

Mouse 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 thyroxine 유리 억제기전

강형섭 · 김송규 · 강창원 · 김진상 · 이호일

전북대학교 수의과대학
(1998년 4월 15일 접수)

Inhibitory mechanism of α_1 -adrenergic stimulation on the release of thyroxine in mouse thyroids

Hyung-sub Kang, Song-kyu Kim, Chang-won Kang, Jin-sang Kim, Ho-il Lee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Apr 15, 1998)

Abstract : Thyroid function is mainly regulated through cAMP and phosphatidylinositol, and it is well known that TSH-stimulated thyroxine (T_4) release is inhibited by catecholamine from mouse thyroids via the α_1 -adrenoceptor stimulation. Previous study has established that the inhibition of T_4 release by α_1 -adrenoceptor stimulation results in activated protein kinase C (PKC). The purpose of this study was to determine if ion transport systems are involved in the inhibition of T_4 release elicited by α_1 -adrenergic agonist in mouse thyroids.

TSH-, IBMX- and cAMP analogue-stimulated T_4 release were significantly inhibited by methoxamine, R59022 (diacylglycerol kinase inhibitor), and MDL (adenylate cyclase inhibitor). TSH-stimulated T_4 release could be inhibited by Bay K 8644 and cyclopiazonic acid, but not by verapamil and tetrodotoxin. The addition of nifedipine (Ca^{2+} channel blocker), tetrodotoxin and lidocaine (Na^+ channel blockers), but not amiloride (EIPA) and ryanodine, completely blocked the inhibitory effects of methoxamine on T_4 release. TSH-stimulated T_4 release was also inhibited by benamil (Na^+ - Ca^{2+} exchange inhibitor). TSH-, IBMX- and cAMP-stimulated T_4 release were inhibited by methoxamine or R59022, these effects were reversed by nifedipine. but not by verapamil. Furthermore, nifedipine reversed the inhibitory effects of benamil and R59022 on TSH-stimulated T_4 release.

These data suggest that the observed α_1 -adrenoceptor-mediated inhibition of T_4 release in mouse thyroids is the result of an increase in intracellular Na^+ or Ca^{2+} effected via activation of fast Na^+ or nifedipine-sensitive Ca^{2+} channels, and that Na^+ - Ca^{2+} exchange may play an important

role in reducing thyroid hormone by increasing intracellular Ca^{2+} .

Key words : α_1 -adrenoceptor, methoxamine, thyroxine, nifedipine, Na^+ - Ca^{2+} exchange.

서 론

갑상선 기능은 adenylyate cyclase계와 Ca^{2+} -phosphatidylinositol(PI)계와 같은 주요 두 신호전달계에 의해서 조절된다¹. TSH는 adenylyate cyclase를 활성화시킴으로써 갑상선에 많은 대사효과를 나타낼 뿐만 아니라² PI를 가수분해시킴으로써 diacylglycerol(DAG) 생성을 촉진하여 protein kinase C(PKC)를 활성화시킨다³. 이 PI의 가수분해 또는 PI 가수분해에 의한 Ca^{2+} 증가는 cAMP에 비의존적으로 일어난다⁴. 그러나 α_1 -adrenoceptor나 muscarinic 수용체 자극은 PI 가수분해를 촉진시킴으로써 DAG나 inositol triphosphate(IP₃) 생성으로 세포내 Ca^{2+} 이 증가될 수 있으며^{5,6} 이는 Ca^{2+} 증가에 의해서 갑상선 호르몬 분비가 억제된다^{7,8}. TSH에 의한 갑상선 세포내 반응은 일반적으로 첫째 호르몬 분비에 영향을 미칠 수 있다고 생각되는 cAMP 경로와 둘째 세포내 Ca^{2+} 증가에 따라 활성화 되는 PI 경로가 갑상선 호르몬 유리에 대한 상반된 두 기능이 있음을 알 수 있다. 그러나 이 두 상호작용에 의한 갑상선 세포기능 조절기전은 정립되어 있지 않다. 다만 갑상선 세포내 Ca^{2+} 증가로 H_2O_2 생성⁹, iodide 유출 촉진⁵ 및 glucose oxidation 증가^{9,10} 등이 일어나지만 갑상선 호르몬 분비는 억제된다고 하였다⁷. Oda *et al*⁸에 의하면 마우스 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리효과가 Ca^{2+} 제거로 차단됨을 보여 Ca^{2+} -의존성 기전에 의한다고 했을 뿐 Ca^{2+} 을 조절하는 α_1 -adrenoceptor의 구체적 신호전달계의 경로는 물론 Ca^{2+} 조절계에 의한 갑상선 호르몬 유리억제 기전은 밝히지 못했다. 그 외에 많은 연구자들에 의해서 α_1 -adrenoceptor 자극으로 갑상선 호르몬 유리가 억제되고^{1,8} 이 수용체 자극에 의한 신호전달기전¹¹ 및 Ca^{2+} 증가기전^{5,10}에 대한 연구보고가 있었으나 갑상선 호르몬을 억제하는 이온들과의 관계에 대해서는 알려져 있지 않았다. 최근 저자 등¹²은 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리 억제효과가 DAG를 경유한 PKC 활성화에 의한 결과임

을 알았으며, PKC는 다른 조직 및 세포에서 Na^+ - H^+ 교환기, K^+ 통로, Ca^{2+} 통로 및 Na^+ - Ca^{2+} 교환기 등에 작용하여 세포내 이온을 조절할 수 있다^{11,13}.

