

인체 간암세포주(Hep 3B)의 증식에 미치는 amiloride의 억제효과

신체희, 박기룡, 최병주, 서수홍, 김성훈, 박무인,
박선자, 정근옥*, 박건영*, 구자영

고신대학교 의학부 내과학 교실, 부산대학교 식품영양학과*

The Effect of amiloride on the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells

Chae Hee Shin, Ki Ryong Park, Byung Ju Choi, Soo Hong Seo, Kim Sung Hoon,
Moo in Park, Seun ja Park, Kun Ok Chung, PhD.*, Kun young Park, PhD.*, Ja Young Koo

Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

*Department of Food & Nutrition, Busan National University, Busan, Korea

Abstract

Background/Objective Cytoplasmic alkalization induced by activation of the Na⁺/H⁺-antiporter which is stimulated upon the addition of growth-promoting agents, such as insulin, epidermal growth factor, phorbol ester, plays an essential role in the initiation on cell proliferation. In the present study the effects of amiloride, a specific and reversible inhibitor of Na⁺/H⁺-exchanger, on the growth of human hepatocellular carcinoma cell line, Hep 3B were examined and the effects of 5-fluorouracil (5-FU) combined with amiloride were also studied to determine the role of amiloride in the treatment of hepatocellular carcinoma. Cell cycle analysis was done to examine the mechanisms for the inhibitory effects of amiloride. **Methods** The growth of Hep 3B cells were examined by counting cell number on two and four days treatment with 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M amiloride, and 0.1 μ g/ml, 0.3 μ g/ml 5-FU, after plating Hep 3B cells into 35-mm² plastic dishes at a density of 20×10^4 cells/dish. The reversibility of the effects of amiloride was examined on two days to eight days treatment with 20 μ M amiloride after seeding 4×10^4 cells/dish. Cell cycle analysis was done on the cells after four days treatment with 20 μ M amiloride. **Results** Amiloride significantly inhibited the growth of Hep 3B in a dose-dependent fashion ($p < 0.05$). The inhibitory effect of amiloride on the growth of Hep 3B cells was firstly shown at the concentration of 1 μ M, which is not so higher than the concentration of 0.1-0.2 μ M attainable by administration of usual dose of amiloride (5~10mg). Forty-eight percent inhibition of growth was found at an amiloride concentration of 20 μ M and 92% inhibition of growth was found at an amiloride concentration of 160 μ M after 4 days treatment. The removal of amiloride by a media change after 48 hours treatment lead to significantly more growth than amiloride treated group ($p < 0.05$). Amiloride combined with 5-FU significantly inhibited the growth of Hep 3B in a dose-dependent fashion compared to an amiloride or a 5-FU alone ($p < 0.05$), which suggested additive effect of the two drugs. After four days treatment with 20 μ M amiloride, the fraction of cells in G0-G1 phase, S phase and G2-M phase was 57.9%, 20.8%, 21.3%, respectively in the amiloride group (20 μ M) and 38.9%, 20.8%, 40.3% in the control group, showing much higher G1 fraction in amiloride group compared to control group. **Conclusions** Amiloride significantly inhibited the growth of Hep 3B in a dose-dependent fashion, which may be reversible. The reversibility of growth inhibition suggests that amiloride is not a non-specific cytotoxin for Hep 3B cells. Because the lowest inhibitory concentration of amiloride for the growth of Hep 3B cells in this study was 1 μ M, which is not so higher than the concentration of 0.1~0.2 μ M attainable by administration of usual dose of amiloride (5~10mg), amiloride or its analogues may be used alone or in conjunction with other modalities of therapy of hepatocellular carcinoma, for example, hepatic arterial chemoembolization or radiofrequency interstitial thermal ablation therapy. Since Hep 3B cell transition through the G1 phase was inhibited by amiloride, the inhibitory effects of amiloride on the growth of Hep 3B may be mediated in part by blocking G1-S transition. Further study is needed to clarify the effects of more potent analogues of amiloride on the growth of human hepatocellular carcinoma.

Key words: Amiloride, 5-FU, human hepatocellular carcinoma cells (Hep 3B)

서론

간암은 특히 B형 간염 바이러스 감염이 많은 우리나라에서는 흔히 발생하는 소화기계통의 암으로서 진단시에 이미 병소가 여러 군데이거나 그 크기가 커서 수술로서 완치가 불가능하거나, 합병되어 있는 간경변증 때문에 수술을 하지 못하는 경우가 많으며, 이때에는 항암요법을 하기 하지만 그 효과가 크지 않다. 그리고 암소가 적은 경우에도 간경변증이 합병된 경우는 수술이 어렵고 따라서 이러한 경우에는 열이나 알콜등 약물을 국소에 작용시켜 암을 파괴시키는 국소치료법이나 혹은 혈관 촬영술을 이용하여 간암으로 가는 동맥을 차단하고 약물도 투입하는 동맥색전술도 사용되어 지고 있지만 모두 한계점이 있어서 효과가 아주 좋지는 않고 부작용 또한 적지 않아서 만족할 만한 치료법이 되지는 못한다.¹⁾

따라서 이러한 치료법과 작용기전이 다르면서도 병용 요법시에 그 효과를 증강시킴으로써 그 치료 효과를 높일 수 있는 약물들에 대한 연구는 매우 바람직하며 또한 필요한 실정으로, 실제 면역 증강제들이나 암의 생물학적 특성을 이용한 여러 물질들, 예를 들면 성장인자 억제제, 세포신호전달 물질의 길항제 등이 연구되어 지고 있는데,¹⁾ 이러한 약물들 중의 하나로서 여러 종류의 포유류의 세포막에 존재하는 Na^+/H^+ antiporter를 억제하는 작용을 가진 amiloride를 들 수 있다. 이 약물은 1983년 Sparks 등²⁾에 의해서 처음으로 쥐에서 DMA/J 유선암과 H6 간암의 증식을 억제하는 것으로 밝혀 졌다. 또한 실험실에서 배양된 섬유아세포에 있어서 amiloride 및 이와 동일한 기전을 가진 다른 약물들에 의해서 Na^+/H^+ antiporter가 불활성화되면 그 증식이 억제된다³⁻⁵⁾는 사실이 알려짐으로써, 암의 치료에 사용될 수 있을 가능성이 제기되었다.⁶⁾

