



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](#)

약학박사학위논문

천식환자의 기관지 폐포세척액  
내에서의 지질체 변화 규명을 위한  
지질체학 연구

Lipidomics study for identification of lipidome  
changes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)  
of asthmatics

2015 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

강 윤 표

약학박사학위논문

천식환자의 기관지 폐포세척액 내에서의 지질체  
변화 규명을 위한 지질체학 연구

Lipidomics study for identification of lipidome  
changes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of  
asthmatics

지도교수 권 성 원

이 논문을 약학박사학위논문으로 제출함

2015 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

강 윤 표

강윤표의 약학박사학위논문을 인준함

2015 년 8 월

위 원 장 박 정 일 (인)

부위원장 박 성 우 (인)

위 원 홍 순 선 (인)

위 원 김 유 선 (인)

위 원 권 성 원 (인)

## 국문초록

지질체학 (lipidomics)은 광범위한 구조적 다양성을 지니는 생체 내 지질들을 정성 및 정량적으로 분석하여 이들이 생체에서 맡고 있는 역할들에 대한 폭넓은 이해를 목적으로 하는 학문이다. 과거에는 다양한 구조의 지질들로 이루어진 지질체의 상세한 분석이 어려웠지만 최근 분석기기의 급격한 발전에 힘입어 복잡한 지질체의 빠르고 정확한 분석이 가능해짐에 따라 지질체학을 응용한 연구가 급증해왔고, 이를 통해 지금까지 밝혀지지 않았던 당뇨, 비만, 고혈압, 각종 암과 같은 굉장히 다양한 질환들의 병태생리와 지질변화 간의 구체적 연관성이 새롭게 규명되어왔다. 하지만 아직까지도 호흡기 계통 질환의 발병장소인 기관지계 지질체의 직접적 분석법은 확립되어있지 않다. 따라서 본 학위논문은 기관지계 지질 형질과 호흡기계 질환간의 연관성을 탐구하기 위한 지질체학 분석법 개발의 일환으로 표준품 기반 라이브러리, 고성능 지질 구조 규명 소프트웨어, 고성능 액체크로마토그래피-이온분무 사중극자 비행시간 질량분석기 (HPLC-ESI-QTOF-MS)를 종합적으로 사용하여 기관지 폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 지질 프로파일링법을 개발하였다. 이 분석법은 스테로이드 치료 전 천식환자들, 흡입형 코르티코스테로이드 치료를 받은 천식환자들, 건강한 개체들로 구성된 천식 실험 모델의 BALF 지질분석에 적용되었고 그 결과

리소포스파티딜콜린 (lysophosphatidylcholine, LPC), 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine, PC), 포스파티딜글리세롤 (phosphatidylglycerol, PG), 포스파티딜세린 (phosphatidylserine, PS), 스피고미엘린 (sphingomyelin, SM), 트리글리세리드 (triglyceride, TG)의 6 가지 지질 클래스에 각각 속하는 69 종의 지질들을 규명 하였다. 실험결과, 각 클래스 별 다양한 지질들이 천식 군에서 비정상적으로 증가되어 있는 반면 흡입형 코르티코스테로이드 치료를 받은 천식환자군의 지질은 정상과 유사하였다. 게다가 천식 환자에 특이적으로 증가되어 있는 BALF 지질들은 천식군을 구분하기 위한 지표 물질로 개발될 가능성이 있었으며 이들 중 일부가 천식의 병태생리에 중요한 역할을 한다고 알려진 호산구와 유의적 상관관계에 있었다. 종합해 볼 때 기관지 지질들의 변화는 천식의 병리와 연관되어 있으며 본 연구를 통해 개발된 BALF 지질체 분석법은 다양한 호흡기계 질환에서 기관지 지질들의 변화를 연구하기 위해 유용하게 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

주요어: 리소포스파티딜콜린 (lysophosphatidylcholine), 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine), 포스파티딜글리세롤 (phosphatidylglycerol), 포스파티딜세린 (phosphatidylserine),

스핑고미엘린 (sphingomyelin), 트리글리세리드 (triglyceride), 기관지  
폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid), 천식 (asthma)

학 번: 2009-21651

# 목 차

국문초록	i
목차	iv
List of Figures	vii
List of Tables	ix
List of Abbreviations	x
1. 서론	1
1. 1. 지질과 지질체학 (Lipid and Lipidomics)	1
1. 2. 천식모델에서 수행된 lipid 관련 연구들	2
1. 3. 천식연구에서 BALF lipid profiling 의 의의	3
2. 재료 및 방법	5
2. 1. 천식모델 설정	5
2. 2. BALF 수집	6
2. 3. 시약	7
2. 4. 시료 조제	7
2. 5. HPLC-ESI-QTOF-MS 조건	8
2. 6. LC-MS 데이터 처리	10
2. 7. 통계분석	11
2. 7. 1. Univariate 와 multivariate 분석	11

2. 7. 2. ROC 곡선 시험	12
2. 7. 3. Spearman' s rank correlation test	13
2. 8. Lipid 구조 규명	13
2. 9. Lipid 구조 표기	14
3. 결과 및 고찰	16
3. 1. Lipid 구조 규명	16
3. 1. 1. Internal spectral library	16
3. 1. 2. Online database 기반 high throughput 지질 구조 규명	33
3. 2. Individual quantity scale 을 이용한 천식 모델 실험 군 간 lipid species 의 차이 발굴	34
3. 3. 천식환자의 비정상적 BALF lipid profile 과 이에 대한 inhaled corticosteroid 치료의 회복 효과	38
3. 4. 천식환자의 비정상적 BALF lipid profile 의 biomarker 개발 가능성 확인	41
3. 4. 1. PLS-DA	41
3. 4. 2. ROC 곡선 시험	42
3. 5. BALF inflammatory cell 과 BALF lipid biomarker candidate 간의 상관관계	48
4. 결론	53

참고문헌.....	54
Abstract.....	63

## List of Figures

- Figure 1. Lipid identification procedure
- Figure 2. Internal spectral library spectra of LPC (17:0)
- Figure 3. Internal spectral library spectra of PC (17:0/17:0)
- Figure 4. Internal spectral library spectra of PG (17:0/17:0)
- Figure 5. Internal spectral library spectra of PS (17:0/17:0)
- Figure 6. Internal spectral library spectra of SM (d18:1/24:1)
- Figure 7. Internal spectral library spectra of TG (17:0/17:0/17:0)
- Figure 8. MS/MS spectrum of LPC (18:2) in BALF
- Figure 9. MS/MS spectrum of PC (16:0/16:0) in BALF
- Figure 10. MS/MS spectrum of PG (16:0–18:2) in BALF
- Figure 11. MS/MS spectrum of PS (18:0–18:1) in BALF
- Figure 12. MS/MS spectrum of SM (d18:1/24:1) in BALF
- Figure 13. MS/MS spectrum of TG (48:0) in BALF
- Figure 14. Lipid species compositions belonged to corresponding lipid classes of PC, PG in BALF from normal control

Figure 15. Pattern of significantly different lipids among the NSBA, SBA and NC groups

Figure 16. Score plot of PLS-DA for comparison of the NSBA and NC groups

Figure 17. Receiver operating characteristic (ROC) curve and BALF lipid biomarker candidates for the discrimination of the NSBA and NC groups

Figure 18. Spearman ' s correlation test between lipid biomarker candidates and inflammatory cells

## List of Tables

Table 1. A List of the authentic lipid standards and related adduct ion forms.

Table 2. The number of significant difference among the NC, NSBA and SBA groups

Table 3. PLS-DA results of the cross validation and permutation tests among the NSBA, SBA and NC groups

Table 4. VIP scores of lipid species from PLS-DA results for the discrimination of NSBA and NC

## List of Abbreviations

### A

AA	arachidonic acid
APCI-MS	atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry
AUROC	area under the receiver operating characteristic curve

### B

BAL	bronchoalveolar lavage
BALF	bronchoalveolar lavage fluid

### C

CI	confidence interval
COPD	chronic obstructive pulmonary disease

### E

EI-MS	electron impact mass spectrometry
ESI-HRMS	electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry

### F

FDR	false discovery rate
-----	----------------------

### G

GINA	global initiative for asthma
------	------------------------------

### H

HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-ESI-	high performance liquid chromatography-electrospray ionization-
QTOF-MS	quadrupole time-of-flight mass spectrometry
HTP	high throughput lipid search

<b>I</b>	
IS	internal standard
<b>L</b>	
LPC	lysophosphatidylcholine
<b>M</b>	
MALDI-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
MCCV	Monte Carlo cross validation
<b>P</b>	
PC	phosphatidylcholine
PG	phosphatidylglycerol
PLA2	phospholipase A2
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis
post-BD FEV1	post-bronchodilator forced expiratory volume in one second
<b>R</b>	
ROC	receiver operating characteristic
RT	retention time
<b>S</b>	
S1P	sphingosine-1-phosphate
SM	sphingomyelin
SMase	sphingomyelinase
<b>T</b>	
TG	triglyceride
<b>V</b>	
VIP	variable importance in the projection

# 1. 서 론

## 1. 1. 지질과 지질체학 (Lipid and Lipidomics)

지질 (lipid)은 생체 내에서 이중막 (bilayer)의 형태로 세포막 (cell membrane)을 구성하고 에너지 저장소 역할을 함과 동시에 생체 신호 전달 물질 (signaling molecule)로 작용한다 (1, 2). 생체 내 lipid의 집합체인 지질체 (lipidome)는 크게 리소인지질 (lysophospholipid)들, 글리세로인지질 (glycerophospholipid)들, 스펅고지질 (sphingolipid)들, 중성 지질 (neutral lipid)들처럼 특정한 backbone 구조에 의하여 수십 여 지질 클래스 (lipid class)로 분류되며, 각각의 class 별로 지방산 잔기 (fatty acid moiety, FA)들의 조합을 따라 수백 여 지질종 (lipid species)들이 존재할 가능성이 있다 (1, 3). 이렇게 굉장히 다양한 lipid species가 존재한다고 여겨짐에도 불구하고 아직까지 lipid의 다양성이 생체 시스템에서 하는 역할들이 상세히 알려져 있지 않으며 따라서 이를 이해하기 위한 많은 연구가 필요한 실정이다.

지질체학 (lipidomics)은 생체 내에 존재하는 다양한 지질들의 역할을 종합적으로 이해하기 위한 연구들을 총칭하며 (3) 지질체학 기술 (lipidomics technology)이라 함은 다양한 lipid species를 포괄적으로 정성 및 정량할 수 있는 기법들을 의미한다. 현존하는 lipidomics technology 들은 주로 전자충격 질량분석기 (electron impact mass

spectrometry, EI-MS), 화학적 이온화 대기압 질량 분석기 (atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, APCI-MS), 매트릭스지원 레이저 탈착이온화 질량 분석기 (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS), 전자 분무 이온화 질량 분석기 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)와 같은 질량 분석 기술들을 기반으로 발전되었다 (3, 4). 특히 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)와 결합된 전자 분무 고 분해능 질량분석기 (electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry, ESI-HRMS) (HPLC-ESI-HRMS)는 한 번의 분석을 통해 시료에 포함된 다양한 lipid species 의 정량 및 정성적 데이터를 효과적으로 획득해왔다 (5-8).

## 1. 2. 천식모델에서 수행된 lipid 관련 연구들

천식은 매우 흔한 만성 호흡기 질환이며 기관지 염증반응, 과민반응, 기관지 붓기 및 리모델링과 같은 특징이 있다 (9, 10). 최근까지 진행된 연구들을 통해 주로 phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), 아라키돈산 (arachidonic acid, AA)과 같은 제한적인 특정 지질들 만이 폐포상피세포 (alveolar epithelial cell), 혈청 (serum), 담 (sputum), 그리고 기관지 폐포세척액

(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)과 같은 생체 시료들에서 분석되어 이들이 천식에 미치는 영향들이 밝혀졌다. LPC 와 AA 는 포스포리파아제 A2 (phospholipase A2, PLA2)에 의한 PC 의 가수분해로 생성된다 (11). LPC 는 천식환자의 폐 계면활성제 (pulmonary surfactant)형질, 폐 저항성, 폐 모세혈관 투과도를 변환시키는 역할을 한다고 밝혀졌으며 (12-14), AA 는 염증유발세포 (pro-inflammatory cells)로부터 대사되어 강한 혈관반응 및 기관지 반응을 일으키는 eicosanoid 류의 지질들을 생산함으로 천식의 진행에 관여한다고 보고되었다 (11, 14). 하지만 아직까지 천식 환자의 기관지 내 lipidome 이 정상인과 어떠한 차이를 보이는지, 그리고 lipidome 의 변화가 천식의 병태생리 (pathophysiology)에 어떠한 영향을 미치는 지에 대하여 명확히 밝혀진 바가 없다.

