

Neuroblastoma 세포의 생존과 분화에 미치는 retinoic acid, thyroid hormone, 및 hydrocortisone의 작용

이경은* · 배영숙

이화여자대학교 의과대학 약리학교실

Effect of Retinoic Acid, Thyroid Hormone and Hydrocortisone on Viability and Differentiation in SK-N-SH Neuroblastoma Cell Lines

Kyungeun LEE* and Youngsook PAE

Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, 158-710, KOREA

(Received August 5, 2000; accepted December 5, 2000)

Abstract – The effects of the members of the same nuclear receptor superfamily (all-trans retinoic acid (RA), thyroid hormone(T3) or hydrocortisone) on proliferation and differentiation in the SK-N-SH neuroblastoma (NB) cell lines were studied. NB cells were treated with RA, T3, or hydrocortisone at concentration of 10^{-6} M or 10^{-8} M for 3 days or 7 days. RA induced concentration- and time-dependent morphologic differentiation(neurite outgrowth and microtubule-associated protein expression) and growth inhibition in NB cells. Treatment of 10^{-6} M T3 for 7 days increased viability and differentiation of NB cells. Treatment of 10^{-6} M hydrocortisone for 7 days increased viability of NB cells. Although these three effectors are members of the same receptor superfamily, the regulation of brain development may be carried out in a different manner.

Key words □ Neuroblastoma, Retinoic acid, Thyroid hormone, Hydrocortisone, Viability, Neurite outgrowth, Microtubule-associated protein

신경아세포종(neuroblastoma; NB)은 소아에 주로 발생하는 신경내분비계 종양으로 미분화 세포 형질(phenotype)과 나쁜 예후를 특징으로 한다. NB는 신경륜(neural crest)에서 기인하고 종종 양성 신경절신경종(benign ganglioneuromas)으로 분화함으로써(Cushing와 Wollbach, 1927) 자연적인 퇴화를 보이기도 한다(Grisoni, 1973; Knudson와 Meadows, 1980; Hass, 1988; D'Angio 등, 1971). NB는 사람에게 발생하는 종양 중에서 자연적인 퇴화율이 가장 높으나(Hass, 1988) 반면에 골수로 쉽게 전이되므로 예후가 매우 나쁘다(Evans 등, 1987). 예후는 임상상태, 전이여부, 그리고 암조직의 세포분자적 특성에 달려있다(De Bernarie 등, 1987). 예를 들어 IV단계 전이성 NB의 5년 생존률은 20% 정도이며(Philip 등, 1991) 악성의 정도는 NB 세포의 분화 능력과 연관이 있다고 한다(Tanaka, 1994; Ikegari 등, 1994). NB 치료에는 수술 및 골수이식을 동반한 항암제 투여 등 다양한 시도가 이루어지고 있지만 대부분의 경우에 예후가 나쁜 집단은 평균 생존률이 1-2년 밖에 되지 못한다(Sawaguchi 등, 1990; Cheung과 Heller, 1991; Bowman 등, 1991). 따라서 NB 세포의 성장을

억제하고 분화를 유도할 수 있는 인자를 밝히는 것은 치명율이 높은 NB 치료를 위하여 필수적이다.

Retinoic acid(RA)는 vitamin A 유도체 중 retinoids에 속하는 작은 지방용해성 물질로서 배자 발달(embryonal development)에 중요한 역할을 담당하여 “a developmental signalling molecule”로 불리는데(Summerbell과 Maden, 1990) 특히 사지(limb) 발달 및 재생(regeneration)에 큰 영향을 미친다고 한다(Maden, 1982; Tickle 등, 1982). Retinoids는 정상 상피세포의 성장, 분화, 세포교환, 운동, 시력 및 영양 등 다양한 생물학적 현상에 관여한다고 알려져 있으며(Summerbell과 Maden, 1990) 또한 유방암, 자궁경부암, 백혈병 및 흑색종 등 다양한 사람의 종양세포에서 직접적인 성장억제 효과를 나타내는데(Lotan, 1980) 특히 생체 외에서 사람 흑색종세포의 멜라닌형성을 자극한다고 한다(Meyskens와 Salmon, 1979; Meyskens와 Fuller, 1980; Lotan과 Lotan, 1980). 흑색종에 대한 이러한 효과는 흑색종과 마찬가지로 신경륜에서 기인한 종양 즉, NB에 retinoid가 효과를 미칠 수 있을 것이라고 암시한다(Botterstein, 1979). 또한 사람의 뇌에서 RA 수용체가 발견되고 또한 세포질 내에서는 RA 결합 단백질(CRABP)이 고농도로 존재하며

*To whom correspondence should be addressed.

(Ong 등, 1982) 최근 닭의 척수를 배양한 실험에서 RA가 내인성으로 생성, 유리됨이 보고되므로 RA가 신경계에 어떠한 작용을 나타낼 수 있을 것이라고 생각된다.

RA의 작용은 세포내에 존재하는 2가지 종류의 단백질에 의하여 매개되는데 그 하나는 세포질에 위치하며 RA와 결합하는 단백질(cellular RA-binding protein I & II: CRABP I & II)이고 (Bailey와 Siu, 1988; Giguere 등, 1990; Kitamoto 등, 1988) 다른 하나는 세포내에 존재하는 RA 수용체로서 vitamin D 또는 갑상선 호르몬(thyroid hormone; T3) 등과 함께 스테로이드 호르몬 수용체 superfamily에 속한다(Brand 등, 1988; de Tbe 등, 1989; Giguere 등, 1987; Petkovich 등, 1987; Zalent 등, 1991; Leid 등, 1992).

