韓國家畜繁殖學會誌 17(1) : 49~56(1993)
Korean J. Animal Reprod.

유선발달에 있어서 cAMP, EGF, IGF-I 및 단백질 인산화 작용의 역할
Ⅰ. EGF, IGF-I 및 Photoreactive Cyclic AMP가 유선상피세포의 DNA합성에 미치는 효과

여인서 · 박춘근 · 홍병주
강원대학교 축산대학

Role of cAMP, EGF, IGF-I and Protein Phosphorylation in Mammary Development
Ⅰ. Effect of EGF, IGF-I and Photoreactive Cyclic AMP on DNA Synthesis of Mammary Epithelial Cell

Yuh, I. S., C. K. Park and B. J. Hong
College of Animal Agriculture, Kangwon National University, Chuncheon

SUMMARY

Mouse mammary epithelial cells(NMuMG) were plated onto 24 well plates(100,000 cells/well), in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. After serum starvation for 24 hours, EGF(0~100ng/ml) was added simultaneously with IGF-I(10 ng/ml), 1 μM photoreactive cAMP(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine-3',5' cyclic monophosphate, DMNB) or IGF-I plus DMNB. After 2 hours, the cells were exposed to UV light(300nm, 3 second pulse) in order to activate DMNB which induces a rapid transient increase in intracellular cAMP upon UV irradiation. DNA synthesis was estimated as incorporation of ^{3}H-thymidine into DNA(1 hour pulse with 1 μCi/ml, 18~19 hours after UV exposure). Without IGF-I or DMNB, EGF(10 or 100ng/ml) increased DNA synthesis from 8,362 dpm/well in control to 16,345 or 18,684 dpm/well with EGF(pooled SE=1,239 dpm/well, $P<0.05$). IGF-I or IGF-I plus DMNB alone increased DNA synthesis from 8,362 dpm/well in control to 17,307 or 20,427 dpm/well, respectively($P<0.05$). Addition of IGF-I, DMNB or IGF-I plus DMNB into 0~100ng/ml EGF did not significantly change the shape of dose response curve of EGF alone. In other experiment, EGF or IGF-I was added at the time of UV irradiation(after 2 hours from DMNB addition). Addition of IGF-I plus DMNB into 10ng/ml EGF group exhibited interaction effect in DNA synthesis [EGF(10ng/ml)=18,497; IGF-I+EGF=22,837; DMNB+EGF=20,658; IGF-I+DMNB+EGF=29,658, pooled SE=1,055, $P<0.05$]. These results indicate that simultaneous activation of EGF, IGF-I and intracellular cAMP interact in DNA synthesis of mouse mammary epithelial cells.

* 본 논문은 1992년도 교육부 지원 학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구조성비에 의해 연구되었음.

Ⅰ. 서 론

유선조직내 cyclic adenosine-monophosphate (cAMP)의 함량과 유선상피세포의 성장과는 고도의 정의 상관관계가 있는 것으로 보고되어왔다(Loizzi, 1983; Rillema, 1976; Sapag-Hagar와 Greenbaum, 1974; Sheffield 등, 1987).

이와 같은 사실에서 cAMP가 유선상피세포의 증식작용에 매우 중요한 정보전달물질임을 제시하여 왔으며, 이를 확인하기 위하여 세포내 cAMP함량을 높이는 여러 종류의 생화학물질을 *in vivo* 및 *in vitro* 상태에서 첨가시키므로서 cAMP가 유선상피세포의 증식에 관여한다는 사실을 거듭 확인하여 왔다(Sheffield, 1989a; Sheffield, 1989b; Sheffield 등, 1985; Silberstein 등, 1984; Stampfer, 1982).

최근에는 protein kinase A의 antisense oligonucleotides를 유선상피세포에 첨가시킨 결과 유선상피세포의 성장을 억제시키는 것으로 보고되어 왔다(Sheffield, 1991).

지금까지 보고되어온 cAMP와 세포성장에 관한 연구보고는 불가역적으로 장기간 세포내 cAMP함량을 높일 수 있는 cholera toxin을 이용하거나 phosphodiesterase의 작용에 분해되지 않는 cAMP agonist를 이용하므로서 cAMP가 세포성장에 관여하는 중요한 물질임을 확인하여 왔다.

