

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Delta가 갑상선암 세포주의 성장 및 침습에 미치는 영향

울산의대 서울아산병원 내과, 외과¹, 아산 생명과학 연구소²

김원구 · 최현정² · 김의영 · 김태용 · 김원배 · 김성철¹ · 송영기

Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Delta on the Growth and Invasion of a Thyroid Cancer Cell Line

Won Gu Kim, Hyun Jeung Choi², Eui Young Kim, Tae Yong Kim,
Won Bae Kim, Seong Chul Kim¹, Young Kee Shong

*Department of Internal Medicine, Surgery¹, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine; and
Asan Institute of Life Science²*

ABSTRACT

Background: Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR- δ) is a ligand-activated nuclear transcription factor that is associated with many diseases, such as diabetes, obesity, metabolic syndrome, and cancer. However, the function of PPAR- δ is controversial in carcinogenesis since its ligands may inhibit or promote the growth of cancer cells. The purpose of this study was to determine the effect of GW501516, the specific agonist of PPAR- δ , in the growth and invasiveness of thyroid cancer cell lines by modulation of the target genes, ANGPTL-4 and MCP-1.

Methods: Three kinds of human cancer cell lines, FRO (thyroid anaplastic carcinoma), NPA (melanoma), and ARO (colon cancer) were treated with GW501516 in serum-free media. Cell viability was assayed using a colorimetric cell counting kit-8 assay. The changes in the level of expression of PPAR- δ and its target genes, angiopoietin-like protein-4 (ANGPTL-4) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), were determined by RT-PCR analysis and invasiveness was assessed by a cell invasion assay kit.

Results: GW501516 inhibited the cell growth of cancer cell lines in a dose-dependent manner and modulated the stimulation of ANGPTL-4, as well as inhibition of MCP-1. These effects were more prominent in NPA and ARO, but less effective in the thyroid cancer cell line, which had higher PPAR- δ and lower ANGPTL-4 mRNA levels. The inhibitory effects of GW501516 on cancer invasiveness had a similar pattern.

Conclusion: The activation of PPAR- δ by GW501516 reduced the cell growth and invasiveness of the thyroid cancer cell line. This effect of GW501516 was associated with a stimulatory effect of ANGPTL4 and an inhibitory effect of MCP-1 in cancer cell lines. GW501516 was less effective in the thyroid cancer cell line, which had a low basal ANGPTL-4 mRNA level. The findings of our study serve as an impetus for further studies to elucidate the precise role of ANGPTL-4 and PPAR- δ in carcinogenesis. (*J Korean Endocr Soc* 24:25~32, 2009)

Key Words: Angiopoietin-like protein-4, Monocyte chemotactic protein-1, Peroxisome proliferator-activated receptor delta, Thyroid cancer

접수일자: 2008년 11월 21일

통과일자: 2009년 2월 23일

책임저자: 김성철, 울산의대 서울아산병원 외과

서 론

갑상선암은 내분비계의 가장 흔한 악성 종양으로 전체 종양의 약 1% 정도를 차지하며 암에 의한 사망의 0.4%를 차지한다[1]. 갑상선암의 발생은 전 세계적으로 증가 추세에 있으며[2~4], 2008년 중앙 암 등록본부의 발표에 따르면 갑상선암은 2003년에서 2005년 사이에 국내에서 발생한 암 중에서 5번째 흔한 암이었으며, 여성에서는 2번째로 흔한 암 이었다(<http://www.re.kr/index.jsp>). 최근 연구에서는 갑상선암의 발생에는 mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로와 관련된 돌연변이나 유전자 재조합이 중요한 병인으로 밝혀졌다[5]. 하지만, 침윤성과 원격 전이 등을 동반한 공격적인 성향의 갑상선암의 분자생물학적인 병인과 기전에 대해서는 아직 연구가 충분치 않은 실정이다.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)는 α , β/δ , γ 세 종류가 있으며 핵 내 수용체로 리간드에 결합한 후에 전사인자로서 작용하는데 지질과 당 대사, 에너지 조절, 면역 염증반응 그리고 세포의 증식과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다[6~9]. PPAR- δ 는 근육, 지방, 신장, 간, 심장 등의 대부분의 조직에서 발견되지만, PPAR- α 나 PPAR- γ 에 비해서 그 역할이 잘 알려져 있지 않은 편이다[10,11]. 최근 암 연구에서도 PPAR- δ 의 역할이 주목 받기 시작했지만, 암세포의 성장과 분화에 미치는 영향에 대해서는 암의 종류나 연구 방법에 따라서 상반된 결과를 보고하고 있다[12~18].