T3과 스테로이드 호르몬도 신경세포(Aizenman 등, 1986; Aizenman과 De Vellis, 1987; Chaudhury와 Sarkar, 1983; Grave, 1977; Shanker 등, 1985), 신경교 세포(Aizenman과 De Vellis, 1987) 및 oligodendrocyte(Cabacungan 등, 1991; Saneto와 de Vellis, 1985; Shanker 등, 1985; Stephen과 Pieringer, 1984)의 분화를 촉진시킬 수 있다고 한다. 포유류의 중추신경계의 기능적 성숙이 일어나기 위하여 특정 발달시기, 즉 myeline 생성시기(McIlwain과 Buchelard, 1971)에 T3의 존재를 필요로 하며(Ford와 Cramer, 1977) 출생후 신생아의 갑상선 상태는 myelination의 과정에 영향을 미친다. 그러나 T3는 중추신경계의 정상적인 형성에 필수적임에도 불구하고 T3가 신경세포의 증식과 분화에 미치는 영향 및 기전에 대해서 분명하게 알려진 것이 없다. 한편 어린 동물에 cortisol을 투여하면 myelination이 지연되고(Field, 1955; Howard, 1965; Noguchi, 1982) 뇌세포 수 감소가 일어나는데(Cotterrell 등, 1972; Howard, 1965) 이는 고농도의 cortisol이 뇌하수체에서 성장 호르몬 유리를 억제함으로써 초래된다고 한다(Noguchi 등, 1982). 그러나 cortisol의 이러한 효과가 스테로이드 호르몬의 직접효과인지 단순히 성장호르몬을 통한 간접적인 효과인지는 아직 분명하지 않다.

RA에 관한 다양한 실험에 의하면 RA는 생체내 또는 생체외에서 NB 세포의 성장을 억제하고 분화를 촉진시킨다고 한다(Sidell, 1982; Abemayor 등, 1990; Reynolds 등, 1991). 그러나 동일 수용체 계열에 속하는 T3 및 스테로이드 호르몬은 NB 세포의 성장 및 분화에 어떤 영향을 미치는지 잘 알려져 있지 못하다. 따라서 이번 실험에서는 미분화 상태인 NB 세포를 배양하고 동일 수용체 계열에 속하는 RA, T3 또는 스테로이드 호르몬을 투여하고 나타나는 성장 및 분화를 비교 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 약물 투여

사람 NB 세포주(cell line)인 SK-N-SH(HTB 11, ATCC,

Rockville, Maryland)를 10% 우태아혈청(Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 0.1M Sodium pyruvate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 및 1% non-essential amino acid(Gibco BRL)를 포함하는 MEM (Minimum essential medium, Gibco BRL) 배양액에서 5% CO₂, 37°C 및 포화습도 하의 항온기(Forma Scientific Inc., Marietta, OH)에서 배양하였다. 배양액은 2일에 한번씩 새로운 영양액으로 교체하였다. 일상적인 계대배양을 위하여 0.05%(w/v) trypsin/EDTA(Gibco BRL)가 포함된 Dulbecco's PBS를 사용하여 세포를 수거하였다. 수거된 세포를 poly-L-lysine(10 µg/ml, Sigma)이 도포된 배양접시(Falcon, Franklin lakes, NJ)에 심어주고 24시간 후 all-trans retinoic acid(RA; Sigma), water soluble hydrocortisone(Sigma) 및 갑상선 호르몬(T3; Sigma)을 10⁻⁶M과 10⁻⁸M의 농도로 투여하였다. T3와 hydrocortisone은 배양액에 녹여 투여하였으며 RA는 95% ethanol에 10⁻²M stock 용액을 만들어서 deep freezer에 분주 보관하였다가 실험 직전에 배양액으로 희석하여 사용하였다. 최종 ethanol 농도는 0.1%(v/v)를 넘지 않도록 하였으며 대조군에는 0.1%(v/v) ethanol을 투여하였다. 이러한 ethanol 농도는 NB 세포의 성장 및 분화에 영향을 미치지 않았다.

세포 생존율 측정

NB 세포의 성장에 미치는 시험물질의 영향을 알아보기 위하여 poly-L-lysine이 도포된 25cm² 배양용기에 10⁶/ml 밀도로 세포를 심고 5 ml의 배양액을 넣어 주었다. 세포를 심어 준 다음 날 배양액을 시험물질이 함유된 배양액으로 교체하였고 2일에 한번씩 시험물질이 함유된 새로운 배지로 교환해 주었다. 약물 투여 3일 및 7일째에 trypsin/EDTA 0.05%(Gibco BRL)를 사용하여 세포를 수거한 후 hemocytometer로 세포수를 계산하였다. 세포 생존율은 trypan blue exclusion 방법으로 측정하였다.

Neurite outgrowth 측정

시험물질이 NB 세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 poly-L-lysine이 도포된 60mm 배양용기에 10⁵/ml 밀도로 세포를 심고 1 ml의 배양액을 넣어 주었다. 세포를 심어 준 다음 날 배양액을 시험물질이 함유된 배양액으로 교체하였고 2일에 한번씩 시험물질이 함유된 새로운 배지로 교환해 주었다. 시험물질 처리 후 2일과 5일째에 배양접시 당 3-4개의 시야를 무작위로 골라 200배 현미경(Olympus, Shibuya-ku, Tokyo) 하에서 동일 부위를 촬영하고 negative film을 slide projector로 비추어 다른 세포와 연결되지 않고 세포돌기가 잘 발달된 신경세포를 선택하였다. 선택된 신경세포가 있는 screen 위치에 흰 종이에 대고 신경세포의 모양을 그대로 그린 후 실을 이용하여 각 신경돌기의 길이를 측정하고 선택된 하나의 신경세포가 가진 모

든 신경돌기의 합을 구한 뒤 현미경 및 slide projector에 의해 확대된 비율로 환산하여 μm 로 표시하였다.

