

다약제내성 발현 암세포에서 ^{99m}Tc-sestamibi와 ^{99m}Tc-tetrofosmin 섭취의 비교

경북대학교 의과대학 핵의학교실

유정아, 정신영, 서명량, 박동석, 안병철, 이규보, 이재태

Comparison of the Uptakes of ^{99m}Tc-sestamibi and ^{99m}Tc-tetrofosmin in Cancer Cell Lines Expressing Multidrug Resistance

Jeong Ah Yoo, Ph.D., Shin Young Chung, M.D., Myeng Rang Seo, B.S., Dong Suk Kwak, M.D., Byeong-Cheol Ahn, M.D., Kyu Bo Lee, M.D., Jaetae Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea

Abstract

Purpose : Cellular uptakes of ^{99m}Tc-sestamibi(MIBI) and ^{99m}Tc-tetrofosmin into cancer cell lines expressing multidrug resistance(MDR) were investigated and compared. The effects of verapamil and cyclosporin A, well-known multidrug resistant reversing agents, on cellular uptakes of both tracers were also compared.

Materials and Methods : Doxorubicin-resistant HCT15/CL02 human colorectal cell and doxorubicin-resistant K562(Adr) and vincristine-resistant K562(Vcr) human leukemic cells were studied. RT-PCR analysis was used for the detection of *mdr1* mRNA expression. MDR-reversal effects with verapamil and cyclosporine A were evaluated at different drug concentrations after incubation with MIBI and tetrofosmin for 1, 15, 30, 45 and 60 min, using single-cell suspensions at 1×10⁶ cells/ml incubated at 37°C. Radioactivity in supernatants and pellets were measured with gamma well counter.

Results : The cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin in K562(Adr) and K562(Vcr) were lower than those of parental K562 cell. In HCT15/CL02 cells and K562(Adr) cells, there were no significant difference in cellular uptakes of both tracers, but cellular uptake of MIBI was higher than that of tetrofosmin in K562(Vcr) cells. Coincubation with verapamil resulted in a increase in cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin. Verapamil increased cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin by HCT15/CL02 cell by 11.9- and 6.8-fold, by K562(Adr) cell by 14.3- and 8-fold and by K562(Vcr) cell by 7- and 5.7-fold in maximum, respectively. Cyclosporin A increased cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin by HCT15/CL02 cell by 10- and 2.4-fold, by K562(Adr) cell by 44- and 13-fold and by K562(Vcr) cell by 18.8- and 11.8-fold in maximum, respectively.

Conclusion : Taking together, MIBI and tetrofosmin are considered as suitable radiopharmaceuticals for detecting multidrug resistance. However, MIBI seems to be a better tracer than tetrofosmin for evaluating MDR reversal effect of the modulators. Since cellular uptakes of both tracers might differ in different cell types, further experiments regarding differences in cellular uptakes between cell types should be explored.

Key Words : ^{99m}Tc-sestamibi, ^{99m}Tc-tetrofosmin, Cancer cell, Multidrug resistance

Received May. 20, 2003; accepted June. 10, 2003

Corresponding author : Jaetae Lee, M.D.

주 소 : 대구시 중구 삼덕 2가 50번지 경북대학교 병원 핵의학과

소 속 : 경북대학교 의과대학 핵의학교실

전화번호 : 053-420-5586, 전송번호 : 053-422-0864

전자우편 : jaetae@knu.ac.kr

Acknowledgement : 이 연구는 원자력 중장기연구개발사업의 연구비 지원에 의한 결과임.

서 론

악성종양의 항암제 치료에서 치료실패의 중요한 원인 중의 하나는 항암제를 세포바깥으로 배출시켜 세포내 약제의 저류를 감소시키는 P-glycoprotein (P-gp)과 multidrug resistance associated protein (MRP)의 과도한 생성에 의한 다약제내성 (multidrug resistance, MDR)의 발생이다.¹⁻³⁾ P-gp는 *mdr1* 유전자의 발현에 의해 조절되는 세포막의 170-kDa 당단백질로 ATP를 이용하여 anthracyclines, vinca alkaloids, topoisomerase II inhibitor등과 같은 항암 치료약물을 세포로부터 제거시킬 뿐만 아니라 세포내 약물 축적을 감소시킨다.^{4,7)} 감마선을 방출하는 지용성 방사성 의약품인 ^{99m}Tc-sestamibi(MIBI)와 ^{99m}Tc-tetrofosmin은 심근관류를 추적하는 방사성 의약품으로 개발되었으나, 악성종양에도 선택적으로 섭취된다는 것이 알려진 뒤 암의 진단 및 치료 방법의 선택, 치료 후의 추적 관찰 등에 널리 이용되어 왔다.⁸⁻¹⁰⁾ MIBI와 tetrofosmin의 종양내 섭취는 항암제들의 세포내 섭취기전과 유사하게 섭취되며, P-gp 발현의 정도에 의해 영향을 받아서 세포막에 높은 농도의 P-gp가 존재하는 경우에는 세포내에 저류되지 못하고 세포외부로 배출된다는 것이 알려져 있다.¹¹⁾ 따라서, 핵의학영상에서 암조직의 MIBI와 tetrofosmin섭취를 정량적으로 측정하면 다약제내성 유전자와 P-gp의 과발현을 예측할 수 있다고 하였다.²⁾

이와 같이 MIBI와 tetrofosmin이 악성종양의 평가에 널리 이용되고 있으나, 두 약제의 진단성능을 평가하기 위하여 동일한 환자에서 두 약제의 종양내 섭취정도를 비교한 연구는 드물다. 유방암에서 MIBI와 tetrofosmin의 진단율은 유사하나 tetrofosmin의 표지방법이 MIBI보다 간편하므로 tetrofosmin이 유리한 방사성의약품이라고 보고된 바 있으나⁹⁾ 세포 실험에서는 MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취정도를 비교한 연구들은 실험에 사용한 세포의 종류에 따라 서로 상이한 결과들을 보이고 있다.¹²⁻¹⁵⁾ 그러나, 약제내성을 평가하기 위한 두 약제의 직접적인 비교연구는 드물고 대부분의 실험들은 약제내성이 없는 림프종세포, 유방암세포, 연

조직 육종세포들을 이용한 연구였으며^{12,13,16)}, *mdr-1* 유전자의 과발현에 의한 다약제내성이 유발된 암세포들에서 MIBI와 tetrofosmin섭취에 대한 비교연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 다약제내성이 유발된 1개의 대장암 세포와 2개의 백혈병 세포에서 *mdr1* 유전자의 과발현을 증명하고 이들 세포내 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 비교하였고, 다약제내성 극복제로 알려진 verapamil과 cyclosporin A 처치시 악성종양세포내에서 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도의 변화를 비교하여 약제내성 극복제의 효능평가지의 두가지 방사성의약품의 유용성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

