

기니픽 갑상선에서 Thyrotropin에 의한 thyroxine 유리에 대한 muscarinic 수용체 자극효과

김 흥 현 · 김 진 상

전북대학교 수의과대학
(1998년 12월 22일 접수)

Effects of muscarinic receptor stimulation on the thyrotropin- induced thyroxine release in the guinea pig thyroid

Hong-hyun Kim, Jin-shang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Dec 22, 1998)

Abstract : The present experiments were performed to examine the effects of acetylcholine (ACh) and carbachol (CC) on thyroxine (T_4) release and any possible relation between inhibition of T_4 release and signaling pathway in guinea pig thyroids. The thyroids were incubated in the medium containing the test agents, samples of the medium were assayed for T_4 by EIA kits. ACh and CC inhibited the TSH-stimulated T_4 release. These inhibition were reversed by atropine, but not by α -tubocurarine. The inhibitory effects of ACh on T_4 release were prevented by M_1 - and M_3 -muscarinic antagonists and its inhibition was also slightly reversed by M_2 - and M_4 -muscarinic antagonists. R59022, like ACh and CC, also inhibited the TSH-stimulated T_4 release. This inhibition was reversed by protein kinase C inhibitor and Ca^{2+} channel blocker. The present study suggests that cholinergic inhibition of T_4 release from thyroids can be induced mainly by activation of the M_1 - or M_3 -receptors and that it is mediated through the muscarinic receptor-stimulated protein kinase C activation.

Key words : muscarinic receptor, thyroxine, thyroid, protein kinase C, acetylcholine.

서 론

갑상선에는 부교감신경^{1,2}이 분포되어 부교감신경성 전달물질에 의해 갑상선 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다^{3,4}. 신경전달물질 중의 하나인 acetylcholine (ACh)은 갑상선에서 muscarinic 수용체를 경유하여 cGMP를 감소^{5,6}시키고 iodide organification과 당산화를 자극^{5,7}하는 것으로 알려져 있으며 norepinephrine에 의한 갑상선 호르몬 유리 억제효과는 adrenergic 및 cholinergic 신경전달물질과 관련된다고 하였다³. 이러한 억제효과는 cAMP 축적의 억제⁸와 apical phagocytosis 억제⁴에 의한 결과로 보고되었다. 그러나 개 갑상선 세포에서 carbachol이 세포내 Ca²⁺을 증가시키고⁹ Ca²⁺ ionophore(A23187)가 thyroid stimulating hormone(TSH)에 의한 갑상선 유리를 억제하고^{5,10} Ca²⁺ 증가는 protein kinase C(PKC) 활성화에 기인한 것으로 밝혀졌다. 따라서 ACh는 어느 선택적 muscarinic 수용체를 자극하여 Ca²⁺을 증가시킴으로써 갑상선 호르몬 분비를 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

한편 갑상선 뿐만 아니라 여러 기관에서 신호전달물질 및 약물로 세포막 수용체를 자극하면 세포막 phospholipase C(PLC)가 활성화되어 phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate(PIP₂)가 가수분해 되어¹¹ 생성된 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)이 각각 고유의 세포반응을 일으킨다¹². 즉, IP₃는 세포내 Ca²⁺ 저장소로부터 직접 Ca²⁺을 유리시켜 세포내 Ca²⁺ 수용체 등에 영향을 미치며¹³ 갑상선 기능조절에 관여하고 있다^{12,14}. TSH는 주로 cAMP를 경유하여 효과를 나타내지만¹⁵ PIP₂ 신호전달체계를 경유하여¹⁶ 갑상선 호르몬 유리를 조절할 수 있다. Catecholamine 역시 PIP₂를 가수분해하여 세포내 Ca²⁺을 증가시킴으로써¹⁷ 갑상선 세포내 iodide 유리를 자극하며¹⁸ 갑상선 세포에 IP₃를 직접 투과시킬 때도 역시 Ca²⁺이 증가되어 갑상선 기능을 조절한다고 하였다¹⁹. PIP₂ 가수분해에 의하여 생성된 DAG는 PKC를 활성화시키며²⁰ IP₃와 같이 TSH에 의해 증가된다²¹. 이 DAG 증가는 PKC를 활성화시켜^{25,26} 세포내 Ca²⁺을 증가시킨다^{22,23}. 이러한 Ca²⁺ 증가는 갑상선 세포에서 muscarinic 수용체 자극에 의한 PIP₂ 가수분해로 일어날 수 있기 때문에²⁴ 이 가수분해는 갑상선 호르몬 합성 및 유리에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다²⁵.

