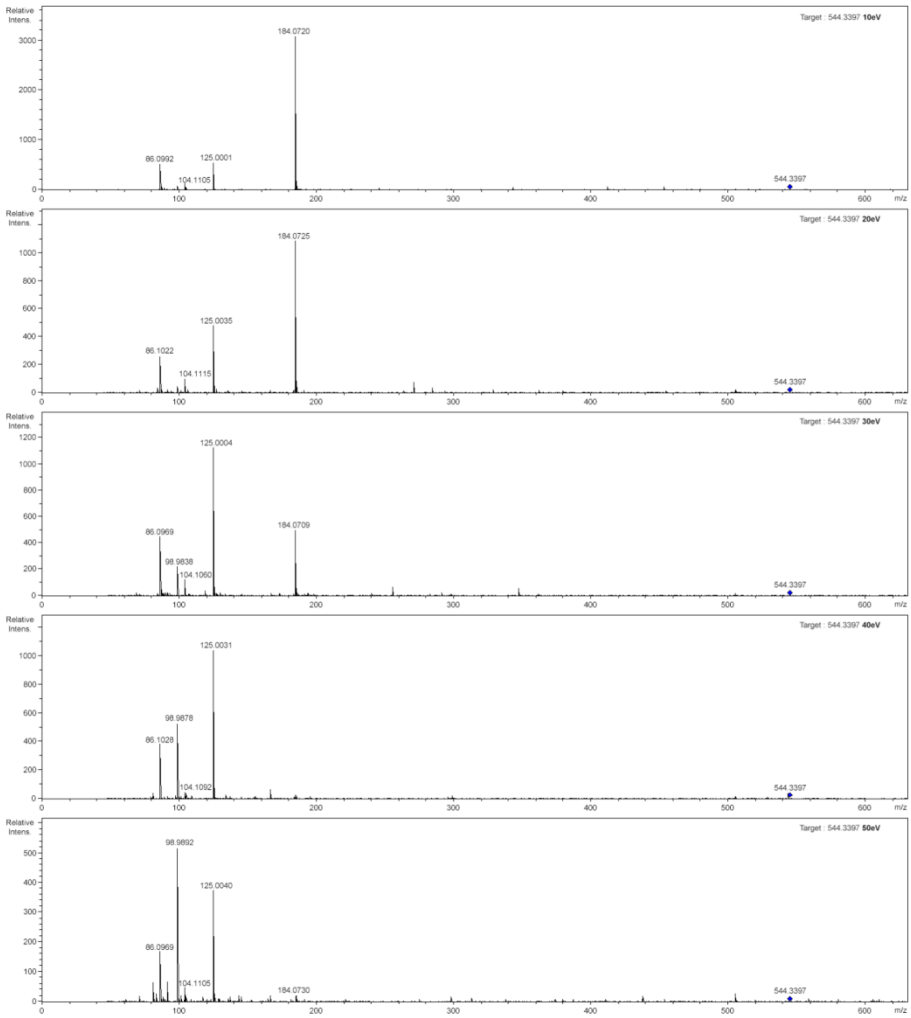

Figure 12. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 20:4 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

