

인체 췌장암세포주(Capan-1)의 증식에 미치는 amiloride의 억제효과

임대관, 김신, 김유리, 노지훈, 이지현, 김지연, 박무인, 정근옥*, 박건영*, 구자영

고신대학교 의과대학 내과학 교실, 부산대학교 식품영양학과 *

The Effect of amiloride on the Growth of Pancreatic Cancer Cells

Dae Kawn Lim, Sin Kim, Yu-Ri Kim, Gi Hun Noh, Jee Hyun Lee, Jee Yeon kim,
Moo In 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

Backgrounds/Aims 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⁺ antiporter, on the growth of human pancreatic carcinoma cell line, Capan-1 cells was examined and the effects of 5-fluorouracil(5-FU) were also studied. Cell cycle analysis was done to examine the mechanisms for the inhibitory effects of amiloride. **Materials/Methods** The growth of Capan-1 cells were examined by counting cell number on two and four days treatment with 1 μ M, 5 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 Capan-1 cells into 35-mm² plastic dishes at a density of 10 $\times$ 10⁴ cells/dish. The reversibility of the effects of amiloride was examined on two day to eight days treatment with 20 μ M amiloride after seeding 2 $\times$ 10⁴ 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 Capan-1 cells in a dose-dependent fashion ($p < 0.05$). The inhibitory effect of amiloride on the growth of Capan-1 cells was firstly shown at the concentration of 5 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 after 4 days treatment, and ninety-three percent inhibition of growth was found at an amiloride concentration of 160 μ M after 4 days treatment. The inhibitory effect of amiloride on growth of Capan-1 cells was reversible since removal of amiloride by a media change after 48 hours treatment lead to significantly more growth than amiloride treated group ($p < 0.05$). The reversibility of growth inhibition suggests that amiloride is not a non-specific cytotoxin for Capan-1 cells. Amiloride combined with 5-FU significantly inhibited the growth of Capan-1 cells in a dose-dependent fashion compared to an amiloride or a 5-FU alone ($p < 0.05$). After four days treatment with 20 μ M amiloride, the fraction of cells in G0-G1 phase, S phase and G2-M phase was 47.3%, 35.8%, 16.9% respectively in the amiloride group (20 μ M), and 44.3%, 37.1%, 18.6% in the control group, showing no significant differences between the two groups. **Conclusions** Amiloride significantly inhibited the growth of Capan-1 cells in a dose-dependent fashion, which was reversible. The reversibility of growth inhibition suggests that amiloride is not a non-specific cytotoxin for Capan-1 cells. The concentration of 5 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), which suggests amiloride or its analogues may be used alone or in conjunction with 5-FU for the treatment of pancreatic carcinoma. Further study is needed to clarify the effects of more potent analogues of amiloride on the growth of human pancreatic carcinoma cells.

Key words : Amiloride, 5-FU, human pancreatic carcinoma cells (Capan-1)

서론

교신저자 : 구 자 영
주소 : 부산시 서구 압남동 34번지 고신대학교 복음병원
내과학 교실(602-702)
전화 : 051-990-6103 Fax : 051-248-5686
E-mail : jykoo@ns.kosinmed.or.kr

췌장암은 구미에서는 상당히 흔한 암으로서 미국의
경우 암 사망원인으로서 남자에서는 4번째, 여자에서는

* 이 논문은 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해서 연구되었음.

5번째를 차지할 정도로 흔하며¹⁾, 최근 우리나라에서도 증가하는 경향을 보이고 있다. 췌장암은 조기진단이 어려워져 진단시에 이미 병이 많이 진행되어 있어서 수술로서 완치가 불가능한 경우가 많고, 이러한 경우에는 항암치료나 방사선치료등을 시도하지만 그 효과가 좋지 않고 부작용 또한 적지 않아서 만족할 만한 치료법이 되지는 못한다.

따라서 이러한 항암제와 작용기전이 다르면서도 병용투여시에 항암제의 부작용을 줄이거나 항암제의 효과를 증강시킴으로써 그 치료효과를 높일 수 있는 약물들에 대한 연구는 매우 바람직하며 또한 필요한 실정인데, 이러한 약물들중의 하나로서 포유류의 여러 동물들의 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 가역성임을 밝혔다. 또한 이 억제제의 기전으로서 ornithine decarboxylase(ODC) 활성도의 억제 및 polyamine 합성의 억제가 관여하고, 이러한 면에서 amiloride가 항암제로서 유용할 것으로 보고하였다. 그리고 Delvaux 등⁹⁾은 amiloride 및 그 유사체가 췌장선외세포주인 AR42J세포에서 Na^+/H^+ antiporter의 작용을 억제하는 동일 농도에서 세포의 증식도 억제함을 보고하였고, Tatsuta 등¹⁰⁾은 amiloride투여가 azaserine의 쥐 췌장암의 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 왔지만^{11,12)} 지금까지 국내외적으로 인체의 췌장암에 대한

amiloride의 효과를 연구한 보고는 없다.

