



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](#)

박사학위논문

췌장  $\beta$  -세포에서  
2-Deoxy-D-ribose에 의해  
유발된 Ferroptosis

제주대학교 대학원

의학과

김 동 규

2023년 2월

췌장  $\beta$ -세포에서  
2-Deoxy-D-ribose에 의해 유발된  
Ferroptosis

지도교수 고관표

김동규

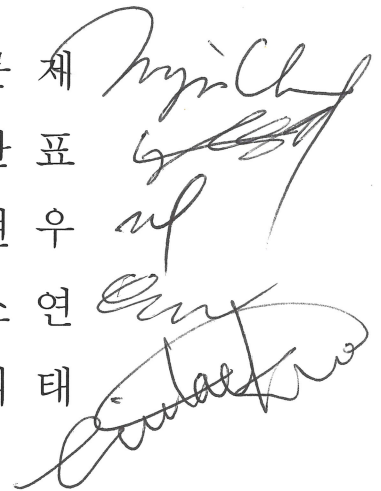
이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함

2022년 11월

김동규의 의학 박사학위 논문을 인준함

심사 위원장  
위 원  
위 원  
위 원  
위 원

조 문 채  
고 관 표  
김 현 우  
유 소 연  
김 의 태



제주대학교 대학원

2022년 11월

# 2-Deoxy-D-ribose Induces Ferroptosis in Pancreatic $\beta$ -cells

Dong-Kyu Kim

(Supervised by professor Gwanpyo Koh)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of Doctor of medical science(Department of  
Internal Medicine)

November, 2022

This thesis has been examined and approved.

Thesis director:

Professor Moonjae Cho

Chairman

Professor Gwanpyo Koh

Professor Hyunwoo Kim

Professor Soyeon Yoo

Professor Euitae Kim

2022. 11

Department of Internal Medicine

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY



## TITLE

한글: 췌장 b-세포에서 2-Deoxy-d-ribose에 의해 유발된 Ferroptosis

영문: 2-Deoxy-d-ribose Induces Ferroptosis in Pancreatic b-Cells

## 초록

Ferroptosis는 철 의존적(iron-dependent)인 지질산화(lipid peroxidations)에 의해 발생하는 새로운 cell death mechanism으로, cystine의 세포내 이동을 매개하는 system  $x_c$ -를 억제하는 물질들은 ferroptosis를 유발한다고 알려져 있다. 우리는 이전 연구에서 2-deoxy-d-ribose (dRib)이 베타세포에서 cystine의 세포내 이동을 억제하여 산화손상을 유발한다고 보고하였다. 이에 dRib에 의한 베타세포 산화손상이 ferroptosis인지 알아보기 위해 본 연구를 계획하였다.

RIN5mF 세포와 쥐로부터 분리한 islets을 30 mM dRib과 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (2-ME), 100  $\mu$ M deferoxamine (DFO) with or without 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 20  $\mu$ M Ferrostatin-1 (Fer-1), or 20  $\mu$ M Liproxstatin-1 (Lip-1)로 동시에 자극하여 배양한 후 xCT mRNA & protein expressions, 1-[<sup>14</sup>C]cystine uptake, intracellular GSH content, lipid peroxidation and cell viability를 측정하였다. Lipid peroxidation은 intracellular malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels 그리고 C11-BODIPY staining을 이용한 flow cytometry로 측정하였다. dRib에 의한 세포 형태학적 변화는 transmission electron microscope (TEM)으로 관찰하였다.

RIN5mF 세포에서 dRib 자극은 system  $x_c$ -의 mRNA와 단백질발현을 농도의존적으로 증가시키고, cystine uptake 감소, GSH depletion, lipid peroxidation과 cytotoxicity를 유발하였다. System  $x_c$ -를 우회하여 cystine의 세포내 이동을 증가시키는 것으로 알려진 2-ME는 dRib으로 유발된 cystine uptake 감소, GSH depletion, lipid peroxidation과 cytotoxicity를 거의 대조군 수준으로 회복시켰다. Iron chelator인 DFO와 Fer-1 & Lip-1은 cystine uptake와 GSH content에는 영향이 없었으나 dRib에 의해 유발된 lipid peroxidation과 cytotoxicity를 회복시켰고, DFO의 효과는 FeSO<sub>4</sub> 추가로

상쇄되었다. 이러한 효과들은 isolated islets에서도 동일하게 관찰되었다. TEM으로 관찰했을 때 dRib 자극은 미토콘드리아의 수축(shrinkage), 용기 수의 감소(reduced cristae)와 외막파열 (outer membrane rupture)을 유발하였으나, nuclear integrity는 intact하였다.

위 결과들을 종합할 때, dRib은 베타세포에서 system  $\chi_c$ 를 억제함으로써 세포내 GSH가 고갈되어 lipid peroxidation에 의한 세포사인 ferroptosis를 유발하는 것으로 보인다. 향후 dRib은 ferroptosis와 관련된 여러 질환들의 연구에 쓰일 수 있다고 생각한다.

Keywords: 2-Deoxy-d-ribose, Ferroptosis, System  $\chi_c$ ,  $\beta$ -Cell.

## ABSTRACT

Ferroptosis is a cell death mechanism caused by iron-dependent lipid peroxidation. Substances that inhibit system  $x_c^-$ , which mediates the cellular uptake of cystine, induce ferroptosis. 2-Deoxy-d-ribose (dRib) inhibits cellular uptake of cystine in  $\beta$ -cells to cause oxidative damage. In this study, we examined whether dRib-induced oxidative damage of  $\beta$ -cells is a type of ferroptosis.

RIN5mF cells and rat islets were co-stimulated with 30 mM dRib and 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 100  $\mu$ M deferoxamine with or without 100  $\mu$ M  $\text{FeSO}_4$ , 20  $\mu$ M ferrostatin-1, or 20  $\mu$ M lipoxstatin-1. After culture, the mRNA and protein expression of  $xCT$ , 1-[ $^{14}\text{C}$ ] cystine uptake, intracellular GSH content, lipid peroxidation, and cell viability were measured. Lipid peroxidation was evaluated by using flow cytometry with C11-BODIPY staining and measuring intracellular malondialdehyde and 4-hydroxynonenal levels. Cellular morphological changes caused by dRib were observed using transmission electron microscopy.

Stimulation of RIN5mF cells by dRib increased the mRNA and protein expressions of system  $x_c^-$  in a concentration-dependent manner, decreased cystine uptake, and induced GSH depletion, lipid peroxidation, and cytotoxicity. 2-Mercaptoethanol, which increases the cellular uptake of cystine via bypassing system  $x_c^-$ , restored dRib-induced cystine uptake reduction, GSH depletion, lipid peroxidation, and cytotoxicity to levels similar to those in the control. The iron chelators deferoxamine, ferrostatin-1, and lipoxstatin-1 did not influence cystine uptake or the GSH content but restored dRib-induced lipid peroxidation

and cytotoxicity. Addition of  $\text{FeSO}_4$  prevented the effects of deferoxamine. These results were also observed in isolated islets. Transmission electron microscopy revealed that stimulation by dRib caused mitochondrial shrinkage, reduced cristae, and outer membrane rupture, whereas the nuclear integrity remained intact.

Our results suggest that dRib inhibited the system  $\chi_c^-$  in  $\beta$ -cells to deplete GSH and induce ferroptosis via lipid peroxidation. dRib can be used to study ferroptosis-related diseases.

Keywords: 2-Deoxy-d-ribose, Ferroptosis, System  $\chi_c^-$ ,  $\beta$ -Cell

# 목차

I. INTRODUCTION .....	1
II. MATERIALS AND METHODS	
2.1. Materials .....	3
2.2. Cell culture and islet isolation .....	4
2.3. RNA isolation and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction .....	4
2.4. Western blotting .....	5
2.5. Measurement of intracellular cystine transport .....	6
2.6. Measurement of intracellular GSH levels .....	7
2.7. Assessment of cell viability .....	7
2.8. Measurement of intracellular malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels .....	8
2.9. Assessment of lipid reactive oxygen species (ROS) levels .....	8
2.10. Transmission electron microscopy .....	9
2.11. Statistical analysis .....	10
III. RESULTS	
3.1. dRib은 system xc <sup>-</sup> 발현을 증가시킨다 .....	11

3.2. Mercaptoethanol, iron chelator와 lipid radical scavengers는 dRib에 의한 GSH depletion & cell death를 예방한다 .....	15
3.3. Mercaptoethanol, iron chelator와 lipid radical scavengers는 dRib에 의한 lipid peroxidation을 억제한다 .....	19
3.4. dRib은 미토콘드리아의 형태학적 변화를 초래한다 .....	28
3.5. Isolated islets에서 mercaptoethanol, iron chelator와 lipid radical scavengers는 dRib에 의한 GSH depletion & cell death를 예방한다 .....	34
IV. DISCUSSION .....	38
V. REFERENCES .....	43
VI. FIGURE LEGENDS .....	47
FIGURE 1 .....	12
FIGURE 2 .....	16
FIGURE 3 .....	20
FIGURE 4 .....	22
FIGURE 5 .....	29
FIGURE 6 .....	35
FIGURE 7 .....	42

## LIST OF FIGURES

Fig. 1A .....	12
Fig. 1B .....	13
Fig. 1C .....	14
Fig. 2A .....	16
Fig. 2B .....	17
Fig. 2C .....	18
Fig. 3A .....	20
Fig. 3B .....	21
Fig. 4A .....	22
Fig. 4B .....	23
Fig. 4C .....	24
Fig. 4D .....	25
Fig. 4E .....	26
Fig. 4F .....	27
Fig. 5A .....	29



Fig. 5B .....	30
Fig. 5C .....	31
Fig. 5D .....	32
Fig. 5E .....	33
Fig. 6A .....	35
Fig. 6B .....	36
Fig. 6C .....	37
Fig. 7 .....	42

## I. INTRODUCTION

Ferroptosis는 기존에 알려진 necrosis, apoptosis, pyroptosis, autophagy 등의 세포사와는 다른 새로운 기전의 programmed cell death로서, 철 의존적(iron-dependent)인 산화손상(oxidative damage)과 지질산화(lipid peroxidation)를 특징으로 한다 [1,2]. Ferroptosis는 2012년 Dixon 등 [3]이 처음 명명하였다. 그 들은 종양발생 RAS 돌연변이 세포주(oncogenic RAS mutant cell lines)를 선택적으로 죽이는 저분자(small molecule)인 erastin이 세포막의 system  $x_c$ -를 억제하여 철 의존적 산화손상을 유발함으로써 ferroptosis를 초래하고 이는 ferrostatin-1에 의해 억제된다고 하였다. Ferroptosis는 형태학적으로 미토콘드리아가 작아지고 outer mitochondria membrane의 파열과 mitochondrial cristae의 소실 등의 미토콘드리아 변화를 특징으로 하며, necrosis의 cytoplasmic and organelle swelling, apoptosis의 chromatin condensation 그리고 autophagy의 double-membrane enclosed vesicles 등의 소견들은 관찰되지 않는다 [3,4]. 암 뿐만 아니라 허혈/재관류 손상(ischemia/reperfusion injuries, IRI), 만성신경변성질환(chronic neurodegenerative diseases), 신장 및 간질환 그리고 각종 염증 및 면역질환 등 다양한 질환에서 ferroptosis가 중요한 병인으로 밝혀지고 있으며 [5,6], 향후 ferroptosis의 조절을 통해 이러한 질환들의 치료가 가능할 것으로 기대하고 있다 [7,8].

System  $x_c$ -는 세포막에 위치하여 세포외 cystine과 세포내 glutamate를 1:1로 교환하는 sodium-independent antiporter이다 [9]. System  $x_c$ -는 heterodimer 구조로 이루어져 있으며, light chain인 solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11, xCT로도 알려짐)은 catalytic subunit로서 transport를 담당하고, heavy chain인 solute carrier family 3 member 2 (SLC3A2, 4F2hc 또는 CD98hc로도 알려짐)는 chaperone으로서 SLC7A11을 구조적으로 안정되게 한다

[10]. System  $x_c$ -를 통해 들어온 cystine은 세포질에서 NADPH에 의해 cysteine으로 환원되고, 이 세포내 cysteine 양은 GSH 합성의 결정인자(rate-limiting factor)로 작용한다 [11]. GSH를 기질(substrate)로 사용하는 glutathione peroxidase 4 (GPX4)는 iron을 촉매로 하는 Fenton reaction에 의해 세포막지질로부터 형성된 ferroptosis의 핵심물질인 phospholipid hydroperoxides를 lipid alcohol로 환원시키는 유일한 항산화효소이다 [12,13]. 따라서 system  $c_c$ 를 억제하는 약물들(예, erastin [3], sulfasalazine [14], 또는 sorafenib [15])은 세포내 GSH를 고갈시켜 GPX4를 비활성화 시키므로 지질산화에 의해 발생하는 ferroptosis를 유발할 수 있다 [16,17]. 한편 Mercaptoethanol은 system  $x_c$ - 억제를 우회하여 cystine uptake를 증가시키므로 system  $x_c$ - 억제제에 의해 유발되는 ferroptosis를 예방할 수 있다 [3,18].

2-Deoxy-d-ribose (dRib)는 강력한 환원능(reducing capacity)을 가진 당(sugar)으로 protein glycation을 통해 산화스트레스를 유발한다고 알려져 왔다 [19,20]. 그러나 본 연구진은 dRib이 췌장 베타세포에서 나트륨 비의존적으로(sodium-independently) intracellular cystine transport를 억제하여 세포내 GSH를 고갈시켜 산화손상을 초래하고, 2-ME 전처리 또는 system  $x_c$ -의 기능적단위(functional subunit)인 xCT 유전자과발현이 dRib에 의한 cystine transport 억제, GSH 고갈, 산화스트레스와 세포사를 예방함을 확인하였다. 즉 dRib이 system  $x_c$ -를 통한 cystine uptake를 억제한다고 결론 내릴 수 있었다 [21]. 이에 연구진은 dRib에 의한 세포사가 ferroptosis일 것으로 생각하고 이를 확인하기 위해 본 연구를 계획하였다. dRib에 의한 ferroptosis가 입증된다면 췌장 베타세포의 산화손상 뿐만 아니라 암을 비롯한 여러 질환의 병인연구 및 치료제 개발에 dRib이 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

## II. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

dRib, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, HEPES는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. RPMI-1640 medium, penicillin, streptomycin, trypsin, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)는 Gibco Invitrogen (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 HyClone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 1-[<sup>14</sup>C]cystine과 scintillation cocktail은 PerkinElmer (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Polyacrylamide gel과 nitrocellulose membrane은 Amersham (Amersham, Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. 30% Acrylamide-bis solution 와 bovine serum albumin (BSA)은 Biosesang (Seongnam City, Gyeonggi, South Korea)과 Bovogen Biologicals (Keilor East, Victoria, Australia)에서 각각 구입하였다. SASP, HCA, 2-ME, CaCl<sub>2</sub>, d-glucose, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), polybrene, Triton-X 100, collagenase P, deferoxamine (DFO), FeSO<sub>4</sub>, Ferrostatin-1 (Fer-1), liproxstatin-1 (Lip-1) 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 모든 배양접시와 튜브들은 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다.

## 2.2. Cell culture and islet isolation

Rat insulinoma cell line인 RINm5F 세포를 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)로 부터 구입하였다. 37°C의 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> 하에서 10% FBS, 100 mg/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640 medium으로 배양하였다. 이틀마다 새로운 배양액으로 교체하였으며, 세포들의 confluence가 70%에 도달하면 trypsin 처리하여 subculture하였다.

