

Application News

No. 01-00761-ENK

Gas Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry GCMS-TQ™8040 NX

순환 종양 세포(CTCs)의 분리 농축 장치와 GC-MS/MS를 이용한 액체 생검 연구의 촉진

Facilitation of Liquid Biopsy Research using a GC-MS/MS and a Circulating Tumor Cells Isolator

사용자 활용 포인트

- ◆ 볼케이노 플롯의 분석 결과를 대사 경로도에 투영하여 통계적으로 유의미한 차이가 있는 화합물의 대사 경로 위치를 확인할 수 있다.
- ◆ 멀티오믹스 해석 패키지를 이용함으로써 1차 대사물 측정 데이터 뿐만 아니라, 세포나 배지에 관한 데이터를 읽어 특징이 많은 측정 항목(디지털 바이오마커)을 검출할 수 있다.

■ 소개

최근, 액체 생검(Liquid Biopsy)은 암 연구에 있어서 획기적인 기술로서 주목을 받고 있다. 특히 혈액을 이용하여 암의 조기 검출이나 치료 효과의 모니터링을 실시하는 액체 생검은 종래의 조직 생검에 비해 비침습적이고 재검사가 간편하다.

액체 생검을 이용한 암의 조기 발견이나 치료법의 개발에서는 통상 ctDNA가 주로 주목받고 있지만 ctDNA에서는 DNA만을 측정하기 하기 때문에 RNA와 단백질 등 혈중 순환 종양 세포(CTCs)에 대한 해석의 중요성도 커지고 있다(그림 1).

혈액 속에 소량으로 존재하는 CTCs를 손상 없이 살아있는 상태로 분리하기 위해 반도체의 고밀도 미세다공 칩(HDM, High Density Microporous Chip)을 이용하여 동반진단(CDx, Companion Diagnosis)에 활용하거나 암세포에 존재하는 미량의 대사물의 변화를 파악하는 것은 액체 생검 연구에 크게 공헌할 수 있을 것으로 판단된다.

GC-MS/MS(Gas Chromatograph Triple Quadrupole Mass Spectrometer)는 배지 중의 당, 아미노산, 지방산, 핵산, 유기산 등의 1차 대사물을 분석할 수 있지만, 전문 지식과 대사 경로를 찾는 데에는 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 본 뉴스레터에서는 배지를 이용해 GCMS-TQ™8040 NX와 Smart Metabolites Database™ Ver.2로 분석하였다(그림 2).



그림 2. GCMS-TQ™8040 NX (왼쪽) 및 CytoGen사의 Smart Biopsy™ Cell Isolator (오른쪽)

해당 데이터베이스를 사용하면 방법 개발에 필요한 전문 지식과 기술이 필요하지 않으며, 500 성분 이상을 23 분 내에 동시 분석할 수 있다. 시료는 H358 폐암 세포와 H1975 폐암 세포 2종류의 CTC를 CytoGen사 Smart Biopsy™ Cell Isolator로 분리하고, 개별 배지에서 단종으로 세포 수 0 개, 1 개, 10 개, 50 개, 100 개로 각각 배양했다. 통계 해석은 eMSTAT Solution Ver.2와 멀티오믹스 해석 패키지를 이용하여 ANOVA와 대사 경로도를 조합한 가시화법이나 대사 경로도 상에서 CTC수 측정 데이터와 각 대사물의 상관관계를 가시화하여 해석했다.

향후 예상되는 연구대상

miRNA (마이크로 RNA)

miRNAs는 암의 진행과 항암제 치료로 인한 암의 상태와 상관관계가 있어 암의 유착에 대한 생물 지표로 쓸 수 있는 가능성이 높다. 분비된 miRNAs는 암의 생물 지표로서 여러 가지 이점이 있다. 암의 개시, 침윤, 전이와 치료 반응에서 분비된 miRNAs는 유일한 발현 형태가 되어, 분비 miRNAs는 병의 진단, 목표 치료와 병의 예후 예견을 하는 새로운 생물 지표가 될 수가 있다.

목표 연구 대상 (부분적)

CTC (혈중 순환 종양 세포)

종양 세포 중에서 희귀세포(수 억개의 세포 중 하나)이며, '싱글셀 분리 기술'이 필요하며 분리 난이도가 높다. 그러나, 종양 조직을 그 자체를 취하는 것과 마찬가지로 DNA, RNA, 단백질, 오르가넬라(3D 이미징), 세포의 물성(경도 등) 등을 평가할 수 있다. 검출 시, ctDNA 등의 해석 결과와 일치율도 높고 정확도도 높다.

