

Vanadate 처리가 종양세포의 방사선 감수성에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 치료방사선학과, 연세대학교 의과대학 미생물학교실*

이 명 자 · 이 원 영*

= Abstract =

Enhanced Radiosensitivity of Tumor Cells Treated with Vanadate in Vitro

Myung Za Lee, M.D. and Won Young Lee, Sc.D.*

Department of Therapeutic radiology, Hanyang University, College of Medicine

**Dept. of Microbiology, Yonsei University, College of Medicine*

Intracellular ions which have a major role in cellular function have been reported to affect repair of radiation damage. Recently it has been reported that ouabain sensitizes A549 tumor cells but not CCL-120 normal cells to radiation. Ouabain inhibits the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump rapidly thus it increases intracellular Na concentration.

Vanadate which is distributed extensively in almost all living organisms is known to be a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase inhibitors. This study was performed to see any change in radiosensitivity of tumor cell by vanadate and any role of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in radiosensitization.

Experiments have been carried out by pretreatment with vanadate in human cell line(A549, JMG) and mouse cell line(L1210, spleen). For the cell survival MTT assay was performed for A549 and JMG cells and trypan blue dye exclusion test for L120, and spleen cells. Measurements of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity in control, vanadate treated cell, radiation treated cell (9 Gy for A549 and JMG, 2 Gy for L1201, spleen), and combined 10^{-6}M vanadate and radiation treated cells were done.

The results were summerized as follows.

1. L1210 cell was most radiosensitive, and spleen cell and JMG cell were intermediate, and A549 cell was least radiosensitive.

2. Mininum or no cytotoxicity was seen with vanadate below concentration of 10^{-6}M .

3. In A549 cells there was a little change in radiosensitivity with treatment of vanadate. However radiation sensitization was shown in low dose level of radiation i. e. 2- Gy. In JMG cells no change in radiosensitivity was noted.

Both L1210 and spleen cell had radiosensitization but change was greater in tumor cell.

4. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity was inhibited significantly in tumor cell by treatment of vanadate.

5. Radiaiton itself inhibited $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity of tumor cell with high $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase concention. Increase in radiosensitivity by vanadate was closely associated with orginal $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase contents.

From the above results vanadate had little cytotoxicity and it sensitized tumor

cells to radiation.

Inhibitory effect of vanadate on $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity might be one of the contributing factors for radiosensitization to tumor cells which has greater enzyme activity than that of normal cell.

It was suggested vanadate could be used as a potential radiosensitizer for tumor cells.

Key Words : Vanadate, Radiosensitizer, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

서 론

암의 방사선요법은 외과적치료와 더불어 중요한 국소치료법의 하나이다. 방사선요법의 국소 병소 완치율은 그동안 치료 기기와기술의 발달로 많이 향상되고 있으나 아직도 만족할만한 정도는 아니고 주위 정상세포의 손상을 최소화 하기 위해 방사선량은 제한되어 있다¹⁾. 방사선치료가 성공적으로 되려면 암세포의 손상을 극대화하고 정상조직의 손상을 줄일 수 있는 방법의 개발이 필수적이다. 즉 암조직의 방사선 감수성을 정상 조직보다 더 증가시키면 치료효율(therapeutic ratio)을 높일 수 있다. 이의 일환으로 최근에 방사선 감작제 (radiosensitizer)의 개발이 많이 시도되고 있다²⁾. 방사선에 대한 세포 반응은 세포질내에 존재하는 이온들의 구성 상태에 따라 달라질 수 있다. 즉 세포질 내의 이온들은 세포의 기능에 매우 중요한 역할을 하며 이러한 이온을 변화시킴으로써 방사선에 의한 세포손상이 달라지며 특히 손상된 세포의 재생능력 또한 다를 수 있다³⁾.

Ouabain은 cardiac glycoside로써 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-pump}$ inhibitor 작용이 있어 세포내 이온에 영향을 주어 Na^+ 농도를 높이고 단백 합성의 저해작용이 있음이 밝혀졌다⁴⁻⁸⁾. Ouabain의 장기간 처리는 세포의 부피를 증가시키는 작용이 있음도 알려지고 있다⁹⁾. 최근에 ouabain이 암세포 A549에 특이적인 방사선 감작작용이 있었던 반면 정상세포 CCL-210에는 감작작용이 없었다고 보고하였고 이는 정상세포와 암세포의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 차이로 인해 각 세포의 방사선 반응이 달라졌을 것으로 생각하고, 방사선 감작작용에 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-pump}$ 의 기능이 중요한 것으로 생각하였다^{3, 10-12)}.

Vanadium oxyanion인 vanadate는 포유동물의

생체조직에 분포되어 있는 미량물질로¹³⁾ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 강력한 억제제라는 것이 밝혀진 이래 생체 조직에 미치는 생리 및 생화학적 효과와 그 작용기전에 대해 연구가 진행되어 왔다. Vanadate는 세포막의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 를 억제하며 그외 세포내의 carbohydrate enzyme system에 영향을 주고 adenylate cyclase를 stimulation 시키고 농도가 높을때는 oxydative phosphorylation의 저해, coenzyme A, Q의 합성, cystine metabolism 과정의 변조에 관여한다^{14, 15)}. 더우기 vanadate의 장점은 작용시간이 빠르고 비교적 신체에 독성이 없다.

본 실험에서는 ouabain같이 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 저해작용은 비슷하면서도 신체독성이 극히 낮은 것으로 알려진 vanadate의 감작작용을 평가하고자 하였다. 또한 암세포를 vanadate로 억제제로 처리한 후 방사선을 조사하여 감작기능을 관찰하고 방사선 조사후 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 변화를 측정하여 방사선 감작효과를 규명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 세포주와 배양

종양세포로는 American Type Culture Collection (Maryland, U.S.A)에서 공급받은 A549 (human lung adenocarcinoma cell line)와 L1210 (mouse leukemic cell)를, 정상대조군으로는 새로 만든 정상신생아 포피세포인 JMG (human foreskin fibroblast)와 ICR mouse에서 적출한 비장세포를 계대배양하여 사용하였다.

A549와 JMG는 penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 μ /ml)과 우태아 혈청이 10% 함유된 MEM (minimal essential medium)에 배양하였고 L1210과 마우스 비장세포는 RPMI 1640

(Flow Lab. U.S.A.) 배지를 사용하여 배양하였다. Stock culture에는 플라스틱 용기 (Corning, U.S.A.)를 사용하였고 실험에서는 flat-96 well plate (Costar, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 약제처리에 의한 세포 독성능력 측정

각각의 세포주마다 증식 속도가 다르므로 방사선조사 및 약제 처리 시간을 지수 증식기로 (exponential phase of growth) 정하기 위해 성장곡선을 관찰하여 각 세포주의 지수증식기를 선택하였다. Vanadate (Sigma, U.S.A.)를 최종 농도 0.5M이 되도록 배양액에 녹여 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

배양된 A549 및 JMG 세포에 vanadate를 농도별 ($10^{-8}M$, $10^{-7}M$, $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$)로 4시간 처리한 후 새로운 배지로 세척하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 항온기에 4일간 배양하였다. 배양후 배지를 제거하고 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 검정법으로 생리 식염수에 녹인 MTT (Sigma: 1mg/ml, U.S.A.) 50 μ l 의 DMSO (dimethylsulfoxide)를 넣어 잘 혼든 후에 ELISA reader (Bioteck Instrument, Model EL 308)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 결과는 한번 실험에 8 well을 사용하였고 3번 반복 실험 결과 대조군의 평균 흡광도와 실험군의 평균 흡광도의 비를 생존율 (survival ratio)로 표시하였다¹⁶⁾.