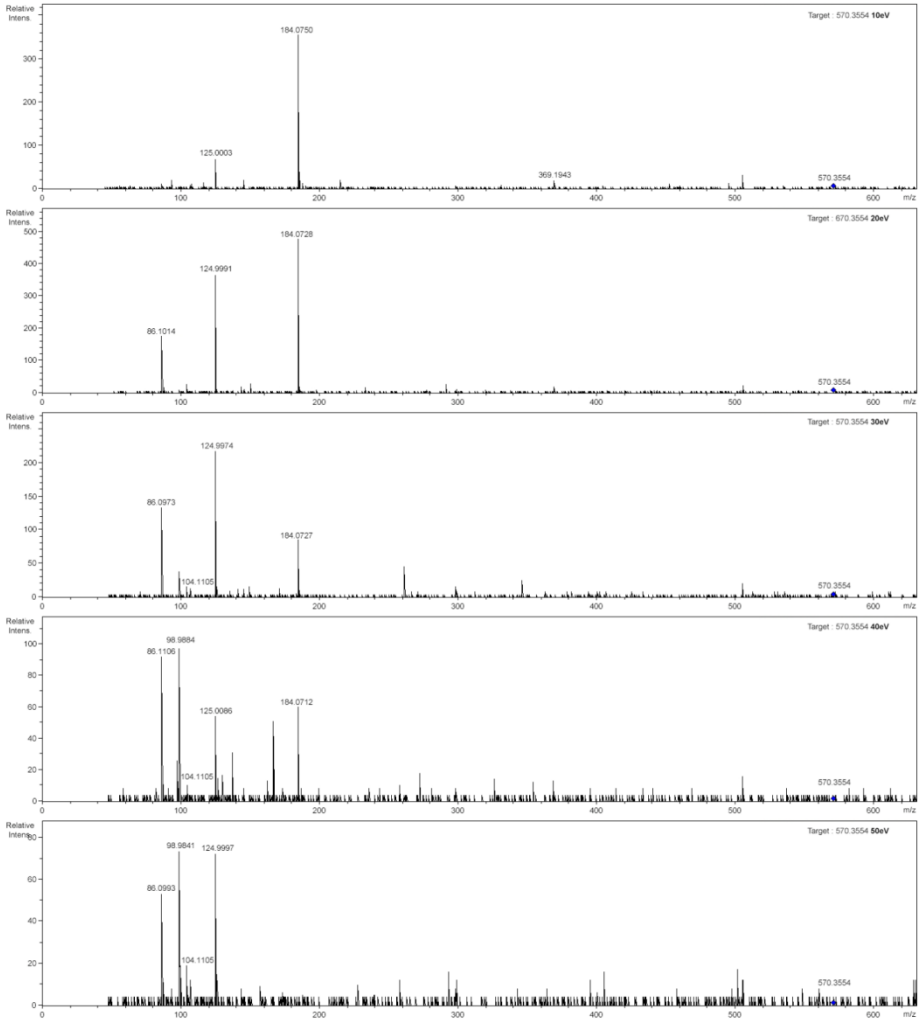

Figure 13. MS/MS spectrum of lysophosphatidylcholine 22:5 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 10~50 eV).

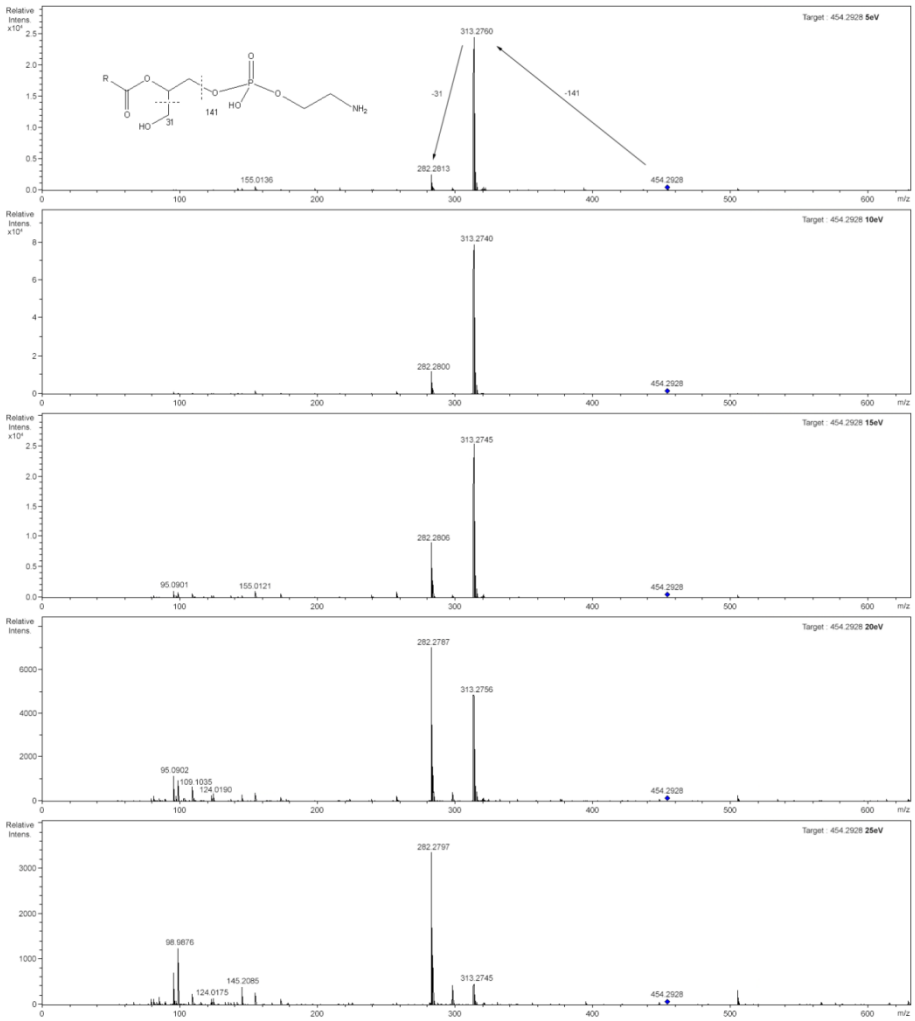

Figure 14. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 16:0 standard (Collision energy: 5~25 eV).