MAP(Microtubule Associated Protein)의 분리 및 정량

NB 세포 분화의 또 다른 지표로서 MAP 단백질 발현 정도를 검색하였다. Poly-L-lysine이 도포된 25 cm^2 배양용기에 $10^6/\text{ml}$ 밀도로 세포를 심고 5 ml의 배양액을 넣어 주었다. 세포를 심어 준 다음 날 배양액을 시험물질이 함유된 배양액으로 교체하였고 2일에 한번씩 시험물질이 함유된 새로운 배지로 교환해 주었다. 약물 처리 후 3일과 7일째에 cell scraper를 이용하여 세포를 회수하고 원심분리하였다. 140 mM NaCl, 0.8 mM EDTA, 10 mM Tris(pH 8.0), 0.1 mM PMSF(Phenyl methyl sulfanyl fluoroid, Sigma)으로 조성된 ice-cold extraction buffer를 세포에 첨가하여 부유시킨 다음 원심분리 하고 MES buffer(80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 100 mM MES(pH 6.8), 0.1 mM PMSF)를 첨가하여 재부유시켰다. 부유액을 -70°C 에서 30분간 반응시키고 실온에서 해동시킨 후, 원심분리하여 얻은 상층액에 0.2% β -Mercaptoethanol과 0.75M NaCl을 첨가하고 5분간 가열한 후, 얼음에서 식히고 원심분리하여 상층액을 취하였다.

얻어진 단백질 함량은 Bradford(1976)의 방법으로 흡광도 595 nm에서 spectrophotometry(Beckman, Fullerton, CA)를 이용하여 분석하고 Bovine serum albumin(Bio-Rad, Hercules, California)으로 함량을 표준화하였다.

MAP의 immunoblotting

정량된 단백질을 5% SDS/PAGE gel에서 전기영동한 후, nitrocellulose membrane (Pharmacia biotech, San Francisco, California)에 transfer하였다. Blocking buffer(5% skim milk in TBS buffer, DIFCO Laboratories, Detroit, MI)로 밤새 반응시킨 후, monoclonal anti-MAP protein(Boehringer

Mannheim, Germany)에서 반응시키고 TBS로 세척하였다. 다시 anti-mouse IgG-POD monoclonal antibody(Upstate, Lake Placid, NY)에서 반응시킨 후 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL; Amersham-Pharmacia bio-tech, Buckinghamshire, UK) 방법으로 X-ray film(Fuji Photo Film Co. Ltd, Japan)에 노출시켜 band를 가시화시키고 densitometry(Pharmacia, Uppsala, Sweden)로 강도를 측정하였다.

자료분석

실험자료는 평균 \pm 표준오차로 표현하였으며 Macintosh 컴퓨터의 Statview 4.01 프로그램으로 분석하였다. 실험군 간의 비교를 위하여 분산분석(analysis of variance)을 이용하였고, 각 군간의 차이는 Dunnett 법으로 비교하였다.

결 과

NB 세포 생존율(Table 1)

NB 세포 성장에 미치는 RA, T3, 및 스테로이드 호르몬의 영향을 알아보기 위하여 trypan blue exclusion 방법으로 생존율을 측정하였다.

RA를 10^{-8}M 농도로 투여하였을 때, 3일째에는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았으나 7일째에는 생존율이 64.9%(p value=0.0142)로 감소하였다. RA 10^{-6}M 투여시에는 3일째(47.3%; p value 0.0056)와 7일째(31.4%; p<0.001)에서 모두에서 현저한 생존율 감소를 나타내었다.

T3 투여 3일째에 10^{-8}M 및 10^{-6}M 모두 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 의미는 없었다. 투여 7일째에는 10^{-8}M 투여는 120.5%의 세포 생존율 증가 경향을 나타내었으며 10^{-6}M 의 경우는 140.5%(p value=0.0115)로 상당한 생존율 증가를 나타내었다.

Hydrocortisone의 경우에 갑상선 호르몬 투여시와 마찬가지로

Table I. Cell viability and neurite outgrowth of human neuroblastoma cells after exposure to retinoic acid, thyroid hormone, or hydrocortisone for 2 days or 5 days

Drugs used	Viability		Neurite outgrowth	
	2days	5days	2days	5days
Control	99.3 \pm 16.3	101.5 \pm 8.6	102.1 \pm 8.8	117.9 \pm 5.8
R(10^{-8}M)	93.6 \pm 9.8	64.9 \pm 12.0*	153.2 \pm 26.6*	175.8 \pm 10.3***
R(10^{-6}M)	47.3 \pm 12.3**	31.4 \pm 4.3***	214.6 \pm 17.7***	243.6 \pm 13.0***
T(10^{-8}M)	118.6 \pm 7.9	120.5 \pm 11.6	113.0 \pm 11.6	130.2 \pm 8.3
T(10^{-6}M)	124.7 \pm 16.7	140.5 \pm 18.6*	99.2 \pm 13.3	153.3 \pm 7.4**
H(10^{-8}M)	110.3 \pm 7.9	122.8 \pm 13.0	113.2 \pm 11.9	111.8 \pm 8.1
H(10^{-6}M)	126.7 \pm 24.3	146.6 \pm 16.8*	91.7 \pm 8.1	126.3 \pm 6.4

Results are expressed as the relative percent of the control group (mean \pm S.E).