다약제내성 암세포로는 doxorubicin에 의해 내성이 유발된 사람 대장암 세포 HCT15/CL02¹⁷⁾와 사람 백혈병 K562세포에 지속적으로 doxorubicin과 vincristine을 첨가하여 내성이 유발된 2개의 백혈병 세포, K562(Adr) 과 K562(Vcr)을 실험에 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 GIBCO BRL (Grand Island, USA)에서, verapamil은 Sigma (St. Louis, USA), cyclosporin A는 Sandoz (Basel, Switzerland)에서 구입하여 0.9% 생리식염수에 녹여 원액을 만들었으며, verapamil은 1, 10, 50, 100, 200 μM의 농도로, cyclosporin A는 0.1, 1, 10, 50, 100 μM의 농도로 실험할 때마다 0.9% 생리식염수로 희석하여 사용하였다.

방사성의약품인 sestamibi (Cardiolite, E.I. Du Pont Pharma, North Billerica, MA)와 tetrofosmin (Myoview, Amersham International, Aylesbury, Buckinghamshire, UK)은 kit로 구입하여 ^{99m}Tc pertechnetate를 매 실험마다 새롭게 표지하여 사용하였다.

RNA분리 시 TRI-Reagent는 MRC (Cincinnati, OH.), RT-PCR Kit는 Perkin Elmer (New Jersey, USA), *mdr1* primer는 Bioneer (대전, KOREA)에서

구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) ^{99m}Tc-sestamibi와 ^{99m}Tc-tetrofosmin

MIBI는 0.9% 생리식염수 2 ml에 ~200 MBq의 원액을 만들어 100°C에서 15분간 끓인 후, 10 MBq/ml이 되도록 생리식염수로 희석하였다. 같은 방법으로 tetrofosmin도 10 MBq/ml이 되도록 상온에서 준비하였으며 세포내 섭취 실험에서는 100 µl의 용량을 5 ml의 세포 현탁액에 첨가하였으므로 방사성의약품의 최종농도는 0.1 MBq (50 nmol/ml)이 된다.

2) 세포배양

다약제내성 암세포들은 5% fetal bovine serum (FBS) 및 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 배지에서 37°C, 95% O₂ / 5% CO₂의 배양조에서 배양하였다. 세포들은 수확하여 새로운 배지로 세척한 후 1.0×10⁶ cells/ml의 농도로 부유시킨 상태에서 사용하였으며, 일단 약제에 내성을 나타내는 암세포들도 항암제가 없는 상태로 계속 계대배양하면 다시 내성이 없어지는 경우가 있으므로 실험하기 일주일 전에 doxorubicin과 vincristine을 각각 0.1 mg/ml이 되도록 처리하고 4주정도 추가배양 한 후 사용하였다.

3) 역전사 종합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의한 *mdr1* 유전자의 동정

수확한 세포들은 1,000 g 에서 5분간 원심 분리한 다음, PBS로 2회 세척하였다. 침전된 세포에 TRI용액 1 ml을 넣어 세포 균질액을 만든 후 상온에서 10분간 방치한 다음, 200 µl의 chloroform을 넣어 혼합하고 원심분리(12,000 g, 15분, 4°C) 하여 상층액을 얻었다. 분리한 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 섞어준 다음 상온에서 10분간 두었다가 원심분리(12,000 g, 15분, 4°C)하여 RNA 침전물을 모았다. 수거한 RNA는 75% ethanol로 수세하고 다시 원심분리(7,500 g, 5분)하여 상층액은 버리고 상온에서 10분간 건조시켜 50~200 µl의 물에 녹인 후 56~60°C에서 완전히 용해시켰다. 분리한 RNA는 RT-PCR kit (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 먼저 1 µg의 RNA에

10×PCR buffer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNase inhibitor (1 U), 2.5 µM random hexamer, reverse transcriptase (2.5 U)를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 reverse transcription (42°C, 15분), denature (99°C, 5분), cool (5°C, 5분)을 차례로 실시하였다. 이렇게 합성된 cDNA 혼합물에 다시 10×PCR buffer, 2 mM MgCl₂, Taq DNA polymerase (2.5 U), *mdr1* primer (Bioneer, 대전)를 첨가하여 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 gel에 전기영동을 실시한 다음, etidium bromide (EtBr) 염색으로 확인하였다. 증폭된 *mdr1*은 243bp에서 나타났다. RT-PCR에 이 용한 *mdr1* primer 의 핵산배열은 아래와 같다.

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

4) 방사성 의약품의 세포내 섭취를 측정

다약제내성 암세포들의 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취는 Utsunomiya 등¹⁴⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 간단히 설명하면, 5 ml의 세포 현탁액은 MIBI와 tetrofosmin을 첨가하기 전 10분 동안 37°C 항온수조에서 verapamil 혹은 cyclosporin A를 농도별로 처리하였다. 여기에 100 µl의 MIBI 혹은 tetrofosmin을 첨가하여 1, 15, 30, 45, 60분 동안 반응시킨 후, 각 시간대 별로 300 µl의 용액을 4°C의 생리식염수 1 ml이 든 microcentrifuge tube로 옮겼다. 14,000 rpm에서 2분간 원심분리 한 후 상층액과 침전물을 분리하고 침전물들은 충분히 말린 후, 1분 동안 감마 계수기로 140 keV에너지에서 각각의 방사능치를 측정하여 투여한 방사능치에 대한 섭취 백분율로 표시하였다. 세포 섭취율의 측정은 독립된 3회 이상의 실험결과를 평균하여 구하였다.

$$\text{Uptake(\%)} = \frac{\text{Count(pellet)}}{\text{Count(supernatant)} + \text{Count(pellet)}} \times 100(\%)$$

을 관찰할 수 없었다.

