

## 이종이식된 인체종양에서 KR-30035가 Tc-99m MIBI체내 분포에 미치는 영향으로 평가한 다약제내성 역전가능성

경북대학교 의과대학 핵의학교실, 내과학교실<sup>1</sup>, 임상병리학 교실<sup>2</sup>, 한국화학연구소<sup>3</sup>

김정균 · 이재태 · 이병호<sup>3</sup> · 최상운<sup>3</sup> · 유성은<sup>3</sup> · 이상우 · 천경아 · 안병철 · 박재용<sup>1</sup> · 서장수<sup>2</sup> · 이규보

### Reversal of Multidrug Resistance with KR-30035: Evaluated with Biodistribution of Tc-99m MIBI in Nude Mice Bearing Human Tumor Xenografts

Jung Kyun Kim, M.D., Jaetae Lee, M.D., Byung Ho Lee, Ph.D.<sup>3</sup>, Sang Woon Choi, Ph.D.<sup>3</sup>, Sung Eun Yoo, Ph.D.<sup>3</sup>, Sang Woo Lee, M.D., Kyung Ah Chun, M.D., Byeong Cheol Ahn, M.D., Jae Young Park, M.D.<sup>1</sup>, Jang Soo Suh, M.D.<sup>2</sup>, Kyu Bo Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Department of Internal Medicine<sup>1</sup>,  
Department of Clinical Pathology<sup>2</sup>, Kyungpook National University Hospital, Taegu, ;  
Bioorganic Science Division<sup>3</sup>, Korea Institute of Chemical Technology, Taejon, Korea

#### Abstract

**Purpose:** KR-30035 (KR), a new MDR reversing agent, has been found to produce a similar degree of increased Tc-99m MIBI uptake in cultured tumor cells over-expressing mdr1 mRNA compared to verapamil (VP), with less cardiovascular effects. We assessed the MDR-reversing ability of KR *in vivo*, and effects of various doses of KR on MIBI uptake in nude mice bearing P-glycoprotein (P-gp) positive (+) and P-gp negative (-) human tumor xenografts. **Methods:** P-gp (+) HCT15/CLO2 colorectal and P-gp (-) A549 non-small cell cancer cells were inoculated in each flank of 120 nude mice (20 mice x 6 groups). Group 1 (Gr1) mice received 10mg/kg KR i.p. 3 times (x3); Gr2, 10mg/kg VP i.p. x3; Gr3, 10mg/kg KR i.p. x2 + 25mg/kg KR i.p. x1; Gr4, 10mg/kg KR i.p. x2 + 50mg/kg i.p. x1; Gr5, 10mg/kg KR i.p. x2 + 25mg/kg KR i.v. x1, GrC, controls. The mice were then injected with Tc-99m MIBI and sacrificed after 10 min, 30 min, 90 min and 240 min. Tumor uptake of MIBI (TU) in each group was compared. **Results:** TU in P-gp (+) and (-) tumors were both higher in Gr1 than Gr2. Washout rate between the 10 min and 4 hours was lower in Gr5 of P-gp (+) cell(0.93) than the control. Percentage increases in TU were higher in P-gp (+) than P-gp (-) tumors with all KR doses. Pgp (+) TU were highest at 10 min (173% of GrC) and persisted up to 240 min (144%) in Gr3. Larger doses of KR resulted in a lesser degree of increase in P-gp (+) TU at 10 min (130% in Gr4 and 117% in Gr5) and 30 min (178%, 129%), but TU increased by time up to 240 min (177%, 196%). Heart and lung uptakes were markedly increased in Gr4 and Gr5 at 10 and 30 min, likely due to cardiovascular effects. No mice died. **Conclusion:** These data further suggest that KR that has significantly lower cardiovascular toxicity than verapamil can be used as an active inhibitor of MDR. Even a relatively low dose of KR significantly increased Tc-99m MIBI uptake in P-gp (+) tumors *in vivo*. (Korean J Nucl Med 2001;35:168-184)

**Key Words:** KR-30035, Verapamil, Mutidrug resistance, Tc-99m MIBI

Received May 11, 2001; accepted Jun. 18, 2001

책임저자 : 이재태, 경북대학교 병원 핵의학과

주소 : 대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지 경북대학교 병원 700-721

Tel : 053-420-5586, Fax : 053-422-0864, E-mail : jaetae@knu.ac.kr

## 서 론

악성종양의 항암제 치료시 발생하는 다약제내성 (multidrug resistance, MDR)의 중요한 원인중의 하나는 170kDa의 단백질인 P-당단백 (P-glycoprotein, P-gp)이 암세포에 생성되는 것이고, P-당단백의 생성은 크기가 4.5Kb인 다약제내성 *mdr1* 유전자의 과다발현에 의하여 결정된다.<sup>1,2)</sup> P-당단백은 ATP-binding cassette transport군에 속하는 에너지 의존성 배출펌프 역할을 하며 항암제 치료시에 항암화학요법 약제들을 암세포 밖으로 배출시켜 결과적으로 암세포의 약제에 대한 내성을 유발하게 한다.<sup>3,4)</sup> 다약제 내성이 발생한 암조직은 식물이나 진균에서 추출된 알칼로이드나 항암제 (vinka alkaloid, anthracyclines, epipodophyllotoxin, dactinomycin) 등에 내성을 보이는 경우가 많고, 알킬화 제재인 melphalan, nitrogen mustard, mitomycin-C 등에도 교차내성을 가진다. 다약제내성의 배출펌프기능에 연관된 또 다른 기전은 190 kDa의 단백질인 multidrug resistance-associated protein (MRP)의 생성이다. 악성종양에서 화학요법이 실패한 환자의 상당수에서 암세포나 조직절편에서 *mdr1* mRNA의 과다발현과 면역화학염색상 암세포의 P-당단백과 MRP의 생성이 증가되어 있음이 보고된 바 있다.<sup>5,6)</sup>

다약제 내성의 극복은 악성종양의 완치에 결정적인 역할을 할 것으로 판단되나 아직도 그 임상응용은 성공적이지 못하다.<sup>7)</sup> 다약제 내성의 극복방법 중 P-당단백에 작용하여 다약제 내성을 역전시킬 수 있는 약제들로는 verapamil로 대표되는 칼슘통로 차단제, cyclosporin과 그 유도체인 PSC833, quinine 유사체, calmodulin길항제, quinolone계 항생제, reserpine 유사체, acridonecarboxamides, triazinoaminopiperidines 등이 있다.<sup>8-10)</sup> 이들은 다약제 내성의 발현 암세포에서 세포막의 유출 수송인자인 P-당단백의 공통결합부위와 경쟁하거나, 단백질내의 인지 부위와의 친화성을 변화시켜 항암요법제의 세포외로의 유출을 막아, 종양세포내 약제의 농도를 증가시키게 된다. 칼슘 통로 차단제인

verapamil은 실제 임상에서 가장 먼저 사용된 바가 있는 다약제 내성 극복제이다.<sup>11-13)</sup> 그러나, verapamil은 다약제 내성인자를 역전시킬 수 있는 혈중 농도에서 저혈압, 울혈성 심부전, 심장의 전도이상과 같은 심장독성을 초래하기 때문에 다약제 내성을 극복할 수 있는 고용량을 실제 임상에서 사용하기는 어렵다. 따라서, 바람직하지 않은 인체의 독성 효과는 적고 다약제 내성의 역전효과는 큰 제재들이 연구되고 있다. 한국화학연구소에서 합성한 KR-30035(KR)는 새로운 칼슘 통로 차단제로서 심혈관 약리작용은 verapamil보다 적으면서, P-당단백이 발현된 인체 암세포주에서의 로다민 배출능으로 측정된 다약제 내성인자의 역전효과는 verapamil보다 더 크다고 보고되었다.<sup>14)</sup>

다약제 내성인자는 세포막에서 생성이 되므로, 생검이나 수술에서 얻은 암조직의 면역화학적 염색법, 분자생물학적 분석법이나 생존된 암세포에서의 로다민 배출능을 측정함으로써 체외 (in-vitro)에서 증명을 할 수 있다.<sup>15-17)</sup> 그러나 대부분의 경우 종양 세포나 조직을 얻은 후 체외실험을 통하여 증명하는 만큼 종양세포의 채취가 비교적 간단한 백혈병 등의 혈액질환 외에는 실제 이용하기가 쉽지 않다. 심장관류의 평가에 널리 사용중인 Tc-99m MIBI (methoxy-isobutyl isonitrile)는 분자구조가 다약제 내성과 연관 항암제들과는 상이하나, 세포막을 자유롭게 통과하는 저 분자량의 물질로서 암세포내로의 섭취는 항암제들과 유사한 기전을 가지고 있다. Piwnica-Worms 등<sup>18,19)</sup> 과 Rao 등<sup>20)</sup>은 다약제 내성 유전자의 과다발현과 연관된 P-당단백 생성이 증가된 인체암세포에서는 Tc-99m MIBI가 항암제와 유사한 기전으로 세포바깥으로 배출되어 세포내 Tc-99m MIBI저류가 감소된다고 보고하였고, 연구자들은 악성종양 환자에서 Tc-99m MIBI 영상으로 악성종양의 다약제 내성의 발현을 예측하고 예후를 평가할 수 있다고 보고하였다. 조 등<sup>21)</sup>은 다약제내성을 발현시킨 생쥐 백혈병세포를 이용한 실험관실 실험에서 같은 농도의 KR과 verapamil은 Tc-99m MIBI섭취를 비슷한 정도로 증가시킨다고 보고하였다.

