

갑상선에서 protein kinase C에 의한 thyroxine 유리조절

김진상

전북대학교 수의과대학
(1999년 6월 11일 접수)

Regulation of thyroxine release in the thyroid by protein kinase C

Jin-shang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Jun 11, 1999)

Abstract : Previous studies suggested that the inhibition of thyroxine (T_4) release by α_1 -adrenoceptor and muscarinic receptor stimulation results in activated protein kinase C (PKC) from mouse and guinea pig thyroids. In the present study, the effect of carbachol, methoxamine, phorbol myristate acetate (PMA), and R59022 on the release of T_4 from the mouse, rat, and guinea pig thyroids was compared to clarify the role of PKC in the regulation of the release of T_4 . The thyroids were incubated in the medium containing the test agents, samples of the medium were assayed for T_4 by EIA kits. Forskolin, an adenylate cyclase activator, chlorophenylthio-cAMP sodium, a membrane permeable analog of cAMP, and isobutyl-methylxanthine, a phosphodiesterase inhibitor, like TSH (thyroid stimulating hormone), enhanced the release of T_4 from the mouse, rat, and guinea pig thyroids.

Methoxamine, an α_1 -adrenoceptor agonist, inhibited the TSH-stimulated release of T_4 in mouse, but not rat and guinea pig thyroids. In contrast, carbachol, a muscarinic receptor agonist, inhibited the release of T_4 in guinea pig, but not mouse and rat thyroids. These inhibition were reversed by prazosin, an α_1 -adrenoceptor antagonist or atropine, a muscarinic antagonist or M_1 - and M_3 -muscarinic antagonists, in mouse or guinea pig thyroids. In addition, staurosporine, a PKC inhibitor, reversed methoxamine or carbachol inhibition of TSH stimulation. Furthermore, PMA, a PKC activator, and R59022, a diacylglycerol (DAG) kinase inhibitor, inhibited the TSH-stimulated release of T_4 in mouse, rat, and guinea pig thyroids. These inhibition were blocked by staurosporine. These findings suggest that the activation of receptor or DAG inhibits TSH-stimulated T_4 release through a PKC-dependent mechanism in thyroid gland.

Key words : thyroxine, protein kinase C, carbachol, methoxamine, staurosporine.

서 론

갑상선에 교감 및 부교감 신경이 분포^{1,2}되어 관련된 수용체 자극은 신호전달계의 활성화로 갑상선 호르몬 합성 및 분비를 조절한다^{1,4}. 신호전달계중 *adenylate cyclase*계, Ca^{2+} 및 Ca^{2+} -*phosphatidylinositol*(PI)계가 갑상선 기능조절에 중요한 역할을 하고 있다^{5,6}. 갑상선 호르몬 분비는 TSH(thyroid stimulating hormone)에 의한 *adenylate cyclase*의 활성화로 cAMP가 증가⁷됨으로써 일어나지만 PI 신호전달계를 경유하여 호르몬 분비를 조절할 수 있다^{5,6}. 그러나 호르몬 분비 및 합성 등이 cAMP, Ca^{2+} 또는 PI계의 단독 또는 상호작용에 의해 조절되고 각 조직에 분포된 *adrenoceptor*나 *cholinergic* 수용체는 각각의 subtype으로 구분되고 이들은 서로 다른 신호전달체계를 경유하여 생리학적 반응을 나타내기 때문에 매우 복잡하다. 그리고 신경전달물질 중 *adrenaline*은 TSH 처럼 cAMP를 증가시키는 대표적인 물질이다. 그러나 이는 각각의 subtype 수용체를 자극하여 다양한 효과를 나타낸다. 갑상선에서 subtype 중 α_1 -*adrenoceptor*이 자극되면 세포내 Ca^{2+} 증가로 호르몬 분비가 억제된다⁸. 마우스나 기니피 갑상선에서 PI계를 활성화시키는 α_1 -*adrenoceptor*나 *muscarinic* 수용체를 경유한 *diacylglycerol* 증가에 의한 PKC 활성화는 TSH에 의한 호르몬 분비를 억제하고 이 억제 기전으로 PKC 활성화에 의한 갑상선 세포내 Ca^{2+} 증가로 밝혔다^{9,10}. 그러나 상기 보고에서는 각각의 동물에서 단일 수용체 자극에 의한 결과만을 보여 그 억제기전을 설명하기에 부족하였다. 최근 저자는 마우스, 랫드나 기니피 갑상선에서 α_1 -*adrenoceptor*나 *muscarinic* 수용체 자극으로 갑상선 호르몬 분비억제 효과가 다르지만 공통적으로 상기 세 동물의 갑상선에서 직접적인 PKC 활성화로 호르몬 분비가 억제됨을 관찰하였다. 상기 두 수용체 자극시 궁극적으로 PKC 활성화는 잘 알려져 있기 때문에 수용체를 경유하지 않고 *diacylglycerol*과 같은 신호전달물질을 직접적으로 증가시킬 때 갑상선 호르몬 분비가 조절될 수 있음을 추측하였다. 이러한 결과에 의하면 실험동물에 따라 신경분포가 다르거나 신경자극에 의한 갑상선 기능조절이 다르므로 다양한 조절기전이 관련될 수 있음을 고려할 수 있다. 그 예로 *cholinergic* 수용체 자극제인 *acetylcholine*과 *carbachol*, *adrenoceptor* 자극제인 *norepinephrine*과 *methoxamine* 등이 개와 마우스