결 과

1. *mdr1* 유전자 과발현 세포의 확인

대장암세포 HCT15/CL02와 백혈병 세포 K562(Adr)과 K562(Vcr)에서 *mdr1* 유전자의 과발현은 RT-PCR로 증명할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 K562세포의 RT-PCR에서는 *mdr1* 유전자의 과발현

2. HCT15/CL02세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율 비교

다약제내성이 유발된 대장암 세포 HCT15/CL02에서 1분, 15분, 30분, 45분, 60분 배양에서 MIBI의 섭취율은 각각 0.33±0.03%, 0.49±0.07%, 0.47±0.04%, 0.49±0.08%, 0.48±0.08%였고, tetrofosmin은 0.31±0.01%, 0.43±0.15%, 0.42±0.11%, 0.46±0.12%, 0.49±0.1%로 각각의 시간별로 두 약제 사이에 유의한 차이가 없었다(Table 1). 그러나, verapamil을 1, 10, 50, 100, 200 μM의 농도로 처리

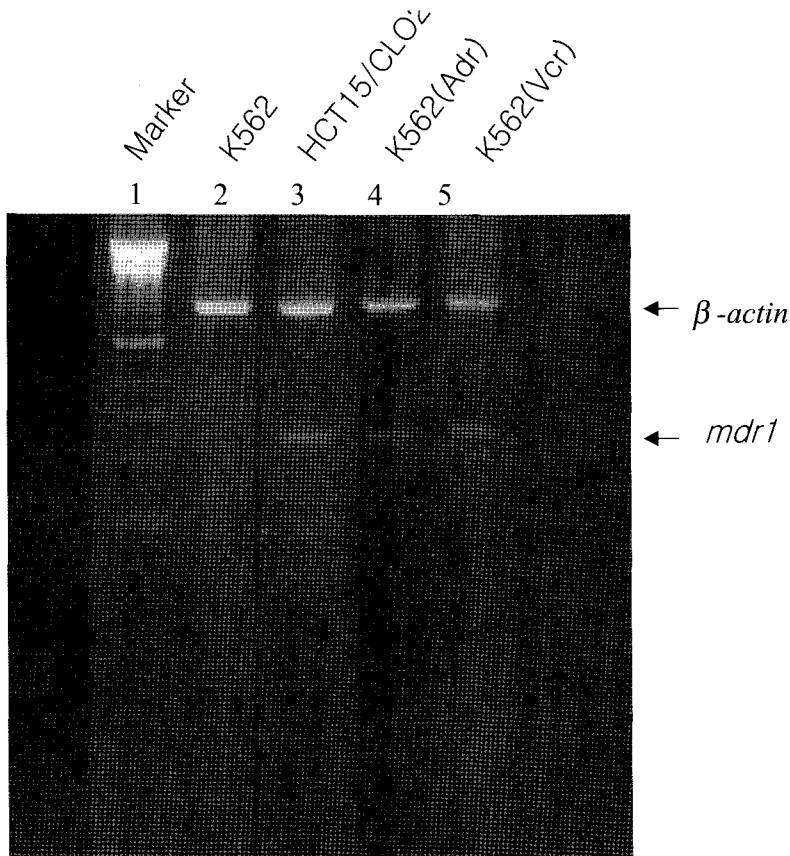


Fig. 1. Representative gel of RT-PCR products demonstrating *mdr1* gene expression in cancer cell lines. Control K562 cell line (lane 2) did not detected *mdr1* gene in RNA samples. lane 1: molecular size marker, lane 2: K562 cell, lane 3: HCT15/CL02 cell, lane 4:K562(Adr) cell, lane 5: K562(Vcr) cell.

Table 1. % uptakes of MIBI and tetrofosmin in cancer cell lines. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were measured over 60 min in the absence of verapamil or cyclosporin A as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SD obtained from three separate experiments.

(A)

	1min	15min	30min	45min	60min
HCT15/CLO2	0.33 \pm 0.03	0.49 \pm 0.07	0.47 \pm 0.04	0.49 \pm 0.08	0.48 \pm 0.08
K562	1.91 \pm 0.73	12.6 \pm 1.57	14.5 \pm 2.74	17.5 \pm 1.21	18.9 \pm 0.64
K562(Adr)	0.23 \pm 0.07	0.34 \pm 0.04	0.35 \pm 0.08	0.44 \pm 0.05	0.78 \pm 0.51
k562(Vcr)	0.53 \pm 0.17	1.23 \pm 0.40	1.31 \pm 0.45	1.32 \pm 0.52	1.41 \pm 0.42

(B)

	1min	15min	30min	45min	60min
HCT15/CLO2	0.31 \pm 0.01	0.43 \pm 0.15	0.42 \pm 0.11	0.46 \pm 0.12	0.49 \pm 0.1
K562	1.29 \pm 0.04	5.62 \pm 0.18	7.03 \pm 0.75	8.27 \pm 1.32	9.59 \pm 0.98
K562(Adr)	0.29 \pm 0.07	0.33 \pm 0.03	0.4 \pm 0.07	0.4 \pm 0.04	0.49 \pm 0.03
k562(Vcr)	0.36 \pm 0.17	0.62 \pm 0.27	0.74 \pm 0.20	0.87 \pm 0.46	0.77 \pm 0.29

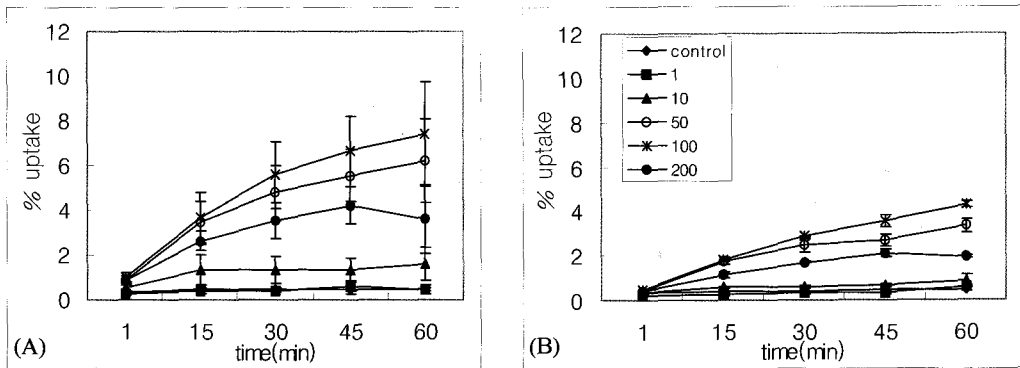


Fig. 2. Uptakes of MIBI and tetrofosmin in HCT15/CL02 cells. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were measured over 60 min in the absence (0 μ M) or presence of verapamil as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SD obtained from three separate experiments.

하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 증가하였으며 100 μ M일 때 최고 섭취율을 나타내었다(Fig. 2). Verapamil투여시 섭취율을 투여하지 않은 상태의 30분배양시 섭취율과 비교하면 100 μ M, 30분 배양한 경우 MIBI의 섭취율은 9배 증가하였고, tetrofosmin의 섭취율은 6.8배 증가하여 verapamil 처치시 MIBI의 섭취율이 tetrofosmin보다 거의 2배정도 높았다. Cyclosporin A

를 0.1, 1, 10, 50, 100 μ M의 농도로 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 증가하였으며 50 μ M일 때 최고 섭취율을 나타내었다(Fig. 3). Cyclosporin A를 50 μ M농도로 30분간 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 10배 증가하였고, tetrofosmin는 2.4배 증가하였으므로 cyclosporin A에 의한 MIBI 섭취율의 증가가 tetrofosmin보다 거의 4배 이상 높았다.