현재의 주류 (포괄적)

ctDNA (혈액 순환 종양 DNA)

현재 연구의 주류 대상은 ctDNA이며, 혈액의 55 %를 포함하는 혈장(Plasma)에 다수 존재하므로 분리가 용이하다. 하지만 DNA만을 분석하고 RNA, 단백질, 유기체, 세포 물성은 관찰할 수 없는 것이 단점이다. 또한 정상 세포 유래 DNA 등 외부 DNA의 혼입, 치료에 의한 종양 파괴에서도 DNA 총량이 오르는 점, 평가 방법이 확립되어 있지 않은 점 등의 해결되지 않은 과제가 있다.

EV (세포외 소포)

세포에서 방출되어 핵이 없고 복제할 수 없다. 지질 이중막으로 둘러싸인 입자로, 동결 용해 등으로 파괴되기 때문에 신중한 취급이 요구된다. DNA, RNA, 단백질을 한 번에 분석할 수 있지만, 현재까지 연구 사례는 ctDNA에 비해 적은 편이다.

cfDNA (혈액 순환 유리 DNA)

세포 안에 존재하지 않고 혈액에 떠돌아다니는 평균 길이 약 170bp의 DNA 조각이다. 암환자의 종양 세포는 세포 자멸사와 괴사가 활발히 일어나 더 많은 DNA를 방출시키는데, 이렇게 종양 세포에서 유래한 cfDNA를 ctDNA라 부른다. 암환자의 혈액에서 증가한 cfDNA는 진단 마커로서 활용성이 높다.

cfRNA (혈액 순환 유리 RNA)

분석이 어려운 것으로 알려져 있으나, cfDNA와 비교하여 융합 유전자(암 발생에 관련된 유전자)를 식별하는데 더 적합(종양 조직의 분석과 일치)하다.

그림 1. 액체 생검(Liquid Biopsy) 연구 대상의 개요

■ 실험

피험자의 혈액 샘플을 산성 시트르산 포도당 용액 A 튜브(BD사, Franklin Lakes, New Jersey, USA)에 채취하였다. CTC 분리 키트 (제품 번호 CIKW10; CytoGen Inc.) 및 Smart Biopsy™ Cell Isolator(제품 번호 CIS030; CytoGen Inc.)를 사용하여 혈액 샘플을 처리하여 CTC를 농축하였다. 희석된 세포 현탁액을 고밀도 미세 다공성 (HDM) 칩을 통해 여과 후, HDM 칩의 세포를 회수하여 마이크로 튜브로 옮겼다.

인간 폐암 세포주 H358 (야생형 EGFR) 및 H1975 (L858R 및 T790M)를 10 % 열 불활성화 소 태아 혈청 및 5 mL 항생제-항진균제 (제품 번호 15240062; Gibco) 및 300 mg/L 글루타민 (제품 번호 11875093; Gibco)을 함유한 RPMI 1640 배지에서 분리하였으며, 배양은 온도 37 °C, 5 % CO₂ 가습 조건에서 배양되었다.

