

玄蔘이 甲狀腺機能亢進症 誘發 흰쥐의 遺傳子 發顯에 미치는 影響

김대복, 조충식, 김철중

대전대학교 한의과대학 신계내과학교실

Gene Expression of Hyperthyroid Rats treated by *Scrophularia buergeriana* Miquel

Dae-bok Kim, Chung-Sik Cho, Cheol-Jung Kim

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea.

ABSTRACT

Objective : The study was done to investigate *Scrophularia buergeriana* Miquel's effects in the genomic level, by measuring gene expression in hyperthyroid induced rats using cDNA microarray.

Methods : Spargue-Dawley rats were separated into three groups(each with 10 rats). Except normal group, the other two groups were treated with Sodium levothyroxine 160 μ g/kg/days for 5 days by oral administration.

After 2 hours of the last intake of Sodium levothyroxine on two experimental group , one group was treated *Scrophularia buergeriana* Miquel extract 1.0g/kg/days for 3 days. The other groups(normal group, administration group) was treated normal saline 1.0g/kg/days for 3 days.

Gene expression of hyperthyroid rats were measured after medication of solid extract of *Scrophularia buergeriana* Miquel with cDNA microarray.

Results : In thyroid tissue, the numbers of the genes showed over twice increase and decrease in the control group compared to the normal group were 296, in the *Scrophularia buergeriana* Miquel administration group compared to the normal group were 859 and in the hypothalamus, the numbers of the genes showed over twice increase and decrease in the control group compared to the normal group were 416, in the *Scrophularia buergeriana* Miquel administration group compared to the normal group were 391.

Conclusion : According to the above results, it is suggested that *Scrophularia buergeriana* Miquel suppress hyperthyroidism effectively and regulate the gene expression in the thyroid and brain.

Key words : Hyperthyroidism, *Scrophularia buergeriana* Miquel, Gene Expression

서 론

갑상선기능항진증은 갑상선 세포의 증식으로 인한 갑상선종의 생성 및 갑상선 호르몬의 과다생산에 의하여 갑상선중독 증상이 나타나는 일련의 증후군이다¹⁾.

조직의 성장과 성숙, 세포호흡과 전체 에너지 소비, 그리고 기초적인 모든 기질, 비타민, 호르몬의 교체에 영향을 주는 갑상선호르몬에 의한 유전자발현의 조절은 갑상선호르몬수용체(thyroid hormone receptors, TRs)에 의해 중재되며, 갑상선 기능은 상위 갑상선 및 갑상선 내에서 조절된다²⁾. 상위갑상선 조절의 매개체는 갑상선자극호르몬으로 갑상선의 비후 및 증식을 조절하며 티로글로불린을 비롯한 핵산과 단백질의 합성을 촉진시키고, 갑상선 내 유기적 요오드 양의 변화는 성장, 아미노산의 흡수, 당대사 및 핵산합성을 조절한다²⁾.

玄蔘은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속한 다년생 초본인 현삼(*Scrophularia buergeriana* Miquel)의 뿌리를 건조한 것으로 성미는 甘苦鹹하고 寒無毒하여 浮游하는 火를 억제하는 滋陰降火의 要藥이 되며 潤燥, 軟堅解毒의 효능이 있으므로 牡蠣, 浙貝母 등 軟堅散結藥과 배합하여 癭癰痰核을 치료하는데 사용된다^{3,4)}.

갑상선기능항진증은 한의학적으로 癭, 癭癰 등의 범위에 속하며⁵⁾ 濕痰, 瘀血, 肝火, 陰虛 등의 병리로 보아 滋陰降火, 活血化痰, 平肝潛陽 등의 치법을 사용한다⁶⁻⁹⁾.

최근에는 sodium levothyroxine으로 갑상선기능항진증을 유발한 흰쥐에 대해 玄蔘을 투여한 실험에서는 갑상선호르몬(T3, T4)을 유의성 있게 감소시킴이 보고 되었다¹⁰⁾.

DNA microarray법은 샘플에서 추출한 mRNA에서 역전사한 probe DNA를 고밀도로 배치한 후 형광색소로 표식한 표적 DNA와 상보적으로 결합시켜 probe 상에서 결합하고 있는 표식된 표적분자의 시그널을 측정하여, 결합하고 있는 probe 분자를 동정하는 방법으로¹¹⁾, 신약개발을 위한 타겟이 되는 유전자 분석, 새로운 질환형태의 분류 등 다양한 범위에 걸쳐 응용되고 있다¹²⁾.

이에 저자는 갑상선기능항진증에 실험적, 임상적으로 효과를 보이는 현삼의 작용기전을 밝히기 위하여 cDNA chip을 이용하여 관련 유전자의 발현 양상을 조사한 결과 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험약재

본 실험에 사용된 현삼은 현삼과에 속한 다년생 초본인 *Scrophularia buergeriana* Miquel의 뿌리를 건조한 것³⁾으로 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 것을 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 체중 180±20g의 Spargue-Dawley계 수컷흰쥐를 다물사이언스에서 공급받아 사용하였다. 사육환경은 멸균한 polycarbonate cage(대한실험동물)에 넣어 멸균한 시판 실험동물용 고형사료(삼양사료 Co., 조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.5%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상)를 물과 함께 충분히 공급하였고, 실험전에 실험실 환경(항온·항습조건 23±2℃, 50±10%)에서 4주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Human Cot-1 DNA, Superscript RT, nucleotides(Gibco-BRL, USA), Yeast tRNA, poly(A) RNA, Trisma base, Sodium chloride, Sodium dodesy sulfate(Sigma, USA), Oligo d(T)20(Bioneer, Korea), Cyanine-3, Cyanine-5(NEN, USA), RNA-zolB(Tel-test, USA), Microcon YM-30(Amicon, USA), PCR purification kit(Quiagen, Germany), RNasin(Promega, USA), 5K rat cDNA chip, hybridization chamber 및 GT rack(Genomic Tree Co. Inc., Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

玄蔘 200g을 한약추출기를 이용하여 2시간 동안 가열한 후 추출하여 얻은 여액을 여과하여 rotary vacuum evaporator(Büchi Co., Switzerland)에서 감압농축하였다. 이 농축액을 -85℃ deep freezer(Sanyo Co., Japan)에서 1시간 동안 방치하고 freeze dryer(EYELA Co., Japan)로 동결건조하여 건조분말 74.5g을 얻어 실험에 필요로 하는 농도로 생리식염수에 녹여 검액으로 사용하였다.