Rat islets은 Lacy 등 [22]이 기술한 방법에 근거하여 분리하였다. 6-8주령의 수컷 Sprague Dawley rats을 OrientBio Corp. (Seongnam City, Gyeonggi, South Korea)으로부터 구입하였다. 마취 후 경추탈골로 쥐들을 희생시키고 개복하였다. 그리고 나서 9 - 10 mL의 collagenase P (1 mg/mL in HBSS)를 bile duct를 통해 췌장에 주입하였다. 팽창된 췌장을 쥐로부터 분리(remove)하여 37°C에서 12 분 간 소화(digestion)시키고, Ficoll gradient를 이용해 분리(separation)하였다. 이렇게 분리된 islets을 20% FBS와 11.1 mM glucose가 함유된 RPMI-1640 배양액에 24시간 부유(suspension)시킨 후 실험에 착수하였다. 이 연구는 Jeju National University의 Institutional Animal Care and Use Committee에 의해 승인되었다 (2022-0014).

## 2.3. RNA isolation and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Total RNA는 TRIzol<sup>®</sup> (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, U.S.A.)을 이용해 제작사의 지침에 따라 세포로 부터 추출하였다. RNA 분리는 RNase가 없는 환경에서 실행되었다. 2 mg의 RNA로 MMLV reverse transcriptase (MGmed

Corporation, Seoul, Korea), oligo (dT)15 primer, dNTP (10 mM) and 40 unit/mL RNase inhibitor (MGmed Corporation)을 이용해 reverse transcription을 수행하였다. RT qPCR은 KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (KAPA biosystems, MA, USA) and an iQTM 5 Multicolor Real Time PCR Detection system (Bio Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해 수행하였다. 합성 cDNA는 specific primers를 이용해 40 cycles at 95°C for 3 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, with an initial cycle of 95°C for 1 min 동안 증폭시켰다. Specific primers의 염기서열은 다음과 같다: xCT forward, 5'-TCAAATCCTTGCCCATCTGC-3', and reverse, 5'-GTGAGCTTGCCCCACTGTAT-3' and  $\beta$  actin forward, 5' TCC TGG CCT CAC TGT CCAC 3', and reverse, 5' GGG CCG GAC TCA TCG TACT 3'. 모든 primers는 Bioneer Corporation (Daejeon, Korea)에 주문 제작하였다.

#### 2.4. Western blotting

Lysis buffer로 세포를 용해하고, 각 군 당 동일 용량의 단백질을 가하여 10% Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane으로 이전(transfer)하였다. 단백질이 이전된 membrane은 0.1% Tween과 3% BSA이 포함된 Tris-buffered saline에 incubation하여 non-specific antibody binding을 차단(blocking)하였다. 이어 xCT에 특이적인 primary antibody (1:5,000 dilutions; Abcam #ab175186, Boston, MA, USA)와 4°C 에서 2시간 동안 배양하였다. Loading control로서는 b-actin (1:10,000 dilutions; Sigma #A2228)을 사용하였다. 이후 1:5,000 비율로 희석한 horseradish peroxidase - conjugated secondary anti-rabbit antibody와 2시간 배양하였다. Western Lightening™ Plus-ECL (PerkinElmer, Waltham,

MA, USA)로 발색반응을 유발하여 밴드를 관찰하였다.

## 2.5. Measurement of intracellular cystine transport

1-[<sup>14</sup>C]cystine의 세포내 이동은 이전에 기술된 방법 [23]을 약간 변형하여 측정하였다. 간단히 기술하면, 24-well cell culture plate의 각 well에 동일한 양의 isolated islets을 분주하여 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 medium으로 37°C에서 이틀 간 배양한다. 그리고 배양액을 버리고 122 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM d-glucose, and 10 mM Hepes (pH 7.4)로 구성된 37°C의 extracellular fluid (ECF) buffer 500 mL로 세척한다. 이어서 30 mM dRib과 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1을 동시에 3시간 자극하고 마지막 1시간 동안 0.1 mCi 1-[<sup>14</sup>C]cystine (1.7 mM)가 함유된 37°C의 ECF buffer 500 mL를 각 well에 채워 넣어 1-[<sup>14</sup>C]cystine 세포내 섭취반응을 유발한다. 그리고 나서 well 내 용액을 모두 제거하고 radioisotope가 없는 차가운 ECF buffer로 세척하여 세포내 섭취반응을 중지시킨다. 750 mL의 1% Triton-X 100/DPBS로 세포를 용해하고, 세포용해액 500 mL를 5 mL의 scintillation cocktail에 혼합하여 Wallac MicroBeta TriLux 1450 LSC and Luminescence Counter (PerkinElmer, San Juan, PR, USA)로 radioactivity를 측정한다. 남아있는 세포용해액에서 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용해 단백질을 측정한다. 1-[<sup>14</sup>C]cystine 세포내 섭취는 세포의 총단백질농도로 보정한 cpm/mg protein으로 표시한다.

## 2.6. Measurement of intracellular GSH levels

세포내 GSH 농도는 glutathione reductase를 이용한 enzymatic recycling 방법에 기반한 Glutathione Assay Kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA)로 측정하였다. RIN5mF 세포를 6-well cell culture plate에 well당  $1 \times 10^6$  cells 농도로 분주하여 10% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배양액으로 키우고, 30 mM dRib과 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1을 동시에 자극하여 6시간 동안 배양하였다. 그리고 sonication으로 세포를 파괴하고 원심분리 후 상층액으로부터 제작사의 매뉴얼 내용에 따라 GSH 양을 측정하였다. 세포내 GSH 양은 세포의 총단백질농도로 보정하여 nmol/mg·protein으로 표시하였다.

## 2.7. Assessment of cell viability

우선 lactate dehydrogenase (LDH) assay로 dRib에 의한 cytotoxicity를 측정하였다. RIN5mF 세포를 96-well cell culture plate에 well당  $1 \times 10^5$  cells 농도로 분주하였고, isolated islets은 96-well cell culture plate의 well마다 동일한 개수가 들어가도록 분주하였다. 10% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배양액으로 키우고, 30 mM dRib과 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1을 동시에 자극하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 손상된 세포의 cytosol로부터 유리된 LDH를 colorimetric method로 측정하는 Cytotoxicity Detection KitPLUS (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하였다. Cytotoxicity (%)는 다음과 같은 공식으로 계산하였다: 
$$\frac{((\text{experimental value} - \text{background control}) - (\text{low control} - \text{background control}))}{((\text{high control} - \text{background control}) - (\text{low control} - \text{background control}))} \times 100$$



control - background control)))  $\times 100$ . 최종적으로 cell viability (% control)는 100-cytotoxicity (%)로 계산하였다.

## 2.8. Measurement of intracellular malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels

MDA와 4-HNE는 lipid peroxidation 중 발생하는 secondary oxidation products를 함유한 aldehydes이다 [24]. 따라서 우리는 세포내 lipid peroxidation을 평가할 markers로 MDA와 4-HNE를 선택하였다. RIN5mF 세포를 6-well cell culture plate에 well당  $1 \times 10^6$  cells 농도로 분주하여 10% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배양액으로 48시간 키운 후, 30 mM dRib과 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1을 동시에 6시간 동안 자극하였다. 그리고 나서 cell lysate로부터 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)를 colorimetric method로 평가하는 EZ-Lipid peroxidation Assay Kit (DoGenBio, Seoul, South Korea)로 MDA를 측정하고, Universal 4-Hydroxynonenal ELISA Kit (Novus, Centennial, CO, USA)를 이용하여 4-HNE를 측정하였다. 세포내 MDA와 4-HNE 양은 세포의 총단백질농도로 보정하여 각각 nmol/mg·protein과 ng/mg·protein으로 표시하였다.

## 2.9. Assessment of lipid reactive oxygen species (ROS) levels

세포내 Lipid peroxide 농도는 C11-BODIPY dye (Molecular Probes, Eugene,

OR, USA)를 이용한 flow cytometry로 측정하였다. RIN5mF 세포를 6-well cell culture plate에 well당  $1 \times 10^6$  cells 농도로 분주하여 10% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배양액으로 키우고, 30 mM dRib과 100  $\mu$ M DFO with or without 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 20  $\mu$ M Fer-1, or 20  $\mu$ M Lip-1을 동시에 자극하여 6시간 동안 배양하였다. 마지막 30분 간 4  $\mu$ M C11-BODIPY 자극 후 0.05% trypsin을 처리하여 세포를 harvest하였다. 원심분리한 세포들을 PBS에 풀어 FACScan instrument (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용해 세포내 lipid ROS levels을 측정하였다. 검체 당 10,000개의 세포를 분석하였고, 결과는 mean fluorescence intensity를 계산하여 아무 것도 자극하지 않은 대조군에 대한 비율(fold)로 표시하였다.

## 2.10. Transmission electron microscopy

RIN5mF 세포를 100 mm tissue culture dish에  $1 \times 10^6$  cells 농도로 분주하여 배양한 후 30 mM dRib으로 6시간 자극한다. 세포들을 상온(room temperature)의 0.1M phosphate buffer에서 2% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde로 30분간 고정(fix)한다. 완충액으로 3회 세척 후 1% osmium tetroxide로 90분간 2차 고정한다. 그리고 ascending ethanol series로 탈수하여 epon-812 혼합액 (OKEN, Japan)에 포매하고(embedded), ultramicrotome (UC6, Leica, Germany)을 이용하여 박절편(thin section)들을 얻어 5% uranyl acetate와 lead citrate로 염색한다. Transmission electron microscope (TEM) (H-7650, Hitachi, Japan)로 80 kV에서 세포들을 관찰한다.

## 2.11. Statistical analysis

모든 데이터는 mean  $\pm$  SD로 표기하였다. 그룹 간 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc test로 검정하였다. 모든 분석은 SPSS software (version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고,  $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다고 판단하였다.

### III. RESULTS

#### 3.1. dRib은 system $x_c$ - 발현을 증가시킨다

우리는 system  $x_c$ -의 기능적 단위인 xCT (SLC7A11)의 mRNA와 단백질 발현을 조사하였다. dRib 농도가 증가할 수록 xCT의 mRNA 발현이 비례하여 증가하였으며 (Fig. 1A), xCT 단백질발현도 dRib 농도에 비례하여 동일한 추세로 증가하였다 (Fig. 1B and C).

Fig. 1A

**A**

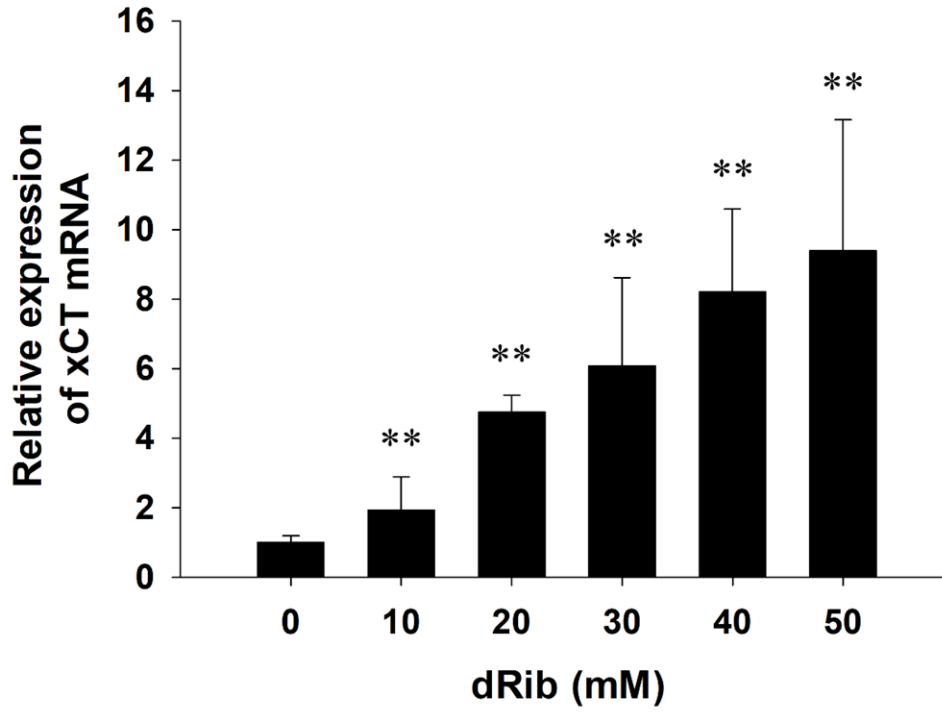


Fig. 1B

**B**

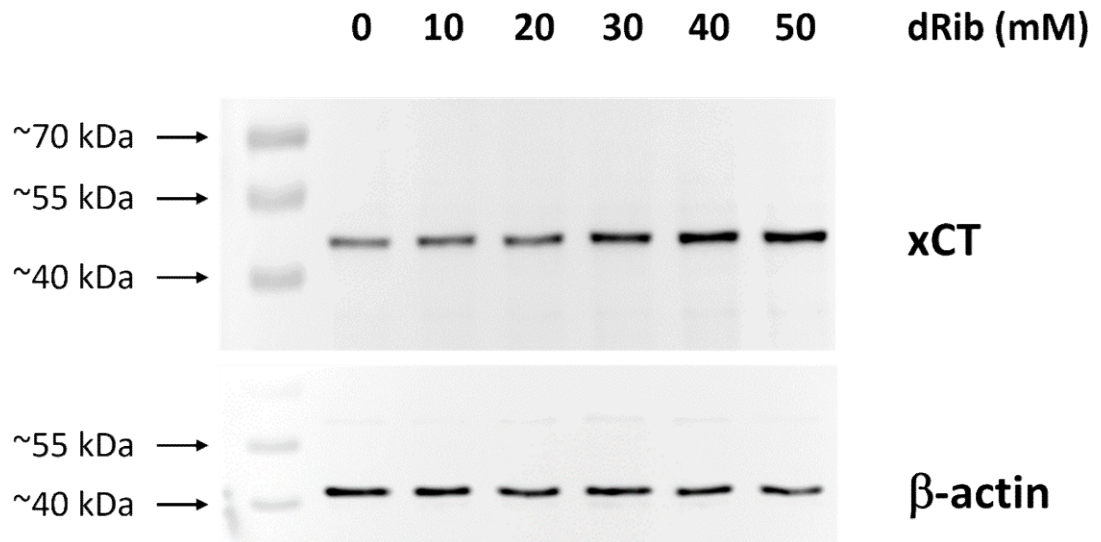
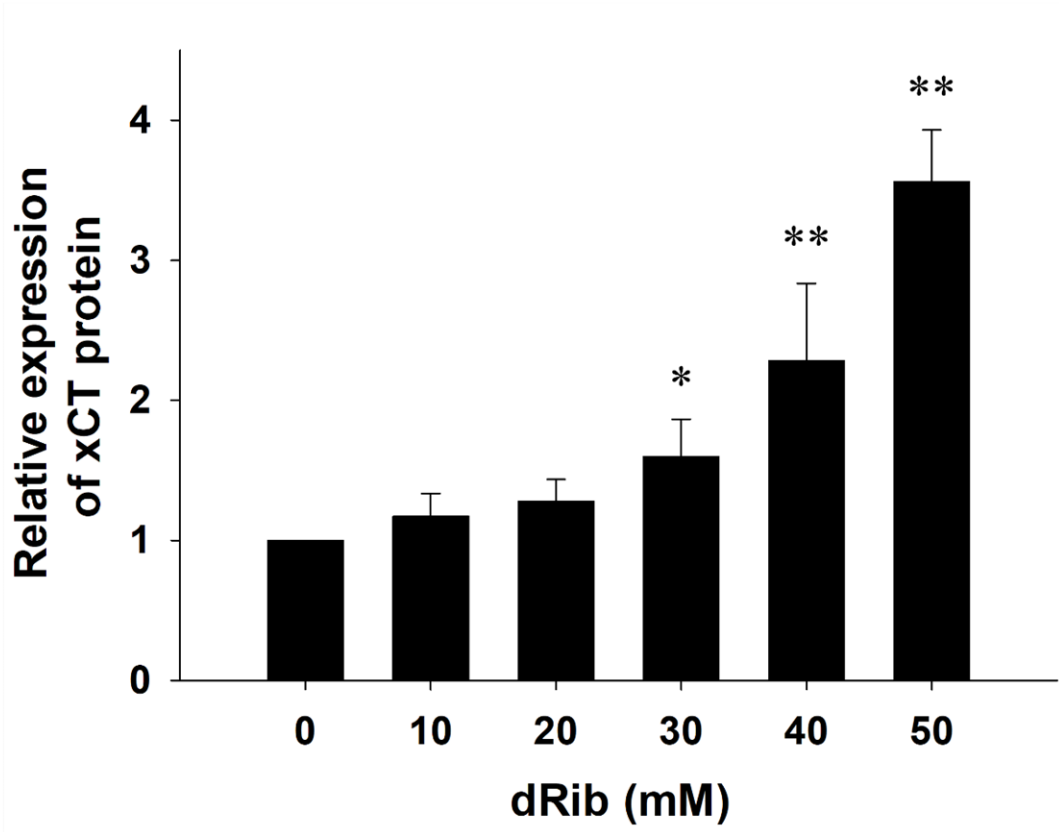


Fig. 1C

**C**



3.2. Mercaptoethanol, iron chelator와 lipid radical scavengers는 dRib에 의한 GSH depletion & cell death를 예방한다

dRib 자극은 cystine의 세포내 섭취를 현저히 감소시켰으며, system  $X_c$ 를 우회하여 intracellular cystine transport를 향진시키는 2-ME의 추가는 감소된 cystine uptake를 거의 대조군 수준으로 회복시켰다. 그러나 iron chelator인 DFO, lipid radical scavengers인 Fer-1과 Lip-1은 cystine uptake를 회복시키지 못했다 (Fig. 2A). 세포내 GSH 함량도 동일한 양상을 보였다. dRib은 세포내 GSH 함량을 현저히 감소시켰고, 2-ME는 감소된 GSH 함량을 완전히 회복시켰으나 DFO, Fer-1과 Lip-1은 회복시키지 못했다 (Fig. 2B). Cell viability는 dRib 자극에 의해 유의하게 감소되었고 2-ME와 DFO 추가로 거의 대조군에 가깝게 회복되었다. DFO에 의해 회복된 cell viability는 iron sulfate ( $FeSO_4$ ) 추가에 의해 다시 dRib-alone group과 거의 동일한 수준으로 감소되었으므로, dRib에 의한 cell viability의 감소는 iron에 의해 매개된다고 할 수 있다. 또한 lipid radical scavengers인 Fer-1과 Lip-1도 dRib에 의한 cell viability 감소를 유의하게 회복시켰다 (Fig 2C).



