



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

신장 세뇨관 상피세포에서
2-Deoxy-D-Ribose에 의한 System λ_c -의
억제와 산화 손상에 대한 연구

제주대학교 대학원

의학과

김 미 연

2022년 8월

신장 세뇨관 상피세포에서
2-Deoxy-D-Ribose에 의한 System χ_c^- 의 억제와
산화 손상에 대한 연구

지도교수 고관표, 김현우

김미연

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함

2022년 5월

김미연의 의학 박사학위 논문을 인준함

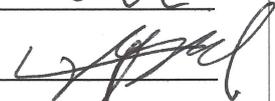
심사위원장

한상훈



위 원

고관표



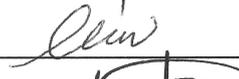
위 원

김현우



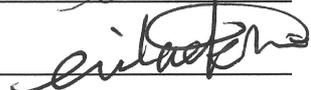
위 원

유소연



위 원

김의태



제주대학교 대학원

2022년 5월



2-Deoxy-D-Ribose Induce Oxidative Damage
through Inhibition of System χ_c -
in Renal Tubular Epithelial Cells

Miyeon Kim
(Supervised by Professor Gwanpyo Koh, Hyun Woo Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Doctor of medicine and Doctor of Philosophy
[Doctor of Medicine, Doctor of Philosophy]

2022

This thesis has been examined and approved.

Thesis director : Sang Hoon Han, prof. of Internal Medicine

한상훈

(Name and signature)

2022. 7. 1

Date

GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

국문 초록

신장 세뇨관 상피세포에서 2-Deoxy-D-Ribose에 의한 system χ_c^- 의 억제와 산화 손상에 대한 연구

제주대학교 대학원

의학 전공 김미연

지도교수 고관표, 김현우

배경: 신세포의 산화 스트레스는 당뇨병성 신증과 급성 신손상의 병인 중 하나로 알려져 있다. 2-Deoxy-D-ribose (dRib)은 베타세포 등 일부 세포에서 GSH를 고갈시켜 산화 손상을 초래한다고 보고되고 있다. system χ_c^- 는 나트륨 비의존적으로(sodium-independent) 세포 외 cystine을 세포 내로 이동시키는 막통로로, 이 system χ_c^- 를 통한 cystine uptake는 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는데 매우 중요한 세포 내 GSH 합성의 rate-limiting step으로 알려져 있다. 본 연구에서는 신장 세뇨관 상피 세포에서 dRib이 산화 손상을 초래하는지 확인하고, 구체적으로 dRib이 어떤 기전을 통해 산화 스트레스를 증가시키는지 알아보고자 하였다.

연구 방법: 신장 근위 세뇨관 세포주인 NRK-52E 세포에서 L-[14C]cystine uptake, GSH content, reactive oxygen species (ROS) level, cell viability를 측정하였고, system χ_c -의 functional unit인 xCT의 mRNA와 protein의 발현을 조사하였다. Rat에서 분리한 신장 근위 세뇨관 세포에서는 L-[14C]cystine uptake, GSH, cell viability를 측정하였다. 그리고 NRK-52E 세포에서 lentivirus를 이용해 xCT 유전자를 과발현시켰다.

연구 결과: NRK-52E 세포를 다양한 농도의 dRib으로 자극했을 때 L-[14C]cystine uptake는 감소되고 xCT의 mRNA와 단백질의 발현은 증가되었으며, 세포내 GSH 및 ROS 레벨과 cell viability는 용량 의존적으로 현저히 감소되었다. dRib에 의해 감소된 L-[14C]cystine uptake, 세포내 GSH 및 ROS 레벨과 cell viability는 xCT 과발현에 의해 모두 의미 있게 회복되었다. 일차 신장 세뇨관 상피세포(primary renal tubular epithelial cells)에서도 dRib은 L-[14C]cystine uptake, GSH content 및 cell viability를 유의하게 감소시켰으며, cystine uptake enhancer인 2-mercaptoethanol 전처리에 의해 거의 완벽하게 회복되었다.

결론: 신장 세뇨관 상피세포에서 dRib은 xCT를 억제하여 cystine uptake를 감소시킴으로써 GSH를 고갈시킨다. 이렇게 초래된 산화 손상은 xCT를 과발현 시킴으로써 막을 수 있다. 따라서 system χ_c -조절을 통해 신장 세뇨관 세포의 산화 손상을 예방할 수 있을 것으로 생각한다.

주제어: 시스틴, 산화 스트레스, 급성 신손상

Astract

2-Deoxy-D-Ribose Induces Oxidative Damage Through Inhibition of system χ_{c-} in Renal Tubular Epithelial Cells

Background: Oxidative stress in renal tubular cells is one of the etiologies of diabetic nephropathy and acute kidney injury. 2-Deoxy-D-ribose (dRib) causes oxidative damage by depleting GSH in cells, including beta cells. system χ_{c-} is a membrane transporter that moves extracellular cystine into cells independent of sodium, and cystine uptake through system χ_{c-} is a rate-limiting step for intracellular GSH synthesis, which is important for protecting cells from oxidative stress. I conducted this study to determine whether dRib causes oxidative damage in renal tubular cells and, specifically, investigate the mechanism through which dRib increases oxidative stress.

Methods: L-[¹⁴C]cystine uptake, GSH content, reactive oxygen species (ROS) levels, and cell viability were measured in NRK-52E cells, a renal tubular cell line, and the mRNA and protein expression of xCT, the functional unit of system χ_{c-} , were investigated. The xCT gene was then overexpressed in NRK-52E cells using lentivirus. L-[¹⁴C]cystine uptake, GSH, and cell viability were also measured in primary renal tubular epithelial cells isolated from rats.

Results: When NRK-52E cells were stimulated with various concentrations of dRib, L-[¹⁴C]cystine uptake decreased, mRNA and protein expression of xCT increased, and intracellular GSH and ROS levels and cell viability were significantly decreased in a dose-dependent manner. L-[¹⁴C]cystine uptake, intracellular GSH and ROS levels, and cell viability reduced by dRib were all significantly recovered by xCT overexpression. In primary renal tubular epithelial cells, dRib also significantly reduced L-[¹⁴C]cystine uptake, GSH content, and cell viability, and these were almost completely recovered by pretreatment with 2-mercaptoethanol, a cystine uptake enhancer.

Conclusion: In renal tubular epithelial cells, dRib depletes GSH by reducing cystine uptake through inhibition of xCT. The resulting oxidative damage can be prevented by overexpressing xCT. Therefore, it is thought that oxidative damage in renal tubular cells can be prevented through system χ_c -regulation.

Key words: cystine, oxidative stress, acute kidney injury

목차

I. 서론	1
1.1 연구 배경	1
1.2 연구의 목적	5
II. 연구 방법	6
2.1 실험재료	6
2.2 실험방법	7
1) 세포 배양	7
2) 세포 생존을 평가	7
3) 세포 생존과 사멸을 평가하기 위한 Calcein-AM/PI 염색법	8
4) 활성산소종(ROS)의 세포내 수준 평가	8
5) 글루타치온(GSH)의 세포내 수준 평가	9
6) 시스틴 수송량 측정	10
7) 세포 형질 도입(cell transduction).....	11
8) RNA 분리 및 역전사 정량적 중합효소 연쇄 반응	11
9) 웨스턴 블랏.....	12

10) 일차세포배양(primary cell culture).....	12
2.3. 통계분석.....	13
III. 결과	14
3.1 NRK-52E 세포에서 xCT 과발현의 확인	14
3.2 xCT 과발현된 세포에서 L-[14C] 시스틴 섭취 감소에 미치는 영향	19
3.3 xCT 과발현된 세포에서 dRib에 의한 세포내 GSH 양 감소에 미치는 영향	22
3.4 xCT 과발현된 세포에서 dRib에 의한 세포독성(cytotoxicity) 증가에 미치는 영향	25
3.5 Calcein-AM/PI 염색으로 확인한 세포 생존/ 사멸	27
3.6 xCT 과발현된 NRK - 52E 세포의 세포내 활성산소종(ROS) 수준에 대한 유량세포 계 분석	29
3.7 일차 배양된 레트 신장 세뇨관 상피세포에서 dRib과 2-ME의 효과.....	34
IV 토론	39
V. 결론	43
VI. 참고 문헌	44

List of Figures

Figure 1. Enforced expression of xCT in NRK-52E cells.	17
Figure 2. Effects of enforced expression of xCT on the 2-deoxy-D-ribose (dRib)-induced decreases in L-[14C]cystine uptake.....	20
Figure 3. Effects of enforced expression of xCT on 2-deoxy-D-ribose (dRib)-induced decreases in intracellular GSH content.....	23
Figure 4. Effects of enforced expression of xCT on 2-deoxy-D-ribose (dRib)-induced increases in cytotoxicity.....	26
Figure 5. Cell viability was examined by calcein-AM/PI staining.....	28
Figure 6. Flow cytometric analysis for intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in NRK-52E cells transfected with xCT-expressing or empty viral vector.....	33
Figure 7. Effects of 2-deoxy-D-ribose (dRib) and 2-mercaptoethanol (2-ME) treatments in isolated rat renal tubular epithelial cells.....	37
Figure 8. Schematic diagram of the action of dRib and 2-ME on system χ_c	42

I. 서론

1.1 연구 배경

신세포의 산화 스트레스는 당뇨병성 신증의 병인 중 하나로 알려져 있다. 당뇨병성 신증에서 최종당화산물(advanced glycation endproducts; AGEs)과 수용체의 상호작용은 세포의 기능 이상을 초래하고, 이후 염증 반응과 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)을 형성하여 산화 스트레스를 유발하게 된다. 여러 동물, 세포 연구에서 당뇨병성 신증에서 이 경로의 관련성이 증명되었다. 형성된 ROS는 세포 기능 이상의 결과이면서 동시에 사구체와 신세뇨관 세포에 영향을 줘 신기능 악화에 복합적으로 작용한다. ROS는 미토콘드리아 수준에서 NADPH 산화효소 시스템을 통해 생성된다. 동물 실험에서 NADPH 산화 효소 저해제는 이 경로의 효과를 개선하는데 작용하여 당뇨병성 신증 진행에 대한 치료의 한 주소를 제공하였다 (1). 당뇨병성 신증에서 지속적인 고혈당 상태와 AGE의 증가로 인한 산화환원계(redox system)의 변화는 장기간의 ROS 생산 증가를 초래한다. 이러한 현상은 레닌-안지오텐신 체계와 TGF- β 등이 염증 매개 물질의 신호 전달에 영향을 주게 되어 만성 염증과 사구체 및 세뇨관 비대, 신조직 섬유화를 유발하게 되고, 결과적으로 알부민뇨, 사구체 경화, 신세뇨관 섬유화를 유발하게 된다 (2). 과도한 ROS 생성은 신섬유화와 염증을 촉진시키게 되고, 지질 과산화의 촉진, DNA 손상, 단백질 변형, 미토콘드리아 기능 장애를 유발하여 조직 손상의 원인이 된다 (3).

