creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

약학석사학위논문

GC/MS를 이용한 폐암세포 A549의 starvation에 따른 대사체 변화 분석

Analysis of metabolites of A549 lung cancer cell during starvation by GC/MS

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
김 형 민

GC/MS를 이용한 폐암세포 A549의 starvation에 따른 대사체 변화 분석

Analysis of metabolites of A549 lung cancer cell during starvation by GC/MS

지도교수 박정일

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2013년 12월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

김 형 민

김형민의 약학석사학위논문을 인준함

2013년 12월

위 원 장	**송 준 명**	(인)
부 위 원 장	**권 성 원**	(인)
위 원	**박 정 일**	(인)

국 문 초 록

암세포는 생체 내에서 성장 및 생존 하는 데에 있어서 정상 세포에 비하여 많은 영양분을 요구하게 된다. 그럼에 따라 주변의 영양소가 급격히 소모되고, 이를 보충하기 위해 미세혈관의 확장작용이 일어나게 된다. 이때, 영양소의 급격한 소모에 따른 암세포의 생리적인 형질의 변화가 일어날 것이라 예상되며, 따라서 영양분이 부족한 상황에서 암세포의 생리를 연구하는 것은 암의 병리를 이해하는 데에 있어서 매우중요하다고 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 A549 폐암세포주를 이용하여 invitro-starvation 시 변화하는 대사체를 연구하고자 하였다. A549를 배양시 영양분의 양을 다르게 하면 세포 내에 대사과정에서 변화가 있을 것이라 예상 되었고 이에 따라 대사체들에 변화가 있을 것으로 예상되었다. 우리는 A549세포에 대해 FBS를 10 %, 2 % 그리고 0 %로 조절하여 배양 후 이들의 대사체를 분석함으로써 A549 세포가 starvation이 되었을 때 발생하는 대사체의 변화를 관찰하였다. 대사체 변화분석은 GC/MS, LC/MS 와 NMR등 의 기기를 이용해서 연구되고 있다. 그 중 본 연구에서 사용한 GC/MS는 기존에 설립된 풍부한 대사체 library를 매우 쉽게 이용할 수 있기 때문에 대사체 분석에 있어서 매우 용이하였다. 3가지의 cell 개수를 동일하게 모아서 Chloroform : Methanol : Water (2 : 5 : 2)로 추출하였고, methoxyamine과 BSTFA (1 % TMCS)를 이용하여 유도체화 하였다. GC column 은 DB-5 (30 m X 0.25 mm, 0.25 ㎛)를 사용하였으며, MS는 scan mode로 설정하여 전체적인 대사체의 차이를 확인할 수 있게 분석하였다. 세포내의 대사체들은 authentic standard를 사용하여 동정 하였고 그 결과 총 64종의 metabolite들을 동정 할 수 있었다. 3가지 그룹간의 차이를 살펴본 결과 3-Hydroxybutyric acid 와 malic acid는 FBS의

양이 감소할 때 같이 감소하는 경향을 보였다. 반면에, Pyroglutamic acid 및 glutamic acid, Hypoxanthine은 starvation 시킨 그룹에서 증가되어 있었다. 결론적으로 위 5가지 대사체들의 증감에 관여하는 biological pathway가 starvation상황에서 A549 폐암세포주의 생리활성에 영향을 미칠 것이라 예상되며, 이를 추가 연구를 위한 발전 가능성으로 삼을 수 있을 것이라 기대된다.

주요어: A549, FBS Starvation, GC/MS, Hydroxybutyric acid, Glutamic acid, Hypoxanthine

학번: 2012-21580

목 차

국문초록 ····· i
목 차 ····· iii
List of Figures ····· iv
List of Tables ····· v

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험 ····· 3
1. 시료 ····· 3
2. 시약 및 기기 ····· 3
2-1. 표준품, 시약 및 용매 ····· 3
2-2. 실험 기구 ····· 4
2-3. 분석기기 ····· 4
3. 실험방법 ····· 5
3-1. A549 세포배양 ····· 5
3-2. 시료 전처리 및 유도체화 ····· 6
3-3. GC/MS 분석조건 ····· 8

Ⅲ. 결과 ····· 9
1. 대사체들의 identification ····· 9
2. 그룹간의 차이가 나는 대사체들 ····· 12
3. FBS starvation 시 A549세포의 대사과정 ····· 14
3-1 암세포의 대사과정 ····· 14
3-2 Starvation 조건에서 감소한 대사체 ····· 16
3-3 Starvation 조건에서 증한 대사체 ····· 18

Ⅳ. 결론 ····· 20

Ⅴ. 참고문헌 ····· 21

Abstract ····· 23

List of Figures

Fig 1. A549 세포배양 및 처리 과정 ····· 6

Fig 2. Pellet 형태의 A549 세포의 전처리 및 유도체화 과정 ····· 7

Fig 3. FBS의 양을 다르게 하여 배양 후 GC/MS를 이용하여 분석한 전체 크로마토그램 ····· 10

Fig 4. 표준품의 크로마토그램과 시료 내의 대상물질의 크로마토그램 ····· 11

Fig 5. Starvation조건에서 감소한 대사체 3-Hydroxybutyric acid와 Malic acid. ····· 12

Fig 6. Starvation조건에서 증가한 대사체 Pyroglutamic acid와 Glutamic acid, Hypoxanthine ····· 13

Fig 7. 암세포에서의 전반적인 대사과정 ····· 15

Fig 8. Glutamate와 Malic acid가 포함된 암세포내의 대사과정 ··· 17

Fig 9. Hypoxanthine의 아데노신 대사과정 ····· 19

Fig 10. Salvage pathway ····· 19

List of Tables

Table 1. GC/MS 분석조건 ····· 8

Table 2. GC/MS 분석을 통해 ID가 된 대사체들. ····· 9

Ⅰ. 서론

암세포는 암을 유발하는 세포로서 정상세포와는 대사, 분화과정 등 여러 부분에서 다른 점이 존재한다. 암세포는 분화에 필요한 단백질을 합성하는 능력을 잃고 암세포가 자라는데 필요한 단백질들을 합성한다. 이로 인해 암세포는 정상세포와는 다르게 증식속도를 조절하는 능력을 잃고 빠르게 증식한다. 따라서 암세포는 생체 내에서 성장 및 생존하는데 있어서 정상 세포에 비하여 많은 영양분을 요구하게 된다. 그럼에 따라 주변 영양소가 급격히 소모되고 영양소의 소모에 따라 주변의 영양소가 부족하게 되어 암세포의 생리적인 형질 변화가 일어날 것이라 예상된다. 영양분이 부족할 때 암세포의 변화된 생리를 연구하는 것은 암의 병리를 이해하는데 있어서 중요하다고 할 수 있을 것이다.