R: retinoic acid, T: thyroid hormone, H: hydrocortisone

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control (Dunnett method for multiple contrast was used.).

지로 세포 생존율의 증가 양상을 나타내었지만 투여 7일째 $10^{-6}M$ 을 투여한 경우(146.6%; p value=0.04)에만 의의가 있었다.

Neurite outgrowth(Table I)

RA, T3, 및 스테로이드 호르몬이 NB 세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neurite outgrowth를 측정하였다.

RA $10^{-8}M$ 투여시 neurite outgrowth가 2일째에 147.9%(p value=0.0052), 5일째에는 166.8%(p<0.0001)로 증가되었으며 $10^{-6}M$ 투여시 2일째에 199.2%(p<0.0001), 5일째에는 227.2%(p<0.0001)로 시간 경과 및 농도에 따라 더욱 증가되었다.

T3 $10^{-8}M$ 투여 2일째 및 5일째, 그리고 $10^{-6}M$ 투여 2일째에는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았으나 $10^{-6}M$ 투여 5일째에는 140.8% (p<0.0001)로 neurite outgrowth가 크게 증가되었다.

Hydrocortisone 투여의 경우에도 $10^{-6}M$ 투여 5일째에 118.4%(p value=0.0126)로 neurite outgrowth가 약간 증가되었을 뿐이었다.

MAP(Microtubule Associated Protein)(Fig. 1)

RA, T3, 및 스테로이드 호르몬이 NB 세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 또다른 지표로서 MAP의 변동을 측정하였다.

RA 투여시 모든 경우에 MAP의 발현이 증가하였고 T3 투여시 $10^{-6}M$ 을 5일간 투여하였을 때만 MAP 발현이 증가하였으며 hydrocortisone 투여시에는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다.

고 찰

NB는 신경릉에서 기인하고 교감신경계에서 발생하는 흔한 소아기 두개강외 악성 종양이다(De Bernardi 등, 1987). 비록 NB 세포는 common transformed progenitor로부터 기인되지만(Tsokos 등, 1987) neuronal, neurilemmal, epithelioid, 및 melanocytic 등 다양한 형질을 표현한다(Tsokos 등, 1987; Biedler 등, 1973). 모든 형질은 자발적으로 또는 조직 배양 조건에 따라 생체외에서 상호전환이 가능하다(Ross 등, 1983; Ciccarone 등, 1989).

NB 세포주는 신경세포에서 발현되는 것과 동일한 단백질(예; neuronal-specific enolase(NSE) 또는 neurofilament), 신경활성인자(neuroactive factor)의 수용체 및 신경전달물질의 생합성에 필요한 효소(예; choline acetyltransferase, tyrosine hydroxylase, dopamine-β-hydroxylase) 등을 생체외에서 합성할 수 있으므로(Pahlman 등, 1990, Sadee 등,

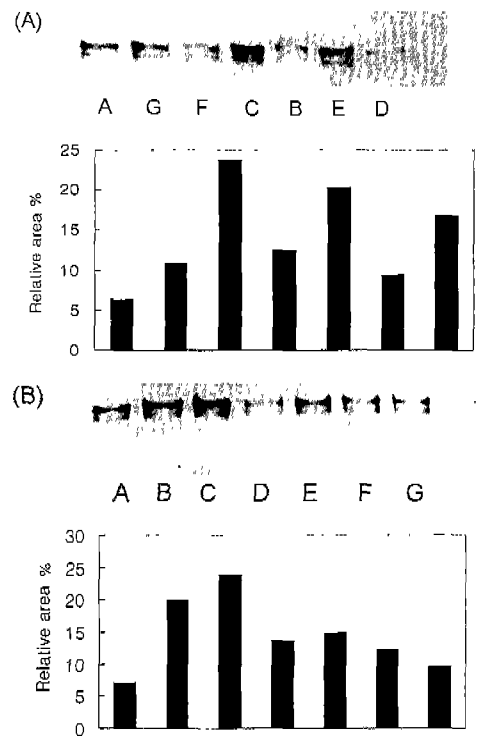


Fig. 1. Immunoblot analysis of microtubule-associated protein (MAP). (A): Immunoblot analysis of MAP protein after drug treatment for 3 days. (B): Immunoblot analysis of MAP protein after drug treatment for 7days.Lane A: Control, Lane B: Retinoic acid $10^{-8}M$, Lane C: Retinoic acid $10^{-6}M$, Lane D: Thyroid hormone $10^{-8}M$, Lane E: Thyroid hormone $10^{-6}M$, Lane F: Hydrocortisone $10^{-8}M$, Lane G: Hydrocortisone $10^{-6}M$

1987; Ciccarone 등, 1989; Biedler, 1978; Serra 등, 1988; Mei 등, 1989), 사람 신경세포를 연구하는 좋은 모델로서 널리 사용되어져 왔다(Piacentini 등, 1992; Hanada 등, 1993; Kruman 등, 1993; Pahlman 등, 1990). 또한 NB 세포는 여러 자연적인 또는 화학적 인자에 의해 생체외에서 미분화상태에서 분화된 신경세포로 분화가 유도될 수 있으며(Sidell, 1982; Abemayor와 Sidell, 1989) 분화된 NB 세포는 더 이상 암을 유발시키지 않으므로 NB 세포를 이용한 연구는 신경세포의 성장, 사멸 및 분화 기전을 밝히고 종양의 치료제 개발에 응용될 수 있다.