따라서 본 연구에서는 PKC 자극에 의한 T₄ 유리 억제 효과가 결국 세포내 이온의 변동에 의한 결과일 것으로 추측하여 α_1 -adrenoceptor 자극효과가 어떠한 이온계의 변동에 의해서 T₄ 유리를 억제하는지를 규명하기 위하여 마우스 갑상선 조직에서 T₄ 유리체에 의한 T₄ 유리에 미치는 PKC 자극에 의해 조절될 수 있는 이온계 약물의 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물, 갑상선 분리 및 장치 : 전북대학교 실험동물센터로부터 수컷 mouse(ICR, 8-10주령, 체중 25-35g)를 공급받아 sodium pentobarbital(30mg/kg)를 복강내로 투여하여 마취한 후 갑상선을 적출하였다. 적출시 갑상선 조직의 손상을 줄이고 조직 주변에 육안적인 출혈을 피하면서 기관과 후두부위를 함께 적출한 즉시 O₂와 CO₂가 포화된 Krebs-bicarbonate 완충액(118.05mM NaCl, 4.69mM KCl, 1.16mM MgCl₂, 5.5mM Glucose, 2.0mM CaCl₂, 1.16mM NaH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 0.3% BSA, pH 7.4, 37°C)이 들어있는 시험관(14×40mm)에 넣어 shaking water bath(37°C, RPM 150)에서 배양시켰다. Maayan *et al*¹⁸의 방법에 따라 gas를 5-6시간동안 공급하였다. 즉, 시험관 마개(polyethylene)에 두개의 관(0.3mm)을 관통시켜 그중 하나는 끝이 시험관내 완충액 부위까지 삽입하여 완충액에 gas를 공급하였다. 또 다른 관은 짧게 하여 gas가 시험관 밖으로 배출되도록 하였다.

시료채취 및 T₄ 정량 : 하나의 시험관에 mouse 4수에서 적출한 갑상선(8 pieces, 후두와 기관 포함)을 넣고 37°C, 1시간 30분동안 배양시킴으로써 조직내 혈액 등을 제거하고 조직을 시험관내에 안정시켰다. 그리고 microforceps을 이용하여 1ml의 완충액이 든 시험관내에 갑상선 조직을 옮긴 후 1시간동안 배양하여 상층액을 대조

액으로 하였다. 그후 TSH 또는 약물이 포함된 1ml의 완충액이 든 시험관에 매시간마다 갑상선 조직을 옮겨 반복적으로 1ml의 배양액을 취하였다(결과 참조). 그 시료는 -70℃ 보관한 후 2일 이내에 효소면역 측정법에 따라 T₄ 측정 kit(Roche, Swiss)를 사용하여 T₄를 측정하였고, 그 측정은 Cobas Core(Roche, Swiss)를 이용하였다. 측정된 T₄ 농도는 각 시간마다 ng/ml로 표시하였다. Fig에서 3시간 부터 5 또는 6시간까지 각각의 약물존재하에서 TSH나 T₄ 유리제의 효과를 표시하였다.

사용약물 : TSH, methoxamine(α_1 -adrenoceptor agonist), ryanodine(Ca²⁺ releaser inhibitor), nifedipine, verapamil(이상 Ca²⁺ channel blocker), lidocaine, tetrodotoxin(이상 Na⁺ channel blocker) 및 MDL-12330A hydrochloride(adenylate cyclase inhibitor)은 Sigma Chemical Co.로부터 그리고 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amilroide (EIPA, Na⁺-H⁺ antiporter inhibitor), Bay K 8644(Ca²⁺ channel activator), cyclopiazoic acid(intracellular Ca²⁺ releaser), R59022(diacylglycerol kinase inhibitor), forskolin(adenylate cyclase activator), 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP sodium(membrane permeable analog of cAMP), benzamil(Na⁺-Ca²⁺ antiporter inhibitor) 및 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(IBMx, phosphodiesterase inhibitor)는 RBI로부터 구입하였다.

결 과

TSH, IBMx 및 cAMP의 T₄ 유리효과에 미치는 methoxamine, R59022 및 MDL의 영향 : Fig 1에서 보는 바와 같이 T₄ 유리에 미치는 TSH(100 μ U/ml)의 효과와 methoxamine(10⁻⁵M)의 억제효과를 확인하였다. 그리고 methoxamine의 억제효과가 staurosporine(10⁻⁶M)으로 차단됨을 관찰하였으며, 이는 methoxamine에 의한 T₄ 유리 억제효과는 PKC를 경유한 효과임을 확인하였다(자료 미제시). TSH는 adenylate cyclase를 자극하여 세포내 cAMP를 증가시킴으로써 갑상선 호르몬을 유리시키는 여러 연구자들의 보고에 따라 methoxamine의 갑상선 호르몬 유리 억제효과가 adenylate cyclase 억제 또는 cAMP 증가억제에 의한 결과일 수 있다고 추측한 바 직접적으로 세포막을 투과하여 세포내 cAMP 농도가 증가되는 8-Cl-cAMP(10⁻³M, membrane permeable analog of cAMP)에 의한 T₄ 유리효과에 대한 methoxamine의 영향을 관찰하였다.