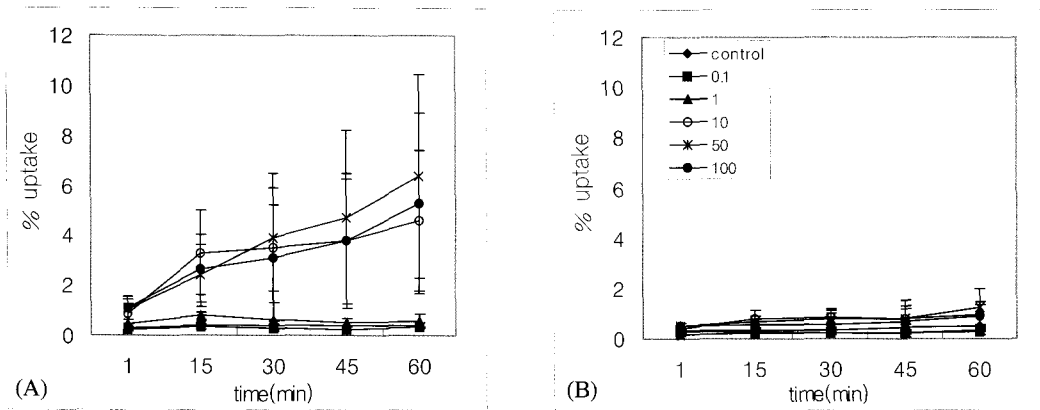


Fig. 3. Uptakes of MIBI and tetrofosmin in HCT15/CL02 cells. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) was measured over 60 min in the absence (0 μM) or presence of cyclosporin A as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SD obtained from three separate experiments.

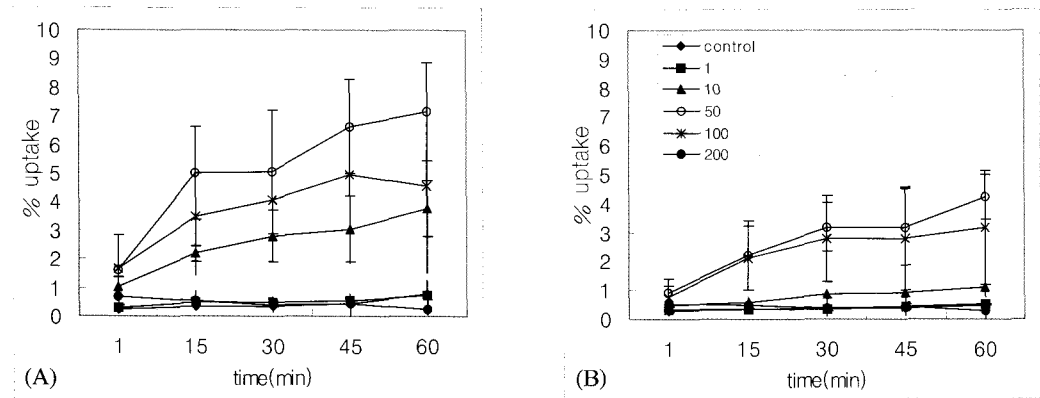


Fig. 4. Uptakes of MIBI and tetrofosmin in K562(Adr) cells. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were measured over 60 min in the absence (0 μM) or presence of verapamil as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SD obtained from three separate experiments.

3. K562세포와 다약제내성 유발 K562 (Adr)세포, K562(Vcr)세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율 비교

백혈병세포 K562세포에서 MIBI를 1분, 15분, 30분, 45분, 60분 배양한 후 측정된 섭취율은 각각 $1.91 \pm 0.73\%$, $12.6 \pm 1.57\%$, $14.5 \pm 2.74\%$, $17.5 \pm 1.21\%$, $18.9 \pm 0.64\%$ 였고, tetrofosmin 섭취율은 $1.29 \pm 0.04\%$, $5.62 \pm 0.18\%$, $7.03 \pm 0.75\%$, $8.27 \pm 1.32\%$, $9.59 \pm 0.98\%$ 로서 1분 측정치외의 모든 측정치가 MIBI 섭취율이

tetrofosmin 섭취율 보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 항암제 adriamycin과 vincristine으로 다약제내성을 유발시킨 두 종류의 암세포 K562(Adr)과 K562(Vcr)의 MIBI와 tetrofosmin 섭취율은 모세포인 K562세포보다 현저하게 낮았다($P < 0.001$). K562(Adr)에서 1분, 15분, 30분, 45분, 60분 배양에서 MIBI의 섭취율은 각각 $0.23 \pm 0.07\%$, $0.34 \pm 0.04\%$, $0.35 \pm 0.08\%$, $0.44 \pm 0.05\%$, $0.78 \pm 0.51\%$ 였고, tetrofosmin은 $0.29 \pm 0.07\%$, $0.33 \pm 0.03\%$, $0.4 \pm 0.07\%$, $0.4 \pm 0.04\%$, $0.49 \pm 0.03\%$ 였고, vincristine에 의해 다약제내성이 유발된 백혈병 세포 K562(Vcr)에

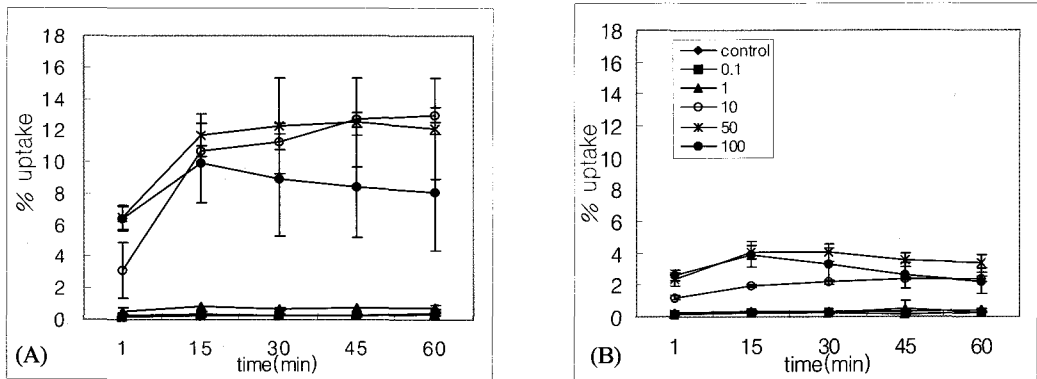


Fig. 5. Uptakes of MIBI and tetrofosmin in K562(Adr) cells. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were measured over 60 min in the absence (0 μM) or presence of cyclosporin A as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SD obtained from three separate experiments.