갑상선 호르몬 유리가 Ca²⁺ 증가에 의해 억제된다고

알려져 있고 muscarinic 수용체 자극에 의해서도 억제된다는 몇몇 보고가 있으나 muscarinic 수용체 중 어떤 subtype을 경유하는지 이 수용체 자극시 어느 신호전달계를 경유하여 Ca²⁺을 증가시켜 호르몬 분비를 억제하는지는 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 기니피프 갑상선에서 호르몬 분비억제에 관련된 muscarinic 수용체의 subtype을 구분하고 이 신호전달계에 의한 호르몬 억제기전을 밝히고자 하였다. 특히 두 신호전달체(IP₃와 DAG)는 갑상선에서 Ca²⁺을 증가시키므로 M₁-과 M₃-muscarinic 수용체 자극시 DAG 경로를 경유한 PKC 활성화와 갑상선 유리 억제효과와의 관계를 중점적으로 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물, 갑상선 분리 및 장치 : 수컷 guinea pig(Hartley, 10~12주령, 체중 300~350g)를 pentobarbital sodium(30mg/kg)으로 마취한 후 갑상선을 적출하였다. 적출한 즉시 O₂와 CO₂가 포화된 Krebs-bicarbonate 완충액(118.05mM NaCl, 4.69mM KCl, 1.16mM MgCl₂, 5.5mM Glucose, 2.0 mM CaCl₂, 1.16mM NaH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 0.3% BSA, pH 7.3, 37°C)이 들어있는 시험관(14×40mm)에 넣어 shaking water bath(37°C, RPM 150)에서 배양시켰다. Maayan *et al*²⁶의 방법에 따라 5시간 동안 배양하면서 지속적으로 O₂와 CO₂를 공급하였다. 즉, 시험관 마개에 두개의 관(0.2mm)을 관통시켜 그 중 하나는 끝이 시험관내 완충액 근처까지 삽입하여 gas를 공급하고 다른 관으로는 배출되도록 하였다.

실험방법 : 한개의 시험관(완충액 1.5 ml)에 한마리 기니피프에서 적출한 갑상선(2 pieces)을 넣고 1시간 동안 preincubation 시켜 조직을 안정화시켰다. 다시 약물을 처리하지 않은 시험관내(완충액 1ml)에서 2시간 동안 배양하여 이 배양액내 T₄를 측정하여 대조치로 하였다. 그 후 약물 또는 TSH를 가한 완충액이 들어있는 시험관에 갑상선을 옮겨 다시 2시간 동안 배양한 후 검액을 취하여 T₄를 측정하고 이를 시험치로 하였다. 시료는 -20°C 보관한 후 T₄를 48시간 이내에 효소면역측정법에 의한 T₄ 측정 kit(Roche, Swiss)를 사용하여 Cobas Core(Roche, Swiss)로 측정하였다. 실험 후 주위조직을 제거하고 무게를 측정하였으며 측정된 T₄ 농도는 각 시료(1ml)에서 갑상선 무게 mg당 T₄ ng/(ng/mg)으로 계산하였고 대조치에 대한 시험치를 %로 표시하였다.