따라서 Cl-cAMP 및 IBMx(phosphodiesterase inhibitor)는 시간에 따라 현저한 T₄ 유리(자료 미제시)를 나타냈고 이 유리효과가 methoxamine(10⁻⁵M) 또는 R59022(10⁻⁴M, diacylglycerol kinase inhibitor)으로 억제되었으며, MDL (10⁻⁴, adenylate cyclase inhibitor) 존재하에서 TSH에 의한 T₄ 유리 증가효과가 억제되었다(Fig 1).

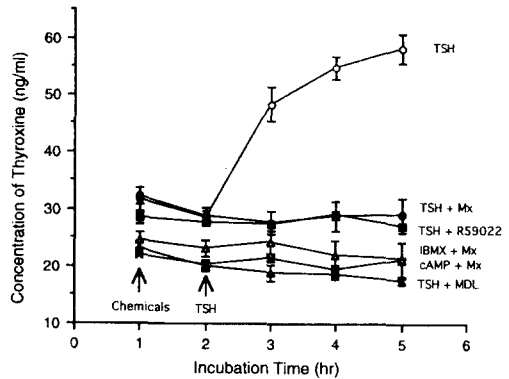


Fig 1. Effects of TSH, IBMx, Cl-cAMP, MDL, methoxamine (Mx) and R59022 on thyroxine (T₄) release from isolated mouse thyroids. Mx (10⁻⁵M), R59022 (10⁻⁴M) were added in the buffer at the time indicated by the first arrow. After 1hr of incubation, thyroids were stimulated by adding TSH (100 μ U/ml), IBMx (6 \times 10⁻⁴M) and cAMP(10⁻³M), each second arrow). Samples were collected every 1hr. Each point represents mean \pm S.E. by joining data files from separate experiments (TSH, n=6; TSH+Mx, n=6; TSH+R59022, n=4; IBMx+Mx, n=4; cAMP+Mx, N=4; TSH+MDL, n=5), each containing four thyroid preparations, i.e. thyroid with larynx and trachea.

Methoxamine과 R59022에 의한 T₄ 유리 억제효과에 미치는 EIPA 및 ryanodine의 영향 : Diacylglycerol kinase 억제제인 R59022(10⁻⁴M) 역시 methoxamine과 유사하게 TSH에 의한 T₄ 유리를 현저히 억제시킴을 관찰하였다(Fig 1). PKC 활성화는 세포막 이온전달계에 영향을 미쳐 세포내 이온변동을 일으킬 수 있으므로 Na⁺-H⁺ 교환기와의 관계를 알아보기 위하여 이 교환기 억제제인 EIPA(10⁻⁵M)의 효과를 관찰하였다(Fig 2). 세포막의 Na⁺-H⁺ 교환기 억제는 H⁺ 증가로 세포내 산성화를 초래할 수 있다. 그러나 산성화 또는 Na⁺-H⁺ 교환기 차단은 TSH에 의한 T₄ 유리에 영향을 미치지 못했다. 또한 EIPA는 methoxamine과 R59022에 의한 T₄ 유리 억제효과를 차단시키지 못했다. 따라서 PKC 자극에 의한 Na⁺-H⁺ 교환기

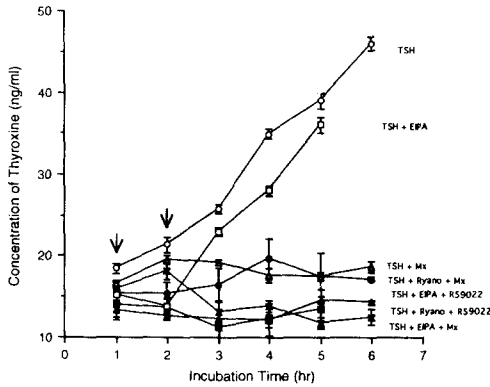


Fig 2. Effect of Mx, R59022, EIPA (10^{-5} M) and Ryano (ryanodine, 3×10^{-5} M) on the TSH-stimulated T_4 release from isolated mouse thyroids. Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1. Each point represents mean \pm S.E. by joining data files from separate experiments (TSH+EIPA, n=5; TSH+EIPA+R59022, n=5; TSH+EIPA+Mx, n=4; TSH, n=6; TSH+Mx, n=4; TSH+Ryano+Mx, n=5; TSH+Ryano+R59022, n=5).