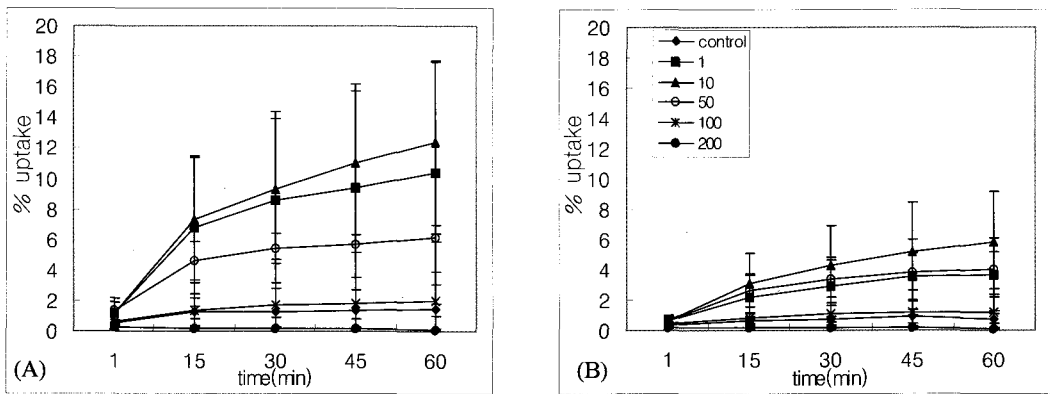


Fig. 6. Uptakes of MIBI and tetrofosmin in K562(Vcr) cells. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were measured over 60 min in the absence (0 μM) or presence of verapamil as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SD obtained from three separate experiments.

서 1분, 15분, 30분, 45분, 60분 배양에서 MIBI의 섭취율은 각각 $0.53 \pm 0.17\%$, $1.23 \pm 0.40\%$, $1.31 \pm 0.45\%$, $1.32 \pm 0.52\%$, $1.41 \pm 0.42\%$ 였고, tetrofosmin은 $0.36 \pm 0.17\%$, $0.62 \pm 0.27\%$, $0.74 \pm 0.20\%$, $0.87 \pm 0.46\%$, $0.77 \pm 0.29\%$ 로 두 방사성 의약품의 섭취율을 비교하면 MIBI의 섭취정도가 tetrofosmin보다 약간 높았다 (Table 1) ($p < 0.05$). K562(Adr)세포를 verapamil 1, 10, 50, 100, 200 μM의 농도로 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 모두 증가하였으며 50 μM일 때 최고 섭취율을 나타내었다(Fig. 4). Verapamil의 기저치 30분 배양을 기준으로 50 μM, 30분 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면

MIBI는 14.3배 증가하였고, tetrofosmin은 8배 증가하였으므로 verapamil에 의한 MIBI의 섭취율이 tetrofosmin보다 거의 2배정도 높았다. Cyclosporin A의 농도가 0.1, 1 μM 일 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치와 유의한 차이가 없었으며, 10, 50, 100 μM일 때는 기저치보다 증가하였으며 50 μM일 때 최고 섭취율을 나타내었다(Fig. 5). Cyclosporin A의 기저치 30분 배양을 기준으로 50 μM, 30분 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 44배 증가하였고, tetrofosmin은 13배 증가하였으므로 cyclosporin A에 의한 MIBI의 섭취율이 tetrofosmin보다 거의 3배이상 높았다.

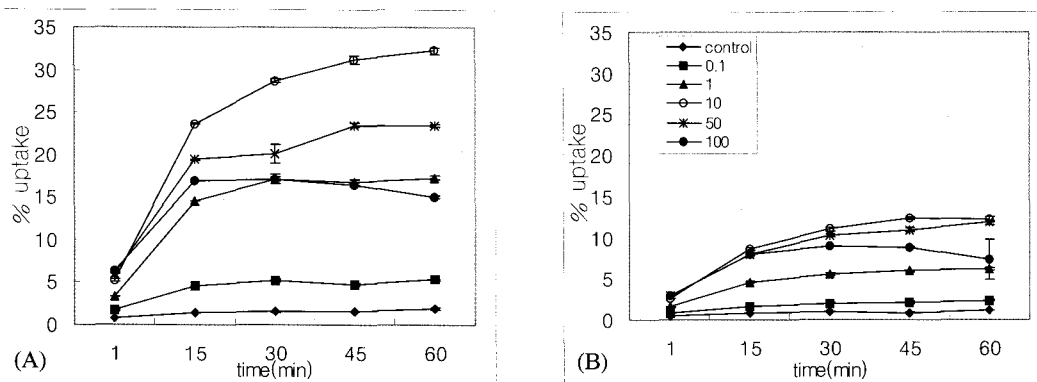


Fig. 7. Uptakes of MIBI and tetrofosmin in K562(Vcr) cells. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were measured over 60 min in the absence (0 μM) or presence of cyclosporin A as described in Materials and Methods. Data represent mean ± SD obtained from three separate experiments.

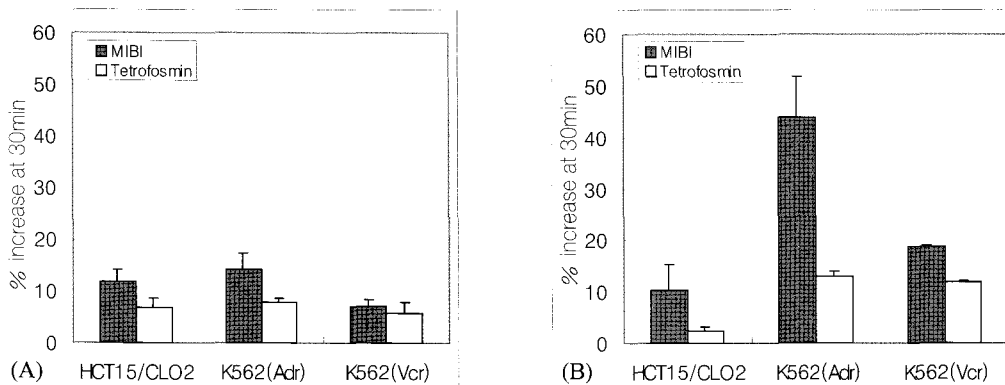


Fig. 8. Comparison of the uptakes of MIBI and tetrofosmin in MDR-expressing cancer cells. The uptakes of MIBI and tetrofosmin at 30 min in the presence of verapamil(A) and cyclosporin A(B) were compared (100 μM of verapamil and 50 μM of cyclosporin A in HCT15/CLO2 cell, each of 50 μM of verapamil and cyclosporin A in K562(Adr) cell, each of 50 μM of verapamil and cyclosporin A in K562(Vcr) cell). The results are expressed in % compared with uptakes at 30 min in the absence of verapamil or cyclosporin A considered as 1%(control).