### 1. 3. 천식연구에서 BALF lipid profiling 의 의의

기관지 폐포세척 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 통한 BALF 의 수집은 하기도 액 (fluid lining the lower respiratory tract)시료를 수집하기 위한 가장 신뢰도 높은 방법이며 따라서 BALF 는 천식의 생리학적 특성을 규명하기에 매우 적합한 시료이다 (15, 16). 기관지 폐포세포 (bronchoalveolar cell)는 천식의 발병과 직접적으로 연관되어 있고, lipid 는 type II 폐포세포 (alveolar type II cell)로부터 생성되는

계면활성물질 (pulmonary surfactant)의 구성 요소이다 (15, 17). Pulmonary surfactant 는 소기관지 (small airway)의 개방성 (patency)을 가능하게 하기 때문에 (17) BALF 의 lipid profiling 을 통해 기관지 lipidome 의 변화를 규명하는 것은 천식의 병태생리를 이해하는 데 중요한 역할을 할 것이라 예상되지만 아직까지 천식 환자의 BALF 에 존재하는 pulmonary surfactant 의 다양한 lipid species 를 효과적으로 profiling 할 수 있는 lipidomics technology 가 개발된 적이 없다. 따라서 본 연구를 통해 HPLC-ESI-HRMS 의 일종인 HPLC 와 이온분무-사중극자-비행시간 질량분석기 (electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry) (HPLC-ESI-QTOF-MS)를 기반으로 하는 효과적인 BALF lipid profiling 법을 개발하고자 하였으며 또한 확립된 분석법을 통해 천식환자 38 명과 정상군 13 명으로부터 획득한 총 51 명 분의 BALF lipid profiling 을 분석하여 천식환자와 정상군 간의 호흡기 lipidome 의 차이와 천식환자들 간 흡입형 코르티코스테로이드 (inhaled corticosteroid) 치료 유무에 따른 호흡기 lipidome 의 차이를 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2. 1. 천식모델 설정

천식모델의 설정, 천식환자의 진단 및 실험군 모집, 각각의 개체 특성 확립, BALF 의 수집은 모두 순천향대학교 부천병원에서 (Soonchunhyang University Bucheon Hospital, Republic of Korea) 수행되었다. 이 연구에 포함된 실험군은 38 명의 천식환자와 13 명의 건강한 사람들로 구성 되었다. 본 연구에서는 Global Initiative for Asthma (GINA) 가이드라인 (18) 을 기반으로 가볍거나 보통의 상태 (mild to moderate)에 해당하는 천식환자들을 구성하였다. Mild to moderate 천식은 1 초 동안 내쉴 수 있는 최대의 공기량 (post-bronchodilator forced expiratory volume in one second, post-BD FEV1)이 예측값에 비하여 75% 이하이며 밤 동안 천식 징후가 2 회 이상 발생하여 활동에 제한이 있는 경우로 설정 되었다 (18). 또한 천식환자들은 두 그룹으로 구성되었다. 첫 번째 그룹은 inhaled 혹은 systemic corticosteroid 를 치료 채취 전 4 주 동안 받지 않은 개체들로 구성되었으며 (NSBA, 18 명) 두 번째 그룹은 inhaled corticosteroid 를 지속적으로 3 달 이상 사용한 개체들로 구성되었다 (SBA, 20 명).

모든 천식 환자들은 안정된 상태로 유지되었으며 통제집단 (control group)은 천식 그룹들과 유사한 나이대의 지원자들로 구성 되었다 (NC, 13 명). 각 개체들은 모두 규격화된 전혈구 (complete blood count)검사, 총 IgE (total IgE)검사, 흉부 방사선 검사 (chest posteroanterior radiograph), 알러지 진단 검사 (allergy skin-prick test), 폐활량 검사 (spirometry)들을 받았다 (19). 또한 4 주에 걸친 검사기간 동안 호흡기계 감염이 있었던 경우, 1 년에 10 갑 이상의 흡연력이 있었던 경우, 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)이 있었던 경우, screen 동안 post-BD FEV1 가 예측값에 비하여 75% 이하로 떨어진 경우는 실험군에서 배제 되었다. 이 연구는 병원윤리위원회 (hospital ethics committee)의 승인을 받았으며 모든 환자들로부터 서면 동의서를 제공 받았다 (SCHBC\_biobank\_2012-003).

## 2. 2. BALF 수집

각 개체들의 BAL (Bronchoalveolar lavage)는 굴곡형기관지경 (fiberoptic bronchoscopy) (Olympus B2-10; Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 순천향대학교 부천병원에서 수행되었다. 보다 상세한 BAL 과정은 이전 연구에 잘 설명되어 있다 (20). 채취한

BALF 는 무세포 상태로 소분되어  $-80^{\circ}\text{C}$  에 저장되었다. 모든 개체들의 BAL 과정에서 합병증은 발견되지 않았다.

### 2. 3. 시약

지질 표준품들은 모두 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다. HPLC 등급의 아세토니트릴 (acetonitrile), 이소프로필알코올 (2-propanol), 클로로폼 (chloroform), 메탄올 (methanol), 물 (water)은 모두 JT Baker (Philipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. LC-MS 등급의 포름산 (formic acid), 아세트산암모늄 (ammonium acetate)은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 4. 시료 조제

BALF 에 존재하지 않는 C17:0 지방산 잔기 (fatty acid moiety, FA)로 구성된 지질들을 이용하여 (21) 내부 표준물질 (internal standard, IS)용 혼합물을 준비하였다. chloroform/methanol (2:1, v/v)혼합액에 LPC (17:0/0:0), PC (17:0/17:0), PS (17:0/17:0), PG (17:0/17:0)를  $20\ \mu\text{g/mL}$  의 농도로, TG (17:0/17:0/17:0) 를  $10\ \mu\text{g/mL}$  농도로 녹였다. 준비한 IS 혼합액  $20\ \mu\text{L}$  를  $400\ \mu\text{L}$  의

BALF 에 넣고 vortexing 한 후 600  $\mu$ L 의 chloroform/methanol (2:1, v/v) 혼합액을 추가로 넣고 다시 vortexing 하여 이를 상온에서 20 분 동안 방치한 뒤 16,000 g 에서 10 분동안 원심분리 하였다. 원심분리를 통해 나뉜 두 층 중 하층액을 HPLC 용 바이알에 옮긴 후 HPLC-ESI-QTOFMS 를 이용하여 분석하였다.

## 2. 5. HPLC-ESI-QTOF-MS 조건

시료 조제 과정을 통해 준비된 모든 지질 추출물 시료들을 무작위 순으로 1260 HPLC system (Agilent, CA, USA)에 주입하였다. HPLC 분석 조건은 다양한 lipid species 의 효과적 분리능이 확립된 이전 연구를 참조하여 (22) 다음과 같이 설정하였다. 고정상으로는 역상컬럼 (Brownlee SPP C18, 2.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  75 mm PerkinElmer, Branchburg, NJ, USA)을 사용하였으며 컬럼 오븐의 온도는 50° C 로 설정하였다. 시료 분리 시 용매 기울기 조건 (solvent gradient condition)을 적용하기 위하여 2 가지 종류의 용매 (A, B)를 사용 하였다. 용매 A 는 1% 1 M ammonium acetate 와 0.1% formic acid 의 water, 용매 B 는 1% 1 M ammonium acetate 와 0.1% formic acid 의 acetonitrile 과 2-propanol (1:1, v/v)혼합물로 구성하였고 이들을 이용한 gradient condition 을 다음과 같이 설정 하였다. 0.4 mL/min 의 유속으로 65%의 용매 A 비율을 8 분 동안 20%로

감소시켰고, 이를 다시 14 분 동안 0%로 감소시킨 후 14 분 동안 유지시켰다.

HPLC 를 통해 분리된 lipid species 는 Agilent Jet Stream Technology 의 ESI 소스가 장착된 Agilent 6530 QTOF-MS (Agilent, CA, USA)를 이용하여 검출 되었다. QTOF-MS 는 ESI-positive 모드에서 작동되었으며 액체질소로부터 기화된 질소 가스가 이온화를 위해 사용되었다. 이온 소스 파라미터는 다음과 같았다. 가스 온도는 350° C, 피복(sheath) 가스 온도는 400° C, 가스 유속은 11 L/min, sheath 가스 유속은 12 L/min, 분무기 (nebulizer) 압력은 20 psi 였다. 스캔 소스 파라미터는 다음과 같았다. 모세관 전압 (capillary voltage) 은 4000 V, 분사구 전압 (nozzle voltage) 은 0 V, 단편화 전압 (fragmentor voltage)은 170 V, 스킨머 전압 (skimmer voltage) 은 60 V 였다. 분석 과정 시 동시 주입되는 표준 용액 (reference solution) 으로부터 얻어진 purine (m/z; 121.0509) 과 HP-0921 (m/z; 922.0097) 의 m/z 값들을 통해 동일한 MS 스펙트럼에 포함된 이온들의 질량 (m)과 전하 (z)의 비 (m/z)값이 실시간으로 자동 보정되었다. MS 스펙트럼의 수집 범위는 50-1500 였고 MS/MS 분석은 다섯 종류의 서로 다른 단편화 에너지 (fragmentation energy)들 에서 (10, 20, 30, 40, 50 eV) 각각 수행되었다.

## 2. 6. LC-MS 데이터 처리

HPLC-ESI-QTOF-MS 를 통해 획득한 원 자료 (raw data)를 mzData 형식으로 출력 후 이를 오픈 소스 LC-MS 데이터 처리 소프트웨어인 MZmine 2.10 (23)에 입력한 뒤 온라인 사용 지침서에 나타난 대로 (<http://mzmine.sourceforge.net>) peak detection, chromatographic deconvolution, isotopic-peak grouping, gap filtering, peak-list alignment 의 과정들을 통하여 m/z 값, 머무름 시간 (retention time, RT), 피크 면적 (peak area)로 구성된 피크 테이블을 출력하였다. 이후 지질 관련 피크의 구조 규명을 수행하였으며 이 과정은 '3.1' 부분에 상세히 기록하였다.

출력된 피크 테이블 상의 피크 면적은 BAL 회수율 (회수량/주입량)을 통하여 표준화 (normalization)하였으며 (24) 구조 분석을 통해 규명된 지질들은 해당 클래스 별 IS 피크로 normalization 하였다. IS 로 normalization 된 피크 면적값 (Individual quantity)을 통해 각 지질의 클래스 내에서의 구성비 (class composition)를 계산한 후 individual quantity 와 class composition 의 각 테이블을 CSV 형식으로 전환하여 MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>)에 업로드 한 뒤 지침서에 따라 다음과 같이 처리하였다 (25, 26). 우선 결측값이 전체 구성의 20% 이상인 변수들을 제거한 후 그 외의 결측값들은 데이터세트 내에서 최소값의 절반에 해당되는 값으로 대체하였다.

이후 각 변수들을 로그 변환 후, 평균중심화 (mean-centering)한 뒤 표준편차 (standard deviation)값으로 나누었고 이 값을 이용하여 통계분석을 수행하였다.

## 2. 7. 통계분석

### 2. 7. 1. Univariate 와 multivariate 분석

MetaboAnalyst 를 사용하여 모든 단변량 (univariate) 및 다변량 (multivariate) 분석을 수행하였다 (25, 26). 세 실험군 (SBA, NSBA, NC) 간 lipid 의 차이는 Kruskal-Wallis test 를 통하여, 그리고 두 실험군 간 차이가 lipid 의 차이는 Wilcoxon rank sum test 를 통해 규명하였다. 분석 결과 p value 값이 0.05 미만 이면서 false discovery rate(FDR) 값이 0.1 미만인 변수들은 유의성이 있다고 판단하였다.

또한 실험군 들을 효과적으로 구분하는 데 최적화된 지질 종들을 찾기 위하여 부분 최소 자승 판별 분석 (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA)을 수행하였다 (25, 26). PLS-DA 과정 중 모델의 교차검증 (cross validation) 과정을 거쳐 판별 모델을 확립 하였으며 확립된 모델의 질 (quality)을 cross validation 결과로 얻어진  $Q^2$  값과  $R^2$  값을 통하여 검증하였고 이때  $Q^2$  값을 기준으로 그룹 간 구분을 위하여 사용되는 요소의 최적화된 개수를 결정하였다. 또한 확립된

모델의 과대적합 (over-fitting) 경향성을 그룹 간 예측 정확도 (predictive accuracy)와 분리 거리 (separation distance, B/W) 값을 이용한 순열검정법 (permutation test)을 통해 검증하였다. Permutation test 결과 p value 값이 0.05 미만인 모델의 경우 over-fitting 경향성이 없으며 최적화 된 모델이라 간주하였다. 한편 PLS-DA 모델을 확립하는 과정에서 계산된 각 변수들의 영사 내 변수 중요도 (variable importance in the projection, VIP)점수 (score)를 출력하였다. VIP score 가 높은 변수는 그룹 간의 신뢰도 높은 분리능력이 있음을 의미한다. 본 연구에서는 이전에 수행된 유사 연구들을 참조하여 VIP 점수가 1 이상인 변수를 중요하다고 판단하였다 (27, 28).

## 2. 7. 2. ROC 곡선 시험

단변량 통계분석 결과에서 유의성이 있으면서 다변량 통계분석 결과에서 또한 중요하다고 판단된 변수들 ( $p$ -value < 0.05, FDR < 0.1, VIP >1)을 대상으로 실험 군 간 구분 능력을 측정 하기 위하여 랜덤 포레스트 (Random Forest)알고리즘을 기반으로 하는 온라인 수신기 조작기 특성 (receiver operator characteristic, ROC)곡선 시험기 (<http://www.rocet.ca/ROCCET>) 를 통해 ROC 곡선의 면적 (area under the ROC curve, AUROC)을 계산하였다. AUROC 와 이 값의 신뢰구간 (confidence interval, CI)은 몬테카를로 교차분석 (Monte

Carlo cross validation, MCCV)의 100 회 반복을 통하여 계산 되었다. 0.9 에서 1.0 사이의 AUROC 값은 그룹 간에 뛰어난 (excellent) 구분 능력을 지닌다고 해석 되었다 (29). 한편 확립된 ROC 곡선의 over-fitting 경향성을 검증하기 위하여 1000 회 반복에 걸친 permutation test 를 수행 하였다. Permutation test 결과 p-value 값이 0.05 미만인 경우 ROC 곡선의 over-fitting 경향성이 없으며 이 곡선은 최적화 되었다고 판단하였다 (29).