이에 본 연구에서는 이러한 Na^+/H^+ antiporter의 억제 약물인 amiloride가 췌장암의 치료에 도움이 될지를 좀 더 자세히 구명하기 위해 세포배양실험을 통하여 amiloride가 인체 췌장암세포의 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 Sigma 회사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100 units/ml penicillin-streptomycin은 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. amiloride는 amiloride는 실험할 때에 DMSO용액에 녹여서 바로 사용하였고, 5-FU는 PBS에 녹여 바로 사용하였다.

2. 세포 배양

Capan-1 세포는 한국세포주은행 으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였고, 세포배양은 CO_2 incubator(Sanyo, model MCO96, Japan)를 사용하였다. Capan-1 세포는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 15%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO_2 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 이상일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

3. amiloride의 Capan-1 세포 증식억제 효과

증식기에 있는 Capan-1 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 10×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M의 농도로 amiloride 10 μ l를 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 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 Capan-1 세포 증식억제 효과의 가역성

amiloride가 Capan-1세포에 미치는 증식억제작용의 가역성 여부를 조사하기 위해서 증식기에 있는 Capan-1 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 2×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 amiloride 20 μ M를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 다시 48시간 배양하였고, 이 때에 배지를 갈아 주면서, 3 well에는 amiloride를 제거하였고, 다른 3 well에는 그대로 둔채, 제거한 날부터 2일, 4일, 6일 째에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포 수를 hemocytometer로 측정하였다. 그렇게 측정된 세포 수를 대조군의 세포수와 비교하여 암세포 증식 억제효과와 가역성 여부를 관찰하였다.

5. amiloride와 5-FU가 Capan-1 세포의 증식에 미치는 상호작용

amiloride와 5-FU가 Capan-1 세포의 증식에 미치는 상호작용을 알기 위해서 증식기에 있는 Capan-1 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된

세포를 분리하여 원심분리한 후, 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 10×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 하룻밤 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 대조군, amiloride 10 μ M, amiloride 20 μ M, 5-FU 0.1 μ g/ml, 5-FU 0.3 μ g/ml, 5-FU 0.1 μ g/ml + amiloride 10 μ M, 5-FU 0.3 μ g/ml + amiloride 10 μ M, 5-FU 0.3 μ g/ml + amiloride 20 μ M의 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 세포들의 수를 hemocytometer로 측정하여 대조군의 세포 수와 비교하여 각 군의 암세포 증식 억제효과를 관찰하였다.

6. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

amiloride가 Capan-1 세포에 있어서 cell cycle의 어느 단계를 지연시키는지 flow cytometry를 이용하여 2회 시행, 분석하였다. amiloride 20 μ M을 첨가한 배지에서 4일간 배양된 세포를 PBS용액으로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol로 고정하였다. 고정 후 RNase A(Sigma, USA)를 넣어서 RNA를 처리하고 DNA intercalating dye인 propidium iodide(Sigma, USA)로 DNA를 염색하여 Becton Dickinson FACStar Flow Cytometer 및 Becton Dickinson Cell Fit Software를 이용하여 세포주기를 비교 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 Capan-1 세포 증식억제 효과

amiloride를 1 μ M 첨가 후 2일 째의 Capan-1 세포 수는 $(44 \pm 3) \times 10^4$ 였고, amiloride를 첨가하지 않고 0.4% DMSO만 첨가한 대조군의 경우 2일 째의 세포 수는

인체 췌장암세포주(Capan-1)의 증식에 미치는 amiloride의 억제효과

(45±3)(x10⁴)로서 amiloride 50 µM 첨가군에서 대조군에 비하여 증식이 약간 억제 되었으나 통계적인 유의성은 없었고, amiloride 1 µM 첨가 4일 췌의 세포 수는 (83±3)(x10⁴)로서 대조군의 (83±4)(x10⁴)과 큰 차이가 없었다. 그러나 첨가된 amiloride 농도가 5 µM인 경우, 2일 췌의 Capan-1 세포 수는 (37±1)(x10⁴)로서 대조군의 2일 췌 세포 수인 (45±3)(x10⁴)보다 유의하게 세포 수가 감소됨으로써 2일 췌부터 세포의 증식이 의미있게 억제 되었고(p<0.05), 4일췌는 그 수가 (72±3)(x10⁴)으로서 대조군의 (83±4)(x10⁴)에 비해 현저하게 그 증식이 억제 됨을 볼 수 있었다(p<0.05).