Fig. 2A

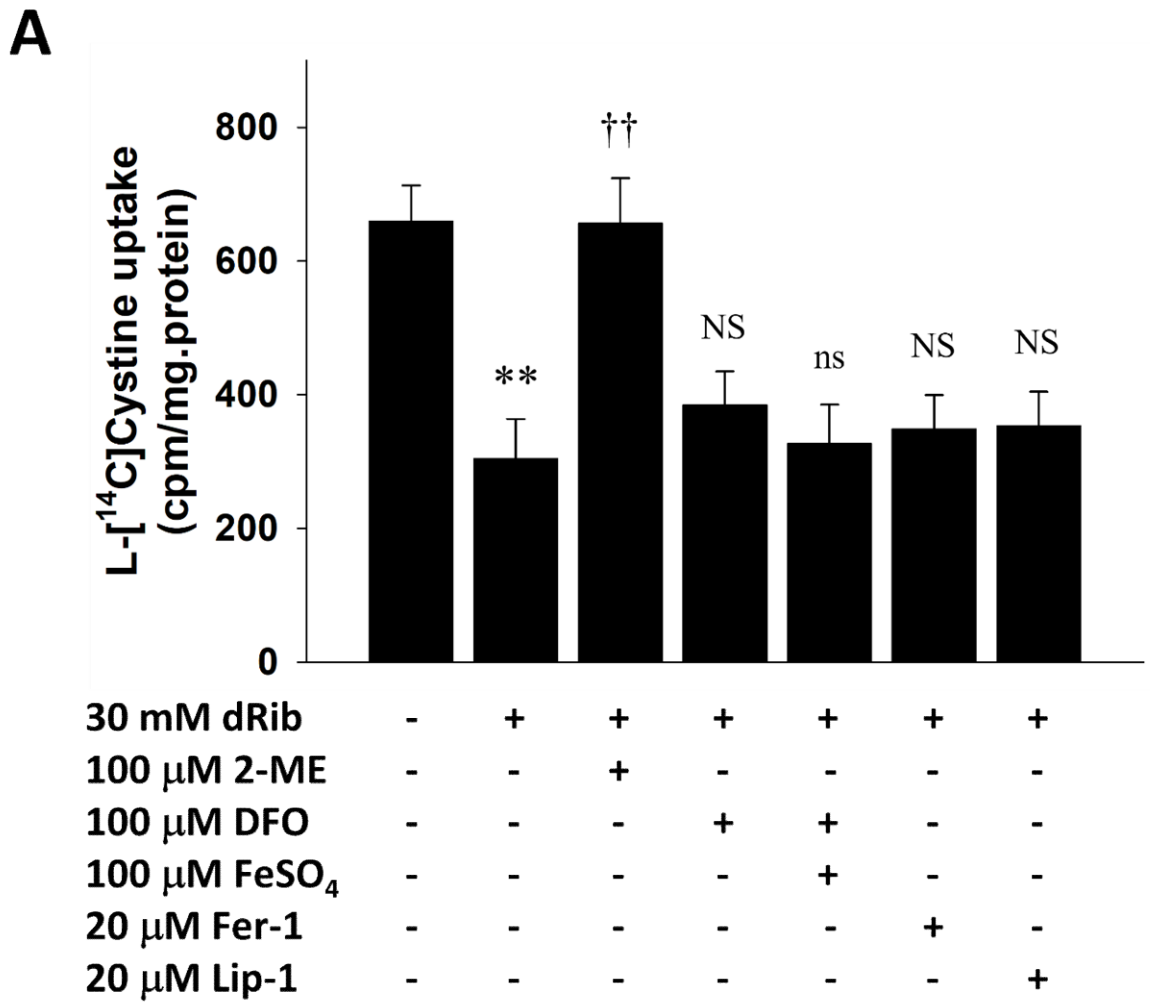
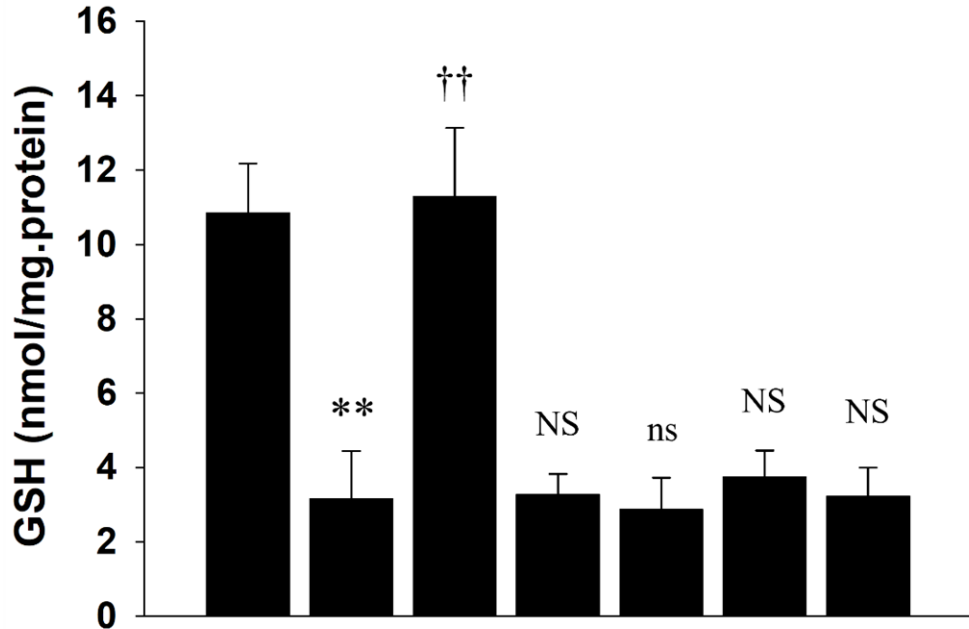


Fig. 2B

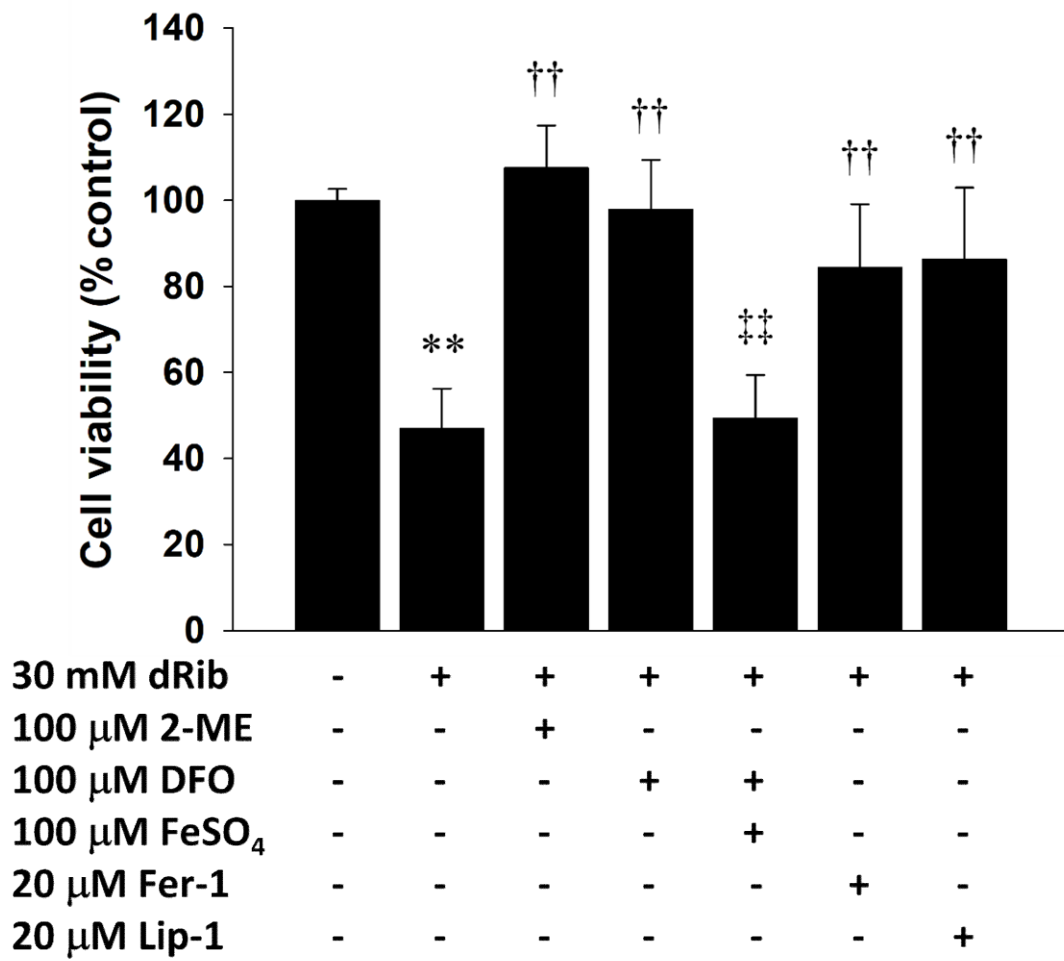
**B**



30 mM dRib	-	+	+	+	+	+	+
100 μM 2-ME	-	-	+	-	-	-	-
100 μM DFO	-	-	-	+	+	-	-
100 μM FeSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	+	-	-
20 μM Fer-1	-	-	-	-	-	+	-
20 μM Lip-1	-	-	-	-	-	-	+

Fig. 2C

**C**

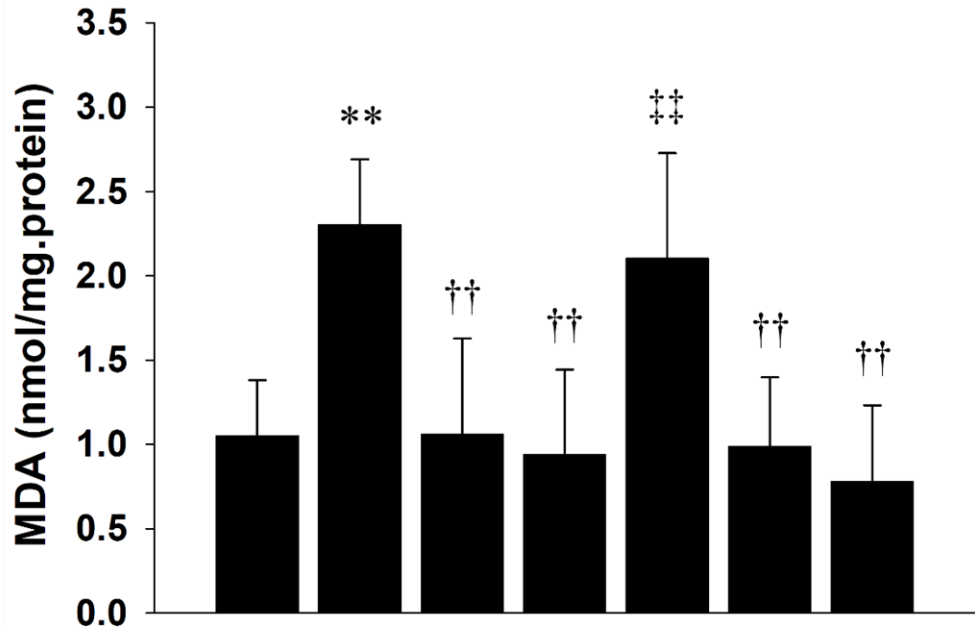


### 3.3. Mercaptoethanol, iron chelator와 lipid radical scavengers는 dRib에 의한 lipid peroxidation을 억제한다

dRib에 의한 lipid peroxidation은 aldehyde-containing products인 MDA와 4-HNE의 세포내 농도와 세포내 lipid ROS levels을 측정하여 평가하였다. dRib 자극에 의해 세포내 MDA 농도는 현저하게 증가하였고, 이 증가는 2-ME와 DFO 추가에 의해 거의 대조군 수준으로 감소하였다. DFO에 의해 감소된 MDA 농도는 FeSO<sub>4</sub> 처치에 의해 다시 증가하였다. Fer-1과 Lip-1 처치도 dRib에 의한 세포내 MDA 증가를 유의하게 감소시켰다 (Fig 3A). 4-HNE도 MDA와 거의 동일한 양상을 보였다. dRib에 의해 감소된 4-HNE 농도는 2-ME와 DFO 추가에 의해 감소하였으며, DFO에 의해 감소된 4-HNE 농도는 FeSO<sub>4</sub>에 의해 상쇄되었다. Fer-1과 Lip-1도 dRib에 의한 4-HNE 증가를 감소시켰다 (Fig 3B). C11-BODIPY dye를 이용한 flow cytometric analysis로 측정된 세포내 lipid ROS levels은 dRib 자극에 의해 의미있게 증가하였고 (Fig. 4A and F), 2-ME 추가로 감소되었다 (Fig. 4B and F). Iron chelator인 DFO는 dRib에 의해 증가된 lipid ROS levels을 감소시켰고, 이 증가는 FeSO<sub>4</sub> 추가에 의해 다시 증가하였다 (Fig. 4C and F). Lipid radical scavengers인 Fer-1와 Lip-1은 dRib에 의해 증가된 lipid ROS levels을 거의 대조군 수준으로 감소시켰다 (Fig. 4D, E and F).