2) 갑상선기능항진증 유발 및 검액의 투여

흰쥐 10마리를 1군으로 하여 정상군(normal group), 대조군(control group), 현삼 1.0g/kg 투여군(HS)으로 나누었고, 갑상선기능항진증 유발은 정상군을 제외한 대조군과 실험군에 Sodium levothyroxine(썬지로이드, 부광약품(주)) 160 μ g/kg을 1일 1회 5일간 경구 투여 하여 갑상선기능항진증을 유발시켰다.

검액은 최종 갑상선기능항진증 유발약물인 Sodium levothyroxine 투여 2시간 후부터 실험군에 현삼 1.0g/kg 농도로 1일 1회 3일간 경구 투여하였고, 대조군과 정상군에는 동량의 생리식염수를 1일 1회 3일간 경구 투여 하였다.

3) cDNA microarray를 이용한 유전자 대량 해석

(1) 조직 및 혈액으로 부터 total RNA 추출

약물 투여를 마친 실험 동물은 ether 마취 후 기관지를 절개하여 갑상선 부위를 분리 적출 하였으며, 시상하부에서 뇌하수체에 이르는 부위는 우선 목을 절단한 뒤 좌우로 존재하는 골격을 잘라주고 두개골을 따라 절개하였다. 이후 두개골을 좌우로 젓혀 뇌를 완전히 노출 시킨 뒤 조심스럽게 대뇌를 제거 하고 중앙 뒷편에 존재하는 뇌 조직을 얻어 total RNA 분리에 사용하였다. 약물투여를 마친 실험동물은 ether 마취 후 심장천자를 하여 채혈을 하고 기관지에서 갑상선 부위를 분리하였다. Total RNA는 얻어진 두 조직을 RNazol B(Tel-test, TX) 1,000 μ l를 가하고 homogenizer를 이용하여 고루 파쇄한 다음 세포가 완전히 용해될 때까지 pipette를 이용하여 고루 섞어 주었다. 세포가 완전히 용해된 것을 확인하고 전체 부피에 1/10의 chloroform을 첨가하여 vortex로 강하게 15초간 혼합하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 13,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하고 동일 부피의 iso-amylalcohol을 첨가해 얼음에서 15분간 방치하여 RNA를 침전시켰다. 이를 다시 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고 70% 에탄올로 세척하여 건조한 후 20 μ l의 Diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리된 증류수에 녹여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(2) Probe의 fluorescence labelling

Total RNA 50 μ g에 2 μ l(μ g/ μ l)의 Oligo dT(5'-T VN-3')를 첨가하고 15.4 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였다. 이를 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성 후 얼음에서 냉각시켰다. 5 \times first-strand buffer 6 μ l, 0.1M

DTT 3 μ l과 unlabeled dNTPs 0.6 μ l를 첨가한 뒤, 정상군 RNA는 Cy3-dUTP(NEN, 1mM)를, 대조군 및 玄蔘투여군 RNA는 Cy5-dUTP(NEN, 1mM)를 각각 3 μ l씩 넣고 Superscript II(Gibo-BRL, 200unit/ μ l) enzyme을 2 μ l씩 첨가하였다. Quick spin down후 42 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 각각의 산물을 QIA quick PCR purification kit를 이용하여 최종 50 μ l로 2회 elution하였다.

(3) Blocking 및 DNA-chip hybridization

Probe hybridization하기 전 chip은 blocking solution(5X SSC, 0.1% 10mg/ml BSA)에서 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 blocking하고 증류수 2회, isopropanol에서 각각 1분간 세척하고 spin dry하였다.

Cyanine dye로 labelling 된 두 개의 probe를 섞은 다음 human Cot1 DNA 20 μ l, poly RNA 2 μ l과 yeast tRNA 2 μ l를 첨가하고 Microcon-30을 사용하여 12 μ l까지 부피를 줄여주었다. 여기에 20X SSC 15 μ l, 2% SDS 3 μ l와 formamide 30 μ l 첨가하여 60 μ l의 hybridization 용액을 제조하고 chip에 apply하기 전 100 $^{\circ}$ C에서 3분간하여 사용하였다.

GT hybridization chamberTM의 down reserve에 5X SSC을 spotting하여 hybridization 과정에서 hybridization 용액이 증발하는 것을 막아 주었다. Blocking을 끝낸 chip은 chamber의 중앙에 위치시키고 핀셋과 yellow tip을 이용하여 cover slip을 덮은 뒤 hybridization 용액을 틈 사이로 조심스럽게 주입하고 chamber의 뚜껑을 조립한 후 GT chamber stationTM에 얹어서 42 $^{\circ}$ C water bath에서 12시간 hybridization하였다.

(4) Stringency washing

Hybridization을 마친 chip은 low stringency solution(2X SSC, 0.1% SDS)과 high stringency solution(0.1X SSC, 0.1% SDS)으로 각각 4분간 세척한 뒤 0.1X SSC로 4분간 2회 세척하고 증류수로 1분간 3회 세척하고 spin dry하였다.

(5) Image scanning 및 data processing

Hybridization 과정을 마친 chip은 GenePix4000 B axon scanner를 사용하여 형광 이미지와 각 spot들의 Cy-5/Cy-3 값을 얻었다. 얻어진 결과는 stanford database(<http://genome-www5.stanford.edu>)와 연계하여 유전자의 기본정보를 얻었다. 유전자 발현의 유연관계는 Stanford Univ.에서 제공하는 cluster와 TreeView 프로그램을 이용하여 분석하였다.