본 연구는 PPAR- δ 의 선택적인 촉진제인 GW501516을 이용하여 갑상선암 세포주에서 PPAR- δ 의 활성화가 세포의 성장과 침습을 억제할 수 있을지를 확인하고자 하였다. 또한, PPAR- δ 의 활성화를 통한 영향이 angiopoietin-like protein-4 (ANGPTL-4)와 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)과 같은 목표 유전자를 경유하는지를 확인하여 PPAR- δ 의 활성화가 갑상선암 치료의 표적 물질이 될 수 있을지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

GW501516은 Alexis biochemicals (Lausen, Switzerland)에서 구입하였으며, Colorimetric Cell Counting Kit-8 (CCK-8)은 Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. 세포 침습 측정키트는 Cell biolab (San Diego, CA)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 우태아 혈청, RPMI-1640 배양액, penicillin-streptomycin계 항생제, 트립신-EDTA, 인산염 완충 용액(PBS)은 Gibco BRL (New York)에서 구입하였다. RevertAid First Strand cDNA 합성 키트는 Fermentas (Glen Burnie, MD), BioMix DNA 중합

효소와 아가로오스는 Bioline (Taunton, MA)에서 구입하였으며 그 외에 사용된 화학 약품들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2. 세포주 및 배양

미분화 갑상선암 세포주인 FRO, 흑색종 세포주인 NPA 그리고 대장암 세포주인 ARO를 10%의 우태아 혈청과 항생제가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 5% CO₂, 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2~3일마다 교환하였으며 세포가 70~80% 정도 자라면 계대 배양을 하였다. GW501516을 처리할 때는 60 mm 배양 접시에 1×10^6 cells개의 세포를 분주하여 70% 정도 자랐을 때 0.5% 혈청이 포함된 RPMI 배양액으로 바꾸어 주고 정해진 농도의 GW501516을 처리하였다. 세포 사멸을 보기 위한 실험에서는 96 우물 배양판에 5×10^3 개씩의 세포를 분주하여 2일 후에 약물을 처리하였다. 세포 침습을 보기 위한 실험에서는 배양 함(chamber) 하나당 3×10^5 세포를 분주하여 실험하였다.

3. 세포 생존 분석(Cell Viability Assay)

GW501516이 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해서 CCK-8을 이용한 발색 분석법을 사용하였다. 96 우물 배양판에 각 우물당 5×10^3 개씩의 세포를 분주하고 2일 후 정해진 농도의 GW501516이 포함된 RPMI 배양액으로 갈아주고 48시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS 용액으로 2번 세척한 후 CCK-8의 농도가 10%가 되도록 혈청을 포함하지 않은 배양액과 희석하여 각 우물당 100 μ L씩 첨가하였다. 세포 배양기에서 1~4시간 동안 배양한 후, 세포의 탈수소효소의 활성도에 의한 formazan 염료 발색을 측정하기 위해 Spectramax Microplate 분광 광도계(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였으며, 각 실험은 독립적으로 3회 반복 실행하여 평균치를 구하였다.

4. 세포 침습 측정(Cell Invasion Assay)

암 세포주의 침습성은 24 우물 배양 접시에 12개의 세포 배양 함이 들어있는 Cell biolab사의 침습 측정 키트를 사용하여 첨부된 사용법에 따라 실험을 진행하였다. 함의 내부에는 300 μ L의 0.2% 우태아 혈청이 첨가된 배양액에 3×10^5 개의 세포를 풀어 사용하였으며, 함 외부에는 10% 우태아 혈청 배양액 500 μ L가 이용되었다. 각각의 배양액에 정해진 농도의 GW501516을 첨가하였으며 48시간 동안 배양을 하면서 24시간 마다 함의 내부와 외부 배양액을 모두 교환하였다. 48시간이 지나면 함의 아래면에 위치한 막을 첨부된 세포 염색시약으로 염색하고, Axiovert S100 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)과 AxioCam 디지털 카메라(Carl Zeiss)를 사용하여 사진 촬영하였다. 투과한 세포의 정

Table 1. RT PCR oligonucleotide primer sequences and product sizes

Gene	Gene bank		Primer sequences	Product size (bp)
ANGPTL-4	GI 33991579	Forward	5'-TCCGTACCCCTTCTCCACTTG-3'	305
		Reverse	5'-GCCAAGAGTCACCGTCTTTC-3'	
MCP-1	NM 002982	Forward	5'- GCTCGCTCAGCCAGATGCAAT-3'	257
		Reverse	5'- TGGGTTGTGGAGTGAGTGTTTC-3'	
PPAR- δ	NM 006238	Forward	5'-ACAGCATGCACTTCCTTCCA-3'	177
		Reverse	5'-TCACATGCATGAACACCGTA-3'	
GAPDH	NM 002046	Forward	5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'	321
		Reverse	5'- GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	

ANGPTL-4, angiotensin-like protein-4; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; PPAR- δ , peroxisome proliferator-activated receptor delta; GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase.