K562(Vcr)세포를 verapamil 1, 10, 50, 100 μM의 농도로 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 모두 증가하였으며 10 μM일 때 최고 섭취율을 나타내었다(Fig. 6). Verapamil을 200 μM 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 기저치보다 낮았다. 그러나 trypan blue염색으로 세포독성을 평가한 결과 손상된 세포는 관찰되지 않았다(data not shown). Verapamil의 기저치 30분 배양을 기준으로 10 μM, 30분 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 7

배 증가하였고, tetrofosmin은 5.7배 증가하였으므로 verapamil에 의한 MIBI 섭취율의 증가가 tetrofosmin보다 1.2배정도 높았다. Cyclosporin A를 0.1, 1, 10, 50, 100 μM의 농도로 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 모두 증가하였으며 10 μM일 때 최고 섭취율을 나타내었다(Fig. 7). Cyclosporin A의 기저치 30분 배양을 기준으로 50 μM, 30분 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 19배의 증가를 보였고, tetrofosmin은 12배의 증가를 보임으로써 cyclosporin A에 의한 MIBI의 섭취율이 tetro

fosmin보다 1.5배 이상 높았다. Fig. 8에 각각의 암세포에서 verapamil과 cyclosporin A에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율의 증가율을 비교하였다.

고 찰

세포막을 자유롭게 통과하는 저분자량의 물질인 ^{99m}Tc -MIBI의 암세포 내로의 섭취는 항암제와 유사한 기전으로 이루어진다. 다약제내성이 발생한 암세포에서는 세포막에 P-glycoprotein (P-gp)이 발현되어 있어 항암제가 세포내에 저류되지 않고 바깥으로 배출되는 것이 약제내성의 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. Piwnica-Worms 등^{2,11)}은 P-gp가 유사한 기전으로 MIBI를 세포외로 배출시킴으로써 약제내성이 발현된 암세포에서는 MIBI저류가 감소된다고 보고한 이후, MIBI는 P-gp의 운반기질로 인정되어 암세포의 다약제내성 연구와 항암약물 치료를 받는 악성종양환자의 평가에 널리 이용되고 있다.¹⁸⁾ 심근관류 영상용 추적자인 diphosphine 계열의 tetrofosmin도 MIBI와 유사한 P-gp의 운반기질로 사용될 수 있는 지용성 양이온 화합물로서, MIBI와 유사하게 암세포의 다약제내성 발현을 예측하기 위하여 영상진단에 사용되고 있다.¹⁹⁻²⁰⁾ Tetrofosmin은 상온에서 표지하여 신속하게 사용할 수 있는 장점이 있으나, 다약제내성의 평가에서는 가장 많이 사용되어 온 MIBI와의 비교연구가 된 경우는 드물었다.

본 연구에서 평가한 다약제내성 *mdr1* 유전자의 과발현이 증명된 대장암세포 HCT15/CL02 세포주와 백혈병세포 K562에서 adriamycin과 vincristine으로 약제내성을 유발시킨 K562(Adr)과 K562(Vcr) 암세포에서의 실험결과는 약제내성 발현의 평가시 MIBI와 tetrofosmin 모두 효과적일 것으로 판단할 수 있었다. 또한 약제내성 극복제의 효능을 평가하기 위하여, 극복제를 투여하였을 때 세포내 방사성의약품의 섭취증가 정도를 정량화하는 목적으로 사용할 경우에는 MIBI가 다소 유리할 것으로 판단할 수 있었다. 즉, HCT15/CL02 세포는 원래 다약제내성을 소량 발현하는 대장암 세포 HCT15를 모세포로 하여 약제내성의 발현을 더욱 증가시켜서 생성하였으므로 약제내성이 발현되지 않는 모세포와

HCT15/CL02세포의 섭취율을 비교하기는 어려우나, *mdr1* 유전자가 발현되지 않은 K562세포에 비하여 K562(Adr), K562(Vcr)세포의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취가 유의하게 낮아 다약제내성이 유발된 세포에서는 두가지 방사성의약품의 섭취가 감소된다는 사실을 확인 할 수 있었다. 이들 세 종류의 암세포들을 37°C에서 1시간동안 배양하였을 때, MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도는 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였고, 각각의 배양시간에 따른 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도는 HCT15/CL02세포와 K562(Adr)세포에서는 유의한 차이가 없었다. 그러나 K562(Vcr)세포에서는 MIBI의 섭취정도가 tetrofosmin보다 약간 높았다.

다약제내성이 발현된 암세포에서 P-gp를 억제하여 다약제내성을 극복하는 verapamil과 cyclosporin A를 처리하였을 때, MIBI와 tetrofosmin의 섭취는 배양 15분부터 1시간까지 측정된 값이 모두 기저치보다 높았다. Verapamil처리 후 30분간 배양시 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 HCT15/CL02세포는 최대 12배와 약 7배(100 μM), K562(Adr)세포에서는 각각 약 14배와 8배(50 μM), K562(Vcr)세포에서는 각각 7배와 6배(10 μM) 높았다. Cyclosporin A를 처리 후 30분 배양시 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율도 HCT15/CL02세포(50 μM)에서는 각각 약 10배와 2.5배, K562(Adr)세포에서는 각각 44배와 13배(50 μM), K562(Vcr)세포에서는 각각 19배와 12배(10 μM)로 두 추적자 모두에서 현저하게 증가하였다. 그러므로 이번 연구에서 평가한 농도의 verapamil과 cyclosporin A 처리 시 MIBI의 섭취율 증가가 tetrofosmin의 섭취율 증가보다 1.2배에서 4배 정도 현저하여 높았으므로 다약제내성 극복제의 효능평가를 위하여 방사성의약품을 이용한 섭취율을 평가하는 목적으로는 MIBI가 tetrofosmin보다 유리할 것으로 판단할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 두가지 약제의 농도가 실제 임상에서 환자의 항암치료시 사용할 수 있는 농도보다는 높은 농도이므로 이를 직접 임상에 이용할 수는 없을 것이나 임상연구에 사용된 verapamil의 농도 10 μM 이하에서도 MIBI의 섭취율 증가가 tetrofosmin보다는 뚜렷하였다. 그러나 Utsunomia 등¹⁴⁾은 저자들의 결과와는 다른 성적