활성화는 TSH에 의한 T_4 유리에 영향을 미치지 않을 것으로 추측하였다. T_4 유리 억제기전중 하나인 DAG 경로를 경유한 세포내 Ca^{2+} 저장소에서의 Ca^{2+} 유리증가에 따른 결과인가를 확인하기 위하여 methoxamine(10^{-5} M) 또는 R59022(10^{-4} M)에 의한 T_4 유리 억제효과에 대한 ryanodine의 영향을 관찰한 바 ryanodine(3×10^{-5} M)은 상기 억제효과를 차단하지 못하였다.

TSH에 의한 T_4 유리효과에 미치는 이온통로 modulator의 영향: α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 갑상선 호르몬의 조절은 궁극적으로는 세포내 이온변동에 의존적일 것이다. 그래서 몇가지 이온통로 modulator의 영향을 관찰하였다. Na^+ 통로 차단제인 TTX(10^{-5} M)은 TSH에 의한 T_4 유리효과에 영향을 미치지 않았고 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil(10^{-5} M) 역시 영향을 미치지 않았다(Fig 3). 즉, 세포내 Na^+ 이나 Ca^{2+} 감소는 TSH 자체에 의한 T_4 유리효과에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러나 Ca^{2+} 통로 활성제인 Bay K 8644(3×10^{-5} M)나 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키는 cyclopiazoic acid(3×10^{-5} M)은 TSH에 의한 T_4 유리효과를 현저히 억제시켰다. Na^+ 의 증가는 결국 주요 교환기중 하나인 Na^+ - Ca^{2+} 교환기에 의해 세포내 Ca^{2+} 을 증가시킬 수 있음을 고려하여 methoxamine의 T_4 유리 억제효과에 대한 Na^+ 통로 차단제인 TTX와 li-

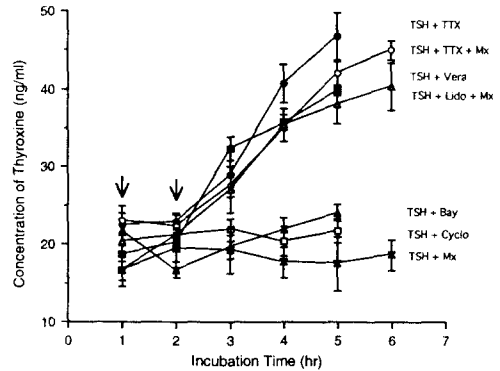


Fig 3. Effects of TTX (10^{-5} M), Vera (verapamil, 10^{-5} M), Bay (Bay K 8644, 3×10^{-5} M) and Cyclo (cyclopiazoic acid, 3×10^{-5} M) on the TSH-stimulated T_4 release from isolated mouse thyroids. Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1. Each point represents mean \pm S.E. by joining data files from separate experiments (TSH+TTX, n=4 TSH+Vera, n=4 TSH++Bay, N=4 TSH+Cyclo, n=4 TSH+Lido+Mx, n=5 TSH+TTX+Mx, n=4 TSH+Mx, n=6).

docaine의 영향을 관찰하였다. Fig 3에서 보는 바와 같이 lidocaine(10^{-5} M)과 TTX(10^{-5} M)은 methoxamine에 의한 T_4 유리 억제효과를 현저히 차단하였다.

Methoxamine나 R59022에 의한 T_4 유리 억제효과에 미치는 Ca^{2+} 통로 차단제의 영향: 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키는 약물에 의해 T_4 유리가 억제되었기 때문에 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T_4 유리억제는 Ca^{2+} -의존성 기

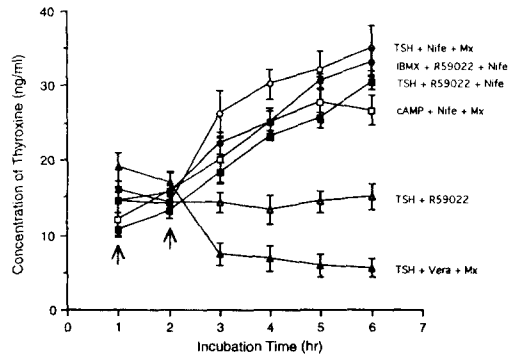


Fig 4. Reversal of R59022 or Mx inhibition of TSH-, cAMP- and IBMX (6×10^{-4} M)-induced T_4 release by Nife (nifedipine, 10^{-5} M). Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1. Each point represents mean \pm S.E. by joining data files from separate experiments(n=5).

전에 의한 결과임을 추측할 수 있었다. 이를 검증하기 위하여 이들 억제효과에 대한 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil과 nifedipine의 영향을 관찰하였다. Verapamil(10^{-4} M)은 methoxamine의 억제효과를 차단하지 못했으나 nifedipine (10^{-4} M)은 methoxamine 또는 R59022의 T_4 유리 억제효과를 현저히 차단하였다(Fig 4). 역시 nifedipine은 TSH, Cl-cAMP 및 IBMX에 의해 유도된 T_4 유리에 대한 methoxamine 및 R59022의 억제효과도 차단하여(Fig 4), T_4 유리를 억제시키는 세포내 Ca^{2+} 증가는 nifedipine 선택적 통로를 경유한 Ca^{2+} 유입의 결과임을 추측할 수 있었다.