성적

1. DNA chip을 통한 유전자 발현의 대량 분석

1) DNA chip hybridization과 data scanning

현삼의 투여에 의해 갑상선 조직과 시상하부 부위에서 변화하는 유전자 발현을 조사하기 위해 DNA chip 실험을 수행하였다. 현삼을 3일간 투여하고 혈액의 채취와 함께 갑상선 및 시상하부 부위 조직을 채취하였다. 이로부터 얻은 total RNA는 Cyanine 형광으로 표지하였으며, 형광의 비교는 각각 정상군과 대조군, 정상군과 현삼(1.0g/kg) 투여군의 set로 진행하였다. 각 실험에서 Cy-3와 Cy-5의 전체 형광량을 1로 회기하도록 전압을 조절하여 형광의 normalization을 수행하였다.

Fig. 1.과 Fig. 2.는 각각 갑상선에서 정상군과 대조군, 정상군과 현삼 투여군의 유전자 profile로, 뚜렷하게 감소하는 유전자(green)와 증가하는 유전자(red)가 구분됨을 볼 수 있으나, 대다수의 유전자(yellow)는 별다른 증감을 보이지 않았다.

Fig. 3.과 Fig. 4.는 각각 시상하부 부위의 정상군과 대조군, 정상군과 현삼 투여군의 유전자 profile로, 뚜렷하게 감소하는 유전자(green)와 증가하는 유전자(red)가 구분됨을 볼 수 있으나, 대다수의 유전자(yellow)는 별다른 증감을 보이지 않았다.

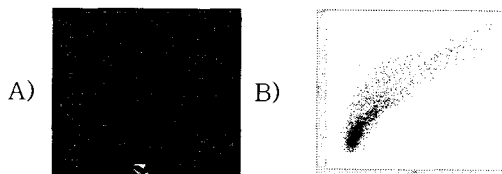


Fig. 1. Expression profiles in the thyroid tissue.

(A) : DNA chip scan images and it's scatter image.

(B) : Total RNA obtained from the normal tissue and levothyroxine treated group were labelled with Cy3-UDP, Cy-5-UDP, respectively.

HS : Treated with *Scrophularia buergeriana* Miquel.

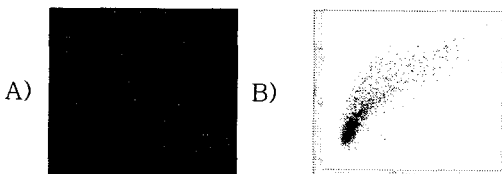


Fig. 2. Expression profiles in the thyroid tissue.

(A) : DNA chip scan images and it's scatter image.

(B) : Total RNA obtained from the normal tissue and

levothyroxine/HS treated group were labelled with Cy3-UDP, Cy-5-UDP, respectively.

HS : Treated with *Scrophularia buergeriana* Miquel.

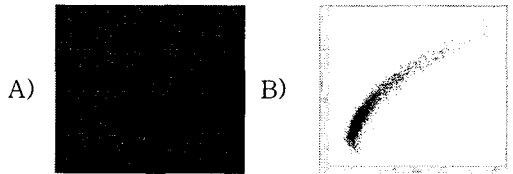


Fig. 3. Expression profiles in the hypothalamus region.

(A) : DNA chip scan images and it's scatter image.

(B) : Total RNA obtained from the normal tissue and levothyroxine treated group were labelled with Cy3-UDP, Cy-5-UDP, respectively.

HS : Treated with *Scrophularia buergeriana* Miquel.

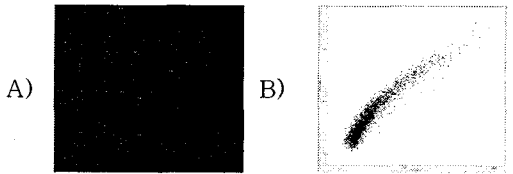


Fig. 4. Expression profiles in the hypothalamus region.

(A) : DNA chip scan images and it's scatter image.

(B) : Total RNA obtained from the normal tissue and levothyroxine/HS treated group were labelled with Cy3-UDP, Cy-5-UDP, respectively.

HS : Treated with *Scrophularia buergeriana* Miquel.

2) Chip Scan data로부터 유전자의 선별

(1) 갑상선과 시상하부 부위에서 유전자 발현의 변화

2배 이상의 증감을 보이는 유전자는 갑상선에서 정상군에 비해 대조군에서 총 296개, 정상군과 실험군간의 비교에서는 859개가 발견되었다. 또한 시상하부 부위에서는 정상군과 대조군 비교시 416개, 정상군과 실험군 비교시 391개가 발견되었다.

Table 1. Gene Expression in the Thyroid and Hypothalamus Region

Tissue	Experimental set	No. of 2X up & down
Thyroid	Control(Cy5)/Normal(Cy3)	296
	HS(Cy5)/Normal(Cy3)	859

Hypothalamus Region	Control(Cy5)/Normal(Cy3)	416
	HS(Cy5)/Normal(Cy3)	391

Normal : None treated group
 Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg

(2) 갑상선에서 현삼 투여에 의해 억제되는 유전자

대조군과 현삼 투여군에서 나온 결과를 상호 비교하여 일차적으로 2배 이상의 증감을 보이는 유전자 중에서 대조군에 비해 투여군에서 발현량이 감소한 유전자 그룹의 선별하였다. H2A histone family는 0.74배로 가장 많이 감소하였으며, synuclein은 0.76배, uPAR-2는 0.80배, cytochrome P-450은 0.81배, connexin은 0.82배의 감소를 보였다(Table 2).