갑상선에서 직접적으로 TSH에 의한 세포내 cAMP에는 영향을 미치지 않지만 갑상선 호르몬 분비를 억제한다^{4,11,12}고 한 반면 *epinephrine*이 고양이, 랫드, *hamster* 및 *pig* 갑상선에서 TSH에 의한 cAMP 형성을 억제한다는 상반된 보고^{13,14}가 있다. 이러한 차이점은 종에 따른 신경계 분포가 다르기 때문일 가능성이 있다⁴. 그러나 갑상선 호르몬 분비가 Ca^{2+} 증가에 의해서 억제된다는 보고^{8,9,10,15}를 근거로 이 연구에서 억제기전으로 수용체를 경유한 cAMP 억제보다 PKC 활성화와 관련될 수 있을 것으로 추측하였다. 따라서 이 연구에서는 T_4 유리에 대한 PKC를 활성화시키는 α_1 -*adrenoceptor*와 *muscarinic* 수용체 자극효과를 마우스, 랫드 및 기니피 갑상선에서 동시에 관찰하고, 직접적인 PKC 활성화에 의한 T_4 유리 억제효과를 상기 실험동물들에서 비교 검토하여 이미 보고^{9,10}된 PI 전달계를 활성화시키는 수용체 자극에 의한 T_4 유리 억제기전을 뒷받침하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물, 갑상선 분리 및 장치 : 수컷 마우스(ICR, 25~35g), 수컷 랫드(Sprague-Dawley, 200~250g), 수컷 기니피(Hartley, 300~350g)를 *pentobarbital sodium*(30mg/kg)를 복강내로 투여하여 마취한 후 갑상선을 적출하였다. 적출한 즉시 O_2 와 CO_2 가 포화된 *Krebs-bicarbonate* 완충액(118.05 mM NaCl, 4.69mM KCl, 1.16mM $MgCl_2$, 5.5mM glucose, 2.0mM $CaCl_2$, 1.16mM NaH_2PO_4 , 25mM $NaHCO_3$, 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*¹⁶의 방법에 따라 5~6시간동안 배양하면서 지속적으로 O_2 와 CO_2 공급하였다. 즉, 시험관 마개(*polyethylene*)에 두개의 관(0.2mm)을 관통시켜 그 중 하나는 끝이 시험관내 완충액 근처까지 삽입하여 *gas*를 공급하고 다른 관으로 *gas*가 시험관 밖으로 배출되도록 하였다.

실험방법 : 한 개의 시험관(완충액 1.5ml)에 실험동물에서 적출한 갑상선(마우스 4마리, 랫드 2마리 그리고 기니피 1마리에서 적출한 갑상선 8, 4 그리고 2 pieces)을 넣고 1시간 30분 동안 *preincubation*하여 안정화시켰다. 이때 마우스 및 랫드의 갑상선은 후두와 기관지 일부가 포함되었다. 다시 약물을 처치하지 않은 시험관내(완충액 1 ml)에서 2시간 동안 배양하여 이 배양액 내 T_4 를 측정하여 대조치로 하였다. 그 후 약물 또는 TSH를 가한

완충액이 들어 있는 시험관에 갑상선을 옮기고 다시 2시간 동안 배양한 후 검액을 취하여 T_4 를 측정하고 이를 시험치로 하였다. 시료는 -20°C 보관한 후 T_4 를 2일 이내에 효소면역 측정법(EIA)에 의한 T_4 측정 kit(Roche, Swiss)를 사용하여 Cobas Core(Roche, Swiss)로 측정하였다. 실험후 주위 조직을 제거하고 무게를 측정하였으며 측정된 T_4 농도는 각 1 ml의 시료에서 갑상선 무게 mg당 T_4 ng(ng/mg)으로 계산하였고 이를 대조치에 대한 시험치를 %로 표시하였다.

