

갑상선 수질암 세포주 증식에 영향을 주는 물질 탐색

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내분비-대사 내과, 삼성생명과학연구소¹

신현원 · 장혜원 · 김근숙¹ · 이지인 · 박지영 · 김선욱 · 민용기 · 이명식 · 이문규 · 김광원 · 정재훈

Search for Materials that Influence Human Medullary Thyroid Carcinoma Cell Proliferation

Hyun Won Shin, Hye Won Jang, Keun Sook Kim¹, Ji In Lee, Ji Young Park, Sun Wook Kim, Yong-Ki Min, Myung-Shik Lee, Moon-Kyu Lee, Kwang-Won Kim, Jae Hoon Chung

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Samsung Biomedical Research Institute¹, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine

ABSTRACT

Background: Surgical excision is the only effective treatment of medullary thyroid carcinoma (MTC) and there is no certain treatment for recurrence or distant metastasis. Materials that influence MTC cell proliferation were recently reported. Presently, we evaluated the influence of dexamethasone, somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, forskolin and gastrin on MTC cell proliferation and calcitonin secretion.

Methods: Genomic DNA was extracted and sequenced from untreated thyroid TT cells and cells treated with 10^{-5} ~ 10^{-10} M dexamethasone, somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, forskolin or gastrin, and cultured for 1~6 days. Cell proliferation was assessed using a BrdU assay at days 1, 2, 3, and 6. Calcitonin in the culture medium from dexamethasone-treated TT cells was measured at days 1~3.

Results: Replacement of cysteine with tryptophan at codon 634 of exon 11 was evident in treated TT cells. There was no significant difference in cell proliferation at days 1~3 in cells treated with somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, gastrin and forskolin, while proliferation was inhibited in dexamethasone-treated cells in a concentration-dependent manner from 10^{-5} ~ 10^{-8} M with no inhibition evident at 10^{-10} M. Calcitonin levels in 10^{-5} ~ 10^{-8} M dexamethasone-treated cells were decreased.

Conclusion: Dexamethasone is a potentially useful compound to suppress MTC cell proliferation. Further studies are necessary to explore this potential further prior to clinical use. (**J Korean Endocr Soc 24:93-99, 2009**)

Key Words: calcitonin, dexamethasone, estradiol-17-beta, forskolin, gastrin, medullary thyroid carcinoma, progesterone, somatostatin

서 론

지금까지 갑상선 수질암은 수술이 유일한 치료 방법이며, 수술 이후에 재발하거나 원격전이가 발견될 경우 적절한 치료 방법이 알려져 있지 않다. 최근에는 갑상선 수질암의 세

포 성장에 영향을 줄 수 있는 물질들이 많이 보고되고 연구 중에 있어 향후 갑상선 수질암 세포의 병태 생리를 이해하고, 새로운 치료법 개발의 중요한 기초 자료가 될 것이 다[1~3]. 그러나, 지금까지 제시된 여러 물질들의 작용 정도를 동시에 비교한 연구는 없었다.

Somatostatin과 dexamethasone은 각각 갑상선 수질암 세포의 증식을 억제하며, dexamethasone은 농도에 따라 사람 갑상선 수질암 세포인 TT 세포에서 somatostatin의 분비를

접수일자: 2009년 2월 19일

통과일자: 2009년 6월 4일

책임저자: 정재훈, 성균관대학교 의과대학 내분비-대사 내과

억제하는 것으로 알려져 있다[4~6]. 또한 갑상선 수질암 세포에서 progesterone과 estrogen의 수용체가 발현됨이 밝혀져 있으나, progesterone과 estrogen이 수질암 세포의 증식과 분비기능에 어떠한 작용을 하는지는 정확히 알려진 바가 없다[7~9]. Forskolin은 갑상선 유두암에서 RET/PTC1 종양 유전자의 효과를 억제하는 것으로 알려져 있으나, 갑상선 수질암은 연구된 바 없다[10]. 그리고, 칼시토닌과 관련된 gastrin이 갑상선 수질암 세포 증식에 관여하는 것으로 보고되었으나 농도에 따라 변화 양상을 보여준 연구는 없었다[11].

따라서 본 연구에서는 TT 세포주에 dexamethasone, somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, forskolin, gastrin을 처리하였을 때 세포 증식에 미치는 영향을 평가하고, 세포 증식에 영향을 미치는 물질이 칼시토닌 분비를 변화시키는지 확인하고자 하였다.