그리고 amiloride의 농도를 10, 20, 40, 80, 160 µM로 증가시킴에 따라 2일췌와 4일췌 모두 Capan-1 세포의 증식이 점점 더 많이 억제되었다. 즉, 2일췌와 4일췌의 Capan-1 세포 수는 10 µM의 경우 각각 (30±3, 57±2)x10⁴, 20 µM의 경우 (21±2, 42±2)x10⁴, 40 µM의 경우 (14±2, 28±3)x10⁴, 80 µM의 경우 (8±2, 16±3)x10⁴, 160 µM의 경우 (3±1, 6±1)x10⁴로서 대조군의 (45±3, 83±4)x10⁴에 비하여 amiloride의 농도에 비례해서 유의하게 그 증식이 억제됨을 보여 주었다(p<0.05). 특히 amiloride 160 µM을 첨가한 후 4일 췌의 세포수가 (6±1)x10⁴로서 대조군의 (83±4)(x10⁴)에 비하여 93%의 증식억제를 보였고, 20 µM의 농도에서는 대조군에 비해 49%의 증식억제를 보였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effects of amiloride(µM) on 2 days and 4 days treatment of Capan-1 cells

		Cell number × 10 ⁴	
		2 days	4 days
amiloride	0+	45±3 ^a	83±4 ^a
	1	44±3 ^a	83±3 ^a
	5	37±1 ^b	72±3 ^b
	10	30±3 ^c	57±2 ^c
	20	21±2 ^d	42±2 ^d
	40	14±2 ^e	28±3 ^e
	80	8±2 ^f	16±3 ^f
	160	3±1 ^g	6±1 ^g

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

+ control group, to which only vehicle(DMSO) was added

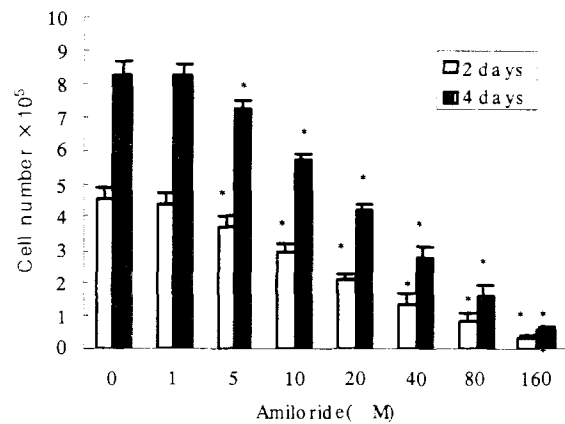


Figure 1. Effects of amiloride on 2 days and 4 days treatment of Capan-1 cells. *p < 0.05 vs. control

2. amiloride의 Capan-1 세포 증식억제 효과의 가역성

amiloride의 증식억제작용의 가역성을 보고자 한 실험에서, amiloride를 처음부터 첨가하지 않은 대조군과 amiloride 첨가후 4일췌에 약 50%의 증식억제효과를 보인 amiloride 20 µM을 첨가하여 48시간 동안 배양시킨 후 amiloride를 제거한 군, 그리고 amiloride 20 µM을 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 Capan-1세포 수는 각각 (3.5±0.5)x10⁴ 및 (4.5±0.5)x10⁴로서 차이가 없었고, 양 군 모두 대조군의 (8±1)x10⁴ 보다는 그 수가 적었으나 통계학적인 유의성은 없었다. amiloride를 제거한 지 2일 췌의 제거군의 Capan-1세포 수는 (18±2)x10⁴로서 amiloride 첨가군의 (10±2)x10⁴에 비하여 상당히 많았으나 통계학적인 유의성은 없었고, 대조군의 (30±2)x10⁴보다는 현저히 적었으며(p<0.05), amiloride 첨가군과 대조군사이에도 그 세포 수에 유의한 차이를 보였다(p<0.05).

amiloride를 제거한 지 4일 췌에 amiloride제거군의 Capan-1세포 수는 (41±3)x10⁴로서 amiloride를 제거하지 않은 군의 (30±2)x10⁴과 비슷하였고, 대조군의 (59.5±3.5)x10⁴에 비해서 유의하게 세포 수가 적음으로써(p<0.05), 제거 2일췌의 결과와 비슷하게 amiloride의 증식억제 작용이 그것을 제거한지 4일췌에도 아직 어느 정도 남아 있음을 나타내었다.

