고농도 여성호르몬이 갑상선 특이 유전자 발현 및 세포증식에 미치는 영향

단국대학교 의과대학 내과학교실

김동우 · 박희윤 · 김도희 · 김희진 · 정현경

Effect of High Concentration of Estradiol on Thyroid Specific Genes Expression and Cell Growth

Dong Woo Kim, Hee Youn Park, Do Hee Kim, Hee Jin Kim, Hyun Kyung Chung

Department of Internal Medicine, Dankook University, School of Medicine, Cheonam, Korea

ABSTRACT

Background: Since various thyroid diseases have dominant prevalence in women, it has been suggested that female sex hormone have important role on thyroid cell physiology. Interestingly, many thyroid disorders are newly diagnosed or changed their course around the period of high estrogen status, such as pregnancy. In this study, we questioned whether high concentration of estrogen could modulate thyroid cell function.

Methods: We treated normal rat thyroid FRTL-5 cell line with different time and concentration of estradiol. Using cell count, FACscan, and Northern blot analysis, we compared the changes of cell growth, cell cycle progression and thyroid specific genes expression. To evaluate the influence of thyroid stimulating hormone (TSH), all experiment was designed as two different sets, with (6H) or without TSH (5H).

Results: The concentration of 10-1000 nM estradiol had definite stimulatory function on thyroid cell growth in 5H condition as concentration dependent manner. FACscan revealed the increased cell growths were related to G1/S progression. The Pax-8, TTF-1 and NIS gene expressions were dramatically increased in 10-1000 nM of estradiol, too. With TSH (6H), however, we could not find any cell growth stimulating effects with 10-1000 nM of estradiol.

Conclusion: High concentration of estradiol is one of important control factor for thyroid growth and thyroid specific genes expression, especially in 5H condition. It indicate that exposure to high concentration of female sex hormone, such as pregnancy, can be a direct stimulating factor to various thyroid function and related to autoimmune or nodular thyroid diseases around the period of pregnancy (J Kor Soc Endocrinol 21:32~39, 2006).

Key Words: Thyrocyte, Estradiol, NIS, Pax-8, TTF-1

서 론

각종 갑상선질환은 특징적으로 여성에서 호발하며, 이와 같은 현상은 요오드 섭취량의 많고 적음을 불문하고 전 세계적으로 공통이다[1]. 또한 생리적, 병적 여성호르몬 농도 변화나 여성호르몬 투여와 함께 각종 갑상선질환이 발병하거나 경과의 변화를 보이는 현상들도 보고된 바 있다[2~6]. 따라서 여성호

접수일자: 2005년 5월 31일
통과일자: 2005년 7월 5일
책임저자: 정현경, 단국대학교 의과대학 내과학교실
* 본 연구는 학술진흥재단 신진교수연구비(KRF-2002-003-E00071) 및 단국대학교 의료원 생명과학연구소 연구비 지원으로 수행되었음.

르몬이 갑상선 세포의 각종 기능을 조절하는데 있어 중요한 작용을 담당하고 있는 것으로 생각된다. 과거의 연구들 중에는 여성호르몬이 갑상선 세포에 미치는 영향이 미미하다거나[7], 여성호르몬의 작용이 갑상선에 직접적인 영향이라기 보다는 뇌하수체-갑상선 축을 통한 간접적인 것이라는 주장도 있었다[8]. 그러나 최근의 연구에서는 갑상선 세포가 여성호르몬에 대한 수용체를 가지고 있으며, 여성호르몬을 자체적으로 생산하기도 한다는 사실이 밝혀졌고[9~11], 여성호르몬 자극하에 나트륨-요오드 수용체의 유전자 발현이 변화되며[12], 각종 세포주기 물질의 단백발현이 조절될 수 있다는 연구결과도 보고된 바 있다[13]. 이는 여성호르몬이 갑상선세포 수준에서 직접적으로 중요한 조절 작용을 담당하고 있음을 의미한다.

지금까지 갑상선세포에 대한 여성호르몬 자극의 영향을 살펴본 연구들은 주로 생리적 농도, 즉 정상 여성의 생리기간 중 배란 전-후기에 해당하는 여성호르몬 자극만을 위주로 실험이 진행되었다. 그러나 한 여성의 일생 중 혈중 여성호르몬의 농도는 생리 주기 뿐 아니라 임신과 분만, 폐경, 치료적 여성호르몬 사용 등의 경우에 다양한 폭으로 변화될 수 있다. 특히 임신과 같이 여성호르몬 농도가 급격하게 증가하는 시기를 전후하여 각종 갑상선 질환의 발생 및 악화가 알려져 있는 바[14~16], 고농도의 여성호르몬이 갑상선세포 기능에 미치는 영향이 어떤 것인지 궁금하다. 이에 본 연구에서는 다양한 농도와 시간의 여성호르몬 자극에 대해 갑상선세포의 증식 및 갑상선특이 유전자 발현이 어떻게 변화하는지 살펴보았다. 본 연구의 결과는 고농도의 여성호르몬이 비교적 낮은 농도의 여성호르몬 자극에서와는 다른 측면의 조절작용을 가지고 갑상선세포의 증식 및 특이 유전자 발현 등의 기능을 변화시키고 있음을 보여준다.