Retinoids, 특히 RA는 실험적 암발생과정에서 antipromotor agents로서 작용하며(Moore, 1967) 암환자에서 극적인 항암효과를 나타내므로 RA가 치료적인 역할을 담당할 가능성에 대한 관심이 모아지고 있다(Smith 등, 1992a). 본 연구에서 RA 투여는 NB 세포의 생존율을 농도 및 투여기간 의존적으로 감소시켰다. RA는 NB 세포를 G1 phase에 정체시킴으로써(Thiele 등, 1985; Goplen 등, 1994) 세포 분열을 억제하거나 apoptosis를 유도하여(Ponzoni 등, 1995; Hanada 등, 1993; Kruman 등, 1993; Goldstein 등, 1991;

Jensen 등, 1992) 생체내 또는 생체외에서 NB 세포증식 및 성장을 억제함으로써 항암 효과를 나타낸다고 한다(Sidell, 1982; Abemayor 등, 1990; Reynolds 등, 1991).

생리적 농도에서 RA는 주로 신경세포의 분화를 촉진하여 amphibian spinal cord에서 neurite outgrowth를 증가시키며(Hunter 등, 1991) 일부 NB 세포주에서 extensive neuritic process network를 형성하고(Thiele 등, 1985) 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다(Sidell, 1982). RA에 의한 분화촉진에는 p145TrkB 유도에 의해 매개되는데 brainderived neurotrophic factor를 구조적으로 발현하는 세포에서 TrkB ligand는 TrkB 신호전달경로를 활성화시켜 neurite extension 및 말초 교감신경 분화와 연관된 몇몇 생화학적, 분자적, 전기생리적 특성을 유도한다고 한다(Sidell, 1982; Kaplan 등, 1993). 본 연구에서 RA 투여는 농도 및 기간 의존적으로 neurite outgrowth를 증가시켰으며 분화된 신경세포의 표지인자인 microtubule-associated protein(MAP) 단백질 발현을 또한 증가시켰다. NB 세포 분화에 있어서 MAPs는 neurite outgrowth의 주된 조절인자라고 한다(Ponzoni 등, 1992). RA 투여는 특히 성숙 신경세포에서 특징적으로 표현되는 인산화 형태의 고분자량 neuro-filament 단백질 발현을 또한 유도한다(Shaw와 Weber, 1982; Carden 등, 1987; Ponzoni 등, 1995).

이처럼 RA 투여는 NB 세포주의 과도한 성장을 억제시키고 성숙한 신경세포로의 분화를 유도함으로써 NB에 대한 항암 치료제로서의 가능성을 나타내었으나 반면에 고농도의 RA 투여는 생체내에서 오히려 신경계 최기형 작용과 같은 독작용을 나타내는(Lammer 등, 1985) 등 높은 독성을 나타낸다고 알려져 있어 전신적인 투여가 제한을 받고 있다(Smith 등, 1992a; Smith 등, 1992b). 본 연구에서 소량(10^{-8} M)의 RA는 투여 기간에 따라 정도의 차이는 있으나 NB 세포의 생존율을 크게 저하시키지 않으면서 NB 세포의 분화를 촉진하였고 고농도의 RA(10^{-6} M)는 분화 촉진과 동시에 세포 생존율을 크게 저하시켰다. 따라서 RA가 NB의 항암제로서 정착되기 위해서는 생체내에서 독작용을 최소화하는 범위에서 분화를 촉진하는 농도를 찾는 것이 필요하다고 하겠다.

본 연구에서 저 농도, 단시간의 T3 투여는 NB 세포의 생존율, neurite outgrowth, 및 MAP 단백질 발현에 별다른 영향을 미치지 않았으나 10^{-6} M을 7일간 투여시에는 생존율 및 분화가 모두 촉진되었다. T3의 역할은 수용체 이성체인 α , β 의 유전자에 의한 핵수용체와 결합하여 시작된다(Lazer, 1993). $\beta 1$ 이성 수용체를 과발현(overexpression)하는(Lebel 등, 1994) NB 세포(N2 α - β 세포)에 T3를 투여하면 세포주기가 G0/G1기에 정지되어 세포증식이 억제되며(Lebel 등, 1994; Puymirat, 등, 1995) 이러한 작용은 일차신경세포배

양이나 형성중인 뇌에서도 유사하다(Dassault와 Ruel, 1987; Puymirat, 1992). T3는 유사분열단계에서 신경아세포(neuroblast)로 진행하게 하는 시계와 같은 역할을 하고 이러한 영향은 핵수용체 $\beta 1$ 의 역할이 $\beta 1$ 전사체가 신경아세포가 증식하는 곳에서 발견되는 것으로 증명된다. 한편 생체내에서 주산기 동안 갑상선 호르몬의 결핍은 myeline 생성 과정을 지연시키고 신생아 갑상선 기능항진증은 이 과정을 촉진시킨다(Balazs 등, 1969; Hamburgh, 1968; Walravens와 Chase, 1969). 갑상선 호르몬은 sulfo-transferase를 자극하여 sulfolipid합성을 촉진하고(Bhat 등, 1981) oligodendroglia 내에 myelin-associated sulfolipid를 축적시킨다.

