

Mouse 갑상선에서 thyrotropin에 의한 thyroxine 유리에 미치는 methoxamine의 억제효과에 대한 protein kinase C의 관련

김 세 곤·김 진 상

전북대학교 수의과대학
(1998년 4월 12일 접수)

The involvement of protein kinase C in the inhibitory effect of methoxamine on the thyrotropin-induced release of thyroxine in mouse thyroid

Se-gon Kim, Jin-sang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Apr 12, 1998)

Abstract : There is evidence that the sympathetic nervous system exerts a control on thyroid function via an adrenergic innervation of thyroid cells. Although it is clear that the inhibitory effects of catecholamines result from an activation of α_1 -adrenoceptors, the mechanisms involved in α_1 -stimulation are not fully understood. The effects of methoxamine and protein kinase C (PKC) activator on the release of thyroxine (T_4) from mouse thyroid were studied to clarify the role of PKC in the regulation of T_4 release *in vitro*. The glands were incubated in the medium, samples of the medium were assayed for T_4 by EIA kits.

Methoxamine inhibited the TSH-stimulated T_4 release. This inhibition was reversed by prazosin, an α_1 -adrenergic antagonist. Furthermore, the inhibitory effect of methoxamine on the T_4 release stimulated by TSH was prevented by chloroethylclonidine, an α_{1b} -adrenoceptor antagonist, but not by WB4101, an α_{1a} -adrenoceptor antagonist. Also methoxamine inhibited the forskolin-, cAMP- or IBMX-stimulated T_4 release. These inhibition were reversed by PKC inhibitors, such as staurosporine and H₇. PMA, a PKC activator, completely inhibited the TSH-stimulated T_4 release, and its inhibition was reversed by staurosporine and H₇, but not by chelerythrine. R59022 (a diacylglycerol kinase inhibitor), like methoxamine, also inhibited the TSH-stimulated T_4 release, and its inhibition was also reversed by staurosporine.

The present study suggests that methoxamine inhibition of T_4 release from mouse thyroid can

이 논문은 1998년도 전북대학교 부속 생체안전성연구소 학술연구비의 일부 지원으로 이루어졌다(CNU-BSRI, No. 98-07).

Address reprint requests to Dr. Jin-sang Kim, Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-576, Republic of Korea.

be induced by activation of the α_{1b} -adrenoceptors and that it is mediated through the α_1 -adrenoceptor-stimulated PKC formation.

Key words : α_1 -adrenoceptor, thyroxine, thyroid, protein kinase C, methoxamine.

서 론

갑상선에는 교감신경^{1,2}은 물론 부교감신경^{3,4}이 분포되어 TSH 작용 및 여러 신경전달물질에 의해 갑상선 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다^{5,6}. 이를 신경전달물질 중의 하나인 catecholamine은 갑상선 세포에서 α -adrenoceptor를 경유하여 iodide organification을 자극하고^{7,8} TSH에 의한 갑상선 호르몬 유리를 억제하며^{9,10} 갑상선 조직에서도 TSH에 의한 cAMP 축적효과를 억제하고¹¹, 이러한 억제적 효과가 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor를 경유한 결과라고 하였다^{6,10}. 최근 Oda *et al*¹²은 catecholamine에 의한 갑상선 세포내 Ca^{2+} 증가가 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리 억제기전이라고 밝히고 갑상선 조직 및 세포에서 Ca^{2+} ionophore(A23187)가 TSH에 의한 갑상선 유리를 억제한다는 결과^{13,14}를 뒷받침하였다.

한편 갑상선 뿐만 아니라 여러기관에서 α_1 -adrenoceptor를 자극하면 세포막 phospholipase C(PLC)의 활성화로 phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate(PIP₂)가 가수분해 된다. 그 결과 inositol triphosphate(IP3)와 diacylglycerol(DAG)이라는 두 2nd messenger가 활성화되어 이들 두 신호전달 매개체에 의해 각각 고유의 세포반응을 일으킨다¹⁵. 즉, IP₃는 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 직접 Ca^{2+} 을 유리시켜 세포내 free Ca^{2+} 수송계 등에 영향을 미친다¹⁶. 이들 역시 갑상선 기능조절에 관여하고 있는데^{17,18} TSH의 대부분의 효과는 cAMP를 경유한 결과이지만¹⁹ TSH는 PIP₂ 신호전달체계를 경유하여²⁰ 갑상선 호르몬 유리를 조절할 수 있다. Catecholamine 역시 PIP₂을 가수분해시켜 세포내 Ca^{2+} 를 증가시키는데²¹ 이 Ca^{2+} 증가로 인하여 갑상선 세포내 iodide 유리가 자극되고²² 갑상선 세포에 IP₃를 직접 투과시킬 때도 역시 Ca^{2+} 이 증가되어 갑상선 기능을 조절한다고 하였다²³. DAG 효과도 갑상선에서 나타나는데¹⁷ PIP₂ 가수분해에 의한 DAG 형성은 PKC를 활성

화시키며²⁴, IP₃처럼 DAG도 TSH에 의해 증가될 수 있으며²⁶ 이 DAG 증가에 의해 PKC가 활성화되어^{25,26} 세포내 Ca^{2+} 을 증가시킨다. 이러한 Ca^{2+} 증가는 갑상선 세포에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 PKC 활성화로 일어날 수 있기 때문에²⁷ PIP₂ 가수분해는 갑상선 호르몬 합성 및 유리에 결정적인 역할을 하는 것으로 추측된다²⁸.