방 법

1. Direct Sequence Analysis

사람 갑상선 수질암 세포주인 TT 세포주로부터 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. Exon 11번의 RET proto-oncogene은 반응개시 DNA인 primer와 함께 thermal cycler, model PE 9600 (Perkin Elmer, Foster city, CA)을 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였다.

사용된 primer는 Forward 5'-GCAGCCTGTACCCAGTGGTG-3', Reverse 5'-GAGACCTGGTTCTCCATGGAG-3'였다. automated direct sequence analyzer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 PCR로 증폭된 DNA 염기서열분석을 시행하였다.

2. 세포주 및 배양

TT 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 제공받았다. 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin을 포함한 F-12K 배양액(ATCC)에서 배양되었으며, 가슴배양기를 이용하여 37°C, 5% CO₂, 95% O₂의 환경에서 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교체하였으며 1주일 간격으로 세포가 70~80% 정도 자라면 계대배양하였다.

Dexamethasone (Sigma, Saint Louis), estradiol-17-beta (Sigma, Saint Louis), progesterone (Sigma, Saint Louis), forskolin (Sigma, Saint Louis)은 각각 100% 에탄올에 용해시키고 에탄올 0.1%의 농도로 약물 처리하는데 사용되었다. Somatostatin (Sigma, Saint Louis)은 Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)로 용해시키고, gastrin (Sigma, Saint Louis)은 증류수로 용해시킨 후에 필요한 적정 농도로 만들어 약물 처리에 사용되었다. 각각의 용해 물질만으로 처리한

세포를 대조군으로 하여 비교하였다.

3. 세포 증식의 억제 효과 평가

세포 증식을 확인하기 위해 thymidine 유사체인 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation (colorimetric)을 상품화된 정량적 ELISA 키트(Cell proliferation ELISA, Roche, Germany)로 BrdU assay를 시행하였다. 갑상선 암세포주를 96-well plate에 각 well 당 세포수가 5×10^4 이 되도록 분주한 후 48시간 동안 세포가 각 well에 안착할 수 있도록 하였다. 실험 시작 24시간 전에 PBS가 포함되지 않은 배양액에서 배양되었다. 이후에 dexamethasone, somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, gastrin, forskolin 각각의 물질을 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M 농도로 처리하고 1, 2, 3, 6일에 BrdU assay를 시행하였다. 세포 증식 변화를 비교하기 위해 각각 약물의 용해 물질만을 각각의 농도로 처리한 세포를 1, 2, 3, 6일에 BrdU assay를 시행하였다.

세포 증식을 측정하기 전에 세포에 BrdU를 넣어 4시간 동안 배양하였다. 세포의 고정과 DNA의 변성 이후에 BrdU 항체가 붙게 되면, 다시 이차적인 기질 반응에 의해 면역 결합체가 형성되고 multi-well spectrophotometer (Molecular Devices; Versamax tunable microplate reader)에 의해 흡광도가 측정되었다. 각 실험은 독립적으로 3회씩 반복하여 평균치로 비교하였다.

4. 칼시토닌 농도 측정

TT 세포 배양 후 dexamethasone 처리 1일째, 2일째, 3일째에 각각의 농도별로 배지 상층액을 250~300 ug씩 얻어 칼시토닌 농도를 측정하였다. 칼시토닌의 농도의 측정은 상품화된 키트(MEDGENIX CT-U.S.-IRMA, Biosource Europe S.A., Belgium)을 이용하여 면역방사측정법으로 측정하였다.

결 과

1. 수질암 세포주의 RET Mutation에 대한 Direct Sequence Analysis

Exon 11번의 코돈 634에서 Cys (TGC)에서 Trp (TGG)로 치환된 돌연변이를 확인하였다(Fig. 1).

2. 각 물질의 농도에 따른 갑상선 수질암의 세포 증식 효과

사람 갑상선 수질암 세포에 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M의 농도로 각각의 물질을 처리하였을 때, 1일부터 3일까지 dexamethasone을 제외한 다른 5가지 물질들은 각각의 대조군과 세포 증식의 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). Somatostatin과 forskolin이 3일째에 증식이 억제되는 것처럼 보였으나 이후