본 연구는 KR의 전임상연구의 일환으로서 다약

제내성 역진효과를 Tc-99m MIBI 체내영상술을 통하여 평가할 수 있는지를 알아보고, KR이 체내에서의 Tc-99m MIBI 분포에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 다약제내성이 없는 인체폐암 A549세포와 다약제 내성이 발현된 인체대장암 HCT/CLO2 세포를 이종이식한 누드마우스의 주요장기와 암조직에서 verapamil과 KR의 Tc-99m MIBI 섭취에 미치는 영향을 비교하고, 약제의 농도에 따른 장기와 종양조직의 Tc-99m MIBI 섭취의 차이를 조사하여 영상술 시행시 사용할 수 있는 KR의 최적용량을 설정하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 약제

Verapamil, doxorubicin, vincristine과 sulforhodamine B (이하 SRB)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, KR은 한국 화학기술 연구소에서 합성<sup>14)</sup>하여 사용하였다. Verapamil은 0.9% 생리식염수에 녹였고, KR은 10% 에칠알콜과 10% cremophor의 혼합액에 녹인 다음 0.9% 생리식염수로 최종량을 맞추었으며, 주사시에는 이용액을 원액으로 하여 0.9% 생리식염수로 희석하여 사용하였다.

### 2. 세포배양 및 다약제내성 세포주

누드마우스에 이식된 종양세포는 다약제 내성이 없는 대조군으로 인체 비소세포 폐암 A549세포주<sup>22)</sup> (ATCC, Rockville, USA)를 사용하였다. 새로운 약제내성 세포를 분리하기 위하여 Dexter 등<sup>23)</sup>이 처음 분리한 인체기원의 대장암세포주인 HCT15 세포주 (ATCC, Rockville, USA)를 기본으로 사용하였으며, HCT15 세포를 최초로 1  $\mu$ M의 doxorubicin을 첨가한 RPMI 1640 배지에서 배양하고, 이 중 정상적인 생장을 하는 세포들을 분리하여 단계적으로 doxorubicin의 농도를 100  $\mu$ M 까지 높여가며 세포를 배양하여 최종적으로 100 $\mu$ M에서 살아 남은 세포를 분리하여 HCT/CLO2 세포주를 최종적으로 생성하였다. 암세포들에 항암제를 투여

하면 이중 일부의 세포들이 약물에 내성을 가지나, 일단 약제 내성을 나타내는 암세포들도 항암제가 없는 상태로 계속 계대 배양하면 다시 내성이 없어지는 경우가 있으므로, 수확된 HCT/CLO2 내성 세포주 질소탱크에 동결 저장하고 동물실험시 녹여 사용하였다. A549세포는 90%의 Ham's F12K medium에 10% fetal bovine serum을 첨가하여 배양하였고, HCT15/CLO2 세포는 80%의 RPMI 1640배지에 20%의 fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 배양액으로 배양하였다. 모든 암세포의 배양 시에는 배지에 penicillin (100 U/ml)과 streptomycin (100 mg/ml)을 첨가하였고 37°C의 95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>의 배양기에서 배양하였다.

### 3. *mdr1* 유전자의 동정: RNA 분리 및 역전사 종합효소 연쇄 반응법 (RT-PCR)

배양 시기 별로 수확한 세포를 1,000  $\times$ g 에서 5분간 원심 분리한 다음, 4°C PBS로 2 회 세척하였다. 침전된 세포에 TRI-용액 1 ml을 넣어 세포균질액을 만든 다음, 상온에서 10 분간 두었다가 200  $\mu$ l의 chloroform을 넣고 혼합한 다음 원심분리 (12,000  $\times$ g, 15분, 4°C) 하여 상층액을 얻었다. 분리한 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 섞어준 다음 상온에서 10 분간 방치해 두었다가 원심분리 (12,000  $\times$ g, 15분)하여 RNA 침전물을 모았다. 모은 RNA는 75% ethanol로 수세한 다음 다시 원심분리 (7,500  $\times$ g, 5분)하여 상층액을 버리고 상온에서 10 분간 건조시켜 50~200  $\mu$ l의 물에 녹인 후 55~60°C에서 완전히 용해시켰다.

분리한 RNA는 RT-PCR kit (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 먼저 1  $\mu$ g의 RNA에 10 $\times$  PCR buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNase inhibitor (1 U), 2.5  $\mu$ M random hexamer, reverse transcriptase (2.5 U)를 첨가하여 상온에서 10 분간 반응시킨 후 reverse transcription (42°C, 15분), denature (99°C, 5분), cool (5°C, 5분)을 차례로 실시하였다. 이렇게 합성된 cDNA 혼합물에 다시 10  $\times$  PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polymerase (2.5 U), *mdr1* primer (Bioneer, 대전)를 첨

가하여 95°C에서 2분 동안 반응시킨 후 melt (95°C, 1분), anneal (58°C, 1분), extend (72°C, 1분)를 35 cycle 동안 실시하고, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. *mdr1* 유전자의 발현 정도는 2% agarose 전기영동을 실시한 다음, etidium bromide (EtBr) 염색으로 확인하였다. RT-PCR에 이용한 *mdr1* primer 의 핵산배열은 아래와 같다.

sense 5' AAG CTT AGT ACC AAA GAG  
GCT CTG 3' (2041-2064)  
antisense 5' GGC TAG AAA CAA TAG TGA  
AAA CAA 3' (2260-2282)

#### 4. 세포독성 실험

KR과 verapamil의 세포독성실험을 아래와 같이 실시하였다. 세포들을 96 well flat-bottom microplate에 well당 세포수가  $2 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  이 되도록 분주하고, 세포가 바닥면에 부착하도록 24시간동안 배양하였다. 세포가 바닥면에 부착한 후에, 배양액을 제거하고, 관심 농도의 약물로 처리하여 30분간 배양 후에 약물을 제거하고, PBS로 2회 세척하였다. 이후 약물이 들어있지 않은 새로운 배양액을 첨가하여, CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간동안 배양하였고, sulforhodamine B (SRB) 법<sup>24)</sup>을 이용하여 세포독성을 측정하였다. 즉 배양이 끝난 후 각 well의 배양액을 제거하고, 10% Trichloroacetic acid (TCA)를 1시간 동안 처리하여 세포들을 고정시킨 후 TCA를 제거하고 물로 세척한 후 실온에서 건조시켰다. 고정된 세포들의 건조가 끝난 후, 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 실온에서 30 분동안 방치하여 세포를 염색하고, 1% acetic acid 용액으로 세척하여 세포와 결합하지 않은 여분의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 세포들에 pH 10.3~10.5의 10mM Trisma base (unbuffered)용액을 가하여 세포와 결합한 SRB를 용출시킨 후 microplate reader를 이용하여 520 nm 파장으로 약물을 가하지 않은 well (C)과 약물을 가한 각 well (T)의 흡광도를 측정하고, 약물을 처음 가할때의 well (Tz)의 흡광도와 비교하여,  $Tz \leq T$  인 경우에는  $[(T-Tz)/(C-Tz)] \times 100$  의 수식으로

세포독성을 계산하였고,  $Tz > T$  인 경우에는  $[(T-Tz)/(Tz)] \times 100$  의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다. 계산값이 80% 이상 나올 때는 약물의 독성효과가 없는 것으로 하였다.

#### 5. 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 organosaline을 부착한 슬라이드 (Probe-on plus slide, Fisher Scientific, U.S.A)에 부착시켜 탈파라핀과 함수 과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. Microwave는 전자렌지법을 이용하여 10mM citrate buffer (pH 6.0)를 750 watt 전자렌지로 5분간 먼저 가온 후에 슬라이드를 넣고 5분간 2회 가온 처리하여 항원표출 후 20분간 실온에 방치하여 온도를 서서히 낮추었으며 이어 tris buffered saline (이하 TBS, 50 mM, pH 7.4)으로 세척한 후 0.3% 과산화 수소용액 처리 후 TBS로 세차레 세척하였다. 조직 내 비특이 항원을 차단하기 위해 Normal horse serum에 30분간 반응시키고 P170-glycoprotein 항체 (clone JSB-1, Monosan, Netherlands)로 1:20으로 희석하여 일차항체를 반응시킨 후 chamber에 두고 4°C 수조에서 하룻밤동안 반응을 시킨후 TBS로 세차레 세척하고 이차항체 (Vector Elite kit, Vector Laboratories, U.S.A)를 30분간 반응시킨후 ABC (avidin-biotin conjugate) reagent 를 실온에서 45분간 반응시켰다. TBS에 세척 후 Tris-HCl (pH 7.6) buffer에 세척한 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Chemicals, U.S.A)로 발색하였다. 증류수에 수세한 후 Mayer Hematoxylin으로 20 초간 대조염색한 후 봉입하여 슬라이드를 완성하고, 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 6. 누드마우스에 이종 이식된 암조직에서의 체내분포 측정

생후 8-14주, 체중 20 gm전후의 암컷 누드마우스 (BALB/c-nu/nu nude mouse, 한국 화학연구소, 대전)를 동물실험에 사용하였다. 다약제 내성이 없는 A549 세포와 다약제 내성이 발현된 HCT15/CLO2 세포를 누드마우스의 좌측 체간과 우측 체간에 각각  $10^5$ - $10^6$ 개/200  $\mu$ l 씩 피하접종하고 사육하