TSH, forskolin, Cl-cAMP 및 IBMX의 T_4 유리효과에 미치는 benzamil의 영향: Na^+ - Ca^{2+} 교환기 억제제인 benzamil(5×10^{-5} M)은 TSH에 의한 T_4 유리를 억제할 뿐만 아니라 forskolin(3×10^{-5} M, adenylate cyclase activator), Cl-cAMP 및 IBMX에 의한 T_4 유리도 억제시켜 TSH에 의한 cAMP 증가는 물론 adenylate cyclase 활성화에 의한 cAMP 증가, cAMP의 직접적인 세포내 투과 및 cAMP 불활성화 억제에 의한 T_4 유리효과까지도 benzamil에 의해 차단되었다. 따라서 이는 Na^+ - Ca^{2+} 교환기에 의한 Ca^{2+} 증가도 T_4 유리 억제효과에 관여하고 있음을 의미할 것이다. 또한 benzamil의 TSH에 의한 T_4 유리 억제효과가 nifedipine(10^{-4} M)에 의하여 현저히 억제되었다(Fig 5).

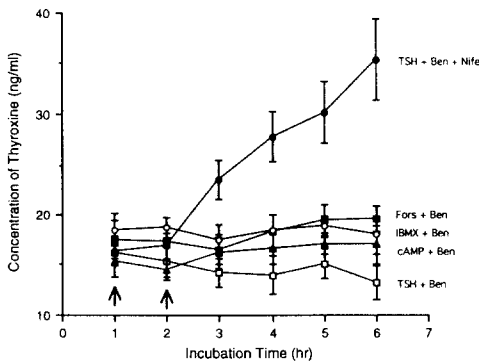


Fig 5. Inhibition of TSH-, IBMX-, cAMP- and Fors (forskolin, 3×10^{-5} M)-stimulated T_4 release by Ben (benzamil, 5×10^{-5} M). Reversal of Ben inhibition of TSH-stimulated T_4 release by Nife(10^{-4} M). Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1. Each point represents mean \pm S.E. by joining data files from separate experiments (TSH+Ben+Nife, n = 4; TSH+Ben, N = 4; Fors+Ben, n = 4; cAMP+Ben, n = 3, IBMX+Ben, n = 5).

고 찰

갑상선 호르몬 유리는 1차적으로 TSH에 의한 adenylate cyclase 활성화로 cAMP에 의해서 일어나며 세포내의 Ca^{2+} 변동에 의해서도 호르몬 분비가 조절될 수 있다¹⁴. 즉, TSH는 PI 가수분해를 촉진시켜 IP_3 와 DAG를 형성¹⁵시킨 결과 DAG 축적으로 인한 PKC가 활성화됨으로써 Ca^{2+} 을 증가시킨다¹⁰. 또한 TSH에 의한 Ca^{2+} 증가경로는 정확히 알려져 있지는 않지만 PI 가수분해 촉진으로 세포질내 Ca^{2+} 이 증가¹⁷되는데 이는 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 유래⁵한 것으로 보아 IP_3 증가에 의한 결과로 추측하였고 지속적인 Ca^{2+} 증가는 세포외액으로부터 유입되었음을 보고하였다¹⁷.

Catecholamine은 adenylate cyclase를 억제¹⁹하고 TSH에 의한 cAMP 증가를 억제한다고 하였지만²⁰ 이는 β -adrenoceptor를 경유하여 cAMP를 증가²¹시키는 반면 α_1 -adrenoceptor를 경유하여 갑상선 세포내 Ca^{2+} 을 증가시킨다고 보고하였다^{5,22}. 또한 cholinergic 또는 adrenergic 수용체 자극시 증가될 수 있는 Ca^{2+} ^{5,6}은 갑상선 기능조절에 중요한 인자²³로써 IP_3 증가에 의한 결과이며, 이에 따른 Ca^{2+} 증가는 cAMP 농도를 감소^{18,24}시켜 간접적으로 갑상선 호르몬 분비를 억제¹⁸하고 α_1 -adrenergic 약물이 직접적으로 여러 동물에서 TSH에 의한 cAMP를 감소시킨다고 하였다²⁰. 그러나 α_1 -adrenergic 및 cholinergic 수용체 자극에 의한 갑상선 호르몬 분비 억제가 cAMP 농도와 무관함을 보고하였다^{18,24,25}. 역시 본 저자의 이전 연구에서 세포내로 직접 투과할 수 있는 8-Cl-cAMP나 cAMP의 불활성화 억제에 의한 T_4 유리효과가 α_1 -adrenoceptor 효현제인 methoxamine으로 차단됨을 관찰하여 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리억제는 cAMP 농도와 무관함을 추측할 수 있었다¹².

