

SHORT COMMUNICATIONS

Stimulation of thyroidal radioiodine uptake by actinomycin and fluorouracil*

(Received 23 January 1964; accepted 24 March 1964)

METABOLIC control in mammalian cells is generally described in terms of activation and induction. In bacterial physiology on the other hand, it is now established that the mechanisms of control of the synthesis of enzymes are negative, in the sense that they operate by inhibition rather than activation of protein synthesis.^{1, 2} Even the induction of new enzyme systems may be considered as a release of the repression of these systems. The observations reported in this communication suggest that this type of regulation may also operate in the functioning of some well differentiated mammalian cells.

Homogeneous groups of Swiss Albino mice (weight 15 g) were fed for seven days with a Remington iodine-free diet. Thereafter, each mouse received for three days the standard iodine-rich laboratory diet and 7.5 μ g of triiodothyronine per mouse per day. The thyroidal uptake of radioiodine was measured by the ¹³¹I activity of the tracheal block 4 hr after administration of 4 μ c of ¹³¹I. ¹³¹I iodide and the drugs were administered by intraperitoneal injection. Actinomycin D, fluorouracil and thyrotropic hormone (Primothyron Schering) were graciously supplied by Merck Sharp & Dohme (Rahway), Roche S.A. (Basel) and Rodolphe Coles S.A. (Brussels).

Actinomycin D (25 μ g), fluorouracil (10 mg) and thyrotropic hormone (TSH: 200 mU markedly stimulated the thyroidal uptake of radioiodide when administered 12 hr before ¹³¹I administration (Table 1). When injected 2 hr before ¹³¹I, thyrotropic hormone stimulated the thyroidal uptake markedly, but the effect of fluorouracil was lowered and the effect of actinomycin was not yet apparent. Puromycin depressed the thyroidal uptake of radioiodine.

Actinomycin effectively blocks the synthesis of RNA by inhibiting the RNA polymerase reaction.³⁻⁷ Fluorouracil is capable of causing, in *E. Coli*, the production of inactive enzymes without interfering with the rate of protein synthesis.⁸⁻¹⁰ Presumably it is incorporated into RNA, with the consequence that abnormal enzymes are formed.^{1, 2} The one common feature of these drugs is that both interfere with the formation of accurate RNA. The stimulation of a function by an inhibitor can only be interpreted through the reversal of a previously existing inhibition. Under the conditions of our experiments, the thyroid function was therefore repressed. The release of this repression by actinomycin and fluorouracil indicates either that the repressing factor is a RNA or that its formation depends on new mRNA synthesis.

Puromycin inhibits protein synthesis, presumably by releasing the soluble RNA binding the polypeptide chain to the ribosome.¹¹ The administration of this drug does not stimulate the uptake of radioiodine by the thyroid gland. The interference with RNA synthesis, but not the interference with protein synthesis thus stimulates the thyroid uptake of ¹³¹I. The stimulation of the thyroidal ¹³¹I uptake by actinomycin and fluorouracil therefore suggests that the repressing (m)RNA is much more readily inactivated than the mRNAs of the enzymes responsible for this uptake.

A perfusion of fluorouracil in the artery supplying one lobe of the thyroid of a dog, enhanced the iodide extraction efficiency¹² of this lobe from 0.25 ± 0.05 to 0.56 ± 0.04 after 1 hr, while this parameter remained at the same level: 0.22 for the contralateral lobe. This preliminary experiment suggests that the enhancement of the thyroid ¹³¹I uptake by actinomycin and fluorouracil is not caused by a stimulation at the pituitary or hypothalamic level.

Halmi *et al.*¹³ have postulated the existence in the thyroid cell of an iodinated compound as inhibitor of the iodide uptake. Iodinated peptides which inhibit the organification of iodide have been isolated from thyroid extracts by Lissitzky *et al.*¹⁴ On the other hand, propylthiouracil, an inhibitor of

* Supported by contract Euratom—U.L.B.—PISA (0.26-63-4 B.I.A.C.) and by a grant of the Fonds de la Recherche Scientifique Fondamentale Collective (F.R.S.F.C. 3.2.22).