그러나 α_1 -adrenoceptor 자극시 Ca^{2+} 증가는 갑상선 호르몬 유리를 억제하여 이 Ca^{2+} 억제기전에 관여하고 있음을 잘 알려져 있다. 이와같이 Ca^{2+} 증가는 호르몬 분비에 억제 역할이 있음을 잘 알려져 있으나 α_1 -adrenoceptor 자극시 어떠한 신호전달계를 경유한 Ca^{2+} 증가로 갑상선 호르몬 분비를 억제하는지는 정립되어 있지 않았다. 따라서 본 실험에서는 다음과 같은 α_1 -adrenoceptor 신호전달계에 의한 호르몬 유리 억제기전을 밝히고자 하였다. 그러나 두 신호전달매개체(IP₃와 DAG)가 모두 갑상선에서 Ca^{2+} 을 증가시킬 수 있기 때문에 이들중 어느 경로를 경유한 효과인가는 신호전달계에 있어서 매우 중요하지만 이에 대한 연구보고는 아직 없으므로 본 실험은 DAG 경로를 경유한 PKC 활성화와 갑상선 유리 억제효과와의 관계를 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물, 갑상선 분리 및 실험장치 : 전북대학교 실험동물센터로부터 수컷 mouse(ICR, 8~10주령, 체중 25~35g)를 공급받아 sodium pentobarbital(30mg/kg, IP)를 투여하여 마취한 후 갑상선을 적출하였다. 갑상선 조직을 순상시킬 수 있는 기구가 갑상선에 뒹지 않고, 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 배양시켰

다. 6시간동안 배양하면서 약물의 효과를 관찰하기 위해 지속적으로 O_2 와 CO_2 를 Maayan *et al*²⁹의 방법에 의하여 공급하였다. 즉, 시험관 마개(polyethylene)에 두개의 관(0.3mm)을 관통시켜 그중 하나는 끝이 시험관내 완충액 근처까지 삽입하여 완충액에 gas를 공급하였다. 또 다른 관은 짧게 하여 gas가 시험관 밖으로 배출되도록 하였다.

실험방법 : 한개의 시험관에 mouse 4수에서 적출한 갑상선(8 pieces, 후두와 기관 포함)을 넣고 1시간 30분동안 preincubation 시킴으로써 조직내 혈액 등을 제거하고 조직을 안정화시켰다. 그리고 microforceps을 이용하여 1ml의 완충액이 든 시험관에 갑상선 조직을 옮긴 후 1시간동안 배양하여 1ml의 배양액을 취하였다. 이를 대조액으로 하여 thyroxine(T_4) 측정에 사용하였고, 그후 TSH 또는 약물이 포함된 1ml의 완충액이 든 시험관에 매시간마다 갑상선 조직을 옮겨 반복적으로 1ml의 배양액을 취하여(결과 참조) -70°C 보관한 후 2일 이내에 효소면역 측정법(EIA)에 의하여 T_4 측정 kit(Roche, Swiss)를 사용하여 시료를 전처리한 후 Cobas Core(Roche, Swiss)를 이용하여 측정하였다. 이렇게 측정된 T_4 농도는 각 시간마다 한 시험관(8 pieces)에서 ng/ml(배양액)으로 표시하였다.

사용약물 : TSH, methoxamine(α_1 -agonist), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), phorbol 12, 13-dibutyrate(PDBu, 이상 PKC activator) 및 H₂(PKC inhibitor)은 Sigma Chemical Co.로부터 그리고 WB4101 (α_{1A} -antagonist), chloro-ethyl-clonidine dihydrochloride(CEC, α_{1B} -antagonist), staurosporine, chelerythrine(이상 PKC inhibitor), R59022(diacylglycerol kinase inhibitor), forskolin(adenylate cyclase activator), 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP sodium(membrane-permeable analog of cAMP) 및 IBMX(phosphodiesterase inhibitor)는 RBI로부터 구입하였다.

결 과

TSH의 T_4 유리에 미치는 methoxamine과 prazosin의 영향 : 각각의 시험관내(완충액 1ml)에서 1시간 30분 동안 preincubation하여 이는 버리고 다시 약물을 처치하지 않은 시험관내에서 1시간동안 배양하여 이를 대조군(그래프상에서 1시간)로 하였다. 이러한 대조군은 시험관마다 많은 T_4 의 차이(10~35ng/ml)를 보였다. 그후 각각의 약물은 TSH를 처치하기 1시간 전에 완충액내에 혼합

배양하여 검액(그래프상에서 2시간)을 취했으며, 3시간부터 5시간까지는 약물 또는 TSH가 혼합된 완충액내에서 배양한 후 검액을 취하여 T_4 를 측정하였다. Fig 1은 4회의 실험중 대표적인 한 결과이다. TSH나 약물을 투여하지 않을 경우 T_4 유리가 시간에 따라 경미하게 감소되었고, TSH(100pU/ml) 투여는 시간에 따라 현저하게 T_4 를 유리시켰다. 이러한 TSH에 의한 T_4 유리효과가 α_1 -adrenoceptor 선택적 효현제인 methoxamine($10^{-5}M$)에 의하여 억제되었다. 이러한 methoxamine의 억제효과가 α_1 -adrenoceptor 선택적 길항제인 prazosin ($3 \times 10^{-6}M$)에 의해 차단되어 α_1 -adrenoceptor의 활성에 의하여 TSH 유리가 억제됨을 알 수 있었다.