최근까지 cholinergic 또는 α_1 -adrenergic 수용체 자극으로 갑상선 호르몬 유리가 억제된다는 보고는 많지만 그 억제기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다. 갑상선에서도 norepinephrine에 의한 PI 가수분해는 α_1 -adrenoceptor를 경유하며¹⁵, carbachol에 의한 PI 가수분해 역시 IP_3 와 DAG의 축적을 일으킨다²⁶. 따라서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리억제가 상기한 IP_3 또는 DAG라는 두 신호전달경로를 경유한 효과이고, 갑상선 억제경로가 PKC 활성화의 결과임을 보고하였다¹². 다른

세포에서도 이 PKC 자극은 세포막의 이온전달계를 변동시켜 생리적 반응을 나타내기 때문에 본 실험의 목적은 α_1 -adrenoceptor 자극시 PKC 활성화에 의한 갑상선 유리 억제효과가 어느 이온 및 이온제 변동과의 관련성을 규명하였다. EIPA는 Na^+ - H^+ 교환기의 억제제로 세포내 pH를 감소시킬 수 있다. 그러나 이는 methoxamine의 T_4 유리 억제효과를 차단하지 못하여 Na^+ - H^+ 교환기는 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T_4 유리 억제효과와 관련이 없음을 알 수 있었다. 또한 Na^+ 통로 차단제는 TSH에 의한 T_4 유리효과에 직접적인 영향을 미치지 못하는 못하였으나 Ca^{2+} 통로 활성화제인 Bay K 8644 또는 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키는 cyclopiazonic acid는 TSH에 의한 T_4 유리효과를 억제하여 세포내 Ca^{2+} 증가가 T_4 유리를 억제하는 것으로 추측할 수 있었다. 이 Ca^{2+} 증가는 두 경로를 경유해서 일어날 수 있다. 즉, 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 세포질내로의 Ca^{2+} 유리^{27,28}와 세포막 Ca^{2+} 통로를 경유한 세포밖 Ca^{2+} 의 유입이다²⁹. 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+} 유리는 IP_3 에 의해서 일어남은 잘 알려져 있는데^{27,28} 이는 초기 Ca^{2+} 증가 원인이 될 수 있고 2차적인 지속적 Ca^{2+} 증가는 Ca^{2+} 통로를 경유한 Ca^{2+} 유입이라고 하였다⁶.

α_1 -Adrenoceptor 자극으로 갑상선 호르몬 유리가 억제된다는 보고가 많고 이 수용체 자극은 IP_3 와 DAG 생성으로 Ca^{2+} 이 증가할 뿐만 아니라^{22,30} Ca^{2+} 증가에 의해서 호르몬 분비가 억제되고⁶, Ca^{2+} 을 증가시키는 A23187에 의해서도 T_4 유리가 억제⁹되기 때문에 갑상선 호르몬 조절과 Ca^{2+} 은 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 또한 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 Ca^{2+} 증가가 nifedipine으로 차단되지 않아 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 유리된 것이라고 하였다⁵. 따라서 T_4 유리 억제기전이 DAG 증가에 의한 PKC 활성화가 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터의 유리된 Ca^{2+} 에 의한 효과인지를 알아보기 위해서 ryanodine의 영향을 관찰한 바 ryanodine은 T_4 유리 억제효과를 차단하지 못하여 ryanodine에 반응할 수 있는 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의해서 T_4 유리효과가 영향받지 않음을 추측할 수 있었다. 그러나 Ca^{2+} 통로 차단제인 nifedipine에 의해서 T_4 유리 억제효과가 차단되었다. 이는 PKC에 의한 Ca^{2+} 통로 활성화의 결과로 세포내 Ca^{2+} 유입이 증가됨으로써 TSH에 의한 T_4 유리가 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 같은 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil에 의해서는 차단되지 않아 그 차이점에 대해서는 앞으로 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Nifedipine 뿐만 아니라 Na^+ 통로 차단제인 lidocaine 및 TTX에 의해서도 methoxamine에 의한 T_4 유리 억제효과가 차단되어 Na^+ 통로를 경유한 Na^+ 유입 또는 Ca^{2+} 유입이 TSH에 의한 T_4 유리가 억제될 것으로 추측되었다. 왜냐하면 Na^+ 통로를 경유해서 Ca^{2+} 이 유입될 가능성도 있고, PKC 활성화에 의해서 Na^+ 통로가 활성화되어 Na^+ 유입증가로 세포내 Na^+ 이 증가된다. 세포내 Na^+ 증가는 Na^+ - Ca^{2+} 교환기를 억제하기 때문에 결국 세포내 Ca^{2+} 가 증가될 수 있다. 본 실험에서도 Na^+ - Ca^{2+} 교환기 억제제인 benzamil이 직접적으로 T_4 유리를 억제하였다. 이러한 Ca^{2+} 증가 역시 갑상선 호르몬 분비를 억제할 수 있을 것으로 추측된다. 또한 benzamil은 TSH, 8-Cl-cAMP 및 IBMX에 의한 T_4 유리효과를 α_1 -adrenoceptor 자극효과와 유사하게 억제하였다. 이 benzamil은 Ca^{2+} 의 세포밖 유출을 억제, 세포내 Ca^{2+} 을 증가^{31,32}시킴으로써 수축력을 증가시킨다³³. Benzamil의 이러한 억제효과가 nifedipine으로 약간 차단되어 Ca^{2+} 유출억제로 인한 Ca^{2+} 증가로 T_4 유리를 억제함을 알 수 있다. 이는 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T_4 유리 억제효과가 PKC 활성화에 의한 이온조절계 변동의 결과임을 의미한다.