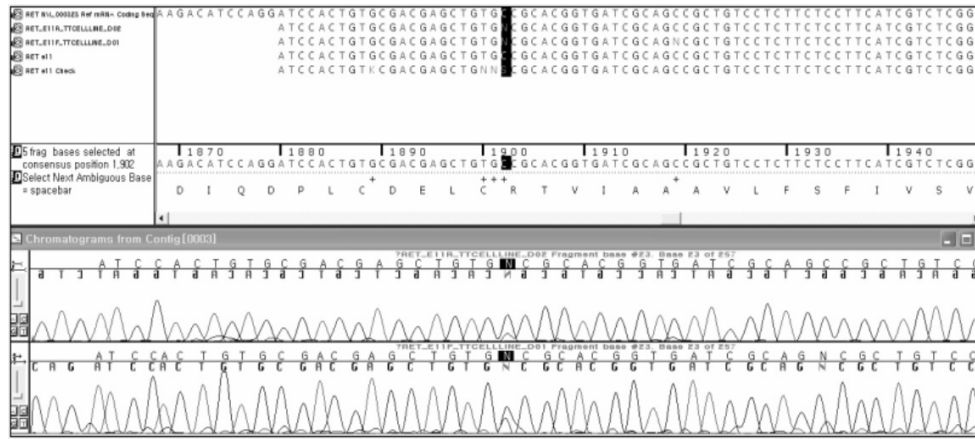


Fig. 1. Direct sequence analysis of RET mutation in TT cells. The substitution of Cys (TGC) to Trp (TGG) was detected at codon 634 of exon 11.