대상 및 방법

1. 세포배양

실험에 이용한 세포주는 쥐 갑상선 세포인 FRTL-5로서 정상적 표현형을 가지며 호르몬 반응성과 갑상선 세포로서의 기능이 보전되어있는 세포이다. FRTL-5 세포는 5% calf serum이 함유된 Ham's F-12 medium으로 배양하며 이 배양액에는 여섯 가지 호르몬 (6H) bovine thyroid stimulating hormone (이하 TSH) (1×10^{-10} M), insulin (10 μg/mL), cortisol (0.4 ng/mL), transferrin (5 μg/mL), glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate (10 ng/mL), somatostatin (10 ng/mL) 및 non-essential amino acids (1 mM)을 넣어 세포의 성장을 위한 배지로 사용하였다. 모든 배지는 3일 마다 교환하였으며 7-10일 마다 passage를 시행하였다. 모든 시약은 Sigma에서 구입하였고, 모든 실험은 30 passage 이내의 세포에서 시행하였다.

2. 여성호르몬 자극조건

Subconfluent 상태의 FRTL-5세포를 3일 간, TSH 결핍 배양액 (5H)에 배양하였다. 이후 서로 다른 조건의 여성호르몬 (estradiol, Sigma) 포함 배양액을 이용하여 세포를 자극하였다. 즉 estradiol (0, 10, 100, 1000 nM)을 TSH 존재 하에 혹은 제거한 상태에서 서로 다른 시간 동안 자극하고 해당 실험을 진행하였다. 실험에 적용한 여성호르몬 농도 범위는 임신 중기-말기의 혈중 estradiol 농도 및 뇨 중 배설량에 근거하여 설정하였다[17]. 일부 실험에서는 여성호르몬 포함 배양액으로 자극하다가 일정 시간 후 여성호르몬을 제거하고 48시간 경과 후 다시 RNA 측정을 위한 세포처리를 진행하였다.

3. 세포 성장 및 세포주기 분석실험

각 세포주를 해당 배양액에 키우면서 서로 다른 농도의 여성호르몬 배양액을 1-5일까지 적용하였다. 모든 세포에서 각 조건당 세 개의 우물을 사용하였으며, 2일 간격으로 배양액을 갈아주었다. 일정 시간 간격으로 세포를 회수하고 phosphate buffered solution (PBS)에 씻은 후 세포수를 세어 변화를 비교관찰하였다. 세포주기 분석은 FACS Caliber instrument (Becton Dickinson)를 이용하여 실시하였다. 세포를 해당 배양액에서 일정한 시간동안 배양한 후 PBS세척 후 propidium iodide를 이용하여 DNA 염색한 후 최소 15000개의 세포를 대상으로 cellular DNA 량을 CELLQUEST software (Becton Dickinson) 이용하여 분석하였다. 세포주기 동조화를 위해서 TSH를 포함하지 않고 0.2% calf serum만을 가지는 배양액 (5H medium)에 옮겨 5일 이상 배양한 후 다시 TSH를 포함하는 6H 배양액으로 옮겨 같은 시간 조건처리하고 트립신 처리를 통해 세포를 얻어 같은 방법으로 flow cytometirc analysis를 실시하였다.

4. Northern Blot Analysis

FRTL-5 세포로부터 총 RNA를 얻기 위해 상품화된 kit (Quigen, Inc.)를 사용하였다. 15 μg의 서로 다른 RNA 시료를 denaturated agarose gel에서 전기영동하고, nytran membrane으로 capillary transfer를 시행하였으며, transfer된 membrane은 5 × SSC로 rinse하고, UV cross-link를 이용하여 RNA를 immobilization시켰다. Quick hybridization solution (QUICKHYB, Stratagene, LaJolla CA)으로 섭씨 62℃에서 30분간 prehybridizaton하고 denatured probe를 이용하여 섭씨 62℃에서 24시간 중합반응을 마친 다음, 6 × SSPE /0.5% SDS (15분)로 2회, 1 × SSPE/0.5% SDS (37℃)로 2회 세척하고 0.1 × SSPE/0.1%SDS로 60분간 섭씨 60℃에서 세척하였다. Re-hybridization을 위한 probe removal은 50% formamide/6 × SSPE (60℃, 30분)으로 처리하고 2 × SSPE로 세척하였으며, 필름 감광은 Kodak-OMAT AR을

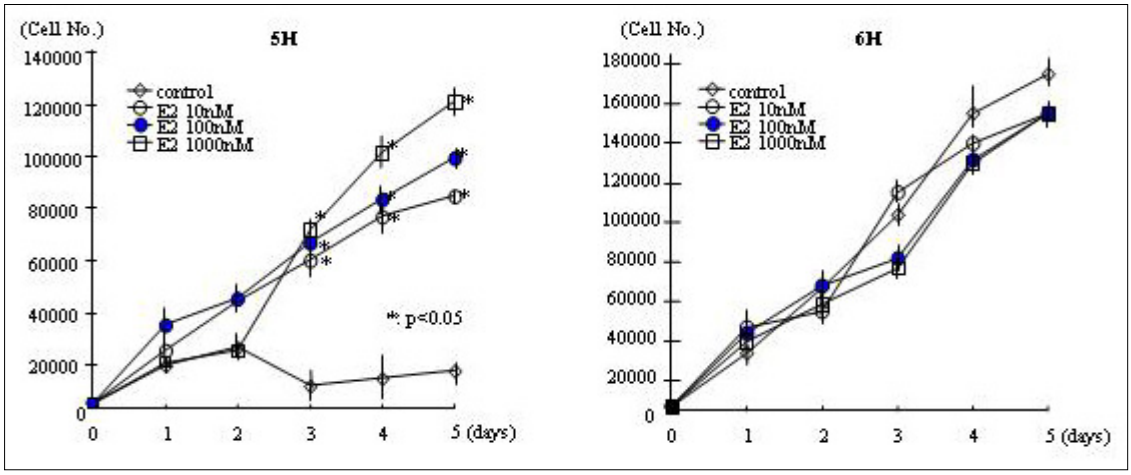

Fig. 1. Estradiol effects on FRTL-5 cell growth. Quiescent FRTL-5 cells were incubated with 10-1000 nM estradiol in the absence (5H) or presence (6H) of TSH for 1-5 days. Cell number was monitored every 24h for 5 consecutive days, and viable cell number is represented. The data are the mean ± SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$ vs. control.