이와 같은 생화학물질의 이용은 세포내 cAMP함량을 높은 농도로 장기간 지속시키기 때문에 비정상적인 생리적인 현상에서 발생되는 세포 증식작용이라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 단시간 동안에 세포내 cAMP함량을 증가시키므로서 지금까지 실험 모델에 이용하여 오던 생화학적 물질보다 정상적인 생리현상에서 더욱 접근하여 세포증식작용에 관여하는 cAMP의 작용을 구체화 시키는데 목적이 있다.

최근에 개발된 "caged-cAMP"는 세포내에서 단시간 동안에만 활성작용을 갖는 물질로, 본 cAMP는 정상적인 생리 조건하에서 발생될 수 있는 작용양식을 연구하기에 적합한 도구로서 이용될 수 있는 것이다. 이 cAMP analog를 세포에 첨가시킬 경우 불활성 상태로 존재하다가 UV(ultra violet)를 노출시키면 세포내에서 단시간내에 활성 cAMP로 전환되며 세포내 phosphodiesterase에 의하여 쉽게 분해되는 특성을 갖고 있다(Blache 등, 1986; Nerbonne, 1986; Nerbonne 등, 1984; Richard 등, 1985; Gurney와 Lester, 1987; Lester와 Nerbonne, 1982).

따라서, 본 연구의 목적은 caged cAMP를 이용하여 단시간내에 cAMP를 세포내에서 유기시키므로 발생되는 DNA합성 정도를 측정하고, 정상적인 생리조건하에서 cAMP에 의한 유선발달 기작을 규명하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 실시하였다. 또한 EGF(epidermal growth factor) 및 IGF-I(insulin like growth factor-I)은 유선상피 세포의 증식작용에 중요한 역할을 담당하고 있는 성장인자임이 보고되어 왔는데(Ethier 등, 1987; Shamay 등, 1990), 이들 성장인자와 cAMP가 유선발달(mammogenesis) 시기에 병행하여 세포증식 작용에 관여할 것으로 기대되어 이들 간의 세포성장에 미치는 상호작용을 검토하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 유선상피세포 배양

NMuMG(normal murine mammary epithelial cells; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 유선상피세포를 24-well 배양접시(Falcon, CA, USA; 100,000 cells/well) 또는 8-chamber plastic culture 슬라이드(Lab-Tek, Miles Scientific, Il, USA; 10,000)에 DMEM 배양액에 10% fetal calf serum(FCS)을 첨가하여 배양하였다. 유선상피세포의 배양은 5% CO_2/95% air 및 37℃ 조건하에서 실시하였다. 유선상피세포를 10% FCS가 함유된 배양액으로 24시간 동안 배양접시에 접착시켰으며, 다음 24시간 동안 FCS가 함유되어 있지 않는 배양액을 이용하여 모든 세포를 세포성장단계의 Go/G1단계에 도달토록 하였다.

2. 처 리

Photoreactive cyclic AMP(DMNB, dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine-3',5' cyclic monophosphate, Molecular Probes, Mo, USA)를 유선상피세포에 처리한 후, 2시간 뒤에 UV를 노출시켜(300nm, 3초간) 세포내에서 불활성 상태로 존재하는 DMNB를 단시간내에 활성 cAMP로 전환시켰다.

Epidermal growth factor(EGF) 및 insulin-like

growth factor-I(IGF-I)과의 병행효과를 위하여, 첫 번째 실험은 DMNB, EGF 및 IGF-I를 단독 또는 병행 처리한 후 2시간 뒤에 UV를 노출시켰으며, 둘째 실험은 DMNB를 세포에 처리한 후 2시간 뒤에 UV를 노출시키고, 동시에 EGF와 IGF-I을 단독 또는 병행으로 첨가하여 DNA합성 정도를 측정하였다.