사용약물 : TSH, acetylcholine, carbachol, atropine, himbacine(M_2 -, M_4 -antagonist), nifedipine(Ca^{2+} channel blocker) 및 staurosporine(PKC inhibitor)은 Sigma Chemical Co.로부터 그리고 pirenzepine, telenzepine(이상 M_1 -antagonists), methoctramine(M_2 -antagonist), 4-DAMP(M_3 -antagonist), tropicamide(M_4 -antagonist) 및 R59022(diacylglycerol kinase inhibitor)은 RBI로부터 구입하였다.

결 과

ACh, carbachol 및 atropine이 TSH에 의한 T_4 유리에 미치는 영향 : Fig 1에서 보는 바와 같이 약물을 처치하지 않을 때 basal T_4 유리는 약간 감소하였고 acetylcholine(ACh, $5 \times 10^{-4}M$)과 carbachol(CC, $3 \times 10^{-4}M$)을 각각 단독 처리했을 때 basal T_4 유리는 약물을 처치하지 않았을 때보다 더 감소하여 ACh과 CC 자체에 의해서 T_4 유리가 경미하게 억제되었다. TSH($100\mu U/ml$)는 현저하게 T_4 를 유리시켰고 이러한 TSH에 의한 T_4 유리효과가 muscarinic 수용체 효현제인 ACh와 CC에 의하여 억제되었다. 이들 억제효과가 muscarinic 수용체 길항제인 atropine

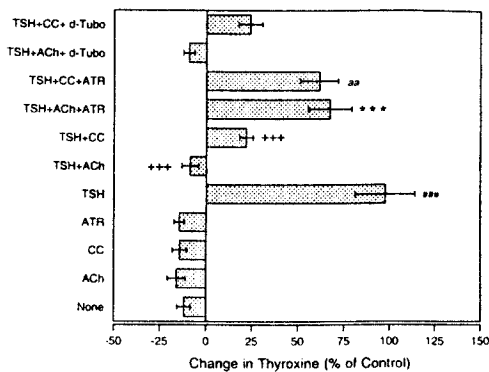


Fig 1. Inhibition by ACh(acetylcholine, $5 \times 10^{-4}M$) and CC (carbachol, $3 \times 10^{-4}M$) of the stimulation of T_4 release(percent of control) *in vitro* by TSH($100\mu U/ml$). Reversal by ATR (atropine, $5 \times 10^{-5}M$). Absence of reversal was seen with *d*-Tudo(*d*-tubocurarine, $10^{-5}M$). The preincubation time was 60 min. Thyroids were incubated with agonists and/or antagonists for 2hrs(control incubation; except None, ACh, CC, ATR and TSH), then incubated for a further 2hrs with TSH(test incubation). Each bar represents the mean \pm SEM of six to twelve vessels, each containing two thyroids preparation. ###, $p < 0.001$ vs. None; +++, $p < 0.001$ vs. TSH; ***, $p < 0.001$ vs. TSH+ACh; aa, $p < 0.005$ vs. TSH+CC.

(ATR, $5 \times 10^{-5}M$)에 의하여 차단되어 T_4 유리가 다소 증가하였으나 nicotinic 수용체 길항제인 *d*-tubocurarine(*d*-Tubo, $10^{-5}M$)에 의해 차단되지 않아 T_4 유리가 현저히 억제되었다.

M_2 - 및 M_4 -antagonist가 ACh에 의한 T_4 유리억제 효과에 미치는 영향 : Muscarinic 수용체는 M_1 - M_5 subtype로 구분할 수 있다. 따라서 cAMP를 감소시킬 수 있는 M_2 - 및 M_4 -수용체 자극억제에 의한 T_4 유리효과를 관찰하였다(Fig 2). TSH에 의한 T_4 유리가 ACh에 의하여 현저히 억제되었고 이러한 T_4 유리억제 효과가 M_2 - 및 M_4 -길항제인 himbacine(HIM, $3 \times 10^{-5}M$)에 의해 약간 차단되었고 역시 M_2 -길항제인 methoctramine(METH, $10^{-4}M$), M_4 -길항제인 tropicamide(TROPI, $6 \times 10^{-5}M$) 또는 HIM의 단독 혹은 혼합투여에 의해서 약간 차단되었다. 그러나 M_2 - 및 M_4 -길항제 혼합투여는 M_2 -길항제 단독투여와 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

