

# Agilent XF Substrate Oxidation Stress Test를 사용해 세포 대사 표현형 및 기능 확인

## 저자

George W. Rogers  
Agilent Technologies,  
La Jolla, CA

Lisa P. Winer  
Agilent Technologies,  
Lexington, MA

Ryan McGarrigle  
Agilent Technologies,  
Cork, Ireland

Alice Gao  
Agilent Technologies  
Lexington, MA

James Hynes  
Agilent Technologies,  
Cork, Ireland

## 개요

Agilent Seahorse XF 기술은 live cell의 에너지 대사를 실시간으로 측정해 세포 건강 및 적합성과 직접적으로 관련된 매우 중요한 기능 정보를 제공합니다. Agilent Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test는 세포 표현형 및 기능과 관련이 있거나 필요한 특정 미토콘드리아 기질에 대한 연구가 가능하도록 핵심 지표를 제공합니다. 이 연구에서는 이러한 분석 전략, 결과 데이터의 예, 암 및 면역 세포 대사와 신약 개발과의 관련성 관점에서 이러한 분석을 가장 잘 적용할 수 있는 방법 등을 종합적으로 논의합니다.

## 서론

오늘날, 대사는 세포의 정상 상태와 질병 상태에서 중요한 세포 기능에 영향을 미치는 핵심 요인으로 여겨지고 있습니다.<sup>1,2</sup> 대조 실험에서의 기질 수요사항을 파악하면 암 치료에서 약물 표적 확인 및 검증, 면역 기능 이상, 심혈관 질환, 신경질환 및 줄기 세포 질병 모델을 포함한 다양한 연구 분야에 정보를 제공해 줄 수 있습니다.<sup>3,4,5</sup>

Agilent Seahorse XF 기술은 염색이 필요 없는 통합 플랫폼으로 XF 분석기, 센서 카트리지, 분석 키트 및 소프트웨어와 원활하게 통합되어 실시간 kinetic 데이터와 함께 기능적 세포 대사 데이터를 제공합니다. 애질런트는 이 플랫폼을 바탕으로 광범위한 세포 기능 평가부터 대사 메커니즘의 특정 세부 사항(그림 S1에서 확인)까지 모든 정보를 얻을 수 있는 다양한 XF 분석 키트를 제공합니다.

최적화된 세포 기질 산화작용을 측정하기 위해 XF Substrate Oxidation Stress Test가 개발되었습니다. 이러한 분석법으로 미토콘드리아 활성을 촉진하는 주요 기질인 긴 사슬 지방산(LCFA), 글루코스/피루빈산 및/또는 글루타민(그림 1)을 연구할 수 있습니다. 특정 기질 산화 경로 억제제를 이용한 XF Cell Mito Stress Test를 통해 종합적인 미토콘드리아 평가를 할 수 있어 기질 수요가 낮을 때(예: 기초 호흡)뿐만 아니라 매우 주요한 기질 의존도가 자주 보여지는, 즉 기질 수요가 높을 때(예: 최대 호흡)의 세포에 대해서도 연구할 있습니다(그림 2). 이러한 키트를 사용하면 특정 기질 산화 과정과 활성화, 증식 및 분리와 같은 근본적인 세포 기능에서 산화 과정이 담당하는 중요한 역할에 대한 연구를 쉽게 할 수 있습니다. 추가적으로 이러한 키트를 사용해 유전적 조작, 약학적 개입 또는 특정 기질 산화와 관련된 특정 질병 관련 미세 환경에 대한 반응 특성을 규명할 수 있습니다.

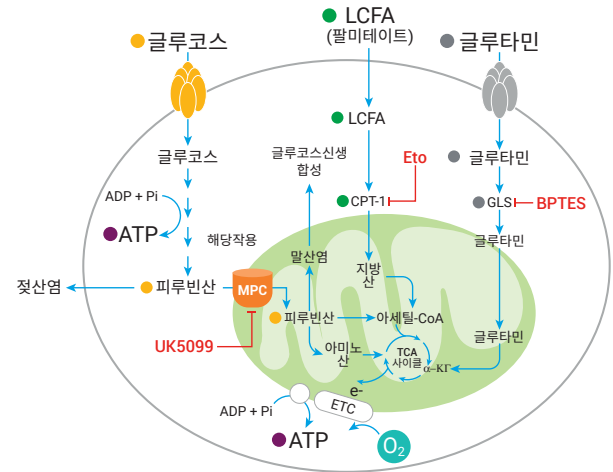


그림 1. 해당작용, TCA 사이클, 전자 전달(ETC), 산화적 인산화(OXPPOS)를 포함한 주요 대사 경로. 글루코스/피루빈산, 글루타민 및 긴 사슬 지방산 산화는 강조 표시되어 있습니다. 빨간색 선/텍스트는 글루코스/피루빈산, LCFA 및 글루타민 대사의 관련 억제제를 나타내며, 특히 해당 기질의 산화를 억제합니다.

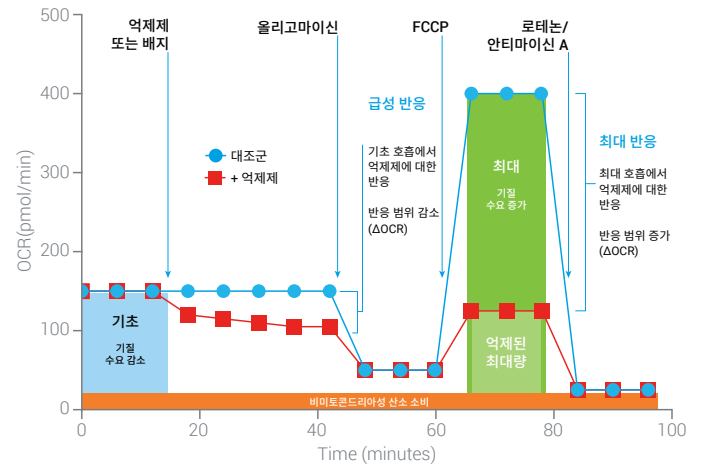


그림 2. 기질 수요에 매우 중요한 호흡 파라미터의 Agilent Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test 프로파일. 연속 화합물 주입을 통해 기초 호흡, 억제제(etomoxir 또는 UK5099 또는 BPTES)에 대한 급성 반응, 억제제 유무에 따른 최대 호흡을 측정합니다. 기초 조건(예: 급성 반응)에서도 최소한의 변화가 측정될 수 있지만, 기질 수요가 높은 조건(예: FCCP)에서 더 큰 반응이 발견되는 경우가 많으며, 이를 통해 대상 기질 산화에 대한 세포 능력의 차이를 확인할 수 있습니다.