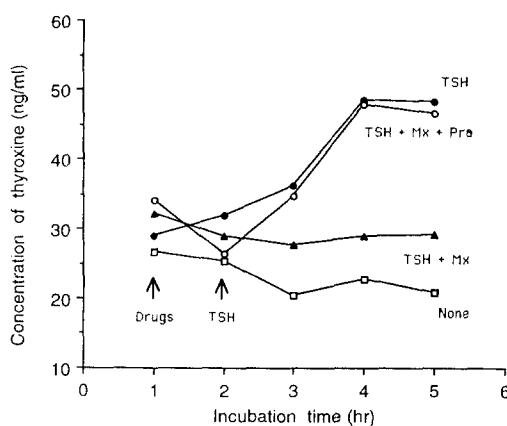


Fig 1. Effects of methoxamine(Mx) or/and prazosin(Pra) on the TSH-stimulated thyroxine(T_4) release in mouse thyroid gland. Mx and Pra were added in the buffer at the time indicated by the first arrow. After 1 hr of incubation, thyroid glands were stimulated by adding 100pU/ml TSH(second arrow). Samples were collected every 1 hr. This figure represents a typical experiment out of four each for the TSH stimulation in the absence(●) and presence of methoxamine, alone(▲) or with prazosin(○), and in the absence of TSH and drugs(□)

Methoxamine의 T_4 유리억제 효과에 미치는 α_{1A} - 및 α_{1B} -adrenoceptor 길항제의 영향 : Fig 1에서 methoxamine의 T_4 유리억제 효과 및 이 억제효과가 prazosin으로 차단됨으로써 T_4 유리억제 효과는 α_1 -adrenoceptor를 경유한 효과임을 알 수 있다. 최근 α_1 -adrenoceptor는 그 subtype로 α_{1A} -과 α_{1B} -adrenoceptor로 분류되었고 이에 대한 선택적인 길항제가 개발되어 본 실험에서 T_4 유리억제 효과가 수용체중 어느 subtype를 경유한 효과인가를

관찰하기 위해 α_{1A} -subtype 길항제인 WB4101과 α_{1B} -subtype 길항제인 CEC 존재하에서 methoxamine의 억제효과를 관찰한 3회의 실험중 대표적인 한 결과이다(Fig 2). TSH나 약물을 투여하지 않을 경우 T_4 유리가 시간에 따라 경미하게 감소되었고(Fig 1), CEC 및 WB4101 자체에 의해서 소량씩 감소되어(자료 미제시) 이를 약물의 직접적인 T_4 유리 억제효과가 있을 것으로 추정된다. WB4101($3 \times 10^{-5} M$) 존재하에서 methoxamine에 의한 억제효과는 차단되지 않았으나 CEC($3 \times 10^{-5} M$) 존재하에서는 methoxamine의 억제효과가 현저하게 차단되었다.

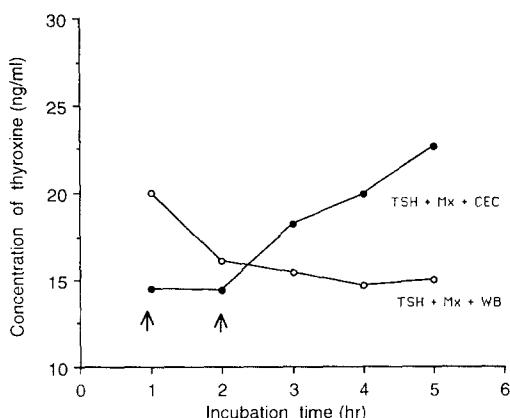


Fig 2. Effects of methoxamine(Mx) in the presence of selective α_1 -adrenoceptor antagonists(WB4101, CEC) on the TSH-stimulated T_4 release in mouse thyroid gland. Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1. This figure represents a typical experiment out of three each for the TSH stimulation in the presence of Mx and either CEC(●) or WB4101(○).

Methoxamine의 T_4 유리억제 효과에 미치는 PKC 억제제의 영향 : α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 신호전달경로는 IP_3 와 DAG 경로가 있다. 따라서 본 실험에서는 DAG 경로와의 관계를 규명하기 위해 PKC 억제제의 영향을 관찰하였다. PKC는 DAG에 의해 활성화되어 궁극적인 DAG의 생리적 반응을 나타낸다. Fig 3에서 보는 바와 같이 methoxamine이 T_4 유리억제 효과가 PKC 억제제인 H₇($5 \times 10^{-5} M$)과 chelerythrine($5 \times 10^{-5} M$)에 의해서는 차단되지 않았으나 PKC 억제제인 staurosporine($10^{-6} M$)에 의해서는 현저하게 차단되어 methoxamine의 유리 억제효과는 DAG 즉, PKC 활성화에 의한 결과임을 암시하고 있다.

TSH의 T_4 유리효과에 미치는 PKC 활성제 및 diacyl-

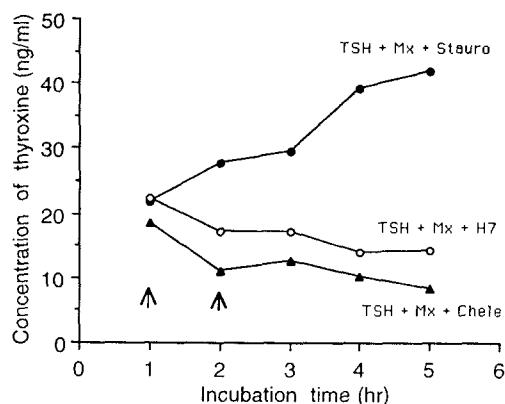


Fig 3. Effects of methoxamine(Mx) in the presence of PKC inhibitors(●, staurosporine; ○, H₇; ▲, chelerythrine) on the TSH-stimulated T_4 release in mouse thyroid gland. Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1.

glycerol kinase 억제제의 효과 : Fig 3에서와 같이 α_1 -adrenoceptor 자극시 T_4 유리 억제효과는 DAG 경로를 경유한 결과임을 추측하고 이를 확인하기 위하여 methoxamine 대신 직접 PKC를 활성화시키는 PMA와 PDBu의 효과를 관찰하였다. PMA($3 \times 10^{-6} M$)와 PDBu($3 \times 10^{-6} M$)은 TSH에 의한 T_4 유리효과를 현저히 억제하였다. 또한 세포내 DAG를 직접 증가시킬 수 있는 diacylglycerol kinase 억제제인 R59022($10^{-4} M$) 역시 TSH에 의한 T_4 유리효과를 차단하였다(Fig 4).

