

갑상선 암 세포주에서 Retinoic Acid에 의한 Na^+/I^- Symporter 발현 조절

¹국립암센터 유방암센터, ²서울대학교병원 임상의학연구소, ³충북대학교 의과대학 외과학교실, ⁴Department of Surgery, University of California, San Francisco, Mt. Zion Medical Center, San Francisco, USA, ⁵서울대학교 의과대학 외과학교실

정기욱¹ · 송민선² · 박진우³ · Orlo H. Clark⁴ · 노동영⁵ · 오승근⁵ · 최국진⁵ · 윤여규^{2,5}

Regulation of Sodium-iodine Symporter Expression by Retinoic Acid in Thyroid Cancer Cell Lines

Ki-Wook Chung, M.D.¹, Min Sun Song, B.S.², Jin-Woo Park, M.D.³, Orlo H. Clark, M.D.⁴, Dong-Young Noh, M.D.⁵, Seung Keun Oh, M.D.⁵, Kuk Jin Choe, M.D.⁵ and Yeo-Kyu Youn, M.D.^{2,5}

Purpose: Response to radioiodine therapy for thyroid cancer is related to the loss of sodium-iodine symporter protein caused by dedifferentiation of thyroid cancer cells. So we aimed to study mRNA expression of CD97, dedifferentiation marker, and sodium-iodine symporter after retinoic acid treatment according to retinoids receptor status.

Methods: Thyroid cancer cell lines; ARO, FRO, NPA, TPO, and FTC133 were prepared. $5\mu\text{M}$ of all trans retinoic acid were administered to each cell lines and then expression of mRNA for retinoids receptors ($\text{RAR}\alpha$, $\text{RAR}\beta$, $\text{RAR}\gamma$, $\text{RXR}\alpha$, $\text{RXR}\beta$, $\text{RXR}\gamma$), CD97, and Sodium-iodine symporter by RT-PCR.

Results: RARs and RXRs were differently expressed in each cell line. After retinoic acid treatment, relative density of retinoic acid receptor mRNA were increased by time dependently in each cell line except TPO cell line. Expression of CD97 also was decreased in every cell lines ($P < 0.001$). Retinoic acid increased expression of sodium-iodine symporter only in FTC133 cell line ($P < 0.001$), and TSH or forskolin did not enhance NIS expression by retinoic acid. $\text{RAR}\beta$ and $\text{RXR}\gamma$ were expressed only in FTC 133cell line before treatment. Induction of sodium-iodine symporter by retinoids disappeared after $\text{RAR}\beta$ specific antagonist LE135

or pan RXR antagonist PA452 administration.

Conclusion: Retinoic acid reduced expression of CD97 in five thyroid cancer cell lines. However, retinoic acid could restore sodium-iodine symporter expression in only FTC 133 cell line specifically containing $\text{RAR}\beta$ and $\text{RXR}\gamma$. Restoration of sodium-iodine symporter expression by retinoic acid is related to $\text{RAR}\beta$ and $\text{RXR}\gamma$ expression. (Korean J Endocrine Surg 2004;4:1-9)

Key Words: Retinoids receptors, Thyroid cancer cell line, Sodium-iodine symporter, $\text{RAR}\beta$

중심 단어: 레티노이드 수용체, 갑상선암 세포주, 소듐-아이오다인 심포터, 레티노이드 수용체 베타

¹Center for Breast Cancer, National Cancer Center, ²Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, ³Department of Surgery, Chungbuk National University College of Medicine, ⁴Department of Surgery, University of California, San Francisco, Mt. Zion Medical Center, San Francisco, USA, ⁵Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine

서론

갑상선 암은 비교적 예후가 좋은 암이지만 일부의 경우 재발하며 이러한 재발암의 치료에서 가장 문제가 되는 것은 방사성 옥소 치료에 반응하지 않는 것이다. 전체 분화 갑상선 암 중 20%에서 50% 정도의 환자와 대부분의 미분화 갑상선암 환자는 기존의 방사성 옥소 치료에 반응하지 않는다. 방사성옥소 치료는 옥소가 갑상선 세포 내로 흡수 되는 것을 전제로 이루어지고 이러한 옥소의 흡수는 여포 세포의 basolateral membrane에 위치한 Na^+/I^- symporter (NIS)에 의하여 이루어진다.(1) NIS는 12개의 transmembrane domain을 가진 막단백질로(2) 주로 갑상선 자극호르몬(TSH)에 의해 발현의 조절을 받는다.(3) 정상적인 갑상선의 여포 세포가 암세포로 바뀌면서 탈분화되어 가는 과정에서 NIS

책임저자 : 윤여규, 서울특별시 종로구 연건동 28
☎ 110-744, 서울대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-760-3447, Fax: 02-741-6288
E-mail: ykyoun@plaza.snu.ac.kr

게재승인일 : 2004년 9월 23일

*본 연구는 서울대학교병원 일반연구비(no. 04-2003-0240)의 지원으로 이루어졌음.

는 발현이 감소하게 되는데 NIS는 갑상선 암 조직에서 100 배 가량 발현이 감소하며 전체 분화암 중 30%에서 90%의 암 조직이 이러한 NIS의 감소를 보이고(4) NIS가 감소된 갑상선 악성 종양에서는 옥소 흡수의 감소를 보인다.(5) 그러므로 방사성 옥소에 불응하는 갑상선 암을 재분화시켜 NIS의 발현을 증가시킬 수 있다면 이론적으로 방사성옥소의 섭취를 증가시킬 수 있다. 이런 재분화 유도에 쓰이고 있는 화합물로는 갑상선 자극호르몬 (TSH) 등이 있지만 가장 대표적으로 시도되고 있는 것이 retinoids이다.

