

수종의 암세포에서 Verapamil이 Tc-99m MIBI와 Tetrofosmin의 섭취에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 학의학교실

김대현, 유정아, 서명랑, 배진호, 정신영, 안병철, 이규보, 이재태

Effect of Verapamil on Cellular Uptake of Tc-99m MIBI and Tetrofosmin on Several Cancer Cells

Dae-Hyun Kim, MD, Jung-Ah Yoo, PhD, Jin-Ho Bae, MD, Shin Young Jeong, MD, Myung-Rang Suh, Byeong-Cheol Ahn, MD, Kyu Bo Lee, MD, Jaetae Lee, MD

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

Abstract

Purpose: Cellular uptake of ^{99}mTc -sestamibi (MIBI) and ^{99}mTc -tetrofosmin (TF) is low in cancer cells expressing multidrug resistance(MDR) by p-glycoprotein(Pgp) or multidrug related protein(MRP). Verapamil is known to increase cellular uptake of MIBI in MDR cancer cells, but is recently reported to have different effects on tracer uptake in certain cancer cells. This study was prepared to evaluate effects of verapamil on cellular uptake of MIBI and TF in several cancer cells. **Materials and Methods:** Cellular uptakes of Tc-99m MIBI and TF were measured in erythroleukemia K562 cell, breast cancer MCF7 cell, and human ovarian cancer SK-OV-3 cells, and data were compared with those of doxorubicin-resistant K562(Ad) cells. RT-PCR and Western blot analysis were used for the detection of mdr1 mRNA and Pgp expression, and to observe changes in isotypes of PKC enzyme. Effects of verapamil on MIBI and TF uptake were evaluated at different concentrations upto 200 μM at 1×10^6 cells/ml at 37°C. Radioactivity in supernatant and pellet was measured with gamma counter to calculate cellular uptake ratio. Toxicity of verapamil was measured with MTT assay. **Results:** Cellular uptakes of MIBI and TF were increased by time in four cancer cells studied. Co-incubation with verapamil resulted in an increase in uptake of MIBI and TF in K562(Ad) cell at a concentration of 100 μM and the maximal increase at 50 μM was 10-times to baseline. In contrast, uptakes of MIBI and TF in K562, MCF7, SK-OV3 cells were decreased with verapamil treatment at a concentration over 1 μM . With a concentration of 200 μM verapamil, MIBI and TF uptakes in K562 cells were decreased to 1.5 % and 2.7% of those without verapamil, respectively. Cellular uptakes of MIBI and TF in MCF7 and SK-OV-3 cells were not changed with 10 μM , but were also decreased with verapamil higher than 10 μM , resulting 40% and 5% of baseline at 50 μM . MTT assay of four cells revealed that K562, MCF7, SK-OV3 were not damaged with verapamil at 200 μM . **Conclusion:** Although verapamil increases uptake of MIBI and TF in MDR cancer cells, cellular uptakes were further decreased with verapamil in certain cancer cells, which is not related to cytotoxicity of drug. These results suggest that cellular uptakes of both tracers might differ among different cells, and interpretation of changes in tracer uptake with verapamil in vitro should be different when different cell lines are used.

Key Words: verapamil, Tc-99m MIBI, tetrofosmin, multidrug resistance, cancer

Received January. 15, 2004; accepted February. 13, 2004

책임저자: 이재태, 경북대학교 의과대학 학의학교실

주소: 700-721 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50번지, 경북대학교병원 학의학교

Tel : 82-53-420-5586, Fax : 82-53-422-0864, E-mail : jaetae@knu.ac.kr

* 이 연구는 과학기술부 한국과학평가원의 원자력중장기 분자핵의학영상 연구비의 지원으로 이루어졌음.

서 론

약성종양의 항암제 치료시 치료 실패와 관련된 원인 중 가장 중요한 요인은 다약제내성(multi-drug resistance, MDR)과 관련된 세포막의 170 kDa P-당 단백 (P-glycoprotein, Pgp)과 190 kDa 다약제내성 관련 단백질 (multi-drug related protein, MRP)의 발생에 의한 항암제에 대한 복합적인 약제내성의 발생이다.^{1,2)} 다약제내성이 발생한 암세포는 세포질내에 항암제를 저류하지 못하여 세포 바깥으로 배출하게 되므로 약제의 치료효과가 감소하게 되며, 한 종류의 항암제에 대한 내성이 발생하여도 알칼로이드와 anthracycline계의 항암제, epipodophyllotoxin, 알킬화제제 계열의 항암제 등에 대한 다발성 내성을 가진다. Pgp와 MRP는 세포막에서 생성되므로 생검이나 수술에서 얻은 암조직에서 면역화학적 염색, 분자생물학적 분석법등의 실험실 검사법이나 생존된 암세포에서의 로다민 배출능을 측정하는 체외분석법등이 이용되어왔다. 이러한, 대부분의 검사방법이 종양세포나 조직의 체외 실험을 통하여 증명하여야 하므로, 종양세포를 반복적으로 체취하기가 비교적 간단한 백혈병 세포 등의 혈액암에서만 제한적으로 이용될 수 있다.³⁾

심근관류 스캔에 이용되는 방사성의약품인 Tc-99m sestaMIBI(MIBI)와 Tc-99m Tetrofosmin(TF)는 분자의 구조가 다약제내성이 발생한 암세포 내에 저류가 되지 않는 여러 종류의 항암제와 화학적인 구조는 상이하나, 세포막을 자유롭게 통과하는 저분자량의 물질로서 암세포내의 섭취기전은 항암제와 유사하다. 다약제내성의 발현과 연관된 Pgp와 MRP의 생성이 증가된 인체 암세포에서는 Tc-99m MIBI와 TF가 항암제와 유사한 기전으로 세포막 바깥으로 배출되어 세포내 농도가 감소되므로,^{2,4)} 악성종양 환자에서 종양세포내의 Tc-99m MIBI와 Tc-99m TF 섭취 정도를 측정하면 종양세포내의 다약제내성 발현을 예측하여 환자의 예후를 평가할 수 있고, 적절한 항암제를 선택하는데 이용할 수 있다.⁵⁾

다약제내성의 극복은 악성종양의 완치에 결정적인 역할을 할 것으로 예상되나 아직도 효과적인 극복법은 개발되지 못하고 있다. 다약제내성의 극복 방법 중 Pgp에 작용하여 다약제내성을 역전시키는 약제로 잘 알려져 있는 verapamil은 실제 임상에서 약제내성을 극복하기 위하여 가장 먼저 사용된 바가 있고, Tc-99m MIBI 종양 영상검사 시에 verapamil를 투여하면 다약제내성 암세포 내의 방사성의약품의 저류가 증가된다는 사실도 보고되었다.^{4,5)} 그러나 최근 어떤 암세포에서는 verapamil이 암세포내의 항암제 농도나 Tc-99m MIBI와 TF의 농도를 감소시킨다는 보고⁶⁾가 된 바 있어, 암세포의 종류에 따라서는 verapamil을 사용하여 Tc-99m MIBI섭취가 증가되는 가를 평가하여 다약제내성이 발생하였는가를 영상진단하는 방법의 유용성이 암세포에 따라 제한 될 수 있을 것으로 추측된다.

