대한내분비학회지: 제25권 제1호 2010
10.3803/jkes.2010.25.1.28

□ 원 저 □

α-lipoic Acid가 갑상선 암세포의 분화에 미치는 영향

울산의대 서울아산병원 내과[1], 아산생명과학 연구소[2], 고려대학교 생명공학과[3]

김원구[1] · 한두희[2] · 최현정[2,3] · 김의영[1] · 김태용[1] · 송영기[1] · 김원배[1]

Effects of α-lipoic Acid on Differentiation of Thyroid Cancer Cells

Won Gu Kim[1], Doo Hee Han[2], Hyun-Jeung Choi[2,3], Eui Young Kim[1], Tae Yong Kim[1], Young Kee Shong[1], Won Bae Kim[1]

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine[1]; Asan Institute of Life Sciences[2]; and College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University[3]

ABSTRACT

Background: Induction of re-differentiation is necessary for the proper treatment of patients with recurrent or metastatic differentiated thyroid cancer (DTC) because cancer cells show de-differentiation in about 30% of these patients. In this study, we evaluated the expression of thyroid specific genes after treatment with various agents to induce re-differentiation in the follicular thyroid cancer cell line FTC-133.

Methods: FTC-133 cells were treated with U0126, LY294002, trichostatin A, retinoic acid (RA), 5'-azacytidine and α-lipoic acid (ALA). We evaluated mRNA expression of thyroid specific genes, thyroglobulin (Tg), sodium iodine symporter (NIS), PAX-8 and TTF-1 by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR). Quantified expression of Tg mRNA was also evaluated by real-time PCR.

Results: The expression of Tg mRNA increased after 48 h of treatment with 0.1 uM RA and the expression of Tg mRNA and TTF-1 mRNA increased after 48–72 h of treatment with ALA (10~100 uM). There was no change in thyroid specific gene expression by the other agents. Increased expression of Tg mRNA was confirmed by real-time PCR (1.3 times by 10 uM ALA and 3.6 times by 100 uM ALA). There was no basal NIS mRNA expression in FTC-133 cells and none of the tested agents induced expression of NIS mRNA. There was no change in phosphorylation of AMPK1-α after ALA treatment of FTC-133 cells.

Conclusion: ALA increases mRNA expression of Tg and TTF-1 of FTC-133 thyroid cancer cells and these effects are not mediated by activation of AMP kinase. The finding that ALA could be a potential re-differentiation inducing agent in thyroid cancer cells is novel. Further studies are needed to elucidate the mechanism of induction of re-differentiation. Furthermore, the effect of ALA on NIS expression and on iodine uptake should be evaluated using diverse thyroid cancer cell lines. **(J Korean Endocr Soc 25:28~36, 2010)**

Key Words: Cancer, Differentiation, Lipoic acid, Thyroglobulin, Thyroid

서 론

분화 갑상선암 환자의 약 10~15%가 초치료 후에 재발을 하고, 약 5%는 원격전이를 하는 것으로 알려져 있다[1,2]. 방사선 요오드 치료는 재발되거나 전이된 갑상선암의 치료에 있어서 중요한 역할을 하고 있지만, 이전 보고에 따르면 약 30%의 재발 또는 전이된 분화 갑상선암에서 역분화 현

접수일자: 2009년 9월 2일
통과일자: 2009년 9월 17일
책임저자: 김원배, 울산의대 서울아산병원 내과
* 본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제번호 A084136).

상이 일어나는 것으로 알려져 있다[3]. 분화도가 감소된 분화 갑상선암 세포는 sodium iodine symporter (NIS)와 갑상선 글로불린(thyroglobulin; Tg)의 발현이 감소되고, 요오드의 섭취능이 떨어지게 되면서 방사성 요오드 치료의 효과도 감소하게 된다[4]. 분화도가 떨어진 갑상선암의 효과적인 치료를 위해 암세포의 분화도 및 요오드 섭취능을 호전시키는 분화 유도제를 발굴하고자 하는 노력은 재발 또는 전이된 갑상선암 연구에 있어서 중요한 부분이나 아직 만족할 만한 효과를 보이는 약제는 없다.

현재까지 갑상선암 세포에서 분화 유도제로 연구된 약물은 retinoic acid (RA)과 histone deacetylase (HDAC) 억제제인 trichostatin A (TSA), depsipeptide, valproic acid, 탈메틸화제제인 5'-azacytidine (AZT) 그리고 troglitazone 등이다[5~11]. 최근에 암세포에 대한 표적치료제로 개발 중인 mitogen activated protein (MAP) kinase 신호전달 체계나 phosphoinositide 3 (PI3) kinase에 대한 선택적 억제제들도 갑상선암 영역의 분화유도 연구에 적용되고 있다[12~14]. 하지만, RA에 의한 분화 유도제가 사용된 임상 연구에서 방사능 요오드 섭취능을 증가시키는 효과는 0~20% 정도로 미미한 것으로 확인되었으며, 다른 분화 유도제 역시 임상에 적용하기에는 한계가 있었다[15~17]. 또한, 최근 연구에서 밝혀진 바와 같이 갑상선암 연구에 많이 사용되고 있는 많은 세포주들이 갑상선암세포가 아닐 가능성이 높다는 연구가 발표됨에 따라 분화 유도제의 발굴과 개발을 위한 연구는 대폭적인 수정이 불가피하다[18].

α-lipoic acid (ALA)는 세포의 호기성 대사 반응, Krebs 주기 등 세포의 대사에 필수적인 효소의 보조 인자로 알려져 있고, 항산화 효과를 가지고 있어서 당뇨병 및 대사 질환에서 활발히 연구되고 있는 물질이다[19]. ALA는 경구 섭취가 가능하면서 안정성이 비교적 높은 것으로 알려져 있으며 임상적으로도 이미 적용되고 있는 약물이다[20]. ALA는 대장암 세포에서 세포 자연사를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 백혈병 세포에서는 비타민 D3와 함께 작용해서 암세포의 분화도를 향상시킬 수 있는 것으로 보고되었다[21,22]. 하지만, 아직 ALA를 암세포에 단독 적용하여 분화 유도 여부를 확인한 연구는 없었다.