사용약물 : TSH, methoxamine, carbachol, atropine, PMA (phorbol myristate acetate) 및 staurosporine은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 그리고 pirenzepine, telenzepine(M_1 -antagonists), 4-diphenylacetocyl-N-methylpiperidine methiodide (4-DAMP, M_3 -antagonist), R59022, forskolin, 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP sodium 및 IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)은 RBI(Natick, MA, USA)로부터 구입하였다.

결 과

TSH, forskolin, cAMP 및 IBMX가 마우스, 랫드 및 기니픽 갑상선에서 T_4 유리에 미치는 영향 : 갑상선 호르몬은 cAMP에 의해 유리되기 때문에 세포내 cAMP를 증가시킬 수 있는 몇가지 효과를 관찰하였다(Fig 1). TSH는 물론 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 증가시키는 forskolin($3 \times 10^{-5}\text{M}$), 세포막을 투과할 수 있는 cAMP (10^{-3}M)와 phosphodiesterase를 억제하여 cAMP를 증가시키는 IBMX가 이 실험에 쓰인 모든 동물의 갑상선에서 약물을 처치하지 않은 실험(none)에서 보다 T_4 유리를 현저히 촉진하였다.

각 실험동물의 갑상선에서 methoxamine이 TSH에 의한 T_4 유리에 미치는 영향과 마우스 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 길항제와 PKC 억제제가 methoxamine에 의한 T_4 유리억제에 미치는 영향 : α_1 -adrenoceptor 효현제인 methoxamine(10^{-5}M)은 마우스 갑상선에서 T_4 유리를 억제한다는 보고에서처럼 TSH에 의한 T_4 유리효과를 억제하였다. 그러나 랫드와 기니픽 갑상선에서 T_4 유리가 methoxamine에 의해 억제되지 않았다. 역시 고농도 methoxamine이 랫드와 기니픽 갑상선에서 T_4 유리를 억제하지 못했다(자료 미제시). 마우스에서 methoxamine에 의한 T_4 유리 억제효과가 α_1 -adrenoceptor를 경유한 PKC 활성화에 의한 결과인지를 확인하기 위하여 α_1 -adreno-

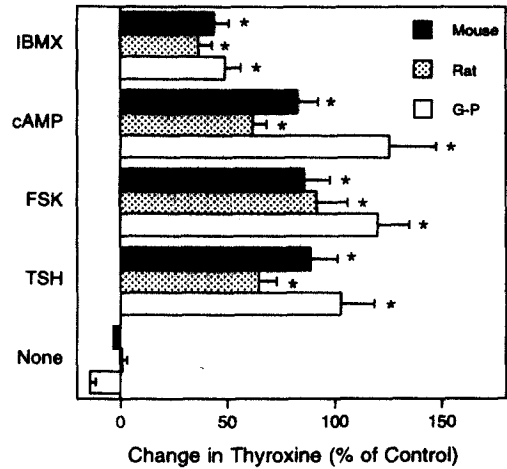


Fig 1. Effects of TSH(100 $\mu\text{U/ml}$), forskolin(FSK, $3 \times 10^{-5}\text{M}$), cAMP(10^{-3}M), and IBMX($6 \times 10^{-4}\text{M}$) on T_4 release(percent of control) in mouse, rat and guinea pig(G-P) thyroids. The preincubation time was 60 min. Thyroids were incubated for 2 h (control incubation), then incubated for a further 2 h with chemicals(test incubation). Each bar represents the mean \pm SEM of seven to eleven vessels, each containing four to eight (rat, mouse) or two(guinea pig) thyroids. * $p < 0.001$ vs. none.

ceptor 길항제인 prazosin과 선택적 PKC 억제제인 staurosporine의 효과를 관찰하였다. Prazosin($3 \times 10^{-6}\text{M}$) 및 staurosporine(10^{-6}M)은 methoxamine에 의한 T_4 유리 억제효과

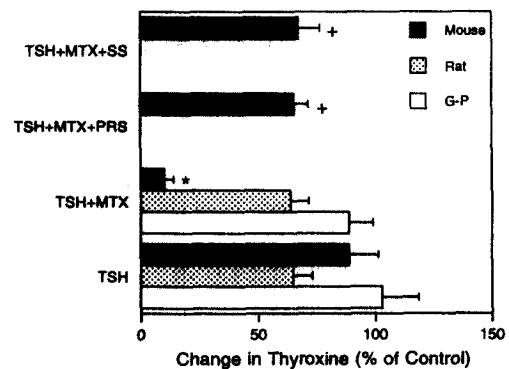


Fig 2. A comparison of the effects of methoxamine(MTX, 10^{-5}M , α_1 -adrenoceptor agonist) on TSH-stimulated T_4 release in the mouse, rat and guinea pig thyroids. The effects of methoxamine was reversed by prazosin (PRS, $3 \times 10^{-6}\text{M}$) and staurosporine(SS, 10^{-6}M) in mouse thyroids. Each bar represents the mean \pm SEM of seven to eleven vessels. * $p < 0.001$ vs. TSH; + $p < 0.001$ vs. TSH+MTX.