A549는 사람의 폐에서 유래된 폐암세포이다. 폐포에는 type Ⅰ과 type Ⅱ두 종류의 세포가 존재한다. Type Ⅰ은 매우 크고 얇은 세포로 넓은 범위에 걸쳐 있다. 이 세포는 자기복제를 할 수 없고 많은 종류의 독성물질에 영향을 받는다. Type Ⅱ는 작고 거친 입방형태의 세포이다. Type Ⅱ는 폐포에서 자기복제를 하고 이를 통해 type Ⅰ의 손상을 대체하는 특징을 나타낸다. A549 세포는 사람으로부터 유래되고 배양되어서 type Ⅱ와 중요한 특징들이 비슷하다. 따라서 이들은 type Ⅱ세포의 모델로 널리 사용되었다. Type Ⅱ와 같은 특성을 가지는 A549 세포가 본 연구에서 적합하다고 생각되어 선택되었다.

Serum은 세포배양에 있어서 첨가제로 흔하게 사용된다. 이것은 세포가 성장하고 증식하는데 필수적인 요소로 작용한다. 세포배양에서 Serum의 주요 기능은 성장인자 자극호르몬, 수송단백질, 무기질, 지질 등의 성장에 필요한 물질들을 공급한다. 그 중에서도 Fetal Bovine Serum(FBS)는 풍부한 양의 성장인자를 가지고 있고 낮은 양의 감마

글로불린을 가지고 있어서 세포배양에 있어서 가장 일반적으로 사용이 되고 있다. 또한 일반적으로 배양할 때 FBS를 10 %의 농도로 media에 포함시켜서 배양한다. 이처럼 성장인자가 많이 포함되어 있어 세포가 자라는데 있어서 필수 요소인 FBS를 포함시키지 않은 배지를 이용하여 암세포를 배양할 경우 암세포에서는 대사과정에서 여러 가지 변화가 생길 것으로 예측이 된다. 이와 같은 변화에 대해 연구해보고 연구결과에 따라 암세포의 대사과정에 대해 더욱 깊은 이해를 할 수 있고 결과를 이용하여 추가적인 연구를 하는 발판으로 삼을 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 대사체학(metabolomics)적인 방법을 이용하여 A549 폐암세포에 존재하는 대사체를 GC/MS를 이용하여 분석하였다. A549 폐암세포를 배양 시에는 배지에 포함된 FBS의 양을 0, 2, 10 % 세 종류로 나누어서 n=3으로 하여 배양하였다. 대사체학이란 LC/MS, GC/MS, NMR 등의 분석기기를 활용하여 생체 내 내인성 대사체의 profile을 확보하고, 표현형에 따라 대사체의 profile이 어떤 양상으로 변하는지 연구하는 학문이다. 본 연구에서는 대사체분석을 통해 FBS를 충분히 공급한 세포와 FBS starvation 상태의 세포 간에 생기는 대사체들의 차이를 분석하였다. FBS의 공급량에 따라 차이가 나는 세포의 대사체들을 확인하고, 이 결과를 이용하여 FBS starvation 시 암세포 내에서 생기는 대사과정의 변화에 대해 추측을 할 수가 있고, 이를 통해 추가적인 연구를 위한 발판이 될 수 있을 것이다.

Ⅱ. 실험

1. 시료

A549 lung cancer cell에 세 종류의 다른 FBS의 농도(0, 2, 10 %)로 overnight으로 배양하였다. 그 후 trypsin으로 세포를 때낸 뒤 모든 그룹에서 동일하게 cell의 개수를 1 * 10^6로 일치시켜 확보하였다. 각 그룹은 n=3이 되도록 하였다.

2. 시약 및 기기

2-1. 표준품, 시약 및 용매

A549 cell을 배양하는데 다음의 media와 시약을 사용하였다.

- DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)
- FBS-Fetal Bovine Serum
- Anti-anti

시료 전처리에 사용한 용매 및 시약으로 다음을 사용하였다.

- Chloroform (J.T. Baker, USA)
- Methanol (J.T. Baker, USA)
- Water (J.T. Baker, USA)
- Toluene (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)

GC/MS분석을 위한 유도체화에 사용한 용매 및 시약으로 다음을 사용하였다.

- Methoxyamine Hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)

- BSTFA(1 % TMCS) (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)
- Pyridine (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA)

2-2. 실험 기구

- Centrifuge tube (2mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Conical tube (15mL, SPL Life Sciences Co. Ltd)
- T175 flask (Nunc, Thermo scientific)
- Adjust pipette (0.5～10μL, 20～200μL, 100～1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Pipette tips (0.5～10μL, 20～200μL, 100～1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Vortex Mixer (Vortex Genie 2)
- Ultrasonicator (Sonics & Material, Inc., USA)
- Nitrogen purge (EYELA MG-2200)
- Vacuum pump (ULVAC DTC-21)
- Vacuum manifold

2-3. 분석기기

- Shimadju QP2010 (Shimadju, Japan)
- Columns
- DB-5 (30 m X 0.25mm, 0.25 μm, Agilent, USA)

3. 실험방법

3-1. A549 세포 배양

A549 세포는 DMEM 배지를 이용하여 배양되었다. DMEM 배지에는 10 %의 FBS와 1 mL의 Antianti가 첨가되었다. T175 flask에 배양하였고 세포가 포화될 때 마다 계대배양 하였다. 계대배양을 계속하여 n=3으로 하여 세 가지 그룹으로 실험을 동시에 진행할 수 있는 충분한 양을 만들었다. Plating 한 첫 날은 항상 하는 배양 조건과 동일하게 10 %의 FBS가 포함된 배지를 이용하여 배양하였다. 그 다음날 starvation 조건을 만들기 위해 다른 조건은 모두 동일하게 하고 FBS의 농도를 0 %, 2 %, 10 %로 조절하여 하루 더 배양하였다. FBS가 0 %와 2 %의 배지로 바꿀 때 기존에 있던 배지를 빼낸 후 기존에 남아있던 배지를 완전히 제거하기 위해 배지를 갈아 넣기 전에 PBS로 3번 세척을 한 후 해당하는 배지를 넣어주었다. 하루 더 배양을 한 후 trypsin을 이용하여 세포를 모두 떼어내었고, cell count를 통해 각 그룹의 세포의 개수를 1 X 10^6 개로 일치시켰다. Centrifuge를 통해 media를 모두 걷어내고 세포를 pellet형태로 eppendorf tube에 보관하였다.

