

감궁탕이 갑상선세포의 증식과 cAMP 축적에 미치는 영향

김미경 · 손윤희 · 남경수 · 손옥례 · 김철호¹ · 전병훈^{2*}

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구소,
1: 동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of Gangung-tang on Proliferation and cAMP Accumulation of Thyroid Cells

Mee Kyung Kim, Yun Hee Shon, Kyung Soo Nam, Ok Lye Son, Cheorl Ho Kim¹, Byung Hun Jeon^{2*}

Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center, Dongguk University,
1: Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abnormal thyroid cell proliferation has a very important role in hypothyroidism. Thyroid stimulating hormone (TSH) stimulates proliferation and maintains differentiated function in thyroid follicular cells. A functioning rat thyroid cell line (FRTL) was used to study the effect of Gangung-tang (GGT, Glycyrrhizae Radix, black beans, Angelicae Radix and Cnidii Rhizoma) on proliferation and cAMP accumulation of thyrocytes. Proliferation of cell was assessed by DNA synthesis and incorporation of [³H]thymidine into DNA. The concentration of cAMP was measured simultaneously with growth assessment. Extract of GGT (0.15~0.9 mg/ml) increased DNA synthesis in a dose-dependent manner. GGT at 0.6 (p<0.05) and 0.9 mg/ml (p<0.01) significantly increased [³H]thymidine incorporation. A comparable effect was observed with TSH. GGT also enhanced cAMP accumulation. These results indicate that GGT increases the proliferation of thyrocytes and may be considered a promising agent for the treatment of autoimmune thyroid disease.

Key words : thyrocyte, thyroiditis, DNA synthesis, [³H]thymidine incorporation, cAMP

서 론

갑상선 자가면역질환은 갑상선세포의 항원에 대한 세포성반응과 체액성반응으로 나타나는 질환으로 이러한 자가면역반응에 의하여 갑상선 자가면역질환인 하시모토갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis)에서는 갑상선기능저하증 (hypothyroidism)이 나타난다. 전 인구의 2%가 하시모토갑상선염을 가지고 있으며 중년여성에게서 많이 발생하는 장기특이 자가면역질환이다¹⁾. 갑상선세포의 파괴와 갑상선의 위축은 사람이나 실험동물의 갑상선기능저하증에서 나타나는 뚜렷한 특징이지만 그 기전에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 그러나 비정상 갑상선 세포의 증식은 갑상선관련 질환에 매우 중요한 역할을 하며 그것의 조절장애 (dysregulation)는 갑상선기능저하 (hypothyroidism), 갑상

선종, 갑상선암의 원인이 된다고 알려져 있다.

갑상선세포 증식의 조절분석은 생체에서 갑상선세포의 증식 조절에 중요하다고 알려진 cAMP를 통한 TSH의 세포 증식효과에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 그러므로 TSH나 여러 성장인자들이 갑상선세포 배양시스템 (쥐의 갑상선세포주인 WRT, PC C13이나 쥐, 개와 사람의 갑상선의 primary culture)에서 세포주기진행 (cell cycle progression)과 세포증식에 미치는 영향에 대한 연구들이 있었다^{2,3)}.

감궁탕 (Gangung-tang, GGT)은 감초, 흑두, 당귀 및 천궁으로 구성된 복방으로 감궁탕 가미방이 갑상선 기능장애에 효능이 있음을 보고하였으며⁴⁾, 감궁탕과 갑상선기능저하증의 자가항체와의 상관성에 관한 연구도 보고되었다⁵⁾.

본 연구에서는 TSH 고갈에 의한 갑상선세포 (FRTL)의 증식과 cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)축적에 감궁탕이 미치는 영향을 DNA 합성, [³H]thymidine incorporation, cAMP assay로 살펴보았다.

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신원동 344-2 원광대학교 한의과대학
· E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6843
· 접수 : 2005/03/28 · 수정 : 2005/04/27 · 채택 : 2005/06/01

재료 및 방법

1. 시약

Coon's modified Ham's F-12 medium, calf serum, insulin, transferrin, thyroid stimulating hormone (TSH) glycy-L-histidyl-L-lysine acetate, somatostatin, hydrocortisone, chicken serum, collagenase, trypsin, trypan blue는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Methyl-³H-thymidine (76 Ci/mmol) 과 cAMP enzyme immuno assay (EIA) kit는 Amersham (Amersham, UK)에서 구입하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 감공탕 제조