### 2. 7. 3. Spearman' s rank correlation test

BALF 내 염증 세포들과 바이오 마커 후보들 간의 상관 관계 (correlation)를 밝히기 위하여 SPSS (version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 스피어맨 순위 상관 분석 (Spearman' s rank correlation test)을 수행하였다. p-value 값이 0.05 미만인 경우 유의성 있는 상관 관계를 보인다고 판단하였다.

### 2. 8. Lipid 구조 규명

BALF 시료의 HPLC-ESI-QTOFMS 분석을 통하여 획득한 MS 스펙트럼 및 다양한 fragmentation energy 들 (10, 20, 30, 40, 50 eV)을 통해 얻은 MS/MS 스펙트럼을 internal spectral library 및

온라인 상용 소프트웨어인 SimLipid 버전 3.0 (PremierBiosoft International, Palo Alto, CA, USA)의 database 와 비교하여 BALF 내 지질의 구조 규명을 수행하였다.

## 2. 9. Lipid 구조 표기

각 lipid species 의 구조는 규명된 정도에 따라 다음과 같이 표기하였다. A) lipid species 의 특정 class 와 그에 결합된 FA 이 해당 조각 이온 (fragment ion) 들을 통하여 규명되었지만 FA 의 구조화학적 위치 (stereochemical position, sn-1, sn-2) 를 나타낼 수 없는 경우 ‘PC (16:0-16:1)’ 과 같이 ‘lipid class (FA 의 탄소 개수: 첫 번째 FA 의 이중결합 개수 - 나머지 FA 의 탄소 개수:나머지 FA 의 이중결합 개수)’ 로 표기 하였다. B) lipid species 를 구성하는 FA 의 종류가 동일하여 stereochemical position 을 표기할 수 있는 경우 ‘PC (16:1/16:1)’ 와 같이 ‘/’ 를 사용 하였다. C) lipid class 와 이를 구성하는 FA 들의 총 탄소 개수 및 이중 결합 수가 규명되었지만 각각의 FA 들을 나타내는 조각 이온 (fragment ion) 들을 MS/MS 스펙트럼 상에서 발견하지 못한 경우와 동일한 RT 에서 ‘동일한 class 에 속하며 동일한 parent ion 의 m/z 값을 지님에도 서로 다른 FA 조합으로 구성된 isobaric 관계의 lipid species’ 가 검출된 경우 PC (32:0)와 같이 ‘lipid class (FA 들의 총 탄소 개수:FA 들의 총

이중결합 개수)’ 로 표기 하였다. D) lipid class 및 FA 구성이 동일하지만 FA 의 stereochemical position (sn-1, sn-2 position)의 차이에 의하여 각기 다른 RT 에서 검출 된 isobaric 관계의 lipid species 는 혼란을 피하기 위하여 LPC (18:2a)와 LPC(18:2b)같이 RT 의 순서에 따라 영문 소문자를 추가로 표기 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3. 1. Lipid 구조 규명

본 연구는 LPC, PC, PG, PS, TG, SM 의 6 종 lipid class 를 대상으로 이에 속한 lipid species 의 profiling 법을 개발 하고자 하였다. 이를 위한 lipid 구조 규명을 Figure 1 에 표기한 과정에 따라 수행하였다.

##### 3. 1. 1. Internal spectral library

각 class 별 lipid species 인 LPC (17:0), PC (17:0/17:0), PG (17:0/17:0), PS (17:0/17:0), TG (17:0/17:0/17:0), SM (d18:1/24:1)에 해당하는 표준품 (authentic standard) 분석을 통해 미리 internal spectral library 를 확립하여 본 연구의 분석 시스템 상에서 lipid class 별 어미 이온 (parent ion)의 주 이온화 형태 (major ionization form) 및 이들의 구조 특이적 fragment ion 들을 정의하였다. MS 스펙트럼 상에서 LPC, PC, PS, SM 의 major ionization form 은  $[M+H]^+$  였고 PG 의 경우  $[M+Na]^+$  였으며 TG 의 경우  $[M+NH_4]^+$  였다. (Table 1).

또한 단계별 fragmentation energy 들 (10, 20, 30, 40, 50 eV)에서 획득한 MS/MS 스펙트럼 상에서 규명된 lipid class 별 특정한 fragment

ion 들은 다음과 같았다. 우선 LPC, PC, SM 들의 경우 이들 모두에 포함된 공통적 head group 인 phosphocholine 에 해당하는 184.07 m/z 의  $[HG+H]^+$  fragment ion 을 생성하였다 (Figure 2, 3, 6). PG 의 경우 head group 인 phosphoglycerol 에 해당하는 195.00 m/z 의  $[HG+Na]^+$  fragment ion 을 생성하였다 (Figure 4). PS 의 경우 parent ion 으로부터 head group (185 m/z)이 떨어져 나간  $[M-NL+H]^+$  fragment ion 을 생성 하였다 (Figure 5). TG 의 경우 TG 에 포함된 세 지방산 잔기 중 한 지방산 잔기가 떨어져 나간  $[M-FA]^+$  fragment ion 을 생성 하였다 (Figure 7).

Lipid class 와 관련된 구조규명이 효과적으로 진행되었음에도 불구하고 PC, PG, PS, SM 의 경우 FA 와 연관된 fragment ion 들의 이온 세기가 낮았기 때문에 검출된 모든 lipid species 의 FA 구조를 규명하기에는 한계가 있었다 (Figure 3~6). Fragment ion 의 이온 세기가 너무 낮은 경우 MS 피크의 해상도 (resolution)가 떨어지며 계산된 m/z 값의 정확도가 흔들리는 현상이 관찰 되었고 이는 정확한 구조 규명을 저해하는 요인으로 작용하였다. 따라서 lipid 를 구성하는 FA 구조를 보다 효과적으로 규명하기 위하여 단계별 fragmentation energy 들 (10, 20, 30, 40, 50 eV)을 상에서 MS/MS 스펙트럼을 획득하였다. BALF 에서 규명한 다양한 lipid species 별로 fragment ion 들의 fragment energy 별 이온 강도가 다양하였기 때문에 모든

fragmentation energy 에서 획득한 fragment ion 들 중 이온 강도가 가장 높게 나타난 fragment ion 의 m/z 값 들이 주로 구조 규명에 사용되었다 (Figure 8 ~ 13). 예를 들어 Figure 9 에서 보여진 것 과 같이 두 16:0-FA 로 구성된 PC (16:0/16:0)의 경우  $[M+H]^+$  은 10 eV 에서,  $[M-FA+H]^+$ 와  $[HG+H]^+$ 은 30 eV 에서, 그리고  $[FA]^+$  은 40 eV 에서 가장 큰 이온 강도를 나타내었고 이들에 해당되는 m/z 값을 통해 구조 규명을 수행하였다. LPC, PG, PS, SM 의 경우 Figure 8, 10~12 에서 예시된 것 과 같이 유사한 구조 규명 방식이 적용되었다. 한편 본 연구에서 수행된 HPLC-ESI-QTOFMS 시스템을 통해 분석된 BALF lipid 들 중 TG 의 경우 두 종 이상의 isobaric 관계에 있는 TG 들이 동일한 RT 에서 동시에 검출 되었다. 예를 들면 Figure 13 과 같이  $[M-14:0]^+$ ,  $[M-15:0]^+$ ,  $[M-16:0]^+$ ,  $[M-18:0]^+$  에 각각 해당되는 네 가지 종류의  $[M-FA]^+$  이온들이 동일한 RT 에서 검출되었고, 동일한 parent ion 의 정확한 m/z 값과 더불어 이들은 TG (15:0-15:0-18:0), TG (16:0-16:0-16:0), TG (14:0-16:0-18:0)의 3 가지 isobaric TG 조합으로 규명 되었다. 이러한 경우, 각 물질들의 상대적인 존재비가 불확실했기 때문에 TG (48:0)과 같이 'lipid class (FA 들의 탄소개수 총 합:FA 들의 이중결합 수 총 합)' 으로 표기 하였다. PC, PG, PS, 들과 SM 중 FA 와 연관된

fragment ion 들이 모든 fragmentation energy 에서 검출되지 않은 경우 위와 동일한 방식으로 구조를 표기 하였다.

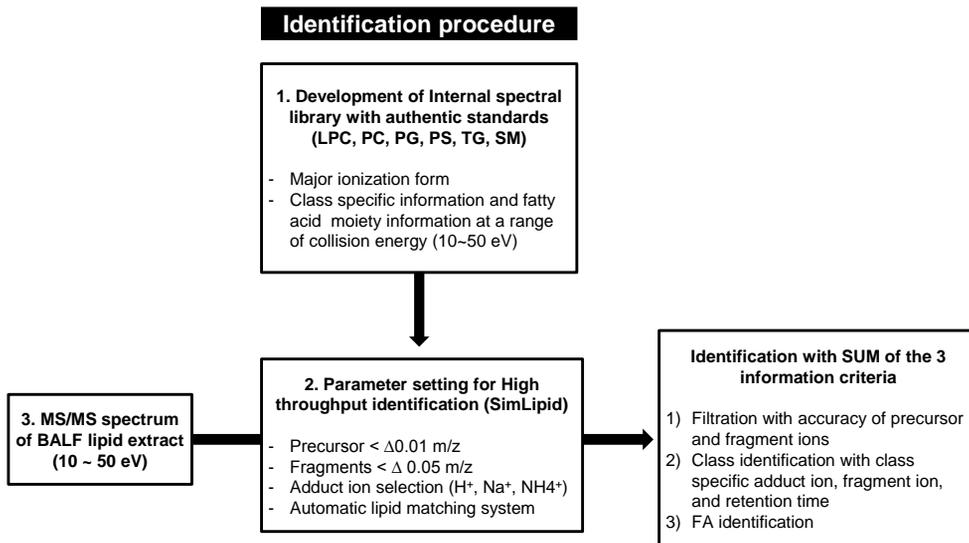


Figure 1. Lipid identification procedure

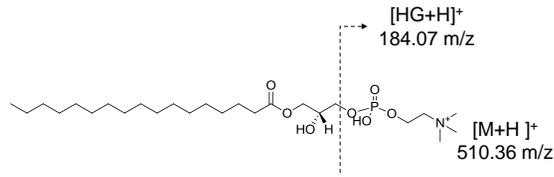
Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

Table 1. A List of the authentic lipid standards and related adduct ion forms.

Lipid standards	Adduct ions			RT(min)	Use
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		
LPC (17:0)	<b>Major</b>	Minor	N.D.	8.4	IS and Spectral library
PC (17:0/17:0)	<b>Major</b>	Minor	N.D.	17.7	IS and Spectral library
PG (17:0/17:0)	N.D.	<b>Major</b>	N.D.	16.7	IS and Spectral library
PS (17:0/17:0)	<b>Major</b>	Minor	N.D.	16.6	IS and Spectral library
TG (17:0/17:0/17:0)	N.D.	Minor	<b>Major</b>	26.7	IS and Spectral library
SM (d18:1/24:1)	<b>Major</b>	Minor	N.D.	18.4	Spectral library

The six lipid standard classes and major ionization form are shown. (IS, internal standard; RT, retention time; N.D., Not detected) Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

## Lysophosphatidylcholine (17:0)



### MS/MS spectrum

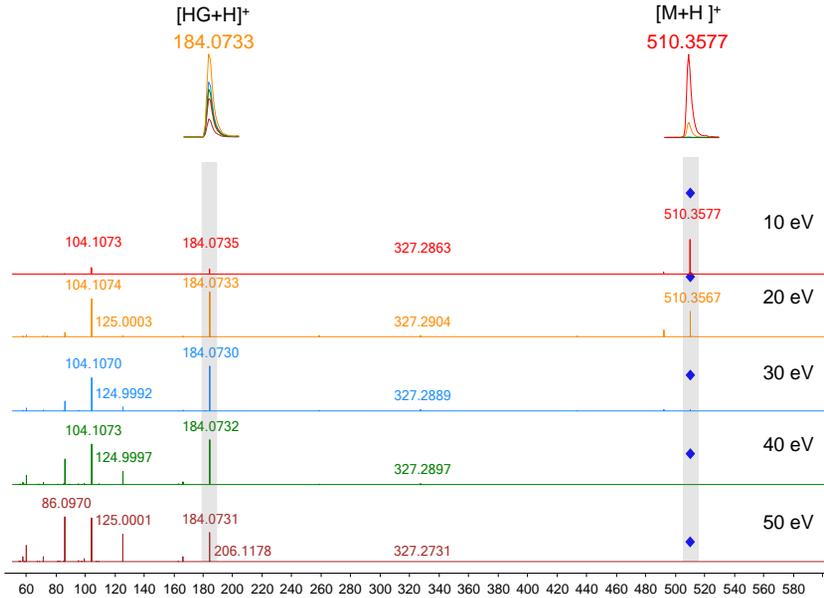
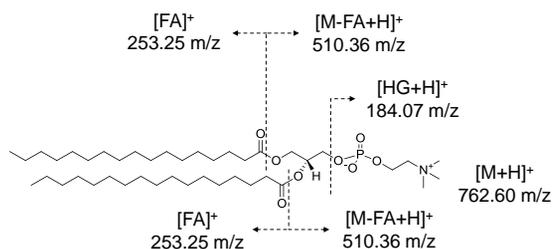