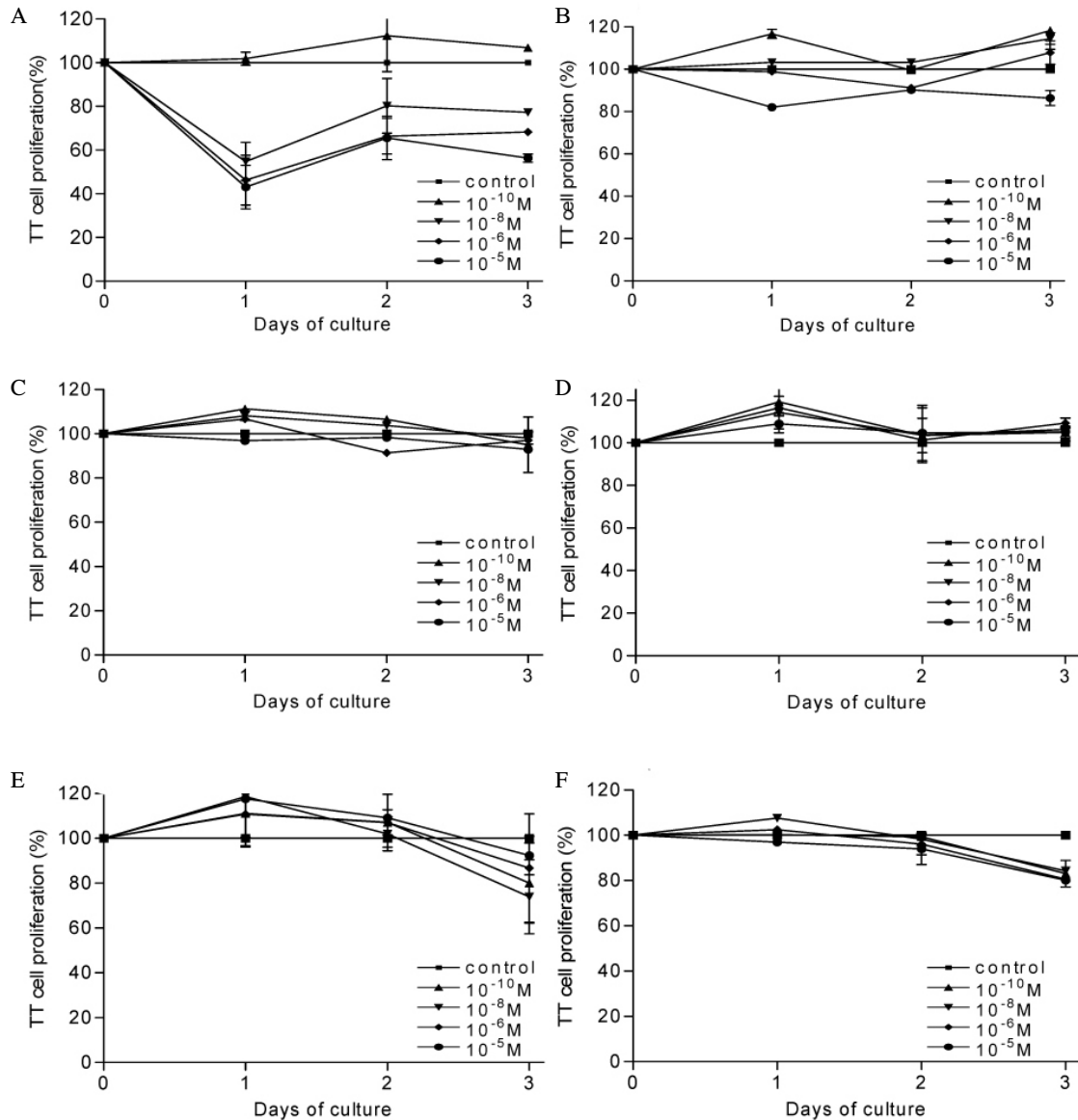


Fig. 2. Time and dose related effects of dexamethasone (A) progesterone (B) estradiol-17-beta (C) gastrin (D) somatostatin (E) and forskolin (F) on TT cell proliferation. The dose dependent decrease in TT cell proliferation with exposure to only dexamethasone is demonstrated. Results presented are the mean of proliferation ratio (mean \pm SD).

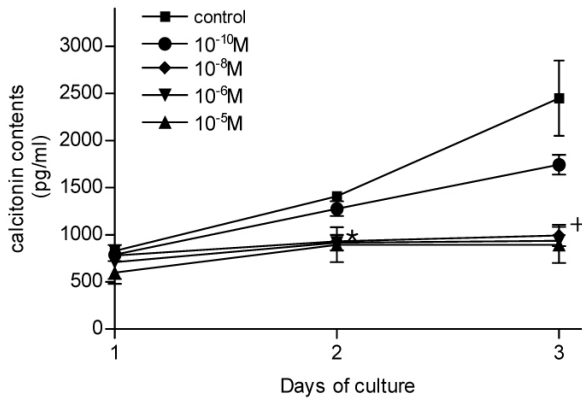


Fig. 3. Calcitonin levels during TT cell proliferation. Calcitonin levels are increased steadily at the control during 1, 2, 3 day. Calcitonin levels in the dexamethasone treated cells (10^{-8} , 10^{-6} 10^{-5} M) are inhibited about the increase in Calcitonin levels (* $P < 0.05$ vs. control day 1, † $P < 0.05$ vs. control day 2). Results presented are the mean of Calcitonin levels (mean \pm SD).

6일째 대조군과 증식을 비교하였을 때 차이를 보이지 않았다. 그 이외에 다른 3가지 물질들도 6일째 세포 증식을 대조군과 비교하였으나 차이를 보이지 않았다. 각 물질의 10^{-4} M 농도로 처리 시에는 2일째부터 약물의 독성으로 세포가 죽어 약물에 의한 효과를 알 수 없었다.

Dexamethasone은 10^{-8} M에서 10^{-5} 까지 농도가 증가함에 따라 갑상선 수질암 세포의 증식이 더 억제되는 경향을 보여 주었으나 10^{-10} M에서는 대조군에 비해 억제되지 않았다. 10^{-10} M보다 적은 농도에서도 증식이 억제되지 않았다. Dexamethasone을 처리했을 때 1일째 가장 많이 증식이 억제되었으며 그 이후에 세포 증식의 억제 정도는 감소하였다.

3. Dexamethasone 처리 시 칼시토닌 분비 변화

갑상선 수질암 세포의 증식이 억제되는 dexamethasone을 10^{-10} M에서 10^{-5} 농도로 처리 시 시간에 따라 칼시토닌 농도를 측정하였다. 10^{-8} M에서 10^{-5} M까지 농도로 dexamethasone을 처리 시 각 시점에서 대조군에 비해 칼시토닌의 농도가 의미있게 감소하였다($P < 0.05$) (Fig. 3).

고 찰

갑상선 수질암의 유일한 치료법은 이른 시기에 발견하여 수술하는 것이며 임파선의 침입이 없는 경우에는 75~90% 생화학적 치유를 얻을 수 있다. 그러나 임파선의 침입이 있을 경우에는 20~30% 정도만이 생화학적 치유를 얻을 수 있으며 그 이상으로 퍼져 있을 경우에는 치유는 거의 드문 것

으로 알려져 있다[12]. 또한 재발하는 경우에도 적절한 치료법이 알려져 있지 않다. 최근에는 갑상선 수질암의 치료법으로 수술 이외에 여러 가지 약물에 의한 효과를 알아보기 위해 많은 연구들이 보고되고 있으며 진행 중에 있다[13~15].