TABLE 1. EFFECT OF ACTINOMYCIN, FLUOROURACIL, PUROMYCIN AND THYROTROPIC HORMONE ON THE THYROIDAL UPTAKE OF RADIOIODINE

Treatment	Dose ($\mu\text{g}/\text{mouse}$)	Time lapse between drug and ^{131}I in- jection (hr)	Thyroidal uptake (cpm)		Sex
			Treated animals	Controls	
TSH (200 mU)	—	0	18·300 (3)	18·900 $\pm$ 200 (8)	O_2
TSH (200 mU)	—	2	65·900 $\pm$ 12·500 (6)	20·100 $\pm$ 1·800 (5)	O_2
Actinomycin D	25	2	17·000 $\pm$ 3·100 (4)	18·900 $\pm$ 2·900 (6)	O_2
	25	2	13·600 (3)	20·100 $\pm$ 1·800 (5)	O_2
Fluorouracil	10·000	2	23·800 $\pm$ 3·000 (4)	18·900 $\pm$ 2·900 (6)	O_2
	10·000	2	97·500 $\pm$ 28·600 (5)	20·100 $\pm$ 1·800 (5)	O_2
TSH (200 mU)	—	12	92·600 $\pm$ 17·400 (4)	18·900 $\pm$ 200 (8)	O_2
	—	12	56·700 (3)	13·200 $\pm$ 800 (4)	O_2
	—	12	51·300 $\pm$ 5·500 (5)	13·000 $\pm$ 1·900 (6)	O_2
	—	12	48·700 $\pm$ 8·600 (5)	11·300 $\pm$ 1·600 (6)	O_2
	—	12	163·800 $\pm$ 36·400 (8)	18·900 $\pm$ 2·900 (6)	O_2
Actinomycin D	25	12	47·500 $\pm$ 900 (4)	13·200 $\pm$ 800 (4)	O_2
	25	12	41·900 $\pm$ 6·200 (5)	13·000 $\pm$ 1·900 (6)	O_2
	25	12	41·600 (3)	11·300 $\pm$ 1·600 (7)	O_2
	25	12	95·800 (3)	18·900 $\pm$ 2·900 (6)	O_2
	25	12	163·900 (3)	20·100 $\pm$ 1·800 (5)	O_2
Fluorouracil	10·000	12	42·900 $\pm$ 8·500 (4)	13·000 $\pm$ 1·900 (6)	O_2
	10·000	12	23·300 $\pm$ 4·900 (6)	11·300 $\pm$ 1·600 (7)	O_2
	10·000	12	39·000 (3)	18·900 $\pm$ 2·900 (6)	O_2
	10·000	12	98·600 $\pm$ 15·200 (7)	20·100 $\pm$ 1·800 (5)	O_2
Puromycin	2·000	12	7·600 $\pm$ 500 (5)	11·300 $\pm$ 1·600 (7)	O_2
TSH (200 mU)	—	24	63·700 (2)	18·900 $\pm$ 200 (8)	O_2

() Number of animals

Results are expressed as means and S.D.M.

iodide organification in thyroid, stimulates several aspects of thyroid cell metabolism *in vitro*, when it is used at a concentration well below the level inhibiting iodide organification.^{15, 16} Our findings could perhaps be explained by speculating that the thyroid nucleus is synthesizing with a relatively fast turnover mRNA's coding for iodinated intracellular peptidic inhibitors.

Acknowledgement—The authors wish to thank Professor H. Chantrenne for his interest in these studies and Dr. M. Bonnyns for his advice on the handling of mice.

Center of Nuclear Medicine,
School of Medicine,
115 Boulevard de Waterloo,
Brussels 1,
Belgium

J. E. DUMONT
F. R. RODESCH
P. ROCMANS

REFERENCES

1. H. CHANTRENNE. *The Biosynthesis of Proteins*, Pergamon Press (1961).
2. F. JACOB and J. MONOD. *J. mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
3. J. M. KIRK, *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 167 (1960).
4. J. HURWITZ, J. J. FURTH, M. MALAMY and M. ALEXANDER, *Proc. U.S. nat. Acad. Sci.* **48**, 1222 (1962).
5. I. H. GOLDBERG and M. RABINOWITZ, *Science* **136**, 315 (1962).
6. E. KAHAN, F. M. KAHAN and J. HURWITZ, *J. biol. Chem.* **238**, 2491 (1963).
7. G. HARTMANN, V. COY, G. KNESE and F. ZEITSCH, *Physiol. Chemie* **330**, 227 (1963).
8. N. K. CHAUDHURY, B. J. MONTAG and C. HEIDELBERGER, *Cancer Res.* **18**, 318 (1958).
9. J. HOROWITZ, J. J. SAUKKONEN and E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 222 (1958).
10. S. NAONO and F. GROS, *C.R. Soc. sci.* **240**, 3527 (1960).

11. D. W. ALLEN and P. C. ZAMECNIK, *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 865 (1962).
12. D. S. RIGGS, *Pharmacol. Rev.* **4**, 284 (1952).
13. N. S. HALMI, *Vitam. and Horm.* **19**, 133 (1961).
14. S. LESITSKY, G. GREGOIRE, J. GREGOIRE and N. LIMOZIN, *Gen. and Comp. Endoc.* **1**, 519 (1961).
15. P. F. MULVEY and D. W. SLINGERLAND, *Endocrinol.* **70**, 7 (1962).
16. P. F. MULVEY, J. J. KELLEHER and D. W. SLINGERLAND, *Endocrinol.* **70**, 481 (1962).