Table 1. Cell Cycle Progression of FRTL-5 Cells Stimulated with Different Dose of Estradiol

	16 h				24 h			
	sub G1	G0/G1	S	G2/M	sub G1	G0/G1	S	G2/M
5H only	0.26 ± 0.03	93.24 ± 0.20	1.64 ± 0.02	4.80 ± 0.18	0.71 ± 0.03	94.23 ± 0.11	1.29 ± 0.09	3.85 ± 0.09
+10 nM E2	1.20 ± 0.01	73.16 ± 0.04*	6.61 ± 0.08	19.25 ± 0.21	0.78 ± 0.08	85.02 ± 0.08	1.76 ± 0.12	12.27 ± 0.15
+100 nM E2	1.45 ± 0.04	66.61 ± 0.16*	8.92 ± 0.16	23.28 ± 0.16	1.28 ± 0.11	88.39 ± 0.09	2.51 ± 0.05	8.65 ± 0.05
+1000 nM E2	2.45 ± 0.08	67.78 ± 0.32*	9.50 ± 0.08	20.73 ± 0.24	0.62 ± 0.07	88.88 ± 0.09	1.94 ± 0.01	8.61 ± 0.08
5H only	0.49 ± 0.02	75.77 ± 0.08	11.20 ± 0.09	12.01 ± 0.06	0.82 ± 0.02	86.52 ± 0.18	2.77 ± 0.03	10.01 ± 0.01
+10 nM E2	0.79 ± 0.05	74.20 ± 0.04	6.27 ± 0.04	18.31 ± 0.05	0.51 ± 0.04	80.73 ± 0.07	2.42 ± 0.20	16.32 ± 0.06
+100 nM E2	0.34 ± 0.03	73.17 ± 0.05	8.43 ± 0.05	17.54 ± 0.08	0.84 ± 0.05	81.09 ± 0.03	2.58 ± 0.06	15.39 ± 0.09
+1000 nM E2	0.15 ± 0.02	70.70 ± 0.02	9.73 ± 0.07	18.57 ± 0.11	0.74 ± 0.05	77.58 ± 0.02	4.41 ± 0.02	16.20 ± 0.11

* $P < 0.05$ vs. control (5H only)

이용한다.

결 과

1. 고농도의 여성 호르몬 자극에서 갑상선세포 성장곡선의 변화

정상 갑상선세포에서 서로 다른 농도의 여성호르몬 자극 후 세포 성장곡선의 변화를 살펴본 결과, TSH 유무에 따라 상이한 결과를 보였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 TSH의 영향을 배제한 상태 (5H)에서 서로 다른 농도의 여성호르몬 자극이 주어진 경우, 48시간 까지는 대조군과 큰 차이를 보이지 않지만, 그 이후부터는 10-1000 nM 농도의 여성호르몬 자극에 의해 농도 의존적으로 갑상선세포의 증식이 현저하게 촉진되었다. 한편 TSH를 동시에 처리한 경우는 여성호르몬 자극에 따른 갑상선세포 증식의 차이를 보이지 않았다.

2. 고농도의 여성 호르몬 자극에서 갑상선 세포주기의 변화

TSH 자극을 배제한 상태에서 여성호르몬 자극에 의한 갑상선세포 성장 촉진을 세포주기 측면에서 살펴보았다. 8,12,16,24,48시간 동안의 여성호르몬 자극 후 FACS 를 이용하여 세포주기의 비율을 확인한 결과, 16시간 경과 이후 대조군 세포에서 G0/G1 정지 현상을 보인 반면, 여성호르몬 자극 세포군에서는 G1/S주기로의 진행이 촉진됨을 확인할 수 있었다 (Table 1). 따라서 여성호르몬에 의해 증가되는 갑상선 세포증식은 G1/S세포주기의 촉진에 의한 것으로 생각되었다. TSH를 동시에 자극하였을 경우에는 TSH자극에 의한 세포주기 진행을 고농도 여성호르몬이 변화시킬 수 없었으며, 이는 세포성장 곡선에서 확인한 바와 같은 결과이다. 동일 조건에서 세 번의 실험을 반복하여, 그 중 가장 전형적인 세포주기 곡선의 변화를 Fig. 2에 제시하였다.

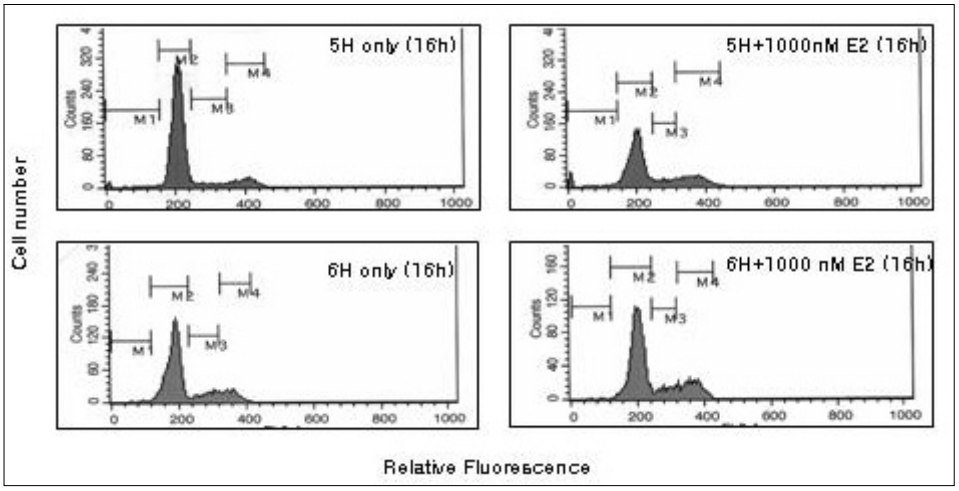

Fig. 2. Effect of high concentration of estradiol on cell cycle distribution of FRTL-5 cells. Flow cytometric histograms of FRTL-5 cells maintained in 5H medium for 72h, stimulated with different concentration of estradiol in the absence or presence of TSH are represented. Samples were collected after 24h of treatment for FACS analysis. The intensity of the propidium iodide statining vs. cell number is represented. The percentage of the cell cycle distribution is shown in Table 1.