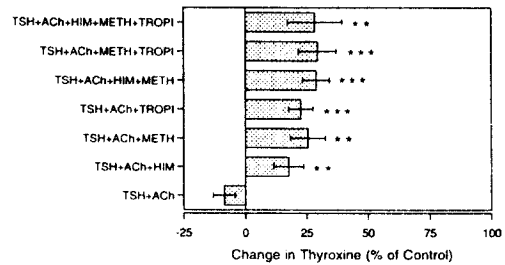


Fig 2. Effects of ACh($5 \times 10^{-4}M$) in the presence of selective M_2 - and M_4 -receptor antagonists(HIM, $3 \times 10^{-5}M$; METH, $10^{-4}M$; TROPI, $6 \times 10^{-5}M$) on the TSH-stimulated T_4 release by guinea pig thyroids. The mean \pm SEM of six to twelve vessels are shown, each containing two thyroids preparation. ** $p < 0.005$ vs. TSH+ACh; *** $p < 0.001$ vs. TSH+ACh.

M_1 및 M_3 길항제가 ACh에 의한 T_4 유리억제 효과에 미치는 영향 : PLC 활성화에 의한 IP_3 와 DAG를 활성화시킬 수 있는 경로는 M_1 -, M_3 - 및 M_5 -수용체 자극이다. 따라서 ACh의 T_4 억제효과에 대한 M_1 - 및 M_3 -길항제의 영향을 관찰하였다(Fig 3). TSH에 의한 T_4 유리효과가 ACh에 의해 현저히 억제되었으며 이 억제효과가 M_1 - 또는 M_3 -길항제인 pirenzepine(PIREN, $10^{-4}M$), telenzepine (TELEN, $10^{-4}M$) 및 4-DAMP($10^{-4}M$)의 단독 또는 복합투여에 의해서 TSH 단독처리 보다 현저히 차단되었다. 그러나 이들 길항제의 혼합투여에 의한 차단효과는 단독

투여와 차이는 없었다.

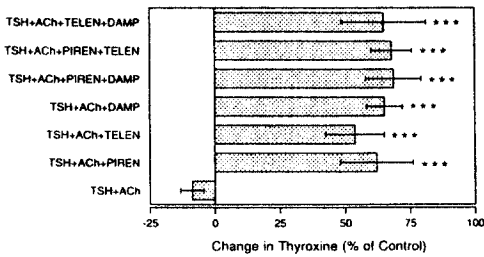


Fig 3. Effects of ACh($5 \times 10^{-4}M$) in the presence of selective M_1 - and M_3 -receptor antagonists(PRIEN, $10^{-6}M$; TELEN, 10^{-4} ; DAMP, 10^{-4}) on the TSH-stimulated T_4 release by guinea pig thyroids. The mean \pm SEM of six to twelve vessels are shown, each containing two thyroids preparation, ***, $p < 0.001$ vs. TSH+ACh.

PKC 억제제 및 Ca^{2+} 통로 차단제가 ACh와 CC에 의한 T_4 유리억제 효과에 미치는 영향 : Fig 2에서와 같이 ACh에 의한 T_4 유리억제 효과가 M_2 - 및 M_4 -길항제로 약간 차단되어 이 억제 효과가 M_2 - 및 M_4 -수용체를 경유한 효과임을 추측할 수 있었으나 그 효과가 M_1 - 및 M_3 -길항제에 의한 차단효과보다 경미하였다. Fig 3에서와 같이 ACh에 의한 T_4 유리억제 효과가 M_1 - 및 M_3 -길항제로 현저히 차단되어 이 억제효과가 주로 M_1 - 및 M_3 -수용체를 경유한 효과임을 추측하고 DAG의 활성화와 관련성을 확인하기 위해서 PKC 억제제인 staurosporine (STAURO)의 효과를 관찰하였다(Fig 4). ACh 또는 CC에 의한 T_4 유리억제 효과가 STAURO($10^{-6}M$)에 의해 현저히 차단되었

