

인간의 갑상선 결절성 과증식증과 유두상 암종에서의 Endothelial Nitric Oxide의 발현

인하대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹⁾ 약리학교실²⁾
건국대학교 의과대학 이비인후과학교실³⁾

김영모¹⁾ · 조정일¹⁾ · 김용재¹⁾ · 양태용¹⁾ · 김대형¹⁾ · 박창신²⁾ · 한창준³⁾

= Abstract =

Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Benign Nodular Hyperplasia and Papillary Carcinoma of Human Thyroid Gland

Young-Mo Kim, M.D.,¹⁾ Jung-Il Cho, M.D.,¹⁾ Yong-Jai Kim, M.D.,¹⁾
Tae-Yong Yang, M.D.,¹⁾ Dae-Hyung Kim, M.D.,¹⁾
Chang-Sin Park, M.D.,²⁾ Chang-Jun Han, M.D.³⁾

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery¹⁾ and Pharmacology,²⁾
Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

Department of Otorhinolaryngology,³⁾ Kunkuk University College of Medicine, Seoul, Korea

Background and Objectives : Nitric oxide (NO) is generated in mammalian tissue by the conversion of L-arginine to L-citrulline. This reaction is catalyzed by nitric oxide synthase (NOS). NO is an important bioactive agent and a signalling molecule that mediates a variety of biologic actions such as vasodilation, neurotransmission, host defense, and iron metabolism but increased NO production may also contribute to the pathogenesis of a various of disorders, including cancer. Before now, the role of NO in thyroid gland is still investigated and it was supposed that NO mediate the angiogenesis in tumor growth. Others journal and works identified the expression of iNOS that involve by neutrophil and eNOS that involve in part in the vascular remodeling and to understand the role of NO in human thyroid gland. But authors revealed only eNOS in thyroid neoplasm. iNOS was identified by inflammation in fault.

Materials and Methods : Western blot analysis was performed, using a polyclonal antibody against eNOS (Rabbit polyclonal IgG). Using the same antibody, the distribution of eNOS was examined in 15 formalin-fixed paraffin embedded samples by immunohistochemistry. By NADPH consumption rate, NOS activity was estimated at nodular hyperplasia.

Results : Western blot analysis exhibited that eNOS was significantly elevated in thyroid papillary carcinoma, compared to that in nodular hyperplasia and normal tissue. Immunohistochemistry showed that the immunoreactivity was present more significantly in thyroid follicular epithelial cell layer than vascular endothelial cell. NOS activity increased in nodular hyperplasia.

Conclusions : Thyroid papillary cancer without neutrophil invasion expressed only eNOS. The endothelial localization of eNOS may play an important role in pathogenesis of human thyroid nodular hyperplasia and the follicular localization of thyroid papillary carcinomas.

KEY WORDS : Papillary cancer · Nodular goiter · Nitric oxide · Nitric oxide synthase.

서 론

Nitric Oxide(이하 NO)는 중요한 세포간 정보전달 물질 중 하나로서 신경계, 면역계, 심혈관계등 신체전반에 걸쳐 세포간 상호작용, 세포독성(cytotoxicity), 세포증식 억제성(cytostasis), 항상성 기전(homeostatic mechanism) 등에 관여하는 것으로 밝혀지고 있다¹⁾.

NO는 생물학적 매개체(biologic mediator)로서 강한 확산력을 가졌을 뿐 아니라 aqueous, hydrophobic environment에서 잘 녹으며 고형질의 조직을 통과할 수 있는 매개체이다. 또한 다른 세포간 신호전달 물질(messenger molecule)과는 달리 NO에는 특이한 세포 수용체가 없으며 그 대신 세포막을 통해 확산하여 세포내의 여러 단백질이나 DNA와의 반응을 통해 다양한 생물학적 현상을 유발한다²⁾.

NO는 여러 기관 또는 조직에서 병변의 매개체로, 또는 보호물질(protective agent)로 알려져 있다. 염증반응에 있어서 NO의 다양한 역할은 잘 알려져 있는 사실이지만 염증반응에서의 면역 매개체들과의 작용기전은 확실하게 알려져 있지 않다. 염증반응은 혈관이완(vasodilatation), 혈관외 유출(vascular leakage), 세포 부착(cell adhesion), 이동(migration), 세포 활성화(cellular activation), 조직 손상(tissue damage), 그리고 통증 등의 복잡한 요소들이 포함된 일련의 반응이며 NO가 이들의 과정에서 모두 다르게 작용한다.