## 실험

모든 세포주(cell lines)는 제조업체 권장사항에 따라 배양하였습니다. XF 분석의 경우 A549 세포를 2mM Glutamax와 10% serum을 첨가한 DMEM F12(Corning 10-090-CV)에서 well당  $1.5 \times 10^4$ 개 세포 수로 XF96 세포 배양 마이크로플레이트에 시딩했습니다. C2C12 세포는 4mM 글루타민, 1mM 피루빈산 및 10%의 serum을 첨가한 DMEM high glucose(Gibco 11960)에서 well당  $1.2 \times 10^4$ 개 세포수로 XF96 세포 배양 마이크로플레이트에 시딩했습니다. HepG2 세포는 2mM Glutamax 및 10%의 serum을 첨가한 DMEM low glucose(Gibco 11885)에서 well당  $2.0 \times 10^4$ 개 세포수로 XF96 세포 배양 마이크로플레이트에 시딩하고 배양했습니다. 모든 세포는 하룻밤 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양했습니다. 다음날 기질 산화 분석 배지(Substrate Oxidation Assay Media)(XF DMEM pH 7.4 및 10mM XF 글루코스, 1mM XF 피루빈산 및 2mM XF 글루타민)로 세포를 2회 세척했고 37°C, CO<sub>2</sub>가 없는 조건에서 60분 동안 배양했습니다. 그런 다음 세포 플레이트를 XFe96 분석기로 옮겨 분석 하였으며 포트 A에 Etomoxir(4µM), UK5099(2µM) 또는 BPTES(3µM)를 첨가한 다음 oligomycin(1.5µM), FCCP(1.5µM, 3가지 모든 세포 유형용) 및 rotenone/antimycin A(각 0.5µM)(최종 농도)를 차례로 주입했습니다. (보정을 위해) Cytation 5 기기를 사용해 세포 수를 카운트했습니다.

모든 XF 분석법은 화합물 희석 및 센서카드리지 준비 등 XF Substrate Oxidation 사용자 가이드에 명시된 대로 수행했습니다.

Agilent Seahorse Analytics를 이용해 기초 호흡, 급성 반응 및 최대 호흡의 기질 산화 스트레스 테스트 파라미터를 계산했습니다. 이러한 파라미터는 Seahorse Analytics에 설명되어 있습니다. 각 세포 유형에 따라 억제제를 추가한 후 % 기초 OCR 및 억제제가 존재하는 상태에서의 % 최대 OCR(그림 7)을 Microsoft Excel을 사용해 계산하고 그래프화 하였습니다.

- **억제제 추가 후 % 기초 OCR** = [(기초 OCR + 급성 반응 OCR)/기초 OCR] × 100%
- **억제제가 존재하는 상태에서 % 최대 OCR** = [(최대 대조 OCR - 최대 억제 OCR)/최대 대조 OCR] × 100%

## 재료

| 재료  | 공급업체                 |
|---|----------------------|
| A549 Cell Line                                    | ATCC                 |
| C2C12 Cell Line                                   | ATCC                 |
| HepG2 Cell Line                                   | ATCC                 |
| DMEM/F12 Medium                                   | Corning              |
| DMEM High Glucose Medium                          | Gibco                |
| DMEM Low Glucose Medium                           | Gibco                |
| Glutamax  | Gibco                |
| Serum   | Hyclone              |
| XF96 Tissue Culture Plate                         | Agilent              |
| XFe96 센서 카드리지                                     | Agilent              |
| XF 캘리브레이션 용액                                      | Agilent              |
| XF DMEM pH 7.4 실험 배지                              | Agilent              |
| XF 글루코스   | Agilent              |
| XF 피루빈산   | Agilent              |
| XF 글루타민   | Agilent              |
| XF Long Chain Fatty Acid Oxidation Stress Test 키트 | Agilent              |
| XF Glucose/Pyruvate Oxidation Stress Test 키트      | Agilent              |
| XF Glutamine Oxidation Stress Test 키트             | Agilent              |
| Seahorse XFe96 분석기                                | Agilent              |
| Cytation 5  | BioTek(Agilent의 자회사) |

## XF Substrate Oxidation Stress Test: 실험 전략 및 분석 디자인

XF Substrate Oxidation Stress Test는 XF Cell Mito Stress Test(MST)와 다음의 기질 경로별 억제제가 결합된 실험입니다 (그림 1).

- 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼레이스 1a(CPT1a)로 LCFA 산화를 억제하기 위한 Etomoxir(Eto)<sup>6</sup>
- 미토콘드리아 피루빈산 캐리어(MPC) 억제를 통한 글루코스 또는 피루빈산을 억제하기 위한 UK5099<sup>7</sup>
- 글루타민아제 1(GLS-1)을 통해 글루타민을 억제하기 위한 BPTES<sup>8</sup>(참고: BPTES는 글루타민아제 2(GLS2)는 억제하지 않음)

미토콘드리아 기능을 분석하는 데 널리 사용되는 강력한 실험인 MST를 이러한 억제제와 함께 사용해 특정 대사 기질에 대한 의존도를 밝혀낼 수 있습니다. 기초 호흡률 및 최대 호흡률은 MST를 통해 볼 수 있는 미토콘드리아 기능의 핵심 지표입니다. 기질 산화 측면에서 기초 호흡률과 특히, 최대 호흡률은 세포가 이용 가능한 기질을 전달하고 산화시킬 수 있는 능력에 크게 영향을 받습니다.<sup>9</sup> 이 분석법은 기초 조건에서 세포 기질 수요를 평가하거나 기질 수요가 증가했을 때의 반응을 평가(최대 호흡)하는 데 가장 적합합니다. 그림 2는 표준 기질 산화 분석의 kinetic 프로파일링 및 관련 분석 파라미터를 보여줍니다.

기질 산화 스트레스 테스트를 수행하기 위해 기초 호흡을 확립한 다음에 관련 경로 억제제를 주입했습니다. 억제제에 대한 급성 반응은 여러 측정 주기(일반적으로 6회)로 수행한 후에 oligomycin, FCCP 및 rotenone/antimycin A의 기본 순서에 따라 주입했습니다.

설명된 실험 디자인을 통해 기초 호흡 및 기초 기질 수요 조건에서 경로 억제가 미치는 영향에 대한 데이터를 제공해줍니다. 이와 동시에 최대 호흡에 경로 억제가 미치는 영향의 특성을 규명해 기질 수요가 높은 조건에서 특정 대사 경로의 손상에 대한 세포의 민감도를 보여 줄 수 있기 때문에 이 측정에서 많은 정보를 얻을 수 있습니다.

각 키트는 관련 억제제의 최적화 된(최종) 농도를 사용하여 한개의 기질 테스트에 초점이 맞추어져 있습니다.