Figure 2. Internal spectral library spectra of LPC (17:0)

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

### Phosphatidylcholine (17:0/17:0)



### MS/MS spectrum

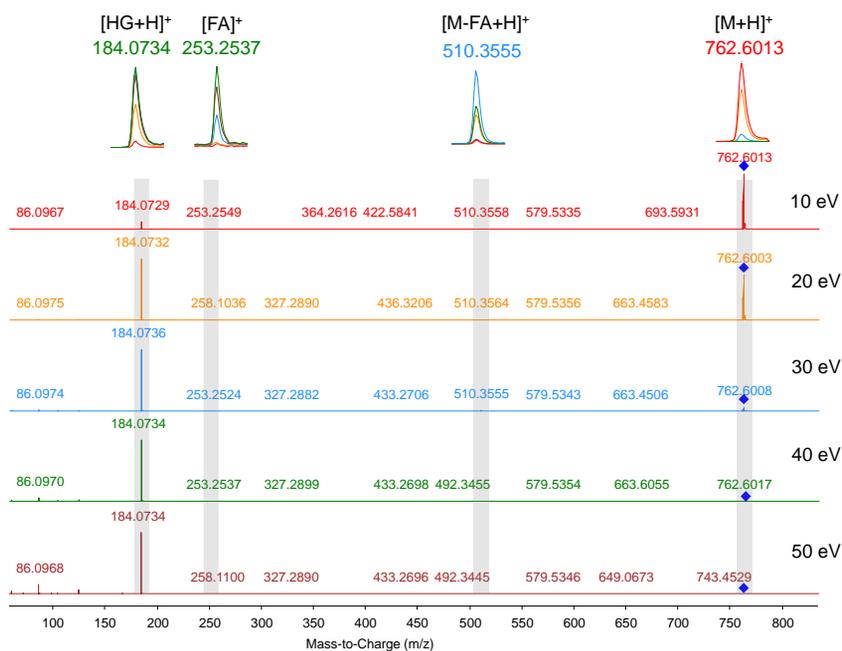
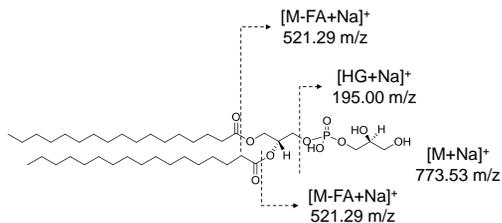


Figure 3. Internal spectral library spectra of PC (17:0/17:0)

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

### Phosphatidylglycerol (17:0/17:0)



### MS/MS spectrum

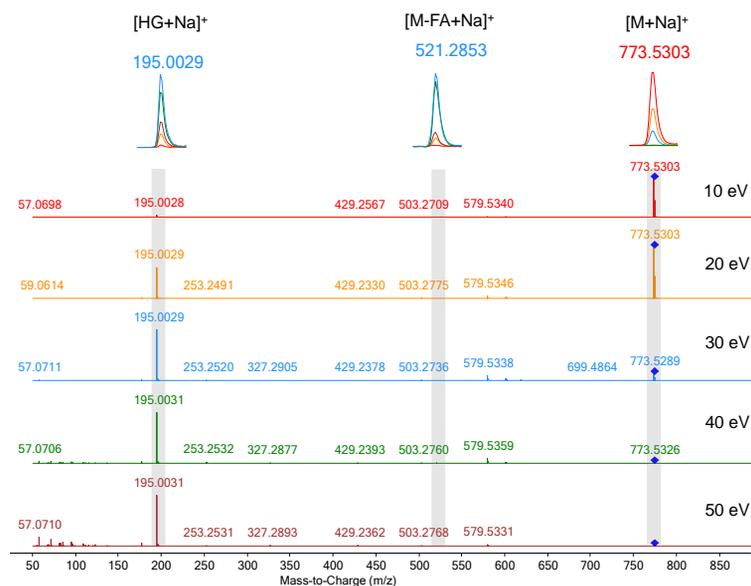
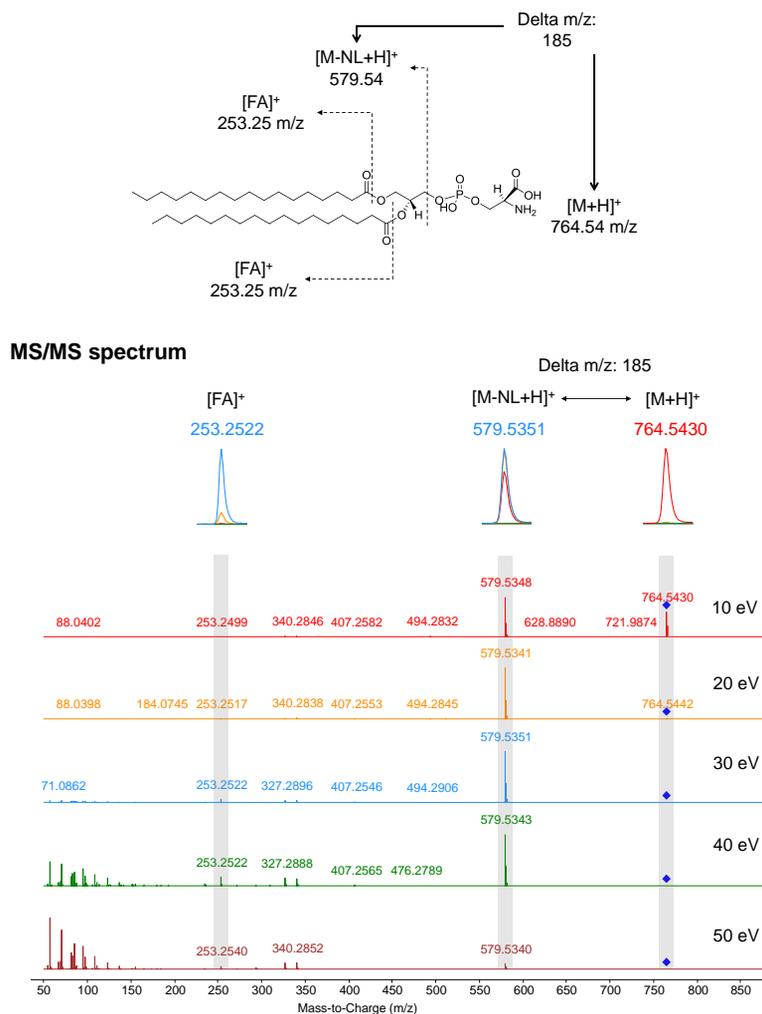


Figure 4. Internal spectral library spectra of PG (17:0/17:0)

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

### Phosphatidylserine (17:0/17:0)



**Figure 5. Internal spectral library spectra of PS (17:0/17:0)**

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

## Sphingomyelin (d18:1/24:1)

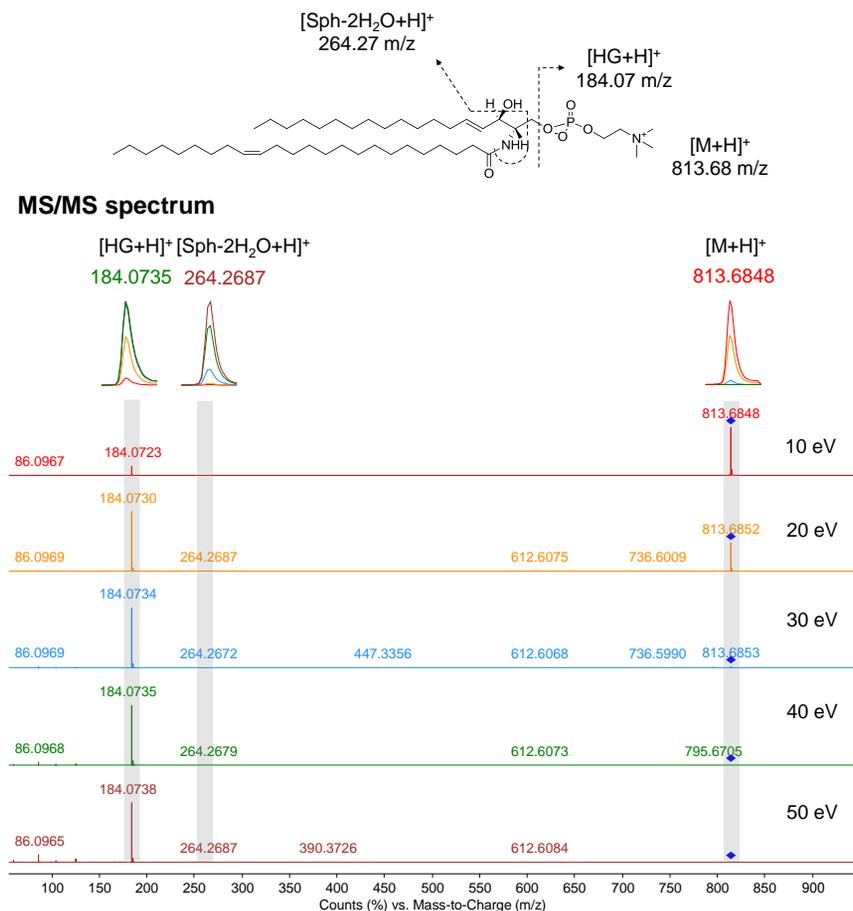


Figure 6. Internal spectral library spectra of SM (d18:1/24:1)

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

## Triglyceride (17:0/17:0/17:0)

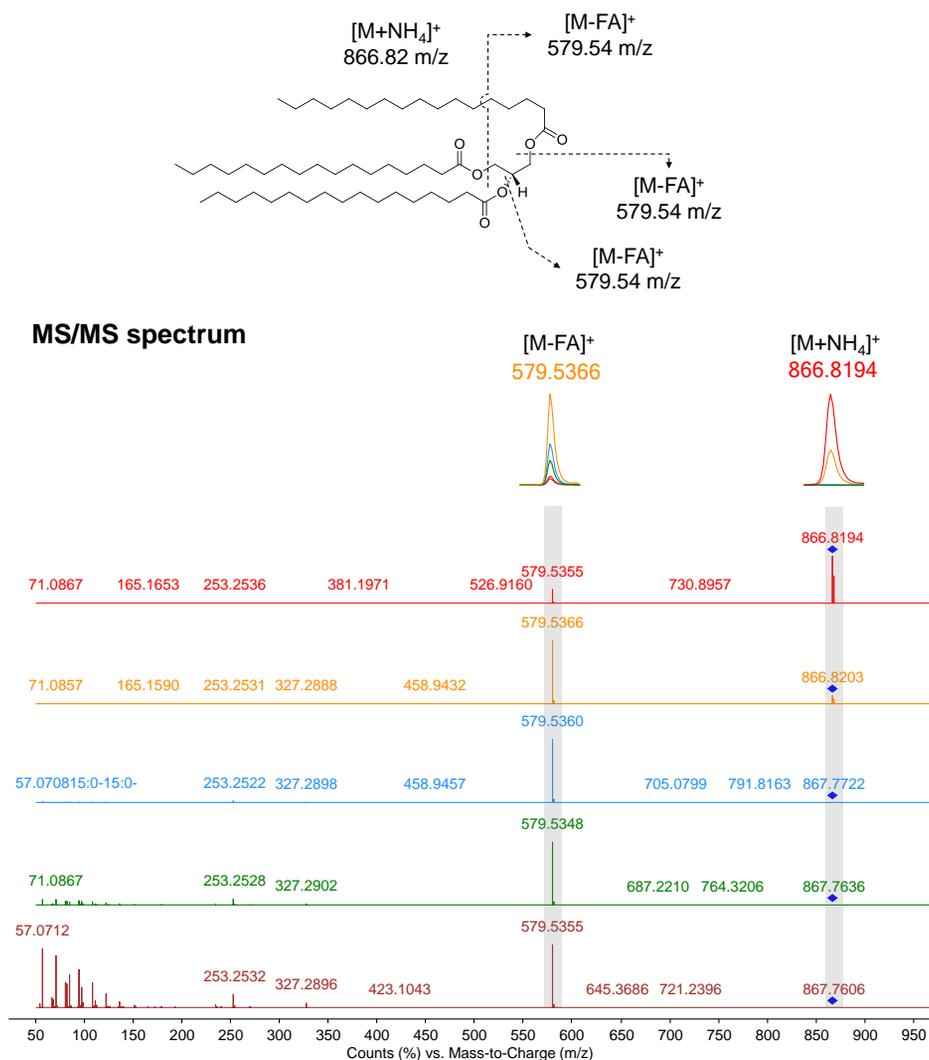
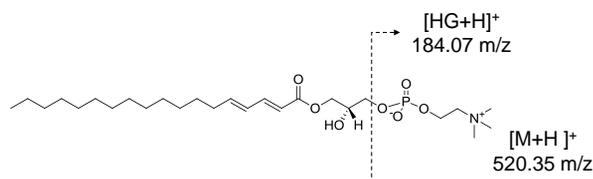


Figure 7. Internal spectral library spectra of TG (17:0/17:0/17:0)