지금까지 MDR을 나타내는 많은 세포주에서 약제내성에 관한 효소나 단백질 인산화의 역할로 protein kinase-C(PKC)가 증가한다고 알려져 있다.^{7,8)} 또한 verapamil은 세포의 종식과 분열에 중요한 역할을 하는 PKC의 발현에 영향을 미치며, PKC를 억제하는 약제에 저항성을 가지는 암세포는 다약제내성의 성질을 가진다는 보고가 있어, verapamil의 투여 시 PKC 효소의 변화가 있을 것으로 추측되고 있다.^{7,8)}

본 연구는 암세포의 종류에 따라 verapamil이 MIBI와 TF의 섭취에 미치는 영향이 세포에 따라 다른지를 알아보고, verapamil이 암세포에서 MIBI나 TF의 섭취를 감소시킬 수 있다면, 이러한 현상이 MDR 발생여부와 연관이 있는지 알아보았다. 또한 verapamil에 의한 세포내 방사성추적자의 섭취 차이가 세포독성이나 PKC 효소 발현의 증가에 기인한 것인지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

암세포 중 인체 적백혈병 세포 K562와 유방암

세포 MCF-7은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서, 난소암 세포 SK-OV-3는 National Cancer Institute (Bethesda, MD., USA)에서 구하였으며, K562(Adr)세포는 모세포인 K562 세포주에 doxorubicin의 농도를 단계적으로 증가시킨 RPMI 배지에서 배양하면서 최종농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 살아남은 세포를 분리하여 다약제내성이 발현된 것을 확인한 후, 실험에 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 GIBCO BRL (Grand Island, USA)에서, verapamil은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 0.9% 생리식염수에 녹여 원액을 만들었으며, 실험할 때마다 0.9% 생리식염수로 희석하여 1, 10, 50, 100, 200 μM 의 농도로 사용하였다.

MTT assay (Promega, Madison, WI, USA)와 bovine serum albumin (BSA) protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA)는 kit으로, protein kinase C 동위효소 항체들은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

방사성의약품인 MIBI (Cardiolite, E.I. DuPont Pharma, North Billerica, MA)와 Tetrofosmin (Amersham International, Aylesbury, Buckinghamshire, UK)은 kit로 구입하여 신선한 Tc-99m pertechnetate으로 매 실험마다 새롭게 표지하여 사용하였다.

2. 방법

① Tc-99m MIBI와 tetrofosmin의 표지

Tc-99m MIBI는 1 vial에 0.9% 생리식염수 2 ml 에 Tc-99m pertechnetate $\sim 200 \text{ MBq}$ 의 원액을 만들어 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 끓인 후 표지율이 95% 이상이 된 경우 사용하였으며, 방사능치가 10 MBq/ml 이 되도록 생리식염수로 희석하였다. 같은 방법으로 TF도 10 MBq/ml 이 되도록 상온에서 준비하였으며 세포내 섭취 실험에서는 100 μl 의 용량을 5 ml 의 세포 혼탁액에 첨가하였으므로 방사성 의약품의 최종농도는 0.1 MBq , 50 nmol/ml 로 하였다.

② 세포배양

암세포는 5% fetal bovine serum (FBS) 및 100 units/ ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 첨가한 RPMI

1640 배지에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 95% O₂/5% CO₂의 배양조에서 배양하였다. 세포들은 밀성되면 수확하여 새로운 배지로 세척한 후 1 $\times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ 의 농도로 부유시킨 상태에서 방사성의약품의 세포내 섭취율의 측정에 사용하였다.

③ 방사성 의약품의 세포 섭취율 측정

암세포의 MIBI와 TF의 세포내 섭취율을 간단하게 설명하면, 5 ml 의 세포 혼탁액들은 10분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 최대 200 μM 까지 verapamil을 농도 별로 처리한 후, 여기에 100 μl 의 MIBI 혹은 tetrofosmin을 첨가하여 1, 15, 30, 45, 60분 동안 반응시킨 후, 각 시간대 별로 300 μl 의 용액을 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 생리식염수 1 ml 이 든 microcentrifuge tube로 옮겼다. 14,000 rpm에서 2 분간 원심분리 한 후 상층액과 침전물을 분리하고 침전물들은 충분히 말린 후, 1분 동안 감마 계수기로 각각의 방사능 양을 측정하여 투여한 방사능에 대한 섭취 백분율로 표시하였다. 세포내 섭취율 측정실험은 3회 이상 독립적으로 시행하였고, 각각의 실험마다 3개의 측정값을 구하였으며 최종적으로 전체의 평균값을 비교하였다.

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

④ Verapamil의 세포독성 측정

세포독성은 tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 방법으로 측정하였다. 96-well plate에 2 $\times 10^4/\text{ml}$ 세포의 밀도로 100 μl 씩 분주하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 95% O₂/5% CO₂ 배양조에서 12시간 이상 안정화시켰다. Verapamil을 농도별로 60분간 처리한 후 Cell Titer 96^R Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)의 dye solution을 15 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 첨가하여 4시간 더 반응시켰다. Stop solution 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 을 넣고 1시간 뒤 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. MTT assay로 측정한 세포생존도는 측정한 흡광도 값을 각각의 암세포들의 대조군에 대한 백분율로 표시하였고, 세포생존도가 50%로 감소하는 농도를 IC50(50%

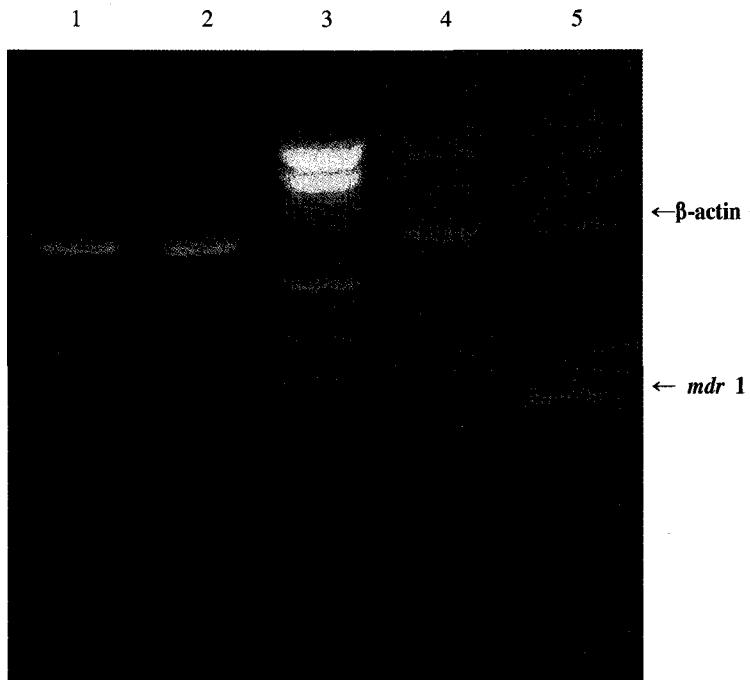


Fig. 1. Representative gel of RT-PCR products demonstrating *mdr1* gene expression in cancer cell lines. K562(Adr) cell detected *mdr1* gene in RNA samples. Over-expression of *mdr1* gene is only observed in K562(Adr) cells. 1; MCF-7, 2; SK-OV-3, 3; molecular size marker, 4; K562, 5; K562(Adr)

inhibitory concentration)으로 표시하였다.