세포는 산화환원계의 활성산소종의 생성 및 제거를 통해 항상성을 유지한다. 활성산소기는 수퍼

옥사이드(O_2^-), 하이드록시 라디칼(HO^\cdot) 같은 유리기로 존재하는 물질과 과산화수소 같은 비유리기를 포함한다. 활성산소종은 유핵 세포에서 산소로부터 파생되는 의무구성요소이다. 첫번째 생성물인 슈퍼옥사이드는 세포의 산화 작용에 대한 첫번째 방어 기전인 항산화 효소인 슈퍼옥사이드디스무타제(superoxide dismutase; SOD)로 세포의 슈퍼옥사이드(산화물)를 과산화수소와 산소로 균질화(dismutation)를 촉매한다 (4).

과산화산소는 또는 과산화물은 글루타치온 퍼옥시다제(glutathion peroxidase; GPX)에 의해 산소와 물로 변화하는데 글루타치온(GSH)은 글루타치온 퍼옥시다제의 반응에 전자를 주면서 글루타치온 디설피드(GSSG)로 산화된다. 이것은 NADPH를 이용하여 GSSG 환원 효소에 의하여 글루타치온으로 전환된다 (5). GSH는 γ -L-글루타미드-L-시스테인-글리신으로 트리펩티드 구조로 이루어져있다. GSH는 세포내에서 합성되는 가장 중요한 저분자량의 항산화제로 산화 환원 항상성에 중요한 역할을 한다. 티올-환원(GSH) 형태와 이황화물-산화(GSSG) 형태로 존재하는데 주요 형태는 GSH이며 대부분의 세포에서 mM 농도로 존재한다 (6). 글루타치온은 ATP 의존적인 두 가지 순차적 단계에 의해 합성된다. 첫 번째 단계는 글루탐산에 시스테인이 결합하는 것으로, 글루탐산 생합성에서 속도 제한 단계로 간주되는 γ -글루타미드 시스테인 합성효소(γ -glutamylcysteine synthetase; γ -GCS)에 의해 촉매 된다. 두 번째 단계는 GSH 생성 효소에 의해 촉매되는 글리신의 결합이다. GSH 합성을 결정하는 두 가지 요인은 시스테인의 가용성과 γ -GCS 활성이다 (7). 글루탐산과 글리신이 세포에 고농도로 존재하기 때문에 세포 내 시스테인 총량이 GSH 합성을 위한 속도 제한 단계이다 (8).

시스테인의 황화수소기(-SH)는 환원과 공액반응(conjugation)에 관여하므로 GSH의 구조에서 가장 중요한 기능을 담당한다. 시스테인은 주로 세포 내부에 존재하지만, 디설피드 형태인 시스틴은 주로 세포 밖에 존재한다. 시스틴은 시스템 Xc⁻ (cystine/glutamate antiporter system) 이동 통로를 통해 세포로 운반될 수 있다. 세포 내부의 환원 환경에서 시스틴은 GSH 생합성에 사용되는 시스테인으로 빠르게 환원된다. 시스테인은 여러 아미노산 운반체를 통해 세포로 운반될 수 있다고 보고되었다 (9). 시스템 알라닌-세린-시스테인(ASC)은 시스테인, 트레오닌, 아스파라긴, 알라닌, 세린, 글루타민과 같은 중성 아미노산을 운반한다 (10). 포유류 세포는 오직 간과 일부 조직에서 메티오닌으로부터 시스테인을 합성하는데 대부분의 세포에서 스스로 시스테인과 황화 경로를 합성할 수 없다 (11). 따라서 대부분의 세포에서 시스테인의 주요 공급원은 system χ_c^- 를 통한 시스테인 획득이다

system χ_c^- (cystine/glutamate antiporter system) 은 나트륨 비의존성 및 염소 의존성 아미노산 역수송체(sodium-independent and chloride-dependent amino acid antiporter)이다. 글루탐산염과 1:1 비율로 교환하여 시스틴을 세포로 흡수하는 것을 매개한다 (12). 시스템 Xc⁻는 양방향으로 아미노산을 운반할 수 있지만 세포내 및 세포외 기질 농도의 기울기로 인해, 일반적으로 시스틴을 수입하고 글루탐산을 수출한다.

본 연구에서는 신 세포관 상피세포의 산화적 손상을 유도하기 위해 2-디옥시-D-리보스 (dRib)가 이용되었다. 환원당 중에서 포도당은 반응성이 가장 낮은 반면, dRib은 반응성이 가장 높다 (13).

실험에서 세포에 포도당의 독성 효과를 내는 것은 어렵고 시간이 수 주 이상 소요된다 (14). 본 저자가 참여하는 연구팀의 연구진들은 이전에 췌장 베타세포에서 dRib 유도 system χ_c -의 역할을 규명하는 연구를 수행하였고, dRib이 system χ_c -를 통한 시스틴 수송의 억제를 통해 세포 내 GSH 함량을 감소시킨다는 것을 확인하였다. xCT는 system Xc-의 수송 기능을 담당하는 경쇄 구조로, xCT의 과발현은 RINm5F 세포에서 dRib에 의한 산화적 손상에 대한 보호 효과를 보여주었다. 이 결과는 췌장 β -세포의 system χ_c - 결핍이 산화 스트레스 유발 손상에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다 (15). 본 연구에서는 신세뇨관 상피세포 (NRK-52E)에서 dRib이 산화 손상을 초래하는지 확인하고, 구체적으로 dRib이 어떤 기전을 통해 산화스트레스를 증가시키는지 알아보려고 하였다.

1.2 목적

본 연구에서는 신장 세뇨관 세포에서 dRib 이 산화 손상을 초래하는지 확인하고, 어떤 기전을 통해 산화스트레스를 증가시키는지 알아보고자 했다. system χ_c -가 과발현된 세포에서 dRib에 의한 산화 손상의 예방 효과에 대해 연구를 수행하였다.

구체적으로, dRib 를 처리한 신장 세뇨관 상피세포(NRK-52E)에서 세포 내 시스틴 섭취 감소와 세포 내 GSH, ROS 수준 및 세포 생존율 감소 정도를 측정하고, dRib 에 의해 감소된 L-[14C] 시스틴 섭취, 세포 내 GSH, ROS 수준과 세포 생존은 렌티바이러스를 이용해 xCT를 과발현 시켰을 때 회복 정도를 측정함으로써 dRib 에 의한 산화 손상을 극복할 수 있는지 확인하였다

II. 연구 방법

2.1 실험 재료

2-Deoxy-D-ribose, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), dimethylsulfoxide, Triton X-100 은 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)에서 구입하였다.

항 xCT 항체 (Abcam, ab175186), 항 β -actin 항체 (sigma, A2228), Streptomycin sulfate, HEPES, trichloroacetic acid (TCA), guanidine hydrochloride, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic (Amresco, Solon, OH), Hydrochloric acid (HCl) 30% Acrylamide-bis solution (Biosesang, A2004-1), ethanol (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Dulbecco phosphate-buffered saline (DPBS), trypsin, penicillin, streptomycin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (gibco, 11995-065), Collagenase P (sigma, C7657), HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (gibco, 14065-056), Deoxyribonuclease I (sigma, DN25), Tissue culture Flask, collagen type I coated (SPL, 75075), bovine serum albumin (Bovogen Biologicals, BSA050)

2.2 실험 방법

1) 세포배양

레트(Rat) 근위세뇨관 세포(NRK-52E)는 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)를 통해 획득하였다. 세포는 DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였으며, 10% FBS, 100 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin을 포함한 배지를 사용하였다. 배양된 세포는 최대 70%가 유지되게 트립신 처리를 통해 계대 배양되었다. 계대 배양 2일 뒤 배지를 교체하였고, 10% FBS로 보충한 DMEM과 다양한 농도의 dRib 을 처리하고 이후 1, 3, 6, 12 시간 동안 배양하였다.

2) 세포 생존율 평가

세포 생존율은 MTT 분석과 트립판 블루 염색을 이용하여 측정되었다. NRK-52E 세포는 24개의 웰 플레이트에서 1개의 웰당 1x10⁵ 개의 세포 밀도로 배양하였다. 0, 10, 30, 50 mM dRib로 24시간 동안 처리하였다. 세포를 채취하고 5분 동안 0.4% 트립판 블루로 염색했다. 검체는 혈구 측정기를 통해 염색된 죽은 세포와 염색되지 않은 생존 세포로 계산하였다. 100% 생존율을 나타내는 배지만으로 배양된 세포를 모든 실험의 대조군으로 하여 세포 시료의 생존율을 추정할 수 있도록 했다. 일차 배양 세포에서의 Cytotoxicity는 lactate dehydrogenase (LDH) assay로 측정하였다.

96 웰 플레이트에서 동일한 개수가 들어가도록 하고, 10% FBS가 들어있는 DMEM으로 배양액으로 키우고, 0, 10, 30, 50 mM dRib과 24시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 손상된 세포의 세포질로부터 유리된 LDH를 colorimetric method로 측정하는 Cytotoxicity Detection KitPLUS (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하였다. Cytotoxicity (%)는 다음과 같은 공식으로 계산하였다: $(\text{experimental value} - \text{negative control}) / (\text{positive control} - \text{negative control}) \times 100$

3) 세포 생존과 사멸을 평가하기 위한 Calcein-AM/PI 염색법

NRK-52E 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 24시간 배양되었다. 대조군과 xCT 유전자 과발현 군에 각각 dRib 0, 50mM 을 처리하였다. 생존 세포는 Calcein -AM 에 염색되어 녹색 형광을 방출하며, 사멸한 세포는 Propidium iodine (PI) 으로 염색되어 적색 형광을 방출하여 세포 생존과 사멸을 동시에 평가하였다.