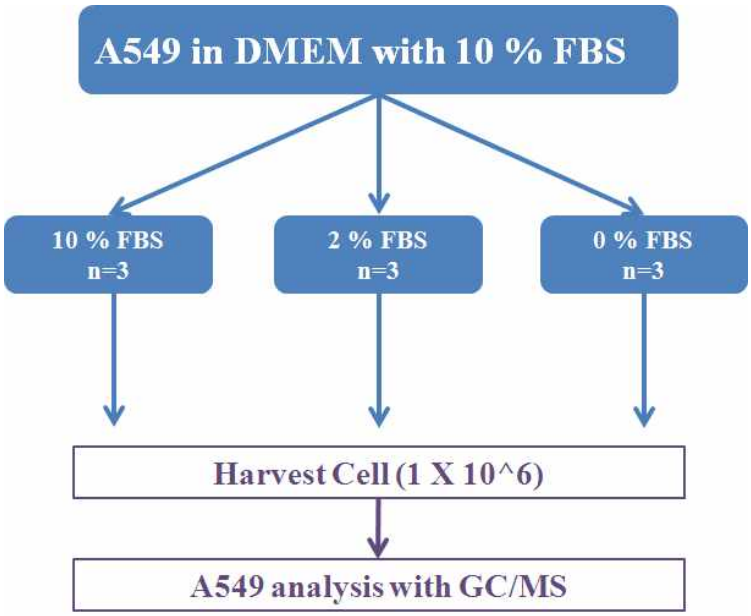

Fig 1. A549 세포배양 및 처리 과정

3-2. 시료 전처리 및 유도체화

A549 세포를 pellet형태로 만든 후 세포내의 metabolite들을 추출하기 위하여 다음과 같은 방법을 사용하였다. (Fig 2.) 우선 각각의 세포에 Chloroform : Methanol : Water (2 : 5 : 2) 혼합액을 1 mL씩 넣었다. 그 다음 ultrasonication을 30 초간 진행하여 세포의 pellet이 용매에 균일하게 퍼지게 하여 추출하였다. 용액 내에 불용성 불순물을 제거하기 위하여 16,000 rcf에서 5 분간 원심분리한 후 supernatant를 따로 800 uL 취하였다. 따로 취한 용매를 50 ℃에서 1 시간 동안 nitrogen purge를 이용하여 모두 날려 보냈다. 여기에 수분을 완전히 제거하기 위하여 anhydrous toluene을 100 uL 넣어주고 2

분간 voltexing 하였다. 수분제거는 유도체화의 효율을 높이기 위해 꼭 필요한 과정이다. 그 후 바로 직전 과정과 마찬가지로 50 ℃에서 1 시간 동안 nitrogen purge를 이용하여 모두 날려 보냈다. 따로, methoxyamine hydrochloride와 pyridine을 준비하여 15 mg/mL의 농도로 만들었다. 이 용액을 80 uL 넣고 30 ℃에서 90 분 동안 incubation 하였다. 그 후 따로 준비된 1 %의 TMCS가 포함된 BSTFA 80 uL를 추가로 넣고 70 ℃에서 15 분간 incubation 하였다. 이와 같은 과정으로 준비한 시료를 GC/MS를 이용하여 분석하였다.

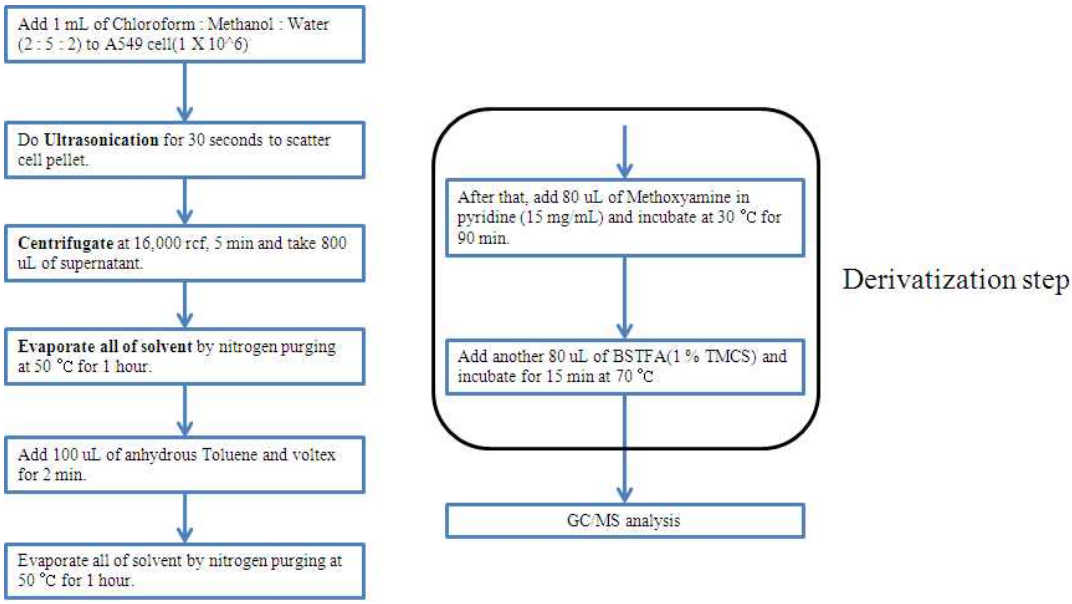

Fig 2. Pellet 형태의 A549 세포의 전처리 및 유도체화 과정

3-3. GC/MS 분석조건

A549 세포에서 metabolite를 추출한 시료를 Shimadzu-QP2010을 사용하여 분석하였다. GC column은 5 % phenyl methyl poly siloxane 구조를 가진 DB-5 (30 M X 0.25 mm, 0.25 um, Agilent)를 사용하였다. MS detector는 EI(Electron impact ionization)방식으로 이온화하였다. 이것은 전자 충격 이온화법으로 일정한 전압인 70 eV에서 분석물을 이온화시킨다. 이에 따라 기존의 분석결과인 Library를 통해 identification을 할 수 있다.

Table 1. GC/MS 분석조건.

GC/MS (Shimadzu QP-2010)	
Column	DB-5 (30 M X 0.25 mm, 0.25 um, Agilent)
Carrier gas	Helium
Flow rate	1.0 mL/min
Split ratio	2.0
Oven temperature	80 ℃ (2 min) - 5 ℃/min - 300 ℃ (5 min)
Injectionvolume	1 uL
Solvent cutoff	2.5 min
Injection Temperature	270 ℃
Source Temperature	200 ℃
Ionization Energy	70 eV
Scan range	30~600 m/z

Ⅲ. 결과

1. 대사체들의 Identification

GC/MS를 이용하여 시료를 분석한 후, 각각의 물질에 해당하는 mass spectrum과 retention time을 기존의 standard로 분석한 mass spectrum과 retention time과의 비교를 통해 identification을 진행하였고, 그 결과 64개의 대사체가 ID되었다. 그 중에는 Glucose, Pyruvic acid, Lactic acid 등 대사과정에서 중요한 역할을 하는 대사체들도 다수 발견되었다.

Table 2. GC/MS 분석을 통해 ID가 된 대사체들.