⑤ PKC 동위효소에 대한 Western blot 분석

세포를 ice-cold로 세 차례 수세한 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 μ L 씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4 °C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. BSA protein assay kit로 정량한 후 동일 량의 단백질 (50 μ g)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 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, protein

kinase-C (PKC) isotypes에 대한 항체와 반응시키고, 각 항체들에 대한 2차 항체인 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG 항체로 각각 1 시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회 세척하였다. 이어서 각 항체에 대한 대응단백질 band는 enhanced chemiluminescence (ECL : Amersham/Pharmacia Biotech, USA) detection 법으로 확인하였다.

결과

세포에서 *mdr1* 유전자 과발현의 측정

K562세포의 RT-PCR에서는 *mdr1*유전자의 과발현이 관찰되지 않았고, 배혈병 세포 K562(Adr)에서 *mdr1* 유전자의 과발현을 RT-PCR로 증명할 수 있었다. 그러나 K562, MCF7, SK-OV-3 세포에서는 *mdr1* 유전자의 과발현이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

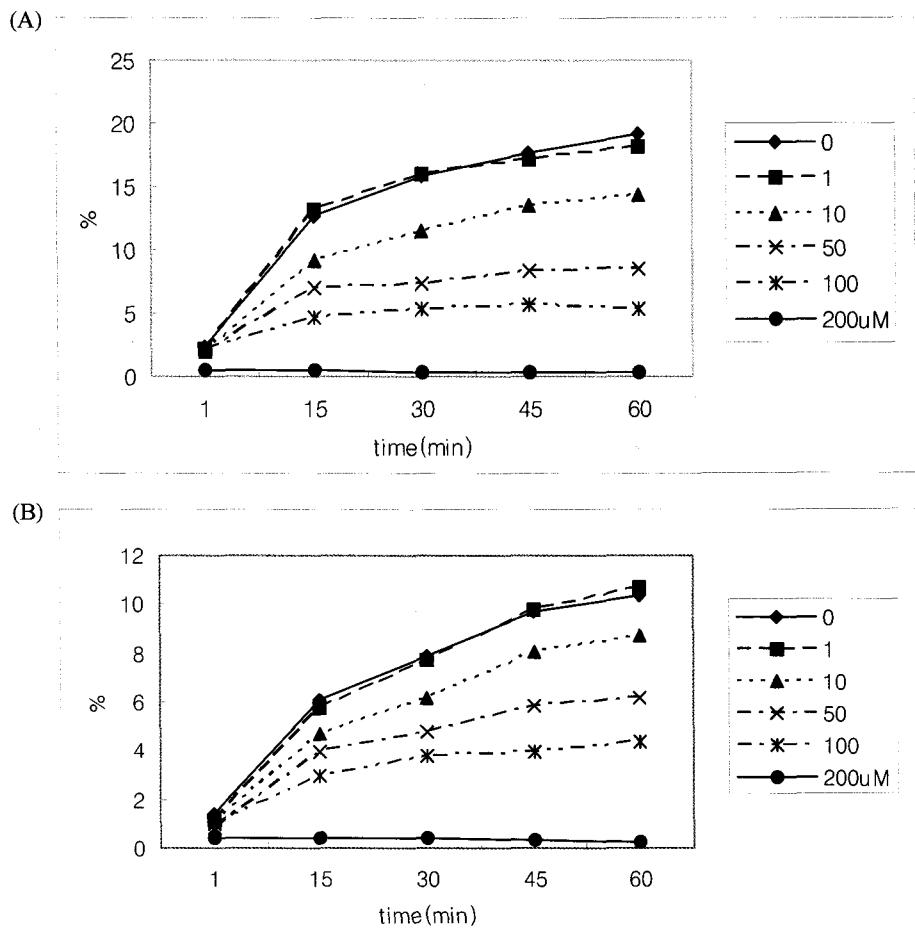


Fig. 2. Changes in cellular uptakes of MIBI and Tetrofosmin (TF) in K562 cells. Uptakes of MIBI (A) and TF (B) was measured over 60 min in the absence (0 μ M) or in the presence of verapamil as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SD obtained from three separate experiments.

K562세포와 K562(Adr)세포에서 MIBI 와 tetrofosmin의 섭취율 비교

백혈병세포 K562세포에서 MIBI를 1분, 15분, 30분, 45분, 60분 배양한 후 측정한 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, TF 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 TF 섭취율 보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). MDR이 유발된 세포인 K562(Adr)의 MIBI와 TF 섭취율은

K562세포보다 낮았고($P < 0.001$), 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, TF는 $0.29 \pm 0.07\%$, $0.33 \pm 0.03\%$, $0.4 \pm 0.07\%$, $0.4 \pm 0.04\%$, $0.49 \pm 0.03\%$ 로 45분 60분에서의 MIBI의 섭취정도가 TF보다 약간 높았다 ($p < 0.05$).

Verapamil에 의한 Tc-99m MIBI 와 tetrofosmin 섭취의 변화

K562(Adr)세포를 verapamil 1, 10, 50, 100, 200

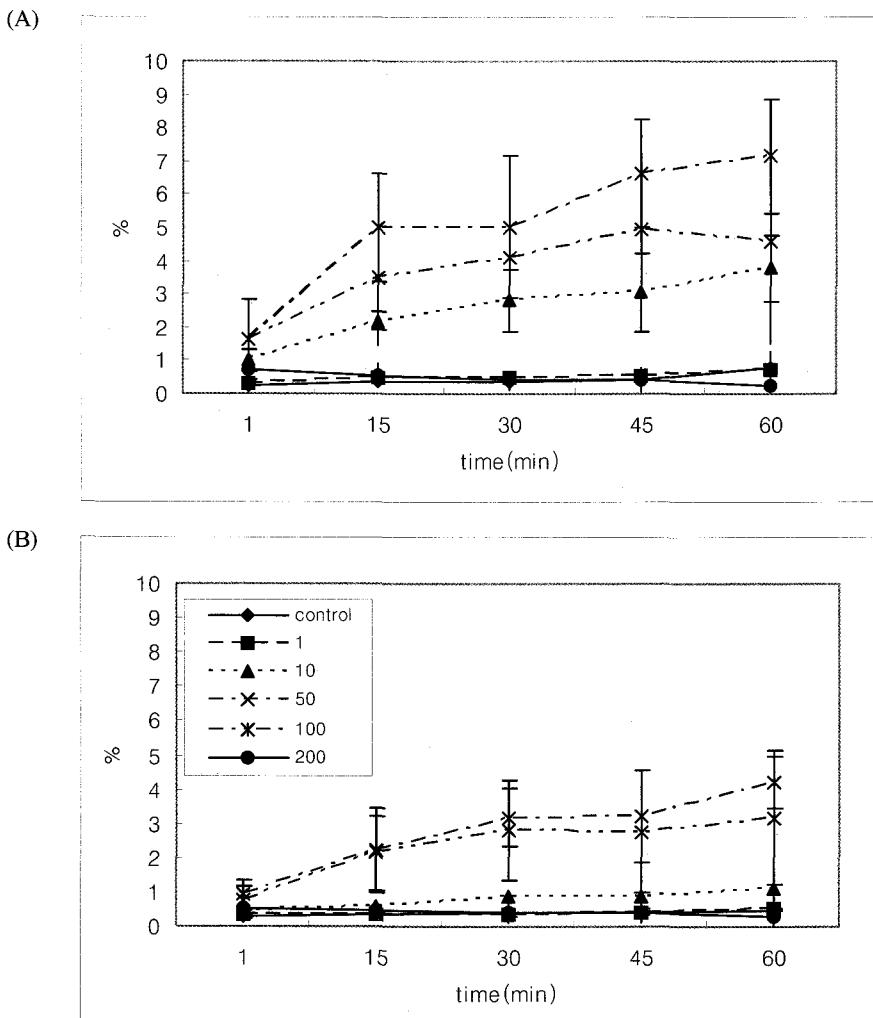


Fig. 3. Changes in cellular uptakes of MIBI and Tetrofosmin(TF) in MDR K562(Adr) cells. Uptakes of MIBI (A) and TF (B) was measured over 60 min in the absence (0 μ M) or in the presence of verapamil as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SD obtained from three separate experiments.