가족형 갑상선 수질암과 일부 단발성 갑상선 수질암 환자에서 RET을 분자 유전학 치료의 목표로 보고 RET 키나제의 억제제로 Vandetanib, Sorafenib, Motesanib, Sunitinib, imatinib 등이 새로운 치료법으로 임상 연구 중에 있다[16~20]. 그리고 그 외에도 NF κ B와 관련된 proteasome 억제제인 bortezomib가 연구 보고 되었으며, 방사선 치료 및 약물 치료의 단독 요법이 아닌 혼합 요법도 제시되고 있다[16,21]. 그러나 이러한 여러 가지 많은 연구 들은 갑상선 수질암이 더 진행되지 않도록 할 수는 있으나 암세포를 죽여 완치에 이르도록 하지는 못하고 있다.

본 연구에서는 갑상선 수질암의 증식에 영향을 줄 것으로 생각되는 6가지 약물을 인간의 갑상선 수질암 세포에 처리하여 세포 성장의 변화를 관찰하였다.

Estrogen 수용체가 대부분의 갑상선 수질암에서 발현되는 것으로 알려져 있으나 아직 정확한 그 역할은 알려져 있지 않다[22]. 과거 갑상선 수질암 세포에 estradiol을 처리하였을 때 7일 후 5×10^{-9} M의 생리학적 용량에서 가장 세포 증식이 증가하는 경향을 보여 주었으나 그 이상의 농도에서는 오히려 억제하는 경향을 보였다[9]. 또한 estrogen 수용체의 아형인 α 수용체와 β 수용체가 갑상선 수질암에 존재하며 각각의 수용체 발현에 의해 수질암 세포가 증식하거나 억제됨이 보고된 바 있다[22]. 본 연구에서는 3일째에도 세포 성장의 변화는 보이지 않았으며 6일째 세포 성장 비교에서도 변화를 보이지 않았다. 갑상선 수질암 세포에서 estrogen 수용체 아형의 분포가 다르게 나타나는 것을 고려한다면 이후에 수용체를 확인하고, 6일 이후에까지 세포 증식 변화를 관찰해야 할 것이다.

여형성암 세포주인 KTC-2에서 합성 progesterone인 medroxyprogesterone acetate (MPA)를 처리하였을 때 세포 성장에 변화를 보이지 않음이 보고되었으나 갑상선 수질암 세포에서는 연구된 바가 없었다[23]. 본 연구에서 갑상선 수질암 세포주에 progesterone을 처리 시에 세포 성장에는 변화를 보이지 않았다.

갑상선 여포 세포에서 발현되어 갑상선 유두암을 발생시키는 암유전자인 RET/PTC1를 나타내는 세포에 forskolin을 처리할 경우 forskolin이 RET/PTC1의 역할과 반대 작용을 하는 것으로 보고되었다[10]. 그러나, 갑상선 수질암에서 forskolin의 역할에 대해 보고된 연구는 없었다. 본 연구에서는 갑상선 수질암 세포주에 forskolin을 처리하였을 때 세포 증식에 변화를 보이지 않았다.

정상적인 갑상선 C-세포와 갑상선 수질암에서 발현된다고 알려진 cholecystokinin₂ 수용체는 그 역할이 정확히 알려

저 있지 않으나 이 수용체를 자극하는 gastrin이 갑상선 수질암 세포주에서 세포 증식을 일으키는 것으로 보고된 바 있다[11,24~26]. 그러나, 갑상선 수질암 초기에는 cholecystokinin₂ 수용체의 높은 발현 현상을 보이나 진행되거나 전이된 갑상선 수질암에서는 cholecystokinin₂ 수용체가 발현되지 않음을 보고한 바 있다[26]. 과거 연구에서 10^{-6} M의 gastrin 처리 시에 2일째부터 6일째까지 세포 성장이 자극되는 것으로 보고되었으나, 본 연구에서는 10^{-6} M 이외에 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-5} M 모두에서 3일째까지 각 대조군과 차이를 보이지 않았으며 6일째에서도 이 같은 차이를 보이지 않았다[11].

Somatostatin은 다양한 조직에서 세포의 성장과 분비 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[4]. 갑상선 수질암 환자에서도 octreotide, lanreotide 등의 somatostatin 유사물질을 사용 시에 calcitonin의 수치를 낮추고 증상을 완화시켜 주는 것으로 보고되었는데[4,27]. 그리고, somatostatin 수용체의 아형 1, 2, 5가 갑상선 수질암 세포에서 발현되나 각각의 아형에 따른 somatostatin 유사 물질은 세포 성장을 증가시키거나 또는 억제시키는 서로 다른 효과를 보여주는 것으로 보고 되었다[4,12,28]. 과거에 somatostatin 유사 물질을 환자에게 주었을 때 갑상선 수질암의 증식에 영향을 미치지 않았다는 점과 각각의 수용체 아형에 따라 세포 성장에 미치는 영향이 차이가 있음을 볼 때 본 연구에서 성장 변화가 뚜렷하게 나타나지 않는 것은 이전 연구와 일치하는 것으로 보인다[12].