그 후 amiloride의 인체암에 대한 증식억제 효과에 대해서 1990년 Koo 등^{7,8)}이 처음으로 실험실배양 연구에서 amiloride가 인체 대장암세포(HT-29)의 증식을 농도에 비례하여 억제하며, 그 억제 작용은 가역적임을 밝혔다. 또한 이 억제의 기전으로서 ornithine decarboxylase(ODC) 활성도의 억제 및 polyamine 합성의 억제가 관여하고, 이러한 면에서 amiloride가 항암제로서 유용할 것으로 보고하였

다.^{7,8)} 그리고 Tatsuta 등⁹⁾은 최근 amiloride가 azaserine의 쥐 췌장암 발암 작용을 억제하였다고 하였는데, amiloride의 이러한 작용은 실험적으로 유발된 쥐 췌장암 조직의 세포 증식을 억제하여 나타나는 것 같다고 하였다. 그 후에도 여러 종류의 생체 혹은 배양된 세포에서 amiloride가 종양의 증식이나 전이를 억제하거나 종양의 발생을 줄이는 것으로 알려져 왔으며^{10,11)} 근래 Strazzabosco 등¹²⁾은 인체 간암세포인 Hep G2 세포에서 amiloride가 EGF(Epidermal Growth Factor)나 TGF- α 에 의해 활성화되는 Na^+/H^+ antiporter의 작용을 저해하고 TGF- α 및 10% FBS첨가에 의한 Hep G2 세포의 성장도 억제함을 보고하였다.

이에 본 연구에서는 이러한 Na^+/H^+ antiporter의 억제 약물인 amiloride가 간암세포의 성장에 미치는 영향을 좀 더 자세히 구명하고 임상에서의 응용의 가능성도 알아보고자 세포배양실험을 통하여 amiloride가 인체 간암세포인 Hep 3B(이하 Hep 3B세포라 함)의 증식에 미치는 효과를 조사하고, 기존의 항암제 5-fluorouracil(5-FU)과의 병용효과를 조사하였다. 그리고 또한 amiloride의 작용 기전을 좀 더 자세히 구명하기 위해서 증식억제에 따르는 각 세포주기별 비율을 flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Amiloride, 5-FU 및 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, MEM(Medium Eagle's Minimum Essential Medium), fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100units/ml penicillin-streptomycin은 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. Amiloride는 실험할 때에 DMSO용액에 녹여서 바로 사용하였고, 5-FU는 PBS에 녹여 바로 사용하였다.

2. 세포 배양

Hep 3B 세포는 한국세포주은행(KCLB No. 58064)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였고, 세포배양은 CO_2 incubator(Sanyo, model MCO96,

Japan)를 사용하였다. Hep 3B 세포는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 MEM (Medium Eagle's Minimum Essential Medium)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 새로운 배지로 갈아 주고, 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 원심분리하여 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일 마다 분주하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상 일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

3. Amiloride의 Hep 3B 세포 증식억제 효과

증식기에 있는 Hep 3B 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 20×10^4 cells/well 농도로 seeding하여 24시간 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 160 µM의 농도로 amiloride 10 µl를 각각 3 well에 첨가하고 (triplicate), 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 부착세포는 시료처리한 날로부터 2일 및 4일 후에, 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 각 세포 수를 hemocytometer로 측정하였으며, 이 때 세포의 생존여부는 trypan blue 염색으로 확인하였고, 그렇게 측정된 세포 수를 0.4% DMSO 용액만을 첨가한 대조군의 세포 수와 비교하여 암세포 증식 억제효과를 관찰하였다.

4. Amiloride의 Hep 3B 세포 증식억제 효과의 가역성

Amiloride가 Hep 3B 세포에 미치는 증식억제작용의 가역성 여부를 조사하기 위해서 증식기에 있는 Hep 3B세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 4×10^4 cells/well 농도로 분주하여 24시간 배

양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 amiloride 20 µM를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 다시 48시간 배양하였고, 이 때에 배지를 갈아 주면서, 3 well에는 amiloride를 제거하였고, 다른 3 well에는 그대로 둔 채, 제거한 날부터 2일, 4일, 6일 째에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 각 세포 수를 hemocytometer로 측정하였다. 그렇게 측정된 세포수를 대조군의 세포 수와 비교하여 암세포 증식 억제효과와 가역성 여부를 관찰하였다.

5. Amiloride와 5-FU가 Hep 3B 세포의 증식에 미치는 상호작용

Amiloride와 5-FU가 Hep 3B세포의 증식에 미치는 상호작용을 알기 위해서 증식기에 있는 Hep 3B 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후, 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 20×10^4 cells/well 농도로 분주하여 하룻밤 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 대조군, amiloride 10 µM, amiloride 20 µM, 5-FU 0.1 µg/ml, 5-FU 0.3 µg/ml, 5-FU 0.1 µg/ml + amiloride 10 µM, 5-FU 0.3 µg/ml + amiloride 10 µM, 5-FU 0.3 µg/ml + amiloride 20 µM의 8군으로 나누어 3 well에 첨가하고(triplicate), 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 부착세포는 시료처리한 날로부터 4일 후에, 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하였다. 그렇게 하여 분리된 세포 수를 hemocytometer로 측정하여 대조군의 세포 수와 비교하여 각 군의 암세포 증식 억제효과를 관찰하였다.

6. Flow cytometry를 이용한 세포주기분석

Amiloride가 Hep 3B 세포에 있어서 세포주기의 어느 단계를 지연시키는지 flow cytometry를 이용하여 2회 시행, 분석하였다. amiloride 20 µM을 첨가한 배지에서 4일간 배양된 세포를 PBS용액으로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol로 고정하였다. 고정 후 RNase A(Sigma, USA)를 넣어서 RNA를 처리

하고 DNA intercalating dye인 propidium iodide (Sigma, USA)로 DNA를 염색하여 Becton Dickinson FACStar Flow Cytometer 및 Becton Dickinson Cell Fit Software를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과에 대한 분석은 일원분산분석(ANOVA)중의 Duncan's multiple range test를 이용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. Amiloride의 Hep 3B 세포 증식억제 효과

