

## FRTL-5 세포의 성장 및 세포자연사에 대한 Wnt-1의 영향

울산의대 서울아산병원 내과, 아산생명과학연구소<sup>1</sup>

김정민 · 김태용 · 송영기 · 이윤수<sup>1</sup> · 박은정<sup>1</sup> · 최현정<sup>1</sup> · 김원배

### Effects of Wnt-1 on the Growth and Apoptosis of FRTL-5 Cells

Jung Min Kim, Tae Yong Kim, Young Kee Shong, Yoon Soo Rhee<sup>1</sup>,  
Eun Jung Park<sup>1</sup>, Hyun Chung Choi<sup>1</sup>, Won Bae Kim

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, Asan Institute for Life Sciences<sup>1</sup>, University of Ulsan College of Medicine

#### ABSTRACT

**Background:** Wnt proteins are major signaling molecules involved in embryonic induction, generation of cell polarity and the cell fate decision. A central player in the Wnt signaling pathways is beta-catenin. Several studies have suggested that the Wnt/beta-catenin signaling pathway may be involved in the physiologic/pathologic control of thyroid cell growth and function.

**Methods:** We investigated the effect of thyroid-stimulating hormone (TSH) on the expression of Wnt proteins in FRTL-5 cells. To evaluate the effect of Wnt-1 on FRTL-5 cells growth, we isolated a stable cell line that overexpressed Wnt-1 (W1), and a vector-transfected cell clone (V3) was used as a control. We investigated the differences in the cellular growth rate, the cell cycle and cell apoptosis in the W1 and V3 cell lines.

**Results:** TSH caused a significant increase in the Wnt-1 level and a pronounced decrease in both the active and total beta-catenin levels in the FRTL-5 cells. The growth rate, the percentage of cells in the S/G2/M phase and the c-myc level were significantly higher in the W1 cells compared with the V3 cells. There was no change in the beta-catenin level and the cyclin D1 level in the W1 cells compared with the V3 cells. The cellular apoptosis induced by actinomycin-D seemed to be significantly decreased because the level of bcl-2 was increased in the W1 cells compared with the V3 cells.

**Conclusion:** The FRTL-5 cells expressed Wnt-1 protein, and TSH increased the Wnt-1 expression, and it paradoxically decreased beta-catenin in the FRTL-5 cells. Overexpression of Wnt-1 in the FRTL-5 cells increased cell growth and it decreased apoptosis. Growth stimulation by Wnt-1 overexpression was not mediated by beta-catenin (the canonical Wnt pathway), but seemed to be mediated by activation of the Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway, which involves an increased c-myc level. Suppression of apoptosis with Wnt-1 overexpression was due to the increased bcl-2 level. (J Kor Endocrinol Soc 22:35~44, 2007)

**Key Words:** Beta-catenin, Thyroid, Wnt-1 protein

#### 서 론

접수일자: 2006년 9월 5일

통과일자: 2006년 11월 16일

책임저자: 김원배, 서울아산병원 내분비내과

본 연구는 아산생명과학연구소의 연구비(06-289) 지원에 의하여 이루어졌음.

Wnt 단백질은 배아 유도, 세포 극성의 생성, 세포 운명 결정에 관여하는 주요한 신호 분자로[1], 최근까지 19개의 Wnt 단백질이 포유동물에서 발견되었다. Wnt 단백질은 시스테

인이 풍부한 당단백질로 아주 한정된 범위에서만 작용하는 리간드(short-range ligand)이며 수용체 매개 신호 전달체계를 국소적으로 활성화시켜 세포 증식과 분화에 중요한 조절 인자로 작용한다[2]. Wnt 신호 전달체계에서 중요한 역할을 하는 것은 베타 카테닌(beta-catenin)으로[3], T cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/LEF)와 결합하여 표적 유전자 발현을 유도하고, 세포 간의 부착에서 액틴 세포골격(cytoskeleton)과 카드헤린(cadherin)을 연결하는 역할을 한다[4,5].

Wnt는 세포에서 분비된 후 Frizzled 단백질과 지질단백 관련 단백질 5/6 (LRP 5/6)이라는 두 개의 수용체 분자와 결합한다. 이 결합은 “Wnt/베타 카테닌” 전달체계, “Wnt/갈슘” 전달체계, “평면 세포 극성(planar cell polarity)” 전달체계를 포함한 다양한 신호 전달체계를 활성화시킨다[1~3,6]. 이들 중에 가장 잘 알려지고 광범위하게 연구된 전달체계는 “Wnt/베타 카테닌” 신호 전달체계로 ‘고전적(canonical)’ 신호 전달체계로 불리며, 베타 카테닌의 세포 내 농도를 조절하는 역할을 한다. Wnt 신호가 없는 경우 프로테오솜(proteosome) 매개 분해로 인해 베타 카테닌의 세포 내 농도는 낮게 유지된다[3]. 베타 카테닌은 액신(axin)과 adenomatous polyposis coli (APC) 단백질 골격 복합체와 결합되어 있는 casein kinase I (CKI) 및 glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)에 의해 인산화가 되고, 26S 프로테오솜에서 유비퀴틴화(ubiquitination)된 후 분해된다[7,8]. Wnt 신호 전달체계가 활성화되면 GSK-3  $\beta$  매개 인산화가 감소하여 베타 카테닌이 세포질 내에 축적된다. 축적된 베타 카테닌은 핵으로 이동하여 TCF/LEF 전사요소와 결합하고, 다양한 표적 유전자의 전사를 유도한다.

Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계는 여러 종류의 암에서 활성화되어 있다고 알려져 있다[9~12]. 인체의 갑상선 세포에는 Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계의 요소인 Wnt, Frizzled, Disheveled 단백질 등이 발현되는 것으로 알려져 있다[13]. Wnt/베타 카테닌 전달체계의 조절 이상으로 인하여 갑상선 세포의 비정상적인 성장과 탈분화가 일어나 갑상선 종양이 생긴다는 보고도 있다[14~17]. 이런 소견은 Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계가 갑상선 세포의 성장과 기능의 생리적, 병리적 조절에 연관되어 있음을 시사하나 아직 이에 관한 연구는 없다.