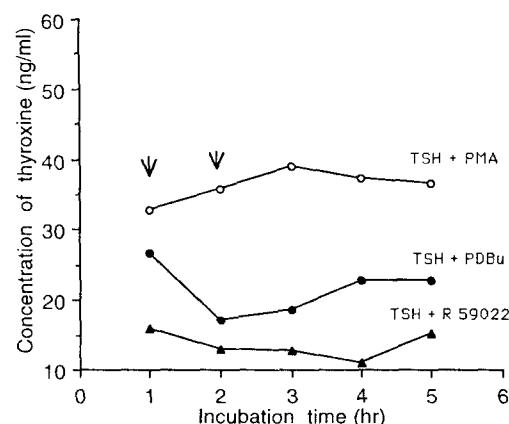


Fig 4. Effects of PKC activators(○, PMA; ●, PDBu) or diacylglycerol kinase inhibitor(▲, R59022) on the TSH-stimulated T_4 in mouse thyroid gland. Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1.

PKC 활성제와 R59022의 T₄ 유리억제 효과에 미치는 PKC 억제제의 영향 : Fig 4에서 PKC 활성제 및 직접적인 세포내 DAG 증가에 의해서 T₄ 유리가 억제됨을 관찰하였다. 이러한 효과 역시 PKC 억제제로 차단되는가를 확인하기 위해서 선택적인 PKC 억제제인 staurosporine (10^{-6} M) 존재하에서 PMA(3×10^{-6} M)와 R59022(10^{-4} M)의 영향을 관찰한 결과 staurosporine은 이들 효과를 차단하여 직접적인 PKC 활성 뿐만 아니라 DAG 증가로 인한 PKC 활성화가 TSH에 의한 T₄ 유리를 억제함을 알 수 있었다. 또한 R59022에 의한 억제효과는 H₇(5×10^{-5} M)에 의해 차단되었다(Fig 5).

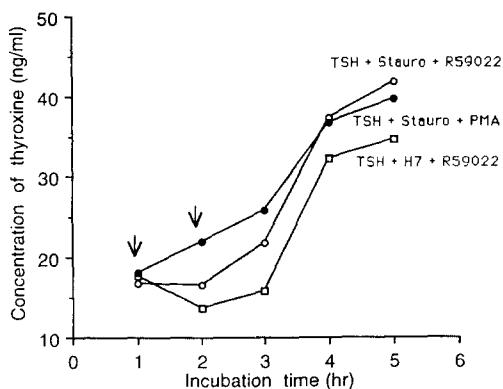


Fig 5. Effects of PKC inhibitors(● and ○, staurosporine; □, H₇) on diacylglycerol kinase inhibitor(□ and ○, R59022) or PKC activator(●, PMA) inhibition of TSH stimulation in mouse thyroid gland. Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1.

Forskolin의 T₄ 유리효과에 미치는 methoxamine 및 PKC 억제제(staurosporine, H₇)의 영향 : 이상의 결과에서는 TSH에 의한 T₄ 유리에 미치는 PKC 관련약물들의 영향을 관찰하였다. Fig 6, 7 및 8에서는 TSH 처럼 cAMP를 증가시키는 약물 또는 직접적으로 cAMP를 처리할 경우 T₄ 유리효과 및 PKC와의 관련성을 알 수 있는 추가적인 결과를 나타내고 있다. Adenylate cyclase를 직접 자극하는 forskolin은 세포내 cAMP를 증가시켜 T₄를 유리시킬 수 있다. Fig 6에서 보는 바와 같이 TSH 처럼 forskolin(3×10^{-5} M)도 T₄를 유리시켰고 이러한 유리효과가 역시 methoxamine에 의해서 억제되었다. 이와 같은 methoxamine에 의한 억제효과가 staurosporine과 H₇으로 차단되어 cAMP의 작용에 의한 T₄ 유리에 PKC가 관련되어 있음을 확인하였다.

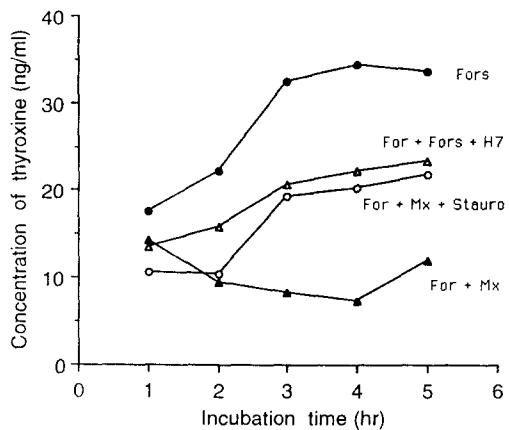


Fig 6. Inhibition of forskolin(adenylate cyclase activator, Fors)-stimulated T₄ release(●) by methoxamine(▲). Reversal by staurosporine(○) or H₇(△). Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1.

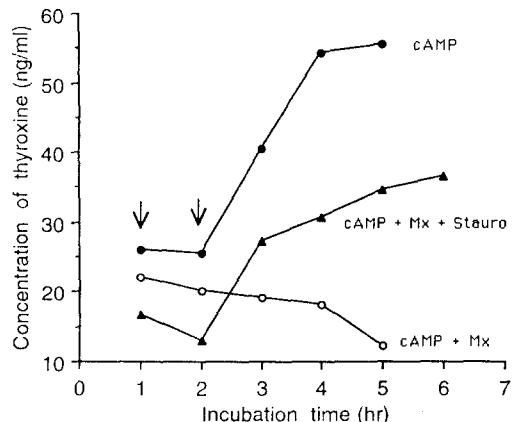


Fig 7. Inhibition of cAMP(membrane permeable analog of cAMP)-stimulated T₄ release(●) by methoxamine(○). Reversal by staurosporine(▲). Other experimental conditions were similar to those described in Fig 1.

cAMP의 T₄ 유리효과에 미치는 methoxamine 및 staurosporine의 영향 : 갑상선 세포에서 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 증가시킨다. 이 cAMP에 의해서 갑상선 호르몬이 분비된다. Fig 7은 TSH 대신 세포내 cAMP를 증가시키기 위하여 세포내로 직접 투과되는 cAMP를 처리한 결과이다. TSH에 의한 T₄ 유리효과처럼 cAMP(10^{-3} M)의 직접 투여 역시 현저한 T₄ 유리효과를 나타냈으며, 이와 같은 효과가 methoxamine에 의해 억제

되었다. 이와같은 억제효과가 staurosporine(10^{-6} M)에 의해 차단되었다. 따라서 PKC 활성에 의한 T_4 유리억제효과는 cAMP의 작용상에 영향을 미침으로써 일어남을 뒷받침하고 있다.