를 차단하였다(Fig 2). 따라서 마우스 갑상선에서 methoxamine에 의한 T_4 유리 억제효과는 α_1 -adrenoceptor를 경유한 PKC 활성화에 의한 결과임을 추측할 수 있다. 그러나 랫드와 기니픽에서 α_1 -adrenoceptor 분포차이로 억제되지 않았을 것으로 추측한다.

각 실험동물의 갑상선에서 carbachol이 TSH에 의한 T_4 유리에 미치는 영향과 기니픽 갑상선에서 muscarinic 길항제와 PKC 억제제가 carbachol에 의한 T_4 유리억제에 미치는 영향 : muscarinic 수용체 효현제인 carbachol($3 \times 10^{-4}M$)은 단지 기니픽 갑상선에서만 TSH에 의한 T_4 유리효과를 억제하였고 마우스나 랫드 갑상선에서 T_4 유리를 억제하지 못했다. 고농도 carbachol 역시 랫드와 기니픽 갑상선에서 T_4 유리를 억제하지 못했다(자료 미제시). 기니픽에서 carbachol에 의한 T_4 유리 억제효과가 muscarinic 수용체를 경유한 PKC 활성화에 의한 결과인지를 확인하기 위하여 길항제인 atropine과 PKC 억제제인 staurosporine의 효과를 관찰하였다. 기니픽 갑상선에서 atropine($5 \times 10^{-5}M$) 및 staurosporine($10^{-6}M$)은 carbachol에 의한 T_4 유리 억제효과를 차단하였다(Fig 3).

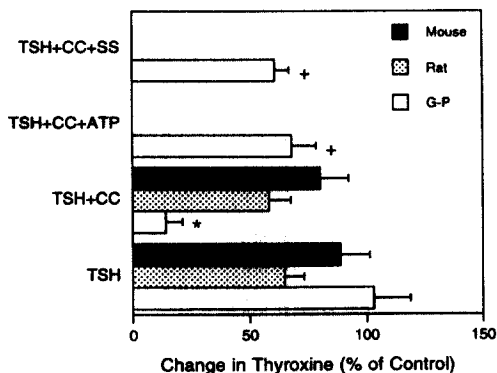


Fig 3. Effects of carbachol(CC, $3 \times 10^{-4}M$, muscarinic agonist) on TSH-stimulated T_4 release in the mouse, rat, and guinea pig thyroids. The effect of carbachol was reversed by atropine (ATR, $5 \times 10^{-5}M$) and staurosporine(SS, $10^{-6}M$) in guinea pig thyroids. Each bar represents the mean \pm SEM of seven to nine vessels. * $p < 0.001$ vs. TSH; + $p < 0.001$ vs. TSH+CC.

기니픽 갑상선에서 M_1 및 M_3 길항제가 carbachol에 의한 T_4 유리억제 효과에 미치는 영향 : 상기 Fig 3의 결과를 보충하기 위하여 carbachol에 의하여 T_4 유리가 억제되는 기니픽 갑상선에서 DAG 활성화에 의한 PKC를 활성화시킬 수 있는 경로인 M_1 -과 M_3 -수용체 길항제의

영향을 관찰하였다(Fig 4). TSH에 의한 T_4 유리효과가 carbachol에 의해 현저히 억제되었으며, 이 억제효과가 M_1 - 및 M_3 -길항제인 pirenzepine(PIR, $10^{-4}M$), telenzepine (TEL, $10^{-4}M$) 및 4-DAMP($10^{-4}M$)에 의해서 현저히 차단되었다.