3. DNA합성(DNA synthesis)

^{3}H-thymidine(New England Nuclear, Wilmington, DE; 78.5~85.6Ci/mmole)을 UV노출 후 18시간 뒤에 1시간 동안 첨가하여 ^{3}H-thymidine(1 μCi/ml)이 DNA로 삽입되는 정도를 DNA합성율로 추정하였다. ^{3}H-thymidine을 1시간 동안 세포에 노출시킨 후 tris-buffered saline(TBS; 150mM NaCl, 50mM Tris, pH 7.5), 10% trichloroacetic acid(TCA)용액 및 100% ethanol로 3번 세척한 후 건조시켜 0.5M NaOH-0.1% Triton-X-100으로 용해하여 scintillation counter로 방사선 정도를 측정하였다.

4. Autoradiography

유선 상피세포를 배양 슬라이드에서 배양시켰으며 모든 처리 및 ^{3}H-thymidine 첨가는 DNA합성에서 나타낸 바와 동일하였다. 그밖에, ^{3}H-thymidine을 1시간 동안 첨가 배양한 후, TBS로 3번 세척하여 10% phosphate-buffered formalin으로 30분간 고정시켰으며, 70% ethanol과 증류수로 3번 세척하여 건조시켰다. 건조 후 슬라이드를 Ilford K5 용액(Polysciences, Inc., PA, USA)에 담그고 건조시켜 빛이 노출되지 않토록 슬라이드 박스에 넣고 4℃에서 9일간 노출시켰으며 Kodak D-19 developer로 현상하고 세포를 hematoxylin으로 염색하여 현미경하에서 세포성장 주기의 S단계에 도달한 세포를 관찰하였다.

5. 통계분석

각 처리내 표본은 2 또는 3개 였으며 3반복 실험을 통하여 실험 결과를 얻었다. 실험자료 분석은 SAS package를 이용하였고, 완전 임의 배치법의 ANOVA로 통계분석하였으며, 각 처리간 비교는 planned comparison에 의하여 비교하였다(Steel and Torrie, 1960).

Ⅲ. 결 과

UV를 노출시키지 않은 그룹에 1 μM DMNB를 첨가시켰을 경우 소량의 DNA합성 증가 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났으며, UV를 노출시킨 그룹에 1 또는 10 μM DMNB를 첨가시킨 구에 있어서는 0 μM DMNB 처리구보다 유의하게 DNA 합성을 증가시켰고($P<0.05$), UV를 노출시키지 않은 그룹의 동일 DMNB 농도에 비교하여 유의하게 DNA 합성 정도를 증가시켰다($P<0.05$, Fig. 1).

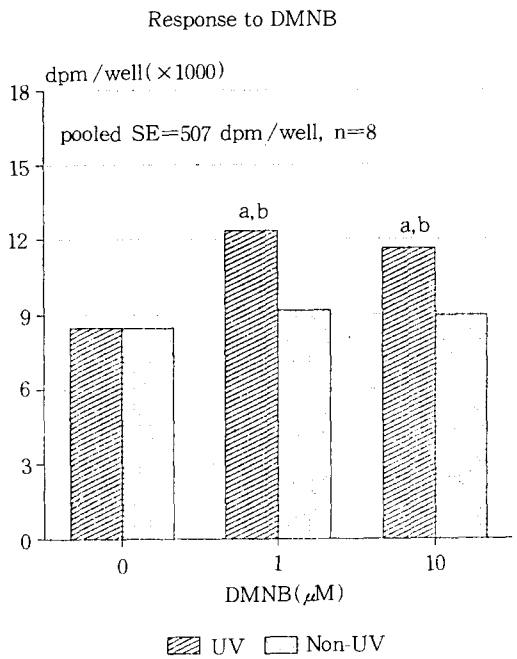

Fig. 1. Effect of dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine-3',5' cyclic monophosphate (DMNB) and UV irradiation on subsequent DNA synthesis in mouse mammary epithelial cells. a = significant effect of DMNB followed by UV irradiation compared to the indicated concentration of DMNB without UV irradiation, b = significant effect of DMNB with UV irradiation compared to no addition of DMNB with UV irradiation($P<0.05$).

UV를 노출시킨 그룹내에서 1~10 μM DMNB 첨가는 0 μM DMNB구에 비교하여 약 40~50%의 DNA합성율을 증진시켰다(pooled SE = 507 dpm /well).