4) 활성산소종(ROS)의 세포내 수준 평가

세포 내 ROS 수치는 H₂DCF-DA 염료를 사용하여 분석하였다. 세포 형광 강도는 세포 내 ROS 수준과 직접적인 상관 관계가 있다. NRK2-52E 세포는 24개의 웰 배양 플레이트에 5x10⁵

세포/웰의 밀도로 두었고, 세포는 0, 50 mM dRib로 6시간 동안 처리하였으며, 배양 종료 30분 전에 총 $10 \mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 를 세포 배양에 첨가하였다. 그 후, 세포들을 PBS로 두 번 세척하였고, 0.05%의 트립신을 처리하였다. 그 후, 세포들을 원심 분리 후 PBS로 다시 현탁하고, ROS의 세포 내 수치는 FACSscan instrument (BD Bioscience)를 사용하여 측정하였다. 시료 당 총 1×10^4 개의 세포를 분석하였다. 데이터는 평균 형광 강도로 계산하였으며 대조군 세포와 비교하여 배수 차이로 표현하였다.

5) 글루타치온(glutathione; GSH)의 세포 내 수준 평가

세포내 GSH 수치는 글루타치온 환원효소를 이용한 enzymatic recycling method를 기초한 Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포는 웰 배양 플레이트에 5×10^5 세포/웰의 밀도로 배양하였다. 세포는 얼음으로 식힌 DPBS로 세척하고 초음파 처리한 후 섭씨 4도에서 15분 간 10,000 g로 원심 분리하였다. 생성된 상등액은 GSH 및 GSSG 측정을 즉시 시행하였다. 검체의 총 세포 단백질 양은 BCA 단백질 분석 키트(Pierce)를 사용하여 측정하였다. 총 단백질 함량 ($\mu\text{g/mL}$)에 대해 세포 내 GSH 및 GSSG 함량을 보정하여 nmol/mg 단백질로 표현하였다.

6) 시스틴 수송량 측정

L-[14C]시스틴의 세포 내 흡수 측정시, 세포들은 24개의 웰 세포 배양 판에 3×10^5 세포/웰 밀도로 두었다. 세포는 2일 동안 10% FBS를 보충한 DMEM 배지로 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES로 이루어진 pH 7.4, 37 °C 500 μL의 세포외액(ECF) 완충액으로 세포를 행구었다. 시스틴 흡수의 Na⁺ 의존성을 조사했을 때, 완충액 내의 화합물을 함유한 나트륨은 콜린 당량으로 대체되었다. 섭취 분석(uptake assay)을 위해 dRib 유무에서 37° C에서 2-ME의 유무에 따라 0.1 μCi L-[14C]시스틴(1.7 μM)을 함유한 50 μL ECF 완충액의 첨가를 시행하였다. 수용액은 용액을 제거하고 방사성 동위원소가 없는 저온 ECF 완충액으로 세포를 두 번 세척 후 종료하였다. 그런 다음 100 μL 1% Triton-X 100/DPBS 에서 세포를 분석하였다. 가용화 세포 50 μL를 150 μL 섬광 콕테일 (scintillation cocktail)에 첨가하고, 통합 시스틴의 방사능은 liquid scintillation counter (PerkinElmer) 또는 Wallac MicroBeta TriLux 1450 LSC and Luminescence Counter (PerkinElmer) 로 확인하였다. 나머지 15 μL aliquot에 대해 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) 를 사용하여 단백질 분석을 수행하였다. L-[14C] 시스틴 섭취는 cpm/μg 단백질 또는 pmol/mg 단백질/min 로 측정하였고, 개별 실험 대조군에서의 흡수의 백분율로 표현하였다.

7) 세포 형질 도입(Cell transduction)

SLC7A11(cat. RR208495L4V) 또는 대조군(cat. PS100093V)으로 인코딩된 렌티바이러스 입자(OriGene, Rockville, MD, USA)을 사용하였다. 제조사의 지침에 따라 실험을 수행하였다. NRK-52E 세포는 24 웰 배양판에 배양 후 24개의 웰 배양판에 나누었고, 8 μ g/ml polybrene (Sigma, St. Louis, MO) 첨가 후 MOI 10에서 렌티바이러스 입자를 감염시켰다. 1.4 μ g/ml Puromycin (Sigma)을 사용하여 안정적으로 표적 유전자가 도입된 세포 만을 선택하였다.

8) RNA 분리 및 역전사 정량적 증합효소 연쇄 반응

(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT qPCR)

TRIzol[®]를 사용하여 제조사 지침에 따라 총 RNA를 분리하였다. RNA 분리는 RNase가 없는 환경에서 수행되었다 총 2 μ g의 RNA를 MMLV reverse transcriptase (MGmed Corporation, Seoul, Korea), oligo (dT)15 primer, dNTP (10 mM)와 40 unit/ μ l RNase inhibitor (MGmed Corporation)를 이용하여 역전사를 수행하였고, RT-qPCR은 KAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (KAPA biosystems, MA, USA), iQ[™] 5 Multicolor Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하여 수행하였다. PCR은 특정 프라이머의 존재 하에서 합성된 cDNA를 증폭시키기 위해 95 °C에서 3초 간, 60 °C에서 30초 간, 72 °C에서 30초 간 40

사이클 실시하였으며, 초기 사이클은 1분 동안 95°C였다. PCR 반응을 위해 프라이머는 cDNA sequences: xCT forward, 5'-TCAAATCCTTGCCCATCTGC-3', reverse, 5'-GTGAGCTTGCCCCACTGTAT-3', β -actin forward, 5'-TCC TGG CCT CAC TGT CCAC-3', and reverse, 5'-GGG CCG GAC TCA TCG TACT-3'. Bioneer Corporation (Daejeon, Korea) 가 사용되었다.

9) 웨스턴 블랏(Western blot)

xCT 형질 도입된 NRK-52E 세포에서 단백질 발현을 분석하기 위해 웨스턴 블랏이 수행되었다. 대조군과 xCT 과발현군에 dRib 0, 10, 20, 30, 40, 50 mM 농도로 3 시간 또는 6 시간 처리 후 웨스턴 블랏을 시행하였다. xCT 일차 항체(55kDa, 1:5000), beta actin 일차 항체(42kDa, 1:10,000)를 2 시간 처리하였고, 항 마우스 이차항체(1:5000-1:10,000)를 2 시간 처리하여 반응시켰다.

10) 일차 세포 배양(primary cell culture)

NRK-52E 세포에서 수행된 실험 결과의 재현성 확인을 위해 레트 근위세뇨관 세포 일차 배양 및 실험을 수행하였다. 10 주 령 전후의 레트는 실험동물윤리위원회의 규저에 따라 마취 후 신장을

분리하였고, Hanks' balanced salt solution (HBSS, GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) 으로 세척 후 신장 캡슐을 제거하고, 4개의 조각으로 나누고, 피질 조직만 다듬어서 얻어내었다. 이후 HBSS는 제거하고, 차가운 PBS로 세척하였다. 신피질 조직은 트립신 처리된 플라스크로 옮겨 20 ml deoxyribonuclease (DNase, 1 mg/ml)-collagenase(2 mg/ml) Type I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution (in regular HBSS containing calcium and magnesium, GIBCO)을 처리하였고, 이 후 2차례 다른 크기의 체(sieve)를 통과시켜 원위 세뇨관과 사구체 세포를 순차적으로 제거하였다. HBSS이 포함된 근위 세뇨관 세포 상층액은 10분간 228 g (1000 rpm) 원심 분리 시행 후 rat tail collagen (Sigma) coated plastic surfaces (SPL, 75075)에 옮겨 2 일 간 37°C에서 배양을 시행하고, 배양액을 교체하였으며, 일주일 뒤 세포를 획득하였다. 이후 0, 10, 30 mM dRib, 0.1mM 2-mercaptoethanol (2-ME)을 처리 후 동위원소 시스틴 섭취 (L- [¹⁴C]cystine uptake), 세포 내 GSH 총량 측정, LDH assay를 시행하였다.

2.3. 통계분석

모든 데이터는 평균과 표준 편차로 표현되었다. 그룹 간 비교는 일방향 분산 분석(ANOVA)과 덩컨의 사후 검정을 통해 분석되었다.

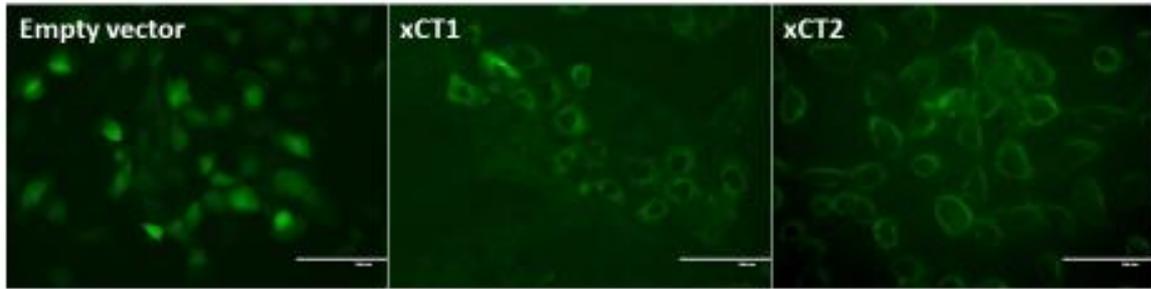
모든 분석은 SPSS 소프트웨어(버전 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행되었으며 $p < 0.05$ 는 유의한 것으로 간주되었다.