FRTL-5 세포는 갑상선자극호르몬과 인슐린/인슐린유사성장인자의 조절을 받는 백색 갑상선 세포주로, thyroperoxidase, 갑상선글로불린, sodium iodide symporter, 갑상선자극호르몬수용체 유전자와 같은 갑상선 특이적 혹은 제한적인 유전자를 발현한다[18~21]. FRTL-5 세포는 지속적으로 계대 배양이 가능하지만(immortalized) 시험관 내(in vitro)나 생체 내(in vivo)로 이식되었을 때 종양을 형성하지는 않는 특성을 가진다.

본 연구에서는 FRTL-5 세포를 사용하여 갑상선세포에서 Wnt 신호 전달체계의 생물학적 역할을 평가하기 위해 갑상선자극호르몬에 의한 Wnt-1 및 베타 카테닌의 발현 변화와, 안정적 Wnt-1 과발현에 의한 세포 성장의 변화 및 조절기전을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

Coon's modified F-12 배양액에 열불성화된 5% 우태아 혈청(Gibco; Grand Island, NY, USA), 1 mM non-essential amino acid (Biosource International; Rockville, MD, USA), 갑상선자극호르몬(10 mU/mL), 인슐린(10  $\mu$ g/mL), 코르티솔(0.4 ng/mL), 트랜스페린(5  $\mu$ g/mL), glycyl-L-histidyl-L-lysine 아세트산염(10 ng/mL), 소마토스타틴(10 ng/mL) 등의 6가지 호르몬 혼합체를 첨가하여 만든 배양액(6H 배양액)에 FRTL-5 세포주(Interthyr Research Foundation, Baltimore, MD, USA)를 배양하였다. 새로운 배양액으로 2~3일마다 교환하였고, 세포를 5~7일마다 계대 배양하였다. 일부 실험에서는 실험 전 5~6일 동안 FRTL-5 세포를 갑상선자극호르몬이 없는 배양액(5H 배양액)에서 배양하였다.

### 2. 일시 과발현 FRTL-5 세포의 제작

DEAE-dextran (ProFection<sup>®</sup> Mammalian Transfection System, Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 Wnt-1, Wnt3, Wnt-5a 등을 일시적으로 과발현하는 FRTL-5 세포주를 제작하였다. pCS2+ 벡터에 클로닝된 마우스 Wnt-1, Wnt-3, Wnt-5a cDNA (각각 Wnt-1/CS2+, Wnt-3/CS2+, Wnt-5a/CS2+)가 실험에 사용되었다[22~25]. 세포가 우물 바닥의 40~50% 정도 찰 때까지 6H 배양액에서 배양하고, 5H 배양액에서 5~6일 동안 유지한 후, 과발현 세포 제작 하루 전에 다시 6H 배양액으로 교환하였다. 배양된 세포를 실온에서 9분 동안 DEAE-dextran 수용액(1 mg/mL를 함유한 D-PBS)으로 전처리한 후에 플라스미드 수용액(20  $\mu$ g/540  $\mu$ L D-PBS)을 추가하였다. 세포를 중간중간 흔들면서 37°C에서 30분 동안 반응시키고, 6H 배양액에서 추가로 48~72 시간 동안 배양 후, 총 RNA 또는 whole cell lysate를 분리하였다.

### 3. Wnt-1 안정 과발현 FRTL-5 세포주의 확립

전기천공(electroporation) 방법을 이용하여 Wnt-1을 안정적으로 과발현하는 FRTL-5 세포주를 제작하였다. Wnt-1을 선택한 이유는 갑상선자극호르몬 자극에 대한 민감도뿐 아니라, 세포 내 베타 카테닌 농도를 상승시키는 데 있어서 여러 Wnt 발현 벡터 중에 가장 효과적이기 때문이었다.

pVITRO3-mcs (hygromycin 저항 유전자인 hph를 지님)에 클로닝된 생쥐 Wnt-1 cDNA (pVITRO3/Wnt-1)를 이용하여 안정 과발현 FRTL-5 세포주를 제작하였다[25~28]. pVITRO3/Wnt-1의 대조군 벡터(pVITRO3)는 Eco/RI으로 Wnt-1 cDNA 단편 부위를 잘라내고 벡터 조각을 재결합하여 만들었다. 세포 부유액( $5 \times 10^6$  cells/mL)과 30  $\mu$ g의 플라스미드를 큐벳에 혼합하고 Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 300 V에서 전기충격을 가한 후, 200  $\mu$ g/mL hygromycin B (Invitrogen)에서 유지하였다. 클로닝 실린더를 이용하여 클로닝을 시행하였다. 각 클론은 Wnt-1 mRNA 및 단백질 발현 정도에 따라 선별하여 선택되었다.

#### 4. RNA 분리와 노던블롯 분석

노던블롯 분석은 이전에 기술된 대로 시행되었다[26]. FRTL-5 세포를 PBS로 세척하였고, 상품화된 키트(RNeasy Mini Kit; Qiagen Inc.)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 0.66M 포름알데히드를 함유하고 있는 1% 변성된 (denaturing) agarose 겔에 각 시료 당 20  $\mu$ g의 총 RNA를 영동하여 Nytran 막(Schleicher and Schuell Inc.; Keene, NH, USA)으로 이동시킨 후 자외선 교차결합 및 부합화 (hybridization)를 시행하였다. Wnt-1/CS2+ 벡터로부터 Wnt-1에 대한 표지자를 얻었고,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP와 Ladderman Labeling Kit (Takara Biochemical Inc.; Berkeley, CA, USA)로 표지하였다. 영상 분석은 BAS 1500 Bioimaging Analyzer (Fuji Photo Film Co., Ltd. Medical Systems USA Inc.; Stamford, CT)을 이용하였다.