그러나 amiloride를 제거한 지 6일째에는 amiloride 제거군의 Capan-1세포 수가 $(72 \pm 2) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(81.5 \pm 1.5) \times 10^4$ 와 거의 비슷한 정도를 보인 반면(대조군의 90.0%, p:ns), amiloride를 제거하지 않았던 군의 $(39.5 \pm 3.5) \times 10^4$ 보다는 훨씬 더 많음(첨가군의 175.0%)를 보여 주었다($p < 0.05$). 그리고 amiloride를 제거한 군에서 amiloride를 제거한 날과 2일사이의 증식비율이 4.5배로서 대조군의 3.5배보다도 높았고, amiloride를 제거하지 않았던 군의 2.5배보다는 현저히 높았으며, 이러한 경향은 amiloride를 제거한지 4일과 6일 사이의 증식비율에서도 잘 관찰 됨으로써 amiloride의 증식 억제 작용이 가역성임을 보여 주었다.(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Reversibility of effects of amiloride(20 μ M) on the growth of Capan-1 cells.

	Cell number $\times 10^4$				
	0day	2days	4days	6days	8days
Control	2	8 ± 1^a	30 ± 2^a	59.5 ± 3.5^a	81.5 ± 1.5^a
Amiloride removed [*]	2	3.5 ± 0.5^b	$3.5^{1)}$	2	1.4
			18 ± 2^b	41.0 ± 3^b	72.0 ± 2^a
Amiloride	2	4.5 ± 0.5^b	4.5	2.3	1.8
			10 ± 2^b	30.0 ± 2^b	39.5 ± 3.5^b
			2.5	3	1.3

* amiloride treatment for 48 hours followed by replacement with amiloride-free medium.

^{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

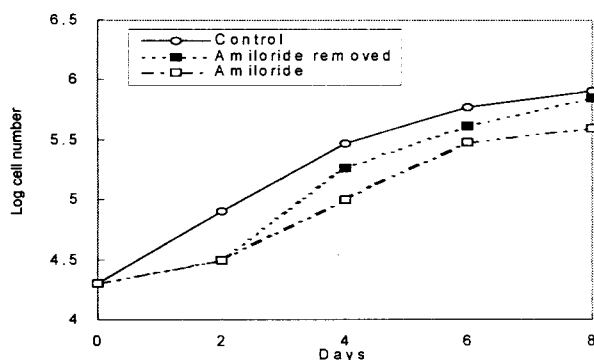


Figure 2. Reversibility of effects of amiloride(20 μ M) on the growth of Capan-1 cells.

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 Capan-1 세포의 증식에 미치는 상호작용

Table 3에서 보는 바와 같이 배양 4일째의 대조군의 Capan-1세포 수는 $(82 \pm 5) \times 10^4$ 였고, amiloride 10 μ M 첨가군 및 amiloride 20 μ M첨가군의 세포수는 각각 $(56 \pm 2) \times 10^4$ 및 $(47 \pm 2) \times 10^4$ 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 $(73 \pm 2) \times 10^4$ 및 $(64 \pm 2) \times 10^4$ 로서 양군 모두 대조군의 $(82 \pm 5) \times 10^4$ 과 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 M첨가군의 세포수는 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($p < 0.05$).

그리고 5-FU의 증식억제 작용에 미치는 amiloride의 영향을 살펴 보면, 5-FU 0.1 μ g/ml과 amiloride 10 μ M을 병용 첨가한 군의 Capan-1세포 수는 $(43 \pm 3) \times 10^4$ 로서 5-FU 0.1 μ g/ml만을 첨가한 군의 $(73 \pm 2) \times 10^4$ 이나 amiloride 10 μ M 단독 첨가군의 $(56 \pm 2) \times 10^4$ 에 비하여 세포 수가 유의하게 적었다($p < 0.05$). 이로써 5-FU 0.1 μ g/ml나 amiloride 10 μ M 단독에 의한 Capan-1세포에 대한 증식억제효과보다 두 약제를 병용했을 때에 그 효과가 더 큼을 알 수 있었다(Fig. 3).

Table 3. Effects of amiloride(μ M) and/or 5-fluorouracil(μ g/ml) on 4 days treatment of Capan-1 cells.

	Cell number $\times 10^4$	Inhibition rate (%) ¹⁾
Control	82 ± 5^a	
Amiloride 10	56 ± 2^d	31.8
Amiloride 20	47 ± 2^e	42.7
5FU 0.1	73 ± 2^b	11.0
5FU 0.3	64 ± 2^c	22.0
5FU 0.1 + Amiloride 10	43 ± 3^e	47.6
5FU 0.3 + Amiloride 10	33 ± 3^f	59.8
5FU 0.3 + Amiloride 20	22 ± 3^g	73.2