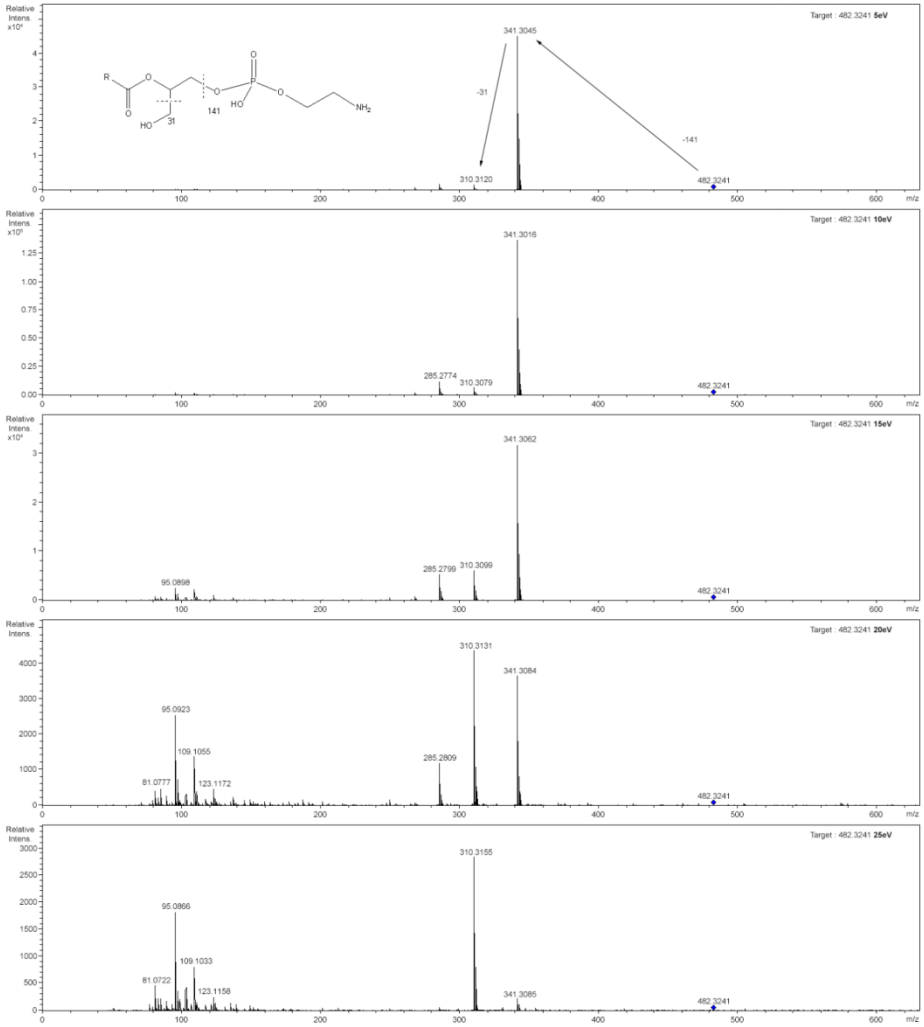

Figure 15. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 18:0 standard (Collision energy: 5~25 eV).

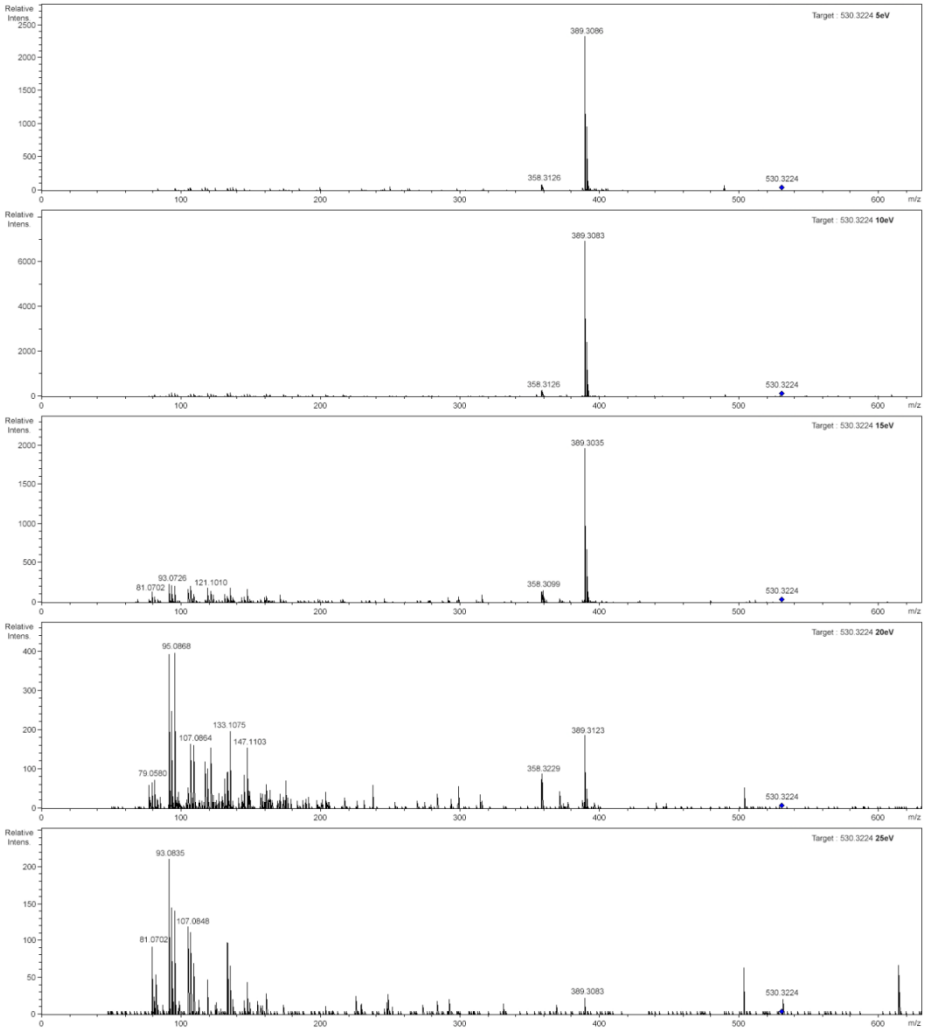

Figure 16. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 22:4 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 5~25 eV).