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

## Lysophosphatidylcholine (18:2)



### MS/MS spectrum

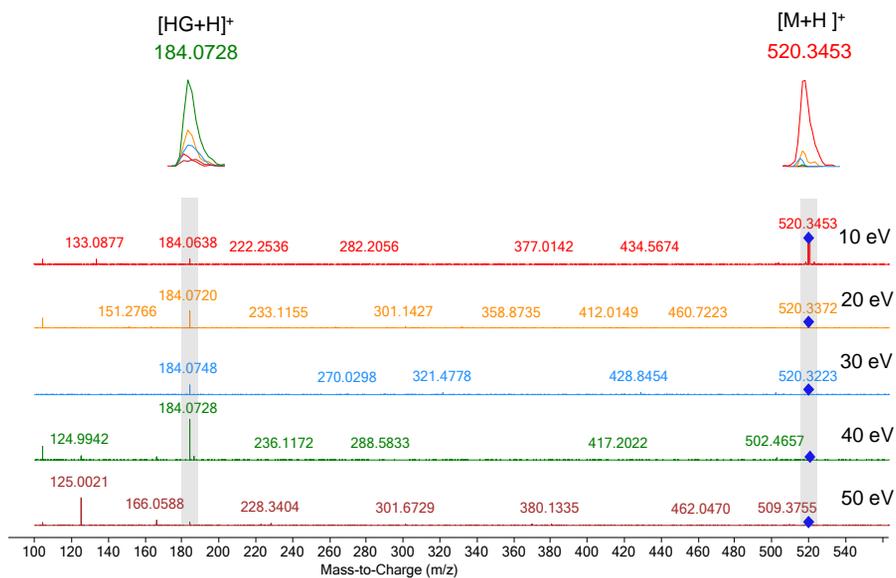


Figure 8. MS/MS spectrum of LPC (18:2) in BALF

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

## Phosphatidylcholine (16:0/16:0)

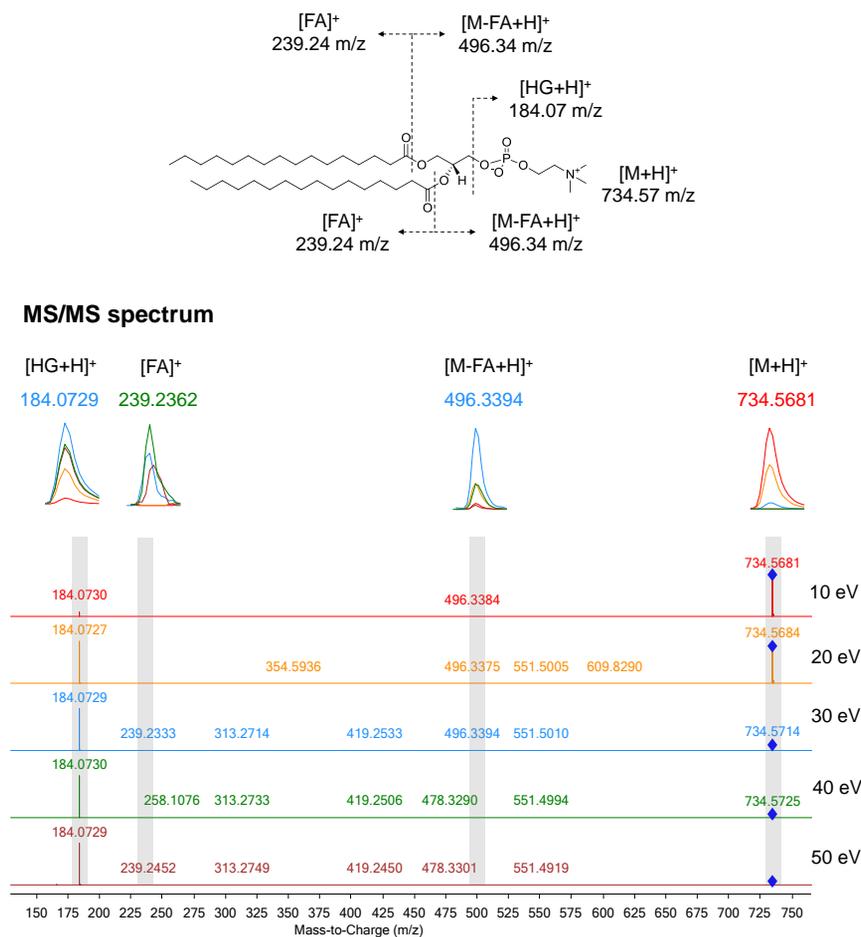
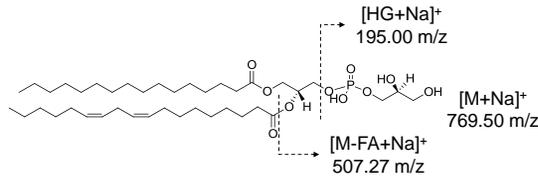


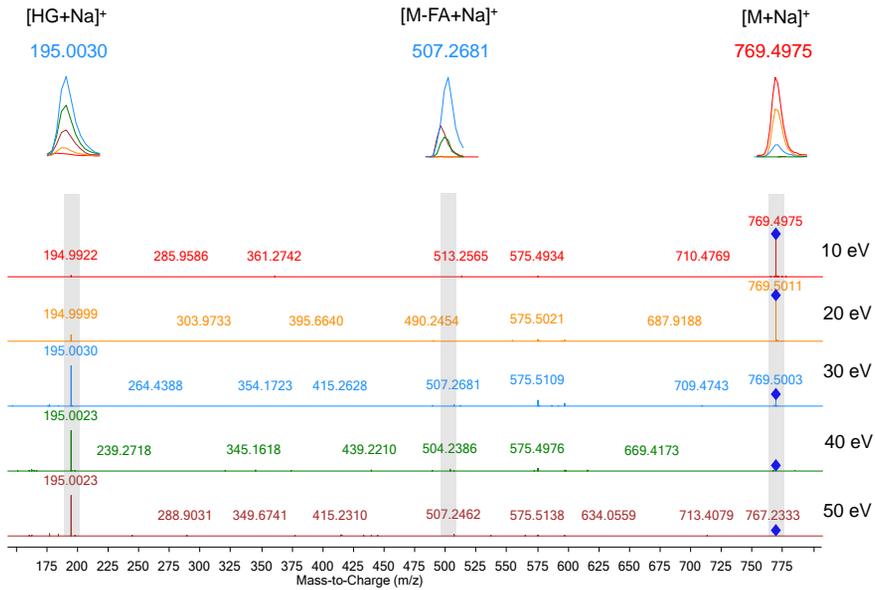
Figure 9. MS/MS spectrum of PC (16:0/16:0) in BALF

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919-3929.

**Phosphatidylglycerol (16:0-18:2)**



**MS/MS spectrum**



**Figure 10. MS/MS spectrum of PG (16:0–18:2) in BALF**

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

### Phosphatidylserine (18:0-18:1)

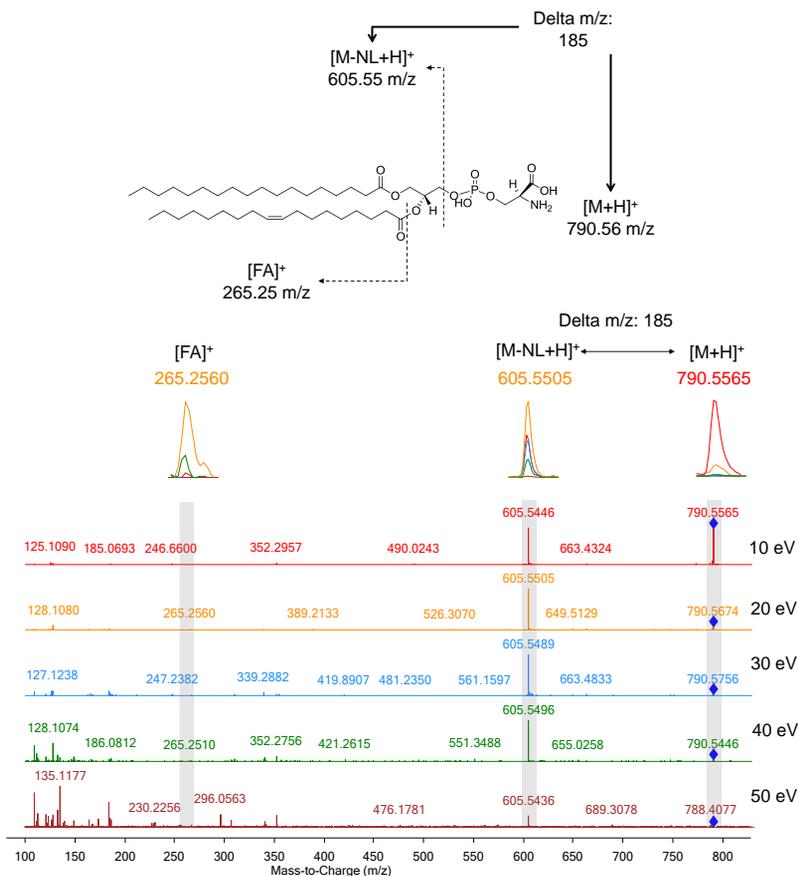


Figure 11. MS/MS spectrum of PS (18:0–18:1) in BALF

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

### Sphingomyelin (d18:1/24:1)

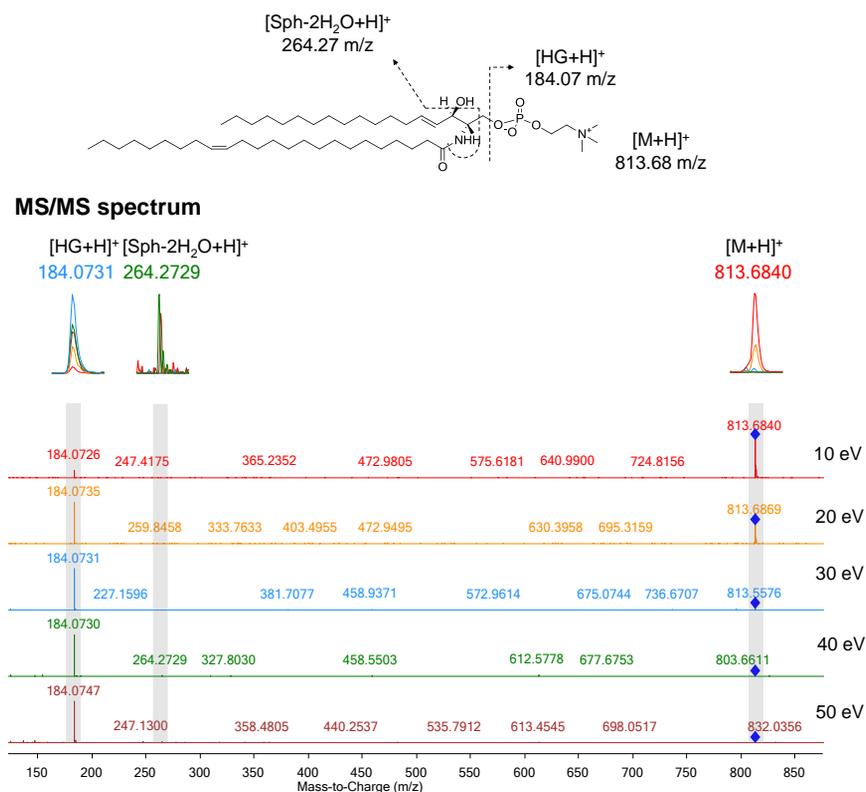
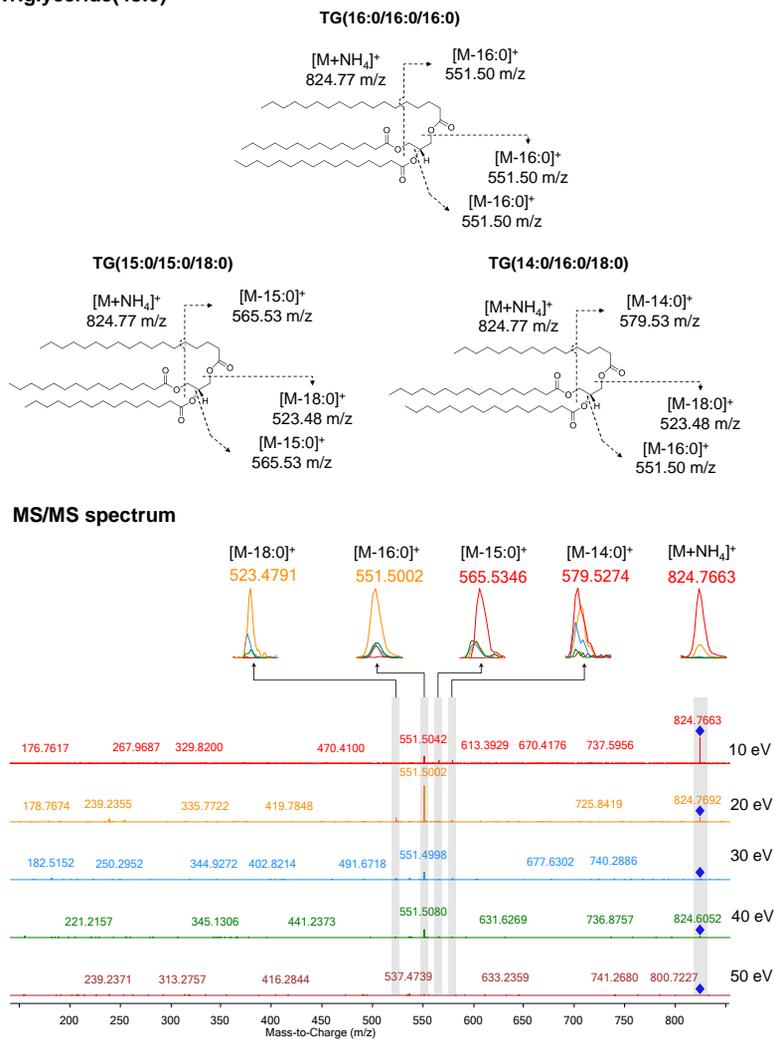