#### 5. 웨스턴블롯 분석

Protease inhibitor를 포함하고 있는 용해 완충액을 세포에 가한 후 세포를 수집하였다. Sonic dismembrator 550 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)를 이용하여 세포막을 파괴하여 세포 용해액을 얻고, micro BCA 단백질 분석 키트 (Pierce; Rockford, IL)로 단백질 농도를 측정하였다. 용해액 20  $\mu$ g을 NuPAGE™ 4~12% Bis-Tris 겔(Invitrogen)에서 전기영동한 후 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 막을 5% 탈지분유를 함유한 TBS-T [10 mM Tris (pH8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20]으로 반응시키고, 베타 카테닌 항체, 활성화된 베타 카테닌 항체, Wnt-1, 베타 액틴 항체를 1% 탈지분유를 함유한 TBS-T에서 반응시켰다. 막을 TBS-T로 세척하고 horseradish phosphatase와 접합된 이차 항체와 반응시켰고, ECL Western Blot detection system (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

#### 6. 세포 성장 분석

세포 성장은 methyl-thiazoletetrazolium bromide (MTT) 분석법으로 측정하였다[27]. 우물당  $2 \times 10^4$  세포를 24 우물 용기에 분주한 후 지정된 시간 동안 배양하였다. 각 시간 별로 50  $\mu$ L의 1 mg/mL MTT 수용액을 0.5 mL 배양액이 있는 우물에 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 후 500  $\mu$ L의 MTT 용해액(10% Triton-X 함유한 isopropyl alcohol)을 추가하였다. 각 우물의 흡광도를 570 nm에서 ELISA 판독기 (Model 540; Bio-Rad Labs, Merck, USA)로 측정하였다. 세포 분주 3시간 후의 수치를 기저치로 하였다. staurosporin을 이용한 실험의 경우, 분주 후 24시간 후에 staurosporin을 배양액에 첨가하였고 MTT 분석은 72시간째에 시행하였다. 각 실험 조건 당 6개의 독립적인 우물의 결과를 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다.

#### 7. 세포 주기의 유속 세포측정 분석

세포가 우물 바닥의 80~90% 정도 차면 트립신으로 처리하여 모은 후 PBS로 세척하였다. 세포를 다시 PBS에 부유시킨 후 차가운 에탄올을 첨가하였다. 시료는 분석하는 날까지 4°C에 보관하였다. 분석 당일, 시료를 리보핵산분해효소 A (3  $\mu$ g/mL)와 propidium iodide (0.05 mg/mL)를 포함한 PBS 수용액으로 세척, 부유시킨 후 차광된 상태로 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 세포는 FACSsort flow cytometer (Becton Dickinson; San Jose, CA, USA)로 측정하였다.

#### 8. 세포자연사(apoptosis)의 측정

Cell death detection ELISA plus kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포자연사를 측정하였다. 6 우물 용기에 배양 중인 세포에 actinomycin-D를 다양한 농도로 첨가하여 일정시간 배양하고 트립신을 이용하여 분리한 후 PBS로 세척하고 1.5 mL 튜브로 옮겼다. 각 튜브에 세포를 10<sup>4</sup>개씩 넣어 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 각 우물에 200  $\mu$ L의 용해 완충액을 첨가하여 15~25°C에서 30분간 반응시켰다. 튜브를 다시 10분간 원심분리하고 상층액 20  $\mu$ L를 streptavidin이 코팅된 96 우물 용기에 옮겼다. 각 우물에 면역반응액을 80  $\mu$ L씩 첨가하고 덮개 호일로 감싼 후 300 rpm에서 15~25°C의 온도에서 2시간 동안 반응시켰다. 용액을 제거하고 반응액으로 3회 세척하고 각 우물에 ABTS 용액을 100  $\mu$ L씩 첨가하여 충분한 발색반응이 보일 때까지 약 10~20분 동안 250 rpm으로 반응시킨 후, 405 nm에서 ELISA 판독기(Model540; Bio-Rad Labs, Merck, USA)로 흡광도를 측정하였다.

## 9. Statistics

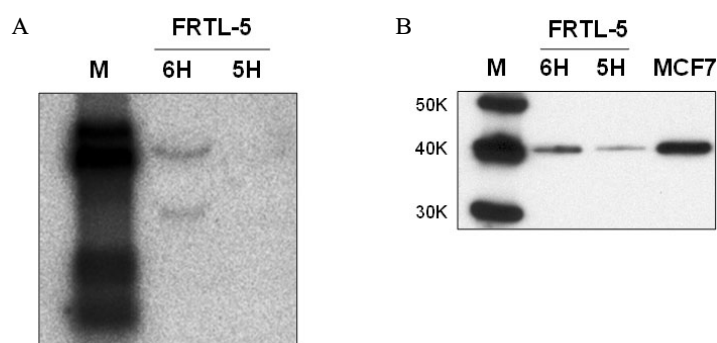
양 군 간의 통계학적 차이를 평가하기 위해 Mann Whitney U Test (SPSS® 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하였다. 표준편차는 오차 막대로 표시하였다.