본 연구결과를 종합하면, α_1 -Adrenoceptor가 자극되면 IP_3 와 DAG 생성으로 DAG는 PKC를 활성화시킴은 잘 알려져 있다^{5,6}. 이 활성화된 PKC가 Ca^{2+} 통로와 Na^+ 통로를 활성화시킴으로써 갑상선 세포내 Ca^{2+} 이 증가한다. 따라서 α_1 -adrenoceptor의 자극에 의한 T_4 의 유리 억제기전은 갑상선 세포내 PKC 활성화에 의해 증가된 Ca^{2+} 에 의하며 이는 저장소에서 유리된 Ca^{2+} 에 의한 것 보다는 Ca^{2+} 통로를 경유한 Ca^{2+} 유입에 의한 증가이며, 이 Ca^{2+} 증가는 Na^+ - Ca^{2+} 교환기의 억제에 의하여 일어날 수 있다.

결 론

갑상선의 기능은 갑상선 세포내에 존재하는 조절자(2nd messenger)인 cAMP와 phosphatidylinositol에 의해 조절되며 마우스의 갑상선에서 TSH 자극에 의한 T_4 의 유리는 catecholamine에 의해 α_1 -adrenoceptor를 경유하여 T_4 유리를 억제하며 이러한 T_4 유리 억제효과는 PKC 활성화에 의한 것으로 알려져 있다. 본 연구는 마우스 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T_4 유리억제와 세포내 이온을 조절할 수 있는 이온조절계와의 관계를 규

명하고자 실시하였다.

Methoxamine과 R59022는 TSH 및 cAMP 자극에 의한 T₄의 유리를 억제시켰으며 이러한 억제효과는 PKC 억제제인 staurosporine에 의해 차단되어 T₄의 유리 억제효과가 PKC를 경유한 효과임을 확인하였으며, 또한 methoxamine에 의한 T₄ 유리 억제효과가 nifedipine, TTX 및 lidocaine에 의해서는 차단되었으나 Na⁺-H⁺ exchange inhibitor인 EIPA 및 ryanodine에 의해서는 차단되지 않았다. TSH 자극에 의한 T₄ 유리는 세포내 Ca²⁺을 증가시킬 수 있는 Bay K 8644 및 cyclopiazonic acid에 의해 억제되었고, Na⁺-Ca²⁺ 교환기 억제제인 benzamil에 의해서도 억제되었다. TSH, IBMX, forskolin 또는 cAMP 자극에 의한 T₄ 유리에 대한 methoxamine 및 R59022의 T₄ 유리 억제효과는 nifedipine에 의해 전환되었다. 또한 TSH 자극에 의한 benzamil 및 R59022의 억제효과도 nifedipine에 의해 차단되었다.

이상의 결과로 마우스의 갑상선에서 α₁-adrenoceptor를 경유한 T₄ 유리 억제효과는 nifedipine sensitive한 Ca²⁺ channel의 작용에 의한 Ca²⁺의 농도증가 및 fast Na⁺ channel을 경유한 Na⁺ 유입에 의해 조절되고, Na⁺-Ca²⁺ 교환기 억제에 의한 세포내 Ca²⁺ 증가는 갑상선 호르몬 유리 억제에 중요한 역할을 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Raspe E, Dumont JE. Control of the dog thyrocyte plasma membrane iodide permeability by the Ca²⁺-phosphatidylinositol and adenosine 3',5'-monophosphate cascades. *Endocrinology*, 135:986-995, 1994.
2. Dumont JE. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm*, 29:287-412, 1971.
3. Friedman Y, Poleck T, Henricks L, et al. Diacylglycerol-activated, calcium/phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) activity in bovine thyroid. *Biochem Biophys Res Commun*, 130:971-980, 1985.
4. Gerard C, Haye B, Jacquemin C, et al. Chronic and acute effects of thyrotropin on phosphatidylinositol turnover in cultured porcine thyroid cell. *Biochem Biophys Acta*, 710:359-369, 1982.
5. Corda D, Marcocci C, Kohn LD, et al. Association of the changes in cytosolic Ca²⁺ and iodide efflux in-