Table 2. Down regulated Genes in the Thyroid Tissue

Gene name	Means of Median		Value*
	Control	HS	
	H2A histone family, member Y	3.164	
Rattus norvegicus synuclein 1 mRNA	4.198	3.193	0.761
R.norvegicus uPAR-2 mRNA for urinary plasminogen activator receptor 2	3.185	2.542	0.798
Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase mRNA	6.652	5.397	0.811
Rattus norvegicus connexin(CXN-311) gene	3.464	2.833	0.818
Rattus norvegicus mRNA for TESK1	2.613	2.208	0.845
Rattus norvegicus mRNA for synGAP-b1	5.429	4.598	0.847
Rat angiotensinogen(PAT) gene	2.803	2.660	0.949
Rat prolactin-like protein B mRNA	3.230	3.108	0.962
Rattus norvegicus low voltage-activated, T-type calcium channel alpha subunit(CACNA1G) mRNA	2.424	2.350	0.969
R.norvegicus mRNA for macrophage metalloelastase(MME)	3.281	3.247	0.990
Rattus norvegicus nucleoporin(Nup98) mRNA	2.827	2.799	0.990

Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg
 * : HS/Control

(3) 갑상선에서 현삼 투여에 의해 증가되는 유전자

대조군과 현삼 투여군에서 나온 결과를 상호 비

교하여 일차적으로 2배 이상의 증감을 보이는 유전자 중에서 대조군에 비해 현삼 투여군에서 발현량이 증가한 유전자 그룹의 선별하였다. GADD153은 8.76배로 가장 많이 증가하였으며, sex hormone binding globulin(androgen)은 3.32배, liver apolipoprotein A-I는 3.30배, ceruloplasmin(ferroxidase)은 3.05배, 그 외의 유전자들도 약 2배에서 3배 사이의 증가를 보였다(Table 3).

Table 3. Up regulated Genes in the Thyroid Tissue

Gene name	Means of Median		Value*
	Control	HS	
	Rattus norvegicus partial mRNA for CRM1	2.036	
R.norvegicus mRNA for muscle LIM protein	2.109	4.393	2.083
Rattus norvegicus mRNA for phospholipase	2.273	4.759	2.091
Rattus norvegicus kynurenine 3-hydroxylase mRNA	2.962	6.239	2.100
R.norvegicus mRNA for cytoplasmic dynein	3.302	7.01	2.125
R.norvegicus mRNA for G protein-coupled receptor kinase GRK6a	2.393	5.149	2.152
Unconventional myosin from rat 3	2.592	5.606	2.163
Rattus norvegicus G protein gamma subunit	3.909	8.568	2.192
Calcitonin/calcitonin-related polypeptid	2.611	5.735	2.190
Rat xanthine dehydrogenase mRNA	4.248	9.967	2.346
cytochrome P450, 2b19	3.311	7.821	2.362
Hypoxanthine phosphoribosyl transferase	2.731	6.716	2.459
Rattus norvegicus mRNA for R-ras GTPase	2.349	6.400	2.725
preproenkephalin 2	3.876	10.602	2.735
Rattus norvegicus homer-1c mRNA	2.225	6.241	2.805
Rattus norvegicus mRNA for ecto-ATPase	2.618	7.536	2.879
Rattus norvegicus vesicular GABA transporter(VGAT) mRNA	2.409	7.085	2.941
Ceruloplasmin(ferroxidase)	2.689	8.193	3.047
Rat liver apolipoprotein A-I mRNA(apoA-I)	3.517	11.566	3.290
Sex hormone binding globulin or androgen	2.350	7.795	3.317
Rattus norvegicus GADD153 mRNA	2.107	18.459	8.761

Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg
 * : HS/Control

(4) 뇌시상하부 부위에서 현삼 투여에 의해 감소되는 유전자

대조군과 투여군에서 나온 결과를 상호 비교하여 일차적으로 2배 이상의 증감을 보이는 유전자 중에서 대조군에 비해 투여군에서 발현량이 감소하는 유전자 그룹의 선별하였다. Cathepsin E는 0.77배로 가장 많이 감소하였으며, unc-50 related protein은 0.78배, DNA helicase는 0.81배, catalytic subunit of protein phosphatase 1은 0.82배, Arginosuccinate synthetase 1은 0.89배, TFIIA small subunit

는 0.90배, mitochondrial enoyl-CoA hydratase와 CD1 antigen precursor, 그리고 IFRD1(PC4)는 0.91배 정도 감소하였다(Table 4).

Table 4. Down Regulated Genes in the Hypothalamus Region

Gene name	Means of Median		Value*)
	Control	HS	
Cathepsin E, (two slightly different products(a and b))	2.753	2.125	0.772
Rattus norvegicus unc-50 related protein mRNA	3.727	2.920	0.783
Rattus norvegicus mRNA for DNA helicase	2.587	2.105	0.814
Rattus norvegicus mRNA for catalytic subunit of protein phosphatase 1	2.574	2.100	0.816
Arginosuccinate synthetase 1	2.266	2.024	0.893
Rattus norvegicus TFIIA small subunit mRNA	3.013	2.711	0.900
Rat mRNA for mitochondrial enoyl-CoA hydratase(EC 4.2.1.17)	2.503	2.267	0.906
Rattus norvegicus mRNA for CD1 antigen precursor	2.345	2.124	0.906
Rattus norvegicus IFRD1(PC4) mRNA, interferon related, developmental regulator, nerve growth factor-inducible	2.413	2.192	0.908
Rattus norvegicus phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA	2.273	2.075	0.913
Rattus norvegicus liver cytochrome c oxidase subunit VIII (COX-VIII) mRNA	2.314	2.123	0.917
Rattus norvegicus mRNA for AF-9	2.247	2.067	0.920
Cystatin C(cysteine proteinase inhibitor)	2.294	2.124	0.926
Bone morphogenetic protein 6	2.154	2.000	0.929
Murine leukemia viral(v-raf-1) oncogene homolog 1 (3611-MSV)	2.435	2.269	0.932
Rattus norvegicus mRNA for E-cadherin, c	2.167	2.036	0.940
Rat alternatively spliced mRNA	2.240	2.119	0.946
Delta - aminolevulinic acid dehydratase	2.239	2.122	0.948
Rattus norvegicus G protein beta1 subunit	2.233	2.128	0.953
Rat small nuclear ribonucleoparticle-associated protein (snRNP) mRNA	2.083	2.009	0.964
Rat mRNA for liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase	2.335	2.256	0.966
R.norvegicus mRNA for RT1.Mb	2.077	2.010	0.968
Collapsin response mediator protein 1	2.134	2.076	0.973
R.norvegicus mRNA for metallothionein-II	2.118	2.069	0.977

Rattus norvegicus transcription factor	2.271	2.237	0.985
Rattus norvegicus cathepsin S mRNA, compete	2.289	2.263	0.989
R.norvegicus(Sprague Dawley) ribosomal protein L15 mRNA	2.050	2.038	0.994
Rattus norvegicus liver cytochrome oxidase subunit VIc (COX-VIc) mRNA	2.073	2.062	0.995

Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg
 * : HS/Control

(5) 시상하부 부위에서 현삼 투여에 의해 증가되는 유전자

Fyn proto-oncogene의 경우 1.40배로 증가되었지만 감상선에서와 비교하여 뚜렷하게 나타나지는 않았다(Table 5).