## 결 과

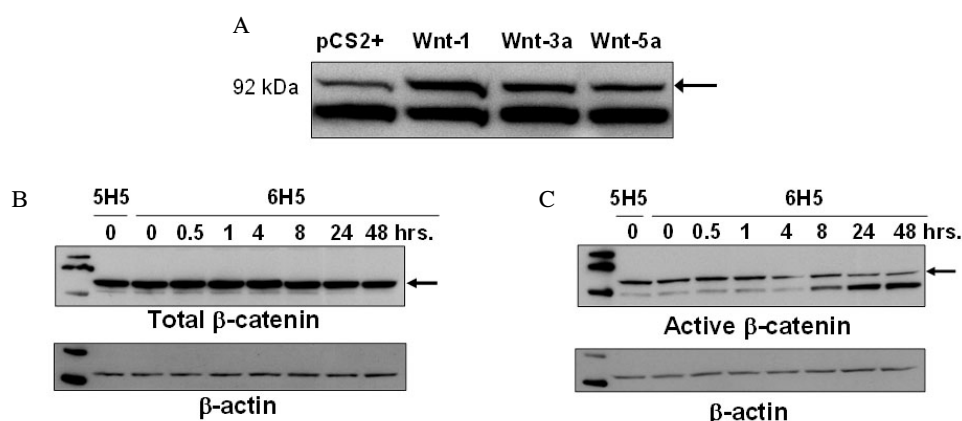
### 1. FRTL-5 세포주에서 갑상선자극호르몬에 의한 Wnt-1 발현 증가와 베타 카테닌 농도 감소

FRTL-5 세포에서 갑상선자극호르몬 첨가 시 Wnt-1

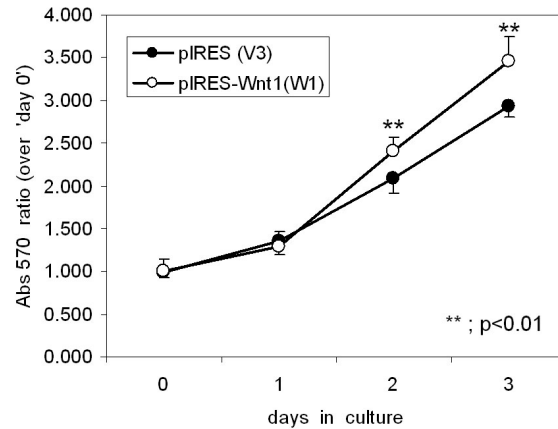
mRNA 농도(Fig. 1A)와 단백질 농도(Fig. 1B)가 의미 있게 증가하였다. FRTL-5 세포에서 몇 가지 Wnt 발현 벡터를 과 발현시켰을 때 Wnt-1의 경우에만 활성화된 베타 카테닌 농도가 증가하였다(Fig. 2A, 화살표). 하부 항체 반응 복합체 (lower antibody reactive complex) 밴드는 Wnt 발현과 무관하게 일정하였다. FRTL-5 세포의 Wnt-1 농도가 갑상선 자극호르몬 처리 시 증가한 본 실험 결과를 통해, FRTL-5 세포에서 갑상선자극호르몬을 투여하면 베타 카테닌 농도가 증가할 것이라 가정할 수 있었다. 그러나 FRTL-5 세포에 갑상선자극호르몬 투여 시 총 베타 카테닌 농도는 약간 감소하였고(Fig. 2B, 화살표), 활성화된 베타 카테닌 농도는



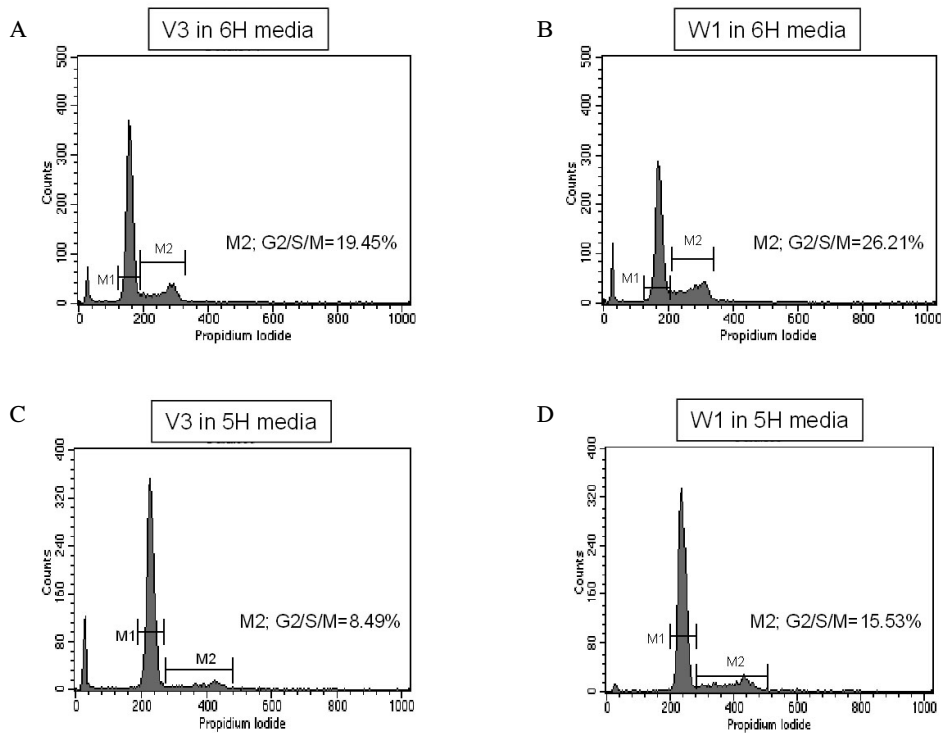
**Fig. 1.** Wnt-1 expression in FRTL-5 cells being increased by TSH. FRTL-5 cells were grown in the absence (5H media, '5H') or presence (6H media, '6H') of TSH for 5 days. A, Total cellular RNA was subjected to Northern blot analyses using Wnt-1 probe. B, 20 µg of cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using Wnt-1 antibody. MCF7, a breast cancer cell line known to over-produce Wnt-1 protein, was used as positive control.



**Fig. 2.** Total and active beta-catenin level in FRTL-5 cells being affected by TSH. A, Lysates of FRTL-5 cells transfected with Wnt-1, Wnt-3a or Wnt-5a expression vectors were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using antibody against 'active beta-catenin'. B, Lysates of FRTL-5 cells grown in the absence (5H media, '5H') or presence (6H media, '6H') of TSH were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using antibody against total beta-catenin. C, Lysates of FRTL-5 cells grown in the absence (5H media, '5H') or presence (6H media, '6H') of TSH were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using antibody against active beta-catenin. Arrows indicate target protein (total or active beta-catenin).