Retinoids는 retinol의 천연 유도체로서 all trans retinoic acid (ATRA), 9-cis retinoic acid (9cRA)와 13-cis retinoic acid (13cRA)를 포함하고 있고 각각은 특이한 수용체에 반응하며 그 밖에 많은 합성유도체들이 존재한다.(6) Retinoids는 발생과정에서 분화와 장기형성에 관여하며 *in vitro* 그리고 동물 model에서 전골수세포성 백혈병, 피부암, 유방암, 폐암 등의 암세포의 분화를 촉진한다.(7) 갑상선 암세포주에서는 분화표지자인 type I 5' deiodinase activity를 증가시키며(8) 세포 간 상호작용을 증가시킨다.(9) 갑상선암 세포주에서 ATRA로 처리 후 탈분화 표지자인 CD97의 발현을 확인해 보면 retinoic acid (RA)는 갑상선암 세포주에서 CD97의 발현을 감소시켜 분화를 유도하는 것을 알 수 있다.(10, 11) 특히 retinoic acid는 FTC133 cell line 등의 일부의 갑상선암 세포주에서 NIS의 발현을 증가시키는 것으로 보고되어 있다.(12) Retinoids의 작용기전을 고찰하여 보면 retinoids들은 특이한 수용체를 통하여 세포 내에서 작용하게 되는데 retinoid 수용체는 nuclear transcription factor로서 retinoic acid 수용체들(RAR α , RAR β , RAR γ)과 rexinoid 수용체들(RXR α , RXR β , RXR γ)로 나뉘며(13) retinoids와 결합하여 RAR-RXR heterodimer를 이룬 후 SRC-1 등의 cofactor와 같이 DNA의 retinoic acid receptor response element (RARE)에 결합하여 전사를 유도한다.(14) Retinoc acid에 의한 NIS의 발현 조절은 이러한 ligand-RAR-RXR heterodimer complex가 NIS gene promotor의 RARE에 결합하여 transcription을 촉진하기 때문이라고 생각되어진다.(15) 그러므로 retinoid 수용체가 발현되어 있지 않으면 RA에 의한 분화 조절기전은 작동할 수가 없다.(16) 임상적으로도 방사성 옥소에 반응하지 않는 재발암에서 retinoids를 이용하여 방사성 옥소의 섭취를 증가시키려는 시도가 있었는데 문제점은 retinoid에 대한 반응도의 예측이 불가능하다는 점이다. Simon등은 소수의 재발한 분화 갑상선암 환자에서 임상적으로 방사성 옥소의 섭취를 증가시키고자 retinoids 요법을 시도하였으나 약 6~30%의 환자에서 부분적인 관해를 얻는 것에 그쳤다.(17) 그리고 retinoid 자체는 발적이나 점막의 가피형성, 간기능 장애 같은 부작용을 가지고 있으므로 유방암에서의 호르몬 수용체와 같은 치료의 예측인자를 찾아내는 것이 중요하다. 현재까지 시도된 임상연구를 고찰하면 retinoid 수용체의 유무에 대한 검색이 이루어지지 않았다. 또 수용

체가 양성인 세포라도 RAR과 RXR에는 6가지의 아형이 있어 각각 특이한 작용기전을 가진다고 가정하면 RAR 또는 RXR 발현 상태에 따라 retinoid 분화요법에 대한 반응이 다를 것이라 생각할 수 있다. 그렇다면 RAR과 RXR의 발현 상태는 retinoid에 대한 종양의 반응도의 예측인자가 될 수 있을 것이다. 이에 저자는 갑상선 유두암 세포주, 여포암 세포주, 그리고 미분화갑상선암 세포주에서 역전사 중합효소법(RT-PCR)을 통해 RAR, RXR의 발현분포를 확인하고 RAR에 특이적인 ligand인 all trans retinoic acid (ATRA)를 각 세포주에 처리하여 RAR과 RXR 유무에 따른 분화표지자인 CD97과 NIS 발현의 변화를 분석하고자 하였다.

방 법

1) 사용화합물

사용한 모든 화합물들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. RAR β 특이적 길항제인 LE135, RXR 특이적 ligand인 Hx630, 그리고 RXR 특이적 길항제인 PA452 (18 Xu Q, et al. 2002)은 동경대학의 Professor Hiroyuki Kagechika (Tokyo, Japan)가 제공하였다.

2) 세포배양

갑상선 암세포주인 ARO cell line (미분화암 세포주), NPA cell line (유두암 세포주), FRO cell line (미분화암 세포주), 그리고 TPO cell line (유두암 세포주)을 10%/5% fetal calf serum (FCS)을 첨가한 RPMI1640 배지에서 일주일 동안 배양하였다. 3~4일에 1회씩 배지를 교환해 주었다. ATRA (Sigma Co, Missouri, USA)를 처리하기 전 혈청포함배지에서 하루를 배양한 후 혈청을 제외한 배지로 옮기고 24시간 후에 5 μ M all trans retinoic acid로 처리하였다. FTC133 cell line (여포암 세포주)은 10% FCS, TSH (10 mU/ml), fungizone (250 mg/ml), penicillin (10,000 U/ml), streptomycin (10,000 U/ml), glutamine (12.5 mg/L), insulin (0.01 mg/ml)을 첨가한 DMEM F-12 (6H) 배지에서 같은 방법으로 배양하였다. ARO cell line, NPA cell line, FRO cell line은 서울대학교의 정준기 교수(서울, 대한민국)가, FTC133 cell line과 TPO cell line은 Heinrich Heine 대학의 Professor Peter Goretzki (Düsseldorf, Germany)가 제공하였다.

3) 역전사 중합효소반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: RT-PCR)

ATRA로 처리하기 전의 ATRA vehicle인 ethanol만 처리된 세포주와 ATRA 처리 후 24시간, 48시간, 72시간 후의 세포주에서 추출한 RNA를 이용하였다. 총 RNA는 처리한 세포에서 TRIzol reagent (GIBCO BRL Life Technologies, Maryland, USA)를 이용하여 추출하였다. RNA pellet은 DEPC treated water에 약 0.5 μ g/ μ l에서 1.0 μ g/ μ l의 농도로

녹여서 섭씨 영하 70°C에서 보관하였고 준비된 RNA의 정량과 정성은 260 nm과 280 nm의 투과도를 이용하여 분석하였다. 총 RNA 1µg과 random primer p (dN)6 (최후 농도 1µM)를 12.5µl의 DEPC-treated water에 넣고 2분간 섭씨 70도에 방치 후 수분간 cooling 하였다. cDNA합성은 recombinant MMLV reverse transcriptase (GIBCO BRL Life Technologies, Maryland, USA) 1µl를 이용하여 공급자의 제안대로 시행하고 반응은 섭씨 42°C에서 1시간 동안 진행하였다. 반응은 섭씨 94°C에서 5분간 가열하면서 종료하였고 증폭은 다음과 같은 primer를 사용하였다(Table 1). 각각의 PCR 반응은 cDNA 3µl, 10pM primer 1µl, 2.5 mM dNTPs mixture 1µl, 10배 PCR buffer 2.0µl와 recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase (TaKaRa Shuzo Co Ltd. Tokyo, Japan) 0.5 unit를 혼합하여 최종 volume이 20µl가 되도록 하였다.