Fig. 3A

**A**



30 mM dRib	-	+	+	+	+	+	+
100 μM 2-ME	-	-	+	-	-	-	-
100 μM DFO	-	-	-	+	+	-	-
100 μM FeSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	+	-	-
20 μM Fer-1	-	-	-	-	-	+	-
20 μM Lip-1	-	-	-	-	-	-	+

Fig. 3B

**B**

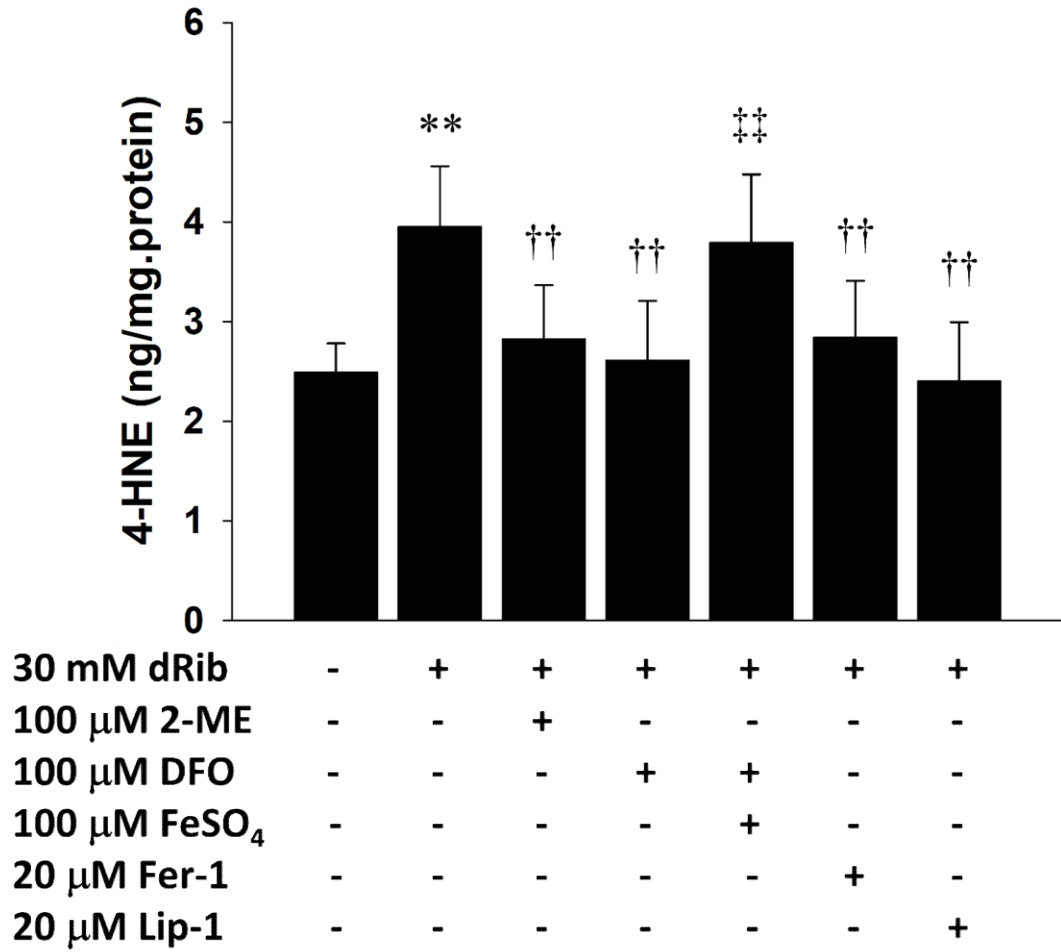


Fig. 4A

**A**

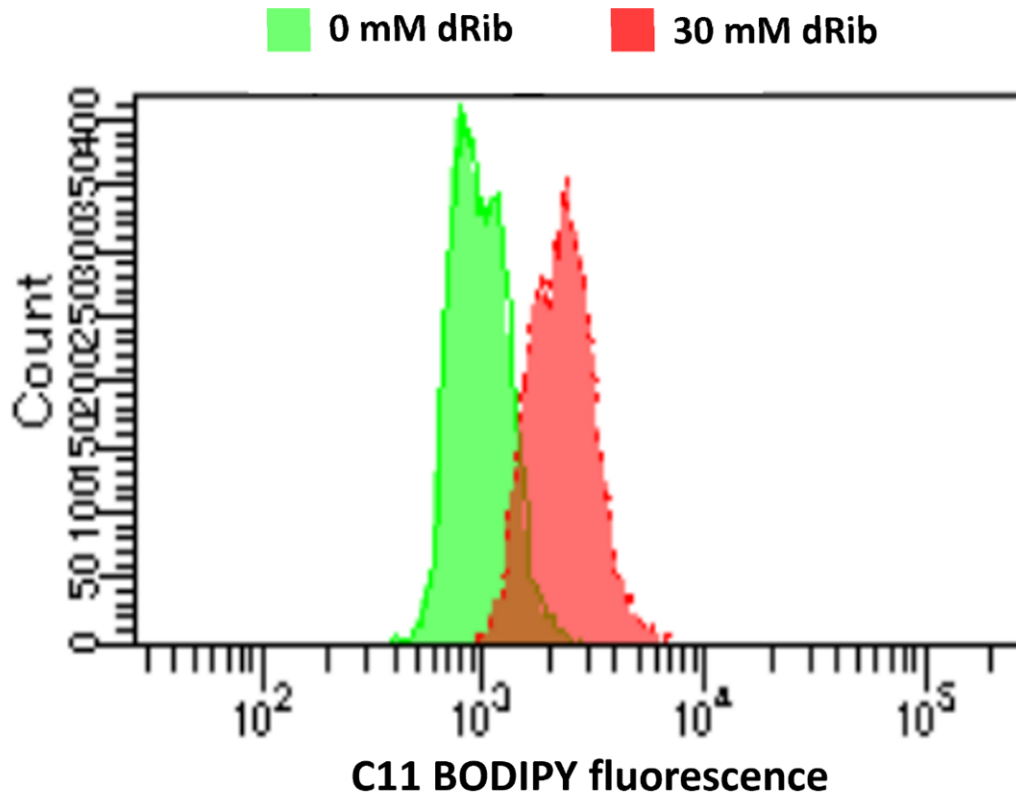


Fig. 4B

**B**

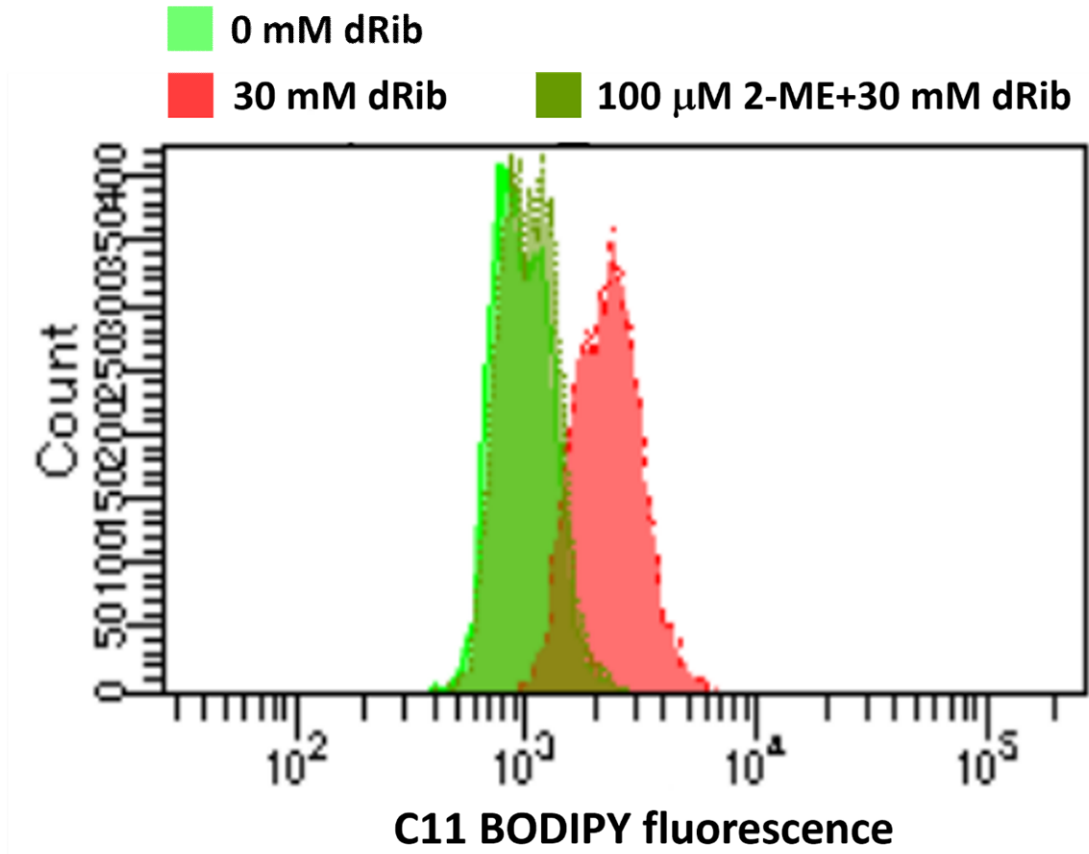




Fig. 4C

**C**

0 mM dRib      100  $\mu$ M DFO+30 mM dRib  
30 mM dRib    100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>+100  $\mu$ M DFO+30 mM dRib