- LCFA 산화를 억제하기 위한 Etomoxir(4µM)
- 글루코스 또는 피루빈산의 산화를 억제하기 위한 UK5099(2µM)
- 글루타민(최종 농도)의 산화를 억제하기 위한 BPTES(3µM)

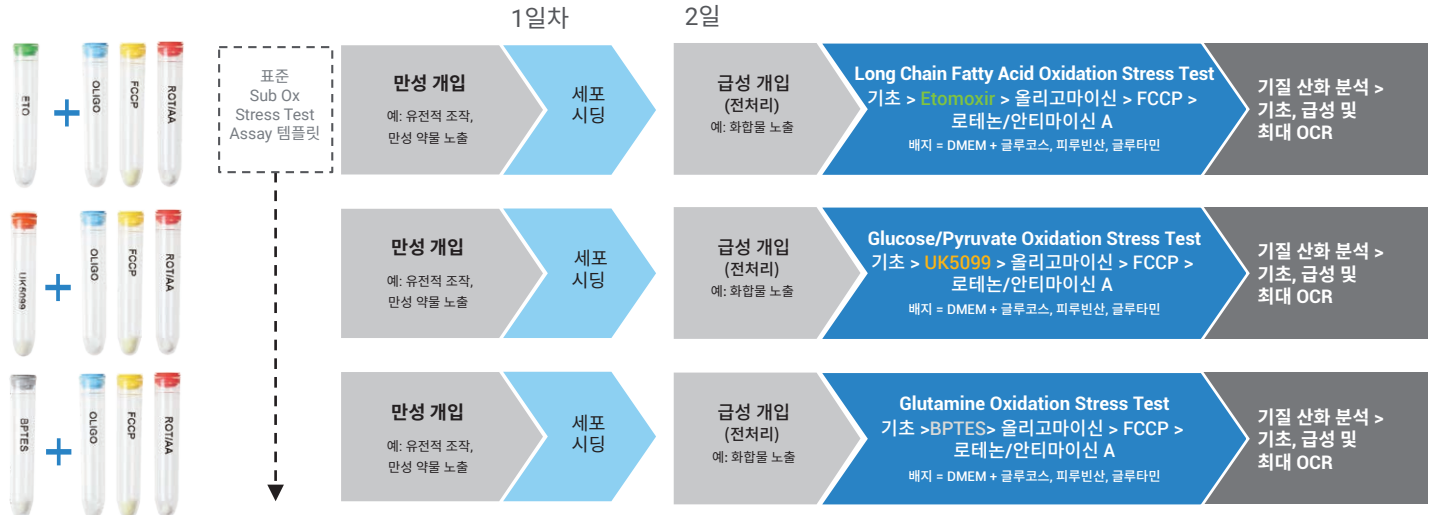
표준 기질 산화 스트레스 테스트 분석은 분석 배지의 글루코스 (10mM), 피루빈산(1mM) 및 글루타민(2mM) 기질의 포화 조건에서 수행하도록 디자인 되어 있습니다. 긴 사슬 지방산은 세포 속 지질/LCFAs의 내인성 저장소에서 유래되며, 이는 세포 유형에

따라 달라집니다. 그림 3은 각 XF Substrate Oxidation Stress Test에 따른 표준 분석법 및 분석 조건을 보여줍니다. 사용한 억제제의 종류를 제외하고 분석법은 동일합니다.

억제제에 대한 반응(그림 2)은 정해진 실험 조건에서 세포가 해당 특정 기질을 요구하거나 해당 특정 기질에 의존한다는 점을 보여줍니다. 아래 논의 섹션에서 더 자세하게 다루겠지만, 일반적으로 이 표준 산화 분석은 다음과 같은 의문점이 있을 때 사용될 수 있도록 디자인 되었습니다.

- 세포가 특정 기질에 대한 수요가 있습니까?
- 세포가 특정 기질에 지나치게 의존합니까? 아니면 다른 기질로 세포 수요를 충족할 수 있습니까?
- 유전적 조작 또는 약물 노출과 같은 개입이 세포에 적용되는 경우 미토콘드리아 기질의 수요 또는 의존성이 어떻게 영향을 받습니까?

대부분의 XF 분석과 달리 기질 산화 스트레스 테스트는 연구자가 디자인한 전처리 조건 또는 개입 조치 후에 수행하는 것이 일반적입니다. 이는 세포에 대한 만성 개입(예: 유전적 조작 또는 장기적인 약물 노출)(XF 분석의 시 ~ 일 업스트림) 또는 XF 분석 직전 급성 개입(예: 약물 노출)으로 나타납니다(그림 3). 몇몇 경우에는 만성 개입과 급성 개입 모두를 적용하는 경우(예: 화합물 노출을 통한 유전적 기능 부전 회복)도 있습니다. 이러한



**그림 3.** Agilent Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test를 사용해 미토콘드리아 기질 수요 또는 의존성을 연구합니다. 각 키트는 관련 억제제(LCFA 산화 억제를 위한 Etomoxir, 글루코스 또는 피루빈산 산화 억제를 위한 UK5099 및 글루타민 산화 억제를 위한 BPTES)를 사용해 단일 기질을 테스트하는 데 초점을 맞추고 있습니다. 만성 또는 급성 개입(유전적 조작/약물 노출)은 이러한 조절이 특정 미토콘드리아 기질 산화에 미치는 영향을 이해하기 위해 분석 초기(업스트림)에 수행할 수 있습니다. 자세한 정보는 본문을 참조하십시오.

키트는 일련의 개입 또는 화합물이 특정 기질 산화에 어떻게 영향을 미치는지를 연구하기 위해 개별적(예: 하나의 특정 기질에 초점을 맞춤)으로 사용하거나 상호보완적(예: 두 개 이상의 기질에 초점을 맞춤)으로 사용해 기질 산화 및 미토콘드리아 기능과 관련된 특정 개입의 전체적인 영향을 설명할 수 있습니다. XF Substrate Oxidation Stress Test 사용자 가이드는 다양한 실험 시나리오를 바탕으로 하는 여러 가지 분석 템플릿 디자인을 제시하며 그림 4는 보여진 데이터를 생성하는 데 사용되는 간단한 분석 디자인 템플릿을 설명하고 있습니다.



**그림 4.** 여러 키트/억제제를 사용한 기질 산화 스트레스 테스트용 Agilent XFe96 분석 템플릿. 그림 지정 및 대조군(포트 A에서 실험 배치 주입)을 포함해 세 가지 다른 억제제로 각 세포 유형을 테스트하기 위한 플레이트 레이아웃. 이 템플릿을 3번 반복 했으며, 세포 유형(A549, C2C12 또는 HepG2)만 변경했습니다. 기타 모든 분석 템플릿 정보 및 XF 기기 실행 명령은 분석 전반에서 동일합니다.