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

¹⁾ Inhibition rate compared to control group

인체 췌장암세포주(Capan-1)의 증식에 미치는 amiloride의 억제효과

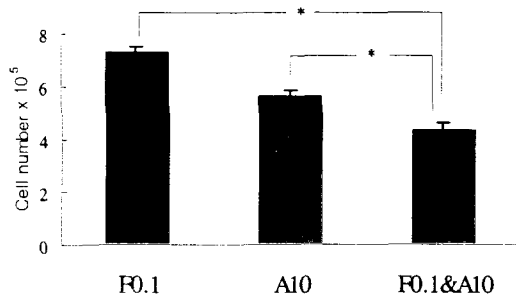
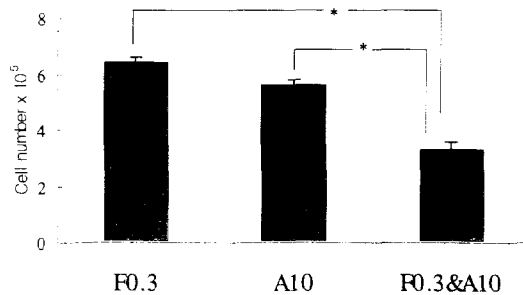


Figure 3. Effects of amiloride(μ M) and/or 5-FU(μ g/ml) on 4 days treatment of Capan-1 cells. * $p < 0.05$

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

한편 5-FU 0.3 μ g/ml과 amiloride 10 μ M의 병용첨가군의 세포 수는 $(33 \pm 3) \times 10^4$ 로서 5-FU 0.3 μ g/ml만을 첨가한 군의 $(64 \pm 2) \times 10^4$ 이나 amiloride 10 μ M 단독 첨가군의 $(56 \pm 2) \times 10^4$ 에 비하여 세포 수가 현저하게 적었다 ($p < 0.05$)(Fig4).

Figure 4. Effects of amiloride(μ M) and/or 5-FU(μ g/ml) on 4 days treatment of Capan-1 cells. * $p < 0.05$



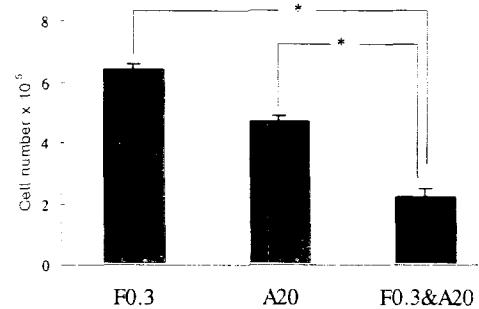
F: treatment with 5-FU A: treatment with amiloride
F & A: treatment with 5-FU & amiloride

이러한 경향은 amiloride의 농도를 높여 5-FU 0.3 μ g/ml과 amiloride 20 μ M을 병용 첨가했을 때에 더 뚜렷해져서 그 세포 수가 $(22 \pm 3) \times 10^4$ 으로서, 5-FU 0.3 μ g/ml 단독첨가군의 세포 수 $(64 \pm 2) \times 10^4$ 나 amiloride 20 μ M 단독첨가군의 $(47 \pm 2) \times 10^4$ 보다 현저하게 낮음을 볼 수 있었다. ($p < 0.05$)(Fig.5).

그리고 5-FU 0.1 μ g/ml과 amiloride 10 μ M을 병용 첨가한 군에서는 대조군에 비해서 47.6%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.1 μ g/ml 단독첨가군과 amiloride 10 μ M 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($11.0 + 31.8 = 42.8\%$)과 유

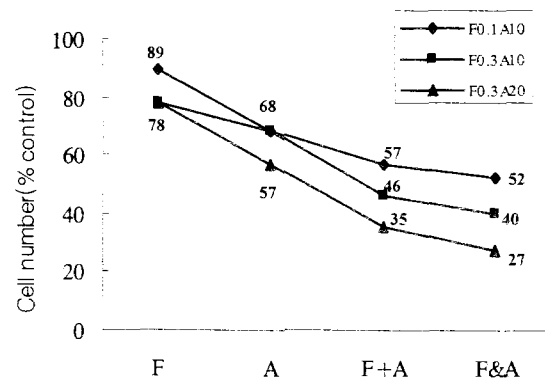
사한 정도를 나타냄으로, 두 약물이 상승작용을 가지고 있음을 시사하였다. 그리고 이러한 경향은 5-FU 0.3 μ g/ml과 amiloride 10 μ M을 병용 첨가군에서 대조군에 비해서 59.8%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.3 μ g/ml 단독첨가군과 amiloride 10 μ M 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($22.0 + 31.8 = 53.9\%$)과 유사한 정도를 나타낸 성적과, 5-FU 0.3 μ g/ml과 amiloride 20 μ M을 병용 첨가군에서 대조군에 비해서 73.2%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.3 μ g/ml 단독첨가군과 amiloride 20 μ M 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($22.0 + 42.7 = 64.7\%$)과 유사한 정도를 나타내었던 결과에서 더욱 뚜렷하였다(Fig. 6).