량을 위해서 10% 아세트산 용액으로 막에 있는 세포를 녹여 96 우물 용기에 옮겨 560 nm 파장에서 Spectramax Microplate 분광 광도계로 흡광도를 측정하였다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석

암 세포주로부터 추출한 2 μ g의 RNA에서 RevertAid First Stand cDNA 합성 키트(Fermentas)를 이용하여 첫 가닥의 cDNA를 합성하였다. ANGPTL-4의 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 94 $^{\circ}$ C에서 45초간 분리, 51 $^{\circ}$ C 에서 45초간 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 합성되는 과정을 35주기에 걸쳐서 DNA를 증폭하였다. MCP-1은 94 $^{\circ}$ C에서 분리, 60 $^{\circ}$ C에서 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 합성되는 과정을 각각 60초씩 35번의 증폭 과정을 거쳤으며, PPAR- δ 는 94 $^{\circ}$ C에서 분리, 55 $^{\circ}$ C에서 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 합성되는 과정을 각각 30초씩 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다. GAPDH는 94 $^{\circ}$ C에서 분리, 55 $^{\circ}$ C에서 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 합성되는 과정을 각각 30초씩 25회 반복하여 DNA를 증폭하였다. RT-PCR에 사용된 시동체(primer)의 염기 서열과 증폭된 생성물의 크기는 Table 1과 같다. 역전사중합효소 연쇄반응의 생성물은 1% 아가로오스 겔에서 전기 영동하였으며, Gel-doc 시스템에서 사진을 찍어 확인하였다.

결 과

1. 암 세포주에서 PPAR- δ , ANGPTL-4 및 MCP-1의 발현

PPAR- δ 의 활성화가 암 세포의 성장에 영향을 주는 분자 생물학적인 기전을 확인하기 위해서 우선 암 세포주에서 PPAR- δ 와 그 표적 유전자의 발현 양상을 RT-PCR을 통해서 확인하였다. PPAR- δ 와 ANGPTL-4는 NPA, ARO, FRO 모두에서 발현되었다. 갑상선암 세포주인 FRO에서의 PPAR- δ 발현량이 흑색종 세포주인 NPA와 대장암 세포주인 ARO 보다 상대적으로 높았다. 반면, ANGPTL-4의 경우

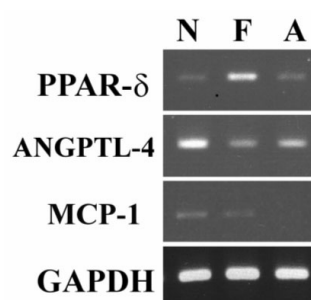


Fig. 1. Expression of the PPAR- δ and its target genes, ANGPTL-4 and MCP-1 in human cancer cell lines. Total RNA was isolated from cancer cell lines, ARO, FRO and NPA. The expression of PPAR δ , ANGPTL-4, and MCP-1 gene were determined by RT-PCR analysis. N, NPA; F, FRO; A, ARO

에는 FRO에서의 발현량이 다른 세포주에 비해서 상대적으로 낮았다. MCP-1은 ARO에서는 발현되지 않았으며, NPA와 FRO에서도 상대적으로 적은 양이 발현되었다(Fig. 1).

2. GW501516에 의한 암 세포주 성장 억제

선택적 PPAR- δ 촉진제인 GW501516이 암 세포주의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 NPA, ARO 및 FRO 세포주 각각에 다양한 농도의 GW501516을 48시간 동안 처리하고 CCK 측정하였다(Fig. 2). 모든 세포주에서 GW501516에 의해서 농도 의존적으로 세포의 성장이 억제됨을 확인하였다. NPA와 ARO의 경우에는 약 10 μ M의 농도에서 세포의 성장이 50% 가량 억제되었으나, 갑상선암 세포주인 FRO는 같은 농도의 GW501516에서 성장 억제에 미치는 효과가 상대적으로 적었다.