Amiloride를 1 μM 첨가 후 2일째의 Hep 3B 세포 수는 $(28 \pm 3)(\times 10^4)$ 였고, 0.4% DMSO만 가한 대조군의 경우 2일째의 세포 수인 $(30 \pm 4)(\times 10^4)$ 와 큰 차이가 없었지만, amiloride 1 μM 첨가 4일째에는 그 세포 수가 $(57 \pm 3)(\times 10^4)$ 로서 대조군의 $(63 \pm 4)(\times 10^4)$ 에 비하여 유의하게 세포의 증식이 억제되었다($p < 0.05$). 또한 첨가된 amiloride 농도가 5 μM 인 경우, 2일째의 Hep 3B 세포 수는 $(25 \pm 2)(\times 10^4)$ 였고 대조군의 2일째 세포 수는 $(30 \pm 4)(\times 10^4)$ 로서 amiloride 5 μM 첨가군에서 대조군에 비하여 증식이 약간 억제되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 4일째는 amiloride 5 μM 첨가군에서의 세포 수가 $(51 \pm 2)(\times 10^4)$ 으로서 대조군의 $(63 \pm 4)(\times 10^4)$ 에 비해 현저하게 그 증식이 억제됨을 볼 수 있었다($p < 0.05$).

그리고 amiloride의 농도를 10, 20, 40, 80, 160 μM 로 증가시키에 따라 2일째와 4일째 모두 Hep 3B 세포의 증식이 점점 더 많이 억제되었다. 즉, 2일째와 4일째의 Hep 3B 세포수는 10 μM 의 경우 각각 $(21 \pm 2, 43 \pm 3) \times 10^4$, 20 μM 의 경우 $(15 \pm 2, 33 \pm 2) \times 10^4$, 40 μM 의 경우 $(8 \pm 2, 21 \pm 2) \times 10^4$, 80 μM 의 경우 $(4 \pm 1, 13 \pm 2) \times 10^4$, 160 μM 의 경우 $(2 \pm 1, 5 \pm 1) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(30 \pm 4, 63 \pm 4) \times 10^4$ 에 비하여 amiloride의 농도에 비례해서 유의하게 그 증식이 억제됨을 보여 주었다($p < 0.05$). 특히 amiloride 160 μM 을 첨가한 후 4일째의 세포수가 $(5 \pm 1) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(63 \pm 4)(\times 10^4)$ 에 비하여 92%의 증식억제를 보였고, 20 μM 의 농도에서는 대조군에 비해 48%의 증식억제를 보였다 (Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effects of amiloride(μM) on 2 days and 4 days treatment of Hep 3B cells.

		Cell number $\times 10^4$	
		2 days	4 days
Amiloride	0	30 ± 4 a	63 ± 4 a
	1	28 ± 3 a	57 ± 3 b
	5	25 ± 2 ab	51 ± 2 c
	10	21 ± 2 b	43 ± 3 d
	20	15 ± 2 c	33 ± 2 e
	40	8 ± 2 d	21 ± 2 f
	80	4 ± 1 de	13 ± 2 g
	160	2 ± 1 e	5 ± 1 h

a~h : Means with the different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

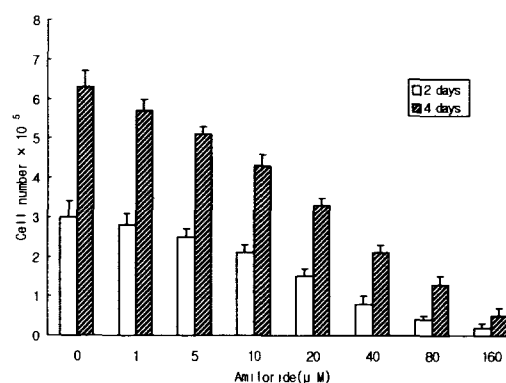


Fig. 1. Effects of amiloride on 2 days and 4 days treatment of Hep-3B cells. * $p < 0.05$ vs. control

2. Amiloride의 Hep 3B 세포 증식억제 효과의 가역성

Amiloride의 증식억제작용의 가역성을 보고자 한 실험에서, amiloride를 처음부터 첨가하지 않은 대조군과 amiloride 첨가후 4일째에 약 50%의 증식억제효과를 보인 amiloride 20 μM 을 첨가하여 24시간 동안 배양시킨 후 amiloride를 제거한 군, 그리고 amiloride 20 μM 을 첨가해서 계속 그대로 둔 군으로 나누어 관찰하여 보았을 때, 분주후 24시간 뒤에 amiloride를 첨가한 후 48시간 배양했다가 첨가한 amiloride를 제거한 날에는 제거군과 제거하지 않은 군 사이의 Hep 3B 세포 수는 각각 $(5.5 \pm 0.5) \times 10^4$ 및 $(5.5 \pm 0.5) \times 10^4$ 로서 차이가 없었고, 양군 모두 대조군의 $(8.5 \pm 1.5) \times 10^4$ 보다는 그 수가 적었으나 통계학적인 유의성은 없었

다. 그리고 amiloride를 제거한 지 2일째의 제거군의 Hep 3B 세포 수는 $(14 \pm 2) \times 10^4$ 로서 amiloride 첨가군의 $(8.5 \pm 1.5) \times 10^4$ 에 비하여 현저히 많았으나 통계학적인 유의성은 없었고, 대조군의 $(21 \pm 2) \times 10^4$ 보다는 유의하게 적었으며($p < 0.05$), amiloride 첨가군과 대조군 사이도 그 세포 수에 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

Amiloride를 제거한 지 6일 째에 amiloride제거군의 Hep 3B 세포 수는 $(28.5 \pm 2.5) \times 10^4$ 로서 amiloride를 제거하지 않은 군의 $(18 \pm 1) \times 10^4$ 보다는 훨씬 많았고($p < 0.05$), 대조군의 $(41 \pm 3) \times 10^4$ 에 비해서는 유의하게 세포수가 적음으로써($p < 0.05$), 제거한 지 2일째에 비해서 amiloride의 증식억제 작용이 많이 감소하였음을 보여 주었다. 그리고 amiloride를 제거한 지 6일 째인 집중 8일째에는 amiloride 제거군의 Hep 3B 세포 수가 $(45 \pm 2) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(57 \pm 3) \times 10^4$ 보다는 낮았으나(대조군의 83.3%, $p < 0.05$), amiloride를 제거하지 않았던 군의 $(26 \pm 2) \times 10^4$ 보다는 훨씬 더 많음(첨가군의 181%)를 보여 주었다($p < 0.05$). 그리고 amiloride를 제거한 군에서 amiloride를 제거한 날과 2일 사이의 증식비율은 2.5배로서 대조군의 2.5배와는 비슷하였지만 amiloride를 제거하지 않았던 군의 1.5배보다는 현저히 높았으며, 이러한 경향은 amiloride를 제거한 지 4일과 6일 사이의 증식비율에서도 잘 관찰됨으로써 amiloride의 증식 억제 작용이 가역적임을 보여 주었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Reversibility of effects of amiloride(20 μ M) on the growth of Hep 3B cells.