여, 종양의 크기가 1g 정도로 자란 뒤 20마리씩 한 군으로 하고 6군으로 구분하여 합계 120마리에서 실험하였다. 1차 실험은 PBS를 복강내 주사한 대조군에 비교한 KR과 verapamil의 종양조직 내로의 Tc-99m MIBI 섭취증가 비율을 관찰하기 위하여 대조군 (Control Group, GrC)과 KR 치료군 (Group1, Gr1), verapamil 치료군 (Group 2, Gr2)의 3개의 그룹으로 나누어 실험하였다. Verapamil과 KR의 처치는 검사 하루 전에 12시간 간격으로 두 번 10 mg/kg을 복강내 주사하였고, 다음 날 아침에 한번 더 5 mg/kg을 복강내 주사한 뒤 1시간 후에 Tc-99m MIBI 370 KBq를 꼬리정맥으로 주사하였다. 대조군도 Tc-99m MIBI주사 1시간 전에 PBS를 복강내 주사하였다. 2차 실험은 KR의 투여용량의 차이에 따른 장기와 종양조직내의 Tc-99m MIBI섭취의 차이를 구명하고자 시행하였으며, 전 처치는 Gr1과 같이 검사 하루 전에 12시간 간격으로 두 번 10 mg/kg을 복강내 주사하였으나, 다음 날 Tc-99m MIBI주사 10분전에 25 mg/kg를 복강내에 주사한 군 (Group3, Gr3), 50mg/kg를 복강내에 주사한 군 (Group4, Gr4), 25 mg/kg를 꼬리정맥으로 주사한 군 (Group5, Gr5)으로 구분하여 누드마우스의 장기와 종양조직에서의 Tc-99m MIBI섭취정도를 정량적으로 계산하였다. Tc-99m MIBI는 MIBI (Cardiolite®, Du Pont, Massachusetts, USA) cold vial에 Tc-99m pertechnetate를 넣고 10분이상 끓여 표지한 후 사용하였고, 박막크로마토그래피에

서 표지효율은 95% 이상이었다. Tc-99m MIBI를 주사한 후 10분, 30분, 90분, 240분에 halothane 마취하에 심장에서 25게이지 주사기로 혈액을 채취함으로써 생쥐를 희생시켰고, 혈액, 간, 신장 등의 주요장기와 좌우측 체간의 종양을 적출하여 혈액을 닦고, 무게를 측정하였다. 얻어진 조직은 감마계수기로 140 KeV에서 20%의 에너지 창을 열어 Tc-99m의 방사능을 측정하여 주사량에 대한 단위 무게별 장기섭취율 (% injected dose/gm of organ, 이하 %ID/gm)을 계산하였다. Tc-99m MIBI의 제거율은 각각의 10분-장기섭취율에서 240분-장기섭취율을 뺀 값을 10분-섭취율로 나누어 구하였다.

### 7. 통계학적 분석

모든 결과는 평균과 표준편차로 표시하였고, 통계학적 처리는 SAS program (version 6.11)을 이용하였다. 사용한 통계기법은 T-검정, one-way analysis of variance (ANOVA)이며, p 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 암조직과 세포에서 다약제내성의 발현 측정

영구적인 내성을 갖는 세포주를 분리하기 위하여, HCT15세포를 기본으로 하고, 100µM 농도의 doxorubicin을 첨가한 배양액에서 배양시 살아남은

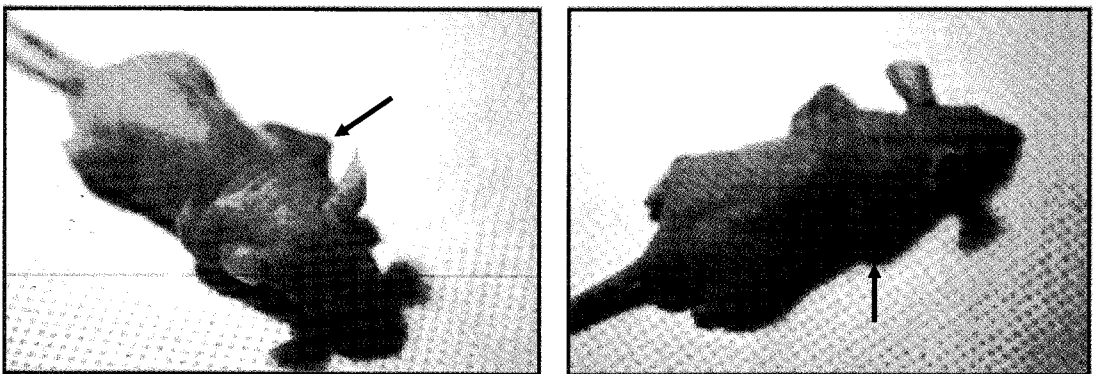


Fig. 1. Photo of nude mouse with human tumor xenografts in both flanks. P-gp positive HCT15/CLO2 colon cancer was grown in left, and P-gp negative A549 lung cancer in right flank.

세포들을 6개월 이상 doxorubicin을 첨가하지 않은 배지에서 추가 배양하여, 6개월 이후에도 정상적인 생장양상을 보이며 또한 유의성 있는 내성을 나타내는 HCT15/CLO2 세포주를 최종적으로 얻어 사용하였다. 암세포를 피하주사후 평균 2주 정도에 양쪽 측면에 1 gm정도의 종양이 형성되었다 (Fig. 1).

다약제내성 발현은 RT-PCR에 의한 *mdr1*-mRNA의 측정과 P-당단백에 대한 항체를 이용한 면역조직염색으로 증명하였다. RT-PCR 검사에서 A549세포에서는 전기영동한 젤에서 *mdr1* 위치에 선영이 나타나지 않았고, 배양배지에 doxorubicin를 유지시킨 HCT15/CLO2 세포주에서는 *mdr1* 위치에 선명한 선영이 나타나 *mdr1* 유전자가 과다발현된 것으로 판단하였다. 종양조직에서의 P-당단백 생성은 P170-glycoprotein 항체 (clone JSB-1)를 이용한 면역화학염색 검사에서는 대조군인 A549 폐

암에서는 종양세포에 염색이 되지 않았으나, HCT15/CLO2 암조직 절편에서는 세포막에 진하게 염색되었고 부분적으로는 세포질에 분절상으로 염색이 되어 P-당단백의 생성을 알 수 있었다 (Fig. 2).

## 2. 세포독성 실험

SRB법으로 측정한 세포독성실험결과는 Table 1에 표시하였다. KR의 세포독성에서 실험에 사용한 100 μM 농도에서 A549세포는 94.6%, HCT세포는 98.8%, HCT15/CLO2세포 94.6%의 생존율을 보여 세포의 SRB섭취능이 90% 이상 유지되었고, 300 μM와 1 mM의 농도에서도 90% 이상의 값으로 나타나 세포독성은 높지 않았다. Verapamil을 이용한 실험 결과도 KR과 유사하여 A549세포, HCT세포, HCT15/CLO2세포 모두에서 1 mM농도 배양시에

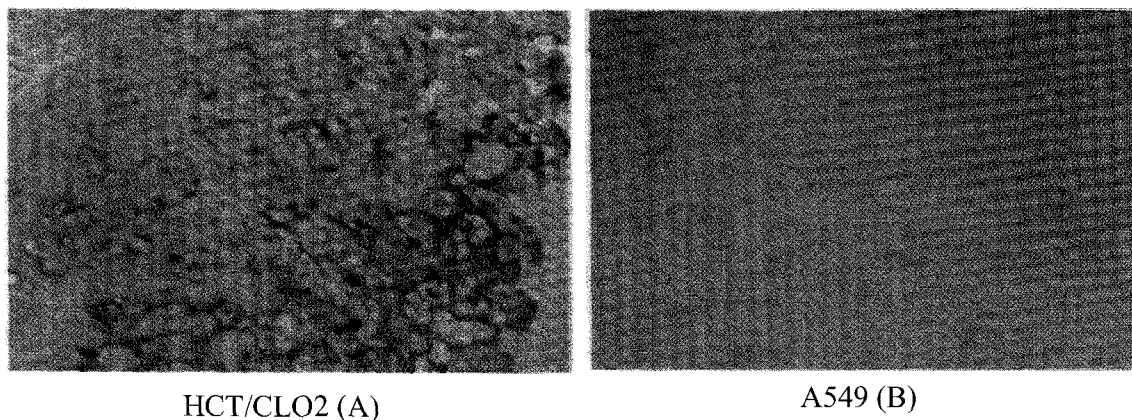


Fig. 2. Immunochemical staining of tumor tissues with anti-P170-glycoprotein antibody revealed intense brownish staining in cell membrane of P-gp (+) HCT/CLO2 tumor (A), whereas P-gp negative A549 tumor (B) showed no visible staining.

Table 1. Results of cellular cytotoxicity of KR-30035 and Verapamil measured with Sulforhodamine B method

Cells 농도 (μM)	Verapamil			KR-30035		
	A549	HCT15	HCT15/CLO2	A549	HCT15	HCT15/CLO2
100	99.58	93.54	96.57	94.61	98.76	94.62
300	93.54	87.41	102.57	106.37	95.37	99.07
1000	94.27	92.29	91.63	90.58	91.64	90.61

Values are represented as percentage cell viability.

도 세포성장이 대부분 90% 이상으로 유지되었으므로 KR과 verapamil은 두 약제 모두가 1 mM 농도로 배양액에 30분간 배양하였을 때 세포독성은 높지 않은 것으로 판단되었다.