배양된 L1210와 비장세포에 vanadate를 농도별 ($10^{-8}M$, $10^{-7}M$, $10^{-6}M$, 10^{-5} , $10^{-4}M$)로 4시간 처리한 후 새로운 배지로 갈아 2일간 배양하였다. 배양후 trypan blue dye exclusion검사로 살아 남은 세포수를 세어 대조군과 실험군의 비를 세포생존율로 표시하였고 한 실험에 4 well을 사용하였으며 4번 실험결과와 평균을 내었다.

3. 방사선 조사

방사선조사는 2500 Curie의 코발트-60 동위원소를 방사선 발생원으로 하여 SSD (source surface distance) 50cm 거리에서 10cm×10cm 조사범위의 분당 선량율을 2Gy (1 Gray=100rad)로 조사하였다.

A549와 JMG cell은 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 12 Gy

의 방사선을 조사하여 4일후 MTT 검정법으로 대조군과 비교하여 세포생존율을 구하였다.

L1210 및 비장세포는 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy의 방사선을 조사하고 2일후 trypan blue dye exclusion 검사로 대조군과 비교하여 세포생존율을 구하였다.

Na⁺-K⁺-ATPase 활성도 측정을 위한 방사선량은 약 50%의 생존율을 보이는 양으로 정하여 A549와 JMG는 9 Gy로, L1210와 Spleen은 2 Gy로 조사하였다.

4. Vanadate처리 및 방사선 조사에 의한 세포생존율 측정

방사선량을 방사선 단독조사 때와 같이 조사하였으며 vanadate처리는 방사선조사 1시간 전에 하고 방사선조사 완료 3시간후에 혈청이 없는 배지로 2번 세척하여 약물을 제거하고 10% 우태아 혈청이 포함된 새로운 배지로 갈아주었다. 처리된 vanadate농도로 세포 독성력이 20% 이하인 $10^{-6}M$ 을 택하였다. 세포독성율은 vanadate 처리일로부터 배양용기 표면 부착세포인 A549와 MTT 검정법으로 L1210와 spleen은 2일 후 trypan blue dye exclusion 검사로 대조군과 비교하여 세포 생존율을 구하였다.

5. Na⁺-K⁺-ATPase의 활성도 측정

각 세포를 초음파로 깨뜨리고 초원심으로 세포막분획을 얻은 다음 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도 측정을 위해 가장 적절한 단백질 농도를 Lowry 등의 방법으로 각각 구하였다¹⁷⁾. Na⁺-K⁺-ATPase 활성도 측정은 반응용액 (40mM NaCl, 5mM MgCl₂, 20mM KCl, 20mM Tris, 0.25 mM EDTA)에 ATP(5mM)와 세포막분획을 첨가하여 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 한편 Mg⁺⁺-ATPase 측정 할때는 KCl을 choline을 대체하였으며 0.1 mM ouabain을 첨가하였다. 그 직후에 TCA (trichloroacetic acid, 50%) 200 μ l 로 반응을 정지시키고 동시에 10,000rpm (4°C)에 원침시켜 단백질을 가라앉힌 후 상층액 1.5ml에 ethanol 0.4ml를 혼합해 충분히 섞었다. 그위에 1ml의 Fiske-Subbarow 시약 (F-S reagent, 2% ammonium molybdate solution, 4N H₂SO₄ 1:2:2)을 넣고 15분 작용 시킨 뒤 UV-spectropho-

tometer (Shimadzu, Japan)로 660nm에서 optical density를 측정하여 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 농도를 환산하였다¹⁸⁾.

가장 적절한 반응시간을 결정하기 위하여 앞에서 결정한 단백질 농도로 직선적인 반응을 나타내는 15분으로 정하였다. 결정된 단백질농도와 적정 반응시간에 맞추어 1) 대조군, 2) vanadate 단독처리군, 3) 방사선 단독 처리군, 4) 방사선과 vanadate를 함께 작용시킨 군 각각의 활성도를 A549와 JMG는 처리 2일 후에 L1210과 Spleen은 처리 4일 후에 측정하여 $\mu\text{mole Pi/mg protein/hr}$ 로 표시하였다.

각 실험결과와 유의성은 SAS 프로그램을 이용한 t-test 및 paired comparison t-test로 검정하였다.

실험성적

1. 세포주의 성장특성

각 세포주마다 증식 속도가 다르므로 각세포의 지수 증식기 세포를 선택하고 대조군간의 일정세포수를 기준하기 위하여 flat-bottom 96 well에 A549 cell 2. 5×10^3 , 5×10^3 , 1.5×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , JMG cell 3×10^3 , 6×10^3 , 1.5×10^4 , 3×10^4 을 배양하여 최적접종 세포수를 결정하였다. A549 cell과 JMG cell은 배양 4일까지 지수 성장을 보였고, 실험에 적합한 증식곡선을 보여 주는 최적 접종 세포수는

A549는 1.5×10^4 , JMG는 3×10^4 였다.

L1210은 5×10^3 , 1×10^4 , 4×10^4 , 비장세포은 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 5×10^6 의 세포를 접종 배양하여 성장 곡선을 비교하여 보았다. L1210은 3일까지 지수성장을 하였으며 정상 비장세포은 시험관내 증식이 안되고 계속 감소하여 3일후에는 급격한 감소를 보였고 특히 5×10^5 수 이하를 접종하였을 때는 감소가 급격하였다. 각 군간을 안정한 상태로 비교할 수 있는 최적 접종 세포수는 L1210에서는 1.5×10^4 비장세포에서는 5×10^5 이었다. 따라서 이후의 실험에서 각 well당 이 이상의 농도로 세포를 접종하였다(Fig. 1, Fig. 2).

2. 암세포와 정상세포에 대한 vanadate 세포독성 및 농도

Vanadate 농도를 10^{-8}M , 10^{-7} , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M 로 하여 A549, JMG, L1210, 비장세포에 4시간 처리하여 세포독성을 관찰하였다.

Vanadate 처리 후 A549 및 JMG는 각 실험농도에서 독성을 보이지 않았고 L1210은 10^{-5}M 이하에서는 독성반응이 없었고, 비장세포에서도 vanadate 각 농도에 독성반응을 보이지 않았다 (Table 1, Fig. 3).

따라서 방사선 감작효과를 보기 위한 실험에서는 독성반응이 거의 없는 10^{-6}M 을 택하여 전처리하였다.