Table 5. Up regulated Genes in the Hypothalamus Region

Gene name	Means of Median		Value*)
	Control	HS	
Nucleoplasmin-related protein(Nuclear protein B23)	2.010	2.014	1.002
ribosomal protein S26	2.213	2.220	1.003
Rat myogenin mRNA	2.071	2.085	1.007
Rat cytolysin mRNA	2.425	2.450	1.010
Rat mRNA for preoptic regulatory factor-1(PORF-1)	2.123	2.158	1.016
Lactate dehydrogenase B	2.098	2.150	1.025
Rattus norvegicus mRNA for BAT3	2.246	2.305	1.026
Adenomatosis polyposis coli S-antigen	2.023	2.095	1.036
2.065	2.151	1.042	
Rat submaxillary gland PS kallikrein mRNA	2.449	2.552	1.042
Rat cyclophilin mRNA	2.022	2.126	1.051
Rat mRNA for F1-ATPase alpha subunit(EC 3.6.1.34)	3.626	3.832	1.057
solute carrier family 16(monocarboxylic acid transporters)	2.180	2.310	1.060
Rattus norvegicus beta defensin-1(BD-1)mRNA	2.019	2.170	1.075
Rattus norvegicus vacuolar ATPase subunit F(vatf) mRNA	2.232	2.401	1.077
Rat transcriptional repressor of myelin-specific genes(SCIP) mRNA	2.145	2.333	1.088
Rat mRNA for adenylate kinase 2	2.203	2.464	1.118
Rattus norvegicus decidual prolactin-related protein mRNA	2.011	2.253	1.120

Rattus norvegicus thiol-specific antioxidant mRNA	2.055	2.305	1.124
Prostaglandin F receptor	2.106	2.372	1.126
Carnitine palmitoyltransferase 2	2.090	2.356	1.127
Rattus norvegicus placental lactogen-1 variant mRNA	2.154	2.458	1.141
Insulin-like growth factor 2 receptor	2.051	2.345	1.143
Rat rhoB gene mRNA	2.004	2.327	1.161
Rattus norvegicus protein tyrosine phosphatase D30 mRNA	2.027	2.464	1.216
glutathione S-transferase, pi 2	2.117	2.613	1.234
Rat mRNA for lactate dehydrogenase	2.016	2.514	1.247
Rattus norvegicus brain specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter mRNA	2.019	2.548	1.262
Fyn proto-oncogene	0.485	0.674	1.400

Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg
 * : HS/Control

(6) 갑상선에서 갑상선 기능과 관련된 유전자의 변화

Chromogranin B는 1.16 배, EST(Highly similar to TYPE III IODITHYR)는 3.48 배, EST(Highly similar to thyroid hormon)는 3.03배, parathyroid hormone-like peptide는 1.80배, parathyroid hormone/parathyroid related-peptide receptor는 1.75배, thyroid hormone responsive protein는 1.24배, thyroid transcription factor 1은 1.80배, thyrotropin releasing hormone receptor는 4.12배로 증가되었다(Table 6).

Table 6. Expression Changes of Genes related with Thyroid Function in the Thyroid Tissue

Gene name	Means of Median		Value *)
	Control	HS	
Chromogranin B, parathyroid secretory protein	2.13	2.48	1.164
EST, similar to TYPE III IODITHYR	0.85	2.96	3.482
ESTs, Highly similar to thyroid hormone receptor coactivating protein [H.sapiens]	0.66	2.00	3.030
Parathyroid hormone-like peptide	0.97	1.75	1.804
Rat parathyroid hormone/parathyroid hormone related-peptide receptor mRNA	0.08	0.14	1.750
Thyroid hormone responsive protein	0.93	1.15	1.237
Thyroid transcription factor 1 TTF-1 NK-2 (Drosophila) homolog A(thyroid nuclear factor)	2.17	3.89	1.793
Thyrotropin releasing hormone receptor	0.42	1.73	4.119

Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg
 * : HS/Control
 EST : Expressin Sequence Tag

(7) 시상하부 부위에서 갑상선 기능과 관련된 유전자의 변화

EST(highly similar to TYPE III IODITHYR)는 1.67배, parathyroid hormone-like peptide는 1.33 배, parathyroid hormone/parathyroid related-peptide receptor는 1.75배, thyroid hormone responsive protein은 1.07배 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 갑상선 조직과는 다르게 chromogranin B는 0.74배, thyroid transcription factor 1은 0.62배로 감소하였고, EST(Highly similar to thyroid hormone)는 검출되지 않았다(Table 7).

Table 7. Expression Changes of Genes related with Thyroid Function in the Hypothalamus Region

Gene name	Means of Median		Value *)
	Contro l	HS	
Chromogranin B, parathyroid secretory protein	1.67	1.24	0.743
EST, Highly similar to TYPE III IODITHYRONINE DEIODINASE	1.94	3.23	1.665
ESTs, Highly similar to thyroid hormone receptor coactivating protein	0.78	-	-
Parathyroid hormone-like peptide	1.52	2.01	1.332
Rat parathyroid hormone/parathyroid hormone related-peptide receptor mRNA	0.50	0.96	1.920
Rattus norvegicus thymosin beta-like protein mRNA	1.34	1.07	0.799
Rattus norvegicus thyroid hormone responsive protein mRNA	0.81	0.87	1.074
Thyroid transcription factor 1 TTF-1 NK-2(D-rosophila) homolog A (thyroid nuclear factor)	2.01	1.24	0.617
Thyrotropin releasing hormone receptor	0.23	0.43	1.870

Control : Treated group with Sodium levothyroxine
 HS : Treated group with Sodium levothyroxine and Scrophularia buergeriana Miquel 1.0g/kg
 * : HS/Control
 EST : Expressin Sequence Tag

고 찰

纒은 갑상선종이 나타나는 갑상선기능항진증을 포함하면서 비중독성 갑상선종, 양성 갑상선결절, 갑상선암, 갑상선염 등 갑상선의 외형적 비후가 보이는 다양한 갑상선 질환을 포함하는 개념이다¹³⁾. 본 질환의 치료에 海藻, 昆布, 海苔 등 요오드 함유량이 높은 약제를 사용한 海藻玉壺湯¹⁴⁾, 散腫潰堅湯¹⁵⁾, 海

藻水鍼¹⁶⁾ 등에 의한 실험 및 이들을 포함하지 않은 逍遙散加味方¹⁷⁾, 十六味流氣飲¹⁸⁾, 順氣歸脾丸¹⁹⁾, 六鬱湯²⁰⁾, 甲亢方²¹⁾ 등에 의한 실험에서 각각 치료상 유의성이 입증된 바 있다.