### 3. KR-30035가 누드마우스 체내의 Tc-99m MIBI분포에 미치는 영향

대조군 (GrC), 25 mg/kg (Gr3), 50 mg/kg (Gr4)를 복강내 주사한 군과 25 mg/kg를 정맥주사한 군

**Table 2.** Biodistribution of Tc-99m MIBI in mice treated with various doses of KR-30035 infused either intraperitoneally or intravenously.

group	organ	10min	30min	90min	240min
(GrC) control	Blood	0.23±0.05	0.13±0.01	0.07±0.01	0.03±0.00
	Liver	22.8±2.9	18.4±2.37	10.7±2.3	1.82±0.25
	Kidney	32.6±2.62	7.4±0.92	13.1±2.6	2.1±0.39
	Intestine	11.8±0.9	13.9±2.6	21.4±0.68	4.6±1.19
	Lung	1.5±0.31	1.2±0.28	0.6±0.16	0.4±0.09
	Heart	11.3±1.7	11.2±1.86	11.1±1.18	9.0±1.31
(Gr3) 25mg ip	Blood	0.3±0.08	0.15±0.04	0.12±0.04	0.03±0.007
	Liver	23.9±1.5	22.8±3.3*	14.9±6.4	2.1±0.2
	Kidney	66.6±4.22+	41.2±12.8+	15.4±1.9+	3.1±0.28+
	Intestine	12.1±0.9	12.4±0.7	15.4±11.6	15.2±4.3
	Lung	2.3±0.73	1.0±0.23	0.8±0.2	0.4±0.13
	Heart	10.5±4.2	9.5±2.7	9.9±1.5	9.1±1.3
(Gr4) 50mg ip	Blood	0.4±0.02	0.14±0.02	0.1±0.01	0.03±0.01
	Liver	21.2±1.76	21.7±3.1*	9.5±6.3	2.8±1.29
	Kidney	53.2±12.4+	43.7±1.9+	16.2±0.86+	3.6±0.94+
	Intestine	8.9±3.3	10.7±1.5	12.8±0.55	10.3±6.02
	Lung	2.9±0.4	1.4±0.24	0.9±0.21	0.4±0.07
	Heart	11.2±4.1	9.0±2.3	8.6±4.6	6.1±1.6
(Gr5) 25mg iv	Blood	0.7±0.08	0.2±0.02	0.08±0.01	0.04±0.01
	Liver	7.6±1.1**	10.8±1.4**	8.0±2.4**	2.1±0.4
	Kidney	25.9±7.7+,++	18.6±14.5+,++	10.9±2.4+,++	3.1±0.4+,++
	Intestine	5.3±0.2	7.3±2.9	9.4±1.7	9.1±2.5
	Lung	6.7±0.3	2.7±1.5	1.1±0.3	0.8±0.3
	Heart	24.8±1.7+++	17.0±4.7+++	19.5±6.1+++	16.3±1.9+++

Values are represented as percentage injected dose per gram of tissue (%ID/gm). Organ uptakes were measured in different time points after injection. GrC: without treatment of KR-30035, Gr3 : treatment with 25 mg/kg i.p. of KR-30035, Gr4 : treatment with 50 mg/kg i.p. of KR-30035, Gr5 : treatment with 25 mg/kg i.v. of KR-30035, \* : p<0.01, Compare to liver uptake in GrC at 30 min.

\*\* : p<0.01, Compared to liver uptake in Gr3 and Gr4 at same times, + : p<0.01 Compared to kidney uptake in GrC at same times ++ : p<0.01 Compared to kidney uptake in Gr3 and Gr4 at same times, +++ :p<0.01 Compared to heart uptake in GrC, Gr3 and Gr4 at the same times.

(Gr5)에서 KR이 누드마우스 체내의 Tc-99m MIBI 분포에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. Tc-99m MIBI는 정맥주사후 섭취율을 처음으로 측정할 10 분의 혈액 1 gm당 섭취율이 1%이하로 빠르게 혈중에서 소실되어 체내장기에 섭취되었으며, 무게당 섭취율은 신장이 가장 높았고, 간 섭취율과 담도배설에 의한 소장과 대장 섭취도 높았다. 간장, 신장의 섭취는 시간이 경과함에 따라 감소하였으나 소장과 대장의 섭취는 간내섭취의 감소와 연관되어 시간의 경과에 따라 약간 증가하였다. Tc-99m MIBI의 혈중소실은 Gr3, Gr4, Gr5의 10분과 30분치가 GrC보다 높았다. 간 섭취율은 Gr3의 10분치는 GrC와 유사하나 Gr3, Gr4의 30분치는 GrC보다 유의하게 증가되어 간내 저류가 많았고 ( $p<0.01$ ), Gr3과 Gr4군에는 차이가 없었다. 그러나 Gr5의 간 섭취율은 10분, 30분, 90분에 모두 다른 세군 (GrC, Gr3, Gr4)보다 유의하게 낮았으나 ( $p<0.01$ ), 240분치는 유사하였다. 신장섭취는 Gr3, Gr4, Gr5의 모든 시간대에서 GrC보다 높았으나 ( $p<0.01$ ), Gr5는 Gr3과 Gr4보다 낮았다 ( $p<0.01$ ). GrC의 위장관의 방사능 섭취량은 Gr3과 Gr4와 초기섭취가 유사하고 90분에서는 더 높았으나, 240분에서는 KR을 주사한 군이 GrC보다 높아, 장내로의 배설이 지연됨을 알 수 있었다. 그러나 Gr5에서의 10분, 30분 섭취율은 다른 군 보다 낮았다. 폐 섭취율은 Gr3, Gr4, Gr5의 순서로 높아졌으나 240분에는 유사한 값을 보였다. 심장 섭취율은 GrC에서 10분 섭취율

이 Gr3, Gr4보다 약간 높았으며 시간 경과에 따른 변화는 많지 않았고, GrC, Gr3, Gr4군 간에 유사하였다. 그러나 Gr5에서는 10분의 섭취가 다른 군의 2배 이상 높았고, 모든 시간대에서 GrC, Gr3, Gr4군 보다 섭취가 높았다 ( $p<0.01$ ).

#### 4. KR-30035와 verapamil의 종양조직내 Tc-99m MIBI섭취에 미치는 영향

종양에서의 Tc-99m MIBI섭취는 다약제내성이 있는 HCT15/CLO2 종양이 다약제내성이 없는 A549 종양보다 높았다 (Table 3). 종양내 Tc-99m MIBI의 섭취는 P-당단백 (+), P-당단백 (-)모두에서 Gr1이 Gr2보다 높았다. P-당단백 (+) HCT15/CLO2 종양에서의 Tc-99m MIBI 섭취는 verapamil을 주사한 경우 대조군과 비교하여 Tc-99m MIBI 주사후 10분 107%, 30분에 103%, 90분에 96%, 240분에 118%로 증가하였고, KR을 주사한 경우는 10분 후 119%, 30분 후 127%, 90분 후 113%, 240분 후 132%로 KR 주사 후에 Tc-99m MIBI의 섭취가 verapamil 주사시보다 통계적으로 유의하게 높았다. 다약제내성이 없는 A549 종양에서 verapamil을 주사한 후 Tc-99m MIBI의 섭취는 GrC에 비교하여 주사후 10분에 99%, 30분에 101%, 90분에 101%, 240분에 116%로 240분 섭취율 만이 GrC에 비하여 유의하게 높았고, KR을 주사한 경우는 10분 후 113%, 30분 후 108%, 90분 후 121%, 240분 후 122%로 모두 대조군에 비하여 유의하게

**Table 3.** Comparison of Tc-99m MIBI uptake between P-gp positive HCT15/CLO2 and P-gp negative A549 tumors with intraperitoneal treatment of 10 mg/kg KR-30035 or Verapamil

		10min	30min	90min	240min
(GrC)	mdr(+)	1.77±0.11*	1.57±0.07*	1.73±0.18*	1.29±0.03*
control	mdr(-)	1.39±0.12	1.30±0.09	1.07±0.08	1.09±0.06
(Gr1)	mdr(+)	2.10±0.29*	2.01±0.24*	1.97±0.19*	1.71±0.22*
KR-30035	mdr(-)	1.58±0.20	1.41±0.37	1.30±0.20	1.34±0.04
(Gr2)	mdr(+)	1.89±0.24*	1.54±0.04*	1.58±0.16*	1.53±0.16*
Verapamil	mdr(-)	1.39±0.21	1.25±0.22	1.09±1.10	1.27±0.10

Values are expressed as percentage injected dose/gm of organ. \* :  $p<0.01$ , Compared to Tc-99m MIBI uptake of mdr(-) cell in same time and with the same pharmacologic treatment.



높았다. 두 종류의 종양내 Tc-99m MIBI의 섭취는 KR을 주사한 경우가 verapamil을 주사한 경우보다 10분, 30분, 90분, 240분에서 모두 유의하게 높았다 (Table 4).

다약제 내성이 발현된 HCT15/CLO2 종양에서의 Tc-99m MIBI 섭취정도는 verapamil을 주사한 군보다 KR을 주사한 군에서 유의하게 높았다 (p<0.05).

**5. KR-30035 주입용량에 따른 종양내 Tc-99m MIBI섭취**

P-당단백 (+) 종양내 Tc-99m MIBI섭취율은

Gr3, Gr4, Gr5이 10분, 30분, 90분에서 GrC보다 높았고, 10분 섭취율은 Gr3 > Gr4 > Gr5의 순서로 높았고, 30분 섭취율은 Gr4 > Gr3 > Gr5 의 순서로 높았다. 240분 섭취율은 절대값이 낮았으나 % 증가율은 Gr5 > Gr4 > Gr3의 순서로 높았다. 전체적으로 10분치는 Gr3이 높았으나, 30분과 90분의 섭취율은 Gr4가 가장 높았다. KR의 혈액학적 작용이 소실된 240분 섭취율은 Gr5가 가장 높았고, Gr4, Gr3의 순서로 섭취가 증가되었다. P-당단백 (-) 종양에서의 Tc-99m MIBI 섭취율은 Gr3와 Gr4에서 10분 섭취율이 증가되었으나, 30분 섭취율은 오히려 GrC보다 낮았고, 90분, 240분 섭취율이 소

**Table 4.** Percentage increases in Tc-99m MIBI uptake with 10ug KR-30035 or Verapamil in P-gp positive HCT15/CLO2 and P-gp negative A549 tumor xenografts in mice

		10min	30min	90min	240min
KR-30035	HCT15/CLO2	119*	127*	113*	132*
	A549	113*,**	108**,	121**,	122**,
Verapamil	HCT15/CLO2	107	103	96	118
	A549	99	101	101	116**

Values are expressed as mean percentage increases in tumor uptake compared to control mice.

$$\text{(value} = \frac{\%ID/\text{gm of VP or KR treated group}}{\%ID/\text{gm of control group}} \times 100)$$

\* : p<0.05, compare to percentage increase of Tc-99m MIBI in cells with verapamil treatment,

\*\* : p<0.01, significant increased Tc-99m MIBI uptake compare to the uptake in GrC.