최근 nitric oxide synthase(이하 NOS)가 인간의 종양 세포주(human tumor cell line)와 고형암 조직에서 발견되면서, 종양세포생존(tumor cell survival)과 병리에 중요한 여러 가지 병리 생태학적인 특성이 NO에 의해 매개 될 것으로 보고 있다^{3,4)}. 또한 종양의 혈류와 부종, 투과성 등에 NO의 역할이 밝혀지면서 암종의 발생과 성장 및 전이 등에 NO가 관여함이 알려지고 있다⁵⁻⁷⁾.

NOS는 크게 세가지 형태로 존재되는 것으로 알려져 있다. NOS I는 다른 말로는 ncNOS이라고도 하고 neurons에서 처음 발견되었고, NOS II는 iNOS로 cytokine-induced macrophages에서 주로 발견되었으며, NOS III는 ecNOS이라고도 하며 endothelial cell에서 주로 발견되었다.

현재까지 여러 가지 종양에 대해서 NO의 역할에 대한 많은 연구가 있어 왔지만 갑상선에 대한 연구는 많이 시행되지 않았다. 그러나 다른 연구 실험에서 NOS III가 갑상선 암종에서 가장 많이 증가되어 있고 면역 질환이나 갑상선 항진증등과 가장 관련이 깊은 것으로 보고되고 있다. 이에 양성 갑상선 종양인 결절성 과증식증(nodular hyperplasia 이하 NH)에서와 유두상 갑상선 종양(thyroid papillary carcinoma 이하 TPC)에서 혈관 증식 등의 중요한 역할을 하리라고 알려진 endothelial Nitric Oxide Synthase(이하

eNOS)의 발현에 대하여 연구하게 되었다. western blot을 이용하여 특이적 단백질의 정량 분석 및 발현을 확인하고 eNOS 면역 조직학적 염색을 통해서 조직 내 eNOS의 세포학적 분포를 알아보고자 하였다. 이를 토대로 갑상선 결절성 과증식증과 유두상 갑상선 암종의 carcinogenesis에 있어서의 eNOS와의 연관성과 NO의 역할을 알아보는 데 기초자료가 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

갑상선 결절성 과증식증(NH)으로 엽절제술(hemithyroidectomy) 아갑상선 절제술(subtotal thyroidectomy)을 시행 받은 4례의 nodular hyperplasia 조직과 4례의 갑상선 유두상 암종, 그리고 조직 검체 중 정상으로 판명된 갑상선 조직만을 이용하여 eNOS의 Western blot 분석에 이용하였다. 면역조직학적 염색은 정상 조직 7례와 결절성 과증식증(Nodular Hyperplasia) 4례, 갑상선 유두상피암종(thyroid papillary carcinoma) 4례 총 15례의 갑상선 조직에서 모두 시행하였다. 분자 생물학적 연구를 위한 조직은 수술시 적출 하자마자 액체 질소에 담귀 즉시 동결시킨 후 -80°C 에서 보관하였다.

2. 방 법

1) Western blot

Western blot를 이용한 단백질 정량분석은 조직내의 전체 단백질을 분리하기 위하여 320mM sucrose, 20mM HEPES, 1mM EDTA가 함유된 pH 7.2의 buffer에 1mM DTT, $10\mu\text{g/ml}$ 의 leupeptin, $10\mu\text{g/ml}$ 의 soybean-trypsin inhibitor, $2\mu\text{g/ml}$ 의 aprotinin이 함유된 용액을 제조하여 조직당 5ml(조직의 3~5배)씩 가하고 30초간 조직 파쇄(homogenizing) 시킨 후 $10\mu\text{g/ml}$ 의 PMSF(phenylmethylsulfonyl Fluoride) 1mM을 첨가하여 다시 한번 조직 파쇄시켰다.

각 조직은 10,000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 택하여 다시 100,000rpm에서 1시간 초고속 원심 분리하였다. 상층액인 세포질성 단백질 분획(cytosolic fraction)은 -80°C 에 보관하고 침전물은 다시 동일한 buffer를 첨가하여 100,000rpm에서 30분간 원심 분리하는 세척과정을 수행하였다.

침전물에 CHAPS($(3-[(3\text{-cholamicopropyl})\text{demethylaminonio}]-1\text{-propanesulfonate})$, Sigma.)가 포함된 동일한 buffer에서 조직 파쇄 한 뒤 20분간 rolling하고 100,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 particulated form으로 용해된 NOS 단백질이 포함된(예, eNOS) 상층액을 얻었다.