이와 같은 현상은 autoradiography를 이용하여 세포성 장주기의 S단계(DNA 복제단계)에 있는 세포들을 관찰한 결과와 매우 유사하였는데(Fig. 2), UV를 노출시키지 않은 그룹의 0, 1 또는 10 μM DMNB구에 있어서는 각각 4.4, 4.9 또는 4.7%의 세포가 S 단계에 있는 세포로 추정되었으며, UV를 노출시킨 그룹에 있어서는 0, 1 또는 10 μM DMNB구에서 각각 4.5, 7.7 및 7.8%의 세포가 S단계에 있는 세포로 추정되어 단기간 동안 인위적으로 세포내 활성 cyclic AMP를 증진시킨 결과 유의하게 S단계에 있는 세포수를 증진 시키는 것으로 나타났는데(pooled SE = 0.5%, P<0.05), 이는 DNA합성율을 측정한 결과와 매우 유사한 반응이었다.

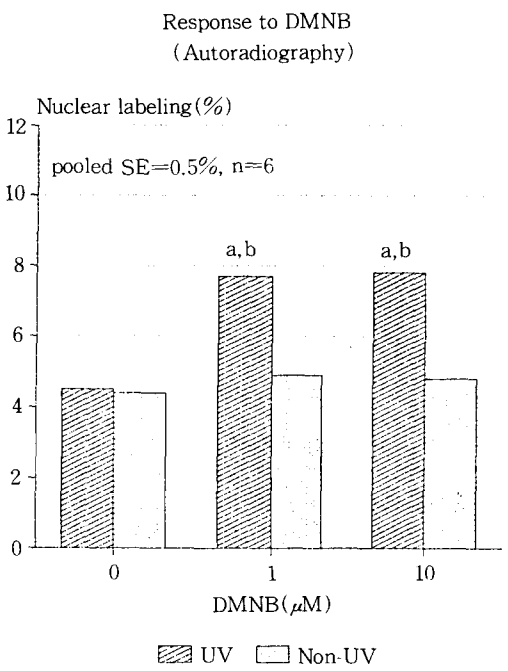

Fig. 2. Effect of DMNB and UV irradiation on nuclear labeling index in mouse mammary epithelial cells. a = significant effect of DMNB followed by UV irradiation compared to the indicated concentration of DMNB without UV irradiation, b = significant effect of DMNB with UV irradiation(P<0.05).

세포배양시 100 μM DMNB를 첨가한 구에서는 세포들이 죽는 현상을 관찰할 수 있었으나(data not shown), 1 또는 10 μM의 DMNB를 첨가시켰을 때 유선상피세포는 정상적으로 배양접시내에서 유지되었는데, 이는 UV노출 또는 UV를 노출시키지 않았을 경우 1 또는 10 μM DMNB 분해산물(dimethoxy nitrobenzene)이 DNA합성 정도에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Fig. 3은 DMNB와 EGF 및 IGF-I을 동시에 첨가시킨 후 2시간 후에 UV를 노출시킨 결과를 보여주는 것이다. IGF-I 및 DMNB를 병행하지 않은 EGF 단독 첨가그룹에서, 10 또는 100ng /ml EGF첨가시 대조구 8,692 dpm /well에 비교하여 16,345 및 18,684 dpm /well의 DNA합성율을 보여 EGF가 유의하게 DNA 합성을 증가시키는 것으로 나타났다(P<0.05).

또한 IGF-I(10ng /ml) 및 IGF-I(10ng /ml) plus DMNB(1 M)를 처리한 구에 있어서는 DNA합성율이 각각 16,640 및 20,093 dpm /well로 대조구의 8,692 dpm /well보다 유의하게 DNA합성율을 증진시켰다(P<0.05). IGF-I, DMNB 또는 IGF-I plus DMNB를 EGF(0.01~100 ng /ml)의 각 농도에 첨가시키고 2시간 후에 UV를 노출시킨 결과, EGF 단독처리에 의한 투여량 반응 곡선(dose response curve)의 모양을 변화시키지 않았으며, 이들 첨가에 따라 상가적으로 곡선을 위쪽으로 이동시키는 현상을 보였는데, 이는 IGF-I, EGF 또는 IGF-I plus EGF에 의하여 유선상피세포의 DNA합성을 유도시키고 2시간 후에 세포내 활성 cyclic AMP에 의하여 DNA 합성을 유도시킨 작용간에는 상호작용 효과가 없음을 나타내 주는 결과였다.