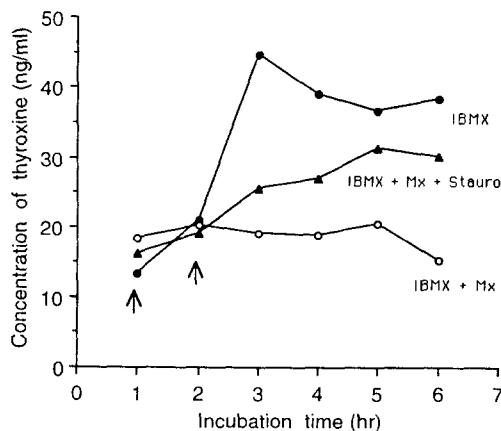


Fig 8. Inhibition of cAMP phosphodiesterase inhibitor(IBMX)-stimulated T_4 release(●) by methoxamine(○). Reversal by staurosporine(▲). This figure represents a typical experiment out of five each for the IBMX stimulation in the presence of methoxamine, alone or with staurosporine.

T_4 유리에 미치는 cAMP phosphodiesterase 억제제와 이에 대한 methoxamine의 영향 : 이상 실험결과에서는 신호전달계의 자극 및 직접적인 cAMP 투여에 의한 세포내 cAMP 증가로 T_4 유리효과를 관찰하였으며, 역시 IBMX도 cAMP를 증가시킬 수 있다³⁰. 세포내 cAMP의 불활성화를 억제함으로써 cAMP를 증가시키는 cAMP phosphodiesterase 억제제인 IBMX에 의해서도 상기한 TSH의 T_4 유리효과처럼 현저한 T_4 유리효과가 관찰되었고 이와같은 유리효과가 역시 methoxamine(10^{-5} M)에 의해서 억제되었다. 이 억제효과가 역시 staurosporine(10^{-6} M)에 의해 차단되었다(Fig 8). 이상의 결과에서 나타난 바와 같이 adenylate cyclase 활성화나 cAMP의 불활성화 억제에 의한 cAMP 증가 또는 직접 cAMP 처치시에도 α_1 -adrenoceptor 자극에 의해 T_4 유리가 억제되고 이 억제효과가 PKC 억제제로 차단되었다(Fig 6,7,8). 이들 결과에 의하면 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T_4 유리억제가 TSH에 의한 cAMP의 활성화 과정에 영향을 미친 결과가 아니고 cAMP의 작용에 영향을 미친 결과임을 알 수 있다.

고찰

갑상선에서 TSH에 의한 호르몬 분비조절은 대부분 adenylate cyclase 활성화에 의한 cAMP를 경유하지만¹⁹ 이 cAMP가 갑상선 세포내 모든 기능 및 신호전달계 조절의 매개체는 아니다^{8,20,31}. TSH에 의한 PIP₂ 가수분해로 생성되는 신호전달 매개체도 TSH의 생리적 기능에 중요한 역할²⁰은 물론 PIP₂ 가수분해 경로가 갑상선 호르몬 합성에 결정적인 역할을 한다²⁸. 즉, cAMP 이외에 PIP₂ 가수분해에 의한 IP₃와 DAG도 관여하고 있음을 의미한다^{26,32}. 그러나 TSH에 의한 PIP₂ 가수분해 효과는 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 효과보다 미약하다^{33,34}. 이와같이 갑상선 호르몬 분비조절에 두가지 다른 신호전달계(cAMP, PIP₂)가 있어서 갑상선 기능에 다양한 효과를 나타낼 수 있다. TSH에 의한 cAMP 증가로 갑상선 호르몬 분비의 증가가 일어남은 잘 알려져 있으나 PIP₂ 가수분해에 의한 IP₃와 DAG가 갑상선에서 어떠한 역할을 하는가는 잘 정립되어있지 않고 단지 TSH에 의한 PIP₂ 가수분해와 세포내 Ca²⁺ 증가²⁶가 cAMP에 비의존적으로 일어난다²⁰. 그런데 TSH에 의한 갑상선 호르몬 분비, cAMP 측정 및 adenylate cyclase 등은 교감 및 부교감신경계 약물에 의해 조절될 수 있다. Acetylcholine, carbachol, norepinephrine 및 methoxamine 등이 개와 mouse 갑상선에서 TSH에 의한 세포내 cAMP 측정에 대해서는 영향을 미치지 않지만^{5,6,8} TSH에 의한 T_4 유리를 억제하여²⁹ cholinergic 및 adrenergic 수용체 자극에 의한 갑상선 호르몬 분비 억제효과가 cAMP의 변동과 관계없이 일어남을 제시하였고^{6,10,12,36} norepinephrine에 의한 Ca²⁺ 변동이 iodide 유출과 병행되지만 세포내 cAMP 농도와는 관계가 없다고 하였다²². 또한 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 adenylate cyclase 활성도 억제(cAMP 농도감소)로 T_4 유리효과가 일어나지 않는다고 하였다⁶. 본 실험에서도 TSH에 의한 자극, adenylate cyclase 활성화, 세포내 cAMP의 직접적인 투과 및 cAMP 불활성화 억제로 인한 세포내 cAMP 증가시 일어나는 T_4 유리효과가 methoxamine에 의해 억제되었을 뿐만 아니라 이 억제효과가 PKC 억제제로 차단되었지만 adenylate cyclase 억제제에 의한 TSH의 T_4 유리 억제효과가 PKC 억제제로 차단되지 않았음을 α_1 -adrenoceptor를 경유한 T_4 유리 억제효과가 cAMP 농도나 합성과 무관하고 작용상에 α_1 -adrenoceptor가 관여하고 있음을 알 수 있