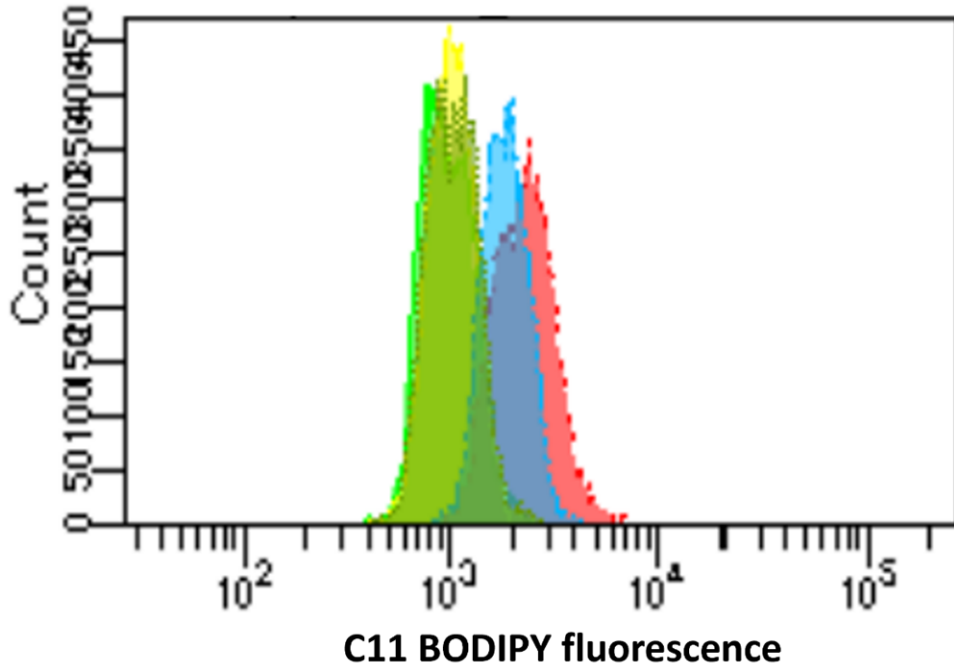


Fig. 4D

**D**

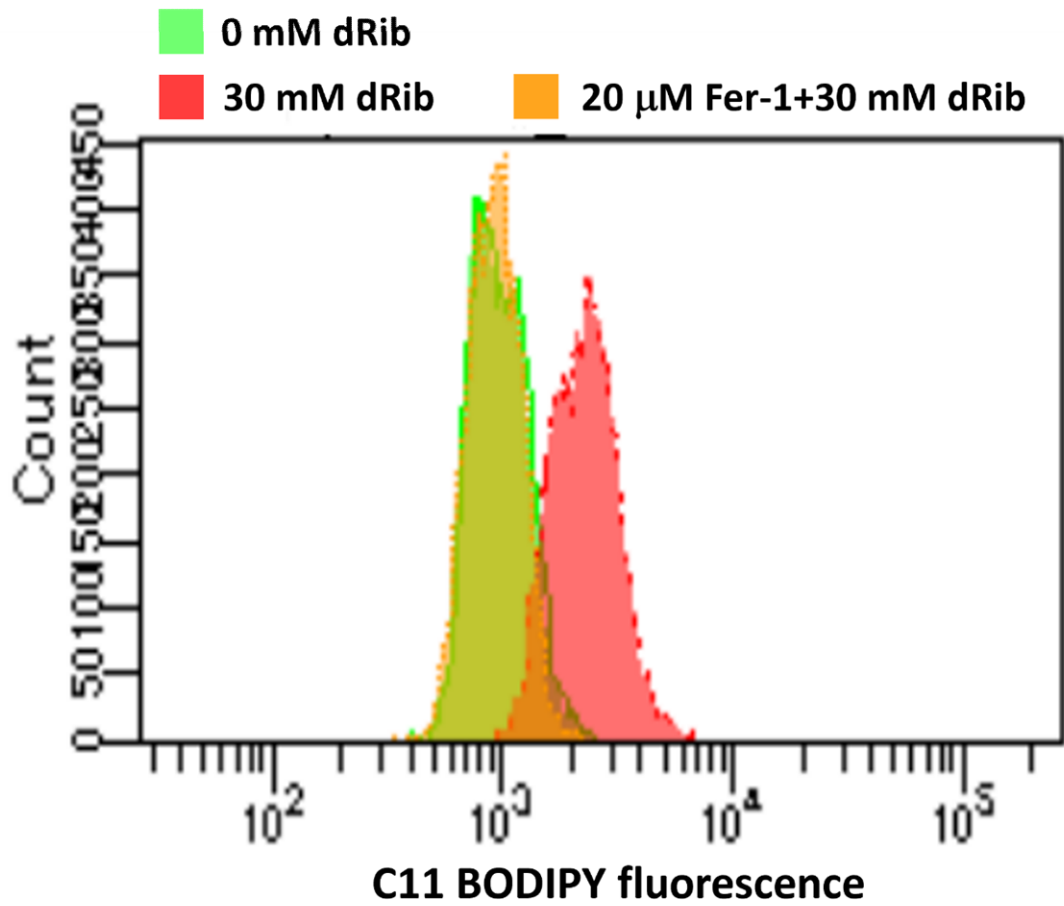


Fig. 4E

**E**

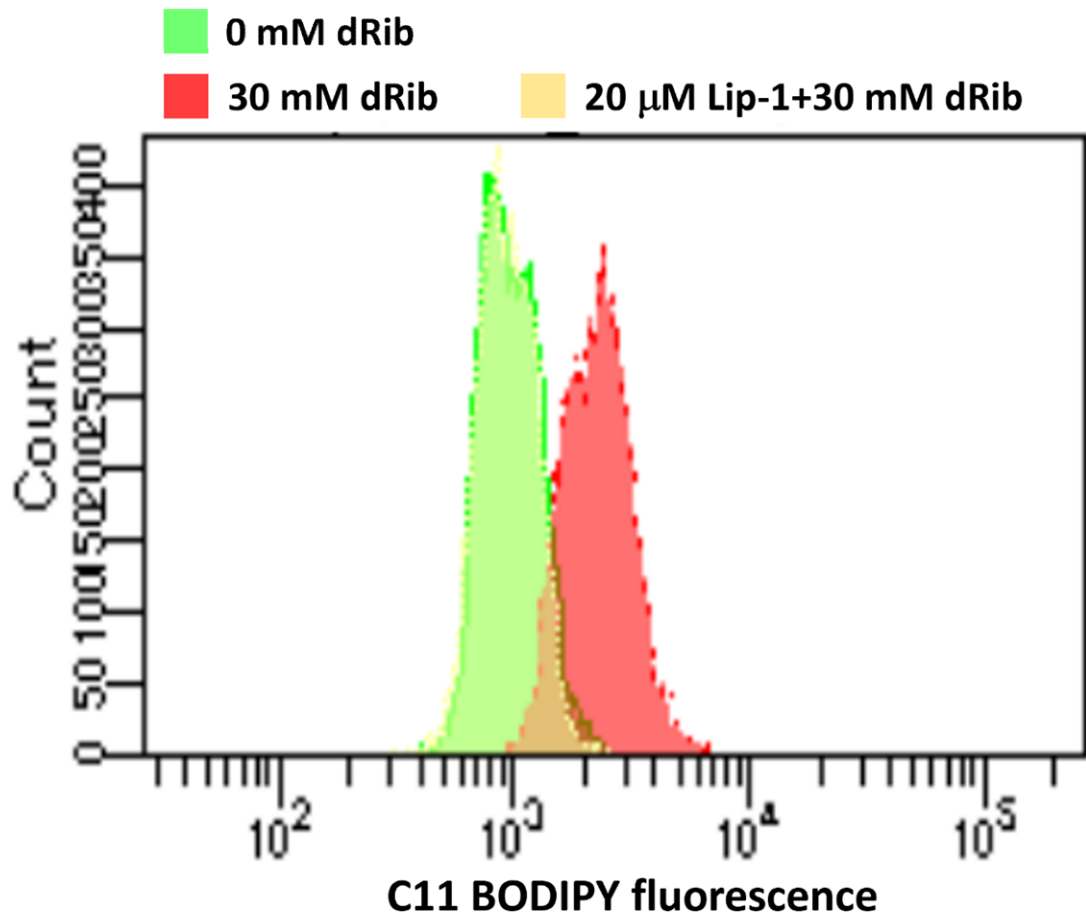
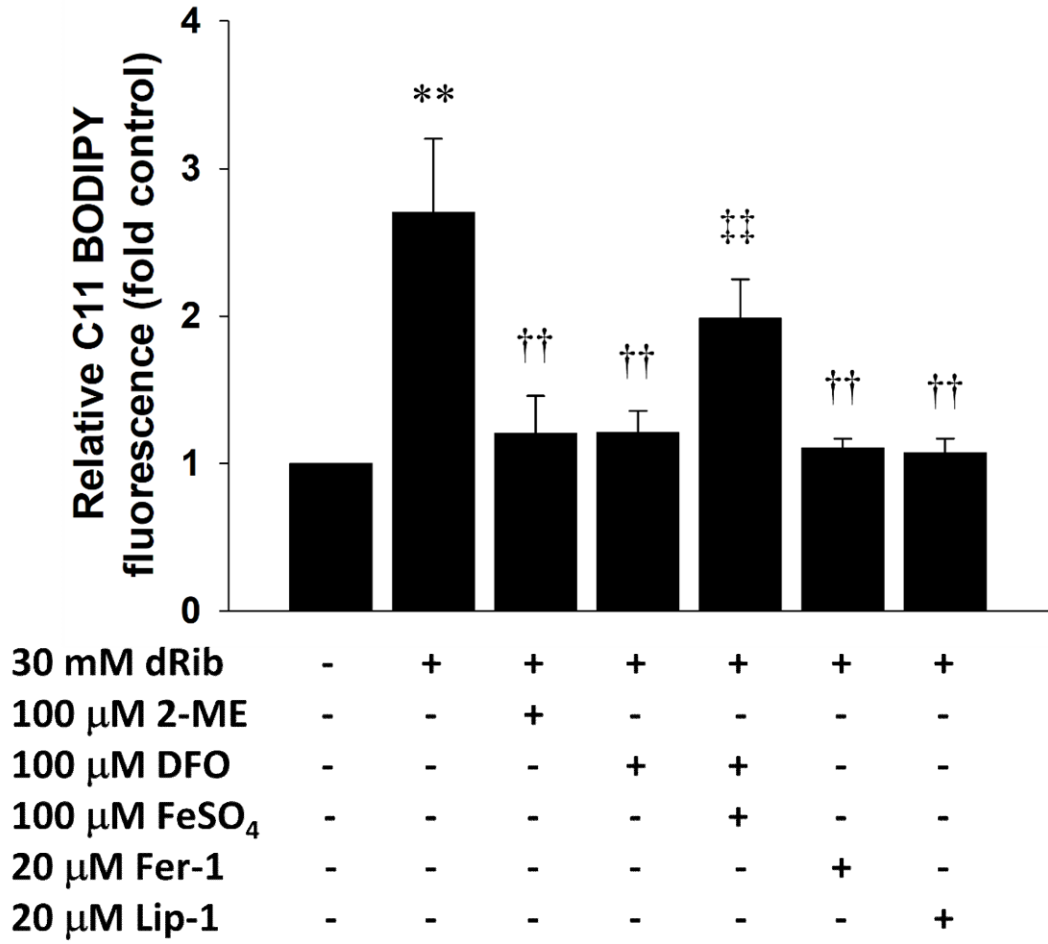


Fig. 4F

**F**



### 3.4. dRib은 미토콘드리아의 형태학적 변화를 초래한다

Ferroptosis는 기전 뿐만 아니라 형태학적 변화도 다른 세포사들과 구별된다 [3]. 우리는 RINm5F 세포를 6시간 동안 dRib으로 자극 후 TEM으로 관찰하였다. Necrosis or apoptosis와 달리 nuclear integrity와 plasma membrane이 잘 보존돼(preserved) 있었고, chromatin condensation이나 plasma membrane blebbing은 관찰되지 않았다 (Fig. 5C). 대신 ferroptosis의 특징인 미토콘드리아의 변화가 많이 관찰되었다. 미토콘드리아의 음영이 증가하고, 수축되었으며 (shrunken), 그리고 둥그레졌다 (round-shape). 또한 미토콘드리아의 융기들의 수가 감소하고(reduced cristae), 외막파열 (outer membrane rupture) 소견이 관찰되었다 (Fig. 5C-E).