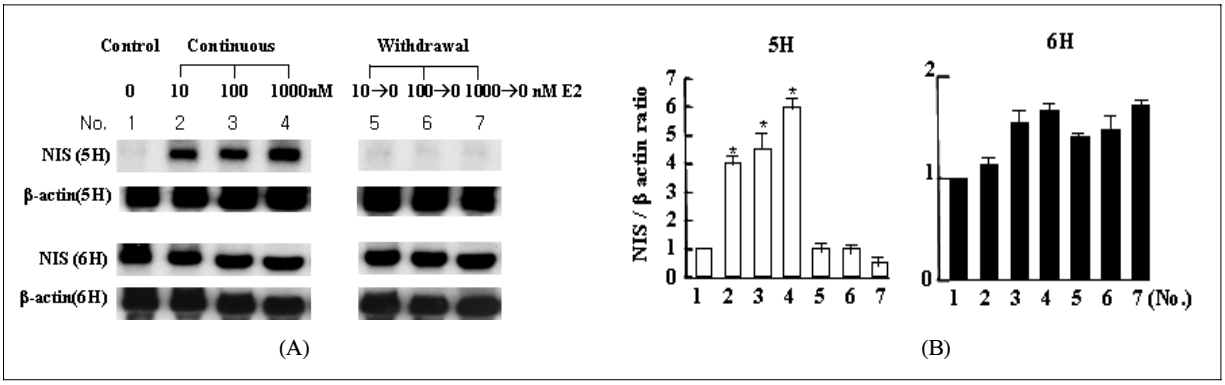

Fig. 3. Effect of high concentration of estradiol on NIS RNA levels in FRTL-5 cells. Different time and concentration of estradiol in the absence (a) or presence (b) of TSH were compared. In contrast of continuous estradiol stimulation for 4 days (No.2-4), 2 days withdrawals after 2 days stimulations (No. 5-7) were also compared. Ability of estradiol to modulate NIS mRNA levels was significant in 5H condition (A). The ratio of the binding of each probe to β actin was calculated, and ratio of No.1 was set as 1 (B). Data are the mean ± SD of three different experiments, each performed in duplicate. *, $P < 0.05$ vs. control.

3. 고농도의 여성호르몬 자극에서 갑상선 특이 유전자 발현의 변화

정상 갑상선 세포에서 여성호르몬 자극 후 갑상선 특이 전사인자인 Pax-8, TTF-1과 갑상선특이 항원으로 알려진 thyroglobulin (이하 TG), thyroid Peroxidase (이하 TPO) 및 sodium iodide symporter (이하 NIS), major histocompatibility complex (이하 MHC)-class I의 RNA 발현의 변화를 확인하기 위하여 FRTL-5 세포를 이용한 Northern blot assay를 진행하였다. 48시간 동안 서로 다른 농도 (0, 10, 100, 1000 nM)의 여성호르몬 자극을 진행한 뒤, 일부 세포는 여성호르몬 자극을 지속하고 일부에서는 다시 48시간 동안 여성호르몬을 제거한 상태에서 배양한 후 각각에서 얻은 RNA를 well 당 20 μg씩 로딩한 후 해당 probe와 반응시켰다. 특히 동일 조건의 실험을 TSH 존재 하/ TSH 제거 후에 각각 실시하였다.

갑상선 여포세포에서만 특이적으로 기능하는 유전자의 발현을 살펴본 결과, TG, TPO 및 MHC-class I 등은 여성호르몬 자극 전후에 발현율 차이를 보이지 않았으나 (data 제시하지 않음), NIS의 경우에는 특징적인 변화양상을 보였다 (Fig. 3). TSH 동시 자극의 경우에는 (6H) 여성호르몬 자극에 따라 NIS 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 하지만 TSH를 배제한 상태에서는 (5H) NIS 유전자의