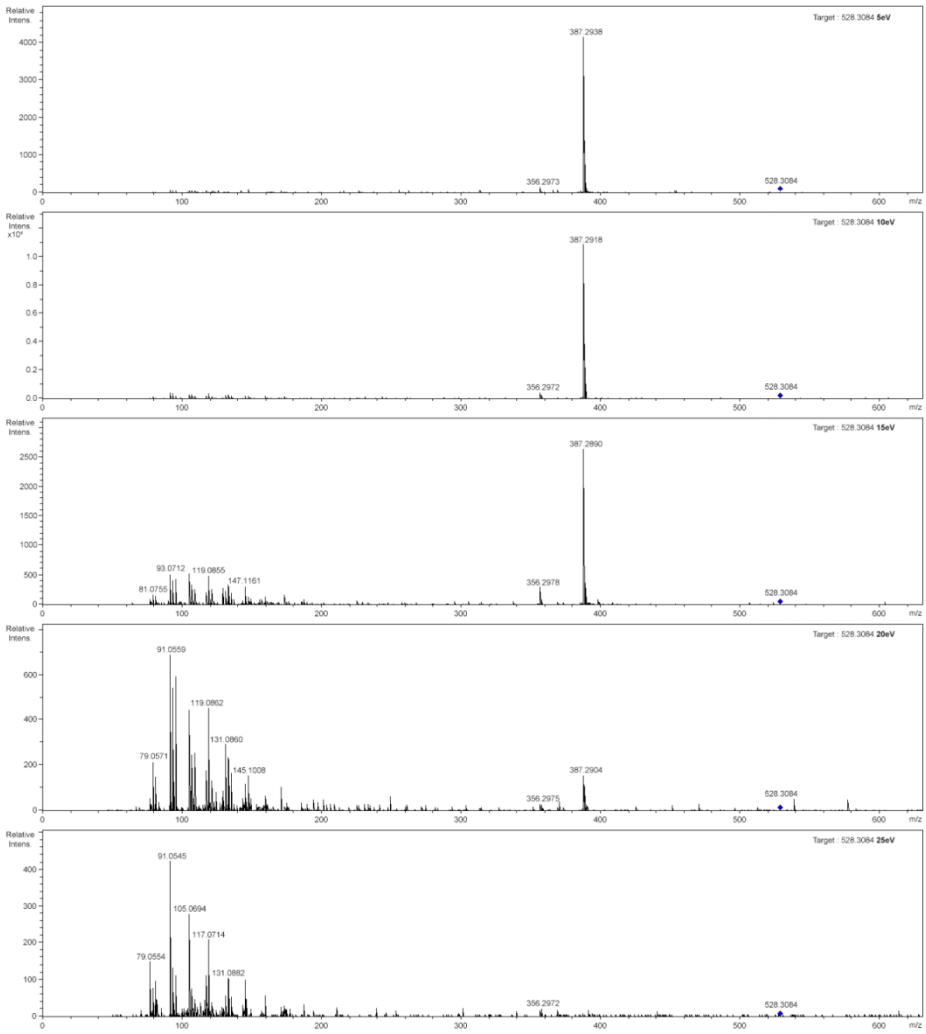

Figure 17. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 22:5 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 5~25 eV).