본 연구에서는 갑상선 여포암 세포주인 FTC-133 세포에서 기존에 알려진 분화 유도제들과 ALA를 사용하여 갑상선 특이 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였고, 처음으로 ALA가 갑상선암 분화 유도제로 이용될 수 있을 가능성을 발견하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

분화 유도를 위해서 사용된 U0126, LY2904002은 calbiochem (La Jolla, CA, USA) TSA, *trans*-retinoic acid (*t*RA), AZT, ALA는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 세포 배양에 필요한 우태아 혈청, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액, Ham's F12 배양액, penicillin-streptomycin계 항생제, 트립신-EDTA, 인산염 완충용액(PBS)은 Gibco BRL (New York, USA)에서 구입하였다. 세포 생존 분석을 위해서 사용된 Colorimetric Cell Counting Kit-8 (CCK-8)은 Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. RNA 추출에 필요한 Trizol 용액은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), RevertAid Fist Strand cDNA 합성키트는 Fermentas (Glen Burnie, MD, USA)에서 구입하였다. 니트로셀룰로스막은 Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, USA), BioMix DNA 중합효소와 한천은 Bioline (Taunton, MA, USA)에서 구입하였다. Phopho-5-AMP-activated protein kinase (AMPK)-1α와 AMPK-1α에 대한 일차 항체와 세포용해 완충액은 Cell Signaling사(Danver, MA, USA)에서 구입하였다. 이차 항체인 HRP-conjugated anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG는 Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)에서 구입하였다. 단백 정량에 사용된 Quanti-iT™ Protein Assay 키트는 Molecular Probe사 (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 그 외에 사용된 화학약품들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 세포주 및 배양

분화된 여포 갑상선암 세포주인 FTC-133[23]은 European Collection of Cell Culture (ECACC)를 통해서 구입하였다. DMEM 배지와 Ham's F12 배지를 반반씩 혼합하여 만든 배지에 2 mM의 글루타민, 10%의 우태아혈청, 그리고 항생제가 함유된 배지를 사용하였다. 배양액은 2~3일마다 교환하였으며 세포가 70~80% 정도 자라면 계대 배양을 하였다. 분화 유도제를 처리할 때는 60 mm 배양 접시에 1×10^6개의 세포를 분주하여 70% 정도 자랐을 때 배양액으로 바꾸어 주고 정해진 농도의 분화 유도제들을 처리하였다. 세포 사멸을 보기 위한 실험에서는 96 우물 배양판에 5×10^3개씩의 세포를 분주하여 48시간 후에 약물을 처리하였다. RNA 추출을 위한 실험에서 60 mm 배양 접시에 1×10^6개의 세포를 분주하여 48 시간 후에 일정 농도의 약물이 포함된 배지로 교환하였으며 ALA는 72시간 동안 처리하였으나, 그 외 약물들은 48시간 동안 처리하였다.

3. 세포 생존 분석(Cell Viablility Assay)

재분화를 유도하기 위해서 사용된 U0126, LY2904002, TSA, RA, 6-AZT 및 ALA가 FTC-133 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해서 CCK-8을 이용한 발색 분석법을 사용하였다. 96 우물 배양판에 각 우물 당 5×10^3개씩의 세포를 분주하고 2일 후 정해진 농도의 분화 유도제가 포함된

배양액으로 갈아주고 48시간 동안 세포 배양기에 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS 용액으로 2번 세척하고 CCK-8의 농도가 10%가 되도록 혈청을 포함하지 않은 배양액과 희석하여 각 우물마다 100 μL씩 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, USA)에서 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였으며, 각 실험은 독립적으로 3회 반복 실행하여 평균치를 구하였다.

4. RNA 분리와 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

FTC-133 세포로부터 Trizol을 이용하여 RNA를 추출하였다. 2 ug의 RNA에서 RevertAid First Stand cDNA 합성 키트를 이용하여 첫 가닥의 cDNA를 합성하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 사용되는 glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Tg, paired box 8 (PAX-8), thyroid transcription factor-1 (TTF-1) 및 NIS 유전자 시동체(primer)들의 염기 서열과 증폭된 생성물의 크기, 합성(annealing) 온도 그리고 반응 주기는 Table 1에 기술된 바와 같다. 94°C, 45초간 변성(denaturation), 기술된 온도에서 45초 동안 합성 하였으며 72℃, 45초간 신장(extension)되는 과정을 Table 1에 기술된 반응 주기에 따라서 반응시켰다. RT-PCR의 생성물은 1% 한천 젤에서 전기영동하였으며 Gel-doc 시스템을 이용하여 사진을 찍어 확인하였으며, GAPDH의 양을 기준으로 상대적인 mRNA 발현량을 비교하였다.

5. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (Real-time Quantitative PCR)

ALA에 의한 Tg mRNA의 정량을 위해서는 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응(real-time quantitative PCR; real-time PCR)을 이용하였다. 정해진 농도의 ALA를 처리한 후에 각 시료에서 합성된 cDNA 단편을 주형으로 하였으며, 증폭된 유전자의 정량 분석을 위해 SYBR Green을 사용하였다. Real-time PCR에 사용한 primer는 다음과 같다. β-actin, 5'-AGT ACT CCG TGT GGA TCG GC-3'와 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GA-3'; Tg 5'-GTG CCA ACG GCA GTG AAG T-3', 5'-TCT GCT GTT TCT GTA GCT GACAAA-3'. 96 우물판을 사용하였으며 ABI Prism 7000 Sequence Detector (Perkin-Elmer Corp. PE Applied Biosystems)를 이용하였다. 95℃, 15초에서 변성, 60℃, 1분에 결합, 72℃, 30초에 신장되는 조건에서 40 주기를 반응시켰다. 각 조건 마다 실험은 독립적으로 3회 반복하였으며, 각 시료 별로 5번 독립적인 실험을 진행하여 평균과 표준 편차를 계산하였다. 결과는 SDS 7000 software로 분석하였다.