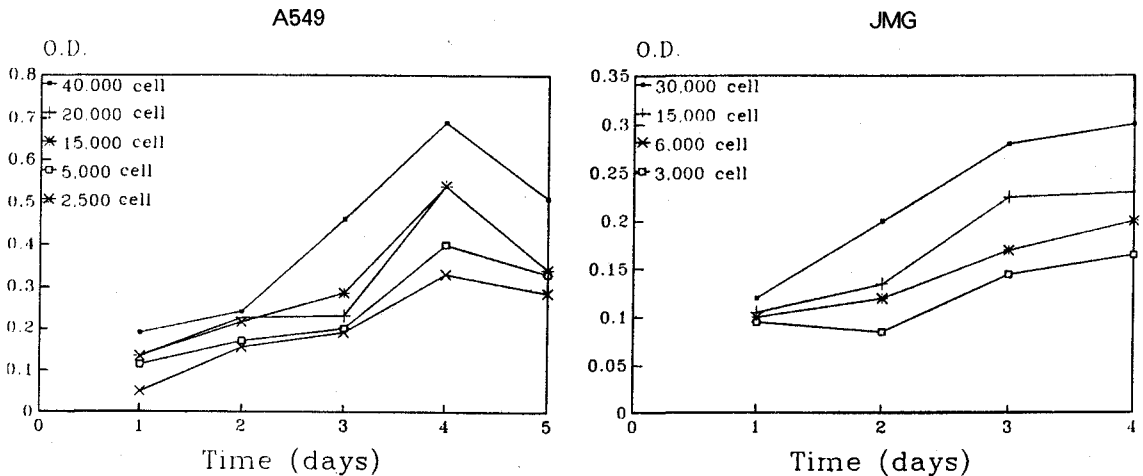


Fig. 1. Growth curves of A549 and JMG cells seeded in different numbers. Cell count was done by MTT test on day 1, 2, 3, 4, and 5 for A549 cells, and on day 1, 2, 3, and 4 for JMG cells.

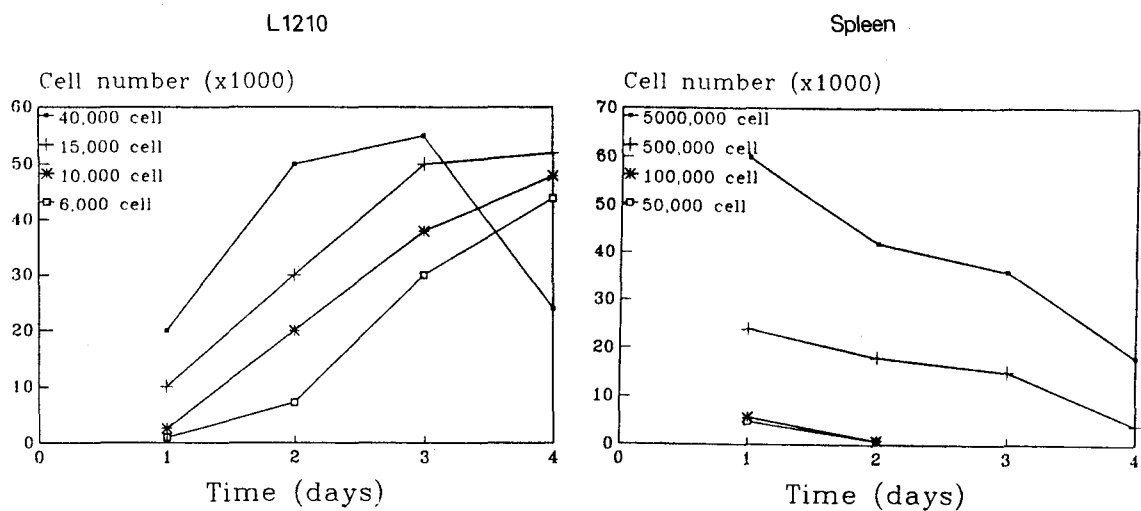


Fig. 2. Growth curves of L1210 and spleen cells seeded in different numbers. Cell count was done by trypan blue dye exclusion on day 1, 2, 3 and 4 for L1210 and spleen cells.

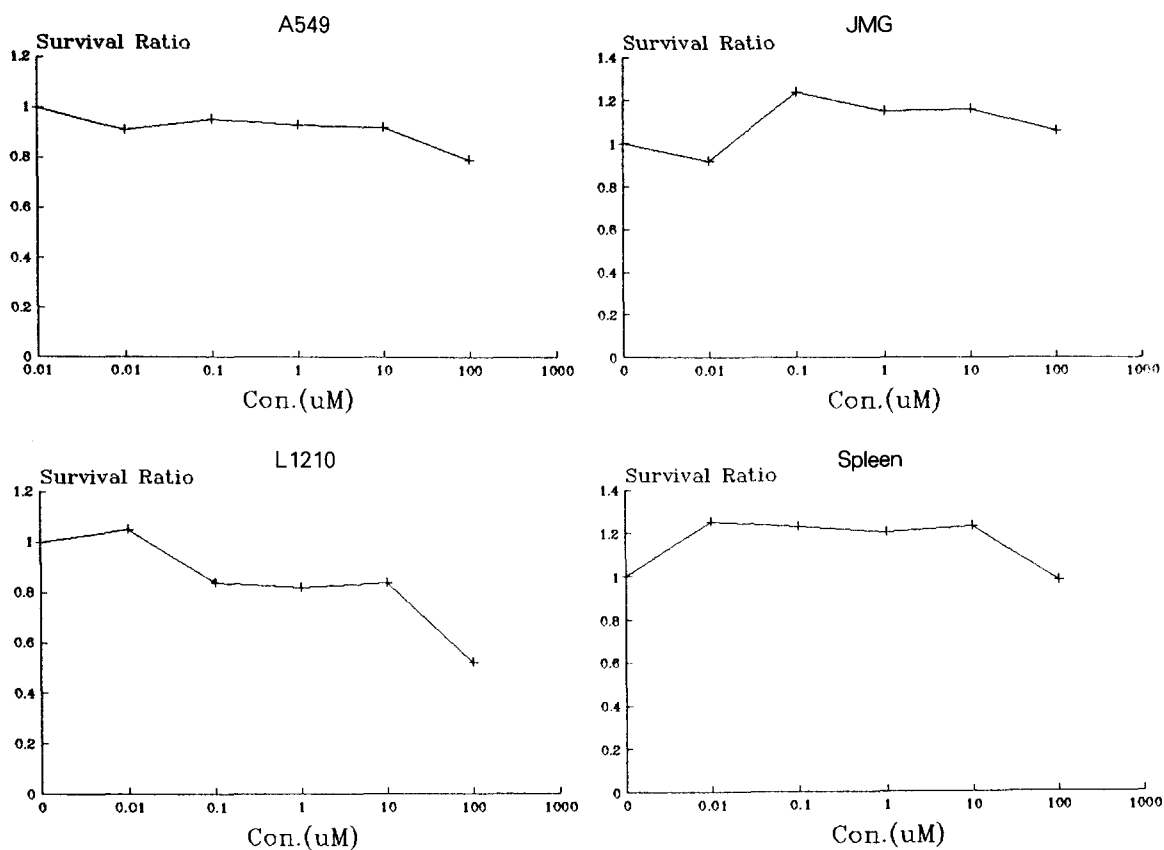


Fig. 3. Effect of vanadate on cell survival curve. Cells were treated for 4 hours with different concentrations of vanadate.