Identification	
Pyruvic acid	Petroselinic acid
Lactic acid	Octadecanoic acid (c18:0)
Glycolic acid	Mannose-6-phosphate
3-Hydroxybutyric acid	Arachidonic acid (c20:4)
Valine	Glucose-6-phosphate
Leucine	Sorbitol-6-phosphate
Phosphoric acid	Arachidic acid (c20:0)
Nicotinic acid	Docosahexaenoic acid (c22:6)
Isoleucine	Docosapentaenoic acid (C22:5)
Proline	Inosine
Glyceric acid	Behenic acid
Uracil	Sucrose
Fumaric acid	Lactose
Serine	Nervonic acid (c24:1)
Hypotaurine	8-Hydroxy-deoxy-guanosine
Threonine	Cholesterol
Thymidine	Alanine
Malic acid	Benzoic acid
N-acetyl serine	Citric acid
Pyroglutamic acid	Fructose
Meso-Erythritol	Glycine
Aspartic acid	Oleic acid
Cysteine	Succinic acid
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	Tryptophan
Arginine + Citruline	
Glutamic acid	
Phenylalanine	
Dodecanoic acid (c12:0)	
Homocysteine	
Orotic acid	
Dihydroxyacetonephosphate	
Hyopxanthine	
Ornithine	
Myristic acid (C14:0)	
Adenine	
Glucose	
Lysine	
Mannitol	
Myo-inositol	
Hexadecanoic acid (c16:0)	