한편, 유선상피세포에 DMNB(1 μM)를 첨가시키고 2시간 후에 UV노출과 동시에 EGF(0~100 ng /ml)와 IGF-I(10ng /ml) 및 EGF plus IGF-I을 첨가시킨 경우(Fig. 4), IGF-I plus DMNB plus EGF(10 or 100ng /ml) 그룹에서 DNA합성 작용에 상호작용 효과(interaction effect)를 볼 수 있었는데 [EGF(10ng /ml) = 17,513; IGF-I + EGF = 22,170; DMNB + EGF = 10,830; IGF-I + DMNB + EGF = 28,258 dpm /well; pooled SE = 898 dpm /well; P<0.05], 이와 같은 사실은 유선상피세

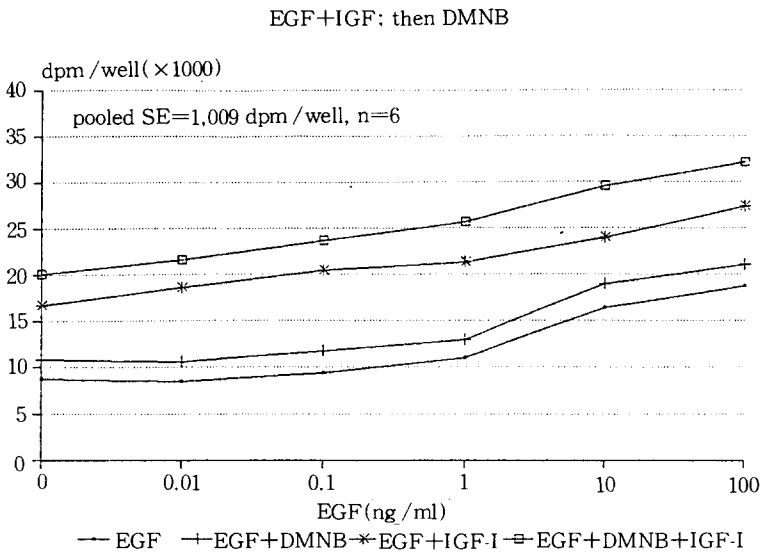

Fig. 3. Effect of epidermal growth factor(EGF), isuline like growth factor-I(IGF-I, 10ng/ml) and DMNB(1 μM), followed by UV irradiation, on DNA synthesis in mammary epithelial cells. EGF and IGF-I added at the same time as DMNB(2 hours prior to UV irradiation). There were no significant interaction effects among EGF, IGF-I and DMNB on DNA synthesis of mouse mammary epithelial cells.

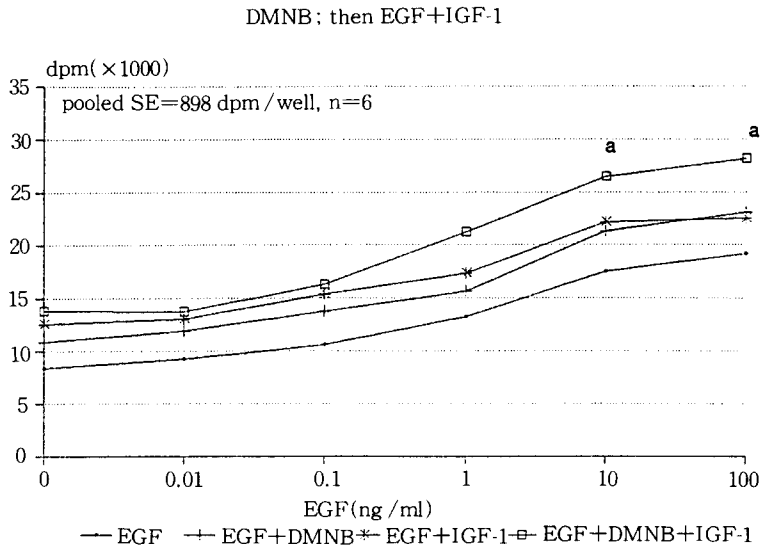

Fig. 4. Effect of EGF(0~100ng/ml), IGF-I(10ng/ml) and DMNB(1 μM), followed by UV irradiation, on DNA synthesis in mammary epithelial cells. EGF and IGF-I added at the time of UV irradiation. a = significant interaction effect among EGF, IGF-I and DMNB[$P<0.05$, EGF(10 or 100 ng/ml)+IGF-I+DMNB minus EGF(10 or 100 ng/ml) alone vs EGF(0 ng/ml)+IGF-I+DMNB minus EGF(0 ng/ml)].