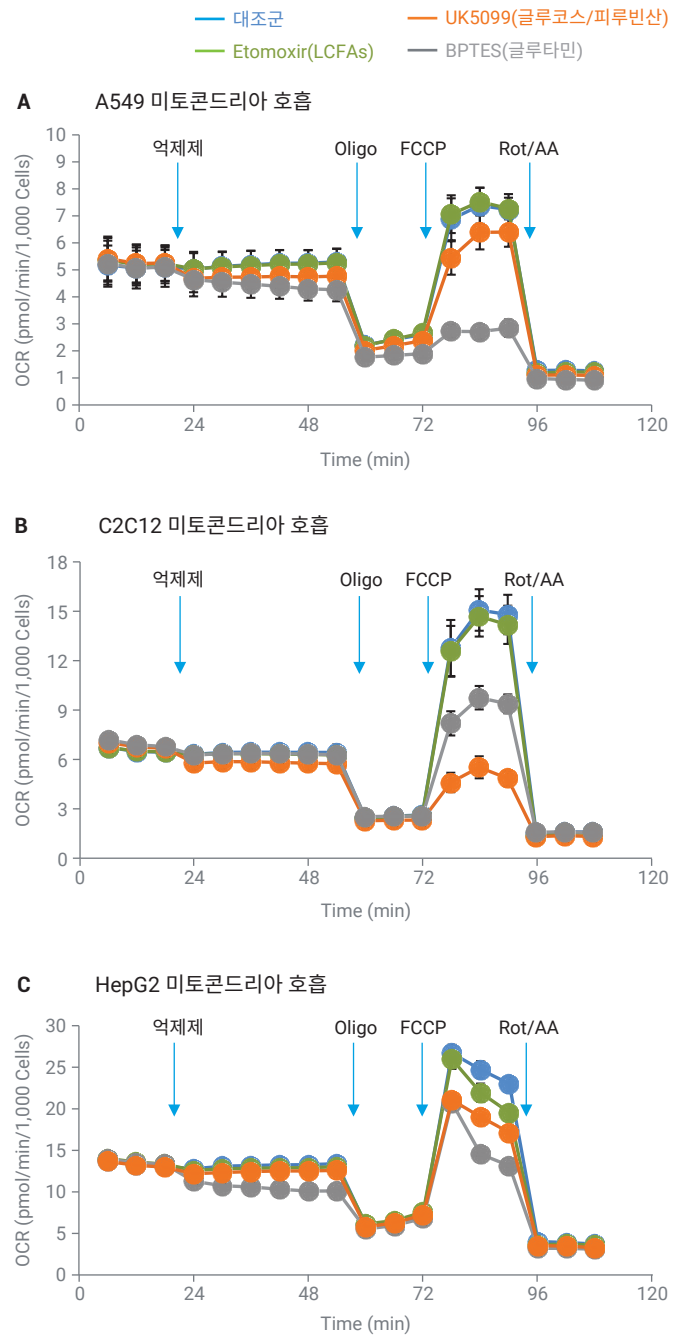
구체적인 긴 사슬 지방산 산화(LCFAO) 연구를 위한 별도의 자세한 프로토콜 및 전용 키트도 이용할 수 있습니다. 이 키트는 XF Palmitate-BSA 기질을 포함해 추가 구성 요소를 제공하며, 분석 프로토콜은 XF Substrate Oxidation Stress Test 사용자 가이드에 상세하게 설명되어 있습니다.

## 결과 및 토의

### XF Substrate Oxidation Stress Test 응용

세 가지 기질 산화 스트레스 테스트의 각 키트 하나씩(글루코스/피루빈산, 긴 사슬 지방산 및 글루타민)을 사용했으며, 세 가지 표준 세포주를 앞에서 설명한 표준 분석법 및 템플릿(그림 2 ~ 4)에 따라 실험 했습니다. 세포 배양, 세포 시딩 및 XF 분석 준비에 대한 모든 세부 정보는 이 문서의 실험 섹션과 XF Substrate Oxidation Stress Test 사용자 가이드에 설명 되어 있습니다.

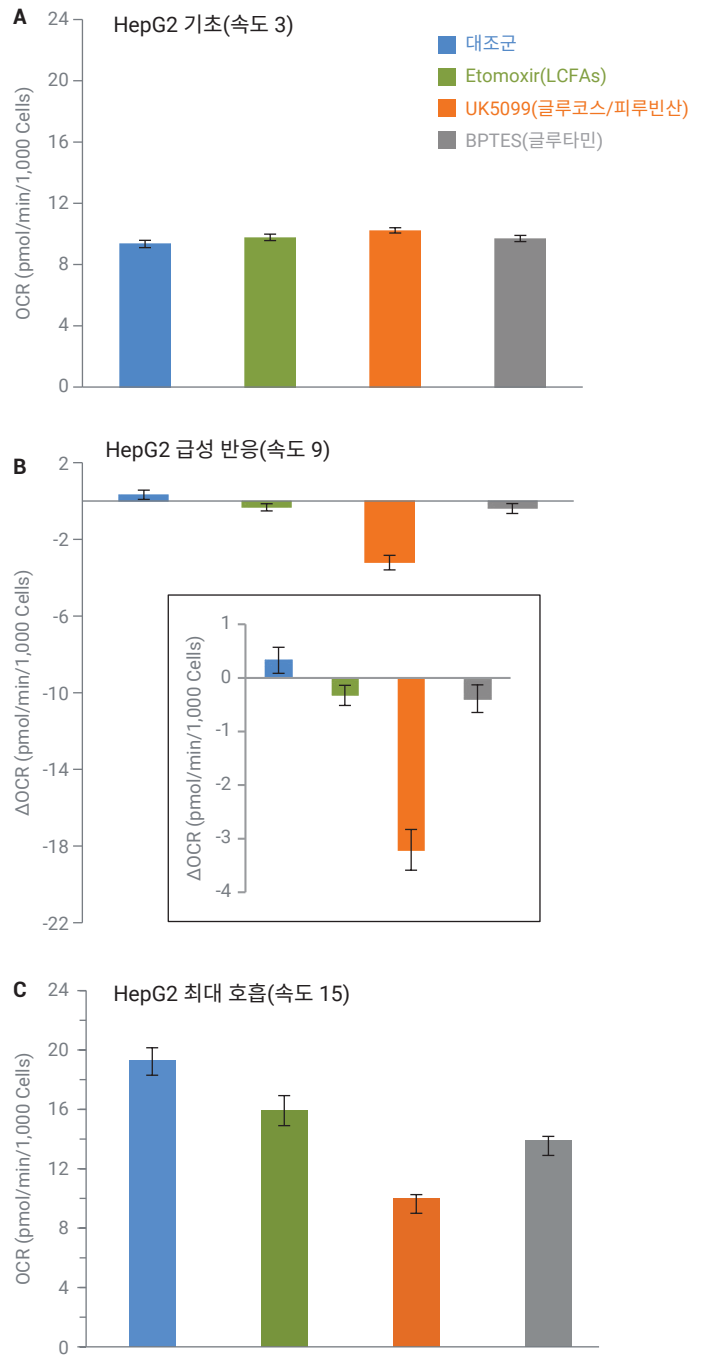
그림 5(패널 A, B 및 C)는 A549, C2C12 및 HepG2 세포 각각에 대한 kinetic OCR 변화를 보여줍니다. HepG2 세포의 기초 호흡, 급성 반응 및 최대 호흡에 대한 기질 산화 스트레스 테스트 파라미터는 그림 6과 같습니다.