μ M의 농도로 처리하였을 때 MIBI와 TF의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 모두 증가하였으며 50 μ M일 때 최고 섭취율을 나타내었다. Verapamil의 기저치 30분 배양을 기준으로 50 μ M, 30분 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 14.3배 증가하였고, TF은 8배 증가하였으므로 verapamil에 의한 MIBI의 섭취율이 TF보다 거의 2배정도 높았다. Verapamil의 기

저치 30분 배양을 기준으로 10 μ M, 30분 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 7배 증가하였고, TF은 5.7배 증가하였으므로 verapamil에 의한 MIBI 섭취율의 증가가 TF보다 1.2배정도 높았다. K562세포를 Ver 1 μ M로 처리하였을 때는 기저치와 유사하였으나, Ver의 농도가 증가함에 따라 MIBI와 TF의 세포섭취는 모두 감소하였다. K562세포의 60분 MIBI 섭취율

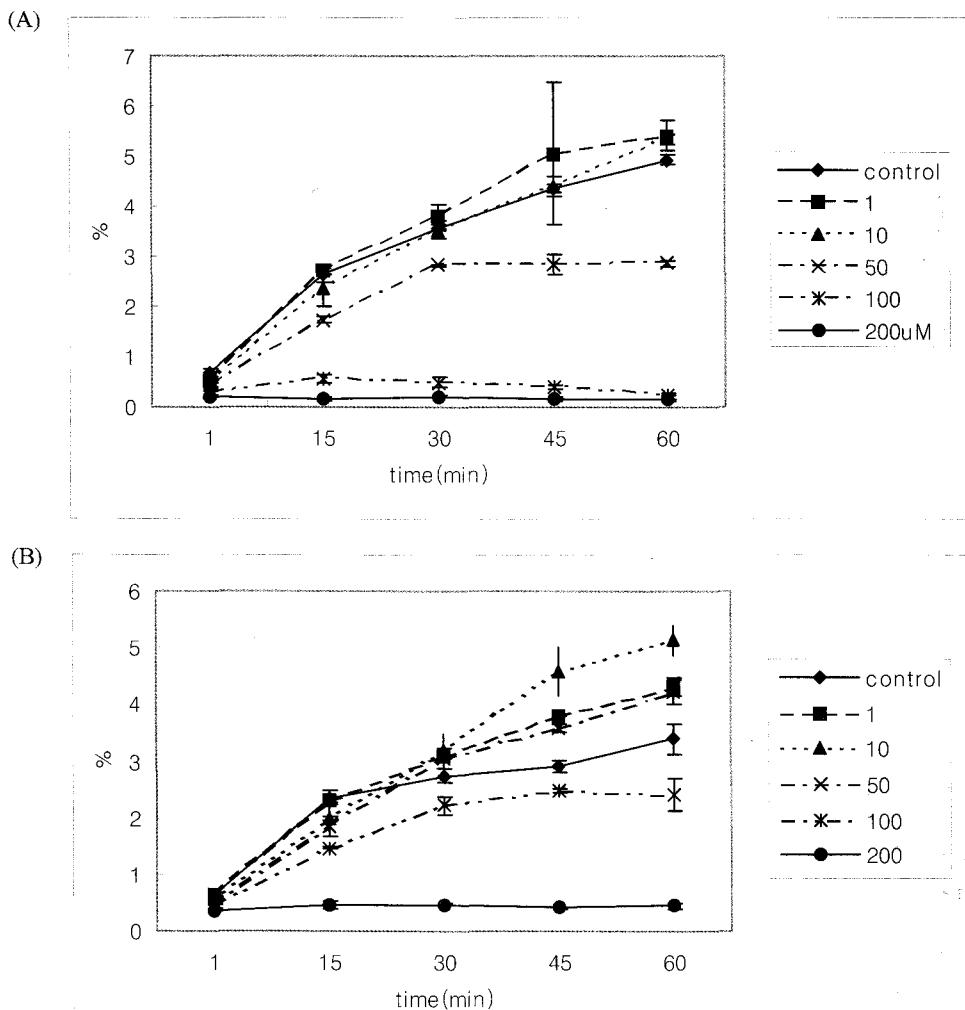


Fig. 4. Changes in cellular uptakes of MIBI in cancer cells. Uptakes of MIBI in MCF-7 cell (A) and SK-OV-3 cell (B) was measured over 60 min in the absence (0 μ M) or in the presence of verapamil as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SD obtained from three separate experiments.¹

은 79%(10 μ M), 47%(50 μ M), 29%(100 μ M), 1.5%(200 μ M)로 verapamil의 용량이 증가함에 따라 감소하였으며, TF 섭취율도 84%(10 μ M), 60%(50 μ M), 42%(100 μ M), 2.7%(200 μ M)로 감소하였다(Fig. 2) (Fig. 3).

MCF7세포에서는 60분 MIBI섭취가 2.9%였고 verapamil 1 μ M투여시 섭취가 기저치와 유사하였고 10 μ M의 농도에서는 5.6%로 기저치보다 193%

증가하였으나, 50 μ M 이상의 용량에서는 감소하여 100 μ M에서는 1.6%로 기저치의 55%로 섭취가 감소되었다. SK-OV-3세포는 기저치가 4.9%였고 verapamil 10 μ M까지는 MIBI의 섭취가 기저치와 유사하거나 소량 증가하여 10 μ M에서 5.3% (기저치의 108%) 섭취되었으나, 50 μ M이상의 용량에서는 섭취가 현저하게 감소하여 100 μ M에서는 기저치의 5%인 0.26% 만 섭취되었다(Fig. 4). TF섭취