**Fig. 3.** The growth rate of FRTL-5 cells stably transfected with Wnt-1. Growth rates of FRTL-5 cells stably transfected with Wnt-1 expression vector (W1) or control vector (V3) were compared at indicated time points using MTT assay. Background absorbance (cell culture medium only) was subtracted to obtain actual absorbance. Absorbance values were plotted relative to baseline absorbance (i.e., absorbance at day 0). All values are mean  $\pm$  standard deviation.



**Fig. 4.** Cell cycle analysis in stable transfectant overexpressing Wnt-1. Cell cycle analysis of Wnt-1 overexpressing cells (W1) and vector-transfected cells (V3) was performed using flow cytometry. DNA content of cells stained with propidium iodide was measured and analyzed. Cell cycle distribution of V3 clone grown in 6H media (A), maintained in 5H media for 6 days (B), W1 clone grown in 6H media (C), and maintained in 5H media for 6 days (D) are shown. M1 indicates cells in G1 phase and M2 indicates cells in G2/S/M phase.

현저하게 감소하였다(Fig. 2C, 화살표).

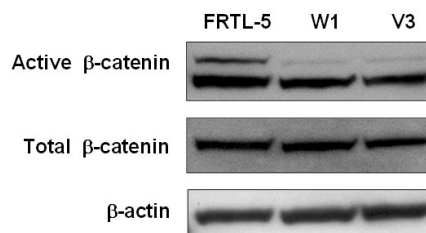
## 2. FRTL-5 세포의 성장을 촉진하는 Wnt-1

FRTL-5 세포는 transfection 효율이 매우 낮기 때문에 일시적 과발현에 의해서는 세포 성장속도의 변화를 파악하기 어렵다. 따라서 FRTL-5 세포 성장에 대한 Wnt-1의 효과를 평가하기 위해 Wnt-1 발현 농도를 기준으로 대표 클론을 하나씩 선택하여 Wnt-1 안정적 과발현 세포주 클론(W1)과 대조군으로 벡터만 안정적으로 과발현시킨 세포주 클론(V3)을 분리하였다. MTT 분석방법으로 세포 생존을 측정하였을 때, W1에서 V3보다 세포의 성장률이 유의하게 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 3). Wnt-1 과발현 세포주의 증가한 성장률은 세포 주기 분석을 통하여 확인되었는데, 감산전자극호르몬에 관계없이 S/G2/M 주기의 세포 비율이 W1에서 V3보다 의미있게 높았다(Fig. 4).

## 3. Wnt-1 과발현에 의한 FRTL-5 세포 성장의 기전

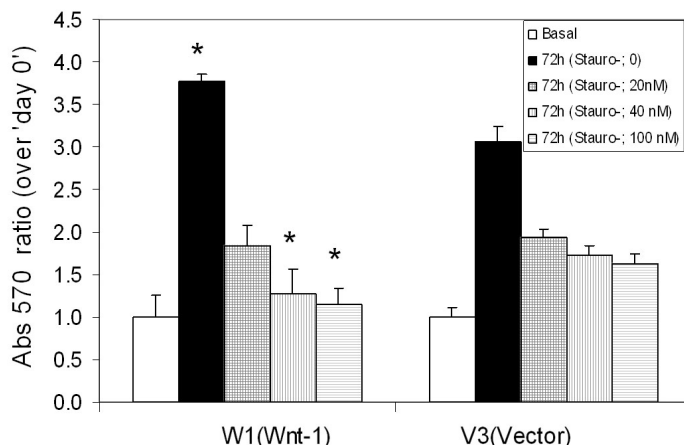
각 클론에 대하여 활성화된 베타 카테닌(TCF/LEF factors와 함께 핵 복합체를 형성하는 Ser-37과 Thr-41 위치에 모두 비인산화된 베타 카테닌[28])과 총 베타 카테닌을 기저상태에서 살펴보았다. 활성화된 베타 카테닌은 FRTL-5 세포와 비교해서 W1과 V3에서 감소되었고, 총 베타 카테닌은 V3, FRTL-5 세포와 비교해서 W1에서 변화가 없었다

(Fig. 5). 이는 W1 세포주의 성장 촉진 현상이 고전적인 Wnt 신호 전달체계(베타 카테닌)를 매개로 하지 않음을 시사한다. Wnt/칼슘 신호 전달체계가 W1 세포주에서 활성화되어 있는지 살펴보기 위해 단백질키나아제(protein kinase C; PKC) 억제제를 W1에 가하고 성장에 대한 영향을 평가하였다. PKC 억제제인 staurosporin을 이용하여 세포의 성장률을 비교하였을 때, W1에서 V3보다 성장 억제 정도가 더 큰 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 각 클론에서 c-myc, cyclin D1의 농도를 기저상태에서 살펴보았을 때, W1에서 V3보다



**Fig. 5.** Beta-catenin level in Wnt-1 transfected FRTL-5 cells.

20  $\mu$ g of cell lysates of Wnt-1 transfected (W1) or vector-transfected (V3) FRTL-5 cells and FRTL-5 cells grown in the presence of TSH (6H media) were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using antibodies against 'active beta-catenin' and 'total beta-catenin'.



**Fig. 6.** Effect of staurosporin, a PKC inhibitor, on the growth rate of FRTL-5 cells stably trasfected with Wnt-1 or control vector.

Growth rates of FRTL-5 cells stably transfected with Wnt-1 expression vector (W1) or control vector (V3) were compared in the presence of staurosporin or control (DMSO) using MTT assay. Background absorbance (cell culture medium only) was subtracted to obtain actual absorbance. Absorbance values at 72 hours were plotted relative to baseline absorbance (i.e., absorbance at day 0). All values are mean  $\pm$  standard deviation of 6 independent wells.