Figure 12. MS/MS spectrum of SM (d18:1/24:1) in BALF

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

**Triglyceride(48:0)**



**Figure 13. MS/MS spectrum of TG (48:0) in BALF**

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

### 3. 1. 2. Online database 기반 high throughput 지질 구조 규명

한 번의 HPLC-ESI-QTOF-MS 분석과정 시 얻어지는 MS/MS 스펙트럼은 수 천 개였다. 따라서 각각의 스펙트럼으로부터 lipid species 의 구조 규명을 수동으로 진행하기 위해서는 엄청난 시간이 소요될 것이기 때문에 본 연구에서는 상용화 된 lipid 구조규명 소프트웨어인 SimLipid 를 구조규명 과정에 적용하였다. 이 소프트웨어에 포함된 'high throughput lipid search, HTP' 기능은 온라인 데이터베이스를 기반으로 실제 MS 및 MS/MS 스펙트럼을 자동으로 비교해 주었고 또한 1000 개의 MS/MS 스펙트럼에 해당하는 lipid 의 구조 규명 결과를 수 분 안으로 출력할 수 있었다. 반면 결과를 분석하는 과정에서 종종 긍정오류 (false positive)가 발생하였기 때문에 본 연구에서는 HTP 를 수행하기 전 미리 확립해 놓은 internal spectral library 를 기반으로 적절한 HTP 파라미터들을 다음과 같이 설정하였다. 우선 구조 규명 시 parent ion 및 fragment ion 들에 해당하는 m/z 의 실측값 (experimental value)과 이론값 (theoretical value)의 오차 허용 범위를 각각 0.01 Da 미만, 0.05 Da 미만으로 설정하였다. 또한 LPC, PC, PS, SM 의 parent ion 의 ionization form 을  $[M+H]^+$ 로, PG 의 parent ion 의 ionization form 을  $[M+Na]^+$ 로, TG 의 parent ion 의 ionization form 을  $[M+NH_4]^+$ 로 제한 하였다.

이를 통해 본 연구에서는 BALF 에서 추출한 지질들 중 LPC, PC, PG, PS, SM, TG 에 포함되는 69 종의 지질들 규명 하였다. 비록 이전 연구에서 HPLC 와 결합한 이온트랩 질량분석기 (ion trap-mass spectrometry) 를 사용하여 제한된 수의 PC, PG, LPC 들을 BALF 에서 분석한 사례가 있었지만 (21), 우리가 아는 한 본 연구에서 개발한 분석법은 최초로 BALF 에 존재하는 지질들 중 lysophospholipid 에 속한 LPC, glycerophospholipid 류에 속한 PC, PG, PS, sphingolipid 류에 속한 SM, neutral lipid 류에 속한 TG 의 정성 및 정량적 profiling 을 한번의 분석으로 가능하게 하였다.

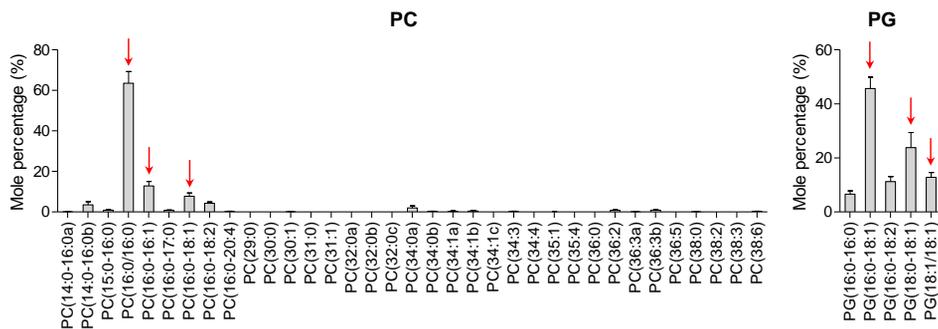
### 3. 2. Individual quantity scale 을 이용한 천식 모델 실험 군 간 lipid species 의 차이 발굴

이전 연구들에서 chromatography 기법을 이용한 사전 분리 없이 ESI-MS 를 사용하여 BALF 내 PC 와 PG 를 분석하였고, 이들은 class composition scale 을 통해 정상군과 천식 환자 군들을 비교하였다 (15, 30). 이를 통해 PC (16:0/16:0), PC (16:0-16:1), PC (16:0-18:1) 및 PG (16:0-18:1), PG (18:0-18:1), PG (18:1/18:1)가 각각 정상인들의 BALF 내 PC 와 PG 의 주된 비율을 차지하며, 이 비율들이 천식 환자들과 유의적 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 HPLC-ESI-QTOF-MS 기반 lipid profile 은 이와 유사한

패턴을 나타내었다. 정상 군 (NC)에서 BALF 전체 PC 및 PG 의 class composition 에서 각각 큰 구성비를 차지하는 lipid species 들이 이전에 보고된 연구 결과들과 일치하였고 (Figure 14, 붉은 화살표) 이들은 천식환자 군 (NSBA, SBA)과 유의적 차이를 보이지 않았다. 게다가 나머지 lipid species 의 class composition 값들 또한 실험 군 들 간에 유의적 차이를 나타내지 않았다.

반면 이와는 대조적으로 광범위한 lipid species 의 individual quantity 값들이 천식 모델 실험 군 간 유의성 있는 차이를 나타내었다. Table 3 에 표기된 바와 같이 Kruskal-Wallis test 결과 전체 lipid species (69 종) 중 과반 수 이상의 lipid species (45 종) 가 NSBA, NC, SBA 그룹 간에 유의적 차이를 나타내었다. 또한 Wilcoxon rank sum test 결과 LPC, PC, PG, PS, SM, TG 에 속한 40 종의 lipid species 가 NC 와 NSBA 간에 유의적 차이를 나타내었고, PC, PG, PS, SM, TG 에 속한 29 종의 lipid species 가 SBA 와 NSBA 간에 유의적 차이를 나타내었다. 한편 SBA 와 NC 군 간의 유의적 차이는 발견되지 않았다.

이와 같이 본 연구에서 획득한 lipid profile 결과는 class composition 이 아닌 individual quantity 값을 통해 최초로 천식환자와 정상군 간의 광범위한 BALF lipid species 의 차이를 규명하였다.



**Figure 14. Lipid species compositions belonged to corresponding lipid classes of PC, PG in BALF from normal control** Red arrows indicate large abundant lipid species of PC and PG. Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

**Table 2.** The number of significant difference among the NC, NSBA and SBA groups

Statistical analysis method (p-value < 0.05, FDR < 0.1)	Lipid expression scale	
	Individual quantity (Normalized by IS)	Class composition (Mole percentage)
<u>Kruskal-Wallis test</u>		
NSBA vs. SBA vs. NC	N=45 (LPC, PC, PG, PS, SM and TG)	N=0
<u>Wilcoxon rank sum test</u>		
NSBA vs. NC	N=40 (LPC, PC, PG, PS, SM and TG)	N=0
NSBA vs. SBA	N=29 (PC, PG, PS, SM and TG)	N=0
SBA vs. NC	N=0	N=0

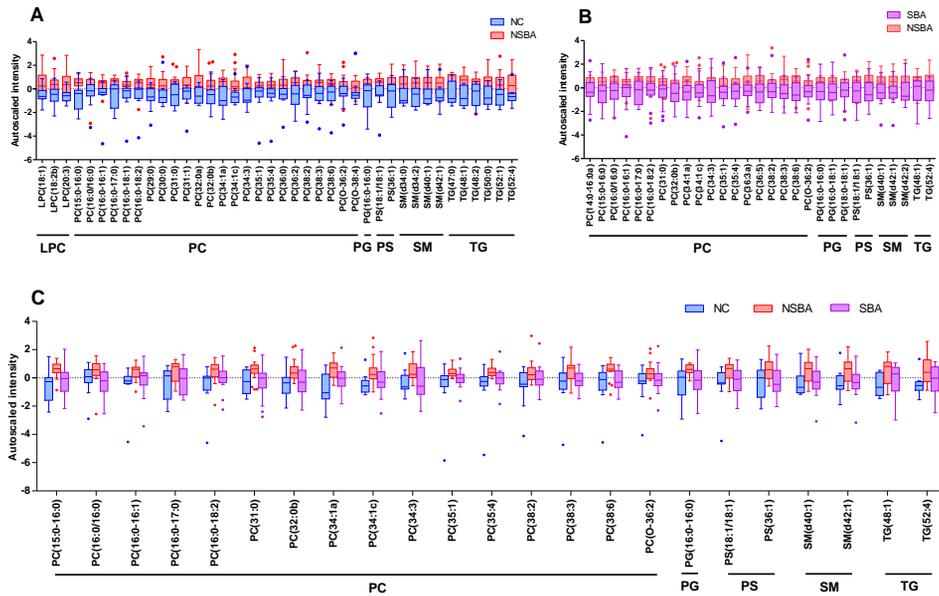
Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

### 3. 3. 천식환자의 비정상적 BALF lipid profile 과 이에 대한 inhaled corticosteroid 치료의 회복 효과

정상군에 비하여 LPC, PC, PG, PS, SM, TG 에 각각 속해있는 다양한 종류의 lipid 들이 NSBA 에서 비정상적으로 증가되어 있었다 (Figure 15A). 이들 중 LPC 에 대하여 이전부터 천식의 병인에 관련하여 다양한 연구가 진행되었다. LPC 는 정상인에 비하여 천식 환자들의 BALF 에서 증가되어 있으며 (11, 13) 백혈구 (leukocyte) 를 매개로 하는 염증 반응을 촉진하여 기관지의  $\beta$  수용체 (receptor) 를 둔감하게 만들고 (31, 32) eosinophil 의 침윤과 기관지 저항성을 증가시킨다고 알려져 있다 (14). 반면 나머지 lipid class 의 경우 정상인 비하여 천식환자의 BALF 에서 유의적 차이를 나타낸 보고가 없었으며 천식의 병인 관련 기전에 대한 역할 또한 알려져 있지 않았다. Lipid 는 pulmonary surfactant 의 매우 중요한 구성물질이기 때문에 (33) 본 연구결과를 통해 새롭게 규명된 천식 환자 BALF lipid 의 광범위한 증가는 호흡기계 lipid 변화와 천식의 병태생리간의 관계를 밝히기 위한 추가 연구의 필요성을 제시하였다.

Inhaled corticosteroid 는 천식 조절을 위한 가장 효과적인 약 중 하나로, 기관지 상피세포 (airway epithelial cells) 의 염증 유발 유전자의 발현을 억제시키고 eosinophil, macrophage, T 임파구 (lymphocyte) 와 같은 특정 염증 세포들의 기관지 점막 침윤을 막아

강력한 항 염증 효과를 나타낸다 (34, 35). Inhaled corticosteroid 치료를 수행한 SBA 군과 치료가 진행되지 않은 NSBA 군 간의 비교 분석 결과 PC, PG, PS, SM, TG 에 속한 29 종의 lipid species 는 모두 NSBA 에서 증가되어 있었으며 (Figure 15B) 이들 중 대부분이 (23 종) NC 군에 비하여 NSBA 에서 증가되어 있던 것들이었다 (Figure 15C). 따라서 이 결과는 비정상적으로 증가된 NSBA 의 BALF lipid species 중 일부가 inhaled corticosteroid 치료로 인하여 정상과 유사한 수치로 회복되었을 가능성을 제시하였다.



**Figure 15. Pattern of significantly different lipids among the NSBA, SBA and NC groups** The auto-scaled intensities (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable) of the differentially expressed lipid species for the comparisons of (A) NSBA vs. NC, (B) NSBA vs. SBA, and (C) NSBA vs. SBA vs. NC are displayed in box and whiskers plot. (LPC; Lysophosphatidylcholine, PC; Phosphatidylcholine, PG; Phosphatidylglycerol, PS; Phosphatidylserine, SM; Sphingomyelin, TG; Triglyceride) Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

### 3. 4. 천식환자의 비정상적 BALF lipid profile 의 biomarker 개발 가능성 확인

#### 3. 4. 1. PLS-DA

Univariate analysis (Kruskal-Wallis test, Wilcoxon rank sum tes) 를 통한 유의성 검정과 별도로 본 연구에서는 천식환자에서 비정상적으로 증가한 BALF lipid species 가 천식환자의 biomarker 로 사용될 가능성이 있는지 여부를 확인 하기 위하여 multivariate analysis 의 일종인 PLS-DA 를 통해 세 실험 군을 분명하게 구분할 수 있는 lipid species 를 추가로 결정하였다. PLS-DA 모델의 성능 (performance) 및 over-fitting 경향성은 각각 cross-validation 및 permutation test 를 통해 결정하였다. 지질들의 individual quantity scale 및 class composition scale 을 각각 이용하여 확립된 PLS-DA 모델 들의 cross-validation 및 permutation 결과는 Table 4 와 같았다.