III. 결과

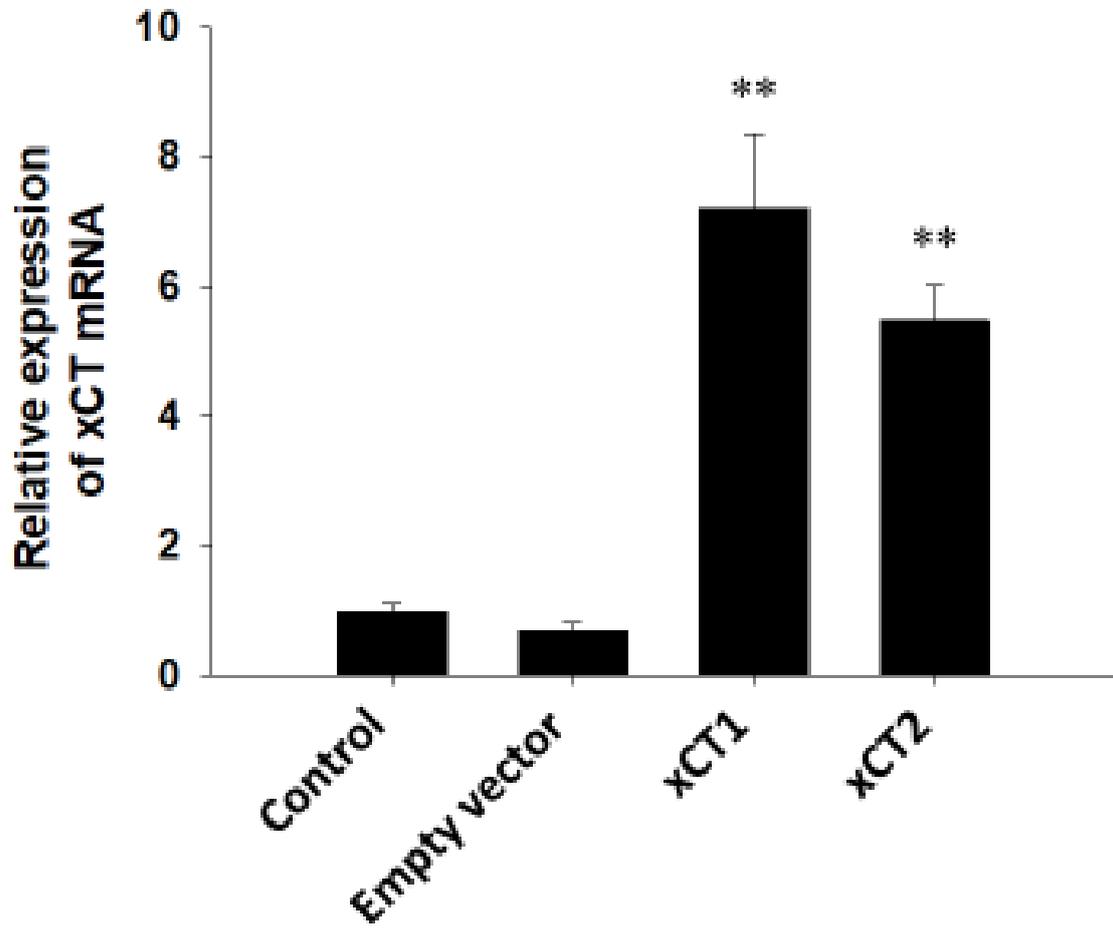
3.1. NRK-52E 세포에서 xCT 과발현의 확인

NRK-52E 세포에서 xCT 과발현은 3 가지 방법으로 확인하였다. 첫번째로 녹색형광단백질 (green fluorescence protein; GFP)이 융합되어 있기 때문에 살아있는 세포에서 형광 관찰로 형질 도입된 세포를 확인하였다(Fig. 1A). 이후 실시간 정량적 역전사 정량적 증합 효소 연쇄반응을 통해, 형질 도입된 세포에서 대조군과 빈벡터(empty vector)로 감염된 세포에 비해 xCT 유전자가 의미 있게 과발현 됨을 확인하였다(Fig. 1B). NRK-52E xCT 단백질 발현에 대한 웨스턴 블랏 분석으로 단백질 발현의 차이를 확인하였다 (Fig. 1C).

A



B



C

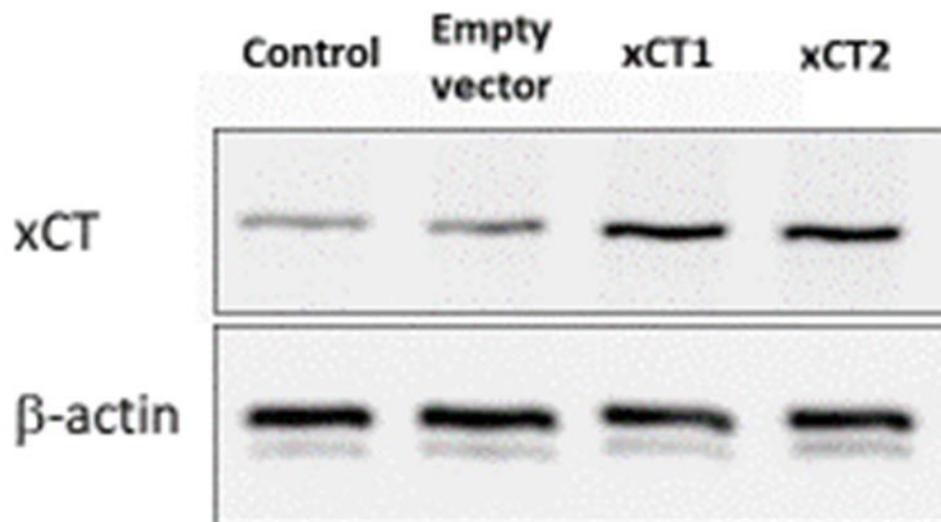


Figure 1. Enforced expression of xCT in NRK-52E cells. xCT transduction was confirmed by GFP fluorescence (A). Real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (B) and western blot (C) analyses of xCT mRNA and protein expressions in NRK-52E cells cells transduced with xCT-expressing or empty viral vector. Relative expression of the mRNA was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The expression levels were normalized against the control group. Data are presented as the mean \pm SD. This experiment was performed thrice, in triplicate. $**p < 0.01$, vs. empty vector as

determined by one-way analysis of variance and Duncan's post hoc test. The western blot is representative of four independent experiments. Control; uninfected NRK-52E cells, Empty vector; empty viral vector-transduced clone, xCT1 and xCT2; two xCT-expressing vector transduced clones.

3.2. xCT 과발현된 세포에서 L-[14C] 시스틴 섭취 감소에 미치는 영향

NRK-52E 세포를 dRib의 다양한 농도로 37°C에서 1시간 동안 1.7 μ m L-[14C]시스틴(0.1 μ Ci/mL)을 함유한 세포 외액 완충액으로 배양하였다. 세포에 통합된 방사능은 액체 섬광 카운터를 사용하여 측정되었다. 모든 세포 군에서 dRib 농도를 0, 10, 30, 50mM 로 증가하여 처리시 시스틴 섭취가 유의하게 감소하였고, xCT 과발현 군은 대조군과 빈벡터 주입된 군에 비해 유의하게 시스틴 섭취의 감소가 줄어들었다 (Fig. 2).

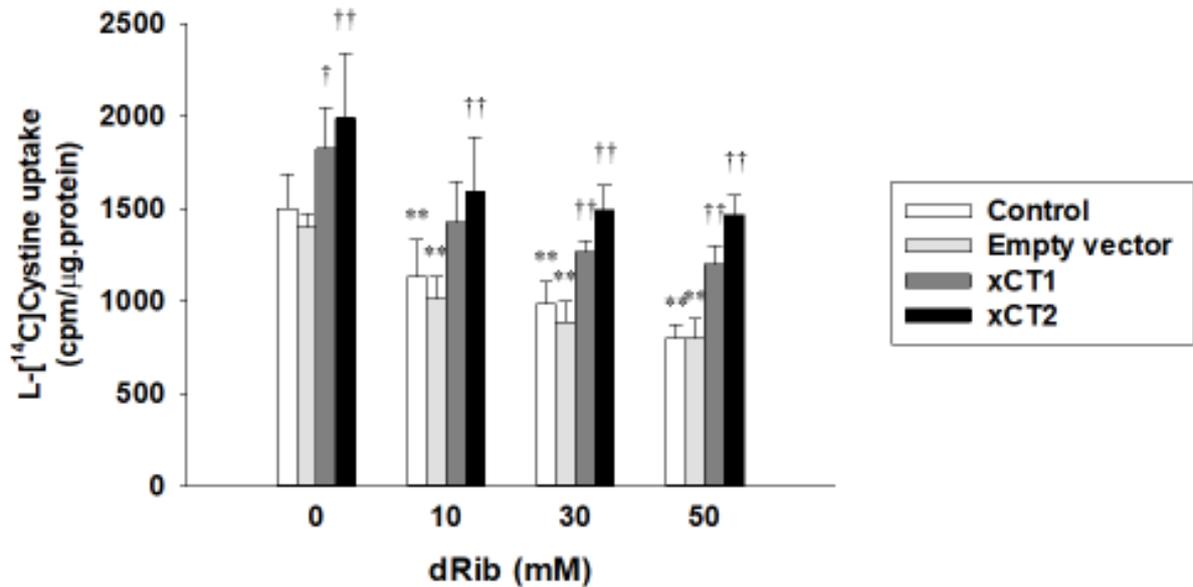


Figure 2. Effects of enforced expression of xCT on the dRib induced decreases in L-[14C]cystine uptake. NRK-52E cells were incubated with extracellular fluid buffer containing 1.7 μ M L-[14C]cystine (0.1 μ Ci/mL) at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour with the various concentrations of dRib. The radioactivity incorporated into the cells was determined using a liquid scintillation counter. Data are presented as the mean \pm SD. This experiment was performed in triplicate, thrice. $**p < 0.01$ vs 0 mM dRib group; $\dagger p < 0.05$ and $\dagger\dagger p < 0.01$ vs control and empty vector groups, as determined by one-way analysis of variance and Duncan's post-hoc test. Control; uninfected NRK-52E cells, Empty vector;

empty viral vector-transduced clone, xCT1 and xCT2; two xCT-expressing vector transduced clones.

3.3. xCT 과발현 된 세포에서 dRib가 세포내 GSH 감소에 미치는 영향

NRK-52E 세포를 0, 10, 20, 30 mM dRib에서 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 6시간 동안 배양하였다. 세포 내 GSH 농도는 글루타치온 분석 키트 (glutathione assay kit)를 사용하여 측정하였다. 모든 세포 군에서 dRib 농도를 0, 10, 30, 50mM 로 증가하여 처리시 대조군과 빈벡터 주입된 군은 dRib 농도가 증가시 유의하게 세포내 GSH가 감소하였으나 xCT 과발현 군은 유의하게 세포내 GSH 양이 유지되었다 (Fig. 3).