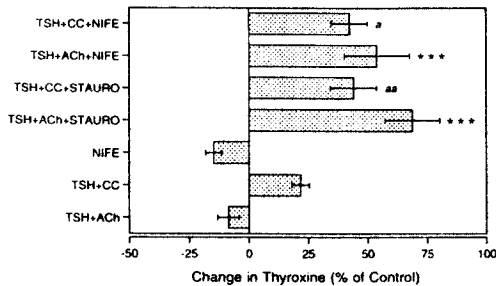


Fig 4. Reversal effects of PKC inhibitor(STAURO, $10^{-6}M$) and Ca^{2+} -channel blocker(NIFE, nifedipine, $2 \times 10^{-4}M$) on the ACh- or CC-induced inhibition of T_4 release. The mean \pm SEM of six to twelve vessels are shown. ***, $p < 0.001$ vs. TSH+ACh; aa, $p < 0.005$ vs. TSH+CC; a, $p < 0.05$ vs. TSH+CC.

다. PKC 활성화는 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키기 때문에 이 Ca^{2+} 증가에 의한 T_4 유리억제 효과가 일어날 수 있을 것으로 사료되어 Ca^{2+} channel 차단제인 nifedipine(NIFE, $2 \times 10^{-4}M$) 존재하에서 ACh의 T_4 유리억제 효과를 관찰한 결과 이 억제효과가 현저히 차단되었다.

Diacylglycerol kinase 억제제에 의한 T_4 유리억제 효과와 이에 대한 staurosporine 및 nifedipine의 영향 : Fig 4에서 ACh에 의한 T_4 유리억제 효과가 PKC를 경유한 Ca^{2+} 의 증가에 기인한 것인지 확인하기 위하여 DAG kinase 억제제의 영향과 이에 대한 차단효과를 관찰하였다. 세포내 DAG를 증가시킬 수 있는 DAG kinase 억제제인 R59022(DAG, $10^{-6}M$) 투여에 의해서도 ACh나 CC처럼 T_4 유리를 억제하였다(Fig 5). 이 억제효과는 staurosporine 이나 nifedipine에 의해 차단되었다.

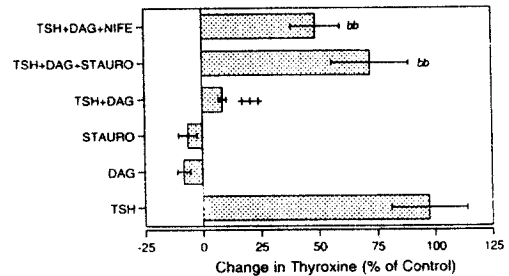


Fig 5. Effects of diacylglycerol kinase inhibitor(DAG, R59022, $10^{-6}M$) on the TSH-stimulation T_4 release by guinea pig thyroids. Reversal effects of PKC inhibitor(STAURO, $10^{-6}M$) and Ca^{2+} -channel blocker(NIFE, $2 \times 10^{-4}M$) on the DAG-induced inhibition of T_4 release. The mean \pm SEM of six to twelve vessels are shown. + + +, $p < 0.001$, vs. TSH; bb, $p < 0.005$ vs. TSH+DAG.