Figure 5. Effects of amiloride(μ M) and/or 5-FU(μ g/ml) on 4 days treatment of Capan-1 cells. * $p < 0.05$



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

Figure 6. The effects of amiloride(M) and/or 5-FU(g/ml) on 4 days treatment of Capan-1 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 체장암세포를 이용하여 세포주기 측정을 하였는데, 대조군의 경우 G0-G1기가 44.3%, S기는 37.1%, G2-M기는 18.6%였고, amiloride 20 μ M 첨가군에서는 G0-G1기가 47.3%, S기는 35.8%, G2-M기가 16.9%로서 양군 사이에 큰 차이가 없었다(Table 4).

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

Sample(μ M)	% of cells		
	G0/G1	S	G2/M
Control	44.3	37.1	18.6
Amiloride(20)	47.3	35.8	16.9

고찰

고형암은 혈액 공급이 충분하지 않아 저산소혈증에 노출된 부분이 있으며¹³⁾, 이 부위는 정상 조직에 비하여 산성을 띄게 된다고 하며 정상조직의 세포의 pH가 7.1에서 7.6정도인데 반하여 암조직의 세포의 pH는 6.5에서 7.0으로 측정되었다.¹⁴⁾ 그리고 P-NMR-spectroscopy로 측정한 세포내 pH는 정상조직과 암조직간에 차이가 없었다.¹⁵⁾ 이러한 정상조직과 암조직간의 산도의 차이는 암조직에만 선별적으로 작용하는 치료법의 가능성을 제공한다고 할 수 있는데⁶⁾, 산도가 높은 환경에서 세포내 pH를 조절하는데 관여한다고 알려진 두 가지 중요한 exchangers인 stilbene-sensitive Na⁺ dependent HCO₃⁻/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 포유류 동물의 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 섬유아세포 증식의 초기 단계에서 그 증식을 유발하는데 아주 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져

있다³⁻⁵⁾. 그리고 이 Na⁺/H⁺ antiporter는 insulin, 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. 최근 Rich 등²²⁾은 leukemia세포가 가장 강력한 amiloride의 유사체인 5-(N,N-hexamethylene)-amiloride(HMA)투여에 따르는 Na⁺/H⁺ antiporter의 억제로 인해서 세포의 자연사가 일어난다고 보고하면서 amiloride와 그 유사체들^{5,23,24)}이 백혈병의 치료제로 유용할 것이라고 보고하였다. 따라서 이러한 Na⁺/H⁺ antiporter를 억제하는 것으로 알려진 amiloride와 그 유사체들은 여러 종류의 암의 치료제로서의 가능성을 충분히 지니고 있다.⁶⁾

지속적인 이노작용에 따르는 K⁺ 이온의 소실을 막아주는 이노제 amiloride는 1967년 Cragoe 등²³⁾에 의하여 처음으로 합성되었고, 신세뇨관 상피세포의 나트륨통로를 가역적으로 차단시킴으로써 이노 효과를 나타내게 된다고 알려져 있으며,²⁵⁾ amiloride에 감수성이 있는 나트륨통로는 신세뇨관 뿐만 아니라 신피질 집합세뇨관²⁴⁾과 신수질부와 신유두부의 집합세뇨관^{27,28)}, 그리고 방광²⁹⁾과 원위부 대장, 기관, 땀샘관³⁰⁾에도 존재한다. 약물역동학적 연구에 의하면 amiloride가 세포외부의 Na⁺의 유입을 경쟁적으로 억제함으로써 Na⁺/H⁺ antiporter의 작용을 억제한다고 하며³¹⁾, 생리적인 Na⁺ 농도에서는 amiloride 0.1-1 mM의 농도에서 Na⁺/H⁺ antiporter를 억제하는데³²⁾ 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), EIPA(5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride) 및 5-(N,N-hexamethylene)-amiloride(HMA)등이 개발되었는데, Na⁺/H⁺ exchanger억제도가 amiloride에 비하여 각각 DMA는 20배, MIBA는 100배, EIPA는 200배, HMA는 500배 더 높

다.³³⁾

본 연구에서 amiloride를 투여한 군에서 amiloride 대신 DMSO를 첨가했던 대조군에 비하여 Capan-1세포의 증식이 억제되었으며, 그 효과는 5 μ M의 농도에서 처음 나타났고 10~160 μ M로 증가함에 따라서 더욱 더 현저해졌다. 이러한 결과는 췌장암에 대한 amiloride의 증식억제 효과를 처음으로 실험실에서 입증한 것으로서, 인체 대장암세포(HT-29)를 이용한 이전의 Koo등^{7,8)}의 연구에 뒤이어 다른 소화기암에서의 amiloride의 증식억제효과를 확인한 것이라고 하겠다.