Class composition scale 을 이용한 모든 PLS-DA 모델들의 경우 over-fitting 경향성을 나타내었으며 ( $p$  value  $> 0.05$ ), 낮은  $Q^2$  값 ( $-0.016 \sim -0.013$ ) 을 나타낸 반면 individual quantity scale 을 사용한 PLS-DA 모델들 중 NSBA 와 NC 를 구별하기 위한 모델은 만족할만한 모델 performance 값 ( $Q^2 = 0.321$ ,  $R^2 = 0.431$ , accuracy = 0.85) 과 최적화된 모델 경향성을 나타내었다 (accuracy 기반  $p$ -value = 0.007,

B/W 기반  $p$ -value = 0.006). 이 모델의 score plot 은 Figure 16 에서 나타난 것 같이 그룹 간 분리 패턴을 나타내었다. 따라서 NSBA 와 NC 간의 비교 모델에서 각각의 lipid species 에 그룹 간 분리에 미친 영향에 따라 계산된 VIP score 를 추가로 출력하였고, 그 결과 LPC, PC, PG, PS, SM, TG 에 각각 속하는 총 37 종의 lipid species 에 대하여 그룹 간 분리에 중요한 영향력을 지닌다고 여겨지는 1 이상의 VIP score 가 할당되었음을 확인 하였다 (Table 5).

Kruskal-Wallis test, Wilcoxon rank sum test, PLS-DA 를 모두 적용한 결과 총 34 종의 lipid species 가 NSBA 와 NC 간에 유의적 차이 및 구분 능력을 모두 나타내었다 ( $p$ -value < 0.05, FDR < 0.1, VIP > 1). 이 lipid species 들은 3 종의 LPC, 20 종의 PC, 1 종의 PG, 2 종의 PS, 4 종의 SM, 4 종의 TG 로 구성되어 있었으며 모두 NC 에 비하여 NSBA 에서 증가되어 있었다 (Figure 17A).

### 3. 4. 2. ROC 곡선 시험

Univariate 및 multivariate 분석 결과 획득한 34 종의 lipid species 가 천식 환자 특이적 biomarker 로 개발될 수 있는지 여부는 ROC 곡선 시험을 통해 검증 되었다. 그 결과 Figure 17C 와 같이 34 종의 lipid species 를 사용하여 확립된 ROC 곡선은 1000 회 반복의 permutation test 결과를 통해 over-fitting 되지 않았음이 검증 되었으며 ( $p$  value

= 0.004), 0.903 (95% CI; 0.673 - 1) 의 높은 AUROC 값을 통해 이 lipid species 들이 NC 와 NSBA 간의 excellent 한 구분 능력이 있음을 판단할 수 있었다 (Figure 17B). 결국 NSBA 에서 증가한 34 종의 BALF lipid species 는 천식 환자에 특이적인 biomarker 의 가능성이 있는 biomarker 후보들 (biomarker candidate) 로 판단 되었다.

Table 3. PLS-DA results of the cross validation and permutation tests among the NSBA, SBA and NC groups

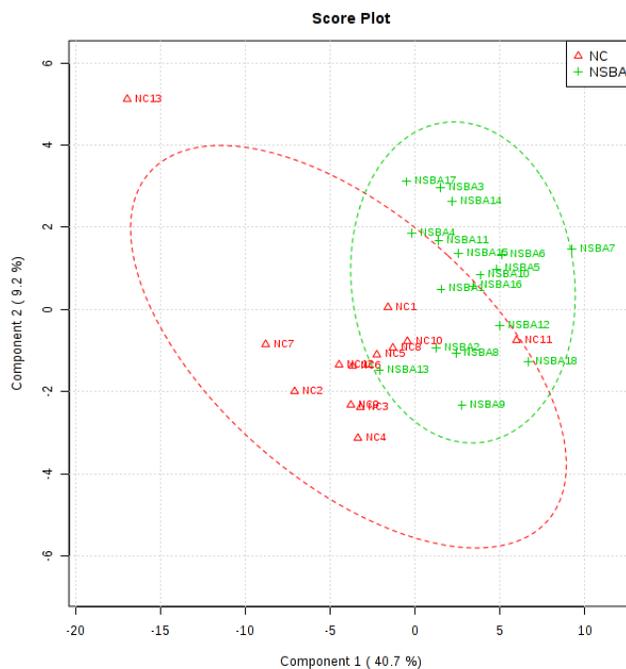
Scale	Model	Cross-validation			Permutation test (p value)	
		Accuracy	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Accuracy	B/W
Individual quantity (Normalized by I.S)	NSBA vs NC	0.85	0.431	0.321	0.007*	0.006*
	NSBA vs SBA	0.75	0.288	0.097	0.117	0.112
	SBA vs NC	0.673	0.138	-0.102	0.951	0.952
Class composition (Mole percentage)	NSBA vs NC	0.75	0.319	0.013	0.309	0.228
	NSBA vs SBA	0.706	0.854	-0.105	0.373	0.329
	SBA vs NC	0.66	0.269	-0.016	0.559	0.564

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919-3929.

Table 4. VIP scores of lipid species from PLS–DA results for the discrimination of NSBA and NC

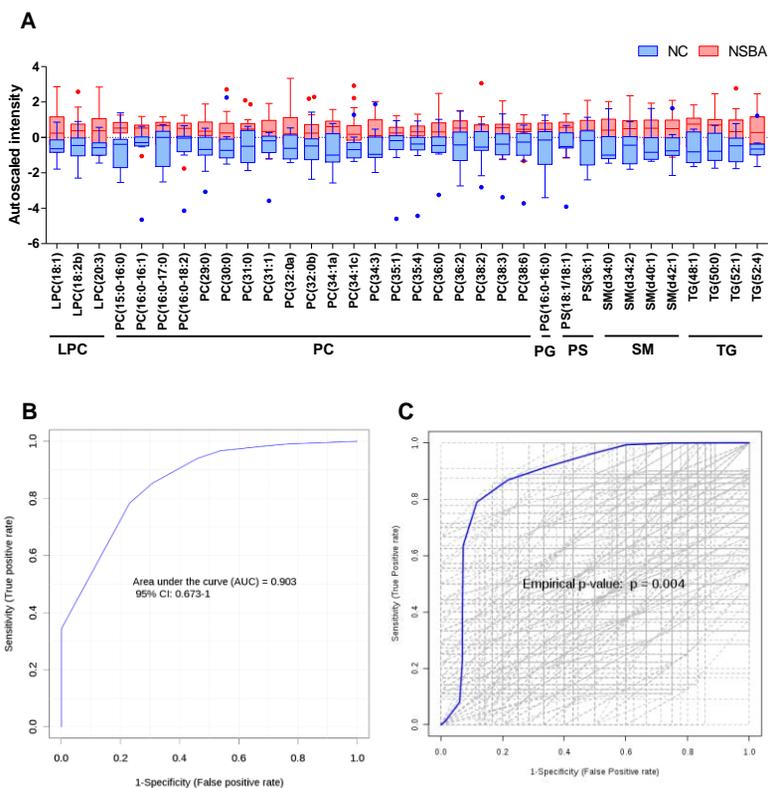
Lipid species	VIP	Lipid species	VIP	Lipid species	VIP	Lipid species	VIP
PC(34:1a)	1.5696	PC(31:1)	1.1687	PC(O-36:2)	0.89852	SM(d36:1)	0.60214
PC(29:0)	1.5368	PC(36:2)	1.1481	TG(46:1)	0.84109	PG(18:1/18:1)	0.55047
PC(15:0-16:0)	1.4556	PC(36:0)	1.1474	SM(d38:1)	0.8401	SM(d18:1/24:1)	0.53083
TG(52:4)	1.3765	PC(14:0-16:0a)	1.1338	PC(30:1)	0.83868	TG(49:1)	0.52229
SM(d34:0)	1.3616	PC(32:0a)	1.1332	PC(38:0)	0.83396	TG(48:0)	0.34278
TG(52:1)	1.3262	SM(d42:1)	1.1213	LPC(18:2a)	0.79006	PC(16:0-20:4)	0.32187
PC(32:0b)	1.2894	PC(35:1)	1.1098	PG(18:0-18:1)	0.76505	PC(36:3b)	0.2857
LPC(20:3)	1.2708	LPC(22:6)	1.1047	PC(36:3a)	0.76422	PC(34:0b)	0.049532
SM(d40:1)	1.2632	PS(36:1)	1.0919	SM(d41:1)	0.72622	PC(34:0a)	0.035877
PC(34:3)	1.2607	PC(30:0)	1.083	TG(47:1)	0.72349		
PG(16:0-16:0)	1.2575	PC(14:0-16:0b)	1.0611	PG(16:0-18:1)	0.71724		
TG(50:0)	1.2442	PC(38:2)	1.0499	PC(32:0c)	0.71558		
LPC(18:2b)	1.236	PC(16:0-16:1)	1.0235	PC(16:0/16:0)	0.7086		
SM(d34:2)	1.2315	PS(18:1/18:1)	1.0164	PC(36:5)	0.69617		
PC(34:1c)	1.2314	PC(38:3)	1.0101	PC(34:4)	0.68863		
TG(48:1)	1.2158	PC(16:0-18:2)	1.0078	PC(O-32:0)	0.6471		
PC(38:6)	1.1958	PC(16:0-17:0)	1.0062	SM(d42:2)	0.64198		
PC(35:4)	1.1911	PC(16:0-18:1)	0.97489	PC(O-38:4)	0.63433		
PC(31:0)	1.1897	TG(48:2)	0.96566	PC(34:1b)	0.62292		
LPC(18:1)	1.188	TG(47:0)	0.93346	PG(16:0-18:2)	0.62173		

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC–QTOF–MS–Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid–Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.



**Figure 16. Score plot of PLS-DA for comparison of the NSBA and NC groups**

Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.



**Figure 17. Receiver operating characteristic (ROC) curve and BALF lipid biomarker candidates for the discrimination of the NSBA and NC groups** The discriminative and significantly different lipid species between the NSBA and NC groups ( $p$ -value  $< 0.05$ , FDR  $< 0.1$ , and VIP  $> 1$ ) are displayed in a box and whisker plot (A). Additionally, the ROC curve results of the significant lipid species (B) and the 1000-iteration permutation results (C) are displayed. Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. *Journal of proteome research* 13(9):3919–3929.

### 3. 5. BALF inflammatory cell 과 BALF lipid biomarker candidate 간의 상관관계

BALF 내 inflammatory cell 들 중 eosinophil 은 천식의 병태생리와 관련하여 기관지 상피 손상과 염증의 악화를 야기시킨다고 알려져 있으며 (36, 37) 이는 NSBA 에서 NC 군에 비하여 유의성 있게 증가되어 있었다. 반면 macrophage 는 NSBA 에서 NC 에 비하여 유의성 있게 감소되어 있었다. 본 연구에서는 천식환자에서 비정상적 BALF lipid 가 증가한 원인을 밝히기 위한 노력의 일환으로 lipidomics 접근법을 통한 BALF lipid biomarker candidate 와 천식환자에서 유의성 있게 증감했던 BALF 내 inflammatory cell 인 eosinophil 및 macrophage 간의 연관성을 각각 correlation analysis 를 통해 측정하였다.

Spearman' s rank correlation 분석 결과 Figure 18A 에 나타난 것처럼 biomarker candidate 들 중 NC 의 eosinophil 은 PC (31:0) 과만 유의적 양의 상관관계를 나타내었던 반면 NSBA 군의 eosinophil 은 PC (31:0) 이외에 PC (16:0-18:2), PC (38:2), PC (32:0a)과 같이 다양한 PC 들 과 강한 양의 유의적 상관관계를 나타내었다. 이전 연구들에서 천식환자에서 존재하는 많은 수의 활성화된 eosinophil 이 alveolar type II cell 의 PC 분비를 촉진 시킴이 증명되었고 (38-40), 이는 NSBA 군에서 PC 와 eosinophil

간의 상관성이 강하게 나타난 원인으로 작용할 수 있을 것이라 예상되었다. 또한 NC 와 다르게 NSBA 의 eosinophil 은 SM (d34:0) 과 양의 유의적 상관관계를 나타내었다. 비록 SM 과 eosinophil 간의 직접적인 상호 증가 관련 메커니즘을 찾기는 어려웠지만, 몇몇 연구들을 통해 SM 이 생체 내 대사과정을 기반으로 eosinophil 의 증가에 기여할 수 있음을 확인하였다. SM 은 스핑고미엘리나제 (sphingomyelinase, SMase) 에 의하여 가수분해되어 세라미드 (ceramide, Cer) 를 생성하며 Cer 는 다시 세라미다제 (ceramidase) 와 스핑고신 키나제 (sphingosine-kinase) 에 의하여 스핑고신 (sphingosine) 과 스핑고신-1-인산 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 으로 변환된다 (41). SM 과 SMase 가 천식 환자의 적혈구 (erythrocyte) 세포막에서 모두 증가되어 있다는 연구 결과는 천식 환자에서 SM 으로부터 ceramide 의 생성이 촉진될 수 있음을 나타내었다 (42). 이와 관련하여 기니피크 (guinea pig) 천식 모델 연구는 오브알부민 (ovalbumin) 에 노출된 guinea pig 의 기관지 상피 내에서 Cer 가 증가되었으며 이는 기침 (cough)을 증가시키고 호흡곤란 (dyspnea)의 잠재기를 감소시킴과 같이 기관지 이상과 밀접한 관계에 있다고 알려져 있다 (43). Cer 는 그 자체로 비만세포 (mast cell)의 과립탈실 (degranulation) 과 eosinophil 의 침윤 같은 폐의 염증반응을 매개한다고 알려져 있을 뿐 아니라 Cer 의 대사 산물인 S1P 는 또한

천식 환자의 BALF 에서 증가되어 있으면서 기관지 과민 및 remodeling 에 연관되어 있고 eosinophil 들을 불러들이는 화학주성 (chemotactic) 신호의 역할을 나타낸 다고 알려져 있다 (43-46).