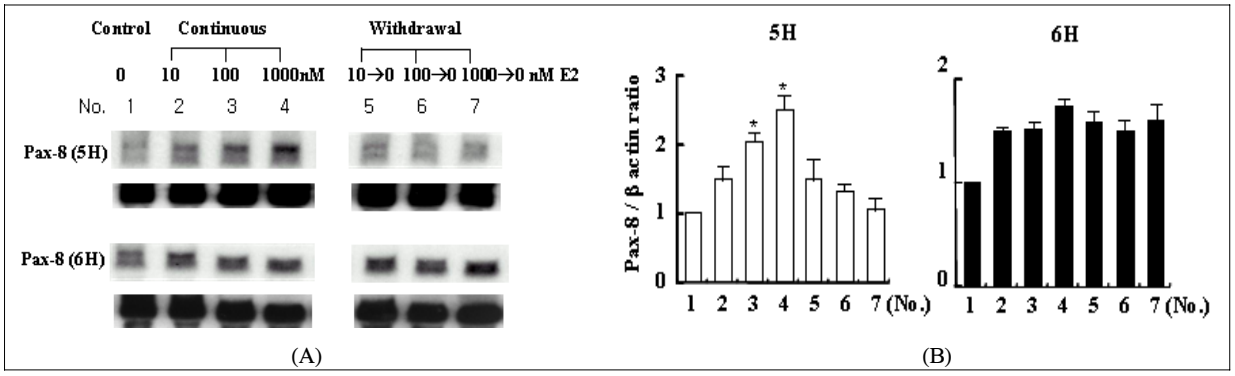

Fig. 4. Effect of high concentration of estradiol on Pax-8 RNA levels in FRTL-5 cells. Each number represents the different estradiol and TSH condition as indicated in Fig. 3 (A). The ratio of the binding of each probe to β actin was calculated, and ratio of No.1 was set as 1 (B). Data are the mean ± SD of three different experiments, each performed in duplicate. *, $P < 0.05$ vs. control.

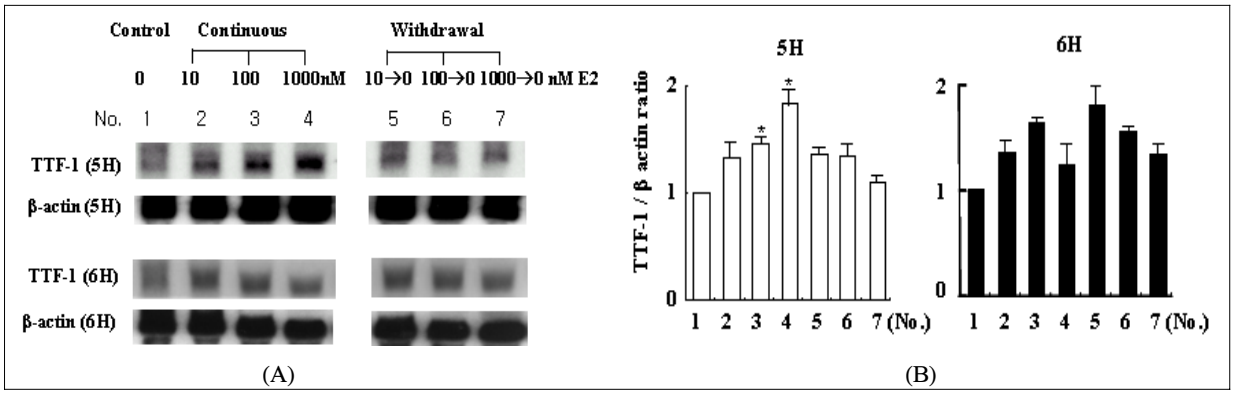

Fig. 5. Effect of high concentration of estradiol on TTF-1 RNA levels in FRTL-5 cells. Each number represents the different estradiol and TSH condition as indicated in Fig. 3 (A). The ratio of the binding of each probe to β actin was calculated, and ratio of No.1 was set as 1 (B). Data are the mean ± SD of three different experiments, each performed in duplicate. *, $P < 0.05$ vs. control.

발현이 통계적으로 유의한 수준으로 현저히 증가하였다. 그리고 여성호르몬을 제거하였을 때 이와 같은 현상이 함께 사라짐을 확인함으로써 NIS 유전자 발현의 변화가 여성호르몬 자극에 특이적인 것임을 입증하였다.

갑상선특이 전사인자의 유전자 발현 또한 여성호르몬 농도에 비례하여 증가하였고, TSH를 배제한 상태에서 보다 뚜렷한 차이를 나타내었다 (Fig. 4, 5). 6H 조건에서는 Pax-8, TTF-1의 RNA 정량 시 농도에 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 의의를 둘 정도로 뚜렷하지는 않았다. 5H 조건에서는 100 nM 농도부터 현저하게 Pax-8, TTF-1의 RNA 발현이 증가함을 확인할 수 있었고 이는 농도에 의존적이었다.

고 찰

본 연구는 고농도의 여성호르몬 자극이 Pax-8, TTF-1와 NIS 등 갑상선 특이 유전자 발현을 농도 의존적으로 증가시키며, 갑상선 세포의 증식을 촉진하는 쪽으로 작용함을 보여준다. 이번 실험에 사용한 여성호르몬 농도 10-1000 nM은 정상적인 생리주기의 혈중 여성호르몬 농도 (0.1-1 nM)의 수십-수백 배에 해당하는 농도이다[18]. 여성의 일생 중 이와 같은 고농도의 여성호르몬에 노출될 수 있는 경우는 대표적으로 임신기를 들 수 있다. 임신 중 혈중 여성호르몬 농도는 비임신기와 비교했을 때 수십 배에 달하며, 뇨중 배출량으로 측정하면 수백-수천 배까지도 증가하는 것으로 알려져 있다. 이는 임신 중기-말기에 갈수록 점차 증가하였다가 분만과 함께 급격히 저하한다[17].