요오드 자체는 갑상선내로의 요오드의 이동억제, 요오드의 산화 및 유기화를 억제하며 이미 만들어져 갑상선내에 저장되어 있는 갑상선 호르몬의 방출을 억제하므로¹⁾, 海藻, 昆布, 海苔 등이 빈용된 처방은 이와 같은 요오드의 작용이 상당한 작용을 미치리라 생각된다. 다만 그 이외의 처방들은 갑상선 관련 호르몬의 증가 및 감소 효과는 관찰되었으나 보다 근원적 수준의 작용기전을 위해서는 갑상선 관련 호르몬 유전자 발현에 대한 조사가 요구된다.

갑상선 수용체는 스테로이드 호르몬, 레티노이드 및 비타민 D와 함께 핵수용체 superfamily에 속하며, 갑상선호르몬 수용체는 특정한 유전자의 갑상선 호르몬 반응요소(thyroid hormone response element, TREs)라고 불리는 DNA sequence 부분과 결합하여 유전자 발현(gene expression)을 조절하게 된다. 갑상선호르몬 반응요소는 리간드가 없는 상태에서 retinoid X receptor와 이형복합체(RXR-TR heterodimer)를 이룬 후에 공동억제자복합체(corepressor complex)와 상호작용하여 유전자 전사를 억제하며, 리간드가 있는 상태에서 TRs는 구조적 변화가 일어나 결과적으로 공동억제자(corepressor) 대신 공동활성자(coactivator)와 결합하여 유전자 전사를 촉진한다²²⁾. 갑상선에 특이적인 단백질의 발현을 관장하는 전사요소에는 갑상선 thyroid transcription factor 1, 2(TTF-1, TTF-2) 및 Pax-8이 있다²³⁾.

현삼은 浮游하는 火를 억제하는 滋陰降火의 要藥으로, 陰虛火旺, 虛火內動이 기본병리가 되는 갑상선 기능항진증에 응용되어지고 있다⁵⁾. 또한 sodium levothyroxine으로 갑상선기능항진증을 유발한 흰쥐에 대해 玄蓼를 투여한 실험에서는 갑상선호르몬(T3, T4 및 T3-uptake 含量)의 감소와 TSH 함량의 증가가 보고되었다¹⁰⁾.

DNA microarray법은 수천 내지 수만의 유전자에 대해서 그 발현을 동시에 관찰함으로써 종래의 분자생물학적 수법으로는 곤란한 생명현상의 통합적 해석을 가능하게 해주는 방법으로 다량의 유전자의 발현 양상을 분석할 수 있는 매우 효율적 시스템이다¹²⁾.

이에 저자는 갑상선기능항진증에 대한 실험적, 치료적 유의성이 있는 玄蓼를 이용하여 Sodium levot

hyroxine으로 갑상선기능항진증을 유발한 흰쥐에 대한 玄蓼의 유전자 발현을 관찰하기 위하여 cDNA microarray법을 시행하였다.

DNA chip을 통한 유전자 발현의 대량분석에서는 갑상선조직과 시상하부 부위에서의 정상군과 대조군(Fig. 1., Fig. 3.), 정상군과 투여군(Fig. 2., Fig. 4.)의 profile에서는 뚜렷하게 감소하는 유전자(green)와 증가하는 유전자(red)가 구분되지만 대다수 유전자(yellow)에서 특별한 증감은 나타나지 않았다.

Chip Scan data로부터 유전자의 선별에서 갑상선과 시상하부 부위에서 2배 이상의 증감을 보이는 유전자 발현의 변화를 살펴본 결과, 갑상선에서 정상군에 비해 대조군에서 총 296개, 정상군과 현삼 투여군간의 비교에서는 859개가 발견되었다. 또한 시상하부 부위에서는 정상군과 대조군 비교시 416개, 정상군과 현삼 투여군 비교시 391개의 유전자가 발견되었다(Table 1). 대조군에서 보이는 유전자 발현의 차이는 Sodium levothyroxine 투여에 의한 변화라 여겨지며 이 변화하는 유전자들 중에 갑상선 항진과 연관된 유전자가 존재할 것으로 여겨진다. 반면 현삼 투여군에서 대조군에 비해 2배 이상의 발현 차이를 보이는 유전자의 경우는 현삼에 의해 증감이 되는 유전자로 생각할 수 있으며, 이들 중 갑상선기능항진증의 치료과정에 관련된 유효 유전자가 있을 것으로 여겨진다.

갑상선 조직에서 현삼 투여로 억제되는 유전자 중 H2A histone family는 0.74배로 가장 많이 감소하였으며, synuclein, uPAR-2, cytochrome P-450, Connexin순으로 감소되었고, 반대로 현삼 투여로 증가되는 유전자 중 GADD153은 8.76배로 가장 많이 증가하였으며, sex hormone binding globulin(a androgen), liver apolipoprotein A-I, ceruloplasmn(ferroxidase) 등은 3배 이상, 그 외는 2배에서 3배 사이의 증가를 보였다(Table 2,3).