	Cell number $\times 10^4$				
	0day	2days	4days	6days	8days
Control	4	8.5 ± 1.5^a	21 ± 2^a	41 ± 3^a	57 ± 3^a
		2.5 ¹⁾	2.0	1.4	
Amiloride removed ²⁾	4	5.5 ± 0.5^a	14 ± 2^{ab}	28.5 ± 2.5^b	45 ± 2^b
		2.5	2.0	1.6	
Amiloride	4	5.5 ± 0.5^a	8.5 ± 0.5^a	18 ± 1^c	26 ± 2^c
		1.5	2.1	1.4	

^{a~c}: Means with the different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾: growth ratio

²⁾: amiloride treatment for 48 hours followed by replacement with amiloride-free medium.

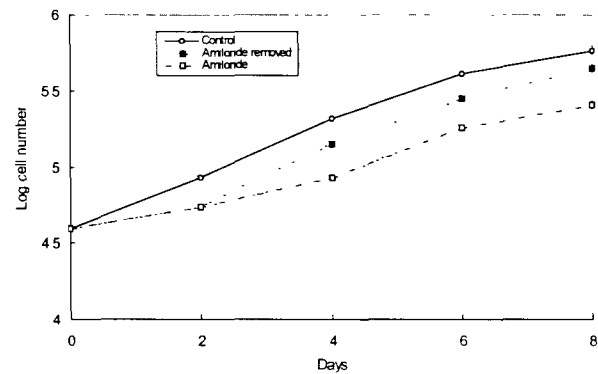


Fig. 2. Reversibility of effects of amiloride(20 μ M) on the growth of Hep 3B cells. Open circles=control group; closed squares=amiloride treatment for 48 h followed by replacement with amiloride-free medium; open squares=continuous amiloride treatment.

3. Amiloride와 5-FU가 Hep 3B 세포의 증식에 미치는 상호작용

Table 3에서 보는 바와 같이 배양 4일째의 대조군의 Hep 3B 세포 수는 $(59 \pm 3) \times 10^4$ 였고, amiloride 10 μ M 첨가군 및 amiloride 20 μ M 첨가군의 세포 수는 각각 $(42 \pm 1) \times 10^4$ 및 $(29 \pm 2) \times 10^4$ 로서 양군 모두 대조군과 유의한 차를 보였다($p < 0.05$). 5-FU 0.1 μ g/ml를 첨가한 군 및 5-FU를 0.3 μ g/ml를 첨가한 군의 세포 수는 $(47 \pm 1) \times 10^4$ 및 $(37 \pm 3) \times 10^4$ 로서 양군 모두 대조군의 $(59 \pm 3) \times 10^4$ 와 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), 양군 사이에도 그 세포 수의 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 그리고 amiloride 10 μ M 첨가군 및 amiloride 20 μ M 첨가군의 세포 수는 양군 모두 5-FU 0.1 μ g/ml를 첨가한 군 및 5-FU를 0.3 μ g/ml를 첨가한 군의 세포 수보다 유의하게 적었다($p < 0.05$).

Table 3. Effects of amiloride(μ M) and/or 5-fluorouracil(μ g/ml) on 4 days treatment of Hep 3 B cells.

Cell number $\times 10^4$		
Control	59 ± 3^a	
Amiloride (10)	42 ± 1^c	28.9*
Amiloride (20)	29 ± 2^{ef}	50.9
5FU 0.1	47 ± 1^b	20.4
5FU 0.3	37 ± 3^{cd}	37.3
5FU 0.1 + Amiloride 10	32 ± 3^{de}	45.8
5FU 0.3 + Amiloride 10	26 ± 2^f	56.0
5FU 0.3 + Amiloride 20	12 ± 2^g	79.7

^{a~g}: Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

*: Inhibition rate compared to control group

그리고 5-FU의 증식억제 작용에 미치는 amiloride의 영향을 살펴 보면, 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 과 amiloride 10 μM 을 병용 첨가한 군의 Hep 3B 세포수는 $(32\pm3)\times10^4$ 로서 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 만을 첨가한 군의 $(47\pm1)\times10^4$ 이나 amiloride 10 μM 단독 첨가군의 $(42\pm1)\times10^4$ 에 비하여 세포수가 유의하게 적었다($p<0.05$). 이로써 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 나 amiloride 10 μM 단독에 의한 Hep 3B 세포에 대한 증식억제효과보다 두 약제를 병용했을 때에 그 효과가 더 큼을 알 수 있었다(Fig. 3).

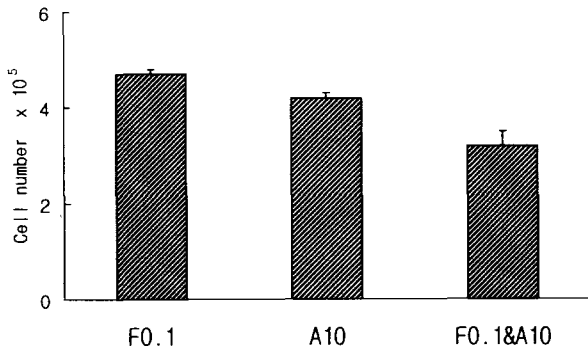


Fig. 3. Effects of amiloride(μM) and/or 5-FU($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of Hep 3B cells. * $p < 0.05$
F: treatment with 5-FU A: treatment with amiloride
F & A: treatment with 5-FU & amiloride

한편 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 amiloride 10 μM 의 병용 첨가군의 세포 수는 $(26\pm2)\times10^4$ 로서 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 만을 첨가한 군의 $(37\pm3)\times10^4$ 이나 amiloride 10 μM 단독 첨가군의 $(42\pm1)\times10^4$ 에 비하여 세포 수가 유의하게 적었다($p<0.05$)(Fig 4).