포의 DNA합성을 IGF-I, EGF와 활성 cyclic AMP로 동시에 유도시킬 경우 이들 인자들간에는 DNA합성에 상호작용 효과를 보이는 결과라 할 수 있다. 이들의 실험을 통하여 유선상피세포내 cyclic AMP가 EGF + IGF-I에 의한 DNA합성 경로를 촉진 또는 활성화 시킨 결과로 사료된다.

Ⅳ. 고 찰

본 연구에서 DMNB가 유선상피세포의 DNA합성을 약 40~50% 증가시킨 결과는 Sheffield(1989a)가 adenylate cyclase의 활성자인 cholera toxin을 이용하여 얻은 DNA합성 반응(대조구에 2배 증가)보다는 낮은 것으로 나타났으나, DMNB가 유선상피세포의 DNA합성을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 장기간 그리고 고농도의 cAMP 함량의 증가에 의하여 DNA합성이 유도된 것보다는 단시간 동안의 cAMP 노출에 의하여 야기된 DNA합성 정도가 적지만, 유선상피세포의 DNA합성을 유의하게 증가시켰다는 점에서 매우 흥미로운 결과라 할 수 있다.

지금까지 유선 상피세포의 증식작용을 연구하기 위하여 세포내 장기간 그리고 비생리적인 cAMP의 농도를 유발시키는 생화학적 물질(예, cholera toxin 또는 phosphodiesterase 억제인자들)을 이용하여 유선발달에 관한 기전을 연구하여 왔는데, 이와 같은 생화학적 물질들을 이용하여 얻은 결과들은 cAMP가 장기간 세포내에서 고농도로 존재하기 때문에 발생될 수 있는 비생리적 반응이라 하여 cAMP에 의한 세포 증식작용에 관하여서는 많은 학자들에 의하여 의문점이 제시되어 왔다.

그러나 본 실험에서 단시간 동안의 cAMP 활성작용이 DNA합성을 증가시켰다는 점은 지금까지 cholera toxin이나 phosphodiesterase 억제인자들을 이용하여 얻은 결과들이 정상적인 생리조건 하에서 발생될 수 있는 cAMP작용 양식을 대표할 수 있는 결과들임을 제시하여 주는 결과라 할 수 있다. DMNB와 UV노출에 의하여 증가된 DNA합성 효과는 cAMP 단독작용에 의하여 발생된 것이며 UV에 의한 작용이나, DMNB(dimethoxy nitrobenzene)가 UV에 의하여 분해될 때 생성된 부산물에 의하여 야기된 결과가 아닐 것으로 사료된다(Kaplan 등, 1978; McCray 등, 1980).

Shamay 등(1990)은 EGF, IGF-I 및 phosphodiesterase 억제인자인 IBMX(isobutyl-methylxanthine)를 젖소의 유방에서 얻은 유선상피세포에 병행하여 첨가시켰을시 유선상피세포의 성장에 상호작용 효과가 있음을 보고하였으며 Ethier 등(1987)은 EGF와 cholera toxin을 병행하여 쥐 유선상피세포에 첨가시킨 결과 세포성장에 상호작용 효과를 나타내었다.

본 연구의 결과에서는 EGF와 IGF-I을 첨가시키고 2시간 후에 cAMP작용을 활성화 시킨 실험에서는 DNA합성에 상호작용 효과를 얻을 수 없었으나 세포내 cAMP를 활성화시키고 동시에 EGF와 IGF-I을 첨가시킨 그룹에서 DNA합성에 상호작용 효과를 얻을 수 있었는데, 이와 같은 결과는 EGF, IGF-I 및 cAMP에 의한 DNA합성 상호작용에 있어서 cAMP에 의한 정보전달 기작이 EGF와 IGF-I에 의한 정보전달 매체를 조절한 결과에서 발생된 것으로 사료된다. 본 연구에서는 shamay 등(1990)이 젖소의 유선상피세포에서 얻은 상호작용효과 보다는 적었으나 이와 같은 결과는 Shamay 등(1990)이 phosphodieaterase 억제인자를 이용하여 세포내 cAMP함량을 장기간 고농도로 유지시킨 결과에서 나타난 차이점으로 사료된다.