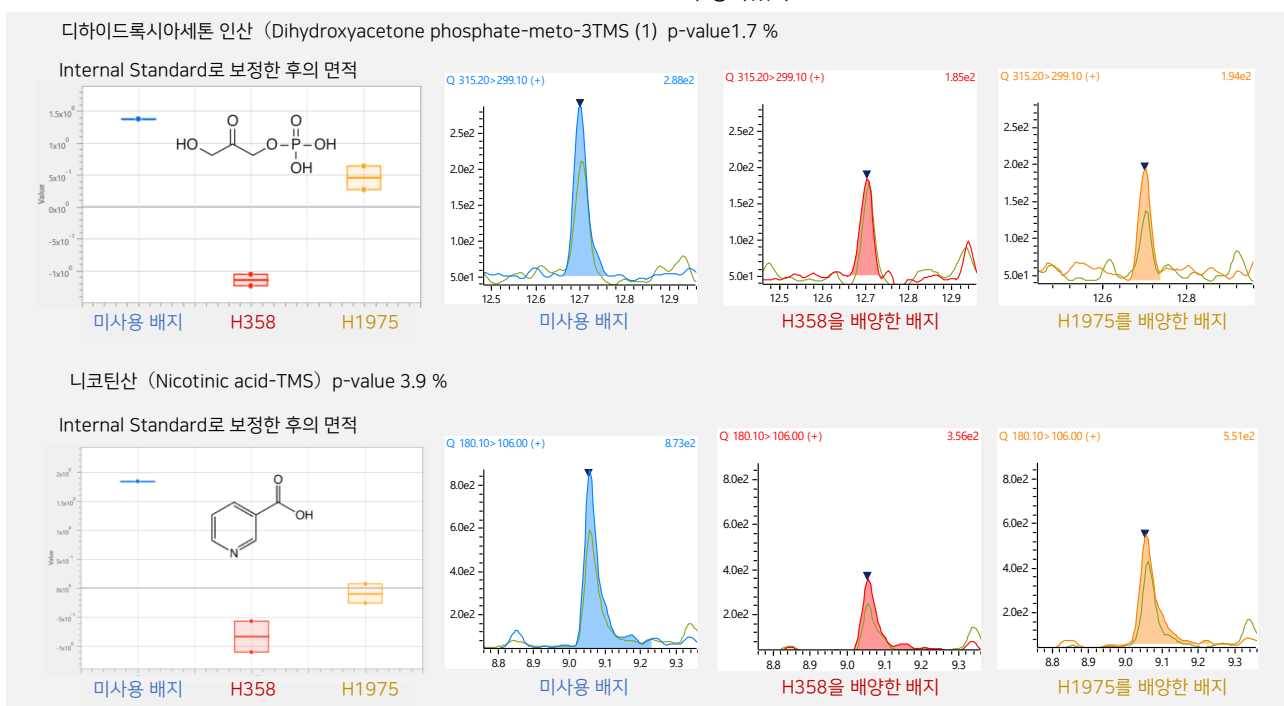
분리 및 배양된 CTCs의 대사물 프로파일에 대한 영향을 확인하기 위해, 11개의 배지 시료 (미사용 배지, 각각의 폐암세포에 대해 1 세포를 포함하는 배지(n=2), 10 세포를 포함하는 배지, 50 세포를 포함하는 배지, 100 세포를 포함하는 배지)를 GCMS-TQ™8040 NX로 분석하였다.

전처리는 「[Metabolomics Pretreatment Handbook](#)」에 따라 준비하였으며, Smart Metabolites Database Ver. 2의 방법에 따라 GC-MS/MS의 Multi Reaction Monitoring (MRM) 모드를 이용하여 23 분의 분석 시간안에 500 성분 이상의 화합물을 고감도로 분석할 수 있었다. 전처리 방법이나 분석 조건에 대한 자세한 내용은 본 뉴스레터의 "관련 뉴스레터" 항목에 기재된 01-00410 "GC/MS를 이용한 유전자 변이 Drosophila의 metabolomics 차이 분석"을 참조할 수 있다.

■ ANOVA를 이용한 대사 경로 분석

ANOVA는 그룹 간의 데이터 차이를 테스트하고 그 차이가 우연이 아닌지 여부를 결정하는 데 사용된다. ANOVA의 결과는 보통 p값일 뿐이지만, 그 결과를 대사 경로에 투영함으로써 생물학적 지식을 폭넓게 해 줄 뿐만 아니라 새로운 연구의 방향성을 발견할 수 있도록 해준다.

그림 3에서는 미사용 배지(청색), 폐암 세포 H358 50 개, 100 개를 배양한 배지(적색)와 폐암 세포 H1975 50 개, 100 개를 배양한 배지(황색)의 p값을 ANOVA로 산출했다. 그 결과 중 p값이 5% 이하인 대사물을 멀티오믹스 분석패키지 대사 경로도에 투영하였다.