시상하부 부위에서 현삼 투여로 감소되는 유전자 중 Cathepsin E는 0.77배로 가장 많이 감소하였고, DNA helicase, catalytic subunit of protein phosphatase 1, Arginosuccinate synthetase 1, TFIIA small subunit, mitochondrial enoyl-CoA hydratase, CD1 antigen precursor, IFRD1(PC4) 등의 순으로 감소하였다(Table 4). 반면 현삼 투여로 증가되는 유전자 중 Fyn proto-oncogene는 1.40배로 가장 크게 증가하였지만 갑상선에서 나타난 결과와 비교하여 뚜렷하게 증가하는 유전자는 나타나지는 않았다(Table 5). 이는 외부의 자극에 의

해 변화하는 유전자의 양이 갑상선 조직에 비해 시상하부 부위에서 덜 민감하게 나타나는 것으로 생각된다.

갑상선에서 갑상선 기능과 관련된 유전자의 변화를 살펴본 결과, thyrotropin releasing hormone receptor는 4.12배로 가장 많이 증가 되었으며 EST(Highly similar to TYPE III IODITHYR)는 3.48배, EST(Highly similar to thyroid hormon)는 3.03배, parathyroid hormone-like peptide는 1.80배, Thyroid transcription factor 1은 1.80배, parathyroid hormone/parathyroid related-peptide receptor는 1.75배, thyroid hormone responsive protein은 1.24배, chromogranin B는 1.16 배로 증가되어 전체적으로 갑상선 기능과 관련된 유전자가 증가하였다(Table 6).

시상하부 부위에서 나타난 갑상선 기능과 관련된 유전자의 변화를 살펴본 결과, EST(highly similar to TYPE III IODITHYR)는 1.67배, parathyroid-like peptide는 1.33배, parathyroid hormone/parathyroid related-peptide receptor는 1.75배, thyroid hormone responsive protein은 1.07배 증가하는 것으로 나타났지만 갑상선과는 다르게 chromogranin B는 0.74배, thyroid transcription factor 1은 0.62배로 감소하였고, EST(Highly similar to thyroid hormon)는 검출되지 않았다(Table 7).

Chromogranin B는 1989년 Forss-Petter 등에 의해 크로닝 되어진 유전자로 생물학적으로 중요한 펩타이드의 형성에 관련되었을 것으로 기대되며, 갑상선 호르몬에 역시 비슷한 기능을 할 것으로 여겨지나 현재까지 많은 연구는 진행되고 있지 않다²⁴⁾. 현삼 투여로 chromogranin B는 갑상선 조직에서는 증가하고, 시상하부 부위에서는 감소하였다. 이것으로 미루어 보아 이 물질은 시상하부-뇌하수체-갑상선축에 영향을 미치는 것으로 생각되지만 작용기전에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

Type III iodothyronine deiodinase는 T4(3,5,3',5'-tetraiodothyronine)를 deiodination하여 T3(3,3',5'-triiodothyronine)로, T3를 다시 T2(3,3'-diiodothyronine)로 전환시키는 효소로서, 이처럼 변환된 T3와 T2는 생물학적으로 Km 값이 많이 낮음으로 불활성화 되는 것으로 보이는 현상은 fetal tissues의 발달 과정에서 지나친 갑상선 호르몬에 과다 노출을 억제하는 데에서 많이 관찰된다²⁵⁾. 현삼 투여로 EST(Highly similar to TYPE III

IODITHYRONINE DEIODINASE)가 갑상선과 시상하부 부위에서도 모두 증가한 것으로 보아 갑상선 항진 과정에서 분비된 호르몬의 작용을 억제하는 작용하고 있는 것으로 추측된다.

Parathyroid hormone-like peptide 유전자의 경우는 rat의 genomic library를 대상으로 사람의 유전자와 유사성이 있는 구조로서 아직 정확한 기능은 밝혀져 있지 않으나 구조적으로 유사성을 지니고 있다²⁶⁾. 현삼 투여로 갑상선과 시상하부 부위에서 모두 증가하여 나타났으며, 갑상선 기능 항진 과정에서 어떤 작용을 하는지에 대해서는 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

Parathyroid hormone과 parathyroid related peptide receptor는 parathyroid hormone과 parathyroid hormone-related peptide의 receptor로서 이들이 갖는 활성은 adenylyl cyclase와 phosphatidylinositol-calcium등과 같은 2차 신호 전달 시스템 활성화되는 G-protein들에 만들어지는 신호를 전달하는 역할을 수행한다^{27,28)}. 현삼 투여로 갑상선과 뇌의 시상하부 부위에서 모두 증가하였는데, 갑상선 기능과의 관련성에 대하여는 향후 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Rattus norvegicus thyroid hormone responsive protein mRNA는 갑상선 호르몬 대사에 관련된 호르몬들의 세포 내 이동에 관여한다²⁹⁾. 현삼 투여로 시상하부 부위에서 증가한 것으로 보아 갑상선 호르몬의 이동을 조절하여 갑상선 호르몬의 합성과 분비를 조절하는 것으로 생각된다.

Thyroid transcription factor 1(TTF-1) 및 Pax-8은 티로글로불린(thyroglobulin, TG) 및 갑상선 과산화효소(thyroid peroxidase, TPO)의 발현을 자극하며 TTF-1은 또한 TSH 수용체의 발현에 영향을 주고, Pax-8은 티로글로불린보다는 갑상선 과산화효소 발현의 전사 활성화에 더 중요한 역할을 한다^{23,30)}. 또한 TTF-1 NK-2(thyroid nuclear factor)는 thyroglobulin, thyroperoxidase, 그리고 thyrotropin receptor와 같은 갑상선 조직에서 특이적으로 만들어지는 유전자들의 프로모터에 결합하여 해당 유전자의 발현을 촉진시키는 역할을 하는 분자로서 갑상선 분화 표현형(phenotype)의 유지에 중요한 역할을 한다³⁰⁾. 갑상선에서 현삼이 기능항진증을 억제시킨다는 보고와는 다르게 TTF-1 유전자가 증가된 것에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