**Table 5.** Effect of various doses of KR-30035 on tumoral uptake of Tc-99m MIBI in P-gp positive HCT15/CLO2 and P-gp negative A549 cells in nude mice bearing human tumor xenografts

		10min	30min	90min	240min
(GrC) control	mdr(+)	0.49±0.07	0.20±0.04	0.09±0.01	0.02±0.01
	mdr(-)	0.63±0.19	0.52±0.04	0.30±0.10	0.13±0.03
(Gr3) 25mg i.p.	mdr(+)	0.85±0.48	0.31±0.21	0.13±0.05	0.02±0.01
	mdr(-)	0.83±0.09	0.48±0.24	0.32±0.03	0.15±0.03
(Gr4) 50mg i.p.	mdr(+)	0.63±0.14	0.36±0.07	0.16±0.02	0.03±0.01
	mdr(-)	0.69±0.19	0.46±0.07	0.38±0.07	0.19±0.01
(Gr5) 25mg i.v.	mdr(+)	0.57±0.29	0.26±0.10	0.14±0.08	0.03±0.01
	mdr(-)	0.59±0.22	0.44±0.07	0.26±0.03	0.11±0.04

Values are expressed as percentage injected dose/gm of organ.

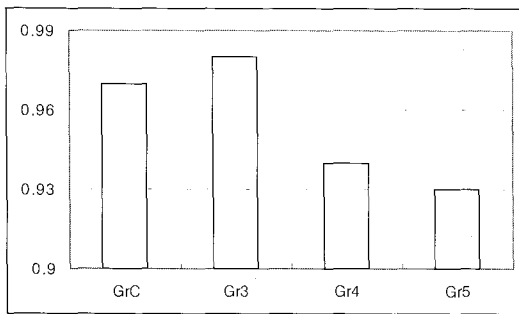
**Table 6.** Percentage increases in Tc-99m MIBI uptake with different doses of KR-30035 in P-gp positive HCT15/CLO2 and P-gp negative A549 tumor xenografts in mice

		10min	30min	90min	240min
(Gr3) 25mg i.p.	mdr(+)	173*	150*	138*	144*
	mdr(-)	131	93	106	115
(Gr4) 50mg i.p.	mdr(+)	130*	178*	170*	177*
	mdr(-)	109	88	126	142
(Gr5) 25mg i.v.	mdr(+)	117*	129*	148*	196*
	mdr(-)	92	86	86	85

Values are expressed as percentage increases in uptake compared to those of control mice.

$$\text{(Value} = \frac{\%ID/gm \text{ of VP or KR treated group}}{\%ID/gm \text{ of control group}} \times 100)$$

\* : p<0.05, compare to percentage increase in Tc-99m MIBI uptake in mdr(-) cell.



**Fig. 3.** Effect of different doses of KR-30035 on Tc-99m MIBI washout rate in P-gp positive HCT15/CLO2 tumor grafted in nude mice. ns : no significance. GrC: without treatment of KR-30035, Gr3 : treatment with 25 mg/kg i.p. of KR-30035, Gr4 : treatment with 50 mg/kg i.p. of KR-30035, Gr5 : treatment with 25 mg/kg i.v. of KR-30035.

량 증가하였으나, 증가정도는 P-당단백 (+)종양 보다 유의하게 낮았다 (p<0.05). 특히 Gr5에서는 측정된 모든 시간에서 GrC보다 섭취율이 감소하였다 (Table 5, 6). P-당단백 (+) 종양에서 Tc-99m MIBI 배출율은 Gr3가 0.98로서 GrC의 0.97보다 약간 높았으나 유의한 차이는 아니었고, Gr4는 0.94, Gr5는 0.93으로서 GrC와 Gr3보다 낮아 용량을 증가시키거나 정맥주사한 경우 배출율이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3). 그러나 P-당단백 (-) 종양에서는 Gr3에서의 배출율은 0.81, Gr4는 0.72, Gr5는 0.80

로서 KR을 투여한 군의 배출율이 GrC의 배출율 0.79와 차이가 없었다. 그러나 종양의 특성이 다른 관계로 P-당단백 (+)종양과 P-당단백 (-)종양과의 직접적인 비교는 시행하지 않았다.

## 고찰

약성종양의 항암화학제 요법시 치료실패의 중요한 원인인 다약제내성 (multidrug resistance, MDR)은 항암제를 세포바깥으로 배출시켜 세포내 약제의 저류를 감소시키는 P-당단백과 multidrug-resistance associated protein (MRP)의 과도한 생성이 연관되어 있다.<sup>1,2)</sup> 다약제 내성의 발생 기전은 P-당단백과 MRP 외에도 110 KDa 크기의 lung resistant related protein (LRP)의 생성, 많은 항암제의 표적이 되는 세포내 DNA효소인 topoisomerase II의 변이 및 감소, 세포질내의 글루타치온의 증가, pyruvate kinase의 변화와도 관련이 있는 복합적인 현상이다.<sup>1-4,25)</sup> MRP는 *mrl1* 유전자에 발현에 의하여 생성되며 작용기전은 P-당단백과는 다르게 글루타치온 S-conjugate efflux pump로 작용하여 글루타치온에 접합한 약제를 배출시키거나 글루타치온과 같이 배출시킨다.<sup>6)</sup> 특히 vincristine 등의 빈카알카로이드계 항암제 배출에 연관된 약제내성의 발생원인이 되고, leukotrienes의 이동에도 작용한다.

그러나 간에는 MRP1 발현이 적고 비특이적 음이온의 배설에 관여하는 MRP2가 간세포의 미세담관면으로 발현되어 있으며, 담즙배설의 이상이 나타나는 Dubin-Johnson증후군에서는 MRP2가 결핍되어 있었다고 보고되었다.<sup>6)</sup> 동물실험에서 *buthionine sulfoximine* (BSO)으로 세포내 글루타치온농도를 고갈시키는 경우 MRP에 의한 약제내성은 소실된다고 한다. Benderra 등<sup>26)</sup>은 P-당단백은 세포막을 통한 약물의 배출에 관련되고, 세포질내의 소낭(vesicle)을 통한 약제의 세포 바깥으로의 이동은 MRP만이 관여한다고 보고하였다.

다약제내성의 진단은 *mdr1* 유전자, P-당단백과 MRP 발현을 측정하며 암조직에서 RT-PCR에 의한 *mdr1* mRNA의 측정과 Northern blotting에 의한 P-당단백의 측정, P-당단백과 MRP에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적염색 및 유세포분석법(flow cytometry) 등의 체외 검사법과 동축점(confocal) 현미경을 이용하여 세포내 약제의 분포를 관찰하는 방법 등이 이용되고 있다.<sup>15-17,27)</sup> 실제로 아주 적은 정도의 *mdr1* 유전자도 다약제내성을 유발할 수 있으므로 RT-PCR같은 민감한 방법으로 적은 양의 mRNA도 찾을 수 있다.<sup>1-4)</sup> 본 연구에서도 doxorubicin을 배양액에 첨가하여 다약제내성을 유도시킨 HCT/CLO2세포에서 RT-PCR방법으로 *mdr1* mRNA의 과발현을 측정할 수 있었고, 누드마우스에 HCT/CLO2세포를 이종이식하여 생성된 종양조직의 항P-당단백 항체를 이용한 면역조직화학 염색법으로 세포막에 진하게 염색되어 다약제내성이 성공적으로 유도되었음을 확인할 수 있었다. P-당단백이나 MRP에 의한 암세포의 약제 배출능을 평가에는 rhodamine-123나 doxorubicin, daunorubicin 등 형광을 발산하는 약제의 세포저류를 측정하는 방법이 이용되고 있다. 그러나 이러한 방법들의 검사기술이 간단하지는 않고, 매년 암세포나 종양조직을 얻어 체외에서 시행하는 검사이므로 실질적으로 이용하기에 힘든 경우가 많다. 한편 P-당단백이 세포막에 발현된 종양에서도 항암제 치료에 반응을 보이는 경우가 있고 그 반대의 경우도 있을 수 있어, 체외검사의 결과만으로 판단하는 경우에는 치료방침의 선택에 혼선이 발생할 수도

있다. 특히 고형종양의 치료에서 다약제 극복제제 사용 시에 P-당단백의 존재여부와 치료결과가 별다른 연관성을 보이지 못한 경우가 많고, 그 원인은 극복제제의 농도가 P-당단백을 차단할 만큼 충분한 정도로 도달하지 못하거나 암세포에 존재하는 P-당단백이 비활동형이기 때문이라고 추측된다<sup>28)</sup>. 또한 Oda 등은<sup>28)</sup> 같은 검체에서 RT-PCR로 측정된 *mdr1* RNA 발현과 조직화학염색에서 단백질 발현 정도, dot blot소견이 일치하는 정도는 47%였고 대부분은 P-당단백이 불균등하거나 낮은 농도로 분포하여 유전자 수준의 변화가 반드시 단백질 생성과 연관되어 있지는 않아, 한가지 방법으로 정확하게 평가할 수 없다는 문제점이 있다고 하였다. 그러므로 체내에서 다약제내성의 발현을 비침습적으로 진단하고, P-당단백의 MRP의 동적인 약제배출능을 객관적으로 평가할 수 있어야 만이 적절한 극복제를 선택할 수 있거나 불필요한 극복제의 사용을 피할 수가 있다.