본 연구에서 amiloride의 증식억제 효과의 기전으로서는 amiloride의 농도가 50 μ M에서 800 μ M사이에서 Na⁺/H⁺ antiporter를 억제한 이전의 보고³²⁾로 미루어 생각해 볼 때, Na⁺/H⁺ antiporter의 억제 가능성을 생각할 수 있다. 그러나 amiloride의 경우 이러한 농도에서 단백질 합성을 저해하거나³⁴⁾ 여러 종류의 protein kinases^{35,36)}나, Na⁺/K⁺ ATPase³²⁾의 활성을 저하시키는 것으로 알려져 있으므로, 이들에 대한 앞으로의 연구도 필요할 것으로 생각되었다. 그리고 본 연구에서 amiloride가 Capan-1세포의 증식을 억제 했던 최소농도는 5 μ M로서 Koo등^{7,8)}이 대장암에서 보고한 amiloride의 최소 유효농도였던 50 μ M보다 훨씬 낮았는데, 그 원인으로서는 각 암세포에 따라 Na⁺/H⁺ antiporter의 활성정도가 다른 점을 생각할 수 있으며^{30,37)}, 실제 췌장선암세포인 AR42J세포는 Na⁺/H⁺ antiporter를 지니고 여러 외부로부터의 신호에 대해서 Na⁺/H⁺ antiporter를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며³⁸⁾, 이로 미루어 볼 때에 췌장암의 증식도 이러한 Na⁺/H⁺ antiporter의 활성화와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며, 이는 간암세포주에서도 보고되고 있다³⁷⁾.

그리고 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 보고들과도 일치된다^{7,8,39)}. 그리고 이러한 가역성은 amiloride가 가지는 Na⁺/H⁺ antiporter에 대한 억제 작용이 가역적인 점³⁰⁾과 상통하는 소견으로서 amiloride의 작용기전이 비특이적이거나 세포독성에 기인하는 것은 아니라는 것을 의미

한다고 할 수 있겠다.

5-FU는 1957년에 처음으로 합성되었으며⁴⁰⁾ 세포핵내에서 대사되어 thymidylate synthase의 기능을 억제하여 DNA합성을 저해시키거나, RNA에 결합하여 RNA의 기능을 방해하여 세포독성을 나타낸다.⁴¹⁾ 인체 위암세포주를 이용한 연구에서 5-FU 단독 보다는 recombinant human interleukin-2와 recombinant human tumor necrosis factor와의 병용 요법시 항암효과가 더 낫다고 하였으며⁴²⁾, nucleoside운반 억제제인 dipyrindamole과 5-FU를 병용하여 인체대장암세포주인 HCT116에 투여하였을 때 5-FU의 항암작용을 농도에 비례하여 증가시켰다.⁴³⁾

본 연구에서 5-FU와 amiloride의 병용 투여는 Capan-1세포의 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 수긍할 수 있겠다. 본 연구에서 amiloride가 췌장암의 항암치료제로 가장 효과가 좋은 5-FU와 이러한 상가작용을 보이는 것은 실제로 임상에서 두 가지 약물을 병용 치료함으로써 5-FU의 항암작용을 증강시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 amiloride의 농도 5~160 μ M이 실제 amiloride가 임상에서 사용될 때 사람에서의 혈중 농도의 25~320배가 된다는 보고⁴⁴⁾도 있음을 감안할 때에 본 연구에서 사용한 농도보다 더 낮은 농도(예를 들면, 0.1~0.2 μ M)에서 5-FU와의 병용효과를 검토하는 일이 필요하며, 또한 Na⁺/H⁺ antiporter 억제능이 amiloride 보다 20배에서 500배정도 더 높은 amiloride 유사체들³³⁾을 사용하여 5-FU와의 병용효과를 조사함으로써 임상에서의 사용 가능성에 대해 더 검토하는 것이 필요하다고 생각되었다.

본 연구에서 amiloride 20 μ M 첨가 유무에 따르는 Capan-1세포의 세포주기 측정결과는 대조군의 경우 G0-G1기가 44.3%, S기는 37.1%, G2-M기는 18.6%였고, amiloride 20 μ M 첨가군에서는 G0-G1기가 47.3%, S기는 35.8%, G2-M기가 16.9%로서 양군 사이에 큰 차이가 없었다. Paner 등³⁹⁾은 amiloride 1.0 mM이 혈청에 의해서 일어나는 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 DNA합성을 약간 감소시킨다고 하였다. 또한 Koo등^{7,8)}은 인 대장암세포(HT-29)를 이용한 연구에서 amiloride 투여군에서 ornithine decarboxylase(ODC)활성도 및 polyamine uptake가 유의하게 억제되었다고 하였는데 ODC의 활성화는 mid-G1기의 표지자로서 알려져 있으므로⁴⁵⁾ amiloride에 sensitive한 Na^+/H^+ antiporter 활성화가 G1기에서 다음 세포주기로 진행하는데 있어서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였다. 따라서 세포주기의 분포가 대조군과 amiloride군과의 차이가 없었던 본 연구에서의 성적에 대해서는 추후 더 자세한 검토가 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