3. 암 세포주에서 GW501516이 세포의 침습성에 미치는 영향

GW501516이 암세포의 침습성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 침습 측정 키트를 사용하였으며, GW501516을

1~20 μM 의 농도로 처리하여 48시간 후에 막을 염색하고 사진을 촬영하였다(Fig. 3). 모든 세포주의 막 침습은 농도 의존적으로 감소하였으며, 막을 통과하여 염색된 세포를 10% 아세트산으로 녹여 낸 후, 560 nm의 흡광도로 발색 정도를 측정된 결과 농도 의존적으로 발색 수치가감소함을 확인하였다. 10 μM 의 농도에서 NPA와 ARO세포의 침습성은 약 55% 가량 억제됨을 확인할 수 있었으나(Fig 3A, 3B), FRO 세포에서는 침습성이 약 25% 정도만 억제되었다(Fig 3C). 세포주에 따라서 GW501516이 세포의 성장과 침습성에 미치는 영향은 비슷한 양상을 보였다.

4. GW501516이 PPAR- δ , ANGPTL-4 및 MCP-1 의 발현에 미치는 영향

GW501516이 PPAR- δ 유전자 발현과 그 표적 유전자들에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각의 암세포를 10 μM 농도의 GW501516에서 정해진 시간 동안 노출한 후에 RT-PCR을 하여 유전자 발현을 확인하였다. NPA, ARO 및 FRO 세포에서 GW501516에 의해서 PPAR- δ 유전자의 발현이 시간에 따라서 조금씩 증가되었다(Fig. 4). NPA, ARO 및 FRO 세포주에서 ANGPTL-4의 발현은 GW501516에 의해서 증가되었다. 하지만, MCP-1의 발현은 NPA와 FRO에서 모두 감소하였으며, ANGPTL-4와 MCP-1의 발현이 GW501516에 의해서 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

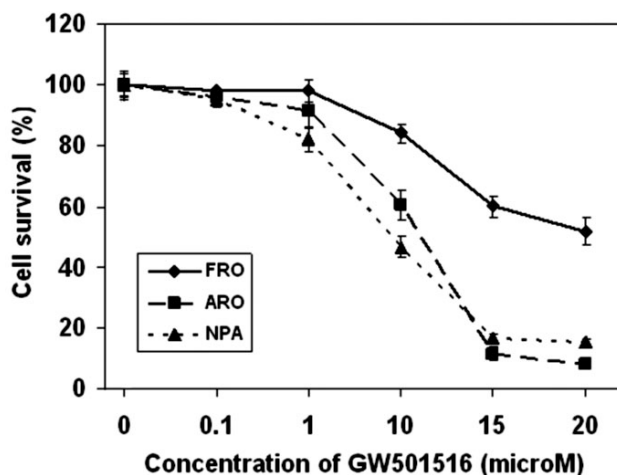


Fig. 2. Effect of GW501516 on cell viability in human cancer cell lines, NPA, ARO, and FRO. Cells were exposed to the indicated concentrations of GW501516 for 48 hours and cell viability was determined by CCK assay. Data presented are mean \pm SD for three independent experiments.