Fig. 5A

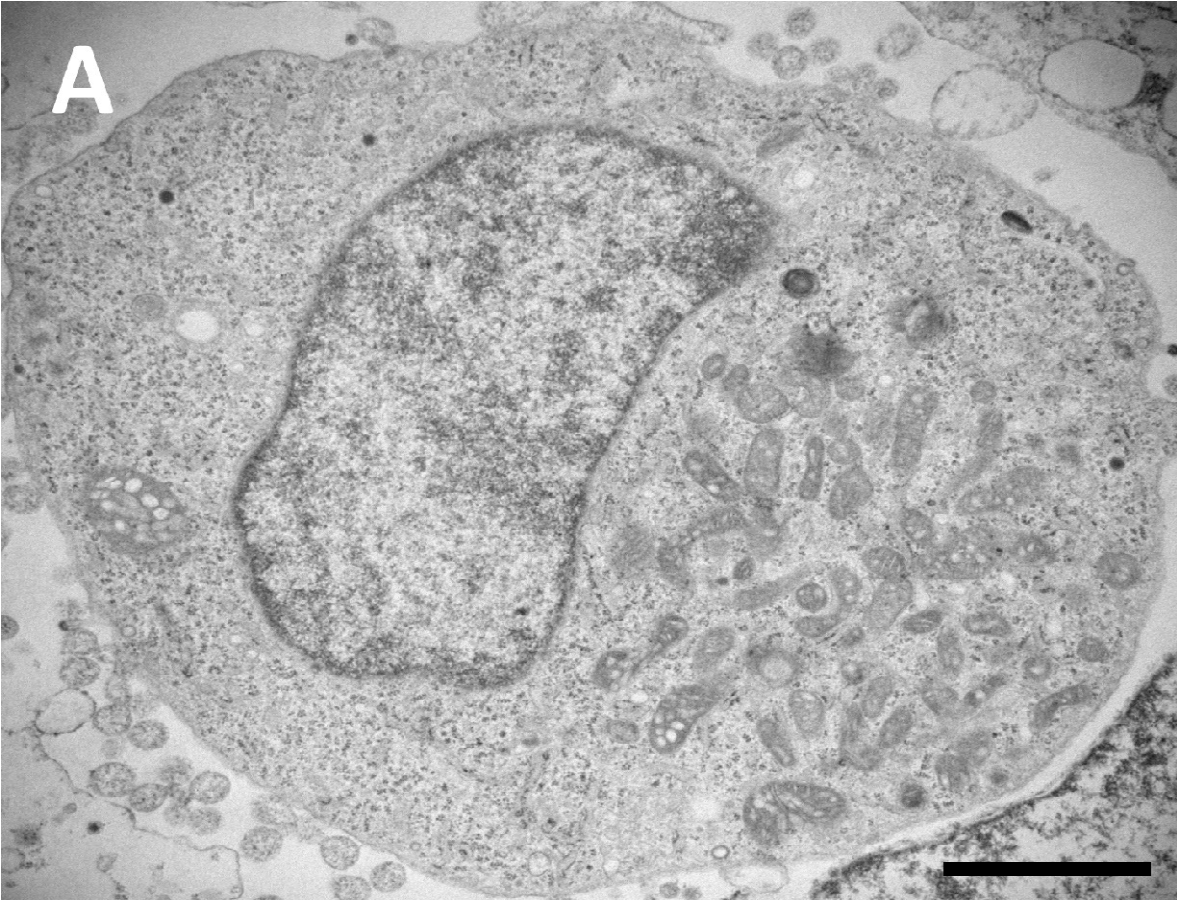


Fig. 5B

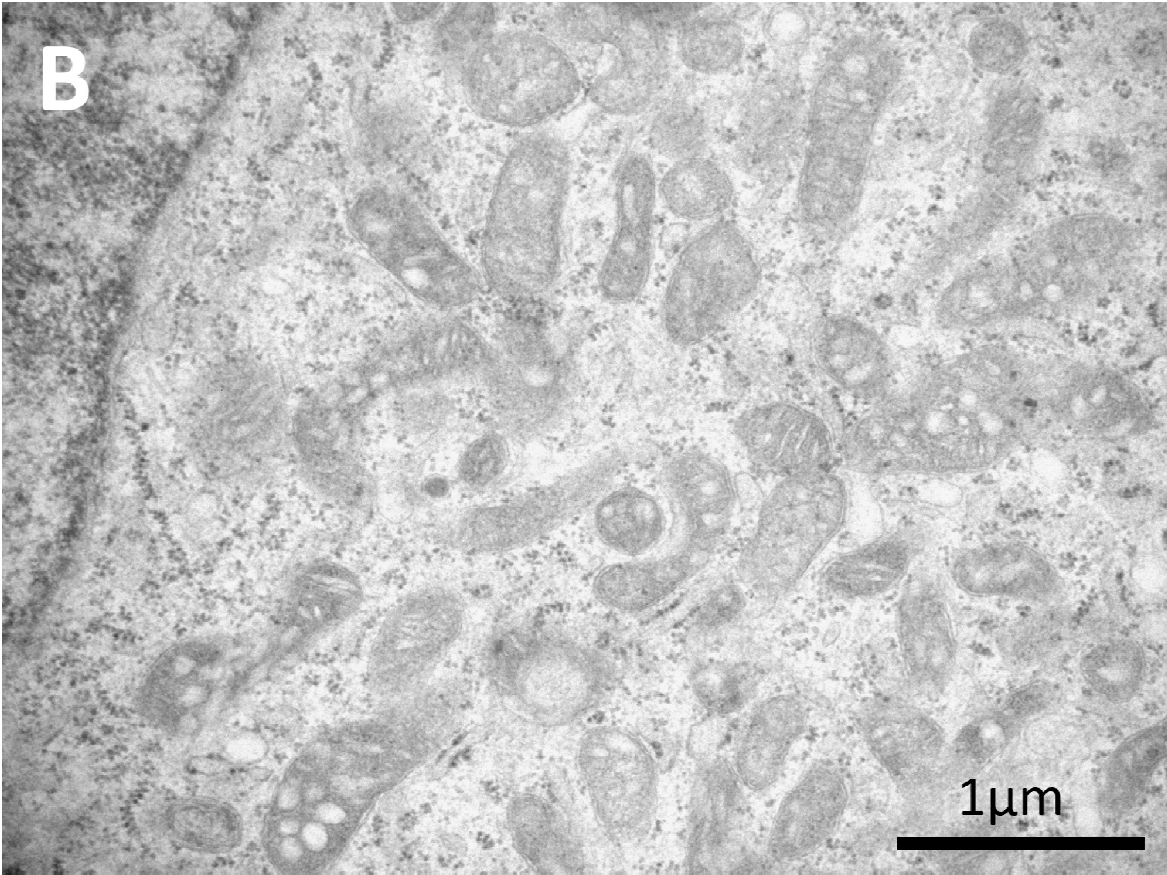




Fig. 5C

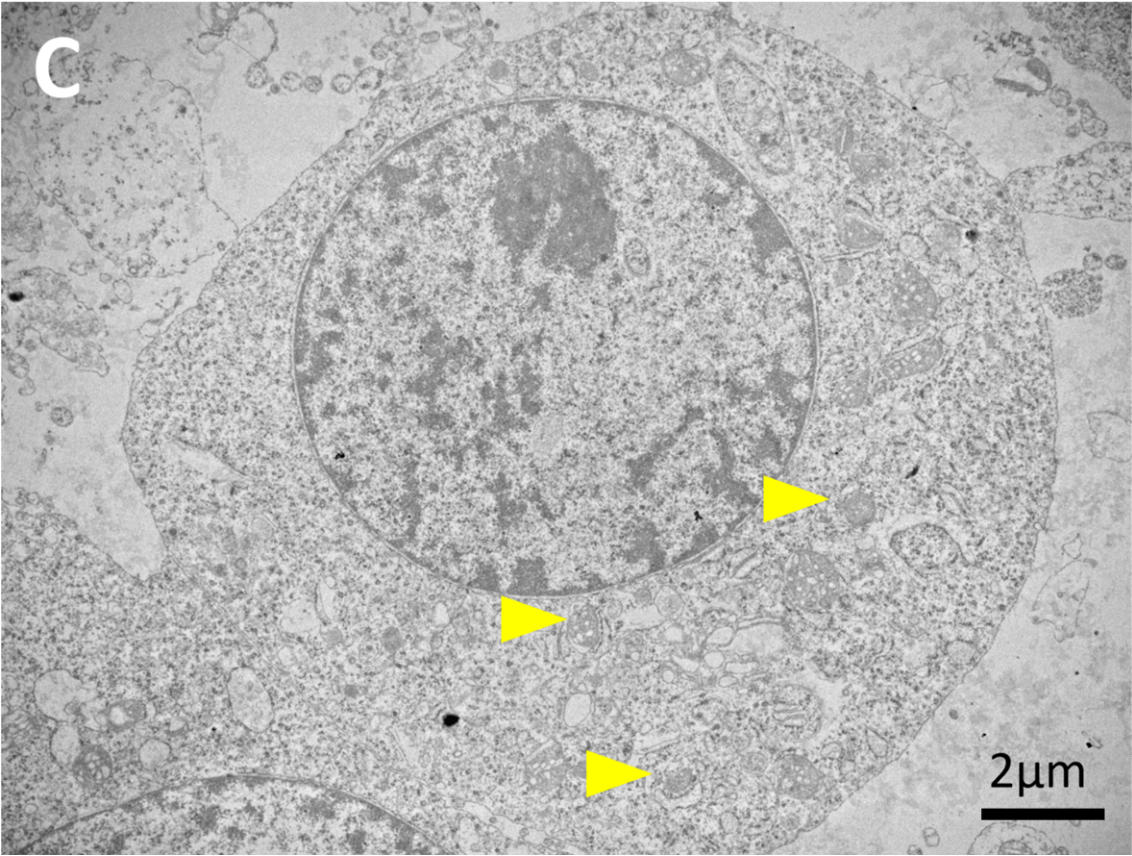




Fig. 5D

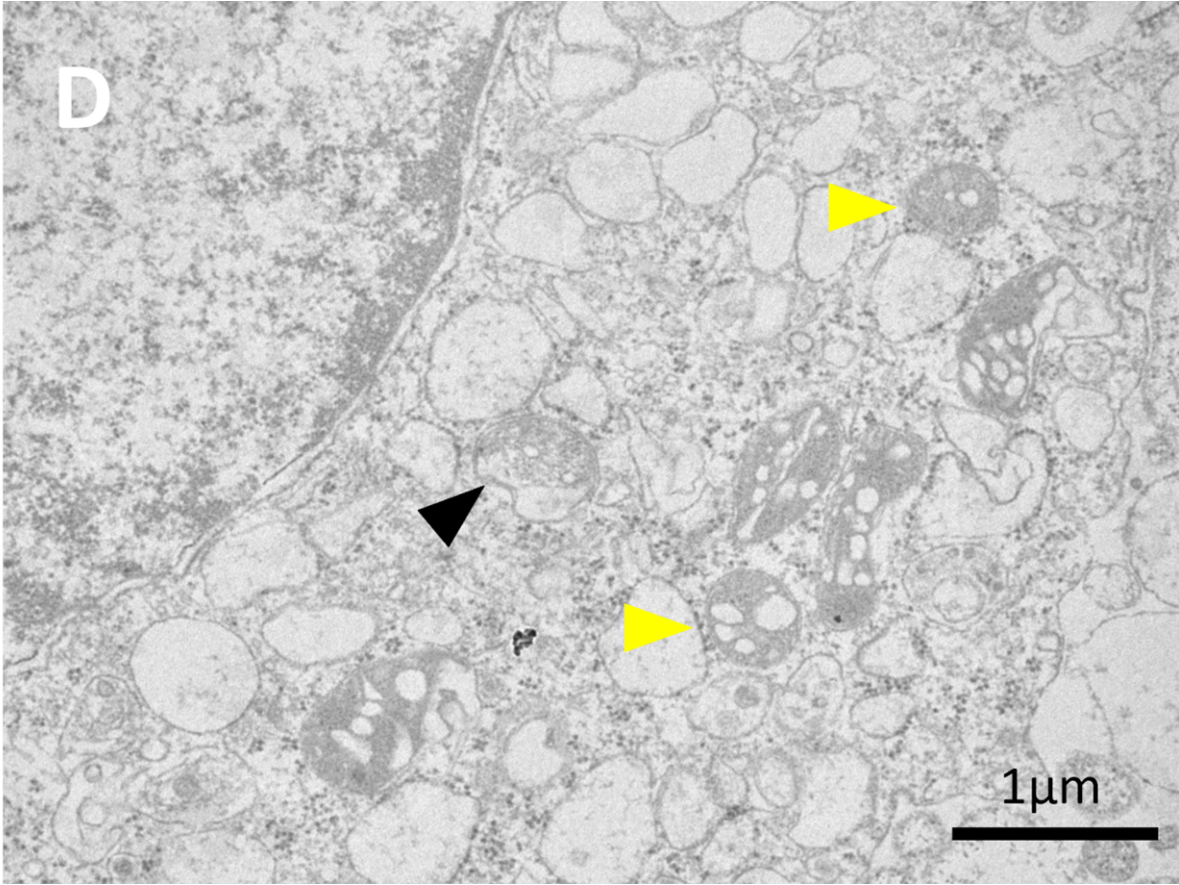
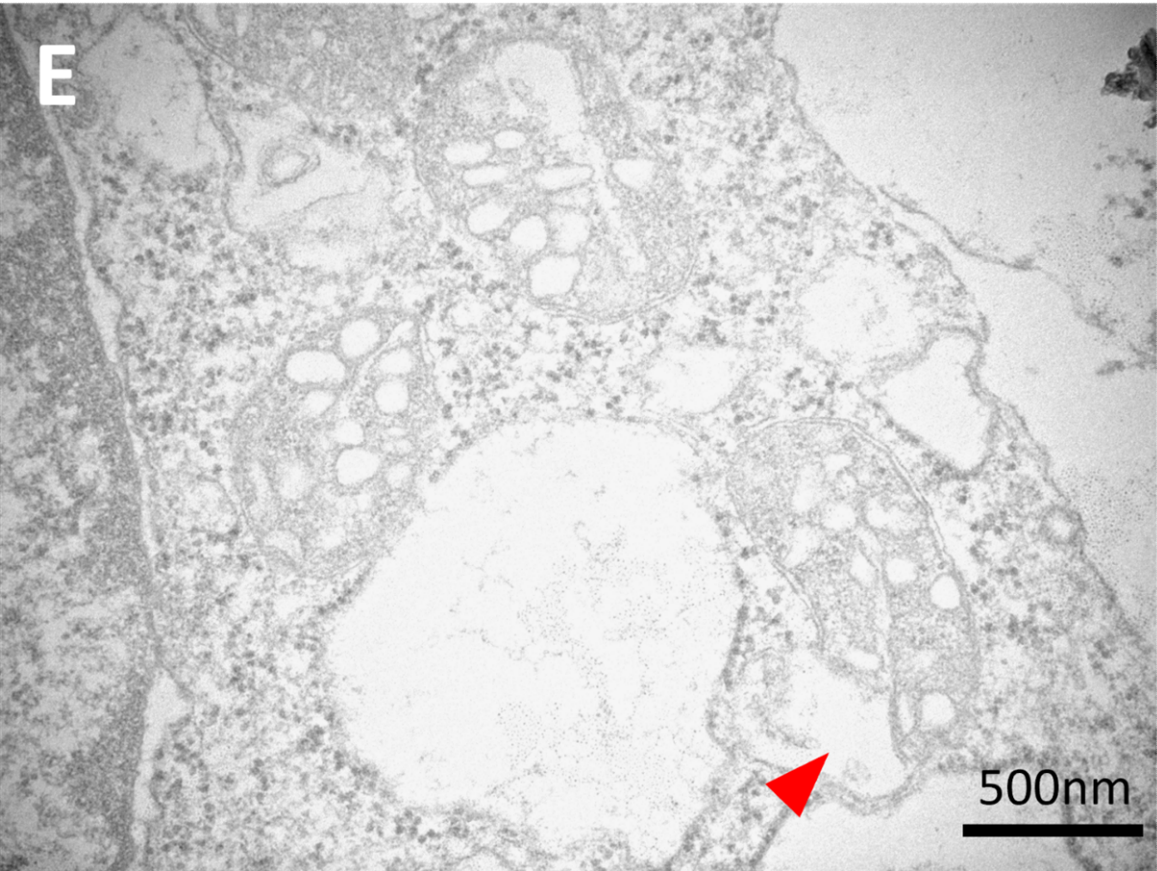


Fig. 5E



3.5. Isolated islets에서 mercaptoethanol, iron chelator와 lipid radical scavengers는 dRib에 의한 GSH depletion & cell death를 예방한다

우리는 쥐로부터 분리한 islets을 일차배양하여 dRib, 2-ME, DFO, FeSO<sub>4</sub>, Fer-1 and Lip-1의 효과를 조사하였다. Isolated islets에서 dRib은 cystine의 세포내 섭취를 감소시키고, GSH를 고갈시켰으며, 그리고 cell death를 유발하였다. System x<sub>c</sub>-를 우회하여 cystine uptake를 증가시키는 2-ME는 dRib에 의한 cystine 섭취감소, GSH 고갈, 그리고 cell death를 모두 예방하였다. DFO는 dRib에 의한 cystine 섭취감소와 GSH 고갈에는 영향이 없었으나 cell death는 예방하였다. DFO의 cell death 예방효과는 FeSO<sub>4</sub>에 의해 상쇄되었다. Fer-1와 Lip-1도 dRib에 의한 cystine 섭취감소와 GSH 고갈에는 영향이 없었으나 cell death는 유의하게 예방하였다 (Fig. 6A, B and C). 따라서 RINm5F 세포 뿐만 아니라 islets에서 관찰되는 dRib에 의한 세포사도 ferroptosis일 것으로 생각한다.

Fig. 6A

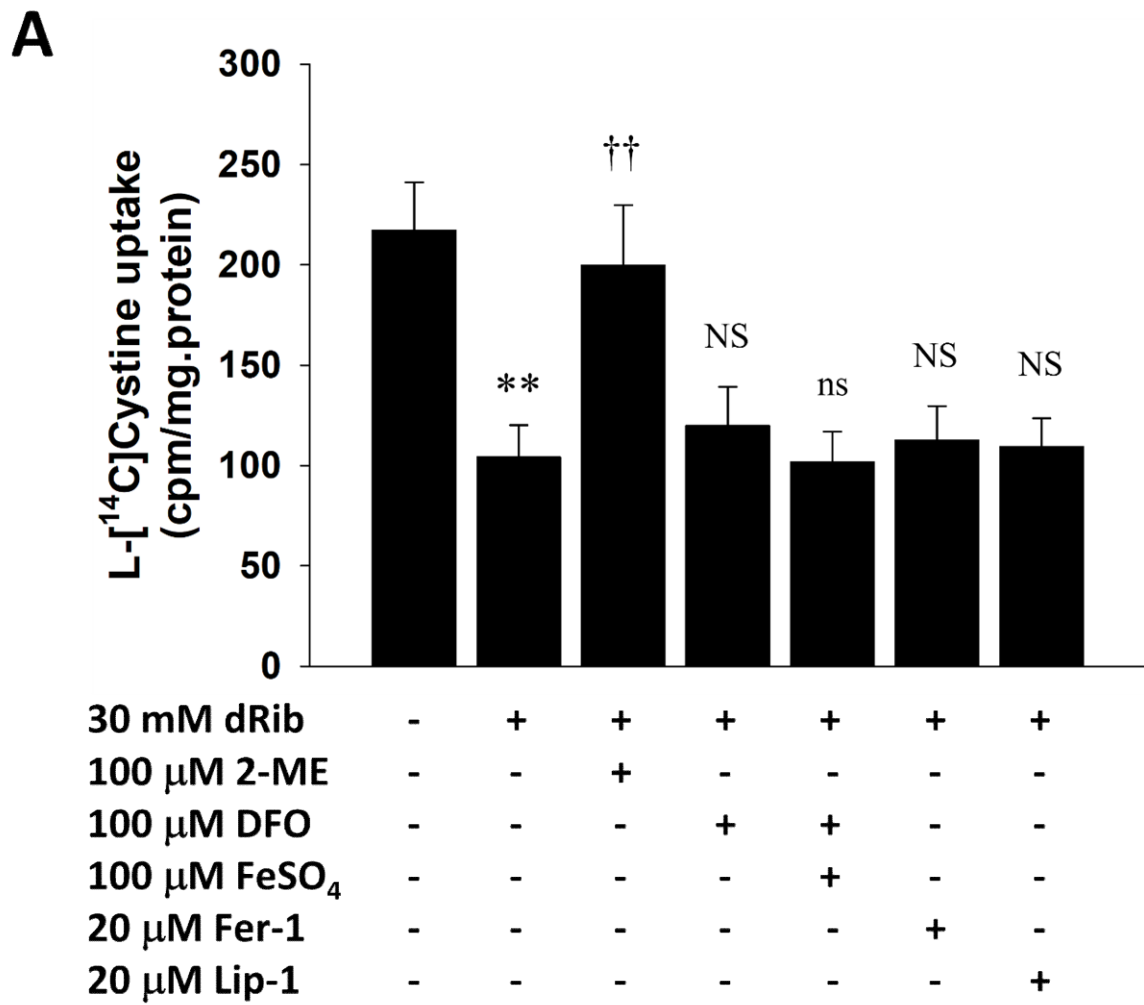
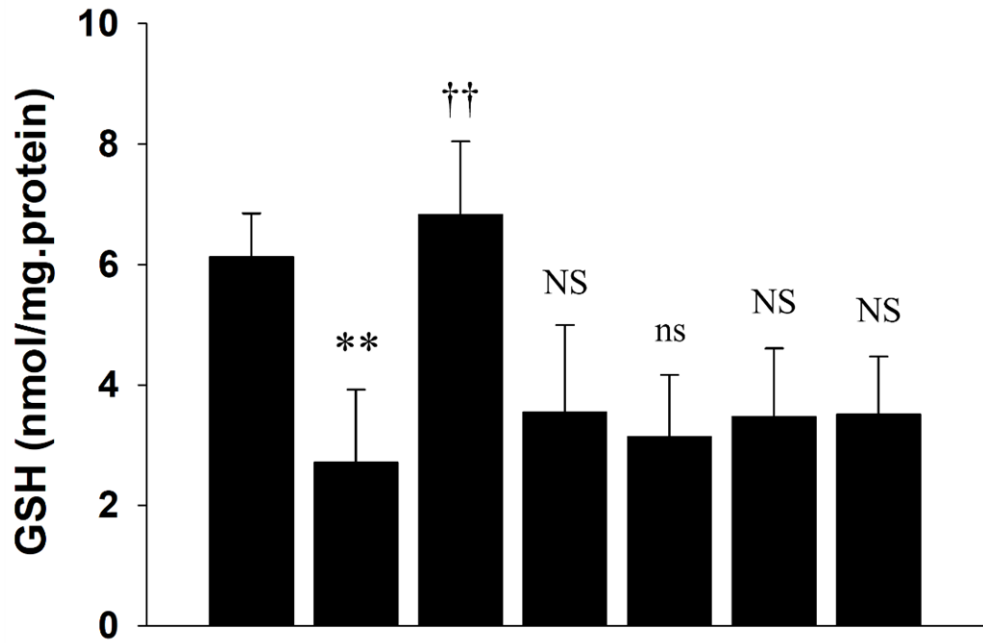


Fig. 6B

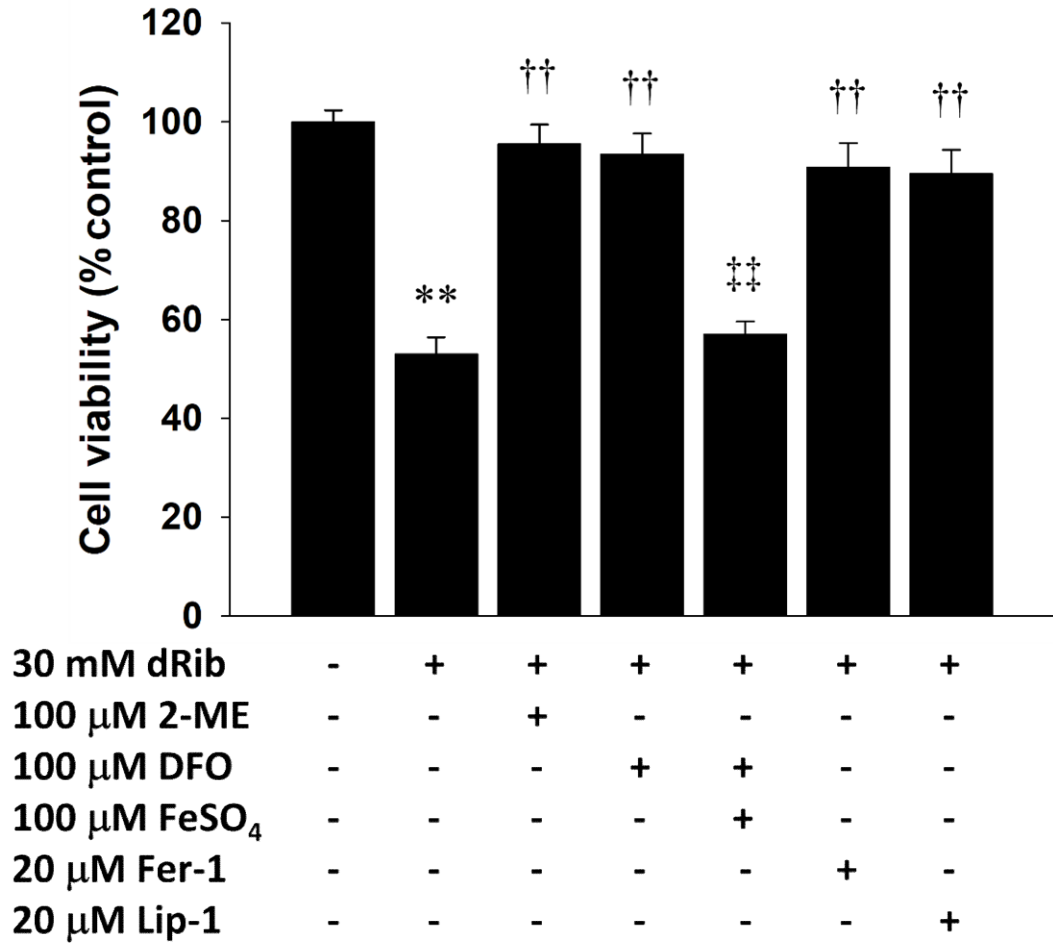
**B**



30 mM dRib	-	+	+	+	+	+	+
100 μM 2-ME	-	-	+	-	-	-	-
100 μM DFO	-	-	-	+	+	-	-
100 μM FeSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	+	-	-
20 μM Fer-1	-	-	-	-	-	+	-
20 μM Lip-1	-	-	-	-	-	-	+

Fig. 6C

**C**



## IV. DISCUSSION

본 연구에서 dRib은 lipid peroxidation을 증가시키고 GSH를 고갈시키며 베타세포의 죽음을 유발하였다. dRib에 의해 증가된 lipid peroxidation과 고갈된 GSH 그리고 세포사는 mercaptoethanol, iron chelator 그리고 lipid radical scavengers에 의해 현저히 억제되었다. 이러한 현상은 베타세포주 뿐만 아니라 일차배양한 islets에서도 관찰되었다. 또한 전자현미경을 통해 dRib에 의한 주된 형태변화가 미토콘드리아에서 발생했음을 확인하였다. 우리는 이전 연구에서 system  $\chi_c$ -의 과발현이 cystine의 세포내이동을 향진시켜 dRib에 의한 GSH 고갈과 산화손상을 예방한다고 보고한 바 있다 [21]. 따라서 본 연구결과와 이전 연구결과들을 종합할 때 dRib에 의해 유발된 베타세포의 죽음이 system  $\chi_c$ - 억제로 인해 GSH가 고갈되어 유발되는, iron에 의해 매개되고 lipid peroxidation을 특징으로 하는 ferroptosis라고 결론 지을 수 있다 (Fig. 7).