증폭은 TaKaRa Shuzo Co Ltd (Tokyo, Japan)의 TaKaRa PCR Thermal Cycler Personal을 이용하였다. 얻어진 PCR 최종산물을 가지고 Ethium Bromide (Sigma Chemical Company, Missouri, USA) 염색을 이용하여 2% agarose gel electrophoresis를 시행하고 Biological Image Processing System (BiPS) 3.0 (BIOMEDLAB Co, Seoul, Korea)을 이용하여 gel image를 얻은 후, 그 밀도를 정량화하였다. 각각의 유전자에 대한 상대적 밀도는 동일 cDNA로부터 얻은 house-keeping gene인 GAPDH의 밀도로 보정하여 구하였다.

4) NIS와 CD97에 대한 RT-PCR

동일한 방법으로 ATRA vehicle인 ethanol만 처리된 세포주와 ATRA 처리 후 24시간, 48시간, 72시간 후의 세포주에서

NIS와 CD97에 대하여 RT-PCR을 시행하였다. 조건과 사용한 primer는 Table 1에 예시하였다. 따로 TSH와 forskoin에 의한 ATRA의 synergistic effect를 확인하기 위하여 TSH free DMEM F12 (5H) media에서 배양한 FTC 133세포주에서 ATRA와 TSH (1 mU/ml), forskolin (10 nM/L)을 처리 후 72시간째에 NIS에 대한 RT-PCR을 시행하였다. FTC 133세포주에서 RARβ의 역할을 분석하기 위하여 RARβ 특이적 길항제인 LE135 (0.1µM/L)와 ATRA를 같이 처리한 후 72시간째에 NIS에 대하여 RT-PCR을 시행하였다. 또 FTC 133세포주에서 RXRγ의 역할을 분석하기 위해 특이적 ligand인 Hx630 (1µM/L), RXR 특이적 길항제인 PA452 (1µM/L)를 동시에 처리한 후 72시간째에 NIS에 대하여 RT-PCR을 시행하였다. 대조군으로 수술 전 갑상선 방사성 옥소 스캔에서 흡수가 있었던 갑상선유두암 환자의 갑상선전적출술 시 얻어진 종양주위의 정상 갑상선 조직을 수술장에서 채취 후 액체질소에 영하 70°C로 급속 냉동시킨 후 NIS와 CD97 발현의 양성대조군과 음성대조군으로 사용하였다. 환자에게는 조직사용에 대한 동의를 구하였다.

5) 통계분석

ATRA로 처리하기 전과 처리한 후의 mRNA 발현 밀도의 변화를 통계적으로 검증하기 위하여 PC용 soft ware인 SPSS 11.0 for WINDOWS를 이용하여 one way ANOVA test를 실시하였다. 발현밀도는 내적 대조군으로 사용한 GAPDH의 밀도에 상대적으로 보정하여 사용하였고 3회 실시한 실험의 mean값을 발현밀도로 간주하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Table 1. Primers used for PCR reaction

Molecule	Sequence	Product size
RARα	Forward: 5-TGGGTGGACTCTCCCGCCA-3 Reverse: 5-CCCACCTCCGGCGTCAGCGTG-3	512 bp
RARβ	Forward: 5-CACTGGCTTGACCATCGCAGACC-3 Reverse: 5-GAGAGGTGGCATTGATCCAGG-3	458 bp
RARγ	Forward: 5-GGCCTGGGCCAGCCTCACCTC-3 Reverse: 5-CAGCCCCAGATCCAGCTGCACG-3	480 bp
RXRα	Forward: 5-ATGGCTGCCCCCTCGCTGCAC-3 Reverse: 5-GGCGCAGATGTGCTTGGTG-3	386 bp
RXRβ	Forward: 5-ATGCCACCCCGCCACTGGGC-3 Reverse: 5-GCCTCCAGGATCCTGTCCACAGGC-3	528 bp
RXRγ	Forward: 5-CCCCTGGTCACACTGGCTCGACG-3 Reverse: 5-CACCAGAGACCCAGGGCTGGTG-3	228 bp
hNIS	Forward: 5-GCCCTCATCCTGAACCAAGTG-3 Reverse: 5-TGATCCGGGAGTGGTTCTG-3	232 bp
CD97	Forward: 5'-GAGCATCAGTGTGACAGCTC-3 Reverse: 5'-CTATGAGGTGCCGGACAGGT-3	331 bp

