

## MRP발현 인체 비소세포 폐암 A549에서 Tc-99m MIBI와 Tc-99m Tetrofosmin섭취의 비교

경북대학교 의과대학 핵의학교실, 한국화학연구소<sup>1</sup>

유정아, 정신영, 서명량, 배진호, 안병철, 이규보, 최상운,<sup>1</sup> 이병호,<sup>1</sup> 이재태

### Comparison of the Uptakes of Tc-99m MIBI and Tc-99m Tetrofosmin in A549, an MRP-expressing Cancer Cell, In Vitro and In Vivo

Jeong Ah Yoo, Ph.D., Shin Young Jeong, M.D., Myung Rang Seo, B.S., Jin Ho Bae, M.D., Byeong Cheol Ahn, M.D., Kyu Bo Lee, M.D., Sang Woon Choi,<sup>1</sup> Ph.D., Byung Ho Lee,<sup>1</sup> Ph.D., Jaetae Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Bioorganic Science Division,<sup>1</sup> Korea Institute of Chemical Technology, Daejeon, Korea

#### Abstract

**Purpose:** Uptakes of Tc-99m MIBI (MIBI) and Tc-99m tetrofosmin (tetrofosmin) in human non-small cell lung cancer A549, multidrug-resistance associated protein (MRP) expressing cell, were investigated in vitro and in vivo. **Materials and Methods:** Western blot analysis and immunohistochemistry were used for detection of MRP in A549 cells with anti-MRP1 antibody. Cellular uptakes of two tracers were evaluated at 100  $\mu$ M of verapamil (Vrp), 50  $\mu$ M of cyclosporin A (CsA) and 25  $\mu$ M of butoxysulfoximide (BSO) after incubation with MIBI and tetrofosmin for 30 and 60 min at 37°C, using single cell suspensions at  $1 \times 10^6$  cells/ml. Radioactivities in supernatants and pellets were measured with gamma well counter. A549 cells were inoculated in each flanks of 24 nude mice. Group 1 (Gr1) and Gr3 mice were treated with only MIBI or tetrofosmin, and Gr2 and Gr4 mice were treated with 70mg/kg of CsA i.p. for 1 hour before injection of 370KBq of MIBI or tetrofosmin. Mice were sacrificed at 10, 60 and 240 min. Radioactivities of organs and tumors were expressed as percentage injected dose per gram of tissue (%ID/gm). **Results:** Western blot analysis of the A549 cells detected expression of MRP1 (190 kDa) and immunohistochemical staining of tumor tissue for MRP1 revealed brownish staining in cell membrane but not P-gp. Upon incubating A549 cells for 60 min with MIBI and tetrofosmin, cellular uptake of MIBI was higher than that of tetrofosmin. Coincubation with modulators resulted in an increase in cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin. Percentage increase of MIBI was higher than that of tetrofosmin with Vrp by 623% and 427%, CsA by 753% and 629% and BSO by 219% and 140%, respectively. There was no significant difference in tumoral uptakes of MIBI and tetrofosmin between Gr1 and Gr3. Percentage increases in MIBI (114% at 10 min, 257% at 60 min, 396% at 240 min) and tetrofosmin uptake (110% at 10 min, 205% at 60 min, 410% at 240 min) were progressively higher by the time up to 240 min with CsA. **Conclusion:** These results indicate that MIBI and tetrofosmin are suitable tracers for imaging MRP-mediated drug resistance in A549 tumors. MIBI may be a better tracer than tetrofosmin for evaluating MRP reversal effect of modulators.

**Key Words:** Tc-99m MIBI, Tc-99m Tetrofosmin, Verapamil, Cyclosporin A, Butoxysulfoximide, Multidrug resistance-associated protein

Received December. 12, 2003; accepted December. 18, 2003

책임 저자: 이재태

경북대학교 의과대학 핵의학교실

대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지 경북대학교 병원 700-721

전화) 82-53-420-5586 전송) 82-53-422-0864 e-mail) jaetae@knu.ac.kr

Acknowledgement : 이 연구는 원자력중장기 연구개발사업의 분자핵의학 연구비지원에 의한 결과임.

## 서 론

악성종양의 항암제 치료시 발생하는 다약제내성(multidrug-resistance, MDR)의 중요한 원인중의 하나는 P-당단백(P-glycoprotein, P-gp)이 암세포에 생성되는 것으로, P-gp는 ATP-binding cassette (ABC) transporter군에 속하는 에너지 의존성 배출펌프 역할을 하여 항암제들을 암세포 밖으로 배출시켜 결과적으로 암세포의 약제에 대한 내성을 유발한다.<sup>1,2)</sup> 다약제내성의 배출펌프 기능에 연관된 또 다른 기전은 190 kDa의 단백질인 multidrug resistance-associated protein (MRP)의 생성이며, MRP는 Cole 등<sup>3)</sup>에 의해 소세포 폐암 H69AR세포에서 처음 확인되었다. 폐암, 위암 그리고 대장암과 같은 여러 세포주에서 vincristine이나 doxorubicin, cisplatin 등에 내성을 나타낼 때는 MRP의 아형중 MRP1 뿐만 아니라 MRP2 단백질도 발현된다고 보고하였다.<sup>4,5)</sup> MRP는 P-gp와 같이 ABC transporter군에 속하는 단백질이나 P-gp에 비해 작용기전은 명확히 구명되어 있지 않다. 최근, MRP는 glutathione S-conjugate efflux pump이며, MRP발현 암세포들을 butoxy-sulfoximide (BSO) 처리시에는 glutathione (GSH) 합성이 저해되고 이와 연관되어 여러 항암제가 세포 밖으로 배출되는 것이 억제되므로 세포내 약물의 농도를 증가시키게 된다. 따라서 세포내 GSH의 증가는 MRP의존성 다약제내성의 발현을 나타내는 중요한 증거라고 하였다.<sup>6-10)</sup>