고 찰

ACh, carbachol, norepinephrine 및 methoxamine 등이 개⁴와 mouse^{3,27-29} 갑상선에서 TSH에 의한 세포내 cAMP 축적에 영향을 미치지 않지만 갑상선 호르몬 분비를 억제시킨다고 하였다^{3,4,27-29}. 또한 norepinephrine에 의한 Ca^{2+} 변동이 iodide 유출과 병행되지만 세포내 cAMP 농도와는 관계가 없다고 하였다¹⁸. 그러나 세포내 Ca^{2+} 를 증가시킬 수 있는 ACh도 catecholamine 처럼 갑상선 호르몬 유리를 억제하는데 이 억제효과는 cAMP 축적을 억제하거나⁸ muscarinic 및 α_1 -adrenergic 약물이 adenylate cy-

class를 직접적으로 억제한다는 상반된 보고도 있다³⁰. 이러한 차이점은 잘 알려져 있지는 않지만 종에 따른 갑상선의 신경계 분포가 다르기 때문일 가능성도 있다^{27,31}. 상기한 바와 같이 cholinergic 및 adrenergic 수용체 자극에 의한 갑상선 호르몬 분비억제기전은 잘 알려져 있지 않지만 세포내 Ca^{2+} 증가, cAMP 감소 또는 cGMP 증가에 의한 결과로 해석하고 있다. 본 실험결과에서도 muscarinic 수용체 길항제인 atropine으로 ACh 및 carbachol에 의해서 T_4 유리억제 효과가 차단되는 반면 nicotinic 수용체 길항제인 d-tubocurarine으로는 차단되지 않아 T_4 유리억제 효과가 muscarinic 수용체를 경유한 결과임을 확인할 수 있었다.

Muscarinic 수용체는 기능적으로 M_1 - M_5 으로 구분되어 있다. 이들 수용체의 subtype 별로 신호전달계를 요약하면 M_1 , M_3 - 및 M_5 -수용체는 IP_3 /DAG의 활성을 촉진하고 M_2 및 M_4 는 신호매개체인 cAMP의 활성을 억제함으로써 고유의 생리적 반응을 나타내는데 갑상선 호르몬 분비억제 효과가 어느 subtype를 경유하는지 그리고 어느 신호전달계를 경유하는지는 전혀 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서 ACh에 의한 T_4 유리억제 효과에 대한 각각의 길항제의 영향을 관찰하였다. T_4 유리억제 효과는 M_2 - 및 M_4 -길항제인 himbacine, methoctramine 및 tropicamide에 의해서 차단되었고 M_1 - 및 M_3 -길항제인 pirenzepine, telenzepine 및 DAMP에 의해서 현저히 차단됨을 관찰하여 muscarinic 수용체 자극에 의한 T_4 유리억제 효과는 M_1 - M_4 -수용체 모두 즉, cAMP 비활성화 및 IP_3 /DAG 활성화에 의한 결과임을 알 수 있었다. 본 연구에서 M_2 - 및 M_4 -수용체 길항제에 의한 차단효과는 M_1 - 및 M_3 -수용체 차단효과보다는 약 60% 미약했으나 cAMP를 활성을 억제하는 M_2 - 및 M_4 -수용체 자극에 의해서도 T_4 유리가 억제될 수 있음이 확인되어 추후 연구해야 할 것으로 생각된다. M_1 - 및 M_3 -수용체 자극에 의한 IP_3 /DAG 활성화 경로 중 세포내 Ca^{2+} 증가는 T_4 유리를 억제한다는 많은 연구보고에 의하면 세포내 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리시킬 수 있는 IP_3 도 T_4 를 억제할 가능성이 있지만 본 연구에서 DAG에 의한 PKC 활성화와 T_4 유리억제 기전을 연구하였다.

Muscarinic 수용체 및 α_1 -adrenoceptor 자극시 활성화되는 두 매개체(IP_3 와 DAG)에 의한 생리적 반응의 공통점은 갑상선 세포내 Ca^{2+} 의 증가인데 IP_3 에 의한 Ca^{2+} 증가는 잘 알려져 있으나^{11,17,19,31} DAG에 의한 Ca^{2+} 증가현상