앞서 얻은 세포질성 단백질 분획과 함께 단백질 농도를 측정된 뒤 각각 10 μ g씩 SDS-PAGE(sodium Dodocyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)로 2시간 동안 전기 영동하였다. 그리고 단백질을 PVDF membrane (Bio-Rad, CA)에 transfer 한 후 (25V, 2시간) Tris-HCl (pH7.5), 10mMn(2M stock 5ml)과 NaCl 100mM(5M stock 20ml), 0.1% Tween 200ml, 증류수 976ml이 함유된 buffer로 세척하고 무지방 분유(nonfat-milk 2.5g, 5%)를 washing buffer 50ml에 녹여 제조한 차단용액에서 밤사이 동안 반응시켰다(4 $^{\circ}$ C). 반응 후 membrane은 각 NOS의 N-말단과 C-말단에서 고안된 1차 항체(NOS3 Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA)를 적절히 희석시켜 상온에서 1시간동안 반응시켰다. washing buffer로 세척 후 membrane을 alkaline phosphatase로 표지된 goat anti-rabbit IgG와 1시간동안 반응시킨 후 다시 washing buffer로 씻어주었다. 세포막을 ECL KIT로 처리한 후 eNOS에 해당하는 밴드를 확인하였다.

면역조직화학적 염색

포르말린에 고정하여 파라핀에 포매한 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 젤라틴(gelatin)으로 전처리한 슬라이드에 부착하여 38 $^{\circ}$ C의 열판에 24시간 동안 둔 후에 xylene과 alcohol로 탈파라핀 및 함수과정을 거쳤다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 3% H₂O₂에 15분간 처리하고 증류수로 수세한 후 0.5% Trion X-100에 5분간 반응시켰다. 30분간 normal goat serum을 처리한 뒤 phosphate buffered saline(이하 PBS)에 1 : 500배 희석한 1차 항체(NOS3 Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA)로 실온에서 각각 60분간 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 2차 항체인 biotinylate anti-rabbit immunoglobulin(vector, ABC kit, USA)을 가하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 수세하였고 다시 peroxidase-conjugated avidin-biotin-complex(Vector, ABC kit, USA)로 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 실온에서 발색시켰다. Meyer의 hematoxylin으로 대조염색을 하고 계열 에탄올(70%, 80%, 90%, 95%, 99%)로 탈수하고 xylene으로 투명화 과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경하에서 검정하였다.

단백질의 활성화 측정

검사한 단백질이 정말로 활성화상태인지 알아보는 검사로 NADPH consumption rate를 이용한 NOS activity의 측정하여 알아보았다. 증류수에 1mM KPO₄와 50mM KPO₄(PH 7.4 store at 4 $^{\circ}$ C)를 20 μ L넣고 250 μ M CaCl₂와 25

mM CaCl₂을 10 μ L을 넣어 37 $^{\circ}$ C까지 예열한 후 substrates로 2mM L-arginine(store at -20 $^{\circ}$ C) 10 μ L와 10mM NADPH(fresh store at -20 $^{\circ}$ C) 10 μ L을 넣고 cofactors로 100 μ M FMN(store at 4 $^{\circ}$ C, dark place) 10 μ L, 100 μ M FAD(store at 4 $^{\circ}$ C, dark place) 10 μ L, 1mM BH₄(store at 4 $^{\circ}$ C dark place) 10 μ L, 10 μ M CaM(store at 4 $^{\circ}$ C) 20 μ L를 넣고 반응을 유발시켰다. 측정된 dA/min값으로 NADPH의 소비율을 계산하였다.

결 과

Western Blot를 이용한 eNOS의 발현 확인은 cytosol과 membrane에서 정상조직과 결절성 과증식증 모두에서 eNOS가 검출되지 않았고 반면 소포체성 단백질 분획에서는 과증식증(NH)에서 125kDa의 eNOS가 정상 갑상선 조직보다 강하게 발현되었다. 유두상 암종(TPC)에서도 125kDa의 특이 단백질이 확연하게 관찰되었다(Fig. 1).

면역조직화학적 염색을 이용한 eNOS의 조직 내 분포를 알아보면 항 eNOS항체로 처리된 음성 대조군 및 결절성 과증식증(NH)과 갑상선 유두상 종양(TPC)의 모든 조직의 혈관 내피세포의 세포막을 따라 염색반응이 관찰되었다. 과증식증(NH)의 여포세포(follicular cell)에서 항 eNOS 항체에 대해 비교적 강한 염색반응을 보였으며, 정상조직의 여포세포에서는 전혀 관찰되지 않았으나 종양세포(TPC)의 세