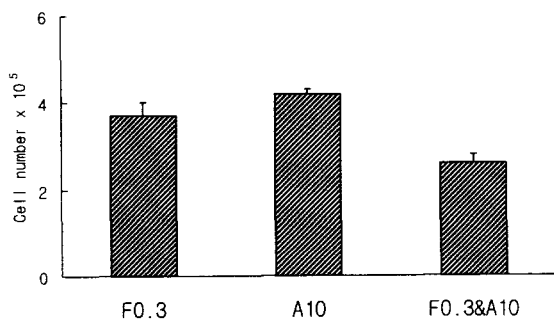


Fig. 4. Effects of amiloride(μM) and/or 5-FU($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of Hep 3B cells. * $p < 0.05$
F: treatment with 5-FU A: treatment with amiloride
F & A: treatment with 5-FU & amiloride

그리고 이러한 경향은 amiloride의 농도를 높여 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 amiloride 20 μM 을 병용 첨가했을 때에 더 뚜렷해져서 그 세포수가 $(12\pm2)\times10^4$ 로서, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 단독첨가군의 세포수 $(37\pm3)\times10^4$ 나 amiloride 20 μM 단독첨가군의 $(29\pm2)\times10^4$ 보다 현저하게 낮음을 볼 수 있었다($p<0.05$)(Fig. 5).

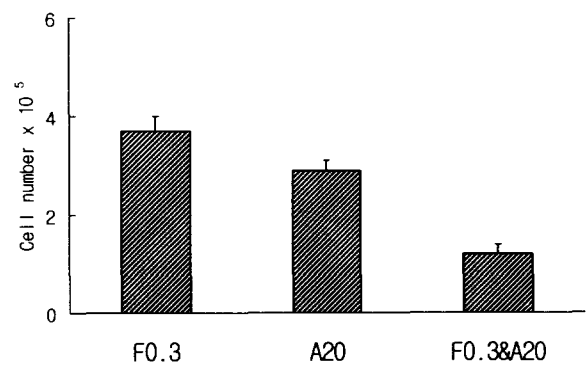


Fig. 5. Effects of amiloride(μM) and/or 5-FU($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of Hep 3B cells. * $p < 0.05$
F: treatment with 5-FU A: treatment with amiloride
F & A: treatment with 5-FU & amiloride

그리고 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 과 amiloride 10 μM 을 병용 첨가한 군에서는 대조군에 비해서 45.8%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 단독첨가군과 amiloride 10 μM 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($28.9+20.4=49.3\%$)과 유사한 정도를 나타냄으로써, 두 약물이 상승작용을 가지고 있음을 시사하였다. 이러한 경향은 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 amiloride 10 μM 의 병용 첨가군에서 대조군에 비해서 56.0%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 단독첨가군과 amiloride 10 μM 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($37.3+28.9=66.2\%$)과 유사한 정도를 나타낸 성적과, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 amiloride 20 μM 의 병용 첨가군에서 대조군에 비해서 79.7%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 단독첨가군과 amiloride 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($37.3+50.9=88.2\%$)과 유사한 정도를 나타내었던 결과에서 더욱 뚜렷하였다(Fig. 6).

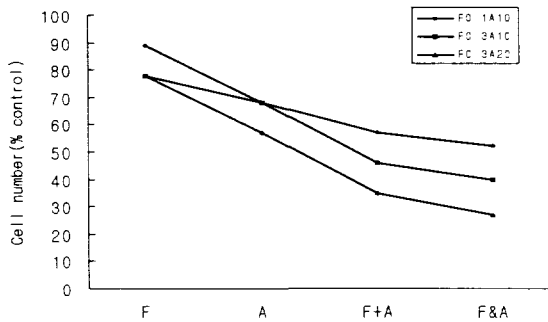


Fig. 6. Effects of amiloride(M) and/or 5-FU(g/ml) on 4 days treatment of Hep 3B cells suggesting additive effect of the two.

F: treatment with 5-FU alone

A: treatment with amiloride alone

F+A: calculated sum of 5-FU and amiloride

F&A: combined treatment with 5-FU and amiloride

4. Flow cytometry를 이용한 cell cycle analysis

Amiloride 20 μ M를 첨가한 배지에서 4일간 배양시킨 군과 amiloride 첨가없이 배양시킨 대조군의 Hep 3B 세포를 이용하여 세포주기 측정을 하였는데, 대조군의 경우 G0-G1기가 38.9%, S기는 20.8%였는데 비하여, amiloride 20 μ M 첨가군에서는 G0-G1기 57.9%, S기 20.8%로 나와 amiloride 첨가군에서 대조군에 비하여 G1기에서 S기로의 진행이 차단되어 세포 증식이 억제되어 있음을 보여 주었다. 또한 G2-M기의 경우는 대조군이 40.3%, amiloride 첨가군이 21.3%이었다(Table 4).

Table 4. Effects of amiloride on cell cycle distribution in Hep 3B cells after 4 days of incubation at 37°C

Sample(μ M)	% of cells on each cell cycle		
	G0/G1	S	G2/M
Control	38.9	20.8	40.3
Amiloride(20)	57.9	20.8	21.3

고찰

고형암은 혈액 공급이 충분하지 않아¹³⁾ 저산소혈 증에 노출된 부분이 있으며, 이 부위는 정상 조직에 비하여 산성을 띄게 된다¹⁴⁾고 하며 정상조직의 세포의 pH가 7.1에서 7.6정도인데 반하여 암조직의 세포

의 pH는 6.5에서 7.0으로 측정되었다.¹⁴⁾ 그리고 P-NMR-spectroscopy로 측정한 세포내 pH는 정상 조직과 암조직간에 차이가 없었다.¹⁵⁾ 이러한 정상조직과 암조직간의 산도의 차이는 암조직에만 선별적으로 작용하는 치료법의 가능성을 제공한다고 할 수 있는데,⁶⁾ 산도가 높은 환경에서 세포내 pH를 조절하는데 관여한다고 알려진 두 가지 중요한 exchangers인 stilbene-sensitive Na^+ dependent $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger¹⁶⁾와 amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiporter¹⁷⁾ 중 후자인 Na^+/H^+ antiporter는 대부분의 동물세포에서 1:1로 세포내 H^+ 와 세포외 Na^+ 를 교환시킨다고 한다.