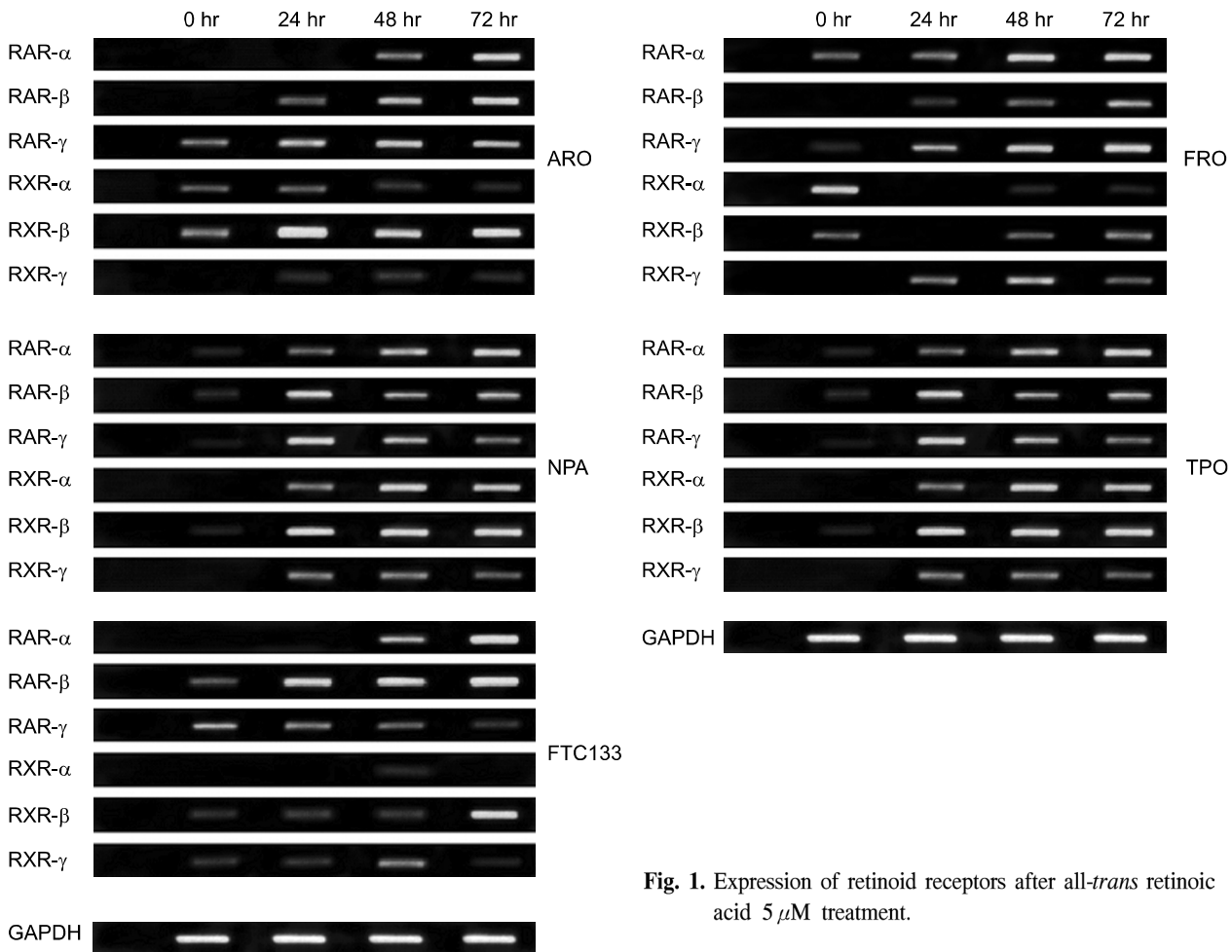


Fig. 1. Expression of retinoid receptors after all-*trans* retinoic acid 5 μ M treatment.

결 과

1) 갑상선암 세포주에서의 retinoids 수용체의 발현

ATRA로 처리 전의 갑상선암 세포주에서 retinoic 수용체의 발현을 검색하였을 때 NPA 세포주에서는 RAR β 가, FRO 세포주에서는 RAR α , RAR γ , RXR α , RXR β 가 ARO 세포주에서는 RAR γ , RXR α , RXR β 가 FTC133 세포주에서는 RAR β , RAR γ , RXR β , RXR γ 가 그리고 TPO 세포주에서는 RAR α 와 RXR β 가 발현되어 있었다(Fig. 1). ATRA를 처리한 후에는 대부분의 세포주에서 RAR과 RXR의 발현이 증가하는 양상을 보였으나 FRO 세포주에서 RXR α 와 RXR β , 그리고 ARO 세포주에서 RXR α 는 오히려 감소하였고 FTC133 세포주에서 RXR α 는 통계적으로 유의한 변화가 없었다($P=0.073$). TPO세포주에서는 모든 RAR과 RXR의 발현에 변화가 없었다(Fig. 2).

2) 갑상선암세포주에서의 CD97과 NIS mRNA의 발현

분화의 지표가 되는 CD97의 경우 ATRA로 처리하기 전

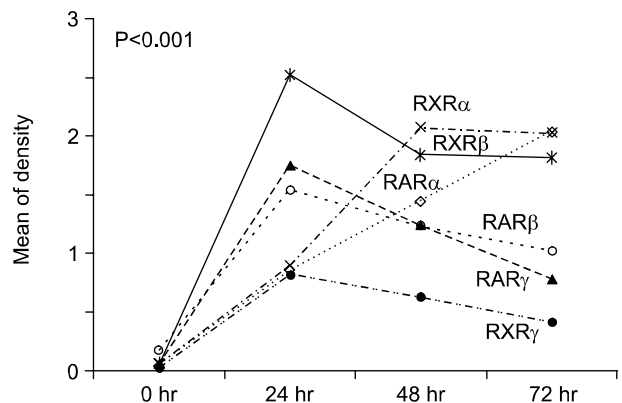


Fig. 2. Messenger RNA expression of RARs and RXRs in NPA cell line after all-*trans* retinoic acid treatment.

에는 모든 암 세포주에서 높은 밀도로 발현되어 있었다(Fig. 3A). ATRA로 처리한 후에는 처리 후 24시간부터 발현이 감소하기 시작하여 처리 전의 세포주와 비교할 때 시간의존적으로 발현이 유의하게 감소하였다($P<0.001$, Fig.

3B). 대조군으로 사용한 정상 갑상선조직과 비교하여 보면 24시간 후의 세포주에서의 CD97의 발현밀도와 정상조직의 발현 밀도 사이에는 통계적으로 차이가 없었으며 24시간이

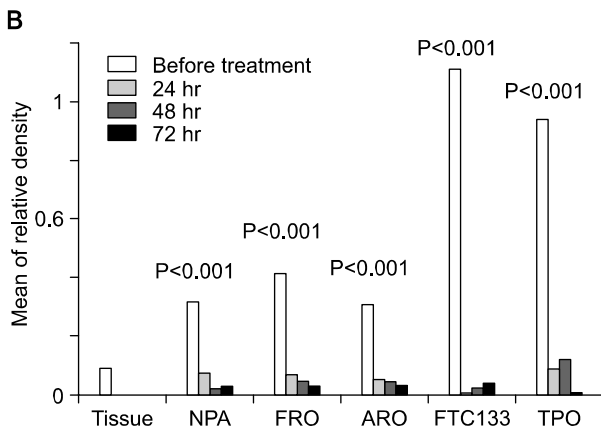
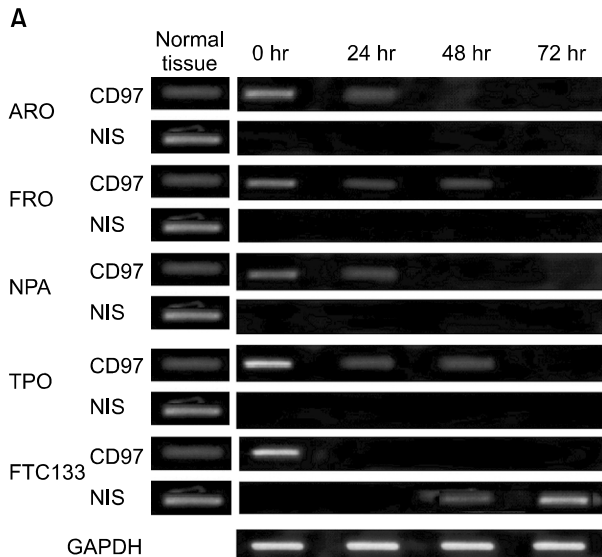