지용성 방사성 의약품인 Tc-99m sestamibi (MIBI)는 세포막을 자유롭게 통과하는 저 분자량의 물질로서 심근관류를 추적하는 방사성 의약품으로 개발되었으나, 악성종양에도 선택적으로 섭취된다는 것이 알려진 뒤 암의 진단 및 치료방법의 선택, 치료 후의 추적관찰 등에 이용되어 왔다.<sup>11-13)</sup>

Piwnica-Worms 등<sup>14,15)</sup>이 P-gp가 항암제와 유사한 기전으로 MIBI를 세포외로 배출시킴으로써 약제내성이 발현된 암세포에서는 MIBI저류가 감소된다고 보고한 이후, MIBI는 P-gp의 운반기질로 인정되어 암세포의 다약제내성 연구와 악성종양 환자의 다약제내성 발현의 예측과 예후 평가에 널리 이용되고

있다. 심근관류 영상용 추적자인 diphosphine 계열의 Tc-99m tetrofosmin (tetrofosmin)도 MIBI와 유사한 지용성 양이온 화합물로서 다약제내성이 발현된 암세포와 악성종양의 평가에 사용되고 있다.<sup>16-18)</sup>

악성종양의 진단과 치료 후 평가에 널리 이용되는 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도는 실험에 사용된 암세포의 종류에 따라 서로 상이한 결과들을 보이는 것으로 보고되고 있다. MRP를 발현하는 비인후암 CNE-1세포주에서는 MIBI의 섭취율이 tetrofosmin보다 2배정도 높았으나, P-gp와 MRP억제에 의해 방사성의약품의 배출억제 정도는 tetrofosmin이 2배가량 높았으며,<sup>6)</sup> 다약제내성이 유발된 암세포들에서 verapamil (Vrp)과 cyclosporin A (CsA)에 의한 MIBI의 세포내 섭취의 증가정도는 tetrofosmin의 증가정도보다 높았다고 보고된 바가 있다.<sup>19)</sup> 연조직 암세포 VX-2를 대퇴부에 이식시킨 토끼에서 종양에 대한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율과 저류율은 MIBI가 tetrofosmin보다 우수하다고 보고되었고,<sup>20)</sup> MCF-7과 ZR-75 유방암세포와 BN-472 유방암이식 흰쥐에서는 MIBI의 섭취율은 tetrofosmin과 Q12보다 높다고 보고되었다.<sup>21)</sup> 임상에서 MIBI와 tetrofosmin은 유방암을 정확하게 진단할 수 있으며, 두 방사성의약품의 유방암 진단성능은 유사하다고 보고되었다.<sup>22)</sup> 그러나, MRP발현 세포 및 실험동물에서 암세포와 악성종양의 평가에 널리 이용되고 있는 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 비교한 연구는 드물다.

본 연구는 MRP가 발현되었다고 보고된 인체 비소세포 폐암 A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도를 비교하고, P-gp와 MRP를 억제하는 Vrp, CsA와 MRP만을 억제하는 BSO처리시 두 방사성의약품의 세포내 섭취정도 변화를 알아보고자 하였다. 또한 A549세포를 이종이식한 누드마우스에서 MRP억제제인 CsA가 종양조직내의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

인체 비소세포 폐암 A549세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 GIBCO BRL (Grand Island, USA)에서, verapamil (Vrp)과 butoxysulfoximide (BSO)는 Sigma (St. Louis, USA)에서, cyclosporin A (CsA)는 Sandoz (Basel, Switzerland)에서 구입하여 0.9% 생리식염수로 희석하여 사용하였다. P-170-glycoprotein (clone JSB-1)과 MRP항체 (clone MRPr1)는 Monosan (Netherlands)에서 구입하였다.

동물실험은 생후 8-14주, 체중 18 gm전후의 암컷 누드마우스 (BALB/c-nu/nu nude mouse, 한국 화학연구원, 대전)를 사용하였다.

방사성의약품인 MIBI (Cardiolite, E.I. Du Pont Pharma, North Billerica, MA)와 tetrofosmin (Amersham International, Aylesbury, Buckinghamshire, UK)은 kit로 구입하여 Tc-99m pertechnetate (<sup>99m</sup>Tc)를 매 실험마다 새롭게 표지하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 방사성의약품

MIBI는 0.9% 생리식염수 2 ml의 ~200 MBq의 Tc-99m pertechnetate 용액을 넣고 100℃에서 15분간 끓여 표지한 후, 10 MBq/ml이 되도록 생리식염수로 희석하였다. 같은 방법으로 tetrofosmin도 10 MBq/ml이 되도록 상온에서 준비하였으며 100 µl의 용량을 5 ml의 세포 현탁액에 첨가하였다. 방사성의약품의 최종농도는 세포실험에서는 0.1 MBq (50 nmol/ml)이 되며, 누드마우스 동물실험에서는 370 KBq을 꼬리정맥으로 주사하였다.

#### 2) 세포배양

A549세포는 5% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 37℃, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>의 배양조에서 배양하였

다. 세포들은 수확하여 새로운 배지로 세척한 후 1×10<sup>6</sup>개/ml의 농도로 부유시킨 상태에서 방사성의약품의 세포내 섭취율 측정에 사용하였다.