ANOVA를 대사 경로도에 투영

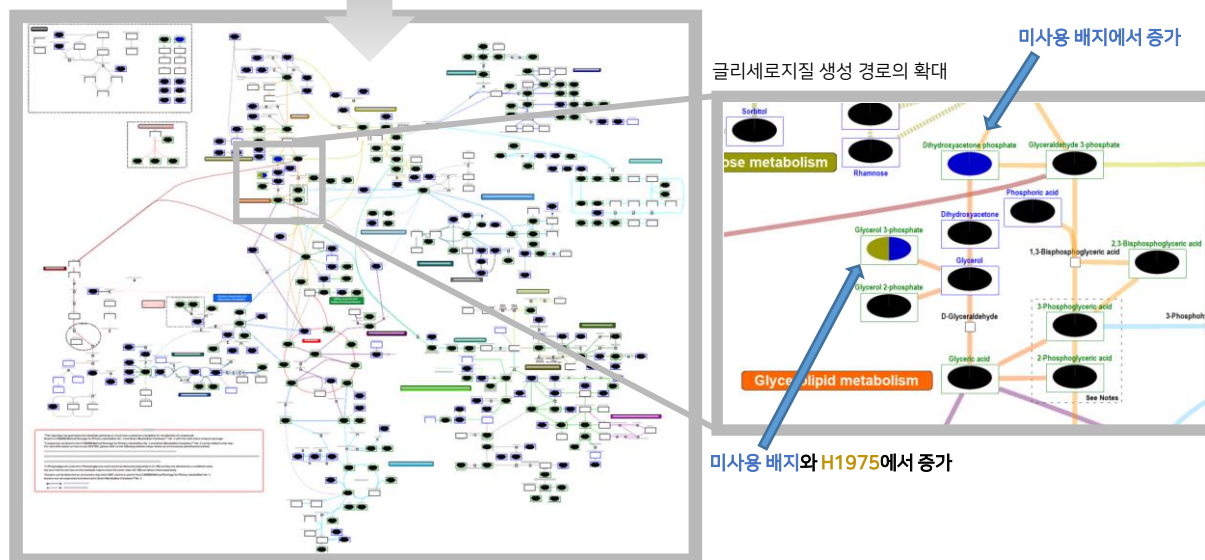


그림 3. eMSTAT에서 ANOVA 분석을 수행한 결과를 멀티오믹스 분석 패키지 대사 경로도에 투영한 결과

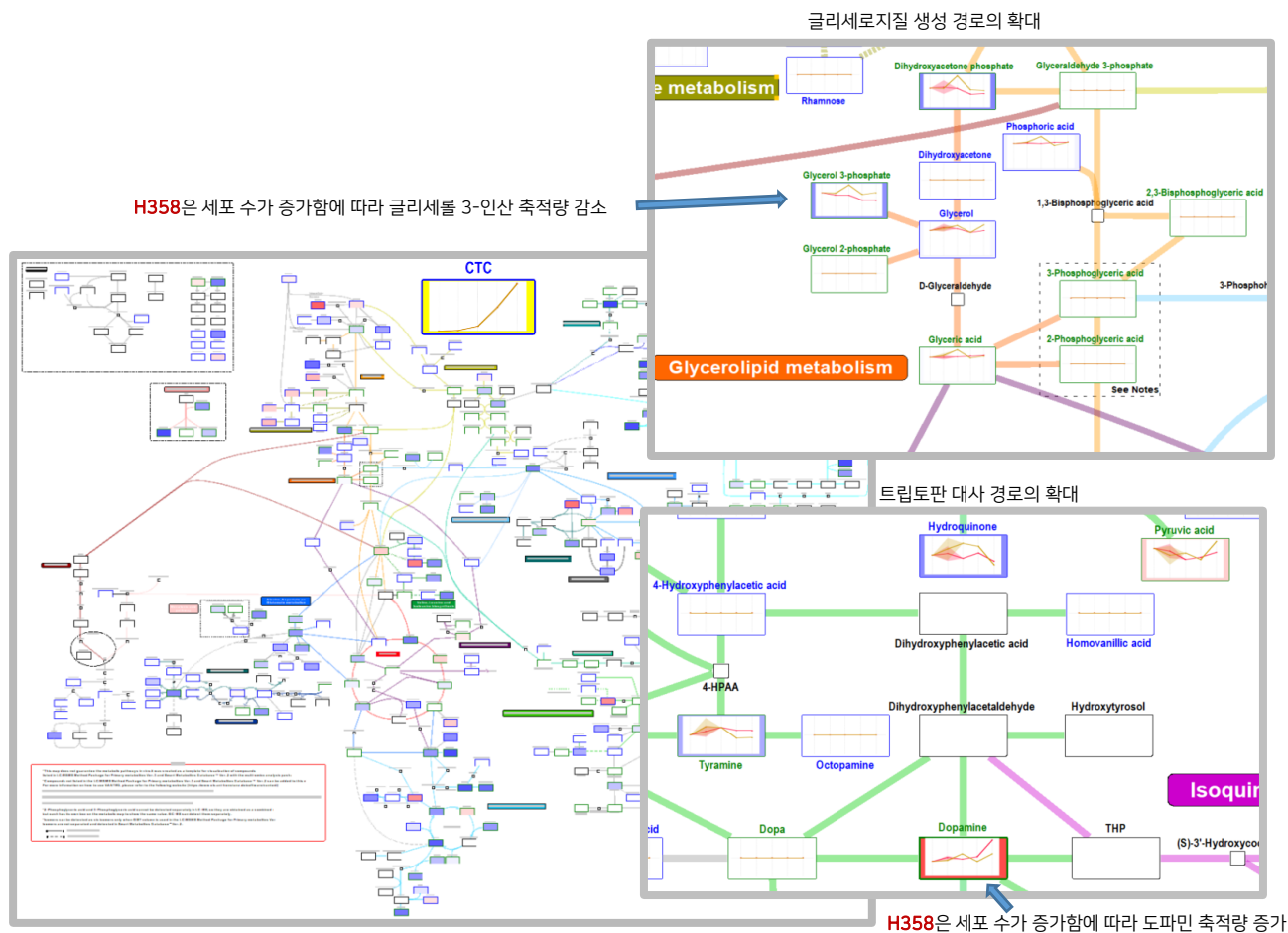


그림 4. CTC 수에 따른 대사 경로 분석 및 대사물의 탐색

그 결과, H358을 배양한 배지는 글리세로지질 대사 경로의 상류역에 존재하는 기질(디하이드록시 아세톤 인산과 글리세롤 3-인산)이 특이적으로 낮은 것을 알 수 있었다. 디하이드록시 아세톤 인산의 부산물로서 메틸 글리옥살 (methyl glyoxal; MG)이 생성되지만, 암세포에서는 해당 과정의 항진에 의해 부산물의 MG가 생성되기 쉬운 것으로 알려져 있다²⁾.

■ 대사 경로도에서 CTC 수와 대사물의 상관분석

멀티오믹스 분석 패키지의 대사 경로 분석 기능을 이용하여 CTC 수 (0 개, 1 개, 10 개, 50 개 및 100 개)에 따른 대사물의 상관 분석을 실시하였다(그림 4).

그 결과, 트립토판 경로의 중간 대사물인 도파민이 H358과 양의 상관관계를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 폐암 환자의 혈장 중 도파민은 건강한 사람보다 유의하게 상승하고 있다는 연구 결과가 과거에 보고되어 있어 향후 인과관계의 해명이 기대되고 있다³⁾.

글리세로지질 생성 경로에서는 글리세롤 3-인산이 H358에서 유의하게 감소하고 있다. 폐암 세포에서는 글리세롤 3-인산은 1,3-비스포스포글리세린산으로 변환하는 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소(NADP+)가 많이 발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이번 실험에서 글리세롤 3-인산이 감소한 이유가 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소(NADP+)의 증가로 인한 것임을 알 수 있었다.