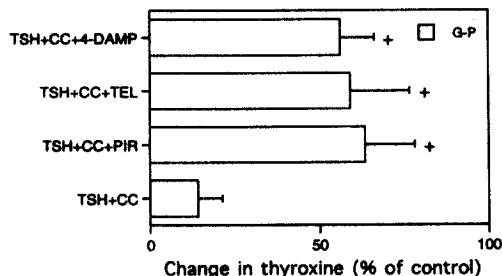


Fig 4. Effects of carbachol(CC, $3 \times 10^{-4}M$) in the presence of selective M_1 - and M_3 -receptor antagonists(PIR, $10^{-4}M$; TEL, $10^{-4}M$; DAMP, $10^{-4}M$) on the TSH-stimulated T_4 release by guinea pig thyroids. The mean \pm SEM of six to nine vessels are shown, each containing two thyroids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

각 실험동물의 갑상선에서 PKC 활성화제가 TSH에 의한 T_4 유리에 미치는 영향과 PKC 억제제가 PKC 활성화제에 의한 T_4 유리억제에 미치는 영향 : 상기 결과에서 처럼 α_1 -adrenoceptor 또는 muscarinic 수용체 자극에 의한 T_4 유리 억제효과가 마우스 또는 기니픽 갑상선에서 PKC 활성화에 의하여 나타남을 추측하였고 흰쥐는 갑상선에서는 상기 두 수용체 자극에 의해서 T_4 유리가 억제되지 않았다. 신경 또는 수용체 분포에 관계없이 PKC 활성화에 의한 T_4 유리효과를 관찰하기 위하여 각 실험동물의 갑상선에서 PKC 활성화제 및 PKC 억제제의 영향을 관찰하였다. PKC 활성화제인 PMA($3 \times 10^{-6}M$)는 각 실험동물의 갑상선에서 TSH에 의한 T_4 유리효과를 현저히 억제하였고 이러한 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine($10^{-6}M$)에 의해 차단되었다(Fig 5).

각 실험동물의 갑상선에서 R59022(diacylglycerol kinase inhibitor)가 TSH에 의한 T_4 유리에 미치는 영향과 PKC 억제제가 R59022에 의한 T_4 유리억제에 미치는 영향 : 세포내 PKC는 diacylglycerol kinase에 의해 불활성화 된다. 따라서 이 효소억제제(R59022)가 불활성화 과정을 억제하여 PKC 활성을 유지시킨다. 따라서 R59022는 Fig 4에서 처럼 PMA에 의한 PKC 활성화와 같은 효과를 얻을 수 있다. 즉, 갑상선 유리 억제효과가 PKC 활

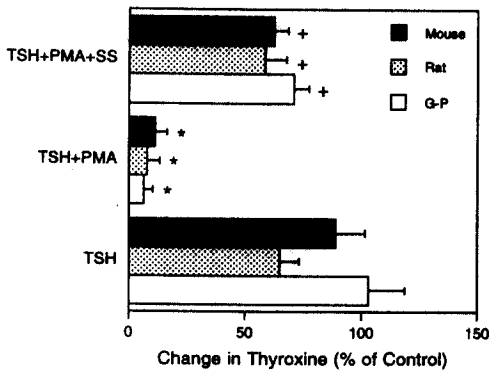


Fig 5. Effects of protein kinase C activator(PMA, $3 \times 10^{-6}M$) on the TSH-stimulated T_4 release in mouse, rat, and guinea pig thyroids. Reversal effects of staurosporine(SS, protein kinase C inhibitor, $10^{-6}M$) on the PMA-induced inhibition of T_4 release. The mean \pm SEM of seven to eight vessels are shown. * $p < 0.001$ vs. TSH; * $p < 0.001$ vs. TSH+PMA.

성화에 의한 결과임을 확인하기 위하여 R59022와 staurosporine의 차단효과를 관찰하였다.

R59022($10^{-4}M$)는 각 실험동물의 갑상선에서 TSH에 의한 T_4 유리효과를 현저히 억제하였고 이러한 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine($10^{-6}M$)에 의해 차단(Fig 6)되어 Fig 5의 결과를 뒷받침하였고 상기 결과인 마우스 및 기니픽 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 또는 muscarinic 수용체를 경유한 T_4 유리 억제효과가 모두 PKC 활성화에

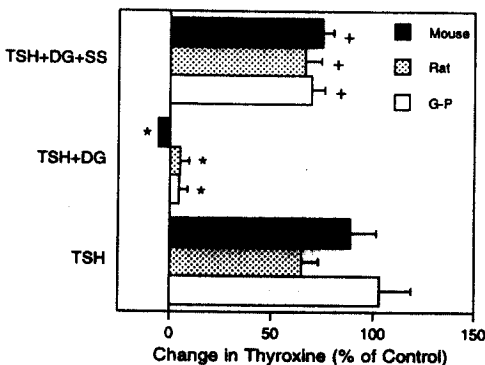


Fig 6. Effects of diacylglycerol kinase inhibitor(DG, R59022, $10^{-4}M$) on the TSH-stimulated T_4 release in mouse, rat, and guinea pig thyroids. Reversal effects of staurosporine(SS, $10^{-6}M$) on the PMA-induced of T_4 release. The mean \pm SEM of seven to eight vessels are shown. * $p < 0.001$ vs. TSH; * $p < 0.001$ vs. TSH+DG.