여러 포유류동물의 세포막에 존재하는 Na^+/H^+ antiporter는 세포외의 Na^+ 이온을 세포내의 H^+ 이온과 교환해서 이동시킴으로써 세포내의 산도를 알칼리성으로 유지하는 역할을 한다.¹⁸⁾ 이렇게 Na^+/H^+ antiporter의 작용으로 이루어지는 세포내의 알칼리화는 실험실에서 배양되는 섬유아세포의 증식의 초기 단계에서 그 증식을 유발하는데 아주 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 그리고 이 Na^+/H^+ antiporter는 insulin, epidermal growth factor(EGF), phorbol ester 등 여러 가지 세포증식인자들의 투여로 즉각적으로 활성화되어 세포질의 알칼리화를 초래하여 세포 성장과 증식을 유발시키며,^{19,20)} 실험실에서 배양된 섬유아세포에 있어서 amiloride 및 이와 동일한 기전을 가진 다른 약물들에 의해서 Na^+/H^+ antiporter가 불활성화되면 그 증식이 억제된다.³⁻⁵⁾ 그리고 Rotin 등²¹⁾은 Na^+/H^+ antiporter가 없는 변이된 인체 방광암세포주 MGH-U1이 면역이 결핍된 쥐에서 종양을 형성하지 못했다고 하였는데, 이는 종양의 성장에 Na^+/H^+ antiporter가 중요함을 의미한다고 할 수 있겠다. 따라서 이러한 Na^+/H^+ antiporter를 억제하는 것으로 알려진 amiloride와 그 유사체들은^{5,22,23)} 암의 치료제로서의 가능성을 충분히 지니고 있다.⁶⁾

이뇨제 amiloride는 1967년 Cragoe 등²²⁾에 의하여 처음으로 합성되었고, 신세뇨관 상피세포의 나트륨 통로를 가역적으로 차단시킴으로써 이뇨 효과를 나타내게 된다고 알려져 있으며,²⁴⁾ amiloride에 감수성이 있는 나트륨통로는 신세뇨관 뿐만 아니라 신피질 집합세뇨관과 신수질부와 신유두부의 집합세뇨관, 그리고 방광과 원위부 대장, 기도, 땀샘관²⁵⁻²⁹⁾에도 존재한다. 약물역동학적 연구에 의하면 amiloride가 세포외부의 Na^+ 의 유입을 경쟁적으로 억제함으로써

Na^+/H^+ antiporter의 작용을 억제한다고 하며,³⁰⁾ 생리적인 Na^+ 농도에서는 amiloride 0.1-1 mM의 농도에서 Na^+/H^+ antiporter를 억제하는데³¹⁾ 이러한 억제는 즉각 나타났다가 약제 제거시 빨리 사라진다고 하였다.¹⁸⁾

그리고 최근에는 amiloride 유사체인 DMA (5-(N,N-dimethyl) amiloride), MIBA (5-(N-methyl-N-isobutyl) amiloride) 및 EIPA (5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride) 등이 개발되었는데, Na^+/H^+ exchanger 억제도가 amiloride에 비하여 각각 DMA (5-(N,N-dimethyl) amiloride)는 20배, MIBA (5-(N-methyl-N-isobutyl) amiloride)는 100배, 그리고 EIPA (5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride)는 200배, HMA는 500배 더 높다.³²⁾

본 연구에서 amiloride를 투여한 군에서 대조군에 비하여 Hep3B세포의 증식이 유의하게 억제되었으며, 이러한 억제효과는 실제 임상에서 사용되는 용량인 amiloride 5~10mg을 투여했을 때의 혈중 농도범위인 0.1~0.2 μM 보다 약간 더 높은 1 μM 에서부터 나타났으며,³³⁾ 160 μM 까지 농도를 단계적으로 증가시켰을 때 그 증식억제효과는 농도에 비례함을 보여 주었다. 이러한 본 연구의 결과는 amiloride가 간암세포의 일종인 Hep G2세포의 성장을 500 μM 농도에서 거의 완전히 억제했던 Strazzabosco 등¹²⁾의 보고와 상통하였으며, 실제로 임상에서 간암환자에 고주파열 파괴요법이나 간동맥혈관색전술등의 치료법을 시행할 때에 amiloride나 그 보다 더 작용이 강한 유사체들을 병용함으로써 보조요법으로서의 효과를 어느 정도 얻을 수 있을 가능성을 제시하였고, 앞으로 이에 대한 구체적인 확인연구가 필요할 것이라고 생각되었다. 또한 amiloride가 쥐에서는 췌장암의 발암을 억제하거나⁹⁾ 혹은 간암의 증식을 억제한다는 보고²⁾로 미루어 볼 때에 amiloride를 간암의 전구병변이라 할 수 있는 간경변증환자에서 사용함으로써 발암을 억제할 수 있는 가능성을 보였다.

본 연구에서 amiloride의 증식억제 효과의 기전으로서는 amiloride의 농도가 50 μM 에서 800 μM 사이에서 Na^+/H^+ antiporter를 억제한 이전의 보고³¹⁾로 미루어 생각해 볼 때, Na^+/H^+ antiporter의 억제 가능성을 생각할 수 있다. 이러한 가능성은 인체 간암세포인 Hep G2세포에서 amiloride가 간암의 성장에 작용하는 중요한 성장인자들인 EGF(Epidermal Growth Factor)나 TGF- α 에 의해 활성화되는 Na^+/H^+ antiporter의

작용을 저해함을 보고한 Strazzabosco 등¹²⁾의 성적에 의해서도 더욱 뒷받침된다고 하겠다. 그러나 또한 amiloride는 이러한 고농도에서 단백질 합성을 저해하거나³⁴⁾ 여러 종류의 protein kinases^{35,36)}나, Na^+/K^+ ATPase³¹⁾의 활성을 저하시키는 것으로 알려져 있으므로, 이들에 대한 앞으로의 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 그리고 본 연구에서 amiloride가 Hep 3B세포의 증식을 억제 했던 최소농도는 Koo 등^{7,8)}이 대장암에서 보고한 amiloride의 최소 유효농도였던 50 μM 보다 훨씬 낮았는데, 그 원인으로서는 각 암세포에 따라 Na^+/H^+ antiporter의 활성정도가 다른 점^{12,31)}을 생각할 수 있으며, 실제 간암세포의 일종인 Hep 3B세포는 Na^+/H^+ antiporter의 활성도가 정상 간세포에 비해 2~3배 더 높다고 하며,¹²⁾ 이러한 현상은 HepG2와 같은 인체의 간암세포인 Hep 3B세포에서도 있을 가능성이 있고, 따라서 amiloride를 간암의 치료에 사용할 수 있는 또 하나의 근거가 될 수 있다고 생각되었다.