Dexamethasone은 본 연구에서 앞에 언급한 여러 실험 물결과 다르게 갑상선 수질암 세포 증식에 억제 작용을 보였다. 과거 Frendo 등은 갑상선 수질암 세포에 dexamethasone을 1^{-6} M 처리 시에 억제 작용이 나타남을 보고하였다[6]. 본 연구에서는 10^{-6} M 이외에 10^{-10} M부터 10^{-5} M까지 다양한 농도로 처리하여 농도에 따른 세포 성장에 미치는 정도를 확인하였으며 10^{-8} M에서 10^{-5} M까지만 dexamethasone의 효과가 나타남을 확인하였다. 그러나, 본 연구는 dexamethasone 처리 시 첫째 날부터 세포 증식이 억제되는 양상을 보이므로 이후에 24시간 내의 시간에 따른 세포 증식 변화 양상을 관찰해야 할 것이다.

갑상선 수질암 세포주 증식 시에는 인간 칼시토닌 수용체(h-CTR)의 4가지 아형 중에 h-CTR2만이 발견되는 것으로 알려져 있으며 dexamethasone을 처리 시에 칼시토닌 분비가 감소함이 보고되었다[6,29]. 이전 연구에서는 dexamethasone 10^{-6} M의 농도로 처리 시 대조군에 비해 칼시토닌 농도가 증가되지 않음을 보고 하였다. 본 연구에서는 갑상선 수질암 세포주의 증식이 억제되는 농도인 10^{-5} 부터 10^{-8} 까지의 dexamethasone 처리 시에 칼시토닌의 농도 변화를 확인하였으며 이전 연구 결과와 일치하였다. 10^{-10} M에서는 칼시토닌 농도가 대조군에 비해 증가되지 않았으나 의미있는 차이를 보이지 않았으며 그 보다 적은 양인 10^{-12} M 농도에서는

대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았다. 그러나 실제로 갑상선 수질암 세포의 칼시토닌 분비의 변화 양상을 알아보기 위해서는 이후 연구에서 각 세포당 칼시토닌의 분비 변화를 확인해 봐야 할 것이다.

본 연구에서는 갑상선 수질암 세포의 성장에 영향을 끼칠 것으로 기대되는 여러 물질을 선정하여 각각의 다른 농도에서 갑상선 수질암의 세포 증식 변화를 관찰하였다. somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, gastrin, forskolin은 세포 증식에 뚜렷한 변화를 주지 않았으나, dexamethasone은 10^{-8} M부터 10^{-5} M까지 농도에서 세포 증식이 억제되는 양상을 보여주었다. 또한 같은 농도에서 칼시토닌 분비도 대조군에 비해 감소하였다. 동시에 여러 가지 물질을 처리하여 갑상선 수질암 세포의 증식을 확인하였으며, 각각의 다양한 농도로 처리하여 각각의 증식 반응을 관찰한 것에 본 연구가 의미 있을 것으로 보인다. 또한 본 연구는 dexamethasone 처리 시에 갑상선 수질암 세포의 증식이 억제되는 최소의 농도를 확인하였다.

따라서, 본 연구는 dexamethasone이 갑상선 수질암의 세포 증식을 억제할 수 있는 하나의 가능성을 보여주고 있다. 그러나 임상에서 갑상선 수질암의 치료를 위해 dexamethasone을 적용하기 위해서는 그 작용 기전 및 이에 따른 신호 전달 체계에 관한 연구가 앞으로 이뤄져야 할 것이다.

요 약

연구배경: 지금까지 갑상선 수질암은 수술이 유일한 치료 방법이며, 수술 이후에 재발하거나 원격전이가 발견될 경우 적절한 치료 방법이 알려져 있지 않다. 최근에는 갑상선 수질암의 세포 성장에 영향을 줄 수 있는 물질들이 많이 보고되고 연구 중에 있다. 따라서 본 연구에서는 TT 세포주에 dexamethasone, somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, forskolin, gastrin을 처리하였을 때 세포 증식에 미치는 영향을 평가하고, 세포 증식에 영향을 미치는 물질에 의해 칼시토닌의 분비가 변화하는지 확인하고자 하였다.