#### 3) 방사성 의약품의 세포내 섭취율 측정

MIBI와 tetrofosmin의 A549세포내 섭취율 측정은 Utsunomiya 등<sup>6)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 1×10<sup>6</sup>개/ml의 세포 현탁액 5 ml를 MIBI와 tetrofosmin을 첨가하기 전 10분 동안 37℃ 항온수조에서 Vrp (100 µM)과 CsA (50 µM)를 처리하였으며, BSO (25 µM)는 24시간 전에 처리하였다. 여기에 100 µl의 MIBI 혹은 tetrofosmin을 첨가하여 60분 동안 반응시킨 후, 300 µl의 용액을 4℃의 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 각각의 방사능 양을 측정하여 투여한 방사능의 섭취 백분율로 표시하였다. 세포내 섭취율은 독립된 3회 이상의 실험결과를 평균하여 구하였다.

Uptake(%) =

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

#### 4) 방사성 의약품의 종양조직내 섭취율 측정

10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>개/200 µl의 A549세포를 누드마우스의 체간에 피하접종하고 사육하여, 종양의 크기가 1 gm 정도로 자란 뒤 4마리씩을 한군으로 하여 함께 24마리로 실험하였다. CsA에 의한 종양조직 내로의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취변화를 비교하기 위하여 MIBI 대조군(Group 1, Gr1)과 CsA 처리군(Gr 2), tetrofosmin 대조군(Gr 3)과 CsA 처리군(Gr 4)의 4개의 군으로 나누어 실험하였다. Gr1과 Gr3는 생리식염수를, Gr2와 Gr4는 CsA 70mg/kg을 복강내로 주사하였으며, 1시간 후에 Gr1과 Gr2에는 MIBI를, Gr3와 Gr4에는 tetrofosmin 370 KBq을 각각 꼬리정맥으로 주사하였다. 두 방사성의약품의 주사 후 10분, 60분, 240분에 enflurane 마취를 시행하였고, 실험로서 동물들을 희생시켜 종양과 장기들을 적출하였으며, 혈액을 닦은 후 무게를 측정하였다. 장기와 종양

조직은 감마계수기로 방사능을 측정하였고 주사량에 대한 단위무게별 장기섭취율(% injected dose/gm of organ, %ID/gm)을 계산하였다.

### 5) 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직은 3-4  $\mu\text{m}$  두께로 절단하여 슬라이드에 부착시켜 60°C 항온기에서 2시간 방치한 후, 탈파라핀과 합수과정을 거쳐 증류수로 세척하고 3% 과산화수소용액에 3분간 처리 후 Tris buffer saline (TBS)으로 3회 세척하였다. 조직내 비특이 항원을 차단하기 위해 정상 말혈청에 30분간 반응시켰으며 일차항체인 p-170-glycoprotein에 대한 clone JSB-1 항체와 MRP에 대한 clone MRPr1 항체를 1:20으로 희석하여 4°C 반응조에서 하룻 밤동안 반응시킨 후, TBS로 3회 세척하고 이차항체를 30분간 반응시킨 후 ABC (avidin-biotin conjugate) reagent를 실온에서 45분간 반응시켰다. TBS로 세척 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB : Sigma, St. Louis, USA)로 발색하고 Mayer Hematoxylin으로 대조염색한 후 봉입하여 슬라이드를 완성하고 광학현미경으로 관찰하였다.

### 6) MRP발현 검증

Western blot analysis를 하기 위해 A549세포와 MRP가 발현되지 않는 K562세포와 HCT15/CL02세포들은 얼음물로 세 번 세척한 다음 lysis buffer [protease inhibitor cocktail 1 tablet/50 ml Tris-NaCl-EDTA-SDS buffer (TNES buffer : 1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl)] 를 100  $\mu\text{l}$  씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. Bovine serum albumin (BSA) 단백질 측정 키트(Sigma, St. Louis, USA)로 정량한 후 동일량의 단백질(30  $\mu\text{g}$ )을 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 transfer하였다. 이 NC를 5% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffer saline-Tween (TBS-T : 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 30분간 반응시켜 비 특이적 단백질에 대한 반응성을 차단한 후, MRP에 대한 항체와 반응시키고, 항체에 대한 2차

항체인 anti-rat IgG 항체로 각각 1 시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회 세척하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band는 enhanced chemiluminescence (ECL : Amersham/Pharmacia Biotech, USA) 검사법으로 확인하였다.

### 7) 통계학적 처리

모든 결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며, 통계학적 처리는 Kruskal-Wallis Test를 이용하였다.

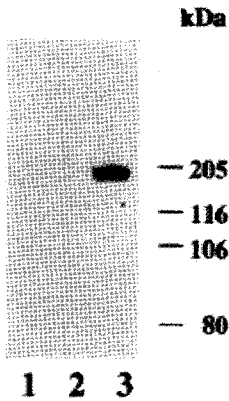
## 결 과

### 1. A549세포의 MRP 발현

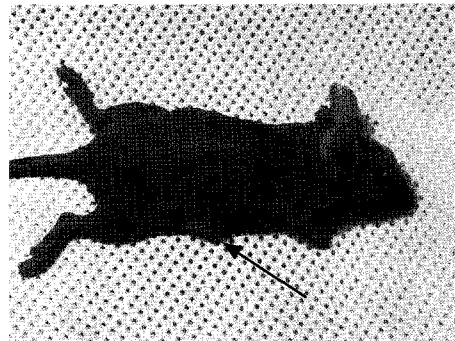
인체 비소세포 폐암 A549세포는 MRP의 아형중 MRP1에 대한 MRPr1 항체(clone MRPr1)를 이용한 western blot analysis에서 약 190 kDa에 해당하는 MRPr1 밴드를 나타내는 반면, K562세포와 doxorubicin을 처리하여 다약제내성을 유발한 HCT15/CL02세포는 MRPr1에 해당하는 밴드가 관찰되지 않았다(Fig 1). RT-PCR에 의한 *mdr1* 유전자의 발현을 확인해 본 결과 HCT15/CL02세포는 뚜렷한 밴드를 나타내는 반면, A549세포는 밴드가 나타나지 않았다(data not shown). A549세포를 누드마우스에 피하주사 후 평균 4주정도 지나서 1 gm 정도의 종양이 측면에 형성되었으며(Fig 2), 종양조직을 MRPr1 항체(clone MRPr1)를 이용한 면역조직화학 염색검사상 갈색염색으로 표현되는 MRP단백질의 발현이 관찰되었다(Fig 3). A549 종양조직은 P-gp 항체(clone JSB-1)에 대해서는 염색되지 않았다.