Table 1. Effect of vanadate on cell survival ratio

cells \ conc.	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
A549	0.91±0.13	0.95±0.19	0.90±0.24	0.92±0.16	0.79±0.10
JMG	0.92±0.17	1.24±0.09	1.15±0.07	1.16±0.19	1.06±0.40
L1210	1.05±0.09	0.84±0.04	0.82±0.02	0.84±0.11	0.52±0.17
Spleen cell	1.25±0.05	1.23±0.03	1.20±0.05	1.23±0.13	0.98±0.08

values represent the the mean±SE
 n=3 for A549 and JMG
 n=4 for L1210 and spleen cells

Table 2. Radiation dose effect on survival rate of A549 and JMG cells pretreated with vanadate

radiation dose	survival ratio					
	0	2 Gy	4 Gy	6 Gy	9 Gy	12 Gy
A549						
control	1	0.96±0.16	0.87±0.27	0.63±0.05	0.52±0.09	0.40±0.37
+vanadate	1	0.73±0.02*	0.76±0.14*	0.59±0.02	0.43±0.01*	0.48±0.16
JMG						
control	1	0.89±0.10	0.59±0.07	0.46±0.15	0.41±0.13	0.35±0.09
+vanadate	1	0.74±0.03	0.64±0.05	0.43±0.07	0.40±0.07	0.39±0.14

Values represent the mean±SE (n=4)
 control:no treatment
 + treated with 10⁻⁶M of vanadate for 1 hr, irradiated and post incubated for 3 hrs
 *p<0.05 compared with control

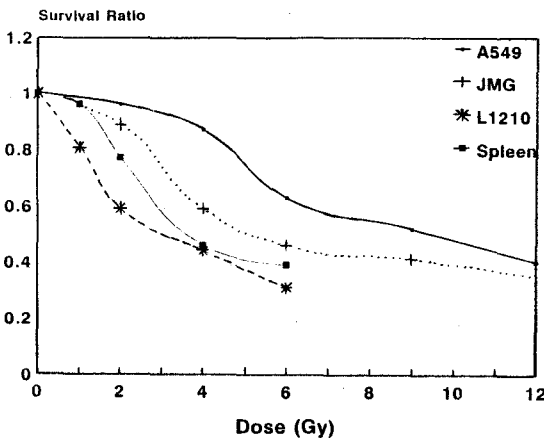


Fig. 4. Comparison of radiosensitivity. A549 and JMG cells were irradiated with radiation dose of 2-12 Gy, and L1210 and spleen cells were irradiated with dose of 1-6 Gy.

3. 방사선 단독처리군의 세포생존율

암세포나 정상세포에서 방사선 조사량이 클수록 세

포생존율은 감소하였고 A549와 JMG는 9 Gy에서 평균 50%가량의 세포생존을 보였고, JMG는 6 Gy L1210는 3 Gy, 비장세포는 4Gy에서 50%의 세포 생존율을 보여 가장 감수성이 예민한 세포는 L1210 이었고 비장세포도 비교적 감수성이 컸고 A549가 가장 감수성이 작았다(Fig. 4).

4. Vanadate 전처리와 방사선에 의한 세포생존율

Vanadate 전처리후 방사선을 조사하였을 때의 세포독성을 관찰한 결과 (Table 2) A549는 세포독성이 증가되었으며 특히 2-4Gy에서 방사선 단독 조사보다 세포독성의 증가가 컸다(p<0.05). 정상세포 JMG에서는 vanadate 처리 후 방사선조사와 방사선 단독효과와의 세포독성 효과의 차이는 없었다(Fig. 5).

L1210에서도 vanadate 처리가 각 방사선량에서 방사선 단독효과보다 독성이 컸다. 또한 비장세포에서도 방사선 단독효과보다 vanadate 처리 후 방사선조사 때 효과가 증대 되었지만 그 정도는 L1210의 경우

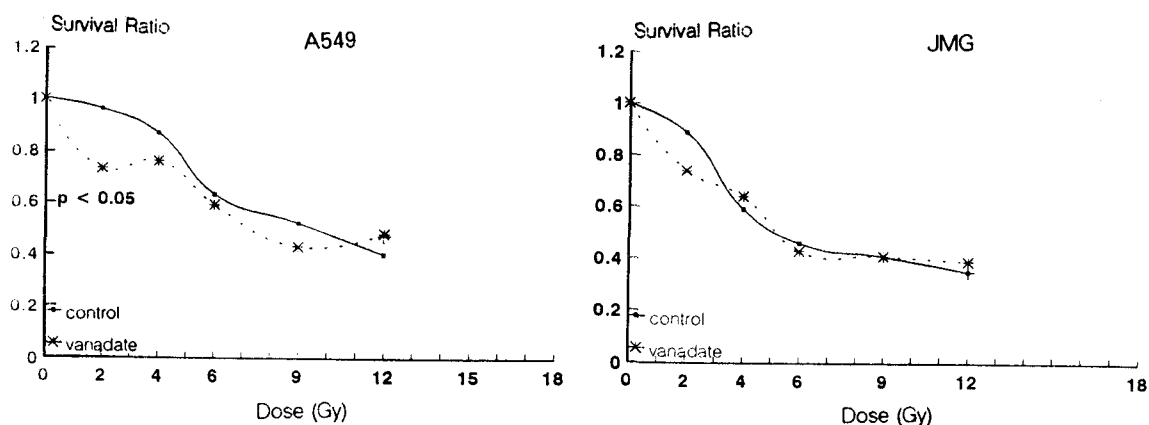


Fig. 5. Changes in radiosensitivity of A549 and JMG cells treated with vanadate. Cells were pretreated with 10^{-6} M vanadate for 1 hr, irradiated and post incubated for 3 hrs. Note that survival ratio at 2–4Gy of irradiation dose in A549 cles pretreated with vanadate were significantly different from control(irradiation alone) at $p < 0.05$.

Table 3. Radiation dose effect on survival of L 1210 and spleen cells treated with vanadate

		survival ratio				
radiation dose	0	1Gy	2Gy	4Gy	6Gy	
L 1210						
control	1	0.81 ± 0.05	0.59 ± 0.09	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.12	
+vanadate	1	$0.70 \pm 0.05^*$	$0.42 \pm 0.03^*$	$0.22 \pm 0.02^*$	$0.22 \pm 0.05^*$	
spleen cells						
control	1	0.96 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.46 ± 0.07	0.39 ± 0.05	
+vanadate	1	1.00 ± 0.10	0.79 ± 0.11	$0.30 \pm 0.05^*$	$0.27 \pm 0.09^*$	

values represent mean \pm SE (n=4)

control: no treatment

+ treated with 10^{-6} M of vanadate for 1hr, irradiated, and post incubated for 3 hrs