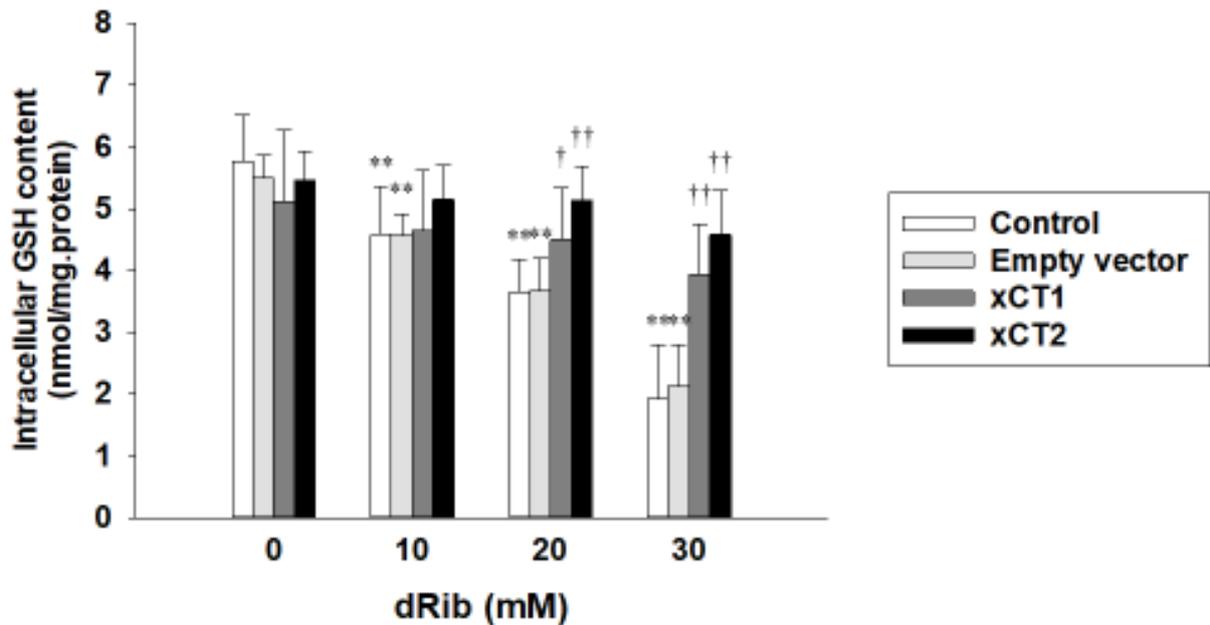


Figure 3. Effects of enforced expression of xCT on 2dRib-induced decreases in intracellular GSH content. NRK-52E cells were incubated with DMEM media containing 10% FBS in 0, 10, 20 and 30 mM dRib for 6 hours. The intracellular GSH concentration was measured using a glutathione assay kit. Data are presented as the mean \pm SD. This experiment was performed in triplicate, thrice. $**p < 0.01$ vs 0 mM dRib group; $\dagger p < 0.05$ and $\dagger\dagger p < 0.01$ vs control and empty vector groups, as determined by one-way analysis of variance and Duncan's post-hoc test. Control; uninfected NRK-52E cells, Empty vector; empty viral

vector-transduced clone, xCT1 and xCT2; two xCT-expressing vector transduced clones

3.4. xCT 과발현된 세포에서 dRib가 세포독성(cytotoxicity) 증가에 미치는 영향

NRK-52E 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 24시간 동안 0, 10, 20, 30, 40, 50 mM dRib로 자극되었다. 세포 생존력은 MTT 분석으로 측정하였다. 대조군과 빈벡터군은 dRib 농도가 30mM 이상이 되면 유의하게 세포 독성이 발생하였다. 이에 반해 xCT 과발현군은 dRib 농도가 50mM 이 되어도 유의하게 세포 생존이 유지되는 것이 확인되었다(Fig. 4).

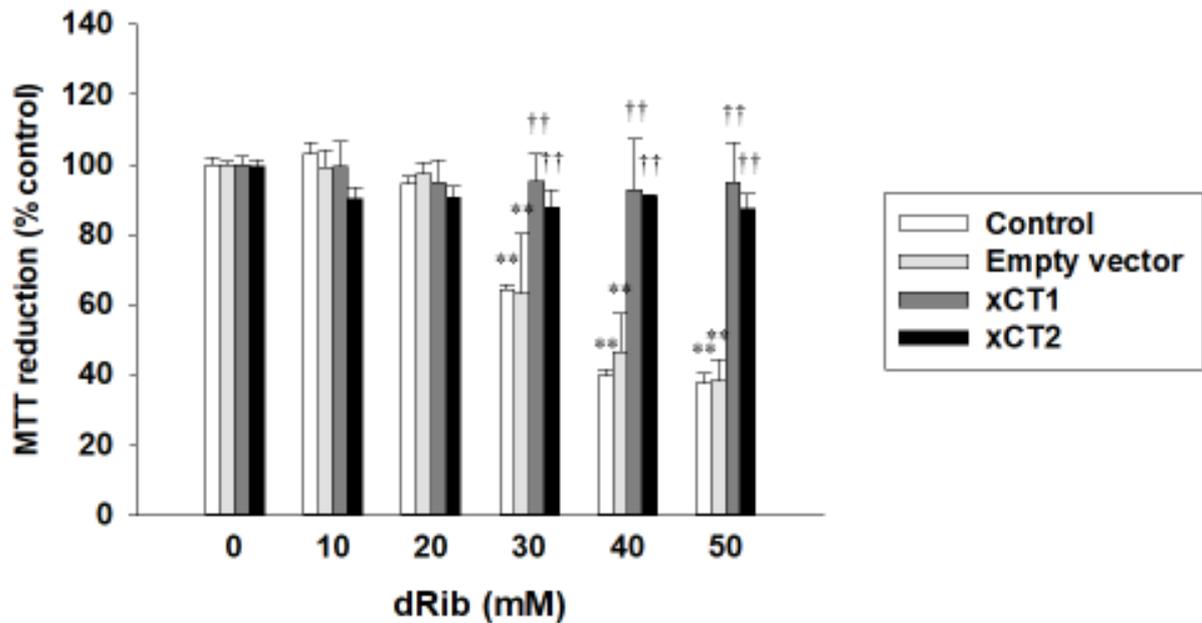


Figure 4. Effects of enforced expression of xCT on dRib-induced increases in cytotoxicity.

NRK-52E cells were stimulated with 0, 10, 20, 30, 40 and 50 mM dRib for 24 hours in DMEM media containing 10% FBS. Cell viability was determined by an MTT assay. Data are presented as the mean \pm SD. This experiment was performed in triplicate, thrice. $**p < 0.01$ vs 0 mM dRib group; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs control and empty vector groups, as determined by one-way analysis of variance and Duncan's post-hoc test. Control; uninfected NRK-52E cells, Empty vector; empty viral vector transduced clone, xCT1 and xCT2; two xCT-expressing vector transduced clones.

3.5. Calcein-AM/PI 염색으로 확인한 세포 생존과 사멸

NRK-52E 세포는 0, 50 mM 농도의 dRib 를 처리하여 10% FBS 가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 24 시간 배양되었다. 살아있는 세포는 calcein-AM 염색되어 녹색 형광을 보이고, 사멸한 세포는 PI로 염색되어 적색 형광으로 확인이 된다.

대조군과 빈벡터 군은 50mM dRib 으로 처리시 대부분의 세포가 사멸한 것은 보여주었고, xCT 과발현 된 세포는 50mM dRib 처리한 경우에도 대부분 생존한 것을 확인할 수 있었다.