었다(Fig 6, 7, 8). 이와 대조적으로 개와 고양이의 갑상선 조직에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의해서 TSH에 의한 cAMP 증가효과가 억제되었고^{11,37}, carbachol도 catecholamine처럼 갑상선 호르몬 유리를 억제하는데 이 억제효과가 cAMP 축적을 억제하기 때문이라고 하였다³⁸. 그리고 muscarine성 및 α_1 -adrenoceptor 약물이 adenylate cyclase를 직접적으로 억제한다는 보고도 있고³⁹ 이러한 차이점은 잘 알려져 있지는 않지만 종종 따른 갑상선의 신경계 분포가 다르기 때문일 가능성도 있다^{6,40}. 따라서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T₄ 유리 억제와 cAMP 및 adenylate cyclase 활성도와의 관계는 또 다른 주요 연구방향으로 제시되어야 할 것이고, 본 연구는 T₄ 억제 경로에 대하여 중점을 두었다.

상기한 바와 같이 α_1 -adrenoceptor 자극은 TSH에 의한 T₄ 유리를 억제한다는 사실은 이전 많은 연구 보고자들에 의해 알려졌다^{6,10,12}. 본 실험결과에서도 α_1 -adrenoceptor 길항제인 prazosin으로 methoxamine에 의한 T₄ 유리 억제 효과가 차단됨으로써 T₄ 유리 억제효과가 α_1 -adrenoceptor 경유한 결과임을 확인할 수 있었다. 한편, α_1 -adrenoceptor 자극시 갑상선 호르몬 유리 억제기전으로서 갑상선 세포내 Ca²⁺이 증가된다고 많은 연구자들이 보고하였다. 이 두 매개체(IP₃와 DAG)에 의한 생리적 반응의 공통점은 갑상선 세포내 Ca²⁺의 증가로서 IP₃에 의한 Ca²⁺ 증가는 잘 알려져 있으나^{21,23,31,41} DAG에 의한 Ca²⁺ 증가현상은 아직 잘 알려져 있지 않다. 갑상선에서 세포내 Ca²⁺ 변동은 많은 반응을 나타내는데 특히 PI 가수분해 촉진^{18,23}, glucose oxidation 증가^{26,42}, iodine 축적, thyroglobulin의 유동, 단백질에 iodine 결합 및 H₂O₂ 생성증가^{26,42} 등 많은 효과를 나타낼 수 있다. 실제 A23187, carbachol 및 catecholamine에 의한 세포내 Ca²⁺ 증가는 갑상선 호르몬 분비를 억제할 수 있고^{6,10,43} catecholamine에 의한 이 Ca²⁺ 증가는 α_1 -adrenoceptor를 경유한 PIP₂의 가수분해 결과라고 하였다^{22,34}. 최근 Oda *et al*¹²도 mouse 갑상선에서 이 억제효과가 Ca²⁺ 의존적인 기전에 의함을 밝혔으나 이 Ca²⁺ 증가경로는 물론 PKC 활성도(DAG에 의한)와의 관계는 밝히지 못했다. IP₃를 경유한 세포내 Ca²⁺ 증가는 잘 알려져 있기 때문에 본 실험에서는 두 경로중 PKC를 활성화시켜 Ca²⁺을 증가시킬 수 있는 DAG 경로를 경유한 효과를 관찰하였다. α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T₄ 유리 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단됨을 관찰하여 PKC를 경유한 효과임을 추측하였으며, PKC

를 직접적으로 활성화시킬 수 있는 PMA와 PDBu를 투여한 결과 역시 methoxamine 효과와 유사하게 T₄ 유리가 억제되었고 이를 억제효과가 PKC 억제제로 차단됨을 확인할 수 있었다. 이를 더욱 검증하기 위하여 R59022 (diacylglycerol kinase inhibitor)라는 약물을 사용하였다. R59022는 세포내 DAG를 감소시키는 diacylglycerol kinase를 억제시켜 세포내 DAG를 증가시키는 약물로써⁴⁴ 갑상선에서 이 약물의 효과에 대한 보고는 없지만 본 실험에서 α_1 -adrenoceptor 자극 결과처럼 R59022도 직접적으로 T₄ 유리를 억제함을 알 수 있었다. 아울러 이 R59022에 의한 억제효과가 PKC 억제제로 차단되었다. 따라서 DAG 증가로 인해서 PKC가 활성화⁴⁵됨으로 PKC에 의존적인 세포내 Ca²⁺ 유리에 의하여 T₄ 유리가 억제됨을 추측할 수 있었다.