감초, 흑두, 당귀와 천궁은 동국대학교 부속한방병원에서 구입하였고, voucher specimens은 동국대학교 난치병한양방치료연구소에 보관되어 있다. 감공탕 재료 (감초 15 g, 흑두 15 g, 당귀 15 g, 천궁 15 g) 60 g에 3차 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BÜCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 200 ml이 되도록 감압농축하고 ethanol을 가하여 75%, 85%와 95% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 µm, Whatman, Germany)로 여과하고 여액을 pH 7.4로 조절하였다. 여과된 시료는 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량 (30 mg/ml)을 측정하였다. 그리고 실험조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

Fischer 흰쥐의 갑상선에서 분리한 갑상선세포 FRTL 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여, 5% calf serum과 6종의 호르몬 [insulin (10 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), glycy-L-histidyl-L-lysine acetate(10ng/ml), somatostatin (10 ng/ml), hydrocortisone (10 nM)과 thyroid stimulating hormone (TSH, 10 mU/ml)]이 포함된 Coon's modified Ham's F-12 배지를 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였다. 이 세포는 액체질소의 기체상태 (-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였다.

4. [³H]thymidine incorporation 측정

FRTL 세포는 12-well plate에 1×10⁴ cells/well을 분주하여 5% calf serum과 6가지 호르몬 (6H)이 포함된 배지에서 24시간 배양하고 5% calf serum을 함유한 5H (without TSH)배지로 교체하여 48시간 배양하였다. 이 세포를 0.1% calf serum과 0.5% BSA를 함유한 5H (without TSH)배지에 감공탕을 농도별 (0.15, 0.3, 0.6, 0.9 mg/ml)로 각각 150 µl 첨가한 배양액에 70시간 동안 배양한 후 [³H]thymidine을 2시간 동안 처리하였다. 처리한 세포는 냉장 보관한 phosphate buffered saline (PBS)으로 2-3회 세척

한 후 냉장 보관한 5% trichloroacetic acid (TCA)를 넣어 4°C에서 10분 동안 반응시켰으며 TCA에 불용해성 침전물은 diphenylamine solution으로 용해시켰다. 그리고 용해된 세포현탁액에 scintillation cocktail을 혼합 후 radioactivity를 liquid scintillation counter (Beckman LS 6500, USA)로 측정하였다.

5. DNA 함량 측정

[³H]thymidine incorporation 실험에서와 같은 방법으로 세포를 12-well plate에 분주하고 세포배양 후 감공탕을 농도별 (0.15, 0.3, 0.6, 0.9 mg/ml)로 처리하였다. 3일 동안 배양된 세포는 Burton's method⁶⁾에 준하여 diphenylamine solution으로 반응시킨 후 분광광도계로 DNA 함량을 측정하였다.

6. 세포에서의 cAMP 함량 측정

FRTL 세포는 96-well plate에 1×10³ cells/well을 분주하여 6H 배지로 24시간 배양하고 5% calf serum을 함유한 5H 배지로 48시간 배양하여 TSH를 결핍시킨 후 0.1% calf serum과 0.5% BSA를 함유한 5H 배지에 감공탕을 농도별 (0.15, 0.3, 0.6, 0.9 mg/ml)로 첨가하고 세포를 48시간 동안 배양하였다. 감공탕이 처리된 세포는 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 세척한 다음 phosphodiesterase inhibitor IBMX를 함유한 HBSS를 넣고 30분 더 배양하였다. 그리고 세포에 lysis buffer를 처리하고 cyclic AMP 함량은 EIA kit로 측정하였다.

7. 통계학적 처리

실험결과는 평균±표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's t-test를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. [³H]thymidine incorporation에 미치는 영향

TSH 고갈 후 FRTL 세포의 [³H]thymidine incorporation에 감공탕이 미치는 영향을 알아보기 위해 감공탕을 0.15, 0.3, 0.6과 0.9 mg/ml의 농도로 처리한 결과, 감공탕을 처리하지 않은 세포에 비하여 감공탕 처리한 세포에서는 20~43%의 증가를 나타내었으며, 감공탕 0.6 mg/ml 농도에서 276 cpm/well (p<0.05), 0.9 mg/ml 농도에서는 284 cpm/well (p<0.01)로 통계적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다. 그리고 TSH (0.5 mU/ml)에 의하여 286 cpm/well이 나타났다.