6. 웨스턴 블롯 분석

단백질 추출을 위해서 실험한 세포를 차게 유지된 PBS 용액으로 2회 세척하여 반응을 종료시켰다. 단백질 분해 효소 억제제를 첨가한 세포용해 완충액을 이용하여 세포를 모아 분해한 후 4℃, 13,000×g에서 30분 동안 원심 분리하고 단백질을 포함하는 상층액을 분리하여 단백질 정량을 하였다. 단백질 정량은 Quanti-iT™ Protein Assay 키트를 이용하였으며, 우태아 혈청 알부민을 표준으로 BCA 정량법으로 측정하였다. 25 ug의 단백질을 12% SDS-PAGE gel에서 전기 영동하여 전개시킨 후에 니트로셀룰로스막으로 이동시켰다. 막에 실험에 해당하는 일차 항체(1:1000 희석)와 12 시간 동안 냉장 반응 시킨 후, HRP가 연결되어 있는 이차 항체(1:4000 희석)로 1시간 동안 반응시켰다. HRP Chemiluminescent Substrate Reagent 키트를 이용하여 막을 필름에 감광시켰다. 발현량의 정량과 보정을 위한 스캔은 FluorS Multi-Imager와 Quantitation Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

Table 1. Primers and conditions of reverse transcriptase polymerase chain reaction for thyroid specific genes in FTC-133 cell

Gene	Gene bank		Primer sequences	Product size (bp)	PCR condition
GAPDH	NM 002046	Forward	5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'	321	55℃
		Reverse	5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'		25 cycles
Tg	NM 003235.4	Forward	5'-CCATTTCTGCTGGAGCTTTC-3'	433	58℃
		Reverse	5'-TCAGAAGTCATGCAGGCAAC-3'		30 cycles
PAX-8	NM 003466.3	Forward	5'-GGCTCCACCTACTCCATCAA-3'	438	53℃
		Reverse	5'-GGAAGGGGTGGAGCTAGAAC-3'		30 cycles
TTF-1	NM 003317.3	Forward	5'-ACGACTCCGTTCTCAGTGTCTG-3'	70	58℃
		Reverse	5'-GCCCTCCATGCCCACTTT-3'		30 cycles
NIS	NM 000453.1	Forward	5'-CTCCCTGCTAACGACTCCAG-3'	302	58.2℃
		Reverse	5'-TTGTTTCCAGTGGGGAGTTC-3'		30 cycles

GAPDH, glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase; NIS, sodium iodine symporter; PAX-8, paired box 8; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; Tg, thyroglobulin; TTF-1, thyroid transcription factor-1.

7. 통계 분석

세포 생존 분석과 real-time PCR 결과는 평균 ± 표준 편차로 표현하였으며, 평균은 Student's t-test와 Tukey의 사후 분석을 이용한 일원배치 분산분석을 통해서 비교하였다. 통계적 유의성은 *P*값으로 표현하였고 양측으로 0.05 미만인 경우에 유의한 차이를 보이는 것으로 간주하였다. 통계 분석은 Statistical Package for Social Science (SPSS), version 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

결 과

1. FTC-133 세포주에서 분화 유도제에 의한 세포 생존 분석

분화 유도제들이 FTC-133 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해서 MEK1/2 억제제인 U0126, PI3 kinase 억제제인 LY2904002, DNA methyltransferase (DNMT) 억제제인 AZT, HDAC 억제제인 TSA, RA 수용체 리간드로써 분화유도체로 알려진 *t*RA, 그리고 항산화제로 알려진 ALA를 48시간 동안 농도별로 처리하고 CCK-8 키트를 이용하여 생존 세포의 비율을 측정하였다(Fig. 1). 각 약물의 분화 유도 효과를 평가하는데 적절한 농도 설정을 위하여, 각 약물이 세포 생존에 미치는 영향을 살펴보았고 일정 수준의 세포 독성을 나타내는 농도 및 그 보다 일정 비율로 낮은 농도, 두 가지 농도를 약물 별로 설정하고자 하였다. 이를 위해 48시간 후에 세포의 생존이 80% 정도 억제되는 농도를 우선 확인하였다. U0126에서 20 uM, LY294002에서는 5 uM 정도의 농도에서 세포 생존이 80% 정도 억제되었다(Fig. 1A, B). TSA, RA 및 AZT 에서는 각각 50 uM, 0.5 uM, 10 uM 정도의 농도에서 80% 정도 세포 생존이 억제되었다(Fig. 1C, 1D, 1E). 반면 ALA는 200 uM 농도에서도 통계적으로 유의한 세포 생존 억제 효과를 보이지 않았다(*P* = 0.81) (Fig. 1F).