이와는 대조적으로 macrophage 퍼센트는 NC 군에서만 PS (18:1/18:1) 과 강한 양의 상관관계를 나타내었다 (correlation coefficient = 0.720, p-value < 0.01) (Figure 18B). 일반적으로 PS 는 세포의 원형질 막 (plasma membrane) 을 이루는 지질 2 층층 (lipid bilayer)의 내부 소엽 (inner leaflet) 쪽에 비대칭적으로 분포하고 있다가 세포 사멸 (apoptosis) 시 외부로 발현되지만 macrophage 는 세포사멸이 진행되지 않은 (non-apoptotic) 상태일 때에도 PS 를 표면에 발현시켜 식세포 작용 (phagocytosis) 을 통해 세포사멸이 진행되는 (apoptotic) 세포들을 제거한다고 알려져 있다 (47). 이를 통해 NC 에서 나타난 PS 와 macrophage 간의 강한 상관성은 macrophage 특이적인 PS 발현에 의한 것이라 예상할 수 있었다. 반면 NSBA 에서 macrophage 퍼센트는 PS (18:1/18:1)와 상관성이 없었으며 PS (18:1/18:1)은 NSBA 군에서 특이적으로 증가되어 있었다. 따라서 이는 NSBA 의 BALF 내 PS 증가가 macrophage 가 아닌 천식 환자의 호흡기계 내에서 증가되어 있는 apoptotic epithelial cell 들 증가로 인한 세포 외벽으로의 PS 발현 증가와 같은 (47, 48) 요인들로 인한 것이라 생각할 수 있었다.

종합하여 이 결과는 증가된 lipid biomarker candidate 들이 천식의 병리학적인 변화들과 연관되어 있을 가능성이 큼을 나타내었다.

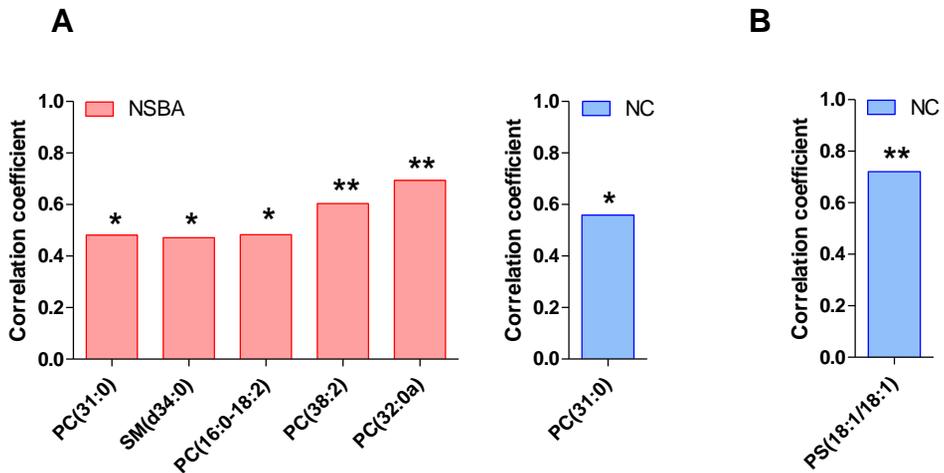


Figure 18. Spearman' s correlation test between lipid biomarker candidates and inflammatory cells In bar graph, Spearman' s correlation coefficient between lipid biomarker candidates and inflammatory cells such as eosinophils (A) and macrophage (B) in NSBA (red) and NC (blue) are displayed. (Significance: p-value < 0.05; \*, p-value < 0.01; \*\*). Ref. Kang YP, et al. (2014) Novel Approach for Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Using HPLC-QTOF-MS-Based Lipidomics: Lipid Levels in Asthmatics and Corticosteroid-Treated Asthmatic Patients. Journal of proteome research 13(9):3919-3929.

## 4. 결 론

HPLC-ESI-QTOF-MS, internal spectral library, high-throughput lipid 구조 규명 소프트웨어를 종합하여 개발된 효과적 BALF lipid profiling 분석법은 실제 천식 모델의 BALF 분석에 적용되어 lipid species 의 composition scale 이 아닌 individual quantity scale 이 치료가 수행되기 전 천식환자들 (NSBA) 과 정상인들 (NC) 간의 차이를 더욱 잘 나타낼 수 있음을 밝힘과 동시에 천식의 특이적인 호흡기계 lipid 증가 패턴 및 이에 대한 inhaled corticosteroid 의 치료 효과를 규명하였다. 또한 NC 에 비하여 NSBA 에서 증가된 지질들 중 LPC, PC, PG, PS, SM, TG 에 각각 포함된 34 종의 지질들이 천식을 진단하기 위한 BALF lipid biomarker 로써 개발될 가능성이 있음을 나타내었으며 (AUROC > 0.9) 이 BALF lipid biomarker candidate 들 중 일부와 inflammatory cell 간의 강한 상관관계를 통해 천식의 특이적인 BALF lipid 증가 메커니즘 중 일부를 제시할 수 있었다. 이 결과들은 천식과 지질간의 관계를 새롭게 밝히고 있으며 이 연구를 통해 개발된 BALF lipid 분석법은 다양한 호흡기계 질환의 연구에 적용될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Shevchenko A & Simons K (2010) Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(8):593–598.
2. Wenk MR (2010) Lipidomics: New tools and applications. *Cell* 143(6):888–895.
3. Wenk MR (2005) The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery* 4(7):594–610.
4. Carrasco–Pancorbo A, Navas–Iglesias N, & Cuadros–Rodríguez L (2009) From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(3):263–278.
5. Yetukuri L, *et al.* (2007) Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Systems Biology* 1(1):12.
6. Orešič M (2012) Obesity and psychotic disorders: uncovering common mechanisms through metabolomics. *Disease Models & Mechanisms* 5(5):614–620.

7. Oresic M, *et al.* (2011) Metabolome in progression to Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry* 1:e57.
8. Hilvo M, *et al.* (2011) Novel Theranostic Opportunities Offered by Characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research* 71(9):3236–3245.
9. Fanta CH (2009) Asthma. *New England Journal of Medicine* 360(10):1002–1014.
10. Grainge CL, *et al.* (2011) Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *New England Journal of Medicine* 364(21):2006–2015.
11. Bowton DL, Seeds MC, Fasano MB, Goldsmith B, & Bass DA (1997) Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155(2):421–425.
12. Hite RD, *et al.* (2005) Lysophospholipid and fatty acid inhibition of pulmonary surfactant: Non-enzymatic models of phospholipase A2 surfactant hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Biomembranes* 1720(1):14–21.

13. Chilton FH, *et al.* (1996) Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. *The Journal of Experimental Medicine* 183(5):2235–2245.
14. Nishiyama O, *et al.* (2004) Roles of lysophosphatidylcholine in eosinophil infiltration and resistance in airways. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31(3):179–184.
15. Wright SM, *et al.* (2000) Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma. *Journal of Applied Physiology* 89(4):1283–1292.
16. Bousquet J, *et al.* (1990) Eosinophilic inflammation in asthma. *New England Journal of Medicine* 323(15):1033–1039.
17. Kwatia MA, Doyle CB, Cho W, Enhorning G, & Ackerman SJ (2007) Combined activities of secretory phospholipases and eosinophil lysophospholipases induce pulmonary surfactant dysfunction by phospholipid hydrolysis. *Journal of allergy and clinical immunology* 119(4):838–847.
18. Bateman ED, *et al.* (2008) Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal* 31(1):143–178.

19. Park S-W, *et al.* (2005) Interleukin-13 and interleukin-5 in induced sputum of eosinophilic bronchitis\*: Comparison with asthma. *CHEST Journal* 128(4):1921-1927.
20. Park SW, *et al.* (2013) Apolipoprotein A1 potentiates lipoxin A4 synthesis and recovery of allergen-induced disrupted tight junctions in the airway epithelium. *Clinical & Experimental Allergy* 43(8):914-927.
21. Barroso B & Bischoff R (2005) LC-MS analysis of phospholipids and lysophospholipids in human bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Chromatography B* 814(1):21-28.
22. Nygren H, Seppänen-Laakso T, Castillo S, Hyötyläinen T, & Orešič M (2011) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)-Based Lipidomics for Studies of Body Fluids and Tissues. *Metabolic Profiling, Methods in Molecular Biology*, ed Metz TO (Humana Press), Vol 708, pp 247-257.
23. Katajamaa M, Miettinen J, & Orešič M (2006) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass

- spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22(5):634–636.
24. Lundström SL, *et al.* (2011) Asthmatics Exhibit Altered Oxylin Profiles Compared to Healthy Individuals after Subway Air Exposure. *PLoS ONE* 6(8):e23864.
  25. Xia J, Psychogios N, Young N, & Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research* 37(suppl 2):W652–W660.
  26. Xia J & Wishart DS (2011) Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols* 6(6):743–760.
  27. Mudiam MKR, Ch R, & Saxena PN (2013) Gas chromatography–mass spectrometry based metabolomic approach for optimization and toxicity evaluation of earthworm sub-lethal responses to carbofuran. *PLoS One* 8(12):e81077.
  28. Hu Z-P, *et al.* (2012) Metabonomic profiling of TASTPM transgenic alzheimer' s disease mouse model. *Journal of Proteome Research* 11(12):5903–5913.

29. Xia J, Broadhurst D, Wilson M, & Wishart D (2013) Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 9(2):280–299.
30. Heeley EL, Hohlfeld JM, Krug N, & Postle AD (2000) Phospholipid molecular species of bronchoalveolar lavage fluid after local allergen challenge in asthma. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 278(2):L305–L311.
31. Kume N, Cybulsky MI, & Gimbrone MA, Jr. (1992) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 90(3):1138–1144.
32. Kume H, Ito S, Ito Y, & Yamaki K (2001) Role of Lysophosphatidylcholine in the Desensitization of  $\beta$  - Adrenergic Receptors by  $Ca^{2+}$  Sensitization in Tracheal Smooth Muscle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25(3):291–298.
33. Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, & Possmayer F (1998) The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et*

*Biophysica Acta (BBA)–Molecular Basis of Disease*  
1408(2):90–108.

34. Wood AJ & Barnes PJ (1995) Inhaled glucocorticoids for asthma. *New England Journal of Medicine* 332(13):868–875.
35. Barnes PJ (1998) Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma. *Journal of allergy and clinical immunology* 102(4):531–538.
36. Gleich GJ (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105(4):651–663.
37. Thomas L & Warner J (1996) The eosinophil and its role in asthma. *General Pharmacology: The Vascular System* 27(4):593–597.
38. Okumura M, *et al.* (1996) Activated eosinophils stimulate phosphatidylcholine secretion in primary culture of rat type II pneumocytes. *Biochemistry and molecular biology international* 38(3):569–575.
39. Walsh GM (1999) Advances in the immunobiology of eosinophils and their role in disease. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 36(5):453–496.

40. Okumura M, Kai H, Shinozawa S, Isohama Y, & Miyata T (1999) Effects of eosinophil granule major basic protein on phosphatidylcholine secretion in rat type II pneumocytes. *American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology* 276(5):L763–L768.
41. Uhlig S & Gulbins E (2008) Sphingolipids in the lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178(11):1100–1114.
42. Gupta P, Vijayan VK, & Bansal SK (2010) Sphingomyelin metabolism in erythrocyte membrane in asthma. *Journal of Asthma* 47(9):966–971.
43. Masini E, *et al.* (2008) Ceramide: a key signaling molecule in a guinea pig model of allergic asthmatic response and airway inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324(2):548–557.
44. Roviezzo F, *et al.* (2004) Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1–phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(30):11170–11175.

45. Jolly PS, Rosenfeldt HM, Milstien S, & Spiegel S (2002) The roles of sphingosine-1-phosphate in asthma. *Molecular immunology* 38(16):1239-1245.
46. Ammit AJ, *et al.* (2001) Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *The FASEB Journal* 15(7):1212-1214.
47. Callahan M, Williamson P, & Schlegel R (2000) Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death & Differentiation* 7(7).
48. Trautmann A, *et al.* (2002) T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109(2):329-337.

# Abstract

Yun Pyo Kang

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis

The Graduate School

Seoul National University

Lipidomics provides an in-depth understanding of various functions of lipids by using quantitative and qualitative analysis. Detailed and precise analysis of complex lipidome was limited but the recent development of analytic instruments has gathered interests in studies using lipidomics to explain the pathogenic phenotypes of various diseases including obesity, high blood pressure, diabetes and cancers by focusing on the change in lipid metabolism. However, direct analysis method to explore the change in the levels of lipids of respiratory diseases are yet to be developed. In response, our study focused on developing a novel method for lipid profiling of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) to better understand the respiratory lipid phenotypes of asthma. BALF was acquired from 38 asthmatic patients (18 patients with non-steroid treated bronchial asthma [NSBA] and 20 patients with steroid treated bronchial asthma [SBA]) and 13 healthy subjects. Using HPLC-QTOF-MS

with an internal spectral library and high-throughput lipid identifying software, we identified 69 lipids and which were each categorized under six lipid classes: lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SM) and triglyceride (TG). The results of this study showed significantly higher levels of lipids in NSBA compared to the NC and SBA groups. Also, some lipids of BALF can be developed as a possible biomarker for identifying asthmatics (AUC > 0.9), and also have positive relationships with eosinophils which are important for pathogenesis of asthma. Taken together, these novel findings revealed a relationship between the lipids of BALF and the phenotypes of asthma and the analytic method developed from this research can be used to study the change in lipids of various respiratory diseases.

Keywords: lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidylserine, sphingomyelin, triglyceride, bronchoalveolar lavage fluid, asthma

Student Number: 2009-21651