Fig. 3. Changes of NIS and CD97 expression after all-*trans* retinoic acid (ATRA) treatment. (A) CD97 decreased in each cell line. NIS increased by ATRA 72 hrs later only in FTC 133 cell line. (B) Decrease of CD97 expression. CD97 decreased to normal tissue level after 24 hrs.

지난 후에는 더 감소하거나 증가하는 경향을 보였지만 24 시간 후, 48시간 후, 그리고 72시간 후 각각의 CD97의 발현 밀도 사이에는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3B, $P > 0.05$). NIS의 경우에는 모든 세포주에서 ATRA 처리 전에는 발현되어 있지 않았고 처리 후에도 발현증가를 보이지 않았다. 그러나 FTC133 세포주에서는 처리 후 48시간부터 NIS 발현이 증가되었고 72시간째에는 정상 조직과 차이 없이 발현되었다(Fig. 3A).

FTC133 세포주에서 TSH에 의한 ATRA의 효과 증강 여부를 알아보기 위해 ATRA와 TSH (1 mU/ml), 그리고 ATRA와 TSH 유사 cAMP 촉진제인 forskolin (10 nM/ml)을 동시에 처리한 후 72시간 후에 NIS의 발현을 검색하여 보았다. ATRA만 처리한 경우, ATRA와 TSH를 처리한 경우, 그리고 ATRA와 forskolin을 처리한 경우 등 세가지 경우 모두에서 NIS의 발현증가를 관찰할 수 있었지만 ATRA 단독 처리한 것과 비교할 때 TSH와 forskolin을 같이 처리한 경우에서 NIS의 발현밀도가 증가하지는 않았다(Fig. 4, $P > 0.05$).

3) Retinoids에 의한 NIS의 발현 유도에서의 $\text{RAR}\beta$ 와 $\text{RXR}\gamma$ 의 특이적인 역할

ATRA 처리 후 NIS의 발현이 증가된 FTC133과 증가되지 않은 다른 세포주의 RAR 과 RXR 의 발현 양상을 정리하면 Table 2와 같다. RAR 의 경우는 3가지 아형 중 한 가지라도 각 세포주에서 발현이 되어 있었고 TPO 세포주에서는 $\text{RAR}\beta$ 가 약하게 발현된 것을 제외하고는 다른 RAR 은 발현되지 않았다. RXR 은 NPA 세포주에서는 세 가지 isoform이 모두 발현되어 있지 않았고 $\text{RXR}\gamma$ 의 경우는 FTC133 세포에서만 발현되어 있었다. 즉 FTC133 세포주에서는 RAR 과 RXR 중에서 RA처리 전에 $\text{RAR}\beta$ 와 $\text{RXR}\gamma$ 만이 특이적으로 발현되어 있었고 $\text{RAR}\beta$ 와 $\text{RXR}\gamma$ 의 상대적인 발현 밀도를 다른 세포주들과 비교해 볼 때 통계적으로 유의하게 발현 밀도가 높았다($P = 0.015$).

$\text{RAR}\beta$ 의 특이적인 반응을 확인하기 위하여 ATRA와 $\text{RAR}\beta$ 에 특이적인 길항체인 LE135를 동시에 처리한 후 NIS의 발현을 72시간 후에 검색하였을 때 ATRA에 의한 NIS의 발현증가가 소실되었다. RXR 수용체 모두에 작용하는 합성 retinoid Hx630을 처리하였을 때에도 72시간 후 NIS

Table 2. Retinoid receptor status before all-*trans* retinoic acid treatment

CELLs	$\text{RAR}\alpha$	$\text{RAR}\beta$	$\text{RAR}\gamma$	$\text{RXR}\alpha$	$\text{RXR}\beta$	$\text{RXR}\gamma$
NPA	Positive	Weak positive	Negative	Negative	Negative	Negative
FRO	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative
ARO	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative
FTC133	Negative	Positive	Positive	Negative	Positive	Positive
TPO	Weak positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative

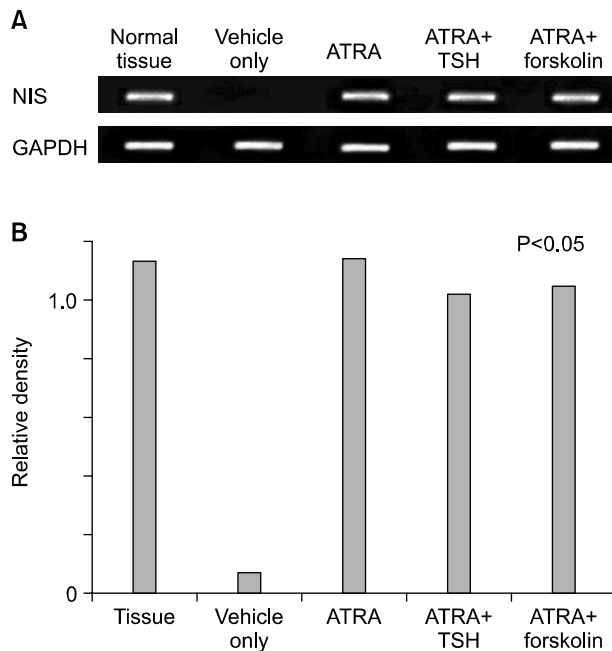


Fig. 4. Costimulatory effect of TSH and forskolin to NIS induction by ATRA. (A) TSH and forskolin did not intensify NIS mRNA induction in 72 hrs. (B) ATRA and TSH, forskolin did not showed statistic difference of NIS mRNA density. Abbreviation: ATRA = all-*trans* retinoic acid; TSH = thyroid stimulating hormone; NIS = sodium-iodine symporter.