Tc-99m MIBI, Tc-99m tetrafosmin, Tc-99m Q58, Tc-99m Q63 등의 화합물을 이용한 SPECT(single photon emission computed tomography)영상법과 C-11표지 colchicine이나 doxorubicin 등의 항암화합물을 이용한 PET(positron emission tomography) 영상법은 P-당단백과 MRP의 운반능을 체내에서 평가할 수 있다고 보고되었다<sup>29)</sup>. P-당단백에 의한 약제의 내성이 발생한 악성종양에서 약제배출능을 비침습적인 방법으로 체내에서 진단할 수 있는 추적제는 3가지의 조건을 충족하여야 한다<sup>29)</sup>. 첫째, 세포막과 세포의 생물학적 제제에 대한 비특이 결합이 없어야 한다. 둘째, 약제 감수성 세포와 P-당단백 발현세포 사이에 섭취정도가 명확한 구별이 되어야 한다. 셋째, 약제내성 극복제의 투여시 내성세포에서 섭취정도가 현저하게 증가하여야 한다. 임상에서 가장 널리 쓰이는 심근관류 영상용 추적자인 Tc-99m MIBI는 Tc-99m tetrafosmin보다 종양내 섭취가 많다고 보고<sup>29)</sup>되었으며 실제 임상에서도 악성종양의 평가에 많이 이용되고 있다. Tc-99m MIBI는 감마선을 방출하는 지용성 방사성의약품이며 감마카메라로 체내분포를 영상화할 수 있어, 심근관류를 검사하는 제제로 개발되었

으나, 악성종양에도 선택적으로 섭취되는 성질을 이용하여 암의 진단 및 치료방법의 선택, 치료후의 추적관찰 등에 광범위하게 사용되고 있다<sup>18)</sup>. Tc-99m MIBI의 세포내 섭취기전은 8-10kDa의 세포질 단백질에 결합, 단순한 지방질로 용해, 확산과 수동적 막투과 등의 세포막 투과기전에 의한다고 알려져 있고 섭취정도는 대부분의 지용성 양이온들과 유사하게 세포막의 높은 음전위압을 가지고 사립체가 풍부한 심장, 간, 신장, 근육 등의 장기에 많이 분포한다<sup>30,31)</sup>. Tc-99m MIBI의 종양내 섭취정도는 종양의 혈류량, 암세포의 생존능과 P-당단백의 발현의 정도에 의해 영향을 받으며<sup>18)</sup>, 항암약제들의 세포내 섭취기전과 유사하게 섭취되며, 세포막에 높은 농도의 P-당단백이 존재하는 경우에는 세포내에 저류되지 못하고 바로 배출된다<sup>32,33)</sup>. 다약제 내성이 발현된 종양에서는 Tc-99m MIBI의 섭취가 감소되므로, 핵의학영상에서 암조직의 Tc-99m MIBI 섭취를 정량적으로 측정하면 다약제 내성 유전자의 과발현을 예측할 수 있다고 보고된 바 있다<sup>34,35)</sup>. 최근의 보고들은 실제 환자에서 암세포의 다약제 내성의 발현유무와 종양병변의 Tc-99m MIBI 섭취정도 사이에 음의 상관성이 있다고 하였다<sup>32,34)</sup>. 실제 유방암 조직에서 Tc-99m MIBI 섭취정도는 P-당단백의 발현정도를 조사한 연구에서는 역상관 관계가 있으나, 종양조직내 P-당단백 분포의 불균등하게 분포하여 일치 정도가 다르게 나타나는 경우가 있다고 하였고<sup>36)</sup>, Del Vecchio 등<sup>37)</sup>은 유방암환자에서 Tc-99m MIBI 스캔과 P-당단백의 분포를 비교한 결과 P-당단백 발현이 높은 경우가 낮은 경우에 비하여 Tc-99m MIBI 배출이 2.7배 높다고 하였고, Bom 등<sup>38)</sup>은 소세포 폐암에서 Tc-99m MIBI 섭취정도가 낮은 경우 항암제치료에 대한 관해율이 낮았다고 보고한 바가 있다. Vergote 등<sup>39)</sup>은 MRP, P-당단백은 유사한 다약제내성 표현형이며 Tc-99m MIBI는 두가지 단백질의 운반기질 (transport substrate)이고, MDR, MRP가 Tc-99m MIBI 배출에 관련되는 정도는 비슷하다고 하였다. 그러나 평균 능동배출 상수 (ka)로 나타낸 효능이 daunorubicin이나 다른 anthracycline계 약제보다 50-100배 낮아 배출 작용이 낮다고 보고하였다. 이러한 보고

로 미루어 보아 Tc-99m MIBI로 평가한 P-당단백이나 MRP의 발현정도는 실제보다 적게 평가될 수 있다고 추측할 수 있으나, 이들은 암세포를 제외어서 평가하였으므로 체내에서 이러한 차이가 반드시 관찰될 것인지는 알 수가 없다.

P-당단백에 경쟁적으로 작용하여 항암제의 세포 외 배출을 억제함으로써 세포내 약물의 농도를 높여주는 다약제내성 길항제들은 다양한 화학적 특성을 지니고 있으나, 양전하를 띠고 소수성인 공통 특성을 가진다.<sup>8-9)</sup> 길항제들의 작용기전으로는 MDR efflux에 의한 이동에 관여하는 공통적인 결합부위에 대한 경쟁적 결합, 또는 단백질 내의 인식 도메인 (recognition domain)과의 친화성 변화 등이 알려져 있고,<sup>9)</sup> 내성극복제중 일부는 세포고사 (apoptosis)를 촉진하여 내성을 극복하는데 기여한다는 보고도 있다<sup>29)</sup>. 약제 내성 암세포는  $Ca^{++}$  농도가 정상보다 높다는 사실에 착안하여 세포막의  $Ca^{++}$  통로차단제인 verapamil을 사용하면 내성이 억제된다는 보고<sup>40)</sup> 이후 항암제 치료시 약제내성의 극복에 verapamil을 병용요법이 사용된 바 있고, calmodulin 길항제, quinine 유도제, 합성 isoprenoids, tamoxifen, 그리고 cyclosporin 등의 약제가 P-당단백의 효과를 역전시켜 세포에서의 항암제 배출을 억제시키는 것으로 알려져 있다<sup>8,9)</sup>. P-당단백에 길항제로 가장 많이 연구되어온 verapamil은 지용성 side-chain을 가진 관동맥확장제로서, 최대 6-10 uM/L의 혈중 농도에서 임상실험이 시행된 바 있다. 길항작용의 기전은 P-당단백에 대한 경쟁적인 억제 작용 (competitive inhibition)이라고 알려져 있다<sup>11)</sup>. 임상실험에서는 verapamil이 1-2 uM/L의 혈장농도에서 심각한 심장독성과 저혈압을 유발하였으므로<sup>13)</sup>, 다약제 내성을 극복하는 능력은 향상되면서 심혈관계 독성을 줄이기 위하여 verapamil의 구조를 변형시킨 여러 가지 verapamil 유도체들이 합성이 연구되어왔고 실제 몇몇 제품은 임상적인 응용도 되었다<sup>41,42)</sup>. Dexverapamil (dextro-(d-) stereoisomer of verapamil, Knoll pharmaceuticals, Whippany, NJ)은 임상적으로 가장 많이 이용된 verapamil 유도체중의 하나이다. Wilson 등<sup>43)</sup>은 EPOCH 항암요법 치료에 반응이 없었던 림프종의 치료시 dexvera-

pamil을 병용하여 부분적으로 관해를 증가시켰다고 보고하였고, 최대 치료용량을 900mg/m<sup>2</sup>/d로 사용하였을 때도 별다른 부작용이 없었다고 보고하였으나, 이에 대조적으로 효능이 없었다는 연구도 있다<sup>44)</sup>. MDR 극복제를 투여하는 경우에는 장기에 대한 독성이 증가할 수 있으나, 일반적으로 항암치료의 실패는 정상 장기에 대한 독성보다는 부적절한 치료 반응에 의한 경우가 대부분인 만큼 큰 문제가 되지는 않는다. 실제 dexverapamil 병용한 치료에서 항암제에 의한 혈액학적 독성을 증가되었다고 보고되었으나 대부분에서 경미하고 가역적인 변화들이었다<sup>45)</sup>.

KR은 한국화학연구소에서 합성한 새로운 다약제내성 극복제제로서 verapamil의 구조에서 두 개의 메틸기를 제거하고 그 부분에 하나의 방향족환과 메톡시기를 첨가한 구조를 가지고 있다<sup>42)</sup>. 조 등<sup>14)</sup>은 P-당단백이 생성된 HCT15 대장암세포에서 KR은 verapamil보다 paclitaxel에 의한 세포독성을 15배 증가시켰고, 암세포내 최대 rhodamine 축적율도 KR을 투여한 경우가 동일농도의 verapamil을 투여한 경우보다 1.5배 더 높아 다약제 내성의 극복제로 사용할 수 있을 것이라 하였다. 조 등<sup>21)</sup>의 다약제 내성 유도 백혈병세포에서의 다약제 내성 역전효과 연구에서는, Tc-99m MIBI 섭취정도가 투여한 verapamil과 KR의 농도에 비례하여 증가하였으며, 다약제 내성인자의 억제효과는 KR과 verapamil의 투여량에 비례하여 증가하고, 동일한 용량을 사용하였을 때의 섭취증가 정도는 두 군 간에 유사하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 KR은 1 mM의 농도로 배양하여도 세포생존이 대부분 90%이상으로 유지되었으므로 이러한 차이가 세포손상을 야기하는 약제독성에 의한 현상은 아니었음을 규명할 수 있었다. 조 등<sup>21)</sup>의 연구에서는 verapamil과 KR 모두에서 정도의 차이는 있으나 P-당단백이 없는 A549 암조직에서도 Tc-99m MIBI 섭취 증가가 관찰되었다고 보고하였고, Piwnica-Worms 등<sup>20)</sup>의 연구에서도 유사한 결과가 보고된 바가 있다.