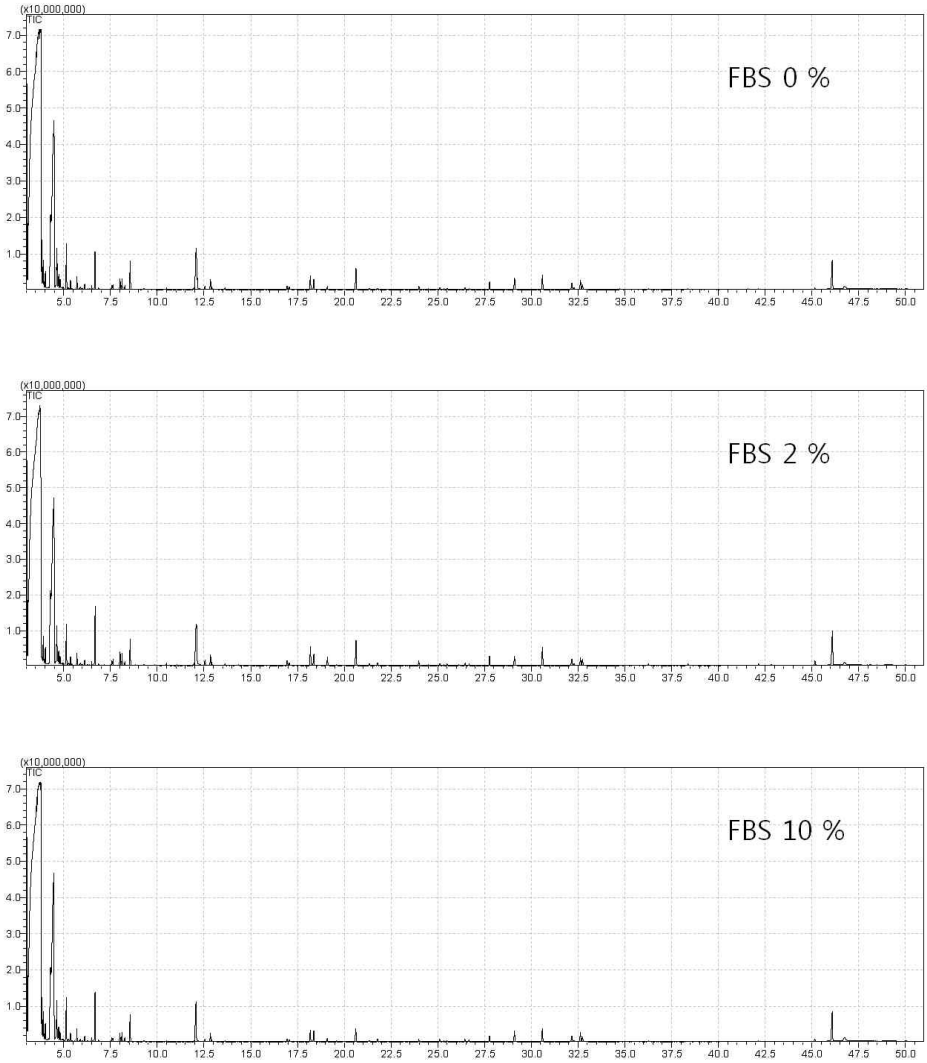

Fig 3. FBS의 양을 다르게 하여 배양 후 GC/MS를 이용하여 분석한 전체 크로마토그램

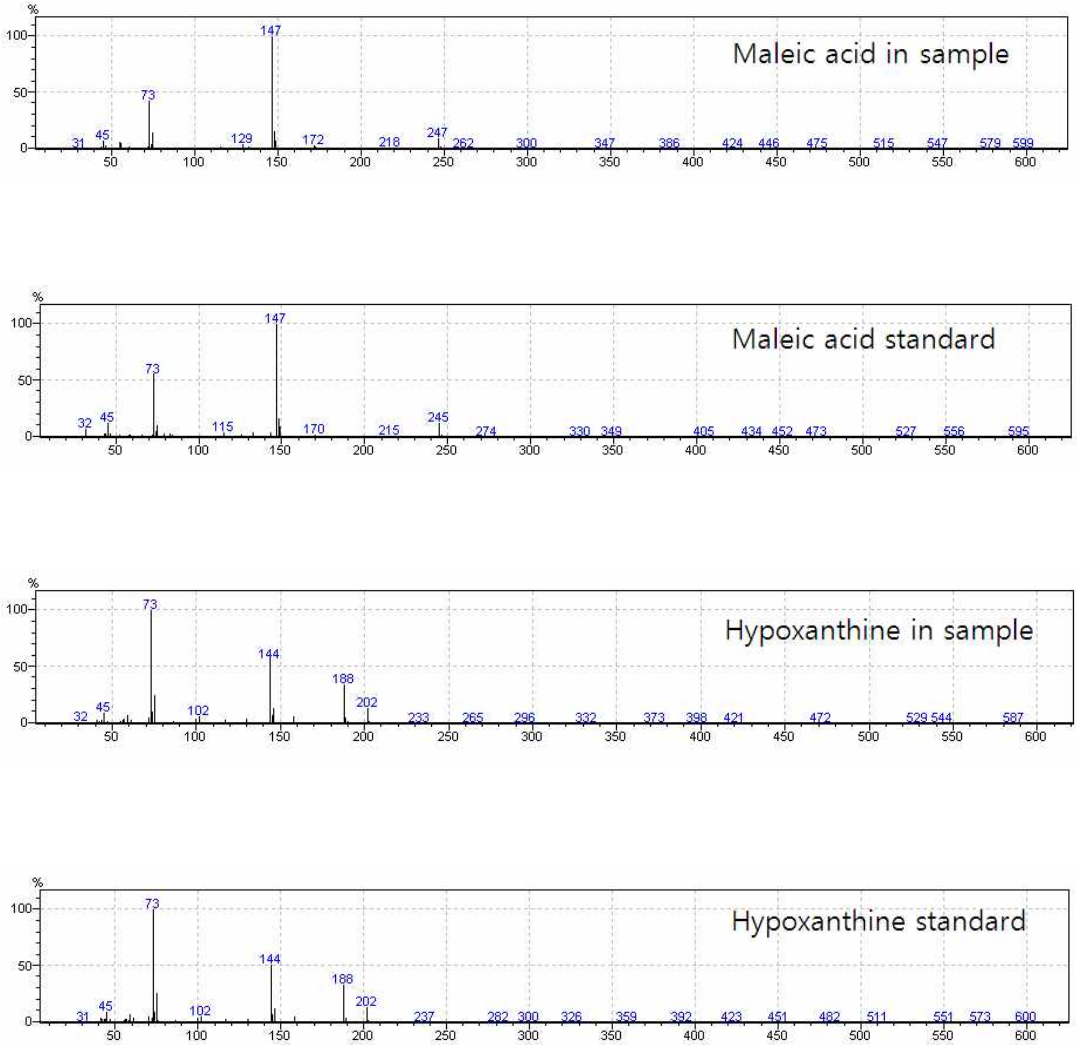

Fig 4. 표준품의 크로마토그램과 시료 내의 대상물질의 크로마토그램

2. 그룹간의 차이가 나는 대사체들

ID한 대사체들을 FBS의 양을 다르게 하여 배양한 그룹간의 결과를 비교하였다. 이를 통해 총 5개의 유의성이 있는 대사체들을 찾았다. 3-Hydroxybutyric acid와 Malic acid는 starvation 상태에서 감소가 되는 것으로 나타났다. 반면에, Pyroglutamic acid 와 Glutamic acid, Hypoxanthine은 starvation 상태에서 오히려 증가하는 것으로 나타났다.

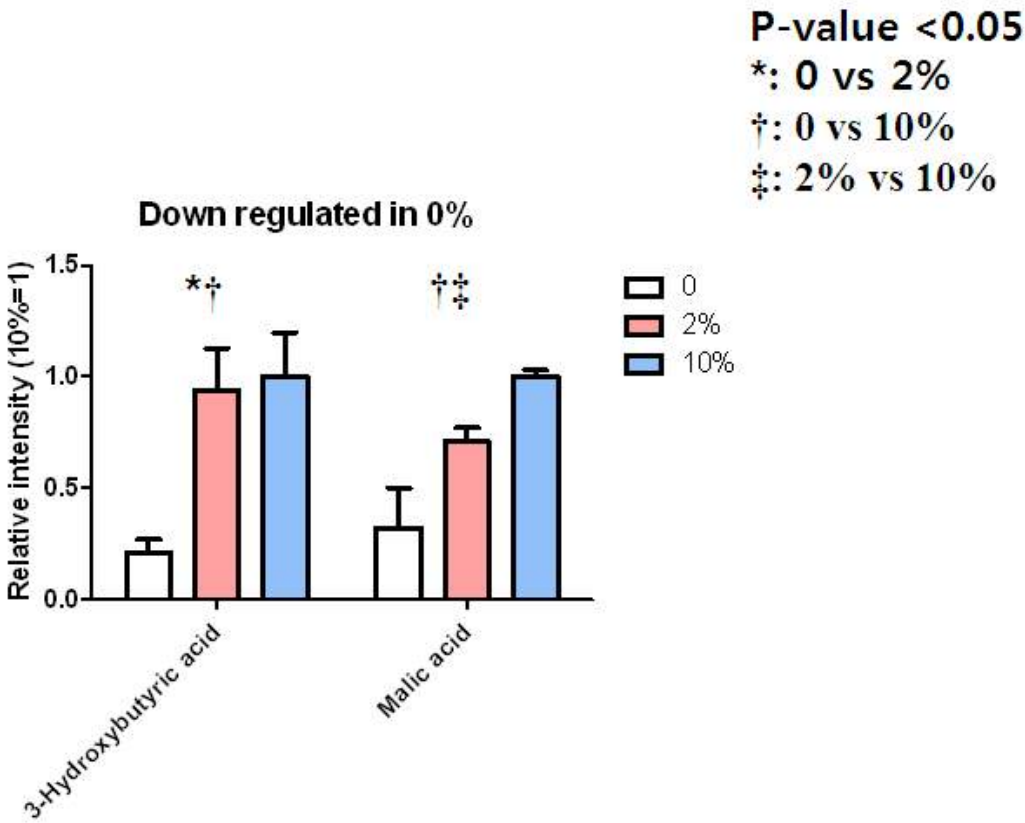

Fig 5. Starvation조건에서 감소한 대사체 3-Hydroxybutyric acid와 Malic acid.

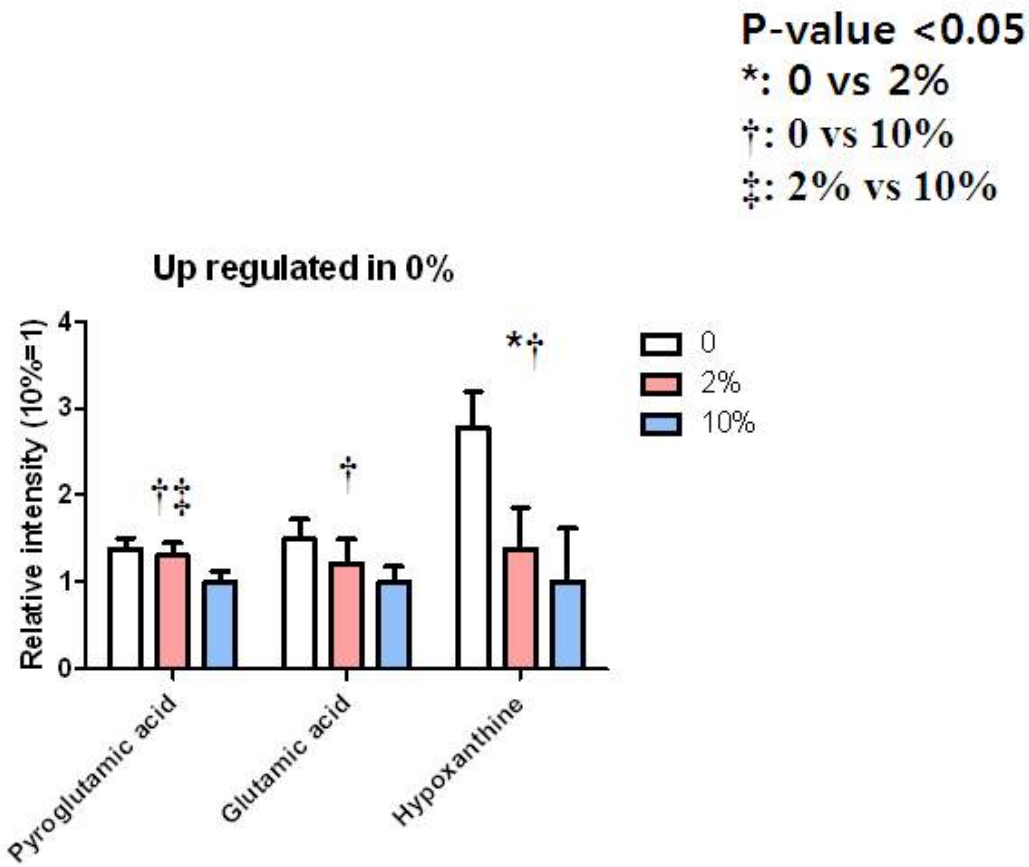

Fig 6. Starvation조건에서 증가한 대사체 Pyroglutamic acid와 Glutamic acid, Hypoxanthine.