은 아직 잘 알려져 있지 않았다. 최근 Oda *et al*²⁹은 mouse 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 자극으로 T_4 유리억제 효과가 Ca^{2+} 의존적인 기전에 의함을 밝혔으나 Ca^{2+} 증가경로는 물론 PKC 활성화(DAG에 의한)와의 관계는 밝히지 못했다. 본 실험에서는 두 경로 중 PKC를 활성화시켜 Ca^{2+} 을 증가시킬 수 있는 DAG 경로를 경유한 효과를 관찰하였다. Muscarinic 수용체 자극에 의한 T_4 유리억제 효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단됨을 관찰하여 PKC를 경유한 효과임을 추측하였으며 이를 확인하기 위하여 세포내 DAG를 감소시키는 diacylglycerol kinase를 억제시켜 세포내 DAG를 증가시키는 약물인 R59022(diacylglycerol kinase inhibitor)³²를 사용하였다. 갑상선에서 이 약물의 효과는 본 연구실에서도 보고³³한 바 있다. 본 실험에서도 muscarinic 수용체 자극 결과처럼 R59022도 직접적으로 T_4 유리를 억제함을 알 수 있었다. 또한 R59022에 의한 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단되었다. 따라서 DAG 증가에 의해서 PKC가 활성화³⁴됨으로 T_4 유리가 억제됨을 알 수 있었다. 이를 더욱 뒷받침 하는 결과로 ACh 및 DAG에 의한 T_4 유리억제 효과가 Ca^{2+} 통로차단제인 nifedipine에 의해서 차단되어 Ca^{2+} 에 의존적으로 T_4 유리가 조절될 수 있음을 들 수 있다.

TSH나 norepinephrine에 의한 PIP_2 가수분해 촉진으로 IP_3 와 DAG가 생성되고^{14,20,21} IP_3 에 의한 Ca^{2+} 증가는 잘 알려져 있으나¹⁹ 이때 Ca^{2+} 증가가 T_4 유리에 어떠한 영향을 미치는가는 아직 잘 알려져 있지 않을 뿐만 아니라 DAG에 의한 T_4 유리억제 효과에 대해서도 잘 알려져 있지 않다. 단지 몇몇 단백질이 PKC에 의해서 인산화될 수 있다고 하였다¹². 따라서 갑상선 호르몬 조절에 있어서 IP_3 와 DAG의 작용기전, 이들 신호전달 매개체와 cAMP와의 관계는 물론 TSH에 의해 증가된 Ca^{2+} 과 PIP_2 에 의해 증가된 Ca^{2+} 의 작용상 등의 차이점에 대해서 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 본 연구에서 기니피프 갑상선에서 PKC 활성화제와 억제제 또는 DAG 증가제로 T_4 유리가 뚜렷이 조절됨을 관찰하였으므로 muscarinic 수용체 자극에 의한 일부 T_4 억제기전은 PKC 활성화 경로임을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 갑상선에서 TSH에 의한 갑상선 기능조절에 있어서도 PKC 활성화에 의한 Ca^{2+} 역시 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

결 론

기니픽 갑상선에서 cholinergic 및 muscarinic 수용체 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리에 미치는 영향을 관찰하여 갑상선 호르몬 조절에 관여하는 muscarinic 수용체 subtype과 유리억제 경로를 밝히기 위해서 연구하였다. 적출한 갑상선은 2시간 동안 약물을 첨가한 영양액 내에서 배양하였고 영양액 내에 유리된 T_4 농도를 측정하였다.

ACh 및 CC는 TSH 자극에 의한 갑상선 호르몬 유리를 억제하였고 이러한 억제효과는 muscarinic 길항제인 atropine에 의해 차단되었으나 nicotinic 길항제인 d-tubocurarine에 의해서는 차단되지 않았다. 또한 ACh에 의한 갑상선 호르몬 유리억제는 M_1 -, M_3 -선택적 길항제에 의해서 차단되었고 M_2 -, M_4 -선택적 길항제에 의해서는 약간 차단되었다. 이들 ACh 및 CC에 의한 T_4 유리억제는 PKC 억제제인 staurosporine 이나 Ca^{2+} channel blocker인 nifedipine에 의해 차단되었다. Diacylglycerol kinase 억제제인 R 59022 역시 ACh나 CC처럼 TSH 자극에 의한 갑상선호르몬 유리를 현저히 억제하였으며 이러한 억제효과는 staurosporine 또는 nifedipine에 의해 차단되었다.