호르몬이나 성장인자들에 의한 대부분의 생리조절 또는 정보전달 중재작용은 세포내 단백질 인산화 작용에 의하여 조절되어지는데(Greengard, 1978), 본 연구의 EGF, IGF-I 및 cAMP에 의한 DNA합성 상호작용 효과가 각 인자들의 세포정보전달 중간매체중 특정 단백질 또는 효소들의 인산화 작용을 통하여 이루어 진 것으로 사료되며, 이들 단백질들의 종류 및 역할에 관한 연구가 현시점에서 요구된다.

EGF, IGF-I 및 cAMP가 유선상피세포의 성장 또는 DNA합성에 미치는 상호작용 기작에 대한 생화학적 또는 분자생물학적 규명에 관하여서는 보고가 극히 적은데, 현시점에서 상호작용에 관여하는 합리적인 정보전달 중간매체를 찾아내고 생물 공학적인 방법에 의하여 이들을 조절하므로서 젖소의 산유량 증진은 물론 인간의 유방암과 같은 의학적인 치료수단을 위한 기초자료로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 적 요

본 실험은 UV노출에 의하여 활성 cAMP로 전환되는 photoreactive cAMP를 이용하여 단시간동안 세포내 cAMP를 증대(cAMP의 정상적 생리반응을 보기 위한 적합한 모델)시키고, 유선발달에 영향을 미치는 성장인자인 EGF와 IGF-I을 첨가하여 DNA합성에 미치는 상호작용효과의 유무를 검토코자 실시하였다. 생쥐의 유선상피세포를 24 well 배양접시(100,000 cells/well)에 기초배양액인 DMEM과 10% FCS를 이용하여 24시간 동안 접착시키고, 다른 24시간동안 10% FCS가 없는 DMEM을 이용하여 세포들을 세포성장 중지단계에 도달토록 하였다.

첫번째 실험은 1 μM photoreactive cAMP(4, 5-dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine-3',5' cyclic monophosphate, DMNB)와 EGF(0~100ng/ml) 및 IGF-I(10ng/ml)을 단독 또는 병행하여 처리하고, 2시간뒤에 UV(300nm, 3초간)를 노출시켰으며(EGF 및 IGF-I첨가 2시간 후 cAMP활성), 18시간 뒤에 1시간 동안 ^{3}H-thymidine(1 μCi/ml)을 첨가하여 DNA합성 정도를 측정하였다. EGF를 단독으로 처리할시 EGF 10~100ng/ml 농도에서 유의하게 DNA합성 정도를 증가시켰다($P<0.05$). DMNB와 IGF-I을 EGF에 병행으로 처리할 경우 EGF 단독에 의한 농도반응 곡선을 상가적으로 증대시켰지만 각 요인간의 상호작용 효과는 볼 수 없었다. 둘째 실험에서, DMNB를 EGF 및 IGF-I과 동시에 활성화 시켰는데(DMNB 첨가 2시간 후 UV노출 과 동시에 EGF, IGF-I첨가), DMNB와 IGF-I을 병용으로 10ng/ml의 EGF에 첨가시킨 구에서 유의하게 상호작용효과를 볼 수 있었다(<0.05). 이와 같은 결과는 세포내 cAMP 증가와 EGF 및 IGF-I이 동시에 세포를 활성화시킬 때 DNA합성에 상호작용 효과가 나타나는 것으로 나타났다.