세포의 죽음이 ferroptosis라고 결론 내리기 위해서는 일반적으로 그 죽음이 iron chelator 뿐만 아니라 Fer-1과 Lip-1 등의 lipophilic antioxidants에 의해서도 억제되어야 하며, 세포내 lipid hydroperoxides의 accumulation이 증명되어야 한다 [5,31]. DFO는 potent iron chelator로 철분과잉(iron overload) 질환의 치료에 널리 쓰이며 [28], iron에 의해 매개되는 ferroptosis를 억제한다고 잘 알려져 있다 [29]. Fer-1과 Lip-1은 Stockwell 등 [3]과 Conrad 등 [30] 이 small molecule libraries의 high-throughput screening을 통해 발견한 ferroptosis 억제제로 lipid hydroperoxides의 accumulation을 방지한다고 알려져 있다. 우리는 dRib에 의한 세포손상이 iron chelator인 DFO와 lipophilic antioxidant인 Fer-1과 Lip-1에 의해 모두 억제됨을 증명하였고, lipid peroxidation의 입증은 dRib 자극에 의해 lipid peroxidation의 secondary products인 MDA와 4-HNE의 세포내 농도가 증가함을 확인했고 또한 C11-BODIPY staining을 통해 세포내 lipid peroxide 농도가 dRib에 의해 증가됨을 확인하였다. 따라서 본 연구의 데이터는 ferroptosis에 부합하다고 할 수 있다. 이 뿐만 아니라 주사전자현미경을 통해 확인한 dRib 자극을 받은 세포의 형태학적 특징은 shrunken mitochondria, reduced/vanishing cristae, outer mitochondrial membrane rupture 등 미토콘드리아 변화가 주된 소견이었고, 반면 nuclear integrity가 잘 보존되어 있었고 chromatin condensation or plasma membrane blebbing 등의 소견은 관찰되지 않아 다른 종류의



세포사들을 배제할 수 있었다. 이러한 전자현미경 소견은 dRib에 의한 ferroptosis를 더욱 뒷받침한다 [1,32].

Ferroptosis가 iron-dependent mechanism임을 보다 확실히 입증하기 위해 dRib에 의한 세포사와 지질산화를 억제하는 DFO의 효과가 iron ( $\text{FeSO}_4$ ) 처치에 의해 상쇄되는지 확인하였다. 본 연구에서 DFO는 dRib에 의한 세포사와 지질산화를 예방하였으나, DFO의 이러한 효과는  $\text{FeSO}_4$  추가 처치에 의해 거의 사라졌다. 따라서 iron-dependent mechanism이 확실하다고 할 수 있다. System  $x_c^-$  inhibitor로 가장 잘 알려진 erastin에 의한 세포사도 외부 iron 공급에 의해 가중된다고 한다 [3]. Erastin-induced ferroptosis에 취약한 RAS oncogene을 가진 종양세포주들은 정상세포에 비해 세포내 iron 함량이 많다고 알려져 있으며 [34], 제2형당뇨병이 체내 iron storage 증가와 관련되고 [35,36] iron toxicity가 인슐린 합성과 분비를 저하시킨다는 보고들 [35,37]은 당뇨병의 병인에서 베타세포 ferroptosis의 역할을 시사한다.

이전 연구에서 우리는 RIN5mF 세포를 dRib으로 자극하면 cystine의 세포내 이동을 감소시키므로 세포내 GSH가 고갈되어 세포가 산화스트레스로 죽게 되고, xCT를 과발현시키면 cystine의 세포내 이동이 증가되어 dRib에 의한 GSH 고갈 및 산화손상이 예방한다고 하였다 [21]. 본 연구에서 우리는 xCT의 mRNA와 protein 발현을 조사하였다. 자극하는 dRib 양이 증가함에 따라 xCT의 mRNA와 protein 발현이 농도의존적으로 증가함을 확인하였다. dRib이 system  $x_c^-$ 를 억제함으로써 세포내 산화스트레스가 증가되고 이를 극복하기 위한 compensatory transcriptional upregulation of xCT 때문에 xCT 발현이 증가된 것으로 생각한다. Dixon 등 [3]의 연구에서도 erastin과 sulfasalazine 등의 system  $x_c^-$  억제제들이 xCT 발현을 증가시키고, 이렇게 증가된 xCT 발현은 세포내 cystine 이동을 증가시키는 2-ME에 의해 감소됨이 관찰되었다. 세포내 산화스트레스가 증가되면 이를 극복하기 위해 세포내 GSH 생산을 늘리기 위한 system  $x_c^-$ 의 기능적 단위인 SLC7A11 (xCT) 발현이 증가되는 것은 이미 알려져 있다 [38,39]. 그러나 system  $x_c^-$ 의 구조적 단위인 4F2hc (SLC3A2) 발현은 증가되지 않는다고 한다 [38]. Stockwell 등 [5]은 ferroptosis가 system  $x_c^-$  억제로 발생했다고 주장하기 위해서는 GSH가 감소되어야 하고 system  $x_c^-$ 를 우회하여 cystine의 세포내 이동을 증가시키는 mercaptoethanol에 의해 세포사가 억제되어야 한다고 하였다. 우리는 본 연구에서 RIN5mF cells 및 isolated islets을 대상으로 dRib에 의한 cystine transport, GSH content and cell viability의 감소들이 mercaptoethanol에

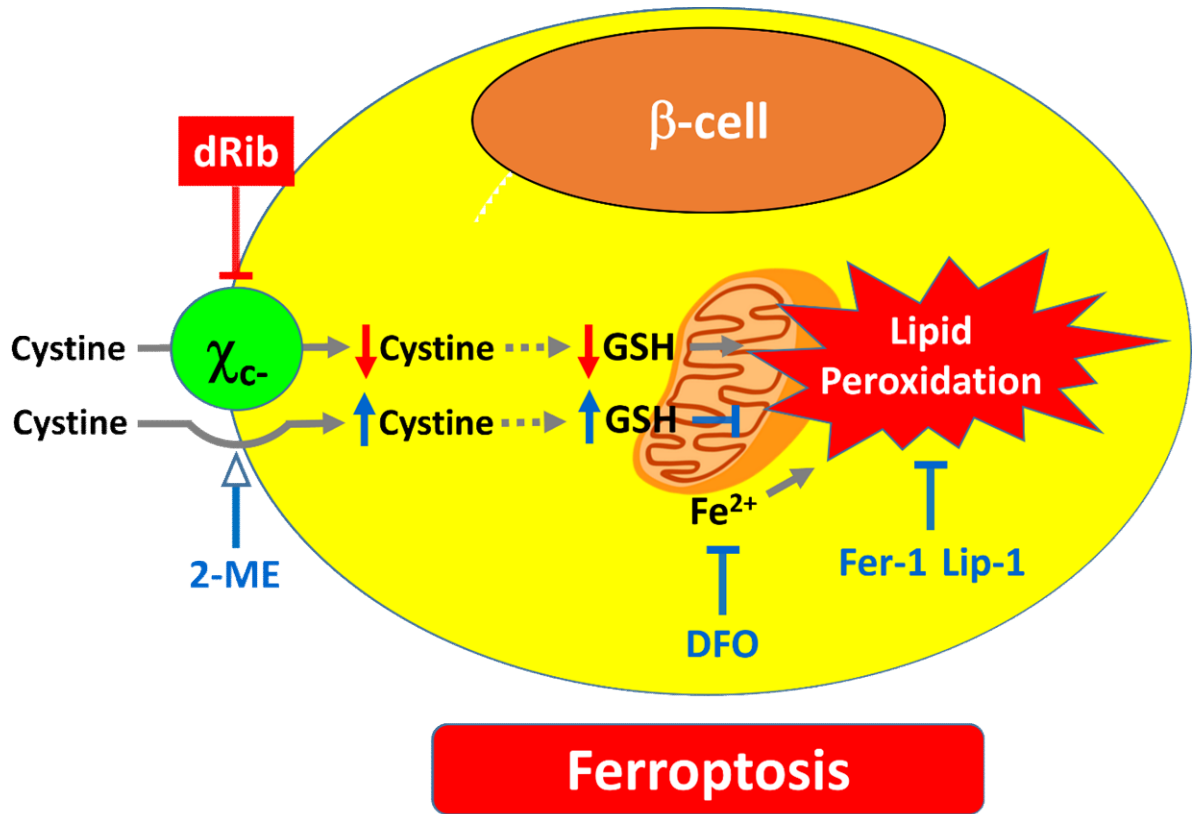


의해 전부 예방됨을 확인하였다. 따라서 dRib에 의한 ferroptosis는 system  $X_c$ - 억제 때문이라고 결론 내릴 수 있다. 또한 본 연구에서 mercaptoethanol과 달리 DFO, Fer-1 and Lip-1은 dRib에 의한 cytotoxicity는 예방했으나 cystine transport와 GSH content는 유의하게 회복시키지 못했다. 이는 DFO는 iron-chelator로 Fenton reaction을 통한 lipid peroxyl radicals 생성을 억제함으로써 lipid peroxidation을 예방하고 [40,41], Fer-1 & Lip-1은 radical-trapping antioxidant로서 lipid peroxyl radicals을 소거함으로써 lipid peroxidation을 예방하기 때문이다 [3,42]. 즉 DFO, Fer-1 and Lip-1은 cystine uptake나 GSH synthesis에는 관여하지 않고 그 보다 하부(distal) 단계에 작용하여 ferroptosis를 억제한 결과로 볼 수 있다 (Fig. 7).

우리 연구는 적지 않은 제한점들을 가지고 있다. 첫째, ferroptosis에 대한 유전자 연구를 하지 않았다. Ferroptosis는 necrosis, apoptosis, autophagy, and necroptosis 등의 다른 세포사들과 morphologically, biochemically, and genetically 명백히 다른 특징들을 가진다 [5,6]. 우리는 본 연구에서 ferroptosis를 입증할 biochemical and morphological approaches는 시도했으나 genetic study는 시행하지 않았다. Ferroptosis는 다른 세포사들과 달리 여러 미토콘드리아 유전자들과 CHAC1, PTGS2, and ACSL4 등의 유전자들과 연관된다고 알려져 있다 [5,32]. 그러나 이런 유전자들의 변화가 항상 관찰되는 것은 아니라고 한다 [5]. 따라서 우리는 이런 genetic study가 dRib-induced ferroptosis 입증에 꼭 필요하다고 생각하지는 않았다. 둘째, 본 연구는 베타세포에 국한된 연구로 베타세포주인 RIN5mF와 일차배양한 islets을 대상으로 본 연구를 수행하였다. 향후 다른 종류의 세포들과 동물을 대상으로 한 연구가 필요하다. 셋째, 아직까지 당뇨병 병인에서 ferroptosis의 역할이 거의 밝혀진 게 없다. 우리는 당뇨병의 발생과 진행에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 베타세포에서 dRib-induced ferroptosis를 연구하였다. 그러나 당뇨병에서 ferroptosis 역할이 제대로 증명된 바 없어 본 연구결과가 어떤 임상적 의미를 가지는지 아직 알 수 없다. 향후 당뇨병 모델에서 베타세포의 ferroptosis 연구가 필요하다고 생각한다. 넷째, dRib이 system  $X_c$ -를 억제하는 구체적 기전을 알 수 없다. 본 연구의 결과로는 dRib이 system  $X_c$ -를 direct inhibition 하는지, system  $X_c$ -의 posttranslational modification에 관여하여 억제하는지 아니면 다른 세부기전이 존재하는지 알 수 없다. 또한 erastin 등의 small molecule들과 system  $X_c$ -를 억제하는 기전이 어떻게 다른 지 아직 모른다. 향후 세부기전에 대한 추가연구가 필요하다.

결론적으로 dRib은 베타세포에서 system  $X_c$ -를 억제하여 cystine의 세포내 이동을 감소시킴으로써, GSH를 고갈시키고 lipid peroxidation을 유발하여 ferroptosis를 초래한다고 할 수 있다. 향후 당뇨병모델을 이용한 연구에서 ferroptosis가 규명된다면 dRib은 당뇨병 병인연구에 이용될 수 있다. 또한 dRib은 ferroptosis가 병인으로 작용한다고 알려진 cancer, 허혈/재관류 손상, chronic neurodegenerative diseases, 신장 및 간질환 그리고 각종 염증 및 면역질환들의 연구에도 유용하게 쓰여질 수 있으며, 이를 위해 향후 다른 종류의 세포 및 동물을 대상으로 한 추가연구들이 필요하다.

Fig. 7



## V. REFERENCES

- [1] J. Li, F. Cao, H.L. Yin, Z.J. Huang, Z.T. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang, Ferroptosis: past, present and future, *Cell Death Dis* 11(2) (2020) 88.
- [2] J. Zhu, Y. Xiong, Y. Zhang, J. Wen, N. Cai, K. Cheng, H. Liang, W. Zhang, The Molecular Mechanisms of Regulating Oxidative Stress-Induced Ferroptosis and Therapeutic Strategy in Tumors, *Oxid Med Cell Longev* 2020 (2020) 8810785.
- [3] S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht, R. Skouta, E.M. Zaitsev, C.E. Gleason, D.N. Patel, A.J. Bauer, A.M. Cantley, W.S. Yang, B. Morrison, 3rd, B.R. Stockwell, Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death, *Cell* 149(5) (2012) 1060-72.
- [4] N. Yagoda, M. von Rechenberg, E. Zaganjor, A.J. Bauer, W.S. Yang, D.J. Fridman, A.J. Wolpaw, I. Smukste, J.M. Peltier, J.J. Boniface, R. Smith, S.L. Lessnick, S. Sahasrabudhe, B.R. Stockwell, RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels, *Nature* 447(7146) (2007) 864-8.
- [5] B.R. Stockwell, J.P. Friedmann Angeli, H. Bayir, A.I. Bush, M. Conrad, S.J. Dixon, S. Fulda, S. Gascon, S.K. Hatzios, V.E. Kagan, K. Noel, X. Jiang, A. Linkermann, M.E. Murphy, M. Overholtzer, A. Oyagi, G.C. Pagnussat, J. Park, Q. Ran, C.S. Rosenfeld, K. Salnikow, D. Tang, F.M. Torti, S.V. Torti, S. Toyokuni, K.A. Woerpel, D.D. Zhang, Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease, *Cell* 171(2) (2017) 273-285.
- [6] M.Y. Yao, T. Liu, L. Zhang, M.J. Wang, Y. Yang, J. Gao, Role of ferroptosis in neurological diseases, *Neurosci Lett* 747 (2021) 135614.
- [7] I. Cepelak, S. Dodig, D.C. Dodig, Ferroptosis: regulated cell death, *Arh Hig Rada Toksikol* 71(2) (2020) 99-109.
- [8] X. Jiang, B.R. Stockwell, M. Conrad, Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(4) (2021) 266-282.
- [9] S. Bannai, Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts, *J Biol Chem* 261(5) (1986) 2256-63.