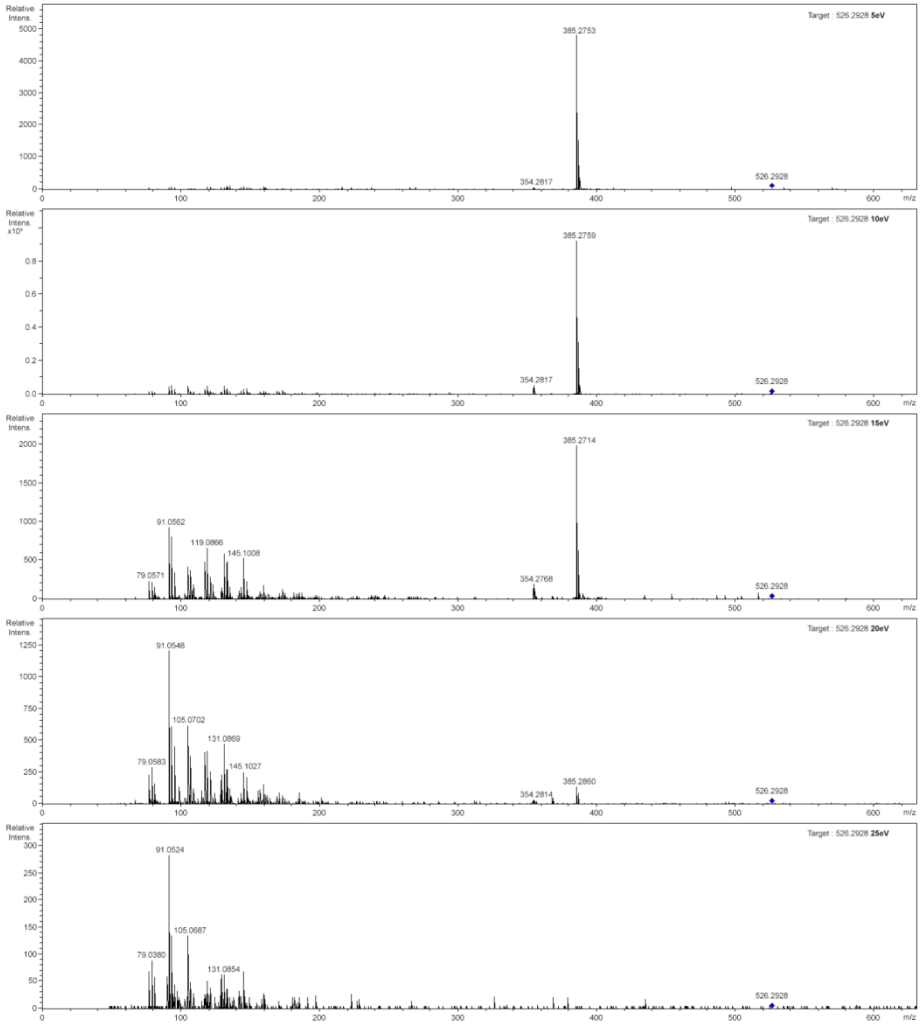

Figure 18. MS/MS spectrum of lysophosphatidylethanolamine 22:6 which is an endogenous metabolite that shows change in expression during senescence process of hcMSC (Collision energy: 5~25 eV).

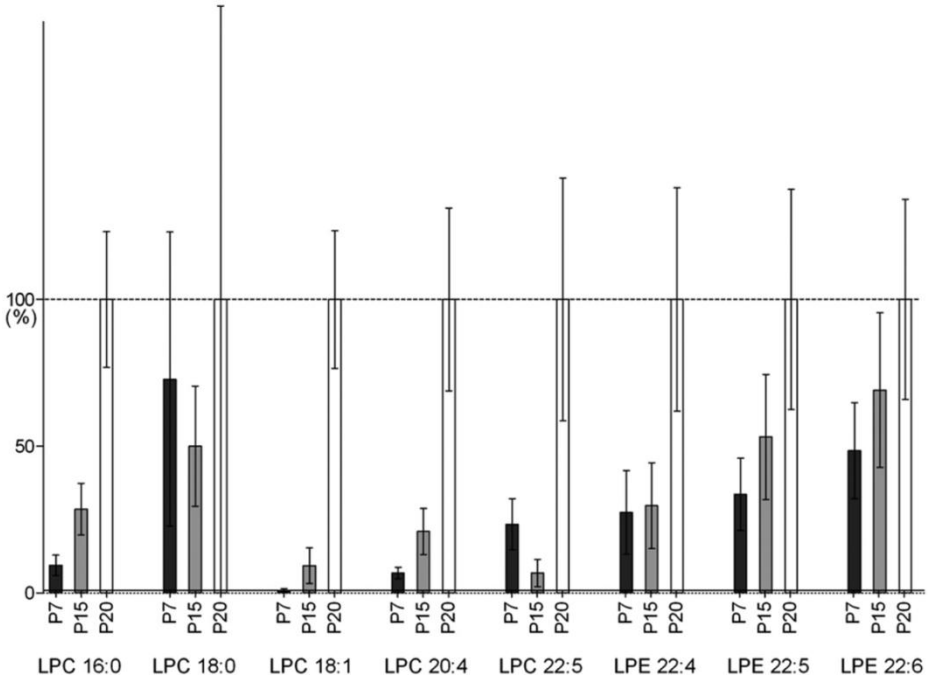

Figure 19. Expression comparison of eight selected marker candidates. This figure shows the mean and standard deviation of the expression of the eight selected metabolites according to the senescence. The expression value of passage 20 was set to 100%, and the values for the other two passages were calculated as relative percentages. The mean of expression values was presented as a bar graph. The expression was greatly increased in passage 20 (after senescence) compared with passages 7 and 15 (before senescence). The standard deviation of each group (n = 3, 2 batches) is presented as an error bar, and there is an increased standard deviation in passage 20 compared with passages 7 and 15.

precursor ion m/z	name
496.340	lysophosphatidylcholine 16:0
524.367	lysophosphatidylcholine 18:0
522.355	lysophosphatidylcholine 18:1
544.343	lysophosphatidylcholine 20:4
570.346	lysophosphatidylcholine 22:5
530.322	lysophosphatidylethanolamine 22:4
528.310	lysophosphatidylethanolamine 22:5
526.291	lysophosphatidylethanolamine 22:6

Table 2. List of candidate senescence markers for metabolomics

IV. 고 찰

중간엽줄기세포는 면역 조절 활성과 손상된 조직을 회복시키는 능력을 통해 높은 치료 능을 가진다. 그러나 이의 활용을 위해서는 반드시 체외 배양 기반의 대량 생산이 필요하다. 몇몇 연구에서 나타났듯, 성체줄기세포와 전구 세포는 반복적인 배양 단계를 거치며 세포 노화(senescence)라 불리는 현상을 통해, 점차 증식능과 분화능을 잃는다. 이런 현상은 다양한 세포 과정 내 방대한 표현형 변화와 관련된 매우 복잡한 메커니즘이다. 이런 이유로, 표현형과의 직접적인 연결을 통해 해석할 수 있는 내인성 대사체 수준의 접근이 필요하다.