본 연구에서의 amiloride의 세포증식 억제효과는 amiloride를 48시간 투여 후 제거하였을 때에 48시간 경과 후 억제 효과가 서서히 없어지는 것으로 나타남으로써 그 증식억제효과의 가역성을 시사하였는데, 이러한 amiloride 효과의 가역성은 이전의 보고들^{7,8,37)}과도 일치된다. 그리고 이러한 가역성은 amiloride가 가지는 Na^+/H^+ antiporter에 대한 억제 작용이 가역성인 점³¹⁾과 상통하는 소견으로서 amiloride의 작용기전이 비특이적이거나 세포독성에 기인하는 것은 아니라는 것을 의미한다고 할 수 있겠다.

5-FU는 1957년에 처음으로 합성되었으며³⁸⁾ 세포핵 내에서 대사되어 thymidylate synthase의 기능을 억제하여 DNA합성을 저해시키거나, RNA에 결합하여 RNA의 기능을 방해하여 세포독성을 나타낸다.³⁹⁾

본 연구에서 5-FU와 amiloride를 병용 투여는 Hep 3B세포의 성장을 상가적으로 억제하는 경향을 보였는데 이러한 결과는 amiloride가 세포성장주기의 비교적 초기에 작용하는 Na^+/H^+ antiporter의 작용을 저해하고, 5-FU는 세포성장 주기의 중기(DNA 합성기)에 작용하는 약물임을 감안한다면 어느 정도 수궁할 수 있겠다. 그리고 이러한 5-FU와 amiloride의 상가적인 Hep 3B 증식억제 작용이 있음을 감안할 때에 5-FU보다 간암에 더 유효하다고 알려진 항암제인 adriamycin과 amiloride의 상호작용을 확인하는 것도

필요할 것으로 생각되었으며, 또한 Na^+/H^+ antiporter 억제능이 amiloride 보다 20배에서 200배정도 더 높은 amiloride 유사체들³¹⁾을 사용하여 5-FU 및 adriamycin과의 병용효과를 조사할 필요가 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서 amiloride 첨가 유무에 따르는 Hep 3B세포의 세포주기는 amiloride 첨가군에서는 G0-G1기 57.9%, S기 20.8%였고 대조군에서는 G0-G1기가 38.9%, S기는 20.8%로서, amiloride가 G1기에서 S기로의 진행을 현저하게 억제하고 있음을 보여주고 있으며, 이러한 G1에서 S기로의 진행을 억제하는 기전에 대해서는 정확하게 알려진 바는 없다. Panet 등³⁷⁾은 amiloride 1.0 mM이 혈청으로 유도되는 Balb/3T3 세포의 DNA 합성을 부분적으로 억제할 뿐 만아니라, Na^+/K^+ cotransporter 저해제인 bumetanide를 병용 투여하였을 경우 G1기에서 S기로의 진행을 완전히 차단하였다고 하며, bumetanide를 단독투여하는 경우 DNA 합성을 약간 감소시킨다고 하였다. 또한 Koo 등⁷⁸⁾은 사람의 대장암세포(HT-29)를 이용한 연구에서 amiloride 투여군에서 ornithine decarboxylase(ODC)활성도 및 polyamine uptake가 유의하게 억제되었다고 하였는데 ODC의 활성화는 mid-G1기의 표지자로서 알려져 있으므로⁴⁰⁾ amiloride에 sensitive한 Na^+/H^+ antiporter 활성화가 G1기에서 다음 세포주기로 진행하는데 있어서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였다.

이러한 여러 연구 결과들로 미루어 생각해 볼 때 amiloride가 암세포에 가지는 G1/S기의 이행 억제작용이나 ODC 활성도 및 polyamine uptake의 억제는 amiloride가 Na^+/H^+ antiporter를 억제하여 나타난 결과라고 추측할 수 있으며, 그 자세한 기전에 대해서는 앞으로 더 깊은 연구가 필요하다고 하겠다.

결론

이상의 결과에서, amiloride가 농도에 비례하여 Hep 3B세포증식을 억제하였고, 그 증식억제 효과가 가역적이었기 때문에 amiloride가 Hep 3B세포에 대해서 비특이적인 세포독이 아니고 일정한 작용 기전을 가진 약물임을 알 수 있었다. 이러한 amiloride의 Hep 3B세포증식에 대한 억제작용은 임상에서의 상용량인 amiloride(5mg-10mg/일)을 투여했을 때의 혈중 농도범위인 0.1~0.2 μM 보다 높은 1 μM 에서부터 나타남으로써 amiloride나 그 유사체들이 고주파 온