을 보고한 바가 있었는데, 이들은 Pgp를 발현하는 세포는 아니나, MRP를 발현하는 비인후암세포인 CNE-1세포주에서는 MIBI의 섭취율이 tetrofosmin의 섭취율보다 2배정도 높았고, P-gp나 MRP를 억제하는 GG918, PSC833, verapamil, cyclosporin A, buthionine sulfoximine등에 의한 방사성의약품의 배출억제 효과는 tetrofosmin이 2배가량 높았다고 보고한 바가 있다. 이들의 보고와 저자들의 연구결과는 상이한 결과로서, 이러한 MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취율의 차이는 세포주에 따라 다를 것으로 추측할 수 있고, 특히 glutathione S-transferases (GSTs) detoxification system과 연관이 있을 것이라고 제시된 바가 있다¹⁵⁾. Cordebes 등⁵⁾은 다약제내성 극복제의 MIBI섭취에 미치는 영향은 세포에 따라 2-12배나 차이가 날 수 있고, 사용한 약제내성 극복제의 농도에 따라 서로 다른 영향을 나타낸다고 보고 한 바 있다.

동일한 세포에서의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취가 차이가 나는 것은 암세포의 대사정도와 세포와 미토콘드리아 막의 전기생리학적인 특성의 차이 및 세포 내에서 두 종류의 방사성의약품의 분포에 따른 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 즉, MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도는 두 방사성의약품의 화학적 구조와 물리적 특성의 차이뿐 만 아니라 암세포의 대사활동 정도에 의해서도 차이가 있다. 두 추적자는 세포막 전위에 의해 수동수송으로 세포내로 섭취되나, MIBI는 미토콘드리아 내부에 90%이상 축적되고 tetrofosmin은 대부분 세포질에 축적되어 세포내에 분포하는 것으로 알려져 있다.²¹⁻²²⁾ 본 연구에서 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취는 HCT15/CLO2, K562(Adr)세포에서는 두 약제의 섭취가 유사하였으나, K562(Vcr)세포에서는 MIBI의 섭취가 더 높았다. 한편 온도도 방사성의약품의 세포내 섭취에 영향을 미치는데, 암세포를 4℃와 22℃에서 MIBI와 배양하였을때의 섭취율은 37℃에서 보다 낮았으며,^{5,13)} 연조직 암세포에서 온도의 차이에 따른 섭취율을 조사한 연구에서도 MIBI, tetrofosmin및 furifosmin의 섭취는 37℃에서 가장 높았다고 보고된 바 있다.¹⁶⁾ 그러므로 본 연구에서는 세포내의 섭취정도를 최대화 할 수 있는 온도에서 실험되었다고 할 수 있다.

Verapamil과 cyclosporin A는 다약제 내성 역전제로 가장 잘 알려져 있으며, 천 등²³⁾은 다약제 내성을 유발시킨 murine leukemia cell line(L1210)에서 verapamil과 cyclosporin A, 그리고 dipyridamole은 MIBI의 섭취율을 증가시켰다고 보고한 바 있다. Verapamil과 cyclosporin A는 다약제 내성이 유발된 사람 암세포들에서 MIBI보다는 낮지만 tetrofosmin의 섭취율도 증가시켰다. Verapamil은 HCT15/CL02세포에서, cyclosporin A는 K562(Adr)세포와 K562(Vcr)세포에서 두 추적자의 섭취율을 증가시키는데 효과적이었다. 특히, K562(Adr)세포와 K562(Vcr)세포에서 cyclosporin A는 verapamil보다 현저하게 MIBI의 섭취율을 증가시켰다. 체외 실험에서 verapamil은 우수한 다약제내성 역전제로서 대부분 MIBI와 tetrofosmin의 섭취를 증가시키는 것으로 보고되었다.^{5,14,24)} 저자들의 연구에서 verapamil과 cyclosporin A가 세포내 섭취를 증가시키고, 그 증가는 cyclosporin A가 verapamil보다 1.2배에서 4배정도 강력하다는 결과는 Piwnica-Worms 등²⁵⁾이 보고한 MIBI의 세포내 저류를 증가시키는 효능을 나타내는 약제의 평균유효농도(mean effective concentration, EC50 in μ M)가 cyclosporin A 1.3과 verapamil 4.1의 차이가 약 3배정도 인 것과 일치하는 결과이었다. 그러나 최근 Rodrigues 등²⁶⁾은 인체 유방암 MCF-7세포주에서는 verapamil을 처리하면 세포내 MIBI의 섭취가 오히려 감소된다고 보고한 바 있으므로, 세포주에 따라 이러한 차이가 관찰될 수 있는지에 대하여 보다 많은 암세포가 다약제내성 극복에 관련된 기전에 관한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구의 결과로 보아 MIBI와 tetrofosmin 모두가 HCT15/CLO2와 K562세포에서의 다약제내성 발현을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되고, 다약제내성 극복제의 효능을 평가하는 경우에는 MIBI가 tetrofosmin보다 유리할 것으로 생각된다. 그러나 이러한 결과들은 세포에 따라 차이가 있을 수 있으므로, 보다 많은 다약제내성 암세포에서 연구되어야 할 것이며, 실제 체내실험에서 MIBI와 tetrofosmin의 장기내 분포의 차이를 직접 비교할 수 있는 영상 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

목적 : 다약제내성이 유발된 암세포에서 ^{99m}Tc-sestamibi와 ^{99m}Tc-tetrofosmin의 암세포 내 섭취정도를 비교하고 다약제내성 극복제로 잘 알려진 verapamil 과 cyclosporin A 처리에 의한 두 방사성의약품의 암세포 내 섭취정도를 비교해 보았다. **재료 및 방법** : Doxorubicin으로 다약제내성이 유발된 HCT15/CL02 대장암 세포와 doxorubicin과 vincristine으로 다약제내성을 유발시킨 K562(Adr)과 K562(Vcr) 백혈병 세포를 사용하였다. 다약제내성의 발현은 RT-PCR로 증명하였으며, verapamil은 1, 10, 50, 100, 200 μM의 농도로, cyclosporin A는 0.1, 1, 10, 50, 100 μM의 농도로 각각 사용하였다. MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취는 37°C에서 1 × 10⁶ cells/ml 농도의 단일세포 부유상태에서 1, 15, 30, 45, 60분 간격으로 배양하여 각 시간대별로 상층액과 침전물을 분리하여 각각의 방사능을 감마 계수기로 측정하였다. **결과** : 다약제내성이 발현된 암세포에서는 모세포에 비하여 MIBI와 tetrofosmin의 섭취가 감소되었다. 두 방사성의약품의 섭취정도는 HCT15/CL02세포와 K562(Adr)세포에서는 유의한 차이가 없었으나, K562(Vcr)세포에서는 MIBI가 tetrofosmin보다 다소 높았다. Verapamil과 cyclosporin A를 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 기저치보다 모두 증가하였고, verapamil에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율(30분)을 기저치(30분)와 비교해 본 결과 HCT15/CL02 세포에서(100μM)는 각각 11.9배와 6.8배, K562(Adr) 세포에서(50 μM)는 각각 14.3배와 8배, K562(Vcr) 세포에서(10μM)는 각각 7배와 5.7배 증가하였다. Cyclosporin A에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율(30분)을 기저치(30분)와 비교해 본 결과 HCT15/CL02세포에서(50 μM)는 각각 10배와 2.4배, K562(Adr)세포에서(50 μM)는 각각 44배와 13배, K562(Vcr)세포에서(10μM)는 각각 18.8배와 11.8배 증가하여, MIBI의 섭취율이 tetrofosmin보다 1.2배에서 4배정도 높게 나타났다. **결론** : 이러한 결과로 보아 MIBI와 tetrofosmin은 다약제내성의 발현을 평가할 수 있는 방사성의약품으로 판단되며, 다약제내