2. DNA 합성에 미치는 영향

FRTL 세포에 TSH를 고갈시킨 후 감공탕을 농도별로 처리한 결과 감공탕의 농도가 높을수록 DNA 합성이 증가하였으며, 감공탕을 0.3 (p<0.05), 0.6 (p<0.01), 0.9 mg/ml (p<0.01)을 처리한 세포는 통계적으로 유의성 있는 DNA 합성 증가를 관찰할 수 있었다. 그리고 TSH (0.5 mU/ml) 처리에 의하여 약 34%의 DNA

합성 증가현상이 나타났다.

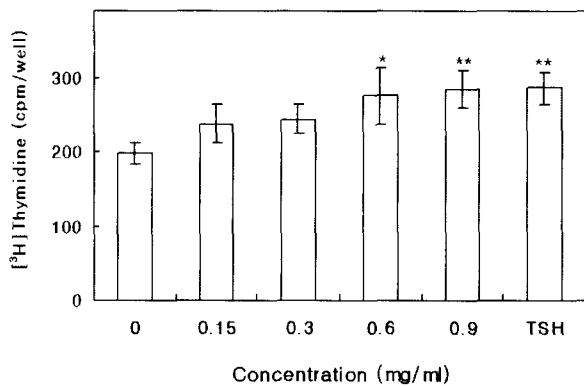


Fig. 1. Effect of GGT on cell growth as measured by [³H]thymidine incorporation in FRTL cells previously maintained in medium deprived of TSH. TSH, 0.5 mU/ml thyroid stimulating hormone. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (* p<0.05, ** p<0.01).

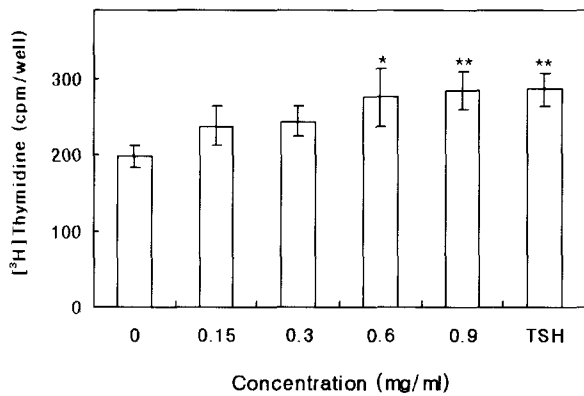


Fig. 2. Effect of GGT on DNA synthesis in FRTL cells previously maintained in medium deprived of TSH. TSH, 0.5 mU/ml thyroid stimulating hormone. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (* p<0.05, ** p<0.01).

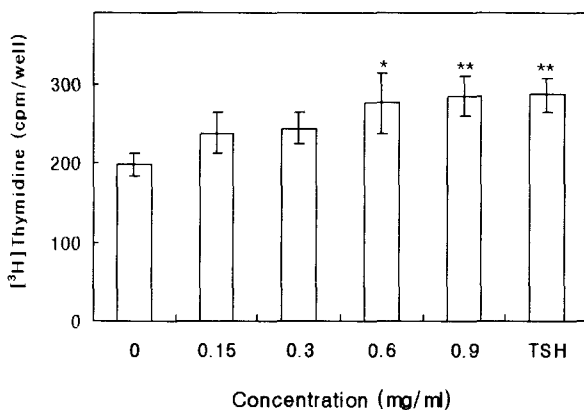


Fig. 3. Effect of GGT on cAMP accumulation in FRTL cells previously maintained in medium deprived of TSH. TSH, 0.5 mU/ml thyroid stimulating hormone. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared with the control are marked as asterisks (* p<0.05, ** p<0.01).

3. cAMP 함량에 미치는 영향

TSH를 고갈시킨 FRTL 세포에 감공탕을 48시간 처리한 후 EIA kit로 세포내 cAMP의 측정량을 측정해 본 결과, 감공탕 농도별 처리에 의하여 7.0~8.2 pmole/ml의 함량을 나타내었으며 감공탕을 처리하지 않은 세포에 비하여 43~67%의 증가를 나타내었다. 특히, 감공탕 0.3, 0.6과 0.9 mg/ml을 처리한 세포에서는 TSH (0.5 mU/ml)를 처리한 세포보다 더 높은 cAMP 축적을 관찰할 수 있었다.