2. FTC-133 세포에서 RT-PCR을 이용한 갑상선 특이 유전자 발현량 분석

갑상선암 세포의 분화 유도 효과를 확인하기 위해서 세포의 생존이 80% 정도 억제되는 농도와 그 1/5이 되는 농도에서 48시간 동안 약물을 처리하고 갑상선-특이 단백질의 mRNA 양 변화를 살펴보았다. 분리된 RNA를 토대로 Tg, NIS, PAX-8, TTF-1의 발현량을 RT-PCR을 통해서 확인하였다(Fig. 2). 사람의 정상 갑상선 조직을 양성 대조군으로 사용하였으며 정상 갑상선 조직에서는 4가지 갑상선 특이 유전자의 발현을 모두 확인할 수 있었다. 약물을 처리하지 않은 상태에서 FTC-133 세포는 PAX-8과 TTF-1 mRNA가 잘 발현됨을 확인할 수 있었고, Tg mRNA의 발현량은 정상 갑상선 조직에 비해서 상대적으로 적었다. 또한 NIS mRNA는 FTC-133 세포에서 거의 발현되지 않은 것을 확인하였다.

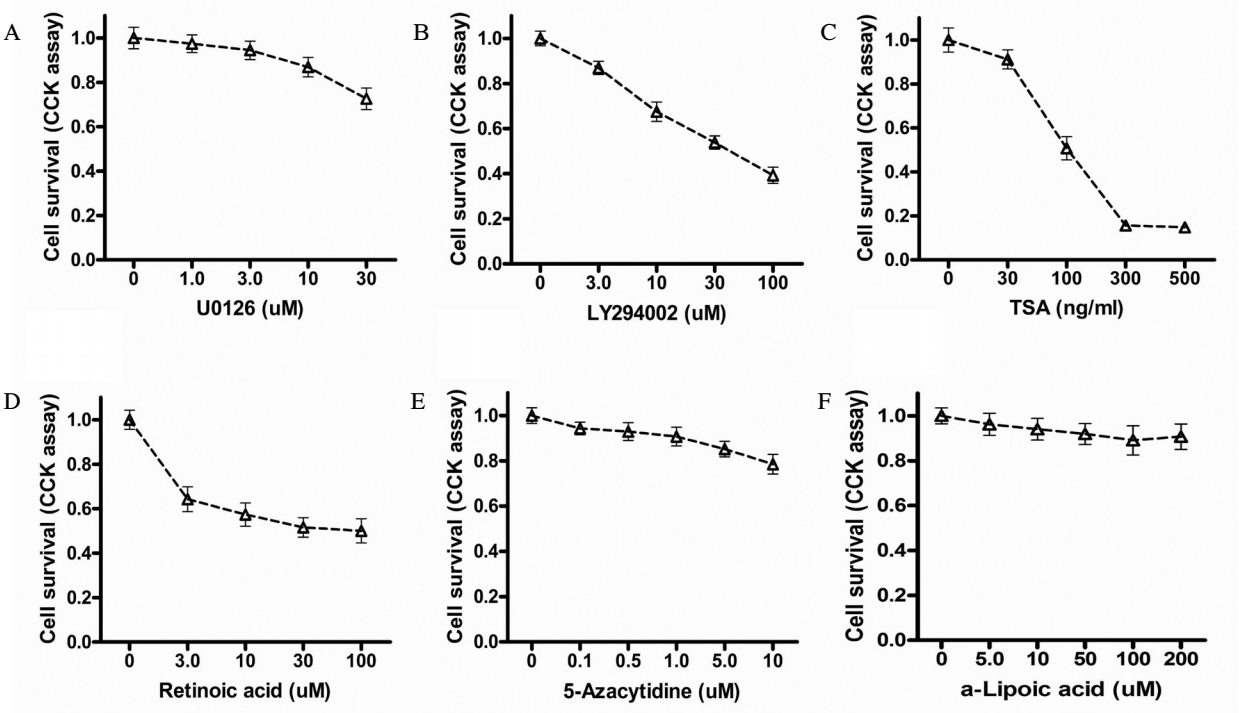

Fig. 1. Cell survival curves measured by cell counting kit-8 after 48 hours of treatment with re-differentiation agents in FTC-133 cells. U0126; selective inhibitor of MEK1/2, LY294002; selective inhibitor of PI3K, TSA; trichostatin A. U0126 (A), LY294002 (B), TSA (C), Retinoic acid (D), 5-Azacytidine (E), a-Lipoic acid (F).

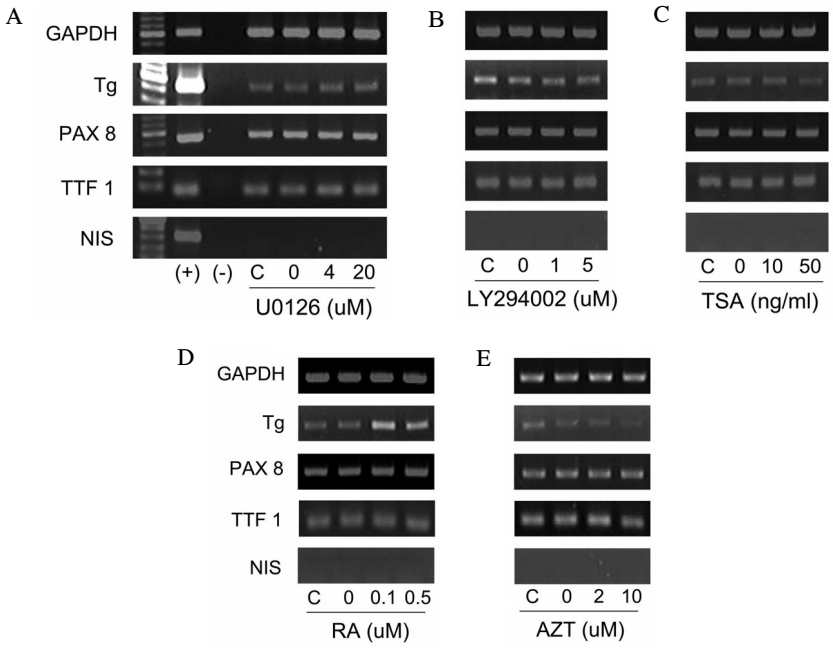

Fig. 2. Results of reverse transcriptase polymerase chain reaction after 48 hours of treatment with re-differentiation agents in FTC-133 cells. GAPDH, glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase; Tg, thyroglobulin; PAX-8, paired box 8; TTF-1, thyroid transcription factor-1; NIS, sodium iodine symporter; (+), positive control (human thyroid tissue); (-), negative control (no template); C, control without vehicle; U0126, selective inhibitor of MEK1/2; LY294002, selective inhibitor of PI3K; TSA, trichostatin A; RA, retinoic acid; AZT, 5'-azacytidine. U0126 (A), LY294002 (B), TSA (C), RA (D), AZT (E).