결절성 갑상선 질환의 빈도가 임신력이 많은 여성에서 더욱 높고[14], 임신 중 새로운 갑상선 결절이 흔히 발생되며[15], 각종 자가면역성 갑상선 질환과 임신이 밀접한 연관성을 가진다는 사실은 익히 알려져 있다[16]. 지금까지 이에 대한 병인적 해석은 임신 중 요오드 평형상태의 상대적인 불균형[19], hCG 등 관련 호르몬의 영향[20], 또는 임신이 자가면역 기전에 미치는 영향[21,22] 등에 집중되어 왔다. 그러나 임신 말기로 진행하면서 점차 혈중 hCG 농도는 감소하는데도 불구하고

갑상선 결절의 빈도나 크기는 오히려 증가하는 현상 등으로부터, hCG나 TSH 이외에 갑상선 세포의 증식을 조절하는 다른 자극인자의 역할이 제시된 바 있다[15]. 이번 연구결과에 근거할 때, 임신이라는 일정 기간 동안 지속적으로 주어지는 고농도의 여성호르몬 자극이 갑상선 세포의 증식을 유도하고 각종 관련 유전자의 발현을 증가시키는 중요한 인자 중 하나라고 생각된다. 또한 여성호르몬 자극이 급격하게 저하되는 것이 갑상선 특이 유전자의 발현에 직접적인 영향을 미치고 있음을 확인함으로써, 분만 후 발생하는 각종 자가면역성 갑상선 질환의 병인에 기여하고 있을 가능성을 제시하였다. 비록 이번 연구결과가 실제 임상적 질환의 발생까지 어떤 고리로 연결되는지에 대한 상세한 기전은 아직 알 수 없다. 하지만 혈중 여성호르몬 농도의 증가가 다양한 갑상선 기능의 안정 상태를 변화시키는 자극으로 작용함은 부인할 수 없다.

이번 연구 결과의 하나 흥미로운 점은 고농도 여성호르몬 자극이 5H 조건, 즉 TSH 작용이 배제된 상태에서만 통계적으로 유의한 변화를 보였다는 점이다. 이는 고농도의 여성호르몬 작용이 TSH의 작용을 능가하거나 변화시킬 수는 없음을 의미하며, TSH가 갑상선 기능을 조절하는 주요인자로 작용하고 있는 일반적 상황에서는 고농도 여성호르몬이 갑상선 기능을 적극적으로 변화시키는 강력한 자극은 아니라는 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 기존의 연구에서 비교적 낮은 농도(1-10 nM)의 여성호르몬 자극이 6 H 조건 하에서도 갑상선 세포의 증식을 촉진하는 일종의 협동인자로 작용하였던 것과 차이를 보인다[12]. 본 실험 과정 중 동일한 낮은 농도 (0.01-10 nM)의 여성호르몬 자극에서도 같은 실험 방법으로 세포 증식 정도를 확인한 결과, 고농도의 경우와 같이 5H 조건에서만 뚜렷한 변화를 확인하였다 (결과 제시하지 않음). 따라서 갑상선 세포의 증식 측면에서는 여성호르몬 농도의 높고 낮음에 상관없이 TSH와 상호작용 하에 일정 수준의 자극을 만들어 내고 있는 것으로 생각된다. 그러나 이차성 뇌하수체 기능저하증 환자나 TSH 억제 요법을 시행 중인 환자 등, 혈중 TSH 농도가 저하되어 있는 상황에서는 여성호르몬 농도의 급격한 증가 (예: 치료적 여성호르몬 투여)가 갑상선 세포의 증식 및 기능에 현저한 영향을 미칠 가능성도 있다.

갑상선 관련 유전자 중 여성호르몬 농도 증가에 따라 가장 뚜렷한 변화를 보인 것은 NIS이다. 고농도의 여성호르몬은 NIS 유전자 발현을 의미있게 증가시킨다. 이는 TSH 제거 시 더욱 뚜렷해지고, TSH 동시 자극 조건하에서도 같은 경향으로 유지되었다. 또한 여성 호르몬 자극을 제거하면 이와 같은 현상이 사라짐으로써 여성 호르몬에 특이한 것임을 보여주었다 (Fig. 3). 임신 시기와 같이 고농도의 여성호르몬 자극 하에서 NIS 발현이 증가되는 것은 임신 중 달라지는 요오드 재균형 상태에 적응하기 위한 현상으로 해석할 수 있다. 비임신기와 달리 임신 중에는 요오드 신제거율의 증가, 요오드의 태반통과를 보상하기 위한 요구량의 증가 등을 볼 수 있고, 이에 대한 반응으로 갑상선 내 요오드 섭취가 증가한다고 알려져 있다[16]. 따라서 임신 중 증가되는 여성호르몬 농도에 따라 NIS 발현률을 적절히 변화시키는 것은 체내 요오드 균형을 위한 생리적 적응 과정일 것으로 생각된다. 아울러 이번 연구결과는 NIS를 이용한 유전자 치료에서 여성호르몬을 이용할 수 있는 가능성을 제시한다. NIS 단백은 각종 종양성 질환에서 유전자 도입을 통해 방사성 요오드 치료를 적응하게 하는 중요한 기능을 가지는데[23], 비갑상선 조직에서 발생한 종양의 경우 TSH 이외에 NIS 유전자 발현을 촉진시킬 수 있는 자극이 필요하다. 이번 연구는 여성호르몬을 이용하여 NIS 유전자의 발현을 적절히 조절할 수 있음을 확인함으로써, NIS 유전자 유도 종양 치료법 개발에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

일부 기존 연구에서 비교적 낮은 농도 (10 nM)의 여성호르몬 자극이 6H 조건 하에서 NIS 발현을 억제하며, 5H 조건에서는 NIS 발현의 변화를 나타낼 수 없다고 보고하였는데[12], 이는 본 연구와 일부 상반되는 내용이다. 이와 같은 차이가 실제 여성호르몬 농도의 차이에 따른 변화인지 또는 실험 방법의 차이 (RT-PCR vs. Northern blot)인지는 뚜렷치 않다. 그러나 기존 연구에서 control 상태의 NIS 발현이 이미 높게 측정된 점이나, 본 실험에서 6H 조건 하에 같은 10 nM E2 자극을 적용하였을 때 NIS 발현의 변화가 통계적 유의성을 가지지 못했던 점 등을 고려할 때, RT-PCR 방법이 가지는 위양성의 가능성을 간과할 수 없다고 본다.