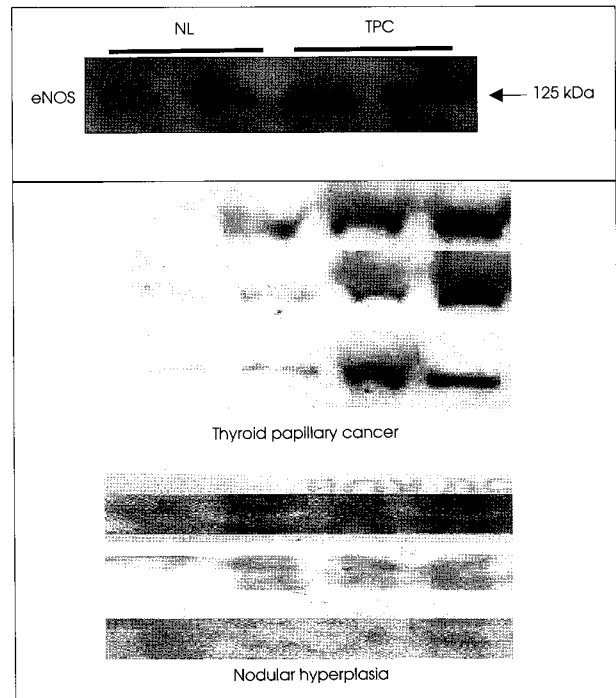


Fig. 1. Protein analysis by Western blot of eNOS. 125kDa of eNOS specific bands in microsomal fraction (Mic.eNOS) are detected not only in nodular hyperplasia but also in thyroid papillary carcinoma.

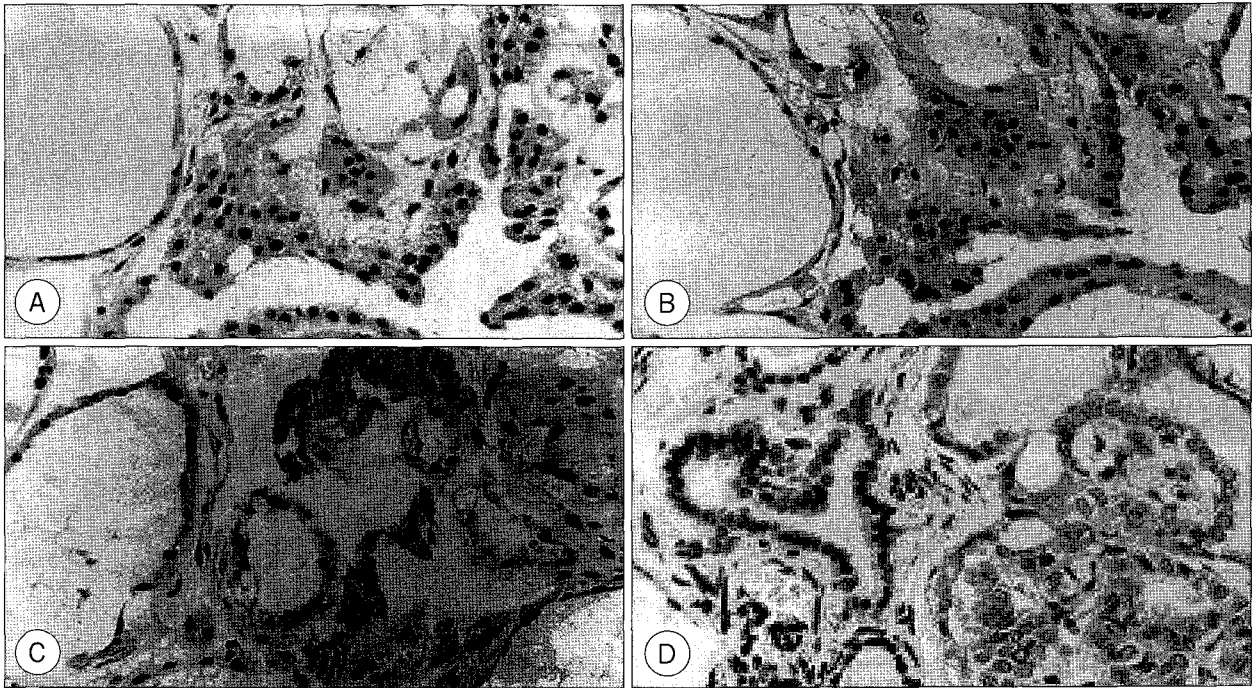


Fig. 2. Immunohistochemical stain with anti-eNOS antibody & anti-iNOS antibody ($\times 400$). Thyroid papillary ca by iNOS staining was nearly not different with normal thyroid tissue. A : normal thyroid, B : thyroid papillary cancer (eNOS stain) C : thyroid papillary ca (iNOS stain) D : nodular hyperplasia (eNOS stain).