고 찰

자가면역성 갑상선질환은 면역조절기전의 결함으로 인해 갑상선조직이 서서히 파괴되는 것으로 갑상선 종대 및 위축, 갑상선기능저하를 나타내며 가장 대표적인 예로 하시모토갑상선염을 들 수 있다. 이 질환은 30~50세, 특히 여자에게서 많이 나타난다. 자가면역성 갑상선질환에 관한 연구로는 혈청내에 존재하는 TSH수용체 항체, 항microsome 항체, 항thyroglobulin 항체와의 연관성⁷⁾, 천연물을 이용한 갑상선기능장애에 효능이 있는 물질 개발⁴⁾ 및 갑상선기능저하증의 자가항체와의 상관성⁸⁾ 등이 있었으며, 최근에는 갑상선기능저하증과 관련된 기전에 대한 연구의 일환으로 TSH수용체를 통한 세포내 신호전달체계에서 cAMP계와 phosphoinositide계의 상호작용⁹⁾, thyroglobulin에서 당을 제거한 non-glycosylated thyroglobulin의 갑상선기능저하증 유발 관련성¹⁰⁾ 및 갑상선 세포주를 이용한 세포 증식 및 성장에 대한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 갑상선 기능장애에 효능이 있는 감초, 흑두, 당귀 및 천궁으로 구성된 감공탕이 갑상선 세포 (FRTL)의 주 성장인자인 TSH가 없을 때 갑상선세포의 증식과 cAMP 축적에 미치는 영향을 조사해 보았다.

FRTL 세포는 Fisher rat의 정상 갑상선 세포에서 클로닝된 세포주로서 TSH수용체의 발현, TSH-의존성 성장, thyroglobulin의 합성과 분비, 요오드 흡수 (active trapping of iodine) 등의 정상적인 갑상선 기능적 특성을 지니고 있다. 또한 배양시에 TSH (thyroid stimulating hormone, 갑상선 자극 호르몬)를 포함하여 6종의 호르몬이 필요하므로 갑상선세포의 호르몬 의존성 apoptosis의 연구 및 갑상선 세포의 성장을 연구하는데 아주 적절한 모델로 인정받고 있다¹¹⁾.

TSH는 FRTL 세포의 세포 증식과 DNA 합성 증가에서 중요한 역할을 하는데, 특히 TSH 결핍에 의하여 세포의 형태학적 변화와 성장을 멈추게 하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 본 연구에서는 대조군과 TSH (0.5 mU/ml)를 처리한 세포를 비교하여 갑상선세포의 증식을 알아보기 위해 [³H]thymidine incorporation과 DNA의 합성을 측정 한 결과 [³H]thymidine incorporation은 286 cpm/well로 1.4배의 증가를 나타내었고 DNA 함량은 16.6 µg/well로서 1.5배의 증가를 나타내었다. FRTL 세포에 TSH 고갈시킨 후 감공탕을 처리하여 농도별로 세포의 증식을 조사한 결과 농도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으며, 감공탕 0.6 및 0.9 mg/ml을 처리한 세포에서는 TSH (0.5 mU/ml)를 처리한 세

포보다 DNA 함량이 1.2배 정도 더 높게 나타났다.

TSH는 내분비선 세포 (endocrine cell)에서의 여러 가지 기능을 조절한다. 갑상선세포의 주성장 인자인 TSH는 세포표면의 G-단백질 결합수용체에 결합하여 adenylate cyclase가 활성화되어 cAMP를 생성한다. TSH는 갑상선세포에서 adenylate cyclase-cAMP를 통하여 단백질 합성 증가¹³⁾, 갑상선세포의 성장과 분열을 촉진¹⁴⁾, 갑상선 호르몬의 분비 증가¹⁵⁾, 갑상선세포 영양원인 glucose 대사 활성화¹⁶⁾, 세포내 colloid droplet의 형성 증가 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 갑상선 치료 농도가 높을수록 cAMP의 생성량이 높게 나타났으며, 특히 갑상선 농도 0.6 mg/ml에서는 TSH (0.5 mU/ml)가 처리된 세포의 cAMP 생성량보다 더 높게 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 TSH에 의존적 성장을 하는 FRTL세포에 갑상선 (0.6 mg/ml)을 처리하였을 때 TSH (0.5 mU/ml)를 처리한 세포에 비해 높은 세포증식과 갑상선세포내 신호전달체계 중의 하나로서 작용하는 세포내 2차 전령인 cAMP 축적의 증가를 관찰할 수 있었다. 그러므로 세포증식과 cAMP의 생성 촉진작용이 있는 갑상선은 갑상선기능저하증을 치료하는데 효과가 있을 것으로 기대된다.