FTC-133 세포에 U0126, LY29004002 및 TSA를 정해진 농도로 48시간 동안 처리한 후, 4가지 갑상선 특이 유전자들의 mRNA발현에는 변화가 없었다(Fig. 2A). RA를 0.1 uM, 0.5 uM씩 처리한 경우에는 PAX-8과 TTF-1 mRNA의 발현에는 변화가 없었으나, Tg mRNA의 발현량이 상대적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). AZT을 처리한 후에는 mRNA 발현량에 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 2B).

3. FTC-133 세포에서 *α*-lipoic Acid에 의한 분화 유도 효과

갑상선 특이 유전자 발현량을 차이를 보기 위해서 ALA를 10 uM, 100 uM의 농도로 72시간 동안 처리하여 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 시행하였다. FTC-133 세포에서 ALA에 의해서 PAX-8과 NIS의 발현에는 변화가 없었으나, Tg mRNA의 발현량은 농도에 따라서 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한, TTF-1 mRNA의 발현량도 10 uM 농도에서부터 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 ALA에 의한 TTF-1 및 Tg mRNA의 증가 효과는 48시간 이후부터 유의하게 나타났다(data not shown).

ALA 10 uM과 100 uM 농도로 72시간 처리한 후에 얻은 RNA를 통해서 만든 cDNA에서 real-time PCR로 Tg의 발현량의 변화를 정량화하였다(Fig. 4). *β*-actin의 발현량을 기준으로 Tg mRNA의 상대적인 발현량 변화를 확인하였다.

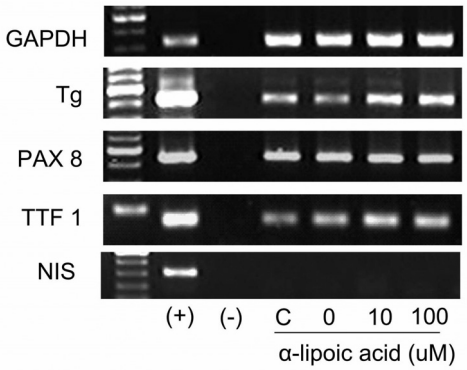

Fig. 3. Results of reverse transcriptase polymerase chain reaction after 72 hours of treatment with *α*-lipoic acids in FTC-133 cells. GAPDH, glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase; Tg, thyroglobulin; PAX-8, paired box 8; TTF-1, thyroid transcription factor-1; NIS, sodium iodine symporter; (+), positive control (human thyroid tissue); (-), negative control (no template); C, control without vehicle.

10 uM 농도의 ALA에서 Tg mRNA는 1.3배 정도 증가하였으며($P < 0.01$), 100 uM 농도에서는 3.6배 증가되어 통계적으로 유의한 증가를 확인하였다($P < 0.01$).

4. FTC-133 세포에서 *α*-lipoic Acid에 의한 AMPK의 변화

ALA에 의한 TTF-1 mRNA 및 Tg mRNA 증가 효과의

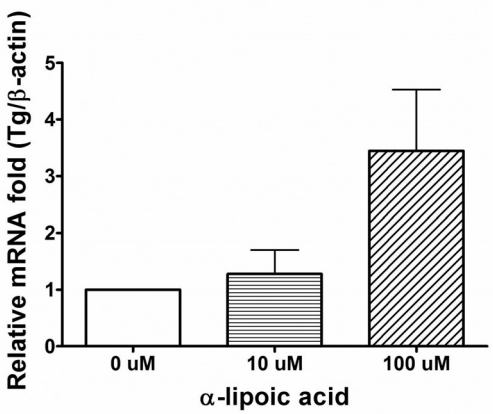

Fig. 4. Results of real-time polymerase chain reaction after 72 hours of treatment with α-lipoic acids in FTC-133 cells.

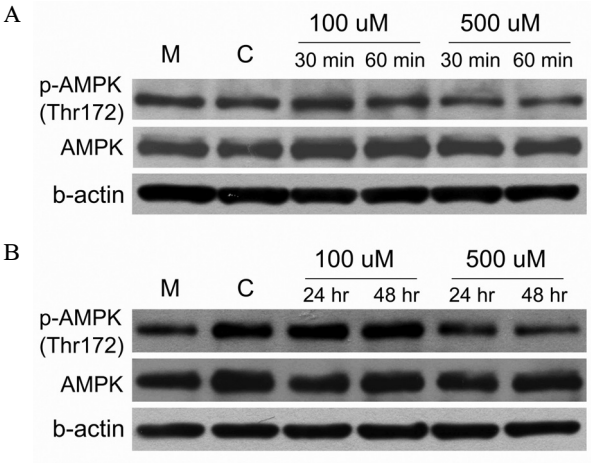

Fig. 5. Western blotting of phospho-5-AMP-activated protein kinase (AMPK)-1α and total-AMPK1-α protein after treatment of α-lipoic acids during 30~60 minutes (A) and 24-48 hours (B) in FTC-133 cells.