본 연구에서, 우리는 계대배양을 통해 노화되는 중간엽줄기세포를 줄기세포 노화의 메커니즘을 이해할 모델 시스템으로 이용했다. 또한 생물학적, 분석적, 통계적 분석을 포괄하는 다학제적 접근을 통합 적용함으로써 중간엽줄기세포의 세포 노화를 폭넓게 확인하고자 하였다. 내인성대사체를 광범위하게 분석하기 위하여, 다양한 극성을 지닌 추출 용매를 순서대로 이용해 세포 대사체를 추출하여(Yanes et al., 2010) 크로마토그램(Figure 4)과 같이 확인하였으며 이 중 보다 신뢰할 만한 정보를 얻기 위해 QC (quality control) 시료를 통하여 확인되었던, 재현성 있는

데이터만을 사용하였다. 노화에 의해 발생한 발현 변화만을 선별하는 과정은 실험모델에 최적화된 통계알고리즘을 설계, 적용하여 진행하였다.

실험 결과로써, passage 7과 15의 두 가지 배치에 속한 총 12개 시료들은 대사체의 상대적 발현 수준 면에서 비슷한 분포를 나타낸 반면, passage 20 내 6가지 표본들은 일관되게 독특한 분포를 나타냈다. 이와 같은 결과를 명확히 확인하기 위하여 주성분분석(PCA)를 수행한 결과, 노화 된 시료는 'PC1의 감소(평균의 변화)', '반복된 표본들 간의 분산 증가'를 가지는 것으로 나타났다. 전체 데이터의 분포를 판단하기 위해, 평균 및 표준편차에 대한 히스토그램을 작성하였고, 이를 통해, 평균과 표준편차 모두 passage 20에서 증가한 것이 동일하게 확인되었다 (Figure 6A). 평균과 표준편차를 scatter plot에서 나타났을 때에도 또한 passage 20만 다른 영역에 위치해 있었으며, 이는 평균과 표준편차 모두 증가했음을 보여주었다 (Figure 6B). 이와 같은 변화가 통계적으로도 유의미한지 판단하기 위해 passage 7, 15, 20에 대해 평균 및 표준편차 검정을 진행하였다. 시간이 지남에 따라 발현의 강도가 변화하는(평균변화) 대사체를 선별하기 위해, t-test 를 적용하여, 평균 값을 검정했으며, F-test을 적용해 표준편차를 검정했다.

선별한 대사체들을 표준품과 MS/MS 스펙트럼을 토대로 동정(identification)한 결과, lysophospholipid로 확인되었다. lysophospholipid은 acyl-chain의 PLA2-mediated hydrolysis의 결과로서 생성되며(Ridgway, 2013), 세포막을 구성하는 phospholipid의 product 이다. 세포 내 phospholipid의 수준은 passage는 물론 apoptosis와 같은 노화나 염증의 개별적인 생리적 상태에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(van Meer and de Kroon, 2011). 본 연구를 통하여 확인한 결과 흥미롭게도 lysophospholipid 중에서도 특히 lysophosphatidylethanolamine (LPE)와 lysophosphatidylcholine (LPC)가 노화 이후 큰 분산증가와 평균증가를 보이는 것으로 나타났으며 이에 대하여 다음과 같은 기전적 해석 및 가설 설정을 진행하였다.

Bioactive pro-inflammatory lipid 인 LPC는 세포의 pathological 활성의 vital sign이다. 긴 배양기간에 의해 발생하는, LPC 농도의 증가는 산화 스트레스의 시작을 의미하며(Colles and Chisolm, 2000), 염증을 막을 능력이 감소함을 나타낸다(Tselepis and John Chapman, 2002). 최근 추가 연구를 통해 LPC의 누적으로 intracellular Ca^{2+}의 증가가 유발되는 동시에, protein kinase C (PKC) 활동성에 의해 막의 자극이 유도된다는 점이 밝혀졌다(Golfman et al., 1999). 특히 본 연구에서 발현이 변화한 것으로 나타난 LPC 16:0, 18:1,

20:4는 prostacyclin2 (PGI 2) 생산을 유도하는 것으로 알려졌다(Riederer et al., 2010). PGI2의 산물인, LPC-elicited 6-keto PGF1α의 생성은 cyclooxygenase (COX)-1, COX-2 와 세포기질의 cytosolic phospholipase type IVA (cPLA2)의 활성에 영향을 미친다. Arachidonic acid 의 cPLA2-dependent release 은 다시 LPC 등을 증가시킨다. 결과적으로 cPLA2는 LPC에 의해 간접적으로 활성화될 수 있고, 이에 따라 LPC를 급격히 증가시킨다(Kast et al., 1993). 이를 통해 LPC가 노화 후에 중간엽 줄기세포에서 발현이 증가하는 결과를 기전적으로 이해할 수 있다.