NB 세포주는 부신 수질의 형태발생(morphogenesis)동안 분화되지 못하고 정체된 부신 신경아세포(neuroblast)에 해당한다(Cooper 등, 1989). 이러한 Sympathoadrenal precursor cell이 교감신경세포 또는 chromaffin 세포로 분화되는 때는 여러 인자와 호르몬이 관계되는데 glucocorticoids는 pre-cursor 세포를 chromaffin 세포로 분화시킨다(Cooper 등, 1989). 본 연구에서 hydrocortisone 투여는 10^{-6} M로 7일간 투여시에만 생존율을 증가시켰고 neurite outgrowth는 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 의미는 없었다. Casulari 등에 의하면 $10 \mu\text{M}$ 의 dexamethasone 투여는 SK-N-SH 세포주의 증식 또는 생존을 증가시킨다. 한편으로는 cortisol 투여는 뇌세포 수를 감소시키며(Cotterrell 등, 1972; Howard, 1965) myelination이 지연된다(Field, 1955; Howard, 1965; Noguchi, 1982). 또한 hydrocortisone은 aryl-sulfatase A를 감소시켜 sulfolipid의 분해를 억제시킴으로써 oligodendroglia 내에 myelin-associated sulfolipid를 축적시킨다고 하는 보고도 있다(Stephens와 Pieringer, 1984).

RA, 갑상선 호르몬 및 스테로이드 호르몬은 동일한 세포내 수용체 계열에 속하므로 뇌 발달 과정에서 유사한 작용을 나타낼 것으로 생각할 수 있으나 본 연구 결과에 의하면 이들 세 물질은 정도의 차이는 있지만 신경세포 분화는 모두 촉진시켰으나 신경세포 생존율에 대해서는 상반된 결과를 나타내었다. 따라서 동일 수용체 계열에 속하더라도 신경세포 발달에 미치는 영향은 서로 다를 수 있음을 알 수 있었다. 향후 이들 세 물질이 신경세포 생존 및 분화에 미치는 기전적인 차이를 연구하는 것이 더 필요할 것으로 생각되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 이화여자대학교 교내 연구비 및 1999년도 보건복지부 뇌의약학 연구개발사업 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Abemayor E., Chang B. and Sidell N. (1990). Effects of retinoic acid on the in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* **55**, 1-5.
- Abemayor E. and Sidell N. (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ Health Perspect.* **80**, 3-15.
- Aizenman, Y. and De Vellis (1987). Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *J. Brain Res.* **414**, 301-308.
- Aizenman, Y., Weichsel. M. E. and De Vellis J. (1986). Change in insulinal transferrin requirements of pure brain neuronal cultures during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2263-2266.
- Bailey, J. S. and Siu, C. H. (1988). Purification and partial characterization of a novel binding protein for retinoic acid from neonatal rat. *Biol. Chem.* **263**, 9326-9332.
- Balazs, R., Brooksbank, B. W., Davison, A. N., Eayrs, J. T. and Wilson, D. A. (1969). The effect of neonatal thyroidectomy on myelination. *Brain Res.* **15**, 219-232.
- Bhat N. R., Subba Rao G. and Pieringer R. A. (1981). Investigation on myelination in vitro: regulation of sulfolipid synthesis by thyroid hormone in cultures of dissociated brain cells from embryonic mice. *J. Biol. Chem.* **256**, 1167-1171.
- Biedler J. L., Helson L. and Spengler B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **33**, 2643-2652.
- Bottenstein, J., Mather, J. and Sato, G. (1979). Growth of neuroepithelial-derived cell lines in serum-free hormone-supplemented media. Cold Spring Harbor Conf. *Cell Prolif.* **6**, 531-544.
- Bowman, L. C., Hancock, M. L., Santana, V. M., Hayes, F. A., Parham, D. M., Furman, W. L., Rao, B. N., Green, A. A. and Crist, W. M. (1991). Impact of intensified therapy on clinical outcome in infants and children with neuroblastoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1988. *J. Clin. Oncol.* **9**, 1599-1608.
- Brand, N., Petkovich, M. and Krust, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* **332**, 850-853.
- Cabacungan E., Mittal R. and Ved H. S. (1991). Degrees of cooperativity between triiodothyronine and hydrocortisone in their regulation of the expression of myelin basic protein and proteolipid protein during brain development. *Dev. Neurosci.* **13**, 74-79.
- Carden M. J., Trojanowsky J. Q., Schlaepfer W. W. and Lee VM-Y. (1987) Two stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J. Neurosci.* **7**, 3489-3504.
- Chaudhury, S. and Sarkar, P. K. (1983). Stimulation of tubulin synthesis by thyroid hormone in the developing rat brain. *Biochem. Biophys. Acta.* **763**, 93-98.
- Cheung, N-K. V. and Heller, G. (1991). Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **9**, 1050-1058.
- Ciccarone V., Spengler P. A., Meyers M. B., Biedler J. L. and Ross R. A. (1989) Phenotypic diversifications in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* **49**, 219-225.
- Cooper M. J., Hutchins G. M., Cohen P. S., Helman L. J., Mennie R. J. and Israel M. A. (1989). Human neuroblastoma tumor cell lines correspond to the arrested differentiation of chromaffin adrenal medullary neuroblasts. *Cell Growth Differ.* **3**, 149-159.
- Cotterrell, M., Balazs, R. and Johnson, A. L. (1972). Effects of corticosteroids on the biochemical maturation of rat brain; postnatal cell formation. *J. Neurochem.* **19**, 2151-2167.
- Cushing H. and Wolbach B. B. (1927). The transformation of a malignant paravertebral sympatheticoblastoma into a benign ganglioneuroma. *Am. J. Pathol.* **3**, 203-207.
- D'Angio G. J., Evans A. E. and Koop C. E. (1971). Special pattern of widespread neuroblastoma with a favorable prognosis. *Lancet.* **1**, 1046-1049.
- De Bernardo B., Rogers D., Carli M., Madon E., Laurentis T., Bagnulo S., Di Tullio M., Paolucci G. and Pastore G. (1987). Localized neuroblastoma. *Cancer(Phila)* **60**, 1066-1072.
- De Bernardi, B., Rogers, D., Carli, M., Madon, E., De Laurentis, T. and Bagnulo, S. (1987). Localized neuroblastoma. *Cancer*, **60**, 1066-1072.
- De The, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A. (1989). Differential expression and ligand regulation on the retinoic acid receptor alpha and beta gene. *EMBO J.* **8**, 429-433.
- Dussault, J. H. & Ruel, J. (1987). Thyroid hormones and brain development. *Annu. Rev. Physiol.* **49**, 321-334.
- Evans, A. E., D'Angio, G. J., Propert, K., Anderson, J. and Hann, H. W. L. (1987). Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer* **59**, 1853-1859.
- Field, E. J. (1955). *J. Anat.* **89**, 201-208.
- Ford, D. H. and Cramer, E. B. (1977). In thyroid hormones and brain development (Grave GD ed.). Raven Press., New York, pp. 1-8.
- Giguer, V., Lyn, S., Yip, P., Siu, C-H. and Amin, S. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6233-6237.
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**, 624-629.
- Goldstein P., Ojcius D. M. and Young J. D. (1991). Cell death mechanism and the immune system. *Immunol. Rev.* **121**, 29-65.
- Goplen D. P., Brackman D. and Aksnes L. (1994). Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid on the proliferation and cell cycle phase distribution of neuroblastoma SK-N-SH cells. *Pediatric Hematol Oncol.* **11**, 173-179.