### 2. A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율 비교

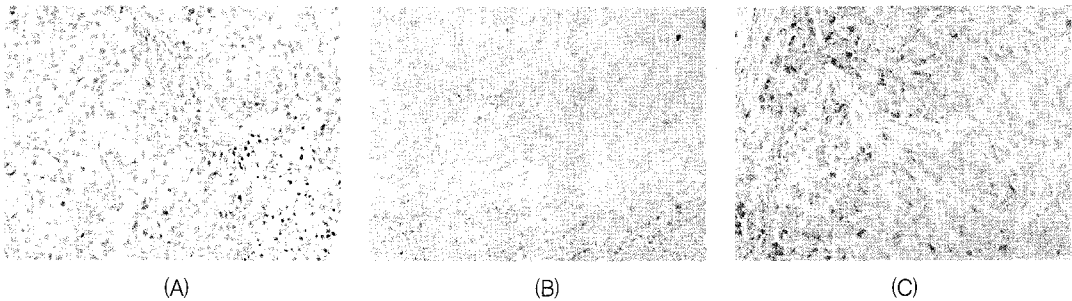
A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 60분간 배양한 경우 30분 배양한 것보다 높았다. 30분 배양시 MIBI섭취는  $1.73 \pm 0.01\%$ 였고, tetrofosmin은  $1.37 \pm 0.12\%$ 였으며, 60분 배양시 MIBI섭취는  $1.89 \pm 0.02\%$ 였고, tetrofosmin은  $1.43 \pm 0.03\%$ 로 MIBI의 섭취정도가 tetrofosmin보다 높았다( $p < 0.05$ ). MRP억제제인 Vrp (100  $\mu\text{M}$ ), CsA (50  $\mu\text{M}$ )와 BSO (25  $\mu\text{M}$ )를 30분 처리했을 때 MIBI섭취는 각각



**Fig 1.** Detection of MRP by western blot analysis from cancer cell lines. Protein (30 ug) was fractionated in a 7.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS. After electrophoresis, MRP was visualized with monoclonal antibody against MRPr1 (190kDa). 1: K562 cell, 2: HCT15/CL02 cell, 3: A549 cell.



**Fig 2.** Photo of nude mouse with MRP-expressing A549 lung cancer xenograft in flank.



**Fig 3.** H-E staining and immunohistochemical staining of tumor tissue either with anti-MRPr1 or anti-P-gp antibody. A549 tumor revealed brownish staining with MRPr1 antibody (C), whereas tumor tissue did not staining with P-gp antibody (B). (A): H-E staining, (B): immunohistochemical staining with P-170-glycoprotein antibody, (C): immunohistochemical staining with MRPr1 antibody.

8.07±0.18%, 10.54±0.39%, 4.5±0.07%였고, tetrafosmin은 각각 3.83±0.03%, 5.52±0.08%, 1.91±0.01%로 증가하였다. MRP억제제들을 60분 처리했을 때 MIBI섭취는 각각 11.58±0.89%, 14.42±0.66%, 4.13±0.01%였고, tetrafosmin은 각각 6.11±0.03%, 9.00±0.14%, 2.00±0.08%로, MRP억제제 처리시 두 방사성의약품의 세포내 섭취율은 모두 유의하게 증가하였다(Fig 4). 두 방사성의약품의 60분 기저치를 기준으로 각각의 억제제에 의한 섭취율의 증가정도를 비교해 보면 Vrp (100 µM)에 의해서 MIBI는

613%, tetrafosmin은 428% 증가하였으며, CsA (50 µM)에 의해서 MIBI는 763%, tetrafosmin은 629% 증가하였고, BSO (25 µM)에 의해서 MIBI는 218%, tetrafosmin은 140% 증가하였다. A549세포에서 MRP억제제들에 의한 세포내 섭취증가 정도는 MIBI가 tetrafosmin보다 높았다(p<0.05).

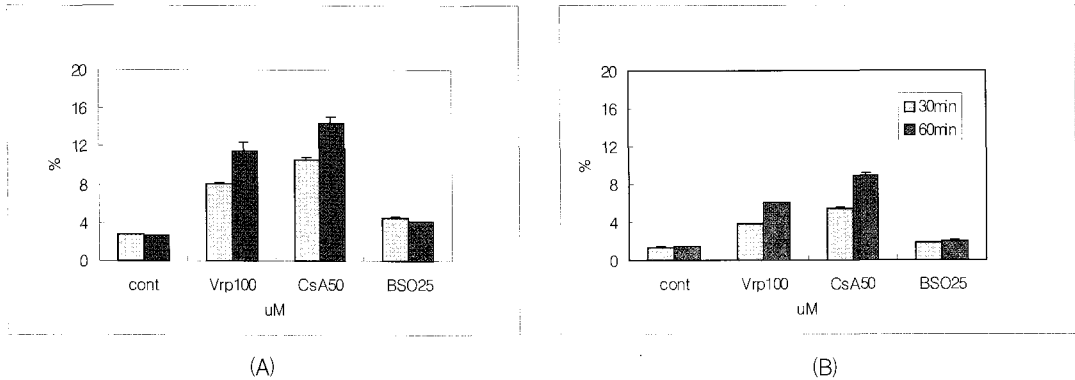


Fig 4. Comparison of uptakes of MIBI and tetrofosmin in A549 cells between 30min and 60min incubation. Uptakes of MIBI (A) and tetrofosmin (B) were increased in the presence of MRP modulators. Data represent mean  $\pm$  SD obtained from three separate experiments. cont: control, Vrp100: verapamil 100  $\mu$ M, CsA50: cyclosporin A 50  $\mu$ M, BSO25: butoxysulfoximide 25  $\mu$ M