의한 결과임을 추측하였다.

고찰

Adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 증가시키는 forskolin, 세포막을 투과하는 Cl-cAMP 및 cAMP 분해를 억제하여 증가시키는 phosphodiesterase 억제제 모두가 이 실험에서 쓰인 마우스, 랫드 및 기니픽 갑상선에서 TSH 처럼 T_4 유리를 촉진하였다. 이러한 결과는 갑상선에서 TSH에 의한 호르몬 분비가 대부분 cAMP에 의해 조절되고 있다는 보고⁷를 뒷받침하고 있지만 이 cAMP가 갑상선 세포내 모든 기능과 신호전달계 조절의 매개체는 아니다¹⁷. Phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate(PIP_2) 가수분해에 의한 신호전달 매개체도 TSH의 생리적 기능에 중요한 역할^{17,18}은 물론 PIP_2 신호전달계가 갑상선 호르몬 합성에 결정적인 역할을 한다^{5,6,19}. Cholinergic 및 adrenergic 수용체를 자극하는 약물 즉, acetylcholine, carbachol, norepinephrine, dopamine 및 methoxamine 등이 개와 마우스 갑상선에서 TSH에 의한 세포내 cAMP 축적에 대해서는 영향을 미치지 않지만^{4,8,11,12,16,20} TSH에 의한 T_4 유리를 억제하고 개와 고양이의 갑상선 조직에서 α_1 -adrenoceptor 자극에 의해서 TSH에 의한 cAMP 증가효과가 억제되었고^{21,22}, carbachol도 catecholamine 처럼 갑상선 호르몬 유리를 억제하는데 이 억제효과가 cAMP 축적을 억제하기 때문이라고 하였다¹⁴. 이러한 차이점은 종에 따른 차이 또는 신경계 및 수용체 분포가 다르기 때문일 가능성도 있다¹³.

마우스 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 자극으로 유리가 억제됨을 보고^{4,8,9}한 바 있으나 이 연구결과에서는 마우스, 랫드 및 기니픽에서 α_1 -adrenoceptor 자극은 단지 마우스 갑상선에서만 T_4 유리를 억제하였고, muscarinic 수용체 자극은 단지 기니픽 갑상선에서만 T_4 유리를 억제하였다. 그리고 랫드 갑상선에서는 상기 두 수용체 자극약물로 T_4 유리를 억제하지 못했다. 이전 연구보고에 의하면 교감신경계가 마우스, cat, 랫드, hamster, 개 및 돼지 갑상선에 분포되어 있음을 암시^{1,17}하였고 부교감신경계가 개, 마우스 및 사람의 갑상선에 분포되어 있음을 보고^{2,3,11,18}하였다. 이 연구결과의 마우스와 랫드에서 T_4 유리결과는 상기 신경계 분포에 관련된 연구보고와 상반된 결과를 보이고 있다. 이는 신경계가 분포되어 있어도 수용체의 분포여부에 의한 결과일 수 있으나 이 연구결

과로 수용체 분포는 확인할 수 없었다. 따라서 랫드 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor 또는 muscarinic 수용체 자극에 의해 T_4 유리에 영향을 미치지 않아 신경분포 또는 수용체 분포여부는 논하기 어렵다. 그러나 공통적으로 마우스, 랫드 및 기니피크 갑상선에서 T_4 유리 억제에 PKC를 활성화시키는 약물에 의해 억제되었고 수용체를 경유한 T_4 유리 억제효과나 직접적인 PKC 활성화에 의한 T_4 유리 억제효과가 모두 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단되었다. 따라서 신경이나 수용체 존재여부에 관계없이 모든 실험동물의 갑상선에서 T_4 유리 억제효과는 PI 가수분해에 의한 PKC 활성화에 의한 결과라고 할 수 있다. 이를 뒷받침하는 결과로 α_1 -adrenoceptor나 muscarinic 수용체 자극은 PKC를 활성화시키는 신호전달체계를 갖고 있다는 이전 보고를 들 수 있다. 또한 마우스나 기니피크 갑상선에서 이 두 수용체 자극은 PKC 활성화로 T_4 유리가 억제됨을 보고한 바 있었다^{9,10}. 이와같이 갑상선 기능 조절에 PKC가 밀접하게 관여하고 있음을 알 수 있다.