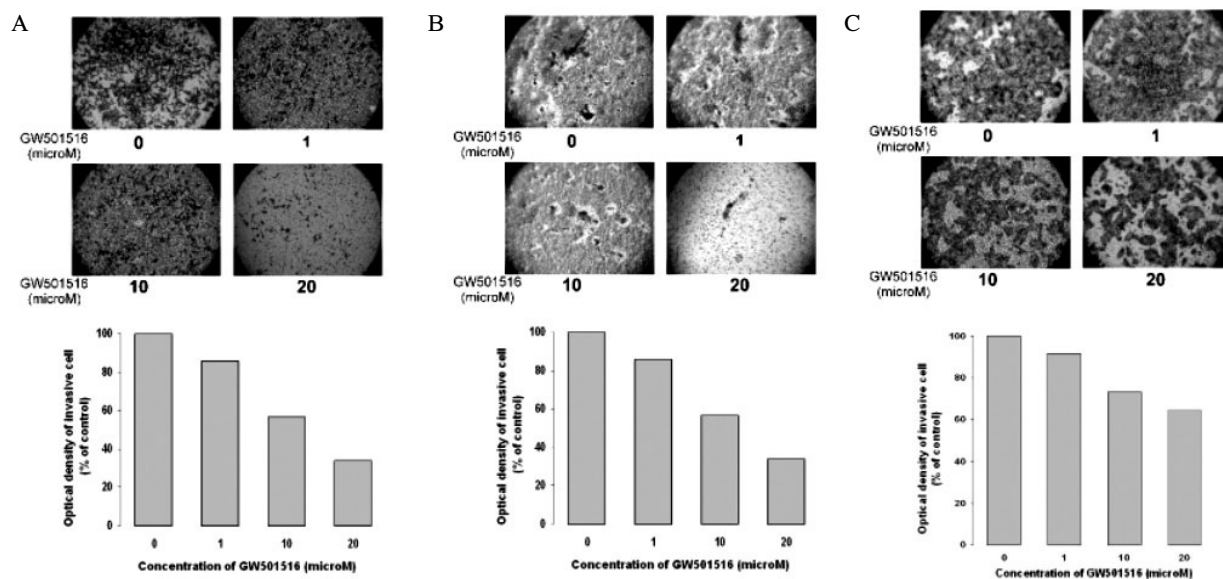


Fig. 3. Effect of GW501516 on invasiveness of human cancer cell lines. A. NPA. B. ARO. C. FRO cells.

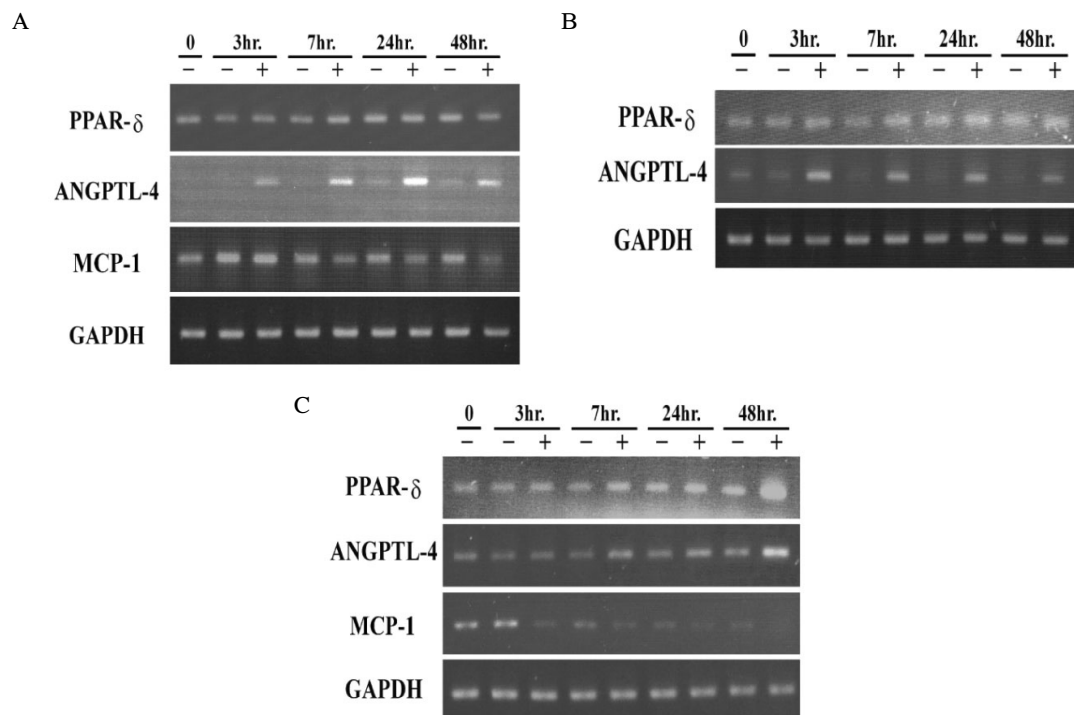


Fig. 4. Effect of GW501516 on PPAR- δ and its target genes, ANGPTL4 and MCP-1 expression. Cells were exposed to 10 μ M GW501516 for 0~48 hr. and the change of PPAR- δ , ANGPTL-4, and MCP-1 expressions were determined by RT-PCR analysis. Expression of GAPDH was used as loading controls. A. NPA. B. ARO. C. FRO cells.

고 찰

갑상선암 세포주인 FRO는 PPAR- δ 의 선택적 촉진제인 GW501516에 의해서 20 μ M 이상의 농도에서 세포 성장이 억제되고, 세포의 이주와 침습이 억제됨을 확인하였다. 하지만, 흑색종 세포주인 NPA와 대장암 세포주인 ARO는 10 μ M 정도의 더 낮은 농도에서 세포 성장 및 침습이 억제되었다. 즉, GW501516은 암의 진행, 침습, 전이를 억제할 수 있을 가능성을 보였지만, 그 효과는 갑상선암 세포주에서는 더 적게 나타났다. 이러한 효과의 차이는 PPAR- δ 의 표적 단백질(ANGPTL-4) 발현량의 상대적인 차이와 관련이 있음을 확인하였다. 또한, PPAR- δ 에 의한 성장 및 침습성 억제는 ANGPTL-4의 발현 증가와 MCP-1의 발현 감소와 관련이 있을 가능성을 제시하였다.