갑상선 특이 전사인자인 Pax-8과 TTF-1의 유전자 발현이 여성호르몬 자극에 따라 변화하는 현상은 지금까지 보고된 바 없다. Pax-8와 TTF-1 은 각종 갑상선 특이 유전자의 발현을 조절하는 주요 전사인자로써, 이들 물질의 변화는 갑상선세포의 각종 기능 조절뿐 아니라 태생적 분화 과정의 조절에도 관여함을 의미한다[24,25]. 따라서 고농도의 여성호르몬 자극이 각종 갑상선 기능의 기본적인 단계의 조절에까지 깊숙이 관련되어 있을 것으로 보인다. 또한 NIS 유전자 발현의 조절인자로 Pax-8, TTF-1 등이 중요함이 이미 알려져 있는 바[26], 고농도 여성호르몬 자극 후 NIS 유전자 발현의 증가는 (Fig. 3) 이들 갑상선특이 전사인자의 발현 증가와 연결되어 있는 것으로 보인다. 물론 같은 전사인자의 작용 하에 발현이 조절되는 TG, TPO 등은 고농도 여성호르몬 자극 후에도 특별한 변화를 보이지 않아서 (결과 제시하지 않음), Pax-8이나 TTF-1에 대한 작용이 모든 갑상선 특이 유전자의 발현에 동일한 영향을 미치는 것은 아닌 것으로 보인다.

연구자 등이 생각하는 본 실험의 취약점으로는 먼저 ICI 182780 등의 여성호르몬 길항제를 사용하여 모든 결과의 특이성을 재확인하지 못한 것을 들 수 있다. 하지만 여성호르몬 자극 중단 후 유전자 발현의 변화를 확인하는 실험 등을 통해 일부 보완한 것으로 생각한다. 또 하나는 실제 갑상선 내 여성호르몬 농도에 대한 궁금증이다. 혈중 여성호르몬 농도와 갑상선 여포 내 여성호르몬 농도는 어떤 차이를 보이는지, 갑상선

내에서 자체적으로 생산되는 여성호르몬의 양은 어느 정도인지 등에 대한 연구가 미흡한 상태이므로, 본 실험 중 사용한 고농도 여성호르몬 자극이 임신 등의 시기에 실제 갑상선 여포세포가 접하게 되는 여성호르몬 농도인지 여부는 명확히 알 수 없다. 하지만 생체에서 갑상선 내에 여성호르몬 농도를 측정하는 것에 제한이 따르므로, 일반적인 혈중 농도에 근거하여 추정할 수 있을 뿐이다. 마지막으로 여성호르몬의 종류에 따른 차이점이다. 본 실험에서는 estradiol 만을 사용하여 실험을 진행하였으나, estriol, estrone 등 서로 다른 여성호르몬 자극에 따라 갑상선세포에 미치는 영향이 다를 가능성이 있다. 특히 임신 중에는 이와 같은 낮은 역가의 여성호르몬 농도가 수 백 배 이상 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 다양한 여성호르몬이 서로 어떤 작용의 차이를 보이는지 여부에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각한다.

결론적으로 고농도의 여성호르몬 자극은 갑상선 세포의 증식 및 NIS, Pax-8, TTF-1 등의 특이 유전자 발현에 자극인자로 작용한다. 이는 TSH 동시 자극 하에서 TSH의 작용을 변화시킬 정도는 아니나, TSH 작용을 배제한 상태에서는 갑상선 세포의 증식 및 관련 유전자 발현의 강력한 자극인자로 작용한다. 이와 같은 결과는 비교적 낮은 농도의 여성호르몬 자극이 NIS 유전자의 발현을 억제하거나, TSH의 세포증식 효과를 증강시킨다는 기존의 보고와 다른 결과로써, 여성호르몬이 특정 농도에 따라 갑상선 여포세포에 대한 조절 작용을 다르게 나타낼 수 있음을 시사한다.

요 약

연구배경: 각종 갑상선질환은 특징적으로 여성에서 호발하며, 특히 임신 등 여성호르몬 농도 증가 시기를 전후하여 각종 갑상선 질환의 발생 및 경과 변화가 보고된 바 있다. 하지만 갑상선 세포에 대한 여성호르몬 자극의 영향을 살펴본 기존의 연구들은 주로 생리주기 중 낮은 농도의 여성호르몬 자극만을 위주로 실험이 진행되었다. 따라서 본 연구에서는 고농도의 여성호르몬 자극이 갑상선세포의 증식과 갑상선 특이 유전자의 발현률에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다.

방법: 정상 갑상선 세포주를 이용하여 고농도의 여성호르몬 자극 전후의 세포 증식 변화를 세포증식 곡선 및 세포주기 분석 방법으로 관찰하고, TG, TPO, TSHR, NIS 등의 갑상선특이 유전자 및 Pax-8, TTF-1 등의 갑상선특이 전사인자의 유전자 발현의 변화를 Northern blot assay 등을 이용하여 측정하였다. 또한 여성호르몬 및 TSH를 동시 자극했을 경우와 TSH 작용을 배제한 상태에서 같은 실험을 반복하여 그 차이점을 살펴보았다.

결과: 여성호르몬 자극과 TSH가 동시에 적용되는 경우에는 고농도 (10-1000 nM estradiol) 여성호르몬 자극에도 갑상선세포의 증식양상이 변화하지 않았다. 갑상선특이 전사 인자 및 NIS RNA 발현율은 증가되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 수준에는 미치지 못하였다. 한편 TSH를 배제한 상태에서는 고농도 여성호르몬이 갑상선 세포의 증식을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 그 정도는 통계적 유의성을 가지고 있었다. 또한 이와 같은 세포 증식의 증가는 세포주기 G1/S의 진행이 촉진되는 것에 기인하였다. 또한 갑상선 특이 유전자 중 선택적으로 NIS 의 발현을 현저하게 증가시키며, Pax-8, TTF-1 등의 갑상선특이 전사인자의 RNA 발현을 통계적으로 유의한 수준으로 증가시켰다.