최근 α_1 -adrenoceptor가 기능적으로 α_{1A} -와 α_{1B} -subtype로 구분하였으며⁴⁶ 따라서 본 실험에서 methoxamine에 의한 T₄ 유리 억제효과에 대한 각각의 길항제의 영향을 관찰하였다. T₄ 유리 억제효과는 α_{1A} -길항제인 WB4101에 의해서는 차단되지 않았으나 α_{1B} -길항제인 CEC에 의해서 차단됨을 관찰하여 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T₄ 유리 억제효과는 α_{1B} -adrenoceptor를 경유한 PKC 활성화에 의함을 알 수 있었다. α_1 -Adrenoceptor를 경유한 갑상선 세포내 Ca²⁺ 증가는 T₄ 유리를 억제한다는 많은 연구보고를 근거로 세포내 저장소로부터 Ca²⁺을 유리시킬 수 있는 IP₃도 T₄를 억제할 가능성이 있지만 본 연구에서는 검토되지 못했다. 그러므로 갑상선 조절에 있어서 IP₃와 DAG의 작용기전, 이들 신호전달 매개체와 cAMP와의 관계는 물론 TSH에 의해 증가된 Ca²⁺과 PIP₂에 의해 증가된 Ca²⁺의 작용상 등의 차이점에 대해서 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 또한 TSH나 norepinephrine에 의한 PIP₂ 가수분해 촉진으로 IP₃와 DAG가 생성되고^{18,24},³² IP₃에 의한 Ca²⁺ 증가는 잘 알려져 있으나²³ 이때 Ca²⁺ 증가가 T₄ 유리에 어떠한 영향을 미치는가는 아직 잘 알려져 있지 않을 뿐만 아니라 DAG에 의한 PKC 활성화의 효과에 대해서도 잘 알려져 있지 않다. 단지 몇몇 단백질이 PKC에 의해서 인산화될 수 있다고 하였다¹⁷. 따라서 PKC 활성제와 억제제 또는 DAG 증가제로 T₄ 유리가 조절됨을 관찰하였음으로 α_1 -adrenoceptor 자극에 의한 T₄ 억제기전은 주로 PKC 활성화 경로임을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 갑상선에서 TSH에 의한 갑상선 기능조절에 있어서도 Ca²⁺의 역할이 중요하다고 할 수 있다.

결 론

갑상선 세포에 adrenergic 수용체가 분포되어 갑상선 기능은 교감신경에 의해 조절되어짐은 잘 알려져 있다. 비록 α_1 -adrenoceptors를 자극하는 catecholamine들은 갑상선에서 갑상선 호르몬 유리기능을 억제한다고 하였으나 그 작용기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 마우스 갑상선에서 methoxamine과 PKC 활성화가 갑상선 호르몬 유리를 미치는 영향을 관찰하여 갑상선 호르몬 조절에 관여하는 PKC의 역할을 명확히 하고자 본 연구를 실시하였다. 갑상선은 영양액내(37°C, pH 7.4)에서 배양하였고 효소면역 측정법에 의하여 배양액내 T₄를 측정하였다.

Methoxamine은 TSH 자극에 의한 T₄ 유리를 억제하였고, 이러한 억제효과는 α_1 -길항체인 prazosin에 의해 차단되었다. Methoxamine에 의한 T₄ 유리억제는 α_1 -adrenoceptor subtype 중 α_{1B} -길항체인 CEC에 의해서는 차단되었으나 α_{1A} -길항체인 WB4101에 의해서는 차단되지 않았다. 또한 methoxamine은 forskolin, cAMP 또는 IBMX 자극에 의한 T₄의 유리를 억제하였고, 이러한 효과는 PKC 억제제인 staurosporine 또는 H₂에 의해 차단되었다. 세포막을 통과할 수 있는 cAMP 및 phosphodiesterase 억제제인 IBMX는 T₄을 역시 유리시켰고, 이 유리효과가 methoxamine에 의하여 억제되었다. 이러한 유리 억제효과는 staurosporine에 의해 현저히 차단되었다. Diacylglycerol kinase 억제제인 R59022 역시 TSH 자극에 의한 T₄ 유리를 억제하였으며, 이러한 억제효과는 staurosporine 또는 H₂에 의해 차단되었다.