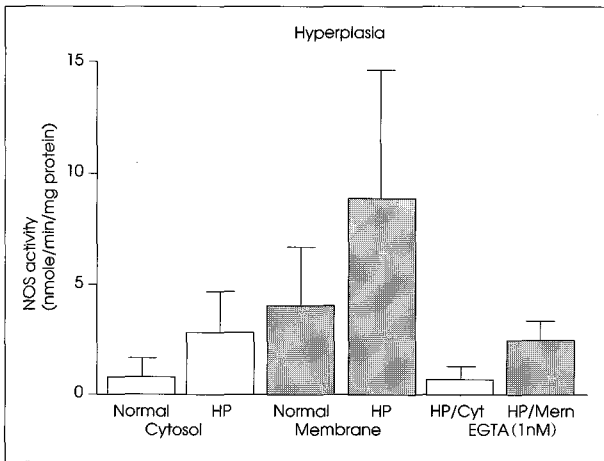


Fig. 3. NOS activity analysis at cytosol and membrane in normal thyroid gland and thyroid nodular hyperplasia. The activity of thyroid nodular hyperplasia was estimated highly in membranous portion but iNOS activity was not increased (HP : nodular hyperplasia, Cyt : cytosol, Mem : membrane).

포질에서는 강한 면역 반응을 보였으며 다른 조직에서도 이와 같은 양상은 거의 일관되게 관찰되었다(Fig. 2).

결절성 과증식증에서 증가된 eNOS의 기능이 정말로 정상보다 의미가 있는가 알아보기 위해 단백질의 활성화(enzyme activity) 검사를 시행하였다. 그 결과 단백질 활성화는 의미 있게 증가되었다(Fig. 3). 다른 논문이나 저널에서 측정된 iNOS는 neutrophil이 침범된 thyroid papillary cancer에서 증가하였다(Fig. 4).

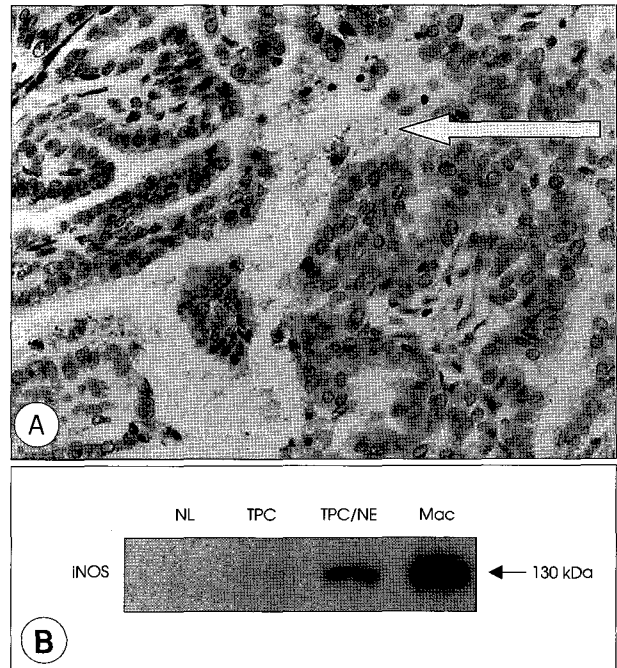


Fig. 4. A : Thyroid papillary cancer with neutrophil invasion was immunostained much by anti iNOS antibody. B : iNOS western blots show that 130kDa of iNOS specific bands are detected. Arrow shows the invasion of neutrophils (NL : normal, TPC : thyroid papillary Cancer, NE : neutrophil invasion, MAC : macrophage).

고 찰

Nitric Oxide Synthases(NOS)는 L-arginine를 NADPH

로 5단계의 oxidation에 의해 L-citrulline과 Nitric Oxide (NO)으로 만드는 복합적인 효소이다. 이것은 cytochrome P-450 reductase와 흡사하여 hemeprotein, FAD, FMN binding site를 가지고 있으며 그 생화학적 활성을 위하여 tetrahydrobiopterin(BH4)과 NADPH를 중요한 cofactor로서 사용하며 calmodulin을 필요로 한다.⁸⁾ NOS는 크게 세 가지 형태로 존재되는 것으로 알려져 있다. NOS I는 다른 말로는 ncNOS이라고도 하고 처음에는 neurons에서 발견되었고, NOS II는 iNOS로 cytokine-induced macrophages에서 주로 발견되었으며 NO와 같은 독성물질을 많이 생산해내며 antimicrobial, antiparasitic, and antineoplastic activity를 가지고 있고 인산화 뿐만 아니라 ubiquitination을 통해서 세포질내에 용해되어 존재하고 있고 Ca²⁺에는 비의존적인 것으로 알려져 있다⁹⁾. NOS III는 ecNOS이라고도 하며 endothelial cell에서 주로 발견되었고 Ca²⁺-activated enzymes으로, 혈관 이완이나 혈소판 응집뿐만 아니라 여러 생리적 역할을 담당하고 있다¹⁰⁾.