방법: 사람 갑상선 수질암 세포주인 TT 세포주로부터 RET 변이를 확인하기 위해 게놈 DNA를 추출하여 DNA 염기서열 분석을 시행하였다. 배양된 TT 세포주에 dexamethasone, somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, gastrin, forskolin 각각의 물질을 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M 농도로 처리하고 1, 2, 3, 6일에 BrdU assay를 시행하여 세포 증식을 확인하였다. TT 세포 배양 후 dexamethasone 처리 1일째, 2일째, 3일째에 각각의 농도별로 배지 상층액을 얻어 칼시토닌 농도를 측정하였다.

결과: 갑상선 TT 세포주는 Exon 11번의 코돈 634에 Cys (TGC)에서 Trp (TGG)로 치환된 돌연변이가 있음을 확인하였다. 갑상선 수질암 세포에 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M의 농도

로 각각의 물질을 처리하였을 때, 1일부터 3일까지 somatostatin, progesterone, estradiol-17-beta, gastrin, forskolin 처리 시에는 세포 증식의 차이를 보이지 않았다. 그러나, dexamethasone은 10^{-8} M에서 10^{-5} 까지 농도에 따라 갑상선 수질암 세포의 증식이 억제되는 경향을 보여주었다. 칼시토닌은 10^{-8} M에서 10^{-5} M 농도로 dexamethasone을 처리 시 대조군에 비해 의미있게 감소하였다($P < 0.05$).

결론: 본 연구는 dexamethasone이 갑상선 수질암의 세포 증식을 억제할 수 있는 하나의 가능성을 보여주고 있다. 그러나 임상에서 갑상선 수질암의 치료를 위해 dexamethasone을 적용하기 위해서는 그 작용 기전 및 신호 전달 체계에 대한 연구가 앞으로 이뤄져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Plaza Menacho I, de Groot JW, Links T, Plukker J, Eggen BJ, Hofstra R: Re: "Inhibition of medullary thyroid carcinoma (MTC) cell proliferation and RET phosphorylation by tyrosine kinase inhibitors". *Surgery* 135:240-241, 2004
2. Skinner MA, Safford SD, Freerman AJ: RET tyrosine kinase and medullary thyroid cells are unaffected by clinical doses of STI571. *Anticancer Res* 23:3601-3606, 2003
3. Cohen MS, Hussain HB, Moley JF: Inhibition of medullary thyroid carcinoma cell proliferation and RET phosphorylation by tyrosine kinase inhibitors. *Surgery* 132:960-966, 2002
4. Zatelli MC, Tagliati F, Piccin D, Taylor JE, Culler MD, Bondanelli M, degli Uberti EC: Somatostatin receptor subtype 1-selective activation reduces cell growth and calcitonin secretion in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 297:828-834, 2002
5. Liu JL, Patel YC: Glucocorticoids inhibit somatostatin gene expression through accelerated degradation of somatostatin messenger ribonucleic acid in human thyroid medullary carcinoma (TT) cells. *Endocrinology* 136:2389-2396, 1995
6. Frendo JL, Delage-Mourroux R, Cohen R, Pichaud F, Pidoux E, Guliana JM, Jullienne A: Calcitonin receptor mRNA expression in TT cells: effect of dexamethasone. *Mol Cell Endocrinol* 139:37-43, 1998
7. Blechet C, Lecomte P, De Calan L, Beutter P, Guyetant S: Expression of sex steroid hormone receptors in C cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 450:433-439, 2007
8. Colomer A, Martinez-Mas JV, Matias-Guiu X, Llorens A, Cabezas R, Prat J, Garcia-Ameijeiras A: Sex-steroid hormone receptors in human medullary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 9:68-72, 1996
9. Yang K, Pearson CE, Samaan NA: Estrogen receptor and hormone responsiveness of medullary thyroid carcinoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 48:2760-2763, 1988
10. Venkateswaran A, Marsee DK, Green SH, Jhiang SM: Forskolin, 8-Br-3', 5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate, and catalytic protein kinase A expression in the nucleus increase radioiodide uptake and sodium/iodide symporter protein levels in RET/PTC1-expressing cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89:6168-6172, 2004
11. Blaker M, Arrenberg P, Stange I, Schulz M, Burghardt S, Michaelis H, Pace A, Greten H, von Schrenck T, de Weerth A: The cholecystokinin2-receptor mediates calcitonin secretion, gene expression, and proliferation in the human medullary thyroid carcinoma cell line, TT. *Regul Pept* 118:111-117, 2004
12. Zatelli MC, Piccin D, Tagliati F, Bottoni A, Luchin A, Vignali C, Margutti A, Bondanelli M, Pansini GC, Pelizzo MR, Culler MD, Degli Uberti EC: Selective activation of somatostatin receptor subtypes differentially modulates secretion and viability in human medullary thyroid carcinoma primary cultures: potential clinical perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2218-2224, 2006
13. Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, Cailleux AF, Mechelany-Corone C, Schlumberger M: Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. *Groupe d'Etude des Tumeurs a Calcitonine (GETC). Br J Cancer* 83:715-718, 2000
14. Wu LT, Averbuch SD, Ball DW, de Bustros A, Baylin SB, McGuire WP 3rd: Treatment of advanced medullary thyroid carcinoma with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. *Cancer* 73:432-436, 1994
15. Modigliani E, Cohen R, Joannidis S, Siame-Mourot C, Guliana JM, Charpentier G, Cassuto D, Bentata Pessayre M, Tabarin A, Roger P, Caron P, Gulllausseau PJ, Lalau JD, Tournlaffe J, Bayard F, Aulèvre P, James-Deldier A, Catmettest C: Results of long-term continuous subcutaneous octreotide administration in