의 증가가 일어났으며 RXR 길항체인 PA452를 동시에 처리하면 마찬가지로 NIS의 증가는 소실되었다(Fig. 5).

고 찰

갑상선암은 일반적으로 예후가 좋은 암으로 알려져 있지만 20~30%의 분화암과 대부분의 미분화갑상선암은 기존의 방사선 동위원소 치료에 반응을 하지 않으며 이는 갑상선암의 치료가 실패하는 중요한 원인 중의 하나이다. 갑상선암이 방사선 동위원소 치료에 반응하지 않는 가장 중요한 이유 중의 하나는 암세포의 탈분화에 의한 Sodium-iodine symporter (NIS) 단백질의 소실이라고 생각된다. 실제로 갑상선암 세포주와 유두암, 여포암, 미분화 갑상선암 조직 모두에서 NIS의 mRNA와 단백질이 모두 감소되어 있는 것을 관찰할 수 있으며 NIS가 감소되어 있는 세포주에서 방사성 옥소의 흡수가 감소하고(19) NIS의 발현 유무와 재발암에서의 치료반응도 관계가 있다.(5) 그러므로 이론적으로는 방사성 옥소에 반응하지 않는 갑상선암세포에 NIS를 발현시키면 종양에서 방사성 옥소의 흡수가 증가하여 치료에 반응할 것이라 예측할 수 있다.

Retinoids는 vitamin A 또는 retinol의 천연 유도체로 인체

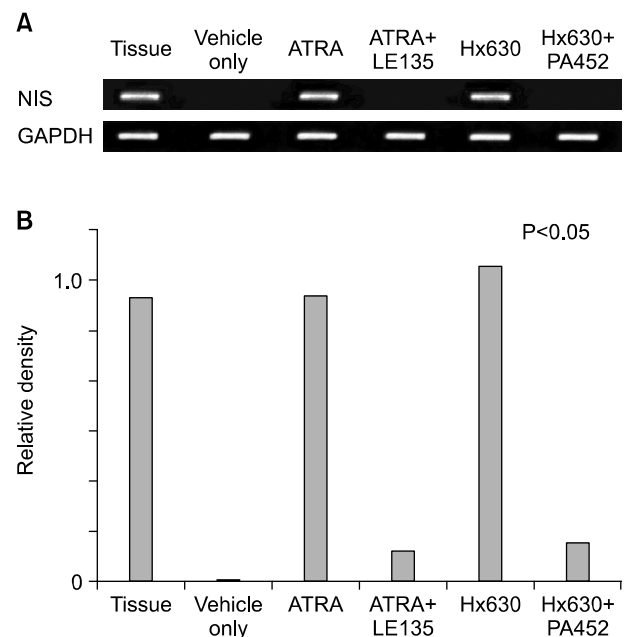


Fig. 5. Receptor specific inhibition of NIS induction by ATRA (A) RAR β specific antagonist LE135 blocked ATRA effect to FTC133 cell line in 72 hrs. RXR specific agonist Hx630 and RXR specific antagonist PA452 also showed similar effect. (B) This blockage effect was statistically different ($P < 0.05$). Abbreviation: ATRA = all-*trans* retinoic acid; TSH = thyroid stimulating hormone; NIS = sodium-iodine symporter.

내에서 많은 생리적 작용에 관여하지만 특히 정상조직과 종양조직에서 세포의 성장과 분화 그리고 세포고사를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(6) 이러한 성질을 이용하여 급성 전골수성 백혈병의 치료제로 사용되고 있으며 그 밖에 피부암, 폐암, 난소암 등에서 화학적 예방에 이용하기 위한 임상연구가 진행 중이고 갑상선 암에서도 RA를 통해 재분화를 얻어내려는 시도가 있어 왔다.(20,21) 이러한 RA의 작용은 nuclear transcription factor인 RAR과 RXR에 의해 매개되므로 유방암의 anti-estrogen요법과 마찬가지로 RA에 의한 분화유도요법에서도 RAR과 RXR의 유무는 중요한 예측인자가 될 것이라고 생각된다. 본 연구에서 각각의 세포주들은 세포주마다 서로 다른 수용체의 발현 양상을 보였는데 Schmutzler등은 4종류의 갑상선암 세포주와 10개의 갑상선암 조직에서 선택적인 RAR과 RXR의 소실을 보고하였고(17) Tang등도 42명의 갑상선 유두암 환자에서 얻은 종양조직에서 RAR α , RAR β 와 RXR α , RXR β 의 소실을 보고하였다.(22) 그러므로 동일한 RA를 처리하였을 때에도 RA에 대하여 서로 다른 반응을 보일 것이라고 생각할 수 있다. 실제로 Simon등은 RA를 투여한 환자에서 RA에 대한 반응도가 다르다고 보고하였으므로(17) RA를 투여하려 할 때 반응을 예측할 수 있는 예측인자

가 중요함을 알 수 있다. 암세포에서 RAR이나 RXR의 발현이 소실되거나 조절되는 기전은 아직 불명확하다. 발현이 소실되는 기전으로는 점 돌연변이,(23) 또는 촉진 유전자의 메틸화에 의한 RAR 유전자의 발현감소(24) 등이 거론되고 있지만 서로 다른 기전이 동시에 작용한다고 생각된다. 특히 RAR β 는 두경부 암이나 비소세포성 폐암, 유방암, 식도암 등에서 소실이 보고되었고(25) retinoid에 반응하는 폐암 세포주에서 RAR β 를 과발현 시켰을 때 세포의 성장이 억제되었으며(26) 유전자조작 생쥐에서 RAR β 에 대한 anti-sense를 발현시켰을 때 폐암이 증식하는 것이 보고되어(27) 종양억제 유전자로서의 가능성이 보고되고 있다. 본 연구에서는 다섯개의 세포주 중에 FTC133을 제외한 네 개의 세포주에서 RAR β 의 발현이 소실되거나 약한 발현만을 보였고 Haugen등도 4개의 갑상선암 세포주에서 공통적인 RAR β 의 소실을 보고하였다(28). Tang등도 42명의 갑상선유두암 환자 중 15명의 환자에서 RAR β 의 소실을 보고하여(22) 갑상선암의 발암과정에서도 RAR β 가 중요한 역할을 하리라는 점을 시사한다.