결 론

이상의 결과에서, amiloride가 농도에 비례하여 인체췌장암세포의 증식을 억제하였고, 그 증식억제 효과는 가역성임을 나타 내었으며, 이로써 amiloride가 비특이적인 세포독이 아님을 알 수 있었다. 그리고 amiloride와 기존의 항암제인 5-FU를 병용 투여하였을 경우 amiloride나 5-FU 단독 투여군에 비하여 현저한 증식억제를 보였으며 농도에 비례하여 상가효과가 있음을 시사하였다. 이로써 본 연구에서 처음으로 amiloride가 단독 혹은 5-FU와 같이 췌장암의 치료제로서 사용될 수 있는 가능성을 보여 주었으며, 앞으로 본 연구에서 사용된 용량보다 훨씬 더 낮은 농도에서 5-FU와의 병용효과를 검토하는 것이 중요하다고 할 수 있겠다. 또한 향후 Na^+/H^+ antiporter 억제능이 amiloride 보다 20배에서 500배정도 더 높은 amiloride 유사체들에 대한 연구를 더 깊이 진행하여 실제 췌장암환자에서 효과가 좋으면서도 부작용은 항암제보다 적은 치료제로서의 가능성에 대해서도 더 연구해야 할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotos GG: Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumor suppressor genes, growth factors, and their receptors from clinical perspective. *Cancer*

- Treat Rev 26:29-52, 2000
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). *Gastroenterolgy* 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. Delvaux M, Bastie MJ, Chentoufi J, Cragoe EJ, Vaysse JN, Ribet A: Amiloride and analogues inhibit Na^+/H^+ exchange and cell proliferation in AR42J pancreatic cell line. *Am J Physiol* 259: G842- G849, 1990
10. 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
11. 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
12. 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
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
20. tin D, Steele-Norwood D, Grinstein S, Tannock L: Requirement of the Na⁺/H⁺ exchanger for tumor growth. *Cancer Res* 49: 205-211, 1989
22. Rich IN, Diana WW, Garden OA, Musk P: Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger. *Blood* 95: 1427-1434, 2000
23. Cragoe EJ Jr, Woltorsdorf OW, Bicking JB: Pyrazine diuretics. II.
24. N-amidino-3-amino-5-substituted-halopyrazinecarboxamides. *J Med Chem* 10: 66-75, 1967
25. Kleyman R, Cragoe Jr EJ: amiloride and its analogues as tools in the study of ion transport. *J Membrane Biol* 105: 1-21, 1988
26. Bentley PJ: amiloride: A potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J Physiol* 195: 317-330, 1968
27. 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
28. 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
29. 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
30. Lewis SA, Diamond JM: Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Membrane Biol* 28: 1-40, 1976
31. Kleyman R, Cragoe Jr EJ: The mechanism of action of amiloride. *Sem Nephrol* 8: 242-248, 1988
32. 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
33. 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
34. 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
35. Lubin M, Cahn F, Coutermarsh BA: amiloride, protein synthesis, and activation of quiescent cells. *J Cell Physiol* 113: 247-251, 1982
36. Davis RJ, Czech MP: amiloride directly inhibits growth factor receptor tyrosine kinase activity. *J Bio Chem* 260:2543-2551, 1985
37. 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 Chem* 260:1155-1159, 1985
38. 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 insulinlike growth factor-II on Na⁺/H⁺ exchange activity. *Hepatology* 22: 588-597, 1995
39. Bastie MJ, Williams JA: Gastrointestinal peptides activate Na⁺/H⁺ exchanger in AR42J cells by increasing its affinity for intracellular H⁺. *Am J Physiol* 259: G958-G966, 1990
40. 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
41. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Daneberg P: Fluorinated pyrimidines. A new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 179: 663, 1957
42. Bruce AC, Dan LL: Cancer chemotherapy and biotherapy. 2nd edition: 149-211, 1996
43. Li Y, Ito S, Cheng W, Ishii Y: Combined effect of 5-fluorouracil and recombinant tumor necrosis factor against human gastric carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 16:1771-1774, 1996
44. Jean LG: Biochemical modulation of fluorouracil by dipyridamole: preclinical and clinical experience. *Seminars in Oncology* 19: 56-65, 1992
45. Kleyman R, Cragoe Jr EJ: The mechanism of action of amiloride. *Sem Nephrol* 8: 242-248, 1988
46. 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