* $p < 0.05$ compared with control

Table 4. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activitie of the cells treated with radiation, vanadate, and vanadate followed by radiation

	control	+vanadate	radiation#	R+vanadate
A549	1.948 ± 0.016	$0.496 \pm 0.016 \dagger$	$0.352 \pm 0.072^*$	0.308 ± 0.008
JMG	0.652 ± 0.004	$0.280 \pm 0.008^*$	0.628 ± 0.236	0.592 ± 0.016
L 1210	4.940 ± 0.100	$1.472 \pm 0.004 \dagger$	$2.856 \pm 0.020^*$	$1.292 \pm 0.040 \dagger$
spleen	2.540 ± 0.220	$1.340 \pm 0.089^*$	0.996 ± 0.008	1.120 ± 0.040

unit:umole/mg protein/hr: values represent the mean \pm SE (n=4)

+vanadate concentration: 10^{-6} M

#radiation dose of 9Gy for A549 and JMG, 2Gy for L1210 and spleen cell

* $p < 0.05$ compared with control

\dagger $p < 0.01$ compared with radiation

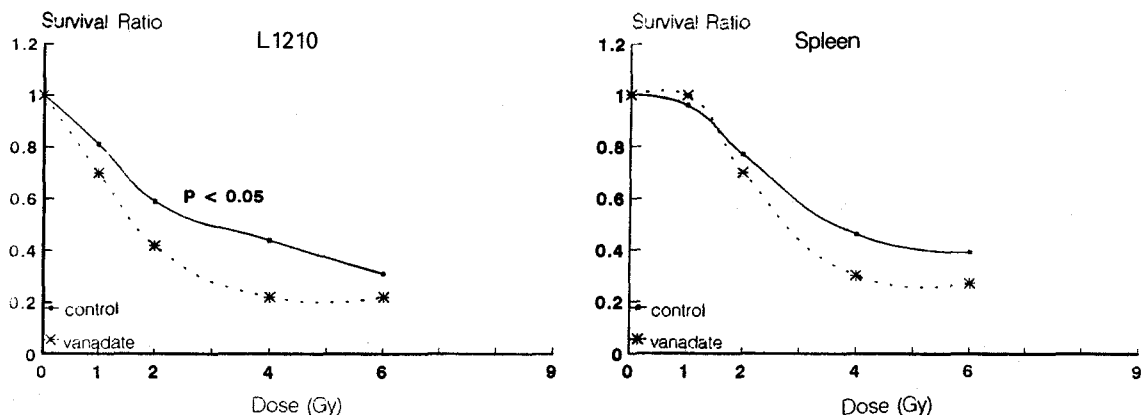


Fig. 6. Changes in radiosensitivity of L1210 and spleen cells treated with vanadate. Cells were pretreated with 10^{-6} M vanadate for 1 hr, irradiated and post incubated for 3 hrs. Note that survival ratios at all irradiation dose of L1210 cells pretreated with vanadate were significantly different from control(irradiation alone) at $p < 0.05$.

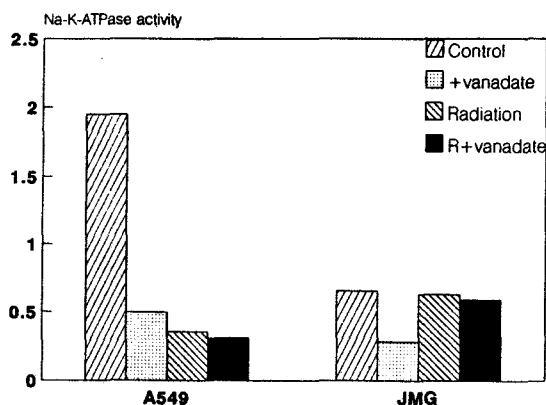


Fig. 7. Changes of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activities treated with radiation, vanadate and combined radiation and vanadate in A549 and JMG cells. Cells were treated with 10^{-6} M vanadate, and irradiated at dose of 9Gy.

보다 작았다(Table 3, Fig. 6).

5. Vanadate의 단독처리에 의한 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도의 변화

A549의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 $1.948 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 JMG의 $0.652 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 에 비해 3배 정도 높았다. L1210의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 $4.940 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 비장세포의 $2.540 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 에 비해 2배 정도 높았다(Table 4).

A549의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 대조군에서 $1.948 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 이며 vanadate로 처리하였을때 $0.496 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 대조군에 비해 $1.452 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 의 감소를 보였고 JMG의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 $0.652 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 으로 vanadate 처리시 $0.280 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 대조군에 비해 $0.372 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 의 감소를 보였으나 유의한 변화는 없었다 (Table 4, Fig. 7).

L1210의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 vanadate 처리시 $0.87 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 대조군에 비해 $3.468 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 의 감소를 보였다. 비장세포의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 대조군에 비해 vanadate 처리시와 각 $1.344 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 감소하였다 (Table 5, Fig. 8).

Vanadate로 처리했을 때에는 모든 세포에서 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도가 감소하였으며, 감소된 양은 암세포인 A549 및 L1210에서 유의있게 컸다($p < 0.005, p < 0.01$) (Table 4).

6. Vanadate와 방사선에 의한 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도 변화의 복합효과

방사선 9Gy 조사시 A549의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 $0.352 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 로 방사선조사 후 하지않았을 때(대조군)에 비해 $1.596 \mu \text{mole/mg protein/hr}$ 의 감소를 보였고($p < 0.05$), JMG의

Na⁺-K⁺-ATPase 활성도에서 0.652 μ mole/mg protein/hr으로 방사선 조사에 의한 감소는 없었다 (Table 5, Fig. 7). 방사선 2Gy 조사시에는 비장세포의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도는 0.996 μ mole/mg protein/hr로 대조군에 비해 1.544 μ mole/mg protein/hr의 감소를 보였으며 (p<0.1), L1210의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도는 2.856 μ mole/mg protein/hr로 2.084 μ mole/mg protein/hr의 감소를 보여(p<0.05), 비장세포에 비해 방사선 조사에 의한 감소 효과가 컸다 (Fig. 8).

A549의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도는 vanadate 처리와 방사선 조사후 0.308 μ mole/mg protein/hr로 방사선 단독조사 때의 0.352 μ mole/mg protein/hr에 비해 약간 감소하였으나 뚜렷한 차이가 없었다 (Table 4, Fig. 7). JMG의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도는 vanadate와 방사선 조사후 0.592 μ mole/mg protein/hr로 방사선 단독조사 때의 0.628 μ mole/mg protein/hr에 비해 별차이가 없었다 (Table 4, Fig. 8).

Vanadate 처리와 방사선 조사 후 L1210의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도는 1.292 μ mole/mg protein/hr로 방사선 단독 조사시의 2.856 μ mole/mg protein/hr에 비해 유의있게 감소하였다(p<0.01).

비장세포의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도는 방사선과 vanadate 처리시 1.120 μ mole/mg protein/hr로 방사선 단독조사 때의 0.996 μ mole/mg protein/hr에 비해 유의한 차이가 없었다(Table 4, Fig. 8).