NOS의 발현은 여러 transcription단계에서 제어되고 있으며 발현의 일반성과 연속성은 아직도 논쟁의 여지가 남아 있다. NOS II induction은 transcriptional과 posttranscriptionally 작동하는 immunomodulatory compound에 의해 조절된다. 각각 ecNOS, ncNOS, iNOS가 chromosome 7, 12, 17에서 각각 발견되어진다¹¹⁾. NO의 생성량은 enzyme의 절대량과 enzyme의 activity, mRNA의 synthesis에 의해 결정된다.

혈관의 내피에 존재하는 eNOS에 의해 생성된 NO는 주변 평활근의 cGMP를 증가시켜 혈관벽을 이완시키고 혈압을 낮춘다¹²⁾. 중추 신경계의 nNOS에 의해 생성된 NO는 신경연접에서 역행성 신호전달자로 작용함으로써 강화기능(potentiation)과 기억(memory)에 관여한다¹³⁾. 또한 말초 신경계에서도 NANC(nonadrenergic noncholinergic) system에서의 신경전달물질의 하나로서 작용하기도 한다. 뿐만 아니라 정상적으로 작용하는 면역계에도 관여하여 비특이적 면역에서 NO는 종양과 세포내 기생충을 죽이는 세포독성 물질(cytotoxic molecule)로 작용하기도 한다¹⁴⁾¹⁵⁾.

암종의 생리에 있어서 NO의 역할은 아직 명확하지는 않지만 NO와 다른 oxygen radical들이 발암기전에 관여한다는 연구들이 있으며 이미 이전의 많은 연구들에서 고혈압과 종양세포주에서의 NOS 발현을 보고한 바 있다. 암종의 성장에 있어서 NO는 세포괴사와 종양세포 증식의 매개체로서 이중적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 대식구로부터 유리되는 NO는 종양세포에서 세포괴사를 촉진하는 것으로 알려져 있으며¹⁷⁾ 더 나아가서 iNOS유전자가 존재하는 종양세포에서 생산되는 NO는 그 자신의 괴사 뿐 아니라 주변의 종양세포 부착을 매개함으로써, 또는 혈관 투과성을

증진시킴으로써 원발성암종의 급속한 성장과 타부위로의 전파에 기여한다고 알려져 있다¹⁸⁾.

NO는 thyroid cell에서 iodide의 수송과 조직화를 방해하여 구조적인 모양의 변화를 가져온다¹⁹⁾. thyroid function의 제어에 NO가 주된 역할이다²¹⁾. NO는 thyroid peroxidase activity를 증가시켜 thyroid hormone의 생성을 증가시킨다²²⁾.

Grave's disease나 Hashimoto's thyroiditis에서는 NOS III의 gene 발현율이 다양하게 나타난다. 일반 사람의 human thyroid follicular cell에서 NOS III의 발현이 증가할수록 hyperthyroidism의 발현율이 증가되었다²³⁾.

NOS protein 발현과 subcellular localization은 immunohistochemistry로 확인하였을때, immunoreactivity는 vascular endothelial cell에서 주로 발견되어지나 follicular cell에서도 발견되어지기도 하였다²⁴⁾.

Colin등이 1995년에 발표한 논문에 의하면 NO의 과생산은 혈관투과성의 증진과 관련있다는 보고도 있는데 실제로 goiter를 형성한 동물에서 NOS inhibitor인 NAME(N-nitro-L-arginine-methyl-ester)를 이용하여 vascular change을 얻을 수 있었다²⁵⁾. NO는 vasoactive substance를 국소적으로 생산하고 thyroid vascularization을 바꾸는 것으로 추정된다.

악성 종양과 연관된 NO에 관한 연구는 다양한 암종에서 이루어졌는데 동일한 암종을 대상으로 한 연구에서도 NOS의 발현에 차이가 있으며 상충하는 부분이 많다.