**그림 5.** XF Glucose Pyruvate, Long Chain Fatty Acid 및 Glutamine Oxidation Stress Test 키트를 사용해 A549, C2C12, HepG2 세포 간의 기질 산화 비교. A549(A), C2C12(B) 및 HepG2(C) 세포는 Agilent XFe96 세포 배양 플레이트에 시딩해 하룻밤 동안 배양했습니다. 분석 배치(대조군, Etomoxir(LCFA 산화), UK5099(글루코스/피루빈산 산화) 또는 BPTES(글루타민 산화)를 주입한 후 oligomycin, FCCP 및 rotenone/antimycin A를 일반적으로 순차 주입하는 XF Substrates Oxidation Stress Test를 통해 세포를 테스트했습니다. XF 실험 배지 = XF DMEM, pH 7.4 + 10mM 글루코스, 1mM 피루빈산 및 2mM 글루타민. 각 세포 유형은 3일 동안 1회씩(예: n = 3) 실험했으며, 결과 데이터는 Agilent Seahorse Analytics를 사용해 취합하고 처리했습니다. 오차는 ±SEM(측정표준오차)으로 표기 되었습니다.

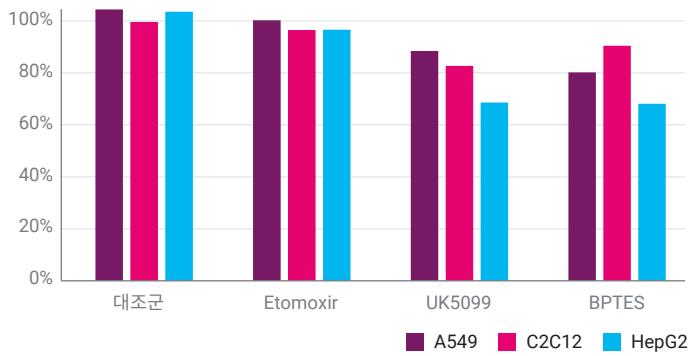
각 세포 유형에 대한 기초 호흡 파라미터를 확인 했을 때 예상했던 결과가 나왔으며, 억제제를 추가하기 전 모든 조건에서 동일한 기초 OCR이 나왔습니다. 억제제 주입 직후 기초 실험 조건에서의 호흡과 관련해 각 세포 유형에 상대적으로 작지만, 차이가 나는 수준의 급성 반응이 나타났습니다. 하지만, 최대 호흡 조건(예: 미토콘드리아에 의한 기질 수요가 더 높을 때의 조건)에서는 억제제에 대한 반응이 유의미하게 증가했으며, 억제제에 따른 다른 반응이 테스트 한 세 가지 세포 유형에서 명확하게 나타났습니다.

예를 들어, A549 세포(그림 6A)에서 BPTES에 대한 반응은 크게 나타났지만, UK5099에 대한 반응은 훨씬 더 적었고, Etomoxir에 대한 반응은 관찰되지 않았습니다. 이는 A549 세포가 기질 수요가 높은 조건에서 글루타민 산화에 상당히 의존한다는 점을 보여주는 것입니다. 이와 비교해 C2C12 세포는 UK5099 및 BPTES(그림 6B)에 상당한 반응을 보이며 이는 최대 기질 수요 조건에서 이 두개의 기질 모두 세포에 필요함을 보여줍니다. 반대로 HepG2 세포는 최대 호흡 조건(그림 6C)에서 글루코스/피루빈산, LCFA 및 글루타민에 보다 균형잡힌 의존성을 나타냈는데, 이는 UK5099, Etomoxir, 및 BPTES 각각에 대한 상당한 반응으로 알 수 있습니다. 그림 7은 억제제를 추가한 후 % 기초 OCR과 세 가지 세포 유형에 억제제가 존재할 때의 % 최대 OCR을 요약해 보여줍니다. 기질 수요 증가로 인한 미토콘드리아 기질 의존성을 평가할 때 최대 호흡변화는 가장 유용한 파라미터 입니다.

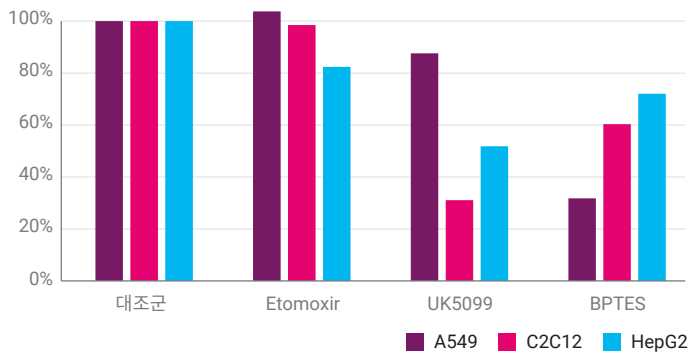


**그림 6.** HepG2 세포의 기초 호흡, 급성 반응 및 최대 호흡에 대한 기질 산화 스트레스 테스트 파라미터 예. (A) 기초 호흡률. (B) 급성 반응: 이 값은 기초 호흡률에 대한 OCR의 변화( $\Delta$ )로 표시합니다. (C). 각 억제제가 있을 때 최대 호흡률. 그래프 및 값은 그림 5에서 확인할 수 있는 것처럼 Agilent Seahorse Analytics를 사용해 kinetic 변화에서 도출합니다. A549 및 C2C12 세포에 대해서도 동일한 파라미터를 계산했습니다(데이터는 표기하지 않음).

**A** 억제제 추가 후 % 기초 OCR



**B** 억제제가 존재하는 상태에서의 % 최대 OCR



**C**

| % 기초 OCR | LCFA (Etomoxir) | 글루코스/피루빈산 (UK5099) | 글루타민 (BPTES) |
|----------|-----------------|--------------------|--------------|
| A549     | 100%            | 88%                | 80%          |
| C2C12    | 96%             | 83%                | 90%          |
| HepG2    | 97%             | 69%                | 68%          |

**D**

| % 최대 OCR | LCFA (Etomoxir) | 글루코스/피루빈산 (UK5099) | 글루타민 (BPTES) |
|----------|-----------------|--------------------|--------------|
| A549     | 104%            | 88%                | 32%          |
| C2C12    | 97%             | 31%                | 60%          |
| HepG2    | 82%             | 52%                | 72%          |

**그림 7.** A549, C2C12 및 HepG2 세포의 기질 산화 비교. (A) 억제제 추가 후 % 기초 OCR 및 (B) 억제제가 존재하는 상태에서의 % 최대 OCR(그림 6의 각 억제제와 관련된 데이터에 기반) 표 C 및 D는 패널 A 및 B의 데이터 각각을 요약해 보여줍니다. % 값 계산은 실험 섹션을 참조하십시오. 기초 호흡 조건에서 급성 반응과 비교해 최대 호흡(기질 수요 증가)에서 억제제에 대한 민감도가 증가하고 세포 유형에 따라 억제제에 대한 반응이 크게 달라진다는 점에 참고하십시오.