기전을 살펴보기 위하여, 처리한 농도의 ALA가 AMPK를 활성화 시키는지를 FTC-133 세포에서 확인하였다. ALA를 처리한 후 30분, 60분, 24시간과 48시간에 AMPK1-α의 활성화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 100 uM과 500 uM의 ALA 농도에서 1시간 이내 및 48시간까지 처리하여도 AMPK1-α의 인산화에는 변화가 없었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구는 ALA가 분화 갑상선암 세포에서 Tg와 TTF-1 유전자 발현을 증가시킬 수 있음을 보여, 향후 갑상선암의 새로운 분화 유도제로서 사용될 가능성을 제시한 첫 연구이다. 갑상선 여포암 세포인 FTC-133에서는 ALA와 RA가 Tg의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었으나, 그 외에 U0126, LY294002, TSA, AZT는 갑상선 특이 유전자의 발현에 별다른 영향을 미치지 못하였다. 기저 상태의 FTC-133 세포에서는 NIS mRNA의 발현이 없는 상태였으며, 본 연구에서 NIS mRNA의 발현을 새롭게 유도할 수 있는 약제는 없었다. 갑상선 암의 경우는 치료적 측면에서 분화 유도가 매우 중요한 의미를 가지는데, 잘 알려진 바와 같이 방사선 요오드 치료 또는 갑상선호르몬 억제 요법 등은 분화암의 치료에 이용되며 요오드 섭취능을 포함한 세포의 분화도를 증가시키거나 복원시키는 것이 치료 효과를 크게 개선시킬 것으로 기대되기 때문이다.

분화된 갑상선 세포는 갑상선 호르몬을 생산하기 위해서 갑상선 세포에만 특이적으로 존재하는 Tg, thyroperoxidase 유전자와 일부 조직에서만 발현되는 NIS와 TSH receptor 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하고 있다[24]. 이러한 갑상선 세포의 분화는 특이적인 전사인자와 조절인자의 상호작용에 의해서 조절되며, TTF-1, TTF-2 그리고 PAX-8 이라는 3가지 전사 인자가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[21]. 따라서, 갑상선 세포의 분화도를 평가하기 위한 방법으로는 요오드 섭취능을 직접적으로 확인하는 방법 이외에도 갑상선 특이적인 유전자나 단백질의 발현을 확인하는 것이 흔히 이용되었으며[8,10,12,13], 본 연구에서도 Tg, NIS, TTF-1, PAX-8의 mRNA 발현량을 통해서 갑상선 암세포의 분화 여부를 확인하였다.

ALA는 대사와 관련된 여러 효소 복합체의 cofactor로 알려져 있으며, 미토콘드리아의 산화적 인산화를 촉진시키고, 정상 세포에서 유리 산소에 의한 산화를 방지하는 항산화물질로 알려져 있다[19]. ALA는 동물 실험에서 AMPK의 활성화를 통해서 근육세포의 인슐린 감수성을 개선하고[25], 내피세포에서도 AMPK를 활성화시키며 이는 세포 기능을 호전시키는 것으로 알려져 있다[26]. 또한, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)를 억제하여 collagen에 의해서 유도되는 관절염을 호전시키고[27], 동맥경화 진행 과정에서 평활근 세포의 이주를 억제하는 것으로 알려져 있어서 염증반응을 억제하는데도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[28]. ALA에 의한 항산화 효과는 이 약제를 당뇨병성 신경병증의 치료제로 사용하게 되는 근간이 되는 기전이다.

ALA를 암세포에 적용한 연구에서는 일부 세포에서 bcl-2나 bcl-X(L)을 억제하고, caspase-9과 caspase-3를 활성화시켜서 세포자연사를 유도하는 것으로 보고되어 있으며, 세포주기에서 cyclin 의존성 kinase를 억제하는 $p27^{kip}$의 양을 증가시켜서 암세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다[19]. 암세포의 치료에 있어서 ALA를 말기 췌장암 환자들에 적용한 유일한 연구가 있으며, 고농도의 ALA가 말기 암환자의 생존과 삶의 질을 호전시킬 가능성이 있다고 제시하기도 하였다[29]. 하지만 ALA에 의한 암세포의 자연사 유도 또는 세포 성장 억제 효과는 매우 미미하기 때문에 현재까지는

항암치료제로써 이용될 수 있는 수준은 아니며, 항암 치료제의 보조제 또는 항암 치료의 합병증을 줄이는 목적으로 이용되고 있을 뿐이다[19]. 또한, 급성전골수성 백혈병 세포에 대한 연구에서는 비타민 D3와 ALA를 병합하는 치료가 실험적으로 암세포의 분화도를 개선시킬 수 있을 가능성이 제시되기도 하였으나 ALA가 단독으로 암세포 분화를 유도한다는 보고는 아직 없다[22]. 본 연구에서는 ALA에 의해서 Tg와 TTF-1의 유전자 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, ALA의 효과가 나타나는 기전에는 AMPK의 활성화가 관련이 없음을 보였다. ALA가 갑상선암 세포의 분화를 유도하는 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요하며, ALA가 암세포의 NF-κB의 전사 활성을 억제하는 기전이나 항산화효과가 유전자의 전사 조절에 미치는 영향을 고려해 볼 수 있다. 또한, 혐기해당작용에 의존하던 암세포의 대사가 ALA에 의해서 조절되는 기전이나 cyclin AMP-protein kinase A 경로와의 관련성에 대해서도 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서 ALA는 TTF-1과 Tg의 유전자 발현을 함께 증가시켰다. Tg의 발현에 대한 이전 연구에서는 TTF-1과 PAX-8이라는 2가지 전사 인자가 Tg 유전자의 프로모터에 작용해서 Tg의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, TTF-1이 PAX-8보다 더 중요한 역할을 하고 두 전사인자가 같이 작용할 때 전사 활성도가 더 높은 것으로 보고한 바 있다[30]. 또한, TSH 수용체 유전자를 제거한 쥐에서 TTF-1, PAX-8, Tg 유전자의 변화가 함께 발현하는 것으로 보아 TSH 신호 전달체계와는 별도로 TTF-1과 PAX-8에 의해 Tg의 발현이 조절된다고 볼 수 있다[31]. 따라서, 본 연구에서 ALA가 TTF-1의 발현 증가시켜서 Tg의 발현 조절할 수 있을 가능성이 있지만, 이를 증명하기 위해서는 ALA가 Tg promoter에 미치는 직접적 영향과 TTF-1을 작용을 배제한 상태에서 변화를 보는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