결 론

갑상선이 TSH 고갈에 의한 갑상선세포(FRTL)의 증식과 cAMP 축적에 미치는 영향을 DNA 합성, [³H]thymidine incorporation, cAMP assay로 살펴본 결과, 갑상선을 처리한 세포는 [³H]thymidine incorporation, DNA의 합성 및 cAMP 축적량이 증가됨을 나타내었다. 따라서 세포증식과 cAMP의 생성 촉진효과가 있는 갑상선은 갑상선기능저하증을 치료하는데 효과가 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원 (01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kloos, R.T., Baker Jr, J.R. Thyroiditis, In Robert, E.R.(ed), Conn's Corrent Therapy, WB Saunders Company, Philadelphia, USA, p 634-641, 1996.
2. Brandi, M.L., Rotella, C.M., Mavilia, C., Franceschelli, F., Tanini, A., Toccafondi, R. Insulin stimulates cell growth for a new strain of differentiated rat thyroid cells. Molecular and Cellular Endocrinology 54, 91-103, 1987.
3. Fusco, A., Berlingieri, M.T., Di-Fiore, P.P., Portella, G., Grieco, M., Vecchio, G. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. Molecular Cell Biology 7, 3365-3370, 1987.

4. 최호승, 김영목, 임종국, 손윤희, 남경수, 김철호, 전병훈. 갑상선 가미방이 갑상샘 기능장애에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 17, 648-655, 2003.
5. 남경수, 손윤희, 백태선, 김철호, 임종국, 황철원. Anti-thyroglobulin monoclonal antibody의 제작 및 특성. 한국생명과학회지 12, 460-463, 2002.
6. Butron, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochemical Journal 62, 314-323, 1956.
7. 조보연, 고창순, 이문호. 자가면역성 갑상선질환에서 갑상선 자극 호르몬 결합억제 면역글로블린 측정의 임상적 의의. 대한내과학회지 28, 299-308, 1985.
8. 손윤희, 김철호, 전병훈, 남경수. Thyroglobulin에 대한 단일클론항체의 혈소판응집 저해작용. 동의생리병리학회지 18, 534-537, 2004.
9. 문병술, 박영주, 김성연, 조보연, 이흥규, 박도준. FRTL-5 세포에서 TSH 수용체를 통한 세포내 신호전달체계에서 cAMP계와 phosphoinositide계의 상호작용. 대한내분비학회지 18, 404-413, 2003.
10. Moon, S.K., Kang, B.S., Kim, Y.G., Chung, T.W., Kim, J.R., Cha, B.Y., Moon, J.Y., Lim, J.K., Shon, Y.H., Nam, K.S., Ko, J.H., Jeon, B.H., Kim, C.H. Induction of an autoimmune thyroiditis by deglycosylated thyroglobulin induction of a Tc1- mediated experimental autoimmune thyroiditis by deglycosylated porcine thyroglobulin. Immunopharmacology and Immunotoxicology 26, 355-372, 2004.
11. Ambesi-Impimbaato, F.S., Parks, L.A.M., Coon, H.G. Culture of hormone dependent functional epithelial cells from rat thyroids. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77, 3455-3459, 1980.
12. Nitsch, L., Garbi, C., Gentile, F., Masica, A., Negri, R., Polistina, C., Vergani, G., Zurzolo, C. Morphological changes induced by prolonged TSH stimulation or starvation in the rat thyroid cell line FRTL. Hormone and Metabolic Research 7, 32-37, 1990.
13. Avvedimento, V.E., Tramontano, D., Wrsini, M.V., Monticelli, A., Di Lauro, R. The levels of thyroglobulin mRNA is regulated by TSH both *in vitro* and *in vivo*. Biochemical and Biophysical Research Communication 122, 472-477, 1984.
14. Gerber, H., Peter, H.J., Bachmeier, C., Kaempf, J., Studer, H. Progressive recruitment of follicular cells with graded secretory responsiveness during stimulation of the thyroid gland by thyrotropin. Endocrinology 120, 91-96, 1987.
15. Filetti, S., Damante, G., Foti, D. Thyrotropin stimulates glucose transport in cultured rat thyroid cells. Endocrinology 120, 2576-2581, 1987.
16. Valente, W.A., Vitti, P., Kohn, L.D., Brandi, M.L., Rotella,

C.M., Toccafondi, R., Tramontano, D., Aloj, S.M., Ambesi-Impiombato, F.S. The relationship of growth and

adenylate cyclase activity in cultured thyroid cells: separate bioeffects of thyrotropin. *Endocrinology* 112, 71-79, 1983.