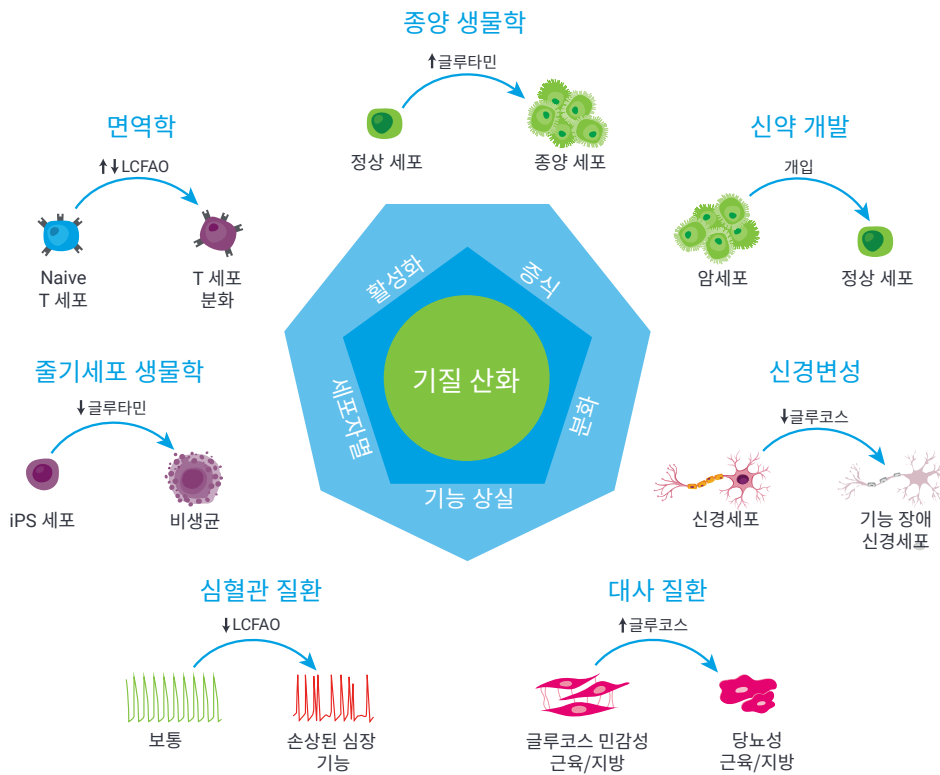
## 암 및 면역 세포 대사, 신약 연구 및 제시된 응용 분야와 기질 산화의 관련성

기질 의존성을 이해하는 것은 많은 질병의 치료 기회를 확대하는데 있어 매우 중요합니다. 따라서 대사를 조절하는 유전자, 단백질 및 경로를 연구하는 것은 광범위한 질병에 대한 새로운 목표를 수립하는 데 있어 유용한 방법입니다(그림 8). 새로운 정보들에 따르면, 특정 미토콘드리아 기질의 산화를 포함해 대사 산물 그 자체가 증식, 분화 및 기능 장애/질병과 관련한 세포 기능 및 표현형을 촉진 시킬 수 있습니다.<sup>5</sup>

암세포 증식은 기질 가용성에 의해 촉진됩니다. 기질은 암세포의 악성화와 증식을 추진할 뿐만 아니라 특정 기질의 가용성은 종양 미세 환경의 주요 특징으로, 무엇보다도 화학 치료 효율성에 영향을 미칩니다.<sup>10</sup> 의약품 개발과 관련해 암세포 대사에서 기질 요구사항을 깊이 있게 이해하는 것이 매우 중요합니다. 암 치료 전략은 피루빈산, 글루타민 및 지방산 산화뿐만 아니라 해당작용,

TCA 사이클, 전자전달(ET), 산화적 인산화(OXPHOS)를 포함한 여러 가지 대사 경로를 표적으로 합니다(그림 1). 예를 들어, 글루타민 산화가 쥐의 p53 KrasG12D 폐 종양<sup>11</sup>에서는 미비한 것으로 나타났지만, 여러 *in vitro* 연구에서는 PDAC 세포를 포함해 글루타민 산화가 중요한 역할을 하는 것으로 나타났습니다. 이는 호흡이 아스파르트산염 생합성을 시뮬레이션 한다는 측면에서 암세포 증식에서 합성대사작용을 한다는 점을 보여주는 것입니다<sup>12</sup>

전립선 암세포에서 가장 풍부하게 사용되는 생체에너지 경로 중 하나는 증가된 팔미테이트 흡수와 지방산 산화이며, 종양 세포의 생체에너지 요구를 충족하기 위한 대체 경로의 역할을 한다는 점이 입증되었습니다. 여기서 한 발 더 나아가 췌장암세포가 특히 영양이 부족한 조건에서 미토콘드리아의 산화적 인산화에 의존하고, 미토콘드리아 대사가 중요한 대사 취약성을 나타낸다는 점을 보여주는 새로운 증거가 있습니다.<sup>12</sup>



**그림 8.** 세포 표현형 및 기능(기능 이상)을 유발하는 미토콘드리아 기질 산화의 예. Agilent Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test 분석은 특정 세포 표현형 및 기능과 관련이 있거나 필요한 특정 미토콘드리아 기질에 대한 연구 및 이해를 쉽게 할 수 있도록 해줍니다.



실험 디자인과 관련해 그림 9A는 자연적이든 조작에 의한 것이든 암 유형의 여러 유전 변이를 테스트하는 데 있어 가능한 한 가지 시나리오를 개략적으로 보여주고 있습니다. 이는 세포가 비슷하거나 또는 고유한 기질 산화 "특징"을 가지고 있는지 이해하기 위한 것으로, 세포 증식 또는 변형과 관련이 있는 기질입니다. 또한, 이러한 정보는 대사 역할에 대한 정보를 제공함으로써 치료법 발견에 도움이 됩니다.