ALA는 현재 당뇨병 환자에서 사용되고 있고 부작용도 미미하다는 점에서 실제로 임상 적용이 가능한 약제로 생각된다. ALA는 돌연변이를 유발하거나 유전자에 독성이 거의 없는 약물로 알려져 있으며 하루에 체중 1 kg 당 61.9 mg까지의 섭취에도 큰 부작용이 없다[20]. 본 연구에서 사용한 10~100 uM의 농도는 당뇨병 환자에서 사용하는 하루 수백 mg 용량의 ALA 섭취 시에 보이는 혈중 농도와 유사하거나 오히려 낮다. 따라서, ALA는 갑상선암 환자에서 실제 임상 적용이 바로 가능한 약제로 판단된다.

FTC-133 세포는 갑상선 여포암에서 확립된 세포이다[23]. 최근 Schweppe 등[18]에 의한 연구에서는 현재 갑상선암에서 유래된 것으로 알려진 40개의 세포주들을 short tandem repeat를 이용한 DNA profiling, single nucleotide polymorphism array 및 PAX-8과 TTF-1 mRNA 발현 등을 확인하여 이중에서 50%만이 갑상선에서 유래한 암세포 임을 확인하였다. 또한 가장 널리 사용되던 세포주인 NPA87, ARO81-1, DRO90-1 등의 세포가 갑상선암이 아닌 다른 종류의 암세포에 의해서 오염된 것임을 확인하였다. FTC-133은 이 연구에서 갑상선 특이 전사인자인 PAX-8과 TTF-1의 mRNA가 모두 잘 발현되는 갑상선암 세포주 6개 중 하나였다. 또한, 갑상선암의 분화 유도에 관련된 연구에서 가장 많이 이용된 세포주였기 때문에 본 연구에서는 FTC-133 세포를 이용하여 실험을 진행하였다[32]. 하지만, 갑상선암의 분화 유도 치료는 NIS의 단백 발현량을 증가시키고 그에 따른 요오드 섭취능을 개선시켜서 방사선 요오드 치료의 효과를 높이는 것이 핵심이다. 따라서, 본 연구에서와 같이 NIS의 발현량이 거의 없는 FTC-133 세포주를 이용하면 요오드 섭취능을 개선시킬 수 있는지를 확인하는 데는 제한점이 있다. PI3 kinase 억제제를 분화 유도에 적용한 연구에서는 NIS를 발현하는 정상 갑상선 세포주인 FRTL-5와 NIS를 인위적으로 발현하도록 만든 갑상선암 세포주를 이용하였고[14], MAP kinase 억제제에 대한 연구에서도 정상 갑상선 세포주와 유전자가 변형된 암세포주가 이용되었다[13]. 따라서, 추후 ALA에 대한 연구는 NIS의 발현이 일부 남아있는 암세포주나 정상 갑상선 세포주에서 요오드 섭취능을 개선시킬 수 있는지에 대한 확인이 필요할 것이다.

본 연구에서는 갑상선 여포암 세포주인 FTC-133에서 ALA가 Tg와 TTF-1의 mRNA 발현량을 증가시킬 수 있음을 처음으로 관찰하였으며, 이러한 세포 분화도 개선이 AMPK의 활성화와는 관련이 없음을 확인하여 보고하는 바이다. ALA에 의한 분화 유도의 기전과 요오드 섭취능에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

배경: 재발 또는 전이된 분화 갑상선암의 30% 정도에서 암세포의 분화도가 떨어져 있으며, 새로운 분화 유도제의 개발 및 그 기전에 대한 연구는 이러한 환자들의 치료에 있어서 중요한 역할을 할 것이다. 본 연구에서는 갑상선 여포암 세포에서 분화 유도제들이 갑상선 특이 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

연구방법: 갑상선 여포암 세포주인 FTC-133에서 U0126, LY294002, trichostatin A, retinoic acid (RA), 5'-azacytidine과 α-lipoic acid (ALA)를 처리한 후에 갑상선 특이 유전자인 thyroglobulin (Tg), sodium iodine symporter (NIS), PAX-8, TTF-1 mRNA 발현의 변화를 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해서 확인하였다. 또한, ALA에 의한 Tg mRNA의 변화를 실시간 중합효소 연쇄반응으로 확인하였다.

결과: FTC-133 세포에서 0.1 uM 이상의 농도에서 RA를 48시간 처리한 후에 Tg의 mRNA 발현이 증가하였으며,

ALA를 10 uM 이상의 농도로 48~72시간 처리한 후에는 Tg 및 TTF-1 mRNA 발현이 증가하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응에서 ALA에 의한 Tg mRNA는 10 uM에서 1.3배, 100 uM에서 3.6배로 증가하였다. 상기 농도의 ALA는 FTC-133 세포에서 AMPK1-α의 인산화를 증가시키지 않았다. 기저 상태에서 FTC-133 세포에서는 NIS의 발현이 없었으며, 사용된 분화 유도제들은 NIS 유전자의 발현을 유도시키지는 못했다.