저자들은 조 등<sup>21)</sup>이 체외실험에서 관찰된 결과가 동물실험에서 재현될 수 있는지를 조사하고, P-당

단백과 MRP의 생성 뿐만 아니라 다약제내성 극복제의 효능을 비침습적인 방법으로 체내에서 직접 평가할 수 있다고 알려진 Tc-99m MIBI의 체내 분포를 통하여 KR의 투여용량 차이에 따른 다약제내성 극복능을 평가하여 임상적으로 사용할 수 있는 적정용량을 찾고자 하였다. KR과 verapamil의 효능을 비교한 저자들의 연구에서는, KR 투여군에서는 verapamil 투여군보다 Tc-99m MIBI 섭취율의 증가가 유의하게 높았고, Tc-99m MIBI 제거율은 verapamil과 KR 투여군 모두에서 대조군보다 낮았으나, verapamil과 KR 투여군 사이에 유의한 차이는 없었다<sup>21)</sup>. 그러나 세포를 이용한 체외실험에 비하여 Tc-99m MIBI 섭취증가 정도는 낮았다. 체내에서는 실험관 실험에 비하여 충분한 농도의 약제가 종양조직에 분배되지 않아 이러한 차이가 관찰되었으리라 생각되며, 한편으로는 칼슘통로 개방제의 약리학적 혈관확장 작용에 의하여 종양조직의 혈류가 증가되며, 세포막의 막전위차의 변화를 야기하여 Tc-99m MIBI 섭취를 증가시켰을 가능성이 있으므로, 순수한 암세포의 다약제내성 극복 효과에 의한 섭취증가 정도가 모호하게 되었을 가능성이 있을 것으로 추측된다.

본 연구에서는 예비실험을 통하여 KR의 LD50 용량이 50 mg/kg 정맥주사라는 자료를 얻은 후 (미발표 자료), 25 mg/kg (Gr3)와 50 mg/kg (Gr4)의 복강내 주사한 경우와 25 mg/kg를 정맥주사 (Gr5) 한 경우로 구분하여 투여용량에 따른 동물 장기와 종양내 Tc-99m MIBI 섭취의 변화를 관찰하였는데, Gr3, Gr4, Gr5의 순으로 10분 혈중섭취율이 증가하여 제거가 늦었고 신장과 간 섭취는 실험군 간에 시간별로 다양한 변화를 보였다. P-당단백이 많이 존재한다고 알려진 간섭취는 10분에는 Gr3, Gr4와 대조군 (GrC)이 비슷하였으나 30분, 90분, 240분에는 두 군이 모두 높았으며, 신장섭취는 모든 시간대에 Gr3, Gr4군이 GrC보다 높았다. 심장과 폐섭취는 10분에 유사하였으나, 30분 이후에는 GrC군에서 Gr3, Gr4보다 더 높았다. 이에 반하여 Gr5는 Gr3, Gr4와는 다른 양상을 보여 간과 신장 섭취는 240분을 제외한 모든 시기에 GrC, Gr3, Gr4보다 현저하게 낮았으며, 혈액의 방사능 치와 심장과 폐

의 섭취는 GrC, Gr1, Gr2보다 많이 높았다. Gr5군에서 P-당단백이 존재한다고 알려진 간과 신장에서의 Tc-99m MIBI의 섭취가 대조군보다 높고, P-당단백이 없는 심장에서의 섭취는 현저하게 증가된 현상은 P-당단백과 연관된 Tc-99m MIBI의 섭취기전으로 설명하기에는 적당하지 않으므로, 고용량 KR을 정맥주사할 경우에 나타나는 심혈관계 작용에 의한 현상으로 판단된다. 즉 고용량의 KR은 심장수축력을 감소시키고 혈관을 확장시켜 폐 울혈을 증가시키게 되어 폐와 심장조직내 섭취를 증가시켰으나, 전신 혈류순환을 감소시켜 간과 신장 등에서는 섭취가 오히려 감소되었을 것으로 추측된다. 최등<sup>25)</sup>의 보고에 의하면 KR의 생쥐의 적출 대동맥분절 및 기니피그의 적출 심장에 대한 심혈관계 약리작용은, KR의 대동맥 평활근 확장능이 verapamil보다 25배 낮았고, 적출한 기니아피그 심장의 좌심실압 감소능은 KR이 35배정도 낮았다고 하였다 하나, 대량에서는 심한 약리작용이 나타날 수 있을 것이다. P-당단백 양성인 종양에서 Tc-99m MIBI의 종양내 섭취는 10분에는 Gr3군의 섭취증가가 가장 높았으나, 90분, 240분의 섭취는 Gr4나 Gr5군이 Gr3군보다 높았다. P-당단백 음성인 종양에서는 섭취가 증가되지 않거나, 증가정도가 P-당단백 양성종양보다 낮았다. 이러한 차이도 KR의 약리작용과 연관이 있을 것으로 판단되며, 심혈관 약리작용이 소실되어 안정상태로 회복되는 90분이나 240분에서의 종양내 Tc-99m MIBI 섭취 정도는 Gr4, Gr5군이 더 높았을 것으로 생각된다. Barbaris 등<sup>46)</sup>은 유방암세포와 P-당단백을 발현시켜 paclitaxel에 200-300배 정도 내성이 증가된 유방암 세포를 이식한 누드마우스에서 Tc-99m MIBI의 체내분포를 연구한 결과 P-당단백 음성 종양의 섭취정도가 P-당단백이 발현된 종양보다 2.2-2.5배 높았다고 하였다. 그러나 P-당단백 차단제인 PSC833을 투여한 경우 P-당단백 양성 암에서는 약물의 농도에 비례하여 섭취정도가 증가하였으나, P-당단백 음성인 경우에는 증가가 없었다고 하였다. 그러므로 이러한 차이는 PSC833이 혈관계작용이 없는데 비하여 verapamil유도체가 혈관확장 작용의 종양조직으로 혈류를 증가시키고, 암세포의 세포막 전위차를 증

가시켜 Tc-99m MIBI섭취 증가가 야기되었으리라 추측케 하는 것이다<sup>47)</sup>. Piwnica-Worms 등<sup>19)</sup>은 각각의 종양의 혈류상태와 생존도가 다약제내성에 의한 섭취의 차이보다 더 클 수 있으므로 Tc-99m MIBI의 섭취율에서 Tl-201섭취율을 나누어 준 값으로 보정한 값이 중요하다고 하였다. 저자들은 시간별 Tc-99m MIBI섭취율을 약제를 처치하지 않은 대조군의 값으로 나눈 비를 비교하였으므로 약제의 효과를 평가하기 위하여는 저자들의 방법이 합리적인 것으로 생각하나, 약동학 (pharmacodynamic effect)의 차이를 배제하는데는 이들의 방법이 도움이 될 것이다.

다약제내성 P-당단백이나 MRP의 발현 여부와 약제내성 극복제의 효능을 암세포의 Tc-99m MIBI 섭취율로 평가하는 방법은 비침습적이고 기능적인 영상을 통하여 체내에서 직접 시행할 수 있는 방법 이어서 검사방법의 표준화를 통하여 정량적 기준을 설정하면 임상적으로도 유용한 지표로 사용될 수 있을 것이다. 새로운 약제의 개발후 암세포에서의 상대적인 효능측정에 응용할 수 있을 뿐만 아니라<sup>48)</sup>, 체내에서 약제의 분포에 미치는 영향을 실질적으로 평가할 수 있을 것으로 판단되므로 실제 항암제의 이동정도와 Tc-MIBI섭취를 비교하는 연구와 같은 추가적인 연구<sup>49)</sup>가 필요할 것으로 판단된다.

## 요 약

**목적 :** 새로이 합성된 다약제내성 (MDR) 극복제인 KR-30035(KR)는 다약제내성 유전자가 과발현된 암세포에 Tc-99m MIBI의 섭취를 증가시키며, 그 효과는 verapamil과 유사하나 심혈관계에의 영향은 적다. 본 연구는 체내에서 KR의 MDR 극복효과를 평가하고자 nude mice에서 P-당단백이 발현된 세포와 발현되지 않은 세포에서 다양한 농도의 KR이 MIBI섭취에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. **방법 :** P-당단백이 발현된 세포는 HCT15/CL02 대장암 세포를, P-당단백이 없는 세포로는 A549 비소세포 폐암 세포를 120마리의 생쥐에 이종이식하였다. 120 마리를 모두 6군으로 나누었다. 제 1군은 복강내로 KR을 10mg/kg의 용량으로 3차

례 주입한 군이고, 제2군은 verapamil을 같은 방법으로 주입한군, 제 3군은 KR을 2회는 10 mg/kg의 용량으로 1회는 25 mg/kg의 용량으로 복강내에 주입한 군이며, 제 4군은 KR을 2회는 10 mg/kg의 용량으로 1회는 50 mg/kg의 용량으로 복강내 주입한군, 제 5군은 KR을 2회는 10 mg/kg의 용량으로 복강내에 주입하고 1회는 25 mg/kg의 용량으로 혈관내에 주입한 군이다. 그리고 제 6군은 처치하지 않은 대조군으로 하였다. 이들 각군에 Tc-99m MIBI를 주사하고 10분, 30분, 90분, 그리고 240분 후에 동물을 희생시켜서 장기와 종양 조직내의 MIBI 섭취정도를 측정하여 비교하였다. **결과** : MIBI 섭취 정도는 P-당단백 양성과 P-당단백 음성인 그룹 모두에서 제 2군보다 제 1군에서 높았다. 10분과 240분 사이의 배출율은 P-당단백 양성세포에서 KR을 정맥주사한 제 5군에서 MIBI 섭취가 증가하는 경향을 보였으나 그 외에는 유의한 차이가 없었다. P-당단백 양성 그룹에서 MIBI 섭취는 10분 (대조군의 173%)에서 가장 높았고 KR의 용량이 증가할수록 P-당단백 양성군 에서의 MIBI 섭취증가의 정도가 낮았다 (10분에 제 4군에서 130%, 제 5군에서 117%, 30분에 제 4군에서 178%, 제 5군에서 128%). 심장과 폐의 섭취는 제 4군과 제 5군에서 10분과 30분에서 각각 크게 증가하였다. **결론** : KR은 verapamil 보다 심혈관계 작용이 적은 MDR의 억제제이며, verapamil보다 20-50배 투여량을 증가시킬 수 있으므로, 약성종양의 항암요법시 다약제내성을 극복하는데 보다 안전하고 효과가 큰 약제로 판단된다.