■ 결론

본 뉴스레터에서는 H358 폐암 세포와 H1975 폐암 세포를 CytoGen사 Smart Biopsy™ Cell Isolator로 분리하여 배양했다. GCMS-TQ™8040 NX와 Smart Metabolites Database Ver. 2를 이용하여 배지를 분석하고 멀티오믹스 분석 패키지를 통해 CTC 수와 상관관계가 있는 대사물을 검출하였다.

■ 참고문헌

- 1) [Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers](#), Tokunaga et al., 2024년 5월 24일 참조
- 2) [植物由来生理活性物質の探索と作用機構の解析](#) [식물 유래 생리 활성 물질의 탐색 및 작용 메커니즘의 분석], 金田 典雄, 2024년 5월 24일 참조
- 3) [Circulating dopamine level, in lung carcinoma patients, inhibits proliferation and cytotoxicity of CD4+ and CD8+ T cells by D1 dopamine receptors: an in vitro analysis](#), Baisakhi Saha et al., 2024년 5월 24일 참조

■ 관련 뉴스레터

- 1) GC/MS를 이용한 유전자 돌연변이 Drosophila의 metabolomics 차이 분석 [Application News No.01-00410-JP](#)

01-00761-ENK



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

Copyright © 2024 SHIMADZU group. All rights reserved.