열과괴요법이나 간동맥혈관색전술등 다른 치료법에 보조요법으로서 유용할 수 있음을 시사하였고, 기존의 항암제인 5-FU나 adriamycin등과의 병용 투여도 기대할 수 있을 것으로 생각되었다. 그리고 amiloride의 Hep 3B세포의 G1기에서 S기로의 세포주기 진행의 억제가 Hep 3B세포증식억제작용기전 중의 하나일 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Yamada T: Textbook of gastroenterology 3rd ed, Philadelphia, Lippincott williams & Wilkins, 1999, 1500-1520.
2. Sparks RL, Pool TB, Smith NKR, Cameron IL: Effects of amiloride on tumor growth and intracellular element content of tumor cells in vivo. *Cancer Res* 43: 73-77, 1983
3. Rozengurt E, Mendoza S: Monovalent ion fluxes and the control of cell proliferation in cultured fibroblasts. *Ann NY Acad Sci* 339: 175-190, 1980
4. Moolenaar WH, Yarden Y, de Laat SW and Schlessinger J: Epidermal growth factor induces electrically silent Na^+ influx in human fibroblast. *J Biol Chem* 257: 8502-8506, 1982
5. L'Alleman G, Franchi A, Cragoe E Jr, Pouyssegur J: Blockade of the Na^+/H^+ antiport abolish growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. *J Biol Chem* 259(7): 4313-4319, 1984
6. Tannock IF, Rotin D: Acid pH in tumours and its potential for therapeutic exploration. *Cancer Res* 49: 4373-4384, 1989
7. Koo JY, Saydjari JR, Parekh D, Evers BM, Farre A, Townsend CM, Thompson JC: amiloride inhibits the growth of human colon cancer cells(HT-29). *Gastroenterology* 98: A290, 1990
8. Koo JY, Parekh D, Townsend CM, Saydjari JR, Evers BM, Farre A, Ishizuka J, Thompson JC: amiloride inhibits the growth of human colon cancer cells in vitro. *Surg Oncol* 1: 385-389, 1992
9. Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Yano H, Iseki K, Uehara H, Nakaizumi A: Inhibition by amiloride of experimental carcinogenesis induced by azaserine in rat pancreas. *Cancer Lett* 106: 23-28, 1996
10. Evans DM, Sloan-Stakleff K, Arvan M, Guyton DP: Time and dose dependency of suppression of pulmonary metastases of rat mammary cancer by amiloride. *Clinic Experi Metas* 16: 353-357, 1998
11. Ray P, Bhatti R, Gadarowski J, Bell N, Nasruddin S: Inhibitory effect of amiloride on the urokinase plasminogen activators in prostatic cancer. *Tumour Biol* 19: 60-64, 1998

12. Strazzabosco M, Poci C, Spirli C, Zsembery A, Granato A, Massimino ML, Crepaldi G: Intracellular pH regulation in Hep G2 cells: effects of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and insulin-like growth factor-II on Na^+/H^+ exchange activity. *Hepatology* 22: 588-597, 1995
13. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P: Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49: 6449-6465, 1989
14. Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold JS: The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 2: 343-366, 1984
15. Daly PF, Cohen JS: Magnetic resonance spectroscopy of tumors and potential in vivo clinical applications: a review. *Cancer Res* 49: 770-779, 1989
16. Cassel D, Scharf O, Rotman M, Cragoe Jr EJ, Katz M: Characterization of Na^+ -linked and Na^+ -independent $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchange in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 263: 6122-6127, 1988
17. Grinstein S, Rotin D, Mason MJ: Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic changes. Role in cellular proliferation. *Biochem Biophys Acta* 988: 73-97, 1989
18. Mahnensmith RL, Aronson PS: The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological process. *Circ Res* 56: 773-788, 1985
19. Grinstein S, Rothstein A: Mechanism of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. *J Membr Biol* 90: 1-12, 1986
20. Seifter JL, Aronson PS: Properties and physiological role of the plasma membrane sodium-hydrogen exchanger. *J Clin Invest* 78: 859-864, 1986
21. Rotin D, Steele-Norwood D, Grinstein S, Tannock L: Requirement of the Na^+/H^+ exchanger for tumor growth. *Cancer Res* 49: 205-211, 1989
22. Cragoe EJ Jr, Woltorsdorf OW, Bicking JB: Pyrazine diuretics. II. N-amidino-3-amino-5-substituted-halopyrazinecarboxamides. *J Med Chem* 10: 66-75, 1967
23. Kleyman R, Cragoe Jr EJ: Amiloride and its analogues as tools in the study of ion transport. *J Membrane Biol* 105: 1-21, 1988
24. Bentley PJ: amiloride: A potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J Physiol* 195: 317-330, 1968
25. Gross JB, Imai M, Kokko JP: A functional comparison of the cortical collecting tubule and the distal convoluted tubule. *J Clin Invest* 55: 1284-1294, 1975
26. Koeppen BM: Conductive properties of the rabbit outer medullary collecting duct: Inner stripe. *Am J Physiol* 248(Renal Fluid Electrolyte Physiol 17): F500-F506, 1985
27. Koeppen BM: Conductive properties of the rabbit outer medullary collecting duct: Outer stripe. *Am J Physiol* 250(Renal Fluid Electrolyte Physiol 19): F70-F76, 1986
28. Lewis SA, Diamond JM: Na^+ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Membrane Biol* 28: 1-40, 1976
29. Kleyman R, Cragoe Jr EJ: The mechanism of action of amiloride. *Sem Nephrol* 8: 242-248, 1988
30. Paris S, Pouyssegur J: Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiporter in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 258: 3503-3508, 1983
31. Zhuang Y, Cragoe EJ Jr, Saikewitz T: Characterization of potent Na^+/H^+ exchange inhibitors from the amiloride series in A431 cells. *Biochemistry* 23:4481-4488, 1984
32. Maidorn RP, Cragoe Jr EJ, Tannock IF: Therapeutic potential of analogues of amiloride: inhibition of intracellular pH as a possible mechanism of tumour selective therapy. *Br J Cancer* 67: 297-303, 1993
33. mail Z, Triggs EJ, Smithurst BA, Parke W: The pharmacokinetics of amiloride-hydrochlorothizide combination in the young and elderly. *Eur J Clin Pharmacol* 37: 167-171, 1989
34. Lubin M, Cahn F, Coutermarsh BA: Amiloride, protein synthesis, and activation of quiescent cells. *J Cell Physiol* 113: 247-251, 1982
35. Davis RJ, Czech MP: Amiloride directly inhibits growth factor receptor tyrosine kinase activity. *J Bio Chem* 260: 2543-2551, 1985
36. Besterman JM, May Jr WS, LeVine III H, Cragoe Jr EJ, Cutrecasas P : Amiloride inhibits phorbol ester-stimulated Na^+/H^+ exchange and protein kinase C. An amiloride analog selectively inhibits Na^+/H^+ exchange. *J Biol Vhem* 260: 1155-1159, 1985
37. Panet R, Snyder D, Atlan H: Amiloride added together with bumetanide completely blocks mouse 3T3-cell exit from G0/G1-phase and entry into S-phase. *Biochem J* 239: 745-750, 1986
38. Heidelberger C, Chaudhuari NK, Danebergj P: Fluorinated pyrimidines. A new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 179: 663, 1957
39. Bruce AC, Dan LL: Cancer chemotherapy and biotherapy. 2nd edition: 149-211, 1996
40. Haddox MK, Magun BE, Russell DH: Ornithine decarboxylase induction during G1 progression of normal and rous sarcoma virus transformed cells. *Cancer Res* 40: 604-608, 1980