본 연구는 거의 연구가 이루어지지 않은 갑상선의 양성 결절성 과증식증에서 NO를 생성하는 eNOS의 존재를 확인하고 암종에서 혈관증식에 대한 NO의 대해 추정해 보았다. 갑상선은 혈관조직이 매우 풍부한 기관으로 그레이브스병 등이 갑상선 기능 항진증 같은 경우 현저한 혈류 증가를 보인다. 갑상선 비대증의 경우에서도 갑상선의 여포세포의 증식뿐 아니라 혈관의 증식 또한 뚜렷하게 관찰된다²⁶⁾. 갑상선 비대증의 실험적 모델에서 보면 여포세포의 증식에 앞서 혈관 내피세포의 증식이 선행됨이 관찰되었고 이는 아마도 갑상선 증식에 있어서 혈관화가 중요한 역할을 할 것으로 추정된다²⁷⁾. NO는 국소적인 혈류 조절에 중요한 역할을 하는 물질이며 cGMP 축적과 관련하여 갑상선 세포의 신호전달 물질(signaling molecule)로 알려져 있다²⁸⁾. 인간에서 갑상선 기능에 따른 NO의 효과를 연구하였는데²⁹⁾ 기능항진증을 가진 갑상선 조직에서 eNOS mRNA의 발현이 정상 갑상선 기능을 가진 갑상선조직에 비해 약 1.6배 증가함을 보고하여 갑상선의 호르몬 분비기능이 증가하였을 때의 eNOS관련 가능성을 시사하였다. 이들은 또 면역조직학적 염색에서 eNOS 항체에 대한 염색이 혈관내피세포 뿐 아니라 여포세포에서도 관찰되었으며 정상이거나 기능 저하증 조직에서보다 결절조직과 기능 항진증 조직에서 더 강하

게 관찰되었다³⁰⁾. 이는 NO가 혈관증식에 관여할 뿐 아니라 갑상선 세포의 기능과 증식에 있어 중요한 역할을 한다는 증거라고 추정하였다.

본 연구결과에서는 정상조직에 비해 결절성 과증식증과 유두상 암종에서 eNOS의 특이 단백질 증가되었고 혈관과 암종의 세포질에서 증가된 모습을 나타내었으며 단백질의 활성도도 증가하였다. 이러한 증가된 발현이 기존의 연구의 보고와 같이 비대증으로 성장하면서 혈관화와 혈관증식에 의해 eNOS가 발현될 것이라 추측할 수 있다. 면역조직학적 염색 결과 혈관내피세포에서는 정상에 비해 약간 증가된 염색반응을 보였고 오히려 정상에서는 발현되지 않았던 여포세포에서 강하게 염색반응을 보였다. NOS activity 결과 또한 constitutive form의 activity가 결절성 과증식증(NH)에서 더 높은 것으로 나타났다. 이를 통해 갑상선의 결절성 과증식증(NH)에서 증가된 eNOS의 발현이 갑상선 여포 세포의 증식이나 신생혈관 형성에 관여함을 추측할 수 있다.

결 론

연구 결과, 인간의 갑상선 결절성 과증식증(NH)에서 발생에 관여하는 것으로 추측되는 eNOS protein의 발현의 증가와 activity의 크기가 증가를 관찰할 수 있었다. 갑상선 유두상 암종(thyroid papillary carcinomas)에서도 western blot를 이용하여 eNOS의 특이 단백질이 암종 세포에 의미 있게 증가되었음을 확인하였다. 또한 면역조직학적 염색을 통해 정상에서는 혈관내피세포에만 미약한 염색반응을 보였는데 과증식증에서(NH)는 혈관내피세포와 여포세포에서도 염색반응을 보였고 갑상선 유두상 암종(TPC)의 암종 세포에 주로 분포 되어있는 것을 확인 할 수 있었다. 정상과 비교하여 증가된 과증식증(NH)에서의 NO를 생성시키는 eNOS protein은 단백질 활성화 역시 증가되어 있어 이를 통해 볼 때 follicular cell의 증식과 기능변화에 주로 관여하는 것으로 사료된다. 다른 연구의 iNOS의 증가는 본 연구결과로 볼 때 검체 선택의 bias가 있던 것으로 보여 지며 neutropil 침범이 없는 갑상선 유두상 암종(TPC)에서는 eNOS만이 증가되었다. eNOS의 증가를 증명함으로써 갑상선 질환을 진단할 수 있는 진단 적인 가치를 얻지는 못했지만, pathogenesis를 일반 적인 두경부 암종과 달리 풍부한 혈관세포의 돌연변이나 생성촉진 등에 의한 것으로 추측할 수 있었으며, 이러한 검사 결과는 향후 갑상선에 추가적인 병인 연구에 방향을 제시할 수 있을 것이다. 연구의 중간 단계로 발표된 이 결과는 좀 더 진행된 실험으로 의미 있는 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

중심 단어 : 유두상 암종 · 결절성 과증식증 · Nitric oxide · Nitric oxide synthase.