성 극복제의 효능평가에는 MIBI가 tetrofosmin보다 더 우수할 것으로 사료되나, 세포주에 따른 차이가 있을 수 있으므로 보다 많은 세포주에서의 추가적인 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I. Human multidrug-resistant cell lines: Increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 1986;232:643-5.
2. Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* 1993;53:977-84.
3. Breuninger LM, Paul S, Gaughan K, Miki T, Chan A, Aaronson SA. Expression of multidrug resistance associated protein with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res* 1995;55:5342-7.
4. Kostakoglu L, Elahi N, Kiratli P, Ruacan S, Sayek I, Baltali E. Clinical validation of the influence of P-glycoprotein on technetium-99m-sestamibi uptake in malignant tumors. *J Nucl Med* 1997;38:1003-8.
5. Cordobes MD, Starzec A, Delmon-Moingeon L, Blanchot C, Kouyoumdjian JC, Prevost 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.
6. 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.
7. Cayre A, Moins N, Finat-Duclos F, Verrelle P, Maublant J. Comparison between technetium-99m-sestamibi and H-3-daunomycin myocardial cellular retention in vitro. *J Nucl Med* 1997;38:1674-7.
8. Kao CH, Ho YJ, Shen YY, Lee JK. Evaluation of chemotherapy response in patients with small cell lung cancer using technetium-99m-tetrofosmin. *Anticancer Res* 1999;19:2311-5.

9. Lee J. Functional imaging of the multidrug resistance in vivo. *Korean J Nucl Med* 2001;35:66p-75p.
10. Soman P, Taillefer R, DePuey EG, Udelson JE, Lajiri A. Enhanced detection of reversible perfusion defects by ^{99m}Tc sestamibi compared to ^{99m}Tc tetrofosmin during vasodilator stress SPECT imaging in mild-to-moderate coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:458-62.
11. Piwnica-Worms D, Holman BL. Noncardiac applications of hexakis (alkylisonitrile) technetium-99m complexes. *J Nucl Med* 1990;31:1166-7.
12. Ding HJ, Shiau YC, Tsai SC, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Uptake of ^{99m}Tc tetrofosmin in lymphoma cell lines: a comparative study with ^{99m}Tc sestamibi. *Appl Radiat Isot.* 2002;56:853-6.
13. Rodrigues M, Chehne F, Kalinowska W, Berghammer P, Zielinski C, Sinzinger H. Uptake of ^{99m}Tc -MIBI and ^{99m}Tc -tetrofosmin into malignant versus nonmalignant breast cell line. *J Nucl Med* 2000;41:1495-9.
14. Utsunomiya K, Ballinger JR, Piquette-Miller M, Rauth AM, Tang W, Su ZF, et al. Comparison of the accumulation and efflux kinetics of technetium-99m sestamibi and technetium-99m tetrofosmin in an MRP-expressing tumour cell line. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1786-92.
15. Perek N, Prevot N, Koumanov F, Frere D, Sabido O, Beauchesne P, et al. Involvement of the glutathione S-conjugate compounds and the MRP protein in ^{99m}Tc -tetrofosmin and ^{99m}Tc -sestamibi uptake in glioma cell lines. *Nucl Med Biol* 2000;27:299-307.
16. Rodrigues M, Chehne F, Kalinowaka W, Zielinski C, Sinzinger H. Comparative ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -tetrofosmin and ^{99m}Tc -furfosmin uptake in human soft tissue sarcoma cell lines. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1839-43.
17. Choi SU, Kim NY, Choi EJ, Kim KH, Lee CO. Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from HCT15 human colorectal cancer cells. *Arch Pharm Res* 1996;19:342-7.
18. Ballinger JR, Hua BW, Berry BW, Firby P, Boxen I. ^{99m}Tc -sestamibi as an agent for imaging P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance: in vitro and in vivo studies in a rat breast tumour cell line and its doxorubicin-resistant variant. *Nucl Med Commun* 1995;16:253-7.
19. Kelly JD, Forster AM, Higley B, Archer CM, Booker FS, Canning LR, et al. Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med* 1993;34:222-7.
20. Meghdsi S, Karanikas G, Schlabauer-Wadl H, Jansen B, Chehne F, Rodrigues M, et al. Technetium-99m-tetrofosmin: a new agent for melanoma imaging? *Anticancer Res* 1998;18:2759-62.
21. Arbab AS, Koizumi K, Toyama K, Arai T, Araki T. Technetium-99m-tetrofosmin, technetium-99m-MIBI and thallium-201 uptake in rat myocardial cells. *J Nucl Med* 1998;39:266-71.
22. Arbab AS, Koizumi K, Toyama K, Araki T. Uptake of technetium-99m-tetrofosmin, technetium-99m-MIBI and thallium-201 in tumor cell lines. *J Nucl Med* 1996;37:1551-6.
23. 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 ^{99m}Tc -sestamibi in murine L1210 leukemia cells. *Korean J Nucl Med* 1999;33:152-62.
24. Rao VV, Chiu ML, Kronauge 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.
25. Piwnica-Worms D, Rao VV, Kronauge JF, Croop JM. Characterization of multidrug resistance transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
26. Rodrigues M, Kalinowska W, Zielinski C, Sinzinger H. Verapamil decreases accumulation of ^{99m}Tc -MIBI and ^{99m}Tc -tetrofosmin in human breast cancer and soft tissue sarcoma cell lines. *Nucl Med Commun* 2001;22:645-50.