한편, LPE는 phospholipase D (PLD) 활성을 억제하는 lipid mediator phospholipid 이다(Ryu et al., 1997). 세포막 내 phospholipid 을 분해하는 효소인 PLD의 가장 중요한 역할은 세포 내 세포 기관의 생물학적 막의 구조를 유지하는 것이며 최근 추가로 밝혀진 생리학적 역할들은 다음과 같다. 첫째, Rho GTPase와 ARF와 같은 작은 G protein과 함께 endoplasmic reticulum-to-golgi transport 및 endoplasmic reticulum 의 형성 과정을 진행한다(Brown et al., 1993; Cockcroft et al., 1994). 둘째, phosphatidic acid (PA)를 생성하여 세포 신호 전달, 세포 증식, 면역, nucleic acid 합성, mitogenesis 과정의 메신저 역할을 한다(Cockcroft, 1992; Houle and Bourgoin, 1996). 기전적으로, PA는

PA tyrosine kinase, GTPase activating protein (GAP), PI-4 kinase, RafF를 활성화시킨다. 또한 PA는 칼슘 신호 전달 및 NADH oxidase 를 통한 oxidative burst의 활성에 기여한다(L'Heureux et al., 1995). 또한 LPE는 구조적으로 산화적 공격을 받기 매우 쉬우며, 이는 비슷한 파괴로부터 다른 phospholipid을 보호하는 데 도움을 준다(Wallner and Schmitz, 2011). Scavenge reactive oxygen species를 제거하는 LPE의 능력 때문에, 노화에 따라 분자 수준의 LPE는 항상 증가하며 이로도 해결하지 못하는 경우 세포에 oxidative stress 가 진행된다.

요약해 보면, 본 연구를 통하여 밝혀진 중간엽줄기세포 내 lysophospholipid의 구성 변화는 노화에 대해 기존의 연구들에서 제시한 메커니즘과 상호 연관되어 있다. 연구결과에서, 세포의 lysophospholipid 수준은 초기 passage 의 중간엽줄기세포에서 일정하게 조절되지만, 후기 passage 에서 불규칙해지는데 그 이유는 노화 때문일 수 있으며 signaling molecule 로써 지질의 기능과 연관된 것으로 생각되었다. 특정 lipid signaling pathway 변형 때문에 differentiation, proliferation, programmed cell death 와 같은 다양한 세포의 활성들이 변화될 수 있으므로 중간엽줄기세포의 세포 노화 중 관찰되는 내인성 대사체의 발현 변화는 세포의 활성을 확인하는 일종의 바이오마커로 이용될 수

있으며 이런 관점에서 볼 때, lysophospholipid들을 통해, 신뢰성 있게 평가된 기능적인 줄기세포에 의해 보다 효과적인 줄기 세포 치료의 발달을 위한 기회 또한 만들 수 있을 것이다.

V. 결　론

중간엽줄기세포는 개체를 통해 얻을 수 있는 양이 한정되어 채취 후에 체외에서 배양 및 증폭하는 과정을 거쳐야만 한다. 따라서 이러한 배양과정에서 중간엽줄기세포가 분화능과 활성을 균일하게 유지하고 있는지를 확인하고 조절하는 기술이 필연적으로 요구된다. 본 연구는 노화에 관련한 내인성 대사체를 선별하여 해석하고 그 결과를 지표물질로 제시함으로써, 배양중인 중간엽줄기세포의 노화 진행여부를 측정할 수 있게 하였다. 또한 중간엽줄기세포가 분화능과 활성을 적절히 유지하여 연구 또는 임상에 적용할 가치가 있는지를 판단할 근거로 사용할 수 있게 하였다.

VI. 참고문헌

Avadhani, M., Geyer, R., White, D.C. and Shimkets, L.J. Lysophosphatidylethanolamine Is a Substrate for the Short-Chain Alcohol Dehydrogenase SocA from Myxococcus xanthus. *Journal of Bacteriology* 188 (2006), pp. 8543-8550.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L. and van Deursen, J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479 (2011), pp. 232-6.

Barber, M.N., Risis, S., Yang, C., Meikle, P.J., Staples, M., Febbraio, M.A. and Bruce, C.R. Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS One* 7 (2012), p. e41456.

Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C. and Sternweis, P.C. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75 (1993), pp. 1137-44.

Chakkalakal, J.V., Jones, K.M., Basson, M.A. and Brack, A.S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 490 (2012), pp. 355-60.

Cockcroft, S. G-protein-regulated phospholipases C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1113 (1992), pp. 135-60.

Cockcroft, S., Thomas, G.M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Truong, O. and Hsuan, J.J. Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 263 (1994), pp. 523-6.

Colles, S.M. and Chisolm, G.M. Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events. *J Lipid Res* 41 (2000), pp. 1188-98.

Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J.D., Halsall, A., Haselden, J.N., Nicholls, A.W., Wilson, I.D., Kell, D.B. and Goodacre, R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 6 (2011), pp. 1060-83.

Efron, B. Large-scale simultaneous hypothesis testing: The choice of a null hypothesis. *Journal of the American Statistical Association* 99 (2004), pp. 96-104.

Efron, B., Tibshirani, R., Storey, J.D. and Tusher, V. Empirical Bayes analysis of a microarray experiment. *Journal of the American Statistical Association* 96 (2001), pp. 1151-1160.

Golfman, L.S., Haughey, N.J., Wong, J.T., Jiang, J.Y., Lee, D., Geiger, J.D. and Choy, P.C. Lysophosphatidylcholine induces arachidonic acid release and calcium overload in cardiac myoblastic H9c2 cells. *J Lipid Res* 40 (1999), pp. 1818-26.

Hayflick, L. and Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 (1961), pp. 585-621.

Houle, M.G. and Bourgoin, S. Small GTPase-regulated phospholipase D in granulocytes. *Biochem Cell Biol* 74 (1996), pp. 459-67.