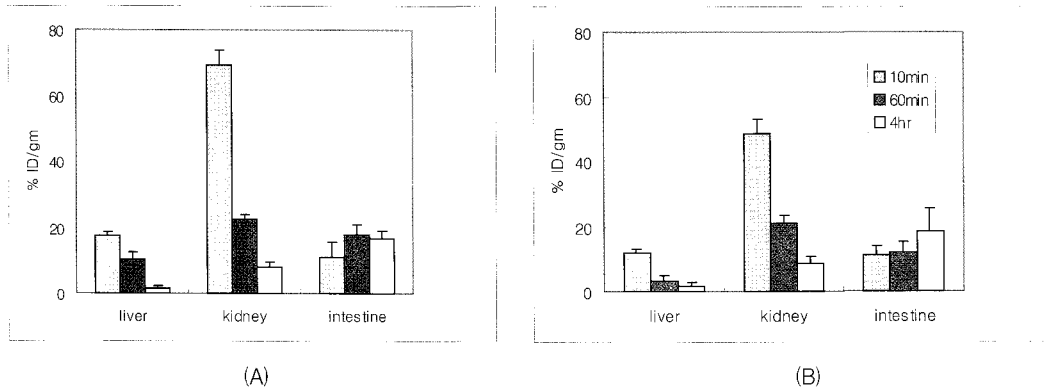


Fig 5. Biodistribution of MIBI(A) and tetrofosmin(B) of liver, kidney and intestine in normal mice over various time.

### 3. Cyclosporin A가 누드마우스의 장기 및 종양조직에서 MIBI와 tetrofosmin섭취에 미치는 영향

MIBI와 tetrofosmin의 정맥주사 후 섭취율은 처음으로 측정된 10분의 혈액 1 gm당 섭취율이 1%이하로 빠르게 혈중에서 소실되어 체내장기에 섭취되었으며, 무게당 섭취율은 신장이 가장 높았고, 간과 장의 섭취도 다른 장기에 비해 높았다. 시간이 경과함에 따라 간과 신장의 섭취는 감소하였으나 장의 섭취는 증가하였다(Fig 5). CsA에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취증가 정도는 P-g가 많이 존재한다고 알려진 간과 신장에서 관찰할 수 있었다. MIBI와 tetrofosmin의 주사 후 10분에서 CsA에 의한 간과 신장의 섭취율 증가정도를 10분 기저치와 비교

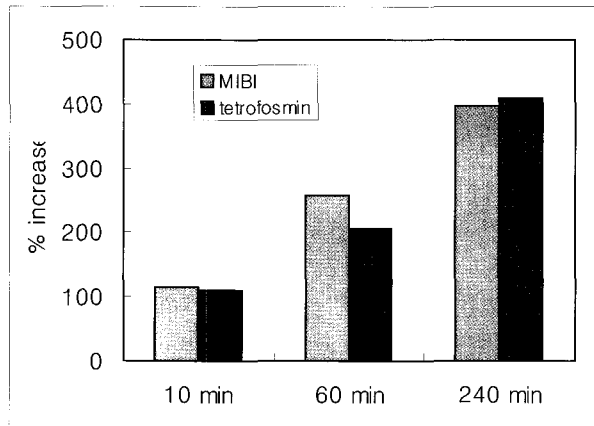
해 보면 간에서는 각각 186%와 111%로, 신장에서는 각각 177%와 162%로 유의하게 증가하였다(data not shown).

A549종양에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도는 유사하였으나(Table 1), CsA주사 후 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도는 모두 증가하였다. CsA를 처리한 경우, MIBI섭취정도는 10분에 114%, 60분에 257%, 240분에 396%로 증가하였고, tetrofosmin섭취 정도는 10분에 110%, 60분에 205%, 240분에 410%로 증가하였다. CsA주사 후 MIBI섭취는 60분과 240분에서 유의하게 증가하였으며(각각  $p < 0.05$ ), tetrofosmin도 60분과 240분에서 유의하게 증가하였으나(각각  $p < 0.05$ ), 두 방사성의약품간의 섭취율증가의 차이는 없었다(Fig 6).

**Table 1.** Comparison of Tc-99m MIBI and Tetrofosmin Uptakes in Control and CsA Pretreated (70mg/kg) Nude Mice with A549 Tumor Xenograft

		10 min	60 min	240 min
MIBI	Control	1.12±0.42	0.40±0.08	0.19±0.04
	CsA	1.28±0.14	1.02±0.24	0.76±0.16
Tetrofosmin	Control	1.04±0.22	0.46±0.10	0.15±0.03
	CsA	1.14±0.41	0.94±0.21	0.63±0.1C

Data are % uptake of radiotracers and represented as mean ± SD.



**Fig 6.** Percentage increases of MIBI and tetrofosmin in MRP-expressing A549 tumor xenograft by cyclosporin A (70 mg/kg). Values are expressed as percentage increases of radiotracers uptake compared to those of control mice without cyclosporin A treatment.