References

- 1) Robbins RA, Hamel FG, Floreani AA : Bovine bronchial cells metabolize L-arginine to L-citrulline : possible role of nitric oxide synthase. *Life Sci.* 1992 ; 52 : 709-716
- 2) Nathan C, Xie Q-W : Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 13725-13728
- 3) Leone AM, Palmer MJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S : Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem.* 1991 ; 266 : 23790-23795
- 4) Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR : Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 ; 88 : 2811-2814
- 5) Palmer RMJ : The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg.* 1993 ; 128 : 396-401
- 6) Kitano H, Kitanishi T, Nakanishi Y, Suzuki M, Takeuchi E, Yazawa Y, et al : Expression of inducible nitric oxide synthase in human thyroid papillary carcinomas. *Thyroid.* 1999 ; 9 (2) : 113-117
- 7) Amber IJ, Hibbs JB, Jr, Taintor RR, Vavrin Z : The L-arginine dependent effector mechanism is induced in murine adenocarcinoma cells by culture supernatant from cytotoxic activated macrophages. *J Leukocyte Biol.* 1988 ; 43 : 187-192.
- 8) Radomski MW, Jenkins DC, Holmes L, Moncada S : Human colorectal adenocarcinoma cells : differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res.* 1991 ; 51 : 6073-6078
- 9) Xie K, Fidler IJ : Induction of apoptosis in transformed fibroblasts can be mediated via endogenous and exogenous nitric oxide. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1993 ; 34 : 95
- 10) Andrade SP, Hart IR, Piper PJ : Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in turnout-associated neovascularization. *Br J Pharmacol.* 1992 ; 107 : 1092-1095
- 11) Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide : A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med.* 1989 ; 169 : 1543-1555
- 12) Palmer RMJ : The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg.* 1993 ; 128 : 396-401
- 13) Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE : Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991 ; 351 : 714-718
- 14) Busconi L, Michel T : Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem.* 1993 ; 268 : 8410-8413
- 15) Knowles RG, Moncada S : Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci.* 1992 ; 17 : 399-402
- 16) Sanders KM, Ward SM : Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic, neuro-transmission. *Am J Physiol.*

- 1992 ; 262 : 379
- 17) Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL : *Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxide from Larginine. J Immunol.* 1990 ; 144 : 2725
 - 18) Croen KD : *Evidence for an antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type I replication. J Clin Invest.* 1993 ; 91 : 2446-2452
 - 19) Vamvakas S, Schmidt HH : *Just say NO to cancer? J Natl Cancer Inst.* 1997 ; 89 : 406-407
 - 20) Cifone MG, Cironi L, Meccia MA : *Role of nitric oxide in cell-mediated tumor cytotoxicity. Adv Neuroimmunol.* 1995 ; 5 : 443-461
 - 21) Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Wang Y, Fidler IJ : *Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene. J Natl Cancer Inst.* 1997 ; 89 : 421-427
 - 22) Gavilanes J, Moro MA, Lizasoain I : *Nitric oxide synthase activity in human squamous cell carcinoma of the head and neck. Laryngoscope.* 1999 ; 109 : 148-152
 - 23) Petruzzelli GJ : *Tumor angiogenesis. Hend Neck.* 1996 ; 18 : 283-291
 - 24) Fukumura D, Yuan F, EnDo M, Jain RK : *Role of nitric oxide in tumor microcirculation : blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. Am J Pathol.* 1997 ; 150 : 713-725
 - 25) Vidal MJ, Zocchi MR, Poggi A, Pellegatta F, Chierchia SL : *Involvement of nitric oxide in tumor cell adhesion to cytokine-activated endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol.* 1992 ; 20 (suppl 12) : S155-s159
 - 26) Filep JG, Filep EF, Sirois P : *Nitric oxide modulates vascular permeability in the rat coronary circulation. Br J Pharmacol.* 1993 ; 108 : 323-326
 - 27) Doi K, Akaike T, Horie N : *Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. Cancer.* 1996 ; 77 : 1598-1604
 - 28) Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL : *Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; 92 : 4392-4396
 - 29) Colin IM, Nava E, Toussaint D, Maiter DM : *Expression of nitric oxide synthase isoforms in the thyroid gland : Evidence for a role of nitric oxide in vascular control during goiter formation. Endocrinology.* 1995 ; 136 : 5283-5290
 - 30) Danef JF, Ovaert C, Many MC : *Experimental goitrogenesis. Ann Endocrinol (Paris).* 1989 ; 50 : 1-15