세포 에너지 대사는 면역 세포 기능 및 계통 실행(lineage commitment)의 지표이자 제어 요소로 많은 면역 세포 경로에 영향을 미치는 것으로 여겨지고 있습니다. 흥미롭게도 대사 산물 그 자체가 면역 세포 분화 및 기능에 직접 영향을 미칠 수 있습니다.<sup>5</sup> 따라서 대사 메커니즘과 대사 산물 생성의 변형을 통해 면역 기능을 조절할 수 있습니다. 예를 들어, 글루타민 대사는 TCA 사이클에 연료를 제공해 M2 대식세포 분극화에서 매우 중요한 역할을 담당하고, '훈련된' 면역에서 발견되는 안정적인 표현형 생성을 촉진하지만,<sup>13</sup> 양성 중앙 기억 T 세포는 지방산과 트리글리세라이드를 합성하기 위해 글루코스와 글리세롤을 유입한 다음에 지질분해를 통해 가수분해하는 방식으로 지방산 산화(FAO)에 연료를 제공하는 것으로 확인되었습니다.<sup>14</sup>

면역 세포 기능 및 기질 산화 분석과 관련해 그림 9B는 XF Substrate Oxidation Stress Test를 다양한 유형의 면역 세포 (naïve, activated, memory 등)와 함께 사용해 정상적인 세포 분화 또는 기능을 할 때 하나 또는 그 이상의 기질에 대한 기질 의존성을 연구하고 잠재적으로 특정 기질의 산화를 통해 면역 세포 운명을 조작 또는 제어하는 방법을 보여줍니다.

여기서 면역 세포 활성화, 분화 및 기능을 변경하기 위한 중요한 메커니즘으로 대사 프로그래밍이 새롭게 이용되는 것입니다.<sup>15</sup> 면역 반응을 구성하는 다양한 세포의 대사 요건은 표현형과 기능을 분리할 수 있는 독창적 기회를 제공합니다. 암 면역 치료를 위한 한 가지 접근 방식은 자가 T 세포를 *ex vivo* 배양하고 유전적으로 조작한 다음에 키메라 항원 수용체 (CAR)-T 세포 치료를 포함해 양자면역세포이입(adoptive transfer) 프로토콜에서 다시 체내에 주입하는 것입니다. 여기서 T 세포는 T 세포 활성의 자극 경로와 특이 항암 항체 펩타이드를 연결하는 키메라 단백질 발현하기 위해 유전적으로 프로그래밍되어 있습니다.<sup>3</sup> 종양내 조절 T 세포 (Treg cells), 골수 유래 억제 세포 및 M2 대식세포와 같은 억제 면역 세포를 대상으로 하는 연구가 최근에 이루어지고 있습니다. 이러한 모든 하위집단은 대사 프로파일이 뚜렷하게 구별되기 때문에 매우 흥미로우며, 이는 유전적 조작 또는 약물 노출을 통해 상대적으로 표적에서의 높은 수준의 특이성을 얻을 수 있음을 시사합니다.<sup>3</sup>

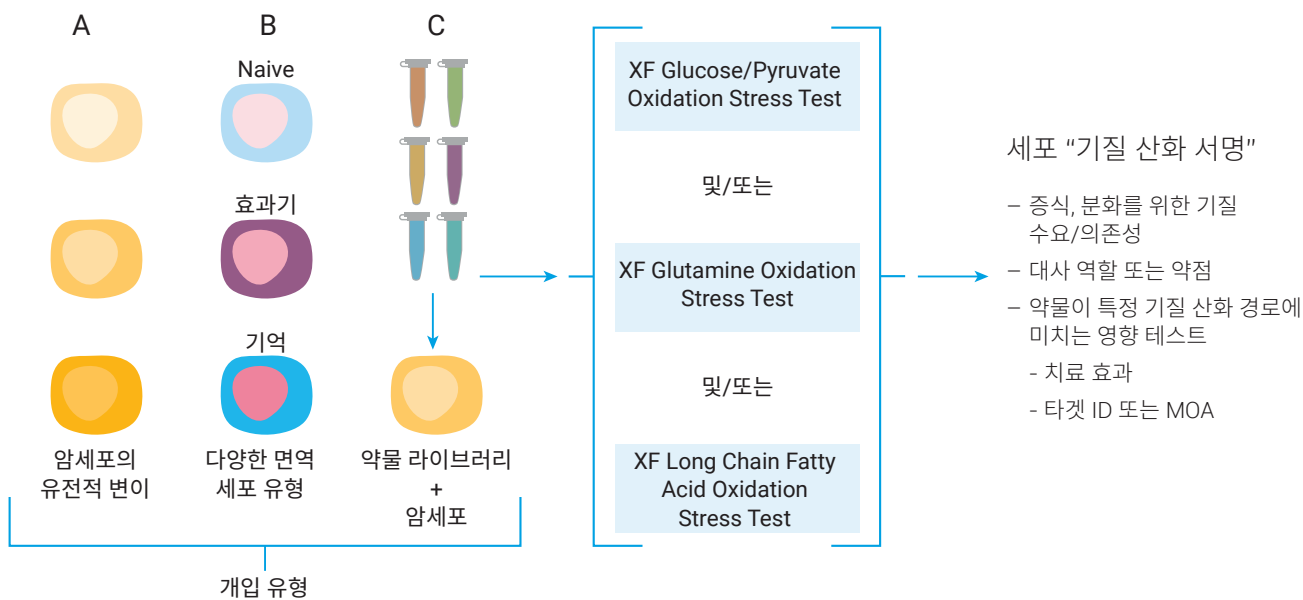


그림 9. 기질 산화 스트레스 테스트 분석 디자인의 예. (A) 암세포 생물학, (B) 면역 세포 기능 및 (C) 신약 연구 분야에서 Agilent XF Substrate Oxidation Stress Test를 적용할 수 있는 잠재적인 실험 디자인. 더 자세한 내용은 결과 및 논의를 참조하십시오.

의약품 테스트 및 개발을 위한 실험 디자인과 관련해 이러한 유형의 분석은 특정 미토콘드리아 기질 산화 경로에 대한 약물의 영향을 테스트할 수 있습니다. 이를 통해 화합물이 기능 이상 세포에 미치는 잠재적인 치료 영향을 이해하거나 약물 표적 확인을 가능하게 하고 작용 메커니즘을 더 잘 설명할 수 있습니다. 여기서 약물에 대한 노출 시간(만성 또는 급성)과 약물 농도와 같은 변수를 연구할 수 있습니다(그림 9C).

## 결론

이 연구는 특정 세포 기능 또는 표현형과 관련이 있거나 필요한 기질을 이해하는 데 사용하는 Agilent XF Substrate Oxidation Stress Test의 분석 디자인 및 개념 검증 절차(POC)를 소개합니다. 이러한 키트는 미토콘드리아의 연료 역할을 하는 세 가지 주요 기질, 즉, 긴 사슬 지방산, 글루코스/피루빈산 및/또는 글루타민을 평가해 세포 기질 산화를 측정할 수 있는 편리하고 빠른 최적화 솔루션으로 구성되어 있으며, 기존의 endpoint 기질 흡수 또는 이용 분석에서는 확보할 수 없었던 다중 파라미터 정보를 풍부하게 실시간으로 제공합니다. 이 실험 디자인은 세포에 특정 기질에 대한 수요가 있는지, 세포에 대한 개입이 미토콘드리아에 의한 특정 기질 산화에 영향을 미치는지를 연구하고자 할 때 사용하는 것이 좋습니다. 이러한 기능 정보는 세포가 기질의 산화를 변화시켜 핵심적인 세포 기능인 활성화, 증식 및 분화를 어떻게 수행하는지를 연구하는 데 도움을 줍니다.