- duced by thyrotropin and by the stimulation of α₁-adrenergic receptors in cultured rat thyroid cells. *J Biol Chem*, 260:9230~9236, 1985.
6. Raspe E, Roger PP, Dumont JE. Carbacholamine, TRH, PGF_{2α} and fluoride enhance free intracellular Ca²⁺ and Ca²⁺ translocation in dog thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 141:569-577, 1986.
7. Tajima K, Miyagawa J, Mori M, et al. Inophore A 23187 inhibits the release of thyrotropin-stimulated 3, 5,3'-triiodothyronine from perfused rat thyroid glands. *J Endocrinol Invest*, 11:165-169, 1988.
8. Oda Y, Tajima K, Mori-Tanaka M, et al. α₁-Adrenergic regulation of thyrotropin-stimulated release of 3,5, 3'-triiodothyronine and thyroxine from perfused mouse thyroid. *J Endocrinol Invest*, 14:867-873, 1991.
9. Bjorkman U, Ekholm R. Accelerated exocytosis and H₂O₂ generation in isolated thyroid follicles enhance protein iodination. *Endocrinology*, 122:488-494, 1988.
10. Lippes HA, Spaulding SW. Peroxide formation and glucose oxidation in calf thyroid slices : Regulation by protein kinase-C and cytosolic free calcium. *Endocrinology*, 118:1306-1311, 1986.
11. Otani H, Otani H, Das DH. α₁-Adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in rat left ventricular papillary muscle. *Circ Res*, 62:8-17, 1988.
12. Kim SG, Chang SE, Kim JS. The involvement of protein kinase C in the inhibitory effect of methoxamine on the thyrotropin-induced release of thyroxine in mouse thyroid. *Korean J Vet Res*, 36:59, 1996(abstract).
13. Iwakura K, Hori M, Watanabe Y, et al. α₁-Adrenoceptor stimulation increases intracellular pH and Ca²⁺ in cardiomyocytes through Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Eur J Pharmacol*, 186:29-40, 1990.
14. Ollis CA, MacNeil S, Walker SW, et al. A possible role for calmodulin in human thyroid cell metabolism. *J Endocr*. 99:251-260, 1983.
15. Bone EA, Alling DW, Grollman EF. Norepinephrine and thyroid-stimulating hormone induce inositol phosphate accumulation in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 119:2193-2200, 1986.

16. Field JB, Ealey PA, Marshall NJ, *et al.* Thyroid stimulating hormone stimulates increase in inositol phosphate as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line. *Biochem J*, 247:519-524, 1987.
17. Rani CSS, Shilling WP, Field JB. Intracellular Ca^{2+} mobilization by thyrotropin, carbachol, and adenosine triphosphate in dog thyroid cells. *Endocrinology*, 125: 1889-1897, 1989.
18. Maayan ML, Volpert EM, From A. Acetylcholine and norepinephrine : Compared actions on thyroid metabolism. *Endocrinology*, 112:1358-1362, 1983.
19. Cochaux P, Van Sande J, Dumont JE. Negative control of norepinephrine on the thyroid cyclic AMP system. *Biochem Biophys Acta*, 721:39-46, 1982.
20. Sherwin JR, Mills I. Epinephrine inhibits thyrotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cat thyroid tissue. *Endocrinology*, 106:28-34, 1980.
21. Spaulding SW, Burrow GN. β -Adrenergic stimulation of cyclic AMP and protein kinase activity in the thyroid. *Nature*, 254:347-349, 1975.
22. Corda D, Kohn LD. Phorbol myristate acetate inhibits α_1 -adrenergically but not thyrotropin-regulated functions in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology*, 120: 1152-1160, 1987.
23. Berman MI, Jerdack G, Thomas Jr CG, *et al.* α -Adrenergic regulation of TSH-stimulated cyclic AMP accumulation in rat thyroid cells. *Arch Biochem Biophys*, 53:249-256, 1986.
24. Mills I, Sherwin JR. A comparison of the mechanism of α -adrenergic inhibition of thyrotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate in cat, rat, mouse, hamster, beef, and pig tissues with the stimulatory effect of epinephrine on beef thyroid iodination : Evidence for multiple, species-specific adrenergic mechanisms. *Endocrinology*, 116:1310-1315, 1985.
25. Unger J, Ketelbant P, Ermeux C, *et al.* Mechanism of cholinergic inhibition of dog thyroid secretion *in vitro*. *Endocrinology*, 114:1266-1271, 1984.
26. Graff I, Mockel J, Laurent E, *et al.* Carbachol and sodium fluoride, but not TSH, stimulate the generation of inositol phosphates in the dog thyroid. *FEBS Lett*, 210:204-210, 1987.
27. Berridge MG, Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315-321, 1984.
28. Joseph SK, Tomas AP, Williams RJ, *et al.* myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate : a second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{2+} in liver. *J Biol Chem*, 259:3077-3081, 1984.
29. Schulz I. Messenger role of calcium in function of pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*, 239:G335-G347, 1980.
30. Rani CSS, Boyd III AE, Field JB. Effects of acetylcholine, TSH and other stimulators on intracellular calcium concentration in dog thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 131:1041-1047, 1985.
31. Wacholtz-MC, Cragoe EJ Jr, Lipsky PE. Delineation of the role of a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in regulating intracellular Ca^{2+} in T cells. *Cell Immunol*, 147:95-109, 1993.
32. Lee YS, Sayeed MM, Wurster RD. Intracellular Ca^{2+} mediates the cytotoxicity induced by bepridil and benzamil in human brain tumor cells. *Cancer Lett*, 88:87-91, 1995.
33. Brown L, Cragoe EJ Jr, Abel KC, *et al.* Amiloride analogues induce responses in isolated rat cardiovascular tissues by inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Nauyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 344:220-224, 1991.