즉 방사선 단독조사는 암세포인 A549와 L1210 및 정상세포인, 비장세포의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도를 감소시켰으며, 정상세포로 Na⁺-K⁺-ATPase 농도

Table 5. Relation of inhibition effect of Na⁺-K⁺-ATPase activities and radio-sensitization

	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase activity	inhibition effect	radiosensitization
A549	medium	++ #	++ *
JMG	low	—	—
L1210	high	+++ #	+++ *
spleen	medium	+	—

evaluation of radiosensitization at 9 Gy for A549 and JMG, 2Gy for L1210 and spleen cell

#p<0.01 compared with control

+p<0.05 compared with control

*p<0.05 compared with radiation alone

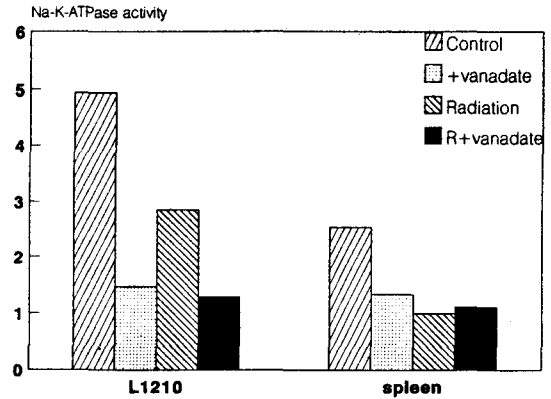


Fig. 8. Changes of Na⁺-K⁺-ATPase activities treated with radiation, vanadate and combined radiation and vanadate in L1210 and spleen cells. Cells were treated with 10⁻⁶ M vanadate, and irradiated at dose of 2 Gy.

가 적은 JMG에서는 방사선에 의한 감소가 없었다. Vanadate 처리와 방사선 조사에 의한 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도의 억제효과는 L1210에서만 방사선 단독조사보다 유의있게 나타났으며 이때의 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도의 감소는 Na⁺-K⁺-ATPase 억제제 단독처리시와 비슷하여 방사선 조사에 의한 효과보다 주로 Na⁺-K⁺-ATPase 억제제에 의한 효과였음을 의미한다 (Fig. 7 및 Fig. 8).

고 찰

방사선요법은 암치료를 중요한 일익을 담당하고 있고 특히 국소치료요법으로 암세포가 국소에 국한되거나 주위 조직침윤 및 주위 임파절 전이가 있는 경우가 지 포괄적으로 치료할 수 있는 장점이 있다. 그러나 방사선치료 시에 주위 정상 조직이 방사선조사 범위에 포함되어 방사선량이 제한되므로 방사선에 대한 암세포의 감수성의 고저는 방사선 치료효과에 중요한 영향을 준다. 암치료의 목표는 암세포의 손상을 극대화하고 정상조직의 손상을 최소화할 수 있는 방법의 개발이 필수적이다. 이러한 방법의 하나로서 최근에는 방사선 감작제(radiosensitizer)를 이용하는 요법이 많이 시도되고 있다²⁾. 그 일환으로 여러 종류의 방사선 감작제가 개발되고 있으며 이들은 크게 저산소 세포에 감작을 일으키는 제제와 비저산소 세포 감작제로 구분

된다^{19,20)} 그중 비저산소 감작제로서 halogenated pyrimidin, nucleotide analog, DNA polymerase inhibitor, glutathione modulator 등이 있으며 이들의 감작제 작용 기전은 방사선 후에 손상된 세포의 재생을 억제시키는 제제로 보고되고 있으나 암세포에만 감작효과가 있지는 않다²¹⁻²⁷⁾. 정상세포보다 암세포의 재생을 억제시키는 제제는 방사선 감작효과를 증가시켜 치료효율을 높일 수 있으며 특히 독성이 없는 제제이어야 임상적 이용이 가능할 것이다.

방사선에 대한 세포감수성은 세포질 내에 존재하는 이온들의 구성요소에 좌우될 수 있다. 즉 세포질내 이온들은 세포의 기능에 매우 중요한 역할을 하며 이러한 이온을 변화시킴으로써 방사선에 의한 직접손상을 크게하던지 혹은 준치사손상에 의한 세포의 재생능력을 감소시킬 수 있다³⁾. 세포내 이온에 영향을 주는 ouabain은 cardiac glycoside로 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-pump}$ 를 억제하여 세포질 내의 Na^+ 농도를 높이고 그외 protein 합성 및 volume regulation에 영향을 준다⁴⁻⁹⁾. Vanadate는 포유동물의 생체조직에 분포되어 있는 미량물질로서 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 강력한 억제제라는 것이 밝혀진 이래 생체조직에 미치는 생리 및 생화학적 효과와 그 작용 기전에 대해 연구가 진행되어 왔다^{13,28)}. Vanadate는 세포막의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 를 억제하며, 그외 세포내의 carbohydrate enzyme system에 영향을 주고, adenylate cyclase를 stimulation 시키고 농도가 높을 때는 oxidative phosphorylation의 저해 등 여러 세포내 metabolism 과정의 변조에 관여 한다고 알려져 있다^{14,15)}. 특히 vanadate는 ouabain에 비해 세포독성이 적은 장점을 갖고 있으며 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제로 tumor cell에 대한 감작제의 가능성이 있으리라 생각하여 vanadate의 방사선 감작유무를 보기위하여 ouabain에서 세포독성이 없는 농도로 알려진 10^{-6}M 로 택하였다²⁹⁾.

본 실험에서 human tumor cell인 A549와 그에 대조되는 정상세포로 human foreskin fibroblast를 사용하였고 이 두 세포는 바닥에 잘 붙어 monolayer culture가 가능하여 같은 방법으로 실험을 할 수 있었다. 그외 암세포로 mouse leukemic cell인 L1210을 택하였고 이와 비슷한 성질을 가진 lymphoid orgin의 mouse 비장세포를 사용하였으며 이 두세포

는 바닥에 붙지 않고 잘 뜨는 세포로 실험조건이 비슷하였다. MTT검정법은 실험결과가 신속하며 세포수가 dye exclusion이나 clonogenic assay보다 적게 이용되는 장점이 있으나 오염등으로 clonogenic assay 처럼 충분한 mitotic death가 일어날 때까지 긴 기간 동안 관찰할 수는 없다. 그러나 약물처리나 방사선후 세포독성을 보는데 비교 이용되는 실험법으로 보고되었고 본 실험에서는 상기의 단점이 결과 판정에 영향을 주지않기 때문에 주로 바닥에 붙어서 자라는 A549와 JMG cell은 세포수측정에 오차가 적은 MTT 방법으로 실험하였고, 뜨는 세포인 L1210 및 비장세포는 trypan blue dye exclusion법으로 실험하였다. Dye exclusion법도 신속하게 결과가 나오나 실험시 시간소모가 많고 세포수가 적으면 오차가 심한 단점이 있다. 한편 본 실험결과에서 다른 저자의 clonogenic assay법을 이용한 실험결과보다 방사선 조사에 의한 생존율이 높게 나타났다. 그 이유는 clonogenic assay의 경우 mitotic death가 일어날 때가 충분한 배양기간으로 배양을 한 후의 결과이고 MTT검정법의 세포독성 영역이 10^{-2} 정도의 독성효과에 국한되어 있는 차이일 뿐 이러한 차이에 의한 방사선 감작효과 판정에는 유의한 차이를 주지는 않았다. 오히려 MTT test는 약물이나 방사선의 감수성을 상대적인 효과를 판정하는 데는 비교적 정확하다고 보고된 바 있다³⁰⁾.