- [10] P. Koppula, Y. Zhang, L. Zhuang, B. Gan, Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer, *Cancer Commun (Lond)* 38(1) (2018) 12.
- [11] R. Dringen, J. Hirrlinger, Glutathione pathways in the brain, *Biol Chem* 384(4) (2003) 505-16.
- [12] L.J. Su, J.H. Zhang, H. Gomez, R. Murugan, X. Hong, D. Xu, F. Jiang, Z.Y. Peng, Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis, *Oxid Med Cell Longev* 2019 (2019) 5080843.
- [13] F. Ursini, A. Bindoli, The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes, *Chem Phys Lipids* 44(2-4) (1987) 255-76.
- [14] S.J. Dixon, D.N. Patel, M. Welsch, R. Skouta, E.D. Lee, M. Hayano, A.G. Thomas, C.E. Gleason, N.P. Tatonetti, B.S. Slusher, B.R. Stockwell, Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis, *Elife* 3 (2014) e02523.
- [15] C. Louandre, Z. Ezzoukhry, C. Godin, J.C. Barbare, J.C. Maziere, B. Chauffert, A. Galmiche, Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib, *Int J Cancer* 133(7) (2013) 1732-42.
- [16] X. Chen, C. Yu, R. Kang, G. Kroemer, D. Tang, Cellular degradation systems in ferroptosis, *Cell Death Differ* 28(4) (2021) 1135-1148.
- [17] L. Liu, R. Liu, Y. Liu, G. Li, Q. Chen, X. Liu, S. Ma, Cystine-glutamate antiporter xCT as a therapeutic target for cancer, *Cell Biochem Funct* 39(2) (2021) 174-179.
- [18] T. Ishii, S. Bannai, Y. Sugita, Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine, *J Biol Chem* 256(23) (1981) 12387-92.
- [19] V.M. Monnier, Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process, *J Gerontol* 45(4) (1990) B105-11.
- [20] S.P. Wolff, R.T. Dean, Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes, *Biochem J* 245(1) (1987) 243-50.
- [21] S. Yoo, J.Y. Bae, J. Moon, G. Koh, Systemic overexpression prevents

- 2-deoxy-d-ribose-induced beta-cell damage, *Free Radic Biol Med* 153 (2020) 17–25.
- [22] P.E. Lacy, M. Kostianovsky, Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas, *Diabetes* 16(1) (1967) 35–9.
- [23] M. Tomi, K. Hosoya, H. Takanaga, S. Ohtsuki, T. Terasaki, Induction of xCT gene expression and L-cystine transport activity by diethyl maleate at the inner blood-retinal barrier, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(3) (2002) 774–9.
- [24] A. Benedetti, M. Comporti, H. Esterbauer, Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim Biophys Acta* 620(2) (1980) 281–96.
- [25] W.A. Pryor, On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples, *Free Radic Biol Med* 7(2) (1989) 177–8.
- [26] N. Zarkovic, 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes, *Mol Aspects Med* 24(4–5) (2003) 281–91.
- [27] H. Esterbauer, P. Eckl, A. Ortner, Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors, *Mutat Res* 238(3) (1990) 223–33.
- [28] S. Ortega-Gutierrez, J.J. Garcia, E. Martinez-Ballarín, R.J. Reiter, S. Millán-Plano, M. Robinson, D. Acuna-Castroviejo, Melatonin improves deferoxamine antioxidant activity in protecting against lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide in rat brain homogenates, *Neurosci Lett* 323(1) (2002) 55–9.
- [29] S. Doll, M. Conrad, Iron and ferroptosis: A still ill-defined liaison, *IUBMB Life* 69(6) (2017) 423–434.
- [30] J.P. Friedmann Angeli, M. Schneider, B. Proneth, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, V.J. Hammond, N. Herbach, M. Aichler, A. Walch, E. Eggenhofer, D. Basavarajappa, O. Radmark, S. Kobayashi, T. Seibt, H. Beck, F. Neff, I. Esposito, R. Wanke, H. Forster, O. Yefremova, M. Heinrichmeyer, G.W. Bornkamm, E.K. Geissler, S.B. Thomas, B.R. Stockwell, V.B. O'Donnell, V.E. Kagan, J.A. Schick, M. Conrad, Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice, *Nat Cell Biol* 16(12) (2014) 1180–91.
- [31] Z. Shi, L. Zhang, J. Zheng, H. Sun, C. Shao, Ferroptosis: Biochemistry and Biology in Cancers, *Front Oncol* 11 (2021) 579286.
- [32] H. Yu, P. Guo, X. Xie, Y. Wang, G. Chen, Ferroptosis, a new form of cell

death, and its relationships with tumourous diseases, *J Cell Mol Med* 21(4) (2017) 648–657.

[33] S. Wang, J. Luo, Z. Zhang, D. Dong, Y. Shen, Y. Fang, L. Hu, M. Liu, C. Dai, S. Peng, Z. Fang, P. Shang, Iron and magnetic: new research direction of the ferroptosis-based cancer therapy, *Am J Cancer Res* 8(10) (2018) 1933–1946.

[34] W.S. Yang, B.R. Stockwell, Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells, *Chem Biol* 15(3) (2008) 234–45.

[35] D. Basuli, R.G. Stevens, F.M. Torti, S.V. Torti, Epidemiological associations between iron and cardiovascular disease and diabetes, *Front Pharmacol* 5 (2014) 117.

[36] L. Sun, G. Zong, A. Pan, X. Ye, H. Li, Z. Yu, Y. Zhao, S. Zou, D. Yu, Q. Jin, F.B. Hu, X. Lin, Elevated plasma ferritin is associated with increased incidence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Chinese adults, *J Nutr* 143(9) (2013) 1459–65.

[37] R.C. Cooksey, H.A. Jouihan, R.S. Ajioka, M.W. Hazel, D.L. Jones, J.P. Kushner, D.A. McClain, Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis, *Endocrinology* 145(11) (2004) 5305–12.

[38] M. Lo, V. Ling, Y.Z. Wang, P.W. Gout, The xc<sup>-</sup> cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance, *Br J Cancer* 99(3) (2008) 464–72.

[39] Y. Zhao, Y. Li, R. Zhang, F. Wang, T. Wang, Y. Jiao, The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy, *Onco Targets Ther* 13 (2020) 5429–5441.

[40] C. Rice-Evans, R. Burdon, Free radical-lipid interactions and their pathological consequences, *Prog Lipid Res* 32(1) (1993) 71–110.

[41] H.F. Yan, T. Zou, Q.Z. Tuo, S. Xu, H. Li, A.A. Belaidi, P. Lei, Ferroptosis: mechanisms and links with diseases, *Signal Transduct Target Ther* 6(1) (2021) 49.

[42] O. Zilka, R. Shah, B. Li, J.P. Friedmann Angeli, M. Griesser, M. Conrad, D.A. Pratt, On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death, *ACS Cent Sci* 3(3) (2017) 232–243.

## VI. FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Expression of xCT mRNA and protein and in RINm5F cells after treatment with various concentrations of 2-deoxy-d-ribose (dRib). The cells were stimulated with 0, 10, 20, 30, 40 or 50 mM dRib for 6 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. (A) The mRNA levels of xCT and b-actin were analyzed by real-time quantitative reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Relative expression of xCT mRNA was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. This experiment was performed thrice, in triplicate. (B, C) Protein expression of xCT was evaluated using Western blot, and b-actin was used as an internal control. This experiment was performed four times. The presented blot is representative of four independent experiments. The expression levels were normalized against 0 mM dRib group. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , vs. 0 mM dRib group, as determined by one-way analysis of variance and Duncan's post-hoc test.

Fig. 2. Effects of 2-mercaptoethanol (2-ME), deferoxamine (DFO) with or without  $\text{FeSO}_4$ , ferrostatin-1 (Fer-1) and lipoxstatin-1 (Lip-1) treatments on dRib-induced decreases in 1-[ $^{14}\text{C}$ ]cystine uptake (A), intracellular GSH content (B), and cell viability (C). (A) RINm5F cells were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM  $\text{FeSO}_4$ , 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 3 h in the extracellular fluid buffer containing 1.7 mM 1-[ $^{14}\text{C}$ ]cystine (0.1 mCi/mL) at 37°C. The radioactivity incorporated into the cells was determined by a liquid scintillation counter. (B) RINm5F cells were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM  $\text{FeSO}_4$ , 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 6 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. The intracellular GSH concentration was measured using a glutathione assay kit. (C) RINm5F cells were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM  $\text{FeSO}_4$ , 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 24 h in RPMI-1640 media



containing 10% FBS. Cell viability was measured by LDH release assay. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. This experiment was performed thrice, in triplicate.  $**p < 0.01$  vs. control;  $^{*}p < 0.01$  vs. 30 mM dRib-alone group ;  $^{*}p < 0.01$  vs. 30 mM dRib plus 100 mM DFO group, as determined by one way analysis of variance and Duncan's post hoc test. NS: no significant difference from 30 mM dRib-alone group. ns: no significant difference from 30 mM dRib plus 100 mM DFO group.

Fig. 3. Effects of 2-mercaptoethanol (2-ME), deferoxamine (DFO) with or without FeSO<sub>4</sub>, ferrostatin-1 (Fer-1) and liproxstatin-1 (Lip-1) treatments on 2-deoxy-d-ribose (dRib)-induced lipid peroxidation. RINm5F cells were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 6 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. The intracellular levels of lipid peroxidation products malonyldialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) were measured by using MDA (A) and 4-HNE (B) assay kits, respectively. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. This experiment was performed thrice, in triplicate.  $**p < 0.01$  vs. control;  $^{*}p < 0.01$  vs. 30 mM dRib-alone group;  $^{*}p < 0.01$  vs. 30 mM dRib plus 100  $\mu$ M DFO group, as determined by one way analysis of variance and Duncan's post hoc test.

Fig. 4. Effects of 2-mercaptoethanol (2-ME), deferoxamine (DFO) with or without FeSO<sub>4</sub>, ferrostatin-1 (Fer-1), and liproxstatin-1 (Lip-1) treatments on 2-deoxy-d-ribose (dRib)-induced increase in intracellular levels of lipid reactive oxygen species (ROS). RINm5F cells were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 6 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. Intracellular lipid ROS level was quantified by flow cytometry using the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY. Cells were incubated with 4 mM C11-BODIPY during the final 30 min. (A-E) The histogram is representative of four independent experiments. (F) Fold

control of the mean fluorescence intensity of experimental groups. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. This experiment was performed four times.  $**p < 0.01$  vs. control;  $^{*†}p < 0.01$  vs. 30 mM dRib-alone group;  $^{†‡}p < 0.01$  vs. 30 mM dRib plus 100 mM DFO group, as determined by one way analysis of variance and Duncan's post hoc test.

Fig. 5. 2-Deoxy-d-ribose (dRib)-induced changes in mitochondrial morphology. RINm5F cells were stimulated with or without 30 mM dRib for 6 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. The mitochondrial changes were examined using a transmission electron microscope (TEM). Representative TEM images of mitochondria in the control (A, B) and dRib-treated (C-E) groups. (yellow arrowheads, classical shrunken mitochondria; black arrowheads, reduced/vanishing cristae; red arrowheads, outer membrane rupture).

Fig. 6. Effects of 2-mercaptoethanol (2-ME), deferoxamine (DFO) with or without FeSO<sub>4</sub>, ferrostatin-1 (Fer-1), and liproxstatin-1 (Lip-1) treatments on 2-deoxy-d-ribose (dRib)-induced decreases in 1-[<sup>14</sup>C]cystine uptake (A), intracellular GSH content (B), and cell viability (C) in isolated islets. (A) Isolated islets were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 3 h in the extracellular fluid buffer containing 1.7 mM 1-[<sup>14</sup>C]cystine (0.1 mCi/mL) at 37°C. The radioactivity incorporated into the cells was determined by a liquid scintillation counter. (B) The islets were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 6 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. The intracellular GSH concentration was measured using a glutathione assay kit. (C) The islets were co-stimulated with 100 mM 2-ME, 100 mM DFO with or without 100 mM FeSO<sub>4</sub>, 20 mM Fer-1, or 20 mM Lip-1 and 30 mM dRib for 24 h in RPMI-1640 media containing 10% FBS. Cell viability was

measured by LDH release assay. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. This experiment was performed thrice, in triplicate. \*\* $p < 0.01$  vs. control;  $^{\dagger\dagger} p < 0.01$  vs. 30 mM dRib-alone group;  $^{\ddagger\ddagger} p < 0.01$  vs. 30 mM dRib plus 100 mM DFO group, as determined by one way analysis of variance and Duncan's post hoc test. NS: no significant difference from 30 mM dRib-alone group. ns: no significant difference from 30 mM dRib plus 100 mM DFO group.

Fig. 7. A schematic illustration summarizing the mechanism of dRib-induced ferroptosis and its inhibition by 2-mercaptoethanol (2-ME), deferoxamine (DFO), ferrostatin-1 (Fer-1), and liproxstatin-1 (Lip-1).

## 감사의 글

1988년 의과 대학을 졸업하였고, 1997년 내과 전공의 시절 대학원에 진학하였다가 중도 포기하고, 1988년 내과 전문의가 된 이후에는 학위를 받아야겠다는 생각 없이 평범하게 지냈다.

그러다가 대한내분비학회 제주지회에서 활동하면서, 까마득히 잊혀졌던 학업에 대한 욕망이 다시 생겨났고, 이때 오늘의 저를 있게끔 이끌어주신 고관표 교수님을 만나게 되었다.

마음은 젊지만, 이미 50대 후반인 나는 교제, 논문, PPT 작성, 영어 모든 것들이 힘들었다.

이때마다 고관표 교수님께 도움을 청했고, 교수님께서서는 친절히 도움을 주셨고, 오늘 마지막까지 논문을 지도해주셨습니다. 너무나 감사해서 어떤 말로도 부족할 따름입니다, 감사합니다,

그리고, 유소연 교수님, 내 스스로 하기에 어려운일이 생길때면, 아무 때나 연락드려서 도움을 청했고, 교수님께서서는 성심성의껏 도움을 주셨습니다, 감사드립니다. 그리고 실험에 도움을 주신 배주영 연구원님께도 감사드립니다.

그리고, 조문제 교수님, 나이 많은 학생이라서 부담이 되었을 텐데도, 잘 설명하여 주시고, 많은 조언을 해주셨습니다, 감사합니다.

그리고, 김진석 교수님, 김현우 교수님, 김의태 교수님, 격려와 도움에 감사드립니다.

또한, 우리 병원 직원들, 수업, 레포트, 논문, 진료하느라, 병원 직원들에게 소홀한 점이 많았었는데도 잘 이해해 주어서 고마워요.

마지막으로 , 우리 집안 식구들.

우리 딸은, 석 박사 과정을하는 나보다 더 힘들었을 거라고 생각이 든다. 시도 때도 없이 호출해서 어떻게 되는지 ? 물었다, 너무 미안하고, 고맙다..

그리고, 큰 아들, 작은 아들. 항상 아빠에게 용기를 주어서 고마워.

마지막으로 사랑하는 나의 아내 김미정. 항상 격려해주고, 웃음을 주고, 맛있는 간식도 만들어 주고, 오랜 시간 묵묵히 참아줘서 고마워요..