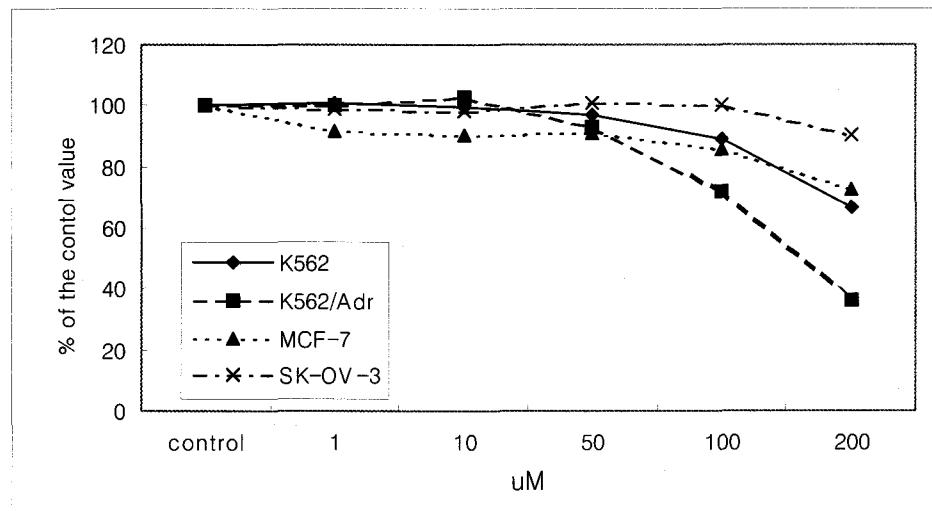


Fig. 5. Comparison of percentage fraction of viable cells measured with MTT assay. IC50 for K562(Adr) cell was between 50 and 100 μ M of verapamil.

율의 변화는 1회 측정하였고, 기저 세포섭취율은 MIBI 섭취율 보다 낮았으나, MIBI의 섭취율 변화와 유사한 경향을 보였다 (data not shown).

Verapamil의 세포독성과 verapamil이 PKC 효소 아형의 발현에 미치는 영향

MTT assay의 결과는 Fig 5에 표시하였다. MTT assay상 K562(Adr)세포는 verapamil의 농도 100 μ M에서 세포생존도가 72%로 유지되었으나, 200 μ M에서는 36%로 현저하게 감소하였다. 이러한 변화가 더욱 뚜렷하였다. K562, MCF7 세포와 SK-OV-3 세포는 100 μ M에서는 90%이상의 생존도를 유지하였고, verapamil 200 μ M의 농도에서는 K562, MCF7 세포는 70-73%의 생존도를 유지하였으며 SK-OV-3 세포는 90%이상이 생존도를 유지하였다(Fig. 5).

K562세포와 K562(Adr) 세포에서의 PKC 아형의 변화를 알아보기 위해 각각의 항체들을 이용하여 시행한 Western blot 소견 상, K562세포에서는 PKC- α , β I, β II, θ 가 발현되었다. K562(Adr)세포에서는 PKC- β I, β II는 변화가 없었으나, PKC- α 와 θ 는 약간 증가하였고, PKC- ϵ 이 뚜렷하게 발현된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). K562와

K562(Adr)세포를 50 μ M 농도의 verapamil로 처리한 후, 막 분획에서 PKC- α , - β I, - θ , - ϵ 의 변화는 관찰되지 않았으므로, verapamil에 의한 PKC 아형의 변화는 없었다(Fig. 7).

고 칠

암세포에서 다약제내성(MDR) 발생의 가장 중요한 원인은 세포막에 Pgp나 MRP등의 단백질이 발현되고, 단백질의 작용에 의하여 세포질 내의 항암제가 저류되지 못하여 세포 막을 밖으로 배출되는 것이다. 그 결과로 치료효과를 나타낼 만큼의 항암약제의 세포내 농도를 유지하지 못하며, 한 종류의 항암제에 대한 내성이 발생하면 알칼로이드 계나 anthracycline계의 항암제, epipodophyllotoxin, 알킬화재제 계열의 항암제등에 대한 동시에 다발성 내성을 가진다. 세포막을 자유롭게 통과하는 저분자량의 물질인 Tc-99m MIBI의 암세포 내로의 섭취는 항암제와 유사한 기전으로 이루어지고, MIBI 섭취가 감소된다.^{3,5)} 1990년대 중반 이후 MIBI는 Pgp의 운반기질로 인정되어 암세포의 다약제내성 발생과 관련된 연구와 항암약물치료를 받는 악성종양 환자의 평가에 널리 이용

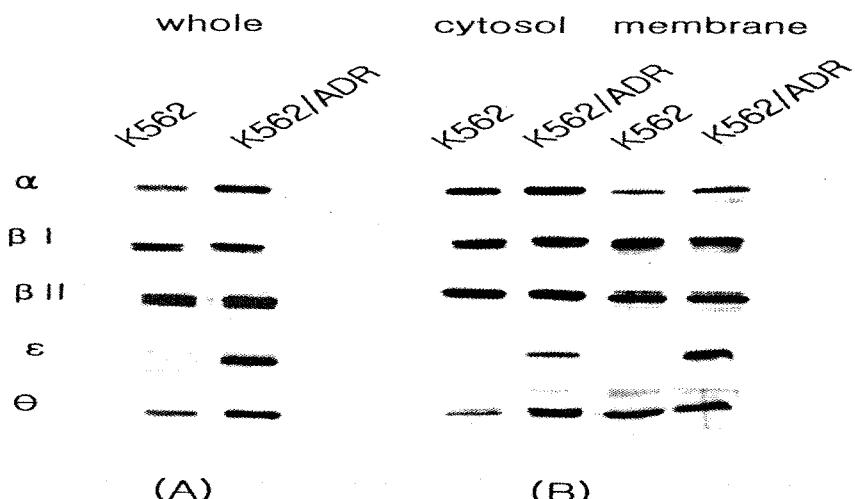


Fig. 6. Western blot for PKC isotypes. Lysates of K562 and K562(Adr) cells were used for Western blotting to detect PKC isoforms (A). The cell were fractionated into cytosolic and particular membrane fractions, and lysates were used for immunoblotting with PKC isoform-specific antibodies.

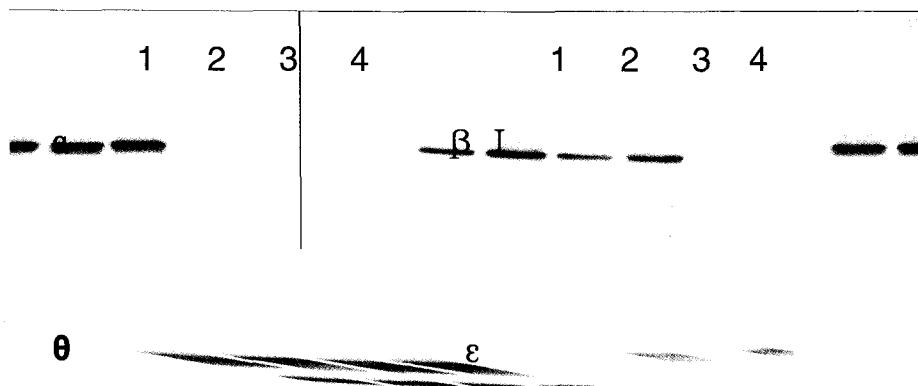


Fig. 7. Western blot for PKC isotypes after verapamil treatment. The cells were treated with or without 50 μ M verapamil and membrane fractions were used for immunoblotting with PKC isoform-specific antibodies. 1; K562, 2; K562(Adr), 3; K562 with 50 μ M verapamil, 4; K562(Adr) with 50 μ M verapamil treatment