결론: ALA는 FTC-133 세포에서 Tg 및 TTF-1 mRNA의 발현을 증가시켰으며 이는 AMP kinase 활성화와는 관련이 없는 것으로 보인다. 본 연구는 ALA가 갑상선암에서 분화 유도제로 사용될 수 있을 가능성을 제시하는 첫 연구이다. 이를 위해서는, 향후 그 기전에 대한 연구가 필요할 것이다. 또한, 다양한 갑상선암 세포주들을 이용한 NIS 발현이나 요오드 섭취능에 대한 ALA의 효과에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, Mclver B, Sherman SI, Tuttle RM; American Thyroid Association Guidelines Taskforce: Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid 16:109-142, 2006
2. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W; European Thyroid Cancer Taskforce: European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. Eur J Endocrinol 154:787-803, 2006
3. Goretzki PE, Simon D, Frilling A, Witte J, Reiners C, Grussendorf M, Horster FA, Röher HD: Surgical reintervention for differentiated thyroid cancer. Br J Surg 80:1009-1012, 1993
4. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M: Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. Eur J Endocrinol 141:443-457, 1999
5. Zarnegar R, Brunaud L, Kanauchi H, Wong M, Fung M, Ginzinger D, Duh QY, Clark OH: Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. Surgery 132:984-990, 2002
6. Van Herle AJ, Agatep ML, Padua DN 3rd, Totanes TL, Canlapan DV, Van Herle HM, Juillard GJ: Effects of 13 cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA R0 82 W-1) in vitro. J Clin Endocrinol Metab 71:755-763, 1990
7. Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Köhrle J: Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. Biochem Biophys Res Commun 240:832-838, 1997
8. Furuya F, Shimura H, Suzuki H, Taki K, Ohta K, Haraguchi K, Onaya T, Endo T, Kobayashi T: Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter thyroperoxidase and thyroglobulin. Endocrinology 145:2865-2875, 2004
9. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB: Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na+/I-symporter gene methylation status. J Clin Endocrinol Metab 84:2449-2457, 1999
10. Fortunati N, Catalano MG, Arena K, Brignardello E, Piovesan A, Boccuzzi G: Valproic acid induces the expression of the Na+/I- symporter and iodine uptake in poorly differentiated thyroid cancer cells. J Clin Endocrinol Metab 89:1006-1009, 2004
11. Kogai T, Taki K, Brent GA: Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. Endocr Relat Cancer 13:797-826, 2006
12. Liu D, Liu Z, Jiang D, Dackiw AP, Xing M: Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations. J Clin Endocrinol Metab 92:4686-4695, 2007
13. Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M: Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. Clin Cancer Res 13:1341-1349, 2007
14. Kogai T, Sajid-Crockett S, Newmarch LS, Liu YY, Brent GA: Phosphoinositide-3-kinase inhibition induces sodium/iodide symporter expression in rat thyroid cells and human papillary thyroid cancer cells. J Endocrinol 199:243-252, 2008

15. Grüning T, Tiepolt C, Zöphel K, Bredow J, Kropp J, Franke WG: Retinoic acid for redifferentiation of thyroid cancer--does it hold its promise? Eur J Endocrinol 148:395-402, 2003
16. Courbon F, Zerdoud S, Bastie D, Archambaud F, Hoff M, Eche N, Berry I, Caron P: Defective efficacy of retinoic acid treatment in patients with metastatic thyroid carcinoma. Thyroid 16:1025-1031, 2006
17. Kim WG, Kim EY, Kim TY, Ryu JS, Hong SJ, Kim WB, Shong YK: Redifferentiation therapy with 13-cis retinoic acids in radioiodine-resistant thyroid cancer. Endocr J 56:105-112, 2009
18. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenthi U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR: Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. J Clin Endocrinol Metab 93:4331-4341, 2008
19. Novotny L, Rauko P, Cojocel C: alpha-Lipoic acid: the potential for use in cancer therapy. Neoplasma 55:81-86, 2008
20. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B: Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). Regul Toxicol Pharmacol 46:29-41, 2006
21. Wenzel U, Nickel A, Daniel H: alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O2-*-generation. Apoptosis 10:359-368, 2005
22. Sokoloski JA, Hodnick WF, Mayne ST, Cinquina C, Kim CS, Sartorelli AC: Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by vitamin E and other antioxidants in combination with low levels of vitamin D3: possible relationship to NF-kappaB. Leukemia 11:1546-1553, 1997
23. Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roeher HD: Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. Recent Results Cancer Res 118:48-63, 1990
24. Damante G, Di Lauro R: Thyroid-specific gene expression. Biochim Biophys Acta 1218:255-266, 1994
25. Lee WJ, Song KH, Koh EH, Won JC, Kim HS, Park HS, Kim MS, Kim SW, Lee KU, Park JY: Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 332:885-891, 2005
26. Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim MS, Jo I, Oh GT, Park IS, Youn JH, Park SW, Lee KU, Park JY: Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:2488-2494, 2005
27. Lee EY, Lee CK, Lee KU, Park JY, Cho KJ, Cho YS, Lee HR, Moon SH, Moon HB, Yoo B: Alpha-lipoic acid suppresses the development of collagen-induced arthritis and protects against bone destruction in mice. Rheumatol Int 27:225-233, 2007
28. Kim HS, Kim HJ, Park KG, Kim YN, Kwon TK, Park JY, Lee KU, Kim JG, Lee IK: Alpha-lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF-kappaB transcriptional activity. Exp Mol Med 39:106-113, 2007
29. Berkson BM, Rubin DM, Berkson AJ: The long-term survival of a patient with pancreatic cancer with metastases to the liver after treatment with the intravenous alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone protocol. Integr Cancer Ther 5:83-89, 2006
30. Espinoza CR, Schmitt TL, Loos U: Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. J Mol Endocrinol 27:59-67, 2001
31. Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF: Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. Proc Natl Acad Sci U S A 99:15776-15781, 2002
32. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P: A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. Eur J Endocrinol 155:495-512, 2006