이상의 결과로 마우스 갑상선에서 methoxamine에 의한 α_1 -adrenoceptor 자극으로 갑상선 호르몬 유리 억제효과는 α_{1B} -adrenoceptor를 경유한 PKC 활성화에 기인한 결과임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Melander A, Ericson LE, Sundler F, et al. Sympathetic innervation of the mouse thyroid and its significance in the thyroid hormone secretion. *Endocrinology*, 94:959-966, 1974.
2. Tice LW, Creveling CR. Electron microscopic identification of adrenergic nerve endings on thyroid epithelial cells. *Endocrinology*, 97:1123-1129, 1975.
3. Van Sande J, Dumont JE, Melander A, et al. Presence and influence of cholinergic nerves in the human thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*, 51:500-502, 1980.
4. Melander A, Sundler F. Presence and influence of cholinergic nerves in the mouse thyroid. *Endocrinology*, 105:7-9, 1979.
5. Maayan ML, Volpert EM, From A. Acetylcholine and norepinephrine : Compared actions on thyroid metabolism. *Endocrinology*, 112:1358-1362, 1983.
6. Muraki T, Uzumaki H, Nakatake T, et al. Involvement of α_1 -adrenergic receptors in the inhibitory effect of catecholamine on the thyrotropin-induced release of thyroxine by the mouse thyroid. *Endocrinology*, 110:51-54, 1982.
7. Maayan ML, Ingbar SH. Effects of epinephrine on iodine and intermediary metabolism in isolated thyroid cells. *Endocrinology*, 87:588-595, 1970.
8. Maayan ML, Volpert EM, From A. Norepinephrine and thyrotropin effects on the thyroid *in vitro* : Simultaneous stimulation of iodide organification and antagonism of thyroxine release. *Endocrinology*, 109: 930-934, 1981.
9. Maayan ML, Debons AF, Volpert EM, et al. Catecholamine inhibition of thyrotropin-induced secretion of thyroxine : mediation by an α -adrenergic receptor. *Metabolism*, 26:473-475, 1977.
10. Maayan ML, Debons AF, Krimsky I, et al. Inhibition of thyrotropin- and dibutyryl cyclic AMP-induced secretion of thyroxine and triiodothyronine by catecholamines. *Endocrinology*, 101:284-291, 1977.
11. Yamashita K, Yamahita S, Ogata E. Regulation of cyclic AMP levels in canine thyroid slices by α -adrenergic action. *Life Sci*, 21:607-611, 1977.
12. Oda Y, Tajima K, Mori-Tanaka M, et al. α_1 -Adrenergic regulation of thyrotropin-stimulated release of 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine from perfused mouse thyroid. *J Endocrinol Invest*, 14:867-873, 1991.
13. 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. *Endocrinol Invest*, 11:165-169, 1988.
14. Van Sande J, Decoster C, Dumont JE. Effects of carbachol and inophore A23187 on cyclic 3',5'-AMP and cyclic 3',5'-GMP accumulation in dog thyroid slices. *Mol Cell Endocrinol*, 14:45-57, 1979
 15. Otani H, Otani H, Das DH. α_1 -adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in rat left ventricular papillary muscle. *Circ Res*, 62 : 8-17, 1988.
 16. Howe HH, Akhtar RA, Naderi S, et al. Correlative studies on the effect of carbachol on myo-inositol triphosphate accumulation, myosin light chain phosphorylation and contraction in sphincter smooth muscle of rabbit iris. *J Pharmacol Exp Ther*, 239:574-583, 1986.
 17. 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.
 18. Taguchi M, Field JB. Effects of thyroid-stimulating hormone, carbachol, norepinephrine, and adenosine 3', 5'-monophosphate on polyphosphatidyl inositol phosphate hydrolysis in dog thyroid slices. *Endocrinology*, 123:2019-2026, 1988.
 19. Dumont JE. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm*, 29:287-412, 1971.
 20. Scott TW, Freinkel N, Klein JH, et al. I. Metabolism of phospholipids, neutral lipids and carbohydrates in dispersed porcine thyroid cells : Comparative effect of thyrotropin and dibutyryl 3'5'-adenosine monophosphate on the turnover of phospholipids in isolated cells from pig thyroid. *Endocrinology*, 87:854-863, 1970.
 21. Philp NJ, Grollman EF. Thyrotropin and norepinephrine simulate the metabolism of phosphoinositides in FRTL-5 thyroid cells. *FEBS Lett*, 202:193-197, 1986.
 22. Corda D, Marcocci C, Kohn LD, et al. Association of the changes in cytosolic Ca^{2+} and iodide efflux induced by thyrotropin and by the stimulation of α_1 -adrenergic receptors in cultured rat thyroid cells. *J Biol Chem*, 260:9230-9236, 1985.
 23. Nakamura Y, Ohtaki S. Calcium release from porcine thyroid microsomes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-triphosphate. *Endocrinology*, 120:2302-2307, 1987.
 24. Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, et al. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun*, 91:1218-1224, 1979.
 25. Kuo JF, Anderson RGG, Wise BC, et al. Calcium-dependent protein kinase : Widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc Natl Acad Sci*, 77:7039-7043, 1980.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Raspe E, Dumont JE, Control of the dog thyrocyte plasma membrane iodide permeability by the Ca^{2+} -phosphatidylinositol and adenosine 3',5'-monophosphate cascades. *Endocrinology*, 135:986-995, 1994.
 29. Maayan ML, Sellitto RV, Volpert EM. Dopamine and L-dopa : Inhibition of thyrotropin-stimulated thyroidal thyroxine release. *Endocrinology*, 118:632-636, 1986.
 30. Mashita K, Kawamura S, Kishino B, et al. Effects of iodide and propylthiouracil on the release of 3,5,3'-triiodothyronine and of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate from perfused rat thyroids. *Endocrinology*, 110:1023-1029, 1982.
 31. Berridge MG, Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315-321, 1984.
 32. Igarashi Y, Kondo Y. Acute effect of thyrotropin on phosphatidylinositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid fol-

- icles. *Biochem Biophys Res Commun*, 97:759-765, 1980.
33. Michell RH, Kirk CJ. Studies of receptor-stimulated inositol lipid metabolism should focus upon measurements of inositol lipid breakdown. *Biochem J*, 198: 247-248, 1981.
 34. Bone EA, Alling DW, Grollman EF. Norepinephrine and thyroid-stimulating hormone induce inositol phosphate accumulation in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 119:2193-2200, 1986.
 35. 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.
 36. Unger J, Ketelbant P, Erneux C, et al. Mechanism of cholinergic inhibition of dog thyroid secretion *in vitro*. *Endocrinology*, 114:1266~1271, 1984.
 37. Sherwin JR, Mills I. Epinephrine inhibits thyrotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cat thyroid tissue. *Endocrinology*, 106:28-34, 1980.
 38. Miot F, Dumont JE, Erneux C. The involvement of a calmodulin-dependent phosphodiesterase in the negative control of carbamylcholine on cyclic AMP levels in dog thyroid slices. *FEBS Lett*, 151:273-276, 1983.
 39. Cochaux P, Van Sande J, Dumont JE. Negative control of norepinephrine on the thyroid cyclic AMP system. *Biochim Biophys Acta*, 721:39-46, 1982.
 40. 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.
 41. Joseph SK, Tomas AP, Williams RJ, et al. myo-Inositol 1,4,5-triphosphate : a second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{2+} in liver. *J Biol Chem*, 259:3077~3081, 1984.
 42. Bjorkman U, Ekholm R. Accelerated exocytosis and H_2O_2 generation in isolated thyroid follicles enhance protein iodination. *Endocrinology*, 122:488-494, 1988.
 43. Decoster C, Mockel J, Van Sande J, et al. The role of calcium and guanosine 3',5'-monophosphate in the action of acetylcholine on thyroid metabolism. *Eur J Biochem*, 104:199~208, 1980.
 44. Cockcroft S, Baldwin JM, Allan D. The Ca^{2+} -activated polyphosphoinositide phosphodiesterase of human and rabbit neutrophil membrane. *Biochem J*, 221:477-482, 1984.
 45. Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Sicence*, 225:1365-1370, 1984.
 46. Han C, Minneman KP. Interaction of subtype-selective antagonists with α_1 -adrenergic receptor binding sites in rat tissues. *Mol Pharmacol*, 40:531-538, 1991.