IP_3 역시 갑상선 기능조절에 관여하고 있는데^{5,18} catecholamine이 PIP_2 를 가수분해시켜 세포내 Ca^{2+} 를 증가시킨다²³. 또한 갑상선 세포에 IP_3 를 직접 투과시킬 때도 Ca^{2+} 이 증가되어 갑상선 기능을 조절한다고 하였다²⁴. PIP_2 가수분해에 의한 또 다른 매개체인 DAG 형성은 PKC를 활성화시키며²⁵, IP_3 처럼 DAG도 TSH에 의해 증가될 수 있으며²⁶ 이 DAG 증가에 의해 PKC가 활성화되어^{26,27} 세포내 Ca^{2+} 를 증가시킨다. 이러한 Ca^{2+} 증가는 갑상선 세포에서 α_1 -adrenoceptor 및 muscarinic 수용체 자극에 의한 PKC 활성화로 일어날 수 있기 때문에²⁸ PIP_2 가수분해는 갑상선 호르몬 합성 및 유리에 중요한 역할을 하고, 상기 두 수용체 자극으로 갑상선 호르몬 유리가 억제된다는 사실과 이 두 매개체(IP_3 와 DAG)에 의한 생리적 반응의 공통점은 갑상선 세포내 Ca^{2+} 의 증가로서 IP_3 에 의한 Ca^{2+} 증가는 잘 알려져 있으나^{23,24,29,30} DAG에 의한 PKC 활성화와 Ca^{2+} 증가에 의한 T_4 유리 억제기전은 잘 알려져 있지 않았다. 최근 Oda *et al*⁸도 마우스 갑상선에서 이 억제효과가 Ca^{2+} 의존적임을 밝혔으나 이 Ca^{2+} 증가 경로는 물론 PKC 활성화와의 관계는 밝히지 못했다. 단지 최근 저자 등은 마우스와 기니피크 갑상선에서 muscarinic 수용체 및 α_1 -adrenoceptor 자극이 T_4 유리를 억제하는데 이 억제 효과가 PKC를 경유한 세포내 Ca^{2+} 증가에 의한 결과로 추측^{9,10}하였을 뿐 동물간의 차이점과 직접적인 신호전달물질의 자극효과는 비교 검토하지 못

하여 갑상선 호르몬 분비 억제기전을 충분히 설명하지 못했다. 이 연구에서는 각각의 수용체 자극효과가 다른 동물들에서 PKC를 활성화시킬 수 있는 상기 두 수용체 자극은 물론 직접적인 PKC 활성화로 T_4 유리 억제효과가 있었고 이 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단됨을 관찰하여 PKC를 경유한 효과임을 확인하였으며, PKC를 직접적으로 활성화시킬 수 있는 PMA가 모든 실험동물의 갑상선에서 특히, methoxamine이나 carbachol에 의해 T_4 유리가 억제되지 않은 랫드 갑상선에서 역시 methoxamine이나 carbachol 효과와 유사하게 T_4 유리를 억제시켰고 이들 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단됨을 확인할 수 있었다. 이를 더욱 뒷받침하는 결과로 세포내 DAG를 감소시키는 diacylglycerol kinase를 억제시켜 세포내 DAG를 증가시키는 약물인 R 59022(diacylglycerol kinase inhibitor)³¹는 muscarinic 수용체나 α_1 -adrenoceptor 자극처럼 또는 PMA처럼 마우스, 랫드 및 기니피크 갑상선에서 직접적으로 T_4 유리를 억제하였다. 이 R59022의 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단되어 갑상선에서 T_4 유리는 DAG 증가로 인해서 PKC가 활성화되어 억제됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 랫드에서 상기 두 수용체 자극으로 갑상선 호르몬 유리에 영향을 미치지 않음은 동물에 따라 수용체 분포차이로 추정되고 상기 두 수용체 분포가 없어도 궁극적으로 PKC에 의해 갑상선 호르몬 분비가 조절될 수 있음을 의미한다. 결론적으로 PI 신호전달계를 활성화시킬 수 있는 수용체 자극이나 직접적인 PKC 자극은 갑상선에서 호르몬 분비를 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

마우스와 기니피크 갑상선에서 α_1 -adrenoceptor와 muscarinic 수용체 자극에 의한 T_4 유리 억제효과는 PKC 활성화 결과임을 이전 연구논문에 의해 보고되었다. 이 연구에서는 마우스, 랫드 및 기니피크 갑상선에서 T_4 유리조절에 대한 PKC의 역할을 명확히 하기 위하여 T_4 유리에 대한 carbachol, methoxamine, phorbol myristate acetate (PMA) 및 R59022의 효과를 관찰하였다.