3. FBS starvation시 A549세포의 대사과정

3-1. 암세포의 대사과정

세포의 에너지원인 glucose는 세포내의 cytoplasm에서 glycolysis를 통해 pyruvate로 전환이 된다. 정상세포에서 산소가 존재한다면, pyruvate는 미토콘드리아 내에서 TCA cycle을 통해 oxidative phosphorylation이 발생한다. 이 과정을 통해서 ATP를 생산한다. 산소의 농도가 낮다면 pyruvate는 cytoplasm에서 lactate로 바뀌며 NAD+를 생성한다. 하지만 암세포는 산소가 있음에도 불구하고 대부분의pyruvate를 lactate로 전환시킨다. 이는 TCA cycle에서 생성하는 에너지에 비해 훨신 비효율적이다. 암세포는 빠르게 복제해나가는 특유의 특징에 의해 위와 같이 비정상적인 대사과정을 거친다. 이러한 비정상적인 대사과정을 거치면서 암세포는 여러 가지 이득을 얻는다. 첫 번째로 고분자합성을 위해 필요한 구성요소인 acetyl CoA와 NADPH를 충분히 공급한다. 두 번째로 영양분을 필요이상으로 많이 가져가서 주변을 starvation 상태로 만들어서 퍼져갈 수 있는 공간을 확보한다. 세 번째로 지나친 영양분의 흡수는 ROS를 증가시키고, 이는 암세포의 증식을 촉진시킬 수 있다. 또한 glutamine은 세포성장에 있어서 중요한 역할을 하며 glucose와 함께 암세포에 있어서 필수적인 요소이다. Glutamine은 nucleotides와 비필수아미노산을 생성할 때 질소 공급원으로 쓰인다. 이때 glutamine은 amide group을 제공하고 glutamic acid로 전환된다. 게다가 필수아미노산의 흡수와 glucose의 농도가 낮을 때 TCA cycle을 유지하는 중요한 역할도 한다. 또한, lipid와 nucleotide 생합성에 없어서는 안되는 존재이다. 생합성에 필수적인 NADPH 생산을 도울 뿐만 아니라 콜레스테롤과 지방산 합성의 시작물질인 oxaloacetate의 기원이다.

암세포는 정상세포와는 다르게 빠른 증식이 필요하기 때문에 이처럼 대사과정이 비슷하면서도 다른 점이 많이 있다. 이와 같이 암세포에 대한 일반적인 대사과정에 대한 정보를 토대로 starvation을 시킨 암세포에서는 대사과정 중 어떠한 부분에서 차이가 생겼는지 알아보고자 한다.

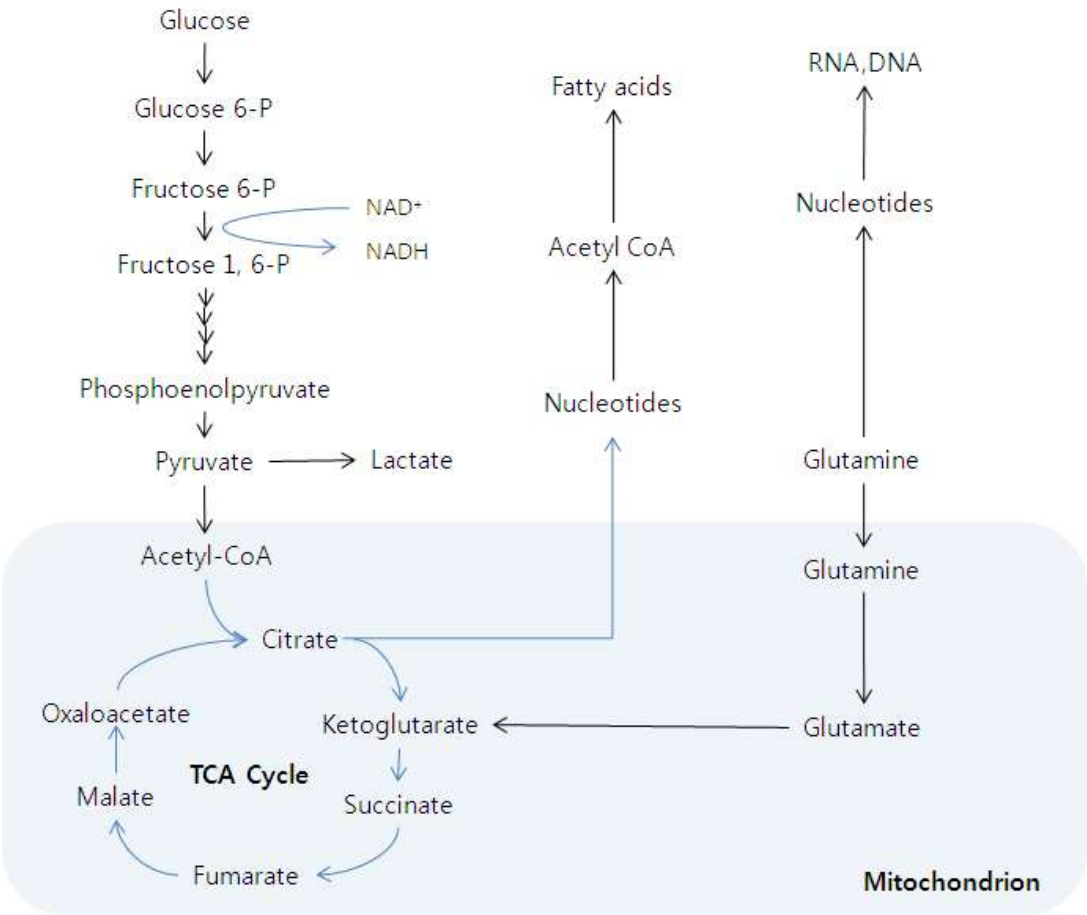

Fig 7. 암세포에서의 전반적인 대사과정.