되어 왔다.⁹⁻¹¹⁾ 심근관류 영상용 추적자인 diphosphine계열의 TF도 MIBI와 유사하게 Pgp의 운반기질로 사용될 수 있는 지용성 양이온 화합물로서, TF는 상온에서 표지하여 신속하게 사용 할 수 있는 장점이 있으므로 TF도 악성종양의 진단과 평가 및 암세포의 MDR 빌현을 예측하기 위

한 영상진단에 사용되고 있다.^{12,13)} 체내에서 MIBI 와 TF의 세포 섭취는 종양으로 분포하는 혈류량과 암세포의 대사상태, 다약제내성의 발생여부 등에 의하여 결정되나, 두 방사성의약품의 세포내 섭취 과정과 섭취 정도와 차이가 있다.¹⁴⁾ Rodrigues 등¹⁵⁾과 Arbab 등¹⁶⁾의 연구는 유방암 세

포인 MCF-7과 SK-BR-3 세포, EB-virus 음성 B-림프종 HBL-2, 소세포성 폐암 SW-13 세포에서는 MIBI의 세포 섭취가 TF보다 높다고 보고 하였다. 본 연구에서도 적백혈병세포인 K562세포와 MDR이 유도된 K562(Adr)세포에서 MIBI 섭취율이 TF 섭취율보다 높았다. Yoo 등¹⁷⁾도 *mdrl* 유전자가 발현되지 않은 K562세포와 K562(Adr)세포의 MIBI와 TF 섭취를 비교한 결과 K562(Adr)에서의 섭취가 유의하게 낮아 다약제내성이 유발된 세포에서는 MIBI와 TF의 섭취가 감소되었으며, 두 종류의 세포 모두에서 MIBI 섭취가 TF보다 높다고 보고 하였다. 그러나 세포에 따라서는 TF가 높다고 하였는데, Utsunomiya 등¹³⁾은 MRP 발현 암세포에서는 TF 섭취가 MIBI 섭취 보다 더 높다고 하였으므로 악성종양의 진단과 MDR의 평가시 어떠한 방사성의약품이 유리한지는 명확하지 않다. 또한 임상 체내영상 시에는 정상 인체 장기나 조직의 방사능 섭취량이 다르므로, 기저방사능치가 두 방사성의약품에서 차이가 있고 종양/배후조직 섭취비가 영향을 받을 것으로 추측된다. 그러나 Soderlund 등¹⁸⁾은 근골격계 악성종양환자에서 MIBI가 TF보다 약간 유리한 면이 있으나 유의한 차이는 아니라고 보고한 바 있다.

암세포에서 MIBI와 TF의 섭취율이 다르게 나타나는 이유는 여러 가지 기전이 있을 것이나 두 약제의 섭취기전이 가장 중요할 것으로 추측되고 있다. MIBI의 세포내 섭취와 저류는 각각 두종의 세포막과 미토콘드리아막의 전하 (electrical potential)의 차이에 기인하고 MIBI는 90%이상이 미토콘드리아내에 저류되는데 비하여, 아직도 그 섭취기전이 확실하게 구명된 것은 아니지만 TF는 비특이적인 기전인 Tc-99m TF의 지용성 성질에 의하여 섭취되며 부분적으로만 세포막과 미토콘드리아 막의 전하 차이에 의한 것이라고 알려져 있다.^{2,5,19,20)}

Pgp에 길항하여 MDR을 억제한다고 알려진 대표적인 약제는 verapamil으로 대표되는 칼슘통로 차단제, cyclosporin과 유도체인 PSC 833, quinine 유사체, calmodulin 길항제 등이 있다. 이들 길항제들의 작용기전으로는 MDR efflux에 대한 이동

에 관여하는 공통적인 결합부위에 대한 경쟁적 결합, 또는 단백질 내의 인식도메인(recognition domain)과의 친화성의 변화 등이 알려져 있고, 내성극복제 중의 일부는 세포고사를 촉진하여 내성을 극복한다는 보고도 있다. Pgp에 직접 작용하여 항암제가 세포 바깥으로 배출되는 것을 억제함으로서 세포내 약제의 농도를 증가시키는 다약제내성 극복제들은 다양한 화학적 특성을 지니고 있으나, 대부분이 양전하를 띠며 소수성인 공통적인 특성을 가지고 있다.^{6,21)} Verapamil은 지용성 side chain을 가진 칼슘통로 차단제로서, 가장 광범위하게 연구되어온 Pgp나 MRP 극복 약제로 알려져 있다. Verapamil은 실제 임상에서 약제 내성을 극복하기 위하여 최대 6-10 uM/L의 농도로 투여한 연구가 보고된 바 있었며, 1-2 uM/L의 혈장농도에서 심각한 심장독성이나 저혈압이 발생하므로 다약제내성을 극복하는 능력은 개선되면서 심혈관계 부작용을 감소시킨 verapamil 유도체인 dexverapamil, KR-30035 등이 새로이 소개되고 있다.^{21,22)} Chun 등²³⁾은 MDR 유발 murine leukemia cell line(L1210)에서 verapamil이 MIBI의 섭취율을 증가시켰다고 보고하였고, MDR세포인 인체대장암 HCT15/CL02세포, K562(Adr)세포에서 현저하게 MIBI의 섭취율을 증가시킨다.²²⁾ 체외 실험에서도 verapamil은 MIBI와 tetrofosmin의 섭취를 증가시키는 것으로 보고 된 다약제내성 역전제로 알려지게 되었다.²¹⁾ Yoo 등¹⁷⁾의 연구에서도 verapamil과 cyclosporin A가 MDR 세포내 MIBI와 TF 섭취를 증가시키고, 그 증가정도는 cyclosporin A가 verapamil보다 1.2배에서 4배정도 강력하다는 하였으며, 이는 Piwnica-Worms 등²⁴⁾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 것으로 미루어 보아 합당한 소견이었다. 그러나 Cordobes 등²⁵⁾은 다약제내성 극복제의 MIBI 섭취에 미치는 영향은 세포에 따라 2-12배나 차이가 날 수 있고, 사용한 약제내성 극복제의 농도에 따라서도 다른 영향을 나타낸다고 보고 한 바 있으므로 세포의

감수성에 따른 차이도 있을 것으로 생각된다.