## 고 찰

다약제내성의 가장 중요한 원인중의 하나는 항암제를 세포바깥으로 배출시켜 세포내 약제의 저류를 감소시키는 P-gp, MRP, lung cancer related protein (LRP)와 breast cancer related protein (BCRP) 등의 과도한 생성이 연관되어 있다.<sup>6,15,23,24)</sup> Tc-99m MIBI, Tc-99m tetrofosmin, Tc-99m furifosmin, Tc-99m Q12 등의 화합물들은 종양의 진단과 치료후의 평가에 이용되어 왔고, P-gp와 MRP의 발현의 평가에도 사용될 수 있다고 보고되었다.<sup>9,10,20,21,25,26)</sup> 임상에서 가장 먼저 사용된 바 있는 심근관류 영상용 추적자인 MIBI는 암세포내 섭취가 tetrofosmin보다 높다고

보고되고있으며,<sup>25,26)</sup> 실제 임상에서도 악성종양의 평가에 가장 많이 이용되고 있다.<sup>9,11,13)</sup> 그러나, MIBI와 tetrofosmin은 악성유방암을 정확하게 진단할 수 있는 방사성의약품으로 유방암 진단능은 유사하고,<sup>22)</sup> 다약제내성이 발현된 유방암세포에서 tetrofosmin은 MIBI와 같이 P-gp의 기질이 될 수 있다고 알려져 있다.<sup>16)</sup> 특히, MRP발현 신경교세포에서 tetrofosmin은 MIBI보다 우수한 방사성의약품이라고 보고된 바 있고,<sup>10)</sup> tetrofosmin은 상온에서 표지하여 사용할 수 있다는 장점이 있어 이에 대한 연구가 필요하였다.

본 연구에 사용한 A549세포는 다약제내성 역전제에 의해 MIBI의 섭취증가가 관찰된다고 보고된 바 있었는데,<sup>29,30)</sup> 미토콘드리아 막전위를 증가시킨

다고 알려진 nigericin을 처리한 A549세포는 미토콘드리아 막전위가 증가됨에 따라 MIBI섭취도 급격히 증가하였다.<sup>11)</sup> Moretti 등<sup>9)</sup>은 암세포에서 MIBI섭취의 감소는 P-gp나 MRP발현과 관련이 있으며, A549세포의 면역화학 염색결과 P-gp가 없는 MRP 발현을 관찰하였고, BSO처리에 의해 MIBI섭취가 증가하였으므로 A549세포는 MRP발현 세포라고 제시하였다. 따라서, A549세포가 MRP만을 발현하는 세포인지에 대한 여부와 A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취변화를 알아보려고 하였다.

이 연구에서도 RT-PCR방법으로 A549세포는 *mdr1* mRNA가 발현되지 않음을 관찰할 수 있었고, MRP 단일클론항체인 MRPr1을 이용하여 western blot analysis를 실시한 결과 190 kDa에 해당하는 MRPr1 밴드가 관찰되었다. 누드마우스에 A549세포를 이종이식하여 생성된 종양조직의 절편에서도 면역조직화학 염색법에 의해 MRPr1 항체가 세포막에 염색됨을 관찰할 수 있었다. MRP발현이 증명된 A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취는 30분보다 60분 배양한 경우가 더 높았고, MIBI의 섭취정도가 tetrofosmin보다 높았다. Vrp과 CsA는 다약제 내성 억제제로 잘 알려져 있으나, MRP억제제로서의 효능도 보고되고 있으며, MRP발현 세포에 BSO 처리는 MIBI의 섭취가 증가된다고 알려져 있다.<sup>6,7,8)</sup> Vrp, CsA 그리고 BSO처리에 의한 두 방사성의약품의 세포내 섭취율은 기저치보다 최저 1.4배에서 최고 7.4배까지 모두 증가하였으므로, MIBI와 tetrofosmin은 P-gp가 없는 A549세포에서 발현되는 MRP의 기질이 될 수 있을 것으로 판단되었다. GSH 합성의 저해제인 BSO는 MRP발현만을 억제하는 약제로, MRP를 발현하는 비인후암세포 CNE-1, 유방암세포 MCF-7과 신경교세포에서 BSO처리에 의해 MIBI와 tetrofosmin섭취가 증가됨이 보고되었고,<sup>6,8,10)</sup> 이 연구의 결과와도 일치함을 보였다. 실제로 P-gp만을 발현하는 대장암세포 HCT15/CL02와 백혈병세포 K562(Adr)에서 BSO에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 변화가 없었음을 관찰할 수 있었다(data not shown).

MRP를 발현하는 신경교세포에서는 BSO에 의한 tetrofosmin의 섭취증가는 MIBI보다 높았으며,<sup>10)</sup> 비

인후암세포에서는 기저치에서 MIBI의 섭취는 tetrofosmin보다 2배정도 높았으나, MRP를 억제하는 PSC833, Vrp, CsA, BSO 등에 의한 방사성의약품의 배출억제 효과는 tetrofosmin이 2배정도 높았다고 하였다.<sup>6)</sup> A549세포에서 BSO처리에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 60분 기저치와 비교해 보면 MIBI는 219%, tetrofosmin은 140%로 MIBI의 섭취율 증가가 tetrofosmin보다 높았다. 이는 앞의 보고와는 상이한 결과로서, MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취율의 증가는 세포주에 따라 차이가 있을 것으로 추측되며, A549세포에서 MRP발현을 평가하는데는 MIBI가 tetrofosmin보다 더 효과적이라고 판단할 수 있었다.