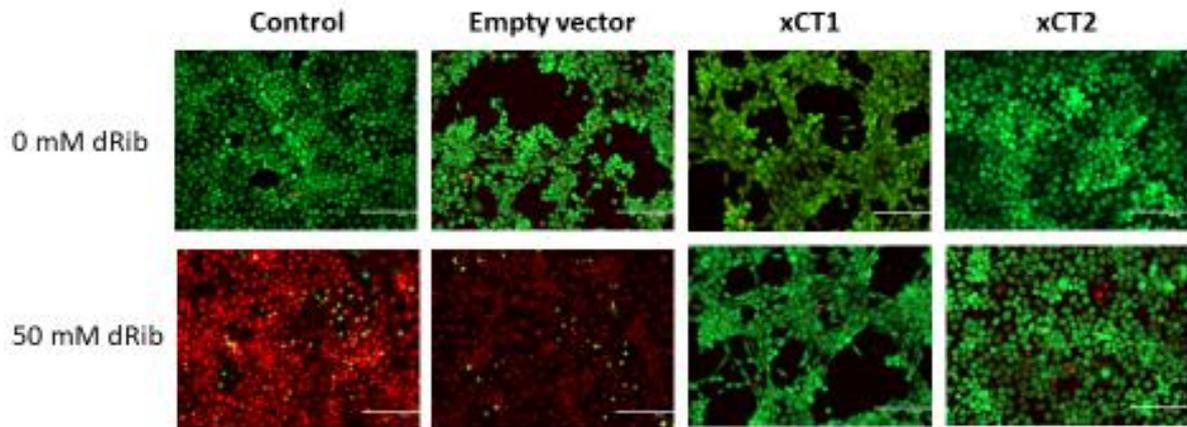


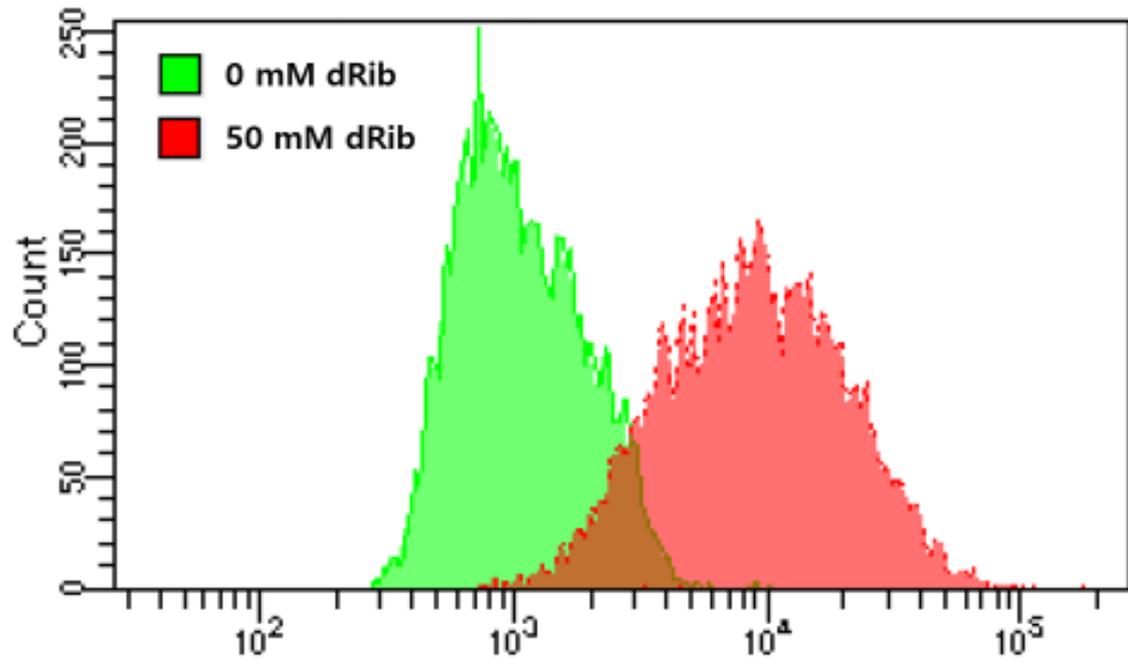
Figure 5. Cell viability was examined by calcein-AM/PI staining. NRK-52E cells were incubated with DMEM media containing 10% FBS for 24 hours with or without 50 mM dRib. The living and dead cells were stained with calcein-AM (green fluorescence) and PI (red fluorescence), respectively. Scale bar = 200 μ m. The photographs shown are representative of four independent experiments. Control, untransduced NRK-52E cells; Empty vector, empty viral vector-transduced clone; xCT1 and xCT2, two xCT-expressing vector transduced clones

3.6 xCT 과발현된 NRK-52E 세포 내 활성산소종(ROS) 수준에 대한 유량세포계 분석

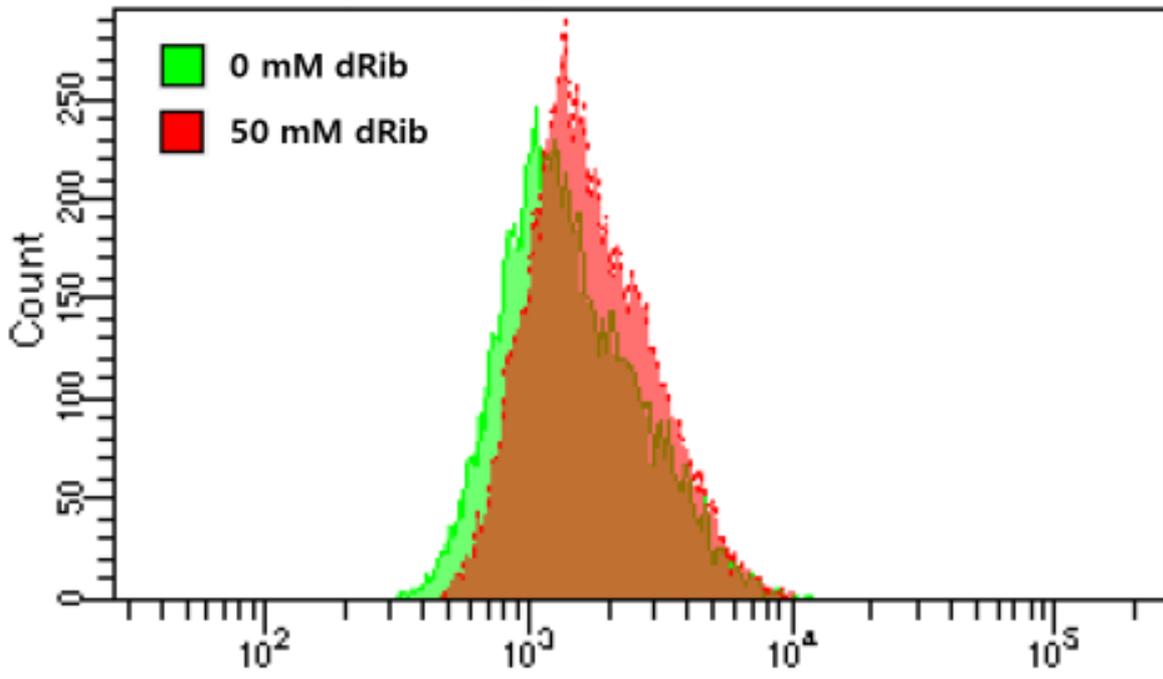
대조군, 빈벡터 군과 xCT 과발현 군 세포에 0, 50 mM 농도의 dRib 을 처리하고, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 6시간 동안 배양하였다. 상대적인 ROS 수준은 ROS 민감성 염료 H2DCF-DA를 사용하여 유세포 측정을 통해 정량화 하였다.

대조군 (Fig. 6 A)과 빈벡터 군(Fig. 6 B)은 50mM dRib을 6시간 처리시 dRib를 처리 하지 않는 경우보다 ROS가 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 xCT 과발현군(Fig. 6C, D)은 dRib 50mM 처리한 실험군에서도 의미 있는 ROS 증가를 보이지 않았다.

A



C



D

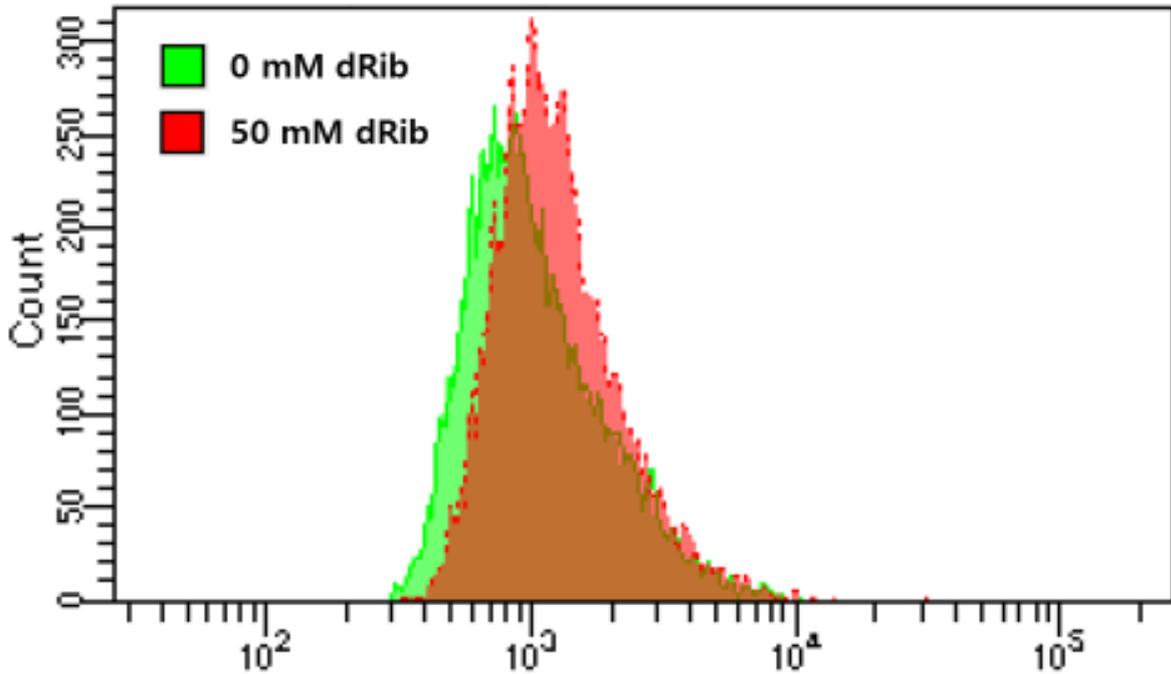


Figure. 6. Flow cytometric analysis for intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in NRK-52E cells transduced with xCT-expressing or empty viral vector. The cells were incubated with DMEM media containing 10% FBS for 6 hours with or without 50 mM dRib. Relative ROS levels were quantified by flow cytometry using the ROS-sensitive dye H2DCF-DA. The histogram is representative of four independent experiments. (A) Control, untransduced NRK-52E cells; (B) Empty vector, empty viral vector-transduced clone; (C and D) xCT1 and xCT2, two xCT-expressing vector transduced clones.

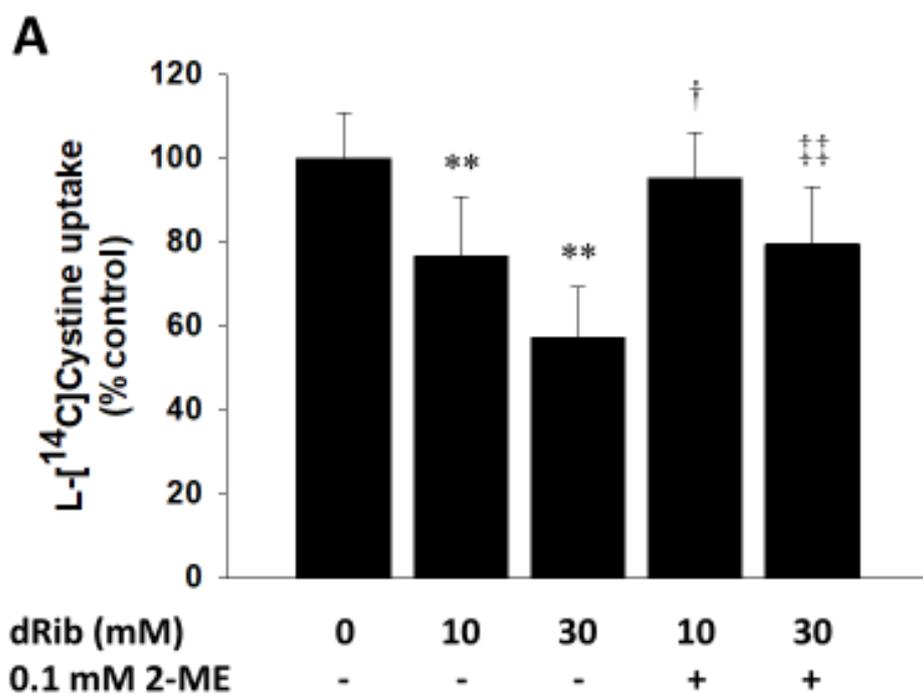
3.7. 일차 배양된 레트 신장 세뇨관 상피세포에서 dRib 과 2-ME (Mercaptoethanol)의

효과

분리된 신장 세뇨관 상피 세포는 $1.7 \mu\text{M}$ L-[^{14}C]시스틴($0.1 \mu\text{C}$)을 함유한 세포 외액 완충액에서 3 시간 동안 0, 10, 30 mM dRib 과 추가로 각 농도당 0.1mM 의 2-ME 으로 처리하였다. dRib 농도가 증가함에 따라 유의하게 시스틴 섭취는 감소하였으나 2-ME 로 극복됨이 확인되었다 (Fig. 7A).