Thyrotropin-releasing hormone receptor는

hypothalamus에서 합성되어 anterior pituitary로 운반되는 작은 크기의 neuropeptide로서, 시상하부-뇌하수체-갑상선축의 조절에 중요한 역할을 하고 있으며 TSH나 prolactin등과 같은 갑상선 호르몬들의 분비를 촉진시키는 역할을 한다³¹⁾. 현삼 투여로 갑상선과 시상하부 부위에서 증가하여 나타난 것은 sodium levothyroxine 투여에 의하여 억제되어 있던 TSH분비가 혈중의 T3, T4 함량이 감소되면서 다시 증가된 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 현삼이 갑상선기능항진증을 억제하는 작용기전은 갑상선 및 시상하부 부위에서 관련 유전자의 발현을 조절하여 정상 기능을 회복하는 것으로 생각되며, 각 유전자의 기능과 발현 조절에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

Sodium levothyroxine으로 갑상선 기능항진증을 유발한 흰쥐에 대한 현삼의 유전자 발현을 관찰하기 위하여 cDNA microarray법을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 갑상선 조직에서 정상군에 비해 대조군에서 2배 이상의 증감을 보이는 유전자는 총 296개, 정상군과 현삼투여군의 비교에서는 859개, 시상하부 부위에서는 정상군과 대조군 비교시 416개, 정상군과 현삼투여군 비교시 391개로 나타났다.

2. 현삼 투여에 의하여 갑상선에서는 Rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase 등 13종의 유전자 발현이 감소되고, Calcitonin/calcitonin-related polypeptide 등 20종의 유전자 발현이 증가되었다.

3. 현삼 투여에 의하여 시상하부 부위에서 Insulin-like growth factor 2 receptor 등 29종의 유전자 발현이 증가되었다.

4. 현삼 투여에 의하여 갑상선 조직에서 sodium levothyroxine 투여에 의하여 감소되었던 parathyroid hormone/parathyroid hormone, thyroid hormone response protein, Thyroid transcription factor 1, thyrotropin releasing hormone receptor 등의 발현이 증가되었다.

5. 현삼 투여에 의하여 시상하부 부위에서 sodium levothyroxine 투여에 의하여 유전자 발현이 증가되었던 parathyroid-like peptide, parathyroid hormone/parathyroid hormone, thyroid hormone response protein 등이 정상으로 발현되었다.

참고문헌

1. 대한내분비학회. 내분비학. 서울:고려의학. 1999:269-270.
2. 해리슨 내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울:정담. 1997:2091-2092
3. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1991:192-193
4. 신길구. 신씨본초학. 서울:수문사. 1987:731-732
5. 杜鎬京. 東醫腎系學(下). 서울:東洋醫學研究院. 1991:858-867
6. 陳無擇. 三因方. 台北:大聯國風出版社. 1980:12
7. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987:2107-2111
8. 安徽中醫學院編. 中醫臨床手冊. 서울:成輔社. 1983:206-207
9. 黃甫中. 正校明醫指掌. 서울:꽃잎文化社. 1964:31-32
10. 朴贊旭. 玄參이 甲狀腺機能亢進症 誘發 白鼠에 미치는 影響. 大田大學校大學院 碩士學位論文. 2001.
11. Zweiger G . Knowledge discovery in gene expression microarray data mining the information output of the genome. Trends Biotechnol. 1999;17:429-436
12. 유대열 외. 게놈기능연구 프로토콜. 서울:월드 사이언스. 2001:23-24
13. 上海中醫學院 . 中醫內科學. 香港:商務印書館. 1981:494-503
14. 朴宰賢. 海藻玉壺湯이 白鼠의 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 東國大學校大學院 碩士學位論文. 1991.
15. 盧泰錫. 散腫潰堅湯이 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1995.
16. 金慶鎬. 海藻水鍼이 흰쥐의 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 東國大學校 大學院 碩士學位論文.

1990.

17. 孫淑英. 逍遙散加味方이 Sodium levothyroxine 投與로 誘發된 轉錄 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文. 1996.

18 鄭蓮姬 외. 十六味流氣飲 및 그 加味方이 甲狀腺 機能에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1988;9(2):98-108

19. 朴哲勳. 順氣歸脾丸이 實驗적으로 誘發한 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文. 1995.

20. 崔勳變. 六鬱湯이 白鼠의 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1999.

21. 金珉爽 . 甲亢方이 白鼠의 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 1998.

22. Wu Y. Koenig RJ Gene Regulation by Thyroid Hormone Trends Endocrinol Metab. 2000;11(6):208-211

23. Gereben B, Salvator D, Harney JW. MT Helen, The Human but Not Rat. dio2 Gene Is Simulated by Thyroid Transcription Factor-1(TTF

-1) Mol Endocrinol. 2001;15(1):112-124

24. Forss-Petter S. Danielson P. Battenberg E. Bloom F. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence and cellular distribution of rat chrogranin B(secretogranin D) mRNA in the neuroendocrine system. J Mol Neurosci. 1989;1(2):63-75

25. Bonaldo. M.F, Lennon. G., Soares. M.B., Normalization and subtraction ; two approaches to facilitate gene discovery. Genome Res. 1996;6:791-806

26. Karaplis AC, Yasuda T, Hendy GN, Goltzman D, Banville D. Gene-encoding parathyroid hormone-like peptide; nucleotide sequence of the rat gene and comparison with the human homologue. Mol Endocrinol. 1990;(4):441-446

27. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related

peptide from rat osteoblast-like cells ; a single receptor stimulates Intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(7):2732-2736

28. Pausova Z, Bourdon J, Clayton D, Mattei MG, Seldin MF, Janicic N, Riviere M, Szpirer J, Levan G. Cloning of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor(PTHrP) cDNA from a rat osteosarcoma(UMR 106) cell line ; chromosomal assignment of the gene in the human. mouse. and rat genomes. Genomics. 1994;20(1):20-26

29. Shah GN, Li J, Schneiderjohn P, Mooradian AD. Cloning and characterization of a complement ary DNA for a thyroid hormone-responsive protein in mature rat cerebral tissue. Biochem J. 1997;327:617-623

30. Guazzi. S., Price.M., De Felice.M., Damante.G., Mattei.M.G. and Lauro.R. Thyroid nuclear factor 1(TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. EMBO J. 1990;9(11):3631-3639

31. Zhao D, Yang J., Jones KE., Gerald C., Suzuki.Y., Hogan. PG., Chin WW and Tashjian.A.H.. Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. Endocrinology. 1992;130:3529-3533