본 연구에서는 all *trans* retinoic acid (ATRA)로 처리한 세포주에서 RAR과 RXR의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었는데 RAR α 나 RAR β 의 경우 gene promotor에 RARE를 가지고 있으므로(29,30) RA 자체가 이 promotor에 작용했을 것이라고 생각된다. 사용된 retinoid인 ATRA는 RAR에 선택적으로 작용하는 화합물로 RAR의 발현이 없거나 아주 약했던 TPO 세포주에서는 RAR과 RXR의 발현이 증가하지 않았으므로 이러한 RA에 의한 RAR과 RXR의 조절 역시 retinoid 수용체를 통하여 이루어지는 것으로 생각할 수 있다.

ATRA로 처리한 세포주에서 관찰할 수 있는 또 하나의 중요한 현상은 CD97 발현의 감소이다. CD97은 seven span transmembrane family의 일원으로 EGF like domain인 CD97 α 와 seven span transmembrane 수용체인 CD97 β 로 구성되어 있는 세포 표면물질이다.(31,32) CD97은 주로 정상 백혈구 세포막에 발현되나 악성상피세포에서 비정상적으로 발현되어 세포의 이동과 침윤에 중요한 역할을 하게 된다.(33) 또 CD97은 갑상선암에서 분화도의 척도가 될 수 있으므로(10,11) CD97의 발현이 감소한 다섯 세포주에서는 재분화가 일어났다고 생각할 수 있다. RA가 CD97의 발현을 감소시키는 기전은 불명확하지만 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 통한 PKC 활성화가 CD97의 발현을 감소시키므로(10) PLC-PKC 경로가 CD97의 조절에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. NIS의 발현을 조절하는 가장 중요한 인자는 TSH로 일반적으로 TSH가 NIS의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으나(3) 본 연구에서는 TSH나 TSH 유사 작용을 하는 forskolin 모두 ATRA와 함께 사용했을 때 상보적인 NIS의 발현증가를 나타내지 않았다. 이는 Schmutzler등이 보고한 바와 같이 RA가 TSH에 의한 NIS 발현증가를 억제하기 때문이라고 생각되어진다.(12)

Schmutzler등이 여포성 갑상선암 세포주에서에서 RA에 의한 NIS의 발현 유도를 보고한 후(12) 임상적인 pilot study가 시행되어 왔지만 결과는 만족스럽지 못하였다. Simon등은 50명의 재발한 환자에서 13cis-RA 1.5 mg/kg를 투여하여 21명의 환자에서 방사성옥소의 섭취가 증가하였고 19명에서 치료에 반응하였다고 보고하였으나 Grünwald등은 12명의 환자에서 단 2명의 환자에서만 의미있는 섭취증가가 일어났다고 보고하였다.(17,34) 앞서 언급한 바와 같이 RAR 또는 RXR의 발현 유무는 RA에 대한 반응을 예측하는데 가장 중요한 지표가 될 것이라고 생각할 수 있다. 그러나 RAR 또는 RXR의 발현 유무 또는 특이한 아형이 발현됨에 따라 반응이 달라지는지에 대한 연구는 거의 없다. 본 연구에 사용된 다섯 종류의 세포주 중 유일하게 ATRA에 반응을 보인 세포주인 FTC 133 세포에서 RAR과 RXR 발현상태를 살펴보면 RA처리 전에는 RAR β , RAR γ , RXR β 와 RXR γ 가 발현되어 있었고 다른 세포주에서는 RXR γ 의 발현은 관찰되지 않았으며 RAR β 는 다른 세포주보다 유의하게 발현이 증가되어 있었다. RAR β 의 발현이 증가되어 있었지만 ATRA에 대한 반응이 없었던 NPA세포주에서는 RXR γ 는 발현하지 않았다. 즉 ATRA에 의한 갑상선암 세포주에서의 NIS의 발현 유도는 RAR β 와 RXR γ 가 모두 발현되어 있는 세포주에서만 일어났다. 또 RAR β 에 특이적인 길항제 LE135로 RAR β 의 기능을 억제하였을 때 RAR α 와 RAR β 가 모두 발현되어 있던 FTC 133 세포주에서 ATRA에 의한 NIS의 발현이 억제 되었으므로 RA-RAR- RXR에 의한 NIS의 발현 조절에서 RAR β 가 중요한 역할을 할 것이라고 생각할 수 있다. RXR의 아형 중에서는 RXR γ 만이 발현되어 있는 FTC133 세포주에서 RXR에 작용하는 ligand인 Hx630으로 처리하였을 때도 마찬가지로 NIS의 발현이 증가되었고 RXR에 특이적으로 작용을 억제하는 길항제인 PA452를 같이 처리하면 NIS의 발현증가가 소실되었다. 그러므로 RXR γ 또한 RA에 의한 NIS 조절기전에 작용할 것이라고 생각할 수 있다. 비록 이러한 결과가 세포주 하나에서만 나타났으므로 단정적으로 이야기하기는 어렵지만 RA에 의한 신호 전달기전에서 RAR-RXR heterodimer를 형성할 때 특이적으로 RAR β -RXR γ 복합체가 NIS 발현에 작용한다고 생각할 수 있다. 최근 Haugen등은 RAR β 와 RXR γ 모두 발현되어 있는 갑상선암 세포주에서만 RA에 의한 세포억제 및 세포고사가 일어난다고 보고하였고(28) Si등과 Toulouse등은 retinoid에 저항성을 가진 폐암세포주에서 RAR β 를 과발현시켰을 경우 retinoid에 의한 세포의 성장이 억제되며 RAR α 를 transfection 시켰을 경우에는 이러한 성장억제를 관찰할 수 없었다고 보고하였다.(35,36) 단 RXR γ 의 경우는 일부 세포주에서 발현이 소실되어 있는 것과는 달리 환자의 종양 조직에서 검색하여 보면 대부분의 종양에서 발현이 소실되어 있지 않으므로(22) 임상적인 상황에서는 RAR β 의 역할이 더욱 중요할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 RAR β 와 RXR γ 가 ATRA에 의한 NIS의 발현조절에 중요한 역할을 하며 RA를 이용한 NIS 유도 요법, 또는 재분화 유도 요법이 시도될 경우 RAR과 RXR 아형의 발현양상은 치료효과의 예측인자로서 중요한 연구대상이 될 것이다.