\* indicates  $P < 0.05$  compared to V3 cells treated with the same concentration of staurosporin.

c-myc의 농도는 높았지만, cyclin D1의 농도에는 차이가 없었다(Fig. 7).

#### 4. Wnt-1 과발현에 의한 FRTL-5 세포의 세포자연사에 대한 감수성 영향 확인

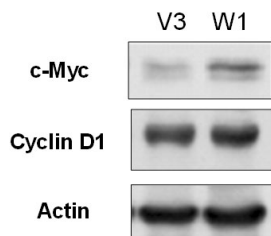
기저상태에서 두 클론 간에 유의한 세포자연사의 차이를 보기 어렵기 때문에, 각 클론을 actinomycin-D 0, 200, 400  $\mu$ M으로 48시간 동안 처리한 후 세포자연사 정도를 평가하였다. W1이 V3에 비하여 모든 농도에서 세포자연사가 적었다(Fig. 8). 그 기전을 알기 위하여 각 클론에서 기저상태의 bcl-2의 농도를 살펴보았을 때, W1에서 V3보다 bcl-2 농도가 높았다(Fig. 9).

### 고 찰

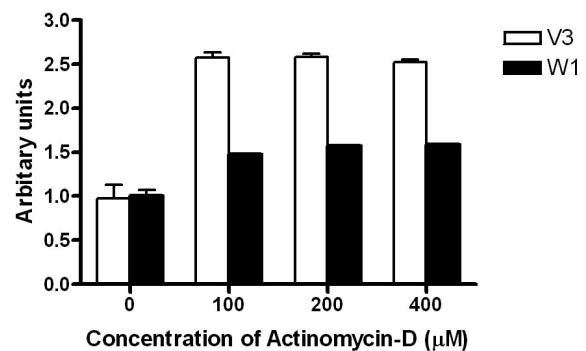
본 연구에서는 분화된 갑상선 세포주인 FRTL-5 세포를 이용하여, Wnt 신호 전달체계 활성화의 생물학적 의미를 조사하였다. 갑상선자극호르몬 처리시 FRTL-5 세포에서 Wnt-1의 농도가 증가하였고, 별도의 실험에서 Wnt-1 과발현은 세포 성장을 촉진하고 세포자연사에 대한 감수성을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

FRTL-5 세포에서 갑상선자극호르몬 처리 시 Wnt-1 단백질과 RNA 농도가 증가하고 베타 카테닌의 농도는 감소하였

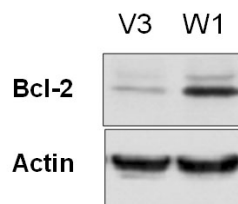
다. Wnt-1은 전통적으로 고전적 Wnt 신호 전달체계를 활성화시켜 베타 카테닌의 분해를 저해함으로써 세포 내 농도를 높여 베타 카테닌의 축적을 일으키기 때문에[1~3,6] Wnt-1 농도를 증가시키는 갑상선자극호르몬 처리시 베타 카테닌 농도의 증가가 기대되었지만 반대의 결과가 나왔다. Wnt-1 안정적 과발현 세포주인 W1에서도 베타 카테닌의 농도, 특히 활성화된 베타 카테닌의 농도가 감소하였다. 이 현상의 원인으로 세 가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫 번째로, 기존의 고전적 신호 전달체계가 아닌 비고전적 신호 전달체계를 통한 작용을 생각해 볼 수 있다. Wnt 신호 전달체계는 베타 카테닌을 증가시키는 고전적 신호 전달체계뿐만 아니라 PKC 활성을 증가시키는 비고전적 Wnt/칼슘 신호 전달체계도 있는 것으로 알려져 있다. PKC 저해제인 staurosporin을 처리했을 때 W1에서 세포의 성장이 저해되었다는 결과를 통해서 Wnt 신호 전달체계가 비고전적 전달체계를 통해 이루어질 가능성을 볼 수 있었다. 따라서 갑상선자극호르몬 처리 시에도 고전적 신호 전달체계가 아닌 비고전적 신호 전달체계를 통해서 베타 카테닌의 발현이 감소하였다고 생각할 수 있다. 두 번째로 갑상선자극호르몬 신호 자극을 통해 FRTL-5 세포에서 베타 카테닌의 분해 과정이 증가했을 가



**Fig. 7.** Protein expressions of c-myc, cyclin D, and actin of Wnt-1 transfected (W1) and vector-transfected (V3) FRTL-5 cells. Expressions of c-myc, cyclin D1, and actin of W1 and V3 were measured by Western blot analysis.



**Fig. 8.** Effects of actinomycin-D on apoptosis of Wnt-1 transfected (W1) and vector-transfected (V3) FRTL-5 cells. Apoptosis was measured by Cell death detection ELISA plus kit (Roche Diagnostics). W1 and V3 were treated by 0, 200, and 400  $\mu$ M of actinomycin-D for 48 hours, respectively.



**Fig. 9.** Protein expressions of bcl-2 and actin of Wnt-1 transfected (W1) and vector-transfected (V3) FRTL-5 cells. Expressions of bcl-2 and actin of W1 and V3 were measured by Western blot analysis.

능성이 있다. 최근에, 세포의 베타 카테닌 농도는 표피성장 인자(epidermal growth factor)에 의해 유도된 Wnt 의존적 기전에 의해 조절될 수 있다는 보고가 있었다[29]. 갑상선자극호르몬이 표피성장인자와 같은 조절자로 작용하여 세포 내 베타 카테닌 농도를 감소시켰을 것으로 생각할 수 있다. 세 번째로, Wnt-1이 FRTL-5 세포에서 기능적으로 유일한 Wnt 단백질이 아닐 수 있다. 즉, FRTL-5 세포가 Wnt-1 외에 많은 다양한 기능적인 Wnt 단백을 가지고 있다면, 갑상선자극호르몬이 Wnt 단백질이나 Wnt 신호 전달체계에 미치는 결과가 달라질 것이다.