최근 Rodrigues 등⁶⁾은 인체유방암 MCF-7 세포주에서는 verapamil을 처리하면 세포내 MIBI의 섭취가 오히려 감소된다고 보고한 바 있었는데, 세포에 따라 verapamil의 작용이 다르다면 지금까지 알려진 바와 같이 verapamil을 이용하여 암세포의 다약제내성 극복 정도를 평가하는 경우 그 결과의 판단이 상이할 수 있으므로 임상적으로도 중요한 의미를 지닌다. 그러므로 세포주에 따라 verapamil이 Tc-99m MIBI와 TF의 섭취를 오히려 감소시킬 수 있는가를 평가하는 연구가 필요하였다. 본 연구의 결과 verapamil은 암세포의 종류에 따라 MIBI와 TF의 섭취를 감소시켰고, 세포독성이 현저해진 고용량에서는 MDR 세포의 섭취도 감소시켰다. 그러므로 MDR의 진단시 verapamil을 처치에 따른 MIBI와 TF의 섭취 정도를 기준으로 하는 경우에는, verapamil의 농도와 세포의 종류에 따라 현저한 차이가 있을 수 있다는 점을 생각하여야 한다. 즉 MTT assay로 세포생존능을 평가한 결과 Tc-99m MIBI와 TF의 세포내 섭취억제 효과는 verapamil의 세포의 생존도를 억제하여 나타난 변화만으로 설명할 수는 없었다. 즉 K562(Adr)세포에서는 MTT assay상 IC50이 100 - 200 μM 사이였으나, 세포생존도가 현저하게 감소한 verapamil 100 μM에서 MIBI와 TF 세포내 섭취가 오히려 증가하였고, K562, MCF7, SK-OV-3 세포에서도 MTT assay상 유의한 세포독성이 관찰되지 않은 농도에서도 현저한 세포내 섭취가 감소되었다. 그러나 MCF7, SK-OV-3 세포에서 verapamil 1-10 μM 농도에서는 세포내 섭취가 약간 증가하거나 변화가 없었으나 50 μM 이상 고농도의 verapamil 처리한 경우 섭취가 감소한 만큼 MTT assay로 평가할 수 없는 세포내 세뇨기관의 미세한 변화등은 독립적으로 분석할 수 없었으므로, 그 가능성은 완전히 배제할 수는 없었다. 본 연구의 결과에서는 verapamil의 세포내 MIBI와 TF 섭취 저하 효과는 MDR이 발현되지 않은 세포에서만 관찰되었고 MDR 발현 K562(Adr)세포에서는 MTT assay상 50% 이상의 세포생존도가 유지된 농도 이하에서는 세포내 MIBI와 TF의 섭취를 증가시켰으므로

MDR세포의 진단과 약제내성 그 극복능의 평가에는 유용하게 이용할 수 있으리라 생각된다. 그러나 향후 더 많은 종류의 세포에서 이러한 연구가 이루어져야 확실한 결론을 내릴 수 있으리라 판단된다.

Verapamil의 MIBI와 TF의 섭취에 영향을 미치는 기전은 여러 가지가 관련될 것으로 추측되고 있다. 세포내 칼슘이나 다른 이온의 농도의 변화에 기인하거나, verapamil의 세포내 농도 증가로 세포질이나 미토콘드리아등에 비치명적인 손상이 진행되어 나타날 수 있다. 그 정도는 암세포 종류에 따라 세포대사 정도가 다르고, 약제에 대한 세포의 반응이 다르므로 차이가 있을 수 있을 것이다.^{4,6)} Verapamil이 세포의 증식과 분열에 중요한 역할을 하는 protein kinase-C (PKC)의 발현에 영향을 미치며, PKC를 억제하는 약제에 저항성을 가지는 암세포는 다약제내성의 성질을 가진다는 보고가 있었고, verapamil이 PKC 효소의 아형에 변화를 일으켜서 약제내성이 발생할 수 있다는 연구도 있었다.^{7,26)} 인체 망막색소세포에서 verapamil을 처리하였더니 1-2시간 내에 PKC의 활성도가 감소하였고, 세포의 증식과 유주(migration)가 억제되었다는 보고도 있었다. PKC 효소를 활성화시킨다고 알려진 TPA는 K562세포를 거핵구(megakaryocytic cell)로의 분화를 유도하며, 세포질에 있던 PKC α, -βⅡ를 세포막으로 이동시킨다고 한다. Pgp이 작용을 나타내기 위하여 필요한 인산화 과정에는 PKC가 관련되어 있고, Pgp의 작용에 연관된 ATPase의 활성을 증가시켜 준다. 또한 Pgp는 다약제내성에 관련되는 것 뿐만 아니라 ATP 통로로서도 작용하는데, Pgp가 증가된 암세포는 증가된 정도에 따라 ATP를 세포질내로 배출시켜주는 것으로 미루어보아 Pgp는 ATP 통로로 작용한다고 생각된다.²⁷⁾ 그러나 본 연구에서는 4가지 종류의 암세포에서 verapamil을 1시간까지 처리하여도 PKC 활성도나 효소아형에 분포에 변화가 관찰되지 않아 이들의 결과를 확인할 수가 없었으므로 PKC 발현의 차이가 verapamil에 의한 MIBI나 TF의 섭취의 차이를 설명할 수 있는 원인이라고 추측하기는 어려웠다.

그러나 저자들의 제한된 연구로는 verapamil의 세포증식효소에 대한 전체적인 역할을 구명할 수 없었으므로 보다 전문적이고 추가적인 연구 결과가 있어야 할 것이다.

Verapamil의 작용기전에 관한 또 다른 가설은 세포막의 verapamil에 대한 투과성에서 차이에 의하여 세포내 verapamil의 농도가 감소하여 나타날 수 있는 현상이라고 추측할 수 있으나, Tunggal 등²⁸⁾이 보고한 바와 같이 verapamil은 일반적으로는 여러 종의 세포가 존재하는 조직에서도 세포막을 잘 투과한다고 알려져 있어 세포의 종류에 따른 verapamil의 농도에 차이가 나서 이러한 현상이 관찰되었을 가능성은 낮다고 하겠다.

최근 암세포의 MIBI 섭취 감소는 Bcl-2 단백질의 과발현과 연관되어 있다는 보고가 되었다.²⁹⁾ Bcl-2 계열의 단백질은 미토콘드리아 막의 투과성을 변화시켜 세포가 죽는 과정과 밀접한 연관성이 있다고 한다. Bcl-2 계통 단백질에는 세포사망을 억제하는 Bcl-2, Bcl-X_L 등과 세포사망을 촉진시키는 Bax, Bak, Bid와 Bad등이 있으며 세포고사를 억제하는 단백질인 Bcl-2의 과발현은 암세포의 항암치료시 약제저항의 원인이 되고 있다.³⁰⁾ 그러므로 본 연구에서 관찰한 바와 같이 세포에 따른 차이는 지금까지 생각하지 못하였던 다양한 기전이 관련되어 나타날 수 있다는 점도 생각하여야 할 것이다.

본 연구에서 관찰된 결과는 임상적으로 여러 면에서 중요한 의미를 지니고 있다. MDR의 진단 시 또는 verapamil이나 그 유도체를 이용한 MDR 극복효과를 평가할 때 verapamil을 처치에 따른 MIBI와 TF의 섭취 정도를 기준으로 하는 경우에는, verapamil의 농도와 세포의 종류에 따라 그 결과가 현저하게 다를 수 있다는 점을 고려하여야 한다는 점을 제시한다. 또한 verapamil은 임상에서 가장 많이 사용되고 있는 칼슘통로 차단제이고, 고혈압과 혀혈성 심질환의 치료, 상심실성 빈맥성 부정맥의 치료제등으로 광범위하게 사용되고 있으므로, 여러 종류의 악성종양의 진단과 평가 시에 Tc-99m MIBI와 TF 영상이 이용될 경우에 위음성 소견을 나타낼 수 있어 verapamil를 복용하고

있는 환자에서는 이러한 점들을 반드시 염두에 두고 영상을 판독하여야 할 것이다.