## 정량 대사 및 에너지 표현형

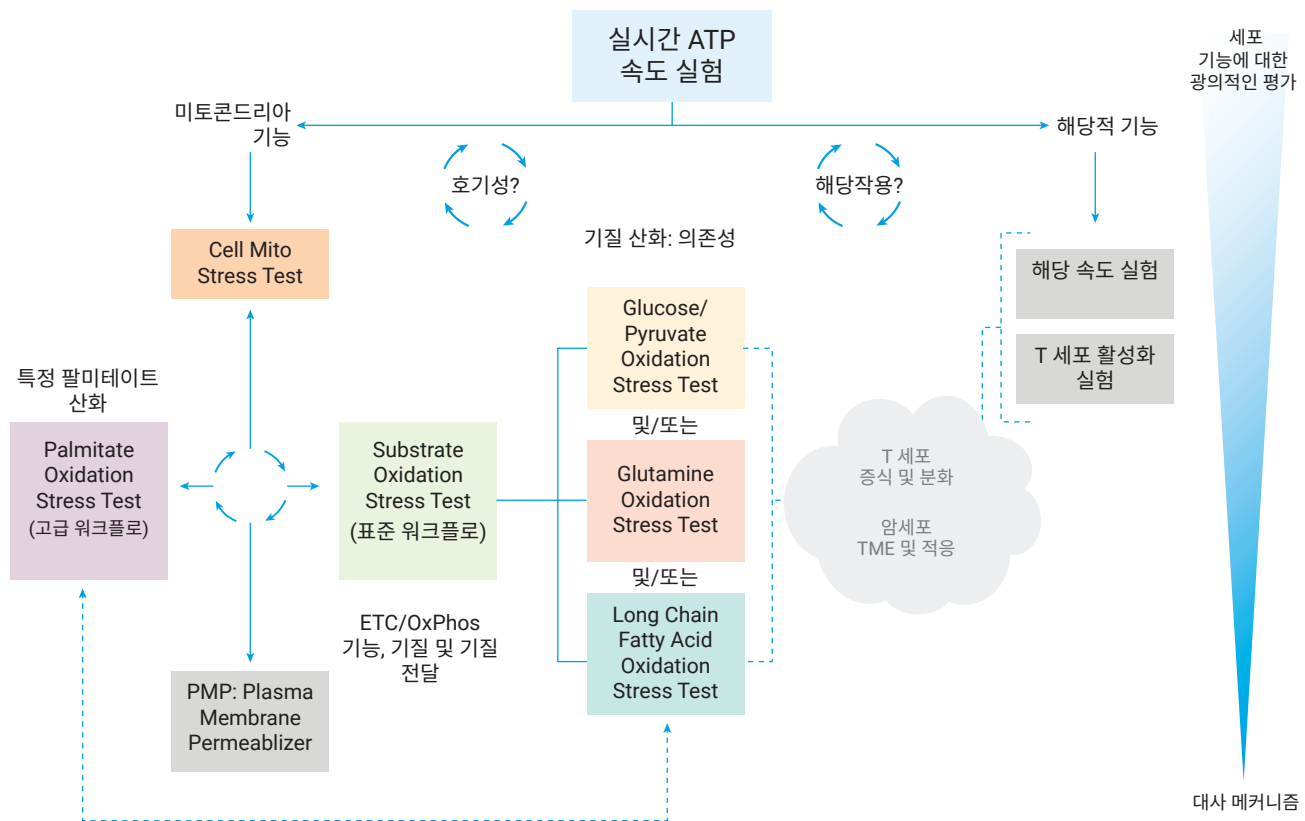


그림 S1. 애질런트는 광범위한 세포 기능 평가부터 대사 메커니즘의 특정 세부 사항까지 모든 정보를 제공하는 다양한 XF 분석 키트를 제공합니다. 미토콘드리아 기능의 변화가 파악되면 연구의 다음 단계는 글루코스/피루빈산, 글루타민 및 긴 사슬 지방산의 산화가 미치는 영향을 포함해 이러한 변화를 일으킨 요인을 이해하는 것입니다.

## 참고문헌

1. Marx, V. How to Follow Metabolic Clues to Find Cancer's Achilles Heel. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 221–24.
2. Vander Heiden, M. G.; DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections Between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168*, 657–69.
3. Beezhold, K.; Byersdorfer, C. A. Targeting Immuno-Metabolism to Improve Anti-Cancer Therapies. *Cancer Letters* **2018**, *414*, 127–35.
4. Corbet, C. Stem Cell Metabolism in Cancer and Healthy Tissues, Pyruvate in the Limelight. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *8*.
5. Patel, C. H. *et al.* Targeting Metabolism to Regulate Immune Responses in Autoimmunity and Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 669–88.
6. Divakaruni, A. S. *et al.* Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 490–503.e7.
7. Hildyard, J. C. *et al.* Identification and Characterisation of a New Class of Highly Specific and Potent Inhibitors of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1707*, 221–30.
8. Robinson, M. M. *et al.* Novel Mechanism of Inhibition of Rat Kidney-Type Glutaminase by Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochemical Journal* **2007**, *406*, 407–14.
9. Divakaruni, A. S. *et al.* Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. *Methods Enzymol.* **2014**, *547*, 309–54.
10. Kalyanaraman, B. *et al.* a review of the Basics of Mitochondrial Bioenergetics, Metabolism, and Related Signaling Pathways in Cancer Cells, Therapeutic Targeting of Tumor Mitochondria with Lipophilic Cationic Compounds. *Redox Biology* **2018**, *14*, 316–27.
11. Kerr, E. M.; Martins, C. P. Metabolic Rewiring in Mutant Kras Lung Cancer. *Febs. J.* **2018**, *285*, 28–41.
12. Kalyanaraman, B. Teaching the Basics of Cancer Metabolism, Developing Antitumor Strategies by Exploiting the Differences Between Normal and Cancer Cell Metabolism. *Redox Biology* **2017**, *12*, 833–42.
13. Viola, A. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*.
14. Raud, B. *et al.* Fatty Acid Metabolism in CD8(+) T Cell Memory: Challenging Current Concepts. *Immunological Reviews* **2018**, *283*, 213–31.
15. Domínguez-Andrés, J.; Joosten, L. A. B.; Netea, M. G. Induction of Innate Immune Memory: The Role of Cellular Metabolism. *Current Opinion in Immunology* **2019**, *56*, 10–16.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
2019년 12월 19일 한국에서 인쇄  
5994-1623KO  
DE.5391782407

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울 특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