FRTL-5 세포에서 Wnt-1을 일시적으로 과발현시키면 활성화된 베타 카테닌 농도가 증가하는데 반하여 Wnt-1 또는 벡터를 안정적으로 과발현시킨 세포주인 W1이나 V3에서 활성화된 베타 카테닌의 농도가 모두 감소한 현상의 원인은 명확하지 않다.

Wnt-1 과발현 세포주인 W1에서 성장률과 S/G2/M 주기의 세포 비율이 증가하며, 세포자연사가 감소하였다. 이는 Wnt 신호 전달체계의 활성화가 FRTL-5 세포의 성장과 세포 주기를 변화시키고, 세포자연사를 감소시켰음을 의미한다. 기존의 여러 연구들에 따르면 Wnt/베타 카테닌 전달체계에서 베타 카테닌 증가가 세포 성장 촉진의 주된 기전으로 생각되기 때문에[6~8] 베타 카테닌 발현을 측정하였으나 W1의 베타 카테닌 발현은 FRTL-5나 V3와 비교하여 전혀 증가하지 않았다. 이러한 결과를 통해서 베타 카테닌이 FRTL-5 세포의 성장 조절에 중요한 역할을 갖지 않는다는 것을 알 수 있었다.

세포 성장과 세포 주기의 세포 비율 변화의 기전을 알기 위해 측정된 c-myc의 발현은 W1에서 증가되어 있었다. 세포 성장을 촉진하는 것으로 알려진 c-myc에 대한 유전자는 베타 카테닌에 의해 발현이 증가하는 직접적인 표적으로 알려져 있다[30~32]. c-myc은 세포의 성장과 증식을 증진시키며, 대부분의 세포에서 분화를 방해하고 세포자연사가 일어나기 쉽게 유도하는 것으로 알려져 있다[33]. c-myc은 진행 세포에서 G1-S progression을 조절하는 cyclin-E-CDK (cyclin dependent kinase) 2의 활성화를 유도하고 CDK 억제제를 불활성화시켜 세포 주기의 G1 시기에 MYC-induced G1-S progression을 일으킨다[33]. 따라서 c-myc의 증가는 Wnt-1 과발현에 의한 세포 성장의 증가와 S/G2/M 주기 세포 비율의 증가를 설명해 줄 수 있다. 그러나 c-myc과 같이 세포 성장을 촉진하며 베타 카테닌의 또 다른 직접적인 표적으로 알려진 cyclin D1[30~32]의 발현은 W1에서 증가하지 않았다. cyclin D1은 특히 대장암 세포에서 Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계 활성화에 의한 성장 촉진의 주요한 요소인 것으로 알려져 있다[7]. W1의 성장이 Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계의 활성화를 통해 증가되었다면, 베타 카테닌의 발현이 증가될 뿐 아니라 c-myc, cyclin D1의 발현도

동시에 증가하였을 것이다. 그러나, 베타 카테닌과 cyclin D1의 발현은 증가하지 않았다는 본 실험 결과를 통해, W1의 성장과 증식이 고전적인 Wnt 신호 전달체계인 Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계가 아닌 비고전적 Wnt 신호 전달체계인 Wnt/칼슘 신호 전달체계에 의해서 일어나는 것으로 생각된다. 그 근거의 하나로 PKC 저해제인 staurosporin을 사용하였을 때 W1에서 성장 촉진이 저해되었다는 결과를 들 수 있다. 이것은 PKC가 W1의 성장에 관여하고 이는 Wnt/칼슘 신호 전달체계를 통해 이루어진다는 점을 간접적으로 시사한다 하겠다. FRTL-5 세포에서 세포 내 칼슘의 증가로 인해 c-myc이 증가될 수 있음이 보고된 바 있다[34]. PKC 활성화를 일으키는 Wnt/칼슘 신호 전달체계 활성화의 기전은, 세포막에서의 Wnt 신호가 Frizzled 수용체의 특정한 이형에 의해 인식되거나[35], heterotrimeric G-protein의 활성화를 통해 기능할 것[35,36]이라는 몇몇 보고에도 불구하고, 현재까지 잘 알려져 있지 않다. 본 연구의 결과를 토대로 할 때, 결국 Wnt/칼슘 신호 전달체계가 Wnt-1의 과발현에 의해서 활성화되고 그 결과 c-myc을 증가시켜서 세포 성장 주기를 증진시키는 것으로 생각된다. Wnt-1 과발현 세포에서 세포자연사 감소의 기전을 알기 위해 측정된 bcl-2는 증가되어 있었다. c-myc의 발현이 증가되었음에도 불구하고 bcl-2의 발현이 증가되었기 때문에 세포자연사가 W1에서 V3보다 적게 일어난 것으로 생각된다.

결론적으로 정상 갑상선 세포주인 FRTL-5 세포에서 정상적으로 Wnt-1이 발현되며 이는 갑상선자극호르몬에 의하여 증가함을 본 연구에서 처음으로 밝혔다. FRTL-5 세포주에서 Wnt-1의 과발현은 세포의 성장을 촉진하였으며 세포자연사를 감소시켰다. Wnt-1의 과발현에 의한 세포 성장의 촉진은 베타 카테닌을 통한 고전적인 Wnt 신호 전달체계를 매개로 하지 않음을 알 수 있었고 c-myc의 증가와 관련된 Wnt/칼슘 신호 전달체계를 매개로 할 것으로 생각된다. Wnt-1 과발현에 의한 세포자연사의 감소는 bcl-2 단백질의 증가 때문임을 알 수 있었다. 즉, 갑상선자극호르몬은 전통적인 cAMP/PKA 경로를 통한 세포 성장 촉진 기전 외에도, Wnt-1 신호 전달체계의 활성화를 통하여 FRTL-5 세포의 성장에 영향을 줄 수 있다.