3-2. Starvation 조건에서 감소한 대사체

우선 3-Hydroxybutyric acid와 malic acid의 양은 정상적인 조건에서 배양한 A549 세포에 비해 starvation 조건에서 감소하였다. 3-Hydroxybutyric acid는 카르복실산 골격을 가지고 있고 사람의 경우는 간에서 acetyl-CoA로 합성이 되어 혈중 glucose 농도가 낮을 때 에너지원으로 사용될 수가 있다. Malic acid는 glutamine 이 lactate로 대사되어 에너지를 생산하는데 중간물질로 작용한다. Malic acid는 cytoplasm으로 배출되어 lactate로 변환되며 NADPH를 생산한다. 여기서 생산되는 NADPH는 암세포에서 NADPH의 주요 공급원으로 예측되며 충분한 NADPH를 생산해서 이를 지방산 합성과 nucleotides 생합성에 이용한다.

폐암환자와 정상인 사이의 대사체들의 차이에 대한 선행된 연구결과가 있었는데 이 연구에서는 폐암환자에서 더 높은 양의 3-hydroxybutyric acid가 검출되었다. 또한 폐암환자는 malic acid를 포함한 대부분의 TCA cycle 관련 대사체들이 정상인에 비해 증가한 것으로 나타났다. 암세포의 에너지 생성과정은 정상세포와는 다르며, 이것에 의해 TCA cycle 관련 대사체들의 양이 증가했다고 말할 수 있다. 따라서 폐암세포 A549가 starvation 상태에 놓였을 때 에너지원인 glucose와 glutamine이 부족하여 암세포의 대사과정이 정상상태와는 다른 과정을 나타냈을 것이다. 에너지원이 부족함에 따라 암세포의 에너지 생산과정이 원활하게 진행되지 않을 것이고, 가장 중요한 부분인 TCA cycle이 제대로 돌아가지 않았을 것이다. TCA cycle은 원활하게 작용하지 않지만 malate가 lactate 생성을 통한 에너지 생성을 위해 꾸준히 cytoplasm으로 빠져나가서 반응이 진행될 것이다. 따라서 starvation 상태에서 malic acid는 생성이 되지 않고 소비되는 양만 증가할 것이다. 이에 따라 TCA cycle의 구성요소 중 하나인

malic acid가 starvation상태에서 감소하는 것으로 나타난 것으로 예상된다.

위의 폐암환자와 정상인의 비교사례를 통해 암세포가 정상적인 대사활동을 할 경우 3-hydroxybutyric acid의 양이 정상상태에 비해 많아진다는 것을 알 수 있다. Starvation 상태에서 감소했다는 것은 3-hydroxybutyric acid와 관련된 대사과정이 starvation에 의해 원활하게 진행되지 않아 3-hydroxybutyric acid의 양의 감소가 나타난 것으로 예측할 수 있다.

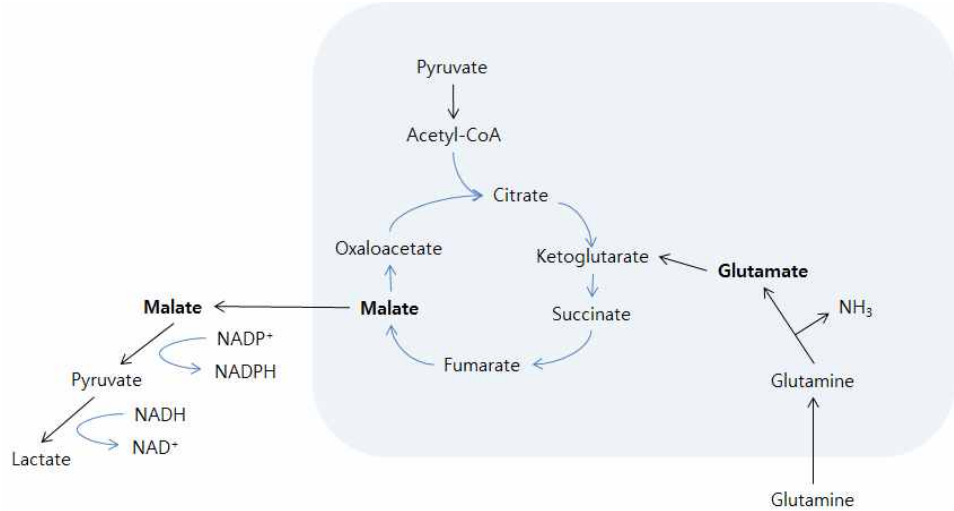

Fig 8. Glutamate와 Malic acid가 포함된 암세포내의 대사과정.

3-3. Starvation 조건에서 증가한 대사체

위에서 언급한 2가지 대사체들과는 다르게 glutamic acid, pyroglutamic acid 와 hypoxanthine의 양은 정상적인 배양조건보다 starvation 조건에서 증가하였다. Glutamic acid는 glutamine 대사의 중간체로 glutamine에서 암모니아가 빠지면 glutamic acid가 된다. Glutamine은 암세포의 대사과정에서 중요한 에너지원으로의 역할을 한다. Gluamine에서 glutamic acid를 거쳐서 ketoglutarate로 전환되어 glucose가 부족할 때 TCA cycle을 보충하는 역할을 한다. Hypoxanthine은 purine 유도체화물이며 주로 nucleic acid의 구성성분으로 발견된다. Hypoxanthine은 adenosine의 대사과정에서와 nucleic acid를 합성할 때 중간체로 작용한다. 이것은 박테리아와 세포에서 기질과 질소공급원으로 필수적으로 필요한 존재이다.

Glutamic acid의 농도가 증가하였다는 의미는 앞에서 언급하였던 malic acid가 감소한 현상과 연관 지어 생각할 수 있다. Starvation 상태가 되면 정상적으로 배양하였을 때와 대비하여 TCA cycle이 원래대로 진행되지 않음에 따라 glutamic acid 가 TCA cycle의 한 부분인 ketoglutarate로 원활하게 바뀔 수 없고 이에 따라 미토콘드리아 내에서 누적이 되어 glutamic acid의 농도가 정상일 때에 비해 증가하였을 것이라고 생각된다.

Hypoxanthine은 아데노신 대사과정의 중간체로서 Xanthine Oxidoreductase(XOR)에 의해서 xanthine으로 대사되고 다시 Uric acid로 최종 대사된다. 하지만 암세포에서 hypoxanthine의 대사효소인 XOR이 감소했다는 보고가 있었고, hypoxanthine과 xanthine은 암세포에서 증가되었고, uric acid는 감소되었다고 한다. 이 의미는 XOR에 의해 대사가 진행되지 않고 다른 경로로 반응했다는 것을 의미한다. Purine 염기로부터 nucleotide를 합성하는 경로가 있는데 이를 salvage pathway라고 한다. Hypoxanthine은 uric acid로 변하지 않고,

salvage pathway를 통해서 암세포의 증식에 필요한 nucleotide를 합성하는 경로로 우회하게 된다. 이 과정에서 starvation이 발생하게 되면, nucleotide를 합성하는 과정이 원활하게 이루어지지 않는다. 따라서 hypoxanthine은 nucleotide로 합성이 되지 않으면서, 또한 XOR의 부족으로 uric acid로 대사도 되지 않기 때문에 양이 증가한 것으로 예측된다.