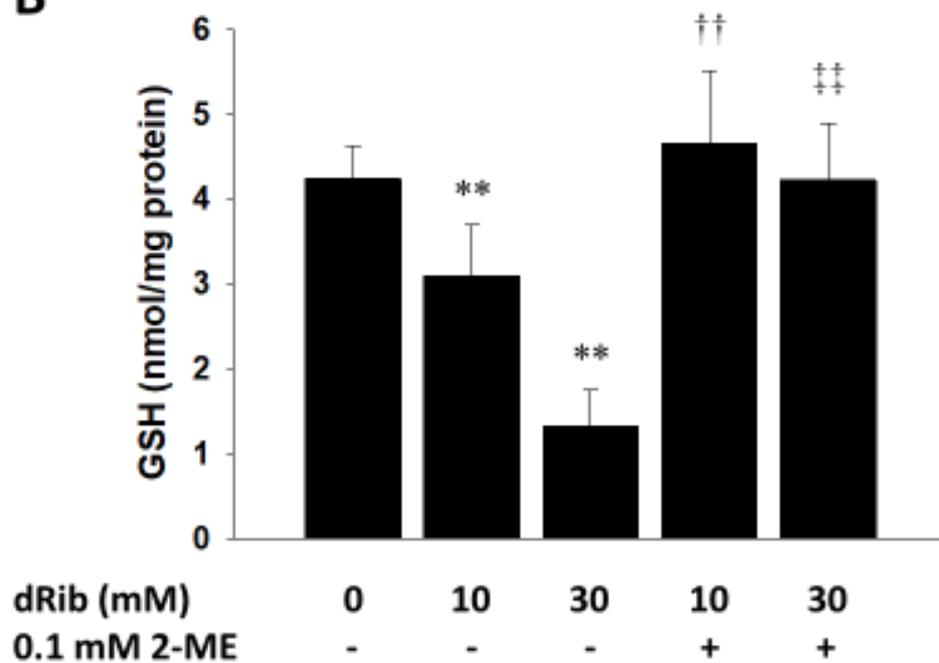
세포 내 GSH 함량의 변화를 확인하기 위해 신세뇨관상피세포는 10% FBS 를 함유한 DMEM 에 서 3 시간 동안 0, 10, 30 mM dRib 과 추가로 각 농도당 0.1mM 의 2-ME 으로 처리하였다. 이후 세포 내 GSH 양을 측정하였다. dRib 농도가 증가함에 따라 유의하게 세포내 GSH 양은 감소하였으나 2-ME 로 처리된 군에서는 GSH 양이 유지됨을 확인하였다 (Fig. 7B).

세포 독성 확인을 위해 신세뇨관상피세포는 10% FBS 를 함유한 DMEM 에서 3 시간 동안 0, 10, 30 mM dRib 과 추가로 각 농도당 0.1mM 의 2-ME 으로 처리하였다. 세포 독성은 젖산탈수소효소 (LDH) 방출 분석에 의해 측정되었다. dRib 농도가 증가함에 따라 유의하게 LDH 양으로 확인되는 세포 독성은 증가하였으나 2-ME 로 처리된 군에서는 처리되지 않은 군에 비해 유의하게 낮게 확인되었다(Fig. 7C).



1

B



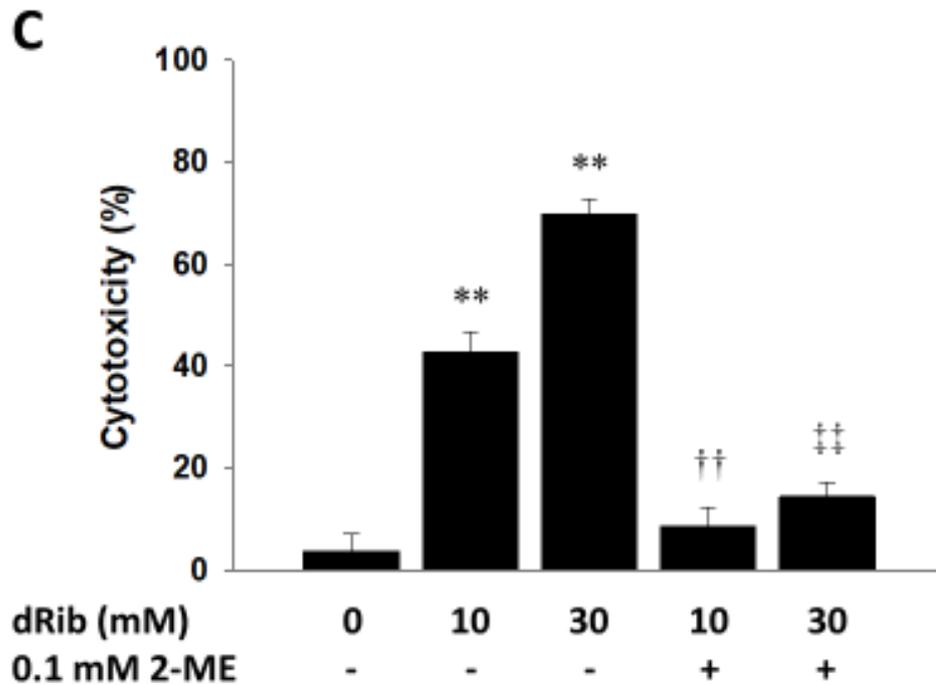


Figure 7. Effects of dRib and 2-mercaptoethanol (2-ME) treatments in isolated rat renal tubular epithelial cells on L-[¹⁴C]cystine uptake (A), intracellular GSH content (B), and cytotoxicity (C). (A) Isolated renal tubular epithelial cells were stimulated with 0, 10 and 30 mM dRib with or without 0.1 mM 2-ME for 3 hours in the extracellular fluid buffer containing 1.7 μ M L-[¹⁴C]cystine (0.1 μ Ci/mL) at 37°C. The radioactivity incorporated into the cells was determined by a liquid scintillation counter. (B) Isolated renal tubular

epithelial cells were co-stimulated with 0, 10 and 30 mM dRib with or without 0.1 mM 2-ME for 3 hours in DMEM containing 10% FBS. The intracellular GSH concentration was measured using a glutathione assay kit. The data are presented as the mean \pm SD. (C)

Isolated renal tubular epithelial cells were co-stimulated with 0, 10 and 30 mM dRib with or without 0.1 mM 2-ME for 24 hours in DMEM media containing 10% FBS. The cytotoxicity was determined by lactate dehydrogenase (LDH) release assay. This experiment was performed thrice, in triplicate. $**p < 0.01$ vs. control; $\dagger p < 0.05$ and $\ddagger p < 0.01$ vs. 10 mM dRib alone; $\#\ddagger p < 0.01$ vs. 30 mM dRib alone, as determined by one way analysis of variance and Duncan's post hoc test.

IV. 토론

본 연구에서 dRib 처리는 신세포(NRK-52E) 내 시스틴 섭취, GSH 함량 및 세포 생존율을 감소시키는 것으로 확인되었으며, 이를 바탕으로, dRib 이 system χ_c^- 를 통한 시스틴 수송의 억제를 통해 세포 내 GSH 함량을 감소시킨다는 것을 시사한다. 또한, 신장 근위 세뇨관 세포의 system χ_c^- 의 결핍 또는 억제가 산화 스트레스 유발 신손상에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. xCT의 유전자 형질 도입은 통한 과발현은 dRib 으로 인한 산화 스트레스로 인한 신손상을 극복하였는데 이는 본 실험에서 L-[14C] 시스틴 섭취 및 세포내 GSH 함량의 감소, ROS 상승, 세포독성 및 세포사멸을 방지하였다.

다양한 포유류 세포는 system χ_c^- (Na^+ 비의존 시스틴/글루탐산 운반체)를 통해 세포 외 시스틴을 흡수한다 (16). system χ_c^- 의 활성은 주로 구조 중 경쇄 xCT 발현에 따라 달라진다. xCT 경쇄 과발현만으로도 다양한 세포 유형에서 system χ_c^- 활성을 현저하게 증가시키는 것으로 보고되었다 (17). system χ_c^- 의 활성은 산화 스트레스, 친전자성 물질, 지질 다당류를 포함한 다양한 자극에 의해 유도된다 (18).

xCT 유전자 과발현을 통한 시스틴 운반 활성의 증가는 세포 내 GSH 수준을 유지함으로써 산화 스트레스로부터 세포를 보호한다. 그러나 림프구와 같은 일부 세포는 system χ_c^- 를 유도할 수 없기 때문에 세포 외 시스테인의 공급에 의존하거나 생존과 증식을 위해 2-ME를 필요로 한다 (19, 20).

2-ME 의 주요 역할은 시스틴을 포함한 배지에서 반응하여 시스테인을 생성하거나 2-ME 와 시스테인의 혼합 이황화물을 형성하는 것이다 (21). 시스테인과 혼합 이황화물은 Na^+ 의존성 중성 아미노산 운반 시스템인 시스템 ASC 를 통해 세포 내로 운반될 수 있다. 세포 내의 혼합된 이황화물은 시스테인을 생성하기 위해 빠르게 환원되고, 세포 배양 동안 GSH 수치를 유지할 수 있다 (22,23). 본 연구에서 일차 배양을 통한 레트 근위 신세뇨관 상피세포에서 dRib 을 처리한 군에서 2-ME 을 처리한 경우 시스템 ASC 를 통해 시스틴을 독립적으로 섭취할 수 있게 하여 system χ_c^- 억제에 의한 세포 손상을 회피한다. 따라서 이러한 발견을 고려할 때, dRib 은 신장 근위 세뇨관 상피 세포에서 system χ_c^- 을 억제하여 시스틴 수송을 억제한다고 가정할 수 있다(Fig. 8).