Biochemical Pharmacology, 1964, Vol. 13, p. 937. Pergamon Press Ltd., Printed in Great Britain.

Die Beeinflussung der Acetylcholinfreisetzung an der neuromuskularen Synapse durch Reserpin

(Received 23 January 1964; accepted 26 February 1964)

IM ZUSAMMENHANG mit unseren Untersuchungen über die Wechselwirkungen zwischen adrenergen und cholinergen Substanzen wurden wir auf die cholinergen Symptome aufmerksam, die sich nach Reserpin beobachten lassen. Um festzustellen, ob Reserpin einen direkten Einfluss auf die Acetylcholinfreisetzung besitzt, bestimmten wir am Rattenwerchfell-Phrenicus-Präparat nach BÜLBRING die Freisetzung von Acetylcholin (Ach) nach Vorbehandlung der Tiere mit 5 mg/kg Reserpin 4 Stunden vor der Entnahme des Zwerchfells. Am Zwerchfell der Kontrollen in Krebs-Lösung bei indirekter supramaximaler Reizung, einer Reizfrequenz von 20 Imp./sec und einer Impulsbreite von 0,1 msec wurden $1,3 \cdot 10^{-12}$ g Ach/Impuls je Hemidiaphragma freigesetzt. An den Zwerchfellen der Tiere, die 4 Stunden vor der Präparation 5 mg/kg Reserpin erhalten hatten, war unter identischen Versuchsbedingungen die Ach-Freisetzung erheblich erhöht. Sie betrug im Mittel $2,4 \cdot 10^{-11}$ g Ach/Impuls und Hemidiaphragma. Das ist eine Steigerung um das 18-fache, der Unterschied ist statistisch gesichert ($P < 0,01$).

In einer anderen Versuchsreihe prüften wir die Beeinflussung der Toxizität von Ach durch Reserpin an weissen Mäusen bei i.-p.-Applikation beider Substanzen. Während die Kontrollen eine LD_{50} für Ach von 237 mg/kg ergaben, zeigte sich nach Reserpinvorbehandlung eine Steigerung der Ach-Toxizität mit einer charakteristischen Verlaufskurve und einem Maximum der potenzierenden Wirkung des Reserpins 18 Stunden nach der Applikation. Die LD_{50} für Ach 18 Stunden nach 5 mg/kg Reserpin betrug nur 92 mg/kg. Auch diese Differenz ist signifikant. (Bereits eine Senkung der Dosis für die LD_{50} von Ach auf 200 mg/kg ist in der Auswertung nach Litchfield und Wilcoxon mit $P < 0,05$ statistisch zu sichern.)

In Auswertung dieser zweiten Versuchsreihe prüften wir nunmehr die Ach-Freisetzung am Ratten zwerchfell ebenfalls 18 Stunden nach der Reserpingabe, um festzustellen, ob zum Zeitpunkt der stärksten Potenzierung der ACH-Toxizität durch Reserpin auch die höchste Freisetzung von Ach zu beobachten ist. Es zeigte sich in der Tat, dass zu dieser Zeit die Menge freigesetzten Ach je Impuls und Hemidiaphragma am grössten ist, sie beträgt $6,8 \cdot 10^{-11}$ g ($P < 0,001$). Das ist rund 52 mal mehr als bei den unvorbehandelten Kontrollen und rund 3 mal mehr als bei den Tieren, die 4 Stunden nach Reserpin getötet wurden. Inwieweit die Steigerung der Ach-Toxizität durch Reserpin über eine gleichzeitige verstärkte Freisetzung endogenen Ach zustande kommt, oder inwieweit diese potenzierende Wirkung durch einen anderen Wirkungsmechanismus mit gleichem zeitlichen Verlauf hervorgerufen wird, bleibt ebenso noch zu klären, wie die Frage, ob die vermehrte Ach-Freisetzung auf das Reserpin direkt oder auf seine Wirkung über adrenerge Systeme zurückzuführen ist.

Pharmakologisches Institut,
Medizinische Akademie,
Magdeburg

HORST LIEBMANN
HANSJÜRGEN MATTHIES

LITERATUR

1. C. L. MALHOTRA and P. K. DAS, *Brit. J. Pharmacol.* **18**, 190-93 (1962).
2. C. L. MALHOTRA and K. PRASAD, *Brit. J. Pharmacol.* **21**, 355-60 (1963).
3. D. W. STRAUGHAN, *Brit. J. Pharmacol.* **15**, 417-24 (1960).