결론: 고농도의 여성호르몬은 갑상선 세포의 증식 및 특이 유전자 발현에 자극 인자로 작용한다. 일반적인 TSH 동시 조건에서는 TSH와 함께 일정 수준의 조절 작용을 만들어내는 보조인자로 작용하며, TSH 작용을 배제한 상태에서는 고농도 여성호르몬 단독으로 갑상선 세포의 증식 및 관련 유전자 발현의 강력한 자극인자로 기능한다. 따라서 임신 전후나 폐경기 여성에서 급작스런 여성호르몬 투여 등, 고농도의 여성호르몬에 노출되는 것은 갑상선 세포의 증식 및 관련 유전자 발현 측면에서 직접적인 자극 조건이 주어지는 상황으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Vanderpump M, Tunbridge W: *The epidemiology of thyroid diseases. In: Braverman L, Utiger R, The Thyroid: A fundamental and Clinical Text, 7th ed. pp 474-482, Philadelphia, Lippincott Raven, 1996*
2. Ishii K, Hayashi A, Tamaoka A, Mizusawa H, Shoji S: *A case of Hashimoto's encephalopathy with a relapsing course related to menstrual cycle. Rinsho Shinkeigaku 33:995-997, 1993*
3. De Leo V, D'Antona D, Lanzetta D: *Thyrotropin secretion before and after ovariectomy in premenopausal women. Gynecol Endocrinol 7:279-283, 1993*
4. Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, Maccallini G, Garcia A, Levalle O: *Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. Thyroid 12:63-68, 2002*
5. Watanabe H, Kawabe H: *Relapse of Graves' disease after estrogen therapy for climacteric symptoms. Clin Endocrinol 45:505-507, 1996*
6. Ogard CG, Ogard C, Almdal TP: *Thyroid-associated orbitopathy developed during hormone replacement therapy. Acta Ophthalmol Scan 79:426-427, 2001*
7. Irizarry S, Paniagua M, Pincus G, Janer JL, Frias Z: *Effect of cyclic administration of certain progestin -estrogen combination on the 24-hour raioiodine thyroid uptake. J Clin Endocrinol Metab 26:6-10, 1966*

8. S.A. D'Angelo SA, Fisher JS: *Influence of estrogen on the pituitary-thyroid system of the female rat: mechanism and loci of action. Endocrinology 84: 117-122, 1969*
9. Hiasa Y, Nishioka H, Kitahori Y, Yane K, Nakaoka S. Ohshima M. Konishi N, Nishii K, Kitamura M, Matsunga T: *Immunohistochemical analysis of estrogen and progesteron receptor in 313 paraffin section cases of human thyroid tissue. Oncology 50:132-136, 1993*
10. Van Hoeven K, Menedez-Botet C, Strong E, Huvos A: *Estrogen and progesteron receptor content in human thyroid diseases. Am J Clin Pathol 99:175-181, 1993*
11. Valle LD, Ramina A, Vianello S, Fassina A, Paola B, Colombo L: *Potential for estrogen synthesis and action in human normal and neoplastic thyroid tissue. J Clin Endocrinol Metab 83:3702-3709, 1998*
12. Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL: *Estradiol increases proliferation and down regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells Endocrinology 140:5705-5711, 1999*
13. Manole D, Schilknecht N, Gosnell B, Anams E, Derwahl M: *Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanism. J Clin Endocrinol Metab 86:1072-1077, 2001*
14. Struve CW, Haupt S, Ohlen S: *Influence of frequency of previous pregnancy on the prevalence of thyroid nodules in women without clinical evidence of thyroid disease. Thyroid 3:7-9, 1993*
15. Kung AWC, Chau MT, Lao TT, Tam SCF, Low LCK: *The effect of pregnancy on thyroid nodule formation. J Clin Endocrinol Metab 87:1010-1014, 2002*
16. Smallridge RC: *Postpartum thyroid diseases through the ages: a historical view. Thyroid 9:671-673, 1999*
17. Speroff L, Glass RH, Kase NG: *The endocrinology of pregnancy. In: Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 6th ed. pp276-335, Maryland, Lippincott, Williams & Wilkins, 1999*
18. Mendelsohn M, Karas R: *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N Engl J Med 340:1801-1811, 1999*
19. Smyth PPA: *Variation in iodine handling during normal pregnancy. Thyroid 9:637-642, 1999*
20. Glinoer D: *What happens to the normal thyroid during pregnancy? Thyroid 9:631-635, 1999*
21. Glinoer D: *The regulation of thyroid functions in pregnancy: pathway of endocrine adaptation from physiology to pathology. Endocr Rev 18:404-433, 1997*
22. Davies TF: *The thyroid immunology of the postpartum period. Thyroid 9:675-684, 1999*
23. Buchsbaum DJ, Chaudhuri TR, Zinn KR: *Radiotarget gene therapy. Nucl Med 46:179-186, 2005*
24. Damante G, Lauro RD: *Thyroid-specific gene expression. Biochim Biophys Acta 1218:225-266, 1994*
25. Plachov DK, Chowdhury C, Walther D, Dimon JL Guenet, Gruss P: *Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. Development 110:643-651, 1990*
26. Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, Lauro RD: *The paired-domain transcription factor Pax-8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclin-AMP-Dependent transcription. Mol Cell Biol 19:2051-2060, 1999*