이전에 dRib 에 의한 세포 내 GSH 고갈의 메커니즘을 설명하기 위한 연구가 일부 보고 되었는데, Fico 는 dRib 이 GSH 의 합성을 억제하고 GSH 의 유출을 증가시켜 세포 내 GSH 를 고갈시킨다고 보고했다. GSH 생합성에서 속도 제한 단계인 글루탐산 시스테인 연결 효소(GCL) 의 활성이 dRib 로 처리시 감소함을 입증했다 (24). 그러나 GCL 활성의 감소는 시스틴 수송의 감소로 인해 발생할 수 있으며, 이는 효소 기질의 농도를 감소시킨다. 또한 GSH 유출을 증가시킴으로써 배양 배지에서 GSH 농도의 dRib 유도 상승을 보였다. 그러나 본 연구에서는 배양 배지에서 다양한 농도의 dRib 에 의한 자극은 자극되지 않은 세포에 비해 GSH 수치를 높이지 않았다. 본 연구 결과를 토대로 시스틴 수송의 억제가 dRib 에 의한 GSH 고갈의 근본 원인이 되는 기전이라고 판단된다.

추가적으로 dRib 에 의한 산화 스트레스와 신장 세뇨관 상피 세포의 세포사멸 사이의 중간

단계인 염증성 사이토카인, 손상 매개 물질의 변화에 대한 측정이 이루어지지 않았다는 점이 본 연구의 제한점이다.

본 연구 결과를 통해 신장 근위 상피세포에서 dRib이 system χ_c^- 를 통한 시스틴 수송을 억제하며 세포 내 GSH 함량을 감소시킨다는 것을 증명하였고, 이는 산화 스트레스와 세포 사멸의 증가를 유발한다는 것을 확인하였다. xCT 유전자 형질 도입을 통한 과발현은 NRK-52E 세포에서 dRib에 의한 산화적 손상에 대한 보호 효과를 보여주었다.

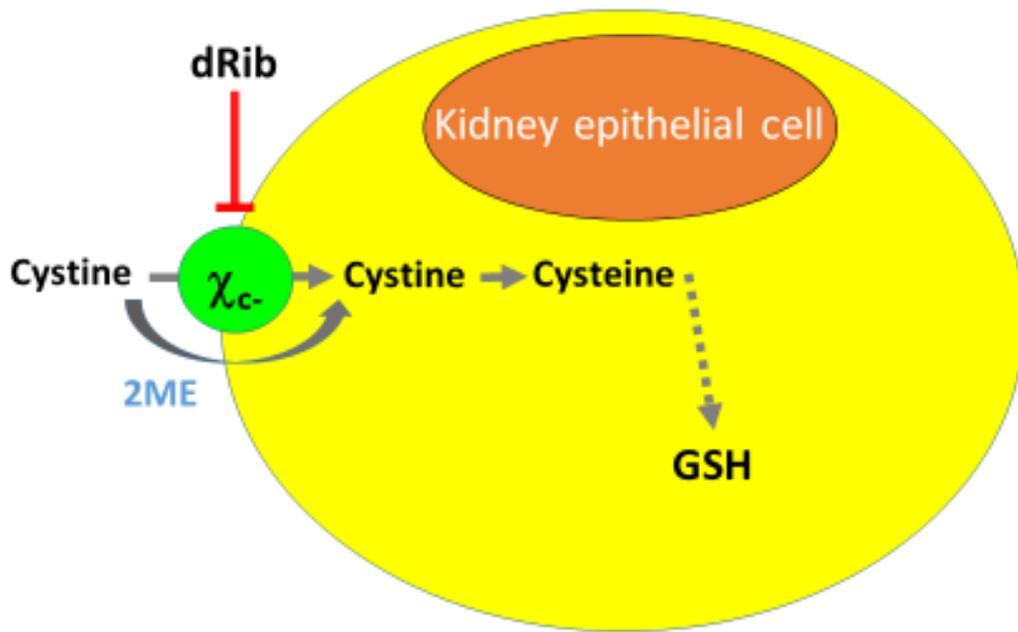


Figure 8. Schematic diagram of the action of dRib and 2-ME on system χ_{c-}

V. 결론

결론적으로, 신장 근위 세뇨관 상피세포에서 dRib은 system χ_c -를 통한 시스틴 수송의 억제를 통해 세포 내 GSH 함량을 감소시켜 산화 스트레스와 세포사의 증가를 유발한다. xCT 과발현된 신장 근위 세뇨관 상피세포는 dRib에 의한 산화 손상을 극복하였다. 따라서 system χ_c -조절을 통해 산화스트레스에 의한 손상 예방할 수 있을 것으로 생각한다.

VI. 참고 문헌

1. Caramori ML, Kim Y, Huang C, et al. Cellular basis of diabetic neephropathy: 1. Study design and renal structural relationships in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:506-13
2. Alejandra G, Leonardo P, Francisco G, Yanowsky E, Jorge A. Oxidative stress in Diabetic Nephropathy with early chronic kidney disease. *Journal of Diabetes Research*. 2016;1-8
3. Jay c. Claudine B, Bryna S, Chow, Mark E, Karin J. Diabetes and Kidney Disease: Role of csidative stress. *Antioxiants and Redox Signaling*. 2016;25(12) :657-683
4. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1343-74.
5. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):1-12.
6. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods in enzymology*. 2002;348:93-112.
7. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(1-2):42-59.
8. Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem*. 2003;384(4):505-16.
9. Bannai S, Tateishi N. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol*. 1986;89(1):1-8.
10. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*. 1990;70(1):43-77.
11. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Seminars in liver disease*. 1998;18(4):331-43.

12. Bannai S. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1986;261(5):2256-63.
13. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science.* 1981;213(4504):222-4.
14. Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest.* 1993;92(1):514-9.
15. Koh G, Yoo S, Bae J, Moon J. System Xc⁻ overexpression prevent 2-deoxy-d-ribose-induced b-cell damage. *Free Radical Biology and Medicine* 2020;153(41)
16. Bannai S, Christensen HN, Vadgama JV, Ellory JC, Englesberg E, Guidotti GG, et al. Amino acid transport systems. *Nature.* 1984;311(5984):308.
17. Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, Lambros M, Gout PW, Kalivas PW, et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)⁻ in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(5):522-55.
18. Ishii T, Sugita Y, Bannai S. Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J Cell Physiol.* 1987;133(2):330-6.
19. Hishinuma I, Ishii T, Watanabe H, Bannai S. Mouse lymphoma L1210 cells acquire a new cystine transport activity upon adaptation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986;22(3 Pt 1):127-34.
20. Ishii T, Sugita Y, Bannai S. Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J Cell Physiol.* 1987;133(2):330-6.
21. 20. Ishii T, Bannai S, Sugita Y. 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.* 1981;256(23):12387-92

22. Ishii T, Mann GE. Redox status in mammalian cells and stem cells during culture in vitro: critical roles of Nrf2 and cystine transporter activity in the maintenance of redox balance. *Redox Biol.* 2014;2:786-94.
23. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids.* 2012;42(1):231-46.
24. Fico A, Manganelli G, Cigliano L, Bergamo P, Abrescia P, Franceschi C, et al. 2-deoxy-d-ribose induces apoptosis by inhibiting the synthesis and increasing the efflux of glutathione. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(2):211-7.

감사의 글

2007년 의대를 졸업하고, 정신 없이 시간이 지났습니다. 제주대학교 병원 신장 내과 의사로 재직 하면서 다양한 환자와 질환을 경험 하고, 임상의로서 자리를 잡게 되었습니다. 학생 때에는 실험 연구에 대한 막연한 열망이나 호기심은 있었지만 의사 수련 과정에서 실험 연구를 경험하거나 배우게 되는 기회는 좀처럼 없었습니다. 김현우 교수님의 도움으로, 내분비내과 고관표 교수님의 연구팀에 합류하면서, 교수님께서 십 수 년 간 체득 하신 실험 기법과 연구 방법을 함께 경험할 귀중한 기회를 얻게 되었습니다.

고관표 교수님, 항상 미흡하고 부족한 제게 가르침 주셔서 진심으로 감사와 존경을 드립니다. 실험할 때 도움을 많이 주신 유소연 교수님, 실질적으로 실험 수행시 주축이 되어 주신 배주영 연구원 님께도 감사의 마음을 전합니다. 김현우 교수님, 지금까지 신장 내과 의사로 성장하는데 도와주시고, 잘 이끌어주셔서 진심으로 감사와 존경의 마음을 드립니다. 김의태 교수님, 웨스턴 블랏 실험이 잘 안돼서 고민일 때 해결 방법에 대해 도와 주셔서 감사드리고, 논문 수정 시 세세한 부분까지 봐 주셔서 감사드립니다. 한상훈 교수님, 바쁘신데 도와주셔서 감사합니다. 그리고 항상 힘든 외중에도 웃음을 잊지 않고, 격려해주시는 가족 같은 김민희 팀장님과 인공 신장실 식구들, PA부지영 간호사님께 감사드립니다. 21년 전 처음 지도 교수님으로 인연이 맺은 이창인 교수님, 진심 어린 조언 해주시고, 격려 해주셔서 감사합니다.

마지막으로 사랑하는 아버지, 어머니, 키워 주셔서 감사하고, 앞으로도 건강 하게 제 곁에 있어 주셨으면 합니다. 지연 언니, 민수야. 의대 다닐 때 학교 데려다 주고, 밤에 도서관에서 공부하고 자정 순환 버스 타고 집에 올 때 무섭지 말라고, 정류장에 마중 나와줘서 고마웠고, 나이 들어도 우애 깊은 형제가 되었으면 합니다. 병원 일 바쁘다고 집에도 자주 늦고, 집안 일도 잘 못 챙겨서 항상 미안한 마음 뿐 인데 편하게 일하게 도와 주시고, 손자를 사랑으로 돌봐 주시는 우리 어머님, 항상 감사한 마음으로 지내고 있습니다. 항상 바쁜 엄마에게 투정 보다는 자랑스럽다고 말해 주는 착한 우리 아들 민호야, 사랑하고, 항상 건강하길 바라고, 열심히 노력해서 꿈을 이루길 바란다. 그리고, 늘 옆에 든든히 있어 주고, 흔들리지 않게 도와 주는 나의 반려자 유정래 님께 사랑한다는 말과 감사의 마음을 전합니다.

2022년 7월

김미연 올림