Hu, C., Wei, H., van den Hoek, A.M., Wang, M., van der Heijden, R., Spijksma, G., Reijmers, T.H., Bouwman, J., Wopereis, S., Havekes, L.M., Verheij, E., Hankemeier, T., Xu, G. and van der Greef, J. Plasma and liver lipidomics response to an intervention of rimonabant in ApoE*3Leiden.CETP transgenic mice. *PLoS One* 6 (2011), p. e19423.

Jungalwala, F.B., Evans, J.E. and Mccluer, R.H. Compositional and Molecular-Species Analysis of Phospholipids by High-Performance Liquid-Chromatography Coupled with Chemical Ionization Mass-Spectrometry. *Journal of Lipid Research* 25 (1984), pp. 738-749.

Kast, R., Furstenberger, G. and Marks, F. Activation of cytosolic phospholipase A2 by transforming growth factor-alpha in HEL-30 keratinocytes. *J Biol Chem* 268 (1993), pp. 16795-802.

L'Heureux, G.P., Bourgoin, S., Jean, N., McColl, S.R. and Naccache, P.H. Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO alpha, stimulates phospholipase D activity. *Blood* 85 (1995), pp. 522-31.

Lee, J.W., Nishiumi, S., Yoshida, M., Fukusaki, E. and Bamba, T. Simultaneous profiling of polar lipids by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry with methylation. *J Chromatogr A* 1279 (2013), pp. 98-107.

Liebisch, G., Drobnik, W., Lieser, B. and Schmitz, G. High-throughput

quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 48 (2002), pp. 2217-24.

Liebisch, G., Vizcaino, J.A., Koefeler, H., Troetzmueller, M., Griffiths, W.J., Schmitz, G., Spener, F. and Wakelam, M.J. Shorthand Notation for Lipid Structures Derived from Mass Spectrometry. *J Lipid Res* (2013).

Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. and Oresic, M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11 (2010), p. 395.

Richards, S.E., Wang, Y., Claus, S.P., Lawler, D., Kochhar, S., Holmes, E. and Nicholson, J.K. Metabolic phenotype modulation by caloric restriction in a lifelong dog study. *J Proteome Res* 12 (2013), pp. 3117-27.

Ridgway, N.D. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48 (2013), pp. 20-38.

Riederer, M., Ojala, P.J., Hrzenjak, A., Graier, W.F., Malli, R., Tritscher, M., Hermansson, M., Watzer, B., Schweer, H., Desoye, G., Heinemann, A. and Frank, S. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelial prostacyclin production. *J Lipid Res* 51 (2010), pp. 2957-66.

Rodier, F. and Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192 (2011), pp. 547-56.

Ryu, S.B., Karlsson, B.H., Ozgen, M. and Palta, J.P. Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), pp. 12717-21.

Son, N., Hur, H.J., Sung, M.J., Kim, M.S., Hwang, J.T., Park, J.H., Yang, H.J., Kwon, D.Y., Yoon, S.H., Chung, H.Y. and Kim, H.J. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic analysis of livers from aged rats. *J Proteome Res* 11 (2012), pp. 2551-8.

Song, S.U., Kim, C.S., Yoon, S.P., Kim, S.K., Lee, M.H., Kang, J.S., Choi, G.S., Moon, S.H., Choi, M.S., Cho, Y.K. and Son, B.K. Variations of clonal marrow stem cell lines established from human bone marrow in surface epitopes, differentiation potential, gene expression, and cytokine secretion. *Stem Cells*

Dev 17 (2008), pp. 451-61.

ter Kuile, B.H. and Westerhoff, H.V. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett* 500 (2001), pp. 169-71.

Tselepis, A.D. and John Chapman, M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 3 (2002), pp. 57-68.

van Meer, G. and de Kroon, A.I. Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci* 124 (2011), pp. 5-8.

Wagner, S. and Richling, E. LC-ESI-MS Determination of Phospholipids and Lysophospholipids. *Chromatographia* 72 (2010), pp. 659-664.

Wallner, S. and Schmitz, G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids* 164 (2011), pp. 573-89.

Yanes, O., Clark, J., Wong, D.M., Patti, G.J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H.P., Trauger, S.A., Desponts, C., Ding, S. and Siuzdak, G. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol* 6 (2010), pp. 411-7.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been used in a wide range of research and clinical studies because MSCs do not have any ethical issues and have the advantage of low carcinogenicity due to their limited proliferation. However, because only a small number of MSCs can be obtained from the bone marrow, *ex vivo* amplification is inevitably required. For that reason, this study was conducted to acquire the metabolic information to examine and control the changes in the activities and differentiation potency of MSCs during the *ex vivo* culture process. Endogenous metabolites of human bone marrow-derived clonal MSCs (hcMSCs) during cellular senescence were profiled by ultra-performance liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/QTOFMS). To select significant metabolites, we used the linear mixed effects model having fixed effects for batch and time (passage) and random effects for metabolites, determining the mean using a t-test and the standard deviation using an F-test. We used structural analysis with

representative standards and spectrum patterns with different collision energies to distinctly identify eight metabolites with altered expression during senescence as types of lysophosphatidylcholine (LPC) and lysophosphatidylethanolamine (LPE), such as LPC 16:0 and LPE 22:4. The present study revealed changes in endogenous metabolites and mechanisms due to senescence.

Keywords:

human clonal mesenchymal stem cells

cellular senescence

lysophosphatidylcholine

lysophosphatidylethanolamine

Student Number: 2009-21705