이상의 결과로 기니픽 갑상선에서 cholinergic 수용체 자극에 의한 갑상선호르몬 유리억제 효과는 주로 M_1 - 및 M_3 -수용체를 경유한 결과이고 이는 muscarinic 수용체 자극에 의한 PKC 활성화 경로를 경유한 Ca^{2+} 유입에 의한 결과임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Melander A, Sundler F. Presence and influence of cholinergic nerves in the mouse thyroid. *Endocrinology*, 105:7-9, 1979.
3. Maayan ML, Volpert EM, From A. Acetylcholine and norepinephrine: Compared actions on thyroid metabolism. *Endocrinology*, 112:1358-1362, 1983.
4. Unger J, Ketelbant P, Erneux C, et al. Mechanism of cholinergic inhibition of dog thyroid secretion *in vitro*. *Endocrinology*, 114:1266-1271, 1984.
5. Van Sande J, Decoster C, Dumont JE. Effects of carbamylcholine 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.
6. Yamashita K, Field JB. Elevation of cyclic guanosine 3',5'- monophosphate levels in dog thyroid slices caused by acetylcholine and sodium fluoride. *J Biol Chem*, 249:7062, 1972.
7. 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.
8. 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.
9. Raspe E, Roger PP, Dumont JE. Carbamylcholine, TRH, PGF_2 and fluoride enhance free Ca^{2+} and Ca^{2+} translocation in dog thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 141:569, 1986.
10. 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.
11. Berridge MG, Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315-321, 1984.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. Dumont JE. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm*, 29:287-412, 1971.
16. Scott TW, Freinkel N, Klein JH, *et al*. Metabolism of phospholipids, neutral lipids and carbohydrates in dispersed porcine thyroid cells: Comparative effect of thyrotropin and dibutyl 3',5'-adenosine monophosphate on the turnover of phospholipids in isolated cells from pig thyroid. *Endocrinology*, 87:854-863, 1970.
17. Philp NJ, Grollman EF. Thyrotropin and norepinephrine stimulate the metabolism of phosphoinositides in FRTL-5 thyroid cells. *FEBS Lett*, 202:193-197, 1986.
18. Corda D, Marocci 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.
19. 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.
20. 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.
21. Igarashi Y, Kondo Y. Acute effect of thyrotropin on phosphatidylinositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid follicles. *Biochem Biophys Res Commun*, 97:759-765, 1980.
22. 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.
23. Raspe E, Roger PP, Dumont JE. Carbacholamine, TRH, PGF_2 and fluoride enhance free intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} translocation in dog thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 141:569-577, 1986.
24. 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.
25. 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.
26. Maayan ML, Sellitto RV, Volpert EM. Dopamine and L-dopa: Inhibition of thyrotropin-stimulated thyroidal thyroxine release. *Endocrinology*, 118:632-636, 1986.
27. Muraki T, Uzumaki H, Nakatate 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.
28. Maayan ML, Debons AF, Krinsky I, *et al*. Inhibition of thyrotropin- and dibutyl cyclic AMP-induced secretion of thyroxine and triiodothyronine by catecholamines. *Endocrinology*, 101:284-291, 1977.
29. 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
30. Cochaux P, Van Sande J, Dumont JE. Negative control of norepinephrine on the thyroid cyclic AMP system. *Biochim Biophys Acta*, 721:39-46, 1982.
31. 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.
32. Cockcroft S, Baldwin JM, Allan D. The Ca^{2+} -activated polyphosphoinositide phosphodiesterase of human and rabbit neutrophil membrane. *Biochem J*, 221:477-482, 1984.
33. Kim SG, 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*, 38:508-517, 1998.
34. Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 225:1365-1370, 1984.