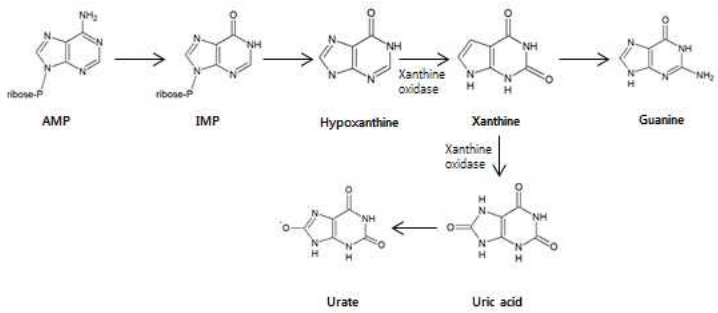

Fig 9. Hypoxanthine의 아데노신 대사과정.

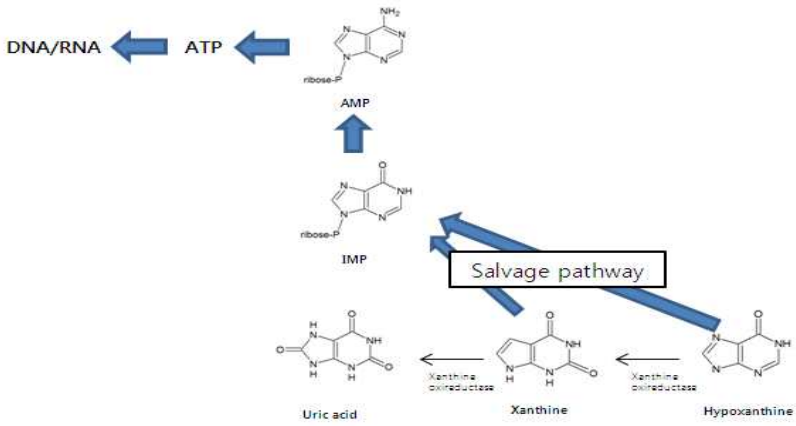

Fig 10. Salvage pathway

Ⅳ. 결론

1. A549세포를 FBS를 세 가지 농도로 조절하여 배양한 뒤 세포들을 모아서 대사체학적인 방법으로 GC/MS를 이용하여 대사체를 분석하였고, 유의적인 차이를 보이는 대사체들에 대해 연구하였다.

2. 분석 결과 3-hydroxybutyric acid 와 malic acid는 starvation 상태에서 감소하였다. 반면에 pyroglutamic acid와 glutamic acid, hypoxanthine 등 3가지 물질은 정상상태에 비해 starvation상태에서 증가하는 결과를 얻었다. 암세포의 대사과정에 대해 문헌조사를 통해 공부하였고, 유의적인 차이를 나타내는 대사체를 적용하여 starvation 시에 대사과정에 생기는 변화에 대해 연구하였다.

3. 본 연구를 통해 A549 세포의 대사과정에 대해 알 수 있었고 암세포의 starvation시에 생기는 대사체들에 대한 변화도 알 수 있었다. 이러한 변화가 추후 A549에 대해 추가적인 대사체연구에 도움이 될 것으로 기대한다.

Ⅴ. 참고문헌

1) Deberardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D., Thompson C. B., 2008. Brick by brick : metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics and Development* 18:54 - 61.

2) Hori, S., Nishiumi, S., Kobayashi, K., Shinohara, M., Hatakeyama, Y., Kotani, Y., Hatano, N., Maniwa, Y., Nishio, W., Bamba, T., Fukusaki, E., Azuma, T., Takenawa, T., Nishimura, Y., Yoshida, M.. 2011. A metabolomic approach to lung cancer. *Lung Cancer* 74(2): 284-292.

3) Kaelin Jr, W. G., Thompson C. B., 2010. Q&A: Cancer: Clues from cell metabolism. *Nature* 465, 562 - 564.

4) Gstraunthaler, G., 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *Altex.* 20, 4/03.

5) Wise, D. R., Thompson C. B., 2010. Glutamine addiction: A new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 35(8), 427-433.

6) Linder, N., Lundin, J., Isola J., Lundin, M., Ravio, K. O., Joensuu, H., 2005. Down-regulated xanthine oxidoreductase is a feature of aggressive breast cancer. *Clinical Cancer Research.* 11, 4372-4381.

7) Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson C. B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. **324**, 1029-1033.

8) Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science*. **123**, 309-314.

9) Deberardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson C. B., 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed celss can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **104**, 19345-19350

10) Jones, R. G., Thompson C. B., 2009. Tumor suppressors and cell metabolim: a recipe for cancer growth. *Genes & Dev*. **23**, 537-548

Abstract

Analysis of metabolites of A549 lung cancer cell during starvation by GC/MS

Hyung Min Kim
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Anaysis
The Graduate School
Seoul National Univerity

Cancer cells need more nutrient than normal cell to survive and grow in the body. Therefore, nutrient near cancer cells are consumed rapidly. To supply these nutrient, vasodilation of microvessel will be happening. At this time, due to rapid consumption of nutrient, it is expected that physiological characteristic of cancer cells will be changed. Thus, study about cancer cells at status of nutrient deprivation could be very important for understanding pathology of cancer. In this study, analysis of change of A549 cell metabolites during in vitro-starvation was done. When cultivate A549 with different nutrient, metabolism in the cancer cells will be changed so that amount of metabolites will be different. During A549 cultivation, amount of FBS was controlled to 0, 2, 10 %. After cultivation, metabolites of these cells were analyzed by GC/MS. By analyzing metabolites, difference in metabolites between normal condition and starvation can be seen. Study about change of metabolites is done with instruments such as GC/MS, LC/MS and NMR. Among

these, GC/MS, which was used in this study, is very useful in studying metabolits because it has library which has various kinds of metabolites. Three kinds of cells were collected with same numbers and it was extracted with Chloroform : Methanol : Water (2 : 5 : 2) and after that methoxyamine and BSTFA (1 % TMCS) was used for derivatizing agent. Anayltical procedures were performed with DB-5 (30 m X 0.25 mm, 0.25 ㎛) GC column. MS was set to scan mode to see the difference of whole possible metabolites. Cell metabolites were identified with authentic standards. As a results, total 64 kinds of metabolites were identified. At the starvation condition, 3-hydroxybutyric acid and malic acid were decreased. On the other hand, pyroglutamic acid, glutamic acid and hypoxanthine were increased in starvation condition. In conclusion, biological pathway which is associated with those five metabolites will affect A549 cells in condition of starvation and these results can be used for additional research.

Keywords: A549, FBS Starvation, GC/MS, Hydroxybutyric acid, Glutamic acid, Hypoxanthine

Student Number : 2012-21580