### 참 고 문 헌

1. Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986;323:728-31.
2. Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, et al. Human multidrug-resistant cell lines: increased mdrl expression can precede gene amplification. *Science* 1986; 232:643-5.

3. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 137-71.
4. Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 1988;263:12163-6.
5. Abe Y, Nakamura M, Ota E, Ozeki Y, Tamai S, Inoue H, et al. Expression of the multidrug resistance gene (MDR1) in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:536-41.
6. Breuninger LM, Paul S, Gaughan K, Miki T, Chan A, Aaronson SA, et al. Expression of multidrug resistance associated protein with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res* 1995;55:5342-7
7. Gottesman MM, Pastan I. Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1989;7:409-11.
8. Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pournier Manzanedo A, Bollinger P, Loo F. *In vivo* circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res* 1991; 51: 4226-33.
9. Sikic BI. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Semin Hematol* 1997;34: 40-7.
10. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand Perret T. *In vitro* and *in vivo* reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridone-carboxamide derivative. *Cancer Res* 1993;53: 4595-602.
11. Benson AB, Trump DL, Koeller JM, Egorin MI, Oltman EA, Witte RS. Phase I study of vinblastine and verapamil given by concurrent i.v. infusion. *Cancer Treat Rep* 1985;69:795-9.
12. Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 1991;9:17-24.
13. Ozols RF, Cunnion RE, Klecker RW, Hamilton TC, Ostchega Y, Parrillo JE, et al. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 1987;5: 641-7.
14. Choi SU, Lee CO, Kim KH, Choi EJ, Park SH, Shin HS, et al. Reversal of multidrug resistance by novel verapamil analogs in cancer cells. *Anticancer Drugs* 1998;9:157-65.

15. Pujol JL, Simony J, Gautier V, Marty Ane C, Pujol H, Michel FB. Immunochemical study of p-glycoprotein distribution in lung cancer. *Lung Cancer* 1993;10:1-12.
16. Georges E, Bradley G, Garipey J, Ling V. Detection of p-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:152-6.
17. Kessel D, Beck WT, Kukuruga D, Schulz V. Characterization of multidrug resistance by fluoroscene dyes. *Cancer Res* 1991; 51: 4665-70.
18. Piwnica-Worms D, Holman BL. Noncardiac applications of hexakis (alkylisonitrile) technetium-99m complexes [comment] *J Nucl Med* 1990; 31:1166-7.
19. Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Krounag JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistance p-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* 1993;53:977-84.
20. Rao VV, Chiu ML, Krounag JF, Piwnica-Worms D. Expression of recombinant human multidrug resistance p-glycoprotein in insect cells confers decreased accumulation of technetium-99m sestamibi. *J Nucl Med* 1994;35:510-5.
21. Cho IH, Lee J, Suh JS, Lee BH, Choi SW, Sohn SK, et al. Effects of a new multidrug resistance reversing agent, KR-30035 on tumoral uptake of Tc-99m MIBI *in vitro* and *in vivo*. *J Kor Cancer Assoc* 1999;31:773-83.
22. Girad DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-23.
23. Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P. N,N-dimethylformamide induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1979;39:1020-5.
24. Piwnica-Worms D, Rao VV, Kronauge JF, Croop JM. Characterization of multidrug resistance transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
25. Hollo Z, Homolya L, Hegedus T, Muller M, Szakacs G, Jakab K, et al. Parallel functional and immunologic detection of multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Res* 1998;18:2981-7.
26. Benderra Z, Morjani H, Trussardi A, Manfait M. Role of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in daunorubicin distribution in etoposide-resistant MCF7 cells overexpressing the multidrug-resistance associated protein. *Int J Oncol* 1998;12:711-5.
27. Duffy PM, Hayes MC, Gattrell SK, Cooper A, Smart CJ. Determination and reversal of resistance to epirubicin intravesical chemotherapy. A confocal imaging study. *Br J Urol* 1996;77: 824-9.
28. Oda Y, Schneider-Stock R, Rys J, Gruchala A, Niezabitowska A, Roessner A. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification of MDR1 gene expression in adult soft tissue sarcoma. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:98-106.
29. Hendrikse NH, Franssen EJJ, van der Graaf WTA, Vaalburg W, de Vries EGE. Visualization of multidrug resistance *in vivo*. *Eur J Nucl Med* 1999;26:283-93.
30. Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica-Worms D. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I) in cultured mouse fibroblasts. *J Nucl Med* 1990;31: 1646-53.
31. Delmon-Moigeon LI, Piwnica-Worms D, Van den Abbeele AD, Holman BL, Davison A, Jones AG. Uptake of the cation hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m by human carcinoma cell lines *in vitro*. *Cancer Res* 1990;50:2198-202.
32. Cordobes MD, Starzec A, Delmon-Moingeon L, Blanchot C, Kouyoumdjian J-C, Prevest G, et al. Technetium-99m-sestamibi uptake by human benign and malignant breast tumor cells: Correlation with *mdr* gene expression. *J Nucl Med* 1996;37:286-9.
33. Kostakoglu L, Elahi N, Kiratli P, Ruacan S, Sayek I, Baltali E, et al. Clinical validation of the influence of P-glycoprotein on technetium-99m-sestamibi uptake in malignant tumors. *J Nucl Med* 1997;38:1003-8.
34. Kostakoglu L, Kiratli P, Ruacan S, Hayran M, Emri H, Ergun EL, et al. Association of tumor washout rates and accumulation of technetium-99m-MIBI with expression of P-glycoprotein in lung cancer. *J Nucl Med* 1998;39:228-234.
35. Taki J, Sumiya H, Asada N, Ueda Y, Tsuchiya H, Tonami N. Assessment of P-glycoprotein in



- patients with malignant bone and soft-tissue tumors using technetium-99m-MIBI scintigraphy. *J Nucl Med* 1998;39:1179-84.
36. Kostakoglu L, Ruacan S, Ergun EL, Sayek I, Elahi N, Bekdik CF. Influence of the heterogeneity of P-glycoprotein on technetium-99m MIBI uptake in breast cancer. *J Nucl Med* 1998;39:1021-6.
  37. Del Vecchio S, Ciarmiello A, Pace L, Potena MI, Carriero MV, Mainolfi C, et al. Fractional retention of technetium-99m sestamibi as an index of P-glycoprotein expression in untreated breast cancer patients. *J Nucl Med* 1997;38:1348-51.
  38. Bom HS, Kim YC, Song HC, Min JJ, Kim JY, Park KO. Technetium-99m uptake in small cell lung cancer. *J Nucl Med* 1998;39:91-4.
  39. Vergote J, Moretti JL, de Vries EG, Garnier Suillerot A. Comparison of the kinetics of active efflux of 99mTc-MIBI in cells with P-glycoprotein mediated and multi-drug resistance protein associated multidrug resistance phenotype. *Eur J Biochem* 1998;252:140-6.
  40. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981;41:1967-72.
  41. Bissett D, Kerr DJ, Cassidy J, Meredith P, Traugott U, Kaye SB. Phase I and pharmacokinetic study of D-verapamil and doxorubicin. *Br J Cancer* 1991; 64: 1168-71.
  42. Choi SU, Lee BH, Kim KH, Choi EJ, Park SH, Shin HS, et al. Novel multidrug resistance modulators, KR-30026 and KR-30031, in cancer cells. *Anticancer Res* 1997; 17: 4577-92.
  43. Wilson WH, Bates SE, Fojo A, Bryant G, Zhan Z, Regis J, et al. Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphoma refractory to EPOCH chemotherapy. *J Clin Oncol* 1995;13:1995-2004.
  44. Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, Grogan TM, Laufman LR, Weiss GR, et al. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* 1995;75:815-20.
  45. Weinlander G, Kornek G, Raderer M, Hejna M, Tetzner C, Scheithauer W. Treatment of advanced colorectal cancer with doxorubicin combined with two potential multidrug resistance reversing agents: high dose oral tamoxifen and dexverapamil. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123:452-5.
  46. Barbaris E, Krounauge JF, Kohen D, Davison A, Jones AG, Croop JM. Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition *in vivo*. *Cancer Res* 1998;58:276-82.
  47. Bae KT, Piwica-Worms D. Pharmacokinetic modeling of multidrug resistance P-glycoprotein transport of gamma-emitting substrates. *J Nucl Med* 1997;41:101-10.
  48. Chun KA, Lee J, Lee SW, Kang DY, Sohn SK, Lee JK, et al. Effect of multidrug resistance gene-1 (mdr1) overexpression on *in vitro* uptake of Tc-99m sestaMIBI in murine L1210 leukemia cells. *Korean J Nucl Med* 1999;33:152-62.
  49. Bosch I, Crankshaw CL, Piwnica-Worms D, Croop JM. Characterization of functional assays of multidrug resistance P-glycoprotein transport activity. *Leukemia* 1997;11:1131-7.