요약

목적: 다약제내성(MDR) 극복제 verapamil은 MDR이 발현된 암세포에서 Tc-99m MIBI(MIBI)와 tetrofosmin(TF)의 섭취를 증가시키는 것으로 알려져 있으나, 세포의 종류에 따라서는 MIBI와 TF의 섭취를 감소시킬 수 있다는 보고가 있다. 본 연구는 암세포의 종류에 따라 verapamil이 MIBI와 TF의 섭취에 미치는 영향이 세포에 따른 차이가 있는지를 알아보고, 이러한 차이가 세포독성이나 PKC효소의 발현에 따른 차이인가를 알아보았다.

방법: 백혈병세포 K562세포와 유방암세포 MCF7, 난소암세포 SK-OV-3 세포 및 MDR이 유발된 K562(Adr)세포를 배양하였다. 시험관에서 1×10^6 cells/ml 농도의 single-cell suspension 상태로 분주하고 verapamil을 1, 10, 50, 100, 200 μM 의 농도로 처리한 후 MIBI와 TF를 배양한 후, 37°C에서 1, 15, 30, 45, 60분 동안 반응시킨 후 pellet과 supernatant의 방사능 치를 감마계수기로 측정하여 투여한 방사능 치에 대한 세포내 섭취백분율을 표시하였다. Verapamil의 세포독성은 MTT assay로 측정하였고, 세포내의 PKC isotypes의 변화는 western blotting analysis로 평가하였다. 결과: 4종류의 세포 모두에서 MIBI와 TF의 섭취는 1, 15, 30, 45, 60분 배양 시간에 따라 증가하였다. verapamil을 처리시 다약제 내성이 유발된 K562(Adr)세포에서 100 μM 의 농도까지는 MIBI와 TF 섭취가 증가하였고, 최대 50 μM 에서 10배 증가하였다. 그러나 K562세포를 verapamil 1 μM 로 처리하였을 때는 기저치와 유사하였으나, verapamil의 농도가 증가함에 따라 MIBI와 TF의 세포섭취는 모두 감소하였다. K562세포의 60분 MIBI 섭취율은 79%(10 μM), 47%(50 μM), 29%(100 μM), 1.5%(200 μM)로 verapamil의 용량이 증가함에 따라 감소하였으며, TF 섭취율도 84%(10 μM), 60%(50 μM), 42%(100 μM), 2.7%(200 μM)로 감소하였다. MCF7, SK-OV-3세포에서는

verapamil 10 μM까지는 MIBI와 TF의 섭취가 기저치와 유사하거나 소량 증가하였으나 50 μM이상의 용량에서는 감소하여 100 μM에서는 각각 40%와 5%만 섭취되었다. MTT assay상 K562(Adr)세포에서는 verapamil 100 μM 이상에서는 유의하게 낮았으나 다른 세포는 200 μM까지에도 차이가 없었다. PKC 아형의 분석상 PKC ε이 K562(Adr)세포에서 많이 발현되었으나, K562와 K562(Adr)세포에서는 verapamil처리에 따른 PKC 아형의 변화는 없었다. 결론: Verapamil은 암세포의 종류에 따라 MIBI와 TF의 섭취를 감소시켰고, 고용량에는 MDR 세포의 섭취도 감소시켰으며 이러한 현상은 세포독성이나 PKC효소 아형과는 관련이 없었다. 그러므로 MDR의 진단시 verapamil을 처치에 따른 MIBI와 TF의 섭취 정도를 기준으로 하는 경우에는, verapamil의 농도와 세포의 종류에 따라 현저한 차이가 있을 수 있다는 점을 생각하여야 한다.

참고문헌

- 1) 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.
- 2) Hendrikse NH, Franssen EJF, van der Graaf WTA, Vaalburg W, de Vries EGE. Visualization of multidrug resistance in vivo. *Eur J Nucl Med* 1999;26:283-93.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Lee J. Functional imaging of the multidrug resistance in vivo. *Korean J Nucl Med* 2001;35:66-75.
- 6) Rodrigues M, Kalinowska W, Zielinski C, Sinzinger H. Verapamil decreases accumulation of ⁹⁹Tc^m-MIBI and ⁹⁹Tc^m-MIBI-tetrofosmin in human breast cancer and soft tissue sarcoma cell lines. *Nucl Med Comm* 2001;22:645-50.
- 7) Zheng B, Chambers TC, Raynor RL, Markham PN, Gebel MW, Vogler WR, et al. Human leukemia K562 cell mutant (K562/OA200) selected for resistance to okadaic acid (protein phosphatase inhibitor) lacks protein kinase C-ε, exhibits multidrug resistance phenotype, and expresses drug pump P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1994;269:12332-8.
- 8) Hardy SP, Goodfellow HR, Valverde MA, Grill DR, Sepulveda V, Higgins CF. Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J* 1995;14:68-75.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
 - 16) Rodrigues M, Chehne F, Kalinowaka W, Zielinski C, Sinzinger H. Comparative ^{99m}Tc-MIBI, ^{99m}Tc-tetrofosmin and ^{99m}Tc-furifosmin uptake in human soft tissue sarcoma cell lines. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1839-43.
 - 17) Yoo JA, Chung SY, Seo MR, Kwak DS, Ahn BC, Lee KB, et al. Comparison of uptakes of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin in cancer cell lines expressing multidrug resistance. *Korean J Nucl Med* 2003;37:178-89.
 - 18) Soderlund V, Larsson SA, Bauer HCF, Brosjo O, Larsson O, Jacobson H. Use of ^{99m}Tc-MIBI scintigraphy in the evaluation of the response of osteosarcoma to chemotherapy. *Eur J Nucl Med* 1997;24:511-5.
 - 19) Ballinger JR. Imaging multidrug resistance with radiolabeled substrates for P-glycoprotein and multidrug resistance protein. *Cancer Biother Radiopharm* 2001;16:1-7.
 - 20) Ding HJ, Shiao 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.
 - 21) Sikik BI. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Semin Hematol* 1997;34:40-7.
 - 22) Kim JK, Lee J, Lee BH, Choi SU, Lee SW, Chun KA, et al. Reversal of multidrug resistance with KR-30035: Evaluation with biodistribution of Tc-99m MIBI in nude mice bearing human tumor xenografts. *Korean J Nucl Med* 2001;35:168-84.
 - 23) Chun KA, Lee J, Lee SW, Kang DY, Sohn SK, Lee JK, et al. Effect of multidrug resistance gene-1 (*mdrl*) overexpression on in-vitro uptake of ^{99m}Tc-sestamibi in murine L1210 leukemia cells. *Korean J Nucl Med* 1999;33:152-62.
 - 24) Piwnica-Worms D, Rao VV, Krounang JF, Croop JM. Characterization of multidrug resistance transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
 - 25) 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.
 - 26) Murray NR, Baumgardner GP, Burns DJ, Fields AP. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 1993;268:15847-53.
 - 27) Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Krarmer R, et al. The multidrug resistance (*mdrl*) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:312-6.
 - 28) Tunggal JK, Melo T, Ballinger JR, Tannock IF. The influence of expression of P-glycoprotein on the penetration of anticancer drugs through multicellular layers. *Int J Cancer* 2000;86:101-7.
 - 29) Del Vecchio S, Zannetti A, Aloj L, Caraco C, Ciarmiello A, Salvatore M. Inhibition of early ^{99m}Tc-MIBI uptake by Bcl-2 anti-apoptotic protein overexpression in untreated breast carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:879-87.
 - 30) Cory S, Adams JM. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-56.