본 실험에서 vanadate를 전처리 하여 정상대조 세포인 JMG에서는 감작 작용이 없었고 정상세포 비장세포에서 암세포인 L1210보다 감작효과 정도가 적은데 비해 A549 및 L1210 암세포에서 방사선 감작을 일으킴을 보여 Lawrence보고에서 ouabain이 A549 암세포에서만 방사선 감작을 일으킨다는 보고와 일치하는 결과다³⁾. 특히 vanadate 처리는 A549 cell의 저 방사선량에서 유의성이 있는 감작을 일으켰고 L1210은 전 방사선량에서 감작효과가 있었는데 이 두세포의 차이는 방사선에 대한 세포 생존곡선에 A549는 shoulder가 있으며 L1210은 shoulder가 없는 세포로 이들 세포는 약제처리아전에 이미 세포자체의 방사선에 대한 반응이 달랐으며 약제처리후 방사선 감작정도 차이도 다르리라 생각된 각각의 세포에 vanadate 자체의 세포독성 효과를 관찰한 결과 vanadate는 특히 10^{-6}M 농도 이하에서 세포독성의

정도가 적었다.

암세포의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 정상세포의 그것보다 높았으며 이는 다른 저자들의 보고와 일치하였다¹⁰⁻¹²). Vanadate가 두가지 모두 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제로 방사선조사와 같이 처리할 때 암세포에서 이 효소의 억제 현상과 감작작용이 연관되어 있음을 알 수 있었다. 일단 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 농도가 낮은 JMG 세포에서는 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도의 변화가 적었고 이때 방사선 감작효과도 낮았다. 즉 기존 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도가 높았던 세포에서 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제인 vanadate에 의해 충분히 억제효과가 있었으며 이때 방사선 감수성도 높아짐을 알 수 있었다. 이는 vanadate에 의한 감작작용은 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도와 깊게 연관되어 있으며 암세포의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 활성도가 정상세포보다 높다는 사실이 암세포에 감작작용을 일으켰다고 생각할 수 있다.

감작효과는 크게 두가지 기전에 의하여 일어날 수 있다. 첫째 방사선에 의한 세포독성의 증가로인하여 방사선감작이 일어날 수 있고 둘째 방사선 손상의 회복에 영향을 주어 감작작용을 일으킬 수 있다. 방사선에 의한 세포독성 증가는 고장액 상태에서 염색질이 밀집되어 방사선 감수성이 증가한다고 보고된 바 있다^{31,32}). Vanadate를 방사선 조사 1시간 전에 처리하였을 때 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제가 직접 암세포내의 세포 독성을 증가시켰을 가능성이 있으며, L1210 세포의 방사선 생존곡선에는 shoulder가 없으므로 (Fig. 6) 준치사 손상의 회복 억제에 의한 감작작용이기 보다는 직접 세포독성 증가의 가능성이 크다고 생각된다.

세포질 내의 이온은 세포의 증식에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다^{8,33,34}). 세포의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-pump}$ 를 block함으로써 세포질 내의 이온 농도에 변화를 주어 효소를 변화시켜 특히 손상 DNA의 repair에 영향을 줄수 있는 것이다. 방사선회복에 관여하는 enzyme는 DNA ligase, ADP-ribose transferase 등이 알려져 있고 이들이 chromatin의 구조를 변형한다고 보고되었다^{35,36}). 세포내의 이온변화는 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제 처리후 곧 일어나며 2-4시간에 최대가 되고 방사선에 의한 준치사손상의 회복도 2-4시간내에 이루어져 방사선에 의한 손상의 회복시기에 이

온의 변화에 의해 repair enzyme에 영향을 주었을 가능성이 크고^{3,36}) Lawrence는 방사선조사와 ouabain 처리시기를 결정한 실험에서 ouabain을 방사선 조사 1시간 전에 처리하였을 경우 감작효과가 컸고 방사선 조사후 즉시 처리하였 때도 효과면에서는 떨어지나 감작효과를 보였으나 방사선 조사후 4시간 후에는 감작효과가 없어 일단 세포 재생이 일어난 후에 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제는 효과가 없었다고 하였다^{3,37}).

본 실험의 A549 세포는 방사선에 의한 세포생존 곡선에 shoulder가 있는 세포로 저 방사선량인 2Gy-4Gy에서 감작효과가 있어 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제에 의한 재생효소에 영향을 주어 준치사손상의 회복을 줄여주어 방사선 감작작용을 일으켰을 것이라 추정된다. 방사선량이 클 수록 감작 작용이 없었던 이유는 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제효과가 방사선에 의해서도 일어나 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제의 효과가 크게 영향을 못 미치리라 생각 된다. 또한 대부분의 비 저산소 세포는 방사선 생존곡선의 고 방사선 영역(high dose range) 보다 저 방사선 영역에 영향을 준다고 한다²⁷).

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제가 DNA 합성에 영향을 주어 방사선에 의한 감작효과를 증가시킬 수도 있으나 세포내의 K^+ 농도가 많이 낮아져야 DNA합성의 저하를 볼 수 있으며 vanadate가 DNA 합성을 촉진하는 효과도 있다고 하나 이 때문에 방사선 감작효과에 영향을 주었을 지는 본 연구 결과로는 알 수 없다³⁸⁻⁴⁰). Protein 합성을 억제하는 cycloheximide나 puromycin등이 방사선 감작효과를 일으키지 않는다고 보고되어⁴¹⁻⁴²) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제제의 단백질 합성 억제효과가 방사선감작을 일으키지는 않은 것 같다. 그외 cell cycle의 변화에 의한 감작작용도 고려해 볼 수 있으나 ouabain이 epithelial cell이나 lymphocyte에 cell cycle에서 변화를 주지 않았다는 보고도 있고^{6,7}) 또 긴 cell doubling time에 비해 약제는 방사선조사전 1시간에 처리하였으므로 cell cycle의 변화가 일어나 radioresistant phase에서 sensitive phase로 되었을 가능성은 적다.

본 실험에서 방사선 단독조사시 방사선 감수성의 차이는 세포마다 달라 L1210이 가장 감수성이 컸고, 비장세포 JMC A549순서로 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도 자체가 방사선 감수성을 결정하지는 않았다. 한

편 방사선 자체도 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도 저하 효과가 있어 방사선 단독조사 시에도 vanadate 처럼 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제효과가 있으나 방사선에 의한 억제효과 보다 vanadate에 의한 효과가 있을 때나, 방사선에 의한 억제효과와 vanadate 효과가 복합적으로 나타날 경우에 방사선 감작작용을 보여 (Table 5) 억제제의 효과가 방사선 감작을 일으켰으리라 생각 된다.

본 연구에서 vanadate는 단독처리시 세포독성이 거의 없고 억제제와 방사선의 복합 처리시 방사선 감작 작용을 증가시키고 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도 변화에 따라 방사선 감작효과가 달라짐을 보아 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 가 방사선 감수성 증강의 한 기전이라 설명할 수 있겠다. 일반적으로 종양세포의 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도는 정상세포보다 크다는 사실을 고려할 때 vanadate는 정상세포보다 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 활성도가 높은 종양세포에 선택적으로 억제효과를 일으키므로 vanadate가 정상세포보다 암세포에 감작제로 쓰일 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 보다 더 나은 기전을 알기 위해 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 의 활성도별에 따른 방사선 감작효과의 상관 관계등이 더 연구되어야 할 과제이다.