VI. 인용문헌

1. Blache, D., J. Nargeot, and J. M. Nerbonne. 1986. Direct evidence for the inhibition of platelet aggregation and release by intracellular cyclic AMP produced with a new photoactivatible derivative. Thromb. Haemostasis 55 : 168.
2. Ethier, S. P., A. Kudla, and K. C. Cundiff. 1987. Influence of hormone and growth factor interactions on the proliferative potential of normal rat mammary epithelial cells *in vitro*. J. Cell. Physiol. 132 : 161.
3. Greengard, P. 1978. Phosphorylated proteins as physiological effectors : Protein phosphorylation may be a final common pathway for many biological regulatory agents. Science 199 : 146.
4. Gurney, A. M., and H. A. Lester. 1987. Light-flash physiology with synthetic photosensitive compounds. Physiol. Rev. 67 : 583.
5. Kaplan, J. H., B. Forbush, and J. F. Hoffman. 1978. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue : Utilization by the Na : K pump of human red blood cell ghosts. Biochemistry 17 : 1929.
6. Lester, H. A., and J. M. Nerbonne. 1982. Physiological and pharmacological manipulations with light flashes. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 11 : 151.
7. Loizzi, R. F. 1983. Cyclic AMP changes in guinea pig mammary gland and milk. Amer. J. Physiol. 8 : E549.
8. McCray, J. A., L. Herbette, T. Kihara, and D. R. Trentham. 1980. A new approach to time resolved studies of ATP requiring biological systems : Laser flash photolysis of caged ATP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 7237.
9. Nerbonne, J. M. 1986. Design and application of photolabile intracellular probes. In : Optical Methods in Cell Physiology, edited by P. DeWeer and B. Salzberg. New York : Wiley 40 : 417.
10. Nerbonne, J. M., S. Richard, J. Nargeot, and H. Lester. 1984. New photoreactivatable cyclic nucleotides produce intracellular

jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations. Nature 310 : 74.

11. Richard, S., J. M. Nerbonne, J. Nargeot, H. A. Lester, and D. Garnier. 1985. Photochemically produced intracellular concentration jumps of cAMP mimic the effects of catecholamines on excitation-concentration coupling in frog atrial fibers. Pflugers Arch 403 : 312.
12. Rillema, J. A. 1976. Cyclic nucleotides, adenylate cyclase, and cyclic AMP phosphodiesterase in mammary glands from pregnant and lactating mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151 : 748.
13. Sapag-Hagar, M., and A. L. Greenbaum. 1974. Adenosine 3' : 5'-monophosphate and hormone interrelationships in the mammary gland of the rat pregnancy and lactation. Eur. J. Biochem. 47 : 303.
14. Shamay, A., M. Pines, M. Waksman, and A. Gertler. 1990. Proliferation of bovine undifferentiated mammary epithelial cells *in vitro* is modulated by G-proteins. Mol. Cell. Endocrinol. 69 : 217.
15. Sheffield, L. G. 1991. Oligonucleotide antisence to catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase inhibit mouse mammary epithelial cell DNA synthesis. Exp. Cell Res. 192 : 307.
16. Sheffield, L. G. 1989a. Influence of cholera toxin(an adenylate cyclase activator) on deoxyribonucleic acid synthesis of bovine mammary tissue *in vitro* and in athymic nude mice. J. Dairy Sci. 72 : 41.
17. Sheffield, L. G. 1989b. Estrogen and progesterone augment growth responsiveness of mammary tissue to cholera toxin. J. Dairy Sci. 72 : 892.
18. Sheffield, L. G. 1990. Effect of sialoadenectomy on the ability of mouse serum to induce deoxyribonucleic acid synthesis in mammary epithelial cells : Possible role of epidermal growth factor. J. Dairy Sci. 73 : 2087.
19. Sheffield, L. G., C. F. Ayslworth, and C. W. Welsch. 1987. Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in mouse mammary glands : Effects of estrogen and progesterone administered *in vivo*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 185 : 283.
20. Sheffield, L. G., Y. N. Shinha, and C. W. Welsch. 1985. Cholera toxin treatment increases *in vivo* growth and development of the mouse mammary gland. Endocrinology 117 : 1864.
21. Silberstein, G. B., P. Strickland, V. Trumpbour, S. Coleman, and C. W. Daniel. 1984. *In vivo*, cAMP stimulates growth and morphogenesis of mouse mammary ducts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4950.
22. Stampfer, M. R. 1982. Cholera toxin stimulation of human mammary epithelial cells in culture. *In Vitro* 18 : 531.
23. Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.