방사성의약품의 섭취정도를 세포 및 동물실험 모두에서 비교한 연구는 드물다. BN-472 유방암이식 흰쥐의 세포실험에서는 MIBI, tetrofosmin, Q12순서로 섭취율이 낮았으나, 동물실험에서는 MIBI, Q12, tetrofosmin순서로 섭취율이 낮는데 이는 방사성의약품의 혈액내 제거와 종양에 대한 정상조직의 비율의 차이 때문이라고 보고하였다.<sup>21)</sup> 유방암진단에 사용하는 MIBI의 섭취율은 종양의 크기나 종양의 조직학적 형태에 따라 차이가 난다는 보고가 있다.<sup>31,32)</sup> A549세포를 이종이식한 생체 내에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 알아보기 위해서 MRP 억제제인 CsA주사 후 10분에서 240분까지의 시간에 따른 변화를 조사하였다. CsA에 의한 두 방사성의약품의 섭취를 각각의 대조군과 비교한 결과 60분과 240분에서 통계적으로 유의하게 높았으나, 두 군간의 유의한 차이는 없었다. 또한, 섭취율의 증가 정도는 체외실험에 비교하여 상대적으로 낮았다. 이러한 결과는 CsA의 작용시간이나 생체 내에서의 대사 등과 연관이 있을 것으로 추측하였다.

이 연구의 결과로 보아 인체 비소세포 폐암 A549 세포와 종양에서 MIBI와 tetrofosmin은 MRP발현을 측정할 수 있는 방사성의약품으로 생각되며, MRP 억제제들에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취증가 정도는 세포실험에서는 MIBI가 tetrofosmin보다 높았으나 동물실험에서는 유사하였다.



## 요 약

**목적 :** 인체 비소세포 폐암 A549세포에서 MRP발현을 조사하고, A549세포와 종양에서 Tc-99m MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 비교하여 MRP추적자로서의 성능을 알아보고자 하였다. **재료 및 방법 :** A549세포의 MRP발현은 MRPr1항체에 대한 western blot analysis와 면역조직화학 검사로 확인하였다. 세포내 섭취는 37°C에서 100 µM의 verapamil (Vrp), 50 µM의 cyclosporin A (CsA)와 25 µM의 butoxysulfonamide (BSO)가 전 처리된  $1 \times 10^6$ 개/ml 농도의 단일세포 부유 상태에서 MIBI와 tetrofosmin을 30분과 60분 동안 반응시킨 후 상층액과 침전물로 분리하여 각각의 방사능을 감마계수기로 측정하였다. 체내 실험은 누드마우스에 A549세포를 이종이식하여 4 군으로 나누었다. Gr1과 Gr3은 MIBI와 tetrofosmin을 각각 주사한 군들이며, Gr2와 Gr4는 CsA를 70mg/kg으로 MIBI와 tetrofosmin투여 1시간 전에 처리한 군들이다. MIBI와 tetrofosmin은 각각 370KBq용량으로 꼬리정맥 주사하고 10분, 60분, 240분 후에 동물들을 희생시켜 종양조직내의 두 방사성의약품의 장기섭취율(%ID/gm)로 계산하여 비교하였다. **결과 :** MRPr1 항체(clone MRPr1)를 이용하여 western blot analysis결과 A549세포는 약 190 kDa에 해당하는 MRPr1 밴드를 나타내었으며, 면역조직화학 염색 검사에 의한 종양조직에서도 MRP가 발현되었음을 관찰할 수 있었다. A549세포에서 세포내 MIBI와 tetrofosmin의 섭취는 배양시간이 지남에 따라 증가하였으며 그 섭취정도는 MIBI가 tetrofosmin보다 높았다. MRP억제제들에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 각각의 60분 대조군과 비교하면 Vrp (100µM) 처리에 의하여 각각 623%와 427%, CsA (50 µM)에 의해서는 각각 763%와 629%, BSO (25 µM)에 의해서는 각각 219%와 140%로 증가하여 모든 억제제에서 MIBI의 섭취증가 정도가 tetrofosmin보다 높았다. 체내에서 Gr1과 Gr3에서 두 방사성의약품의 섭취정도는 유사하였다. Gr2와 Gr4에서 CsA (70mg/kg)에 의한 섭취정도는 각각의 대조군에 비교하여 MIBI는 10분에 114%, 60분에 257%, 240

분에 396%로 증가하였으며, tetrofosmin은 10분에 110%, 60분에 205%, 240분에 410%로 증가하였다. **결론 :** 본 연구의 결과로 보아 인체 비소세포 폐암 A549세포와 종양에서 MIBI와 tetrofosmin은 MRP발현을 측정할 수 있는 방사성의약품으로 사료되며, MRP억제제들에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취증가 정도는 세포실험에서는 MIBI가 tetrofosmin보다 높았으나 동물실험에서는 유사하였다.

## 참고문헌

- 1) Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug-resistance. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948:87-128.
- 2) Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug-resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
- 3) Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistance human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650-4.
- 4) Narasaki F, Oka M, Nakano R, Ikeda K, Fukuda M, Nakamura T, et al. Human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) is expressed in human lung, gastric, and colorectal cancer cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:606-11.
- 5) Evers R, Zaman GJR, van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen LCJM, et al. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein (MRP) in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest* 1996;97:1211-8.
- 6) 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.
- 7) Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a

- plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:8822-6.
- 8) Benderra Z, Yrussardi A, Morjani H, Villa AM, Doglia SM, Manfait M. Regulation of cellular glutathione modulates nuclear accumulation of daunorubicin in human MCF7 cells overexpressing multidrug resistance associated protein. *Eur J Cancer* 2000;36:428-34.
  - 9) Moretti JL, Cordobes MD, Starzec A, de Beco V, Vergote J, Benazzouz F, et al. Involvement of glutathione in loss of technetium-99m-MIBI accumulation related to membrane MDR protein expression in tumor cells. *J Nucl Med* 1998;39:1214-8.
  - 10) Perek N, Prevot N, Koumanov F, Frere D, Sabido O, Beauchesne P, et al. Involvement of the glutathione S-conjugate compounds and MRP protein in Tc-99m-tetrofosmin and Tc-99m-sestamibi uptake in glioma cell lines. *Nucl Med Biol* 2000;27:299-307.
  - 11) Delmon-Moigeon LI, Piwnica-Worms D, Van den Abbeele AD, Holman BL, Davison A, Jones AG. Uptake of the cationhexakis(2-methoxyisobutylisonitrile)-Technetium-99m by human carcinoma cell lines *in vitro*. *Cancer Res* 1990;50:2198-201.
  - 12) Palmedo H, Schomburg A, Grunwald F, Mallmann P, Boldt I, Biersack HJ. Scintimammography with Tc-99m MIBI in patients with suspicion of primary breast cancer. *Nucl Med Biol* 1996;23:681-4.
  - 13) Tonami N. Evaluating benign and malignant bone and soft-tissue lesions with technetium-99m-MIBI scintigraphy. *J Nucl Med* 1997;38:501-6.
  - 14) Piwnica-Worms D, Holman BL. Noncardiac applications of hexakis (alkylisonitrile) technetium-99m complexes. *J Nucl Med* 1990;31:1166-7.
  - 15) Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistance P-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* 1993;53:977-84.
  - 16) Ballinger JR, Banneman J, Boxen I, Firby P, Hartman NG, Moore MJ. Tc-99m-tetrofosmin as a substrate for P-glycoprotein: In vitro studies in multidrug-resistance breast tumor cells. *J Nucl Med* 1996;37:1578-82.
  - 17) Mansi L, Rambaldi PF, Marino G, Pecori B, Del Vecchio E. Tc-99m tetrofosmin uptake in breast tumors. *J Nucl Med* 1995;36S:83p.
  - 18) 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.
  - 19) Yoo JA, Chung SY, Seo MR, Kwak DS, Ahn BC, Lee KB, et al. Comparison of the uptakes of <sup>99m</sup>Tc-sestamibi and <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin in cancer cell lines expressing multidrug resistance. *Korean J Nucl Med* 2003;37:178-89.
  - 20) Otsuka N, Tamada T, Mimura H, Sone T, Morita K, Tomomitsu T, et al. Comparative study on the tumor accumulation of <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin and <sup>99m</sup>Tc-MIBI in rabbits bearing VX-2cancer. *Kaku Igaku* 1997;34:939-43.
  - 21) Bernard BF, Krenning EP, Breeman WA, Ensing G, Benjamins H, Bakker WH, et al. <sup>99m</sup>Tc-MIBI, <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin and <sup>99m</sup>Tc-Q12 in vitro and in vivo. *Nucl Med Biol* 1998;25:233-40.
  - 22) Horne T, Pappo I, Cohen-Pour M, Baumer M, Orda R. <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin scintimammography for detecting breast cancer: a comparative study with <sup>99m</sup>Tc-MIBI. *Nucl Med Commun* 2001;22:807-11.
  - 23) Dole LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein BCRP(ABCG2). *Oncogene* 2003;20:7340-58.
  - 24) Kuo TH, Liu FY, Chuang CY, Wu HS, Wang JJ, Kao A. To predict response chemotherapy using technetium-99m tetrofosmin chest images in patients with untreated small cell lung cancer and compare with p-glycoprotein, multidrug resistance related protein-1, and lung resistance-related protein expression. *Nucl Med Biol* 2003;30:627-32.
  - 25) Rodrigues M, Chehne F, Kalinowska W, Zielinski C, Sinzinger H. Comparative <sup>99m</sup>Tc-MIBI, <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin and <sup>99m</sup>Tc-furifosmin uptake in human soft tissue sarcoma cell lines. *Eur J Nucl Med*

- 2000;27:1839-43.
- 26) Lorke DE, Kruger M, Buchert R, Bohuslavizki KH, Clausen M, Schumacher U. In vitro and in vivo tracer characterizations of an established multidrug-resistant human colon cancer cell line. *J Nucl Med* 2001;42:646-54.
- 27) 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.
- 28) Rodrigues M, Chehne F, Kalinowska W, Berghammer P, Zielinki C, Sinzinger H. Uptake of <sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin into malignant versus nonmalignant breast cell lines. *J Nucl Med* 2000;41:1495-9.
- 29) Cho IH, Lee J, Suh JS, Lee BH, Choi SW, Sohn SK, et al. Effects of new multidrug-resistance reversing agent, KR-30035, on tumoral uptake of Tc-99m MIBI in vivo and in vitro. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:773-83.
- 30) Kim JK, Lee J, Lee BH, Choi SW, Yoo SE, Lee SW, et al. Reversal of multidrug resistance with KR-30035: evaluated with biodistribution of Tc-99m MIBI in nude mice bearing human tumor xenografts. *Korean J Nucl Med* 2001;35:168-84.
- 31) Buscombe JR, Cwikla JB, Thakrar DS, Hilson AJ. Uptake of Tc-99m MIBI related to tumour size and type. *Anticancer Res* 1997;17:1693-4.
- 32) Papantoniou V, Christodoulidou J, Papadaki E, Valotassiou V, Souvatzoglou M, Louvrou A, et al. Uptake and washout of <sup>99m</sup>TcV-dimercaptosuccinic acid and <sup>99m</sup>Tc-sestamibi in the assessment of histological type and grade in breast cancer. *Nucl Med Commun* 2002;23:461-7.
-