PPAR- δ 의 리간드 활성화는 세포의 항상성 조절에 관련되어 있다고 알려져 있어서 당뇨병, 비만, 대사증후군 등의 질병과 관련성이 연구되고 있으며, 암의 발생과 진행에도 영향이 있는 것으로 알려져 있다[6~8,11]. PPAR- δ 의 특이적인 촉진제인 GW501516은 phenoxycetic 산의 유도체로 콜레스테롤의 역수송과 지방 대사에 관련된 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다[19]. 암의 발생과 진행에 있어서 PPAR- δ 의 역할에 대해서는 아직 명확한 결론이 없는 상태이지만, β -catenin/Tcf-4 경로를 경유하여 APC 유전자의 전사를 조절하고, c-myc, cyclin D의 발현에도 영향을 주는 것

으로 알려져 있다[16,20]. 암의 혈관 형성과 관련된 VEGF 경로와 PPAR- δ 가 상호 연관되어 있다는 보고도 있어, PPAR- δ 는 암의 진행과 전이에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다[21]. 하지만, 가장 많이 연구된 대장암 영역에 있어서도 PPAR- δ 가 암의 성장을 촉진하는지 또는 억제하는지에 대해 논란의 여지가 있다[15,16,20,21]. PPAR- δ 의 세포 성장에 대한 역할은 다른 암에 대한 연구에서 역시 세포의 종류나 연구자에 따라 다양한 결과를 보이고 있다. 유방암, 전립선암, 담도암 세포에서는 성장을 촉진한다는 보고가 있고[13,17] 폐암, 간암, 유방암, 흑색종 세포에서는 성장을 억제한다는 보고도 있다[8,14,18,22]. 본 연구에서도 흑색종 세포주인 NPA와 대장암 세포주인 ARO에서는 PPAR- δ 에 의한 성장 억제 효과를 확인할 수 있었다. 갑상선암 영역에서 PPAR- δ 의 역할에 대해서 아직 알려진 바가 없고, 본 연구는 PPAR- δ 와 갑상선암 세포주의 성장과 진행과의 관련성을 보여준 첫 연구이다.

본 연구에서는 PPAR- δ 의 선택적 촉진제인 GW501516이 갑상선암 세포주의 성장과 침습을 억제하는 데 있어서 ANGPTL-4와 MCP-1의 전사 조절에 관련이 있을 가능성을 제시하였다. ANGPTL-4는 angiopoietin군에 속하는 분비성 당화단백으로 혈관 형성과 종양 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 최근 연구에서는 혈관내피세포의 유착과 이동을 억제할 뿐만 아니라 암세포의 이동과 침습도 억제하는 것으로 보고되었다[23,24]. 따라서, 본 연구의 결

요 약

과와 같이 PPAR- δ 의 활성화에 의해서 ANGPTL-4의 발현이 증가됨으로써 갑상선 암 세포주의 성장과 침습이 억제됨을 설명할 수 있다. ANGPTL-4는 PPAR의 목표 유전자로 처음 발견되었으며, PPAR의 리간드에 의해서 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다[18,25~27].

주로 단핵구에서 발현되는 MCP-1은 단핵구와 대식세포를 모집하여 활성화하는데 중요한 것으로 알려진 chemokine으로 염증반응과 혈관 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[28,29]. MCP-1은 난소암, 유방암, 위암, 전립선암 등에서도 증가되어 있음이 보고되었고, 아직 기전이 명확하지는 않지만 종양의 혈관 생성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[30~33]. 본 연구에서는 MCP-1의 감소가 종양 성장 및 침습성 억제와 관련이 있을 가능성을 제시하였으며, PPAR- δ 의 활성화가 MCP-1의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 이전 GW501516 및 PPAR- δ 활성화에 대한 연구에서 MCP-1이 억제되는 것과 비슷한 결과를 보였다[34,35]. ANGPTL-4와 MCP-1은 종양의 침습성에 연관되어 있는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 GW501516은 종양의 성장 억제와 더불어서 암 세포의 침습성을 용량 의존적으로 억제하였다. 따라서 갑상선 암 세포의 진행과 침습성에 ANGPTL-4와 MCP-1의 역할이 중요할 것으로 보이고, 그 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서는 PPAR- δ 발현이 많았지만 ANGPTL-4의 발현이 적었던 갑상선암 세포주 FRO에서 세포의 성장 억제 효과가 상대적으로 낮았다. 반면, PPAR- δ 의 발현이 적었지만 ANGPTL-4의 발현이 많았던 NPA, ARO 세포주에서는 GW501516에 의한 성장 억제 효과가 좋았다. 이는 촉진제에 의한 성장 억제 효과를 나타냄에 있어서 PPAR- δ 의 발현량 자체가 중요한 것이 아니고 PPAR- δ 의 신호 전달 체계의 기저 활성도가 중요함을 시사한다. 즉, PPAR- δ 의 목표 단백질 ANGPTL-4의 발현량이 상대적으로 많은 NPA, ARO 세포에서 성장 억제 효과가 발현량이 적은 FRO세포에 비해 현저하게 나타나기 때문이다. GW501516에 의한 성장 억제 효과의 세포에 따른 차이는 이러한 억제 효과가 PPAR- δ 신호 전달 체계의 축진을 통하여 이루어짐을 시사하는 소견이라 할 수 있다.