- 14 patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 36:183-186, 1992
16. Schlumberger M, Carlomagno F, Baudin E, Bidart JM, Santoro M: New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:22-32, 2008
17. Frank-Raue K, Fabel M, Delorme S, Haberkorn U, Raue F: Efficacy of imatinib mesylate in advanced medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 157:215-220, 2007
18. de Groot JW, Zonnenberg BA, van Ufford-Mannesse PQ, de Vries MM, Links TP, Lips CJ, Voest EE: A phase II trial of imatinib therapy for metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3466-3469, 2007
19. Hong D, Ye L, Gagel R, Chintala L, El Naggar AK, Wright J, Kurzrock R: Medullary thyroid cancer: targeting the RET kinase pathway with sorafenib/tipifarnib. *Mol Cancer Ther* 7:1001-1006, 2008
20. Lanzi C, Cassinelli G, Nicolini V, Zunino F: Targeting RET for thyroid cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 77:297-309, 2009
21. Mitsiades CS, McMillin D, Kotoula V, Poulaki V, McMullan C, Negri J, Fanourakis G, Tseleni-Balafouta S, Ain KB, Mitsiades N: Antitumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4013-4021, 2006
22. Cho MA, Lee MK, Nam KH, Chung WY, Park CS, Lee JH, Noh T, Yang WI, Rhee Y, Lim SK, Lee HC, Lee EJ: Expression and role of estrogen receptor alpha and beta in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis. *J Endocrinol* 195:255-263, 2007
23. Kurebayashi J, Otsuki T, Tanaka K, Yamamoto Y, Moriya T, Sonoo H: Medroxyprogesterone acetate decreases secretion of interleukin-6 and parathyroid hormone-related protein in a new anaplastic thyroid cancer cell line, KTC-2. *Thyroid* 13:249-258, 2003
24. Reubi JC, Waser B: Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 67:644-647, 1996
25. Amiri-Mosavi A, Ahlman H, Tisell LE, Wangberg B, Kolby L, Forssell-Aronsson E, Lundberg PA, Lindstedt G, Nilsson O: Expression of cholecystokinin-B/gastrin receptors in medullary thyroid cancer. *Eur J Surg* 165:628-631, 1999
26. Blaker M, de Weerth A, Tometten M, Schulz M, Hoppner W, Arlt D, Hoang-Vu C, Dralle H, Terpe H, Jonas L, von Schrenck T: Expression of the cholecystokinin 2-receptor in normal human thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 146:89-96, 2002
27. Vitale G, Tagliaferri P, Caraglia M, Rampone E, Ciccirelli A, Bianco AR, Abbruzzese A, Lupoli G: Slow release lanreotide in combination with interferon- α 2b in the treatment of symptomatic advanced medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 85:983-988, 2000
28. Zatelli MC, Tagliati F, Taylor JE, Rossi R, Culler MD, degli Uberti EC: Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 differentially affect proliferation in vitro of the human medullary thyroid carcinoma cell line tt. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2161-2169, 2001
29. Frendo JL, Pichaud F, Mourroux RD, Bouizar Z, Segond N, Moukhtar MS, Jullienne A: An isoform of the human calcitonin receptor is expressed in TT cells and in medullary carcinoma of the thyroid. *FEBS Lett* 342:214-216, 1994