## 요 약

**연구배경:** Wnt 단백질은 배아 유도, 세포 극성의 생성, 세포 운명 결정에 관여하는 주요한 신호 분자로 세포 증식과 분화에 중요한 조절인자로 알려져 있다. Wnt 신호 전달체계에서 중요한 역할을 하는 것은 베타 카테닌으로, Wnt/베타 카테닌 신호 전달체계는 갑상선 세포의 성장과 기능의 생리적, 병리적 조절과 연관되어 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 FRTL-5 세포를 사용하여 갑상선세포에서 Wnt 신호



전달체계의 생물학적 역할을 알아보고자 하였다.

**방법:** FRTL-5 세포를 이용하여 갑상선자극호르몬 유무에 따른 Wnt 단백질과 베타 카테닌 발현 정도를 평가하였다. Wnt-1 발현 클론(W1)과 대조군(V3)을 이용하였다. 각 군에서 세포 성장률, 세포 주기 및 세포자연사를 비교하여 그 기전을 밝히고, 갑상선 세포에서 Wnt-1의 역할을 평가하였다.

**결과:** FRTL-5 세포에 갑상선자극호르몬 처리 시 Wnt-1 mRNA 농도와 단백질 농도가 유의하게 증가한 반면 활성화된 베타 카테닌 및 총 베타 카테닌의 농도는 감소하였다. 세포의 성장률과 S/G2/M의 주기의 세포 비율이 V3와 비교하여 W1에서 유의하게 높았다. c-myc의 농도는 W1에서 V3보다 의미있게 증가하였고, 베타 카테닌 농도와 cyclin D의 농도에서는 차이를 보이지 않았다. actinomycin-D를 이용하여 세포자연사를 평가했을 때, 모든 농도에서 W1에서 V3보다 세포자연사가 적었다. bcl-2 농도는 W1에서 V3보다 높았다.

**결론:** 정상 갑상선 세포주인 FRTL-5 세포에서 정상적으로 Wnt-1이 발현되며 이는 갑상선자극호르몬에 의하여 증가하나 베타 카테닌은 역설적으로 감소하였다. FRTL-5 세포주에서 Wnt-1의 과발현은 세포의 성장을 촉진하였으며 세포자연사를 감소시켰다. Wnt-1의 과발현에 의한 세포 성장의 촉진은 베타 카테닌을 통한 고전적인 Wnt 신호 전달체계를 매개로 하지 않음을 알 수 있었고 c-myc의 증가와 관련된 Wnt/갈슘 신호 전달체계를 매개로 할 것으로 생각된다. Wnt-1 과발현에 의한 세포자연사의 감소는 bcl-2 단백질의 증가 때문임을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Cadigan KM, Nusse R: Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305, 1997
2. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A: WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5:691-701, 2004
3. Nelson WJ, Nusse R: Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-1487, 2004
4. Jamora C, Fuchs E: Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4:E101-E108, 2002
5. Gumbiner BM: Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148:399-404, 2000
6. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT: Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways. *Oncogene* 18:7860-7872, 1999
7. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851, 2000
8. Polakis P: Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* 12:R499-R501, 2002
9. Morin PJ: Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 21:1021-1030, 1999
10. Webster MT, Rozzycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R: Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 28:443-453, 2000
11. Clevers H: Axin and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 24:206-208, 2000
12. Polakis P: The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1332: F127-F147, 1997
13. Helmbrecht K, Kispert A, von WR, Brabant G: Identification of a Wnt/beta-catenin signaling pathway in human thyroid cells. *Endocrinology* 142: 5261-5266, 2001
14. Cerrato A, Fulciniti F, Avallone A, Benincasa G, Palombini L, Grieco M: Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. *J Pathol* 185: 267-272, 1998
15. Huang SH, Wu JC, Chang KJ, Liaw KY, Wang SM: Expression of the cadherin-catenin complex in well-differentiated human thyroid neoplastic tissue. *Thyroid* 9:1095-1103, 1999
16. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL: Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 59:1811-1815, 1999
17. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G: Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 158:987-996, 2001
18. Kohn LD, Saji M, Akamizu T, Ikuyama S, Isozaki O, Kohn AD, Santisteban P, Chan JY, Bellur S, Rotella CM: Receptors of the thyroid: the thyrotropin receptor is only the first violinist of a symphony orchestra. *Adv Exp Med Biol* 261:151-209, 1989
19. Bidey SP, Lambert A, Robertson WR: Thyroid cell

- growth, differentiation and function in the FRTL-5 cell line: a survey. *J Endocrinol* 119:365-376, 1988
20. Kikkawa F, Gonzalez FJ, Kimura S: Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Mol Cell Biol* 10:6216-6224, 1990
21. Shimura H, Okajima F, Ikuyama S, Shimura Y, Kimura S, Saji M, Kohn LD: Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1. *Mol Endocrinol* 8:1049-1069, 1994
22. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT: The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10:1443-1454, 1996
23. Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT: A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6:1302-1306, 1996
24. McMahon AP, Moon RT: Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58:1075-1084, 1989
25. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M: A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12682-12687, 2004
26. Suzuki K, Mori A, Ishii KJ, Saito J, Singer DS, Klinman DM, Krause PR, Kohn LD: Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2285-2290, 1999
27. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983
28. van NM, van de WM, Clevers H: Identification of two novel regulated serines in the N terminus of beta-catenin. *Exp Cell Res* 276:264-272, 2002
29. Lu Z, Hunter T: Wnt-independent beta-catenin transactivation in tumor development. *Cell Cycle* 3:571-573, 2004
30. Tetsu O, McCormick F: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-426, 1999
31. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5522-5527, 1999
32. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-1512, 1998
33. Pelengaris S, Khan M, Evan G: c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2:764-776, 2002
34. Isozaki O, Kohn LD: Control of c-fos and c-myc proto-oncogene induction in rat thyroid cells in culture. *Mol Endocrinol* 1:839-848, 1987
35. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT: Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9:695-698, 1999
36. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT: Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390:410-413, 1997