REFERENCES

1. **Suit HD and Miralbell R**: Potential impact of improvements in radiotherapy on quality of life and survival. *Int J Radiat Onc Bio Phys* 16: 891-895, 1989
2. **Williams MV, Denekamp J, Fowler JF**: Dose-response relationships for human tumors: Implications for clinical trials of dose modifying agents. *Int J Radiat Onc Bio Phys* 10:1703-1707, 1984
3. **Lawrence TS**: Ouabain sensitizer tumor cells but not normal cells to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 15:953-958, 1988
4. **Schwartz A, Lindenmayer GE, Allen JC**: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharm Rev* 27:3-134, 1976
5. **Skou JC**: The Sodium, potassium-pump. *Scand J Clin Lab Invest* 46(Supple 180):11-23, 1986
6. **Quaste MR, Kaplan JG**: Lymphocyte stimulation: the effect of ouabain on nucleic acid and protein synthesis *Exp Cell Res* 62:407-420, 1970
7. **Ledbetter ML, Lubin M**: Control of protein synthesis in human fibroblasts by intracellular potassium. *Exp Cell Res* 105:223-236, 1977
8. **Kaplan JG**: Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Ann Rev Physiol* 40:19-41, 1978
9. **Rosenberg HM, Shank BB, Gregg EC**: Volume changes of mammalian cells subjected to hypotonic solution in vitro evidence for the requirement of sodium pump for the shrinkage phase. *J Cell Physiol* 80:23-32, 1972
10. **Kasarov LB, Freidman H**: Enhanced $\text{Na}^+\text{+K}^+\text{-ATPase}$ activity in transformed fibroblasts. *Cancer Res* 34:1862-1865, 1974
11. **Shen SS, Hamamoto ST, Bern HA, et al**: Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. *Cancer Res* 38:1356-1361, 1978
12. **Racker E, Johnson JH, Blackwell MT**: The role of ATPase in glycolysis of Erlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 258:3702-3705, 1983
13. **Hopkins LL Jr, Mohr HE**: The biological essentiality of vanadium. In newer trace elements in nutrition. ed W. Mertz and W.E. Cornatzer, New York Dekker, 1971, pp195-213
14. **Jandhyala BS, Hom GJ**: Minireview Physiological and Pharmacological Properties of Vanadium. *Life Sciences* 33 1325-1340, 1983
15. **Nechay BR**: Mechanism of Action of Vanadium. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 24 501-524, 1984
16. **Carmichael J, Degraff WG, Gazdar Af et al**: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942, 1987
17. **Lowry OH, Rosebraough NJ, Farr AL, et al**: Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
18. **Fiske CH, Subbarow Y**: The calorimetric determination of phosphorus. *J Bio Chem* 66:375-400, 1925
19. **Adams GE**: Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull* 29:48-53, 1973
20. **Mitchell JB, Russo A, Kinsella T, et al**: The use of non-hypoxic cellsensitizers in radiobiology mol radiotherapy *Int J Onc Biol Phys* 12:1513-1518,

- 1986
21. **Szabolski W**: X-ray sensitization by halopyrimidines. *Cancer Chemother Rep* 58:539-557, 1974
 22. **Weissberg JB, Fischer JJ**: Effect of purine nucleosides and nucleotides on the in vivo radiation response of normal tissue in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7:365-369, 1981
 23. **Thraves Peter J, Mossman Kenneth L, Frazier DT et al**: Inhibitor of Potentially Lethal Radiation Damage Repair in Normal and Neoplastic Human Cells by 3-Aminobenzamide. An inhibitor of Poly (ADP-Ribosylation). *IJROBP* 12 1541-1545, 1986
 24. **Kelland LR, Burgess L, Steel G**: Differential radiosensitization by the poly (ADP-ribose) transferase inhibitor 3-aminobenzamide in human tumor cells of varying radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14:1239-1246, 1988
 25. **Illiakis G, Kurtzman S**: Application of non-hypoxic cell sensitizers in radiobiology and radiotherapy: rationale and future prospects *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16:1235-1241, 1989
 26. **Phillips TL, Mitchell JB, Degraff W, et al**: Variation in sensitizing efficiency for SR 2508 in human cells dependent on glutathione content. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 12:1627-1635, 1986
 27. **Malaise EP**: The non-hypoxic cell sensitizers: Their use in radiobiology and in radiotherapy. In *Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research, Edinburgh, July 1987, Vol 2*, 1987:705-755
 28. **Cantley LC, Josephson L, Warner R et al**: Vanadate is a potent Na⁺-K⁺-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J Biol Chem* 252:7421-7423, 1977
 29. **Mayhew E, Levinson C**: Reversibility of ouabain induced inhibition of cell division and cation transport in Erlich ascites cells. *J Cell Physiol* 72:73-76, 1968
 30. **Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF et al**: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47:943-946, 1987
 31. **Dewey WC, Noel JS, Dettor M**: Changes in radiosensitivity and dispersion of chromatin during the cell cycle of synchronous Chinese hamster cells. *Radiat Res* 52:373-394, 1972
 32. **Raaphorst GP, Frey HE, Kruuv J**: Effect of salt solutions on the radiosensitivity of mammalian cells IV. Treatment with NaCl solutions containing ouabain, NEM, PNAP, cysteamine, or DMSO. *Int J Radiat Biol* 33:341-356, 1978
 33. **Shank BB, Smith NE**: Regulation of cellular growth by sodium pump activity. *J Cell Physiol* 87:377-388, 1975
 34. **Leister KJ, Wenner CE, Tomei LD**: Correlation of ouabain sensitive ion movements with cell cycle activation. *Proc Natl Acad Sci* 82:1599-1603, 1985
 35. **Durkacz BW, Omidij O, Gray DA et al**: (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*, 283:593-596, 1980
 36. **Creissen D, Shall S**: Regulation of DNA ligase activity by poly(ADP ribose). *Nature* 296:271-272, 1982
 37. **Elkind MM, Sutton H**: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res*. 13:556-560, 1960
 38. **Elkind MM, Moses WB, Sutton-Gilbert H**: Radiation response of mammalian cells grown in culture VI. Protein, DNA, and RNA inhibition during the repair of X-ray damage. *Radiat. Res.* 31:156-173, 1967
 39. **Ledbetter MLS, Young GJ, Wright ER**: Cooperation between epithelial cells demonstrated by potassium transfer. *Am j Physiol* 250:C306-313, 1986
 40. **Carpenter G**: Vanadate, epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 102:1115-1121, 1981
 41. **Berry RJ**: Effects of some metabolic inhibitors on x-ray dose-response curves for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractionated X-ray doses. *Br J Radiol* 39:458-463, 1966
 42. **Weissberg JB, Fischer JJ, Moulder JE, et al**: Differential effect of cycloheximide on normal tissue tolerance and tumor control in irradiated rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10:1073-1078, 1984