본 연구는 PPAR- δ 의 선택적인 촉진제인 GW501516이 갑상선 암의 진행과 전이를 억제하는데 있어서 흑색종이나 대장암에 비교하여 차이를 보임을 확인하였다. 이러한 차이는 PPAR- δ 에 의한 효과가 그 하부 신호 전달 체계의 활성화와 관련이 있을 수 있고 이를 통해서 GW501516의 효과를 예측할 수 있을 가능성을 제시하고 있다. 하지만, 향후 PPAR- δ 와 관련된 작용 기전 및 신호 전달 체계에 대한 규명이 선행되어야만 암 치료에 있어서 PPAR- δ 와 관련된 약물이 적용될 수 있을 것이다.

연구배경: Peroxisome proliferators-activated receptor delta (PPAR- δ)는 대사성 질환뿐만 아니라 암의 발생에도 중요한 역할을 하는 리간드 활성화 핵전사인자이다. 하지만, 암의 형성과 진행 과정에서 PPAR- δ 리간드가 세포의 성장을 억제하는지 또는 촉진하는지에 대해서 아직 명확한 결론이 없다. 본 연구의 목적은 PPAR- δ 의 선택적인 촉진제인 GW501516을 이용하여 갑상선암 세포주의 성장과 침습에 미치는 영향과 angiopoietin-like protein-4 (ANGPTL-4)와 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)과 같은 표적 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하는 것이다.

방법: 미분화 갑상선암 세포주인 FRO와 흑색종 세포주인 NPA 그리고 대장암 세포주인 ARO에서 GW501516을 처리하여 세포의 성장과 침습성에 미치는 영향을 확인하였다. 세포의 성장은 분광 측정기를 이용한 발색반응으로 정량화하여 측정하였고, PPAR- δ 와 그 표적 유전자인 ANGPTL4와 MCP-1의 발현은 역전사 증합효소 연쇄반응을 이용하여 확인하였다. 세포의 침습성은 세포침습성 측정 키트를 이용하여 측정하였다.

결과: GW501516은 암세포의 성장을 농도 의존적으로 억제하였고, 기저 PPAR- δ 의 발현이 많고 ANGPTL-4의 발현이 적었던 FRO 세포주에서에 비해서 ANGPTL-4의 발현이 많았던 NPA와 ARO 세포주에서는 그 효과가 더 컸다. GW501516은 농도에 의존적으로 ANGPTL-4의 발현을 증가시켰으며, MCP-1의 발현은 감소되었다. GW501516에 의한 세포 침습성 억제 효과 또한 같은 양상을 보였다.

결론: GW501516에 의한 PPAR- δ 의 활성화는 암세포의 성장과 침습성을 억제하였으나 갑상선암 세포주에서는 상대적으로 그 효과가 적었다. 이는 PPAR- δ 의 목표 단백질 ANGPTL-4 발현량의 상대적인 차이와 관련이 있었고, PPAR- δ 에 의한 성장 및 침습성 억제는 ANGPTL-4의 발현 증가와 관련이 있었다. 향후 PPAR- δ 의 활성화를 통한 ANGPTL-4 증가가 암의 진행과 전이에 미치는 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Sherman SI: Thyroid carcinoma. Lancet 361:501-511, 2003
2. Davies L, Welch HG: Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA 295:2164-2167, 2006
3. Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L: Increased incidence of thyroid carcinoma in france: a true epidemic or thyroid nodule management effects?

- Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 14:1056-1060, 2004
4. Lubina A, Cohen O, Barchana M, Liphshiz I, Vered I, Sadetzki S, Karasik A: Time trends of incidence rates of thyroid cancer in Israel: what might explain the sharp increase. *Thyroid* 16:1033-1040, 2006
5. Kondo T, Ezzat S, Asa SL: Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6:292-306, 2006
6. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM: Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-170, 2003
7. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S: PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116:581-589, 2006
8. Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Hla T, Kondo M: Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 270:400-405, 2000
9. Zandbergen F, Plutzky J: PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1771:972-982, 2007
10. Braissant O, Wahli W: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139:2748-2754, 1998
11. Petrashevskaya NN, Schwarz A: Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta: a new antihypertrophic drug target? *Cardiovasc Res* 65:770-771, 2005
12. Burdick AD, Bility MT, Girroir EE, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM: Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. *Cell Signal* 19:1163-1171, 2007
13. Xu L, Han C, Wu T: A novel positive feedback loop between peroxisome proliferator-activated receptor-delta and prostaglandin E2 signaling pathways for human cholangiocarcinoma cell growth. *J Biol Chem* 281:33982-33996, 2006
14. Hollingshead HE, Killins RL, Borland MG, Girroir EE, Billin AN, Willson TM, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM: Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis* 28:2641-2649, 2007
15. Marin HE, Peraza MA, Billin AN, Willson TM, Ward JM, Kennett MJ, Gonzalez FJ, Peters JM: Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res* 66:4394-4401, 2006
16. Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN: Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med* 10:245-247, 2004
17. Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 64:3162-3170, 2004
18. Girroir EE, Hollingshead HE, Billin AN, Willson TM, Robertson GP, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM: Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF7 human cancer cell lines. *Toxicology* 243:236-243, 2008
19. Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Klier SA, Hansen BC, Willson TM: A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5306-5311, 2001
20. Chen LC, Hao CY, Chiu YS, Wong P, Melnick JS, Brotman M, Moretto J, Mendes F, Smith AP, Bennington JL, Moore D, Lee NM: Alteration of gene expression in normal-appearing colon mucosa of APC(min) mice and human cancer patients. *Cancer Res* 64:3694-3700, 2004
21. Wang D, Wang H, Guo Y, Ning W, Katkuri S, Wahli W, Desvergne B, Dey SK, DuBois RN: Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19069-19074, 2006
22. Fukumoto K, Yano Y, Virgona N, Hagiwara H, Sato H, Senba H, Suzuki K, Asano R, Yamada K, Yano T:

- Peroxisome proliferator-activated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth. *FEBS Lett* 579:3829-3836, 2005
23. Galaup A, Cazes A, Le Jan S, Philippe J, Connault E, Le Coz E, Mekid H, Mir LM, Opolon P, Corvol P, Monnot C, Germain S: Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18721-18726, 2006
24. Cazes A, Galaup A, Chomel C, Bignon M, Brechot N, Le Jan S, Weber H, Corvol P, Muller L, Germain S, Monnot C: Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ Res* 99:1207-1215, 2006
25. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W: Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem* 275:28488-28493, 2000
26. Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman BM: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol* 20:5343-5349, 2000
27. Staiger H, Haas C, Machann J, Werner R, Weisser M, Schick F, Machicao F, Stefan N, Fritsche A, Haring HU: Muscle-Derived Angiopoietin-Like Protein 4 is Induced by Fatty Acids via PPAR{delta} and is of Metabolic Relevance in Humans. *Diabetes*, 2008
28. Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, Inoue S, Ohtani K, Kitamoto S, Tsuchihashi M, Sugaya T, Charo IF, Kura S, Tsuzuki T, Ishibashi T, Takeshita A, Egashira K: Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling. *Circ Res* 94:1203-1210, 2004
29. Niu J, Azfer A, Zhelyabovska O, Fatma S, Kolattukudy PE: Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). *J Biol Chem* 283:14542-14551, 2008
30. Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, Allavena P, Sozzani S, Mantovani A, Balkwill FR: The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* 95:2391-2396, 1995
31. Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayama K: Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. *Clin Cancer Res* 11:7629-7636, 2005
32. Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K: Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 102:220-224, 2002
33. Ghilardi G, Biondi ML, La Torre A, Battaglioli L, Scorza R: Breast cancer progression and host polymorphisms in the chemokine system: role of the macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) -2518 G allele. *Clin Chem* 51:452-455, 2005
34. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK: Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302:453-457, 2003
35. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, Kuroda J, Shibata N: Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol* 536:182-191, 2006