- Grave, G. D. (1977). *Thyroid Hormones and Brain Development*, Raven Press, New York.
- Grisoni, R. (1973). I tumore del sistema nervoso periferico e vegetativo. In: Bucalossi P, Veronesi U (eds), *Trattato di oncologia clinica. Casa Editrice Ambrosiana*, Milano, Italy, pp. 2407-2422.
- Hamburgh, M. (1968). An analysis of the action of thyroid hormone on development based on in vivo and in vitro studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* **10**, 198-213.
- Hanada M., Krajewski S., Tanaka S., Cazals-Hatem D., Spengler B. A., Ross R. A., Biedler J. L. and Reed J. C. (1993). Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **53**, 4978-4986.
- Howard, E. (1968). Reductions in size and total DNA of cerebrum and cerebellum in adult mice after corticosterone treatment in infancy. *Exp. Neurol.* **22**, 191-208.
- Hunter K., Maden M., Summerdell D., Eriksson U. and Holder N. (1991). Retinoic acid stimulates neurite outgrowth in the amphibian spinal cord. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3999-3670.
- Ikegaki, N., Katsumata, M. and Tsujimoto, Y. (1994). The expression and modulation of proteins associated with physiological cell death in neuroblastoma cells. In: Evans, A. E., Biedler, J. L., Brodeur, G. M., D'Angio, G. J. and Nakagawara, A. eds. *Advances in neuroblastoma research 4*. New York : Wiley-Liss Inc., pp117-122.
- Jensen L. M., Zhang Y. and Shooter E. M. (1992). Steady-state polypeptide modulation associated with nerve growth factor (NGF)-induced terminal differentiation and NGF deprivation-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* **267**, 19325-19333.
- Kaplan D. R., Matsumoto K., Lucarelli E. and Thiele C. J. (1993). Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Neuron* **11**, 321-331.
- Kitamoto, T., Momoi, T. and Momoi, M. (1988). The presence of a novel cellular retinoic acid-binding protein in chick embryos: purification and partial characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 1302-1308.
- Kruman II, Kostenko M. A., Gordon R. Y., Popov V. I. and Umansky S. R. (1993) Differentiation and apoptosis of murine neuroblastoma cells N1E115. *Biochem Biophys Res. Commun.* **191**, 1309-1318.
- Lammer E., J., Chen D., T., Hoar R. M., Agnisti, N. D., Bence P. J., Braun, J. T., Curry, C. J., Fernhoff P. M., Cnix A. W., Larr I. T. and Swvan P. S. (1985). Retinoic acid embryopathy. *New Engl. J. Med.* **313**, 837-841.
- Lazar, M. A. (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* **14**, 194-203.
- Lebel, J. M., Dusault J. H. and Puymirat, J. (1994). Overexpression of the beta 1 thyroid receptor induces differentiation in neuro-2a cells. *Proc. Nod. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2644-2648.
- Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 427-433.
- Lotan, R. (1980). Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **605**, 33-41.
- Lotan, R. and Lotan, D. (1980). Stimulation of melanogenesis in a human melanoma cell line by retinoids. *Cancer Res.* **40**, 3345-3350.
- Maden, M. (1982). Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* **295**, 672-675.
- McIlwain, H. and Bachelard, H. S. (1971). in *Biochemistry and the Central Nervous System*, Churchill Livingstone, London, p411.
- Mei L., Roeske W. R. and Yamamura H. (1989). The coupling of muscarinic receptors to hydrolysis of inositol lipids in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res.* **504**, 7-14.
- Meyskens, F. L. Jr. and Fuller, B. B. (1980). Characterization of the effects of different retinoids on the growth and differentiation of a human melanoma cell line and selected subclones. *Cancer Res.* **40**, 2194-2196.
- Meyskens, F. L. Jr. and Salmon, S. E. (1979). Inhibition of human melanoma colony formation by retinoids. *Cancer Res.* **39**, 4055-4057.
- Moore T. (1967). Effects of vitamin A deficiency in animals: Pharmacology and toxicology of vitamin A In: sebrillWH, Harris RS. eds. *The vitamins*. Vol 1. New York: Academic Press. pp 245-266.
- Noguchi, T., Sugisaki, T., Watanabe, M., Kohsaka, S. and Tsukada, Y. (1982). Factors contributing to the poor myelination in the brain of the snell dwarf mouse. *J. Neurochem.* **38**, 246-256.
- Pahlman S., Mamaeva S., Meyerson G., Mattsson M. E., Bjelfman C., Ortoft E. and Hammerling U. (1990). Human neuroblastoma cells in culture: A model for neuronal cell differentiation and function. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* **592**, 25-37.
- Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belong to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**, 444-450.
- Philip, T., Zucker, J. M., Bernard, P., Lutz, P., Bordigoni, P. and Plouvier, E. (1991). Improved survival at 2 and 5 years in the LMCE1 unselected group of 72 children with stage IV neuroblastoma older than one year of age at diagnosis : is cure possible in a small subgroup? *J. Clin. Oncol.* **9**, 1037-1044.
- Piacentini M., Annichiarico-petruzzelli M., Oliverio S., Piredda L., Biedler J. and Melino G. (1992). Phenotype-specific "tissue" transglutaminase regulation in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid: correlation with cell death by apoptosis. *In. J. Cancer* **52**, 271-278.
- Ponzoni M., Bocca P., Chiesa V., Decensi A., Pistoia V., Raffaghello L., Razzo C. and Montaldo P. G. (1995). Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: Apoptosis versus differentiation. *Cancer Res.* **55**, 853-861.
- Ponzoni M., Casalaro A., Lanciotti M., Montaldo P. G. and Cornaglia-Ferraris P. The combination of -interferon and