Adenylate cyclase 활성화제인 forskolin, 세포막을 투과하는 Cl-cAMP 및 phosphodiesterase 억제제인 IBMX는 TSH처럼 마우스, 랫드 및 기니피크 갑상선에서 T_4 유리를 촉

진하여 세포내 cAMP 증가에 의한 T₄ 유리가 촉진됨을 확인하였다. α₁-Adrenoceptor 효현제인 methoxamine은 마우스 갑상선에서 TSH에 의한 T₄ 유리를 억제하였다. 그러나 랫드와 기니피프 갑상선에서는 T₄ 유리를 억제하지 못했다. 그리고 muscarinic 수용체 효현제인 carbachol은 기니피프 갑상선에서 TSH에 의한 T₄ 유리를 억제하였으나 마우스와 랫드 갑상선에서는 T₄ 유리를 억제하지 못했다. 마우스나 기니피프에서 methoxamine나 carbachol에 의한 T₄ 유리 억제효과가 각각의 길항제인 prazosin, atropine 또는 선택적 M₁-, M₃-길항제로 차단되었다. 추가적으로 마우스와 기니피프 갑상선에서 methoxamine이나 carbachol에 의한 T₄ 유리 억제효과가 PKC 억제제인 staurosporine으로 차단되었다. 특징적으로 PKC 활성화제인 PMA와 diacylglycerol kinase 억제제인 R59022는 마우스, 랫드 및 기니피프 갑상선에서 TSH에 의한 T₄ 유리를 억제하였다. 이러한 억제효과 역시 staurosporine으로 차단되었다. 상기 결과에 의하면 갑상선에서 수용체 자극이나 diacylglycerol 활성화는 PKC에 의존적인 기전을 경유하여 T₄ 유리를 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 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.
- 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.
- Maayan ML, Volpert EM, From A. Acetylcholine and norepinephrine: Compared actions on thyroid metabolism. *Endocrinology*, 112:1358-1362, 1983.
- Muraki T, Uzumaki H, Nakatate T, *et al.* Involvement of α₁-adrenergic receptors in the inhibitory effect of catecholamine on the thyrotropin-induced release of thyroxine by the mouse thyroid. *Endocrinology*, 110:51-54, 1982.
- 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*, 130:97-980, 1985.
- Raspe E, Dumont JE. Control of the dog thyrocyte plasma membrane iodide permeability by the Ca²⁺-phosphatidylinositol and adenosine 3',5'-monophosphate cascades. *Endocrinology*, 135:986-995, 1994.
- Dumont JE. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm*, 29:287-412, 1971.
- Oda Y, Tajima K, Mori-Tanaka M, *et al.* α₁-Adrenergic regulation of thyrotropin-stimulated release of 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine from perfused mouse thyroid. *J Endocrinol Invest*, 14:867-873, 1991.
- 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.
- Kim HH, Kim JS. Effects of muscarinic receptor stimulation on the thyrotropin-induced thyroxine release in the guinea pig thyroid. *Korean J Vet Res*, 39:55-61, 1999.
- Unger J, Ketelbant P, Erneux C, *et al.* Mechanism of cholinergic inhibition of dog thyroid secretion *in vitro*. *Endocrinology*, 114:1266-1271, 1984.
- 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.
- Mills I, Sherwin JR. A comparison of the mechanism of α-adrenergic inhibition of thyrotropin-stimulated adenosin 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.
- 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.
- 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.
16. Maayan ML, Debons AF, Krinsky I, *et al.* Inhibition of thyrotropin- and dibutyryl cyclic AMP-induced secretion of thyroxine and triiodothyronine by catecholamines. *Endocrinology*, 101:284-291, 1977.
 17. 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 dibutyryl 3',5'-adenosine monophosphate on the turnover of phospholipids in isolated cells from pig thyroid. *Endocrinology*, 87:854-863, 1970.
 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. 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.
 20. Maayan ML, Sellitto RV, Volpert EM. Dopamine and L-dopa: Inhibition of thyrotropin-stimulated thyroidal thyroxine release. *Endocrinology*, 118:632-636, 1986.
 21. 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.
 22. Sherwin JR, Mills I. Epinephrine inhibits thyrotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cat thyroid tissue. *Endocrinology*, 106:28-34, 1980.
 23. Philp NJ, Grollman EF. Thyrotropin and norepinephrine simulate the metabolism of phosphoinositides in FRTL-5 thyroid cells. *FEBS Lett*, 202:193-197, 1986.
 24. 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.
 25. 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.
 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. 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.
 28. 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.
 29. Berridge MG, Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315-321, 1984.
 30. 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.
 31. Cockcroft S, Baldwin JM, Allan D. The Ca^{2+} -activated polyphosphoinositide phosphodiesterase of human and rabbit neutrophil membrane. *Biochem J*, 221:477-482, 1984.