결 론

갑상선 세포주에서 RAR과 RXR은 다양한 발현 양상을 보였으나 ATRA로 처리한 후 RAR과 RXR의 mRNA 발현이 증가되는 경향을 보였으며 처리 후 모든 갑상선 세포주에서 분화 표지자인 CD97의 발현은 감소하였다. 그러나 NIS의 발현은 FTC133 세포주에서만 ATRA 처리 후 증가하였으며 이러한 증가는 TSH나 forskolin에 의하여 상보적으로 증가하지 않았다. FTC133 세포주에서는 다른 세포주와 달리 RAR β 와 RXR γ 가 특이적으로 발현되어 있었으며 이러한 발현증가는 RAR β 와 RXR γ 에 선택적인 억제제에 의해 소실되었다. ATRA에 의한 갑상선암 세포주에서의 NIS의 발현조절은 retinoid 수용체의 발현양상에 따라 다르게 조절되며 RAR β 와 RXR γ 의 발현 유무와 관련이 있을 수 있다.

REFERENCES

- 1) Paire A, Bernier Valentine F, Selmi Ruby S, Rousset B. Characterization of the rat thyroid iodine transporter using antipeptide antibodies. *J Biol Chem* 1997;272:18245-9.
- 2) Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and Characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
- 3) Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid stimulating hormone of sodiumiodine symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 1997;138:2227-32.
- 4) Lazar V, Vidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Fletti S, et al. Expression of NIS in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3228-34.
- 5) Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Hay ID, Moris JC. Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5627-32.
- 6) Zusi FC, Lorenzi MV, Vivat-Hannah V. Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention. *Drug Discovery Today* 2002;23(7):1165-73.
- 7) Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* 1996;10:1031-6.
- 8) Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Kohrle J. Retinoids stimulates type I 5' deiodinase activity in follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:791-8.
- 9) Bassi V, Vitale M, Fellicciello A, De Riu SW, Rossi G, Fenzi G. Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule 1 hyperexpression in human thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1129-35.
- 10) Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, Kraus G, Schmutzler C, Aust G, et al. Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabolism* 1999;84(3):1104-9.
- 11) Aust G, Eichler W, Laue S, Lehmann I, Heldin NE, Lotz O, et al. CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:1798-806.
- 12) Schmutzler C, Winzer R, Meissner J, Kohrle J. Retinoic acid increases NIS mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppress expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:832-8.
- 13) Mangeldorf DJ, Evans RE. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;86:841-50.
- 14) Misi S, Shomburg L, Yen PM, Chin WW. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 1998;139:2493-500.
- 15) Schmutzler C, Schmidt TL, Glaser F, Loos U, Kohle J. The promotor of the human sodium/iodine symporter gene respond to retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2002;189:145-55.
- 16) Schmutzler C, Brtko J, Winzer R, Jakobs TC, Meissner J, Simon D, et al. Functional retinoids and thyroid hormone receptors in thyroid carcinoma cell lines and tissues. *Int J Cancer* 1998;76:368-76.
- 17) Simon D, Korber C, Krausch M, Segering J, Groth P, Gorges R, et al. Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29(6):775-82.
- 18) Xu Q, Konta T, Furusu A, Nakayama K, Lucio-Cazana J, Fine LG, et al. Transcriptional induction of Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by retinoids. *J Biol Chem* 2002;277(44):41693-700.
- 19) Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, et al. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(2):339-45.
- 20) Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and Chemoprevention. *Critic Revin Oncol Hematol* 2002;41:41-55.
- 21) Schmutzler C, Kohle J. Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid* 2000;10(5):393-406.
- 22) Tang W, Nakamura Y, Zuo H, Yasuoka H, Yang Q, Wang X, et al. Differentiation, proliferation and retinoid receptor status of papillary carcinoma of the thyroid. *Pathology International* 2003;53:204-13.
- 23) Lin RJ, Egan DA, Evans RM. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet* 1999;15:179-84.
- 24) Cote S, Momparler RL. Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1997;8:56-61.
- 25) Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer

- therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7305-15.
- 26) Houle B, Rochette-Egly C, Bradley WE. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(3):985-9.
- 27) Berard J, Laboune F, Mukuna M, Masse S, Kothary R, Bradley WE. Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB J* 1996;10(9):1091-7.
- 28) Haugen BR, Larson LL, Pugazhenth U, Hays WR, Kloppe JP, Kramer CA, et al. Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(1):272-80.
- 29) Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(22):10138-42.
- 30) Sucov HM, Murakami KK, Evans RM. Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;(14): 5392-6.
- 31) Hamann J, Eichler W, Hamann D, Kerstens HM, Poddighe PJ, Hoovers JM, et al. Expression cloning and chromosomal mapping of the leukocyte activation antigen CD97, a new seven-span transmembrane molecule of the secretion receptor superfamily with an unusual extracellular domain. *J Immunol* 1995; 155:1942-50.
- 32) Gray JX, Haino M, Roth MJ, Maguire JE, Jensen PN, Yarme A, et al. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J Immunol* 1996;157:5438-47.
- 33) Aust G, Steinert M, Schutz A, Boltze C, Wahlbuhl M, Hamann J, et al. CD97, but not its closely related EGF-TM7 family member EMR2, is expressed on gastric, pancreatic, and esophageal carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2002;118:699-707.
- 34) Grunwald F, Menzel C, Bender H, Palmedo H, Otte R, Fimmers R, et al. Redifferentiation therapy-induced radioiodine uptake in thyroid cancer. *J Nucl Med* 1998;39(11):1903-6.
- 35) Si SP, Lee X, Tsou HC, Buchsbaum R, Tibaduiza E, Peacocke M. RAR beta 2-mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp Cell Res* 1996;223(1):102-11.
- 36) Toulouse A, Loubeau M, Morin J, Pappas JJ, Wu J, Bradley WE. RARbeta involvement in enhancement of lung tumor cell immunogenicity revealed by array analysis. *FASEB J* 2000; 14(9):1224-32.
-