- tumor necrosis factor causes a rapid and extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **52**, 9331-939
- Puymirat, J. (1992). Thyroid receptors in the rat brain. *Prog. Neurobiol.* **39**, 281-294.
- Puymirat, J., Etonge-Mayer, P. and Dussault, J. H. (1995). Thyroid hormones stabilize acetylcholinesterase mRNA in neuro-2A cells that overexpress the beta 1 thyroid receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 30651-30656.
- Reynolds C. P., Kane D. J. and Einhorn P. A. (1991). Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Adv. Neuroblastoma Res.* **3**, 203-211.
- Ross R. A., Spengler B. A. and Biedler J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 741-747.
- Sadee W., Yu V. C., Richards M. L., Preis P. N., Schwab M. R., Brodsky F. M. and Biedler J. L. (1987). Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* **47**, 5207-5212.
- Saneto, R. P. and De Vellis. J. (1985). Characterization of cultured rat oligodendrocytes proliferating in a serum-free chemically defined medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3509-3513.
- Sawaguchi, S., Kaneko, M., Uchino, J., Takeda, T., iwafuchi, M., Matsuyama, S., Takahashi, H., Nakajo, T., Hoshi, Y., Okabe, I., Yokoyama, J., Nishihira, H., Sasaki, S., Sakurai, M., Sawada, T., Nagahara, N. and Tsuchida, Y. (1991). Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy. *Cancer(Phila.)* **66**, 1879-1887.
- Serra M. Mei L. Roeske W. R., Lui G. K., and Watson M. I. YH. (1988). The intact neuroblastoma cell (SH-SY5Y) exhibits high-affinity [³H]pirenzepine binding associated with hydrolysis of phosphatidylinositols. *J. Neurochem.* **50**, 1513-1521.
- Shanker, G., Amur, S. G. and Pieringer, R. A. (1985). Investigations on myelinogenesis in vitro. *Neurochem. Res.* **10**, 617-626.
- Shaw G. and Weber K. (1982). Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature (Lond)*. **298**, 277-279.
- Sidell N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* **68**, 589-593.
- Sidell N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *JNCI* **68**, 589-593.
- Smith M. A., Adamson P. C., Balis F. M., Feusner J., Aronson L., Murphy R. F., Horowitz M. E., Reaman G., Hammond G. D., Fenton R. M., Connaghan G. D., Hittelman W. N. and Poplack D. G. (1992a). Phase I and pharmacokinetic evaluation of all-trans-retinoic acid in pediatric patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* **10**, 1666-1673.
- Smith M. A., Parkinson D. R., Cheson B. D. and Friedman M. A. (1992b). Retinoids in cancer therapy *J. Clin. Oncol.* **10**, 839-864.
- Stephens J. L. and Pieringer R. A. (1984). Regulation of arylsulphatase A and sulphogactolipid turnover by cortisol in myelinogenic cultures of cells dissociated from embryonic mouse brain. *Biochem J.* **719**, 689-697.
- Summerbell, D. and Maden, M. (1990). Retinoic acid, a developmental signalling molecule. *Trends Neurosci.* **13**, 142-147.
- Tanaka, T. (1994). Ha-ras p21 in neuroblastoma: a new marker in prediction of patient outcome. In : Evans, A. E., Biedler, J. L., Brodeur, G. M., D'Angio, G. J. and Nakagawara, A. eds. *Advances in neuroblastoma research 4*. New York: Wiley-Liss Inc., pp275-280.
- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L. and Lee, J. (1982). *Nature (London)*. **296**, 564-566.
- Thiele C. J., Reynolds C. P. and Israel M. A. (1985) Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* **313**, 404-406.
- Tsokos M., Scarpa S., Ross R. and Triche T. J. (1987) Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix protein. *Am. J. Pathol.* **128**, 484-496.
- Walravens, P. and Chase, H. P. (1969). Influence of thyroid on formation of myelin lipids. *J. Neurochem.* **16**, 1477-1484.
- Zalent, A., Mendelsohn, C. and Kastner, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.* **10**, 71-81.